

# Die Funktion von Membranlipidnanodomänen für Signaltransduktionsprozesse in Pflanzen



Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Vorgelegt von:

**Claudia Brigitte Horntrich**

Geboren in Dresden

Würzburg 2014



# Prüfungskommission

Eingereicht am: 18.09.2014

Vorsitzender: Prof. Dr. Markus Engstler

1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Hedrich

2. Gutachter: Prof. Dr. Gregory Harms

Tag des Promotionskolloquiums: \_\_\_\_\_

Doktorurkunde ausgehändigt am: \_\_\_\_\_



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Die Plasmamembran	1
1.1.1	Modelle und ihre Relevanz	1
1.1.2	Aufbau und Struktur	6
1.1.3	„Lipid Rafts“ und Membrandomänen	7
1.1.3.1	Biophysikalische Methoden zur Detektion und Charakterisierung von Membrandomänen: Erfolge, Limitationen und Herausforderungen	
1.1.3.2	Phytosterole in Modellmembranen	11
1.1.3.3	Detergenzunlöslichkeit	12
1.1.3.4	Größe und Dynamik von Membrandomänen	12
1.1.3.5	Die Manipulation der Membrandomänen: Strategien und Funktionen	15
1.1.3.5.1	Destabilisierung der Membrandomänen durch die Manipulation der Sterolkonzentration	15
1.1.3.5.2	Destabilisierung der Membrandomänen durch die Manipulation der Spingolipidkonzentration	16
1.1.3.6	„Lipid Rafts“ in Hefe	16
1.1.3.6.1	Zellpolarisation und stabile Membrandomänen	17
1.1.4	Lipid- und Proteinmodifikationen	18
1.1.4.1	Myristoylierung	18
1.1.4.2	Palmitoylierung	20
1.1.4.3	Prenylierung	20
1.1.4.4	GPI-Anker	21
1.1.4.5	Übersicht	22
1.1.4.6	Lipidmodifikationen in Pflanzen	23
1.1.4.7	„Lipid Rafts“ in Tieren	24
1.1.4.7.1	„Lipid Rafts“ und Krankheiten	25
1.1.4.7.1.1	Viren ohne Hülle	25
1.1.4.7.1.2	Viren mit Hülle	26
1.1.4.7.2	„Raft“-Größe	26
1.1.4.7.3	Caveolae	27
1.1.4.8	„Lipid Rafts“ in Pflanzen	29
1.1.4.8.1	Die pflanzliche Plasmamembran	30
1.1.4.8.2	Organisierung der pflanzlichen Plasmamembran	31
1.1.4.8.3	Formation von Membrandomänen als Antwort auf die Interaktion mit Mikroorganismen	32
1.1.4.8.4	Der Stand der bisherigen DRM-Forschung	33
1.1.4.8.5	Membrandomänenmarker	35
1.2	Die Signalwege	39
1.2.1	ABA-Signalwege	39
1.2.1.1	ABA-Biosynthese, -Funktion und -Transport	39
1.2.1.2	Kurzfristige physiologische ABA-Einflüsse - Der Stomaschluss	41
1.2.1.2.1	ABA-Rezeptoren und die ABA-Signalkaskade	43

1.2.1.2.2	Die Rolle von Phosphatasen in der ABA-Antwort	44
1.2.1.2.3	Die Rolle von Kinasen in der ABA-Antwort	45
1.2.1.2.3.1	Calcium-abhängige Kinasen	45
1.2.1.2.3.2	Calcium-unabhängige Kinasen	47
1.2.1.2.4	Phosphorylierungsziele der ABA-aktivierten Kinasen	54
1.2.1.2.4.1	Anionenkanäle	54
1.2.1.2.4.2	NADPH-Oxidasen	57
1.3	Ziel dieser Arbeit	65
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>67</b>
2.1	Molekularbiologie	67
2.1.1	Bakterienkultivierung	67
2.1.1.1	<i>Escherichia coli</i> MRF'	67
2.1.1.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	67
2.1.2	DNA-Transformation	68
2.1.2.1	Transformation von MRF'	68
2.1.2.2	Transformation von GV3101	68
2.1.3	Gelelektrophorese von Nucleinsäuren	69
2.1.3.1	Analytische DNA-Gelelektrophorese	69
2.1.3.2	Präparative DNA-Gelelektrophorese	70
2.1.3.3	RNA-Gelelektrophorese	70
2.1.4	DNA-Aufreinigung	71
2.1.4.1	DNA-Miniprep	71
2.1.4.2	DNA-Midiprep	72
2.1.5	DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen	72
2.1.6	DNA-Quantifizierung	72
2.1.7	DNA-Sequenzierung	73
2.1.8	Primerdesign	73
2.1.9	PCR-Amplifikation	73
2.1.10	Kolonie-PCR	74
2.1.11	USER-PCR	75
2.1.12	IVT-PCR	75
2.1.13	PCR-Profile	75
2.1.14	<i>In vitro</i> -Transkription	76
2.1.15	USER-Reaktion	77
2.1.16	Restriktionsverdau	78
2.1.17	Konventionelle Klonierung	78
2.2	Pflanzenanzucht	79
2.2.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	79
2.2.2	<i>Nicotiana benthamiana</i>	79
2.3	Transiente Expression in <i>Arabidopsis thaliana</i> -Protoplasten	79
2.3.1	Isolierung von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Protoplasten	79
2.3.2	DNA-Transfektion	80
2.4	Transiente Expression in <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten	81
2.4.1	RNA-Mikroinjektion und heterologe Proteinexpression in Oozyten	81
2.5	Transiente Expression in HEK293-Zellen	82
2.5.1	HEK293-Zellkultivierung	82

2.5.2	HEK293-Zellsubkultivierung	83
2.5.3	DNA-Transfektion	83
2.5.4	Lyse und Isolierung der mikrosomalen Endomembranfraktion	84
2.6	Partikelbombardement	85
2.6.1	Präparation der Wolframpartikel	85
2.6.2	Beschichtung der Wolframpartikel	86
2.6.3	Transiente Transformation mittels Partikelbombardement	86
2.7	Transiente Expression in <i>Nicotiana benthamiana</i>	86
2.7.1	Aktivierung von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	87
2.7.2	Transiente Transfektion mittels <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	87
2.8	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	88
2.8.1	Lokalisierungs- und Koloalysierungsexperimente	88
2.8.2	Interaktionsexperimente	89
2.8.2.1	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)	89
2.8.2.2	„Sensitized Emission“-Förster-Resonanzenergietransfer (SE-FRET)	90
2.8.2.3	„Acceptorbleaching“-Förster-Resonanzenergietransfer (AB-FRET)	91
2.8.3	„Fluorescence Recovery after Photobleaching“ (FRAP)	92
2.9	Quantitative Messung reaktiver Sauerstoffspezies	93
2.9.1	Peroxidase-katalysierte Luminol-Chemolumineszenztechnik	93
2.10	Proteinbiochemie	94
2.10.1	Proteingelelektrophorese	94
2.10.1.1	Probenvorbereitung	95
2.10.1.2	SDS-PAGE	95
2.10.1.3	Gel Visualisierung	96
2.10.2	Western-Blot	97
2.10.2.1	Transfer	97
2.10.2.2	Antikörperdetektion	98
2.10.3	Proteinquantifizierung/ BCA-Methode	98
2.11	Membranisolierung	99
2.11.1	Homogenisierung des Pflanzenmaterials	99
2.11.2	Isolierung der mikrosomalen Endomembranfraktion	100
2.11.3	Plasmamembranisolierung	100
2.11.4	DRM-Isolierung	101
2.11.4.1	Sterolreduktion mittels MCD	101
2.11.4.2	Detergenzbehandlung	102
2.11.4.3	Zentrifugation über einen Saccharosegradienten	102
2.11.4.4	Fraktionierung des Saccharosegradienten	103
2.12	Verwendete Klonierungsvektoren	103
2.13	Verwendete Proteine	104
2.14	Verwendete statistische Methoden	105
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>107</b>
3.1	Die Identifizierung von Signalkomplexen in Membrandomänen von <i>Arabidopsis thaliana</i> - Calcium-abhängige Kinasen	107
3.1.1	Identifizierung und Lokalisierung von sterolabhängigen Membranproteinen - CPK21 und ABI1	107

3.1.2	Die Interaktion von CPK21 mit SLAH3 ist abhängig von ABA	110
3.2	Identifizierung und Lokalisierung von sterolabhängigen Membranproteinen - Die NADPH-Oxidase AtrbohD	119
3.2.1	Die Diversität von Membrandomänen in <i>Arabidopsis thaliana</i>	123
3.2.2	Identifizierung eines Interaktionspartners für die Oxidase AtrbohD	130
3.2.3	Funktionelle Analyse der AtrbohD-Snrk-Interaktion	139
3.2.3.1	Snrk2.7 aktiviert AtrbohD	143
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	149
4.1	Membrandomänenmarker	150
4.1.1	Die AtRemorine sind Membrandomänenmarker	150
4.2	Signalproteine in den pflanzlichen DRMs	155
4.2.1	Die Membrandomänen-lokalisierten Proteine ABI1 und CPK21 regulieren den Anionenkanal SLAH3	155
4.2.1.1	Regulierung des Stomaschlusses	155
4.2.1.2	SLAH3, CPK21 und ABI1 sind in Membrandomänen lokalisiert	157
4.1.3	Die membranständige Kinase Snrk2.7 aktiviert die NADPH-Oxidase AtrbohD	159
4.1.3.1	Snrk2.7 und OST1 interagieren mit AtrbohD	161
4.1.3.2	Snrk2.7 aktiviert AtrbohD	164
4.1.3.3	Ihre Lokalisierung in Membrandomänen beeinflusst die Funktion der NADPH-Oxidase AtrbohD negativ	166
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	173
	<b>Summary</b>	175
	<b>I – Literaturverzeichnis</b>	177
	<b>II – Tabellen und Abbildungen</b>	223
	<b>III – Plasmidkarten</b>	227
	<b>IV – Kontrollmessungen</b>	247
IV.1	der eine Interaktion beschreibende $E_{\text{FRET}}$ -Wert	247
IV.2	Bestimmung des DNA-Verhältnisses zur Kotransfektion von HEK-Zellen	252
IV.3	SE-FRET in HEK-Zellen	253
	<b>V – Abkürzungsverzeichnis</b>	257
	<b>VI – Begriffserklärung</b>	261
	<b>VII – Publikationsverzeichnis</b>	267
	<b>VIII – Lebenslauf</b>	269
	<b>Erklärung</b>	
	<b>Danksagung</b>	

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Plasmamembran

---

Die kleinste eigenständig lebensfähige Einheit eines jeden Lebewesens ist die Zelle. Davon ausgehend unterscheidet man Einzeller, also Lebewesen, die nur aus einer einzigen Zelle bestehen und Mehrzeller, Lebewesen, die aus mehreren Zellen bestehen. Zu letzterem gehören die Vielzeller, bei denen sich mehrere Zellen gleicher Art zu einer funktionellen Einheit, einem Gewebe, verbinden können. Besagte Zellen sind eigenständige, sich selbsterhaltende, nach außen hin strukturell abgrenzbare Systeme, die in der Lage sind, Informationen über ihre Umwelt und Nährstoffe aufzunehmen und für sich selbst nutzbar zu machen. Sowohl die strukturelle Abgrenzung, von als auch die Verbindung zur Umwelt nach außen, wird über die Zellmembran bewerkstelligt. Die Zellmembran, auch Plasmamembran (PM) genannt, erfüllt grundlegende Funktionen, die die Integrität der Zelle gewährleisten. Darüber hinaus ermöglicht sie den Stofftransport durch Endo- und Exozytose, sowie den über aktive und passive Transportvorgänge. Ebenso werden über Rezeptoren externe Reize von Hormonen und Elicitoren, sowie pH-Änderungen wahrgenommen. Dadurch ist es der Zelle möglich, jederzeit Informationen über ihre Umwelt aufzunehmen und entsprechend darauf zu reagieren, z.B. durch eine Anpassung des Stoffwechsels oder die Freisetzung von bestimmten Signalmolekülen. Diese und auch andere essentielle Prozesse, wie Zellteilung und Zellwachstum sind stark von Aufbau und Struktur der Plasmamembran abhängig.

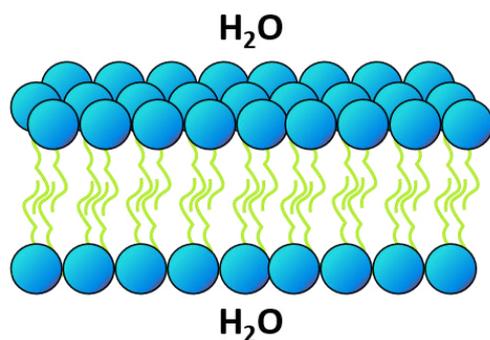
### 1.1.1 Modelle und ihre Relevanz

In seiner 1877 erschienenen Arbeit beschreibt der deutsche Botaniker Wilhelm Pfeffer seine selbst entwickelte Vorrichtung zur Messung des osmotischen Druckes von Flüssigkeiten und Lösungen. Diese Apparatur benannte man nach ihm als „Pfeffersche Zelle“. Damit führte er zahlreiche Messungen durch, um „die oft sehr hohen hydrostatischen Druckkräfte in Pflanzenzellen kennen zu lernen“ (*Osmotische Untersuchungen - 8. Diösmose gelöster Körper*, S. 47). Im Zuge seiner Untersuchungen begriff er die Notwendigkeit einer osmotischen Barriere, die den Protoplasten der pflanzlichen Zelle umgeben muss, um das Membranpotential und somit Stoff- und Ladungsgradienten aufrecht zu erhalten. Diese Barriere nannte er Plasmamembran. Damit gilt Wilhelm Pfeffer als der Begründer der Membrantheorie. Die weiteren Entwicklungen auf diesem Gebiet, sowie auch in anderen Bereichen der Biologie, gehen einher mit der Entwicklung der Theorie der Thermodynamik.

Ein weiterer wichtiger Name in der Entwicklung des Membrankonzeptes ist Charles Ernest Overton. Er untersuchte die osmotischen Eigenschaften von Zellen und stellte fest, dass die Permeabilität von Molekülen durch Membranen mit ihrem jeweiligen Abstoßungskoeffizienten in Wasser und Lipiden zusammenhängt. Aus diesen Erkenntnissen leitete er die Theorie ab, dass die Membran, die die lebenden Zellen umgibt, zum Teil die Eigenschaften von Lipiden haben muss (Overton, 1895).

Im Jahr 1917 erschien eine Arbeit von Irving Langmuir, in der dieser sein Konzept von einer „Monolage“ (eine Schicht organischer Moleküle, die von einer Flüssigkeit auf ein festes Substrat übertragen wird) beschreibt. Mit Hilfe dieser zweidimensionalen, molekularen Oberflächenfilme, erkannte er, dass sich bestimmte polare Gruppen in Lipidmolekülen in Richtung des Wassers ausrichten, während die enthaltenen Hydrocarbonketten lediglich eine Affinität untereinander haben und so das Molekül wasserunlöslich machen.

Ein von Langmuir für dessen Experimente speziell entwickeltes Gerät, die Filmwaage (auch „Langmuir-Trog“), fand 1924 in den Experimenten von Evert Gorter und François



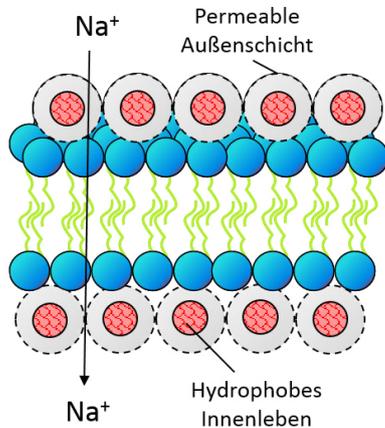
**Abbildung 1.1: Modell der Plasmamembran nach Gorter und Grendel (1925)**

Die polaren Kopfgruppen sind in blau dargestellt und die unpolaren Hydrocarbonketten in grün.

Grendel erneut Verwendung. Sie extrahierten und analysierten die Lipide aus roten Blutkörperchen verschiedener Organismen und fanden heraus, dass die Oberfläche der Monolage genau zweimal so groß war wie die der Zellen. Daraus schlossen sie, dass die Plasmamembran aus zwei Lipidschichten besteht, deren polare Kopfgruppen in Richtung des umgebenden wässrigen Mediums orientiert sind (Gorter und Grendel, 1925). Und obwohl sie in ihrem Modell (Abbildung 1.1) den großen Proteinanteil der Membran völlig außer Acht ließen, prägte dieses Bild der so genannten „Lipiddoppelschicht“ die heutige Vorstellung der Plasmamembran.

Das erste Modell einer Biomembran, das sich auch mit den dazugehörigen Proteinen beschäftigt, stammt von Jim Danielli und Hugh Davson. 1935 schlugen sie vor, dass eine Lipiddoppelschicht mit einer weiteren Schicht aus Proteinen assoziiert ist (Abbildung 1.2). Dabei stellten sie sich die angelagerten Proteine mit hydrophobem Innenleben und einer wasserhaltigen und somit permeablen Außenschicht vor. Weiterhin nahmen sie an, dass die Plasmamembran aufgrund ihres amphiphilen Charakters ebenfalls Wasser enthalten müsse und dadurch der Ionentransport über die Membran bewerkstelligt wird. Dieses Membranmodell, wird auch als „Einheitsmembranmodell“ bezeichnet. Danielli und Davson schlossen jedoch die Möglichkeit nicht aus, dass einige Proteine die Membran

auch durchspannen könnten, so dass die Plasmamembran als ein „Mosaik“ an protein- und lipidreichen Regionen anzusehen ist. Da zu diesem Zeitpunkt aber noch die experimentellen Möglichkeiten fehlten um dies zu beweisen, taucht der Begriff „Mosaik“ im Zusammenhang mit der Plasmamembran erst 37 Jahre später wieder auf.

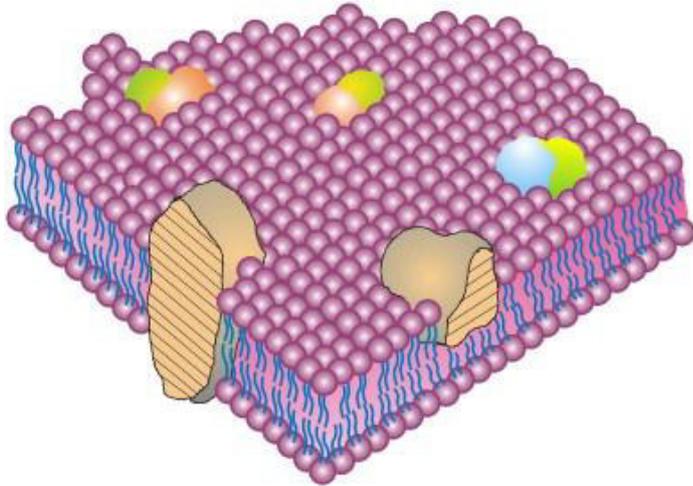


**Abbildung 1.2: Modell der Plasmamembran nach Danielli und Davson (1935)**

Die hydrophoben Hydrocarbonketten (grün) stehen sich gegenüber, die polaren Köpfe (blau) sind von Proteinen überzogen.

Bis 1935 waren die meisten Daten über die Struktur der Plasmamembran nur indirekt gewonnen worden. Die Lichtmikroskopie ist mit einer optischen Grenze von über 200nm nicht geeignet, eine biologische Membran mit einer Stärke zwischen sechs und zehn Nanometer auf ihre biomolekulare Struktur hin zu untersuchen. Dies änderte sich erst mit den Fortschritten auf dem Gebiet der Elektronenmikroskopie. J. David Robertson nutzte diese, in den 50ern optimierte Technik und veröffentlichte 1959 ein Membranmodell, welches großteils denen von Gorter und Grendel (1925) und Danielli und Davson (1935) entsprach. Er beschreibt und vergleicht weiterhin die Membranstrukturen von verschiedenen Zellorganellen und schlussfolgert, dass alle biologischen Membranen nach einem ähnlichen Prinzip aufgebaut seien.

In den 1960er Jahren waren bereits die Strukturen einiger löslicher Proteine mittels Röntgenkristallographie aufgeklärt worden. Auf diese Weise fand man unter anderem heraus, dass viele Membranproteine einen hohen  $\alpha$ -helikalen Anteil besitzen und diese  $\alpha$ -Helices wiederum hydrophobe Aminosäuren enthalten. Aus diesen Sachverhalten schlossen Seymour J. Singer und Garth L. Nicholson, dass einige Proteine Membranen durchspannen können. Auf der Basis dieser Erkenntnisse resultiert das berühmte Singer-Nicholson-Modell, besser bekannt unter dem Namen „Flüssigmosaikmodell“ (Singer und Nicholson, 1972). Dieses Modell kann wie folgt zusammengefasst werden: Biomembranen bestehen aus Lipiden und Proteinen. Diese Proteine können in zwei Hauptklassen eingeteilt werden. Die peripheren Proteine sind nur lose mit der Membranoberfläche verbunden und können einfach davon gelöst werden. Integrale Proteine hingegen können nicht so einfach von der Membran abgelöst werden, da sie diese durchspannen. Sie stellen den Hauptanteil der Membranproteine dar. Die Membran selbst ist eine Doppelschicht aus Lipiden (Abbildung 1.3).



**Abbildung 1.3: Modell der Plasmamembran nach Singer und Nicholson (1972)**

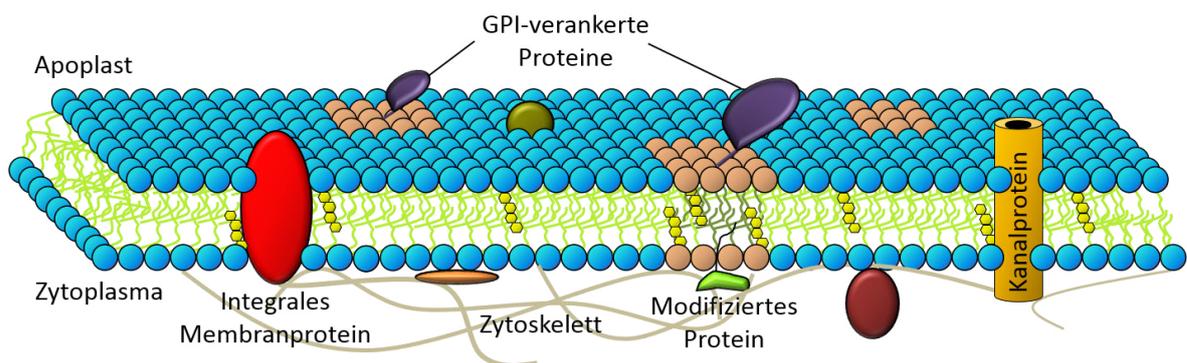
Das „Flüssigmosaikmodell“ zeigt die Lipiddoppelschicht und globuläre Proteine, die die Membran entweder durchspannen oder ihr angelagert sind. Das Modell beinhaltet keine der anderen mit der Membran assoziierten Strukturen. (© Elsevier; Singer und Nicholson, 1972)

Singer und Nicholson stellten weiterhin fest, dass einige Membranproteine mit den umgebenden Lipiden zu interagieren scheinen und die Funktion einiger Proteine von der Anwesenheit spezifischer Lipide abhängig sein könnte. Weiterhin postulierten sie, dass sich die Lipide der Lipidmembran biologischer Zellen in einem flüssigen Stadium befinden und sich somit Proteine frei darin bewegen können. Zu diesem Sachverhalt veröffentlichten L. D. Frye und Michael Edidin bereits 1970 einen Versuch, in dem sie zwei verschiedene Zellen mit unterschiedlicher Proteinausstattung miteinander fusionierten und so zeigen konnten, dass sich die Proteine nach 40 Minuten wieder über die gesamte Membranoberfläche verteilten. Dieser Versuch untermauert die von Singer und Nicholson aufgestellte Theorie von frei diffundierenden Proteinen innerhalb der Zellmembranen. Sie merkten ebenfalls an, dass die „Flüssigmosaikmembran“ wahrscheinlich asymmetrisch ist und sich zusätzliche Strukturen auf der Außenseite, wie auch auf der Innenseite der Membran anlagern.

Die Asymmetrie der Membran wurde tatsächlich später in einigen Experimenten bestätigt (Rothman und Lenard, 1977 und Rothman und Kennedy, 1977). Das „Flüssigmosaikmodell“ von Singer und Nicholson beruhte vorwiegend auf Analysen der thermodynamischen Prinzipien sich selbst organisierender Membranlipide und Proteine, sowie der verfügbaren Informationen über Asymmetrie und laterale Mobilität in der Membranmatrix. Bis heute ist es das am weitesten akzeptierte Modell der biologischen Zellmembran und es wird noch immer genutzt, um die grundlegenden Strukturen in intrazellulären Membranen und Zellmembranen von pflanzlichen, tierischen und niederen Lebensformen zu beschreiben (Nicholson, 2013). Im Laufe der letzten Jahre erfuhr dieses Modell dennoch einige Verfeinerungen, um neue Erkenntnisse mit einzubeziehen, die vor allem extra- und intrazelluläre Mechanismen betreffen, welche die laterale Verteilung von Membrankomponenten beeinflussen. Beispielsweise ist mittlerweile bekannt, dass die laterale Mobilität von Lipiden und Proteinen durch Lipid-Lipid- (Ipsen *et al.*, 1987; Ohvo-Rekila *et al.*, 2002; Aittoniemi *et al.*, 2007), Protein-Protein- (Steck, 1974; Haest, 1982; Mankelov *et al.*, 2012) und Lipid-Protein-

Interaktionen (Mouritsen und Bloom, 1984; Dumas *et al.*, 1999; Mouritsen, 2011) eingeschränkt wird. Weiterhin haben Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktionen, sowie intrazelluläre Membran-assoziierte Protein- und Zytoskelett-Interaktionen einen Einfluss auf den Umfang der Mobilität von bestimmten Membrankomponenten (Nicolson 1976; Webb *et al.*, 1981; Jacobson *et al.*, 1987; Edidin *et al.*, 1991). Vor allem die Interaktion zwischen Lipiden, wie Cholesterol oder anderen Sterolen und Sphingolipiden, sowie die damit einhergehende Etablierung von spezialisierten Domänenbereichen, wie den „Lipid Rafts“, spielt eine wichtige Rolle für die gezielte Anordnung und Ausrichtung von Membranproteinen (Simons und van Meer, 1988; Edidin, 2003; Simons und Vaz, 2004; van Meer *et al.*, 2008; Bagatolli *et al.*, 2010).

Als das „Flüssigmosaikmodell“ zum ersten Mal vorgestellt wurde, unterschied man nur zwischen integralen Membranproteinen, die in die hydrophobe Membranmatrix integriert und somit fest mit dieser verbunden sind, und peripheren Proteinen. Diese sind relativ locker über elektrostatische, oder andere nicht-hydrophobische Wechselwirkungen an die hydrophilen Bereiche der Membran gebunden. Bereits 1976 wurde eine weitere Gruppe von Membranproteinen identifiziert. Diese Membran-assoziierten Proteine sind an der Membranninnenseite angelagerte, oft mit dem Zytoskelett assoziierte und häufig modifizierte Signalproteine, oder an der apoplastischen Membranseite gebundene Glykoproteine (Nicolson, 1976). Im Grunde ist jede biologische Membran (Abbildung 1.4) stark organisiert, und extrem dicht von zahlreichen assoziierten Proteinen, Lipiden, Sacchariden und anderen Strukturen besetzt. Sie ist in der lateralen Diffusion ihrer Komponenten durch die Formation von Lipiddomänen, auch „Lipid Rafts“ genannt, und membranintegralen Glykoproteinkomplexen eingeschränkt. Ebenso ist sie auf ihrer Innenseite direkt oder indirekt mit Elementen des Zytoskelettes verbunden (Nicolson, 2013).



	Phospholipid		Peripheres Protein
	Sphingolipid		Oberflächenprotein
	Sterole		Globuläres Protein

**Abbildung 1.4: Adaptiertes „Flüssigmosaikmodell“ nach Singer und Nicolson.**

Mit Informationen über Membrandomänen (rosa) und die Membran-assoziierten zytoskelettalen (grau) und extrazellulären Strukturen.

### 1.1.2 Aufbau und Struktur

Die Plasmamembran ist eine biologische Membran, genauer gesagt eine Lipiddoppelschicht mit einer Stärke von sechs bis zehn Nanometer. Sie umgibt die lebende Zelle, hält deren inneres Milieu aufrecht und besteht aus einer Vielzahl von Lipiden und Proteinen. In den meisten Zelltypen, egal ob in tierischen, pflanzlichen oder pilzlichen Systemen, bilden Phospho- und Sphingolipide, sowie Sterole, die Hauptkomponenten der Plasmamembran. Die Sterole gehen dabei hydrophobe Wechselwirkungen mit den Lipiden ein und stabilisieren so die ansonsten sehr flexible, fast flüssige Struktur der Membran (Yeagle, 1985). Im tierischen System kann Cholesterin, mit bis zu 50mol%, das in der Membran am häufigsten vertretene Sterol sein. Aufgrund seiner Hydrophobizität interagiert die Hydroxylgruppe des Cholesterols mit dem polaren Phosphatrest der Phospho- und Sphingolipide, während die Kohlenwasserstoffkette in der Membran longitudinal zu den nicht-polaren Fettsäuren eingebettet ist. Dadurch werden nicht nur die biochemischen Eigenschaften der Membran stark modifiziert, sondern auch das Verhalten und die Funktion von Proteinen in der Membran verändert (Yeagle, 1991). Da Cholesterin in Pflanzen kaum vertreten ist, spielen andere Sterole, wie Campesterol, oder Sitosterol im pflanzlichen System die Hauptrolle (Kierszniowska *et al.*, 2008). Etwa 30-40mol% der pflanzlichen Plasmamembran bestehen aus diesen Sterolen und weitere 20-35mol% aus Sphingolipiden (van Meer und Lisman, 2002). Phospholipide bilden den Rest der pflanzlichen Plasmamembran (Warnecke und Heinz, 2003).

Biologische Membranen mit einem hohen Anteil an Sterolen und Sphingolipiden zeigen eine stärker geordnete Membranstruktur als andere. Dies wurde in thermodynamischen Studien gezeigt, in denen artifizielle Membranen mit Cholesterin, Sphingomyelin (einem der hauptsächlich im tierischen System vertretenen Sphingolipiden) und Cerebrosiden (eine Gruppe von Glykosphingolipide, die hauptsächlich in tierischem Nervengewebe vorkommen (Raff *et al.*, 1978)) angereichert wurden. Diese Membranen zeigten eine Transition vom Gel-zum Flüssigzustand bei einer wesentlich höheren Temperatur ( $T_m > 40^\circ\text{C}$ ) als Membranen mit einer niedrigeren Konzentration an Cholesterin, Sphingomyelin und Cerebrosiden (Oldfield und Chapman, 1972).

Sphingomyeline und Cerebroside sind komplexe Sphingolipide. Diese stellen eine besondere Verbindungsklasse der Lipide dar und leiten sich, im Gegensatz zu dem auf Glycerin basierenden Phospholipiden, von dem ungesättigten Aminoalkohol Sphingosin ab. Dieser ist über seine Amin-Gruppe amidisch mit einer Acylgruppe, zum Beispiel an Fettsäuren mit einer Länge von 22-26 Kohlenstoffatomen, verbunden (Harder und Simons, 1997). Diese langkettigen Moleküle können mit Sterolen interagieren und somit die Fluidität der Plasmamembran beeinflussen (Slotte, 1999). Weiterhin können Sphingolipide einen Einfluss auf Signalprozesse haben. Zum Beispiel wurde gezeigt, dass die Proteinkinase C durch Sphingolipide gehemmt und somit das Wachstum von Tumoren in epidermalen Zellen begünstigt werden kann (Kischel *et al.*, 1989). Die Diversität von pflanzlichen Sphingolipiden ist wesentlich höher als die in tierischen Plasmamembranen

und wurde bisher noch nicht im Detail analysiert. Hingegen weiß man bereits, dass Sphingolipide, assoziiert mit Sterolen, die Grundlage für die Formation von so genannten „Lipid Rafts“ bilden (London und Brown, 2000). Diese relativ stabilen Kompartimente zeigen durch die starke Assoziation zwischen Sphingolipiden und Sterolen bei physiologischen Temperaturen eine geringere Löslichkeit in nichtionischen Detergenzien (Brown und Rose, 1992). Das bedeutet, dass man „Lipid Rafts“ und die mit ihnen assoziierten Proteine **theoretisch** durch eine entsprechende Detergenzbehandlung von den „Nicht-Raftmembranen“ separieren kann (siehe 2.11, Seite 99). Die so gewonnenen Fraktionen werden als Detergenz-resistente Membranen („Detergent Resistent Membranes“, DRMs), oder auch Membrandomänen bezeichnet und als den „Lipid Rafts“ biochemisch ähnliche Aggregate angesehen (1.1.4.1). Diese Methode wurde bereits mehrfach erfolgreich angewendet, um die Lipid- und Protein-Zusammensetzung von „Lipid Rafts“ zu analysieren (z.B. Foster *et al.*, 2003, Demir *et al.*, 2013). Dadurch konnte man feststellen, dass spezifische Sphingolipide in DRMs angereichert sind (Borner *et al.*, 2005).

In früheren Studien wurde der Sphingolipidgehalt in isolierten DRMs aus *Arabidopsis thaliana* mit und ohne zusätzliche Behandlung mit Methyl- $\beta$ -D-Cyclodextrin (MCD) bestimmt. Mit Hilfe dieses zyklischen Glukoseoligomers, welches in der Sterolmanipulation von Membranen Anwendung findet, konnte gezeigt werden, dass Sphingolipide im Gegensatz zu den Sterolen, kaum durch die MCD-bedingte strukturelle Veränderung der DRMs beeinflusst werden (Demir *et al.*, 2013). Erst der Einsatz von höheren MCD-Konzentrationen kann auch die Anwesenheit und die Verteilung von Phospho- und Sphingolipiden beeinflussen (Sanchez *et al.*, 2011). Auch bestimmte Sterole sind in DRMs angereichert. In pflanzlichen DRMs ist die Quantität der Sterole und auch das Maß ihrer Anreicherung ähnlich wie in tierischen DRMs (Nebl *et al.*, 2002). Das in pflanzlichen DRMs am häufigsten auftretende Sterol ist das  $\beta$ -Sitosterol (Borner *et al.*, 2005). MCD entfernt dabei vorrangig die Sterole aus den, die „Lipid Rafts“ umgebenden, ungeordneten Membranphasen. Erst der Einsatz höherer Konzentrationen von MCD kann auch die Sterole in den „Rafts“ selektiv beseitigen (Sanchez *et al.*, 2011).

### 1.1.3 „Lipid Rafts“ und Membrandomänen

Die Formation von Membrandomänen kann bisher nicht oder nur unzureichend in der Plasmamembran von lebenden Zellen untersucht werden. Benutzt man aber Modellmembranen wie biphasische Doppelschichten, kleine unilamellare Vesikel („Small Unilamellar Vesicles“, SUVs) oder große unilamellare Vesikel („Giant Unilamellar Vesicles“, GUVs), kann man durchaus die fundamentalen Prinzipien, die hinter der Formation von Membrandomänen stehen, erklären und beschreiben. Solche Modellmembranen sind ternäre Systeme und bestehen meistens aus DOPC, einem synthetischen und ungesättigten Phosphocholin, aus Sphingomyelin, stellvertretend für

die Sphingolipide, und aus Cholesterol (Simons und Vaz, 2004). Durch die Möglichkeit Modellmembranen zu untersuchen, konnte festgestellt werden, dass es einige Faktoren gibt, die die Anwesenheit von Membrandomänen beeinflussen. Dazu zählen zum Beispiel die Temperatur und die Lipidzusammensetzung. Die Verwendung solcher ternären Modellmembranen ermöglicht es also, grundlegende Fragestellungen über die Plasmamembran ausführlich biophysikalisch untersuchen zu können.

Die meisten Zellmembranen zeigen eine deutliche Mikroheterogenität, auch Mikrodomänenstruktur genannt. Einige dieser Mikrodomänen sind angereichert mit speziellen Lipiden und Sterolen und somit resistent gegenüber der Solubilisierung mit Hilfe von nicht-ionischen Detergenzien, weshalb man sie auch als Detergenz-unlösliche Glykolipid-angereicherte Membranen („Detergent-insoluble-glykolipid enriched membrane“, DIG) oder als Glykosphingolipid-angereicherte Membranen („glycosphingolipid enriched membrane“, GEM) bezeichnet. Auch die Benennung „Lipid Rafts“ ist gängig (Simons und Ikonen, 1997). Diese Domänenstrukturen formieren sich an der Plasmamembran auf Grund externer Stimuli, oder werden in vorassemblierter Form über den Vesikelverkehr zur Membran transportiert und über Vesikelfusion in diese eingebaut (Simons und Ikonen, 1997; Brown und Rose, 1992).

„Lipid Rafts“ werden als transient molekulare Assoziationen zwischen Lipid- und Proteinkomponenten der Plasmamembran angesehen, wodurch eine dynamische Heterogenität und lokale Ordnung innerhalb der Plasmamembran entsteht (Edidin, 2001). Membrandomänen werden immer entsprechend der Methode, mit der sie detektiert werden, definiert. Eine chemisch basierte Definition beruht auf ihrer Resistenz gegenüber der Solubilisierung mit Hilfe von milden, nicht-ionischen Detergenzien (wie Triton X-100, Brij, etc.). Dadurch erfolgt die Analyse der Zusammensetzung der Membrandomänen dann meist über die Isolierung dieser flotierenden Detergenz-resistenten Membranfraktionen (DRM) via Ultrazentrifugation über einen Saccharosegradienten (siehe 2.11.4.3, Seite 102) und anschließende proteinbiochemische Methoden (siehe 2.10, Seite 94; Brown und Rose, 1992).

Eine weitere Methode der Definition von Membrandomänen erfolgt über die Detektion und Visualisierung mit Hilfe verschiedener hochauflösender Mikroskopietechniken („confocal laser scanning microscopy“, CLSM; „atomic force microscopy“, AFM, „transmission electron microscopy“, TEM und so weiter) an intakten Zellen (Hwang *et al.*, 1998; Vereb *et al.*, 2000). Einige Membrandomänen könnten auch aus bestimmten Beschränkungen der lateralen Mobilität von diffusionsfähigen Membranproteinen, durch Lipid-Lipid- oder Lipid-Protein-Interaktionen (Anderson und Jacobson, 2002), entstehen. Die Verfolgung von molekularen Bewegungen erfolgt mit Hilfe der Videomikroskopietechnik (Saxton und Jacobson, 1997). Es muss daher immer geklärt werden, ob, bzw. in welchem Maße, die mit unterschiedlichen Methoden definierten und detektierten Membrandomänen einander gleichen. Darüber hinaus leiden all die oben beschriebenen Ansätze unter bestimmten Einschränkungen. So sind die DRM-

Isolationsumstände abhängig von den Detergenzkonzentrationen und der Qualität der Zellyse und auch die Charakteristiken der verwendeten Marker (z.B. zu große fusionierte Fluoreszenzproteine, die möglicherweise die Organisation der Membran stören) können sowohl die Größe, als auch die Stabilität von Membrandomänen beeinflussen. Als Resultat der sich stetig weiterentwickelnden biophysikalischen Methoden, wird inzwischen angenommen, dass Membrandomänen kleiner und weniger stabil sind, als man es noch vor zehn Jahren postuliert hat (Edidin, 2001).

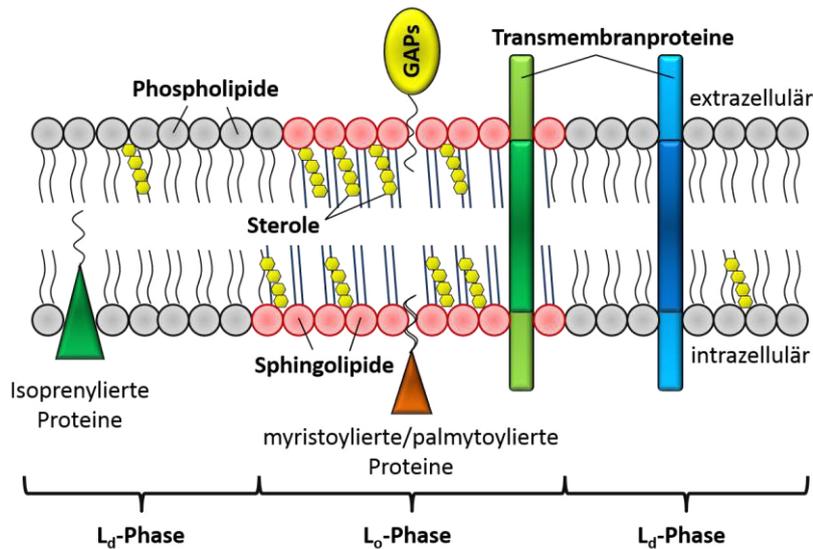
Obwohl das Konzept der Existenz von Membrandomänen bis heute weitgehend akzeptiert ist, sind nach wie vor noch viele grundlegende Fragen offen und werden sehr kontrovers diskutiert.

### 1.1.3.1 Biophysikalische Methoden zur Detektion und Charakterisierung von Membrandomänen: Erfolge, Limitationen und Herausforderungen

Biochemisch betrachtet, wird ein Domänen-assoziiertes Membranprotein dadurch definiert, dass es nach Extraktion mit milden nicht-ionischen Detergenzien (siehe 2.11.4.2, Seite 102), wie Triton X-100, und Zentrifugation über einen Saccharosegradienten (siehe 2.11.4.3, Seite 102) in der Fraktion mit der geringeren Dichte auftaucht. Diese Fraktion nennt man auch Detergenz-resistente Membranfraktion, kurz DRM (Brown und London, 1998). Solche biochemischen Ansätze liefern allerdings nur unzureichende Informationen bezüglich Morphologie, Stabilität, molekulare Organisation und Dynamik von Domänen-assoziierten Molekülen und den Membrandomänen selbst. Zusätzlich gibt es zahlreiche Bedenken über die Eignung dieser experimentellen Ansätze zur Untersuchung der Membranzusammensetzung in intakten Zellen. Eine der wichtigsten Fragen ist: Existieren die Domänen in der Membran bereits vor der Detergenzbehandlung, oder werden sie erst durch die Extraktionsprozesse erschaffen? Bisher konnte diese Frage noch nicht zufriedenstellend beantwortet werden. Dennoch konnten einige *in vitro* Studien zur Wiederherstellung von Membrandomänen nach Detergenzbehandlung von Modellmembranen (MM, siehe 1.1.3.3) zeigen, dass der Extraktionsvorgang selbst keinen signifikanten Einfluss auf die Domänenbeschaffenheit hat (Ahmed *et al.*, 1997; Schroeder *et al.*, 1998).

Die Ergebnisse verschiedener biochemischer und biophysikalischer Studien an Modellmembranen unterstützen die Theorie von der Existenz von „Lipid Rafts“. Normalerweise nutzt man dazu Modellmembranen, die in ihrem Aufbau grob dem von natürlichen Membranen ähneln. Aus einer solchen Modellmembran konnten Detergenz-unlösliche Fraktionen gewonnen werden, die in ihrem Aufbau, ihrer Lipidzusammensetzung und durch die Anwesenheit GPI-verankerter Proteine, DRMs aus lebenden Zellen gleichkamen. Vergleichbar mit Membranfraktionen, die eine Lo-Phase („liquid ordered“, Abbildung 1.5), mit einer kompakten Lipidanordnung bilden, waren sie

angereichert an Sterolen und Lipiden mit gesättigten Acylketten (z.B. Sphingolipide, Schroeder *et al.*, 1994).



**Abbildung 1.5 Model einer allgemeinen Membrandomäne**

lo-Phasen (Membrandomänen) zeichnen sich durch eine starke Anreicherung und Ordnung von Lipiden (Sphingolipiden) mit gesättigten Acylketten und Sterolen, sowie die Assoziation mit modifizierten und GPI-verankerten Proteinen (GAPs) aus. Im Vergleich zu den umgebenden ld-Phasen („liquid disordered“).

Segregierte Lipidphasen (Domänen oder Rafts) in Modellmembranen sind zwar gleichgewichtsbedingte Strukturen, Membranen in lebenden Zellen sind jedoch weit von solchen Gleichgewichtsbedingungen entfernt und bilden eher transiente Strukturen. Dennoch kann man biochemische und biophysikalische Methoden an Modellmembranen anwenden, um nützliche Informationen über die Strukturen und Dynamiken von „Lipid Rafts“ zu gewinnen. Im Gegensatz zu biochemischen Ansätzen, können mit biophysikalischen Ansätzen sowohl Modellmembranen, als auch biologische Membranen *in situ* untersucht werden. Die Charakterisierung von Membrandomänen ist abhängig von der räumlichen, zeitlichen und chemischen Auflösung der, für die Detektion der Rafts, verwendeten Methoden. Verschiedene Methoden können unterschiedliche Bilder derselben Domäne liefern und gleichzeitig für andere wichtige Aspekte der „Raft“-Eigenschaften blind sein. Zu den biophysikalischen Methoden zählen in erster Linie mehrere spektroskopische Techniken, wie Kernspin (NMR)- oder Elektronenspinresonanz (EPR) sowie spezialisierte mikroskopische Techniken (FRET, AFM („Atomic Force Microscopy“), SDT („Single-Dye Tracing“) oder FCS („Fluorescence Correlation Spectroscopy“). Bei diesen Techniken resultieren die unterschiedlichen zeitlichen Auflösungsvermögen (z.B. NMR in Mikrosekunden und EPR in Nanosekunden) in uneinheitlichen Ergebnissen bezüglich der membrangebundenen Lipide (Jost und Griffith, 1980).

Im Gegensatz zu dynamischen Methoden (z.B. EPR), eignen sich fluoreszenzbasierte Methoden lediglich zur Detektion relativ großer Domänen. Die FRET-Technik ist zwar ein sehr selektives und sensitives Werkzeug für die Auflösung von örtlichen Heterogenitäten und molekularen Interaktionen innerhalb einzelner Zellen, ist dabei in ihrer Auflösung aber den optischen Grenzen der Mikroskopie unterlegen. So führten einige vorangegangene FRET-Analysen, die die Verteilung von GPI-verankerten Proteinen in „Lipid Rafts“ aufzeigen sollten, zu sehr kontroversen Ergebnissen. Dies führte dazu, dass man heute davon ausgeht, dass „Lipid Rafts“ in Plasmamembranen nur transient stabilisierte Strukturen sind und wenn sie denn stabil sind, lediglich einen minimalen Anteil der Zelloberfläche ausmachen (Kenworthy *et al.*, 2000).

### 1.1.3.2 Phytosterole in Modellmembranen

In bisherigen Studien zur Analyse von Membrandomänen unter Verwendung von Modellmembranen, bestanden diese stets aus Cholesterol, als Lo-Phasen-formierendes Sterol. Da nur sehr wenige Studien andere Sterole in Modellmembranen behandeln, gibt es kaum detaillierte Informationen über die Rolle von Phytosterolen in der Generierung von „Rafts“. In einer Studie, die sich mit den Effekten verschiedener Sterole auf Sphingomyelinmembranen beschäftigte, konnten diverse Unterschiede zwischen pflanzlichen und tierischen Sterolen festgestellt werden. Cholesterol stellt die grundlegende Struktur für alle anderen Sterole dar, die unter anderem Bestandteil von Biomembranen sind. So wird es mit einer zusätzlichen Ethylgruppe an C<sub>24</sub> (wodurch  $\beta$ -Sitosterol entsteht) oder einer zusätzlichen Doppelbindung an C<sub>22</sub> (wodurch Stigmasterol entsteht) modifiziert. Mit Hilfe verschiedener spektroskopischer Methoden konnte gezeigt werden, dass Cholesterol eine größere Anzahl und stabilere Assoziationen mit Sphingomyelinmembranen eingeht als Phytosterole (Gao *et al.*, 2009). In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass die Phytosterole  $\beta$ -Sitosterol und Stigmasterol, durch ihre Interaktion mit den Alkylketten des Sphingomyelins, an der Entstehung von Lo-Phasen teilhaben (Hac-Wydro *et al.*, 2010). So nützlich künstliche Modellmembranen für die Forschung sind, gibt es dennoch ein grundlegendes Problem: Alle binären und ternären Modellmembranen sind symmetrisch und haben somit dieselbe Lipidzusammensetzung auf der Membranaußen- und auf der Membraninnenseite. Dies entspricht nicht dem Zustand von Plasmamembranen in lebenden Zellen. Dort ist zum Beispiel die innere Membranseite grundlegend anders aufgebaut als die Membranaußenseite und auch ärmer an Sphingolipiden (Simons und Vaz, 2004). Deshalb wird es in Zukunft ein Ziel von vielen Biophysikern sein, eine Modellmembran zu etablieren, die in ihren Details denen von Plasmamembranen im tierischen und pflanzlichen System entspricht. Ebenso fehlen noch detaillierte Studien mit Phytosterolen in Modellmembranen, die aus pflanzlichen Sphingolipiden bestehen.

### 1.1.3.3 Detergenzunlöslichkeit

Die Löslichkeit einer Membran ist abhängig von der Konzentration der verwendeten Detergenz, der Temperatur und der Dauer der Detergenzbehandlung. Die Detergenz Triton X-100, ein nicht-ionisches, oberflächenaktives Reagenz, wird für 30 min bei 4°C eingesetzt, um Membranen zu solubilisieren, ohne dabei gleichzeitig mögliche „Lipid Rafts“ auszulösen. Die Lipidzusammensetzung einer Membran entscheidet dabei über die Effizienz der Behandlung mit Triton X-100. Lipide mit einer niedrigen Schmelztemperatur (z.B. DOPC-Vesikel,  $T_M = -20^\circ\text{C}$ ) können sehr leicht durch Triton X-100 gelöst werden und Lipide mit einer hohen Schmelztemperatur (z.B. Dipalmitoylphosphatidylcholinvesikel,  $T_M = 40^\circ\text{C}$ ) zeigen eine Resistenz gegenüber der Behandlung mit Triton X-100. Diese Tatsache zeigt ganz klar wie wichtig die Lipidzusammensetzung von Modellmembranen für die Löslichkeit durch Detergenzien ist (Morandat und El Kirat, 2006). Die tierische Plasmamembran besteht hauptsächlich aus Cholesterol und Sphingolipiden, deren biophysikalische Eigenschaften in Modellmembranen schon detailliert untersucht und beschrieben wurden (Ahmed *et al.*, 1997). Bei einer physiologischen Temperatur von 37°C führen Cholesterol und Sphingomyelin, in einem physiologischen Verhältnis, zur Generierung von stabilen Lo-Phasen. Dies impliziert, dass es Membrandomänen bei physiologischen Temperaturen bereits vor dem Einsatz von Detergenzien geben muss und diese somit nicht nur ein Artefakt der Detergenzbehandlung sein können.

### 1.1.3.4 Größe und Dynamik von Membrandomänen

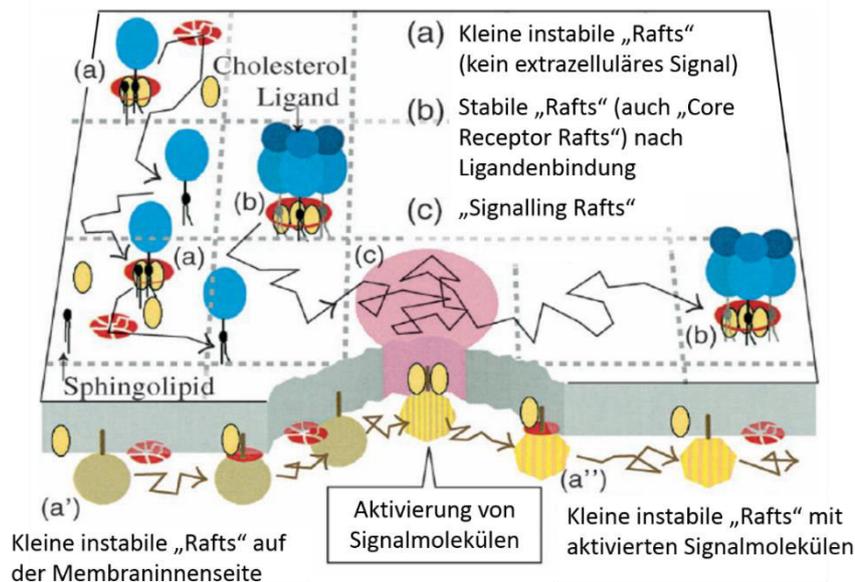
In der Plasmamembran von eukaryontischen Zellen existieren verschiedenartige spezialisierter Bereiche, die für die korrekte Funktion der Zellen wichtig sind. Zu diesen Membrandomänen zählen mikrometergroße fokale Adhäsionen und Adhärensverknüpfungen, 100nm-große Clathrin-beschichtete Membraneinstülpungen und Synapsen sowie sehr kleine Komplexe, wie Rezeptorencluster und assoziierte Lipide. Wie im vorherigen Abschnitt (siehe 1.1.3.1) beschrieben, resultieren die verschiedenen, zur Verfügung stehenden, biochemischen und biophysikalischen Methoden in einem großen Spektrum mutmaßlicher Domänengrößen. Bisher konnte dazu, wie auch zu Form und Verteilung der Domänen, kein einheitlicher Konsensus gefunden werden (Tabelle 1.1).

Membran	Methode	Größe (nm)	Referenz
PM	Chem. Kreuzverknüpfung	>4	Friedrichson und Kurzchalia, 1998
MM	EPR	>5	Jost <i>et al.</i> , 1973
MM	„Short-range Quenching“	>5	London, 2002
PM	FRET, klassisch	0	Kenworthy und Edidin, 1998
PM	FRET, anisotrop	70	Varma und Mayor, 1998
PM	SPT	200-300	Subczynski und Kusumi, 2003
PM	SDT	~300	Edidin, 2001
MM	AFM	200-2000	Schütz <i>et al.</i> , 2000
		40-100	Yuan und Johnston, 2001
PM	„Optical trapping“	26	Pralle <i>et al.</i> , 2000
PM	CLSM	300-1500	Vereb <i>et al.</i> , 2000

**Tabelle 1.1: Größenangaben von verschiedenen Membrandomänen**, aufgezeigt durch verschiedene biochemische und biophysikalische Methoden (PM = Plasmamembran, MM = Modellmembran)

Die Durchführung von chemischen Kreuzverknüpfungsexperimenten offerierte als Raftgröße eine Zahl von 15 Molekülen. Eine andere Methode (EPR) schlägt die Existenz von sehr kleinen, sterolreichen Domänen vor, die nur aus einigen wenigen Molekülen bestehen. Folgt man der Methode der Fluoreszenzlöschung („Short-range Quenching“), können 20-25 Lipidmoleküle eine funktionelle Membrandomäne etablieren. All diese methodischen Ansätze prognostizieren sehr kleine und sehr dynamische Domänen, deren Lebensdauer im Bereich von einigen Nanosekunden bis hin zu wenigen Millisekunden liegt. Die Größe von Membrandomänen kann, folgt man diversen FRET-Methoden, zwischen 50 und 70nm liegen. Die Größe von Domänen, detektiert durch konfokale Mikroskopie, liegen zwischen 250nm und einigen Mikrometern und die Lebensdauer dieser sehr großen, fast riesigen „Lipid Rafts“, die wahrscheinlich nichts anderes als Aggregate aus kleineren Domänen sind, kann mehrere Minuten betragen. Ausgehend von diesen Beispielen scheint es, als ob die Lebensdauer der Membrandomänen mit ihrer Größe zunimmt, auch wenn dieser Zusammenhang bisher keine geradlinige Korrelation zulässt. Die Stabilisierung der riesigen „Lipid Rafts“ wird nicht allein durch die Aggregation kleinere Domänen bewerkstelligt, sondern auch durch deren Interaktion mit Elementen des Zytoskeletts. Es werden drei Typen von Membrandomänen in der Plasmamembran vorgeschlagen. Die einen sind sehr klein und instabil, bestehend aus einigen wenigen Molekülen und einer eher kurzen Lebenszeit von weniger als 1ms. Der zweite Typ wird als „Core Receptor Rafts“ bezeichnet und entsteht durch die oligomere Formation von GPI-verankerten Proteinen oder Transmembranrezeptoren, eingeleitet durch Ligandenbindung. Diese stabilen Oligomere induzieren kleine, aber stabile „Rafts“ in ihrer Nähe, allein durch die geringfügige Reduktion thermaler Bewegungen und der daraus folgenden Assemblierung von Cholesterol. Dieser zweite „Raft“-Typ hat eine Lebenszeit von mehreren Minuten. Der dritte Typ formiert sich um diese „Core Receptor Rafts“ herum und wird als „Signalling Raft“ bezeichnet. Diese „Rafts“ werden sowohl durch die

Assemblierung von Signalmolekülen, als auch durch die Verschmelzung von kleinen, instabilen „Rafts“, die Signalmoleküle beinhalten, gebildet. Die Verdichtung der Membran zu „Rafts“ korreliert stark mit gewissen Signalprozessen in der Zelle. Davon ausgehend kann man vermuten, dass durch die verschiedenen Lipidinteraktionen, die entstandenen Membrandomänen möglicherweise als vielseitige Signalplattformen fungieren. Dies könnte sich schnell wechselnde, miteinander verknüpfte Signalwege begünstigen (Abbildung 1.6; Subczynski und Kusumi, 2003).



### Abbildung 1.6: Die drei Typen von „Rafts“ in der Plasmamembran

Typ (a) ist klein, instabil und kurzlebig (ms) und eventuell mit GPI-verankerten Proteinen assoziiert. Der zweite Typ (b) entsteht, wenn sich Rezeptormoleküle, durch Ligandenbindung, zu Oligomeren zusammenfinden. Diese sind langlebiger (Min) und können GPI-verankert sein, oder eine gewisse Affinität zu Cholesterin und gesättigten Acylketten haben. Oligomerisierte Rezeptoren begünstigen dann die Formation von kleinen, aber stabilen Domänen in ihrer Nähe. Dieser Typ wird als „Core Receptor Raft“ bezeichnet. Der dritte Typ (c) wird „Signalling Raft“ genannt, und ist wahrscheinlich, durch die Assemblierung von Signalmolekül-beinhaltenen „Rafts“, direkt an Signalprozessen beteiligt. Kleine instabile „Rafts“ existieren vermutlich auch auf der Membrannenseite (a') und können mit „Core Receptor Rafts“ (b und c) fusionieren, wodurch das Signalmolekül aktiviert wird und die „Signalling Rafts“ wieder verlassen kann (a''). (Abbildung modifiziert, © Elsevier; Subczynski und Kusumi, 2003)

Das „Lipid Shell“-Modell, ist ein weiteres Modell, welches sich mit der großen Vielfalt an „Rafts“, mit ihrer Größe und mit ihrer Lebensdauer befasst. Anderson und Jacobson (2002) gehen davon aus, dass bestimmte Proteine in einer Hülle („Shell“) aus Sterolen und Sphingolipiden eingekapselt sind. Diese Kapseln bestehen aus 80 Molekülen und haben einen Durchmesser von 7nm. Lipidhüllen könnten demnach thermodynamisch stabile Strukturen, mit einer Affinität für bereits existierende „Rafts“ sein. Daraus resultiert, dass Lipidhüllen die eingekapselten Proteine spezifisch zu solchen

Membrandomänen transportieren. Kondensierte Komplexe rekrutieren mehr und mehr Lipid-ummantelte Proteine und können als funktionelle „Rafts“ in der Plasmamembran fungieren (Anderson und Jacobson, 2002).

### 1.1.3.5 Die Manipulation der Membrandomänen: Strategien und Funktionen

Seit dem Zeitpunkt, als das Konzept der Membrandomänen Akzeptanz fand, wurden zahlreiche Versuche unternommen, die strukturelle Integrität der „Rafts“, sowohl in Modell-, als auch in biologischen Plasmamembranen zu modifizieren, um ein Verständnis für ihre Funktion zu bekommen. Untersuchungen an Modellmembranen zeigten, dass die physikochemischen Faktoren, die eine Ballung der Lipide zu Membrandomänen bewirken, hauptsächlich die langen, gesättigten Fettsäureketten, die glykosylierten Kopfgruppen der Phospholipide, sowie das verbindende Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen darstellen (Masserini und Ravasi, 2001). Sphingomyelin und Glykosphingolipide werden als die Hauptkomponenten von Membrandomänen betrachtet und liegen somit getrennt von Glycerophospholipid-beihaltenden ungesättigten Fettsäureketten vor (Ahmed *et al.*, 1997). Sterole gelten dabei, hauptsächlich aus sterischen Gründen, als stabilisierende Komponenten in verschiedenen Typen von Membrandomänen (Xu und London, 2000). Diese bisherigen Kenntnisse über die chemische Zusammensetzung und die physikalischen Eigenschaften, haben zu der Entwicklung diverser Strategien zur Manipulation der strukturellen Integrität von Membrandomänen geführt (Hooper, 1999).

#### 1.1.3.5.1 Destabilisierung der Membrandomänen durch die Manipulation der Sterolkonzentration

Sterole scheinen eine ausschlaggebende Rolle für die Stabilisierung von Membrandomänen zu spielen. Deshalb wird die reversible Anreicherung oder Reduktion von Sterolen in der Plasmamembran als ein zweckmäßiges Werkzeug zur Analyse der Domänenfunktion verwendet. Die Verwendung von Methyl- $\beta$ -D-Cyclodextrin (MCD), einem wasserlöslichen, zyklischen Glukoseoligomer, führt zu einer Verringerung der Sterolkonzentration und somit zu einer mikroskopisch verfolgbaren Auflösung von Membrandomänen. Dies wiederum resultiert in einer Fehlfunktion zahlreicher Signaltransduktionsprozesse (Xavier *et al.*, 1998; Ilangumaran *et al.*, 1999; Vereb *et al.*, 2000; Matkó *et al.*, 2002). Interessanterweise führt eine Anreicherung der Plasmamembran mit Sterolen, sowie mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren, ebenfalls zu einer Destabilisierung der Membrandomänen (Bodnar *et al.*, 1996; Xu und London, 2000; Stulnig *et al.*, 1998). Diese Effekte resultieren vermutlich aus einem Ungleichgewicht, welches zwischen den neu zugefügten oder entfernten Sterolmolekülen und den eigentlichen Domänenbestandteilen entsteht. Die Verwendung

von MCD ist eine geeignete, reproduzierbare Methode um den Sterolgehalt der Plasmamembran reversibel zu manipulieren und somit die Integrität der Membrandomänen zu zerstören, ohne dabei die eigentliche Plasmamembran grundlegend zu beeinflussen. Ein häufig auftretender Nebeneffekt ist jedoch die Auslösung von kleinen Sterol-bindenden Proteinen aus der Membran (Ilangumara und Hoessli, 1998). Einige andere Sterol-bindende Reagenzien, so wie die Polyenverbindungen Filipin oder Nystatin, komplexieren mit den Sterolmolekülen, führen so zur Formation von relativ großen (20-25nm) Poren und beeinflussen somit die Integrität und die Funktion der Plasmamembran erheblich (Bolard, 1986). Deswegen ist die Verwendung solcher Reagenzien immer mit einer gewissen Vorsicht bei der Einstellung der experimentellen Bedingungen verbunden. Die Sterolkonzentration der Plasmamembran kann auch durch die Verringerung des zellulären Sterolgehaltes, durch Inhibierung der Sterolbiosynthese oder durch Steroloxidation manipuliert werden (Rothberg *et al.*, 1992; Smart *et al.*, 1994).

#### 1.1.3.5.2 Destabilisierung der Membrandomänen durch die Manipulation der Spingolipidkonzentration

Die Manipulation der Sphingolipidbiosynthese, oder -homöostase führt ebenfalls zu einer Auflösung (oder Zerstörung) von Membrandomänen (Sheets *et al.*, 1997). Diese Manipulation erfolgt hauptsächlich durch die Inhibierung der Synthese von Ceramiden und Glykosylceramiden, von Sphingomyelinen und Glykolipiden. Die Reduktion dieser Lipidintermediate verhindert die Formation von Membrandomänen. Wird das hauptsächlichste Sphingolipid im menschlichen System, das Sphingomyelin, durch das Enzym Sphingomyelinase, entfernt, konnte gezeigt werden, dass keine Reduktion der Sterolkonzentration nach MCD-Behandlung mehr erfolgte. Dies bedeutet, dass der Hauptteil an Sterolen in der Plasmamembran mit Sphingolipiden assoziiert ist (Neufeld *et al.*, 1996). Einige biochemische und biophysikalische Experimente haben überzeugend demonstriert, dass, wenn man diese Arten von Manipulierungsstrategien unter Beachtung der zuvor erwähnten Probleme und Schwierigkeiten anwendet, man erfolgreich die Funktion von Membrandomänen bezüglich der Kompartimentierung von Rezeptoruntereinheiten (Kabouridis *et al.*, 2000) und von Signalmolekülen (Lin und Weiss, 2000), in einer Vielzahl von Plasmamembranen verändern kann.

#### 1.1.3.6 „Lipid Rafts“ in Hefe

Hefezellen sind wegen des hohen Ergosterol/Sphingolipid-Gehalts ihrer Plasmamembran und des hohen Gehalts an Membrandomänen-typischen Proteinen, optimale Studienobjekte zur Analyse der Proteinzusammensetzung und -fluktuation von Membrandomänen. Von allen eukaryontischen Zellen, die eine Zellwand besitzen,

konnten in der Plasmamembran von *Saccharomyces cerevisiae* die ersten Anhaltspunkte für die Formation von Membrandomänen gewonnen werden. Sur7, ein Protein mit bisher unbekannter Funktion (Walther *et al.*, 2006) und der Arginin/Protonen-Transporter Can1 sind in diskreten Bereichen der Plasmamembran, die mit Ergosterol (dem hauptsächlichsten Sterol im pilzlichen System) angereichert sind, lokalisiert (Grossmann *et al.*, 2007). Diese Bereiche werden als MCC („Membrane Compartment of Can1“) bezeichnet (Malínská *et al.*, 2003). Etwa ein Dutzend integrale Proteine mit teils unbekannter Funktion, teils spezifische Transporter, lokalisieren mit dem MCC, wodurch dieses eine furchenähnliche Form („Furrow“) bekommt (Strádalová *et al.*, 2009). Andere Proteine interagieren damit von der zytosolischen Seite aus, in Form eines großen, halbtubulären Heterokomplexes, dem so genannten Eisosom (Grossmann *et al.*, 2008). Das am häufigsten vorkommende Protein in der Hefemembran ist Pma1. Es befindet sich nicht in dem MCC-Kompartiment und stellt ein eigenes, netzförmiges Subkompartiment, das MCP („Membrane Compartment of Pma1“) dar. Die Separierung dieser beiden Kompartimente ist sehr stabil und die in den Kompartimenten befindlichen Domänen, sind größtenteils immobil (Malínská *et al.*, 2004). Von anderen Transportern, wie der Aminosäurepermease Gap1 und der Hexosepermease Hxt1, konnten zuvor keine lateral segregierten Verteilungsmuster beobachtet werden, da lediglich optisch eingeschränkte Mikroskopietechniken zur Verfügung standen (Lauwers *et al.*, 2007). Neuerdings konnte mit Hilfe verschiedener hochauflösender Mikroskopietechniken festgestellt werden, dass alle Plasmamembranproteine, Gap1 und Hxt1 eingeschlossen, ungleichmäßig verteilt sind und individuelle, teils einander überlappende Membrandomänen darstellen (Spira *et al.*, 2012). Die Anwendung von Immunhistochemischen Methoden zeigte eine Akkumulation des Hexose/Protonen-Symporters Hup1 aus der Alge *Chlorella kessleri* in dem MCC-Kompartiment, nach funktioneller Expression in Hefezellen (Grossmann *et al.*, 2006). Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass laterale Membrandomänen in Hefe ein evolutionär konserviertes, generelles Prinzip der Domänenorganisation darstellen. Tatsächlich konnten die, für das MCC-Kompartiment typischen, grubenförmigen Strukturen, die „Furrows“, in vielen Organismengruppen (darunter Bakterien, Pilze und Pflanzen) nachgewiesen werden (Strádalová *et al.*, 2009).

### 1.1.3.6.1 Zellpolarisation und stabile Membrandomänen

Die ungleichmäßige Verteilung von Membrankomponenten in der Plasmamembran während der Zellpolarisation, ist bereits in vielen Modelorganismen ausführlich untersucht worden. Die Membrandomänen, die durch die Polarisation von Zellen induziert werden, sind normalerweise mehrere Mikrometer groß und können so durch einfache Fluoreszenzmikroskopie gut aufgelöst und analysiert werden. Dabei handelt es sich jedoch um sehr dynamische Strukturen, welche kaum, bis gar nicht, in isolierten Plasmamembranen detektiert werden können. In der pilzlichen Plasmamembran formieren sich sterolreiche Domänen (SRDs) während des polarisierten Zellwachstums an

elongierenden Zellseiten und Stellen, an denen neue Septen entstehen (*Schizosaccharomyces pombe*; Wachtler *et al.*, 2003), an den Spitzen der Hyphen von pathogenen Hefearten (z.B. *Candida albicans*; Martin und Konopka, 2004) und an den Verschmelzungsstellen von Pheromon-stimulierten Zellen (*Saccharomyces cerevisiae*; Bagnat und Simons, 2002). Die Membranstellen an denen eine Verschmelzung von zwei Hefezellen stattfindet, sind gemäß Laurdanfärbung im Vergleich zur umgebenden Plasmamembran stärker kondensiert und geordnet (Proszynski *et al.*, 2002). Die Filipinfärbung von sich teilenden Zellen zeigt eine hohe Konzentration an Sterolen und eine Akkumulation von spezifischen Proteinen in diesen Teilungsflächen (Li *et al.*, 2006; Marco *et al.*, 2007). Jede Störung der SRDs durch bestimmte Substanzen führt zu einem Verlust der Organisation in den Teilungsflächen der Plasmamembran. Das Zytoskelett, vor allem F-Aktin, ist ebenfalls an der räumlichen Organisation der Plasmamembran in diesen Teilungsflächen beteiligt. Mutanten der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe*, die das für die Zellteilung wichtige Protein Cdc15p nicht mehr exprimieren, zeigen eine falsch lokalisierte SRD in den lateralen Zellmembranen. Die Überexpression von *cdc15<sup>+</sup>* resultierte in zusätzlichen SRDs in den lateralen Zellmembranen, welche unabhängig von F-Aktin waren (Wachtler und Balasubramanian, 2006). Diese letztgenannten Zusammenhänge zeigen die Notwendigkeit von Zellzyklus- und Zellteilungs-kontrollierten Sterolakkumulationen in den entsprechenden Teilungsflächen von Hefezellen auf.

### 1.1.4 Lipid- und Proteinmodifikationen

Im Folgenden Kapitel werden die, meist posttranslationalen, Modifikationen beschrieben, denen einige Membranproteine unterliegen. Die Beschreibung solcher Modifikationen sind notwendig, um die Lokalisation dieser Proteine in den sogenannten „Lipid Rafts“ besser zu verstehen. Die strukturelle Veränderung bestimmter Proteine durch Lipidmodifikationen verändert nicht nur deren Interaktionsverhalten und ihre Lokalisation, sondern auch ihre physiologische Bedeutung. Die Modifikation durch langkettige Acylierung mit Fettsäuren zu Lipoproteinen etwa ist weithin bekannt (Resh, 1999). Zu dieser Art der Modifikation gehören die Anlagerung von gesättigten C<sub>14</sub>- (Myristat) und C<sub>16</sub>- (Palmitat) Fettsäuren.

#### 1.1.4.1 Myristoylierung

Viele N-myristoylierte Proteine sind mit der Plasmamembran oder anderen intrazellulären Membranen assoziiert. Myristoylierung (auch N-Myristoylierung oder Myristylierung genannt) findet statt, wenn die Fettsäure Myristinsäure, katalysiert durch das monomere Enzym N-Myristoyltransferase (NMT), irreversibel an den N-terminalen Glycinrest von Proteinen angehängt wird. Dies geschieht sehr spezifisch, zumeist cotranslational (Wilcox *et al.*, 1987), aber auch posttranslational und in der Regel nach

einer spezifischen Proteolyse. Dabei wird das entsprechende Protein, mit der Konsensussequenz Met-Gly-X-X-X-Ser/Thr-, so geschnitten, dass aminoterminal ein freier Glycinrest (Gly-2) entsteht. Meist wird dafür nur das initiale Methionin durch das Enzym Methioninaminopeptidase abgeschnitten. Die Notwendigkeit der Anwesenheit des Gly-2 ist absolut und keine andere Aminosäure kann diese Bindestelle ersetzen (Resh, 1996). Die Mutation von Gly-2 zu Alanin führt dazu, dass das Protein nicht mehr N-myristoyliert werden kann und resultiert in der Reduktion oder dem Verlust der Membranbindung (Resh, 1999). Über Röntgenkristallanalysen von verschiedenen N-myristoylierten Proteinen, konnte gezeigt werden, dass die angehängte Myristinsäure eine strukturelle Rolle in der Stabilisierung von dreidimensionalen Proteinkonformationen spielt. Zum Beispiel ist die Positionierung von Myristinsäure in einer hydrophoben Tasche der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A (PKA) notwendig für die strukturelle und katalytische Stabilität des Enzyms (Zheng *et al.*, 1993).

Obwohl die Myristoylierung von Proteinen ganz klar für die Bindung an Membranen notwendig ist, reicht diese Modifikation allein aber nicht aus. Biophysikalische Studien haben bewiesen, dass die Bindungsenergie, die von Myristinsäure zu Verfügung gestellt wird, nur relativ schwach ist (sie liegt nur bei  $10^{-4}$  M  $K_d$ ) und nicht ausreicht um Peptide oder Proteine vollständig mit zellulären Membranen zu verankern (Peitzsch und McLaughlin, 1993). Die Existenz eines zweiten Signals innerhalb des N-myristoylierten Proteins ist daher für die effektive Membranbindung notwendig. Dieses zweite Signal kann entweder ein polybasisches Cluster von Aminosäuren sein oder eine Palmitoylierung. Dadurch potenzieren sich die hydrophoben und die elektrostatischen Kräfte (Resh, 1999). Die biophysikalische Grundlage für die Membranbindung von Myristinsäure ist die hydrophobe Insertion der Myristinsäure in die Lipiddoppelschicht, wobei 10 der 14 Kohlenstoffatome in den Hydrocarbonanteil der Membran eingelagert werden (Murray *et al.*, 1998). Die basischen Aminosäuren hingegen interagieren elektrostatisch mit den polaren Köpfen von sauren Phospholipiden (Murray *et al.*, 1997). Solche sauren Phospholipide sind hauptsächlich mit der Innenseite der Plasmamembran assoziiert.

Ein dritter Mechanismus, der die starke Membranbindung von myristoylierten Proteinen ermöglicht, sind Protein-Protein-Interaktionen mit anderen Membran-assoziierten Proteinen (Resh, 1999). Die Myristin-vermittelte Membranverankerung von Proteinen, kann durch Liganden-induzierte Konformationsänderungen, wodurch der Myristinsäurerest in das Zytoplasma verlagert wird, oder durch elektrostatische Veränderungen in dem Myristinsäurerest selbst reguliert werden. Im letzteren Fall führt eine Phosphorylierung in dem polybasischen Aminosäurecluster, welcher für die Membranverankerung notwendig ist, zu einer Verlagerung der Proteine von der Membran in das Zytoplasma (McLaughlin und Aderem, 1995).

#### 1.1.4.2 Palmitoylierung

Wie bereits oben erwähnt, wird die N-Myristoylierung von der NMT, einem inzwischen gut charakterisierten Enzym, katalysiert. Hingegen ist der enzymologische Hintergrund der Palmitoylierungsreaktion bisher nur unzureichend aufgeklärt. Die Palmitoylierung oder auch S-Acylierung ermöglicht die Verankerung von Proteinen in der Zellmembran (Resh, 1999). Dafür werden nahezu alle palmitoylierten Proteine mit Palminsäure oder anderen gesättigten Fettsäuren wie Stearinsäure (C<sub>18</sub>), Ölsäure (cis-C<sub>18</sub>) oder Arachidonsäure (C<sub>20</sub>), durch eine Thioesterbindung mit der Sulfhydrylgruppe von Cystein verknüpft (Casey, 1995). Die proteininterne Position der palmitoylierten Cysteinreste variiert. Einige sind N-, oder C-terminal lokalisiert, andere in der Nähe von Transmembrandomänen.

Die Palmitoylierung von Proteinen wird hauptsächlich durch die Palmitoylacyltransferase (PAT) durchgeführt. Bisher konnte lediglich eine partielle Aufklärung der Aktivität zweier PAT-Enzyme erfolgen, welche für die Palmitoylierung von Säuger-spezifischen Src-Kinasen und G $\alpha$ -Proteinuntereinheiten zuständig sind (Berthiaume *et al.*, 1995; Dunphy *et al.*, 1996). Diese beiden PAT-Enzyme sind membrangebunden und zeigen eine Präferenz für myristoylierte Proteinsubstrate und Palmitoyl-CoA gegenüber anderen Acyl-CoA-Substraten (Dunphy *et al.*, 1996). Es existieren aber auch Mechanismen für eine nicht-enzymatische Palmitoylierung von Proteinen (Reverey *et al.*, 1996). Palmitoylierte Proteine werden in vier Gruppen eingeteilt. In der Gruppe I finden sich vorrangig Plasmamembranrezeptoren und andere Membranproteine, die an einem oder mehreren Cysteinresten direkt neben oder innerhalb von Transmembrandomänen liegen (Veit *et al.*, 1996; Ponimaskin *et al.*, 1995). Die Proteine der Gruppe II sind vor allem Mitglieder der Ras-Familie. Diese werden mit einem Farnesylrest modifiziert. Diese Prenylierung der Ras-Proteine ist Voraussetzung für die anschließende Palmitoylierung von N-terminalen Cysteinresten (Hancock, 1989). Die Mitglieder der dritten Proteingruppe werden in der Nähe ihres N- oder C-Terminus palmitoyliert. Proteine der Gruppe IV werden sowohl mit Myristinsäure, als auch mit Palminsäure acyliert und tragen fast alle die N-terminale Konsensussequenz Met-Gly-Cys. Die Myristoylierung von Gly-2 bewirkt anschließend die Palmitoylierung von Cys-3 (Degtyarev *et al.*, 1994; Morales *et al.*, 1998).

#### 1.1.4.3 Prenylierung

Eine dritte Art der posttranslationalen Proteinmodifikation ist die Prenylierung, oder auch Farnesylierung. Dabei werden Farnesyl- (C<sub>15</sub>), oder Geranylgeranylisoprenoidreste (C<sub>20</sub>) kovalent an die C-terminalen Cysteinreste in Proteinen gebunden. Unter den bereits bekannten prenylierten Proteinen finden sich einige GTP-bindende regulatorische Proteine (G-Proteine), wie zum Beispiel die Gruppe der Ras-Proteine. Die Prenylierung dieser speziellen Proteine ist notwendig, damit durch die Ausbildung ihrer onkogenen

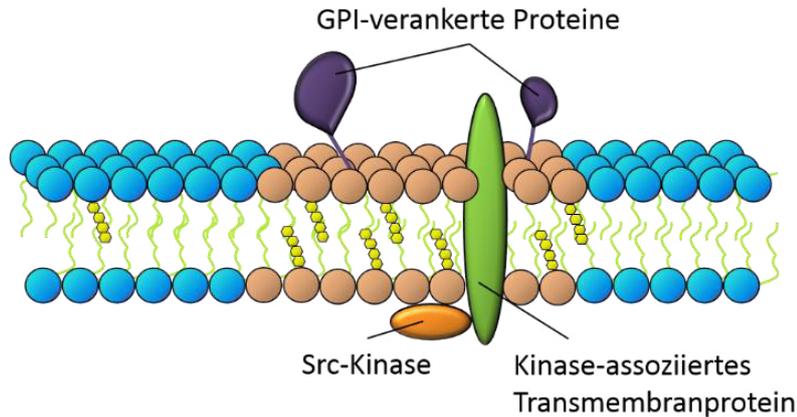
Formen, Zellen entsprechend verändert werden können (Casey *et al.*, 1989). Wegen ihrer stark verzweigten, platzraubenden Lipidstruktur, werden prenylierte Proteine ausschließlich außerhalb von Membrandomänen und „Lipid Rafts“ gefunden (Melkonian *et al.*, 1999).

### 1.1.4.4 GPI-Anker

Während die Prenylierung von Proteinen deren Einbau in Membrandomänen verhindert, gibt es eine andere Klasse der Lipidmodifikation, die die Verankerung von vielen Proteinen in diesen Domänenbereichen bewerkstelligen kann. Im Lumen des rauen Endoplasmatischen Reticulums (ER) wird ein Glykosylphosphatidyl-Anker (GPI-Anker) an die Carboxylgruppe des betreffenden Glykoproteins angehängt, wobei gleichzeitig die Signalsequenz, welche für den Import des Proteins in das ER zuständig war, abgespalten wird (Casey, 1995). Die GPI-Anker sind relativ komplexe Reste, bestehend aus saturierten Phospholipiden, gekoppelt mit Ethanolamin und bestimmten Zuckern (Maeda *et al.*, 2007).

Die meisten GPI-verankerten Proteine (GAPs) sind mit der apikalen Membranaußenseite von polaren Zellen verankert und das, wahrscheinlich deshalb vorrangig in Membrandomänen, weil ihre Lipidanker lange und saturierte Acyl- und Alkylketten beinhalten (Schroeder *et al.*, 1998). Dabei ist die Länge der Lipidanker entscheidend für die Domänenlokalisierung. Wenn die Länge der Fettsäureketten unter C16 liegt, werden die entsprechenden GAPs nicht in „Lipid Rafts“ eingebaut. In Säugetierzellen zeigen die meisten GAPs längere Ketten aus saturierten Fettsäuren, weshalb die GAPs in diesem System eine starke Anhäufung in „Lipid Rafts“ aufweisen (Benting *et al.*, 1999).

Nahezu alle GAPs sind ausschließlich innerhalb der äußeren Membranoberfläche verankert und sind an diversen Funktionen wie Zelladhäsion, Nährstoffaufnahme, Abwehr- und Signaltransduktionsprozessen beteiligt. Einige GAPs können auch als Rezeptoren für Viren und Toxine fungieren (siehe 1.1.4.7.1). Deshalb ist eine Verknüpfung von extra- und intrazellulären Signalen notwendig (Ikezawa *et al.*, 2002). Ein klassisches Beispiel für diese Fragestellung ist die Stimulation von T-Zellen. Extrazelluläre GAPs aktivieren T-Zellen durch die Familie der intrazellulären Src-Kinasen. Wie genau die notwendige Verknüpfung dieser, sich auf entgegengesetzten Seiten der Plasmamembran befindlichen, Signalkomponenten stattfinden kann, ist nach wie vor ungeklärt. Es gibt Vermutungen über die Existenz eines „Transmembranlinkers“, der die Membran durchspannen, direkt mit dem GPI-verankerten Protein interagieren und somit die Funktion beider Proteine miteinander verbinden kann. Wahrscheinlicher ist aber, dass Transmembranproteine nicht direkt mit dem GPI-verankerten Protein interagieren, sondern dieses durch seine Affinität zu Membrandomänen und -clustern mit den ebenfalls darin befindlichen Transmembranproteinen und somit den intrazellulären Kinasen in Verbindung steht (Brown, 1993, Abbildung 1.7).



**Abbildung 1.7: Interaktion von GAPs und Src-Kinasen**

Extrazelluläre GPI-verankerte Proteine (GAPs) sind mit intrazellulären Src-Kinasen gekoppelt, über Transmembranproteine, die in denselben Membrandomänen assoziiert sind (Abbildung modifiziert nach Brown, 1993).

#### 1.1.4.5 Übersicht

Die N-Myristoylierung, die Palmitoylierung und GPI-Anker sind Modifikationen, die die Lokalisierung von Proteinen in Membrandomänen begünstigen. Dem gegenüber steht die Prenylierung, welche bewirkt, dass Proteine aus Membrandomänen ausgeschlossen werden (Tabelle 1.2). Außer der N-Myristoylierung, sind alle diese Lipidmodifikationen reversibel und erlauben eine sehr genaue Regulation der Proteinfunktion und -lokalisierung in Membrandomänen. Einige dieser Lipidmodifikationen haben einen kooperativen Effekt. Zum Beispiel bewirkt die Myristoylierung eine Palmitoylierung weiterer Cysteinreste im Protein. Zumindest trifft das für das tierische System zu.

Modifikation	reversibel	Fettsäurelänge	Membranseite	Assoziation in Membrandomänen
Myristoylierung	-	C <sub>14</sub>	zytosolisch	√
Palmitoylierung	√	C <sub>16-20</sub>	zytosolisch	√
Prenylierung	√	C <sub>15/C20</sub>	zytosolisch	-
GPI-Anker	√	C <sub>16-18</sub>	Extrazellulär	√

**Tabelle 1.2: Zusammenfassung der Proteinmodifikationen**

Die Verteilung von bestimmten Proteinen in Membrandomänen ist abhängig von Lipid- und Proteinmodifikationen (siehe 1.1.4). Isoprenylierte Proteine und Peptide mit mehreren ungesättigten Acylketten zeigen eine sehr geringe Affinität für die Lo-Phasen der analysierten Membranen. Im Gegensatz dazu zeigen N-myristoylierte und N-terminal palmitoylierte Peptide eine starke Tendenz zu einer Verlagerung in die Lo-Phase. Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass prenylierte Proteine, durch diese Modifikation nicht in Membrandomänen integriert werden können (Silvius *et al.*, 2005).

#### 1.1.4.6 Lipidmodifikationen in Pflanzen

Die Lipidmodifikationen, wie sie im tierischen System existieren, sind auch im pflanzlichen System vorhanden, aber es gibt durchaus kleine Unterschiede in der Lipidzusammensetzung der pflanzlichen Plasmamembranen. Zum Beispiel zeigt die Membran der Chloroplasten einen sehr speziellen Lipidtyp, wie er so weder in Pilz- noch in Säugetierzellen vorkommt: Galaktolipide sind Glycerolipide, die eine Zuckerkopfgruppe, wie Monogalaktosyldiacylglycerol (MGDG) oder Digalaktosyldiacylglycerol (DGDG), besitzen (Somerville und Browse, 1991). Diese Lipidklasse existiert nur in Cyanobakterien und Chloroplasten und stellt somit einen Beweis für die Endosymbiontentheorie dar, welche besagt, dass prokaryontische Cyanobakterien von anderen Prokaryonten durch Phagozytose internalisiert wurden und somit die Vorfahren der Chloroplasten sind.

Einen weiteren Unterschied gibt es in der Sterolzusammensetzung der pflanzlichen Zellmembran. Im Gegensatz zum tierischen System, stellt Cholesterol nicht die Hauptkomponente der Zellmembran in Pflanzen dar (Kierszniowska *et al.*, 2009). Die häufigsten Phytosterole sind das vorwiegende  $\beta$ -Sitosterol, aber auch das Campesterol und das Stigmasterol (Beck *et al.*, 2007). In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass, zum tierischen System vergleichbare Lipidmodifikationen, auch im pflanzlichen System zu Lokalisierungsmustern der betreffenden Proteine führen. Zum Beispiel sind Mitglieder der *Arabidopsis*-Rab-Proteinfamilie GTP-bindende Signalproteine, die prenyliert und zusätzlich auch palmitoyliert werden. Viele Rab-Proteine wurden als membranständig, aber nicht als Membrandomänen-assoziiert beschrieben. Dies könnte mit der Prenylierung zusammenhängen, da man weiß, dass auch die Gegenstücke zu diesen Proteinen im Säugetiersystem, die Ras-Proteine, oft außerhalb von Membrandomänen gefunden wurden (Resh, 1999 und 2006). Hingegen zeigen, genau wie im tierischen System, viele Proteine mit einem GPI-Anker, eine deutliche Lokalisierung in Membrandomänen (Borner *et al.*, 2005). Ein Beispiel ist das *Arabidopsis*-Protein Sku5 (At4g12420), eine potenzielle Kupferoxidase, die am gerichteten Wurzelwachstum beteiligt ist (Sedbrook *et al.*, 2002). Dieses Protein ist eines der Proteine, die nach Detergenzbehandlungen pflanzlicher Plasmamembranen am häufigsten in den resultierenden DRMs gefunden werden (Shahollari *et al.*, 2004; Borner *et al.*, 2005; Kierszniowska *et al.*, 2009).

Die Calcium-abhängige Kinase CPK21 (At4g04720) wird durch zwei verschiedene Lipidmodifikationen entsprechend mit der Membran verankert. Der zweite N-terminale Glycinrest wird zuerst myristoyliert und der dritte N-terminale Cysteinrest wird anschließend palmitoyliert. Auf diese Weise ist die Kinase CPK21, ähnlich wie die tierischen Src-Kinasen, mit Domänen der pflanzlichen Plasmamembran assoziiert (Resh *et al.*, 2006).

#### 1.1.4.7 „Lipid Rafts“ in Tieren

In tierischen Membrandomänen ist lediglich ein Sterol, das Cholesterol, angereichert. Zwei Arten von „Lipid Rafts“ wurden identifiziert, Planare „Rafts“, auch nicht-caveolare oder Glykolipidrafts genannt und Caveolae. Planare „Rafts“ sind kontinuierlich mit der Plasmamembran (nicht eingestülpt) und besitzen keine unterscheidbaren morphologischen Eigenschaften. Caveolae sind flaschenartige Einstülpungen der Plasmamembran, die sich durch einen hohen Anteil an Caveolin-Proteinen auszeichnen (Nicolau *et al.*, 2006; Simons und Toomre, 2000). Caveoline sind im tierischen System weitverbreitet und werden im Gehirn, in Mikrogefäßen des Nervensystems, in Endothelzellen, Astrozyten, Oligodendrozyten, Schwannschen Zellen, Spinalganglien und Neuronen des Hippocampus exprimiert (Trushina *et al.*, 2006). Planare „Rafts“ besitzen Flotilline und wurden vorwiegend in Neuronen gefunden, in denen keine Caveolae vorkommen (Lang *et al.*, 1998). Beide „Raft“-Typen weisen eine ähnliche Lipidzusammensetzung auf. Sie sind angereichert an Cholesterol und Sphingolipiden. Flotilline und Caveoline haben die Fähigkeit Signalmoleküle in „Lipid Rafts“ zu rekrutieren und spielen somit eine wichtige Rolle in der Neurotransmitter-vermittelten Signaltransduktion. Diese Mikrodomänen könnten Signalmoleküle räumlich organisieren, um kinetisch bevorzugte Proteininteraktionen zu ermöglichen, die notwendig sind für bestimmte Signaltransduktionsvorgänge. Im Gegensatz dazu könnten diese Mikrodomänen Signalmoleküle auch separieren, um Proteininteraktionen zu inhibieren und somit Antworten in Signalwegen zu dämpfen (Allen *et al.*, 2006).

Die Behandlung mit MCD, und somit die Reduktion des Sterolgehaltes, genauso wie die Bereitstellung von Cyclodextrin-Cholesterolkomplexen, was zu einer Anreicherung von Sterolen führt, ermöglichte es die Effekte von Sterolgehaltveränderungen in Membrandomänen zu analysieren (Christian *et al.*, 1997). MCD-Behandlung beeinflusst nicht nur die Cholesterolkonzentration, sondern unterdrückt auch die Endozytose, vermittelt durch Clathrin-beschichtete Vesikel (CCVs). Die Formation von CCVs und ihre Abspaltung von der Plasmamembran sind abhängig von Cholesterol. Nach Sterolreduktion konnte keine Krümmung der Vesikel mehr beobachtet werden (Subtil *et al.*, 1999). Signalprozesse auf der zellulären Ebene beziehen sich auf alle Prozesse bei denen Zellen eine Signalform oder einen Stimulusart in eine andere umwandeln. Die Bewegungen von Signalen oder Stimuli können sehr einfach sein, so wie die von Rezeptormolekülen. Kompliziertere Signalprozesse setzen die Verknüpfung von Liganden-Rezeptorinteraktionen mit vielen intrazellulären Ereignissen voraus. Die Ereignisse beinhalten Phosphorylierungen durch Tyrosinkinassen und/oder Serin/Threoninkinassen (King, 2013). Die Spezifikation und die Genauigkeit von Signalprozessen sind essentiell für Zellen, um effizient auf sich ändernde Umweltverhältnisse reagieren zu können. Dies wird zum Teil durch die unterschiedlichen Lokalisationen und Kompartimentalisierungen, der in Signalprozessen beteiligten Proteine bewerkstelligt. In der Plasmamembran, wird diese Kompartimentalisierung

durch „Lipid Rafts“ bewerkstelligt (Janes *et al.*, 2000). Individuelle Rezeptoren sitzen in kleinen „Rafts“, welche nach Ligandenbindung örtlich konzentriert werden können (Schmitz und Grandl, 2008). Werden Rezeptoren, die in „Lipid Rafts“ sitzen, aktiviert, können diese durch ihre Lokalisierung vor degradierenden Enzymen (z.B. Membranphosphatasen), welche sich außerhalb der „Rafts“ befinden, geschützt werden. Die Assoziation bestimmter Proteine mit Membrandomänen und somit mit einer neuen Mikroumgebung, bewirkt, dass der Phosphorylierungsstatus dieser Proteine modifiziert wird und somit für andere Signalprozesse zur Verfügung stehen kann (Simons und Toomre, 2000). „Lipid Rafts“ sind im tierischen System beteiligt an vielen Signalprozessen wie Immunoglobulin-E-Signalprozessen, an T- und B-Zell vermittelten Signalprozessen und an vielen anderen.

### 1.1.4.7.1 „Lipid Rafts“ und Krankheiten

Viren als obligate intrazelluläre Parasiten müssen, um in die Wirtszelle eindringen zu können, spezifisch mit zellulären Rezeptoren auf der Plasmamembran interagieren. Zahlreiche Beweise existieren, dass Viren durch bestimmte Membrandomänen in ihre Wirtszellen eindringen können.

#### 1.1.4.7.1.1 Viren ohne Hülle

Die am besten analysierten Modelle von, durch „Lipid Rafts“ in Wirtszellen eindringende unbehüllte Viren, sind der Simian-Virus 40 (SV40) und der Echovirus 1 (EV1). Der Virus SV40 benutzt zwei verschiedene Rezeptoren, um an die Zelloberfläche zu binden: Das Gangliosid GM1, welches in „Lipid Rafts“ lokalisiert ist und der Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse I (MHC; Chazal und Gerlier, 2003; Pietiäinen *et al.*, 2005). Die Bindung von SV40 mittels MHC bewirkt die geclusterte Anordnung von Rezeptoren auf der Plasmamembran und kann mehr Caveolae aus dem Zytoplasma an die Plasmamembran rekrutieren oder bewirken, dass neue Caveolae an der Stelle der Membran gebildet werden, an der der Virus gebunden hat. Anschließend bewirkt eine Kaskade von Virus-induzierten Signalen eine Caveolae-vermittelte Endozytose, also Einschleusung des Virus in die Wirtszelle, innerhalb von nicht einmal 20 min. In einigen Zelltypen kann der Virus SV40 direkt in Caveosomen, das sind präexistierende Organellen, reich an Caveolin-1 und „Lipid Raft“-Bestandteilen, über diese „Lipid Rafts“ eindringen (Pietiäinen *et al.*, 2005). EV1 benutzt das Integrin  $\alpha 2\beta 1$  als zellulären Rezeptor. Ähnlich wie beim SV40, können Anheftung und Bindung des Virus an die Wirtszellen zu einer Clusterung und Verlagerung von Integrinmolekülen von den „Lipid Rafts“ zu Caveolae-ähnlichen Strukturen führen. Die Entfernung von Cholesterol führt zu einer inhibierten EV1-Infektion. Es gibt auch zahlreiche Viren, die einen Infektionsweg, ausschließlich über Membrandomänen und nicht über Caveolae nutzen,

so wie der Echovirus 11 (Chazal und Gerlier, 2003). Wirklich ausführliche Details zu solchen Infektionswegen fehlen aber bisher noch immer.

#### 1.1.4.7.1.2 Viren mit Hülle

Der Influenzavirus A bindet an Sialinsäurerezeptoren, welche mit Glykokonjugaten auf der Zelloberfläche verknüpft sind, wodurch die Endozytose des Virus initiiert wird. Nach dem Transport des Virus in das späte Endosom, bewirkt ein niedriger pH-Wert eine Konformationsveränderung des Glycoproteins Hämagglutinin (HA) und eine Fusion mit der Endosomenmembran führt zu einer Freisetzung von Ribonukleinsäurekomplexen, durch Protoneneinstrom über den viralen Ionenkanal. Für die Fusion mit der Endosomenmembran wird unter anderem Cholesterol benötigt. Der Semliki-Forest-Virus (SFV) und der Sindbis-Virus (SIN) benötigen das Cholesterol und die Sphingolipide in den „Lipid Rafts“ der Zielmembranen um über ihre Hülle mit der Wirtszelle fusionieren und in diese eindringen zu können (Rawat *et al.*, 2003). Der Ebolavirus und der Marburg-Virus benutzen den Folsäurerezeptor  $\alpha$ , ein GPI-verankertes Protein, als zellulären Rezeptor. Der Hepatitis-B-Virus erkennt den menschlichen CD21-Rezeptor. Der Herpesvirus-6 bindet an den CD46-Rezeptor auf der Plasmamembran der Wirtszelle. All diese Rezeptoren sind in „Lipid Rafts“ lokalisiert oder werden nach Infektion in diese verschoben.

Der Humane Immundefizienz-Virus (HIV) ist ein Virus, der eine Barriere aus endothelialen Zellen, die keine Chemokinrezeptoren exprimieren, passieren muss um eine produktive Infektion zu begründen. Ein alternativer Rezeptor der Epithelzellen für die Glykoproteine aus denen die Virenhülle besteht, ist das Glykosphingolipid Galaktosylceramid, welches in „Lipid Rafts“ angereichert ist (Campbell *et al.*, 2001). Mit Hilfe solcher Informationen konnten bereits wirksame antivirale Therapeutika, die zum Beispiel die Biosynthese von Cholesterol inhibieren können, entwickelt werden.

#### 1.1.4.7.2 „Raft“-Größe

Untersuchungen im tierischen System geben unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Größe von „Rafts“. Mittels der SDT-Methode, mit der man fluoreszent markierte, gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuremoleküle nachverfolgen kann, um lipidspezifische Membrandomänen zu analysieren, konnte festgestellt werden, dass gesättigte Lipide 100-fach definiert in kleinen „Raft“-ähnlichen Bereichen lokalisieren und einfach ungesättigte Lipide frei in der Membran diffundieren und keine abgegrenzte Lokalisierung zeigen (Schütz *et al.*, 2000). Diese Tatsache bestätigt die generelle Annahme, dass ungesättigte Phospholipide aus „Lipid Rafts“ ausgeschlossen sind (Simons und Ikonen, 1997). Die in der tierischen Plasmamembran beobachteten „Raft“-ähnlichen

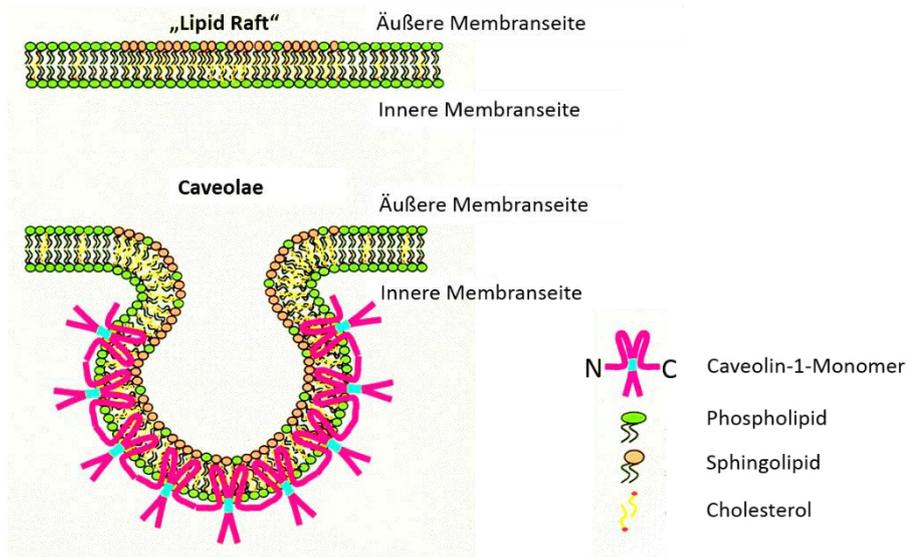
Domänen, die reich an gesättigten Lipiden waren, zeigten eine Größe von durchschnittlich 0,7µm, bedeckten etwa 13% der Membranoberfläche und zeigten eine gewisse räumliche und temporale Dynamik. Eine freie Diffusion dieser „Raft“-ähnlichen Domänen konnte hingegen nicht beobachtet werden. Lediglich unidirektionale Bewegungen, die in einer Auflösung von älteren und einer Etablierung von neuen Domänen an einer anderen fixen Position resultierten, konnten beobachtet werden. Die Einschränkung der freien Mobilität von „Raft“-ähnlichen Domänen ist dabei abhängig vom Zytoskelett (Jacobson und Dietrich, 1999).

### 1.1.4.7.3 Caveolae

Caveolae wurden in den 1950er Jahren entdeckt. Es sind kleine (50-100nm große), sack-, oder flaschenförmige Einstülpungen der Plasmamembran und eine spezielle Form der „Lipid Rafts“ (Yamada *et al.*, 1955). Sie sind stabil und morphologisch einfach, via mikroskopischer Techniken, zu reorganisieren (Harder und Simons, 1997). Die wichtigsten Proteine in den Caveolae sind die Caveoline (Rothberg *et al.*, 1992). Caveoline sind Proteine mit einer Molekülmasse zwischen 22 und 24kDa, mit N- und C-terminalen hydrophilen Domänen, lokalisiert im Zytosol und einer hydrophoben Intermembrandomäne im Zentrum des Proteins, welche der Oligomerisierung der Caveolinmonomere zu Homooligomeren aus 14 bis 16 Monomeren dient (Okamoto *et al.*, 1998). Beide zytoplasmatische Termini zeigen posttranslationale Modifikationen: Der C-Terminus ist palmitoyliert und der N-Terminus zeigt einen Phosphotyrosinrest (Abbildung 1.8). Am besten ist das Caveolin-1 untersucht worden. Es wird als Markerprotein der Cavolae in unterschiedlichen Zelltypen angesehen. Caveolin-1 stellt einen hochmolekularen Komplex dar, interagiert mit Caveolin-2 und ist am stärksten in Fibroblasten, Endothelzellen, Pneumozyten vom Typ I und in Fettzellen (Adipozyten) exprimiert. Caveolin-3 wird ausschließlich in Muskelzellen exprimiert (Cohen *et al.*, 2004).

Die Verwendung von gekürzten und fluoreszent markierten Varianten von Caveolin-1 offenbarte eine 20 Aminosäuren-lange N-terminale Membranbindedomäne, welche für die korrekte Lokalisation der Caveolin-1-Proteine in den Caveolae notwendig ist (Cohen *et al.*, 2004). Ein hoher Anteil an Cholesterol und Sphingolipiden wird für die korrekte Proteinlokalisierung in den Caveolae benötigt. Der Cholesterolanteil in den Caveolae beträgt 30%. Damit die Caveolinproteine in die Plasmamembran eingebaut werden können, ist ein bestimmter Cholesterolgehalt notwendig. Das Protein Caveolin-1 ist in der Lage Cholesterol vom ER zur Plasmamembran zu transportieren. Die Expression der drei verschiedenen Caveolinproteine ist auf transkriptioneller Ebene stark durch den Cholesterolgehalt der Plasmamembran und von Sterol-bindenden Promoterelementen reguliert (Okamoto *et al.*, 1998). Die Reduktion von Cholesterol in den Caveolae mittels MCD hat dramatische Veränderungen der Aktivierungszustände bestimmter Signalmoleküle zur Folge (Furuchi und Anderson, 1998). Die Inklusion von Proteinen in

Caveolae ist weiterhin abhängig von deren Acetylierungsstatus. Zum Beispiel wird die endothelial lokalisierte Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) ausschließlich in Caveolae lokalisiert, wenn sie zuvor myristoyliert und palmitoyliert wurde (Shaul *et al.*, 1996).



**Abbildung 1.8: Organisation von „Lipid Rafts“ und Caveolae**

„Lipid Rafts“ sind reich an Cholesterin und Sphingolipiden. Caveolin-1-Monomere formieren sich zu Homooligomeren bestehend aus 14 bis 16 Caveolinmolekülen. Die Homooligomere ordnen sich Seite an Seite in der Caveolaemembran an und ergeben somit das Netzwerk für die Membraneinstülpung. Die Caveolinmonomere sind in rosa dargestellt und die Oligomerisierungsdomänen in hellblau. (Abbildung modifiziert, © Cell; Galbiati *et al.*, 2001)

Viele Lipid-verankerte Proteine, vor allem GPI-verankerte Proteine, werden von Cholesterin und Sphingolipiden in die Caveolae gezogen (Harder und Simons, 1997). Einige Signalkomplexe sind in der Caveolaemembran bereits vorgefertigt vorhanden. So sind bereits alle Mitglieder eines bestimmten MAP (Mitogen-aktiviertes Protein)-Kinase-Signalweges in den Caveolae von unstimulierten Fibroblasten (verantwortlich für die Bildung der extrazellulären Matrix in Tieren) vorhanden. Erfolgt dann die Stimulierung der Zellen, in diesem Falle durch einen Wachstumsfaktor („Platelet-Derived Growth Factor“ (PDGF)), der von Blutplättchen nach einer Verletzung freigesetzt wird, wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt und die MAP-Kinase in den Caveolae aktiviert. Gibt man den Faktor PDGF zu isolierten Caveolae, wird diese Signalkaskade ebenfalls aktiviert. Aus diesem Grund muss man annehmen, dass alle beteiligten Elemente, die zu einer Aktivierung der MAP-Kinase führen, bereits von Anfang an in den Caveolae sitzen (Liu *et al.*, 1997).

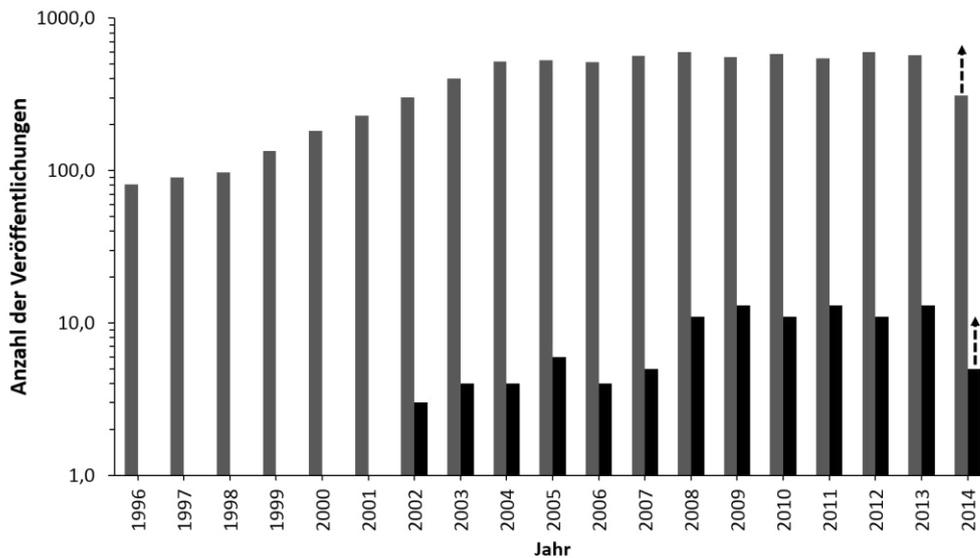
Auch die Mitglieder der GTP-bindenden Ras-Proteinfamilie sind in Caveolae lokalisiert. Für die dynamische Lokalisierung von H-Ras in Caveolae und „Lipid Rafts“ ist dessen Palmitoylierung und Farnesylierung notwendig. Nach der Bindung von GTP ändert es seine Proteinkonformation und dissoziiert aus den „Rafts“ in die umgebende

Plasmamembran. Das so aktivierte H-Ras-GTP kann nun ein Effektorprotein, die Raf1-Kinase binden und so im MAP-Kinase-Signalweg teilnehmen (Prior *et al.*, 2001). Nicht nur Signalproteine sind in den Caveolae endothelialer Zellen lokalisiert, sondern auch Transportproteine wie der Anionenkanal VRAC („Volume Regulated Anion Channel“), der nicht nur an der Regulation des Zellvolumens, sondern auch an Proliferations- und Angiogeneseprozessen beteiligt ist (Trouet *et al.*, 2001b). Zusammenfassend lassen sich Caveolae als hoch spezialisierte, stabile, mikroskopisch visualisierbare, Cholesterol-, Sphingolipid- und GAP-reiche Einstülpungen der tierischen Plasmamembran definieren, in denen Signal- und Transportkomplexe bereit gehalten werden. Im pflanzlichen System gibt es zu den Caveolae leider keine äquivalenten Membranstrukturen.

Kurz zusammengefasst lässt sich festhalten, dass im tierischen System diverse wichtige Signaltransduktions- und Transportprozesse mit der Formation von „Lipid Rafts“ und/oder der Bereitstellung von Signalkomponenten in speziellen Membrandomänen, welche durch das Zytoskelett organisiert werden, verknüpft sind (Brown, 2006; Gupta *et al.*, 2006; Holowka *et al.*, 2000; Xavier *et al.*, 1998). Auch die Aktivität von Anionenkanälen wird durch Lipid-Protein-Interaktionen in „Lipid Rafts“ reguliert (Martens *et al.*, 2000; Eroglu *et al.*, 2003).

### 1.1.4.8 „Lipid Rafts“ in Pflanzen

Im pflanzlichen System wurden „Lipid Rafts“ bisher nicht so ausführlich untersucht und charakterisiert wie im tierischen System, was sich an der Anzahl der bisher publizierten Arbeiten deutlich zeigt (Abbildung 1.9). Nach der Isolierung von DRMs aus *Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis thaliana* mittels Triton X-100, konnte gezeigt werden, dass diese DRMs eine, dem tierischen System ähnliche, Proteinzusammensetzung aufweisen. Genau wie DRMS, isoliert aus tierischen Membranen, waren sie angereichert mit Signal-, Transfer- und Transportproteinen (Peskan *et al.*, 2000). Bei den strukturellen Hauptkomponenten in tierischen Membrandomänen handelt es sich um Cholesterol und Sphingomyelin. Da Cholesterol in pflanzlichen Plasmamembranen keine wichtige Rolle spielt, wird es in pflanzlichen Membrandomänen durch die Sterole  $\beta$ -Sitosterol, Campesterol und Stigmasterol ersetzt. Es gibt Experimente, die eine Korrelation zwischen ABA-induzierter Membranpermeabilität und pflanzlichen Sterolen in künstlichen Lipiddoppelschichten belegen. Bestanden diese Modellmembranen aus 5mol%  $\beta$ -Sitosterol und Campesterol, wurde die ABA-induzierte Membranpermeabilität für das fluoreszente Anion Carboxyfluorescein und der Einfluss von ABA auf die Membran stark reduziert. Diese Reduktion der Membranpermeabilität geschieht auf einem ähnlich hohen Niveau wie nach der Zugabe von Cholesterol. Anhand dieser Beobachtungen lässt sich schließen, dass pflanzliche Sterole in der Plasmamembran die Wirkung des Phytohormons ABA beeinflussen (Stillwell *et al.*, 1990).



**Abbildung 1.9: Anzahl der Publikationen über „Lipid Rafts“**

Für jedes Jahr ab 1996 wurde die Anzahl aller Publikationen mit den Themen „Lipid Raft“, „Microdomain“ oder „DRM“ gegen das entsprechende Jahr aufgetragen (graue Balken). Die schwarzen Balken zeigen die Gesamtanzahl aller Veröffentlichungen im pflanzlichen System. Für das Jahr 2014 wurden nur alle bisherigen Veröffentlichungen (Januar bis Juli) aufgezeichnet. Quelle: „ISI Web of Knowledge“ (© Thomas Reuters 2014)

#### 1.1.4.8.1 Die pflanzliche Plasmamembran

Die pflanzliche Plasmamembran weist distinkte Strukturen auf, das sind vor allem solche, die dynamische Proteinkomplexe beinhalten, die als Antwort auf externe Faktoren wie MAMPs („microbe-associated molecular patterns“) und PAMPs („pathogen-associated molecular patterns“), also nach Pathogenbefall (Assaad, *et al.*, 2004) und der Aktivierung des FLS2-Rezeptors (Chinchilla *et al.*, 2007), angeordnet werden. Wenn das Bakterium *Pseudomonas syringae* eine Pflanze befällt, wird der  $\beta$ -Sitosterolanteil der pflanzlichen Plasmamembran gesenkt und der Anteil an Stigmasterol wird erhöht. Dadurch wird die Zugänglichkeit für Pathogene erhöht (Griebel und Zeier, 2010). Diese Fähigkeit zur Veränderung der Membranzusammensetzung ermöglicht es Pathogenen also erfolgreich eine Pflanzenzelle zu befallen. Zahlreiche Proteomanalysen wurden durchgeführt um den Aufbau der pflanzlichen Plasmamembran zu untersuchen und zu charakterisieren (Alexandersson *et al.*, 2004; Marmagne *et al.*, 2004, 2007; Nelson *et al.*, 2006). Dabei waren einige Analysen eher auf GAPS fokussiert (Borner *et al.*, 2003; Elortza *et al.*, 2003, 2006) und andere auf die Identifikation von Phosphoproteinisoformen (Nühse *et al.*, 2003, 2004). All diese Studien konnten zeigen, dass auch die pflanzliche Plasmamembran reich an Signal-, Transfer- und Transportproteinen ist und somit ein wichtiges Portal für Molekül- und Signalweitergabe darstellt. Auch die GPI-verankerten Proteine finden sich stark angereichert in der extrazellulären Schicht der pflanzlichen Plasmamembran. Diese Tatsache findet sich auch in tierischen Plasmamembranen, dennoch geht man davon aus,

dass GPI-verankerte Proteine keine wichtige Rolle in Signalprozessen in Pflanzen spielen (Sherrier *et al.*, 1999).

#### 1.1.4.8.2 Organisierung der pflanzlichen Plasmamembran

In den Siebzellen von Pflanzen lokalisiert der native Saccharosetransporter SUT1 in der Plasmamembran in Form eines punktierten Musters. Man geht davon aus, dass die Redox-abhängige Dimerisierung und die Membrandomänenlokalisierung von SUT1 der Regulierung des Zuckertransportes dient (Krügel *et al.*, 2008). Der Kaliumkanal KAT1 bildet geordnete Cluster, die in der Plasmamembran von Blattepidermiszellen zufällig verteilt sind und in den Schließzellen radial angeordnete, lineare Domänen formen. KAT1-Cluster zeigen einen hohen Grad an positioneller Stabilität und sind deshalb womöglich mit anderen zellulären Strukturen verknüpft (Sutter *et al.*, 2006). Die linearen Membrandomänen in Schließzellen sind abhängig vom Zellinnendruck, da gezeigt werden konnte, dass sie unter hypotonen Bedingungen verschwinden. Die Orientierung von KAT1-Domänen geht mit der Orientierung von Zellulosefibrillen und der kortikalen Anordnung von Mikrotubuli einher. Das lässt eine Interaktion zwischen KAT1 und der Zellwand, oder dem kortikalen Mikrotubulsystem vermuten (Homann *et al.*, 2007). Das Aquaporin PIP2 ist ein weiteres pflanzliches Protein, von dem gezeigt werden konnte, dass es in Clustern in der Plasmamembran exprimiert wird (Li *et al.*, 2011). Jedes der Cluster besteht aus vier Molekülen und es konnte auch zuvor gezeigt werden, dass Aquaporine als Tetramere in der Plasmamembran erscheinen (Törnroth-Horsefield *et al.*, 2006). Unter normalen Bedingungen wird PIP2;1 durch Clathrin-vermittelte Endozytose aus der Plasmamembran entfernt. PIN-Proteine spielen eine wichtige Rolle für die Erhaltung der Zellpolarität durch die Kontrolle und Leitung des Auxinstromes an die Stelle, an der das Wachstum stattfindet. PIN2 lokalisiert in bestimmten Clustern in der Plasmamembran und ist dabei abhängig von der Anwesenheit von Sterolen. Die Mobilität von PIN2 wird dadurch eingeschränkt, was dazu beiträgt, dass dieses Protein fast ausschließlich nur in der apikalen Membran von kortikalen und epidermalen Zellen der Wachstumszone der Wurzel akkumuliert wird (Kleine-Vehn *et al.*, 2011). Spezifische Interaktionen zwischen PINs und Lipiden finden als tropistische Antworten auf einen polaren Hormontransport statt. Geht die Aktivität der Sterolmethyltransferase 1 (SMT1) verloren, wird die Membranlokalisierung von PIN1 und PIN3 so stark verändert, dass schwerwiegende Entwicklungsstörungen der betroffenen Pflanzen, die Folge sind (Willemsen *et al.*, 2003). Die Anordnung von PIN2 in Membrandomänen wird durch die Ausschaltung der Cyclopropylsterolisomerase 1 (CPI1), einem Enzym, welches einen späten Schritt in der Sterolbiosynthese katalysiert, negativ beeinflusst. In dieser Mutante war nicht nur die Lokalisation des Proteins PIN2 in Membrandomänen verhindert, damit einhergehend traten auch weitere Erscheinungen, wie ein eingeschränkter Gravitropismus, auf (Men *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu PIN2 und PIN3 zeigt PIN1 keine intrinsische Affinität zu Sterolen. Um mit der Plasmamembran interagieren zu können,

benötigt es also einen Interaktionspartner. Bei diesem handelt es sich höchst wahrscheinlich um den Auxin-Transporter ABCB19, da PIN1 bei Detergenzbehandlung eine Translokation in DRMs aufweist, wenn der Transporter ABCB19 ausgeschaltet ist (Titapiwatanakun *et al.*, 2009). Die Remorine sind eine weitere Proteinfamilie, die in lokal abgegrenzten Membrandomänen in der Plasmamembran angereichert werden (siehe 1.1.4.8.5).

#### 1.1.4.8.3 Formation von Membrandomänen als Antwort auf die Interaktion mit Mikroorganismen

PEN3 ist ein auswärts gerichteter Transporter für toxische Sekundärmetabolite und ist beteiligt an der pflanzlichen Immunantwort auf den Befall durch Mehltau. Die Lokalisierung von PEN3 wird dabei durch den Befall der Pflanze verändert. Nicht-infizierte Blätter zeigen eine gleichmäßige Verteilung von PEN3 über die gesamte Plasmamembran. Infizierte Blätter zeigen eine lokale Akkumulation von PEN3 an den Infektionsstellen (Stein *et al.*, 2006). An diesen Infektionsstellen konnte, mittels Filipifärbung, auch eine starke Sterolanreicherung der Plasmamembran beobachtet werden (Kobae *et al.*, 2006). Die Immunantwort in Pflanzen basiert auf Proteinkomplexen aus PEN1 (Assaad *et al.*, 2004), PEN2, PEN3, VAMP722 und weiteren Adapterproteinen, die an der Infektionsstelle akkumuliert werden (Lipka *et al.*, 2008). Dabei erkennt PEN1 die Pathogene, PEN2 dient der Produktion von antimikrobiellen Verbindungen und PEN3 schleust die toxischen Metabolite aus der Zelle aus. Ein weiterer Fall, bei dem Liganden- oder Pathogen-induzierte Endozytose von Rezeptoren zu der Formation von Membrandomänen führt, ist zu beobachten, wenn der Elicitor flg22 (einem 22 Aminosäuren langem Fragment des konservierten N-Terminus des bakteriellen Flagellins) an den Rezeptor FLS2 auf der pflanzlichen Plasmamembran bindet. Die Akkumulation des flg22/FLS2-Komplexes, zusammen mit Proteinen der Endozytosemaschinerie, findet also in definierten Membrandomänen statt (Robatzek *et al.*, 2006). Durch Nutzung der Transmissions-elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass nach Behandlung von kultivierten Tabakzellen (BY2-Zellen) eine spezifische Stimulation der Formation von Clathrin-beschichteten Membranausstülpungen zu beobachten war. Dieser Prozess ist abhängig von der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch die klar in Membrandomänen lokalisierte NADPH-Oxidase NtrbohD (siehe 1.2.1.2.4.2; Leborgne-Castel *et al.*, 2008).

#### 1.1.4.8.4 Der Stand der bisherigen DRM-Forschung

Jedes Jahr werden bis zu 1000 Publikationen über die Bedeutung von „Lipid Rafts“ im tierischen System veröffentlicht. Vor allem über Membrandomänen als Eintritts- und Infektionsstellen für Viren (z.B. HIV) in tierische Zellen (Nisole *et al.*, 2002). Die Anzahl der Publikationen, die sich mit den „Lipid Rafts“ im pflanzlichen System beschäftigen, ist eher gering (siehe Tabelle 1.3). Dennoch wächst das Verständnis über pflanzliche Membrandomänen stetig. Zum Beispiel durch die Identifikation von spezifischen „Raft“-Markern (siehe 1.1.4.8.5), durch die detaillierte Analyse von pflanzlichen DRMs auf ihren Sterolgehalt hin und die Proteinkomposition von pflanzlichen DRMs gegenüber der Applikation von abiotischem und biotischem Stress.

Die ersten Untersuchungen zu pflanzlichen DRMs und Membrandomänen wurden erst zu Beginn des 21. Jahrhunderts durchgeführt. Ein G-Protein gekoppelter Rezeptor wurde in Triton X-100-isolierten DRMs identifiziert (Peskan *et al.*, 2000). Nach diesen ersten Beweisen für die Existenz von DRMs in Pflanzen, wurden zahlreiche Proteomanalysen in Tabakpflanzen durchgeführt. Dabei wurden, zum Beispiel, die Proteine NtRac5 und die NADPH-Oxidase NtrbohD identifiziert, welche nach Triton X-100-Behandlung von DRMs, stark angereichert waren. Weiterhin konnte die Lipidkomposition von pflanzlichen DRMs untersucht und gezeigt werden, dass das Protein StRem1.3 in der Kartoffel *Solanum tuberosum* in Triton X-100-isolierten DRMs lokalisiert ist. Ebenfalls konnte bestätigt werden, dass pflanzliche DRMs, genau wie tierische DRMs, mit Sphingolipiden und Sterolen angereichert und arm an ungesättigten Phospholipiden sind (Mongrand *et al.*, 2004).

Es wurden unterschiedliche Detergenz-Proteinverhältnisse ausgetestet, um das optimale Verhältnis herauszufinden, bei dem eine maximale Anreicherung von Sphingolipiden und Sterolen und eine maximale Reduktion von Phospholipiden in den isolierten DRMs erreicht werden konnte. Eine doppelte Anreicherung von Sphingolipiden und Sterolen, eine 50%ige Verringerung von Phospholipiden und ein gerade noch akzeptabler Verlust von DRM-Proteinen, wurden erzielt mit einem Detergenz-Proteinverhältnis von 15:1 (w/w). Dieses Detergenz-Proteinverhältnis wurde indes für die Isolierung und Untersuchung von pflanzlichen DRMs festgelegt (siehe 2.11.4.2, Seite 102; Mongrand *et al.*, 2004). Erste tiefgehende Analysen des Proteingehaltes von Triton X-100-isolierten DRMs von *Arabidopsis thaliana*-Kotyledonen offenbarten eine Anreicherung bestimmter Signalproteine, Leucin-reicher Proteinkinasen,  $\beta$ -Untereinheiten von heterotrimeren G-Proteinen und GTP-bindende Proteine. Eine ähnliche Proteinzusammensetzung weisen tierische DRMs auf (Shahollari *et al.*, 2004). In einer weiteren Studie konnte bestätigt werden, dass pflanzliche Membrandomänen mit Phytosterolen und Sphingolipiden angereichert sind und die Isolation von DRMs aus *Arabidopsis*-Calli mittels Triton X-100 zeigte eine Anreicherung von GPI-verankerten Proteinen, P-Typ-ATPasen (Typ 2), MDR- („Multidrug Resistance“) Proteinen, ein Pflanzenhomologon zu Flotillin und Proteine der Stomatinfamilie (Borner *et al.*, 2005). Die erste quantitative Analyse von *Arabidopsis*-

DRMs mit besonderer Betrachtung der Sterolabhängigkeit, offenbarte eine Kollektion an stark sterolabhängigen Proteinen. Die, aus kultivierten Zellen von *Arabidopsis thaliana*, isolierten Plasmamembranen wurden dafür mit 30mM MCD behandelt. Dabei konnte gezeigt werden, dass MCD nicht nur die Cholesterolkonzentration in den Pflanzenmembranen, sondern auch die Konzentration der Phytosterole Campesterol,  $\beta$ -Sitosterol und Stigmasterol in konzentrationsabhängiger Weise reduzieren kann. Unter den Proteinen, die durch MCD-Behandlung entfernt wurden, befanden sich GPI-verankerte Proteine, genau wie es auch in tierischen Membrandomänen der Fall ist. Die betreffenden GAPs, zum Beispiel AtSku5, dienen unter anderem der Verankerung mit der Zellwand (Kierszniowska *et al.*, 2008).

Andere Proteine, die durch die Behandlung mit MCD betroffen waren, sind die Remorine AtRem1.2 und AtRem1.3 aus *Arabidopsis thaliana*. Auch Signalproteine wurden durch MCD-Behandlung aus der Plasmamembran entfernt, allerdings zu einer geringeren Konzentration. Daraus lässt sich schließen, dass Signalproteine eher dynamische DRM-Komponenten sind (Kierszniowska *et al.*, 2008). Eine folgende Proteomanalyse wurde durch die Markierung von DRM-Proteinen mit  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  durchgeführt um den Effekt von Cryptogein auf DRMs aus BY2-Zellen zu analysieren (Stanislas *et al.*, 2009). Cryptogein ist ein niedermolekulares Protein aus dem Pilz *Phytophthora*, welches in DRMs von *Nicotiana tabacum* eine hypersensitive Antwort auf Pathogene, durch Aktivierung der, ebenfalls in DRMs lokalisierten NADPH-Oxidase NtrbohD, bewirkt (Simon-Plas *et al.*, 2002). Die besagte Oxidase ist stark von der Sterolkomposition der DRMs abhängig (Roche *et al.*, 2008) und ist verantwortlich für die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, als Reaktion auf die Behandlung mit Cryptogein (Simon-Plas *et al.*, 2002).

Pflanzliche Membrandomänen haben im Großen und Ganzen eine ähnliche Proteinzusammensetzung wie ihre tierischen Gegenstücke (Abbildung 1.5). Jedoch können sie im Durchschnitt mehrere hundert Nanometer groß sein und sind somit deutlich größer als „Rafts“ in tierischen Plasmamembranen. Ein weiterer Unterschied ist, dass pflanzliche „Rafts“ in ihrer Lokalisierung und Zusammensetzung generell sehr stabil sind (Malinsky *et al.*, 2013). Aus diesen beiden genannten Gründen sollten Membrandomänen im pflanzlichen System nicht als „Rafts“ oder „Lipid Rafts“ bezeichnet werden, denn dieser Begriff, der mit „Floß“ zu übersetzen ist, impliziert eine gewisse Dynamik der angesprochenen Membranbereiche. Daher eignet sich der Begriff „Mikrodomäne“ besser um Membrandomänen in pflanzlichen Plasmamembranen zu beschreiben (Tanner *et al.*, 2011).

Kurze Inhaltszusammenfassung	Studienobjekt	Referenz
$\beta$ -Untereinheit von heterotrimerem G-Protein ist lokalisiert in DRMs	<i>N.t.</i> Blätter	Peskan <i>et al.</i> , 2000
Proteomanalyse bestätigt Anreicherung bestimmter Proteine in DRMs	<i>N.t.</i> Blätter	Mongrand <i>et al.</i> , 2004
Signalproteine sind in DRMs angereichert	<i>A.th.</i> Kotyledonen	Shahollari <i>et al.</i> , 2004
Erste profunde Analyse der Lipidkomposition von DRMs	<i>A.th.</i> Callus Membran	Borner <i>et al.</i> , 2005
Eine Rezeptorkinase akkumuliert in DRMs als Reaktion auf Pathogene	<i>A.th.</i> Keimlingwurzeln	Shahollari <i>et al.</i> , 2005
145 DRM-Proteine wurden durch eine Proteomanalyse identifiziert	<i>N.t.</i> BY-2-Zellen	Morel <i>et al.</i> , 2006
DRMs zeigen eine Anreicherung von Sterolen, Sterylglukosiden und Glukosylceramiden	<i>A.th.</i> und <i>A.p.</i> ( <i>Allium porrum</i> ) Keimlinge	Laloi <i>et al.</i> , 2007
Remorine sind pflanzenspezifische Proteine mit Coiled-coil-Domänen	div. Pflanzen	Raffaele <i>et al.</i> , 2007
Quantitative DRM-Analyse nach MCD-Behandlung	<i>A.th.</i> Zellkultur	Kierszniowska <i>et al.</i> , 2008
MCD-Behandlung reichert Membransterole zu etwa 50% ab und bewirkt eine Umverteilung von NtrbohD aus den DRMs	<i>N.t.</i> BY-2-Zellen	Roche <i>et al.</i> , 2008
Kältebehandlung senkt die DRM-Ausbeute und Proteinexpression	<i>A.th.</i> Keimlinge	Minami <i>et al.</i> , 2009
Quantitative Analyse nach Elicitorbehandlung zeigt stärkere Anwesenheit von 14-3-3-Signalproteinen	<i>N.t.</i> BY-2-Zellen	Stanislas <i>et al.</i> , 2009
Erster Signalkomplex und seine funktionelle Regulation in Membrandomänen	<i>A.th.</i> und <i>N.t.</i>	Demir <i>et al.</i> , 2013

**Tabelle 1.3: Zusammenfassung der bisherigen DRM-Forschung**

#### 1.1.4.8.5 Membrandomänenmarker

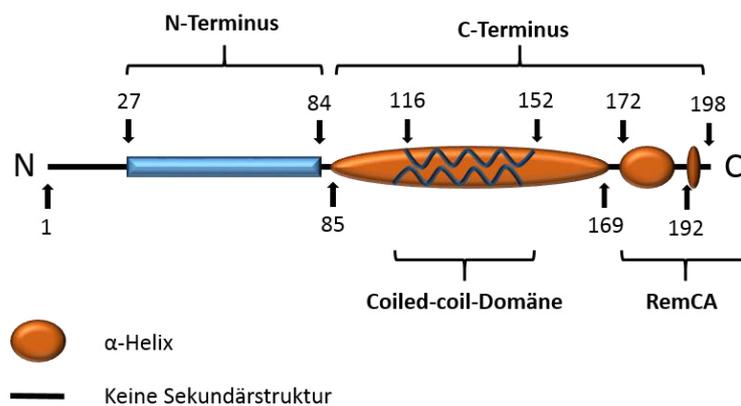
Im Gegensatz zu den vielen bereits bekannten „Lipid Raft“-Marker im tierischen System (z.B. Src-Kinasen, Caveolin-1, Flotilline), waren lange Zeit keine Membrandomänenmarker im pflanzlichen System bekannt. Während der letzten Jahre aber, offenbarte sich eine Familie von pflanzenspezifischen Proteinen, die Remorine, als Domänenmarker in Pflanzen. Das erste Remorin wurde zuerst als unspezifisches, Lysinreiches DNA-bindendes Protein in *Arabidopsis thaliana* identifiziert, welches Auxin-induziert nach 8h 10-fach höher exprimiert war (Alliotte *et al.*, 1989). Dieses besagte Protein, heute unter dem Namen AtRem1.3 bekannt, zeigte aufgrund seiner stark geladenen Proteinstruktur ein verändertes Laufverhalten auf SDS-Gelen. Wegen seinem hohen Glutamat- und Lysinanteil, lief das Protein bei geschätzten 36kDa, statt bei 21kDa,

die seinem Molekulargewicht entsprechen. Die Expression von AtRem1.3 (At2g45820) konnte durch Verwundung und Dehydrierung gesteigert werden (Reymond *et al.*, 2000). Spätere Experimente, durchgeführt an der Kartoffel *Solanum tuberosum* identifizierten das Protein pp34 als ein Plasmamembran-assoziiertes Protein, welches an viraler Verbreitung in Pflanzen beteiligt zu sein scheint (Reymond *et al.*, 1996). Dieses Protein bindet Galacturonide und besitzt mehrere Phosphorylierungsstellen in Form von Threoninresten (Jacinto *et al.*, 1993). Auch dieses Protein migrierte auf SDS-Gelen verändert im Vergleich zu seinem Molekulargewicht von 34kDa, genau wie das Proteinaus *Arabidopsis*. Beide Proteine, AtRem1.3 und pp34 zeigen eine Proteinidentität von 67%, einen vergleichbar hohen Glutamat- und Lysinanteil und einen Prolin-reichen N-Terminus. Da das Kartoffelprotein pp34 trotz fehlenden Transmembrandomänen mit der Plasmamembran interagiert, wurde es in Anlehnung an den Fisch *Remora remora*, welcher sich an andere größere Fische festsaugt, als **Remorin** benannt (Reymond *et al.*, 1996). Als Funktion nahm man damals die Bindung von Oligogalacturoniden an, die strukturelle und regulatorische Bestandteile der extrazellulären Matrix von Pflanzen sind. Weitere Untersuchungen identifizierten ein Remorin aus der Tomate *Solanum lycopersicum*, als Coiled-coil-Strukturen bildendes, oligomeres und filamentöses Protein (Bariola *et al.*, 2004). Coiled-coil-Domänen ermöglichen Protein-Protein-Interaktionen (Kohn *et al.*, 1997). Die Expression des Remorins in der Tomate war besonders hoch in apikalen Geweben, in Blattknospen und vaskulären Geweben. Die Immunlokalisation des Remorins in der Wurzelspitze der Tomate zeigte eine Expression in klar abgegrenzten Membrandomänen, die denen in der tierischen Plasmamembran ähnelten. Man nimmt an, dass diese Strukturen oligomerisierte Remorinproteine darstellen.

Im Jahr 2004 konnte das zuvor erwähnte Remorin der Kartoffel, das als StRem1.3 (P93788) benannt wurde, als ein Bestandteil von, mit Triton X-100 isolierten, DRMs bestätigt werden (Mongrand *et al.*, 2004). Dies bestätigt, dass Remorine im pflanzlichen System in Membrandomänen lokalisiert sind. Weitere Beweise dafür wurden durch Proteomanalysen von DRMs aus *Arabidopsis*-Keimlingen (Shahollari *et al.*, 2004) und Zellkulturen (Kierszniowska *et al.*, 2008) gewonnen. Die Remorine werden auch in der Plasmamembran von Reispflanzen durch Salzstress angereichert (Malakshah *et al.*, 2007). In quantitativen Proteomanalysen konnte AtRem1.3 als ein DRM-Protein identifiziert werden, welches durch Akklimatisierung an Kältestress, stark hochreguliert wird (Minami *et al.*, 2009). Microarray-Analysen zeigten eine starke Induktion von AtRem1.3 durch Trockenstress (Bray *et al.*, 2002) und Pathogenbefall (Journot-Catalino *et al.*, 2006). Ein Hefe-2-Hybridscreen zeigte eine direkte Interaktion von AtRem1.3 mit dem Genregulator ARR4, welcher durch die Phytohormone ABA und Cytokinin induziert wird (Yamada *et al.*, 1998). Zusammengefasst bedeutet das, dass das Protein AtRem1.3 vorrangig an Stressantworten und Signaltransduktionsvorgängen beteiligt sein könnte.

Das Remorin der Kartoffel, StRem1.3 interagiert laut einem Hefe-2-Hybridscreen mit dem Kartoffelvirus X („Potatoe Virus X“, PVX) und ist auch mit diesem in der Plasmamembran und in Plasmodesmata kolokalisiert. Die physiologische Funktion des StRem1.3 scheint die zu sein, dass es die Ausbreitung von viralen Mobilitätsproteinen des PVX über Plasmodesmata unterbindet und somit an der Regulation von Pflanzen-Pathogen-Interaktionen beteiligt ist (Raffaele *et al.*, 2009a). Für die Verankerung von StRem1.3 an der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran dient eine C-terminale Domäne mit einer Länge von 28 Aminosäuren. Diese wird RemCA genannt (Abbildung 1.10). Diese Domäne nimmt in polaren Umgebungen eine  $\alpha$ -helikale Konformation an und bindet dann direkt an Lipide und biologische Membranen. Dabei hat die RemCA-Domäne eine höhere Affinität zu negativ geladenen Lipiden, die besonders in Membrandomänen abundant sind. Verschiedene Mutationen dieser Domäne haben gezeigt, dass StRem1.3 dann nicht mehr an die Plasmamembran binden kann und die Funktion von StRem1.3, die Ausbreitung des PVX-Virus zu unterdrücken, verloren geht (Perraki *et al.*, 2012).

### StRem1.3 (P93788)



### Abbildung 1.10: Proteinstruktur von StRem1.3

Alle Remorine (zumindest die zur Familie 1b gehörigen, Raffaele *et al.*, 2007) besitzen einen prolinreichen N-Terminus und C-terminale Coiled-coil-Domänen. Die RemCA-Domäne dient der Verankerung in der Plasmamembran. Die Remorine aus *Arabidopsis thaliana* besitzen weiterhin C-terminale Palmitoylierungsstellen (hier nicht gezeigt). Die Zahlenwerte geben die entsprechenden Aminosäurepositionen wieder.

Verschiedene biochemische Ansätze identifizierten das StRem1.3 als ein intrinsisches Mitglied in DRMs und als anfällig für eine Sterolreduktion mittels MCD-Behandlung. Wird StRem1.3 mit dem Fluoreszenzmarker GFP fusioniert und transient zum Beispiel in Tabakblättern (siehe 2.7, Seite 86) überexprimiert, erkennt man eine Lokalisation dieses Fusionsproteins in klar abgegrenzten, domänenähnlichen Bereichen auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran, von denen jeder eine Größe von etwa 600nm hat. Verwendet man aber die Methode der elektronenmikroskopischen Lokalisation von Immunogold-beschichteten Proteinen, kann die Größe der StRem1.3-Cluster auf eine Größe von  $76,5 \pm 21,6$ nm eingeschränkt werden. Durch Behandlung mit

MCD werden die Cluster über die gesamte Membranoberfläche hinweg aufgelöst und das StRem1.3 zeigt keine Expression in Aggregaten mehr (Raffaele *et al.*, 2009a). Auch das AtRem1.2 (At3g61260) spielt eine Rolle in Pflanzen-Pathogen-Interaktionen. Es wurde als eines von vier Proteinen identifiziert, die sich, durch spezifische Induktion, als frühe Signalkomponenten in der Antwort gegen den bakteriellen Effektor AvrRpm1 herausstellten (Widjaja *et al.*, 2009).

Die Remorine werden nach Proteinlänge und dem Aufbau ihrer N- und C-Termini in verschiedene Untergruppen eingeteilt. Die Remorine StRem1.3, AtRem1.2 und 1.3 werden gemeinsam in die Untergruppe 1b eingeordnet. Sie sind in der jeweiligen ganzen Pflanze exprimiert, aber am stärksten im Blatt (Raffaele *et al.*, 2007). Für das StRem1.3 konnte weiterhin eine sehr starke Expression in älteren und seneszenten Geweben, sowie in Blattprimordien, also in den Geweben, in denen auch herangereifte und verzweigte Plasmodesmata auftreten, nachgewiesen werden (Lefebvre *et al.*, 2010). AtRem1.2 und 1.3 sind, wegen ihrer hohen und verbreiteten Expression (Raffaele *et al.*, 2007), in Proteomanalysen immer als konstante, Sterol-abhängige DRM-Proteine zu finden (Shahollari *et al.*, 2004; Kierszniowska *et al.*, 2008; Minami *et al.*, 2009). Die Behandlung von *Arabidopsis*-Zellkulturen (Kierszniowska *et al.*, 2008) und Blättern (Demir *et al.*, 2013) mit MCD führt zu einer Ausschleusung der Remorine aus den DRMs. Die physiologische Funktion der *Arabidopsis*-Remorine ist bisher nicht wirklich klar. Es gibt einerseits Hinweise darauf, dass sie an der Regulation der Schließzellöffnung als Antwort auf Trockenstress beteiligt sind, andererseits weiß man, dass AtRem1.2 Teil des RIN4-Komplexes ist, welcher die Aktivität von Membran-ATPasen, als Antwort auf Pathogenbefall, reguliert (Liu *et al.*, 2009a). Wahrscheinlich wird die Funktion der Remorine durch Pflanzenhormone reguliert, und sie spielen eine Rolle in der Antwort auf Pathogenbefall. AtRem1.2 und 1.3, wenn fluoreszent markiert und transient überexprimiert, zeigen nicht nur eine Membranexpression in distinkten Clustern, sondern sie kolokalisieren auch eindeutig miteinander. Weiterhin kolokalisiert AtRem1.3 mit dem zuvor als Membrandomänenmarker etablierten StRem1.3 (Raffaele *et al.*, 2009) und zeigt eine geringe Mobilität innerhalb der Plasmamembrandomänen. Deshalb können die Remorine AtRem1.2 und vor allem AtRem1.3 als potentielle, pflanzliche Membrandomänenmarker angesehen werden (Demir *et al.*, 2013).

## 1.2 Die Signalwege

---

### 1.2.1 ABA-Signalwege

Bereits in den 1960er Jahren wurde der inhibitorische Effekt des Phytohormons Abscinsäure (ABA), veraltet auch Dormin genannt, auf die Transpiration entdeckt (Little und Eidt, 1968; Mittelheuser und Van Steveninck, 1969). ABA kommt in den höheren Pflanzen, Laubmoosen, Algen, Flechten, Pilzen und Cyanobakterien, jedoch nicht in anderen Bakterien, Archaeen und Lebermoosen vor. Im Gegensatz zu den anderen Phytohormonen, handelt es sich bei ABA nicht um eine Stoffgruppe, sondern um einen Einzelstoff. Die Biosynthese von ABA wird durch verschiedene Stresssignale, wie Trockenstress, Salzstress oder Kältestress induziert. Dies resultiert dann in einem Anstieg der ABA-Konzentration in Blättern (Willmer und Fricker, 1996).

#### 1.2.1.1 ABA-Biosynthese, -Transport und -Funktion

Die Biosynthese von ABA wird durch Stress, vor allem durch Trockenstress, im Zuge einer Senkung des Zellinnendruckes ausgelöst. ABA ist ein zyklisches Sesquiterpen und wird, wie andere Tetraterpene, aus Isopentenylpyrophosphat (IPP) über den Methylerythritolphosphatweg (MEP-Weg) in den Chloroplasten der Blätter synthetisiert. Als Zwischenprodukte entstehen bei dieser Terpensynthese das Xanthophyll Xanthoxin. In anschließenden Spaltungs- und Oxidationsprozessen im Zytoplasma, wird aus dem Xanthoxin, mittels der Enzyme ABA2 und der Aldehyd-Oxidase (AAO3), das Phytohormon ABA synthetisiert (Seo und Koshiba, 2011). Die Enzyme ABA2 und AAO3 akkumulieren im Leitgewebe der Blätter, was die Vermutung nahelegt, dass die Synthese von ABA hauptsächlich in diesen Geweben stattfindet (Endo *et al.*, 2008). Diese Vermutung widerspricht aber der früheren Annahme, dass ABA in den Wurzeln gebildet und anschließend über das Xylem in die Blätter transportiert wird (Wilkinson und Davies, 2002). Neuere Erkenntnisse unterstützen aber die Theorie, dass ABA in den Blättern synthetisiert wird (Christmann *et al.*, 2005 und 2007; Ikegami *et al.*, 2009). Das momentan vorherrschende Model besagt, dass der Trockenstress durch die Wurzel registriert, dieser Stimulus über ein hydraulisches Signal an das Leitgewebe der Blätter übertragen und dort die Synthese von ABA aktiviert wird. Das gebildete ABA wird dann an die Schließzellen transportiert, woraufhin der Stomaschluss ausgelöst wird (Seo und Koshiba, 2011).

Wie genau der Transport von ABA in der Pflanze erfolgt, konnte bisher nicht vollständig geklärt werden. Der polare Transport über spezifische Transporter, wie er zuvor für das Phytohormon Auxin beschrieben werden konnte, wäre durchaus eine Möglichkeit (Peer *et al.*, 2011). ABA ist mit einem  $pK_a$ -Wert von 4,7 eine schwache Säure, deshalb käme auch die Möglichkeit in Frage, dass protoniertes ABA einfach passiv über Diffusionsvorgänge transportiert werden kann. Während aber im Zytoplasma, dem

finalen Ort der ABA-Biosynthese, ein pH-Wert von 7,2 - 7,4, dem hingegen im apoplastischen Raum aber ein pH-Wert von 5,0 - 6,0 vorherrscht, liegt die Vermutung nahe, dass für den Export von ABA ein spezifischer Transporter benötigt wird (Wilkinson, 1999; Wilkinson und Davies, 2002). Als Reaktion auf Trockenstress konnte ein Anstieg des pH-Wertes im Xylem und im apoplastischem Raum beobachtet werden (Bianco-Colomas *et al.*, 1991). Dadurch wird auch die passive Aufnahme von ABA in die Zielzellen unmöglich und die Existenz von Transportern wahrscheinlich (Windsor *et al.*, 1992; Perras *et al.*, 1994). Durch Untersuchungen an einer *Arabidopsis*-Mutante, welche in ihrer ABA-Sensitivität eingeschränkt ist, konnte der ABC-Transporter AtABCG25 identifiziert werden (Kuromori *et al.*, 2010). Dieser Transporter wird im Leitgewebe exprimiert und verschiedene biochemische Analysen konnten bestätigen, dass er ABA aus der Zelle heraus transportieren kann (Umezawa *et al.*, 2010). Ein weiterer Transporter, AtABCG40, wird in Schließzellen exprimiert und scheint für die Aufnahme von ABA in diese Zellen verantwortlich zu sein (Kang *et al.*, 2010).

Je nach Pflanzenorgan und dessen Entwicklungszustand variiert der ABA-Gehalt in der Pflanze. Durchschnittlich beträgt er aber etwa 100µg je kg Frischgewicht. ABA wirkt antagonistisch gegenüber anderen wachstumsfördernden Phytohormonen, wie den Auxinen, den Gibberellinen und Cytokininen. Im Grunde lässt sich die Wirkung von ABA in zwei Gruppen aufteilen. Die eine ist die Auslösung und Aufrechterhaltung der Dormanz von pflanzlichen Organen, also die Regulation von Samen- und Knospenruhe, von Blütenbildung, Fruchtreifung, Laubfall und anderen Alterungsprozessen. Weiterhin reguliert ABA die Reaktionen auf biotischen (Pathogene) und abiotischen Stress. So wird als Reaktion auf osmotischen Stress, wie zum Beispiel Kältestress, die Knospenruhe und die Einstellung des primären und sekundären Dickenwachstums induziert und als Reaktion auf Hitze-, Salz- und vor allem Trockenstress, die Transpiration eingeschränkt (Steuer *et al.*, 1988). ABA hat dabei längerfristige und kurzfristige Einflüsse auf verschiedene Signaltransduktionsvorgänge. Die längerfristige, intrazelluläre Signaltransduktion von ABA und die Genaktivierung sind noch weitgehend unerforscht. Man weiß aber bereits, dass es in Pflanzen, neben anderen regulatorischen Sequenzen ein „ABA-Responsive-Element“ (ABRE) in der Promoterregion von Stress-induzierten Genen gibt (Kim *et al.*, 2011). Zu den, durch Aktivierung dieser Promoterelemente gesteuerten längerfristigen Wirkungen, zählt eine Erhöhung der hydraulischen Leitfähigkeit der Wurzeln, ebenso wie ein verstärktes Wurzelwachstum. In der Pflanzenklasse der Laubmoose, induziert ABA spezifisch die Umwandlung von photosynthetisch aktiven Zellen zu vegetativen Dauersporen, den so genannten Brachyzyten (Decker *et al.*, 2005). Die funktionelle Inaktivierung von ABA erfolgt über die Oxidative Spaltung zu Phaseinsäure und Dihydro-Phaseinsäure.

### 1.2.1.2 Kurzfristige physiologische ABA-Einflüsse - Der Stomaschluss

Die Entstehung von Stomata (griech. στόμα stóma „Mund“, „Mündung“, „Öffnung“) war eine essentielle evolutionäre Anpassung der Pflanzen. Um in der trockenen Landatmosphäre zu überleben bildeten die Pflanzen eine wasserundurchlässige Epidermis aus. Die Epidermis ist die äußere Zellschicht des Blattes und oft durch eine wachsartige Cuticula bedeckt, um das unkontrollierte Austrocknen der Pflanze zu verhindern. Diese physikalische Barriere bestehend aus Epidermis und Cuticula dient weiterhin dem Schutz der Pflanze vor Pathogenbefall durch, zum Beispiel Bakterien und Pilze (Willmer und Fricker, 1996). Mit Entwicklung dieser undurchlässigen Schicht musste aber ein Mechanismus ausgebildet werden, der der Aufrechterhaltung von Photosynthese und Respiration dient. Dazu bildeten sich durch Spezialisierung bestimmter Epidermiszellen die so genannten Stomata. Stomata sind mikroskopisch kleine, verschließbare Poren, bestehend aus zwei symmetrischen Schließzellen. Die Stomata werden aus anatomischer Sicht in zwei Typen eingeteilt. Der *Graminaceae*-Typ weist hantelförmige Schließzellen auf, während der *Helleborus*-Typ nierenförmige Schließzellen und elliptische Stomata aufweist (Willmer und Fricker, 1996). Diese zweite Variante ist auch in der Modelnpflanze *Arabidopsis thaliana* zu finden. Durch eine gleichmäßige Verteilung der Stomata über die jeweilige Blattoberfläche, kann ein Austausch von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid, welcher für die Photosynthese essentiell ist, gewährleistet werden (Peterson *et al.*, 2010).

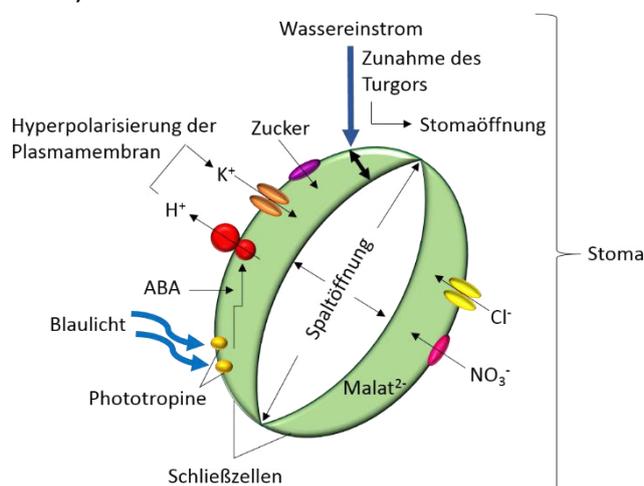
Verschiedene Umweltfaktoren, wie rotes und blaues Licht, Pathogenbefall, sowie Veränderungen der Luftfeuchtigkeit oder der CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Luft, bewirken Veränderungen des Zellinnendruckes (Turgor) und somit ein schnelles (einige Sekunden) Öffnen oder Schließen der Stomata, um die Aufnahme von CO<sub>2</sub> aus der Atmosphäre und den damit einhergehenden Verlust von Wasser auszugleichen (Hetherington und Woodward, 2003; Schroeder *et al.*, 2001).

Das Öffnen der Stomata kann durch kurze Lichtimpulse induziert werden. Dabei bewirkt vor allem Blaulicht, welches von den pflanzlichen Blaulichtrezeptoren, den Phototropinen, wahrgenommen wird, die Stomaöffnung, während rotes Licht als zusätzliche Energiequelle fungiert (Zeiger *et al.*, 1983). Die Lichteinwirkung bewirkt eine Abgabe von Protonen aus den Schließzellen, was zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran und zu einer Ansäuerung des externen Mediums führt (Raschke und Humble, 1973; Assmann *et al.*, 1985). Die blaulichtinduzierte Protonenpumpe der Schließzellen ist die H<sup>+</sup>-ATPase der Plasmamembran (Schwartz *et al.*, 1991; Amodeo *et al.*, 1992). Die H<sup>+</sup>-ATPase bewirkt eine Hyperpolarisierung der Schließzellmembran, die mit -120 bis -180mV, immer leicht negativ vom Aktivierungspotential der K<sup>+</sup>-Aufnahmekanäle ist (Dietrich *et al.*, 2001). Dieses Spannungspotential genügt, um den Einstrom von Kaliumionen (K<sup>+</sup>) aus dem Apoplasten durch einwärtsgerichtete K<sup>+</sup>-Kanäle, zu erlauben (Blatt, 1992; Roelfsema und Prins, 1998). Diese elektrische Kopplung zwischen H<sup>+</sup>-ATPase und K<sup>+</sup>-Kanälen wird noch ergänzt durch die Tatsache, dass K<sup>+</sup>-Kanäle in einer Umgebung

mit niedrigem pH-Wert verstärkt aktiv sind (Brüggemann *et al.*, 1999; Dietrich *et al.*, 1998).

Bei den ersten in *Arabidopsis thaliana* gefundenen  $K^+$ -Kanälen handelt es sich um KAT1 (Anderson *et al.*, 1992) und AKT1 (Sentenac *et al.*, 1992). Die Anreicherung der positiv geladenen  $K^+$ -Ionen in den Schließzellen muss kompensiert werden. Dazu wird Malat<sup>2-</sup> in der Zelle synthetisiert und Chlorid- ( $Cl^-$ ) und Nitrat-Ionen ( $NO_3^-$ ) aus dem Apoplasten aufgenommen. Die meisten Pflanzenspezies akkumulieren dabei bevorzugt Malat<sup>2-</sup> (Willmer und Fricker, 1996). Die Mechanismen, die der Aufnahme von Anionen, wie  $Cl^-$  und  $NO_3^-$ , in Schließzellen dienen, sind bisher noch nicht geklärt. Lediglich die Beteiligung des Nitrattransporters NRT1.1 an der Nitrataufnahme und der Öffnung der Stomata konnte bisher gezeigt werden (Guo *et al.*, 2003).

Neben  $K^+$  als Osmotikum, spielt auch die Akkumulation von verschiedenen Zuckern eine wichtige Rolle für die Öffnung der Stomata. Dabei wird angenommen, dass die Zucker und die Kaliumionen während des Nachmittages, wenn die Sonneneinstrahlung verhältnismäßig am stärksten ist, den Offenzustand der Stomata aufrechterhalten (Tallman und Zeiger, 1988). Ein, für die intrazelluläre Akkumulation von Zuckern verantwortlicher Transporter, könnte der Saccharosetransporter AtSUC3 sein. Dieser wird spezifisch in den Schließzellen exprimiert und ist in seiner Aktivität wahrscheinlich ebenfalls mit der Aktivität der Protonenpumpen gekoppelt (Meyer *et al.*, 2004). Der Einstrom von Kaliumionen (Fisher, 1968) und Zuckern (Poffenroth *et al.*, 1992) und der damit verbundene Einstrom von Wasser, bewirkt den Anstieg des osmotischen Druckes innerhalb der Schließzellen. Durch die asymmetrische Anordnung der Mikrofibrillen in der Zellwand, führt dies zu einer Öffnung der Stomata (Abbildung 1.11). Diese Volumenzunahme der Zelle geht mit einer Oberflächenvergrößerung der Schließzellplasmamembran einher. Um jederzeit kurzfristig über diese zusätzlich benötigte Membranoberfläche zu verfügen, besitzen die Schließzellen im geschlossenen Zustand eine Vielzahl kleiner Vakuolen (Palevitz und O’Kane, 1981). Während des Öffnens fusionieren diese kleinen Vakuolen zu einigen größeren, welche dann, zur Oberflächenvergrößerung, in die Plasmamembran eingebaut werden können (Gao *et al.*, 2005).



**Abbildung 1.11: Blaulicht-induziertes Öffnen der Stomata**

Die Detektion von blauem Licht führt zu einer Aktivierung der  $H^+$ -ATPase. Die damit einhergehende Hyperpolarisation der Plasmamembran führt zu einer Aktivierung der einwärts gerichteten Kaliumkanäle. Dem Einstrom von Kalium folgt Wasser. Dies hat einen Anstieg des Turgors und ein Öffnen der Stomata zur Folge.

Umweltfaktoren wie Trockenstress, eine erhöhte CO<sub>2</sub>- oder Ozonkonzentration, sowie Pathogenbefall führen zu Stomaschluss (Schroeder *et al.*, 2001; Ahlfors *et al.*, 2004). Auch endogene Stimuli, wie die Anwesenheit von ABA, können zum Stomaschluss führen (MacRobbie, 1998). Diese Reduktion der Stomaöffnung dient dem Schutz vor Pathogenbefall und den schädigenden Einfluss von Ozon und dem Bestreben bei einem Anstieg der CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Atmosphäre, weiterhin einen konstanten Gasaustausch aufrecht zu erhalten. Vor allem unter Trockenstressbedingungen ist es für die Pflanze wichtig, so wenig Wasser wie möglich über ihre Blätter zu verlieren. Der zentrale Regulator in dieser abiotischen Stressantwort stellt das Phytohormon ABA dar. Das Phytohormon ABA kann ein sehr komplexes Netzwerk an regulatorischen Signalkaskaden kontrollieren, die es dann der Pflanze erlauben mit der geringen Wasserverfügbarkeit zurechtzukommen. Nicht nur das Schließen der Stomata kann durch eine gesteigerte Anwesenheit von ABA reguliert werden, sondern auch Veränderungen der Genexpression und die Akkumulation von osmotisch kompatiblen Substanzen kann ausgelöst werden. Somit ist die Pflanze in der Lage, besser mit den Stressbedingungen umgehen zu können (Cutler *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010). Die Senkung des Turgors und somit der Schluss der Schließzellen wird durch die Aktivität von Anionenkanälen und dem damit verbundenen Ausstrom von Anionen und Kaliumionen, gesteuert (siehe 1.2.1.2.4.1). Anionenkanäle, die an Stomabewegungen teilhaben, zeigen eine ca. 21-fach höhere Permeabilität für NO<sub>3</sub><sup>-</sup> gegenüber Cl<sup>-</sup> (Geiger *et al.*, 2011; Schmidt und Schroeder, 1994).

### 1.2.1.2.1 ABA-Rezeptoren und die ABA-Signalkaskade

Die ersten ABA-bindenden Proteine wurden bereits vor 25 Jahren im Zytoplasma von *Vicia faba* entdeckt und beschrieben (Hornberg und Weiler, 1984). In *Arabidopsis thaliana* konnten daraufhin 3 verschiedene Arten von Proteinen als potenzielle ABA-Rezeptoren identifiziert werden. Die GPCR-Typ-G-Proteine sind in der Plasmamembran lokalisiert. Die Mg-Chelatase ist in den Plastiden zu finden. Die START-Proteine liegen in gelöster Form im Zytoplasma vor (Ma *et al.*, 2009; Pandey *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2006). Die meisten, der durch ABA ausgelösten, physiologischen Reaktionen werden durch die löslichen Rezeptoren der RCAR/PYR/PYL-Familie vermittelt (Park *et al.*, 2009). In *Arabidopsis* beinhaltet diese Proteinfamilie 14 Mitglieder. Diese sind funktionell hochgradig redundant und blieben vermutlich deshalb so lange unentdeckt. PYR1 („Pyrabactin resistance 1“) wurde durch einen genetischen Screen von Pflanzen, die trotz hoher Konzentration von Pyrabaktin keimen konnten, entdeckt. Pyrabaktin kann, durch Bindung an mehrere ABA-Rezeptoren, den inhibitorischen Effekt von ABA auf Samenkeimung und Genexpression nachahmen (Park *et al.*, 2009).

Durch Interaktionsanalysen, konnten verschiedene ABA-abhängige Interaktionspartner für PYR1 aus der PP2C- (Proteinphosphatase 2C) Familie (siehe 1.2.1.2.2), vor allem die Phosphatasen ABI1 („ABA-insensitive 1“), ABI2 („ABA-insensitive 2“) und HAB1 („homology to ABI1“), identifiziert werden (Meyer *et al.*, 1994; Leung *et al.*, 1994; Leung *et al.*, 1997; Leonhardt *et al.*, 2004; Saez *et al.*, 2004; Santiago *et al.*, 2009). Weiterhin konnte das Protein RCAR1/PYL9 („regulatory component of ABA receptor 1/ PYR1 like 9“), welches mit ABI1 und ABI2 interagieren kann, identifiziert werden (Ma *et al.*, 2009). In Abwesenheit von ABA liegt der Rezeptor RCAR1/PYL9 als asymmetrisches Dimer vor. Beide Untereinheiten besitzen zentrale Bindetaschen (Nishimura *et al.*, 2009). Bindet ABA an diese Taschen, wird eine Konformationsänderung ausgelöst, wodurch letztlich das Dimer in zwei Monomere zerfällt. Diese Monomere können nun mit den Vertretern der PP2C-Familie interagieren. Die Affinität der Rezeptoren zu ABA ist sehr gering, kann aber durch die Anwesenheit kompatibler PP2C-Phosphatasen gesteigert werden (Raghavendra *et al.*, 2010; Szostkiewicz *et al.*, 2010). Diese Tatsache lässt vermuten, dass aus der Verbindung von Rezeptor und Phosphatase eine Art Co-Rezeptorkomplex für ABA entsteht und durch verschiedene Kombinationen der unterschiedlichen Rezeptorkomplex-Komponenten, die Antwort auf Trockenstress sehr differenziert ausgelöst werden kann (Szostkiewicz *et al.*, 2010).

### 1.2.1.2.2 Die Rolle von Phosphatasen in der ABA-Antwort

ABA spielt nicht nur eine Rolle in der Stressantwort, sondern reguliert auch das Pflanzenwachstum und die Entwicklung. Um also eine konstitutive Antwort auf endogenes ABA zu verhindern, muss dieser ABA-Signalweg streng kontrolliert werden. Dies geschieht durch die Repression der Signalweiterleitung durch Phosphatasen. Man unterteilt die Phosphatasen in Hinsicht auf ihre Substratspezifität in Ser/Thr-, Tyr- und Phosphatasen mit dualer Spezifität. Die Ser/Thr-Phosphatasen werden abhängig von ihren biochemischen und strukturellen Eigenschaften in die Gruppen PP1, PP2A und PP2C eingeteilt (Luan, 2003). Die PP2Cs, vor allem ABI1 (At4g26080) und ABI2, gelten als die generellen Regulatoren in ABA-Signalwegen. Diese beiden Phosphatasen zählen innerhalb der Gruppe der pflanzlichen PP2C-Phosphatasen zu der Untergruppe A, welche in *Arabidopsis thaliana*, aus neun Mitgliedern besteht (Schweighofer *et al.*, 2004). Mittlerweile konnten auch HAB1 und HAB2, über ihre Sequenzhomologie zu ABI1, als Mitglieder dieser Kategorie identifiziert werden (Saez *et al.*, 2004). Des Weiteren konnten die PP2C-Phosphatasen AHG1 („ABA-hypersensitive germination 1“) und AHG3/AtPP2CA durch genetische Untersuchungen (Kuhn *et al.*, 2006; Nishimura *et al.*, 2007; Yoshida *et al.*, 2006b) und durch Komplementationsanalysen in Hefen (Kuromori und Yamamoto, 1994) als Komponenten des ABA-Signalweges identifiziert werden. Die PP2C-Phosphatasen stellen wichtige negative Regulatoren des ABA-Signalweges dar. Das wird dadurch deutlich, dass alle Verlustmutanten der PP2Cs aus der Untergruppe A signifikant hypersensitiv auf ABA reagieren (Hirayama und Shinozaki, 2007). In Doppel- oder

Dreifach-PP2C-verlustmutanten konnte die hypersensitive Reaktion auf ABA, im Vergleich zu den Einzelmutanten, sogar noch gesteigert werden. Dies beweist eine funktionelle Redundanz dieser Phosphatasen (Nishimura *et al.*, 2007; Rubio *et al.*, 2009).

Die PP2Cs zeigen charakteristische Expressionsmuster. Die Expression von ABI kann in verschiedenen Geweben, vor allem aber in Samen und Schließzellen nachgewiesen werden. AHG1 und AHG3/AtPP2CA werden ausschließlich im Samen exprimiert (Yoshida *et al.* 2006b; Nishimura *et al.*, 2007; Umezawa *et al.*, 2009). Auch die subzelluläre Lokalisation der verschiedenen PP2Cs unterscheidet sich deutlich. Während AHG1 und AHG3 bevorzugt im Nukleus exprimiert werden, wird ABI1 sowohl im Nukleus, als auch im gesamten Zytoplasma exprimiert (Umezawa *et al.*, 2009).

Im Falle des ABA-Signalweges interagieren die PP2C-Phosphatasen mit den Vertretern der RCAR/PYR/PYL-Familie. Diese Rezeptorproteine binden in Anwesenheit von ABA an die Phosphatasen und hemmen somit deren dephosphorylierende Aktivität (Abbildung 1.16; Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009; Santiago *et al.*, 2009).

### 1.2.1.2.3 Die Rolle von Kinasen in der ABA-Antwort

Mit Hilfe eines Hefe-2-Hybridscreens konnten verschiedene Interaktionspartner, die innerhalb der ABA-Signalkaskade mit den PP2C-Phosphatasen interagieren, identifiziert werden. Neben diversen Transkriptionsfaktoren, handelt es sich dabei vor allem um Proteinkinasen. Darunter befinden sich sowohl Calcium-abhängige, als auch Calcium-unabhängige Proteinkinasen (Himmelbach *et al.*, 2002).

#### 1.2.1.2.3.1 Calcium-abhängige Proteinkinasen

Die Rolle von Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) als sekundärer Botenstoff ist schon lange akzeptiert, nur die molekularen Mechanismen, die die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsänderungen in spezifische Signale umwandeln, sind noch weitestgehend unklar. Im pflanzlichen System existieren verschiedene  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensoren, welche die sich verändernden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit bestimmten Antworten verbinden können. Dazu zählen die Calmoduline (CaMs), die Calmodulin-ähnlichen Proteine (CaMLs, „Calmodulin-like proteins“) sowie die Familie der CBLs („Calcineurin-B like proteins“). Diese können  $\text{Ca}^{2+}$  binden und danach mit Proteinen der CIPK-Familie („CBL-interacting protein kinases“) interagieren und deren Aktivität modulieren. Die CBLs nehmen somit die Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensoren ein.

Im Genom von *Arabidopsis thaliana* existieren zehn Gene, die für die Mitglieder der CBL-Familie und 26 Gene, die für die Familie der CIPKs kodieren. Bestimmte CBLs können mit verschiedenen CIPKs interagieren, wodurch unterschiedliche abiotische Stressfaktoren auf molekularer Basis mit Phytohormon-Signalwegen verknüpft werden können

(D'Angelo *et al.*, 2006). So kann CBL9 sowohl mit CIPK3 interagieren und die ABA-Antwort während der Samenentwicklung steuern (Kim *et al.*, 2003), als auch neben CBL1 ein Interaktionspartner der CIPK23 sein. Beide CBLs können also an die Kinase CIPK23 binden und somit deren Lokalisierung an der Plasmamembran bewirken, wo diese dann durch Aktivierung von einwärtsgerichteten Kaliumkanälen, die ABA-Signaltransduktion negativ regulieren kann (Cheong *et al.*, 2007).

Die CDPKs („Calcium-dependent protein kinases“, in *Arabidopsis* auch CPKs genannt) sind einzigartig unter den  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensoren, denn sie vereinen die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  und die Kinaseaktivität in einem einzigen Protein (Cheng *et al.*, 2002; Harper *et al.*, 2004). Innerhalb dieser Proteine können 4 unterschiedliche Domänen unterschieden werden (Abbildung 1.12): eine variable N-terminale Domäne (N-VD), eine Proteinkinasedomäne (PK-D), eine autohinhibitorische Verzweigungsstelle (AJ) und eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindedomäne (CBD). Der C-Terminus (CT) ist variabel, kürzer als der N-Terminus und wird nicht als distinkte Domäne gesehen. (Harmon *et al.*, 2001).



**Abbildung 1.12: Charakteristische Proteinstruktur der CPKs**

N-VD ist eine variable N-terminale Domäne, PK-D ist eine katalytische Proteinkinasedomäne, AJ ist eine autohinhibitorische Verzweigungsstelle und CBD ist eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindedomäne mit vier EF-Hand-Motiven. CT ist eine C-terminale variable Region (© Plant & Cell Physiology; Valmonte *et al.*, 2013).

Die AJ-Domäne kann auch als autoinhibitorische Domäne bezeichnet werden, da sie als Pseudosubstrat fungieren und durch die Interaktion mit der Kinasedomäne, deren Aktivität gegenüber dem eigentlichen Substrat inhibieren kann. Das aktuell gültige Modell zur Beschreibung der Regulation der Ser/Thr-Kinasen, besagt, dass der C-terminale Bereich der CBD schon bei geringen zytoplasmatischen Calciumkonzentrationen  $\text{Ca}^{2+}$  binden und mit der AJ-Domäne interagieren kann (Harper *et al.*, 2004). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung erfolgt an der CBD, welche ein bis fünf (typischerweise vier) EF-Hand-Motive aufweist (Cheng *et al.*, 2002). Jedes der EF-Hand-Motive ist 12 Aminosäuren lang und wird von zwei  $\alpha$ -Helices flankiert, wodurch eine Helix-Loop-Helix-Konformation entsteht (Cheng *et al.*, 2002; Grabarek, 2006). Die PK-Domäne besitzt Phosphorylierungsstellen, die für Ser/Thr-Kinasen charakteristisch sind (Hardie, 1999) und nur nach einer Konformationsänderung in der AJ- und CBD-Domäne nach Bindung weiterer  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen entstehen (Wernimont *et al.*, 2010). Nun kann eine intramolekulare Autophosphorylierung der CPK stattfinden, welche in einer Aktivierung der Kinase resultiert (Chandran *et al.*, 2006; Ludwig *et al.*, 2004).

Man vermutet, dass die CPKs myristoyliert und palmitoyliert werden (Cheng *et al.*, 2002; Hrabak *et al.*, 2003), was zu einer Assoziation mit der Plasmamembran führt (Martin und Busconi, 2000). CPKs werden durch eine große Genfamilie in den meisten Reichen, wie auch in Pflanzen exprimiert (Harmon *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2008b; Asano *et al.*, 2010; Kiselev *et al.*, 2010), jedoch nicht im tierischen oder pilzlichen Genom (Zhang und Choi, 2001; Hrabak *et al.*, 2003). Die meisten Pflanzen besitzen zwischen 20 und 40 CPKs und in *Arabidopsis* gibt es 34 CPK-Gene. Durch genetische Untersuchungen konnte vier CPKs eine Funktion in Schließzellen und in der ABA-Signaltransduktion zugeordnet werden (Mori *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2007). CPK4 und CPK11 wurden als positive Regulatoren des Ca<sup>2+</sup>-abhängigen ABA-Signalweges beschrieben. Diese beiden CPKs lokalisieren vor allem im Zytoplasma und im Nukleus und phosphorylieren die zwei ABFs („ABA-responsive element binding factor“) ABF4 und ABF1 *in vitro* (Zhu *et al.*, 2007). CPK5 wurde kürzlich als ein positiver Regulator der Immunantwort in Pflanzen gezeigt. Dabei vermittelt CPK5 eine schnelle, PAMP-induzierte Signalweiterleitung und die Induktion einer ausgedehnten transkriptionell und Phytohormon-gesteuerten Pathogenabwehr, in Form der ROS-Synthese nach direkter Interaktion mit und Phosphorylierung der endogenen NADPH-Oxidase AtrbohD (siehe 1.2.1.2.4.2; Dubiella *et al.*, 2013).

Interaktionsstudien belegen, dass die Kinase CPK21, genau wie CPK23 mit den beiden Phosphatasen ABI1 und ABI2 interagieren und dadurch in ihrer Aktivität negativ reguliert werden können (Abbildung 1.16). Diese Tatsache lässt den Schluss zu, dass diese beiden Kinasen an der ABA-Signaltransduktion beteiligt sind. Weiterhin zeigen beide Kinasen in *in-vitro*-Kinase Studien, stark unterschiedliche Ca<sup>2+</sup>-Sensitivitäten. CPK21 besitzt eine hohe Ca<sup>2+</sup>-Affinität mit  $K_{0,5}=277 \pm 24$ nM. CPK23 dagegen besitzt lediglich eine Basis-Kinaseaktivität, welche durch eine Erhöhung der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration nur noch um 40% gesteigert werden kann (Geiger *et al.*, 2010; Scherzer *et al.*, 2012).

### 1.2.1.2.3.2

### Calcium-unabhängige Proteinkinasen

Eine weitere Klasse von Pflanzen-spezifischen Kinasen sind die „SNF1-related kinases“, die Snrk2-Kinasen. *Arabidopsis thaliana* besitzt 38 Proteinkinasen, die zu den Snrk2-Kinasen gezählt werden. Diese werden, abhängig von Sequenzähnlichkeiten und ihrer Domänenstruktur, in drei Untergruppen unterteilt. Die Snrk1-Untergruppe ist dabei den SNF1-Kinasen in Hefen und den AMPKs („AMP-activated kinase“) in Säugetieren am ähnlichsten. In *Arabidopsis* gibt es nur drei Snrk-Sequenzen, die zu der Snrk1-Gruppe gezählt werden. Dabei handelt es sich um die größten der Snrk-Proteine mit Molekülmassen zwischen 56,7 und 58,7kDa. Biochemische und physiologische Analysen ergaben, dass die Snrk1-Proteine, genau wie die SNF-Kinasen und die AMPKs, den globalen Metabolismus und Energiestatus der Zelle in Abhängigkeit von Nährstoffhaushalt und Umweltstress regulieren (Halford und Hardie, 1998; Halford *et al.*, 2003; Halford und Hey, 2009; Polge und Thomas, 2006).

Zahlreiche Interaktionspartner für die Snrk1-Proteine konnten bereits identifiziert werden. Darunter befinden sich einige Enzyme, die den basalen Metabolismus beeinflussen (z.B. Nitratreduktasen, HMG-CoA-Reduktasen usw.) und von den Snrk1-Kinasen direkt phosphoryliert und reguliert werden. Nicht ungewöhnlich ist, dass viele Vertreter der Snrk1-Familie mit pflanzlichen Orthologen von Proteinen, die in Hefen die SNF1-Proteine regulieren, interagieren. Man schließt daraus, dass Snrk1-Kinasen, ähnlich wie ihre tierischen und pilzlichen Orthologen, heterotrimere Komplexe bilden und durch den Einfluss von Glukose reguliert werden (Bhalerao *et al.*, 1999; Bouly *et al.*, 1999; Ferrando *et al.*, 2001).

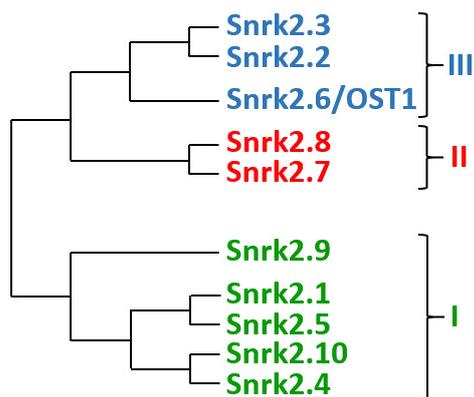
Weiterhin wurde gezeigt, dass die Snrk1-Kinasen mit dem 26S-Proteasom, verschiedenen Proteasomuntereinheiten (Farras *et al.*, 2001) und einer Protein-Tyrosin-Phosphatase (Fordham-Skelton *et al.*, 2002) interagieren können. Snrk1-Kinasen spielen also eine zentrale Rolle in der Regulation des Energiehaushaltes und sie kontrollieren sogar eine große Zahl von Genen, die für Transkriptionsfaktoren kodieren, sie kontrollieren weiterhin Chromatin-remodellierende Proteine und Komponenten verschiedener Signaltransduktionswege (Baena-Gonzalez, 2010). Die Snrk2- und die Snrk3-Kinasen haben sich entwicklungsgeschichtlich weiter von den SNF1/AMPK-Kinasen entfernt und sind ausschließlich im pflanzlichen System zu finden.

In *Arabidopsis* gehören 26 Proteine zur Familie der Snrk3-Kinasen. Diese Gruppe wird durch Proteine repräsentiert, die zuvor von drei Arbeitsgruppen unabhängig, als CIPKS (CBL-interagierenden Proteinkinasen, Kudla *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000; Albrecht *et al.*, 2001), als SOS2-ähnliche Kinasen („salt overly sensitive 2“, Halfter *et al.*, 2000), und als PKS (Proteinkinase S, Guo *et al.*, 2001) identifiziert wurden. Diese Kinasen interagieren mit Calcium-bindenden Proteinen, die als SOS3, ScaBPs oder CBLs (siehe 1.2.1.2.3.1) bezeichnet werden und der regulatorischen B-Untereinheit der Proteinphosphatase Calcineurin (Liu und Zhu, 1998; Kudla *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000; Albrecht *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2001). Diese Kinasen spielen eine wichtige Rolle in den Antworten auf Trockenstress, Kälte, ABA, Zucker, Salz und pH-Änderungen (Coello *et al.*, 2011; Gong *et al.* 2004; Hrabak *et al.*, 2003; Luan, 2009). SOS2, zum Beispiel, reguliert die Aktivitäten der zwei vakuolären Membrantransporter AtNHX1 (einem Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter) und CAX1 (einem Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter) positiv und die Aktivität des hoch-selektiven Na<sup>+</sup>-Transporters AtHKT1 negativ (Rus *et al.*, 2001).

Bis zum Jahr 2000 wurde dieser Unterfamilie kaum Aufmerksamkeit geschenkt, weshalb bis zu diesem Zeitpunkt so gut wie keine Informationen über die Funktion der Snrk2-Familie vorlagen. Im Jahr 2000 identifizierte man die Snrk2-Proteine, in *Nicotiana tabacum* und *Vicia faba*, als Enzyme, die an abiotischen Stressantworten beteiligt sind (Mikolajczyk *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000). In den folgenden Jahren sollten zahlreiche Untersuchungen dazu führen, dass man die Struktur, die Aktivierungsmechanismen und die Funktion der Snrk2-Kinasen heute besser versteht. So wurde 2009, dem selben Jahr, in dem die zytoplasmatischen ABA-Rezeptoren entdeckt wurden, die Dreifachmutante

*snrk2.2/3/6* generiert, die es ermöglichte, die Funktion von ABA-abhängigen Snrk2-Kinasen in der Reaktionen auf Wasserstress und Samenkeimung zu verstehen (Fuji und Zhu, 2009; Fujita *et al.*, 2009; Nakashima *et al.*, 2009). Heutzutage weiß man, dass die Snrk2-Kinasen die Hauptakteure der pflanzlichen Antwort auf osmotischen Stress und der ABA-abhängigen Entwicklung sind (Boudsocq und Lauriere, 2005; Fujii *et al.*, 2011).

Die Snrk2-Kinasen wurden in allen Pflanzen, die dahingehend untersucht wurden, gefunden. In *Arabidopsis thaliana* besteht diese Proteinfamilie aus zehn Mitgliedern (Snrk2A-J oder Snrk2.1-10; Boudsocq *et al.*, 2004), welche ausgehend von phylogenetischen Analysen, in drei weitere Untergruppen eingeteilt werden können (Abbildung 1.13). Die Gruppe I beinhaltet dabei die Kinasen, die nicht durch ABA aktiviert werden können. Die Mitglieder der Gruppe II können nur schwach durch ABA aktiviert werden (ist abhängig von der untersuchten Pflanzenspezies) und die Gruppe III wird sehr stark durch ABA aktiviert (Mustilli *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2002 und 2006; Fujii *et al.*, 2007). Die meisten dieser Kinasen (außer Snrk2.9) können durch die Behandlung mit verschiedenen Osmolyten, wie NaCl, Saccharose, Mannitol, Sorbitol oder ABA, aktiviert werden, was darauf schließen lässt, dass sie eine generelle Antwort auf osmotischen Stress vermitteln (Boudsocq *et al.*, 2004).



**Abbildung 1.13: Phylogenetische Abstammung der Snrk2-Kinasen aus *Arabidopsis thaliana*.**

Gruppe I (grün): ABA-unabhängige Kinasen, Gruppe II (rot): schwach ABA-abhängige Kinasen, Gruppe III (blau): ABA-abhängige Kinasen (Mizoguchi *et al.*, 2010).

Die Kinasen der Snrk2-Familie sind monomere Ser/Thr-Proteinkinasen mit einem Molekulargewicht von etwa 40kDa (Hardie, 1999). Die Aminosäuresequenz aller Snrk2-Kinasen kann in zwei Regionen unterteilt werden. Die N-terminale Kinasedomäne ist hochgradig konserviert und ähnlich der von SNF1 und AMPK. Die C-terminale Domäne weist saure Aminosäuren auf. In der Gruppe I handelt es sich dabei um die Aminosäure Glutamat und in den Gruppen II und III um Aspartat. Weiterhin besteht die C-terminale Domäne aus zwei Subdomänen (Abbildung 1.14). Die Domäne I (etwa 30 Aminosäuren lang) ist charakteristisch für alle Mitglieder der Snrk2-Familie und wird für die ABA-unabhängige Aktivierung der Kinase durch osmotischen Stress benötigt. Die Domäne II (etwa 40 Aminosäuren lang) ist spezifisch für ABA-abhängige Snrk2-Kinasen und ist entscheidend für die ABA-Antwort (Kobayashi *et al.*, 2004; Belin *et al.*, 2006; Yoshida *et al.*, 2006). Kürzliche Untersuchungen haben gezeigt, dass die ABA-abhängigen Snrk2-Kinasen der Gruppe III mit einigen PP2C-Phosphatasen, darunter ABI1, interagieren

können und durch diese Interaktionen negativ reguliert werden (Umezawa *et al.*, 2009; Vlad *et al.*, 2009).

Für die Regulierung der Snrk2-Aktivität ist eine reversible Phosphorylierung der Kinasedomäne notwendig. Alle bisher untersuchten Kinasen wurden, als Reaktion auf osmotischen Stress, phosphoryliert, wobei phosphorylierungsbedingte Änderungen der Kinaseaktivität unterschiedlich und von der jeweiligen Kinase abhängig waren. Weiterhin war die Zunahme des durch ABA induzierten Phosphorylierungsstatus niedriger, als im Falle von osmotischem Stress, was zu der Annahme führt, dass unterschiedliche Phosphorylierungsmechanismen die Snrk2-Aktivierung bewirken (Boudsocq *et al.*, 2007).

### SnRK2-Kinasen



**Abbildung 1.14: Proteinstruktur der Snrk2-Kinasen aus *Arabidopsis thaliana***

Eine N-terminale Ser/Thr-Kinasedomäne wird gefolgt von der C-terminalen Domäne I, welche für die ABA-unabhängige Antwort auf osmotischen Stress benötigt wird und einer Domäne II, welche für die ABA-abhängige Aktivierung der Snrk2-Kinasen benötigt wird.

Bisher wurden für zwei Snrk2-Kinasen die Phosphorylierungsunterschiede, durch den Einfluss von ABA und osmotischem Stress, sehr ausführlich untersucht. Zwei wichtige Phosphorylierungsstellen konnten in der Kinase Snrk2.6/OST1 (Gruppe III) und in Snrk2.10 (Gruppe I) identifiziert werden. Eine davon ist essentiell für die katalytische Aktivität der jeweiligen Kinase und beide zusammen sind wichtig für die vollständige Aktivierung durch osmotischen Stress und ABA. Es konnte auch gezeigt werden, dass OST1 durch die unabhängige Phosphorylierung beider Phosphorylierungsstellen aktiviert wurde, während Snrk2.10 sequentiell, das heißt die Phosphorylierung der einen Stelle war notwendig, damit im Anschluss auch die zweite phosphoryliert werden konnte, aktiviert wurde (Boudsocq *et al.*, 2007; Vlad *et al.*, 2010). Eine übergeordnete Kinase, die die Snrk-Kinasen phosphorylieren und aktivieren könnte, ist bisher noch nicht bekannt. Eventuell können die Snrk2-Kinasen durch Autophosphorylierung aktiviert werden (Fujii *et al.*, 2009), aber diese Annahme konnte bisher nicht bestätigt werden und wird deshalb kontrovers diskutiert.

Obwohl bisher keine übergeordnete Kinase bekannt ist, die die Snrk2-Kinasen aktivieren könnte, konnten einige Negativregulatoren der Snrk2-Aktivität identifiziert werden. Einige Mitglieder der Gruppe A der PP2C-Proteinphosphatasen interagieren mit den ABA-abhängigen Snrk2-Kinasen und deaktivieren sie sehr effizient durch Dephosphorylierung der Serin- und Threoninreste in der Kinasedomäne (Umezawa *et al.*, 2009; Vlad *et al.*, 2009). Diese Erkenntnisse konnten zur selben Zeit gewonnen werden, zu der auch die ABA-Rezeptoren der RCAR/PYR/PYL-Familie identifiziert wurden (Cutler *et al.*, 2010;

Hubbard *et al.*, 2010; Klingler *et al.*, 2010; Umezawa *et al.*, 2010). Die PP2C-Phosphatasen der Gruppe A bilden in Anwesenheit von ABA, einen Komplex mit den RCAR/PYR/PYL-Proteinen, wodurch die Phosphatasen inaktiviert werden. Diese können somit nicht mehr an die Kinasedomäne der Kinasen binden, und folglich können die Kinasen aktiviert werden. In Abwesenheit von ABA, interagieren die PP2C-Phosphatasen mit den ABA-abhängigen Snrk2-Kinasen (der Gruppe III), dephosphorylieren diese und halten sie somit in einer inaktiven Form (Park *et al.*, 2009; Melcher *et al.*, 2009; Santiago *et al.*, 2009; Vlad *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2009; Hirayama und Umezawa, 2010; Nishimura *et al.*, 2009 und 2010; Umezawa *et al.*, 2009 und 2010; Joshi-Saha *et al.*, 2011). Dieser Mechanismus kann bisher aber nur für die Snrk2-Kinasen der Gruppe III als gültig angesehen werden. Die Kinasen der Gruppe II (*Arabidopsis* Snrk2.7 und Snrk2.8) interagieren zwar auch mit den PP2C-Phosphatasen (Umezawa *et al.*, 2009), aber ob sie ebenfalls von den PP2C-Phosphatasen *in vivo* inaktiviert werden, konnte bisher noch nicht gezeigt werden. Die Snrk2-Kinasen der Gruppe I interagierten in einem Hefe-2-Hybridscreen nicht mit den PP2C-Phosphatasen (Umezawa *et al.*, 2009; Vlad *et al.*, 2010).

Ein weiterer Negativregulator der Snrk2-Kinasen ist der Snrk2-interagierende Calcium-Sensor (SCS). SCS ist ein pflanzenspezifisches, Calcium-bindendes Protein, welches sowohl ABA-abhängig als auch ABA-unabhängig mit den Snrk2-Kinasen interagiert. Mit der Entdeckung des SCS kann nunmehr eine Verbindung zwischen der Funktion der Snrk2-Kinasen und den Calcium-abhängigen Signalwegen hergestellt werden (Bucholc *et al.*, 2011). Neben der Phosphorylierung, können vielleicht auch andere posttranslationale Modifikationen die Snrk2-Aktivität in Pflanzenzellen regulieren. So wurde die Kinase Snrk2.10 als eines von vielen Proteinen identifiziert, welches mit der Phosphatidylsäure (PA) interagieren kann und durch dieses Phospholipid reguliert wird (Testerink *et al.*, 2004).

Die Snrk2-Kinasen werden vorrangig auf der posttranslationalen Ebene, durch Phosphorylierung reguliert, aber die Expression der Gene, die für diese Kinasen kodieren, kann ebenfalls als Antwort auf sich ändernde Umweltverhältnisse reguliert werden. Die Expression von verschiedenen Snrk2-Kinasen aus *Oryza sativa*, dem asiatischen Reis, kann differentiell durch ABA, Mannitol und NaCl reguliert werden (Kobayashi *et al.*, 2004). Die Expression des Genes *W55a*, das für ein Protein kodiert, das zur Familie der Snrk2-Kinasen in Weizen gehört, ist durch Trockenstress, exogen appliziertes ABA, Salizylsäure, Ethylen und Methyljasmonat hochreguliert (Xu *et al.*, 2009). Die Expression einiger Snrk2-Gene in Mais (*Zea mays*) wurde als Antwort auf NaCl (*ZmSnrk2.3*, *ZmSnrk2.6* und *ZmSnrk2.4*), ABA (*ZmSnrk2.2*, *ZmSnrk2.4*, *ZmSnrk2.5*, *ZmSnrk2.7*) und Kältestress (*ZmSnrk2.3*, *ZmSnrk2.7*) gesteigert und als Antwort auf Hitze (*ZmSnrk2.5*, *ZmSnrk2.6*) reprimiert (Huai *et al.*, 2008; Zou *et al.*, 2006). Hyperosmolarität induziert die Expression von vier Snrk2-Genen (*SPK1*, *SPK2*, *SPK3*, *SPK4*) in der Sojabohne *Glycine max* (Monks *et al.*, 2001; Yoon *et al.*, 1997). Außerdem kann auch der Licht-Dunkel-Rhythmus die Expression einiger Snrk2-Kinasen (*Snrk2.4*, *Snrk2.1*) regulieren (Park *et al.*, 1993).

Ausführliche Analysen implizieren, dass die Snrk2-Kinasen positive Regulatoren der Antwort auf Trockenstress sind. Die Kinase AAPK („ABA-activated protein kinase“) in den Schließzellen von *Vicia faba*, wird durch ABA, als Antwort auf Trockenstress aktiviert und reguliert so Anionenkanäle und den Schluss der Stomata (Li und Assmann, 1996). Die höchste Homologie zu AAPK hat die Kinase Snrk2.6, auch OST1 genannt, in *Arabidopsis thaliana*. OST1 ist die bisher am eingehendsten, in Bezug auf ihre Rolle in der pflanzlichen Antwort auf Umweltstress, untersuchte Snrk2-Kinase. Die *ost1*-Mutante ist nicht mehr in der Lage auf eine schnelle Senkung der Luftfeuchtigkeit zu reagieren und zeigt im Großen und Ganzen einen welken Phänotyp (Yoshida *et al.*, 2002). Der Verlust dieser Kinase führt zu einem Stomaphänotyp, der unempfindlich auf die Anwesenheit von ABA reagiert. Es konnte gezeigt werden, dass OST1 das ABA-vermittelte Schließen der Stomata reguliert und übergeordnet in den Signalwegen wirkt, die zur Bildung von ROS führen (Mustilli *et al.*, 2002).

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind wichtige Intermediate in den ABA-Signalwegen in Schließzellen, denn sie regulieren den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch die Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen, eine wichtige Komponente des ABA-vermittelten Stomaschlusses (Kwak *et al.*, 2003; Murata *et al.*, 2001). Zwei homologe NADPH-Oxidasen (AtrbohD und F, siehe 1.2.1.2.4.2) sind entscheidend in der ROS-abhängigen ABA-Antwort (siehe 1.2.1.2) in *Arabidopsis* (Kwak *et al.*, 2003). Deswegen ist es sehr wahrscheinlich, dass die ABA-abhängige Regulation der ROS-Produktion durch diese membranständigen NADPH-Oxidasen bewirkt wird. Im Falle der AtrbohD konnte gezeigt werden, dass diese sowohl phosphoryliert als auch durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung aktiviert werden muss (Ogasawara *et al.*, 2008). Die N-terminale Hälfte der rekombinanten, im bakteriellen System produzierte, AtrbohF interagiert mit der Kinase OST1 und wird weiterhin durch diese phosphoryliert. Diese Tatsache impliziert, dass die NADPH-Oxidase AtrbohF ein Substrat der Kinase OST1 *in vivo* sein könnte. Bisher gibt es aber noch keine direkten Daten, die die Phosphorylierung und die Regulierung der Atrboh-Aktivität durch die Snrk2-Kinasen *in planta* darstellen und beweisen.

Spezifische Ionenkanäle (siehe 1.2.1.2.4.1) der Plasmamembran von Schließzellen, werden ABA-abhängig reguliert und vermitteln so den ABA-abhängigen Stomaschluss. Einer dieser Kanäle wurde bereits auf molekularer Ebene identifiziert und charakterisiert. SLAC1 („slow-anion channel 1“) vermittelt die Antwort auf ABA und hohe  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen und ist somit einer der wichtigsten, in Schließzellen lokalisierten Kanäle (Negi *et al.*, 2008; Vahisalu *et al.*, 2008). Sowohl OST1, als auch die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Kinasen CPK3, CPK6, CPK21 und CPK23 können SLAC1 phosphorylieren und somit aktivieren (Abbildung 1.16; Lee *et al.*, 2009; Geiger *et al.*, 2009 und 2010; Brandt *et al.*, 2012; Scherzer *et al.*, 2012). Ein weiterer Ionenkanal, der durch Phosphorylierung aktiviert wird, ist der einwärtsgerichtete Kaliumionenkanal KAT1. Die Aktivierung dieses Kanals geht einher mit einem Stomaschluss und wird ebenfalls durch Phosphorylierung, katalysiert durch die Kinase OST1 und durch diverse CPKs, bewirkt (Pilot *et al.*, 2001).

OST1 phosphoryliert also sowohl Anionenkanäle (SLAC1) als auch Kationenkanäle (KAT1) und trägt somit zur ABA-abhängigen Regulation von Stomaöffnung und Stomaschluss bei.

Eine teilweise funktionelle Redundanz wurde für die ABA-abhängigen Snrk2-Kinasen der Untergruppe III, Snrk2.2, Snrk2.3 und OST1, beschrieben. Die Arabidopsis-Dreifachmutante *snrk2.2/snrk2.3/snrk2.6* ist extrem unempfindlich gegenüber der Wirkung von ABA und zeigt eine stark reduzierte Toleranz gegenüber Trockenstress, nicht nur weil die Mechanismen, die zum Stomaschluss führen würden, gestört sind, sondern weil auch die ABA- und Wasserstress-induzierten Gene herunter reguliert sind (Fujii und Zhu, 2009; Fujita *et al.*, 2009). Diese Tatsachen bestätigen, dass die drei Snrk2-Kinasen Snrk2.2, Snrk2.3 und OST1, die Hauptregulatoren der ABA-Signalwege als Antwort auf Wasserstress (NaCl oder ABA-Behandlung) sind. Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass die *snrk2.2/snrk2.3*-Doppelmutante unempfindlicher gegenüber ABA und auch weniger stark betroffen von Wasserverlust in den Blättern war als die *snrk2.6*-Mutante (Fujii *et al.*, 2007; Yoshida *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass Snrk2.2 und Snrk2.3, im Gegensatz zu OST1, lediglich eine untergeordnete Funktion bei der Kontrolle von Stomatabewegungen und der Antwort auf Trockenstress spielen (Fujii *et al.*, 2007). Dennoch zeigt der Phänotyp der Dreifachmutante ganz klar, dass alle drei Snrk2-Kinasen partiell redundante Funktionen in der ABA-vermittelten Antwort auf Wasserstress und auch auf verschiedene Entwicklungsprozesse haben müssen (Fujii und Zhu, 2009; Fujita *et al.*, 2009; Nakashima *et al.*, 2009).

Über die Funktion der Snrk2-Kinasen der Gruppe II (Snrk2.7 und Snrk2.8) ist weniger bekannt. Mutanten von *Arabidopsis*, in denen Snrk2.8 ausgeschaltet war, zeigten eine hypersensitive Antwort auf Trockenstress und transgene Pflanzen, die Snrk2.8 überexprimierten, waren signifikant toleranter gegenüber Trockenheit als Wildtyp-Pflanzen (Umezawa *et al.*, 2004). Die kürzlich analysierten Expressionsprofile einer *snrk2.7/snrk2.8*-Doppelmutante, im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen, die man Trockenstress ausgesetzt hatte, bestätigte die Annahme, dass diese beiden Kinasen der Untergruppe II eine wichtige Rolle in der Antwort auf Trockenstress spielen (Mizoguchi *et al.*, 2010). Trotz dieser Erkenntnisse, konnte bisher nicht gezeigt werden, dass die Snrk2-Kinasen der Untergruppe II eine ABA-vermittelte Stressantwort regulieren. Es gibt aber Hinweise darauf, dass diese Kinasen an der Regulation von Stoffwechselprozessen beteiligt sind. Snrk2.8 wurde als ein positiver Regulator von pflanzlichen Wachstumsprozessen, wahrscheinlich durch die Phosphorylierung verschiedener Enzyme, die an grundlegenden metabolischen Prozessen beteiligt sind, identifiziert. Es gibt Hinweise darauf, dass die Expression von Snrk2.8 durch einen Mangel an Stickstoff, Kalium und/oder Phosphor runterreguliert wird, was zu einem verminderten Wachstum der Pflanzen führt. Die Überexpression dieser Kinase führt zu einem verbesserten Wachstum von *Arabidopsis*, sowohl bei normalen Nähstoffbedingungen, als auch bei Mangelbedingungen. Es wurden bereits verschiedene Zielproteine der Snrk2.8 identifiziert. Darunter befinden sich 14-3-3-Proteine, die bisher unbekannte Proteine regulieren, sowie die Glyoxylase I und die Ribose-5-Phosphat-Isomerase, die

Nebenprodukte der Glykolyse entgiften und einen finalen Schritt der Kohlenstofffixierung katalysieren (Shin *et al.*, 2007). Noch weniger Informationen sind über die Funktionen der ABA-unabhängigen Snrk2-Kinasen der Untergruppe I vorhanden. In Reis konnte gezeigt werden, dass die Überexpression einer solchen Kinase (SAPK4) zu einer gesteigerten Toleranz gegenüber Salz- und oxidativem Stress führt (Diédhiou *et al.*, 2008). In *Medicago truncatula* konnte eine Snrk2-Kinase der Untergruppe I identifiziert werden, die in der Induktion der somatischen Embryogenese beteiligt ist (Nolan *et al.*, 2006). Dennoch gibt es deutlich zu wenige Erkenntnisse über die Funktionen der ABA-unabhängigen Snrk2-Kinasen, so dass keine generellen Aussagen darüber gemacht werden können.

#### 1.2.1.2.4 Phosphorylierungsziele der ABA-aktivierten Kinasen

Die initialen Schritte für die kurzfristige, schnelle Aktivierung von Anionenkanälen in Schließzellen, können in Calcium-abhängiger (siehe 1.2.1.2.3.1) und Calcium-unabhängiger Weise erfolgen (siehe 1.2.1.2.3.2; Levchenko *et al.*, 2005; Marten *et al.*, 2007). Über solche selektiven Anionenkanäle werden Anionen, wie z.B.  $\text{NO}_3^-$  und  $\text{Cl}^-$ , aus dem Zytoplasma in den Apoplasten ausgeschleust, was letztendlich zum Stomaschluss führt (Van Kirk und Raschke, 1978; Roelfsema und Hedrich, 2005). Der Transport solcher Anionen erfolgt dabei entlang des elektrochemischen Gradienten (dem Konzentrations- und Potentialgefälle).

##### 1.2.1.2.4.1 Anionenkanäle

Durch Patch-Clamp-Messungen an Schließzellprotoplasten von *Vicia faba*, konnten zwei verschiedene Anionenkanaltypen mit unterschiedlichen Charakteristika identifiziert werden. Die Anionenkanäle vom R (rapid)-Typ werden innerhalb von wenigen Millisekunden aktiviert, deaktiviert und inaktiviert und zeigen eine ausgeprägte Spannungsabhängigkeit. Sie sind inaktiv in hyperpolarisierten Membranen und werden durch Depolarisierung aktiviert (Hedrich und Marten, 1993; Kolb *et al.*, 1995). Die maximale Aktivität dieses Kanaltypus liegt bei  $-50\text{mV}$ . Die Aktivierung von Anionenkanälen vom S (slow)-Typ dauert mehrere Sekunden (Lindner und Raschke, 1992) und ist nur geringfügig spannungsabhängig (Hedrich *et al.*, 1990). Beide Ionenkanaltypen sind direkt am Stomaschluss beteiligt, jedoch variiert ihr Beitrag unter dem Einfluss von verschiedenen Umweltreizen. Zum Beispiel werden durch Trockenstress sowohl die S-Typ- als auch die R-Typ-Anionenkanäle durch ABA aktiviert (Roelfsema *et al.*, 2004). Eine Erhöhung des  $\text{CO}_2$ -Partialdruckes führt zu einer stetigen Aktivierung der S-Typ-Anionenkanäle, während die R-Typ-Anionenkanäle dadurch sowohl aktiviert als auch deaktiviert werden können (Raschke *et al.*, 2003).

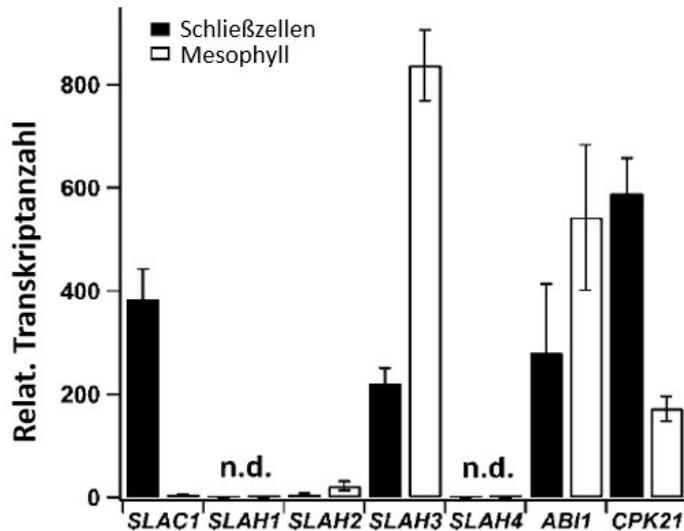
In den Schließzellen von *Arabidopsis thaliana* sind schon seit den achtziger Jahren S-Typ-Anionenströme dokumentiert worden (Schroeder und Hagiwara, 1989; Schroeder und Keller, 1992). Das Gen, das für diesen Anionenkanal kodiert, konnte aber lange Zeit nicht identifiziert werden. Im Jahre 2005 konnte dann, in zwei unabhängigen Studien gleichzeitig, das Gen, welches für den S-Typ-Anionenkanal kodiert, durch Untersuchungen verschiedener *Arabidopsis*-Mutanten genetisch isoliert werden. Man suchte damals einerseits nach Ozon-sensitiven Mutanten (*rcd*, „radical induced cell death“; Kangasjärvi *et al.*, 2005) und andererseits nach CO<sub>2</sub>-insensitiven Mutanten (*cdi*, „carbon dioxide insensitive“; Negi *et al.*, 2005). Die identifizierten Mutanten *rcd3* und *cdi3* trugen die verantwortliche Mutation in dem Gen At1g12480 und wurden später in *slac1-1* („slow anion channel associated 1“; Vahisalu *et al.*, 2008) und *slac 1-2* (Negi *et al.*, 2008) umbenannt.

SLAC1 kodiert für einen, ausschließlich in Schließzellen exprimierten, Plasmamembranständigen, nitratpermeablen S-Typ Anionenkanal mit einem [P(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)/P(Cl<sup>-</sup>)]-Verhältnis von ~10 (Geiger *et al.*, 2009). SLAC1 wird durch das Phytohormon ABA aktiviert. Dabei wird die Phosphorylierung von SLAC1 durch die Ca<sup>2+</sup>-unabhängige Kinase OST1 oder durch Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Kinasen der AtCPK-Familie (CPK3, CPK6, CPK21 und CPK23) stimuliert (Abbildung 1.16; Lee *et al.*, 2009; Geiger *et al.*, 2009; Geiger *et al.*, 2010; Brandt *et al.*, 2012; Scherzer *et al.*, 2012). Funktionsmutanten von SLAC1, deren Aktivität in Chlorid-haltigen Puffern gemessen wurde, zeigten reduzierte S-Typ-Anionenströme. Pflanzen, denen ein funktionelles SLAC1-Gen fehlt, zeigen einen gestörten Stomaschluss in Bezug auf alle essentiellen endogenen Stimuli, wie ABA, Ca<sup>2+</sup> oder NO, genau wie auf alle Umweltfaktoren, wie CO<sub>2</sub>, Dunkelheit, Luftfeuchtigkeit und Ozon (Negi *et al.*, 2008; Saji *et al.*, 2008; Vahisalu *et al.*, 2008).

Neben SLAC1, kodiert das Genom von *Arabidopsis thaliana* noch für vier weitere S-Typ-Anionkanäle. Diese werden auf Grund ihrer Homologie zu SLAC1 als SLAH1-SLAH4 („SLAC1-Homologe“) bezeichnet (Chen *et al.*, 2010; Negi *et al.*, 2008). SLAH1 und SLAH2 konnten bisher nur in den Wurzeln exprimiert, gefunden werden. Der S-Typ Anionenkanal SLAH3 (At5g24030) wird ähnlich wie SLAC1 ebenfalls in Wurzeln und in den Blättern, da nur schwach in den Schließzellen und wesentlich stärker im Mesophyll exprimiert (Abbildung 1.15; Zheng *et al.*, 2014). Auf subzellulärer Ebene konnte für die Kanäle SLAH1, 2 und 3 eine Lokalisation in der Plasmamembran nachgewiesen werden (Negi *et al.*, 2008).

Die Überexpression von SLAH3 unter dem *SLAC1*-Promoter, resultierte in einer Aufhebung des Phänotyps der *slac1*-Mutante. Beide Proteine können also funktionelle Anionenkanäle ausbilden. Beide Kanäle werden durch verschiedene Sets von Kinasen phosphoryliert und aktiviert, um den Transport von Anionen über die Plasmamembran zu ermöglichen. Es gibt aber einige grundlegende Unterschiede zwischen beiden Ionenkanälen. In einem Chlorid-haltigen Medium zeigen Schließzellen, die nur SLAH3 und nicht SLAC1 überexprimieren, keine typischen S-Typ-Anionenströme. Bei Experimenten

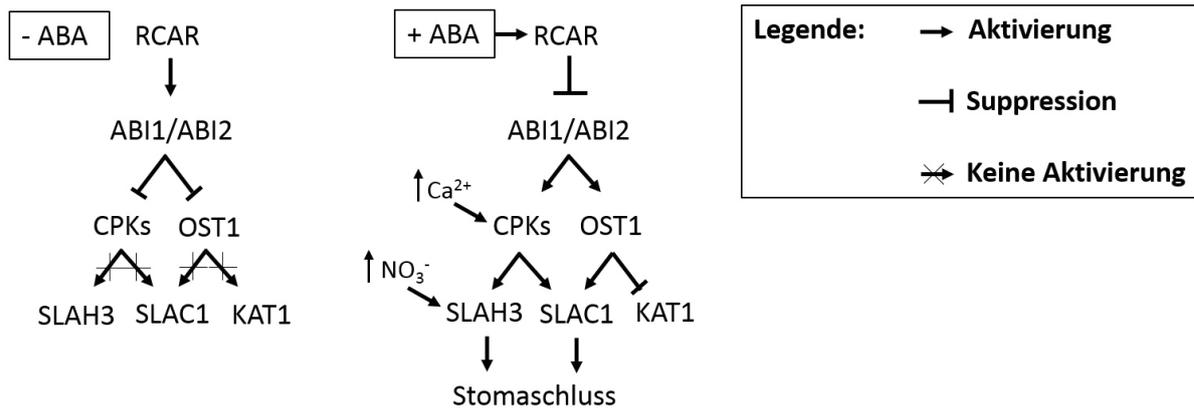
mit Schließzellen in Nitrat-haltigen Puffern, konnten typische Anionenströme gemessen werden (Geiger *et al.*, 2011). SLAH3 ist im Gegensatz zu SLAC1 ein spannungsabhängiger, durch Nitrat aktivierter Anionenkanal mit einem  $[P(NO_3^-)]/P(Cl^-)$ -Verhältnis von 20.



**Abbildung 1.15: Quantifizierung der Abundanz verschiedener Transkripte in Mesophyll und Schließzellen**

Die Transkriptanzahl wurde normalisiert auf 10.000 Moleküle Aktin. SLAC1 wird fast ausschließlich in Schließzellen exprimiert. SLAH3 wird auch in Schließzellen, aber wesentlich stärker noch im Mesophyll exprimiert. n = 4 Experimente, Mittelwert  $\pm$  SD; n.d.: nicht definiert (modifiziert, © Science Signaling AAAS; Geiger *et al.*, 2011)

Experimente mit den ABA-unempfindlichen Mutanten *abi1-1* und *abi2-1* zeigten, dass die Typ-2C-Proteinphosphatasen ABI1 und ABI2 (siehe 1.2.1.2.2) untergeordnet von Stickstoffmonoxid (NO) an der ABA-Signalkaskade teilhaben (Desikan *et al.*, 2002). Um die Interaktion von SLAH3 mit den ABA-Signalkomponenten zu untersuchen, nutzte man die BiFC-Technik. Sowohl im pflanzlichen System der Mesophyllprotoplasten, als auch im heterologen Expressionssystem der *Xenopus*-Oozyten, konnte gezeigt werden, dass SLAH3 direkt mit der Calcium-abhängigen Kinase CPK21 an der Plasmamembran interagiert. Ebenfalls interagiert CPK21 mit den Proteinphosphatasen ABI1 und ABI2 an der Plasmamembran. Wurden die Kinase CPK21 und die Phosphatase ABI1 zusammen mit dem Anionenkanal SLAH3 in Oozyten überexprimiert, ließen sich keine SLAH3-vermittelten Anionenströme mehr messen (Geiger *et al.*, 2011). Das heißt die Stimulierung der beiden Kanäle, SLAC1 und SLAH3 erfolgt auf gleicher Weise, durch den Einfluss von ABA, genauer durch die Bildung des Rezeptor-Phosphatase-Komplexes RCAR1-ABI1. Die Bindung von ABA an diesen Rezeptor-Phosphatase-Komplex inhibiert die Aktivität der Typ-2C-Proteinphosphatase ABI1, wodurch SLAH3, genauso wie SLAC1 durch interagierende und phosphorylierende Kinasen aktiviert werden kann (Abbildung 1.16; Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009, Geiger *et al.*, 2011). Da die SLAH3-Aktivierung von Nitrat und dessen Stimulierung von ABA abhängig ist, geht man davon aus, dass SLAH3 in den Schließzellen die Stomaantwort auf Trockenstress mit dem Nitratmetabolismus und den Nitrat-abhängigen Signalwegen verbindet (Geiger *et al.*, 2011).



**Abbildung 1.16: Schematische Darstellung der schnellen ABA-Signalwege, die zu einer Aktivierung von SLAC1 und SLAH3 in Schließzellen führen**

In Abwesenheit von ABA wird die Autophosphorylierung der CPK-Kinasen und OST1 durch Interaktion mit den Proteinphosphatasen AB1 und ABI2 inhibiert, wodurch diese inaktiv gehalten werden und ihre Zielproteine nicht phosphorylieren können. Nach Perzeption von ABA mittels der zytoplasmatischen RCAR/PYR/PYL-Rezeptoren (hier mit RCAR dargestellt), werden die Phosphatasen gebunden und inaktiviert. Die Inhibierung der Kinasen wird dadurch aufgehoben. Der Anionenkanal SLAH3 kann dann durch die Kinase CPK21 phosphoryliert und aktiviert werden. SLAC1 kann durch die Kinasen OST1 und durch mehrere CPKs aktiviert werden. Die Aktivierung von SLAH3 wird zusätzlich, durch die Anwesenheit von extrazellulärem Nitrat, gesteigert. OST1 inhibiert die Aktivität des Spannungs-abhängigen einwärtsgerichteten Kaliumkanals KAT1 (Sato *et al.*, 2009). Der Anionenausstrom durch SLAH3 und SLAC1 führt zu einer Depolarisierung der Schließzellmembran (Levchenko *et al.*, 2005) und zu einem Kaliumausstrom (Ache *et al.*, 2000; Hossy *et al.*, 2003). Dies bewirkt eine Abnahme des Turgors und resultiert im Stomaschluss (modifiziert, © Science Signaling AAAS; Geiger *et al.*, 2011).

#### 1.2.1.2.4.2

#### NADPH-Oxidasen

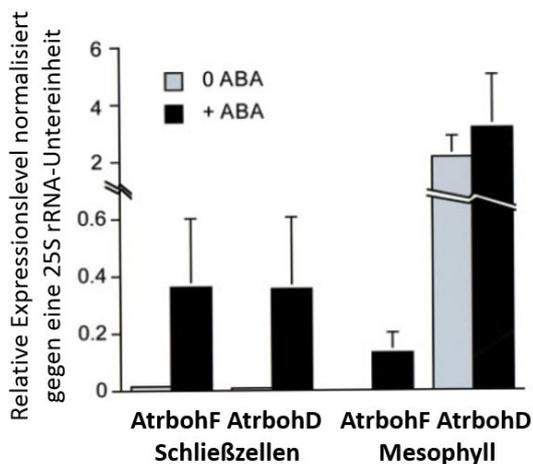
Seit der Entstehung von molekularem Sauerstoff in unserer Erdatmosphäre durch Sauerstoff-produzierende, photosynthetisch aktive Organismen vor etwa 2,7 Milliarden Jahren, sind reaktive Sauerstoffspezies („Reactive Oxygen Species“, ROS) die unwillkommenen Begleiter von aerobem Leben (Halliwell und Gutteridge, 2007). Im Gegensatz zu Sauerstoff, sind diese teilweise reduzierten oder aktivierten Derivate von Sauerstoff (Singulett-Sauerstoff  $^1\text{O}_2$ ; Superoxid-Anion  $\text{O}_2^-$ ; Wasserstoffperoxid  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; Hydroxylradikal  $\text{HO}\cdot$ ) hochgradig reaktiv und toxisch und können zur oxidativen Zerstörung von Zellen führen (Asada und Takahashi, 1987). Als Konsequenz dessen, war und ist die Evolution von aeroben Organismen von effektiven, ROS beseitigenden Mechanismen abhängig. In den letzten Jahren wurden zahlreiche neue Funktionen für ROS gefunden: Die Kontrolle und Regulation von biologischen Prozessen, wie Wachstum, Zellzykluskontrolle, des programmierten Zelltodes, Hormonhaushalt, die Reaktion auf biotischen und abiotischen Stress, sowie die generelle morphologische Entwicklung (Van Breusegem und Dat, 2006; Torres *et al.*, 2006; Carol und Dolan, 2006; Gapper und Dolan,

2006). Diese Studien haben das generelle Verständnis von einer dualen Rolle von ROS in der Pflanzenbiologie als toxisches Nebenprodukt von aerobem Stoffwechsel und als Regulator von essentiellen physiologischen Prozessen, erweitert. Die Verwendung von ROS als Signalmolekül durch Pflanzen setzt voraus, dass diese während der Evolution ein hochgradiges Netzwerk an Kontrollmechanismen entwickelt haben müssen, um mit den ROS und ihrer Toxizität umgehen zu können (Mittler *et al.*, 2004). In Pflanzen wird die Produktion von ROS vor allem durch die Erkennung bestimmter Signale, wie PAMPs/MAMPs („pathogen/microbe-associated molecular patterns“) oder verschiedener Elicitoren ausgelöst. Die Elicitor-induzierte ROS-Produktion geht mit ansteigenden zyttoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen einher (Blume *et al.*, 2000; Kadota *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2005). Dieser intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg kann durch verschiedene Chelatoren (z.B. EGTA und BAPTA) und durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblocker (z.B.  $\text{La}^{3+}$ ) inhibiert werden. Die Elicitor-induzierte ROS-Produktion kann auch durch den Stoff Diphenyliodonium (DPI), der die Aktivität von NADPH-Oxidasen hemmt, inhibiert werden (Zhao *et al.*, 2005; Yoshioka *et al.*, 2001). Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Aktivität der NADPH-Oxidasen in mikrosomalen Membranfraktionen von Tomate und Tabak durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Behandlung *in vitro* gesteigert werden konnte (Sagi und Fluhr, 2001).

Eine molekulare Analyse hat gezeigt, dass zwei NADPH-Oxidasen, die im *Arabidopsis*-Genom kodiert sind, AtrbohD (At5g47910) und AtrbohF (At1g64060), für die ABA-vermittelte ROS-Produktion und den daraus resultierenden Stomaschluss verantwortlich sind. Zehn dieser plasmamembranständigen (Keller *et al.*, 1998) NADPH-Oxidasen sind im Genom von *Arabidopsis thaliana* kodiert. Genchipexperimente mit hochaufgereinigter RNA aus Schließzellen (>98% rein) und Mesophyll (>96% rein) identifizierten die beiden homologen Oxidasen AtrbohD und AtrbohF. Die Oxidasen AtrbohA, AtrbohC, AtrbohE und AtrbohI konnten nicht in Schließzellen nachgewiesen werden. Die AtrbohB wird zwar in geringen Mengen in Schließzellen exprimiert, aber die Behandlung dieser Zellen mit ABA, hob die Genexpression von AtrbohB in Schließzellen wieder auf. Die beiden Oxidasen AtrbohH und AtrbohJ waren auf den eingesetzten Genchips gar nicht zu finden. Die Expression von AtrbohD und AtrbohF war nach ABA-Behandlung in Schließzellen hochreguliert. Die Oxidase AtrbohD war, mit und ohne ABA-Behandlung, ebenfalls im Mesophyll exprimiert. Dem hingegen war AtrbohF vor der Behandlung mit ABA nicht im Mesophyll lokalisiert und nach ABA-Gabe nur in geringsten Mengen (Abbildung 1.17; Kwak *et al.*, 2003).

Um zu untersuchen, ob die NADPH-Oxidasen eine Rolle in ABA-vermittelten Signalprozessen spielen, wurden dSpm-Insertionen in die entsprechenden Gene eingefügt um deren Expression auszuschalten (Tissier *et al.*, 1999; Torres *et al.*, 2002). Da die NADPH-Oxidasen nicht die einzigen möglichen ROS-Produzenten sind, wurden Versuche zum ABA-induzierten Stomaschluss zuerst an den Einzelmutanten durchgeführt. Die Mutante *atrbohD* zeigt im Vergleich zum Wildtyp keinen Unterschied in Bezug auf den Stomaschluss. Der ABA-vermittelte Stomaschluss in der Einzelmutante *atrbohF* war dagegen leicht beeinträchtigt. Die Doppelmutante *atrbohD/F* zeigte dagegen

eine deutliche, starke Einschränkung des Stomaschlusses im Vergleich zum Wildtyp und der Mutante *atrbohF*. Kontrollmutanten (*atrbohE* und *atrbohD/E*) offenbarten keinerlei veränderte ABA-Antwort, woraus sich schließen lässt, dass die Mutation *atrbohD* an einer gesteigerten Unempfindlichkeit gegen ABA in der Doppelmutante verantwortlich ist und die beiden Oxidasen *AtrbohD* und *AtrbohF* teilweise überlappende Funktionen bezüglich der ABA-vermittelten Schließzellantwort haben müssen. Weiterhin zeigten die Schließzellen der Doppelmutante eine verringerte ROS-Produktion, die Folge einer Behandlung mit ABA wäre. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die NADPH-Oxidasen, im Besonderen *AtrbohD* und *AtrbohF*, die hauptsächlichen enzymatischen Quellen der ABA-induzierten ROS-Produktion in Schließzellen sind (Kwak *et al.*, 2003).



**Abbildung 1.17: AtrbohD und AtrbohF sind nach ABA-Behandlung in Schließzellen hochreguliert**

Die RNA für die Genchipexperimente wurde aus Schließzellen und Mesophyllzellen von Pflanzen gewonnen, die 4h zuvor mit 100µM ABA oder Wasser besprüht wurden. Beide Oxidasen sind nach ABA-Behandlung deutlich höher in Schließzellen exprimiert als ohne ABA. Die Oxidase *AtrbohD* ist auch ohne ABA-Behandlung deutlich höher im Mesophyll lokalisiert als *AtrbohF* (modifiziert, © EMBO Journal, Kwak *et al.*, 2003).

Eine weitere interessante Untersuchung mit Hilfe des zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Reporters „Yellow Cameleon 2.1“ (Miyawaki *et al.*, 1997; Allen *et al.*, 1999), diente dazu festzustellen, ob die, von den NADPH-Oxidasen produzierten ROS einen Einfluss auf die ABA-vermittelte Steigerung der zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration haben. Nach der Behandlung mit 5µM ABA zeigten 85,7% der Wildtyp-Schließzellen, einen Anstieg der zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Im Gegenteil dazu, zeigten nur 45,5% der Schließzellen der Doppelmutante *atrbohD/F* eine Reaktion auf ABA im Sinne eines Anstiegs der zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Das bedeutet, dass diese NADPH-Oxidasen die Schließzellantwort, durch Regulation der ABA-induzierten zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, beeinflussen (Kwak *et al.*, 2003).

Die *rboh*-Proteine in Pflanzen besitzen zwei putative EF-Hand-Motive (Abbildung 1.18; Torres und Dangl, 2005). Ein immobilisiertes, synthetisches Peptid, das die beiden EF-Hand-Motive der Oxidase *AtrbohF* beinhaltet, konnte  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  binden (Keller *et al.*, 1998). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  für die Regulierung der Oxidasen notwendig ist. Die Behandlung von Zellen, die transient die NADPH-Oxidase *AtrbohD* überexprimierten, mit Ionomycin, einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor, zeigte eine schnelle, aber nur kurz messbare Induktion der ROS-Produktion. Es konnte jedoch keine ROS-Produktion verzeichnet werden, wenn kein extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  vorhanden war. Diese

Beobachtungen deuten darauf hin, dass die AtrbohD-vermittelte ROS-Produktion hauptsächlich eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Enzymaktivität ist (Ogasawara *et al.*, 2008). Eine Analyse der Aminosäurezusammensetzung der beiden EF-Hand-Motive von AtrbohD zeigten einen Asparaginrest an der zwölften Position des zweiten EF-Hand-Motives im Gegensatz zu einem zweizähnigen Aspartat- oder Glutaminrest, den auch die meisten EF-Hand-Motive in anderen untersuchten Proteinen aufweisen (Tanokura und Yamada, 1984; Gutierrez-Ford *et al.*, 2003; Ogasawara *et al.*, 2008). Um zu testen, ob diese Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung der EF-Handmotive, eine Auswirkung auf deren Fähigkeit zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung haben, wurde die Affinität von  $\text{Ca}^{2+}$  an die beiden Wildtyp-EF-Hand-Motive zu binden mit der der mutierten EF-Hand-Motive, mit jeweils einem Aminosäureaustausch in der zwölften Position, verglichen. Die zwölfte Aminosäure (Glutaminsäure) im ersten EF-Hand-Motiv wurde mit einer nicht-zweizähnigen Aminosäure (Glutamin) ausgetauscht und zeigte daraufhin eine verringerte Affinität zur Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ . Die zwölfte Aminosäure (Asparagin) in dem zweiten EF-Hand-Motiv wurde zu einer zweizähnigen Aminosäure (Glutaminsäure) ausgetauscht, wodurch das zweite EF-Hand-Motiv im Anschluss eine erhöhte Affinität zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung aufwies. Das erste EF-Hand-Motiv trägt also wesentlich stärker zur Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  bei als das zweite.

Ähnliche Erkenntnisse konnten drei Jahre später auch für die Oxidase AtrbohF gewonnen werden. Auch dieses Enzym besitzt eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige ROS-produzierende NADPH-Oxidaseaktivität und auch das erste EF-Hand-Motiv von AtrbohF wird für die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  benötigt und trägt somit stärker zur Aktivierung der AtrbohF bei, als das zweite EF-Hand-Motiv (Kimura *et al.*, 2011).

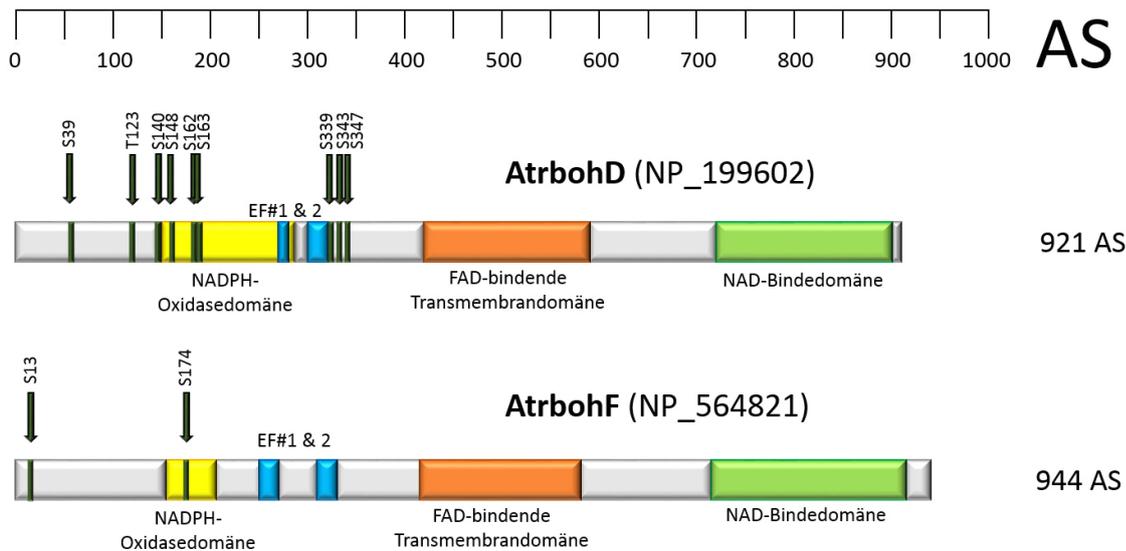
Ebenso konnte gezeigt werden, dass der Kinase-Inhibitor K-252a, die Elicitor-induzierte ROS-Synthese, vermittelt durch die beiden Oxidasen AtrbohD und AtrbohF, unterbindet (Chandra und Low, 1995; Rajasekhar *et al.*, 1999; Kadota *et al.*, 2004) und der Ser/Thr-Phosphatase-Inhibitor Calyculin A diese induziert (Felix *et al.*, 1994; Kuchitsu *et al.*, 1995; Takahashi *et al.*, 1999; Kojo *et al.*, 2006). Dies zeigt, dass auch eine Phosphorylierung der NADPH-Oxidasen für deren Aktivierung notwendig ist. Die ROS-produzierende Aktivität der beiden NADPH-Oxidasen AtrbohD und AtrbohF konnte durch Calyculin A, aber auch in Abwesenheit von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert werden, was beweist, dass die durch Phosphorylierung induzierte ROS-Produktion beider Oxidasen also auch unabhängig von  $\text{Ca}^{2+}$  sein kann (Kimura *et al.*, 2011). Dies wird in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit bestätigt, in welcher gezeigt wurde, dass die PRR („pattern recognition receptors“)-assoziierte Kinase BIK1 nicht nur mit der Oxidase AtrbohD interagieren und diese in Elicitor-abhängiger Weise phosphorylieren kann, sondern die Aktivierung der Kinase und die anschließende Phosphorylierung der Oxidase unabhängig von  $\text{Ca}^{2+}$  erfolgt (Kadota *et al.*, 2014).

Nach einer Behandlung der beiden Oxidasen mit K-252a, konnte die Ionomycin-induzierte ROS-Produktion in einer Dosis-abhängigen Weise unterbunden werden. Das bedeutet,

dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte Aktivierung der beiden Oxidasen AtrbohD und AtrbohF von einer zuvor erfolgten Phosphorylierung der beiden Proteine abhängig ist (Kimura *et al.*, 2011). In einem weiteren Versuch, bei dem zuerst eine Behandlung mit Calyculin A und erst danach eine Induktion der ROS-Produktion durch Gabe von Ionomycin erfolgte, konnte gezeigt werden, dass AtrbohF genau wie AtrbohD synergistisch durch Phosphorylierung und  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung aktiviert wird. Die Quantifizierung der, durch die aktiven Oxidasen produzierten ROS ergab, dass AtrbohD generell aktiver ist und signifikant mehr ROS produziert (Ogasawara *et al.*, 2008; Kimura *et al.*, 2011).

Alle Atrboh-Proteine haben eine ähnliche Domänenstruktur (Abbildung 1.18), weshalb man vermuten könnte, dass sie auch alle durch einen ähnlichen Mechanismus aktiviert werden. Insbesondere aber die Aminosäuresequenzen der N-terminalen, zytoplasmatischen Region der Atrboh-Oxidasen sind sehr variabel, weshalb in der Zukunft unbedingt weitere vergleichende Analysen durchgeführt werden müssen. Obwohl die beiden NADPH-Oxidasen AtrbohD und AtrbohF auf ähnliche Weise aktiviert werden, zeigen die Mutanten *atrbohD* und *atrbohF* dennoch unterschiedliche Phänotypen. Zum Beispiel akkumulieren, durch avirulente Bakterien induziert, gebildete ROS, in Wildtyppflanzen und in der Mutante *atrbohF*, nicht aber in der *atrbohD*. Auch weil die Quantität der durch AtrbohD gebildeten ROS größer ist, kann man davon ausgehen, dass diese NADPH-Oxidase vor allem für die Produktion des Großteils, der in Abwehrreaktion benötigten ROS, verantwortlich ist. Für AtrbohF wird eher eine Beteiligung am hypersensitiven Zelltod angenommen (Torres *et al.*, 2002). Der ABA-induzierte Stomaschluss ist in der Mutante *atrbohF* beeinträchtigt, nicht aber in der *atrbohD* (Kwak *et al.*, 2003). Ethylen induziert die ROS-Produktion und den Stomaschluss in den Schließzellen der *atrbohD*-Mutante, nicht aber in der *atrbohF* (Desikan *et al.*, 2006). Diese signifikanten Unterschiede in der Aktivität beider Oxidasen, könnte eine zumindest teilweise funktionelle Diversität zwischen AtrbohD und AtrbohF bedeuten (Kimura *et al.*, 2011).

Nachdem die Oxidasen AtrbohD und F durch Ionomycin und den damit verbundenen kurzzeitigen zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg aktiviert wurden, zeigte sich keine kontinuierliche Aktivierung der beiden Oxidasen, stattdessen erfolgte eine schnelle Inaktivierung (Ogasawara *et al.*, 2008; Kimura *et al.*, 2011). Diese Tatsache suggeriert die Anwesenheit eines inhibitorischen Mechanismus, der die ROS-produzierende Aktivität der Oxidasen direkt nach deren Aktivierung wieder unterdrückt. Die physiologische Relevanz eines solchen inhibitorischen Mechanismus liegt in der hohen Toxizität von ROS, die vorwiegend darin besteht prinzipiell jedes Protein oxidieren zu können. So könnten auch die beiden Oxidasen AtrbohD und AtrbohF durch die von ihnen gebildeten ROS inaktiviert werden. Diese Annahme wird aber dadurch widerlegt, dass die, durch Calyculin A induzierte, ROS-Produktion auch noch nach der transienten Aktivierung der Oxidasen durch Ionomycin messbar war (Kimura *et al.*, 2011).

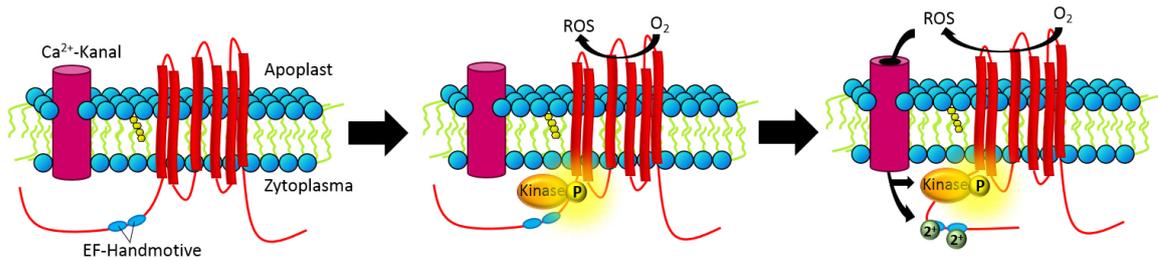


**Abbildung 1.18: Putative Proteinstruktur der beiden NADPH-Oxidasen AtrbohD und AtrbohF**

Der C-Terminus ist hoch konserviert, trägt eine FAD- und eine NAD-bindende Domäne, und wird zu sechs Transmembrandomänen in Form von  $\alpha$ -Helices organisiert. Der N-Terminus unterscheidet sich zwischen den einzelnen Atrbohs und weist jeweils zwei EF-Hand-Motive (blau) auf (Diese Darstellungen beziehen sich auf Analysen die mit dem „Conserved Domains“-Werkzeug der Internetseite „NCBI“ durchgeführt wurden). Mit dunkelgrünen Pfeilen sind die bisher bekannten Phosphorylierungsstellen angedeutet (Sirichandra *et al.*, 2009; Dubiella *et al.*, 2013; Kadota *et al.*, 2014).

Für die in Wurzelhaarspitzen lokalisierte, Oxidase AtrbohC wurde ein positiver Regelmechanismus durch die Wirkung von ROS und  $\text{Ca}^{2+}$  beschrieben. Die Oxidase wird phosphoryliert und produziert ROS, wodurch benachbarte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle aktiviert werden und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle erfolgt.  $\text{Ca}^{2+}$  bindet dann direkt an die EF-Hand-Motive der Oxidase, wodurch die Synthese von ROS noch gesteigert wird (Abbildung 1.19; Takeda *et al.*, 2008). Der Auslöser für diesen Mechanismus ist bisher unbekannt. Auch ob die beiden Oxidasen AtrbohD und AtrbohF ebenfalls auf diese Weise wirken, ist bisher unklar. Die Doppelmutante *atrbohD/atrbohF* zeigt keine ABA-induzierte ROS-Produktion, keine Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen Kanälen und einen gestörten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Schließzellen (Kwak *et al.*, 2003), was nahelegt, dass ein positiver Regelmechanismus, der durch die beiden Oxidasen AtrbohD und AtrbohF reguliert wird, ebenfalls eine Rolle in ABA-Signalwegen spielt.

## 1 Einleitung



**Abbildung 1.19: Hypothetisches Model über die rboh-Aktivierung durch Phosphorylierung als Auslöser für einen positiven Regelmechanismus durch  $\text{Ca}^{2+}$  und ROS**

Die Phosphorylierung der Oxidase durch eine interagierende Kinase ist die Voraussetzung für die  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte ROS-Produktion von AtrbohD und AtrbohF (rot). Im Gegensatz dazu ist die Phosphorylierungs-induzierte ROS-Produktion unabhängig von  $\text{Ca}^{2+}$ . Die Kinase-vermittelte (orange) Phosphorylierung der Oxidase resultiert in einer Aktivierung der ROS-Produktion, wodurch  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (rosa) aktiviert werden und somit ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom stattfindet.  $\text{Ca}^{2+}$  bindet dann an die beiden EF-Hand-Motive (hellblau) der Oxidasen und die ROS-Produktion wird weiter verstärkt.

Die Aktivität der NADPH-Oxidasen wird durch Phosphorylierung reguliert, aber Proteinkinasen, die die NADPH-Oxidasen phosphorylieren können, waren lange Zeit nicht bekannt. Zuvor wurden zwei Calcium-abhängige Kinasen, StCDPK4 und StCDPK5, in der Kartoffel identifiziert, die die Oxidase StrbohB aktivieren können (Kobayashi *et al.*, 2007). In *Arabidopsis* konnten Mitglieder der CDPK- und der Snrk2-Kinasen identifiziert werden, die eine Rolle in ABA-vermittelten Signalprozessen spielen (Mustilli *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2002; Mori *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2007). Eine Mutation in dem Gen der Snrk2-Kinase OST1 beeinträchtigt die ABA-vermittelte ROS-Produktion in Schließzellen. Tatsächlich konnte durch die BiFC-Methode gezeigt werden, dass OST1 mit AtrbohF an der Plasmamembran interagiert. Weiterhin konnte durch spektrometrische Analysen gezeigt werden, dass die Kinase OST die zwei Serinreste S13 und S174 der Oxidase AtrbohF phosphoryliert (Sirichandra *et al.*, 2009). Der Serinrest S174 ist auch in der Oxidase AtrbohD als S163 konserviert und wird in diesem Protein als Antwort auf flg22 phosphoryliert (Benschop *et al.*, 2007).

Der Elicitor flg22 induziert den Stomaschluss in Wildtyppflanzen, aber nicht in der Mutante *ost1* (Melotto *et al.*, 2006). Diese Tatsache beweist, dass OST1 sowohl die ABA- als auch Pathogen-vermittelten Signalprozesse, die den Stomaschluss durch die Aktivierung der NADPH-Oxidasen, zumindest von AtrbohF, induzieren, miteinander verbindet. Auch einige CPKs bewirken die  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Proteinphosphorylierung während pflanzlicher Verteidigungsantworten (Harmon *et al.*, 2000; Harper und Harmon, 2005). CPK4, 5, 6 und 11 wurden als Enzyme identifiziert, deren Funktionen mit Immunsignalprozessen, die durch den PAMP-Rezeptor FLS2 ausgelöst werden, korreliert sind (Boudsocq *et al.*, 2010). Die Oxidase AtrbohD wird ebenfalls als Antwort auf das bakterielle PAMP-Molekül Flagellin *in vivo* phosphoryliert. Davon ausgehend wurde die

CPK5, nach biochemischer Aktivierung als Zelltodmediator in Zusammenhang mit einer direkten Interaktion mit der Oxidase AtrbohD und deren Phosphorylierung *in vivo*, identifiziert (Dubiella *et al.*, 2013).

Die NADPH-Oxidase AtrbohD ist in diskreten, dynamischen Domänenstrukturen in der Plasmamembran von lebenden Zellen organisiert (Hao *et al.*, 2014). Dabei beruht diese Organisation wahrscheinlich auf der Existenz von verschiedenen oligomeren Zuständen, die Monomere und Dimere mit einschließen. Zuvor konnte gezeigt werden, dass die aktive Konformation der NADPH-Oxidase aus *Oryza sativa* OsrbohB eine dimere Struktur aufweist und Monomere über ihre terminalen zytoplasmatischen Domänen miteinander interagieren können (Oda *et al.*, 2010). Die bisher bekannten Regulatoren der Oxidaseaktivität können die Dynamik der Oxidase in der Plasmamembran entscheidend beeinflussen. So kann die Behandlung von transfizierten *Arabidopsis*-Epidermiszellen mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor Ionomycin zu einem signifikanten Anstieg des Diffusionskoeffizienten und zu einer verstärkten Dimerbildung der Oxidase AtrbohD führen (Hao *et al.*, 2014).

Da die Oxidase AtrbohD durch Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an die beiden EF-Hand-Motive aktiviert wird (Ogasawara *et al.*, 2008), könnte die schnellere laterale Membrandiffusion der Oxidase nach der Stimulierung mit einer  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten Konformationsänderung des Enzyms zusammenhängen. Da zelluläre Endozytosevorgänge die Fluktuation von Membranproteinen und somit deren Signalaktivität beeinflussen, ist es denkbar, dass die Oxidase AtrbohD ebenfalls Clathrin-abhängig internalisiert und somit in ihrer Lokalisierung und dadurch in ihrer Aktivität reguliert werden kann (Hao *et al.*, 2014). Diese Daten lassen vermuten, dass auch die Organisation der NADPH-Oxidase AtrbohD in Membrandomänen, die dadurch veränderten Proteindynamiken und die Clathrin-vermittelte Endozytose der Oxidase, auf synergistische Weise deren Aktivität und Funktion verändern.

Durch die Produktion von ROS, welches als Botenstoff in Signalprozessen fungiert, regulieren NADPH-Oxidasen eine Vielzahl von wichtigen Prozessen in Pflanzen. Sie sind einzigartig unter den in Pflanzen vorhandenen ROS-Produktionsmechanismen, weil sie unterschiedliche Signaltransduktionswege, wie  $\text{Ca}^{2+}$ , Proteinphosphorylierung und Lipidsignalprozesse mit der Produktion von ROS verknüpfen. NADPH-Oxidasen vermitteln ebenso die schnelle Signalweiterleitung über lange Distanzen, durch die Generierung einer sich selbstständig ausbreitenden Welle von ROS, wodurch die systemische Genexpression ausgelöst wird. Verantwortlich für die Vermittlung von lokalen und systemischen Signaltransduktionsprozessen, sind die NADPH-Oxidasen die zentral treibende Kraft der ROS-vermittelten Signalprozesse in Zellen und der Schlüssel für die Integration von vielen verschiedenen Signaltransduktionswegen in Pflanzen.

### 1.3 Ziel dieser Arbeit

---

In tierischen und pilzlichen Zellen konnten Plasmamembrandomänen bereits ausführlich als Signalplattformen charakterisiert werden. Im Laufe der Zeit konnten immer mehr Beweise dafür geliefert werden, dass solche Membrandomänen auch für die Regulation von Signalprozessen in pflanzlichen Zellen eine Rolle spielen. Nachdem die Komposition und die Dynamik dieser lateralen Kompartimente auch in Pflanzen ausführlich beschrieben und charakterisiert wurde, konnten Gemeinsamkeiten, aber auch einige grundlegende Unterschiede im Vergleich zu ihren tierischen und pilzlichen Pendanten festgestellt werden. Um nun auch die Funktion dieser Membrandomänen im pflanzlichen System besser verstehen zu können, wurden diese in Form von DRM-Fraktionen durch Detergenzbehandlung isoliert und massenspektrometrisch untersucht. Dabei konnten mehr als 200 Proteine identifiziert werden, von denen 50% bisher nicht in zuvor durchgeführten DRM-Analysen detektiert werden konnten. Unter anderem konnte ein Membrandomänen-assoziiertes Proteinkomplex, bestehend aus der regulatorischen Kinase CPK21 und der PP2C-Phosphatase ABI1, identifiziert werden. Dieser Proteinkomplex reguliert auch den Mesophyll-lokaliserten Anionenkanal SLAH3. Die an dieser Stelle anschließenden Untersuchungen bestätigten, dass SLAH3 abhängig von seiner Lokalisierung innerhalb oder außerhalb von Membrandomänen reguliert wird und diese Domänen somit eine Plattform für die Assemblierung und Funktion von Proteinkomplexen darstellen.

Die NADPH-Oxidase AtrbohD ist verantwortlich für die Generierung von ROS während der ABA-vermittelten Antwort auf einen Befall durch Pathogene und konnte ebenfalls in den isolierten und analysierten DRMs, als Membrandomänen-assoziiertes Signalprotein identifiziert werden. Die enzymatische Aktivität dieser Oxidase wird durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung und Phosphorylierung über die direkte Interaktion mit einer Proteinkinase synergistisch reguliert. Die Funktion von AtrbohD in Mesophyllzellen und die damit zusammenhängende Zelltyp-spezifische Regulation der ROS-Synthese ist bisher nur unzureichend verstanden. Bisher weiß man, dass die Aktivierung von AtrbohD durch die Kinase CPK5 zu einer schnellen Signalweiterleitung und ROS-basierter Antwort auf Pathogenbefall führt. In Schließzellen konnte gezeigt werden, dass die homologe Oxidase AtrbohF durch die Snrk2-Kinase Snrk2.6/OST1 phosphoryliert und letztlich aktiviert wird, wodurch die Produktion von ROS und somit der Stomaschluss eingeleitet wird.

Von diesen wenigen bekannten und funktionell relevanten Interaktionen ausgehend soll nun mit Hilfe verschiedener mikroskopischer Methoden zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen ein weiterer Interaktionspartner für die NADPH-Oxidase AtrbohD identifiziert werden. Ausgehend von der bekannten Interaktion zwischen AtrbohF und der Snrk2-Kinase OST1, stehen vor allem die im Mesophyll lokalisierten Snrk2-Kinasen als potentielle Interaktionspartner der Oxidase AtrbohD im Vordergrund. Im Verlauf dieser Untersuchungen soll weiterhin geklärt werden, ob die funktionelle Regulation und die

Aktivierung von AtrbohD von der Lokalisierung der Oxidase innerhalb oder außerhalb von spezifischen Plasmamembrandomänen beeinflusst wird, so wie es zum Beispiel für den zuvor untersuchten Anionenkanal SLAH3 der Fall ist, oder ob die Oxidase AtrbohD unabhängig von ihrer Membranumgebung reguliert wird.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Molekularbiologie

---

#### 2.1.1 Bakterienkultivierung

##### 2.1.1.1 *Escherichia coli* MRF'

Für Transformation (2.1.2.1), Untersuchung und Aufreinigung von DNA (2.1.4) im Zuge von Klonierungsprozessen, wurde der chemisch kompetente *Escherichia coli* Stamm XL1 Blue MRF' verwendet. Bei optimalen Kulturbedingungen von 37°C haben diese Bakterien eine Verdopplungszeit von 20-30 min. Die Kultivierung dieser Bakterien erfolgte auf LB (Luria-Bertani)-Medium, welches nach der Transformation der Bakterien zu Selektionszwecken mit den entsprechenden Antibiotika, immer mit einer finalen Konzentration von 50µg/l, versetzt wurde. Wenn mit pNB1, pSat, pcDNA3.1, pEF1 oder pUBQ10 USER-Vektoren (2.12) kloniert wurde, wurde Ampicillin zugesetzt und bei Verwendung von pCambia USER-Vektoren Kanamycin (2.12). Für die längerfristige Lagerung transformierter Bakterien, wurde 1ml einer gut angewachsenen Kultur durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge („MiniSpin® Plus“, Eppendorf) pelletiert, in 1ml LB-Medium, versetzt mit 40% Glycerol, resuspendiert und bei -80°C eingefroren. Aus diesen Cryostocks wurden dann direkt die Kulturen für die DNA-Midiprep (2.1.4.2) angeimpft.

LB-Medium:            10g/l Trypton  
                               5g/l Hefeextrakt  
                               10g/l NaCl  
                               (15g/l Agar-Agar, dänisch, für Agar-Platten)

##### 2.1.1.2 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101

Für die transiente Genexpression in Tabakpflanzen (2.7) wurde der elektrokompetente Stamm GV3101 des Bodenbakteriums *Agrobacterium tumefaciens* verwendet. Bei einer Temperatur von 28°C beträgt die Verdopplungszeit dieser Bakterien 90 min. Die Kultivierung erfolgte auf YEB-Medium, welches 10µg/l Rifampicin und 25µg/l Gentamycin enthält. Zur Selektion von erfolgreich mit pCambia-Konstrukten (2.12) transformierten Bakterien wurde dem Medium zusätzlich noch 100µg/l Kanamycin zugesetzt. Auch von diesen Bakterien wurden, nach erfolgreicher Transformation, Cryostocks in YEB-Medium mit 40% Glycerol angefertigt und zum direkten animpfen von Infiltrationskulturen (2.7) verwendet.

YEB-Medium:           5g/l Trypton  
                          5g/l Hefeextrakt  
                          5g/l Saccharose  
                          50mM MgSO<sub>4</sub>  
                          (15g/l Agar-Agar, dänisch für Agar-Platten)

### 2.1.2 DNA-Transformation

#### 2.1.2.1 Transformation von MRF'

Tiefgefrorene 50µl-Aliquots von MRF' wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit 1,5µl einer USER-Reaktion (2.1.15) oder eines Ligationsansatzes (2.1.17) versetzt. Nach einer zweiminütigen Inkubationszeit auf Eis wurden die Bakterien für 45 sec einem Hitzeschock von 42°C unterzogen. Nach einer weiteren kurzen Inkubation von 2-3 min auf Eis wurden die Bakterien bei Raumtemperatur (RT) für eine Minute in einer Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit pelletiert. Der Überstand wurde bis auf etwa 50µl abgeschüttelt, das Bakterienpellet darin resuspendiert, auf einer vorgewärmten LB-Agar-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 2.1.2.2 Transformation von GV3101

Die Agrobakterien vom GV3101-Stamm tragen ein entschärftes Ti-Plasmid, welches die Transferfunktionen in den Wirt enkodiert, aber nicht mehr das T-DNA-Segment beherbergt, welches in die Pflanze übertragen wird. Dieses befindet sich auf einem separaten Plasmid, welches typischerweise in *Escherichia coli* manipuliert und dann über Elektroporation in den Agrobakterienstamm transformiert wird. Dies nennt man ein „binäres Vektorsystem“. In unserem Fall handelt es sich dabei um die pCambia USER-Vektoren (2.12).

Zuerst wurden die Agrobakterien als Flüssigkultur in 5ml YEB-Medium, versetzt mit den Antibiotika Rifampicin (10µg/l) und Gentamycin (25µg/l), bei 28°C angezogen. Zum Ernten werden die Zellen 3-4mal für eine Minute bei 8000×g (relative Zentrifugalbeschleunigung als Vielfaches der mittleren Erdbeschleunigung g) und RT pelletiert und mit jeweils 800µl H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub> gewaschen. Zum Schluss werden die Zellen in 50µl H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub> resuspendiert. Die Bakterienlösung wurde mit 1µl DNA versetzt und in eine auf Eis abgekühlte Küvette mit einem Elektrodenabstand von 2mm gegeben. Die Elektroporation erfolgte bei einer Spannung von -2500V für 5,4 sec („Electroporator 2510“, Eppendorf). Die Bakterienzellen wurden danach in 1ml SOC-Medium aufgenommen und für eine Stunde leicht geschüttelt bei 28°C, um die Expression der

Antibiotikaresistenzen zu optimieren. Durch Zentrifugation für eine Minute bei 8000xg und RT wurden die Zellen pelletiert, der Überstand bis auf 50µl verworfen, die Zellen im verbliebenen Überstand resuspendiert und auf einer vorgewärmten YEB-Agarplatte mit 100µg/l Kanamycin, zusätzlich zu den oben genannten Antibiotika, ausplattiert und für 2 Tage bei 28°C inkubiert. Parallel dazu wurde ein GV3101-Stamm, der einen 19K-Enhancer, einen Genabschnitt der die Transkriptionsaktivität der transformierten Gene verstärken und eine methylierungsbedingte Abschaltung dieser verhindern soll, trägt, auf YEB-Platten mit Rifampicin, Gentamycin und Kanamycin ausplattiert und für zwei Tage bei 28°C inkubiert.

SOB-Medium:            20g/l Trypton  
                              5g/l Hefeextrakt  
                              0,5g/l NaCl  
                              5g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

SOC-Medium:            SOB-Medium + 10mM Glukose

### 2.1.3 Gelelektrophorese von Nucleinsäuren

Die Separierung von Nucleinsäurefragmenten mittels Gelelektrophorese beruht auf dem Prinzip, dass die Zucker-Phosphatketten der Nucleinsäuren negativ geladen sind und somit von der Kathode zu Anode migrieren. Dies geschieht unter Ausnutzung der unterschiedlichen Mobilitäten, mit denen die verschieden großen Moleküle in der Lage sind das stark vernetzte, viskose Medium, das Agarosegel, zu passieren. Die optimale Auflösung dieser Separierung ist abhängig von der Porengröße, welche wiederum vom Anteil der Agarose im Gel abhängt. Idealerweise benutzt man für Fragmentgrößen von 500 – 7.000bp 1%ige Agarosegele, bei Fragmentgrößen zwischen 200 – 4.000bp 2%ige und bei Fragmentgrößen unter 1.000bp eignen sich 3%ige Agarosegele am besten.

#### 2.1.3.1 Analytische DNA-Gelelektrophorese

Die Bestimmung der unterschiedlichen Längen des Elektrophoresematerials erfolgte durch den Vergleich mit einem selbst hergestellten λ-Pst-Größenmarker, der parallel zur Probe mit auf das Agarosegel aufgetragen wurde (0,5µg pro Tasche). Dazu wurde DNA des λ-Phagen komplett mit dem Restriktionsenzym PstI verdaut, wodurch genau 29 Fragmente mit definierten Längen entstehen. Die zu analysierende DNA wurde im Verhältnis 1:1 mit einem DNA-Probenpuffer versetzt und in die jeweiligen Taschen auf dem Gel aufgetragen. Die Auftrennung der einzelnen DNA-Fragmente erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100V für 30-60 min in einem TAE-Puffer. Die Visualisierung der

DNA-Fragmente erfolgte über UV-Transillumination („Gel iX Imager“, INTAS; „BLstar16“, Biometra) von 0,005% „GelGreen™“ (Biotium), enthalten in den Agarosegelen. Dieser fluoreszente Farbstoff ist weniger genotoxisch als Ethidiumbromid, da er nicht in lebende Zellen eindringen und mit deren DNA interkalieren kann.

### 2.1.3.2 Präparative DNA-Gelelektrophorese

Präparative Agarosegele dienen der Separierung von unterschiedlich langen DNA-Fragmenten nach USER-PCRs (2.1.11) oder Restriktionsverdauen (2.1.16) um gewünschte Fragmente von unerwünschten zu separieren, aus dem Gel auszuschneiden und anschließend aus dem Gel aufzureinigen (2.1.5). Dafür wurden die Gele dicker gegossen als bei analytischen Gelen und zwischen jeder aufgetragenen Probe eine Tasche leer gelassen um eine Durchmischung der Fragmente beim späteren Ausschneiden zu vermeiden.

25X TAE-Puffer:                    121g/l Tris  
    28,55gml/l Essigsäure 96%  
    18,6g/l Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O  
    pH > 8,0

5X DNA-Probenpuffer:            0,25% (w/v) Bromphenolblau  
    0,25% (w/v) Xylencyanol  
    100mM EDTA  
    50% Glycerin

### 2.1.3.3 RNA-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von unterschiedlich langen RNA-Fragmenten erfolgte in 5% Formaldehyd-haltigen 1,5%igen Agarosegelen in einem MEN-Puffersystem. Die RNA wurde im Verhältnis 1:1 mit einem RNA-Probenpuffer versetzt, 10 min bei 70°C aufgeköcht, für 2 min auf Eis abgekühlt, in die Taschen des entsprechenden Gels geladen und bei einer Spannung von 60-70V ca. 90 min laufen gelassen. Den Agarosegelen wurde 0,02% „GelRed™“ (Biotium) zugesetzt um die RNA-Fragmente anschließend über UV-Transillumination detektierbar zu machen.

10X MEN:                            41,86g/l MOPS  
    3,89g/l Na-Acetat (H<sub>2</sub>O-frei)  
    1,86g/l EDTA (Na<sub>2</sub>-Salz)  
    pH 7,0

<u>2× RNA-Probenpuffer:</u>	95% Formamid
	0,025% SDS
	0,025% Bromphenolblau
	0,025% Xylencyanol
	0,5mM EDTA

#### 2.1.4 DNA-Aufreinigung

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* MRF' erfolgte in kleinem Maßstab von 1,5ml (DNA-Miniprep) zum Zwecke der Klonierung (2.1.15 und 2.1.17) und Kontrolle (2.1.10 und 2.1.16) von Expressionskonstrukten. In größerem Maßstab von 200ml (DNA-Midiprep) erfolgte die Präparation von Plasmid-DNA vor allem zu Gewinnung von größeren Mengen reinerer Plasmid-DNA für Transformations- und Transfektionsprozesse (2.1.2, 2.3, 2.5 und 2.6).

##### 2.1.4.1 DNA-Miniprep

Nach einer Transformation (2.1.2.1) gewachsene Einzelkolonien wurden in 2ml LB-Medium, mit dem entsprechenden Antibiotikum, angeimpft und bei 37°C über Nacht (ON) bei 500 Umdrehungen pro Minute („revolutions per minute“, rpm) schüttelnd inkubiert. 1,5ml dieser Kultur wurden für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit pelletiert und der Überstand bis auf ca. 50µl abgenommen. Das Bakterienpellet wurde in dem verbliebenen Überstand resuspendiert und durch alkalische Lyse nach Birnboim und Doly (1979) aufgeschlossen. Dazu wurden die resuspendierten Bakterien mit 400µl TENS-Puffer vermischt. Durch Zugabe von 200µl 3M Natriumacetat (pH 5,2) wurde die Lösung neutralisiert und Proteine sowie chromosomale DNA präzipitiert. Nach Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 15 min wurde der DNA-haltige Überstand mit 800µl Isopropanol vermischt und für weitere 15 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die pelletierte Plasmid-DNA wurde im Anschluss mit 500µl 70%igem Ethanol gewaschen (5 min Zentrifugation) und getrocknet (dazu wurde das Mikroliterreaktionsgefäß (RK1G, Hartenstein) offen und umgedreht auf Filterpapier gestellt). Das DNA-Pellet wurde zum Schluss in 30µl H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub> resuspendiert. Die so aufgereinigte DNA wurde anschließend zur Kontrolle einer Klonierung (2.1.15, 2.1.17) in einem Restriktionsverdau (2.1.16) analysiert.

<u>TE-Puffer:</u>	10mM TrisHCl pH 7,0
	1mM EDTA pH 8,0

<u>TENS-Puffer:</u>	9,4ml TE-Puffer
	0,5ml 10% SDS
	0,1ml NaOH
	100µg/ml RNase

#### 2.1.4.2 DNA-Midiprep

Größere Mengen reiner DNA, wie sie für Transformations- und Transfektionsprozesse (2.1.2, 2.3, 2.5 und 2.6) notwendig ist, wurde mit dem „Qiagen Plasmid Plus Midi Kit“ (Qiagen) entsprechend der Herstellervorgaben aus 200ml einer gut angewachsenen ON-Kultur isoliert und in 100µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub> aufgenommen. Nach Quantifizierung (2.1.6) und Sequenzierung (2.1.7) der DNA war diese, gelagert bei 4°C, für mehrere Monate verwendbar.

#### 2.1.5 DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen

Mittels präparativer Gelelektrophorese (2.1.3.2) aufgetrennte DNA-Fragmente wurden durch UV-Transillumination („UV Band-Elutor“, Biometra) detektiert und mit Hilfe von sterilisierten Skalpellklingen aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Um sie in Ligationsansätzen (2.1.15 und 2.1.17) verwenden zu können, wurde die DNA mit Hilfe des „Qiaquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) entsprechend der Herstellervorgaben aus der Agarose aufgereinigt und in 30µl H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub> eluiert und quantifiziert (2.1.16).

#### 2.1.6 DNA-Quantifizierung

Die Konzentrationsbestimmung und somit quantitative Analyse der aufgereinigten (2.1.4 und 2.1.5) Nucleinsäuren erfolgte durch Nutzung des „Nanodrop 2000“ Photometers (Thermo Scientific™). Dabei wurde die optische Dichte (OD) der eingesetzten Suspension bei folgenden Wellenlängen gemessen: 230nm für organische Bestandteile, 260nm für Nucleinsäuren, 280nm für aromatische Aminosäuren und 320nm für RNA. Das Verhältnis  $\frac{260}{280}$ nm für DNA-Messungen, ermöglicht die Bestimmung von Proteinkontaminationen in der DNA-Suspension. Werte über 1,8 sind akzeptabel und ideal sind sie wenn sie über 1,9 liegen. Für die Transformation von HEK-Zellkulturen (2.5) wurde nur DNA mit einem Reinheitswert über 1,9 verwendet.

### 2.1.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung und somit qualitative Analyse der aufgereinigten (2.1.4) Nucleinsäuren, vor allem von Plasmid-DNA, erfolgte nach der „Dideoxymethode“, oder auch „Kettenabbruch-Synthese“ genannt (Sanger *et al.*, 1977), durch die Firmen „LGC Genomics“ und „GATC Biotech“. Beide Firmen benutzten dafür den „3730xl DNA Analyzer“ (Applied Biosystems). Im Grunde wird durch, mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelte ddNTPs, die in die neu synthetisierten DNA-Stränge eingebaut werden und so zu einem Kettenabbruch führen, und nach Kapillarelektrophorese von einem Detektor erkannt werden, die genaue Sequenz des DNA-Stranges aufgezeichnet. Als Sequenzierprimer wurden solche gewählt, die an genau definierten Stellen innerhalb des Polylinkers, oder auch „Multiple cloning site“ (MCS) genannt, des zu analysierenden Vektorkonstruktes, binden konnten. Die Analyse der Sequenzierdaten erfolgte mit Hilfe der Software „Vector NTI Advance®“ Version 10.0 (Life Technologies).

### 2.1.8 Primerdesign

Für die Konzeption von Primern aller Art wurde ebenfalls die Software „Vector NTI Advance®“ Version 10.0 genutzt. Den verwendeten USER-Primern wurde immer die Sequenz GGCTTAAU an den Vorwärtsprimer (5' → 3' Primer) (fwd) vorgehängt und dem Rückwärtsprimer (5' → 3') (rev) die Sequenz UAATTTGG angehängt. Weiterhin wurde immer auf eine etwaige Annealingtemperatur (Die Temperatur bei der die Primer an die denaturierte DNA binden) von 60°C geachtet. Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma „Metabion“.

### 2.1.9 PCR-Amplifikation

Die Produkte aus Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR) wurden vorwiegend zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen (2.1.15 und 2.1.17) genutzt. Generell kam dabei die PfuC<sub>x</sub> DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (hausintern aufgereinigt), in einem finalen Reaktionsvolumen von 50µl (Tabelle 2.1), zum Einsatz. Die Reaktionen wurden entweder im „Mastercycler personal“ (Eppendorf) oder, bei mehr als 10 Proben, im „Primus Thermocycler“ (MWG-Biotech) durchgeführt.

PCR-Bestandteil	Menge
5× Phusion® HF Reaction buffer (NEB GmbH)	10µl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2,5µl
dNTPs (10mM) (Fermentas)	1µl
fwd Primer (10µM)	1µl
rev Primer (10µM)	1µl
DNA Template (100ng/µl)	1µl
PhuCx DNA-Polymerase	0,5µl
HPLC-H <sub>2</sub> O	Final 50µl

**Tabelle 2.1: PCR-Amplifikation**

Nach der Reaktion wurden 3µl der PCR im Verhältnis 1:1 mit DNA-Probenpuffer versetzt und auf ein analytisches DNA-Agarosegel (2.1.3.1) aufgetragen, um das amplifizierte DNA-Fragment zu detektieren. Wenn nötig wurde das gewünschte PCR-Fragment durch präparative DNA-Agarosegelelektrophorese (2.1.3.2) und anschließende DNA Aufreinigung aus Agarosegelen (2.1.5) von anderen unerwünschten Fragmenten sauber getrennt und im weiteren Verlauf für Klonierungsprozesse (2.1.15) verwendet.

### 2.1.10 Kolonie-PCR

Die Kolonie PCR wurde durchgeführt (Tabelle 2.3) um schnell und einfach die korrekte Insertion eines Konstruktes in den gewünschten Vektor zu überprüfen. Für die Amplifikation von Kontroll-PCR-Produkten wurden Einzelkolonien einer Klonierung (2.1.15, 2.1.17) in 10µl HPLC-H<sub>2</sub>O gelöst und durch starkes vortexen lysiert. Von dieser Bakteriensuspension wurde 1µl in die Reaktion mit der PhuCx-Polymerase in einem Gesamtreaktionsvolumen von 20µl eingesetzt.

PCR-Bestandteil	Menge
5× Phusion® HF Reaction buffer (NEB GmbH)	4µl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1µl
dNTPs (10mM) (Fermentas)	1µl
fwd Primer (10µM)	1µl
rev Primer (10µM)	1µl
Bakteriensuspension	1µl
PhuCx DNA-Polymerase	0,2µl
HPLC-H <sub>2</sub> O	final 20µl

**Tabelle 2.2: Kolonie-PCR**

Auch hier wurden nach der Reaktion 3µl der PCR im Verhältnis 1:1 mit DNA-Probenpuffer versetzt und auf ein analytisches DNA-Agarosegel (2.1.3.1) aufgetragen, um das amplifizierte DNA-Fragment zu detektieren. Für die genauere Analyse einer Klonierung eignet sich ein Restriktionsverdau (2.1.16) der durch DNA Miniprep (2.1.4.1) aufgereinigten DNA am besten.

### 2.1.11 USER-PCR

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten die im Anschluss für eine USER-Reaktion geeignet sein sollten (2.1.15) wurden Primer mit bestimmten langen Überhängen, welche immer einen Uracilrest beinhalten, verwendet (2.1.8). Die USER-PCR-Reaktion (Tabelle 2.3) kann nur mit der PhuCx-Polymerase durchgeführt werden, weil nur dieses Enzym die Uracilreste überliest, so dass diese in den resultierenden PCR-Fragmenten enthalten sind (Nour-Eldin *et al.*, 2006). Die USER-PCR wurde in einem Reaktionsvolumen von 50µl durchgeführt (Tabelle 2.1). Danach wurden 3µl der Reaktion im Verhältnis 1:1 mit DNA-Probenpuffer versetzt und auf ein analytisches DNA-Agarosegel (2.1.3.1) aufgetragen um die Fragmente zu detektieren. Wenn nötig auch auf ein präparatives DNA-Agarosegel (2.1.3.2), um die gewünschten Fragmente durch anschließende DNA Aufreinigung aus Agarosegelen (2.1.5) sauber von anderen eventuell aufgetretenen und unerwünschten Fragmenten zu trennen. Im Anschluss wurden diese USER-Fragmente für Klonierungen mittels USER-Reaktion (2.1.15) verwendet.

### 2.1.12 IVT-PCR

Diese Form der PCR (durchgeführt wie in Tabelle 2.3 beschrieben) diente dazu, mit auf spezifischen Regionen vor und nach der MCS, in pNB1-Vektorkonstrukten, bindenden IVT-Primern, das Fragment zu amplifizieren, welches dann in der *in vitro*-Transkriptionsreaktion als Matrize (2.1.14) eingesetzt wurde. Diese IVT- Primer haben immer eine Annealingtemperatur von 60°C.

### 2.1.13 PCR-Profile

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten durch die PhuCx-Polymerase erlaubt Elongationen von einem Kilobasenpaar (kb) pro Minute.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
1) Initiale Denaturierung	98°C	3 min
2) Denaturierung	98°C	30 sec
3) Primerbindung	spezifisch	30 sec
4) Elongation	72°C	abhängig von Fragmentlänge
5) Finaler Schritt	72°C	3 min
Die Schritte 2-4 wurden 30× wiederholt		

**Tabelle 2.3: PCR-Profil**

### 2.1.14 *In vitro*-Transkription

Diese Reaktion diente der Generierung von RNA aus DNA und setzt als Matrize eine aufgereinigte IVT PCR (2.1.12) voraus. Von einem Mastermix B wurden 42µl mit 8µl der IVT-PCR versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 0,5µl GTP (100mM) wurde für weiter 90 min bei 37°C inkubiert. Die Zugabe von 100µl Präzipitierungslösung und eine Inkubation des Ansatzes ON bei -20°C, dienten der Fällung der synthetisierten RNA. Diese wurde am nächsten Tag durch maximale Zentrifugation für eine Stunde bei 4°C pelletiert und mit 750µl eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen (5 min Zentrifugation). Das Pellet wurde dann gut abgedeckt, um es vor RNasen zu schützen, bei 37°C komplett getrocknet und in 20µl Nuklease-freiem DEPC-H<sub>2</sub>O (BPC-H<sub>2</sub>O) resuspendiert. Um größere Mengen reinerer RNA zu produzieren, wurde das „AmpliCap-Max™ T7 High Yield Message Maker Kit“ (Cellscript) entsprechend der Herstellervorgaben verwendet. Die RNA wurde anschließend photometrisch vermessen (2.1.6) um die genaue Konzentration zu überprüfen und in Hinblick auf ihre Qualität über RNA-Gelelektrophorese (2.1.3.3.) überprüft. Die so synthetisierte RNA wurde dann über Mikroinjektion in Oozyten von *Xenopus laevis* (2.4.1) eingebracht, um in diesem System die heterologe Proteinexpression (2.4.2) zu überprüfen.

Mastermix A:                    500µl 5× T7 Transkriptionspuffer (Thermo Scientific™)  
    250µl Dithiothreitol (DTT)  
    250µl BSA  
    25µl ATP (100mM, Fermentas)  
    25µl UTP (100mM, Fermentas)  
    25µl CTP (100mM, Fermentas)  
    1,25µl GTP (100mM, Fermentas)  
    925µl BPC-H<sub>2</sub>O

Mastermix B:                    40µl Mastermix A  
    0,1µl Pyrophosphatase, Inorganic (Fermentas)  
    0,5µl RiboGuard™ RNase Inhibitor (Epicentre)  
    0,3µl Cap (NEB GmbH)  
    1µl T7 RNA-Polymerase (Thermo Scientific™)

Präzipitierungslösung:        7,5M LiCl  
    50mM EDTA

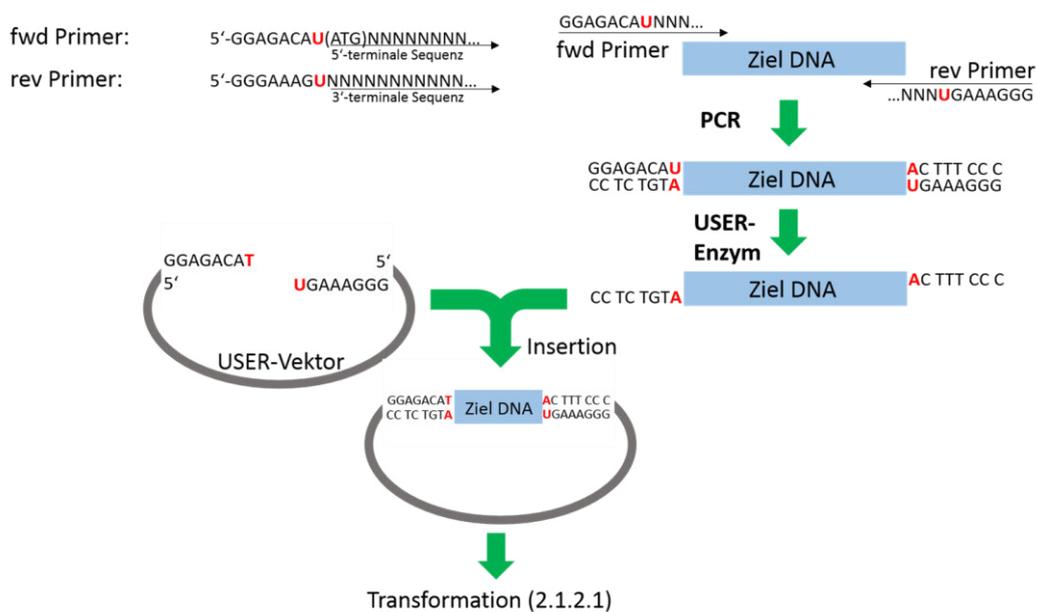
### 2.1.15 USER-Reaktion

Für die gerichtete Klonierung von Vektorkonstrukten mittels der USER-Reaktion (zusammengesetzt wie in Tabelle 2.4 beschrieben) wurde der USER™-Enzymmix („uracil specific excision reagent“, NEB) wie zuvor beschrieben (Nour-Eldin *et al.*, 2006) verwendet. Dieser Enzymmix beinhaltet eine Uracil-DNA-Glycosylase und eine DNA-Glycosylase-Lyase Endo VIII. Diese beiden Enzyme zusammen haben den Doppeleffekt, dass erstens die Uracilreste in den USER-PCR-Produkten (2.1.11) entfernt werden, wodurch die sieben Basenpaare (bp), welche dem gewünschten Fragment vor- und nachgelagert sind, dissoziieren und somit auf dem komplementären Strang ein 8bp langer Überhang entsteht. Diese Überhänge sind wiederum komplementär zu den Vektorüberhängen, wodurch zweitens das Fragment in einen zuvor konstruierten und linearisierten USER-Vektor, mit entsprechenden molekularen Reporter- (z.B. Fluoreszenztags) und Selektionsgenen, eingebaut werden kann. Für diese Reaktion werden also USER-PCR-Fragment und der gewünschte USER-Vektor vermischt und zuerst für 30 min bei 37°C und anschließend für 30 min bei 25°C inkubiert (Abbildung 2.1).

Reaktionsbestandteil	Menge
USER-Vektor	2µl
PCR-Produkt	2µl
EB-Puffer (Qiagen)	5µl
USER™-Enzymmix	1µl

**Tabelle 2.4: USER-Reaktion**

Das resultierende Vektorkonstrukt wurde dann in chemisch kompetente *Escherichia coli* MRF' transformiert (2.1.2.1) und in weiteren Schritten analysiert (2.1.4.1, 2.1.6, 2.1.7, 2.1.10 und 2.1.16).



**Abbildung 2.1: USER-Reaktion**

### 2.1.16 Restriktionsverdau

Ein Restriktionsverdau (zusammengesetzt wie in Tabelle 2.5 beschrieben) von zuvor isolierter Plasmid-DNA (2.1.4.1) ist eine gute Kontrolle der DNA-Transformation (2.1.2) in Bakterien und kann abhängig von den gewählten Restriktionsschnittstellen und den daraus resultierenden Fragmentgrößen auch zur Analyse des korrekten Einbaus eines Fragmentes in einen Klonierungsvektor (2.1.15 und 2.1.17) herangezogen werden. Alle benutzten Restriktionsenzyme gehören zur Familie der bakteriellen Endonukleasen vom TypII (Pingoud und Jeltsch, 2001). Diese Enzyme erkennen eine kurze, oft palindrome Sequenz von 4-8bp und sind in ihrer Aktivität abhängig von  $Mg^{2+}$  (Kostrewa und Winkler, 1995). Für analytische Restriktionsverdaue wurden meistens gleichzeitig zwei verschiedene Restriktionsenzyme mit gleichen, oder ähnlichen Pufferbedingungen und mit mehreren Restriktionsschnittstellen auf dem zu untersuchenden Konstrukt verwendet. Verdaut wurde die zu analysierende DNA meist für eine Stunde (vier Stunden wenn das Insert für eine traditionelle Klonierung (2.1.17) eingesetzt wurde) bei einer Temperatur von 37°C. Im Anschluss wurden 3µl des Verdaues im Verhältnis 1:1 mit DNA-Probenpuffer versetzt und über Detektion auf einem DNA-Agarosegel (2.1.3.1 und 2.1.3.2) analysiert.

Reaktionsbestandteil	Menge
Plasmid-DNA aus einer Miniprep	2µl
Restriktionsenzym	0,2µl
Restriktionspuffer (10×)	2µl
HPLC-H <sub>2</sub> O	final 20µl

**Tabelle 2.5: Restriktionsverdau**

### 2.1.17 Konventionelle Klonierung

Diese Form der Klonierung wurde dann verwendet wenn der Zielvektor nicht in Form eines USER-Vektors vorlag. Dabei muss darauf geachtet werden, dass das gewünschte Fragment im richtigen Leseraster in die MCS des Zielvektors eingebracht wird. Zu Beginn wurde das Ausgangskonstrukt, welches das gewünschte Fragment beinhaltet, mit denselben Restriktionsenzymen (2.1.16), wie der Zielvektor verdaut. Nach der Linearisierung des Zielvektors wurde dieser mit der „Shrimp-Alkaline-Phosphatase“ (Ferments) dephosphoryliert um eventuelle entstandene glatte oder klebrige Enden zu entfernen und somit eine Religierung des Vektors zu verhindern. Dazu wurde dieser mit 2,5µl der Phosphatase und 2µl des entsprechenden Reaktionspuffers vermischt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Phosphatase für 5 min bei 65°C inaktiviert. Sowohl der linearisierte Zielvektor, als auch das Fragment mussten im Anschluss über präparative DNA-Gelelektrophorese (2.1.3.2) und DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen (2.1.4) sauber isoliert und aufgereinigt werden. Danach konnte das gewünschte Insert in

den Zielvektor ligiert werden. Dafür wurden 7,5µl des Fragmentes und 1µl des linearisierten Zielvektors mit 0,5µl T4-Ligase und 1µl des entsprechenden Reaktionspuffers (Fermentas) gemischt und ON bei 22°C inkubiert. Im Anschluss daran wurde diese Klonierung per Hitzeschock in kompetente *Escherichia coli* XL1 MRF' transformiert (2.1.2.1) und auf ihren Erfolg hin analysiert (2.1.3.1, 2.1.4.1, 2.1.7, 2.1.10 und 2.1.16).

## **2.2 Pflanzenanzucht**

---

### **2.2.1 *Arabidopsis thaliana***

*Arabidopsis thaliana*-Pflanzen vom Ökotyp Columbia-0 (Col0) wurden bei 22°C auf Kulturerde (Substrat-1, Klasmann-Deilmann GmbH) und unter geregelten Kurztagesbedingungen (acht Stunden Licht/12 Stunden Dunkelheit) angezogen. Die Lichtintensität betrug  $234,7 \mu\text{mol} \times \text{m}^2 \times \text{s}^{-1}$  und die relative Luftfeuchtigkeit 50%. Nach 6-8 Wochen, wenn die Blätter ihre volle Größe erreicht hatten, wurden die Pflanzen für weiterführende Versuche verwendet (2.3 und 2.6).

### **2.2.2 *Nicotiana benthamiana***

*Nicotiana benthamiana*-Pflanzen wurden im Gewächshaus des Institutes bei Temperaturen von 16-22°C auf Kulturerde (Substrat-1, Klasmann-Deilmann GmbH) unter Kurztagesbedingungen (12 Stunden Licht im Winter) bzw. Langtagesbedingungen (18 Stunden Licht im Sommer) angezogen. Nach vier bis sechs Wochen wurden die Pflanzen für weiterführende Versuche verwendet (2.7 und 2.11).

## **2.3 Transiente Expression in *Arabidopsis thaliana*-Protoplasten**

---

### **2.3.1 Isolierung von *Arabidopsis thaliana*-Protoplasten**

Für die Isolierung der kleinsten, eigenständig lebensfähigen morphologischen Einheit einer mit einer Zellwand versehenen Zelle, den Protoplasten, aus Blättern von *Arabidopsis thaliana* Col0 (2.2.1) wurden ca. 20-30 Blätter von sechs bis acht Wochen alten Pflanzen mit einer Rasierklinge in 0,5-1mm breite Streifen geschnitten und in eine

Petrischale mit Enzymlösung gelegt. Der Ansatz wurde dann in Alufolie gewickelt, um ihn dunkel zu halten und 10 min im Vakuum inkubiert um eine bestmögliche Aufnahme der Enzymlösung in die Blattstücke zu garantieren. Nach dreistündiger Inkubation bei RT auf einem Schwenker, wurden die durch Zellwandverdau entstandenen Protoplasten durch ein Filternetz mit einer Porengröße von 35-75µm und anschließende sanfte Zentrifugation bei 100×g für 2 min geerntet. Nach einer Regenerationsphase von 30 min auf Eis und anschließender Resuspendierung in MMg-Lösung konnten die Protoplasten transfiziert (2.3.2) werden.

Enzymlösung:           20mM MES, pH 5,7  
                              0,4M Mannitol  
                              20mM KCl  
                              1,5% Cellulase „Onozuka“ R10 (Yakult Pharmazeutical Ind. Co, LTD)  
                              0,4% Macerozyme<sup>®</sup> R10 (Yakult Pharmazeutical Ind. Co, LTD)

Diese Lösung wurde 10 min bei 55°C inkubiert um Proteasen zu inaktivieren. Nachdem sie wieder auf RT abgekühlt war, wurden zusätzlich 10mM CaCl<sub>2</sub> und 0,1% BSA hinzugefügt. Die Lösung musste vor Zugabe zu den Blattstreifen noch durch einen Filter mit der Porengröße 0,2µm gedrückt werden um die enthaltenen Stärkepartikel zu entfernen. Diese würden sonst beim Schwenken die entstandenen Protoplasten zerstören.

MMg-Lösung:           0,4M Mannitol  
                              15mM MgCl<sub>2</sub>  
                              4mM MES, pH 5,7

### 2.3.2 DNA-Transfektion

Die Transfektion der isolierten Protoplasten erfolgte mit Hilfe von frisch angesetzter 40% (v/v) PEG-Lösung. Dafür wurden 200µl Protoplastensuspension mit 30µg DNA (Für Ko-transfektionen 15µg + 15µg DNA) und 220µl Polyethylenglykol (PEG)-Lösung versetzt und bei RT 15 min inkubiert. Anschließend wurde der Prozess der Transfektion durch Zugabe von 800µl W5-Puffer gestoppt und die transfizierten Protoplasten durch sanfte Zentrifugation bei 100×g für eine Minute pelletiert. Die Zellen wurden danach in 2ml W5-Puffer vorsichtig gelöst und in einem kleinen Schälchen (Nunc<sup>™</sup>, Thermo Scientific<sup>™</sup>) für zwei Tage bei 16°C, mit oder ohne Zugabe von 50µM Abscisinsäure (ABA) oder Methyl-β-cyclodextrin (MCD), inkubiert, bevor sie für weiterführende Experimente genutzt wurden (2.8).

<u>W5-Puffer:</u>	154mM NaCl 125mM CaCl <sub>2</sub> 5mM KCl 2mM MES, pH 5,7
<u>PEG-Lösung:</u>	4g PEG 4000 (Aldrich #81240) 3ml H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub> 2,5ml 0,8M Mannitol 1ml 1M CaCl <sub>2</sub>

Diese Lösung muss 3h gerührt werden bis sich das PEG vollständig gelöst hat.

## 2.4 Transiente Expression in *Xenopus laevis*-Oozyten

---

Die Oozyten des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* eignen sich besonders gut zur heterologen Expression und funktionalen Analyse von Proteinen. Dieses System wurde bereits 1971 (Gurdon *et al.*, 1971) das erste Mal beschrieben. Dabei wird ssDNA (einzelsträngige DNA), dsDNA (doppelsträngige DNA) aber vor allem cRNA (coding RNA aus *in vitro*-Transkription 2.1.14) direkt per Mikrokapillare in das Zytoplasma der Eizelle injiziert. Dafür garantiert es, im Vergleich zu vielen anderen Transfektionsverfahren, eine Transfektionseffizienz von nahezu 100%, ist dabei aber auch stark von der Qualität der geernteten Zellen abhängig. Diese schwankt oft jahreszeitlich bedingt oder auch in Abhängigkeit vieler anderer äußerer Faktoren, die einen Einfluss auf das Wohlbefinden der Frösche haben.

### 2.4.1 RNA-Mikroinjektion und heterologe Proteinexpression in Oozyten

Für die Mikroinjektion von cRNA in Oozyten wurden Glaskapillaren („Kwik-Fil™ Borosilicate Glass Capillaries“, World Precision Instruments, Inc.) durch punktuelle Erhitzung des Glases in der gewünschten Länge und vorn spitz zulaufend in einem Zug zurecht gezogen (vertikaler Puller PP-83, Narishige, Scientific Instrument Lab). Anschließend wurden sie mit einem Mikromanipulator (hauseigen umgebautes „Wilovert S“, Helmut Hund GmbH), durch Abbrechen auf einen äußeren Durchmesser von 25µm justiert. Mit diesen Kapillaren wurden 50nl/pro Oozyte saubere, in nukleasefreiem Wasser gelöste cRNA (2.1.14), in einer Konzentration von 250ng/µl luftblasenfrei aufgesogen und über einen Mikroinjektor („Nanoliter 2000 Injector“, World Precision Instruments, Inc.) mechanisch in die Zellen injiziert. Die injizierten Oozyten wurden für zwei Tage in ND96<sup>+</sup>-Lösung, dunkel, bei 16°C inkubiert und im Anschluss

fluoreszenzmikroskopisch (2.8) auf die heterologe Expression, Lokalisation und Interaktion der Proteine untersucht.

<u>ND96<sup>+</sup>-Puffer:</u>	93.5 mM NaCl
	2mM KCl
	1.8mM CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O
	2mM MgCl <sub>2</sub> (·6H <sub>2</sub> O)
	5mM HEPES

## 2.5 Transiente Expression in HEK293-Zellen

---

### 2.5.1 HEK293-Zellkultivierung

„Human Embryonic Kidney“ (HEK293)-Zellen sind hypotripleide, adhären wachsende Epithelzellen, die zu Beginn der 1970er Jahre als ein Transformationsprodukt von menschlichen embryonalen Nierenzellen mit spezifischen 4,5kb des menschlichen Adenovirus Typ 5 entstanden sind (Shein *et al.*, 1962; zur Hausen, 1967). Dadurch besitzen diese Zellen bestimmte Charakteristika von Krebszellen und lassen sich einfach kultivieren und transformieren. Die Arbeit mit diesen Zellen erfolgte unter einer Sterilbank mit vertikalem Luftstrom („Cytosafe2000“, Zapf Instruments e.K.), welche stets vor und nach der Benutzung mit 70%igem Ethanol und 25 minütiger UV-Bestrahlung desinfiziert wurde. Medien und Lösungen wurden vor Benutzung in einem Heizblock auf 37°C angewärmt. Die Zellen wurden routinemäßig in Gewebekulturflaschen mit einer Oberfläche von 75cm<sup>2</sup> („BioLite Flasks“, Thermo Scientific™) und belüfteten Schraubdeckeln kultiviert. HEK-Zellen haben eine Verdopplungszeit von 20-24 Stunden und nach Erreichen der Konfluenz, d.h wenn sich ein dichter Zellrasen gebildet hat, wurden sie mit Hilfe von 0,5% Trypsin-EDTA (Gibco®/ Life Technologies™) passagiert. Dafür wurde das alte Medium von den Zellen abgenommen und diese mit 5ml 1× PBS kurz gewaschen. Die Inkubation mit 1ml 0,5% Trypsin-EDTA erfolgte für 5 min bei 37°C. Danach wurden die nun flotierenden Zellen mit 5ml „Dulbecco’s Modified Eagle Medium“ (DMEM, Gibco®/ Life Technologies™) abgespült und durch mehrmaliges hoch- und runter-pipettieren vereinzelt. 1,5ml dieser Zellsuspension wurden zurück in die Zellkulturflasche (oder nach fünfmaligem Gebrauch derselben Flasche in eine neue) gegeben und mit DMEM auf 10ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Die restlichen 4,5ml der Zellsuspension konnten zur Subkultivierung der Zellen (2.5.2) und so für anschließende Transfektionsprozesse (2.5.3) verwendet werden. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem CO<sub>2</sub>-begasteten Inkubator (Model 2123, Zapf Instruments e.K.) bei Standardbedingungen von 37°C, gesättigter Luftfeuchtigkeit, 95% Sauerstoff und 5% CO<sub>2</sub>.

DMEM-Medium: 500ml 10× DMEM (+ L-Glutamin, Gibco®/ Life Technologies™)  
5ml Penicillin-Streptomycin (Gibco®/ Life Technologies™)  
50ml Fetale Bovine Serum (FBS, „heat inactivated“, Invitrogen)

### 2.5.2 HEK293-Zellsubkultivierung

Für das Aussähen einer definierten Anzahl von HEK-Zellen, was für die Transfektion (2.5.3) dieser essentiell ist, wurden die 4,5ml Zellsuspension, die nach der Passage der Hauptkultur (2.5.1) übrig blieben, in eine Petrischale übertragen und mit 8ml frischem DMEM-Medium durch mehrmaliges hoch- und runterpipettieren gut vermischt und vereinzelt. Davon wurden 2ml in eine neue Petrischale gegeben und mit 8ml DMEM-Medium vermengt. Davon wurden 10µl benutzt, um mit Hilfe eines Hämozytometers (Thoma-Zählkammer) die Zellzahl der Zellsuspension zu bestimmen und auf eine Dichte von  $1,5 \times 10^5$  Zellen/ml in einem Volumen von 30ml einzustellen. Von dieser Zellsuspension wurden 100µl in jede Vertiefung einer 96Well-Platte (weiße Wände, durchsichtige und flache Böden, steril und mit Deckel, aus Polystyren, Corning®) gegeben, wenn die HEK-Zellen für die quantitative Messung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (2.9) eingesetzt wurden. Wenn die Zellen für spätere Fluoreszenzmikroskopie-basierte Messungen (2.8) verwendet werden sollten, wurden sie mit einer Dichte von  $3 \times 10^5$  Zellen/ml in 6Well-Platten (Nunc™, Thermo Scientific™) ausgesät, in denen zuvor jeweils ein steriles, rundes Deckgläschen (DG) mit einem Durchmesser von 18mm eingelegt worden war. Die HEK-Zellen wurden mit einer Dichte von  $25 \times 10^5$  Zellen/ml in Zellkulturflaschen mit Filterkappe und einer Wachstumsfläche von  $175\text{cm}^2$  (Nunc™, Thermo Scientific™) in einem Gesamtvolumen von 24ml, ausgesät, um durch Lyse der Zellen die mikrosomalen Fraktionen zu isolieren (2.5.4). Bis zur Transfektion (2.5.3) der subkultivierten Zellen sollten diese nicht länger als 12-18 Stunden inkubiert werden.

### 2.5.3 DNA-Transfektion

Vor der Transfektion sollten die subkultivierten (2.5.2) HEK293-Zellen zu 50-80% konfluent sein. Als Transfektionsreagenz wurde GeneJuice® (Novagen) verwendet. Die negativ geladene DNA bildet einen Komplex mit diesem Transfektionsreagenz, die anders als herkömmliche Transfektionsreagenzien nicht aus einem kationischen Lipid, sondern aus einem nicht-toxischen zellulären Protein und zu einem kleinen Anteil aus einem Polyamin besteht. Dieser so genannte Polyplex lagert sich dann an die Zellmembran an und wird über Endozytose in die Zelle geschleust. Deshalb spricht man bei dieser Art von Transfektion auch von Polyfektion (Zusammensetzung des Reaktionsansatzes in Tabelle 2.6 beschrieben). Dazu wurde Serum-freies Medium (Opti-MEM®, Gibco®/ Life Technologies™) zusammen mit dem Transfektionsreagenz in ein steriles

Mikroliterreaktionsgefäß gegeben und gut gevortext. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde dem Gemisch die in sterilem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$  gelöste Plasmid-DNA zugegeben. Nach zehnmütiger Inkubation bei RT, wurde die Mixtur tropfenweise zu den subkultivierten Zellen hinzugegeben und durch leichtes rütteln der Platten oder Flaschen gleichmäßig darin verteilt. Die Zellen wurden für 48 Stunden bei den Standardkultivierungsbedingungen inkubiert, bevor sie in weiteren Versuchen Verwendung fanden (2.5.4, 2.8, 2.9).

Reaktionsbestandteil	pro Well, 96Well-Platte	pro Well, 6Well-Platte	p. 175cm <sup>2</sup> -Flasche
Opti-MEM	10µl	100µl	1,2ml
GeneJuice®	0,3µl	3,5µl	27µl
Plasmid-DNA (gesamt)	125ng	1,5µg	9µg

**Tabelle 2.6: DNA-Transfektion von HEK293-Zellen**

Für die Kotransfektion der subkultivierten HEK293-Zellen mit mehreren Plasmid-DNAs (NADPH-Oxidase AtrbohD oder AtrbohF und Kinase Snrk2.2, 2.3, 2.7, 2.8, OST1, CPK5), wurden diese in bestimmten Verhältnissen (Tabelle 2.7) eingesetzt. Die Kotransfektion mit dem leeren Vektorplasmid diente dabei als Transfektionskontrolle.

Kotransfektion	Verhältnis	Verwendung
NADPH-Oxidase + leerer Vektor	4:1	2.8 und 2.9
Kinase + leerer Vektor	1:4	
NADPH-Oxidase + Kinase	4:1	2.5.4
NADPH-Oxidase + Kinase	10:1	

**Tabelle 2.7: Kotransfektion von HEK293-Zellen**

#### 2.5.4 Lyse und Isolierung der mikrosomalen Endomembranfraktion

Die zuvor in 175cm<sup>2</sup>-Flaschen subkultivierten (2.5.3) und transfizierten (2.5.4) HEK293-Zellen wurden nach 24h Inkubation durch Behandlung mit 2ml Trypsin-EDTA vom Flaschenboden gelöst, in 24ml Zellmedium aufgenommen und zu je 2ml auf sterile Schalen mit beschichtetem Boden und 6cm Wachstumsfläche (Nunc™, Thermo Scientific™) aufgeteilt und weitere 24h inkubiert bis erneut ein konfluenter Zellrasen entstanden ist. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 2ml „Hank’s Balanced Salt Solution“ (HBSS, +CaCl<sub>2</sub>, +MgCl<sub>2</sub>, ohne Phenolrot, Gibco®/ Life Technologies™) gewaschen, mit je 200µl eiskaltem Puffer A aus den Schalen geschabt und in ein Mikroliterreaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von final 1% Triton X-100-Lösung, wurde die Probe im Kühlraum für 10 min gevortext. Nach der Zugabe von final 400mM NaCl, um die Ionenstärke der Solubilisierungslösung und somit die Isolierung der Membranproteine zu verbessern, wurden die Proben für 15 min bei 4°C rotiert. Ein erster Zentrifugationsschritt bei 9200rpm und 4°C für 30 min diente dazu Zellwandbestandteile,

Mitochondrien und andere Zellreste zu sedimentieren. Der resultierende Überstand, der die mikrosomalen Endomembranfraktionen enthielt, wurde anschließend per Ultrazentrifugation bei 36000rpm und 4°C für eine Stunde zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 200µl eiskaltem 2-Phasenpuffer („Two-Phase-buffer“, TPB) resuspendiert und die Proteinkonzentration mittels BCA-Methode (2.10.3) quantifiziert. Ein entsprechendes Volumen der Probe mit 50µg Proteingehalt wurde dann zur spektrometrischen Analyse zu Prof. Waltraud Schulze geschickt.

Puffer A:                    50mM TrisHCl pH 7,4  
                                  330mM Saccharose  
                                  0,2M EDTA  
                                  0,4M DTT  
                                  1Tablette/50ml „complete EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets“ (Roche Applied Biosciences, PI)

1XTris-DTT:                50mM Tris pH 8  
                                  1mM DTT  
                                  1Tablette/50ml PI

10%ige Detergenzlösung:    50mg Triton X-100, auf final 500mg mit 1XTris-DTT

TBP:                        9,5% (w/w) Saccharose  
                                  6mM KCl  
                                  5mM K<sup>+</sup>P<sub>i</sub> pH 7,8  
                                  1Tablette/50ml PI

## 2.6 Partikelbombardement

---

### 2.6.1 Präparation der Wolframpartikel

Das Partikelbombardement mittels der „Particle Inflow Gun“ (PIG) (Klein *et al.*, 1988; Vain *et al.*, 1993) ist eine gute Methode zur transienten Transfektion von *Arabidopsis thaliana*-Col0-Blättern mit fluoreszent markierten Proteinen. Dafür wurden 50mg Wolframpartikel mit einem Durchmesser von 1,1µm (Bio-Rad) zur Sterilisation mit 1ml 100%igem Ethanol gewaschen und für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit pelletiert. Überstehendes Ethanol wurde komplett abgenommen und die Wolframpartikel getrocknet, bevor sie in 1ml sterilem Wasser gelöst und somit auf eine Konzentration von 50µg/ml gebracht wurden. Diese Wolframsuspension ist bei 4°C mehrere Wochen lagerbar.

### 2.6.2 Beschichtung der Wolframpartikel

Um die Wolframpartikel mit der gewünschten DNA zu beschichten, wurden 100µl der Wolframsuspension (2.6.1) mit 20µg DNA (oder 2× 10µg DNA für Kotransfektionen) versetzt. Während die Probe kräftig gevortext (etwa 2-3 min) wurde, wurden weiter 100µl 2,5M CaCl<sub>2</sub> und 40µl 0,1M Spermidin zugesetzt. CaCl<sub>2</sub> bewirkt dabei die Stabilisierung der DNA während das Polyamin Spermidin die Aufgabe hat, die Präzipitierung der DNA zu optimieren. Die Zugabe von 200µl 100%igem eiskalten Ethanol während des Vortexens hilft, die einzelnen Komponenten gut zu durchmischen, bevor weitere 400µl Ethanol zugesetzt wurden, um die Präzipitierung der DNA zu starten. Diese erfolgte dann bei -20°C für eine Stunde. Die beschichteten Partikel wurden dann für 1 min bei RT zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Nachdem die Partikel leicht trocknen konnten (ein völliges Austrocknen ist zu vermeiden) wurden die Partikel in 100µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub> resuspendiert. Dies ermöglichte zehn Transfektionsansätze mit jeweils 10µl der DNA-beschichteten Wolframpartikel.

### 2.6.3 Transiente Transfektion mittels Partikelbombardement

Blätter von etwa sechs Wochen alten *Arabidopsis thaliana* Col0-Pflanzen wurden mit Hilfe einer selbstgebauten PIG-Apparatur transfiziert. Dazu legte man die Blätter, fixiert auf doppelseitigem Klebeband, mit ihrer Unterseite nach oben, in die Apparatur und beschoss die Blätter mit den DNA-beschichteten Wolframpartikeln (2.6.2) bei einem Heliumdruck von 9bar und einem Kammerinnendruck von -0,8bar. Die Blätter wurden danach in normale Petrischalen, in Leitungswasser gelegt und 16-18h im Dunkeln inkubiert. Die transiente Expression der fluoreszent markierten Proteine wurde im Anschluss daran über konfokale Fluoreszenzmikroskopie detektiert und analysiert (2.8).

## 2.7 Transiente Expression in *Nicotiana benthamiana*

---

Die durch das Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Transfektion von Tabakpflanzen (2.2.2) ist schnell und zuverlässig und eignet sich deshalb besonders gut um gewünschte Gene in Tabakpflanzen transient (und auch stabil) zu exprimieren. Dieses Transfektionssystem wurde erstmal 1983 beschrieben (Schell und Montagu) und macht sich zu Nutze, dass Agrobakterien in der Lage sind, ein DNA-Segment (T-DNA) von einem Tumor-induzierenden (Ti-) Plasmid über horizontalen Gentransfer in Pflanzenzellen einzubringen. Die Agrobakterien wurden zuvor mit Reporter-gen-markierten Fusionskonstrukten transformiert (2.1.2.2). Die transfizierten Tabakpflanzen wurden

anschließend mit Augenmerk auf die Lokalisierung und Koloalisierung (2.8.1) oder die Mobilität (2.8.3) der exprimierten Gene fluoreszenzmikroskopisch untersucht oder für die Isolierung der Plasmamembran homogenisiert (2.11).

### **2.7.1 Aktivierung von *Agrobacterium tumefaciens* GV3101**

Die zuvor transformierten Agrobakterien (2.1.2.2) und der 19K-Helferstamm wurden in 20ml YEB-Medium mit den Antibiotika Kanamycin, Gentamycin und Rifampicin (Konzentrationen wie zuvor angegeben) angeimpft und ON bei 28°C schwenkend angezogen. Wenn am nächsten Tag eine OD<sub>600</sub> von >0,5 erreicht war, wurden die Bakterien für 10 min bei 2000rpm und 20°C pelletiert und danach in 20ml Agromixpuffer resuspendiert. In diesem Puffer wurden sie zwei weitere Stunden bei 28°C schwenkend inkubiert. Der Agromixpuffer sollte einen pH-Wert von 5,6 (ähnlich dem in der pflanzlichen Zellwand) haben, um den Bakterien die Anheftung an die Pflanzenzellen zu erleichtern. Das in dem Agromixpuffer enthaltene Acetosyringon ist ein Phenolderivat. Bestimmte Phenole werden von verwundeten Pflanzen synthetisiert und von den Agrobakterien registriert, wodurch deren Virulenz aktiviert wird. Dadurch wird die Transfektionsrate erheblich verbessert.

Agromixpuffer:        0,01M MgCl<sub>2</sub>  
                              0,01M MES, pH 5,6 (KOH)  
                              150µM Acetosyringon

### **2.7.2 Transiente Transfektion mittels *Agrobacterium tumefaciens* GV3101**

Für Koinfiltrationen wurden die entsprechenden Agrobakteriensuspensionen in gleichen Verhältnissen kombiniert. Dazu wurde  $\frac{1}{6}$  Volumen (*V*) des 19K-Helferstammes (Voinnet *et al.*, 2003) hinzugegeben und gut vermischt. Diese Suspension wurde mit Hilfe von 5ml-Spritzen, (ohne Nadel) in die Unterseiten der Blätter von sechs bis acht Wochen alten Tabakpflanzen, durch die Spaltöffnungen (Stomata) gedrückt. Sollten die Pflanzen anschließend mikroskopisch auf Fluoreszenz (2.8) untersucht werden, wurden pro Konstrukt(paar) nur drei Blätter einer Pflanze infiltriert. Wurden die Pflanzen danach homogenisiert (2.11) und für die Isolierung der Plasmamembran eingesetzt, wurden jeweils fünf Blätter von bis zu 20 Pflanzen infiltriert. Die infiltrierten Pflanzen wurden drei Tage im Gewächshaus bei optimalen Wachstumsbedingungen (2.2.2) inkubiert.

## 2.8 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

---

Für die Analyse von Proteinlokalisierungen, Proteininteraktionen und Proteinmobilität, wurde das TCS SP5 II Laser-Scanning-Mikroskop (konfokal, Leica Microsystems) in einem komplett abgedunkelten Raum bei RT benutzt.

### 2.8.1 Lokalisierungs- und Kolokalisierungsexperimente

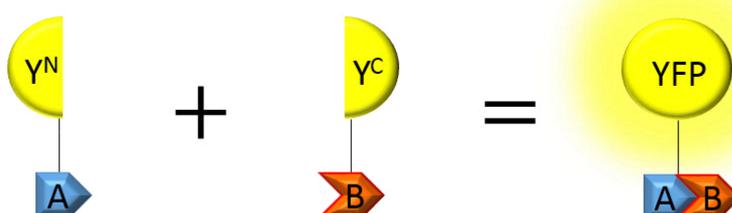
Um zu analysieren wo bestimmte Proteine in der Zelle lokalisiert sind und ob zwei oder mehr Proteine zusammen im selben Zellkompartiment zur selben Zeit vorkommen, wurden Lokalisierungs- und Kolokalisierungsexperimente durchgeführt. Dafür fusioniert man die zu untersuchenden Proteine auf translationaler Ebene mit einem Fluoreszenzprotein (2.1). Diese Proteine werden mit energiereichem Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, das heißt es kommt zur Absorption eines Photons. Danach können sie spontan Licht einer höheren Wellenlänge emittieren. Das angeregte Fluorophor verweilt nach Absorption eines Photons eine Weile im angeregten Zustand, bevor es durch Emission eines Photons wieder auf eine niedrigere Energieebene zurückfällt. Die Lebensdauer dieses angeregten Zustandes ist im Normalfall eher kurz (einige Nanosekunden). Das erste jemals beschriebene Fluoreszenzprotein war das Grün-fluoreszierende Protein („Green fluorescent protein“, GFP, Shimomura *et al.*, 1962) aus der Qualle *Aequorea victoria*. Die Funktion der meisten Fluoreszenzproteine beruht auf einer autokatalytisch gesteuerten Konformationsänderung einer Tripeptidsequenz innerhalb der Polypeptidkette. Oft reichen einzelne Punktmutationen in dieser Tripeptidsequenz um das Emissionsspektrum zu verschieben und so andere Fluoreszenzproteine zu generieren. Wenn für Lokalisierungs- und Kolokalisierungsexperimente mit mehreren markierten Proteinen gearbeitet werden soll, ist es wichtig, diese mit Fluoreszenzproteinen zu markieren, deren Absorptions- und Emissionsspektren weit genug auseinander liegen um eine Kreuzanregung oder –detektion zu vermeiden. Die Fluoreszenzproteine wurden benutzt wie unten (Tabelle 2.8) beschrieben. Generell wurde ein 25× Objektiv (HC PL FLUOTAR 25.0 × 0.95, Wasser, Leica) benutzt. Außer für Versuche zur Visualisierung von Nanodomänen, bei denen ein 63× Objektiv (HCX PL APO 63.0 × 1.2W Corr CS, Wasser, Leica) benutzt wurde, um die nur bis 100nm großem, punktierten Strukturen zuverlässig visualisieren zu können. Die Detektion der Fluoreszenzen erfolgte über hocheffiziente Detektoren („Photomultiplier tubes“, PMT) die auf die Bereiche der entsprechenden Emissionsspektren eingestellt waren. Für Rot-fluoreszierende Proteine („red fluorescent protein“, RFP) erfolgte die Detektion mittels einem sensibleren, hochauflösenden Detektors (HyD-Detektor), da diese Fluoreszenzproteine oft schwächer leuchten und kürzere Lebenszeiten als die meisten anderen benutzten Fluorophore besitzen. Die Zellen wurden mit einer Geschwindigkeit von 400Hz gescannt. Die produzierten Bilder (512 × 512 Pixel) und

Mischbilder („Overlays“) wurden direkt mit Hilfe der Leica Software LAS AF („Leica Application Suite Advance Fluorescence“ Version 2.4.1 und später 2.7.2.9586) produziert und optimiert. Die Optische Blende („Pinhole“) wurde immer auf 1AU („Airy Unit“) eingestellt. Die Auswertung und Bearbeitung der Bilder erfolgte mit der frei verfügbaren Software „Image J“ (Wayne Rasband, National Institutes of Health). Ein dafür modifiziertes Programm (Plugin „Colocalization Finder“) wurde zu Bestimmung der Kolokalisierungskoeffizienten nach Pearson und Spearman (2.13) benutzt (French *et al.*, 2008). Für Lokalisierungsexperimente wurden die *Arabidopsis*- (2.6) oder Tabakblätter (2.7) in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$  zwischen einem Objektträger und einem Deckgläschen plangelegt und untersucht.

## 2.8.2 Interaktionsexperimente

### 2.8.2.1 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)

Die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation („bimolecular fluorescence complementation“, BiFC) ist eine Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen und wurde maßgeblich von Tom Kerppola (Hu *et al.*, 2002) entwickelt. Sie basiert auf der Komplementation eines zuvor auf translationaler Ebene in zwei Hälften geteilten Fluorophors (2.1). Genauer gesagt, werden zwei (oder auch mehr) zu untersuchende Proteine (A und B) translational an zwei nicht fluoreszierende Hälften ( $\text{Y}^{\text{N}}$  und  $\text{Y}^{\text{C}}$ ) eines Fluorophors fusioniert. Interagieren die beiden zu untersuchenden Proteine nun miteinander werden die beiden Fluorophorhälften wieder zu einem fluoreszierenden Komplex (YFP) komplementiert (Abbildung 2.2). Diese Fluoreszenz wurde wie oben erwähnt mit dem Leica TCS SPII LSM untersucht. Für diese Methode wurde das Gelb-fluoreszierende Protein („yellow fluorescent protein“, YFP) verwendet, da dieses Fluorophor eine hohe intrinsische Fluoreszenz besitzt und auch schneller reift als andere. Für die Untersuchung von Oozyten (2.4), wurden diese in kleinen Zellkulturschälchen in  $\text{ND96}^+$ -Puffer direkt mit dem  $25\times$  Objektiv in der Lösung auf Fluoreszenz hin untersucht. Wurden Protoplasten (2.3) untersucht, wurden diese auf einem Objektträger in 1% „Low Melt Agarose“ (Roti®garose, Roth) eingebettet und immobilisiert, um Messungenauigkeiten durch Drehung oder Bewegung der Zellen zu verhindern. Die Fluoreszenzintensitäten der fluoreszierenden Zellen wurde mit Hilfe des Quantifizierungswerkzeuges der Leica Software ausgewertet.



**Abbildung 2.2: Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)**

## 2.8.2.2 „Sensitized Emission“ Förster-Resonanzenergietransfer (SE-FRET)

Wird die Energie eines angeregten Donorfluorophors strahlungsfrei, über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, auf ein Akzeptorfluorophor übertragen, kann man anhand der Intensität dieses Energietransfers auf die Entfernung der beteiligten, an die zu untersuchenden Proteine gekoppelten, Fluorophore schließen (Abbildung 2.4). Der Abstand  $r$  zwischen Donor und Akzeptor liegt bei einem Energietransfer normalerweise zwischen 0,5 und 10nm, wobei die Effizienz des Energietransfers mit der sechsten Potenz des Abstandes zwischen beiden Fluorophoren abnimmt. Zudem ist die Effizienz der Energieübertragung (auch Transferrate  $k_{ET}$  bezeichnet) von der Strahlungsemissionsrate des Donorfarbstoffs  $k_D$  oder dessen Verweildauer im angeregten Zustand  $\tau_D$  abhängig. Weiterhin wird die Transferrate zwischen Donor und Akzeptor vom Försterradius  $R_0$  des Fluorophorpaars bestimmt. Dabei ist  $R_0$  der Abstand zwischen beiden Farbstoffen, bei dem zu 50% eine Energieübertragung erfolgt. Die Transferrate lässt sich demnach wie folgt berechnen:

$$k_{ET} = k_D \frac{R_0^6}{r^6} = \frac{R_0^6}{\tau_D \times r^6}$$

Eine Voraussetzung für das Funktionieren des Energietransfers, ist dass der Akzeptor auch zur Energieaufnahme fähig ist. Dazu sollte die Menge der zu übertragenden Energie, welche der Energiedifferenz aus angeregtem und Grundzustand des Donors entspricht, in dem Bereich liegen, in dem der Akzeptor Energie aufnehmen kann. Um dies zu ermöglichen müssen das Emissionsspektrum des Donors und das Extinktionsspektrum des Akzeptors überlappen (Abbildung 2.3). Die Größe der überlappenden Fläche in den Spektren, zu sehen als das Integral  $J$  ist proportional zur Transferrate  $k_{ET}$  und zur sechsten Potenz des Förster-Radius  $R_0$ :

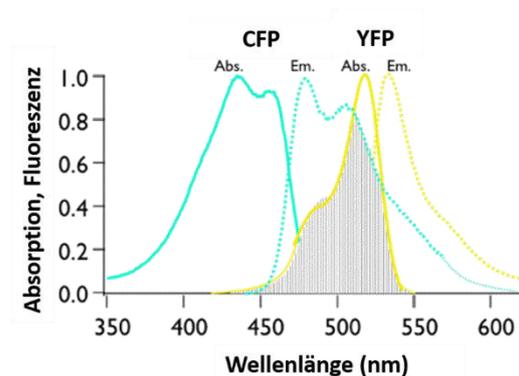
$$k_{ET}, R_0^6 \propto J = \int f_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda$$

Dabei ist  $f_D(\lambda)$  die normierte Strahlungsintensität des Donors bei der Wellenlänge  $\lambda$  und  $\epsilon_A(\lambda)$  ist der Extinktionskoeffizient des Akzeptorfarbstoffes. Weiterhin ist es für einen optimalen Energietransfer wichtig, dass sowohl Donor- als auch Akzeptorfarbstoff möglichst parallele elektronische Schwingungsebenen aufweisen. Das heißt, die Transferrate  $k_{ET}$  und die sechste Potenz des Förster-Radius des Donor-Akzeptor-Paars  $R_0$  sind proportional zum Orientierungsfaktor  $\kappa^2$ :

$$k_{ET}, R_0^6 \propto \kappa^2 = (\cos \theta_{DA} - 3 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2$$

Der Winkel zwischen Emissionsdipol des Donorfarbstoffes und dem Absorptionsdipol des Akzeptorfarbstoffes wird mit  $\theta_{DA}$  bezeichnet.  $\theta_D$  und  $\theta_A$  sind die Winkel zwischen beiden Dipolen und dem Verbindungsvektor zwischen Donor- und Akzeptorfarbstoff.  $\kappa^2$  kann Werte zwischen 0 und 4 annehmen, wobei der Wert 0 die Rechtwinkligkeit, also Orthogonalität der Dipole und der Wert 1 eine parallele Stellung bezeichnet. Der Wert 4

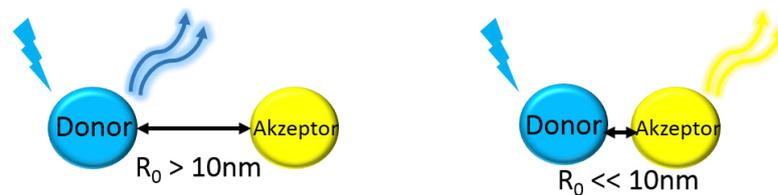
wird bei kollinear angeordneten Dipolen erreicht. Anhand des Wertes  $\kappa^2$ , kann man mit dem Förster-Energietransfer auch auf Änderungen in der Schwingungsebene und somit die Lage der fluoreszent markierten Proteine zueinander rückschließen. Die einfachste Form des FRET ist der SE-FRET, der „Sensitized Emission“ FRET. Für die Charakterisierung der Interaktion zweier fluoreszent markierter Proteine mittels SE-FRET, wird nach spezifischer Anregung des Donormoleküls (z.B. Cyan-fluoreszierendes Protein, CFP), die Emission des zur Strahlungsabgabe befähigten und durch die Energieübertragung angeregten Akzeptorfarbstoffes (Gelb („yellow“)-fluoreszierendes Protein, YFP) gemessen.



**Abbildung 2.3: Überlappung der Spektren von CFP und YFP**

Für den Energietransfer von angeregtem Donor (CFP)- auf das Akzeptormolekül (YFP) muss das Emissionsspektrum (Em) von CFP mit dem Absorptionsspektrum (Abs) von YFP zu mindestens 70% überlappen (schraffierte Fläche). Modifiziert nach Visser und Rolinski.

Die zu analysierenden Protoplasten (2.3) wurden auf Objektträgern in „Low Melt Agarose“ immobilisiert. SE-FRET wurde entsprechend der gängigen Methode (Xia und Liu, 2001) berechnet und die Fluoreszenzintensitäten der fluoreszenten Zellen mit Hilfe des Quantifizierungswerkeuges der Leica Software ausgewertet.



**Abbildung 2.4: „Sensitized Emission“-Förster-Resonanzenergietransfer (SE-FRET)**

### 2.8.2.3 „Acceptorbleaching“ Förster-Resonanzenergietransfer (AB-FRET)

Die am häufigsten genutzte Methode um die Interaktion zwischen zwei fluoreszent markierten Proteinen nachzuweisen ist der AB-FRET. Dabei misst man die Fluoreszenzintensität des Donors vor und nach dem Fotobleichen des Akzeptors. Durch das Ausbleichen des Akzeptors kann die Energie des Donors nicht mehr übertragen werden und steht diesem nun komplett als eigene Fluoreszenz zur Verfügung. Das bedeutet, wenn die Fluoreszenzintensität des Donors nach dem Bleichen des Akzeptors höher wird, hat eine Interaktion der beiden zu untersuchenden Proteine stattgefunden. Durch diese Methode umgeht man das Problem, dass beim SE-FRET der Akzeptor auch

durch Anregung des Donors aktiviert werden kann, wodurch es zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann. Für die Messung der FRET-Effizienz ( $E_{FRET}$ ) wurden beide Anregungswellenlängen (CFP/YFP) abwechselnd angeschaltet um Fluoreszenzsignale von ähnlich gleicher Intensität zu erhalten. Das Fotobleichen des Akzeptors wurde bei 30 „frames“ (ca. 38 sec) und einer 514nm-Laserintensität von 100% durchgeführt. Die AB-FRET-Messungen wurden mit dem „AB-FRET Wizard“ der Leica Software, entsprechend der Formel:  $E_{FRET} = 1 - \frac{I_{CFP_{FRET}}}{I_{CFP}}$  durchgeführt. Dabei ist  $I$  die Intensität von CFP für FRET ( $CFP_{FRET}$ ) wenn das YFP nicht gebleicht ist und von CFP ( $CFP$ ) nachdem das YFP gebleicht wurde. Auch für diese Methode wurden die verwendeten Protoplasten (2.3) auf einem Objektträger in „Low Melt Agarose“ eingebettet um sie zu immobilisieren und somit das optimale Bleichen der gesamten Zelle zu garantieren. HEK293-Zellen (2.5) wurden auf einem Deckgläschen subkultiviert und transfiziert. Diese Deckgläschen wurden dann in ein Zellkulturschälchen mit 2ml „Hank’s Balanced Salt Solution“ (HBSS, +CaCl<sub>2</sub>, +MgCl<sub>2</sub>, ohne Phenolrot, Gibco®/ Life Technologies™) direkt unter dem Mikroskop mit dem 25× Objektiv analysiert.

Fluorophor	Art	Anregung (nm)	Emission (nm)	Verwendung
mTurquoise	CFP	405	450-480	2.3, 2.5, 2.8.2.2, 2.8.2.3
mVenus	YFP	514	540-560	2.3, 2.4, 2.5, 2.8.2.2, 2.8.2.3
eGFP	GFP	488	500-560	2.6, 2.7, 2.8.1, 2.8.3
DsRed2	RFP	561	590-650	2.6, 2.7, 2.8.1
mCherry	RFP	561	600-630	2.6, 2.7, 2.8.1
mEos	Konvertibel GFP → RFP	488 (grün) 561 (rot)	490-520 (grün) 570-600 (rot)	2.3, 2.8.2.3

**Tabelle 2.8: Verwendete Fluoreszenzproteine**

### 2.8.3 „Fluorescence Recovery after Photobleaching“ (FRAP)

Die FRAP-Technik wird oft verwendet um translationale Diffusionsprozesse von Makromolekülen zu analysieren. Die gewonnenen Informationen geben Aufschluss über die kinetischen Eigenschaften, mobilen Fraktionen und Transportraten von fluoreszent markierten Molekülen. Für diese Technik benötigt man einen kurzen, starken Laserimpuls um ein Fluorophor in einer lebenden Zelle durch Bestrahlung lokal zu zerstören. Durch diese Fotobleichung geht das betroffene Fluorophor irreversibel in einen nicht-fluoreszierenden Zustand über. Diffundieren langsam fluoreszente Moleküle aus der Umgebung in diesen entstandenen „schwarzen Fleck“ ein, kann durch Messung des Verlaufs der Fluoreszenzintensität über die Zeit, die Diffusionszeit (bzw. Diffusionskonstante) bestimmt werden. Je langsamer die gemessene Zeit bis zur Rückkehr der vollen ursprünglichen Fluoreszenzintensität, desto langsamer ist die Diffusion der fluoreszenten Komponenten. (Edidin *et al.*, 1976; Axelrod *et al.* 1976). Für die Mobilitätsanalyse von GFP::AtRem1.4 wurde der „FRAP Wizard“ der Leica Software

verwendet. Für die Messung wurden pro Zelle drei bis fünf ROIs markiert, die Fluoreszenz der darin befindlichen Membrannanodomänen bei einer initialen Laserintensität von 20% vermessen und danach über den „Zoom In“- und den „Set Background to zero“-Modus bei 100% Laserintensität lokal gebleicht. Eine eventuelle Rückkehr der Fluoreszenz durch eventuell einwandernde, benachbarte fluoreszent markierte Proteine wurde anschließend mehrere Minuten lang bei einer Laserintensität von 20% beobachtet (Messprotokoll siehe Tabelle 2.9). Der digitale „Gain“ (718V), der Durchmesser des „Pinholes“ (1 AU), Scan Modus (4× Line Average), Bildgröße (256×256 Pixel) und die Scannergeschwindigkeit (1400Hz) waren für alle Messungen und Aufnahmen stets gleich.

Schritt	Intervallanzahl	Minimiertes Intervall	Zeit p. Intervall
Präbleach	10	ja	118ms
Bleach	10	ja	118ms
Postbleach 1	100	ja	118ms
Postbleach 2	10	nein	1 sec
Postbleach 3	10	nein	5 sec
			gesamt 149,502 sec

**Tabelle 2.9: FRAP-Messprotokoll**

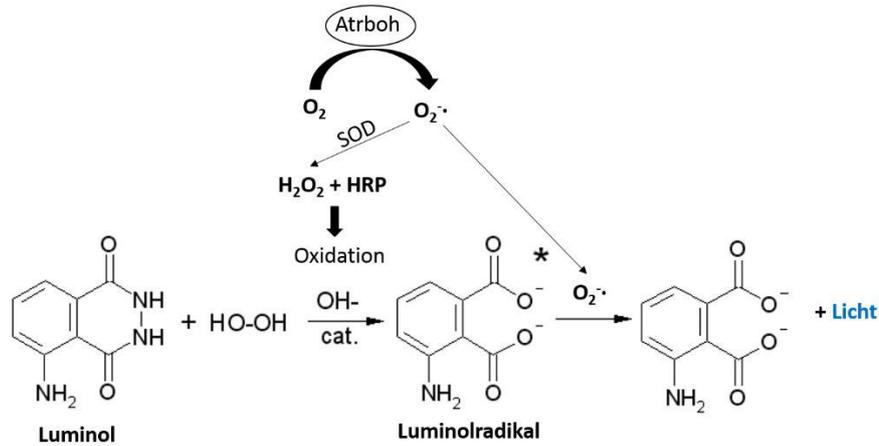
## 2.9 Quantitative Messung reaktiver Sauerstoffspezies

### 2.9.1 Peroxidase-katalysierte Luminol-Chemolumineszenztechnik

Für die Quantifizierung Oxidase-abhängig gebildeter reaktiver Sauerstoffspezies eignet sich das HEK-Zellsystem besonders gut, weil HEK-Zellen keine NADPH-Oxidasen exprimieren und deshalb keine eigene  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige ROS-Produktionsaktivität besitzen. Die Methode zur Messung von exogen produzierten ROS basiert auf der Chemolumineszenz von Luminol. Es wird das, durch die in den HEK-Zellen überexprimierte NADPH-Oxidase, gebildete Superoxid ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), durch die Superoxiddismutase (SOD) zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid disproportioniert. Das von der NADPH-Oxidase gebildete Superoxid kann nicht direkt mit dem Luminol reagieren, dafür aber mit dem Luminolradikal. Dieses Radikal entsteht durch die Oxidation von Luminol durch Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Diese Oxidation wird durch die Meerrettichperoxidase (Horseradish peroxidase, HRP) katalysiert (Abb. 2.5).

Für die Messung von ROS wurden die zuvor in 96Well-Platten ausgesät (2.5.2) und transfizierten (2.5.3) HEK-Zellen einmal mit 100µl HBSS vorsichtig gewaschen. Wurden die Zellen zusätzlich mit MCD behandelt, erfolgte dies bevor das alte Medium entfernt und die Zellen gewaschen wurden. Danach wurden 100µl Reaktionspuffer zu den Zellen gegeben. Die Messung der Lumineszenz erfolgte in einem Luminometer (Luminoskan Ascent, Labsystems) für eine halbe Stunde bei 37°C und einer Wellenlänge von 470nm. Jede Minute wurde ein Messwert aufgezeichnet und nach 5 min wurden 50µl

Ionomycinlösung hinzugegeben. Ionomycin ist ein Ionophor, und begünstigt als mobiler  $\text{Ca}^{2+}$ -Transporter die zelluläre Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  über die Plasmamembran und kann somit die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige ROS-Produktion der NADPH-Oxidasen auslösen. Die gemessene ROS-Produktion der Oxidasen wird angegeben in der Einheit „relative Lumineszenzeinheiten pro Sekunde“ (RLU/s).



**Abbildung 2.5: Peroxidase-katalysierte Luminol-Chemolumineszenztechnik**

Reaktionspuffer (für eine 96Well-Platte):

- 30ml HBSS (Gibco®/ Life Technologies™)
- 0,002g HRP (Carl Roth®) in 200µl HBSS
- 180µl davon zu den 30ml HBSS dazu geben
- 18,8µl 0,4M Luminol (Sigma-Aldrich®)

Iononycinlösung (für eine 96Well-Platte):

- 13ml Reaktionspuffer
- 19,5µl 1mM Iononycin (Sigma-Aldrich®)

## 2.10 Proteinbiochemie

---

### 2.10.1 Proteingelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-Page) ist eine Variante der Polyacrylamid-Gelelektrophorese und dient der Analyse und Trennung von Proteingemischen, nach der Molekülgröße der einzelnen Proteine, in einem elektrischen Feld. Für diese Art der Elektrophorese dient eine diskontinuierliche Matrix auf Polyacrylamidbasis als Trennmittel.

### 2.10.1.1 Probenvorbereitung

Zur Vorbereitung der Proben (2.5, 2.11) wurde diesen ein Überschuss Natriumdodecylsulfat (SDS) zugesetzt. SDS ist ein anionisches Tensid (Detergenz), welches die Eigenladung der Proteine überdeckt. Dabei binden immer 1,4g SDS an 1g Protein, so dass alle im Gemisch vorhandenen Proteine dieselbe negative Ladungsverteilung aufweisen. Durch ladungsbedingte gegenseitige Abstoßung der Proteine im Gemisch und die Linearisierung dieser durch ein Aufkochen der Probe für 10 min bei 98°C, erfolgt dann im elektrischen Feld eine Migration der Proteine zur Anode, wobei eine Auftrennung nach Kettenlänge, proportional zu Molekülmasse erfolgt, da längere Proteine im Polyacrylamidgel stärker zurückgehalten werden als kürzere.

Zu untersuchende Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit einem Probenpuffer versetzt. Handelte es sich dabei um transfizierte HEK-Zellen (2.5) wurde der Probenpuffer direkt zu den Zellen gegeben (50µl in jede Vertiefung von 96Well-Platten und 150µl in jede Vertiefung von 6Well-Platten). Die Zellen wurden mit dem Probenpuffer vermischt, um die Lyse der Zellen zu begünstigen, und anschließend in Mikroliterreaktionsgefäßen gesammelt. Um die Denaturierung der Proben zu optimieren, wurden diese zuerst 10 sec lang sonifiziert (90% Amplitude, Labsonic® M, Sartorius Stedim Biotech GmbH) und im Anschluss für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Die Proben wurden auf RT abgekühlt und danach für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um unerwünschte Zellreste zu entfernen. Der Überstand wurde dann auf ein SDS-Gel geladen.

Proteinprobenpuffer:            0,3M TrisHCl pH 6,8  
    10% SDS  
    37% Glycerol  
    0,5% Bromphenolblau  
    0,2M Dithiothreitol (DTT)  
    10% β-Mercaptoethanol (β-ME)

### 2.10.1.2 SDS-PAGE

Diskontinuierliche SDS-Page wurde durchgeführt wie beschrieben (Ulrich K. Laemmli es 1970). Entweder wurden die Gele kommerziell bezogen (10×10cm, 12 Taschen, 12% Polyacrylamid (PAA), „nUView™“ Fertiggele, Peqlab) oder selbst gegossen wie in Tabelle 2.10 beschrieben. Dafür wurde zuerst das Trenngel gegossen und mit H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub> überschichtet um eine Verformung durch Austrocknen zu verhindern. Nach einer halben Stunde war das Trenngel dann auspolymerisiert und konnte mit dem Sammelgel, welches weitere 15 min zum Auspolymerisieren benötigte, vervollständigt werden.

Bestandteil	Art des Geles (10ml)		
	10% Trenngel	12% Trenngel	Sammelgel (3,2%)
H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub>	4,9ml	4,4ml	6,6ml
4× TrisHCl/SDS, pH 6,8	-	-	2,5ml
4× TrisHCl/SDS, pH 8,8	2,5ml	2,5ml	-
Rotiphorese® Gel 40 (29:1) (Roth)	2,5ml	3ml	0,8ml
10% Ammoniumperoxodisulfat (APS)	50µl	50µl	100µl
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	5µl	5µl	10µl

**Tabelle 2.10: Zusammensetzung der selbst gegossenen SDS-Gele**

APS, das Salz der Peroxidschwefelsäure, ist der Polymerisationsinitiator. Bei dessen Zersetzung gebildete Sulfatradikale greifen elektrophil die Kohlenstoffatome mit Doppelbindungen im Polyacrylamid an und lösen so eine Kettenreaktion, die zur Polymerisierung von Polyacrylamid führt, aus. TEMED dient als Katalysator der Acrylamidpolymerisation. Die Gele, egal ob selbstgegossene oder gekaufte, liefen bei einer anfänglichen Stromstärke von 45mA/Gel bis zum Eintritt der Probe in das Trenngel und ab dann bei 15mA/Gel, bis die Bromphenolblaulauffront aus dem Trenngel lief, in einem denaturierenden Tris-Glycin-Laufpuffer. Zur Bestimmung der Proteingrößen, wurde zum Vergleich 5µl eines Proteinmarkers („PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder“, Thermo Scientific™) mit bekannten Fragmentgrößen parallel mit auf das Gel geladen.

10× Tris-Glycin-Laufpuffer: 29g/l Tris  
141g/l Glycin  
10g/l SDS

### 2.10.1.3 Gel Visualisierung

Um Proteinbanden visualisieren zu können wurden die SDS-Gele nach der Elektrophorese mit Coomassie-Brillant-Blau, einem Triphenylmethanfarbstoff, der sich an die basischen Aminosäuren der Proteine anlagert, unspezifisch angefärbt. Die SDS-Gele wurden in eine Coomassie-Färbelösung gelegt und unter leichtem schwenken ON bei RT inkubiert. Die Entfärbung der Gele erfolgte in Entfärbelösung so lange bis alle überschüssige Färbung ausgewaschen war.

Coomassie-Färbelösung: 1,5g/l Coomassie-Brillant-Blau R250  
200ml/l Methanol  
250ml/l H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub>  
5ml/l Essigsäure

Entfärbelösung: 7% (v/v) Essigsäure  
5% (v/v) Methanol

### 2.10.2 Western Blot

Die Übertragung von Proteinbanden durch ein elektrisches Feld, welches senkrecht zum SDS-Gel (2.10.1.2) angelegt wird, auf eine Trägermembran, um die Proteine anschließend durch Antikörperdetektion (2.10.2.2) nachzuweisen nennt man, in Anlehnung an den „Erfinder“ der Blotting-Technik Edwin Southern (1975), „Western Blot“ (WB).

#### 2.10.2.1 Transfer

Vor dem Transfer der Proteinbanden auf eine Membran aus Polyvinylidenfluorid (PVDF, Hybond-P, GE Healthcare Europe) über polare und hydrophobe Wechselwirkungen, muss diese zuerst aktiviert werden. Dafür wurde die Membran passend zurecht geschnitten und 1 min in 100% Methanol geschwenkt. Danach wurde sie in  $H_2O_{reinst}$  gewässert und zusammen mit dem zu blottenden Polyacrylamid-Gel 15 min in einem Transferpuffer nach Harry Towbin (Towbin *et al.*, 1979) äquilibriert. Dadurch wird das gebundene SDS ausgewaschen, wodurch die Proteine teilweise wieder ihre nativen Sekundär- und Tertiärstrukturen ausprägen können. Auch die für das „Blotsandwich“ benötigten Whatman-Filterpapiere (0,34mm Stärke) wurden für wenigstens 5 min in dem Transferpuffer inkubiert.

Das „Blotsandwich“ wurde wie folgt zusammengesetzt:

- Kathode (-)
- 3× Whatman-Filterpapier
- PVDF-Membran
- Polyacrylamid-Gel
- 3× Whatman-Filterpapier
- Anode (+)

Der Proteintransfer erfolgte aus selbstgegossenen sowie gekauften Gelen für 1h bei 70mA in einem Semi-Dry Elektrobloetter (PerfectBlue, Peqlab). Nach dem Proteintransfer ist es nötig die unbesetzten Bindestellen auf der PVDF-Membran eine Stunde lang mit einer stark proteinhaltigen Blocklösung abzusättigen.

Transferpuffer:      3,03g/l Tris  
                             14,4g/l Glycin  
                             0,05% SDS  
                             20% Methanol

TBS-Puffer:         50mM Tris  
                             150mM NaCl  
                             pH 7,4

TBST/T: TBS-Puffer  
0,05% Tween-20

Blocklösung: TBS/T  
3% Bovines Serumalbumin (BSA)

### 2.10.2.2 Antikörperdetektion

Die Immunodetektion der größentechnisch aufgetrennten (2.10.1.2) und auf eine PVDF-Membran geblotteten (2.10.2.1) Proteine erfolgte durch Inkubation der Membran mit primären Antikörpern (Tabelle 2.11) ON bei 4°C. Diese Antikörper waren kommerziell erhältliche Antikörper von (Abcam oder Sigma-Aldrich®) und wurden entsprechend der Herstellervorgaben in Tris-buffered Saline (TBS/T) mit 0,05% Tween-20, einer milden, nicht-ionischen Detergenz, die schwache Bindungen ablöst, und 3% BSA angesetzt. Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal mit TBS/T für je 5 min gewaschen. Für die Detektion wurde das HRP-System verwendet. Das bedeutet, die sekundären Antikörper (Tabelle 2.11) sind mit der HRP gekoppelt und wurden ebenfalls entsprechend der Herstellervorgaben verdünnt und für 1h auf der PVDF-Membran inkubiert. Auch danach wurde die Membran mit TBS/T gewaschen, zuerst für 10 min, danach folgten drei fünfminütige Waschschriffe. Die HRP-Detektion wurde durchgeführt mit dem hoch sensitiven HRP-Substrat „SuperSignal West Pico“ (Pierce, Thermo Scientific™) entsprechend der Herstellervorgaben. Luminol- und Peroxidlösung wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und für 5 min auf der Membran bei RT inkubiert. Die Signaldetektion erfolgte mit Hilfe einer hoch-sensiblen CCD-Kamera (ChemiLux Imager, Intas) im 2×2-Binning-Modus. Die erste Aufnahme wurde immer nach 1 min gemacht und weitere Expositionszeiten entsprechend der Signalstärke gewählt.

Antikörper	Hersteller	Prod.Nr.	Quelle	Typ	Verdünnung
<b>primär</b>	Abcam	Ab6556	Kaninchen	polyklonal	1:2000
anti-GFP					
<b>sekundär</b>	Sigma-Aldrich®	A4416	Ziege	Polyklonal, HRP-konjugiert	1:15000
anti-Maus IgG					

**Tabelle 2.11: Verwendete Antikörper**

### 2.10.3 Proteinquantifizierung/ BCA-Methode

Die Quantifizierung von Proteinen in Lösung erfolgte mit dem „Pierce BCA Protein Assay Kit“ (Thermo Scientific™) entsprechend der Herstellerangaben. Diese Methode hat die Vorteile, dass sie sehr genau ist und mit geringem Probeneinsatz durchgeführt werden kann. Sie beruht auf der Bichinchoninsäure-Methode (Smith *et al.*, 1985). Dabei reagieren

zweiwertige Kupferionen quantitativ durch Proteineinfluss zu einwertigen Kupferionen. Diese reagieren wiederum mit der Bichinonsäure und bilden einen Komplex mit violetter Farbe. Die Absorption dieses Farbstoffes kann bei einer Wellenlänge von 562nm photometrisch bestimmt werden. Auf diese Weise lassen sich die Proteinkonzentrationen vor allem von mikrosomalen Fraktionen (2.11.2) und Plasmamembranaufreinigungen (2.11.3) sehr genau bestimmen. Die Proben wurden dazu entsprechend verdünnt (Tabelle 2.12) und die Messungen wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt bei einer Wellenlänge von 571nm (Luminoskan Ascent®, Thermo Electron Corporation™), mit einem Verhältnis zwischen Messreagenz und Probe von 10:1. Eine mitgeführte BSA-Verdünnungsreihe zwischen 0 - 2000µg/ml diente dabei zur Erstellung der Standardkurve, anhand derer im Anschluss die genauen Proteinkonzentrationen ermittelt werden konnten.

Fraktion/Probe	Verdünnung
Homogenat	1:40
mikrosomale Fraktion	1:40
Isolierte Plasmamembran	1:10
DRM/DSF Fraktion	1:2,5

**Tabelle 2.12: Verdünnungen für die Proteinquantifizierung**

## 2.11 Membranisolierung

---

### 2.11.1 Homogenisierung des Pflanzenmaterials

Die Blätter zuvor transfizierter Tabakpflanzen (2.7) wurden abgeschnitten und in einem Mixer (Waring Laboratory & Science Inc.) in einem entsprechenden Volumen von Homogenisierungspuffer, unter Hinzunahme von Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) als Reibemittel, zerkleinert. Auf 50g Blattmaterial (30 Pflanzen entsprechen ca. 300g) wurden 100ml Homogenisierungspuffer und 4g PVPP eingesetzt. Die Blätter wurden bei einer Umgebungstemperatur von 4°C, mit zehn kurzen Mixerimpulsen von maximal 30 sec auf höchster Stufe zerkleinert, solange bis keine großen Blattstücke mehr zu sehen waren. Das Homogenat wurde durch eine „Miraclothmembran“ (Merck4Bioscience) filtriert, so dass danach keine größeren Blattstücke mehr enthalten waren. Dieses Homogenat wurde für die Isolierung der mikrosomalen Fraktion verwendet (2.11.2).

Homogenisierungspuffer:

- 330mM Saccharose
- 50mM TrisHCl pH 7,4
- 3mM EDTA pH 8
- 1mM DTT (frisch)
- 1 Tablette/50ml PI
- 4% (w/v) PVPP

### 2.11.2 Isolierung der mikrosomalen Endomembranfraktion

Das aus dem Pflanzenmaterial erhaltene Homogenat (2.11.1) wurde zuerst bei einer niedrigen Geschwindigkeit von  $15.000\times g$  (ca. 9200rpm) für 31 min, bei  $4^{\circ}C$ , in einem JA-10 Rotor in einer „Avanti-XP-Zentrifuge“ (Beckman-Coulter) zentrifugiert und so die mikrosomale Fraktion von groben Zellwandbestandteilen, Mitochondrien, Chloroplasten und anderen Zellbestandteilen und dem PVPP getrennt. Es folgte eine Hochgeschwindigkeitszentrifugation bei  $100.000\times g$  (ca. 36.000rpm) für eine Stunde, bei  $4^{\circ}C$ , in einem 45Ti-Rotor in einer „Optimal-L 100 K-Ultrazentrifuge“ (Beckman-Coulter). Das nach Abgießen des Überstandes erhaltene mikrosomale Pellet wurde in 4ml 2-Phasenpuffer („Two-Phase-buffer“, TPB) resuspendiert und mit einem Glaspotter (Sartorius) homogenisiert. Aus dem mikrosomalen Pellet wurde anschließend die Plasmamembran isoliert (2.11.3).

„Two-Phase-buffer“:

22ml 43% (w/w) Saccharose
600 $\mu$ l (f. 6,5 % PEG / Dextran) 2M KCl
2,5 ml 0,2 M $K^+P_i$ pH 7,8
1 Tablette/50ml PI

### 2.11.3 Plasmamembranisolierung

Die Isolierung sehr reiner Plasmamembran aus mikrosomalen Endomembranfraktionen (2.11.2) geschah unter Ausnutzung unterschiedlicher Mischbarkeiten und somit einer Partitionierung von Membranfraktionen in zwei unterschiedlichen Polymerphasen. Diese Technik wird im englischen „Two-Phase-Partitioning“ genannt (Yoshida *et al.*, 1983 und Larsson 1988). Dabei wurden maximal 5g des mikrosomalen Pellets auf ein 27g schweres 6,5%iges PEG/Dextran-2-Phasensystem geladen und die beiden Phasen durch invertieren gut vermischt. Durch Zentrifugation des beladenen Systems bei  $1500\times g$ , bei  $4^{\circ}C$  für 5 min wurden die beiden Phasen wieder separiert. In der oberen PEG-haltigen Phase befand sich anschließend die isolierte Plasmamembran, in der unteren Dextranphase andere Membranen und zytosolische Proteine. Diese Separierung wurde fünf- bis sechsmal wiederholt, wobei immer die obere PEG-Phase auf die frische untere Dextranphase eines neuen Systems gegeben, um durch Invertieren die Plasmamembran weiter auszuschütteln und so weiter aufzureinigen. Die untere Phase des ersten Systems wurde noch einmal mit einer oberen Phase eines neuen Systems ausgeschüttelt, um die Mehrheit der, durch Überladung des ersten Systems mit einem zu hohen Anteil an mikrosomaler Fraktion ( $>50mg$  Protein), verloren gegangenen Plasmamembranvesikel aufzufangen (Mitra *et al.*, 2009). Das 6,5%ige PEG/Dextansystem ist zwar sehr stringent und führt zu einem gewissen Verlust an finaler Plasmamembranmenge, dafür ist die erhaltene Plasmamembran reiner und daher besser für spektrometrische Messungen geeignet. Die beiden finalen, Plasmamembran-enthaltenden, PEG-Phasen wurden

vereinigt, zweifach mit TBP-Puffer verdünnt und bei 4°C und 100.000×g für 1h zentrifugiert. Nach quantitativer Bestimmung der resultierenden Plasmamembran, mittels BCA-Methode (2.10.3), wurden 0,6mg der aufgereinigten Plasmamembran in 800µl 1×Tris-DTT aufgenommen und in einem Glaspotter homogenisiert. Die resuspendierte Plasmamembran kann nun für weitere Anwendungen (2.11.4) eingesetzt werden. Üblicherweise erhält man aus 80g frischem Blattmaterial etwa 0,6mg Plasmamembran und aus frisch präparierten mikrosomalen Fraktionen erzielt man generell eine größere Ausbeute an isolierter Plasmamembran.

6,5% PEG/Dextransystem: 11,7g 20% (w/w) Dextran T-500  
5,85g 40% (w/w) PEG-3350  
5,94ml 43% (w/w) Saccharose  
82µl 2M KCl  
675µl 0,2M K<sup>+</sup>P<sub>i</sub> pH 7,8  
H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub> auf final 27g

### 2.11.4 DRM-Isolierung

Die Aufreinigung von der „Detergent-resistant membrane fraction“ (DRM) beruht auf einer Sterolreduktion (2.11.4.1) und einer anschließenden Detergenzbehandlung (2.11.4.2). Durch diese Vorgänge ändert sich die Dichte der ansonsten sehr sterol- und sphingolipidreichen DRM. In einem kontinuierlichen Saccharosegradienten flotierte diese DRM dann bei einer Saccharosekonzentration von etwa 30%. Im Gegensatz zu den Proteinen, die nicht resistent gegenüber einer Detergenzbehandlung sind. Diese befinden sich am Boden des Saccharosegradienten als pelletierte Fraktion („Detergent-soluble fraction“, DSF).

#### 2.11.4.1 Sterolreduktion mittels MCD

Die Reduktion von Sterolen in der DRM erfolgte durch Behandlung der Plasmamembran mit 25mM MCD für 30 min bei 37°C unter leichtem Schütteln. Danach wurde dieser Ansatz für eine Stunde bei 100.000×g und 4°C zentrifugiert (TLA-55 Rotor in der „Optima MAX-XP“, Beckman-Coulter). Die Plasmamembran mit nun reduzierter Sterolkonzentration fand sich danach in dem gelblichen Pellet. Sowohl MCD-behandelte als auch unbehandelte Plasmamembranen wurden im Anschluss mit der Detergenz Triton X-100 behandelt um die DRM zu isolieren (2.11.4.2).

### 2.11.4.2 Detergenzbehandlung

Die Behandlung der isolierten Plasmamembran (2.11.3) mit der milden, nicht-ionischen Detergenz Triton X-100, ermöglichte die Aufreinigung der DRM und erfolgte ausnahmslos auf Eis. Die resuspendierte und homogenisierte Plasmamembran (2.11.3) wird mit Triton X-100 idealerweise in einem Protein-Detergenzverhältnis von 1:15 eingesetzt (e.g 720 $\mu$ l = 0,5mg Plasmamembran + 80 $\mu$ l = 8mg Detergenz), um die maximale Anreicherung von Sterolen zu erreichen, ohne dabei zu viel Protein zu verlieren (Mongrand *et al.*, 2004). Nach Zugabe der Detergenz wurde die Membran für exakt 30 min auf Eis inkubiert. Längere Inkubationszeiten würden zu einer unspezifischen Solubilisierung der Proteine durch die Detergenz führen. Dies wiederum würde die Isolierung von spezifischen Membranfraktionen, wie der DRM, verhindern (Morandat und El Kirat, 2006). Nach der Detergenzbehandlung wurde die Probe mit der entsprechenden Menge 60%iger (w/v) Saccharose vermischt um eine 48%ige (w/v) Saccharosekonzentration zu erhalten (e.g 3,2ml 60%ige Saccharoselösung zu 800 $\mu$ l Solubilisierungsansatz). Diese nun 48%ige Saccharosemischung wurde in ein, bei hohen Geschwindigkeiten zentrifugierbares, Polykarbonatröhrchen (Beckman-Coulter) gegeben, bevor der kontinuierliche Saccharosegradient darüber geschichtet wurde (2.11.4.3).

### 2.11.4.3 Zentrifugation über einen Saccharosegradienten

Über die 48%ige Saccharosemischung, welche die Detergenz-behandelte Plasmamembran enthielt (2.11.4.2), wurde ein kontinuierlicher Saccharosegradient mittels eines Gradientenmixers geschichtet. Dieser Gradientenmischer besteht aus zwei Kammern, eine für die hochprozentige (45% (w/v)) und eine für die niedrigprozentige (15% (w/v)) Saccharoselösung. Unter kontinuierlichem Rühren werden die beiden Saccharoselösungen konzentrationsabhängig miteinander vermischt, über die Probe, in das Polykarbonatröhrchen geschichtet, wobei die Konzentration nach oben hin immer niedriger wird. Die Isolation der DRM erfolgte durch Ultrazentrifugation bei 100.000 $\times$ g und 4°C für 18h in einem Ausschwingrotor (SW 32 Ti-Rotor in der „Optima-L 100 K“, Beckman-Coulter). Nach der Zentrifugation ist ein gräulich-weißer, flotierender Ring in der Mitte des Saccharosegradienten zu sehen. Dieser flotierende Ring stellt die isolierte DRM dar, dem hingegen beinhaltet die pelletierte Fraktion alle Plasmamembranproteine, die durch die Behandlung mit Triton X-100 solubilisiert wurden.

2.11.4.4 Fraktionierung des Saccharosegradienten

Für die Fraktionierung des Saccharosegradienten wurde der Überstand über dem flotierenden DRM-Ring (2.11.4.3) abgenommen und verworfen. Der DRM-Ring selbst wurde mit der Pipette abgenommen, mit 1× Tris-DTT auf ein Volumen von 1,5ml aufgefüllt und per Ultrazentrifugation (45Ti-Rotor in der „Optimal-L 100 K“, Beckman-Coulter) pelettiert. Ebenso wurde mit dem DSF-Pellet am Boden des Saccharosegradienten verfahren. Die DRM wurde in 250µl 1× Tris-DTT resuspendiert, die DSF in 150µl 1× Tris-DTT. Im Anschluss daran wurden die Proteinkonzentrationen der beiden Fraktionen mittels eines BCA-Proteinassays quantitativ vermessen (2.10.3), bevor sie zum Zwecke von spektrometrischen Messungen zu Prof. Waltraud Schulze geschickt wurden.

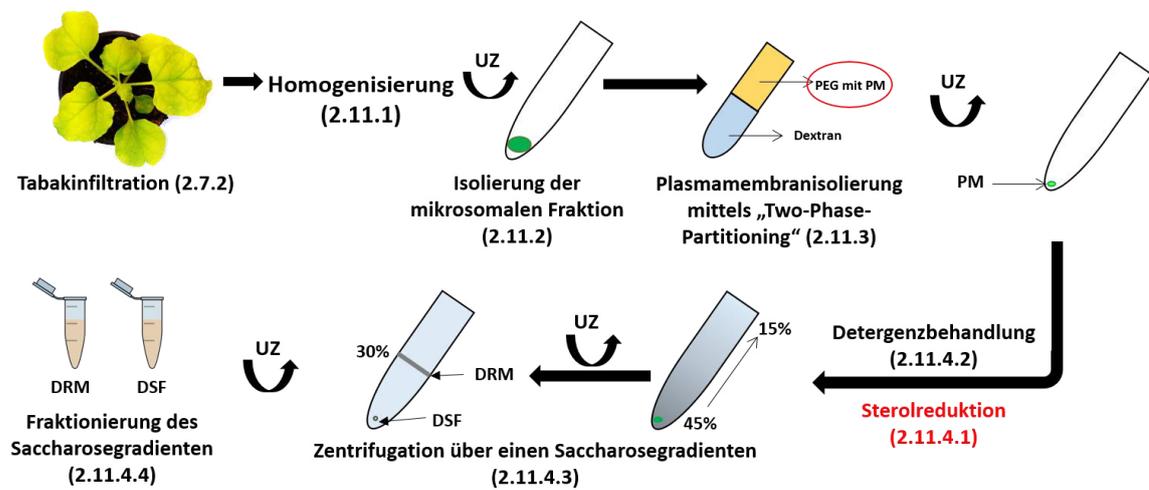


Abbildung 2.6: Membranisolierung

2.12 Verwendete Klonierungsvektoren

Name	Promoter	Terminator	Resistenz	Art	Verwendung
pSat	35S	35S	Ampizillin	USER	2.3, 2.6, 2.8
pUBQ10	UBQ10	RBC	Ampizillin	USER	2.3, 2.6, 2.8
pNBI	SP6	T7	Ampizillin	USER	2.4, 2.8
pcDNA3.1	CAMV, SV40	SV40	Neomycin, Ampizillin	USER	2.5, 2.8, 2.9, 2.10
pCambia7	35S	35S	Kanamycin	USER	2.7, 2.8, 2.10, 2.11
pEF1	EF1-α, SV40	SV40	Ampizillin	traditionell	2.5, 2.8, 2.9, 2.10

Tabelle 2.13: Verwendete Klonierungsvektoren

## 2.13 Verwendete Proteine

Name	Organismus	Code
ABI1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At4g26080
AtrbohD	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g47910
AtrbohF	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g64060
AtRem1.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g48940
AtRem1.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g61260
AtRem1.3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g45820
AtRem1.4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g23750
AtRem3.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g69325
AtRem3.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At4g00670
AtRem4.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g57540
AtRem4.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g41870
AtRem5.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g45207
AtRem6.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g02170
AtRem6.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g30320
AtRem6.3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g53860
AtRem6.4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At4g36970
AtRem6.5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g67590
AtRem6.6	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g13920
AtRem6.7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g61280
CPK21	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At4g04720
CPK5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At4g35310
SLAH3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g24030
RCAR1/PYL9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g01360
Snrk2.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g50500
Snrk2.3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g66880
Snrk2.6/OST1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At4g33950
Snrk2.7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At4g40010
Snrk2.8	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g78290
StRem1.3	<i>Solanum tuberosum</i>	NM_001288060

**Tabelle 2.14: Verwendete Proteine**

## 2.14 Verwendete statistische Methoden

---

Die statistische Auswertung und grafische Darstellung aller gemessenen Daten erfolgte in dem Tabellenkalkulationsprogramm „Microsoft Excel 2013 für Windows“ („Microsoft-Office-Suite“, Microsoft Corporation). Die Berechnung des Mittelwertes erfolgte nach der Formel:

$$\bar{x}_{arithm} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

Dabei sind  $X_1 - X_n$  die gegebenen reellen Zahlen, also die Messwerte und  $n$  ihre Anzahl. Die Berechnung der Standardabweichung  $\sigma_x$  erfolgte nach der Formel:

$$\sigma_x = \sqrt{\text{Var}(x)}$$

Die Standardabweichung  $\sigma_x$  einer Zufallsvariablen  $X$  ist dabei definiert als die Quadratwurzel der Varianz  $\text{Var}(X)$ . Dabei ist die Varianz  $\text{Var}(X)$  definiert als:

$$\text{Var}(X) = E((X - E(X))^2) = E(x^2) - (E(X))^2$$

$X$  ist dabei stets größer oder gleich 0. Das Symbol  $E(\cdot)$  bezeichnet den Erwartungswert, also die Zahl, die die Zufallsvariable  $X$  im Mittel annimmt. Der mittlere Fehler wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{\sigma_x}{\sqrt{n}}$$

Zur Bestimmung der Signifikanz, das heißt zu Prüfung ob die Mittelwerte  $\bar{x}_{arithm}$  zweier Stichprobenmengen gleich oder signifikant unterschiedlich sind, wurde der Zweistichproben-t-test durchgeführt unter der Annahme, dass die zwei Stichprobenmengen eine gleiche Varianz ( $\text{Var}(X)$ ) besitzen. Unterschiede zwischen den Stichprobenmengen wurden als signifikant angenommen wenn der Signifikanzwert  $p < 0,05$  war.

## 2 Material und Methoden

# Ergebnisse

## 3.1 Die Identifizierung von Signalkomplexen in Membrandomänen von *Arabidopsis thaliana* - Calcium-abhängige Kinasen

---

### 3.1.1 Identifizierung und Lokalisierung von sterolabhängigen Membranproteinen – CPK21 und ABI1

Lange Zeit wurden Membrandomänen (Simons und Ikonen, 1997; Lingwood und Simons, 2010) in verschiedenen Systemen und Zelltypen entsprechend ihrer Resistenz gegenüber einer Behandlung mit nicht-ionischen Detergenzien charakterisiert, weshalb man sie auch als „Detergent-Resistant Membranes“ (DRMs, siehe 1.1.3.3, Seite 12) bezeichnet. Heute weiß man, dass die Behandlung von isolierten Membranfraktionen mit Detergenzien zu Artefakten führen kann und dass die Anwesenheit eines Proteins in den DRMs nicht automatisch bedeutet, dass dieses Protein auch mit Membrandomänen assoziiert ist (Zurzolo *et al.*, 2003; Simons, 2008). Mangels anderer zuverlässiger Präparationsmethoden, bedient man sich aber nach wie vor der Methode der DRM-Aufreinigung mittels Detergenzien (siehe 2.11.4, Seite 101), um einen ersten Teileindruck von der Proteinzusammensetzung dieser distinkten Membranbereiche zu bekommen. Durch Verwendung solcher nicht-ionischen Detergenzien, wie Triton X-100 und Brij-98 und durch die anschließende Behandlung der isolierten DRMs aus *Arabidopsis thaliana* mit der sterolreduzierenden Substanz Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (MCD; siehe 2.11.4.1, Seite 101), konnten zuvor (Dissertation Dr. Fatih Demir, "Lipid rafts in *Arabidopsis thaliana* leaves", 2010) durch Massenspektrometrie ca. 80 Proteine identifiziert werden, die konstant sterolabhängig waren und somit als potentiell in Membrandomänen lokalisiert, angenommen werden können. Unter diesen Proteinen befanden sich die beiden Remorine AtRem1.2 und AtRem1.3 (At3g61260 und At2g45820; Tabelle 3.1; Demir *et al.*, 2013).

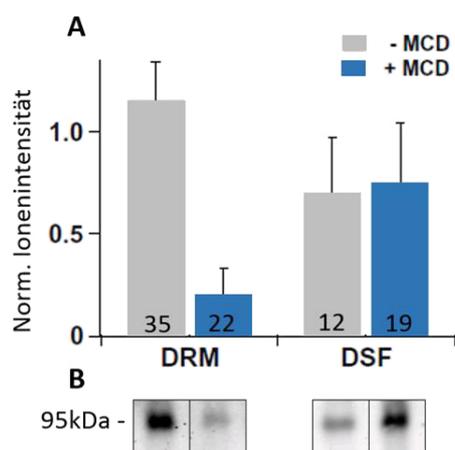
Durch Koexpressionsanalysen (siehe 2.8.1, Seite 88) konnte gezeigt werden, dass diese beiden Proteine nicht nur in Form eines punktierten Musters in der Plasmamembran von *Arabidopsis* exprimiert werden und somit tatsächlich in Membrandomänen lokalisiert sind, sondern auch, dass beide Proteine miteinander kolokalisieren, also zur selben Zeit, in denselben Membrankompartimenten exprimiert sind. Weiterhin wurde gezeigt, dass AtRem1.3 ganz klar mit dem bereits etablierten Membrandomänenmarker StRem1.3 (NM\_001288060; Raffaele *et al.*, 2009) in *Arabidopsis*-Epidermiszellen kolokalisiert ist, wodurch auch dieses Protein als Membrandomänenmarker etabliert werden konnte. Durch Verwendung einer hochauflösenden Mikroskopietechnik (STED) konnte weiterhin die Größe der durch die Remorine bezeichneten Membrandomänen von etwa 250nm auf ~97nm herunterskaliert werden (Demir *et al.*, 2013).

Stark durch MCD beeinflusst	Schwach durch MCD beeinflusst
Actin-7 / 8	ABI1
<b>AtRem 1.2</b>	<b>AtRem 1.3</b>
BAK-1-interagierende RLK 1 (BIR1)	PDR8 (PEN3)
Callose-Synthase 9	PGP19 (MDR11)
<b>CPK10 / 21</b>	Phospholipase D delta
6 LRR-Kinasen	Syntaxin-121 (PEN1)
Zellwand-assoziierte Rezeptorkinase	<b>AtrbohD</b>

**Tabelle 3.1: Auswahl einiger der identifizierten, sterolabhängigen DRM-Proteine**

Sowohl die beiden Remorine AtRem1.2 und AtRem1.3 konnten als sterolabhängig in DRMs lokalisiert identifiziert werden, als auch die an ABA-Signalwegen beteiligte Kinase CPK21 und die Phosphatase ABI1. Die NADPH-Oxidase AtrbohD wurde als schwach sterolabhängig identifiziert (Demir *et al.*, 2013).

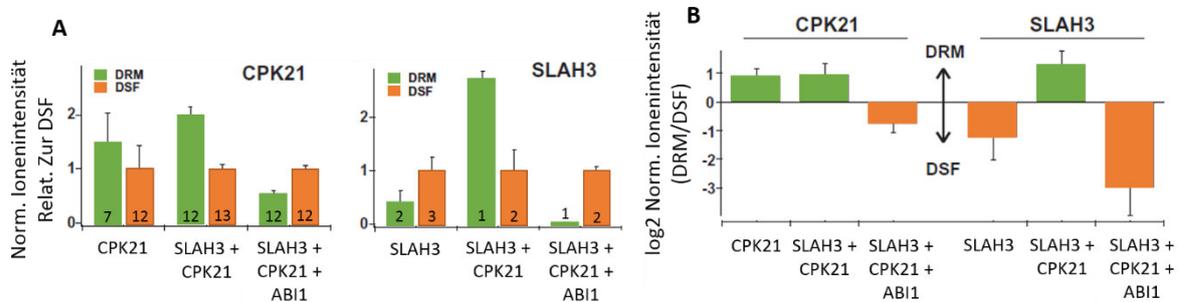
An die oben erwähnten, bereits einige Jahre zuvor durchgeführten Experimente (Dissertation Dr. Fatih Demir, "Lipid rafts in Arabidopsis thaliana leaves", 2010), schließen sich nun weiterführende massenspektrometrische (durchgeführt von Prof. Waltraud Schulze) und Western-Blot-Analysen an. Durch diese kann gezeigt werden, dass die Behandlung von isolierten Plasmamembranfraktionen aus der damals zur Verfügung stehenden stabilen *Arabidopsis*-Linie eGFP::StRem1.3 mit 25mM MCD dazu führt, dass StRem1.3 wesentlich geringer in der aufgereinigten DRM gefunden werden konnte, dafür aber vermehrt in der „Detergent-Soluble Fraction“ (DSF; Abbildung 3.1).



**Abbildung 3.1: MCD-Behandlung von isolierten Plasmamembranfraktionen von stabilen *Arabidopsis* eGFP::StRem1.3-Mutanten**

A: Normalisierte und skalierte Ionenintensitäten von StRem1.3 in der DRM und der DSF mit und ohne MCD-Behandlung. Die Zahlen geben die Anzahl der identifizierten und quantifizierten Peptide für jede Behandlung an. B: Western-Blot-Analysen von DRMs und DSFs isoliert aus stabilen *Arabidopsis*-eGFP::StRem1.3-Pflanzen mit und ohne Behandlung mit MCD (Proteineinsatz = 15µg). Durch Behandlung mit MCD, dissoziiert eGFP::StRem1.3 (~95kDa) aus der DRM und kann verstärkt in der DSF gefunden werden. Die Spektrometrischen Messungen wurden durchgeführt von Prof. Waltraud Schulze.

Unter den als sterolabhängig in DRM<sub>s</sub> identifizierten Proteinen, die als potentiell domänenlokalisiert gelten können, fanden sich neben den beiden Remorinen AtRem1.2 und AtRem1.3 auch die Calcium-abhängige Kinase CPK21 (At4g04720) und die PP2C-Proteinphosphatase ABI1 (At4g26080; Tabelle 3.1; Demir *et al.*, 2013). Dieses Kinase-Phosphatasepaar ist dafür bekannt, den in Schließzellen lokalisierten S-Typ-Anionenkanal SLAC1 in ABA- und Ca<sup>2+</sup>-abhängiger Weise zu regulieren (Geiger *et al.*, 2011). Genauer gesagt wird die Aktivität der Kinase CPK21 durch einen Komplex aus der Phosphatase ABI1 und einem ABA-Rezeptor der RCAR/PYR/PYL-Familie reguliert. SLAC1 selbst wird ausschließlich in Schließzellen exprimiert (Negi *et al.*, 2008) und ist deshalb für Untersuchungen die sich auf domänenlokalisierte Proteine im Mesophyll orientieren, nicht interessant. Aber ein Homologer Anionenkanal, SLAH3 (At5g24030), wird in *Arabidopsis*-Mesophyllzellen exprimiert (Geiger *et al.*, 2011). SLAH3 konnte zuvor, wegen der geringen Signaldichte nicht in Proteomanalysen gefunden werden (Zhao *et al.*, 2008 und 2010). Deshalb wurden massenspektrometrische Analysen mit aufgereinigten DRM<sub>s</sub> aus transient transfizierten Tabakpflanzen durchgeführt (siehe 2.11, Seite 99). Dazu wurden SLAH3, CPK21 und ABI1 mit passenden Detektionsmarkern (SLAH3::V5, CPK21::YFP, ABI1::V5) fusioniert und über Agrobakterien-vermittelte Transfektion in *Nicotiana benthamiana* überexprimiert (siehe 2.7, Seite 86). In den anschließenden Massenspektrometrie-basierten Peptidquantifikationen (Abbildung 3.2, durchgeführt von Prof. Waltraud Schulze) wurde CPK21 sowohl in der DRM als auch in der DSF gefunden.



### Abbildung 3.2: ABI1-abhängige Lokalisierung von CPK21 und SLAH3 in DRM<sub>s</sub>

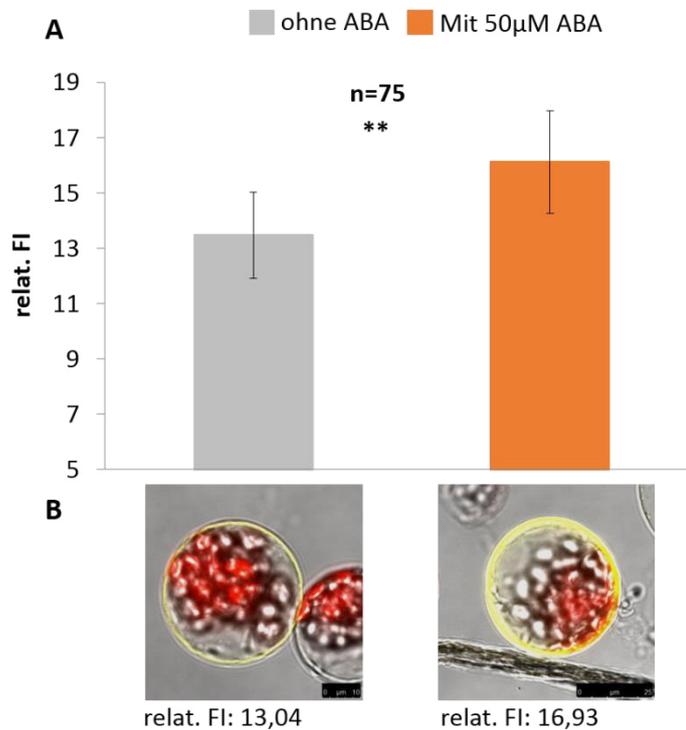
Die Anwesenheit von ABI führt zu einer Verlagerung von SLAH3 und CPK21 aus den DRM<sub>s</sub> in die DSF. A: CPK21 und SLAH3 jeweils einzeln exprimiert, zusammen und mit ABI1. Zwei bis drei Replikate wurden gemessen und gemittelt. Die Ionenintensität der DSF wurde auf 1 gesetzt und die DRM wurde im Vergleich dazu abgebildet. B: Für jede Proteinkombination wurde das DRM/DSF-Verhältnis als normalisierte Ionenintensität gemessen und zwischen den biologischen Replikaten gemittelt. Die grünen Balken zeigen eine höhere Ionenintensität in der DRM und die orangenen Balken zeigen eine vermehrte Proteinexpression in der DSF. Die Zahlen in den Balken (A) geben die Anzahl der identifizierten und quantifizierten Peptide für jede Behandlung an. Die Spektrometrischen Messungen wurden durchgeführt von Prof. Waltraud Schulze.

In Western-Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass CPK21 nach Behandlung der Membranpräparationen mit MCD verringert in der DRM auftritt und dafür vermehrt in der DSF detektiert werden kann. Das beweist eine klare Sterolabhängigkeit von CPK21. Im Gegensatz zu CPK21 kann SLAH3, wenn allein exprimiert, vorwiegend in der DSF detektiert werden. Werden aber beide Proteine zusammen überexprimiert, sind beide vermehrt in den DRMs zu finden. Wird zusätzlich die Phosphatase ABI1 überexprimiert, werden sowohl CPK21 als auch SLAH3 aus der DRM in die DSF verlagert (Demir *et al.*, 2013). Diese Ergebnisse bedeuten, dass CPK21 und SLAH3 als sterolabhängig in Membrandomänen exprimiert angenommen werden können und die Phosphatase ABI1 einen Einfluss auf die Membrandomänenlokalisierung von SLAH3 und CPK21 hat.

### 3.1.2 Die Interaktion von CPK21 mit SLAH3 ist abhängig von ABA

Die „Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation“ (BiFC; siehe 2.8.2.1, Seite 89), ist die Überexpression zweier, mit jeweils einer Fluorophorhälfte (am Häufigsten nutzt man ein gelb („yellow“)-fluoreszierendes Protein (YFP)), gekoppelten Proteine von Interesse (Split-YFP-Fusionskonstrukte), deren Interaktion und somit Komplementation des Fluorophors, es via Fluoreszenzmikroskopie zu analysieren gilt. Mit Hilfe dieser Methode konnte in Epidermiszellen von *Arabidopsis thaliana* eine Interaktion zwischen CPK21 und SLAH3 sowie zwischen CPK21 und ABI1 nachgewiesen werden. Das Fluoreszenzsignal resultierend aus einer Interaktion zwischen den, mit je einer Hälfte eines Fluorophors fusionierten Proteine von Interesse, tritt nicht nur in Form eines punktierten Musters auf, dieses war weiterhin mit dem punktierten Expressionsmuster von DsRed::AtRem1.3 kolokalisiert. Das bedeutet, dass CPK21 sowohl mit SLAH3 als auch mit ABI1 in AtRem1.3-markierten Membrandomänen interagiert. Wird zusätzlich zu den beiden mit den Fluoreszenzproteinhälften markierten SLAH3 und CPK21 die Phosphatase ABI1 überexprimiert, nimmt die Menge und die Intensität der Fluoreszenz, die aus einem gebildeten Komplex aus SLAH3 und CPK21 entsteht, deutlich ab. Elektrophysiologische Untersuchungen im heterologen Oozytensystem (durchgeführt von Dr. Sönke Scherzer) bestätigen, dass SLAH3 tatsächlich durch eine Interaktion mit der Kinase CPK21 phosphoryliert und somit aktiviert wird. Wird ABI1 zusätzlich koexprimiert, sind keine typischen S-Typ-Anionenströme mehr zu messen. Die Anwesenheit von ABI1 verhindert also die Aktivierung des Anionenkanals SLAH3 (Demir *et al.*, 2013). Die Regulation der Interaktion zwischen CPK21 und SLAH3 und der Aktivität von SLAH3 durch die An- oder Abwesenheit von ABI1, gibt aber noch keinen Aufschluss darüber, ob die Interaktion zwischen Anionenkanal und Kinase und die damit einhergehende Aktivierung des Anionenkanals tatsächlich Teil eines ABA-abhängigen Signaltransduktionsweges ist. Werden Protoplasten von *Arabidopsis thaliana* (siehe 2.3, Seite 79) mit den BiFC-Konstrukten SLAH3::Y<sup>N</sup> und CPK21::Y<sup>C</sup> transfiziert, zeigen die Zellen ein deutliches YFP-Signal, resultierend aus der Interaktion zwischen SLAH3 und CPK21. Die Behandlung der transfizierten Zellen mit 50µM ABA resultiert in einem signifikanten Anstieg der relativen

Fluoreszenzintensität des YFP-Signals von 13,04 auf einen Wert von 16,93. Diese Tatsache impliziert, dass die Interaktion zwischen SLAH3 und CPK21 durch die Behandlung mit ABA entweder quantitativ oder qualitativ deutlich gesteigert werden kann (Abbildung 3.3).



**Abbildung 3.3: ABA-induzierte Interaktion zwischen SLAH3 und CPK21 in *A. thaliana* Protoplasten mittels BiFC**

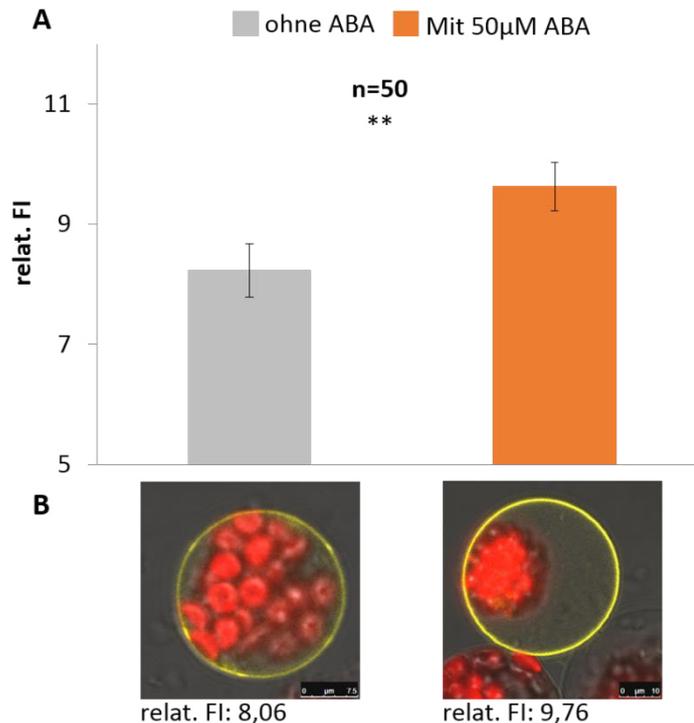
SLAH3 fusioniert mit dem N-Terminus von YFP und CPK21 fusioniert mit dem C-Terminus von YFP wurden transient in Protoplasten von *Arabidopsis thaliana* überexprimiert und mittels BiFC-Technik auf ihre Interaktion hin untersucht. Das deutliche Fluoreszenzsignal resultierend aus einer Komplementation der beiden YFP-Hälften durch die Interaktion der beiden Proteine von Interesse kann durch Behandlung mit 50µM ABA signifikant gesteigert werden. A: statistische Auswertung der Mittelwerte der relativen Fluoreszenzintensität (relat. FI) der einzelnen Zellen (n=75, ± MSE). B: Abbildung von transfizierten Zellen, die beispielhaft ein BiFC-Signal aufzeigen welches der gemittelten relat. FI der statistischen Auswertung entspricht. Statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) sind mit zwei Sternen gekennzeichnet.

Das BiFC-System eignet sich sehr gut um schnell und einfach erste Interaktionsanalysen durchzuführen. Ein Fluorophor wird auf molekularer Ebene in zwei nun nicht mehr fluoreszierende Teile gespalten und auf translationaler Ebene (siehe 2.1, Seite 67) an die zu untersuchenden Proteine fusioniert. Aufgrund seiner hohen intramolekularen Fluoreszenz wird als Fluorophor meist YFP verwendet. Das Ausmaß der Komplementation ist maßgeblich von der Interaktion der beiden zu untersuchenden Proteine und somit einem physischen Kontakt der komplementären Fluorophorfragmente abhängig. Der einmal gebildete komplementierte Fluorophorkomplex ist dann stabil und somit lassen sich auch zeitlich kurze Protein-Protein-Interaktionen in lebenden Zellen nachweisen (Kerppola, 2008). Es hat aber auch gewisse Nachteile. Aufgrund der langsamen

Maturation der fluoreszent-markierten Proteine und der erwähnten stabilen Komplexbildung, lässt sich keine Aussage über die Dynamik der molekularen Interaktion treffen. Weiterhin wird die Anwendbarkeit der BiFC-Methode stark eingeschränkt durch die Position der Untersuchungsprotein-Fluoreszenzproteinfragment-Kopplung, welche für den Erfolg der Messmethode entscheidend sein kann und durch die Selbstkomplementationsrate der beiden Fluorophorfragmente, wodurch es einerseits zu einem artifiziell stark übersteigerten Signal und andererseits zu einer falsch positiven Interpretation der Ergebnisse kommen kann.

Eine andere Methode, mit der man fluoreszenzbasierte Interaktionsmessungen zwischen zwei oder mehreren, Proteinen durchführen kann, ist der sogenannte „Förster-Resonanzenergietransfer“, kurz FRET (Förster, 1948; siehe 2.8.2.2 und 2.8.2.3, Seite 89 und 91). Der Förster-Resonanzenergietransfer ist ein nach Theodor Förster (1948) benannter physikalischer Prozess, bei dem Energie strahlungsfrei (nicht als Emission) von einem angeregten Fluorophor (Donor) auf ein zweites Fluoreszenzprotein (Akzeptor) übertragen werden kann. Dazu werden die zu untersuchenden Proteine auf translationaler Ebene (siehe 2.1, Seite 67) an bestimmte Fluorophore gekoppelt. Häufig verwendet man als Fluorophorpaar das Cyan-fluoreszierende Protein („cyan fluorescent protein“, CFP) als Donor und YFP als Akzeptor, da das Emissionsspektrum von CFP mit dem Absorptionsspektrum von YFP zu mehr als 70% überlappt (Abbildung 2.3, Seite 91). Kommen sich die beiden zu analysierenden Proteine ausreichend nahe ( $R_0$  muss kleiner als 10nm sein), kann die Energieübertragung zwischen Donor und Akzeptor stattfinden ( $R_0$ =Försterradius, d.h. der Abstand zwischen beiden Fluoreszenzproteinen, bei dem die Energieübertragung zu mehr als 50% erfolgt). Der Anionenkanal SLAH3 wurde dazu mit dem Donormolekül mTurquoise, einer stark verbesserten Form des Cyan-fluoreszierenden Proteins (CFP), welches eine höhere Lebenszeit und eine gesteigerte Photonenausbeute aufweist, markiert (Goedhart *et al.*, 2012). Die Proteinkinase CPK21 wurde mit einer ebenfalls verbesserten Variante des YFP, mit dem mVenus markiert.

Die Überexpression der FRET-Paare erfolgte, zwecks Vergleichbarkeit der gemessenen Daten, ebenfalls in dem einfach zu manipulierenden Protoplastensystem (siehe 2.3, Seite 79). Nachdem durch Definition von sehr engen Detektionsgrenzen sichergestellt war, dass keine Donoremission im Detektionsbereich der Akzeptoremission aufgezeichnet wurde, wurde die relat. FI des Akzeptors mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (siehe 2.8, Seite 87) und anhand einer repräsentativen Anzahl von Zellen gemessen und statistisch ausgewertet (Abbildung 3.4). Auch mit Hilfe der SE- („Sensitized Emission“) FRET-Methode kann gezeigt werden, dass der Anionenkanal nicht nur deutlich mit der Kinase CPK21 interagiert, sondern diese Interaktion, angezeigt durch ein detektierbares YFP-Signal, ebenfalls signifikant durch die Behandlung der Zellen mit 50µM ABA von einer relat. FI von 8,06 auf 9,76 gesteigert werden kann.



**Abbildung 3.4: ABA-induzierte Interaktion zwischen SLAH3 und CPK21 in *A. thaliana* Protoplasten mittels SE-FRET**

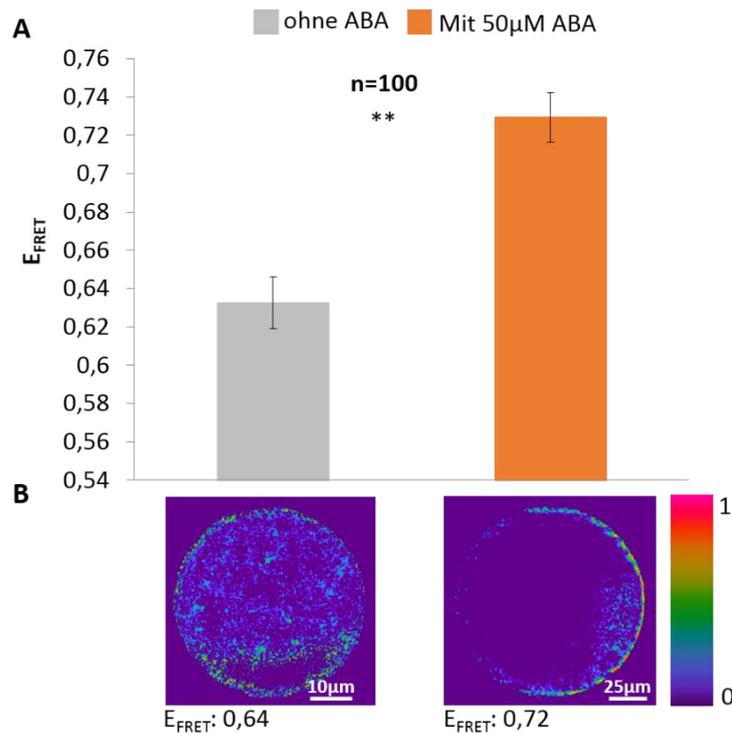
Der Donor SLAH3::CFP und der Akzeptor CPK21::YFP wurden transient in Protoplasten von *Arabidopsis thaliana* überexprimiert und mittels SE-FRET auf ihre Interaktion hin untersucht. Das deutliche Fluoreszenzsignal resultierend aus einem Energietransfer von dem angeregten CFP auf das YFP durch die Interaktion der beiden Proteine von Interesse kann durch Behandlung mit 50μM ABA signifikant gesteigert werden. A: statistische Auswertung der Mittelwerte der relativen Fluoreszenzintensität (relat. FI) der einzelnen Zellen (n=50, ± MSE). B: Abbildung von transfizierten Zellen, die beispielhaft das detektierte YFP-Signal aufzeigen welches der gemittelten relat. FI der statistischen Auswertung entspricht. Statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) sind mit zwei Sternen gekennzeichnet.

Neben der Methode des SE-FRET zur Messung und Interpretation von Proteininteraktionen, gibt es die weit zuverlässigere FRET-Variante des „Acceptorbleaching“-Förster-Resonanzenergietransfer, kurz AB-FRET (siehe 2.8.2.3, Seite 91). Diese FRET-Variante beruht, im Gegensatz zum SE-FRET, welcher sich durch einen Energieübergang von Donor zu Akzeptor und somit durch eine Senkung der Donorfluoreszenzintensität auszeichnet, auf einer Reversion dieses Energieüberganges, da das Akzeptorfluorophor ausgebleicht und somit inaktiviert wird. Durch diesen Vorgang kann man diverse Schwächen, welche die Methode des SE-FRET mit sich bringt umgehen oder ausgleichen. So bergen AB-FRET-Messungen nicht länger das Risiko, dass die Donoremision in den Bereich der Akzeptoremision durchstrahlt und unerwünschter Weise in diesen Detektionsbereich einfließt. Im gleichen Zuge kann vernachlässigt werden, dass das Akzeptormolekül durch die Anregung des Donors ebenfalls mit angeregt wird und auch die unterschiedlichen Reifungsraten der beiden

Fluoreszenzmoleküle kann durch die Methode des AB-FRET vernachlässigt werden. Mit entsprechenden Positiv- und Negativkontrollen, zum Beispiel Donor-Akzeptorfluorophor-Chimären mit kurzen oder langen definierten Aminosäureketten zwischen den beiden Fluorophoren, wurde zuvor die minimale FRET-Effizienz, die nicht als Interaktion angenommen werden kann und die maximale Grenze, welche als absolute Interaktion zu interpretieren ist, definiert. Demnach kann ein  $E_{\text{FRET}}$ -Wert von 0,7 als maximaler Wert für eine zu erwartende Interaktion zwischen den verwendeten Fluorophoren CFP und YFP angenommen werden (siehe IV.2, Seite 251). Da durch die zuvor durchgeführten Experimente bereits eine Interaktion zwischen SLAH3 und CPK21 eindeutig festgestellt werden konnte, wurden keine weiteren Positiv- oder Negativkontrollen durchgeführt.

Wie bereits zuvor gezeigt, kann eine eindeutige Interaktion zwischen dem C-terminal mit mTurquoise (CFP)-markierten Anionenkanal SLAH3 und der C-terminal mit mVenus (YFP)-markierten Proteinkinase CPK21 beobachtet werden (Abbildung 3.5). Die FRET-Effizienz ( $E_{\text{FRET}}$ ) einer Interaktion wird mit Werten zwischen 0 und 1 angegeben. Mit einem Wert von 0,64 ist die  $E_{\text{FRET}}$  der untersuchten Interaktion nahe an dem Maximalwert von 0,7 und somit ziemlich hoch. Dieser Wert und somit die physikalische Interaktion zwischen SLAH3 und CPK21, kann erneut, durch eine Behandlung der transient transfizierten Protoplasten von *Arabidopsis thaliana* mit 50 $\mu$ M ABA, signifikant auf einen Wert von 0,72, also über den definierten Maximalwert gesteigert werden. Weiterhin war der ABA-vermittelte Anstieg der Interaktion am stärksten und am deutlich zu sehen in der Randregion, also der Region der Plasmamembran der untersuchten Protoplasten (Abbildung 3.5 B; 3.6).

Die Interaktion der Kinase CPK21 mit dem Anionenkanal SLAH3 kann also generell durch die Anwesenheit von ABA signifikant gesteigert werden. Das lässt sich auch an durchgeführten Experimenten mit lebenden Zellen über einen längeren Zeitraum beobachten. Dazu wurden transfizierte Protoplasten zuerst vor der Zugabe von ABA vermessen. Danach wurde genau diesen Zellen 50 $\mu$ M ABA zur Verfügung gestellt und jeweils nach 30 min mittels SE-FRET die Interaktion zwischen SLAH3::CFP und CPK21::YFP gemessen. Neun von 10 (eine Zelle ist innerhalb der ersten 30 min geplatzt) zufällig ausgewählten Zellen zeigten, über einen Zeitraum von 1,5 h, einen deutlichen und kontinuierlichen Anstieg der relat. FI von CPK21::YFP und somit der Interaktion zwischen den beiden Proteinen (Abbildung 3.7). Nach 30 min Inkubation der Zellen mit ABA ist diese Induktion der Interaktion am deutlichsten zu sehen. In den darauf folgenden 60 min nimmt die Interaktion zwischen SLAH3 und CPK21 zwar noch weiter zu, aber nicht mehr so stark, wie am Anfang. Aus diesem Kontrollexperiment lässt sich schließen, dass erstens die Induktion der Interaktion zwischen SLAH3 und CPK21 tatsächlich durch den Einfluss des Phytohormons ABA und nicht durch andere Faktoren, wie etwa eine physikalische Beeinflussung der Zellen, wie sie eventuell durch die Applikation von ABA mit sich bringen könnte, bewirkt wird. Zweitens zeigt dieses Experiment, dass in dem gewählten Inkubationszeitraum von 30 min, der verhältnismäßig stärkste Anstieg der Interaktion zwischen SLAH3 und CPK21 stattfindet und dieser dann im weiteren Verlauf der Inkubation nur noch geringfügig weiter ansteigt.

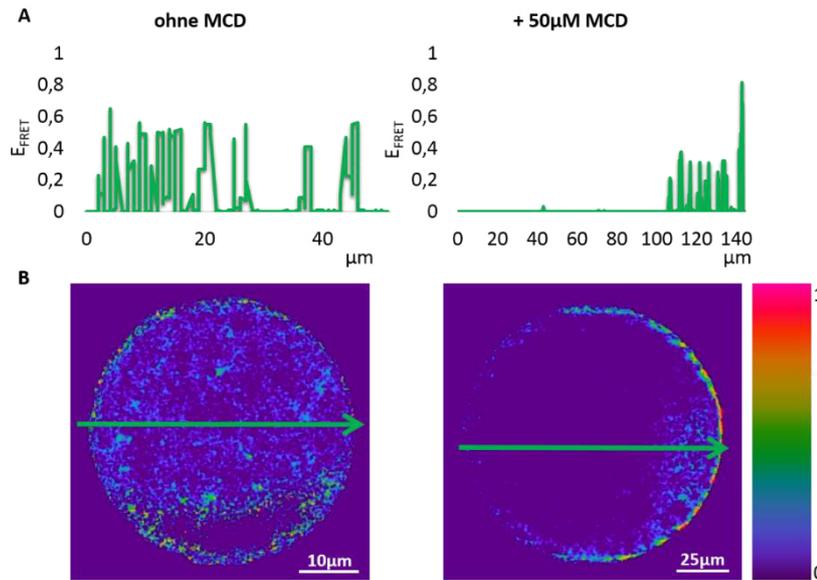


**Abbildung 3.5: ABA-induzierte Interaktion zwischen SLAH3 und CPK21 in *A. thaliana* Protoplasten mittels AB-FRET**

A: Die Behandlung der transfizierten Protoplasten mit 50  $\mu\text{M}$  ABA führte zu einem signifikanten Anstieg der FRET-Effizienz ( $E_{\text{FRET}}$ ) nach der Photobleichung des Akzeptors. Der Akzeptor (CPK21::YFP) wurde mit 100% totaler Laserintensität bei einer Wellenlänge von 514nm für 30frames ( $\sim 32\text{sec}$ ) gebleicht und war wesentlich stabiler in seiner Fluoreszenzintensität in den ABA-behandelten Zellen. Nach der Photobleichung des Akzeptors war die Fluoreszenzintensität des Donors (SLAH3::CFP) erhöht, was auf eine Interaktion der beiden Proteine schließen lässt. Durch Behandlung der transient transfizierten Protoplasten von *Arabidopsis thaliana* mit 50  $\mu\text{M}$  ABA, konnte diese Interaktion signifikant gesteigert werden. In den Schritt der Photobleichung wurde die Oberfläche des gesamten Protoplasten einbezogen, weshalb die gesamte Zelle als ROI („Region Of Interest“, Region von Interesse) markiert wurde ( $n=100$ ,  $\pm\text{MSE}$ ). B: Abbildung von gemessenen Zellen, die beispielhaft die  $E_{\text{FRET}}$ -Werte aufzeigen, welche der gemittelten  $E_{\text{FRET}}$  der statistischen Auswertung entspricht. Die Farbskala (rechts) zeigt die, den Farben in den ausgewerteten Zellen entsprechenden  $E_{\text{FRET}}$ -Werte zwischen 0 und 1. Statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) sind mit zwei Sternen gekennzeichnet.

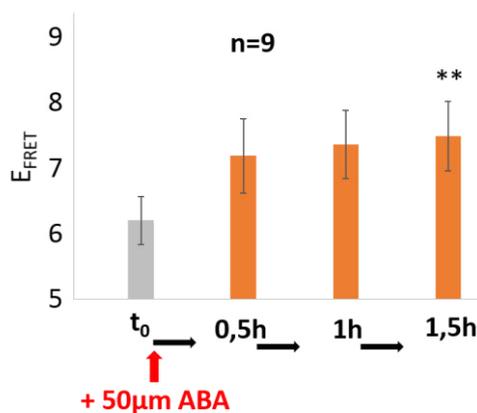
In Anbetracht der zuvor durchgeführten Experimente, durch die gezeigt werden konnte, dass die Proteinphosphatase ABI die Aktivierbarkeit von SLAH3, durch Interaktion mit der Kinase CPK21, inhibiert, sollte der zusätzliche Einfluss von ABI1 auf die durch ABA-induzierbare Interaktion zwischen SLAH3 und CPK21 untersucht werden. Dafür wurden Protoplasten von *Arabidopsis thaliana* nicht nur mit dem AB-FRET-Paar SLAH3::CFP und CPK21::YFP transfiziert, sondern zusätzlich wurde auch die Phosphatase ABI C-terminal mit mCherry fusioniert und koexprimiert. Die Fusion von ABI1 mit mCherry diente einerseits dem fluoreszenzmikroskopischen Nachweis der ABI1-Expression in den zu

messenden Zellen, andererseits wurde das Fluoreszenzprotein so gewählt, dass dessen Emission nicht die FRET-Messung stören konnte.



**Abbildung 3.6:** Die ABA-induzierte Interaktion zwischen SLAH3 und CPK21 in *A. thaliana*-Protoplasten mittels AB-FRET tritt vor allem in der Plasmamembran auf

A: Ein „Linescan“ durch die äquatoriale Ebene (grüner Pfeil in B) der gemessenen Protoplasten bestätigt, dass die, durch Behandlung mit 50µM ABA induzierte Interaktion zwischen SLAH3::CFP und CPK21::YFP, nicht nur höher, sondern vor allem in den Randbereichen der Protoplasten, also in der Nähe der Plasmamembran auftritt. B: Abbildung von gemessenen Zellen, die beispielhaft die  $E_{\text{FRET}}$ -Werte (in Abbildung 3.5) aufzeigen, welche der gemittelten  $E_{\text{FRET}}$  der statistischen Auswertung entspricht. Die Farbskala (rechts) zeigt die, den Farben in den ausgewerteten Zellen entsprechenden  $E_{\text{FRET}}$ -Werte zwischen 0 und 1.

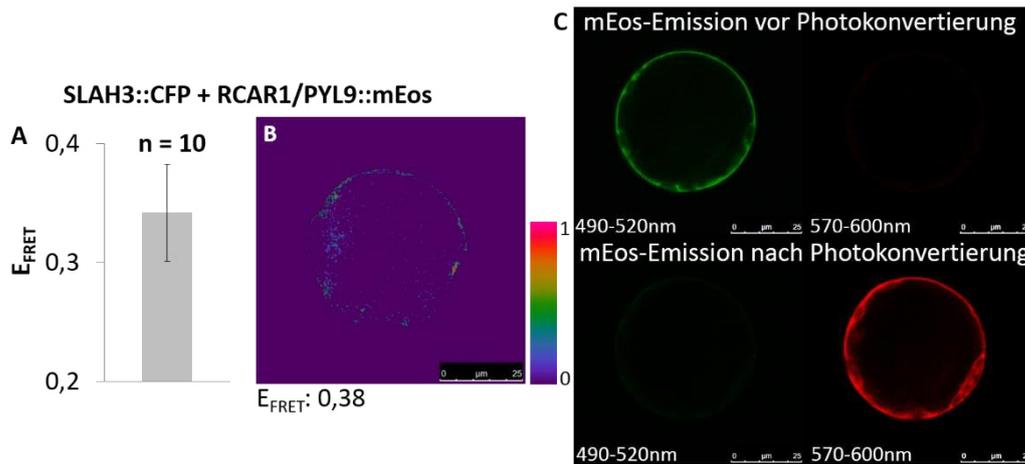


**Abbildung 3.7:** ABA-vermittelter Anstieg der SLAH3-CPK21-Interaktion über die Zeit mittels SE-FRET

Die Interaktion von SLAH3::CFP und CPK21::YFP wurde in transfizierten Protoplasten mittels SE-FRET als relat. FI von YFP gemessen. Nach der Messung der unbehandelten Zellen zum Zeitpunkt  $t_0$  wurden dieselben Zellen mit 50µM ABA behandelt und alle 30 min (0,5h, gesamt 1,5h) vermessen. Die ABA-vermittelte Induktion der Interaktion ist nach 30 min am deutlichsten. Eine Zelle ist innerhalb der ersten 30 min geplatzt ( $n=9$ ,  $\pm$ MSE). Statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) sind mit zwei Sternen gekennzeichnet.

Wurde die Proteinphosphatase ABI1 zusätzlich zu SLAH3 und CPK21 transient in Protoplasten von *Arabidopsis thaliana* koexprimiert, konnte zwar mittels AB-FRET weiterhin eine Interaktion zwischen dem Donor SLAH3::CFP und dem Akzeptor

CPK21::YFP gemessen werden, nur konnte diese Interaktion nicht mehr durch ABA verstärkt werden (Abbildung 3.9). Wie zuvor mehrfach gezeigt interagiert die Phosphatase ABI1 mit der Kinase CPK21 und verhindert somit wahrscheinlich, zumindest wenn die beiden Proteine auf normalem zellulärem Niveau exprimiert würden, eine Interaktion der Kinase mit dem Anionenkanal SLAH3 und dadurch dessen Aktivierung. In der Theorie sollte aber dennoch eine Induktion der Interaktion zwischen SLAH3 und CPK21 durch den Einfluss des Phytohormons ABA stattfinden. Da aber sowohl die Kinase und der Anionenkanal, als auch die Phosphatase auf ein unphysiologisch hohes Maß in den Zellen überexprimiert wurden, war es naheliegend anzunehmen, dass vor allem die Menge an exprimierter Phosphatase die geringere physiologische Konzentration an exprimiertem ABA-Rezeptor übersteigt und ABI1 somit nicht durch einen ABA-Rezeptor-Komplex gebunden und dadurch inhibiert werden kann. Die zusätzliche Koexpression des ABA-Rezeptors RCAR1/PYL9 (At1g01360; Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009) C-terminal fusioniert mit dem photokonvertierbaren Fluoreszenzprotein mEos sollte diesen Zustand aufheben und das Expressionsniveau des ABA-Rezeptors auf dieselbe Ebene heben, wie das der Phosphatase ABI. Das Fluoreszenzprotein mEos wurde gewählt, um zum einen die Detektion des ABA-Rezeptors RCAR1/PYL9 in den zu untersuchenden Zellen zu ermöglichen. Zum zweiten, durch die UV-Licht- vermittelte Konvertierung der Extinktion und Emission des Fluoreszenzproteins vom grünen (490-520nm) in den roten (570-600nm) Spektralbereich, zu gewährleisten, dass die AB-FRET-Messung nicht durch, in den Akzeptoremissionsbereich (die Emission von YFP und GFP liegen nahe beieinander) einstrahlende Emission, gestört wird. Um das zu überprüfen wurden SLAH3::CFP und RCAR1/PYL9::mEos in Protoplasten von *Arabidopsis thaliana* transient koexprimiert und nach der Photokonvertierung von mEos in den roten Spektralbereich mittels AB-FRET die potentielle Energieübertragung von CFP auf nicht komplett konvertiertes, noch im grünen Bereich fluoreszierendes mEos, gemessen (Abbildung 3.8). Vor der Photokonvertierung kann mEos nur mit 488nm angeregt und klar und deutlich im grünen Spektralbereich zwischen 490 und 520nm aufgezeichnet werden, jedoch nicht im roten Spektralbereich. Nach einer 20-sekündigen Bestrahlung des Fluoreszenzproteins mit UV-Licht (405nm), kann festgestellt werden, dass die Photokonvertierung nahezu komplett, aber nicht perfekt erfolgte und mEos fast nur noch mit 561nm angeregt und größtenteils nur noch im roten Spektralbereich detektiert werden kann (Baker *et al.*, 2010). Aus diesem Grund kann nur eine minimale Energieübertragung von dem Donor SLAH3::CFP auf eventuell noch restliches unkonvertiertes mEos im grünen Spektralbereich gemessen werden. Da diese Energieübertragung nur sehr gering ist (gemittelte  $E_{\text{FRET}}$  von 0,38), konnten die vierfach mit SLAH3::CFP, CPK21::YFP, ABI1::mCherry und RCAR1/PYL9::mEos transfizierten Protoplasten von *Arabidopsis thaliana* für die Messung der Interaktion zwischen SLAH3 und CPK21 mittels AB-FRET verwendet werden.

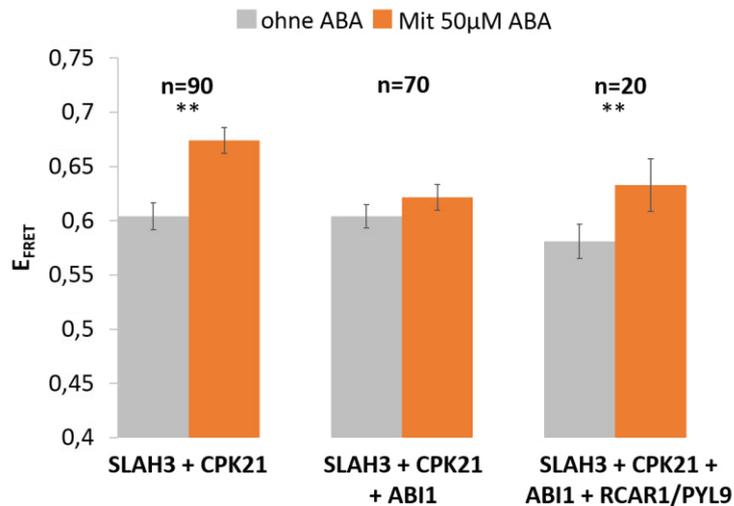


**Abbildung 3.8: Untersuchung des Einflusses von RCAR1/PYL9::mEos auf AB-FRET-Messungen**

A: Die Energieübertragung ( $E_{\text{FRET}}$ ) von SLAH3::CFP auf RCAR1/PYL9::mEos nach dessen Photokonvertierung in den roten Spektralbereich ist sehr gering. B: Abbildung einer gemessenen Zelle, die beispielhaft den  $E_{\text{FRET}}$ -Wert aufzeigt, welcher der gemittelten  $E_{\text{FRET}}$  der statistischen Auswertung entspricht ( $n=10$ ,  $\pm$ MSE). Die Farbskala (rechts daneben) zeigt die, den Farben in den ausgewerteten Zellen auftretenden  $E_{\text{FRET}}$ -Werte zwischen 0 und 1. C oben: Die Extinktion (488nm) und Emission (490-520nm) von mEos kann vor der Photokonvertierung ausschließlich im grünen Spektralbereich erfolgen. C unten: Die Extinktion (561nm) und Emission (570-600nm) von mEos kann nach der Photokonvertierung fast ausschließlich nur noch im roten Spektralbereich erfolgen. Die UV-vermittelte Konvertierung von mEos vom grünen in den roten Spektralbereich erfolgt nahezu vollständig.

Bisher konnte mittels verschiedener Techniken, vor allem mittels AB-FRET, gezeigt werden, dass der Anionenkanal SLAH3 und die Proteinkinase CPK21 in Protoplasten von *Arabidopsis thaliana* miteinander interagieren. Wie in elektrophysiologischen Studien im heterologen Oozytensystem gezeigt, führt diese Interaktion zu einer Aktivierung des Anionenkanals, so dass deutliche S-Typ-Anionenströme gemessen werden können (Demir *et al.*, 2013). Durch Behandlung der transfizierten Zellen mit 50 $\mu$ M ABA kann diese Interaktion nicht nur signifikant induziert, sondern dann auch hauptsächlich im Bereich der zellulären Plasmamembran beobachtet werden. Wird zusätzlich die PP2C-Proteinphosphatase ABI1 koexprimiert, kann zwar immer noch eine physikalische Interaktion zwischen SLAH3 und CPK21 festgestellt werden, aber die Möglichkeit diese durch die Behandlung mit 50 $\mu$ M ABA zu induzieren geht verloren (Abbildung 3.9). Im heterologen Expressionssystem der *Xenopus laevis*-Oozyten können dann auch keine typischen S-Typ-Anionenströme, die von einer Aktivierung des SLAH3 resultieren, gemessen werden (Demir *et al.*, 2013). Die Phosphatase ABI1 scheint also die Kinasevermittelte Aktivierung des Anionenkanals unterbinden zu können. Das Phytohormon ABA sollte diese Inhibierung eigentlich wieder rückgängig machen und erneut eine Aktivierung des Anionenkanals durch verstärkte Interaktion mit CPK21, ermöglichen. Da die Protoplasten aber durch die Überexpression eine unphysiologisch hohe Menge der

transfizierten Proteine überexprimieren, liegt es nahe anzunehmen, dass die von der Zelle, in einer natürlich hohen Konzentration, exprimierten ABA-Rezeptoren nicht ausreichen um nach Bindung von ABA die inhibierende Wirkung von ABI1 zu unterbinden. Wenn man nun dafür sorgt, dass der ABA-Rezeptor RCAR1/PYL9 ebenfalls, durch zusätzliche Koexpression, stark überexprimiert wird, kann durch Behandlung der Zellen mit ABA erneut die Interaktion zwischen SLAH3 und CPK21 signifikant induziert werden (Abbildung 3.9).



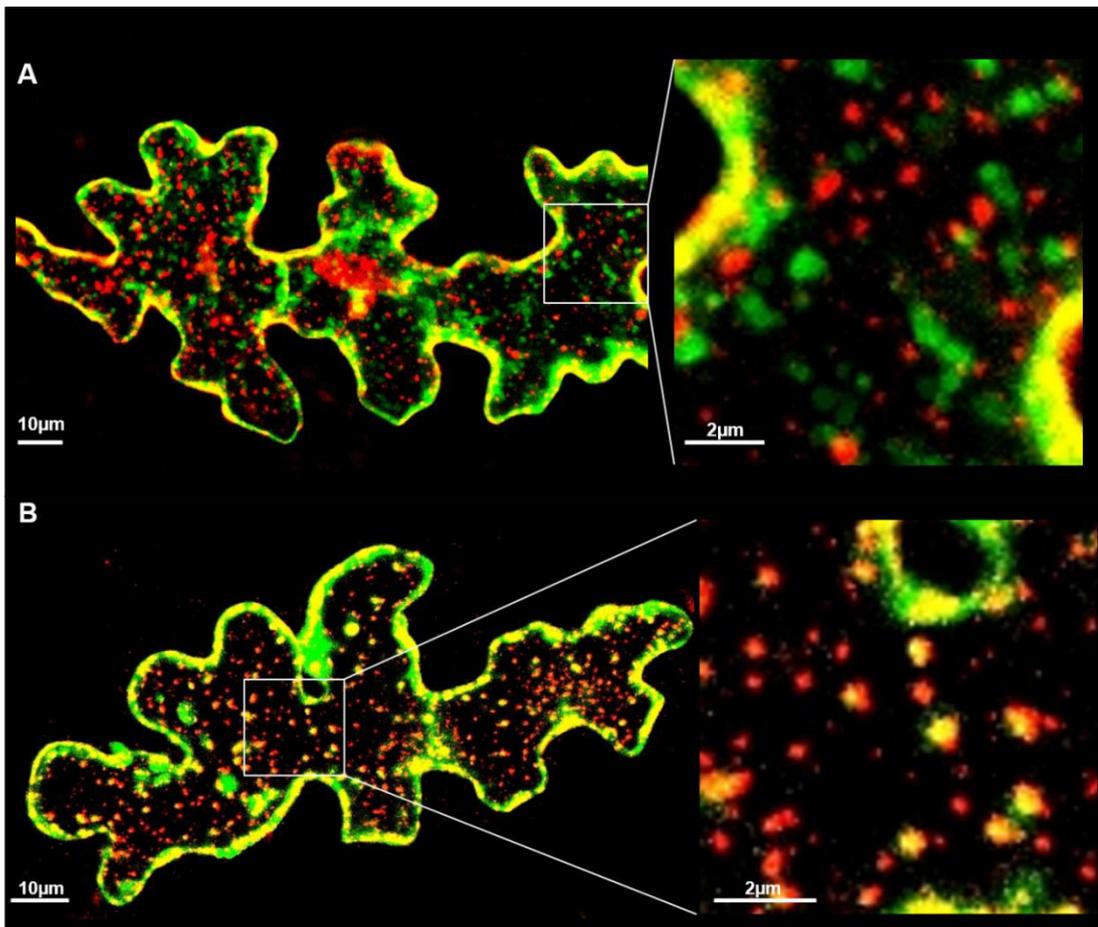
**Abbildung 3.9: Die ABA-induzierte Interaktion zwischen SLAH3 und CPK21 kann in *A. thaliana* Protoplasten durch ABI1 und RCAR1/PYL9 modifiziert werden**

Die Behandlung der transfizierten Protoplasten mit 50µM ABA führte zu einem signifikanten Anstieg der FRET-Effizienz ( $E_{\text{FRET}}$ ) nach der Photobleichung des Akzeptors, nach der die Fluoreszenzintensität des Donors (SLAH3::CFP) erhöht war (n=90,  $\pm$ MSE). Die zusätzliche Überexpression von ABI1::mCherry verhindert die ABA-Induktion der Interaktion von SLAH3 und CPK21 (n=70,  $\pm$ MSE). Die Koexpression des ABA-Rezeptors RCAR1/PYL9::mEos verhindert die ABI1-vermittelte Inhibierung und die ABA-induzierte Steigerung der Interaktion von SLAH3 und CPK21 war erneut detektierbar (n=20,  $\pm$ MSE). Statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) sind mit zwei Sternen gekennzeichnet.

### 3.2 Identifizierung und Lokalisierung von sterolabhängigen Membranproteinen - Die NADPH-Oxidase AtrbohD

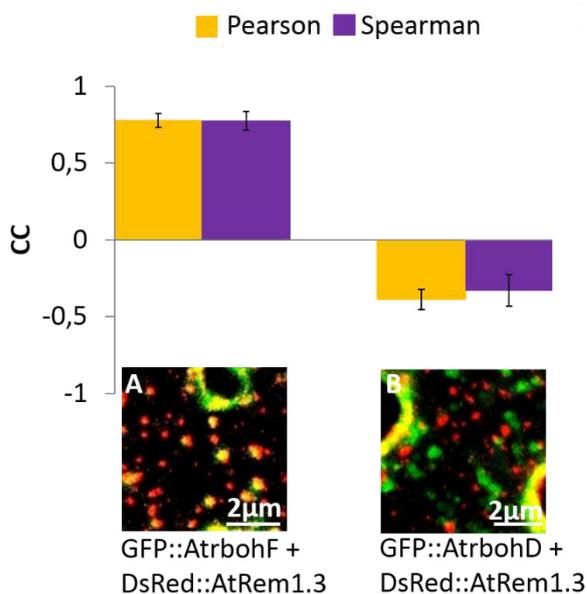
In den zuvor, mittels Einsatz von milden, nicht-ionischen Detergenzien, isolierten und analysierten DRMs (siehe 2.11.4, Seite 101) konnten 246 Proteine identifiziert werden. Die meisten von ihnen sind dafür bekannt in der Plasmamembran lokalisiert und an Signal- und Transportprozessen beteiligt zu sein. Die sterolreduzierende Komponente MCD wurde eingesetzt (siehe 2.11.4.1, Seite 101), um die identifizierten Proteine genauer in Hinblick auf ihre mögliche Abhängigkeit von einer sterolreichen Membrenumgebung zu untersuchen (Dissertation Dr. Fatih Demir, "Lipid rafts in Arabidopsis thaliana leaves",

2010). Die Behandlung von DRMs mit MCD entfernt Sterole zu mehr als 50% (Kierszniowska *et al.*, 2008). Durch diese Behandlung konnten unter den 246 identifizierten Proteinen ca. 80 identifiziert werden, die als sterolabhängig in Membrandomänen lokalisiert gelten können. Proteine, die eine starke Affinität zu ihrer sterolreichen Umgebung hatten, konnten größtenteils nach der Behandlung nicht mehr in den DRMs nachgewiesen werden. Proteine, die schwach sterolabhängig waren, konnten im Anschluss nur noch schwach in den DRMs nachgewiesen werden. Zu diesen schwach sterolabhängigen Proteinen gehörte unter anderem die, im Mesophyll und da vor allem in der Plasmamembran lokalisierte, NADPH-Oxidase AtrbohD (At5g47910). Die Überexpression der fluoreszent markierten AtrbohD zusammen mit dem zuvor etablierten Membrandomänenmarker AtRem1.3 (Demir *et al.*, 2013) in *Arabidopsis*-Epidermiszellen mittels Partikelbombardement (siehe 2.6, Seite 85) sollte klären, ob tatsächlich eine Lokalisation der Oxidase in Membrandomänen vorliegt. Das Expressionsmuster von AtrbohD ist, genau wie das erwartete Expressionsmuster von AtRem1.3, punktiert und nicht homogen über die Plasmamembran verteilt, weshalb man von einem „patchy pattern“ sprechen kann (Abbildung 3.10 A). Die Expressionsmuster beider Proteine zeigen zwar eine ähnliche Verteilung in der Plasmamembran, aber sie überlagern sich nicht, das heißt, beide Proteine kommen nicht zur selben Zeit am selben Ort vor, sie sind also nicht kolokalisiert. Zum Vergleich zeigt die Expression der zuvor bereits eingehend untersuchten, vorwiegend in den Schließzellen von *Arabidopsis* lokalisierten, NADPH-Oxidase AtrbohF (At1g64060, Kwak *et al.*, 2003; Sirichandra *et al.*, 2009) ebenfalls ein punktiertes Expressionsmuster (Abbildung 3.10 B). Allerdings ist in diesem Fall die Lokalisation von AtrbohF dieselbe wie die von AtRem1.3, das heißt beide Proteine sind zur selben Zeit am selben Ort exprimiert und somit kolokalisiert. Die statistische Auswertung der Oxidase-Remorin-Lokalisation in Epidermiszellen erfolgte mittels der Bestimmung der Korrelationskoeffizienten („Correlation Coefficient“, CC) nach Pearson und Spearman. Sind die Korrelationskoeffizienten (CC) nach Pearson und Spearman  $< 0$  bedeutet dies eine Separierung der Signale. Sind sie  $> 0$ , bedeutet dies eine Tendenz zur Kolokalisation der fluoreszent markierten Proteine. Mit Werten zwischen 0,7 und 0,8, wird bestätigt, dass AtrbohF mit dem Domänenmarker AtRem1.3 kolokalisiert ist (Abbildung 3.11). Mit Werten zwischen -0,2 und -0,5 zeigt sich für die Koexpression der AtrbohD mit AtRem1.3 eine starke Tendenz dahingehend, dass beide fluoreszent markierten Proteine lokal voneinander getrennt vorliegen (French *et al.*, 2008). Es kann also eine Membrandomänenlokalisierung für die NADPH-Oxidasen AtrbohD und AtrbohF angenommen werden, nur dass AtrbohD in einer anderen Art von Membrandomänen lokalisiert zu sein scheint wie AtrbohF.



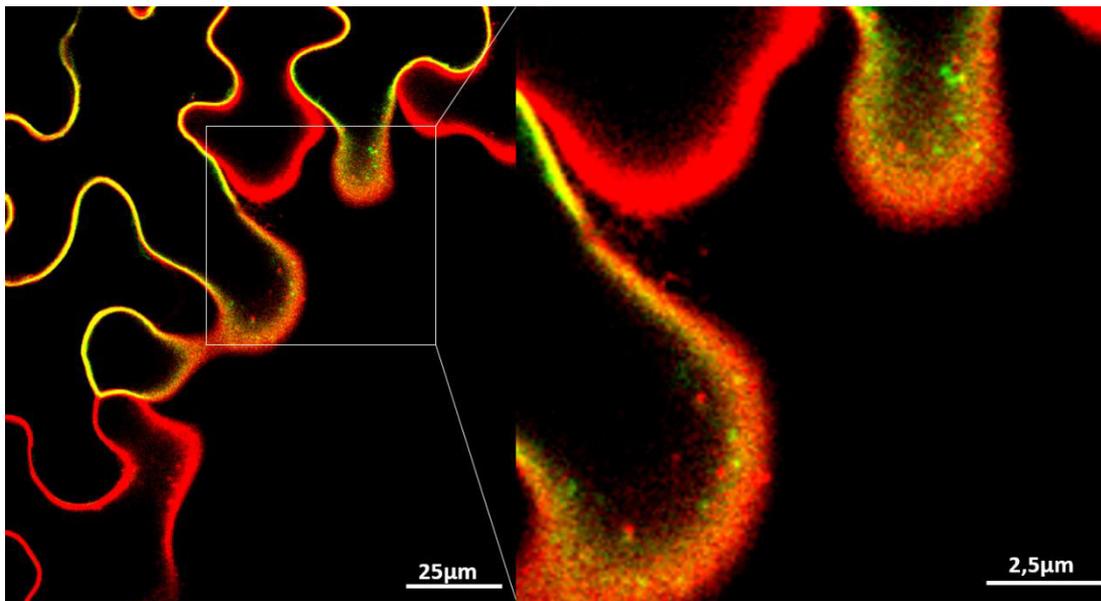
**Abbildung 3.10: Membrandomänenlokalisierung der NADPH-Oxidasen AtrbohD und AtrbohF**

Beide Oxidase-GFP-Fusionsproteine (grün fluoreszierend), sind in Membrandomänen lokalisiert. Die AtrbohD ist aber nicht in denselben Domänen lokalisiert wie der etablierte Domänenmarker AtRem1.3 (rot fluoreszierend), wohingegen AtrbohF mit AtRem1.3 kolokalisiert ist. Angezeigt wird dies durch die gelbe Mischfarbe an den Stellen an denen beide Proteine zur selben Zeit vorkommen, also kolokalisiert sind. A: GFP::AtrbohD + DsRed::AtRem1.3; B: GFP::AtrbohF + DsRed::AtRem1.3



**Abbildung 3.11: Statistische Auswertung der Kolokalisierungsanalysen zwischen AtRem1.3 und AtrbohF/AtrbohD nach transienter Überexpression in Epidermiszellen von *Arabidopsis thaliana***  
Ausgehend von der statistischen Auswertung der Korrelationskoeffizienten nach Pearson und Spearman (CC) bestätigt sich, mit Werten zwischen 0,7 und 0,8, eine Kolokalisation zwischen dem Membrandomänenmarker AtRem1.3 und der Oxidase AtrbohF (n=5,  $\pm$  MSE), nicht aber mit der Oxidase AtrbohD (CC zwischen -0,2 und -0,5, n=5,  $\pm$  MSE). A: GFP::AtrbohF + DsRed::AtRem1.3, B: GFP::AtrbohD + DsRed::AtRem1.3

Die transiente Überexpression der beiden unterschiedlich fluoreszent markierten NADPH-Oxidasen in *Nicotiana benthamiana* (siehe 2.7, Seite 86), zeigt ebenfalls, dass es keine gemeinsame Expression beider Oxidasen am selben Ort gibt (Abbildung 3.12). Beide Fluoreszenzsignale liegen separiert voneinander vor. Die statistische Auswertung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson liegt mit 0,07 eindeutig in dem Bereich, in dem keine Kolo­kalisierung, sondern ein nicht-korrelie­rendes und zufälliges Verteilungsmuster für die entsprechenden Signale und somit für beide Proteine angenommen werden kann. Dies Bestätigt, dass beide Oxidasen zwar zur selben Zeit in einer Zelle überexprimiert werden können, aber dann nicht am selben Ort, in derselben Art von Membrandomänen vorliegen.



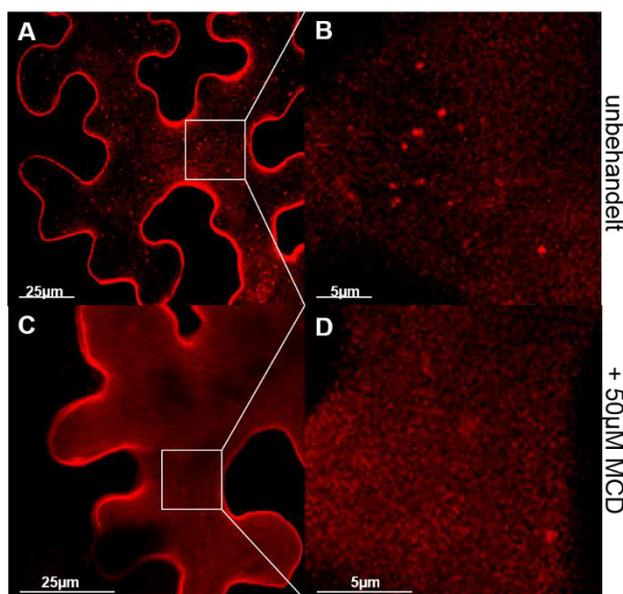
**Abbildung 3.12: Koexpression von AtrbohF und AtrbohD in Epidermiszellen von *Nicotiana benthamiana***

Der Korrelationskoeffizient von GFP::AtrbohF und AtrbohD::mCherry nach Pearson beträgt  $0,07399 \pm 0,05193$  ( $n=5$ ,  $\pm$ MSE) und deutet damit auf eine Separierung der beiden Fluoreszenzsignale hin.

AtrbohD wird in den isolierten DRM­s nach Behandlung mit MCD lediglich als schwach sterolabhängig charakterisiert (Demir *et al.*, 2013). Epidermiszellen von Tabakpflanzen lassen sich sehr einfach mit MCD behandeln. Wird zuvor AtrbohD in *Nicotiana benthamiana* (siehe 2.7, Seite 86) überexprimiert (Abbildung 3.13), ist nicht nur das bereits beobachtete punktierte Expressionsmuster, welches auf eine Lokalisierung von AtrbohD in Membrandomänen hinweist, zu beobachten, sondern auch, dass dieses distinkte Expressionsmuster nach Behandlung der Zellen mit 50µM MCD nahezu komplett verschwindet und aufgelöst wird. Die Lokalisierung von AtrbohD über die Plasmamembran wird homogener und gleichmäßiger. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Oxidase AtrbohD, zumindest in ihrer Lokalisation, vielleicht stärker von einem sterolreichen Umfeld abhängig sein könnte, als zuvor vermutet. Die durchgeführten Lokalisierungs- und Kolo­kalisierungsexperimente legen nahe, dass es in Pflanzen

unterschiedliche Arten von Membrandomänen geben muss und die beiden Oxidasen AtrbohD und AtrbohF zumindest zeitweise in diesen unterschiedlichen Membrankompartimenten lokalisiert und dadurch eventuell auch unterschiedlich reguliert sind.

Für die NADPH-Oxidase AtrbohF ist zuvor schon ein Interaktionspartner identifiziert worden. Die Calcium-unabhängige Kinase Snrk2.6, auch OST1 („Open Stomata 1“, At4g33950) genannt, aus der Familie der Snrk2-Kinasen („SNF1-related protein kinases 2“) interagiert mit AtrbohF an der Plasmamembran von Schließzellen und phosphoryliert die beiden Serinreste 13 und 174, wodurch die Oxidase aktiviert wird (Sirichandra *et al.*, 2009). Um zu klären, ob die unterschiedliche Lokalisierung der beiden Oxidasen auch einen Einfluss auf deren funktionelle Regulation hat, ob also beide Oxidasen zu unterschiedlichen Zeiten, auf unterschiedliche Reize hin, durch den Ablauf unterschiedlicher Signalwege usw. aktiviert werden, musste zuerst ein Interaktionspartner für die, in den voranstehenden DRM-Präparationen als sterolabhängig klassifizierte NADPH-Oxidase AtrbohD, identifiziert werden. Mit Blick auf die bereits erkannte Interaktion zwischen der Oxidase AtrbohF und der Snrk2-Kinase OST1, war es sehr wahrscheinlich unter den restlichen 9 Mitgliedern der Snrk2-Familie in *Arabidopsis* einen solchen, die Funktion von AtrbohD regulierenden Interaktionspartner zu finden.



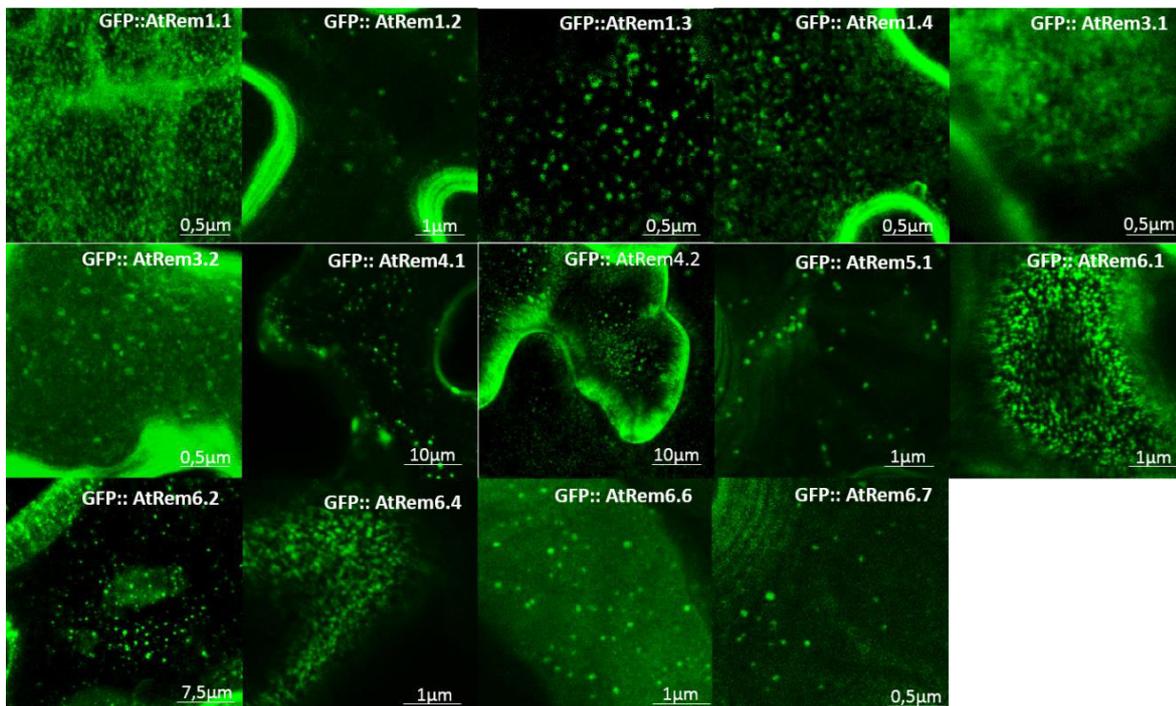
**Abbildung 3.13: Nanodomänen-lokalisierung von AtrbohD**

Transiente Überexpression von AtrbohD::mCherry in Epidermiszellen von *Nicotiana benthamiana*. A & B: ohne MCD-Behandlung ist ein deutliches, punktiertes Expressionsmuster zu erkennen. C & D: nach Sterolreduktion mit 50µM MCD für 30 Min bei RT, erscheint das Fluoreszenzsignal homogen über die Plasmamembran verteilt. B & D sind jeweils vergrößerte Ausschnitte aus den Abbildungen A & C.

### 3.2.1 Die Diversität von Membrandomänen in *Arabidopsis thaliana*

Die NADPH-Oxidase AtrbohD zeigt, wie in Abbildung 3.10 zu sehen, ein sehr heterogenes, punktiertes Expressionsmuster. Sie scheint nicht in denselben, durch das Protein AtRem1.3 markierten, Membrandomänen in *Arabidopsis thaliana* wie die Oxidase AtrbohF lokalisiert zu sein, sondern in einer anderen Art dieser spezialisierten

Membranbereiche. Dies legt die Vermutung nahe, dass es unterschiedliche Membrandomänen mit unterschiedlicher Zusammensetzung und vielleicht auch unterschiedlicher Funktion in der Plasmamembran gibt. Die Lokalisierung eines bestimmten Proteins in einer bestimmten Art von Membrandomänen könnte somit eine bestimmte funktionelle Regulierung dieses Proteins bedeuten. Mit anderen Worten, die Signalwege in denen beide NADPH-Oxidasen involviert sind und die Mechanismen, die zur Regulierung besagter Signalwege beitragen, könnten durch die Lokalisierung der beiden Enzyme in jeweils unterschiedlichen Membrandomänen, unterschiedlich beeinflusst und/oder gesteuert werden. In diesem Zusammenhang steht die Frage im Raum, ob tatsächlich unterschiedliche Arten von Membrandomänen, zumindest in Pflanzen, existieren und ob man diese durch die Überexpression anderer Remorinproteine, visualisieren kann. In *Arabidopsis thaliana* gibt es 16 Gene, die für die unterschiedlichen Vertreter der fünf Remorinuntergruppen kodieren (Raffaele *et al.*, 2007). Die transiente Überexpression der N-terminal mit GFP markierten Remorinproteine in Epidermiszellen von *Nicotiana benthamiana* (Abbildung 3.14; siehe 2.7, Seite 86) lässt erkennen, dass alle Vertreter der Remorinproteinfamilie ein mehr oder weniger distinktes und zumindest temporär punktiertes Expressionsmuster zeigen und somit für diese ebenfalls eine Lokalisierung in Membrandomänen angenommen werden kann.



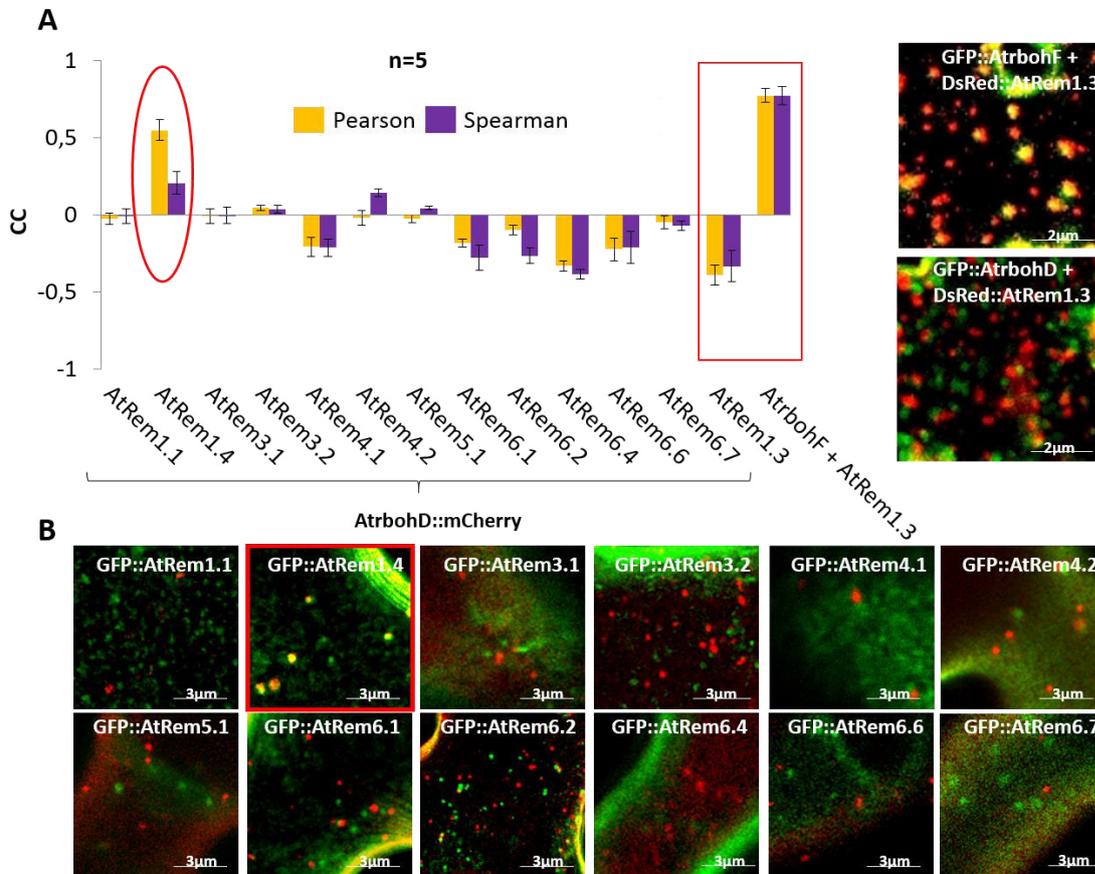
**Abbildung 3.14: Membrandomänenlokalisierung der *Arabidopsis*-Remorine**

Alle 14 (AtRem1.1 (At3g48940), AtRem1.2 (At3g61260), AtRem1.3 (At2g45820), AtRem1.4 (At5g23750), AtRem3.1 (At1g69325), AtRem3.2 (At4g00670), AtRem4.1 (At3g57540), AtRem4.2 (At2g41870), AtRem5.1 (At1g45207), AtRem6.1 (At2g02170), AtRem6.2 (At1g30320), AtRem6.4 (At4g36970), AtRem6.6 (At1g13920), AtRem6.7 (At5g61280)) N-terminal mit GFP markierten und transient in Epidermiszellen von *Nicotiana benthamiana* überexprimierten *Arabidopsis*-Remorine sind mehr oder weniger deutlich und zumindest zeitweise in Membrandomänen lokalisiert.

Es fällt auf, dass einige Remorine, wie das AtRem1.2, das AtRem3.1, das AtRem6.1, das AtRem6.4 und das AtRem6.7, ein weniger deutliches punktiertes Expressionsmuster zeigen als andere Remorine. Zwei Remorinproteine, das AtRem6.3 (At1g53860) und das AtRem6.5 (At1g67590) konnten zuvor nicht aus einem Pool genomischer DNA mittels genspezifischer PCR-Primer amplifiziert werden, so dass deren Überexpression in Tabakpflanzen bisher nicht gelang. Beide Proteine sind laut Datenbank (<http://bar.utoronto.ca>) hauptsächlich in der Blüte und im Sprossapex exprimiert und deshalb für Überexpressionsanalysen zur Lokalisierung im Blattmesophyll weniger von Bedeutung. Für das Remorin AtRem3.1 wurden bisher noch keine Analysen zur gewebespezifischen Expression durchgeführt. Das Protein AtRem5.1 wird hauptsächlich in den Samen exprimiert (Raffaele *et al.*, 2007).

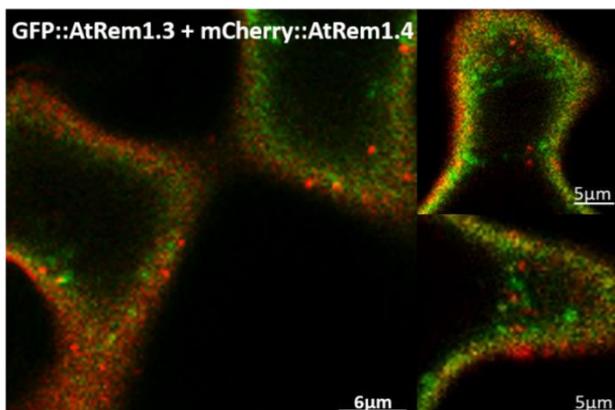
In Pflanzen gibt es also nachweislich verschiedene Proteine, alle zur großen Familie der Remorine gehörig, die mehr oder weniger deutlich Membrandomänen in der Plasmamembran markieren. Ob es sich dabei aber immer um dieselbe Art von Membrandomänen handelt, oder ob tatsächlich die Lokalisierung der verschiedenen Vertreter der Remorine auch unterschiedliche Arten von Membrandomänen anzeigen, ist bisher nicht klar. Klar ist aber, dass AtrbohD in einer anderen Art von Membrandomänen exprimiert ist als die NADPH Oxidase AtrbohF. Eine Koexpression von AtrbohD mit den verschiedenen anderen in Membrandomänen (Abbildung 3.15) lokalisierten Remorinproteinen, zeigt, dass kein Remorin eine Tendenz zeigt mit der Oxidase AtrbohD kolokalisiert zu sein, außer dem Remorin AtRem1.4. Wie das zuvor beschriebene Remorin AtRem1.3, ist es ein Mitglied der Untergruppe 1b (Raffaele *et al.*, 2007) und zeigt nach statistischer Analyse der Korrelationskoeffizienten nach Pearson und Spearman mit Werten von 0,54 und 0,209 eine gewisse Tendenz zur Kolokalisation mit AtrbohD. Aus der entsprechenden Abbildung (Abbildung 3.15 B, markiert mit einer roten Ellipse) ist ersichtlich, dass AtrbohD nicht in allen durch das AtRem1.4 markierten Domänen vorliegt, aber das AtRem1.4 andersherum in all den Domänen, in denen AtrbohD vorliegt, exprimiert wird. Die beiden Remorine AtRem1.3 und AtRem1.4 wurden weiterhin mit komplementären Fluorophoren fusioniert und transient in Epidermiszellen von *Nicotiana benthamiana* überexprimiert, um zu überprüfen, ob es sich bei den markierten Membrandomänen tatsächlich um jeweils unterschiedliche Domänenarten handelt. Die statistische Auswertung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson ergab mit einem Wert von 0,118, dass es sich um eine nicht-korrelierte, zufällige Verteilung der Expressionssignale, also nicht um eine Kolokalisation dieser handelt. Beide Proteine kommen also nicht zu selben Zeit am selben Ort vor und markieren unterschiedliche Arten von Membrandomänen (Abbildung 3.16). Diese Tatsache bestätigt, dass es nicht nur unterschiedliche Arten von Membrandomänen in der pflanzlichen Plasmamembran geben muss, sondern auch, dass das *Arabidopsis*-Remorin1.4 die spezifischen Membranbereiche markiert, in denen die NADPH-Oxidase AtrbohD exprimiert wird und somit ein weiterer Marker für Membrandomänen und zwar für andere

Membrandomänen, als die die sich durch die Expression von AtRem1.2 und AtRem1.3 auszeichnen, etabliert werden konnte.



**Abbildung 3.15: Lokalisation der *Arabidopsis*-Remorine mit AtrbohD**

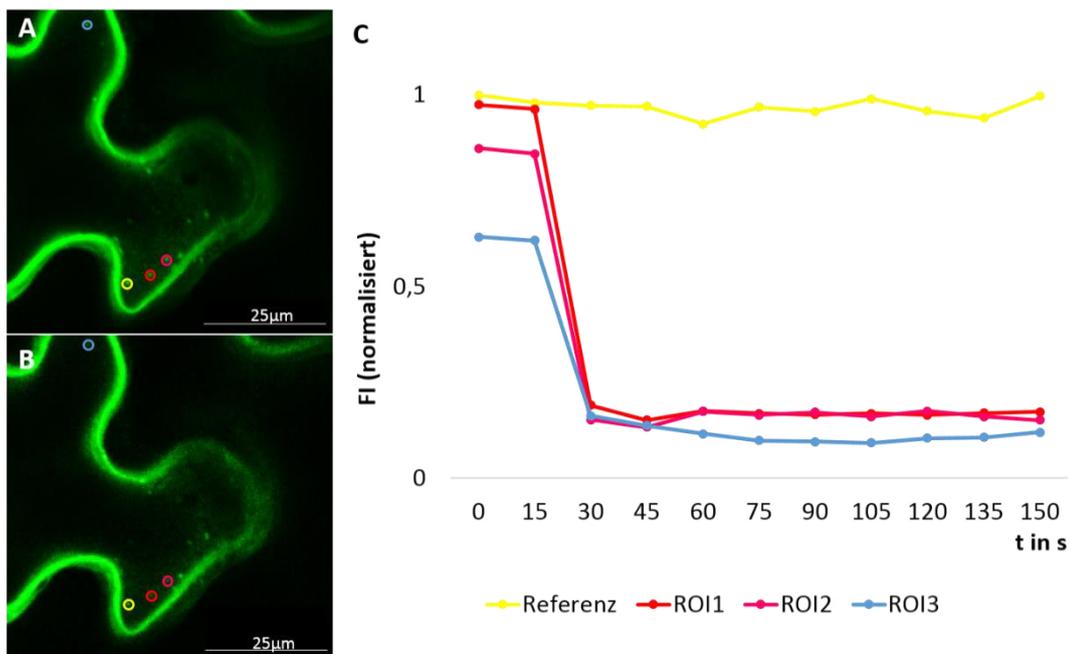
Die Remorine wurden N-terminal mit GFP fusioniert und zusammen mit der C-terminal mit mCherry fusionierten Oxidase AtrbohD transient in Epidermiszellen von *Nicotiana benthamiana* überexprimiert. A: Die statistische Auswertung ( $n=5$ ,  $\pm$  MSE) der Korrelationskoeffizienten (CC) nach Pearson ( $=0,54$ ) und Spearman ( $=0,209$ ) ergibt eine Tendenz zur Kolo-kalisation von AtrbohD mit AtRem1.4 (markiert mit roter Ellipse). Die Koexpression mit den anderen Remorinen ergab sonst keine Kolo-kalisation. Zum Vergleich wurden die zuvor (Abbildung 3.11) ermittelten Korrelationskoeffizienten der Koexpression von AtrbohD mit AtRem1.3, welche keine Kolo-kalisation aufzeigt und die positive Kolo-kalisation zwischen AtRem1.3 und AtrbohF (markiert mit rotem Kästchen) herangezogen. B: Die Expression von mCherry::AtrbohD erfolgt nur in Membrandomänen, in denen auch GFP::AtRem1.4 lokalisiert ist (markiert mit rotem Kästchen).



**Abbildung 3.16: Koexpression von AtRem1.3 und AtRem1.4 in Epidermiszellen von *Nicotiana benthamiana***

Der Korrelationskoeffizient von GFP::AtRem1.3 und mCherry::AtRem1.4 nach Pearson beträgt  $0,11852 \pm 0,02824$  ( $n=7$ ,  $\pm$  MSE) und deutet damit auf eine Separierung der beiden Fluoreszenz-signale hin.

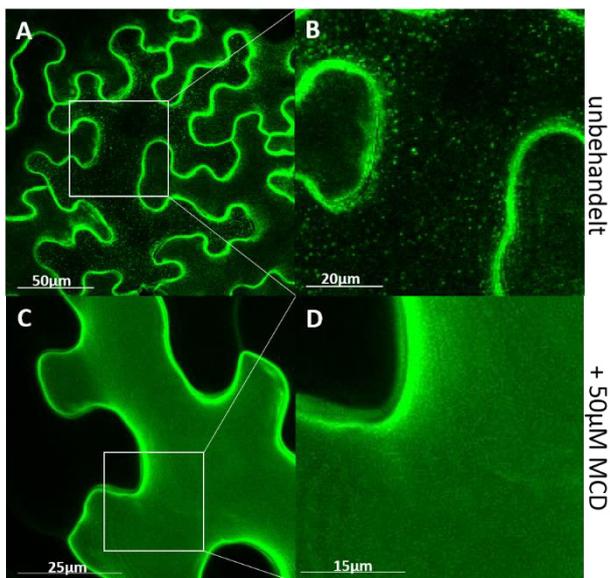
Das *Arabidopsis*-Remorin AtRem1.4 kann somit als ein Marker für eine andere Art von Membrandomänen, als jene, die das AtRem1.3 markiert, angesehen werden. Dazu muss aber verifiziert werden, dass es ebenfalls, wie AtRem1.3, echte pflanzliche Membrandomänen und nicht etwa Makrodomänen oder Aggregate markiert. Es konnte gezeigt werden, dass Membrandomänen in der pflanzlichen Plasmamembran immobil, also weit weniger dynamisch sind (Demir *et al.*, 2013) als man es etwa im tierischen oder pilzlichen System bereits beobachten konnte (Edidin, 2001). Zur Untersuchung und Messung der Diffusionsgeschwindigkeit, also der lateralen Mobilität eines Proteins von Interesse, eignet sich unter anderem die fluoreszenzbasierte Methode des FRAP („Fluorescence Recovery After Photobleaching“, Edidin *et al.*, 1976; Axelrod *et al.* 1976; siehe 2.8.3, Seite 92). Hierbei wird der fluoreszente Marker, der zuvor auf translationaler Ebene (siehe 2.1, Seite 67) an das zu untersuchende Protein fusioniert wurde, durch einen kurzen, hochintensiven Laserimpuls gebleicht. Über einen längeren Zeitraum hinweg wird dann beobachtet, ob die Fluoreszenz und somit das markierte Protein wieder in den gebleichten Bereich zurückdiffundiert. Anhand der gemessenen Fluoreszenzintensitäten, korreliert über die Zeit, kann dann die Diffusionskonstante des entsprechenden Proteins definiert werden.



**Abbildung 3.17: Mobilitätsmessung der AtRem1.4-markierten Membrandomänen**

FRAP-Messungen in transient transfizierten *Nicotiana benthamiana*-Epidermiszellen zeigen nahezu keine Rückkehr der anfänglich hohen Fluoreszenz von GFP::AtRem1.4, nachdem Domänenbereiche, die dieses Protein exprimieren, 15 sec lang gebleicht wurden (ROI1-3). A: Epidermiszelle mit den gesetzten ROIs vor dem Bleichen. B: Epidermiszelle mit den gesetzten ROIs nach dem Bleichen. C: Die gemessenen FI wurden gegen die FI einer nichtgebleichten Referenzregion aufgetragen. Das Experiment wurde genau gleich und mit demselben Ergebnis für 21 verschiedene Zellen durchgeführt. Die definierten ROIs wurden immer annähernd gleich groß gewählt.

Die transiente Überexpression von GFP::*AtRem1.4* in *Nicotiana benthamiana* zeigt erneut ein starkes und klar punktiertes Überexpressionsmuster. Nachdem charakteristische und gleich große Regionen (ROI1-3), die die Membrandomänen darstellen könnten, 15 Sekunden lang auf eine minimale Fluoreszenzintensität gebleicht wurden, zeigte sich, dass es keine signifikante Rückkehr zu der hohen, anfänglichen Fluoreszenzintensität gibt (Abbildung 3.17). Dies bedeutet, dass die Membrandomänen, die von dem Remorin *AtRem1.4* markiert werden, ebenso immobil sind, wie die durch das *AtRem1.3* markierten. Es handelt sich also um echte, lateral immobile Membrandomänen in der pflanzlichen Plasmamembran. Um als potentieller Membrandomänenmarker etabliert werden zu können, muss auch *AtRem1.4* als, in seiner Membrandomänenlokalisierung von einer sterolreichen Umgebung abhängig, charakterisiert werden. Wie bereits in einem ähnlichen Experiment zuvor (Abbildung 3.13) wurden Tabakpflanzen transient mit dem fluoreszent markierten Remorin transfiziert. Erneut zeigte sich nicht nur eine eindeutige Lokalisierung des Proteins in distinkten Membrandomänen, diese wurden nach Behandlung der Zellen mit 50µM MCD aufgelöst, so dass die Lokalisierung des Proteins nun in homogener Form über die gesamte Zelloberfläche zu detektieren war (Abbildung 3.18).

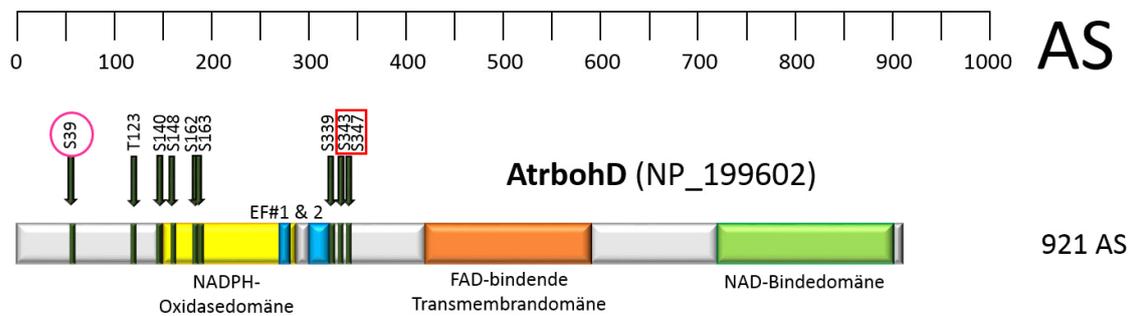


**Abbildung 3.18: Membrandomänenlokalisierung von *AtRem1.4***

Überexpression von GFP::*AtRem1.4* in Epidermiszellen von *Nicotiana benthamiana*. A & B: ohne MCD-Behandlung ist ein deutliches, punktiertes Expressionsmuster zu erkennen. C & D: nach Sterolreduktion mit 50µM MCD für 30 Min bei RT, erscheint das Fluoreszenzsignal homogen über die Plasmamembran verteilt. B & D sind jeweils vergrößerte Ausschnitte aus den Abbildungen A & C.

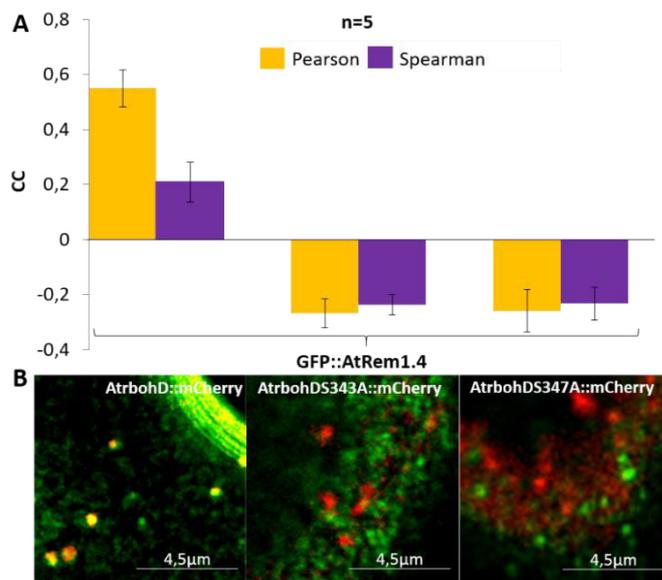
Für die NADPH-Oxidase *AtrbohD* sind bisher neun essentielle Phosphorylierungsstellen erkannt und beschrieben worden (Dubiella *et al.*, 2013; Kadota *et al.*, 2014). Zwei dieser Phosphorylierungsstellen, die Serinreste S343 und S347 (Abbildung 3.19, rot umrandet), sind schon länger bekannt und als stark induziert und in mehreren der 10 Oxidaseisoformen als konserviert beschrieben worden (Nühse *et al.*, 2004). Man weiß, dass diese beiden Phosphorylierungsstellen für die Aktivierung von *AtrbohD* essentiell sind, wenn auch eine alleinige Phosphorylierung nur einer dieser beiden Serinreste nicht ausreicht, um die Oxidase zu aktivieren (Nühse *et al.*, 2007). An dieser Stelle stellte sich die Frage, inwieweit die Phosphorylierung dieser beiden Aminosäuren die Membrandomänenlokalisierung von *AtrbohD* beeinflusst. Aus diesem Grund wurden die

beiden Phosphorylierungsstellen von einem Serinrest zu einem Alaninrest mutiert (S343A und S347A) und somit als solche ausgeschaltet. Interessant ist, dass die Kollokalisierung von AtrbohD und AtRem1.4 keinen Bestand mehr hat, wenn diese zwei Phosphorylierungsstellen auf der Proteinsequenz von AtrbohD mutiert werden. Dennoch zeigt die Expression der fluoreszent markierten AtrbohD unabhängig von den Mutationen in ihrer Proteinsequenz, nach wie vor ein punktiertes Expressionsmuster und damit einhergehend eine Lokalisierung in Membrandomänen (Abbildung 3.20 B).



### Abbildung 3.19: Proteinstruktur von AtrbohD

AtrbohD besitzt drei funktionelle Domänen (in gelb, orange und grün) und zwei C-terminale EF-Hand-Motive (in blau). Sechs Phosphorylierungsstellen (als dunkelgrüne Pfeile) sind bisher bekannt, davon wurden die zwei Serinreste S343 und S347 als essentiell für die Aktivierung von AtrbohD identifiziert (mit rotem Kästchen umrandet).



### Abbildung 3.20: Lokalisation von AtRem1.4 mit den Phosphorylierungsmutanten von AtrbohD

A: Die statistische Auswertung der Korrelationskoeffizienten (CC) nach Pearson und Spearman ergibt keine Kollokalisierung von GFP::AtRem1.4 mit den beiden N-terminal mit mCherry markierten Phosphorylierungsmutanten S343A und S347A von AtrbohD. B: Die Phosphorylierungsmutanten S343A und S347A, werden wie die unveränderte AtrbohD in Membrandomänen exprimiert, aber nicht mehr in denselben wie das AtRem1.4 ( $n=5, \pm$  MSE).

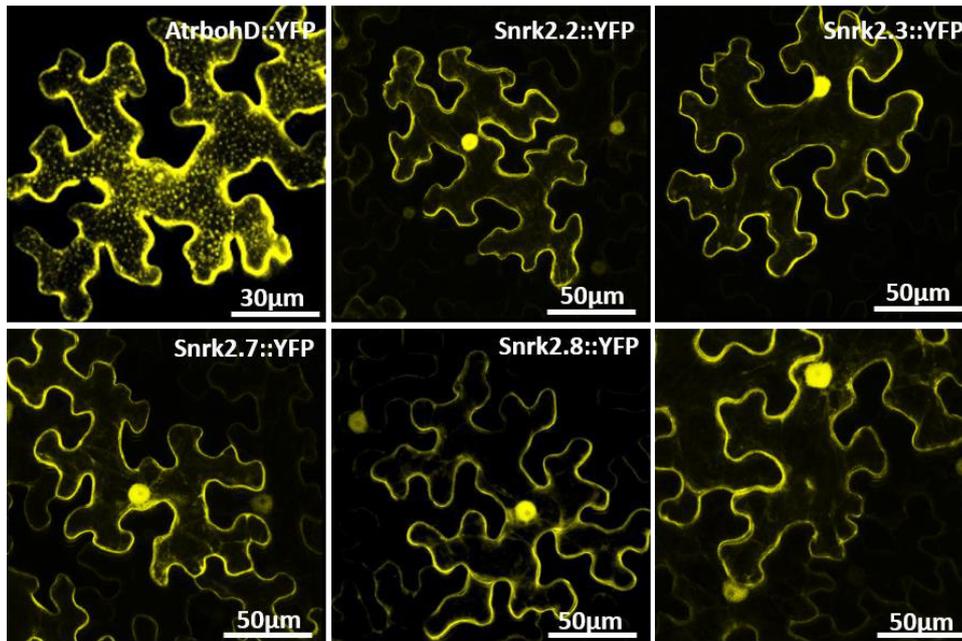
Die Kollokalisierungsanalysen und die statistische Auswertung der Korrelationskoeffizienten nach Pearson und Spearman ergibt, eine nicht-korrelierte und zufällige Verteilung der beiden Expressionsmuster und somit dass die fluoreszent mit mCherry markierte NADPH-Oxidase AtrbohD, wenn die beiden Serinreste S343 und S347 mutiert sind, nicht mehr mit dem N-terminal mit GFP markierten AtRem1.4 kollokalisiert ist (Abbildung 3.19 A). Dies würde bedeuten, dass eine Veränderung der Proteinsequenz,

oder des Phosphorylierungsstatus der Oxidase zu einer veränderten Lokalisierung derselben führt. Ob dies auch eine Veränderung der Funktion und Regulierung der NADPH-Oxidase AtrbohD mit sich bringt, konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht geklärt werden und ist somit Inhalt für weiterführende, zukünftige Untersuchungen.

### 3.2.2 Identifizierung eines Interaktionspartners für die Oxidase AtrbohD

In *Arabidopsis thaliana* gibt es 10 Gene, die für Mitglieder der Snrk2-Familie kodieren (Yoshida *et al.*, 2002 und Hrabak *et al.*, 2003). Diese können in die drei Untergruppen I-III eingeteilt werden (Kobayashi *et al.*, 2004). Die meisten der Snrk2-Kinasen können durch eine hohe Osmolarität aktiviert werden und fünf Mitglieder durch das Phytohormon ABA (Boudsocq *et al.*, 2004). Vor allem drei Mitglieder der Untergruppe III, die Kinasen Snrk2.2 (At3g50500), Snrk2.3 (At5g66880) und OST1 werden sehr stark durch ABA reguliert (Mustilli *et al.*, 2002 und Fuji *et al.*, 2007). Die Kinase Snrk2.8 (At1g78290), ein Mitglied der Untergruppe II, wird stark durch Trockenstress reguliert und hat Einfluss auf bestimmte metabolische Prozesse in Pflanzen (Shin *et al.*, 2007). Ein weiteres Mitglied der Untergruppe II, die Kinase Snrk2.7 (At4g40010) wird ebenfalls durch Trockenstress aktiviert und weniger durch ABA, ähnlich wie Snrk2.8 (Boudsocq *et al.*, 2004 und Yoshida *et al.*, 2006). Alle oben genannten Snrk2-Kinasen werden in Wurzeln, in Blüten, in der Sprossachse und in den Blättern und da, genau wie AtrbohD, vor allem im Mesophyll exprimiert. OST1 und Snrk2.3 sind in Schließzellen höher exprimiert als im Mesophyll (quantitative Expressionsanalyse ausgewertet mit <http://www.bar.utoronto.ca>). Die transiente Überexpression dieser fünf ausgewählten Snrk2-Kinasen, C-terminal fusioniert mit YFP („Yellow Fluorescent Protein“) in *Nicotiana benthamiana* (siehe 2.7, Seite 86; Abbildung 3.21) zeigt eine klare membranspezifische Lokalisierung, jedoch ist keine Domänenlokalisierung zu erkennen. Dies entspricht den bereits publizierten Daten (Nakashima *et al.*, 2009).

Die heterologe Expression verschiedener Proteine in Oozyten der Froschart *Xenopus laevis* ist recht einfach, denn diese Zellen sind leicht zugänglich, sie sind mit einer Größe von 1 bis 1,3mm recht groß und somit leicht zu manipulieren und bestimmte Versuche können so an nur einer einzigen Zelle zur selben Zeit durchgeführt werden. Aus diesen Gründen eignet sich dieses Expressionssystem besonders gut um mit Hilfe der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC; siehe 3.1 und 2.8.2.1, Seite 89) schnell erste Interaktionsexperimente durchzuführen und so einen ersten Eindruck davon zu bekommen, ob die gewählten potenziellen Interaktionspartner tatsächlich für weitere, vertiefende Analysen in Frage kommen.



**Abbildung 3.21: Membranlokalisierung von AtrbohD und der Snrk2-Kinasen**

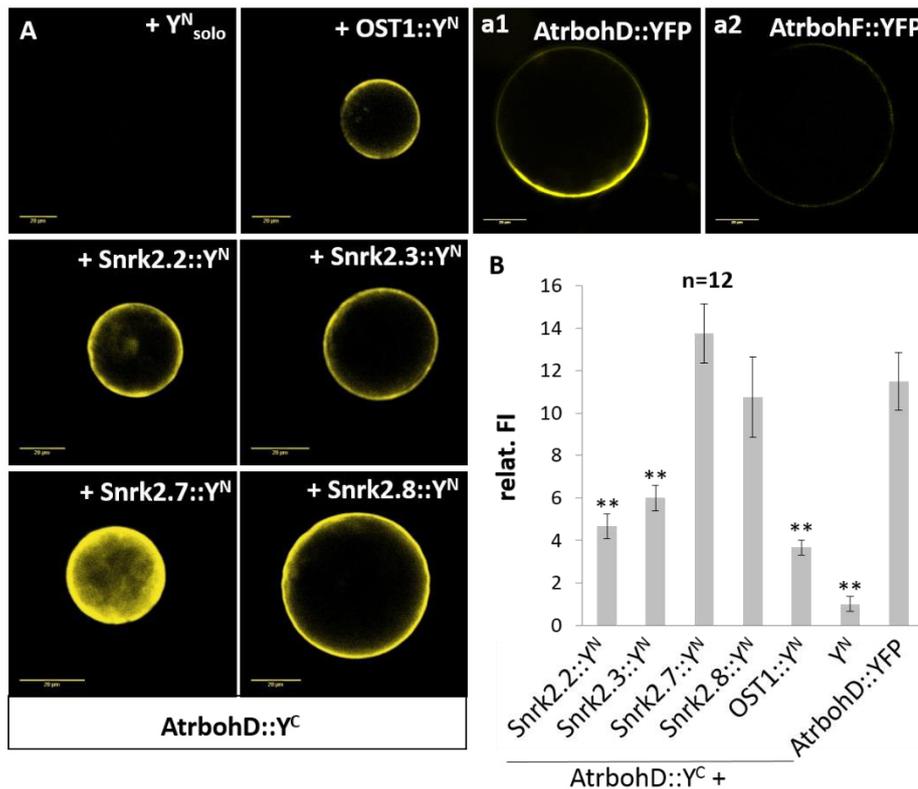
Die fünf Snrk2-Kinasen Snrk2.2, Snrk2.3, Snrk2.7, Snrk2.8 und OST1 und die Oxidase AtrbohD wurden als C-terminale YFP-Fusionskonstrukte in *Nicotiana benthamiana* überexprimiert. Alle sechs Konstrukte sind eindeutig in der Plasmamembran, aber die Snrk2-Kinasen im Vergleich zur Oxidase AtrbohD, nicht in Membrandomänen lokalisiert.

Im direkten Vergleich mit der bereits publizierten Interaktion zwischen AtrbohF und OST1 (Sirichandra *et al.*, 2009), ist erkennbar, dass die Oxidase AtrbohD (C-terminal fusioniert mit der C-terminalen Hälfte von YFP) mit der Kinase OST1 (C-terminal fusioniert mit der N-terminalen Hälfte von YFP) zu interagieren scheint, da sich für diese Koexpression ein relativ starkes, aus einer Komplementation des Fluorophors, resultierendes Fluoreszenzsignal beobachten lässt (Abbildung 3.22). Ein vergleichbar starkes YFP-Fluoreszenzsignal gibt es resultierend aus einer Interaktion zwischen AtrbohD und Snrk2.7. Ein schwächeres Fluoreszenzsignal zeigt die Interaktion zwischen AtrbohD und Snrk2.3. Dieses letztere Signal ist von seiner Intensität her vergleichbar mit den Signalen, die detektiert werden können für die Interaktion zwischen AtrbohF und Snrk2.2, Snrk2.7 und Snrk2.8. Dennoch ist das Fluoreszenzsignal der Koexpression von AtrbohF und Snrk2.2 ähnlich stark wie die Positivkontrolle und könnte somit auch auf eine Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen hinweisen. Im Allgemeinen zeigt AtrbohF, fusioniert mit einem vollständigen YFP, eine eher geringe Expression, deutlich ersichtlich im Vergleich mit der höheren Expression des AtrbohD-YFP-Fusionskonstruktes. Dennoch konnte mit Hilfe der BiFC-Methode, durchgeführt in *Xenopus laevis*-Oozyten, ein erster Eindruck davon gewonnen werden, dass sich mit Snrk2.7 unter den fünf gewählten Snrk2-Kinasen ein potenzieller Interaktionspartner für AtrbohD finden lassen könnte.



gesteuerten Anzuchteinheiten (siehe 2.2, Seite 79) vernachlässigbar. Auch sollten die zuvor beobachteten Interaktionsereignisse vor dem Hintergrund des passenden Membranumfeldes im pflanzlichen System analysiert und verifiziert werden. Nach Isolation und Transfektion von *Arabidopsis thaliana*-Protoplasten (siehe 2.3, Seite 79) mit ähnlichen BiFC-Konstrukten wie zuvor im Oozytensystem, bestätigte sich zunächst die membranständige Expression von AtrbohD, die zum Zwecke der Expressionskontrolle einzeln exprimiert und mit einem kompletten YFP fusioniert war (Abbildung 3.23 a1). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass kein Fluoreszenzsignal nach Koexpression von AtrbohD fusioniert mit dem C-Terminus von YFP und dem N-Terminus von YFP detektierbar war. Deswegen kann man davon ausgehen, dass keine falsch positiven Signale mit in die Messung einfließen und die Ergebnisse beeinflussen. Das stärkste Fluoreszenzsignal, also eine hohe relative Fluoreszenzintensität (relat. FI), liefert ganz klar die Interaktion zwischen AtrbohD und Snrk2.7. Die Interaktion mit der Kinase Snrk2.8 ist unter den vorliegenden Bedingungen hingegen etwas, aber nicht signifikant schwächer. In diesem experimentellen System ist, im Vergleich zu demselben Versuch im Oozytensystem, keine deutliche Interaktion zwischen AtrbohD und OST1 erkennbar. Die relativen Fluoreszenzintensitäten, die sich aus der Koexpression der Oxidase AtrbohD mit Snrk2.2, Snrk2.3 und OST1 ergeben, sind signifikant schwächer als das Fluoreszenzsignal der Oxidase, die mit einem kompletten YFP fusioniert wurde und somit als Richtwert für ein als Resultat einer Komplementation anzusehendes Fluoreszenzsignal gilt (Abbildung 3.23 B). Die C-terminal fusionierte Oxidase AtrbohF (Abbildung 3.23 a2) zeigte in diesem Expressionssystem keine deutliche Expression, weshalb auch keine Daten zu den durchgeführten Interaktionsanalysen gewonnen werden konnten.

Durch transiente Überexpression der beiden NADPH-Oxidasen und verschiedener Snrk2-Kinasen als Split-YFP-Fusionskonstrukte in Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* und in *Arabidopsis*-Protoplasten, konnte bis zu diesem Punkt der Analysen unter Nutzung der BiFC-Methode, die Kinase Snrk2.7 als wahrscheinlichster potentieller Interaktionspartner für die Oxidase AtrbohD identifiziert werden. Dabei scheint es nicht entscheidend zu sein, ob AtrbohD N- oder C-terminal mit einem Fluorophor, oder eben einer Fluorophorhälfte fusioniert wird. Die Oxidase AtrbohF dagegen wird nicht, oder für Fluoreszenz-basierte Messmethoden nicht ausreichend stark exprimiert, wenn sie C-terminal mit einem fluoreszenten Markerprotein gekoppelt wird.



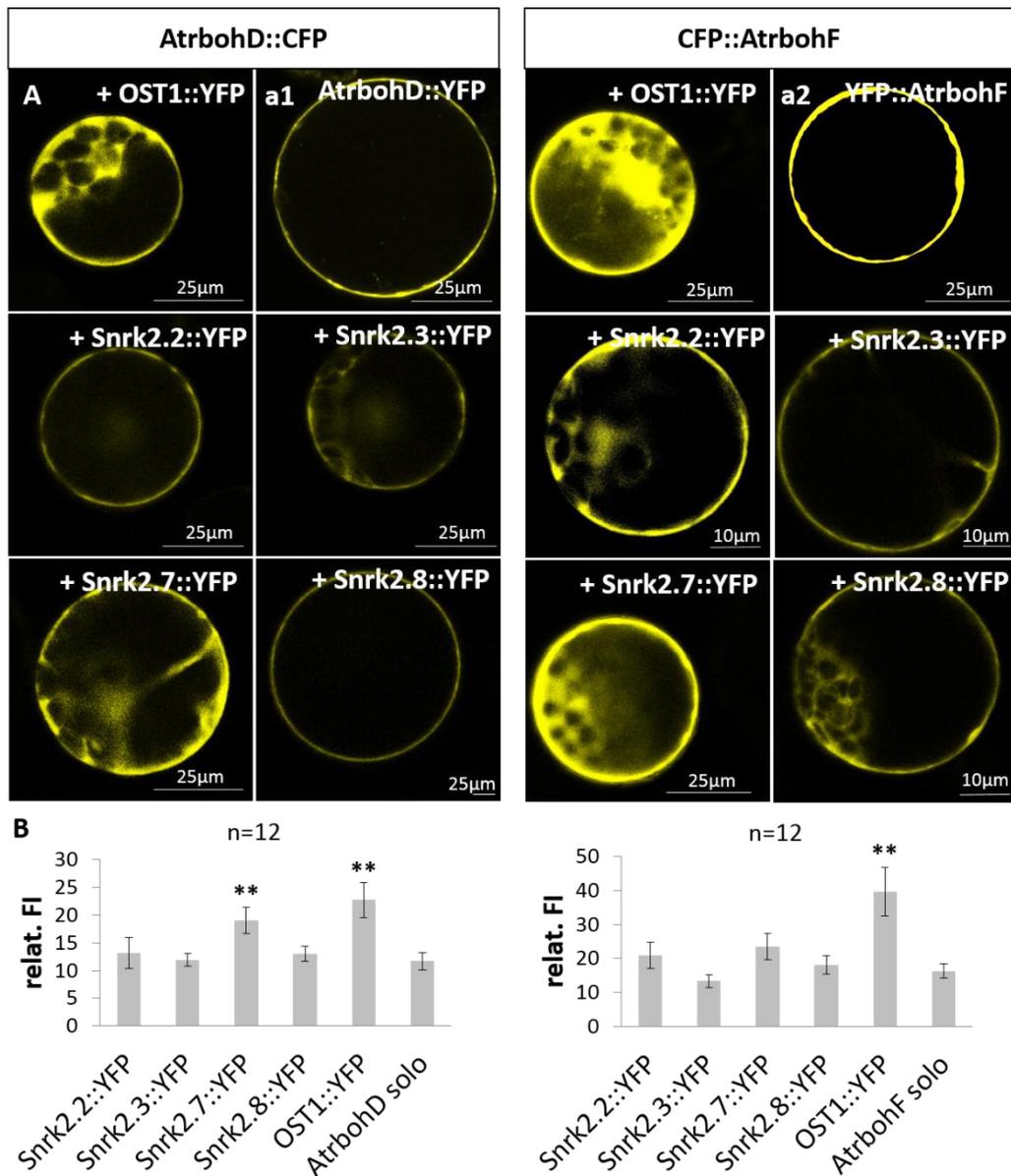
**Abbildung 3.23: Interaktionsanalysen mittels BiFC in *A. thaliana*-Protoplasten**

Beide Oxidasen AtrbohD und AtrbohF wurden C-terminal mit dem C-Terminus von YFP fusioniert und mit den fünf ausgewählten Snrk2-Kinasen koexprimiert, welche wiederum jeweils C-terminal mit dem N-Terminus von YFP fusioniert waren. Die Koexpression von AtrbohD::Y<sup>C</sup> mit dem einzelnen N-Terminus von YFP diente als Negativkontrolle. Die Überexpression der mit einem vollständigen YFP C-terminal fusionierten Oxidasen (a1 und a2) diente als Expressionskontrolle. AtrbohF::YFP (a2) und das entsprechende Split-YFP-Fusionskonstrukt AtrbohF::Y<sup>C</sup> wird im Protoplastensystem nicht ausreichend stark exprimiert, weshalb für AtrbohF keine BiFC-Analysen in diesem Expressionssystem durchgeführt werden konnten. Die Signale von AtrbohD::Y<sup>C</sup> und Snrk2.2::Y<sup>N</sup>, Snrk2.3::Y<sup>N</sup> und OST1::Y<sup>N</sup> zeigen signifikant niedrigere relative Fluoreszenzintensitäten (relat. FI) als Zellen, die AtrbohD fusioniert mit einem kompletten YFP exprimierten (a1). Eine Interaktion ist, angezeigt durch eine hohe relat. FI, zwischen AtrbohD und Snrk2.7 ersichtlich. Auch die Koexpression von AtrbohD mit Snrk2.8 als BiFC-Fusionskonstrukte, führt zu einem hohen Fluoreszenzsignal. A: konfokale Aufnahmen der Protoplasten mit den aus einer Komplementation resultierenden YFP-Fluoreszenzsignalen, B: statistische Auswertung der gemessenen relat. FI (n= 12, ± MSE). Statistisch signifikante Unterschiede (p < 0,05) sind mit zwei Sternen gekennzeichnet.

Auch das BiFC-System hat Vor- und Nachteile. Es können einerseits schnell erste Interaktionsanalysen durchgeführt werden, aber wie bereits weiter oben ausführlich erwähnt, ist das Ausmaß der Komplementation maßgeblich abhängig von der Interaktion der beiden zu untersuchenden Proteine und somit einem physischen Kontakt der komplementären Fluorophorfragmente. Dieser gebildete Fluorophorkomplex ist stabil und es lassen sich keine Aussagen über die Dynamik der molekularen Interaktion treffen.

Weiterhin kann es durch die Affinität der beiden Proteinhälften zueinander, zu falsch als positiv bewerteten Ergebnissen kommen. Zusätzlich zu BiFC-Messungen sollten deshalb immer weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden, um die erhaltenen Daten mit Hilfe weiterer passender Methoden verifizieren zu können. Eine dieser weiteren passenden Methoden ist der bereits ausführlich beschriebene „Förster-Resonanzenergietransfer“, kurz FRET (Förster, 1948; siehe 3.1 und 2.8.2.2, Seite 89). Für die Durchführung eines SE-FRET, wurden die beiden homologen Oxidasen mit dem modifizierten, vom cyan-fluoreszierenden Protein (CFP) abstammenden Donormolekül mTurquoise fusioniert (siehe III.13 und III.14, Seite 239 und 240). Im Gegensatz zu den vorherigen Experimenten, die zeigten, dass AtrbohF, wenn C-terminal markiert, weniger effizient exprimiert wird, wurde die Oxidase diesmal N-terminal mit dem Fluorophor fusioniert. Die Snrk2-Kinasen wurden mit dem ebenfalls modifizierten, vom gelb-fluoreszierenden Protein (YFP) abstammenden Akzeptormolekül mVenus fusioniert (siehe Abbildung III.15, Seite 241).

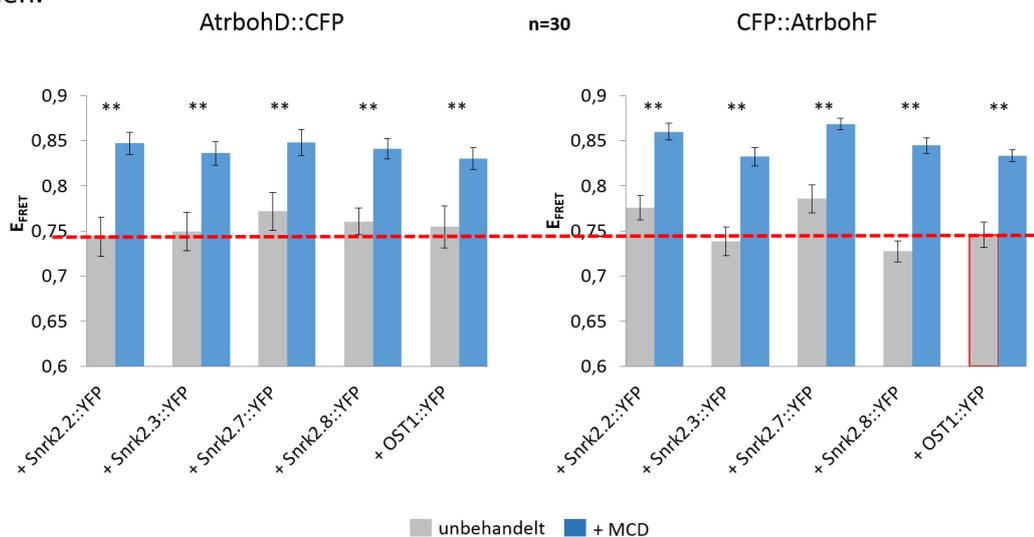
Die Überexpression der FRET-Paare erfolgte in dem einfach zu manipulierenden pflanzlichen Protoplastensystem (siehe 2.3, Seite 79). Nachdem auch hier sichergestellt war, dass keine Donoremission im Detektionsbereich der Akzeptoremission aufgezeichnet wurde, wurde die relat. FI des Akzeptors mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (siehe 2.8, Seite 87) und anhand einer repräsentativen Anzahl von Zellen gemessen und statistisch ausgewertet (Abbildung 3.2). Die Auswertung erfolgte durch den direkten Vergleich des, auf einer Energieübertragung von Donor auf Akzeptor beruhenden Anstieges der Akzeptor-Fluoreszenzintensitäten mit der mit mVenus fusionierten und eigenständig exprimierten Oxidase (Abbildung 3.24 a1 und a2), welche somit als Expressionskontrolle diente. AtrbohD scheint erneut vorwiegend mit der Kinase Snrk2.7 und OST1 zu interagieren, da die Werte der relat. FI für diese beiden beobachteten Interaktionen signifikant höher sind als die relat. FI von AtrbohD C-terminal markiert mit mVenus allein. Dieselben Messungen durchgeführt für die Oxidase AtrbohF, diesmal N-terminal mit dem Fluorophor fusioniert, zeigen eine signifikant höhere relat. FI für die Interaktionen mit den Kinasen Snrk2.2, ebenfalls mit Snrk2.7 und mit OST1 (Abbildung 3.24 B). Dieses letztere Ergebnis bestätigt die Funktionalität der Messung, da die publizierte Interaktion zwischen AtrbohF und OST1 eindeutig reproduziert werden konnte. Für AtrbohD konnte zudem einmal mehr die Kinase Snrk2.7 als Interaktionspartner bestätigt werden.



**Abbildung 3.24: Interaktionsanalysen mittels SE-FRET in *A. thaliana*-Protoplasten**

Die Oxidasen AtrbohD und AtrbohF wurden C- bzw. N-terminal mit dem Donormolekül mTurquoise (CFP) fusioniert. Die Snrk2-Kinasen, wurden jeweils C-terminal mit dem Akzeptormolekül mVenus (YFP) fusioniert und zusammen mit den Oxidasen in *Arabidopsis*-Protoplasten koexprimiert. Die Einzelsexpression (a1 und a2) der mit YFP fusionierten Oxidasen diente als Expressionskontrolle und zur Gewinnung von Vergleichswerten für die statistische Auswertung. Für AtrbohD ist erneut eine Interaktion mit Snrk2.7 und OST1 zu beobachten. AtrbohF interagiert mit Snrk2.2, Snrk2.7 und wie bereits beschrieben mit OST1. A: konfokale Aufnahmen der Protoplasten mit den aus einer Interaktion resultierenden YFP-Fluoreszenzsignalen, B: statistische Auswertung der gemessenen relat. FI (n=12, ± MSE). Statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) sind mit zwei Sternen gekennzeichnet.

Zur Verifizierung der bisher gemessenen Daten und Expressionssysteme und um wesentlich aussagekräftigere Messergebnisse zu erhalten, wurde weiterhin die Methode des bereits ausführlich erläuterten „Acceptorbleaching“-Förster-Resonanzenergietransfer, kurz AB-FRET (siehe 2.8.2.3, Seite 91) durchgeführt. Da die Interaktion von anderen Proteinen als bei dem letzten durchgeführten AB-FRET (Abbildung 3.5) untersucht werden sollte, war hier eine erneute Verifizierung des Systems mit Hilfe der verschiedenen Positiv- und Negativkontrollen notwendig. Weiterhin fanden die zuvor festgelegten unteren und oberen Messwerte, gemessen anhand von Donor-Akzeptorfluorophor-Chimären mit definierten, kurzen oder langen Aminosäureketten zwischen den beiden Fluorophoren zur Definition eines maximalen Wertes für die Interaktion zwischen CFP und YFP Verwendung, um damit die generelle Funktionalität der Messung an sich bewerten zu können (siehe IV.1, Seite 249). Die bereits etablierte Interaktion zwischen AtrbohF und OST1 (rot umrahmter Balken in Abbildung 3.25; Sirichandra *et al.*, 2009) diente zur Definition eines unteren Grenzwertes, für welchen die gemessenen und im Folgenden aufgeführten FRET-Effizienzen ( $E_{\text{FRET}}$ , rote Linie in Abbildung 3.25) als positive Interaktionen angenommen und interpretiert werden können.



**Abbildung 3.25: Interaktionsanalysen mittels AB-FRET in *A. thaliana*-Protoplasten**

Die Oxidasen AtrbohD und AtrbohF wurden C- bzw. N-terminal mit dem Donormolekül mTurquoise (CFP) fusioniert. Die Snrk2-Kinasen, wurden jeweils C-terminal mit dem Akzeptormolekül mVenus (YFP) fusioniert und zusammen mit den Oxidasen in *Arabidopsis*-Protoplasten koexprimiert. Die eingezeichnete rote Linie beschreibt die untere Grenze, für welche die gemessenen  $E_{\text{FRET}}$ -Werte ausgehend von der beschriebenen positiven Interaktion zwischen AtrbohF und OST1 (rot umrahmter Balken) als positive Interaktion angenommen werden können. Die Oxidase AtrbohD interagiert erneut am stärksten mit OST1, Snrk2.7 und auch mit Snrk2.8. Anhand des festgelegten Wertes für eine positive Interaktion zeigt sich eine Interaktion zwischen AtrbohF mit Snrk2.2 und Snrk2.7 (graue Balken). Nach Behandlung der Protoplasten für 30 min mit 100  $\mu\text{M}$  MCD zeigten sich signifikant höhere  $E_{\text{FRET}}$ , die maximale Interaktionen zwischen allen Snrk2-Kinasen und den Oxidasen anzeigen (blaue Balken). Statistische Auswertung der gemessenen  $E_{\text{FRET}}$  ( $n=30$ ,  $\pm$  MSE). Statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) sind mit zwei Sternen gekennzeichnet.

Die Oxidasen wurden erneut wie zuvor mit dem Donorfluorophor mTurquoise (CFP) fusioniert und die Snrk2-Kinasen mit dem Akzeptorfluorophor mVenus (YFP). Die entsprechenden FRET-Paare wurden in *Arabidopsis*-Protoplasten koexprimiert. Anhand der, mit Hilfe der etablierten Interaktion zwischen AtrbohF und OST1 (Sirichandra *et al.*, 2009), definierten unteren Grenze, welche als Maß für eine positive Interaktion angesehen werden kann, zeigte sich erneut eine Interaktion zwischen AtrbohF und den Kinasen Snrk2.2 und Snrk2.7. Die Oxidase AtrbohD interagiert, gemessen an der unteren Grenze, mit allen fünf Snrk2-Kinasen. Am deutlichsten und am stärksten zeigen sich aber die Interaktionen zwischen AtrbohD und Snrk2.7, Snrk2.8 und OST1. Um zu untersuchen ob die Membrandomänenlokalisierung der Oxidasen einen Einfluss auf die gemessenen Interaktionen hat, wurden die transient transfizierten Zellen zur Sterolreduktion mit MCD behandelt. Nach der Behandlung mit 100µM MCD, zeigten sich signifikant erhöhte  $E_{\text{FRET}}$  und somit deutlich stärkere Interaktionen zwischen den Oxidasen und Kinasen in allen untersuchten Fällen. Dies bedeutet, dass nach Entfernung der sterolreichen Membranumgebung, von der die Oxidasen in ihrer Domänenlokalisierung abhängig sind, eine deutlich stärkere Interaktion dieser mit den von Beginn an nicht in Membrandomänen befindlichen Snrk2-Kinasen stattfinden kann.

Methode	AtrbohD					AtrbohF				
	OST1	Snrk2.2	Snrk2.3	Snrk2.7	Snrk2.8	OST1	Snrk2.2	Snrk2.3	Snrk2.7	Snrk2.8
in Oozyten	++	-	+	++	-	++	++	-	++	+
in Protoplasten	++	-	+	+++	+	Keine Expression				
SE-FRET	++	-	-	++	-	+++	+	-	++	-
AB-FRET	+	-	-	++	++	+	+++	-	+++	-
+ MCD	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Sehr starke Interaktion	+++	Starke Interaktion	++	Schwache Interaktion	+	Keine Interaktion	-
-------------------------	-----	--------------------	----	----------------------	---	-------------------	---

**Tabelle 3.2: Zusammenfassung der durchgeführten Interaktionsanalysen und der identifizierten potentiellen Interaktionspartner**

Anhand der zum Vergleich stehenden, beschriebenen Interaktion zwischen AtrbohF und OST1 werden insgesamt 6 positive Bewertungen (+) oder mehr als eine positive Interaktion definiert. Dabei werden die durchgängig als sehr stark bewerteten  $E_{\text{FRET}}$  nach MCD-Behandlung der Protoplasten nicht mit in die Gesamtbewertung einer positiven Interaktion mit einbezogen. Die als positiv bewerteten Interaktionspartner der beiden NADPH-Oxidasen sind mit einem roten Kästchen umrahmt.

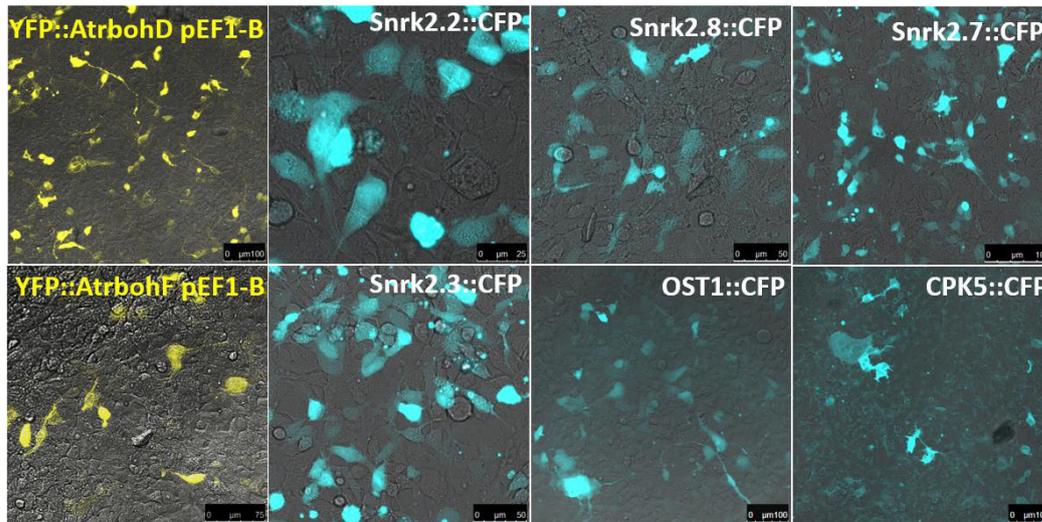
Für die Identifikation von Interaktionspartnern für ein oder mehr Proteine von Interesse eignen sich fluoreszenzbasierte Messmethoden wie die BiFC-Methode, der SE-FRET und der AB-FRET. Diese Methoden sind anderen, wie zum Beispiel einem Hefe-2-Hybridscreen dahingehend überlegen, dass sie im selben System, in dem die Proteine von Interesse im natürlichen Hintergrund exprimiert werden, durchgeführt werden können und dass sie verhältnismäßig einfach und schnell durchgeführt werden können. Nur sollte nie nur eine der oben genannten fluoreszenzbasierten Methoden zur Identifikation von Interaktionspartnern genutzt werden, sondern immer mehrere im Vergleich. Nach

Durchführung der BiFC-, der SE-FRET- und der AB-FRET-Methode ergaben sich bei vergleichender Betrachtung aller Ergebnisse (Tabelle 3.2) die Kinase OST1, welche schon als Regulator für die Oxidase AtrbohF beschrieben wurde und die Kinase Snrk2.7 als putative Interaktionspartner. Die Oxidase AtrbohF, deren Interaktion mit OST1 stets im direkten Vergleich zur Definition einer positiven Interaktion und zur qualitativen Bewertung der Messungen herangezogen wurde, zeigte zudem ebenfalls eine deutliche Interaktion mit den Kinasen Snrk2.7 und Snrk2.2. Die in Signalwegen zur Reaktion auf Trockenstress beteiligte Kinase Snrk2.7 scheint folglich mit beiden untersuchten, vermutlich an unterschiedlichen Stressreaktionen beteiligten NADPH-Oxidasen zu interagieren. Die bloße Interaktion zweier Proteine miteinander bedeutet aber nicht gleich, dass sich daraus auch eine physiologische Relevanz zur Steuerung der Proteinaktivität, oder der Proteinfunktion ergibt. Um eine fundierte Aussage darüber machen zu können, muss man die funktionelle Regulierung des Proteins von Interesse genauer betrachten und die daran teilhabende Funktion des zuvor identifizierten, potenziellen Interaktionspartners.

### 3.2.3 Funktionelle Analyse der AtrbohD-Snrk-Interaktion

Menschliche embryonale Nierenzellen („Human Embryonic Kidney“-Zellen, HEK-Zellen) sind bedingt als Modelorganismus geeignet, da ihnen durch Manipulation mit Fremd-DNA künstlich die Charakteristika von Krebszellen gegeben wurden (siehe 2.5, Seite 82). Sie sind aber sehr einfach zu kultivieren und zu transfizieren und so lange das Verhalten der Proteine in der Zelle und nicht das Verhalten der Zelle selbst im Vordergrund steht, sind diese Zellen als Studienobjekte sehr gut geeignet. HEK-Zellen exprimieren selbst keine endogenen NADPH-Oxidasen und zeigen somit keine eigene  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige ROS-Produktion. Aus diesen Gründen fand das HEK-Zellsystem Verwendung, um die zuvor identifizierte Interaktion zwischen der Oxidase AtrbohD und der Kinase Snrk2.7 funktionell zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurden die Oxidasen, welche oftmals zuvor im Pflanzensystem nicht sehr stark und nicht sehr stabil exprimiert wurden, in den speziellen Expressionsvektor pEF1, generiert aus dem Säugerepressionsvektor pcDNA3.1, eingebaut und diesmal beide N-terminal mit mVenus (YFP) fusioniert. Diese Konstrukte ermöglichten nun eine gleichbleibend höhere und stabilere Expressionsrate der beiden NADPH-Oxidasen in den Säugerzellen. Durch die Kopplung mit dem stark fluoreszierenden und leichter zu detektierenden Fluorophor mVenus lassen sich die anschließend heterolog in HEK-Zellen überexprimierten Oxidasen leichter beobachten und nachweisen. Die Snrk2-Kinasen wurden C-terminal mit dem Fluorophor mTurquoise (CFP) markiert (Abbildung 3.26). So war es auch möglich weiterführende FRET-basierte Messungen im HEK-Zellsystem durchzuführen. Mittlerweile weiß man auch um eine weitere publizierte und funktionell relevante Oxidase-Kinase-Interaktion. Die Calcium-abhängige Kinase CPK5 wird im Zuge einer Antwort auf Pathogenbefall aktiviert und vermittelt die Apoptose betroffener Pflanzenzellen durch die Aktivierung der Synthese

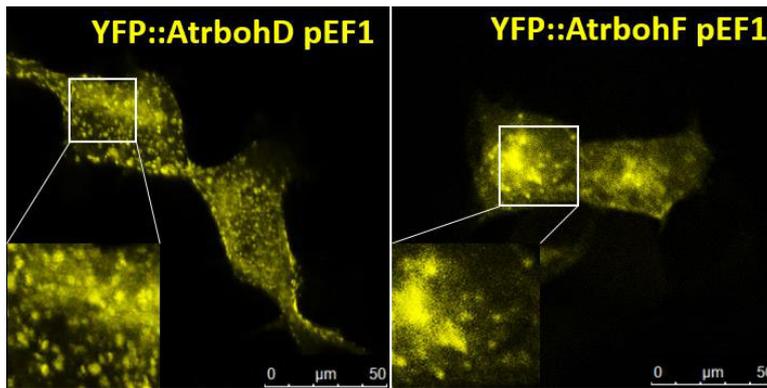
von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Ein direktes Phosphorylierungsziel der CPK5 (At4g35310) ist die NADPH-Oxidase AtrbohD. Dabei werden vor allem die Serinreste S39 und S148 phosphoryliert. Es konnte aber gezeigt werden, dass primär auch andere Kinasen, abgesehen von CPK5, in der Lage sein können die AtrbohD auch an anderen Serinresten, zu phosphorylieren und somit zu aktivieren (Dubiella *et al.*, 2013). Mit diesem interagierenden Proteinpaar kann für die folgenden Versuche eine weitere Positivkontrolle, spezifisch für die zu untersuchende AtrbohD eingesetzt werden. Das bedeutet, dass nicht länger die Interaktion zwischen der verwandten Oxidase AtrbohF und OST als einzige, für Vergleichszwecke zur Verfügung stehende Positivkontrolle genutzt werden muss und der Fokus im Folgenden ganz klar auf AtrbohD liegen wird.



**Abbildung 3.26: Überexpression der Oxidasen und der Kinasen in HEK-Zellen**

Die beiden NADPH-Oxidasen AtrbohD und AtrbohF wurden N-terminal mit mVenus (YFP) und die Kinasen Snrk2.2, Snrk2.3, Snrk2.7, Snrk2.8, OST1 und CPK5 wurden C-terminal mit mTurquoise (CFP) markiert und heterolog in HEK-Zellen überexprimiert. Dabei zeigt sich auch, dass AtrbohF generell schwächer und weniger effizient exprimiert wird, als AtrbohD.

Die Kinase CPK5 wird, wie die anderen Kinasen auch, stark und mit hoher Effizienz exprimiert. Auch die Oxidasen werden im HEK-Zellsystem stärker exprimiert als im pflanzlichen Expressionssystem, wobei auch hier AtrbohF weniger stark exprimiert wird als AtrbohD. Die Expressionssignale der beiden fluoreszent markierten Oxidasen AtrbohD und AtrbohF zeigen ein punktiertes Muster, ein „patchy Pattern“, was auch im HEK-Zellsystem eine Lokalisierung dieser Proteine in Membrandomänen anzeigt (Abbildung 3.27). Die beiden N-terminal mit YFP markierten Oxidasekonstrukte zeigten in Koexpressionsansätzen eine deutlich geringere Expressionsrate als die C-terminal mit CFP fusionierten Kinasen. Verschiedene Koexpressionsansätze mit verschiedenen kombinierten DNA-Konzentrationen ergaben letztendlich, dass eine 100:25-Kombination von Oxidase- zu Kinase-DNA notwendig ist, um eine gleichmäßig starke transiente Expression der jeweils koexprimierten Konstrukte zu gewährleisten (siehe IV.3, Seite 252).

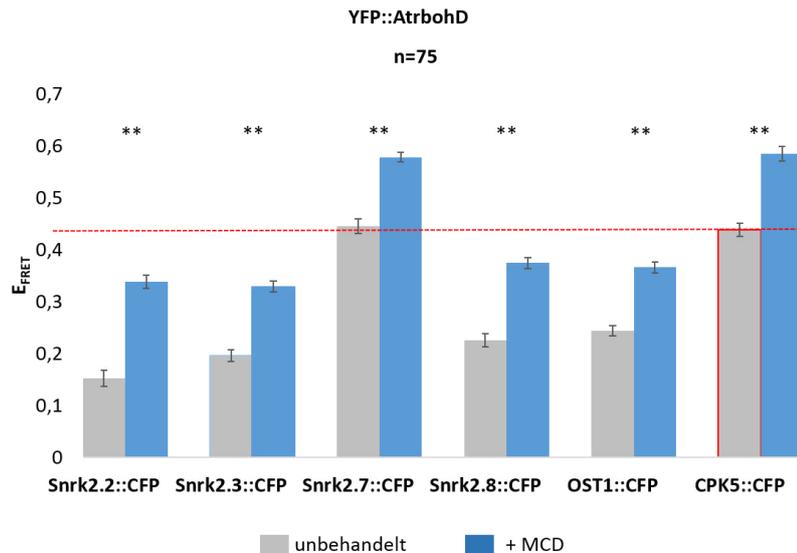


**Abbildung 3.27: Domänenlokalisierung von AtrbohD und AtrbohF in HEK-Zellen**

Beide N-terminal mit YFP markierten und heterolog in HEK-Zellen exprimierten Oxidasen zeigen ein punktiertes Expressionsmuster.

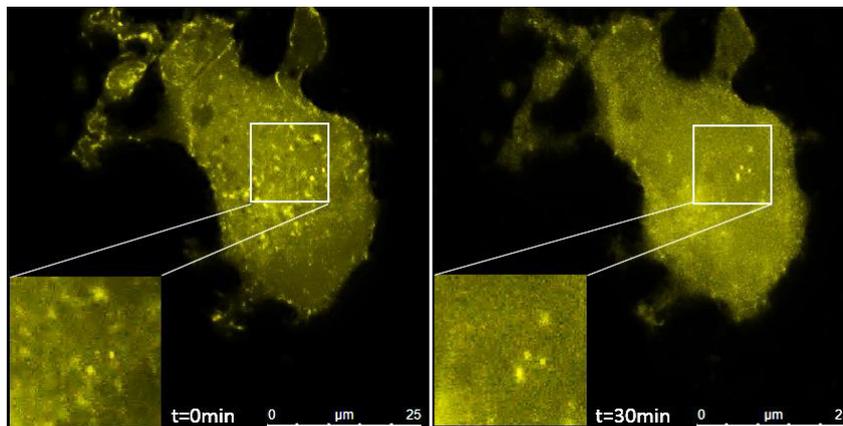
Auch in dem gewählten HEK-Zellsystem, welches vor allem zur funktionellen Charakterisierung der zuvor beobachteten Oxidase-Snrk2-Kinase-Interaktion genutzt werden sollte, wurden erneut Interaktionsmessungen mittels SE-FRET (siehe IV.3, Seite 252) und AB-FRET durchgeführt. Dies diente zuallererst der Verifizierung der Eignung des gewählten HEK-Expressionssystems. Die Interaktion zwischen AtrbohD und der Kinase CPK5 (rot umrandeter Balken in Abbildung 3.28), statt der Kinase OST1 dient nun als Positivkontrolle und zur Definition eines unteren Grenzwertes, welcher den Mindestwert angibt, ab dem eine gemessene FRET-Effizienz eine positive Interaktion bezeichnet (rote Linie in Abbildung 3.28). Bei der Kotransfektion von AtrbohD und Snrk2.7 in HEK-Zellen, kann mit Blick auf den definierten unteren Grenzwert eine Interaktion angenommen werden. Die Kinase OST1 zeigt in diesem Fall keine Interaktion mit der Oxidase AtrbohD, genauso wenig wie die anderen drei koexprimierten Kinasen Snrk2.2, Snrk2.3 und Snrk2.8. Die  $E_{\text{FRET}}$  sind generell geringer als die Werte, die im Protoplastensystem gemessen wurden. Das liegt an der Definition unterschiedlicher Messbereiche. Die Protoplasten konnten aufgrund ihrer sehr klaren, runden Zellform als Ganzes innerhalb eines ROIs markiert werden. HEK-Zellen haben keine klare und einfache Form und liegen nicht vereinzelt, sondern sehr nahe beieinander vor. Deshalb wurden immer 10 kleinere ROIs in den peripheren Membranbereichen der Zellen zur Bestimmung der  $E_{\text{FRET}}$  festgelegt. Die Ergebnisse für diese einzelnen ROIs einer Zelle wurden dann zu einem Wert, der zur Angabe der Interaktionseffizienz in dieser spezifischen Zelle diente, statistisch verrechnet. Bezüglich der Wirkung von MCD auf die Integrität der Domänenstruktur der Plasmamembran in HEK-Zellen zeigte sich, dass eine Inkubation der HEK-Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  MCD für 30 min ausreicht, um die Mikrodomänenstrukturen, welche zuvor zu beobachten waren, größtenteils aufzulösen, ohne die Zellstruktur an sich anzugreifen und die optische Qualität der Zellen somit zu sehr negativ zu beeinflussen (Abbildung 3.29). Nach Inkubation der HEK-Zellen mit MCD zeigt sich ein signifikanter Anstieg aller zuvor gemessenen  $E_{\text{FRET}}$  in einem ähnlichen Maße, wie es zuvor bereits im Protoplastensystem zu beobachten war (Abbildung 3.25). Dies könnte darauf hindeuten, dass die Oxidase AtrbohD, wenn sie durch MCD-vermittelte Sterolreduktion aus den Membrandomänen ausgeschleust wird, effizienter mit den nicht in Membrandomänen lokalisierten Snrk2-Kinasen interagieren kann.

### 3 Ergebnisse



#### Abbildung 3.28: Interaktionsanalysen mittels AB-FRET in HEK-Zellen

Die Oxidase AtrbohD wurde N-terminal mit dem Akzeptorfluorophor mVenus (YFP) fusioniert. Die Snrk2-Kinasen, wurden jeweils C-terminal mit dem Donormolekül mTurquoise (CFP) fusioniert und zusammen mit der Oxidase in HEK-Zellen koexprimiert. Die eingezeichnete rote Linie beschreibt die untere Grenze, für die die gemessenen  $E_{\text{FRET}}$ -Werte als positive Interaktion angenommen werden können und basiert auf der beschriebenen Interaktion zwischen AtrbohD und CPK5 (rot umrandeter Balken). Die Oxidase AtrbohD interagiert erneut am stärksten mit Snrk2.7 (graue Balken). Nach Behandlung der HEK-Zellen für 30 min mit 50 $\mu\text{M}$  MCD zeigen sich signifikant höhere  $E_{\text{FRET}}$ , die maximale Interaktionen zwischen allen Kinasen und der Oxidase anzeigen (blaue Balken). Statistische Auswertung der gemessenen  $E_{\text{FRET}}$  (n=75,  $\pm$  MSE). Statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) sind mit zwei Sternen gekennzeichnet.

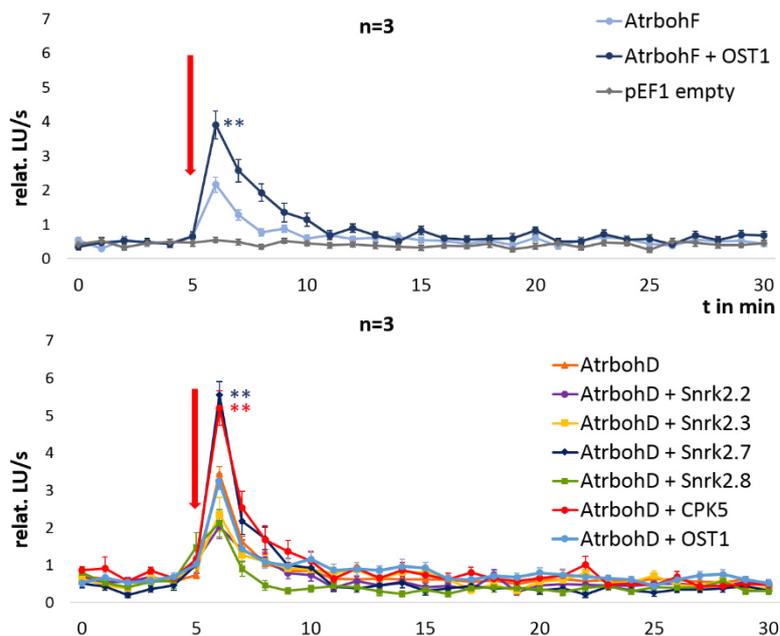


#### Abbildung 3.29: MCD-Behandlung von AtrbohD exprimierenden HEK-Zellen

In der Plasmamembran von HEK-Zellen, die mit YFP::AtrbohD transfiziert waren, ließen sich nach der Inkubation mit 50 $\mu\text{M}$  MCD für 30 min (rechts) deutlich weniger Expression in Form eines punktierten Musters visualisieren als in unbehandelten Zellen (links). Dies deutet darauf hin, dass die Behandlung mit 50 $\mu\text{M}$  MCD ausreicht um einen Großteil der kleinen Membrandomänen aus der Plasmamembran zu entfernen. Die Integrität der Zellmembran und somit die Zellqualität bleiben nach dieser Behandlung, zumindest optisch, weitestgehend erhalten, so dass die Inkubation der Zellen für 30 min mit 50 $\mu\text{M}$  MCD standardmäßig erfolgen kann.

## 3.2.3.1 Snrk2.7 aktiviert AtrbohD

Mit Hilfe der sogenannten „Peroxidase-katalysierten Luminol-Chemolumineszentechnik“ (siehe 2.9.1, Seite 93) kann man die, durch die NADPH-Oxidase synthetisierten reaktiven Sauerstoffspezies („Reactive Oxygen Species“; ROS) quantifizieren. Die durch diese Methode gewonnenen Ergebnisse (Abbildung 3.30), bestätigen zum einen die vermutete Interaktion zwischen AtrbohF und OST1, sowie zwischen AtrbohD und CPK5, wobei diese Interaktion erneut als Positivkontrolle diente, sowie zwischen AtrbohD und Snrk2.7. Zum zweiten bestätigen diese Interaktionsereignisse die Kinase-vermittelte Aktivierung der Oxidasen, welche nun in Form von ROS-Produktion und somit Oxidation des Luminols, angezeigt als relative Lumineszenzeinheiten pro Sekunde (relat. LU/s) messbar wird. Die Aktivierung der Oxidase erfolgt nicht nur im Zuge einer Phosphorylierung der Oxidase durch eine Kinase, sondern auch durch die Bindung von freien  $\text{Ca}^{2+}$  an die EF-Handmotive der NADPH-Oxidase. Diese beiden aktivierenden Prozesse, Phosphorylierung der Oxidase und Calciumbindung müssen synergistisch ablaufen (Ogasawara *et al.*, 2008; Kimura *et al.*, 2011). Im Falle der durchgeführten ROS-Messungen, wurde die intrazelluläre Calciumkonzentration durch das Calcium-Ionophor Ionomycin kurzzeitig gesteigert und somit die initiale ROS-Produktion der Oxidase ausgelöst.

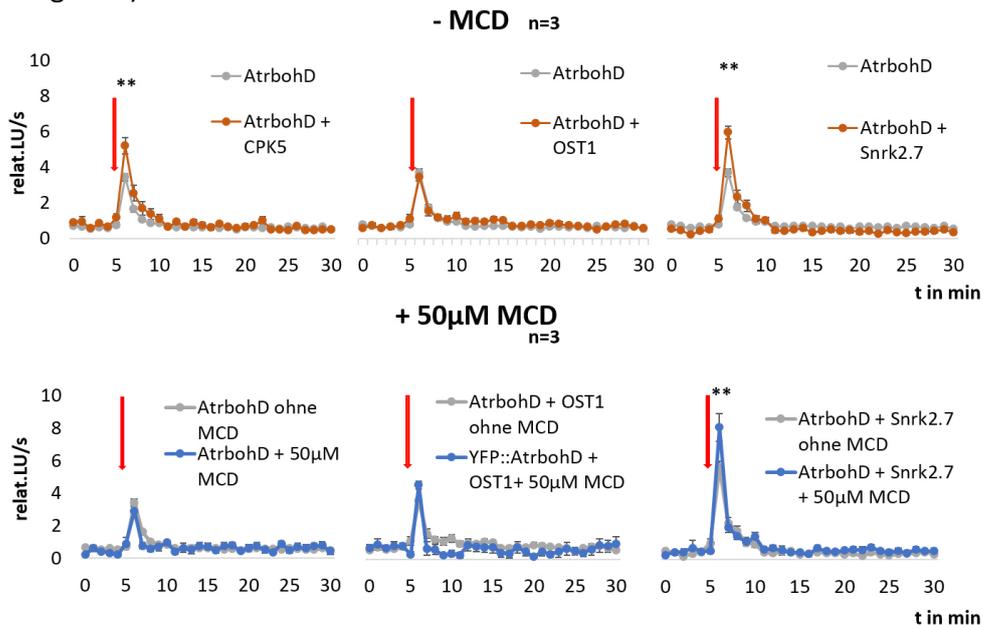


**Abbildung 3.30: ROS-Produktion von AtrbohD und AtrbohF in HEK-Zellen**

Jede Messung wurde 30 min bei 37°C aufgezeichnet. Nach fünf Minuten wurde das Calcium-Ionophor Ionomycin ( $3\mu\text{M}$ ) zu den Zellen gegeben (roter Pfeil). Diese initial, kurzzeitig gesteigerte ROS-Produktion gibt Aufschluss über die Aktivität der Oxidasen. Beide Oxidasen zeigen eine initiale ROS-Produktion, welche für AtrbohF gesteigert werden kann wenn die Kinase OST1 koexprimiert wird (oben). Für AtrbohD kann die initiale ROS-Produktion nach Koexpression mit Snrk2.7 und, wie bereits zuvor beschrieben, mit CPK5 gesteigert werden (unten). Statistische Auswertung der gemessenen relativen Lumineszenzeinheiten pro Sekunde (relat. LU/s, n=3 unabhängige Messungen,  $\pm$  MSE). Statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) sind mit zwei Sternen gekennzeichnet.

Die AtrbohD zeigt eine höhere initiale ROS-Produktion als die AtrbohF, was durchaus an den unterschiedlichen Expressionsmengen liegen kann. Die Aktivierung und somit die ROS-Produktion der AtrbohD kann durch Koexpression mit der Kinase Snrk2.7 auf ein ähnlich hohes Niveau gesteigert werden wie durch die Koexpression mit der Kinase CPK5. Auch die Koexpression der AtrbohF mit der Kinase OST1 zeigt eine gesteigerte initiale ROS-Produktion der Oxidase, vergleichbar mit der ROS-Produktion von Zellen, welche die AtrbohD zusammen mit CPK5 exprimieren. Die Oxidase AtrbohD zeigt hingegen keine gesteigerte Aktivierung und somit ROS-Produktion durch die Koexpression mit der Kinase OST1.

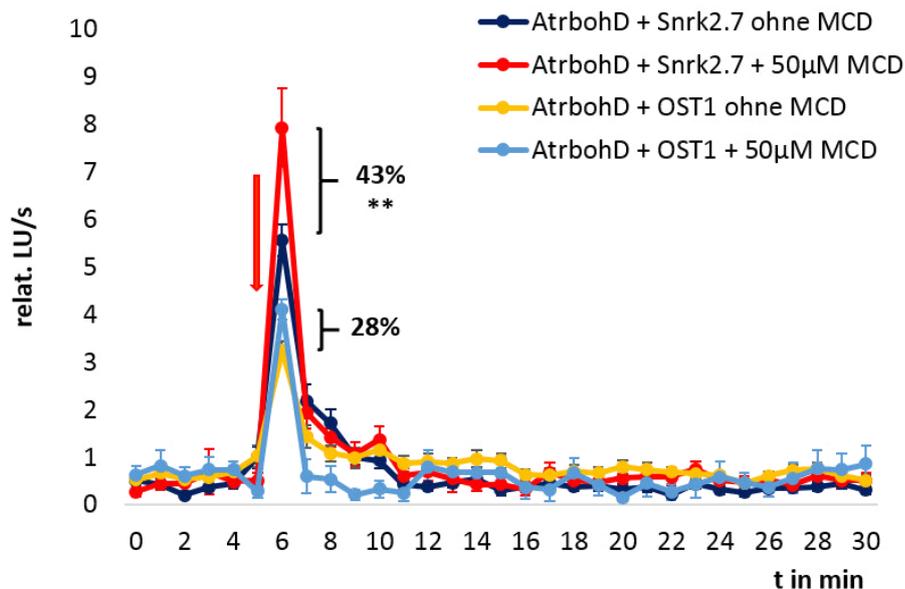
Abhängig von den SE- (Abbildung IV.5, Seite 255/256) und AB-FRET-Messungen (Abbildung 3.28) im HEK-Zellsystem, die zeigen, dass sämtliche analysierten Interaktionen zwischen der AtrbohD und den Snrk2-Kinasen durch Inkubation mit MCD, signifikant gesteigert werden können, stellt sich die Frage ob diese gesteigerten Interaktionen in diesen Fällen auch eine gesteigerte ROS-Produktion bedeuten. Daher wurde die ROS-Produktion von HEK-Zellen gemessen, die die NADPH-Oxidase AtrbohD und die Kinasen OST1 bzw Snrk2.7 exprimierten, und 30 Minuten lang mit 50 $\mu$ M MCD behandelt wurden (Abbildung 3.31).



**Abbildung 3.31: ROS-Produktion von AtrbohD in HEK-Zellen nach Behandlung mit MCD**

Jede Messung wurde 30 min lang bei 37°C aufgezeichnet. Nach fünf Minuten wurde das Calcium-Ionophor Ionomycin (3 $\mu$ M) hinzugegeben (roter Pfeil). Diese initial, kurzzeitig gesteigerte ROS-Produktion gibt Aufschluss über die Aktivität der Oxidase AtrbohD. Oben: Für AtrbohD kann die initiale ROS-Produktion nach Koexpression mit Snrk2.7 und, wie bereits zuvor beschrieben, mit CPK5 gesteigert werden, nicht aber mit OST1. Unten: Nach Behandlung der HEK-Zellen für 30 min mit 50 $\mu$ M MCD, kann die ROS-Produktion von AtrbohD nur bei Koexpression mit Snrk2.7 signifikant gesteigert werden, nicht aber wenn keine Kinase zu Phosphorylierung von AtrbohD oder die Kinase OST1 koexprimiert wird. Statistische Auswertung der gemessenen relativen Lumineszenzeinheiten pro Sekunde (relat. LU/s, n=3 unabhängige Messungen,  $\pm$  MSE). Statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) sind mit zwei Sternen gekennzeichnet.

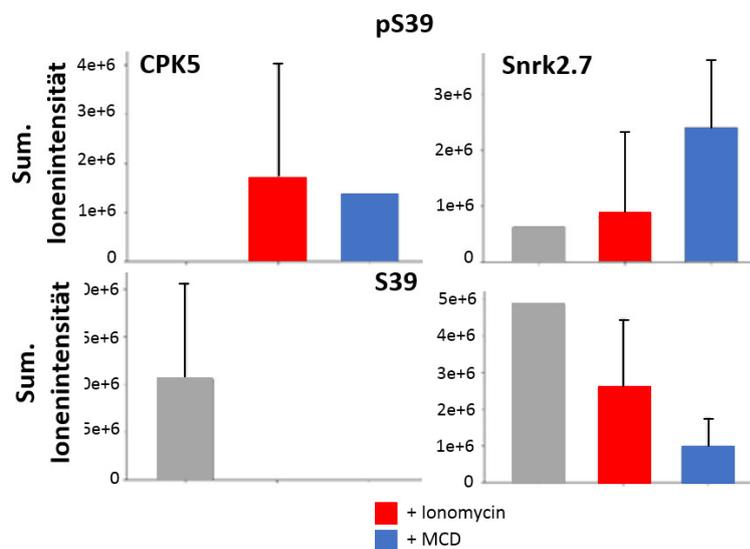
Die alleinig von der AtrbohD abhängige ROS-Produktion kann nicht durch zusätzliche Behandlung mit MCD, gesteigert werden, wenn diese nicht, durch die zusätzlich koexprimierten Kinasen CPK5 und Snrk2.7 phosphoryliert wird. In den vorangegangenen Interaktionsstudien schien die Kinase OST1 oft ein potenzieller Interaktionspartner für AtrbohD zu sein (Abbildungen 3.22, 3.24, 3.25). Mit AtrbohD und OST1 kotransfizierte HEK-Zellen zeigen aber, dass die AtrbohD-vermittelte ROS-Produktion nur leicht und nicht signifikant gesteigert werden kann. In diesem Fall liegt die Induktion der ROS-Bildung durch diese Interaktion bei nur 28% und ist deshalb nicht sonderlich stark. Die Snrk2.7-vermittelte initiale ROS-Produktion der Oxidase AtrbohD hingegen kann durch Behandlung mit MCD signifikant, um fast 43%, gesteigert werden. Weiterhin zeigt sich, dass die Kinase Snrk2.7 die Oxidase AtrbohD generell stärker aktivieren kann als OST1, mit oder ohne Behandlung der transfizierten Zellen mit MCD (Abbildung 3.32). Dieses Ergebnis zeigt, dass eine Interaktion zwischen zwei Proteinen nicht gleichzeitig auch eine regulierende Funktion haben muss und auf jeden Fall immer beide Vorgänge experimentell untersucht werden müssen, um Aussagen über die Funktion eines Proteins und die einer Protein-Protein-Interaktion, in diesem Fall die Funktion der AtrbohD und ihrer Interaktion mit OST1 bzw. Snrk2.7, treffen zu können.



**Abbildung 3.32: Snrk2.7 kann AtrbohD stärker induzieren als OST1**

Die Kinase Snrk2.7 kann nach Koexpression in HEK-Zellen die AtrbohD-bedingte ROS-Produktion stärker induzieren als OST1. Nach Behandlung der Zellen mit 50µM MCD für 30 min führt die Koexpression von AtrbohD und Snrk2.7 zu einem signifikanten Anstieg der ROS-Produktion um 43% (mit zwei Sternen gekennzeichnet). Der MCD-vermittelte Anstieg der ROS-Produktion, nach Applikation von Ionomycin (roter Pfeil) beträgt für Zellen die mit AtrbohD und OST1 kotransfiziert wurde, lediglich 28% und ist nicht signifikant.

Die Oxidase AtrbohD und die aktivierende Kinase Snrk2.7, sowie zur vergleichenden Analyse CPK5, wurden weiterhin in HEK-Zellen koexprimiert. Denn auch dieses Expressionssystem eignet sich sehr gut um die mikrosomale Endomembranfraktion zu isolieren (siehe 2.5.4, Seite 84) und diese in massenspektrometrische Analysen (durchgeführt von Prof. Waltraud Schulze) zur Untersuchung des Phosphorylierungsstatus der Oxidase einzusetzen. Das untersuchte Peptid GAFSGPLGRPK beinhaltet die Aminosäure S39 (Abbildung 3.19, mit rosa Kreis umrandet), welche zuvor schon als bedeutende Phosphorylierungsstelle der Oxidase AtrbohD beschrieben wurde (Dubiella *et al.*, 2013; Kadota *et al.*, 2014). Ziel war es nachzuweisen, dass sowohl die Aktivierung der Oxidase durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung an die zwei EF-Hand-Motive, als auch die Lokalisierung dieser in distinkten Membrandomänen einen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von AtrbohD haben können. Dazu wurden die transient transfizierten HEK-Zellen, bevor sie lysiert wurden, für eine Minute mit  $3\mu\text{M}$  des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophors Ionomycin oder für 30 min mit  $50\mu\text{M}$  von dem sterolabreichernden Reagenz MCD behandelt. Betrachtet man den Phosphorylierungsstatus von S39 zeigt sich, dass die Kinase CPK5 die Oxidase AtrbohD verstärkt nach Behandlung der Zellen mit sowohl Ionomycin, als auch MCD phosphorylieren kann (Abbildung 3.33). Auch fällt auf, dass die Aminosäure S39 von AtrbohD stärker phosphoryliert wurde, wenn die Kinase Snrk2.7 koexprimiert und die Zellen mit MCD behandelt wurden.



**Abbildung 3.33: Die Snrk2.7-vermittelte Phosphorylierung von AtrbohD erfolgt abhängig von deren Lokalisierung in Membrandomänen**

Quantifizierung der Snrk2.7-vermittelten Phosphorylierung von AtrbohD an der Phosphorylierungsstelle S39 mittels SRM-Massenspektrometrie als summierte Ionenintensität (W. Schulze). Die Peptidphosphorylierung wurde an isolierten Endomembranfraktionen aus transfizierten HEK-Zellen gemessen, die zuvor eine Minute mit  $3\text{M}$  Ionomycin oder 30 min mit  $50\mu\text{M}$  MCD behandelt wurden ( $n=6$ ,  $\pm$  MSE). Die massenspektrometrischen Messungen wurden durchgeführt von Prof. Waltraud Schulze.

Die unphosphorylierte Aminosäure S39 konnte in Membranfraktionen von Zellen, die mit der Kinase CPK5 koexprimiert und weder mit Ionomycin, noch mit MCD behandelt wurden, nachgewiesen werden (Abbildung 3.33 unten). Ebenfalls war die Ionenintensität der unphosphorylierten Phosphorylierungsstelle in Membranfraktionen in denen die Kinase Snrk2.7 lokalisiert war, deutlich höher, wenn die Membran aus Zellen isoliert wurde, die zuvor keine Behandlung erfuhren. Die Ionenintensität wird geringfügig niedriger, wenn die Zellen zuvor mit Ionomycin und deutlicher noch mit MCD behandelt wurden. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Kinase CPK5, in der Lage ist, die Phosphorylierungsstelle S39 der Oxidase AtrbohD zu phosphorylieren. Die Kinase Snrk2.7 scheint demhingegen keinen deutlichen Einfluss auf die Phosphorylierung der Aminosäure S39 der Oxidase AtrbohD zu haben. Wahrscheinlich phosphoryliert Snrk2.7 bevorzugt eine der anderen Phosphorylierungsstellen, wie zum Beispiel S343 oder S347 (Abbildung 3.19).

Die Ergebnisse deuten aber darauf hin, dass die Phosphorylierung durch Snrk2.7 durch eine MCD-Behandlung wesentlich gesteigert werden kann und das dies nicht für den Fall einer Phosphorylierung durch CPK5 zutrifft. Die Phosphorylierung und somit die Aktivierung der Oxidase AtrbohD ist also nicht nur von einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung an die beiden EF-Hand-Motive abhängig, sondern auch von einer Lokalisierung der Oxidase in sterolreichen Membrandomänen.

### 3 Ergebnisse

## 4 Diskussion

Pflanzliche DRMs („Detergent Resistent Membranes“; siehe 1.1.3.1, Seite 9) bestehen zu einem hohen Anteil aus Signalproteinen (Peskan *et al.*, 2000; Shahollari, 2004; Mongrand *et al.*, 2004). Daraus kann man schließen, dass Membrandomänen Wirkungspfade für Signale und Plattformen für die Koordination von Signalproteinen und den Transport von Substanzen vom intrazellulären in den extrazellulären Raum darstellen können. Diese Vorgänge sind essentiell notwendig für die Reaktionen der Pflanzen auf abiotische und biotische Stressantworten. Die detaillierten physiologischen Funktionen der in DRMs gefundenen Signalproteine generell und in den ABA-vermittelten Signalwegen im Besonderen, sind aber bisher nur unzureichend verstanden und bedürfen genauerer Analysen.

Aus diesem Grund wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits isolierte DRM-Fractionen aus der Blattplasmamembran von *Arabidopsis thaliana* via Massenspektrometrie in Hinblick auf ihre Proteinzusammensetzung untersucht (Dissertation Dr. Fatih Demir, "Lipid rafts in Arabidopsis thaliana leaves", 2010). Mit Hilfe verschiedener Detergenzien und verschiedener Präparationsprotokolle konnten so 246 DRM-Proteine isoliert und identifiziert werden (Demir *et al.*, 2013). Annähernd die Hälfte dieser Proteine wurde nicht in vorangegangenen Studien identifiziert (Mongrand *et al.*, 2004; Shahollari *et al.*, 2004 und 2005; Borner *et al.*, 2005; Morel *et al.*, 2006; Kierszniowska *et al.*, 2008; Minami *et al.*, 2009). Um unter diesen Proteinen diejenigen heraus zu finden, deren Anwesenheit in den DRMs tatsächlich vom Sterolgehalt ihrer Umgebung abhängig ist, wurden die in der Membran vorhandenen Sterole durch Behandlung mit dem Reagenz Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (MCD) entfernt. Membrandomänen zeichnen sich durch einen hohen Anteil an gesättigten Phospholipiden, Sphingolipiden und Sterolen aus (Simons und Ikonen, 1997) und die Entfernung von Sterolen sollte die Integrität dieser Membranbereiche beeinflussen, so dass stark sterolabhängige Proteine aus der Membran entfernt und in die Detergenz-lösliche Fraktion (DSF) überführt werden sollten (Scheiffele *et al.*, 1997, Simons *et al.*, 1998). Von der genannten Sterolreduktion waren in F. Demirs Analysen mehr als die Hälfte der zuvor mittels Triton X-100 isolierten DRM-Proteine betroffen, wobei 41 Proteine nach der MCD-Behandlung nicht mehr detektiert werden konnten und daher als von einer sterolreichen Umgebung abhängig angesehen werden können. Die Mehrzahl dieser Proteine (41,5%) sind Signalproteine wie zum Beispiel die LRR („leucine-rich-repeat“)-Proteinkinase BRI1 und die Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Proteinkinasen CPK10 und CPK21. Andere Proteine, die durch MCD-Behandlung aus der DRM ausgeschlossen wurden, sind die Proteinphosphatase ABI1 und die beiden Remorine AtRem1.2 und AtRem1.3. Diese Proteine verschwanden aus der DRM und konnten dann teilweise in der DSF („Detergent soluble Fraction“) oder im MCD-Überstand detektiert werden, wodurch sie sich somit als Proteine, die stark von einer sterolhaltigen Umgebung abhängig sind, auszeichnen (Demir *et al.*, 2013).

## 4.1 Membrandomänenmarker

---

Für Untersuchungen von Membrandomänen im tierischen System stehen schon seit längerer Zeit Proteine als Marker zur Verfügung, die entweder in diesen Domänen lokalisieren oder ganz klar aus diesen ausgeschlossen sind. Transferrine und Folsäurerezeptoren sind GAPs (GPI-anchored Proteins“), die nicht in DRMs akkumulieren (Hao *et al.*, 2001; Varma und Mayor, 1998) und sich somit als Nicht-Domänenmarker eignen. Das Transmembranadapterprotein LAT (Head *et al.*, 2006; Wilson *et al.*, 2004), Caveolin (Rothberg *et al.*, 1992) und die palmitoylierte c-Src-Kinase (Resh, 1999; Simons und Ikonen, 1997; Stulnig *et al.*, 1998) sind hochgradig präsent in tierischen Membrandomänen und dienen deshalb in diesem System als Domänenmarker. Diverse zellbiologische Ansätze konnten in den letzten Jahren auch im pflanzlichen System verschiedene Membran-assoziierte Proteine identifizieren, die distinkte Membrandomänen in lebenden Zellen markieren. Dabei handelt es sich um die Flotilline und die Remorine (Raffaele *et al.*, 2009; Haney und Long, 2010, Lefebvre *et al.*, 2010; Haney *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2012; Demir *et al.*, 2013). Sowohl im tierischen als auch im pflanzlichen System besteht die Familie der Flotilline nur aus drei Mitgliedern (in *Arabidopsis thaliana*: At5g2520, At5g25260, At5g64870), während die Familie der pflanzenspezifischen Remorine 16 Mitglieder aufweist (Raffaele *et al.*, 2007). Die Lokalisierung von einzelnen Remorinen in Membrandomänen konnte zuvor für das ektopisch exprimierte Remorin1.3 aus der Kartoffel *Solanum tuberosum* gezeigt werden, für ein endogenes Remorin aus der Tomate *Solanum lycopersicum* (Raffaele *et al.*, 2009), sowie für das nah verwandte Remorin AtRem1.3 aus *Arabidopsis thaliana* (At2g45820; Demir *et al.*, 2013).

### 4.1.1 Die AtRemorine sind Membrandomänenmarker

Ein pflanzlicher Membrandomänenmarker sollte folgende Kriterien erfüllen: i) Eine starke Präsenz in DRMs, ii) eine starke Abhängigkeit in seiner Membranlokalisierung von einer sterolreichen Umgebung und iii) eine mikroskopisch detektierbare *in vivo*-Lokalisierung in kleinen (< 200nm) und definierten Kompartimenten in der pflanzlichen Plasmamembran. Zusätzlich sollten die entsprechenden Proteine eine jeweilige natürlich hohe Expression aufweisen und es sollten mehrere Homologe im pflanzlichen System existieren, damit im Falle unterschiedliche Marker für unterschiedliche Arten von Membrandomänen (Jarsch *et al.*, 2014) etabliert und diese Domänen dann voneinander unterschieden werden können.

Die Remorine 1.2 und 1.3 aus *Arabidopsis thaliana* repräsentieren ideale Kandidaten, die als Membrandomänenmarker angesehen werden können. Diese beiden Proteine gehören zu den 10% am höchsten exprimierten Genen in *Arabidopsis* (Raffaele *et al.*, 2007). Dies erklärt auch ihre Identifizierung in zahlreichen proteomischen Analysen von

DRMs (Kierszniowska *et al.*, 2008; Minami *et al.*, 2009; Shahollari *et al.*, 2004). Eine starke Abhängigkeit dieser beiden Remorine von einer sterolreichen Umgebung konnte zuvor schon in DRMs, isoliert aus einer *Arabidopsis*-Zellkultur und aus Blättern von *Arabidopsis* nachgewiesen werden (Kierszniowska *et al.*, 2008; Demir *et al.*, 2013). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Analysen von Triton X-100-isolierten DRMs aus stabilen *Arabidopsis*-Mutanten, die das Kartoffel-Remorin StRem1.3 überexprimieren, zeigen, dass dieses Protein in seiner Membrandomänenlokalisierung klar von einer sterolreichen Umgebung abhängig ist. Nach der Behandlung der isolierten DRMs mit 25mM MCD konnte StRem1.3 nur noch schwach bis gar nicht mehr nachgewiesen werden, dafür aber verstärkt in der löslichen Fraktion, der DSF (Abbildung 3.1, Seite 108). Dieses Ergebnis wird durch zuvor durchgeführte elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt, welche ebenfalls zeigen, dass StRem1.3 nach der Behandlung mit MCD nicht mehr in DRMs lokalisiert ist und auch nicht mehr in Immunogold-markierten Strukturen aggregiert (Raffaele *et al.*, 2009). Betrachtet man die Lokalisierung der fluoreszent markierten Proteine AtRem1.2 und 1.3, erkennt man klare, punktierte und kleine Strukturen in der Plasmamembran. Diese Strukturen koloalisieren deutlich mit dem zuvor etablierten Membrandomänenmarker StRem1.3. Weiterhin zeigen diese beiden Remorine eine **geringe** laterale Mobilität in der pflanzlichen Plasmamembran wie zuvor durchgeführte FRAP-Experimente deutlich zeigen (Demir *et al.*, 2013). Eine geringe laterale Mobilität allein ist zwar noch kein Beweis für eine Membrandomänenlokalisierung (Kenworthy *et al.*, 2004), aber diese Tatsache bestätigt, dass AtRem1.2 und 1.3, zumindest wenn sie ektopisch in *Arabidopsis* überexprimiert werden, stabile Elemente der Plasmamembran sind. Diese Aussage muss deshalb so stark relativiert werden, weil kürzlich veröffentlichte Untersuchungen zeigen, dass die beiden genannten Remorine eine eher diffuse und wenig distinkte Lokalisierung in der Plasmamembran zeigen und auch in anschließenden FRAP-Analysen hoch mobil zu sein scheinen, wenn sie unter dem nativen Promoter in den entsprechenden *Arabidopsis*-Mutanten exprimiert werden. Lediglich in den Zellen der Wachstumszone des Hypokotyl konnte unter diesen Bedingungen eine Lokalisation der beiden Remorine in distinkten Membrandomänen beobachtet werden (Jarsch *et al.*, 2014). Interessanterweise sind es aber vor allem diese beiden Remorine der Untergruppe 1, die als einzige Remorine immer wieder durch proteomische Analysen in isolierten DRMs gefunden werden. Dies kann vor allem daran liegen, dass diese beiden Proteine sehr hoch exprimiert sind, so dass sie generell immer in DRM-Präparationen zu detektieren sind (Tabelle 3.1, Seite 108; Shahollari *et al.*, 2004; Kierszniowska *et al.*, 2008; Minami *et al.*, 2009; Keinath *et al.*, 2010; Demir *et al.*, 2013).

Die ektopische Überexpression der übrigen 14 Remorine in *Arabidopsis thaliana* offenbarte aber erneut eine klare, zumindest zeitweise Lokalisation dieser in distinkten Domänenbereichen (Abbildung 3.14, Seite 124, Jarsch *et al.*, 2014). Diese Diskrepanzen zwischen den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen und der aktuellsten Literatur, lassen darauf schließen, dass die Remorine zwar in Domänen- oder Domänen-ähnlichen Bereiche der Plasmamembran lokalisiert sind, wenn sie unter einem starken Promoter

ektopisch überexprimiert werden, jedoch nicht wenn sie in natürlichen Konzentrationen in der Pflanze exprimiert werden. Vielleicht lokalisieren sie auch, wenn sie auf einem natürlich hohen Niveau in der Zelle exprimiert werden, in Membrandomänen, sind dann aber einfach auf Grund der Auflösungsgrenzen, die die Lichtmikroskopie mit sich bringt, nur nicht zu erfassen. Denn der Einsatz von TIRF- („total internal reflection“) Mikroskopie offenbart zwar nur eine sehr schwache, aber doch eine vorhandene Lokalisierung der Remorine 1.2 und 1.3 in distinkten Domänenbereichen der Plasmamembran (Jarsch *et al.*, 2014). Eventuell werden die Remorine der Untergruppe 1 auch nur in einer Stimulus- oder Gewebe-abhängigen Weise in Membrandomänen lokalisiert. Da man bisher über die Funktion der einzelnen Remorinproteine noch nicht viel weiß, lässt sich dieser letztgenannte Punkt nur schwer diskutieren.

Es ist bekannt, dass die Stabilität von lateralen Membrankompartimenten durch zwei Systeme gewährleistet wird: Durch die Zellwand und das kortikale Zytoskelett. Untersuchungen an Protoplasten, die kontinuierlich ihre Zellwand wieder regenerieren, zeigten, dass die laterale Stabilität von Proteinen während der Zellwandregeneration stark verändert wurde (Martinière *et al.*, 2012). Im tierischen System, an menschlichen Zellen, konnte die aktive Funktion von Zytoskelettelementen für die laterale Immobilisierung von Membrankompartimenten demonstriert werden (Dinic *et al.*, 2013). Diese Abhängigkeit vom Zytoskelett würde auch erklären warum Prozesse, wie die Invasion von Pathogenen in die Wirtszelle, mit kortikalen Reorganisationen einhergehen (Henty-Ridilla *et al.*, 2013), die die Akkumulierung von sterolreichen Membrandomänen und Resistenzproteinen an den Infektionsstellen auslösen (Bhat *et al.*, 2005; Underwood und Somerville, 2013). Die Remorin-markierten Membrandomänen beinhalten höchstwahrscheinlich solche einzigartigen Zusammenstellungen von Signalproteinen und stellen somit Signalplattformen für die Antwort von Pflanzen auf pathogene und symbiotische mikrobielle Organismen dar (Jarsch und Ott, 2011; Urbanus und Ott, 2012).

Ebenfalls konnte zuvor gezeigt werden, dass nah miteinander verwandte Remorine ein ähnliches Expressionsmuster zeigen (Jarsch *et al.*, 2014). Daraus könnte man schließen, dass evolutionär verwandte Proteine auch in ähnlichen Kompartimenten lokalisiert sein können. Die Remorine der Untergruppe 1 sind nahe miteinander verwandt und somit wäre erklärbar, dass die NADPH-Oxidase AtrbohD, die anders als die verwandte AtrbohF nicht mit dem Remorin 1.3 in Epidermiszellen von Tabak und *Arabidopsis* kolokalisiert (Abbildung 3.10, Seite 121), stattdessen aber mit dem Remorin 1.4 kolokalisiert zu sein scheint (Abbildung 3.15, Seite 126). Mit einem Korrelationskoeffizienten nach Pearson von 0,54 ist diese Kolokalisation deutlich geringer als die zwischen AtrbohF und AtRem1.3 mit Werten zwischen 0,7 und 0,8. Dennoch besagt die Definition der Korrelationskoeffizienten nach Pearson und Spearman, dass Werte zwischen 0,5 und 0,8 als ein deutlicher linearer Zusammenhang, also in diesem Fall als eine Kolokalisation von zwei Proteinen zu deuten sind (Galton, 1888). Dass es in Hinblick auf ihre Lipidkomposition unterschiedliche Arten von Membrandomänen geben muss ist auf Grund des dynamischen Charakters der Plasmamembran logisch, aber worin sich nun

genau die einzelnen Membrandomänen ähneln oder unterscheiden ist bisher nicht klar und muss somit Inhalt zukünftiger Untersuchungen sein. Eine andere neuere Studie hat im Hefesystem gezeigt, dass auch Proteine mit ähnlichen Funktionen die Tendenz haben im selben Membrankompartiment miteinander zu kolokalisieren (Spira *et al.*, 2012). Die beiden *Arabidopsis*-Remorine 1.3 und 1.4 scheinen nicht zur selben Zeit im selben Kompartiment lokalisiert zu sein. Das wird zum einen durch die Tatsache bestätigt, dass die beiden verwandten NADPH-Oxidasen AtrbohF und AtrbohD jeweils mit nur einem der beiden Remorine kolokalisiert sind (Abbildung 3.10 und 3.11, Seite 121 und 3.12, Seite 122). Weiterhin zeigt auch eine Koexpressionsanalyse der beiden Remorine AtRem1.3 und AtRem1.4 in Epidermiszellen von *Nicotiana benthamiana*, in Form des Korrelationskoeffizienten nach Pearson mit einem Wert von 0,118, dass die beiden Proteine nicht kolokalisiert sind (Abbildung 3.16, Seite 126). Diese Fakten untermauern die weit verbreitete Theorie, dass sowohl die Formation von Proteinkomplexen (z.B. SLAH3 und CPK21), als auch die physikalische Separierung von enzymatischen Aktivitäten (z.B. ROS-Produktion) und somit von physiologisch unzusammenhängenden Prozessen, über solche Membrandomänen reguliert werden können.

Im Gegensatz zu anderen kürzlich veröffentlichten Studien (Jarsch *et al.*, 2014) zeigt das AtRem1.4 in unseren Untersuchungen eine sehr deutliche Expression in distinkten, punktförmigen Domänen in der Plasmamembran (Abbildung 3.14, Seite 124). Diese Membrandomänen sind dieselben in denen, zumindest zeitweise, auch die NADPH-Oxidase AtrbohD exprimiert wird (Abbildung 3.15, Seite 126). Um die Tauglichkeit von AtRem1.4 als Membrandomänenmarker zu verifizieren, wurde dessen laterale Mobilität mit Hilfe der FRAP-Technik untersucht. Dazu wurden, zur besseren Vergleichbarkeit ROIs mit annähernd gleicher Größe um ausgewählte, fluoreszent markierte Membrandomänen gesetzt und diese dann 15 sec lang gebleicht. Um die eventuelle Rückkehr von fluoreszenten Proteinen zu erfassen, wurden die Fluoreszenzintensitäten der ROIs anschließend zwei weitere Minuten vermessen. Diese Werte wurden mit den Fluoreszenzintensitäten eines Referenz-ROIs von ähnlicher Größe, welcher nicht gebleicht wurde, verglichen. Da keine Rückkehr von diffundierenden, fluoreszent markierten Proteinen in die zuvor gebleichten Bereiche erfolgte, kann eine laterale Immobilität von AtRem1.4-markierten Membrandomänen angenommen werden (Abbildung 3.17, Seite 127).

Die durchgeführten Experimente liefern sehr gute Hinweise darauf, dass nicht nur die Remorine AtRem1.2 und AtRem1.3, sondern auch das Remorin AtRem1.4 einen guten Membrandomänenmarker darstellt. Genau wie die Proteine StRem1.3, MtSYMREM1 und die *Arabidopsis*-Remorine AtRem1.2 und 1.3, kann auch das AtRem1.4 in isolierten DRMs nachgewiesen werden (Raffaele *et al.*, 2013). AtRem1.4 ist zumindest nach ektoptischer Überexpression in *Nicotiana benthamiana* und unter Verwendung eines starken Promoters (z.B. 35S) immer wieder klar und deutlich in mikroskopisch detektierbaren, distinkten Membrandomänen lokalisiert (Abbildung 3.14-3.18, Seite 124-128 und 3.20, Seite 129). Diese sind nicht zu groß, um lediglich Membrankompartimente (diese haben

eine Größe von ca. 300nm) darzustellen, sondern sind mit einer aus den zahlreichen Abbildungen geschätzten Größe von etwa 100nm als Membrandomänen im pflanzlichen System zu charakterisieren. Diese distinkten Domänenstrukturen sind entsprechend der Definition von Membrandomänen immobil und zeigen in FRAP-Analysen keine laterale Mobilität (Abbildung 3.17, Seite 127). Weiterhin ist das AtRem1.4 in seiner Membrandomänenlokalisierung von einer sterolreichen Umgebung abhängig, wie die nur mehr homogene Verteilung von fluoreszent markierten AtRem1.4 nach Behandlung der transfizierten Epidermiszellen von Tabakpflanzen mit 50µM MCD deutlich zeigt (Abbildung 3.18, Seite 128). Das natürliche Expressionsniveau von AtRem1.4 in *Arabidopsis* ist nicht sehr hoch, aber auch nicht so gering wie das anderer Remorinproteine (Jarsch *et al.*, 2014). In Tabakpflanzen konnte zuvor eine 10-fache Steigerung der Expression von NtRem1.2 von sehr jungen Pflanzen zu erwachsenen und größeren Pflanzen beobachtet werden. Die Expression war in seneszenten Blättern sogar 100-fach erhöht (Raffaele *et al.*, 2013). Daher kann man annehmen, dass die Expression von Genen mit ansteigendem Zellalter zunimmt. Die Remorine besitzen keinerlei Transmembrandomänen und sind stattdessen mit einer kurzen C-terminalen Domäne, RemCA genannt (Abbildung 1.10, Seite 37), mit der Plasmamembran verknüpft. Diese ist in wässrigen Phasen ungeordnet und faltet sich spontan in die richtige Haarnadel-ähnliche Form, bestehend aus amphipathischen  $\alpha$ -Helices, wenn ein nicht-polares Umfeld anliegt. Diese RemCA-Domäne bindet dann bevorzugt an negativ geladene Lipide, wie sie vor allem in Membrandomänen vorkommen. Weiterhin können diese Proteine *in vitro* auch Trimere ausbilden und somit die Stabilität der Membranverankerung noch verstärken. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass zusätzliche strukturelle posttranslationale Modifikationen dieser Proteine, ihre Verankerung mit der Membran ermöglichen oder modifizieren (Perraki *et al.*, 2012). All diese Eigenschaften und vor allem die Anwesenheit der RemCA-Domäne haben alle bisher untersuchten Proteine aus den unterschiedlichen Remorinfamilien miteinander gemeinsam. Deshalb kann, auch wenn kürzlich Ergebnisse veröffentlicht wurden, die zum Teil ein etwas anderes Bild aufzeigen (Jarsch *et al.*, 2014), durchaus angenommen werden, dass alle bisher identifizierten Remorinproteine in distinkten Membrandomänen lokalisiert sind und als Markerproteine für unterschiedliche Arten von koexistierenden Membrandomänen verwendet werden können. Wenn nahe miteinander verwandte Proteine nicht nur in ähnlichen Arten von Membrandomänen lokalisiert zu sein scheinen, sondern ebenfalls eine ähnliche Funktion haben können, könnte man durchaus annehmen, dass die Mitglieder der *Arabidopsis*-Remorinfamilie 1 ähnlich wie das StRem1.3 an Pflanzen-Pathogen- (Raffaele *et al.*, 2009) oder Pflanzen-Symbionten-Interaktionen (Lefebvre *et al.*, 2010) beteiligt sein könnten. Vielleicht markieren die einzelnen Remorine auch Ansatzstellen auf der Plasmamembran an denen ein, für den Ablauf eines bestimmten zellulären Prozesses essentieller Mechanismus, durch die Assemblierung eines bestimmten Signalkomplexes in einer bestimmten Art von Membrandomänen, etabliert werden muss. Diese Annahme ist aber rein spekulativ und bleibt es auch, so lange bis sich

die Funktionen der einzelnen Remorine sowie deren Lokalisierung in Membrandomänen erklären wird.

## 4.2 Signalproteine in den pflanzlichen DRMs

---

### 4.2.1 Die Membrandomänen-lokalisierten Proteine ABI1 und CPK21 regulieren den Anionenkanal SLAH3

Für sessile Organismen, wie Pflanzen, ist Trockenstress ein Hauptproblem und sämtliche Signalwege, die zu Antworten auf diesen Reiz hin erfolgen, müssen bestmöglich reguliert werden. Die Schlüsselrolle in diesen Regulierungskaskaden spielt das Phytohormon ABA (Zhu, 2002). Die beiden Proteinphosphatasen ABI1 und ABI2 sind wichtige Komponenten in dem Signalweg der ABA-abhängigen Antwort auf Trockenstress (Leung *et al.*, 1994 und 1997; Meyer *et al.*, 1994). Dabei ist vor allem ABI1 ein Negativregulator der ABA-Antwort und die *Arabidopsis*-Mutante *abi1-1* zeigt eine Resistenz gegenüber ABA (Gosti *et al.*, 1999). Die Wirkung von ABA basiert auf Veränderungen in den unterschiedlichen Signalkaskaden (Ma und Wu, 2007; Yoshida *et al.*, 2006) und in den Funktionen verschiedener Membrantransportsysteme (Becker *et al.*, 2003; Geiger *et al.*, 2010; Trouverie *et al.*, 2008).

#### 4.2.1.1 Regulierung des Stomaschlusses

In der Reaktion der Pflanze auf Trockenstress spielt die Kontrolle des Stomaschlusses, vermittelt durch die Wirkung von ABA, eine wichtige Rolle. Bisher weiß man, dass der schnelle Stomaschluss von der Aktivität von Anionenkanälen des S-Types abhängig ist (siehe 1.2.1.2.4.1, Seite 57). Diese in der Schließzellmembran lokalisierten Kanäle werden ABA-abhängig aktiviert. Dem resultierenden Anionenausstrom folgt ein Ausstrom von Kaliumionen. Diesem folgt wiederum der Ausstrom von Wasser, eine Senkung des Turgors und somit der Schluss der Stomata. Zu diesen Anionenkanälen zählt SLAC1 (Negi *et al.*, 2008), ein Chlorid- und Nitratkanal in der Plasmamembran von Schließzellen (Vahisalu *et al.*, 2008). Im *Arabidopsis*-Genom gibt es 4 Homologe (SLAH1-SLAH4) zu SLAC1. SLAH3 ist zwar deutlich in Schließzellen exprimiert, es können allerdings höhere Transkriptmengen im Mesophyllgewebe detektiert werden. Sowohl SLAC1 als auch SLAH3 werden durch Calcium-abhängige Kinasen aktiviert (Negi *et al.*, 2008).

Das komplexe Netzwerk an Signalproteinen, die ABA-abhängig den Stomaschluss regulieren, konnte zum Teil mit den Signal- und Transportproteinkomplexen, die in pflanzlichen Membrandomänen lokalisiert sind, in Verbindung gebracht werden. So wurden Mitglieder der CPK-Familie in den, durch Detergenzien aus Blattmesophyll

isolierten DRMs, identifiziert (Dissertation Dr. Fatih Demir, "Lipid rafts in Arabidopsis thaliana leaves", 2010). Dabei handelt es sich vor allem um CPK10 und CPK21 (Tabelle 3.1, Seite 108). Die Kinase CPK21 zeigte dabei in den massenspektrometrischen Analysen die höchste Identifizierungssicherheit und wurde nach MCD-Behandlung als sterolabhängiges Protein charakterisiert. Auch die PP2C-Phosphatase ABI1 wurde unter den sterolabhängig in DRMs lokalisierten Proteinen identifiziert (Demir *et al.*, 2013). Damit sind in den isolierten DRMs zwei Proteine identifiziert worden, die bekanntermaßen an der Regulation des Stomaschlusses maßgeblich beteiligt sind (Geiger *et al.*, 2009 und 2010). Für diese Arbeit waren hauptsächlich domänenlokalisierte Signalwege und Proteine, die im Mesophyll lokalisiert sind von Interesse, weshalb der Anionenkanal SLAH3 in den Fokus rückte.

Die Aktivität von Ionenkanälen wird hauptsächlich durch die Anwesenheit von zytoplasmatischem  $\text{Ca}^{2+}$  reguliert (Hedrich und Neher, 1987), aber auch durch die Interaktion mit bestimmten Kinasen, wie den CPKs (Geiger *et al.*, 2010). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Kinase CPK21 als auch CPK23 mit dem Schließzell-Anionenkanal SLAC1 interagieren, ihn somit aktivieren und regulieren können. Von beiden besagten Kinasen zeigt aber nur die CPK21 eine deutliche Abhängigkeit von  $\text{Ca}^{2+}$ . Wird SLAC1 heterolog, alleine in Oozyten von *Xenopus laevis* exprimiert, ist dieser nicht aktiv (Geiger *et al.*, 2009). CPK21 spielt also eine wichtige Rolle für die Aktivierung des Anionenkanals SLAC1 in den Schließzellen. Für den homologen Mesophyll-Anionenkanal SLAH3 konnte, zumindest elektrophysiologisch, eine ähnliche Interaktion mit CPK21 gezeigt werden (Geiger *et al.*, 2011).

Die negative Regulierung der Aktivität der Anionenkanäle wird durch die PP2C-Proteinphosphatase ABI1 vermittelt. In Abwesenheit von ABA können für SLAC1 (Geiger *et al.*, 2009) und SLAH3 nach Koexpression mit ABI1 (Geiger *et al.*, 2011) keine Anionenströme gemessen werden. Das Phytohormon ABA wird durch zytoplasmatische Rezeptoren der RCAR/PYR/PYL-Familie erkannt und gebunden (Fujii *et al.*, 2009). Dabei bilden diese Rezeptoren Dimere. Nach der Bindung von ABA dissoziieren diese, um einen ABA-Rezeptor-Phosphatase-Komplex zu bilden. Die Formation eines solchen Komplexes wird durch die Aktivität der PP2C-Phosphatase in ABA-abhängiger Weise inhibiert, wodurch die Aktivität einer Proteinkinase, welche dann die betreffenden Anionenkanäle phosphorylieren und somit aktivieren kann, erlaubt wird (Hubbard *et al.*, 2010). Die Regulierung von ABI1 wird nicht nur durch die RCAR/PYR/PYL-Rezeptoren vermittelt, sondern auch durch Lipidsignalmoleküle wie Phosphatidsäuren (Jacob *et al.*, 1999). Phosphatidsäuren (PAs) werden durch die Phospholipase D  $\alpha$ 1 synthetisiert (Zhang *et al.*, 2004) und ziehen die PP2C-Phosphatase ABI1 zur Plasmamembran, wodurch ABI1 deaktiviert wird und die Signalkaskade, die zum Stomaschluss führt, ablaufen kann. Die Phospholipase D $\alpha$ 1 und die PAs wirken zusammen mit der Untereinheit  $\text{G}\alpha$  des heterotrimeren GTP-bindenden Proteins und regulieren somit den Stomaschluss.  $\text{G}\alpha$  mit GTP gebunden, inhibiert die Öffnung der Stomata und  $\text{G}\alpha$  gebunden mit GDP, interagiert

mit der Phospholipase Dα1, wodurch die Öffnung der Stomata eingeleitet wird (Mishra *et al.*, 2006).

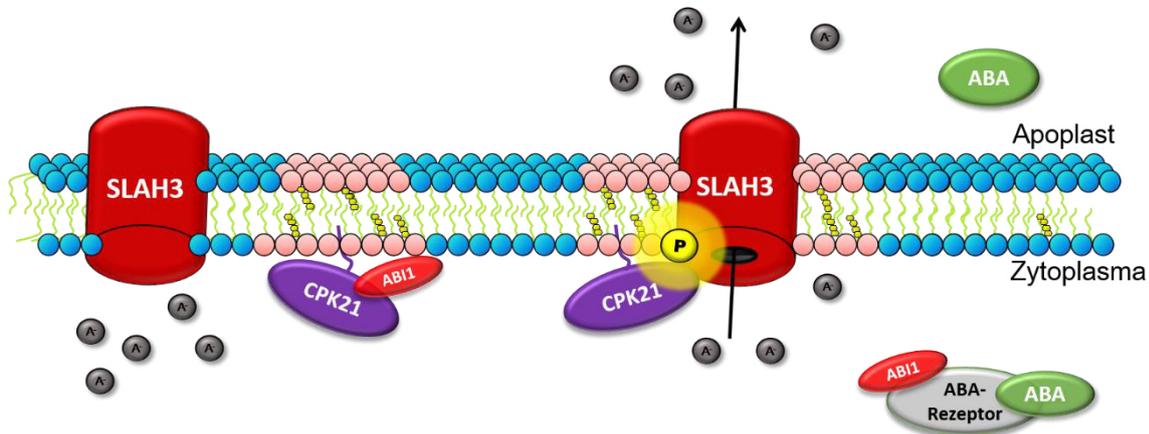
Der Stomaschluss ist also ein Vorgang, der durch ein Netzwerk von Proteinen präzise reguliert wird. Die PP2C-Phosphatase ABI1 spielt für die Aktivierung von beteiligten Anionenkanälen (z.B. SLAH3), durch die interagierenden Kinasen (z.B. CPK21), eine Schlüsselrolle. ABI1 selbst wird durch die Mitglieder der RCAR/PYR/PYL-Rezeptorfamilie und damit durch das Phytohormon ABA reguliert.

#### 4.2.1.2 SLAH3, CPK21 und ABI1 sind in Membrandomänen lokalisiert

In transienten Einzelexpressionsanalysen mit dem Mesophyll-lokalisierten Anionenkanal SLAH3, der Kinase CPK21 und der Phosphatase ABI1, konnte gezeigt werden, dass nur die CPK21 signalunabhängig in DRMs lokalisiert ist. Die Koexpression von sowohl Kinase als auch Anionenkanal, resultierte in einer sterolabhängigen Lokalisierung beider Proteine in den DRM-Fraktionen. Die zusätzliche Koexpression der Phosphatase ABI1, führte zu einer Dislokation von SLAH3 aus den CPK21-besetzten Membrandomänen in die Peripherie der Plasmamembran (Abbildung 3.2, Seite 109). Werden SLAH3 und CPK21 heterolog in Oozyten von *Xenopus laevis* exprimiert, können elektrophysiologisch, makroskopische S-typische Anionenströme gemessen werden, die von einer Aktivität des Anionenkanals SLAH3 zeugen. Wird zusätzlich die Phosphatase ABI1 koexprimiert, bleibt eine SLAH3-Aktivierung durch CPK21 aus (Geiger *et al.*, 2001; Demir *et al.*, 2013). Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass es einen Zusammenhang zwischen der Lokalisation von SLAH3 in den DRMs und somit in Membrandomänen und einem phosphorylierungsbedingten, funktionellen Anionentransport über die Membran gibt. In der vorliegenden Arbeit wird weiterhin gezeigt, dass die Interaktion zwischen SLAH3 und CPK21 deutlich, durch eine ABA-Applikation von außen, induziert werden kann (Abbildung 3.3, Seite 111; Abbildung 3.4, Seite 113 und Abbildung 3.5, Seite 115). Diese gesteigerte Interaktion konnte mittels AB-FRET am deutlichsten in der Plasmamembran der untersuchten Zellen beobachtet werden (Abbildung 3.6, Seite 116). Dies unterstützt zunächst die Aussage, dass SLAH3 und CPK21 in Membrandomänen ABA-abhängig miteinander interagieren und der Anionenkanal dann aktiviert wird. Wenn die Phosphatase ABI, zusätzlich koexprimiert wird, wird diese gesteigerte Interaktion zwischen SLAH3 und CPK21 aufgehoben. Die Anwesenheit von ABI1 unterbindet nachweislich die Phosphorylierung und somit die Aktivierung von SLAH3 (Geiger *et al.*, 2011). Der zusätzlich koexprimierte ABA-Rezeptor RCAR1/PYL9 kann nach Bindung von ABA wiederum die Phosphatase binden und somit deren inhibierende Wirkung auf die Aktivierung des Anionenkanals SLAH3 verhindern (Abbildung 3.9, Seite 119).

Die untersuchte Kinase CPK21 phosphoryliert den Anionenkanal SLAH3 an verschiedenen Stellen im N- (Geiger *et al.*, 2011) und C-Terminus (Nühse *et al.*, 2003) und löst dessen ABA-vermittelte Verlagerung in Membrandomänen und somit dessen Aktivierung aus

(Abbildung 4.1). SLAH3 bewirkt den Chlorid- und Nitratausstrom und somit die für den Stomaschluss wichtige Membrandepolarisation. SLAH3 besitzt drei putative Palmitoylierungsstellen, von denen zwei C-terminal nahe der letzten Transmembrandomäne lokalisiert sind. Solche Palmitoylierungsstellen nahe Transmembrandomänen sind mögliche Signale für die Lokalisierung des betreffenden Proteins in Membrandomänen, so wie es für das virale Hämagglutinin aufgezeigt wurde (Scolari *et al.*, 2009).



**Abbildung 4.1: Model der Interaktion von SLAH3, CPK21 und ABI1 an der pflanzlichen Plasmamembran**

CPK21 ist eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Proteinkinase, die durch myristoylierte und palmitoylierte Lipidanker mit Membrandomänen der Plasmamembran assoziiert ist. In Abwesenheit von ABA (linke Bildhälfte) wird die Autophosphorylierung von CPK21 durch direkte Interaktion mit der PP2C-Proteinphosphatase ABI1 verhindert und SLAH3 kann nicht aktiviert werden. In Anwesenheit von ABA (rechts), bildet ABA einen Komplex mit einem zytoplasmatischen ABA-Rezeptor der RCAR/PYR/PYL-Familie. Dieser ABA-Rezeptorkomplex interagiert direkt mit der Phosphatase ABI1 und hält diese inaktiv. Dadurch kann die Kinase CPK21 autophosphoryliert werden, und durch Interaktion den nun in Membrandomänen lokalisierten Anionenkanal SLAH3 phosphorylieren und somit aktivieren. In Folge dessen kommt es zu einem Chlorid- und Nitratausstrom, also zu einer Depolarisierung der Plasmamembran. Der sich anschließende  $\text{K}^+$ -Ausstrom führt letztendlich zum Stomaschluss als Reaktion auf Trockenstress.

Sobald ABI1 in den transfizierten Oozyten anwesend und aktiv ist, ist SLAH3 nicht mehr in Membrandomänen lokalisiert und es kann keine SLAH3-Aktivität gemessen werden (Demir *et al.*, 2013). Die PP2C-Phosphatase ABI1 unterdrückt durch direkte Interaktion die Autophosphorylierung und Aktivierung von CPK21 und verhindert so die Phosphorylierung von SLAH3 (Abbildung 4.1). Die Deaktivierung von ABI1 kann durch die direkte Bindung von ABA mit dem ABA-Rezeptor RCAR1/PYL9 und durch Interaktion dieses Komplexes mit ABI1 erfolgen (Miyazono *et al.*, 2009). Als Zusammenfassung der voran gegangenen Arbeit (Demir *et al.*, 2013) und dieser Arbeit, lässt sich festhalten, dass die Proteinkinase CPK21 und der Anionenkanal SLAH3 einen in Membrandomänen lokalisierten Signalkomplex bilden, der bei Anwesenheit von ABA den Stomaschluss bewirkt. In Abwesenheit von ABA, ist die PP2C-Proteinphosphatase ABI1 aktiv. Dadurch

wird die Kinaseaktivität von CPK21 inhibiert und die Membrandomänenlokalisierung von SLAH3, dessen Aktivierung und somit der Stomaschluss verhindert. Darüber wie die ABA-vermittelte Lokalisierungsänderung von SLAH3 in die Membrandomänen vermittelt wird, können nur Vermutungen angestellt werden. So lange die Natur der Dynamik und der Entstehungsprozess von Membrandomänen nur so unzureichend verstanden sind, sind diese Vermutungen rein spekulativ.

In der Plasmamembran der Epithelzellen der Säugetierlunge ist ein funktionell ähnlicher Proteinkomplex beschrieben worden. Der Chloridkanal CFTR („cystic fibrosis conductance regulator“) ist nachweislich in Membrandomänen lokalisiert und interagiert mit der Proteintyrosinkinase c-Src (Dudez *et al.*, 2008). Dabei korreliert die Menge an exprimiertem CFTR mit der in isolierten DRMs lokalisierten c-Src-Kinase. Auf ähnliche Weise wie in *Arabidopsis thaliana* der Anionenkanal SLAH3 mit der Kinase CPK21 interagiert, führt auch eine Interaktion von CFTR und c-Src zu einer Aktivierung des Chloridtransportes in Säugetierzellen. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass es sich bei dieser Kolo-kalisation von Ionenkanälen und ihren aktivierenden Kinasen in Membrandomänen um eine lokal begrenzte funktionelle Einheit handelt, um eine schnelle Signaltransduktion zu gewährleisten.

#### **4.1.3 Die membranständige Kinase Snrk2.7 aktiviert die NADPH-Oxidase AtrbohD**

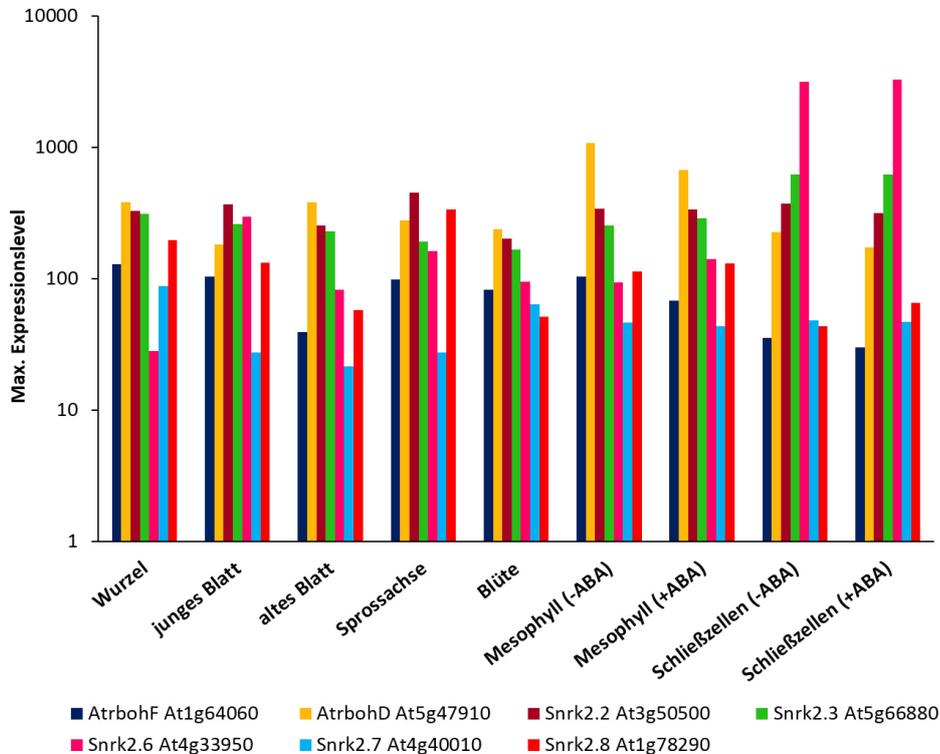
In den ersten durchgeführten Lokalisierungsexperimenten mit dem etablierten Membrandomänenmarker AtRem1.3 zeigte sich zum einen eine Expression der beiden Oxidasen AtrbohD und AtrbohF in einem klaren punktierten Muster über die gesamte Plasmamembran (Abbildung 3.10, Seite 121), zum zweiten war nur das Expressionsmuster der AtrbohF mit dem des Membrandomänenmarkers kolo-kalisiert. Die Oxidase AtrbohD lokalisiert in anderen distinkten Membranbereichen, was bedeutet, dass AtrbohD in einer anderen Art von Membrandomänen lokalisiert sein müsste, als die nahe verwandte NADPH-Oxidase AtrbohF (Abbildung 3.11, Seite 121). Diese durch AtrbohD besetzten Domänen werden durch das AtRemorin1.4 markiert (Abbildung 3.15, Seite 126). Wie erwartet ist die Domänenlokalisierung von AtrbohD wie die des kolo-kalisierenden Remorins AtRem1.4 von einer sterolreichen Umgebung abhängig. Werden transient mit der fluoreszent markierten Oxidase AtrbohD transfizierte Zellen von *Nicotiana benthamiana* mit 50µM MCD behandelt, wird das distinkte, punktierte Expressionsmuster der Oxidase zu einer homogenen Verteilung über die gesamte Plasmamembran aufgelöst (Abbildung 3.13, Seite 123). Diese Experimente bestätigen, dass die NADPH-Oxidase AtrbohD, auch wenn sie in den zuvor isolierten DRMs nur als schwach von einer sterolreichen Umgebung abhängig (Tabelle 3.1, Seite 108) identifiziert wurde, auf jeden Fall ein, in distinkten, sterolreichen Membrandomänen lokalisiertes Enzym ist.

Die beschriebene, distinkte Lokalisation beider NADPH-Oxidasen in unterschiedlichen Nanodomänen spezialisiert, lässt vermuten, dass beide NADPH-Oxidasen in unterschiedlichen Signalwegen angesteuert werden. Da man aber zu diesem Zeitpunkt dieser Arbeit keine detaillierten Informationen über den genauen Wirkmechanismus der AtrbohD, das heißt vor allem, über die einzelnen Schritte der zur Aktivierung führenden Signalkaskade hatte, war es zunächst notwendig eine interagierende und aktivierende Kinase zu identifizieren, um anschließend vergleichende Analysen zwischen den beiden verwandten NADPH-Oxidasen AtrbohD und AtrbohF durchführen zu können.

Die Snrk2-Kinase OST1 interagiert mit der in Membrandomänen lokalisierten NADPH-Oxidase AtrbohF und phosphoryliert diese an den Serinresten S13 und S174, wodurch die Oxidase und somit die ROS-Produktion der Zelle aktiviert wird (Sirichandra *et al.*, 2009). Die Familie der Snrk2-Kinasen besteht im *Arabidopsis*-Genom aus 10 Mitgliedern (Snrk2.1 – Snrk2.10) und kann in drei Untergruppen aufgeteilt werden (Kobayashi *et al.*, 2004). Die Snrks 2.2, 2.3 und 2.6 (OST1) werden stark ABA-abhängig aktiviert und haben essentielle Funktionen bei der positiven Regulation von ABA-Signalprozessen (Mustilli *et al.*, 2002). Diese drei Snrk2-Kinasen spielen Schlüsselrollen in ABA-Signaltransduktionsprozessen, welche auch die ABA-Rezeptoren vom RCAR/PYR/PYL-Typ und vor allem die PP2C-Phosphatasen ABI1 und ABI2 einschließen (Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009 und Umezawa *et al.*, 2009). Die Kinase Snrk2.8 wird vor allem durch Trockenstress aktiviert und spielt weiterhin eine wichtige Rolle bei der Regulation von metabolischen Prozessen während des Pflanzenwachstums (Shin *et al.*, 2007). Genau wie diese Snrk2-Kinase wird Snrk2.7 vor allem durch eine hohe Osmolarität und nur schwach durch den Einfluss von ABA aktiviert (Boudsocq *et al.*, 2004; Winter *et al.*, 2007). Quantitative Transkriptomanalysen ergeben, dass alle Snrk2-Kinasen in der ganzen Pflanze exprimiert werden. Snrk2.2 und Snrk2.6/OST1 werden verstärkt in den Schließzellen exprimiert. Snrk2.7 wird am deutlichsten in den Wurzeln, in den Blättern und in der Blüte exprimiert (Abbildung 4.2; Mizoguchi *et al.*, 2010). Im Allgemeinen sind vor allem die Snrk2-Kinasen 2.2, 2.3, 2.7, 2.8 und OST1 im Mesophyll stark exprimiert (*Arabidopsis* eFP Browser at bar.utoronto.ca), weshalb unter diesen fünf ausgewählten Snrk2-Kinasen ein Interaktionspartner für die in den vorangegangenen DRM-Präparationen identifizierte Oxidase AtrbohD, welche am stärksten im Mesophyll lokalisiert ist (Tabelle 3.1, Seite 108; Abbildung 4.2; Kwak *et al.*, 2003), vermutet wurde.

Die fünf ausgewählten Snrk2-Kinasen sind zwar eindeutig in der Plasmamembran der transfizierten Zellen exprimiert, im Gegensatz zu der Oxidase AtrbohD aber nicht in distinkten Membrandomänen (Abbildung 3.21, Seite 131). Dies entspricht einer bereits zuvor publizierten Untersuchung, die gezeigt hat, dass die Kinasen Snrk2.2, 2.3 und OST1 in den Kotyledonen von embryonalen transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen zwar ein durchaus punktiertes Expressionsmuster zeigen, nicht aber in Wildtyp-Pflanzen (Nakashima *et al.*, 2009). Weiterhin wurde in dieser Veröffentlichung beschrieben, dass diese drei Snrk2-Kinasen im Zellkern lokalisiert sind. Auch die Kinasen Snrk2.7 und Snrk2.8 sind laut publizierten Untersuchungen im Zellkern exprimiert (Mizoguchi *et al.*, 2010). In

der im Laufe dieser Arbeit durchgeführten Expressionsanalyse, zeigte sich ebenfalls diese Lokalisierung aller fünf ausgewählten Snrk2-Kinasen im Zellkern (Abbildung 3.21, Seite 131), wodurch die korrekte intrazelluläre Expression der Snrk2-Kinasen auch für die folgenden Interaktionsversuche bestätigt werden konnte.



#### Abbildung 4.2: Fünf der Snrk2-Kinasen sind in Blättern und im Mesophyll exprimiert

Für Interaktionsanalysen mit der hauptsächlich im Mesophyll lokalisierten AtrbohD wurden unter den zehn in *Arabidopsis thaliana* exprimierten Snrk2-Kinasen aus in Datenbanken abgelegten Expressionsanalysen (Arabidopsis eFP Browser at bar.utoronto.ca, Winter *et al.*, 2007) die Vertreter gegenübergestellt, die ebenfalls verstärkt im Mesophyll exprimiert sind. Dabei handelt es sich um Snrk2.2, Snrk2.3, Snrk2.6/OST1, Snrk2.7 und Snrk2.8.

##### 4.1.3.1 Snrk2.7 und OST1 interagieren mit AtrbohD

Die ersten Interaktionsanalysen wurden in Form von BiFC-Experimenten im heterologen Oozytensystem durchgeführt (siehe 2.8.2.1, Seite 89). In diesem Expressionssystem sollten potentieller Interaktionspartner für die Oxidase AtrbohD identifiziert werden. In den Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* werden beide mit einem vollständigen Fluorophor markierten Oxidasen exprimiert, AtrbohD dabei stärker als AtrbohF (Abbildung 3.22, Seite 132). Die Funktionalität des experimentellen Systems zeigt sich darin, dass die, mit einer Fluorophorhälfte markierten Oxidasen nicht mit den einzelnen jeweils komplementären Fluorophorhälften interagieren. Falsch positive Signale können somit nahezu ausgeschlossen werden. Die bereits publizierte Interaktion zwischen AtrbohF und OST1 (Sirichandra *et al.*, 2009) diente als Positivkontrolle und ließ sich in

diesem Experiment auch bestätigen. Weiterhin ließ sich eine deutliche Interaktion zwischen AtrbohD und OST1 bzw. Snrk2.7 anhand einer Komplementation der beiden fusionierten komplementären Fluorophorhälften nachweisen (Abbildung 3.22, Seite 132). Mit Hilfe der BiFC-Methode konnten also in einem heterologen System zwei potentielle Interaktionspartner für AtrbohD identifiziert werden.

Da sich die Plasmamembran von amphibischen Zellen strukturell von der in Pflanzenzellen deutlich unterscheidet, wurde dieser Versuch analog in *Arabidopsis*-Mesophyllprotoplasten durchgeführt. Zunächst bestätigte sich die membranständige Expression der C-terminal mit YFP fusionierten Oxidase AtrbohD. Auch konnte erneut die Gefahr von falsch positiv auftretenden Fluoreszenzsignalen, die durch die Affinität der beiden Fluorophorhälften zueinander bedingt sein könnte, ausgeschlossen werden, da erneut kein BiFC-Signal, resultierend aus einer Komplementation der markierten Oxidase und der einzelnen komplementären Fluorophorhälfte, detektiert werden konnte. Die mit Abstand deutlichsten Fluoreszenzsignale ergab die Koexpression der BiFC-Konstrukte von AtrbohD und Snrk2.7, aber auch mit der Snrk2.8-Kinase scheint AtrbohD in diesem Experiment zu interagieren. Die Oxidase AtrbohF war in diesem System nicht detektierbar, was daran liegen kann, dass eine C-terminale Markierung mit dem Fluorophor erfolgte. In einigen Publikationen wird diese Oxidase N-terminal markiert, weil festgestellt wurde, dass sie, wenn C-terminal markiert, keine Aktivität und wahrscheinlich auch keine Membranverankerung mehr zeigt (Sirichandra *et al.*, 2009 ; Kimura *et al.*, 2011). Vermutlich besitzt die Oxidase AtrbohF C-terminale Sequenzen, die für Lipid-vermittelte Proteinmodifikationen (siehe 1.1.4, Seite 18) und somit für die Assoziation mit der Plasmamembran benötigt werden. Da die Interaktionsanalysen mittels BiFC vor allem der Gewinnung von ersten Erkenntnissen dienen, auf die später detailliertere Analysemethoden folgen sollten, wurden die BiFC-Messungen zunächst nicht mit der N-terminal markierten Oxidase AtrbohF wiederholt. In allen folgenden Interaktions- und Funktionsanalysen aber, wurde AtrbohF fortan immer N-terminal markiert. Im Falle der Oxidase AtrbohD scheint dieses Problem nicht existent zu sein, da in all den durchgeführten Experimenten keine Beeinträchtigung der Lokalisierung oder der Aktivierung, durch eine C-terminale Fusion zu beobachten war.

Die BiFC-Methode eignet sich gut, um nur wenig Zeit für die Gewinnung von ersten Einblick-gebenden Ergebnissen aufzubringen. Ein erster potentieller Interaktionspartner, der bisher in den ersten beiden durchgeführten Analysen identifiziert werden konnte, ist die Kinase Snrk2.7. Die ebenfalls im Protoplastensystem durchgeführte SE-FRET-Methode (siehe 2.8.2.2, Seite 89) lieferte ebenfalls dieses Ergebnis (Abbildung 3.24, Seite 136). Für diesen Versuch wurde AtrbohF N-terminal markiert und AtrbohD weiterhin C-terminal mit dem Donorfluorophor markiert. Sehr deutlich lässt sich erneut die publizierte Interaktion zwischen AtrbohF und OST1 bestätigen, wodurch dieses experimentelle System als funktionell angesehen werden kann.

Eine weitere Methode, die zwar etwas mehr Zeit in Anspruch nimmt, aber wesentlich deutlichere und statistisch besser abgesicherte Ergebnisse liefert, ist die AB-FRET-

Methode (siehe 2.8.2.3, Seite 91). Wie bereits erwähnt war zu dieser Zeit noch kein Interaktionspartner spezifisch für die Oxidase AtrbohD beschrieben, weshalb in Ermangelung einer anderen Positivkontrolle der mittlere Wert der FRET-Effizienz ( $E_{\text{FRET}}$ ) und somit der Interaktion zwischen AtrbohF und OST1 als der Wert festgelegt wurde, der als Mindestwert eine positive Interaktion beschreibt. Anhand dieses Grenzwertes (rote Linie in Abbildung 3.25, Seite 137) konnte eine Interaktion der Oxidase AtrbohF mit den Snrk2-Kinase 2.2 und 2.7 beobachtet werden und für die Oxidase AtrbohD mit den Kinasen Snrk2.8 und OST1, aber erneut am deutlichsten mit der Kinase Snrk2.7 (Abbildung 3.25, Seite 137).

Betrachtet man alle durchgeführten Interaktionsexperimente (BiFC; SE-FRET, AB-FRET) und bewertet sie quantitativ, zeigt sich, dass die NADPH-Oxidase AtrbohF nicht nur wie bereits beschrieben (Sirichandra *et al.*, 2009) mit der Kinase OST1 interagiert, sondern im Vergleich zu dieser, ebenfalls die Kinasen Snrk2.2 und Snrk2.7 als potentielle Interaktionspartner in Frage kommen (Tabelle 3.2, Seite 138). Für die NADPH-Oxidase AtrbohD konnten ebenfalls zwei potentielle Interaktionspartner identifiziert werden. Genau wie AtrbohF scheint auch die zu 60% homologe Oxidase AtrbohD mit der Snrk2-Kinase OST1 zu interagieren und wesentlich deutlicher noch mit Snrk2.7.

Wie bereits zuvor beschrieben, kann die Behandlung von transient transfizierten Zellen mit MCD und die damit einhergehende Sterolreduktion, dazu führen, dass die Membrandomänenlokalisierung von Proteinen wie dem Membrandomänenmarker AtRem1.4 (Abbildung 3.18, Seite 128) und der Oxidase AtrbohD (Abbildung 3.13, Seite 123), auflöst wird und die entsprechend fluoreszenzmarkierten Proteine fortan homogen verteilt in der Plasmamembran detektiert werden. Um den Einfluss dieser Sterolreduktion auf die zuvor beobachteten Interaktionsereignisse zwischen den Oxidasen und den Kinasen zu untersuchen, wurden auch die zu diesem Zwecke transfizierten Zellen 30 min lang mit 50  $\mu\text{M}$  MCD behandelt. Hier galt es zu prüfen, ob eine Ausschleusung der Oxidasen aus den Membrandomänen durch Sterolreduktion wie im Falle des Anionenkanals SLAH3 (siehe 4.1.1.2) zu einer Verminderung der Aktivität führen würde, weil die Oxidasen außerhalb ihres präferierten, sterolreichen Umfeldes nicht mehr mit den sie phosphorylierenden Kinasen interagieren könnten. Tatsächlich aber zeigte sich ein deutlicher, signifikanter Anstieg der  $E_{\text{FRET}}$ , also der Interaktionseffizienzen zwischen beiden Oxidasen und den fünf ausgewählten Snrk2-Kinasen (Abbildung 3.25, Seite 137). In Anbetracht der Tatsache, dass die Snrk2-Kinasen nicht in Membrandomänen lokalisiert sind (Nakashima *et al.*, 2009), wäre daher zu vermuten, dass die Oxidasen generell erst dann mit den membranständigen Snrk2-Kinasen interagieren können, wenn sie ebenfalls nicht in Membrandomänen lokalisiert sind. Da eine Interaktion zwischen zwei Proteinen aber noch lange nicht mit einer daraus resultierenden funktionellen Regulierung dieser Proteine einhergeht, mussten anschließend funktionelle Analysen durchgeführt werden, um die Bedeutung der beobachteten Interaktionsereignisse beurteilen zu können.

## 4.1.3.2 Snrk2.7 aktiviert AtrbohD

Für Untersuchungen, die klären sollten, ob die Interaktion zwischen AtrbohD und OST1 bzw. Snrk2.7 die Grundlage für die Regulierung, also die Aktivierung der Oxidase ist, wurde das heterologe HEK-Zellsystem gewählt, da hier die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies („Reactive Oxygen Species“, ROS) in Echtzeit verfolgt werden kann. Diese Zellen exprimieren selbst keine NADPH-Oxidasen und zeigen somit keine Ca<sup>2+</sup>-abhängig regulierte ROS-Produktion. Somit konnte das Problem umgangen werden, dass pflanzliche rboh-Proteine nur sehr schwierig ausreichend stark in Systemen exprimiert werden können, in denen die ROS-Produktion in Echtzeit beobachtet und aufgezeichnet werden kann (Ai *et al.*, 2009).

Die ROS-Produktion der homologen NADPH-Oxidase AtrbohC zeigt in HEK-Zellen eine starke Korrelation mit ihrer Aktivität *in planta*. Zum Beispiel konnte in beiden Systemen gezeigt werden, dass die E250A-Mutante der Oxidase AtrbohC eine geringere ROS-Produktion aufzeigt als die Wildtyp-Version (Takeda *et al.*, 2008). Das bedeutet, dass Ergebnisse, die unter Verwendung des heterologen Systems gewonnen werden können, vermutlich denen *in planta* ähneln und deshalb als aussagekräftig angesehen werden können.

Die Plasmamembran von tierischen Zellen unterscheidet sich deutlich von der in pflanzlichen Systemen: so herrschen natürlich tierische Sterole, wie Cholesterol vor. Auch der Charakter des apoplastischen Raumes unterscheidet sich deutlich, da die pflanzliche Plasmamembran noch nach außen hin an die Zellwand angrenzt. Dennoch zeigt sich nach Überexpression der beiden homologen NADPH-Oxidasen nicht nur eine klare Membranlokalisierung der beiden Oxidasen, sondern weiterhin ein deutliches punktiertes Expressionsmuster (Abbildung 3.27, Seite 141 und Abbildung 3.29, Seite 142). Dies lässt die Annahme zu, dass die beiden pflanzlichen Oxidasen auch in tierischen Membranen eine Lokalisation in Membrandomänen aufzeigen und somit eine eindeutige Präferenz für sterolreiche Umgebungen haben. Die Art dieser Sterole scheint für die Lokalisierung der Oxidasen aber keine entscheidende Rolle zu spielen.

Erkenntnisse über die ROS-Produktion von NADPH-Oxidasen, die im HEK-Zellsystem oder *in planta* gewonnen wurden, sind, wie oben bereits erwähnt, durchaus vergleichbar. Um sicher zu stellen, dass dies auch im Falle der durchzuführenden Analysen zutrifft, also ob die geplanten ROS-Messungen tatsächlich Ergebnisse liefern, die auf das pflanzliche System angewendet werden können, wurde zunächst im gewählten HEK-Zellsystem erneut die Interaktion zwischen AtrbohD und den fünf Snrk2-Kinasen via AB-FRET überprüft. Als Positivkontrolle konnte ab diesem Zeitpunkt die Kinase CPK5 eingesetzt werden, die zuvor in der Arbeitsgruppe unserer Kooperationspartnerin Prof. T. Romeis als phosphorylierender Interaktionspartner von AtrbohD in der Reaktion auf Pathogenbefall identifiziert werden konnte (Dubiella *et al.*, 2013). Damit stand nun ein positiver Interaktionspartner für die Oxidase AtrbohD selbst zu Verfügung und es musste nicht länger die Interaktion zwischen der homologen Oxidase AtrbohF und OST1

(Sirichandra *et al.*, 2009) zum Vergleich und zur Verifizierung positiver Ergebnisse herangezogen werden.

Auch im HEK-Zell-basierten AB-FRET konnte erneut eine deutliche Interaktion zwischen AtrbohD und Snrk2.7 festgestellt werden, aber im Vergleich zu demselben Versuch im pflanzlichen System, ist diese Interaktion diesmal wesentlich eindeutiger und im Vergleich zur Positivkontrolle besser herauszuheben (Abbildung 3.28, Seite 142). Das liegt sicher daran, dass in tierischen Zellen weniger störende Einflüsse, wie endogen aktive NADPH-Oxidasen, Kinasen und Phosphatasen, die Messungen beeinflussen können. Erneut zeigt sich, genau wie im pflanzlichen System, ein deutlicher Anstieg der Interaktionseffizienz nachdem die transfizierten Zellen zusätzlich mit 50µM MCD behandelt wurden, d.h. auch hier erscheint die Interaktion der beiden Partner erhöht, sobald die Kompartimentierung der PM durch die Sterolreduktion aufgehoben wird.

Die Bestätigung der Funktionalität des experimentellen Systems zu Messung der durch die Oxidase AtrbohD produzierten ROS erfolgte zunächst durch Überexpression des bereits beschriebenen funktionellen Oxidase-Kinase-Paares AtrbohF und OST1. Auch wenn nur die Oxidase AtrbohF überexprimiert wurde, war nach Behandlung mit Ionomycin eine anfängliche ROS-Produktion messbar. Jedoch wurde diese ROS-Produktion deutlich gesteigert, wenn die Oxidase durch die koexprimierte Kinase OST1 phosphoryliert werden konnte (Abbildung 3.30 oben, Seite 143). Auch die Oxidase AtrbohD zeigt, nach dem Auslösen eines Anstieges der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration durch Behandlung der Zellen mit Ionomycin, eine gewisse anfängliche ROS-Produktion. Wurden die Kinasen CPK5 und Snrk2.7 koexprimiert, war ein signifikanter Anstieg der kurzzeitigen ROS-Produktion messbar. Die Koexpression der Kinase OST1 führte hingegen nicht zu einem Anstieg der AtrbohD-vermittelten ROS-Produktion (Abbildung 3.30 unten, Seite 143 und Abbildung 3.31, Seite 144). Wurden die transfizierten HEK-Zellen mit 50µM MCD behandelt, zeigte sich, dass die Oxidase AtrbohD allein nicht in der Lage ist mehr ROS zu produzieren. Wird aber die Kinase Snrk2.7 koexprimiert, kommt es durch MCD-Behandlung zu einem signifikanten Anstieg der AtrbohD-vermittelten ROS-Produktion. Die Behandlung der Zellen mit MCD hat hingegen kaum Einfluss auf die Produktion von ROS, wenn die behandelten Zellen die Oxidase AtrbohD und die Kinase OST1 exprimieren. In diesem Falle ist nur ein sehr geringer Anstieg der ROS-Produktion zu verzeichnen.

In diesem Falle scheint es, als ob die Kinase OST1 zwar mit der NADPH-Oxidase AtrbohD interagieren kann, diese aber entweder nicht zu aktivieren vermag, oder nicht allein dazu in der Lage ist. Die Oxidase AtrbohD besitzt zahlreiche Phosphorylierungsstellen und es wäre möglich, dass zuerst eine andere Kinase, wie zum Beispiel CPK5, eine Phosphorylierungsstelle von AtrbohD phosphorylieren muss, damit anschließend – z.B. durch eine daraus resultierende Konformationsänderung - OST1 mit AtrbohD interagieren und die Oxidase weiter phosphorylieren kann. Die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Kinase CPK5 phosphoryliert vor allem die Position S347 der Oxidase AtrbohD und nicht die Position S343 (Dubiella *et al.*, 2013). Eventuell könnte diese zweite

Phosphorylierungsstelle diejenige sein, die von  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Kinasen, wie OST1, phosphoryliert werden kann.

Für Phosphorylierungsanalysen steht bisher lediglich ein einziges synthetisiertes Peptid von AtrbohD, welches die zu phosphorylierende Aminosäure S39 beinhaltet (fett markiert), zur Verfügung: GAFSGPLGRPK. Diese Position kann ebenfalls durch die Kinase CPK5 phosphoryliert werden (Dubiella *et al.*, 2013). Dies bestätigt sich auch in den hier durchgeführten Messungen, die deutlich zeigen, dass das phosphorylierte Peptid der Oxidase AtrbohD vor allem dann in isolierten Endomembranfraktionen aus HEK-Zellen identifiziert werden konnte, wenn die transfizierten Zellen zuvor mit MCD oder Ionomycin behandelt wurden. Dabei hat MCD einen geringeren Einfluss auf die CPK5-vermittelte Phosphorylierung von AtrbohD als Ionomycin. Unphosphoryliertes Peptid taucht nur in Membranfraktionen auf, die zuvor nicht mit MCD oder Ionomycin behandelt worden waren. Die Kinase Snrk2.7 kann die Oxidase AtrbohD zwar ebenfalls deutlich stärker phosphorylieren, wenn die Zellen zuvor mit MCD behandelt wurden und in unbehandelten Membranfraktionen kann eine höhere Intensität an unphosphoryliertem Peptid identifiziert werden, die Unterschiede an phosphoryliertem und unphosphoryliertem Peptid sind an sich aber deutlich zu gering um eine phosphorylierende Funktion der Kinase Snrk2.7 an der Position S39 der Oxidase AtrbohD annehmen zu können.

#### 4.1.3.3 Ihre Lokalisierung in Membrandomänen beeinflusst die Funktion der NADPH-Oxidase AtrbohD negativ

Die NADPH-Oxidase AtrbohD wird meist synergistisch durch eine Kinase-vermittelte Phosphorylierung der beiden EF-Hand-Motive und durch die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  und einer daraus resultierenden Konformationsänderung aktiviert (Ogasawara *et al.*, 2008). Vermutlich hat auch die Lokalisierung der Oxidase in distinkten, sterolreichen Membrandomänen einen Einfluss auf die ROS-Syntheseaktivität (Hao *et al.*, 2014). Lange Zeit waren aber keine interagierenden Kinasen, die zur Aktivierung der Oxidase AtrbohD beitragen konnten bekannt. Erst im Jahre 2013 konnte mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen CPK5 ein funktioneller Interaktionspartner der Oxidase AtrbohD identifiziert werden (Dubiella *et al.*, 2013). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Snrk2-Kinase OST1 wird ABA-abhängig reguliert und spielt eine wichtige Rolle in generellen Antworten auf osmotischen Stress, wie dem Stomaschluss (Mustilli *et al.*, 2002). Auch die homologe NADPH-Oxidase AtrbohF vermittelt nachweislich die Schließzellantwort durch ROS-vermittelte Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen und somit durch die Regulation der ABA-induzierten, zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Kwak *et al.*, 2003), deshalb ist es nicht weiter verwunderlich, dass zwischen diesen beiden Proteinen eine Interaktion nachgewiesen werden konnte (Sirichandra *et al.*, 2009).

In den durchgeführten Interaktionsanalysen zeigte sich, dass sowohl die stark ABA-abhängige Snrk2-Kinase OST, als auch die nur schwach ABA-abhängige Snrk2-Kinase Snrk2.7 mit AtrbohD interagieren können (Tabelle 3.2, Seite 138). Die Kinase Snrk2.7 ist bisher nur unzureichend analysiert worden. Man weiß lediglich, dass sie, genau wie OST1, mit Vertretern der PP2C-Phosphatasen interagieren kann (Umezawa *et al.*, 2009). Ob diese Interaktionen *in vivo* auch zu einer Inaktivierung von Snrk2.7 führen kann, ist bisher noch unklar. Funktionell kann über die Snrk2.7 bisher nur spekuliert werden. Da Mutanten der nahe verwandten Kinase Snrk2.8 eine hypersensitive Antwort auf Trockenstress zeigten, schließt man, dass die Kinasen der Snrk2-Gruppe II, also Snrk2.7 und Snrk2.8, Reaktionen auf osmotischen Stress regulieren (Boudsocq *et al.*, 2004). Bisher konnte keine Beteiligung dieser beiden Kinasen an ABA-vermittelten Stressantworten nachgewiesen werden.

Die Oxidase AtrbohD wird sowohl in Schließzellen als auch im Mesophyll exprimiert (Kwak *et al.*, 2003) und zeigt eine deutlich stärkere ROS-Produktion als die homologe Oxidase AtrbohF (Kimura *et al.*, 2011). Beide Oxidasen spielen nicht nur eine Rolle bei der Vermittlung des Stomaschlusses (Keller *et al.*, 1998), sondern haben auch einen Anteil an der PAMP/MAMP-vermittelten ROS-Produktion (Benshop *et al.*, 2007; Sirichandra *et al.*, 2009; Dubiella *et al.*, 2013). Deshalb und weil die Menge an ROS, die durch die Oxidase AtrbohD gebildet wird, deutlich größer ist, kann man davon ausgehen, dass diese Oxidase den Hauptteil, der in Abwehrreaktionen benötigten ROS zur Verfügung stellt. Ob nun auch die, als putativer Interaktionspartner identifizierte Kinase Snrk2.7, eine Rolle in der Pathogenabwehr spielt, sollte sich zukünftig an Hand der *snrk2.7*-Mutante in einem Pathogentest herausfinden lassen.

Sicher ist, dass die Koexpression der Oxidase AtrbohD und Snrk2.7, im Vergleich zur Reaktion der allein exprimierten Oxidase, zu einer deutlichen erhöhten ROS-Produktion führt. Die zuvor beobachtete Interaktion kann somit auch als funktionell relevant für die Aktivität der Oxidase bestätigt werden. Dies steht im Gegensatz zum Fall der Koexpression von AtrbohD und OST1. Obwohl zuvor eine Interaktion beobachtet werden konnte, zeigt sich, dass OST1 anscheinend nicht in der Lage ist die Oxidase AtrbohD ohne weiteres zu phosphorylieren und zu aktivieren. Das kann entweder bedeuten, dass OST1 prinzipiell keine der Phosphorylierungsstellen der Oxidase AtrbohD ansteuern kann, oder dass dies erst geschehen kann, nachdem eine andere Kinase zuvor erfolgreich eine andere Phosphorylierungsstelle phosphoryliert hat. Bei dieser anderen Kinase könnte es sich um die Kinase CPK5 handeln, welche bereits als Interaktionspartner von AtrbohD und somit an der Abwehr von Pathogenen beteiligt, beschrieben wurde (Dubiella *et al.*, 2013). Diese beiden Fragen sollten ebenfalls zukünftig zu beantworten sein. Wenn die beiden Kinasen CPK5 und OST1 zusammen mit der Oxidase überexprimiert, eine deutlich stärkere ROS-Produktion aufweisen, als wenn die Oxidase nur mit einer der beiden Kinasen koexprimiert wurde, wäre bewiesen, dass OST1 die Oxidase AtrbohD zusätzlich phosphorylieren kann, nachdem bereits eine andere Kinase eine andere Phosphorylierungsstelle angenommen hat. Da die Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Kinasen, wie CPK5

vorrangig die Position S347 der Oxidase phosphorylieren (Dubiella *et al.*, 2013) und es sich bei dieser Position um eine von zwei als essentiell beschriebenen Phosphorylierungsstellen handelt (Nühse *et al.*, 2007), ist es wahrscheinlich, dass die zweite Phosphorylierungsstelle S343, diejenige ist, die die Kinase Snrk2.7 ansteuern kann. Stimmt diese Vermutung, ist es keine Überraschung, dass Snrk2.7 kaum in der Lage ist, die Position S39, welche für unsere Messungen als einzige Matrize zur Verfügung stand, zu phosphorylieren. Aber auch an dieser Stelle kann die noch im Raum stehende Frage durch einen gewissen experimentellen Aufwand und durch Benutzung der Peptide, die die Position S347 beinhalten, geklärt werden.

Die homologe NADPH-Oxidase AtrbohF, für die vor allem eine Beteiligung an der Regulation des hypersensitiven Zelltodes angenommen wird, ist mit dem Membrandomänenmarker AtRem1.3 kolokalisiert. Das bedeutet, beide Proteine kommen zur selben Zeit am selben Ort in der Zelle vor. Die Oxidase AtrbohD ist hingegen nicht mit diesem Remorin kolokalisiert. Mit dem AtRem1.4 konnte aber ein Marker für **diejenige** Sorte Membrandomänen identifiziert werden, in denen die Oxidase AtrbohD detektiert wird. Das bestätigt zum einen, dass es unterschiedliche Arten von Membrandomänen mit unterschiedlichem Aufbau und unterschiedlichen Charakteristika geben muss und zum zweiten, dass die Lokalisierung eines regulatorischen Proteins in einer bestimmten Art von Membrandomänen einen Einfluss auf dessen Funktion haben kann. Werden die beiden als essentiell beschriebenen Phosphorylierungsstellen S343 und S347 (Nühse *et al.*, 2007) jeweils einzeln ausgeschaltet, lokalisiert die so veränderte Oxidase nicht mehr in den AtRem1.4-markierten Membrandomänen (Abbildung 3.20, Seite 129). Dies könnte zum einen bedeuten, dass entweder die durch den Aminosäureaustausch von Serin (polar) zu Alanin (unpolar), auftretenden Ladungsunterschiede im Protein dessen andere Lokalisierung bedingen, oder ein anderer Regulierungsmechanismus zugrunde liegt. Nach Mutation der beiden essentiellen Aminosäuren kann aber weiterhin ein distinktes, punktiertes Expressionsmuster der Oxidase AtrbohD beobachtet werden. Diese Tatsache schließt zumindest aus, dass die Oxidase, wenn sie in ihrer Aktivierbarkeit gravierend verändert wird, generell nicht mehr in Membrandomänen lokalisiert ist. Vielleicht handelt es sich dann um eine andere Art von Membrandomänen und es sind dann vielleicht nicht mehr die richtigen Membrandomänen, in denen die Oxidase AtrbohD für eine korrekte funktionelle Regulation lokalisiert sein muss. Die genaue Analyse der Lokalisierung und auch der damit zusammenhängenden funktionellen Regulierung der Phosphorylierungsmutanten der Oxidase AtrbohD wird in dieser Arbeit aber nicht mehr geklärt und wird somit auf jeden Fall Gegenstand von zukünftigen weiterführenden Untersuchungen sein.

Dass die Lokalisation der Oxidase AtrbohD in Membrandomänen einen Einfluss auf deren funktionelle Regulierung hat, beweist die Tatsache, dass eine Sterolreduktion durch die Behandlung der entsprechend transfizierten Zellen mit dem Reagenz MCD eine grundlegend andere Lokalisierung (Abbildung 3.13, Seite 123) und Dynamik (Hao *et al.* 2014) der Oxidase mit sich bringt. Nach MCD-Behandlung kann AtrbohD vermehrt in der

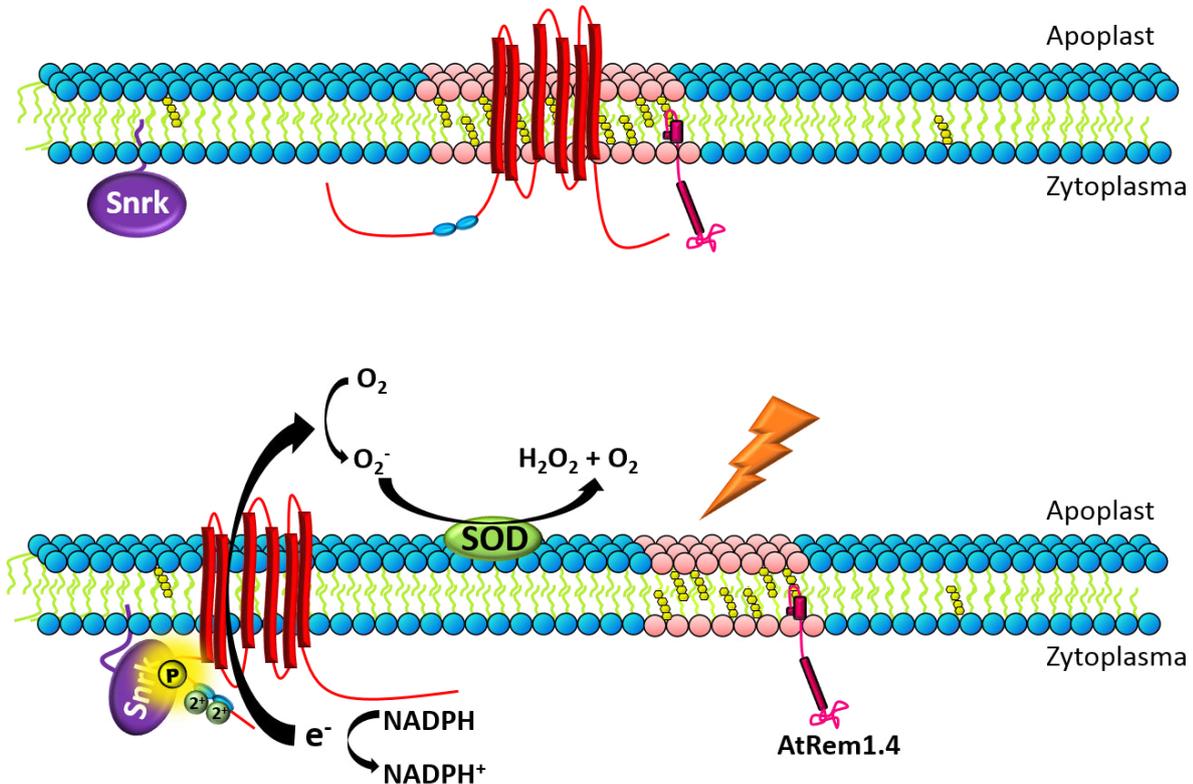
Detergenz-löslichen Fraktion, auch DSF genannt, identifiziert werden (Tabelle 3.1, Seite 108) und mittels FCS („Fluorescence Correlation Spectroscopy“)-Analysen konnte gezeigt werden, dass diese Behandlung dazu führt, dass die Oxidase AtrbohD in dichteren Clustern mit höheren Diffusionskoeffizienten lokalisiert ist. In ähnlicher Weise beeinflussen auch Effektoren der Oxidaseaktivität, wie  $\text{Ca}^{2+}$  oder Phosphorylierung, die Lokalisierung von AtrbohD (Hao *et al.*, 2014). Diese veränderte Lokalisation der Oxidase beeinflusst deren Tendenz mit den fünf ausgewählten Kinasen zu interagieren. Die durchgeführten Analysen zeigen in diesem Fall jeweils eine deutlich höhere Interaktionseffizienz und geben somit Grund zu der Annahme, dass die Oxidase durch diese Änderung ihrer Membranlokalisierung, freier wird, effektiver und somit deutlich stärker mit den fünf ausgewählten Kinasen zu interagieren. Da alle gemessenen Werte für die AtrbohD-Snrk-Interaktionen nach MCD-Gabe deutlich ansteigen (Abbildung 3.25 links, Seite 137; Abbildung 3.28, Seite 142), könnte man zu diesem Zeitpunkt auch annehmen, dass durch MCD-Behandlung einfach eine grundlegende inhibitorische Signalkomponente, z.B. eine Phosphatase, inhibiert und dadurch die Interaktionen gefördert werden können.

In den durchgeführten Analysen zur ROS-Produktion, also zur Aktivität der Oxidase, zeigte sich, dass der Einfluss von MCD einen signifikanten Anstieg der ROS-Produktion zur Folge hatte, wenn die Oxidase mit der Kinase Snrk2.7 koexprimiert war und somit phosphoryliert werden konnte (Abbildung 3.31, Seite 144). Die Oxidase allein oder mit OST1 exprimiert, zeigte nach MCD-Behandlung keine, oder nur eine geringfügig gesteigerte ROS-Produktion. Dieses Ergebnis zeigt erneut, dass eine Interaktion zwischen zwei Proteinen nicht unbedingt bedeutet, dass sich daraus ein regulierender Zusammenhang ergibt. Die Kinase OST1 zeigt ebenfalls eine Interaktion mit AtrbohD, welche ebenfalls signifikant durch die Behandlung mit MCD gesteigert werden kann. Auch für die Kinasen Snrk2.2, 2.3 und 2.8 ist eine sehr starke Interaktion mit AtrbohD nach MCD-Behandlung ersichtlich. Aber nur eine der ausgewählten Kinasen, Snrk2.7 scheint die Oxidase nach MCD-Behandlung verstärkt phosphorylieren und somit auch aktivieren zu können (Abbildung 3.30, Seite 143). Dass durch MCD-Behandlung lediglich eine inhibitorische Komponente entfernt wird, kann also für die induzierte Aktivität der Oxidase allein keine ausschlaggebende Rolle spielen.

Ausgehend von den bereits vorliegenden Erkenntnissen und den durchgeführten Analysen kann man unter der Voraussetzung weiterer, noch durchzuführender Untersuchungen, die zur detaillierteren Erkenntnisbildung noch durchgeführt werden müssen, ein Modell für die lokalierungsbedingte Regulation der NADPH-Oxidase AtrbohD vorschlagen:

Die Oxidase AtrbohD ist im Ruhezustand in sterolreichen Membrandomänen lokalisiert (Abbildung 4.3 oben), welche durch das Remorin AtRem1.4 markiert werden können. Die Oxidase wird durch diese Lokalisierung inaktiv gehalten. Dies würde eine Art Negativregulierung der Oxidase bedeuten, was auch Sinn machen würde, weil die Zelle normalerweise verhindern sollte, dass ROS, wenn sie nicht für Signalprozesse benötigt

werden, ihre toxische Wirkung auf die Integrität von Proteinen und der Zelle selbst ausüben können. Die ausgewählten Snrk2-Kinasen als potentielle Interaktionspartner sind nicht in Membrandomänen lokalisiert (Abbildung 3.21, Seite 131; Nakashima *et al.*, 2009), weshalb die Oxidase, solange sie in den Membrandomänen „festgehalten“ wird, nicht durch die entsprechenden Kinasen phosphoryliert und aktiviert werden kann.



#### Abbildung 4.3: Model der lokalierungsabhängigen Regulierung der NADPH-Oxidase AtrbohD

Oben: So lange die NADPH-Oxidase AtrbohD (rot) in den spezifischen, mit AtRem1.4-markierten Membrandomänen (rosa eingefärbte Membranbereiche) lokalisiert ist, kann sie zumindest nicht von der entsprechenden Snrk2-Kinase phosphoryliert werden, da diese Kinase nicht in Membrandomänen lokalisiert ist. Die Oxidase bleibt also inaktiv.

Unten: Ein spezifischer extrazellulärer Auslöser (z.B. ein PAMP/MAMP, orange) bewirkt den Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. Ca<sup>2+</sup> kann an die beiden EF-Hand-Motive (hellblau) der Oxidase binden. Dies bewirkt eine Konformationsänderung der Oxidase, wodurch diese evtl. aus den Membrandomänen ausgeschleust wird. Vielleicht bewirkt auch die Depolarisierung der Plasmamembran eine Verlagerung oder eine Auflösung der Membrandomänen. Die Oxidase kann nun mit der entsprechenden Snrk2-Kinase interagieren und dadurch phosphoryliert und somit aktiviert werden.

Wird ein Auslöser der Oxidaseaktivität, z.B. PAMPs/MAMPs („pathogen/microbe-associated molecular patterns“), an spezifischen Rezeptoren der Plasmamembran erkannt, steigt die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration (Schwessinger und Zipfel, 2008; Boller und Felix, 2009) an, wodurch Ca<sup>2+</sup> an die EF-Hand-Motive binden und somit eine Konformationsänderung der Oxidase auslösen kann. Diese Konformationsänderung

könnte wiederum dazu führen, dass die Oxidase aus den Membrandomänen ausgeschleust wird. Alternativ hierzu könnte der Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und die damit einhergehende Depolarisierung der Plasmamembran entweder eine Auflösung oder Verlagerung der Membrandomänen, oder lediglich die Ausschleusung der Oxidase aus den Membrandomänen bewirken, wodurch nun eine Interaktion mit der entsprechenden Snrk2-Kinase ermöglicht würde (Abbildung 4.3 unten). Durch diese Interaktion wird die Oxidase an spezifischen Positionen phosphoryliert und aktiviert. Dies führt dann zu einer schnellen Synthetisierung von ROS und somit zu transkriptionellen Umprogrammierungsprozessen und Veränderungen des Hormonhaushaltes, welche für die Einleitung der Resistenz gegen die betreffenden Stressfaktoren und -einflüsse benötigt werden.



## 5 Zusammenfassung

In vielen tierischen Zellen und in Hefe wurden Membrandomänen als Plattformen für die Etablierung von Signalkomplexen bereits gut beschrieben (Foster *et al.*, 2003) und entsprechend ihrer Resistenz gegenüber nicht-ionischen Detergenzien charakterisiert (Shogomori *et al.*, 2003). Die Behandlung von Membranen mit solchen Detergenzien kann zu Artefakten führen und die Anwesenheit eines Proteins in diesen so genannten „DRMs“ bedeutet noch nicht, dass es auch in nativen Membrandomänen lokalisiert ist. Allerdings muss man sich, mangels besserer Methoden zur Aufreinigung von Membrandomänen, heute noch der Methode der DRM-Aufreinigung durch Detergenzien bedienen, um eine erste Vorstellung von der Proteinzusammensetzung dieser bestimmten Membranbereiche zu erhalten.

Mittels Sterolreduktion der DRMs durch die Behandlung der isolierten Membranfraktionen mit MCD und anschließender HPLC-ESI-Massenspektrometrie, konnten 80 Proteine identifiziert werden, die somit als potentiell in Membrandomänen lokalisiert gelten können. Unter diesen befanden sich die beiden *Arabidopsis*-Remorine AtRem1.2 und AtRem1.3, die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Proteinkinase CPK21 und die Proteinphosphatase 2C ABI1. Dieses Phosphatase-Kinase-Paar reguliert den membranständigen, im Mesophyll exprimierten, Anionenkanal SLAH3 in ABA-abhängiger Weise (Geiger *et al.*, 2011). Mit Hilfe biochemischer, massenspektrometrischer und mikroskopischer Methoden konnte gezeigt werden, dass die Phosphatase ABI1 in Abwesenheit von ABA die Interaktion zwischen der Kinase CPK21 und dem Anionenkanal SLAH3 unterbindet. Dies geschieht indem SLAH3 und CPK21 aus den Membrandomänen in die umgebenden Membranbereiche verlagert werden und somit eine phosphorylierungsabhängige Aktivierung des Anionenkanals verhindert wird (Demir *et al.*, 2013).

Unter den in Nanodomänen lokalisiert Proteinen, konnte auch die NADPH-Oxidase AtrbohD als schwach sterolabhängig identifiziert werden. Diese zeigte im Gegensatz zu der homologen Oxidase AtrbohF, nach transienter Koexpression in *Arabidopsis*-Epidermiszellen zwar eine Lokalisation in distinkten Membrandomänen, aber keine Kolokalisation mit dem zuvor etablierten Membrandomänenmarker AtRem1.3 (Demir *et al.*, 2013). Dieses Ergebnis impliziert, dass es verschiedene Arten von Membrandomänen geben könnte und dass die beiden Oxidasen (zumindest zeitweise) in unterschiedlichen Membrankompartimenten lokalisiert und dadurch womöglich auch unterschiedlich reguliert sein können. Nach Koexpression der Oxidase AtrbohD mit den weiteren 12 der insgesamt 16 *Arabidopsis*-Remorinen, konnte eine Kolokalisation der Oxidase mit AtRem1.4 bestätigt werden. Das Remorin AtRem1.4 zeigt in weiteren Versuchen nicht nur eine deutliche Lokalisierung in anderen sterolreichen Membrandomänen als AtRem1.3, es zeigt auch eine eindeutige laterale Immobilität und kann somit als ein

Marker für Membrandomänen etabliert werden. Somit bestätigt sich die Annahme, dass es auch in Pflanzen unterschiedliche Arten von Membrankompartimenten gibt.

Zu diesem Zeitpunkt war noch kein, die Funktion der Oxidase regulierender Interaktionspartner von AtrbohD bekannt, um die Frage des Zusammenhangs zwischen Lokalisation und Funktion der Oxidase beantworten zu können. Mit Hilfe verschiedener mikroskopischer Techniken (BiFC, SE-FRET, AB-FRET) zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen, konnte aus einer Auswahl von fünf Mesophyll-lokalisierten und  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Snrk2-Kinasen, zwei potentielle Interaktionspartner identifiziert werden. Genau wie mit der homologen Oxidase AtrbohF (Sirichandra *et al.*, 2007), interagiert die ABA-abhängige Kinase OST1/Snrk2.6 auch mit AtrbohD. Bei dem zweiten potentiellen Interaktionspartner handelt es sich um Snrk2.7. Die Behandlung der transfizierten und in den Interaktionsmessungen eingesetzten Zellen mit der sterolreduzierenden Reagenz MCD resultierte in einem signifikanten Anstieg der zuvor gemessenen Interaktionseffizienzen (EFRET) aller fünf ausgewählten Snrk2-Kinasen mit AtrbohD.

Eine Interaktion zwischen zwei Proteinen muss nicht zwingend bedeuten, dass sie eine funktionelle Einheit in einem Signalweg darstellen. Aus diesem Grund wurde der Einfluss der identifizierten potentiellen Interaktionspartner auf die ROS-Produktionsaktivität der NADPH-Oxidase AtrbohD untersucht. Es zeigt sich, dass Snrk2.7 die ROS-Produktion durch die Oxidase auf ein vergleichbar hohes Niveau steigern kann, wie die zu diesem Zeitpunkt als Interaktionspartner der Oxidase AtrbohD identifizierte  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Kinase CPK5 (Dubiella *et al.*, 2013). Die Kinase Snrk2.7 interagiert also nicht nur mit AtrbohD, sondern kann die Oxidase auch phosphorylieren (wahrscheinlich an einer der beiden für die Phosphorylierung von AtrbohD als essentiell beschriebenen Positionen S343 oder S347 (Nühse *et al.*, 2007) und nicht an der untersuchten Position S39) und somit aktivieren. Dem hingegen zeigt OST1, trotz einer zuvor bestätigten Interaktion mit AtrbohD, nicht die Fähigkeit diese Oxidase auch aktivieren zu können. Die Snrk2.7-vermittelte Aktivität von AtrbohD ist ebenfalls deutlich durch eine Behandlung der transfizierten Zellen mit MCD induzierbar.

Die NADPH-Oxidase AtrbohD wird also in Abhängigkeit ihrer Lokalisierung in spezifischen Membrandomänen reguliert. Wenn die zwei essentiellen Phosphorylierungsstellen durch eine Punktmutation ausgeschaltet werden und die Oxidase nicht mehr als Antwort auf Pathogene aktiviert werden kann, lokalisiert diese nicht mehr in den AtRem1.4-markierten Membrandomänen. Auch zeigt sich, dass die Aktivität der Oxidase, induziert durch eine Interaktion mit der nicht in Membrandomänen lokalisierten Snrk2-Kinase Snrk2.7, gesteigert werden kann, wenn durch MCD die sterolreichen Membrandomänen angereichert werden. Eventuell dienen Membrandomänen, zumindest im pflanzlichen System, nicht nur der Etablierung von Signalkomplexen, sondern in einigen Fällen auch der Negativregulierung von bestimmten Proteinaktivitäten, wie zum Beispiel in diesem Fall, der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS).

## Summary

In animal cells and yeast, membrane domains have been extensively characterized as signalling platforms (Foster *et al.*, 2003) and characterized upon their resistance to treatment with non-ionic detergents (Shogomori *et al.*, 2003). Such treatment of membranes can result in formation of artefacts and the appearance of a protein in these so-called “DRMs” is not necessarily related with its localization in native membrane domains. The lack of improved preparative methods, results in further use of DRM preparation to get a first insight into the protein composition of special membrane areas.

The protein composition of isolated and MCD-treated detergent resistant membrane (DRM) fractions from purified plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* was investigated by HPLC-ESI mass spectrometry. Eighty proteins could be identified which are thought to be localized in sterol rich membrane domains. Among these sterol-dependent proteins the two Remorins AtRem1.2 and AtRem1.3 and two essential ABA signalling components, namely the protein phosphatase 2C ABI1 and the kinase CPK21, could be identified. This phosphatase-kinase pair was very recently demonstrated to regulate the stomatal aperture via SLAH3-mediated anion release in an ABA-dependent manner (Geiger *et al.*, 2011). Using biochemical, mass spectrometrical and microscopic approaches it could be shown that, in absence of ABA, the phosphatase ABI1 prevents the interaction between CPK21 and SLAH3 by dislocation of both proteins from membrane domains to surrounding membrane areas, which inhibits the phosphorylation and the activation of the channel (Demir *et al.*, 2013).

Among the potentially membrane domain localized proteins, the NADPH-oxidase AtrbohD could be identified to be weakly dependent upon a sterol rich environment. In contrast to the homologous AtrbohF, the isoform D shows no colocalization upon coexpression with the established membrane domain marker AtRem1.3 (Demir *et al.*, 2013). This result implies that there must be co-residing membrane domains and that both oxidases are (at least temporarily) located in different membrane compartments. This could imply functionally different membrane platformes to regulate specific signalling cascades. After Coexpression of AtrbohD with 12 of the altogether 16 Remorin proteins, a colocalization with AtRem1.4 could be confirmed. In further experiments not only a clear localization in other membrane domains than the ones marked by AtRem1.3, but also a clear lateral immobility could be proofed for AtRem1.4, which therefore can be accepted as a marker for another kind of membrane domains. Regarding these results, the existence of diverse Types of membrane compartments, also in plants, can be accepted.

At this time point of the investigations, no interaction partner of AtrbohD was known to regulate the function of the oxidase. Therefore, the relationship between localization and function of the oxidase was still an open question. Using different microscopic techniques

(BiFC, SE-FRET, AB-FRET) to study protein-protein interactions, two potential interaction partners out of a set of five mesophyll expressed  $\text{Ca}^{2+}$ -independent Snrk2-kinases, could be identified. The ABA-dependent kinase OST1/Snrk2.6, which also interacts with AtrbohF (Sirichandra *et al.*, 2007), was demonstrated to be a potential interaction partner of AtrbohD as well as Snrk2.7. The treatment of transfected cells with MCD leads to a significant induction of the measured interaction efficiencies ( $E_{\text{FRET}}$ ) of all the five analysed Snrk2-kinases with AtrbohD.

An interaction between two proteins does not automatically mean a functional regulation of a signalling pathway, therefore the influence of the identified potential interacting partners of AtrbohD on the ROS-producing activity was analysed. At this time point the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent kinase CPK5 was identified to be an interacting and phosphorylating partner of AtrbohD. The kinase Snrk2.7 can induce the ROS-producing activity of AtrbohD to a similar level than CPK5, which means Snrk2.7 is not only interacting with AtrbohD, but also regulating its activity. The phosphorylation and activation of AtrbohD by Snrk2.7 is probably mediated by one of the two essential phosphorylation sites S343 and S347 (Nühse *et al.*, 2007), but not on the analysed S39. In contrast, the kinase OST1 is indeed interacting with AtrbohD, but obviously not regulating its activity. The Snrk2.7-mediated ROS-producing activity of AtrbohD is also inducible upon treatment of the transfected cells with MCD.

The NADPH-oxidase AtrbohD is regulated in dependency to its localization in specific membrane domains. Mutation of the two essential phosphorylation sites leads to a dislocation from AtRem1.4-marked membrane domains. Treatment with MCD, that means disruption of the sterol rich membrane environment, resulted in significantly increased ROS-producing activity of AtrbohD upon interaction with the non-domain located kinase Snrk2.7.

Probably the membrane domains do not only function as signalling platforms in plants, but in some cases also for negative regulation of certain protein activity, such as the production of reactive oxygen species (ROS).

## Anhang I – Literaturverzeichnis

- Ache P, Becker D, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema MR, Hedrich R.  
GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K(+)-selective, K(+)-sensing ion channel. *FEBS Lett.* 2000 Dec 8;486(2):93-8.
- Ahlfors R, Macioszek V, Rudd J, Brosché M, Schlichting R, Scheel D, Kangasjärvi J.  
Stress hormone-independent activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana* during ozone exposure. *Plant J.* 2004 Nov;40(4):512-22.
- Ahmed SN, Brown DA, London E.  
On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes. *Biochemistry.* 1997 Sep 9;36(36):10944-53.
- Ai F, Chen H, Zhang SH, Liu SY, Wei F, Dong XY, Cheng JK, Huang WH.  
Real-time monitoring of oxidative burst from single plant protoplasts using microelectrochemical sensors modified by platinum nanoparticles. *Anal Chem.* 2009 Oct 15;81(20):8453-8. doi: 10.1021/ac901300b.
- Aittoniemi J, Niemelä PS, Hyvönen MT, Karttunen M, Vattulainen I.  
Insight into the putative specific interactions between cholesterol, sphingomyelin, and palmitoyl-oleoyl phosphatidylcholine. *Biophys J.* 2007 Feb 15;92(4):1125-37. Epub 2006 Nov 17.
- Albrecht V, Weinl S, Blazevic D, D'Angelo C, Batistic O, Kolukisaoglu U, Bock R, Schulz B, Harter K, Kudla J.  
The calcium sensor CBL1 integrates plant responses to abiotic stresses. *Plant J.* 2003 Nov;36(4):457-70.
- Alexandersson E, Saalbach G, Larsson C, Kjellbom P.  
*Arabidopsis* plasma membrane proteomics identifies components of transport, signal transduction and membrane trafficking. *Plant Cell Physiol.* 2004 Nov;45(11):1543-56.
- Allen GJ, Kwak JM, Chu SP, Llopis J, Tsien RY, Harper JF, Schroeder JI.  
Cameleon calcium indicator reports cytoplasmic calcium dynamics in *Arabidopsis* guard cells. *Plant J.* 1999 Sep;19(6):735-47.
- Allen JA, Halverson-Tamboli RA, Rasenick MM.  
Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nat Rev Neurosci.* 2007 Feb;8(2):128-40. Epub 2006 Dec 29.
- Alliotte T, Tiré C, Engler G, Peleman J, Caplan A, Van Montagu M, Inzé D.  
An Auxin-Regulated Gene of *Arabidopsis thaliana* Encodes a DNA-Binding Protein. *Plant Physiol.* 1989 Mar;89(3):743-52.

- Amodeo G, Srivastava A, Zeiger E.  
Vanadate inhibits blue light-stimulated swelling of vicia guard cell protoplasts. *Plant Physiol.* 1992 Nov;100(3):1567-70.
- Anderson JA, Huprikar SS, Kochian LV, Lucas WJ, Gaber RF.  
Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 May 1;89(9):3736-40.
- Anderson RG, Jacobson K.  
A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science.* 2002 Jun 7;296(5574):1821-5.
- Asada K, Takahashi M.  
Production and scavenging of active oxygen in chloroplasts. In DJ Kyle, CB Osmond, CJ Arntzen, eds, *Photoinhibition*. Elsevier, Amsterdam, 1987; pp 227–287
- Asano T, Hakata M, Nakamura H, Aoki N, Komatsu S, Ichikawa H, Hirochika H, Ohsugi R.  
Functional characterisation of OsCPK21, a calcium-dependent protein kinase that confers salt tolerance in rice. *Plant Mol Biol.* 2011 Jan;75(1-2):179-91. doi: 10.1007/s11103-010-9717-1. Epub 2010 Dec 7.
- Assaad FF, Qiu JL, Youngs H, Ehrhardt D, Zimmerli L, Kalde M, Wanner G, Peck SC, Edwards H, Ramonell K, Somerville CR, Thordal-Christensen H.  
The PEN1 syntaxin defines a novel cellular compartment upon fungal attack and is required for the timely assembly of papillae. *Mol Biol Cell.* 2004 Nov;15(11):5118-29. Epub 2004 Sep 1.
- Assmann SM, Simoncini L, and Schroeder JI.  
Blue light activates electrogenic ion pumping in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature* 1985 318, 285-287.
- Axelrod D, Ravdin P, Koppel DE, Schlessinger J, Webb WW, Elson EL, Podleski TR.  
Lateral motion of fluorescently labeled acetylcholine receptors in membranes of developing muscle fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976 Dec;73(12):4594-8.
- Baena-González E.  
Energy signaling in the regulation of gene expression during stress. *Mol Plant.* 2010 Mar;3(2):300-13. doi: 10.1093/mp/ssp113. Epub 2010 Jan 15.
- Bagatolli LA, Ipsen JH, Simonsen AC, Mouritsen OG.  
An outlook on organization of lipids in membranes: searching for a realistic connection with the organization of biological membranes. *Prog Lipid Res.* 2010 Oct;49(4):378-89. doi: 10.1016/j.plipres.2010.05.001. Epub 2010 May 15.
- Bagnat M, Simons K.  
Cell surface polarization during yeast mating. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Oct 29;99(22):14183-8. Epub 2002 Oct 8.
- Baker SM, Buckheit RW 3rd, Falk MM.  
Green-to-red photoconvertible fluorescent proteins: tracking cell and protein dynamics on standard wide-field mercury arc-based microscopes. *BMC Cell Biol.* 2010 Feb 22;11:15. doi: 10.1186/1471-2121-11-15.

- Bariola PA, Retelska D, Stasiak A, Kammerer RA, Fleming A, Hijri M, Frank S, Farmer EE.  
Remorins form a novel family of coiled coil-forming oligomeric and filamentous proteins associated with apical, vascular and embryonic tissues in plants. *Plant Mol Biol.* 2004 Jul;55(4):579-94.
- Beck JG, Mathieu D, Loudet C, Buchoux S, Dufourc EJ.  
Plant sterols in "rafts": a better way to regulate membrane thermal shocks. *FASEB J.* 2007 Jun;21(8):1714-23. Epub 2007 Feb 22.
- Becker D, Hoth S, Ache P, Wenkel S, Roelfsema MR, Meyerhoff O, Hartung W, Hedrich R.  
Regulation of the ABA-sensitive Arabidopsis potassium channel gene GORK in response to water stress. *FEBS Lett.* 2003 Nov 6;554(1-2):119-26.
- Belin C, de Franco PO, Bourbousse C, Chaignepain S, Schmitter JM, Vavasseur A, Giraudat J, Barbier-Brygoo H, Thomine S.  
Identification of features regulating OST1 kinase activity and OST1 function in guard cells. *Plant Physiol.* 2006 Aug;141(4):1316-27. Epub 2006 Jun 9.
- Benschop JJ, Mohammed S, O'Flaherty M, Heck AJ, Slijper M, Menke FL.  
Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in Arabidopsis. *Mol Cell Proteomics.* 2007 Jul;6(7):1198-214. Epub 2007 Feb 21.
- Benting J, Rietveld A, Ansorge I, Simons K.  
Acyl and alkyl chain length of GPI-anchors is critical for raft association in vitro. *FEBS Lett.* 1999 Nov 26;462(1-2):47-50.
- Berthiaume L, Resh MD.  
Biochemical characterization of a palmitoyl acyltransferase activity that palmitoylates myristoylated proteins. *J Biol Chem.* 1995 Sep 22;270(38):22399-405.
- Bhalerao RP, Salchert K, Bakó L, Okrész L, Szabados L, Muranaka T, Machida Y, Schell J, Koncz C.  
Regulatory interaction of PRL1 WD protein with Arabidopsis SNF1-like protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Apr 27;96(9):5322-7.
- Bhat RA, Miklis M, Schmelzer E, Schulze-Lefert P, Panstruga R.  
Recruitment and interaction dynamics of plant penetration resistance components in a plasma membrane microdomain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Feb 22;102(8):3135-40. Epub 2005 Feb 9.
- Bianco-Colomas J, Barthe P, Orlandini M, Le Page-Degivry MT.  
Carrier-Mediated Uptake of Abscisic Acid by Suspension-Cultured *Amaranthus tricolor* Cells. *Plant Physiol.* 1991 Apr;95(4):990-6.
- Birnboim HC, Doly J  
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979 Nov 24;7(6):1513-23.
- Blatt MR.  
K<sup>+</sup> channels of stomatal guard cells. Characteristics of the inward rectifier and its control by pH. *J Gen Physiol.* 1992 Apr;99(4):615-44.

- Blume B, Nürnberger T, Nass N, Scheel D.  
Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell*. 2000 Aug;12(8):1425-40.
- Bodnár A, Jenei A, Bene L, Damjanovich S, Matkó J.  
Modification of membrane cholesterol level affects expression and clustering of class I HLA molecules at the surface of JY human lymphoblasts. *Immunol Lett*. 1996 Dec;54(2-3):221-6.
- Bolard J.  
How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? *Biochim Biophys Acta*. 1986 Dec 22;864(3-4):257-304.
- Boller T, Felix G.  
A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol*. 2009;60:379-406. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346.
- Borner GH, Lilley KS, Stevens TJ, Dupree P.  
Identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Arabidopsis*. A proteomic and genomic analysis. *Plant Physiol*. 2003 Jun;132(2):568-77. Epub 2003 May 1.
- Borner GH, Sherrier DJ, Weimar T, Michaelson LV, Hawkins ND, Macaskill A, Napier JA, Beale MH, Lilley KS, Dupree P.  
Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol*. 2005 Jan;137(1):104-16. Epub 2004 Dec 23.
- Boudsocq M, Barbier-Brygoo H, Laurière C.  
Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*. 2004 Oct 1;279(40):41758-66. Epub 2004 Jul 29.
- Boudsocq M, Droillard MJ, Barbier-Brygoo H, Laurière C.  
Different phosphorylation mechanisms are involved in the activation of sucrose non-fermenting 1 related protein kinases 2 by osmotic stresses and abscisic acid. *Plant Mol Biol*. 2007 Mar;63(4):491-503.
- Boudsocq M, Laurière C.  
Osmotic signaling in plants: multiple pathways mediated by emerging kinase families. *Plant Physiol*. 2005 Jul;138(3):1185-94.
- Boudsocq M, Willmann MR, McCormack M, Lee H, Shan L, He P, Bush J, Cheng SH, Sheen J.  
Differential innate immune signalling via Ca(2+) sensor protein kinases. *Nature*. 2010 Mar 18;464(7287):418-22. doi: 10.1038/nature08794. Epub 2010 Feb 17.
- Bouly JP, Gissot L, Lessard P, Kreis M, Thomas M.  
*Arabidopsis thaliana* proteins related to the yeast SIP and SNF4 interact with AKINalpha1, an SNF1-like protein kinase. *Plant J*. 1999 Jun;18(5):541-50.

Brandt B, Brodsky DE, Xue S, Negi J, Iba K, Kangasjärvi J, Ghassemian M, Stephan AB, Hu H, Schroeder JI.

Reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1 anion channel by CPK6 and OST1 kinases and branched ABI1 PP2C phosphatase action. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jun 26;109(26):10593-8. doi: 10.1073/pnas.1116590109. Epub 2012 Jun 11.

Bray EA.

Abscisic acid regulation of gene expression during water-deficit stress in the era of the Arabidopsis genome. *Plant Cell Environ*. 2002 Feb;25(2):153-161.

Brown D.

The tyrosine kinase connection: how GPI-anchored proteins activate T cells. *Curr Opin Immunol*. 1993 Jun;5(3):349-54.

Brown DA.

Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology (Bethesda)*. 2006 Dec;21:430-9.

Brown DA, London E.

Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J Membr Biol*. 1998 Jul 15;164(2):103-14.

Brown DA, Rose JK.

Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*. 1992 Feb 7;68(3):533-44.

Brüggemann L, Dietrich P, Becker D, Dreyer I, Palme K, Hedrich R.

Channel-mediated high-affinity K<sup>+</sup> uptake into guard cells from Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Mar 16;96(6):3298-302.

Bucholc M, Ciesielski A, Goch G, Anielska-Mazur A, Kulik A, Krzywińska E, Dobrowolska G.

SNF1-related protein kinases 2 are negatively regulated by a plant-specific calcium sensor. *J Biol Chem*. 2011 Feb 4;286(5):3429-41. doi: 10.1074/jbc.M110.115535. Epub 2010 Nov 22.

Campbell SM, Crowe SM, Mak J.

Lipid rafts and HIV-1: from viral entry to assembly of progeny virions. *J Clin Virol*. 2001 Oct;22(3):217-27.

Carol RJ, Dolan L.

The role of reactive oxygen species in cell growth: lessons from root hairs. *J Exp Bot*. 2006;57(8):1829-34. Epub 2006 May 23.

Casey PJ.

p21ras is modified by a farnesyl isoprenoid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Nov;86(21):8323-7.

Casey PJ.

Mechanisms of protein prenylation and role in G protein function. *Biochem Soc Trans*. 1995 Feb;23(1):161-6.

- Casey PJ, Solski PA, Der CJ, Buss JE.  
Protein lipidation in cell signaling. *Science*. 1995 Apr 14;268(5208):221-5.
- Casey PJ, Thissen JA, Moomaw JF.  
Enzymatic modification of proteins with a geranylgeranyl isoprenoid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Oct 1;88(19):8631-5.
- Chandra S, Low PS.  
Role of phosphorylation in elicitation of the oxidative burst in cultured soybean cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 May 9;92(10):4120-3.
- Chandran V, Stollar EJ, Lindorff-Larsen K, Harper JF, Chazin WJ, Dobson CM, Luisi BF, Christodoulou J.  
Structure of the regulatory apparatus of a calcium-dependent protein kinase (CDPK): a novel mode of calmodulin-target recognition. *J Mol Biol*. 2006 Mar 24;357(2):400-10. Epub 2005 Dec 20.
- Chazal N, Gerlier D.  
Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003 Jun;67(2):226-37, table of contents.
- Cheng SH, Willmann MR, Chen HC, Sheen J.  
Calcium signaling through protein kinases. The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiol*. 2002 Jun;129(2):469-85.
- Chen Y, Hoehenwarter W, Weckwerth W.  
Comparative analysis of phytohormone-responsive phosphoproteins in Arabidopsis thaliana using TiO<sub>2</sub>-phosphopeptide enrichment and mass accuracy precursor alignment. *Plant J*. 2010 Jul 1;63(1):1-17. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04218.x. Epub 2010 Mar 31.
- Chen YH, Hu L, Punta M, Bruni R, Hillerich B, Kloss B, Rost B, Love J, Siegelbaum SA, Hendrickson WA.  
Homologue structure of the SLAC1 anion channel for closing stomata in leaves. *Nature*. 2010 Oct 28;467(7319):1074-80. doi: 10.1038/nature09487.
- Cheong YH, Pandey GK, Grant JJ, Batistic O, Li L, Kim BG, Lee SC, Kudla J, Luan S.  
Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in Arabidopsis. *Plant J*. 2007 Oct;52(2):223-39.
- Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nürnberger T, Jones JD, Felix G, Boller T.  
A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature*. 2007 Jul 26;448(7152):497-500. Epub 2007 Jul 11.
- Christian AE, Haynes MP, Phillips MC, Rothblat GH.  
Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J Lipid Res*. 1997 Nov;38(11):2264-72.
- Christmann A, Hoffmann T, Teplova I, Grill E, Müller A.  
Generation of active pools of abscisic acid revealed by in vivo imaging of water-stressed Arabidopsis. *Plant Physiol*. 2005 Jan;137(1):209-19. Epub 2004 Dec 23.

- Christmann A, Weiler EW, Steudle E, Grill E.  
A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. *Plant J.* 2007 Oct;52(1):167-74. Epub 2007 Aug 16.
- Clark BJ.  
The mammalian START domain protein family in lipid transport in health and disease. *J Endocrinol.* 2012 Mar;212(3):257-75. doi: 10.1530/JOE-11-0313. Epub 2011 Sep 30.
- Clegg RM.  
Förster resonance energy transfer—FRET what is it, why do it, and how it's done. *Lab. Tech. Biochem. Mol. Biol.* 33,1-58. DOI: 10.1016/S0075-7535(08)00001-6
- Coello P, Hey SJ, Halford NG.  
The sucrose non-fermenting-1-related (SnRK) family of protein kinases: potential for manipulation to improve stress tolerance and increase yield. *J Exp Bot.* 2011 Jan;62(3):883-93. doi: 10.1093/jxb/erq331. Epub 2010 Oct 25.
- Cohen AW, Hnasko R, Schubert W, Lisanti MP.  
Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev.* 2004 Oct;84(4):1341-79.
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR.  
Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol.* 2010;61:651-79. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112122.
- D'Angelo C, Weini S, Batistic O, Pandey GK, Cheong YH, Schültke S, Albrecht V, Ehlert B, Schulz B, Harter K, Luan S, Bock R, Kudla J.  
Alternative complex formation of the Ca-regulated protein kinase CIPK1 controls abscisic acid-dependent and independent stress responses in Arabidopsis. *Plant J.* 2006 Dec;48(6):857-72. Epub 2006 Nov 8.
- Danielli JF and Davson H.  
A contribution to the theory of permeability of thin films. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 1935; 5. 495-508.
- Decker EL, Frank W, Sarnighausen E, Reski R.  
Moss systems biology en route: phytohormones in Physcomitrella development. *Plant Biol (Stuttg).* 2006 May;8(3):397-405.
- Degtyarev MY, Spiegel AM, Jones TL.  
Palmitoylation of a G protein alpha i subunit requires membrane localization not myristoylation. *J Biol Chem.* 1994 Dec 9;269(49):30898-903.
- Demir F.  
Dissertation Dr. Fatih Demir, "Lipid rafts in Arabidopsis thaliana leaves", 2010
- Demir F, Horntrich C, Blachutzik JO, Scherzer S, Reinders Y, Kierszniowska S, Schulze WX, Harms GS, Hedrich R, Geiger D, Kreuzer I.  
Arabidopsis nanodomain-delimited ABA signaling pathway regulates the anion channel SLAH3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 May 14;110(20):8296-301. doi: 10.1073/pnas.1211667110. Epub 2013 Apr 29.

- Desikan R, Griffiths R, Hancock J, Neill S.  
A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Dec 10;99(25):16314-8. Epub 2002 Nov 21.
- Desikan R, Last K, Harrett-Williams R, Tagliavia C, Harter K, Hooley R, Hancock JT, Neill SJ.  
Ethylene-induced stomatal closure in *Arabidopsis* occurs via AtrbohF-mediated hydrogen peroxide synthesis. *Plant J*. 2006 Sep;47(6):907-16.
- Diédhiou CJ, Popova OV, Dietz KJ, Golldack D.  
The SNF1-type serine-threonine protein kinase SAPK4 regulates stress-responsive gene expression in rice. *BMC Plant Biol*. 2008 Apr 28;8:49. doi: 10.1186/1471-2229-8-49.
- Diener AC, Li H, Zhou W, Whoriskey WJ, Nes WD, Fink GR.  
Sterol methyltransferase 1 controls the level of cholesterol in plants. *Plant Cell*. 2000 Jun;12(6):853-70.
- Dietrich P, Dreyer I, Wiesner P, Hedrich R.  
Cation sensitivity and kinetics of guard-cell potassium channels differ among species. *Planta* 1998 205, 277-287.
- Dietrich P, Sanders D, Hedrich R.  
The role of ion channels in light-dependent stomatal opening. *J Exp Bot*. 2001 Oct;52(363):1959-67.
- Dinic J, Ashrafzadeh P, Parmryd I.  
Actin filaments attachment at the plasma membrane in live cells cause the formation of ordered lipid domains. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Mar;1828(3):1102-11. doi: 10.1016/j.bbamem.2012.12.004. Epub 2012 Dec 13.
- Dubiella U, Seybold H, Durian G, Komander E, Lassig R, Witte CP, Schulze WX, Romeis T.  
Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 May 21;110(21):8744-9. doi: 10.1073/pnas.1221294110.
- Dudez T, Borot F, Huang S, Kwak BR, Bacchetta M, Ollero M, Stanton BA, Chanson M.  
CFTR in a lipid raft-TNFR1 complex modulates gap junctional intercellular communication and IL-8 secretion. *Biochim Biophys Acta*. 2008 May;1783(5):779-88. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.01.007.
- Dumas F, Lebrun MC, Tocanne JF.  
Is the protein/lipid hydrophobic matching principle relevant to membrane organization and functions? *FEBS Lett*. 1999 Sep 24;458(3):271-7.
- Dunphy JT, Greentree WK, Manahan CL, Linder ME.  
G-protein palmitoyltransferase activity is enriched in plasma membranes. *J Biol Chem*. 1996 Mar 22;271(12):7154-9.
- Edidin M.  
The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2003;32:257-83. Epub 2003 Jan 16.

- Edidin M.  
Shrinking patches and slippery rafts: scales of domains in the plasma membrane. *Trends Cell Biol.* 2001 Dec;11(12):492-6.
- Edidin M, Kuo SC, Sheetz MP.  
Lateral movements of membrane glycoproteins restricted by dynamic cytoplasmic barriers. *Science.* 1991 Nov 29;254(5036):1379-82.
- Edidin M, Zagyansky Y, Lardner TJ.  
Measurement of membrane protein lateral diffusion in single cells. *Science.* 1976 Feb 6;191(4226):466-8.
- Elortza F, Nühse TS, Foster LJ, Stensballe A, Peck SC, Jensen ON.  
Proteomic analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins. *Mol Cell Proteomics.* 2003 Dec;2(12):1261-70. Epub 2003 Sep 29.
- Elortza F, Mohammed S, Bunkenborg J, Foster LJ, Nühse TS, Brodbeck U, Peck SC, Jensen ON.  
Modification-specific proteomics of plasma membrane proteins: identification and characterization of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins released upon phospholipase D treatment. *J Proteome Res.* 2006 Apr;5(4):935-43.
- Endo A, Sawada Y, Takahashi H, Okamoto M, Ikegami K, Koiwai H, Seo M, Toyomasu T, Mitsushashi W, Shinozaki K, Nakazono M, Kamiya Y, Koshihara T, Nambara E.  
Drought induction of Arabidopsis 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells. *Plant Physiol.* 2008 Aug;147(4):1984-93. doi: 10.1104/pp.108.116632. Epub 2008 Jun 11.
- Eroglu C, Brugger B, Wieland F, Sinning I.  
Glutamate-binding affinity of Drosophila metabotropic glutamate receptor is modulated by association with lipid rafts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Sep 2;100(18):10219-24. Epub 2003 Aug 15.
- Farrás R, Ferrando A, Jásik J, Kleinow T, Okrész L, Tiburcio A, Salchert K, del Pozo C, Schell J, Koncz C.  
SKP1-SnRK protein kinase interactions mediate proteasomal binding of a plant SCF ubiquitin ligase. *EMBO J.* 2001 Jun 1;20(11):2742-56.
- Felix G, Regenass M, Spanu P, Boller T.  
The protein phosphatase inhibitor calyculin A mimics elicitor action in plant cells and induces rapid hyperphosphorylation of specific proteins as revealed by pulse labeling with [<sup>33</sup>P]phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Feb 1;91(3):952-6.
- Ferrando A, Koncz-Kálmán Z, Farràs R, Tiburcio A, Schell J, Koncz C.  
Detection of in vivo protein interactions between Snf1-related kinase subunits with intron-tagged epitope-labelling in plants cells. *Nucleic Acids Res.* 2001 Sep 1;29(17):3685-93.
- Fischer RA.  
Stomatal opening: role of potassium uptake by guard cells. *Science.* 1968 May 17;160(3829):784-5.

Fordham-Skelton AP, Chilley P, Lumberras V, Reignoux S, Fenton TR, Dahm CC, Pages M, Gatehouse JA.

A novel higher plant protein tyrosine phosphatase interacts with SNF1-related protein kinases via a KIS (kinase interaction sequence) domain. *Plant J.* 2002 Mar;29(6):705-15.

Förster T.

Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*  
Volume 437, Issue 1-2, pages 55–75, 1948

Foster LJ, De Hoog CL, Mann M.

Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 May 13;100(10):5813-8. Epub 2003 Apr 30.

French AP, Mills S, Swarup R, Bennett MJ, Pridmore TP.

Colocalization of fluorescent markers in confocal microscope images of plant cells. *Nat Protoc.* 2008;3(4):619-28. doi: 10.1038/nprot.2008.31.

Friedrichson T, Kurzchalia TV.

Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. *Nature.* 1998 Aug 20;394(6695):802-5.

Frye LD and Edidin M.

The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. *Journal of Cell Science.* 1970; 7. 319-335.

Fujii H, Verslues PE, Zhu JK.

Identification of Two Protein Kinases Required for Abscisic Acid Regulation of Seed Germination, Root Growth, and Gene Expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2007 February; 19(2): 485–494. doi: 10.1105/tpc.106.048538

Fujii H, Verslues PE, Zhu JK.

*Arabidopsis* decuple mutant reveals the importance of SnRK2 kinases in osmotic stress responses in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Jan 25;108(4):1717-22. doi: 10.1073/pnas.1018367108. Epub 2011 Jan 10.

Fujii H, Zhu JK.

*Arabidopsis* mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 May 19;106(20):8380-5. doi: 10.1073/pnas.0903144106. Epub 2009 May 6.

Fujita Y, Nakashima K, Yoshida T, Katagiri T, Kidokoro S, Kanamori N, Umezawa T, Fujita M, Maruyama K, Ishiyama K, Kobayashi M, Nakasone S, Yamada K, Ito T, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K.

Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 2009 Dec;50(12):2123-32. doi: 10.1093/pcp/pcp147.

Furuchi T, Anderson RG.

Cholesterol depletion of caveolae causes hyperactivation of extracellular signal-related kinase (ERK). *J Biol Chem.* 1998 Aug 14;273(33):21099-104.

- Gadella TW Jr, van der Krogt GN, Bisseling T.  
GFP-based FRET microscopy in living plant cells. *Trends Plant Sci.* 1999 Jul;4(7):287-291.
- Galbiati F, Razani B, Lisanti MP.  
Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell.* 2001 Aug 24;106(4):403-11.
- Galton F.  
*Co-relations and their measurement, chiefly from anthropometric data. Proceedings of the Royal Society.* 45, Nr. 13, 5. Dezember 1888;135–145
- Gao XQ, Li CG, Wei PC, Zhang XY, Chen J, Wang XC.  
The dynamic changes of tonoplasts in guard cells are important for stomatal movement in *Vicia faba*. *Plant Physiol.* 2005 Nov;139(3):1207-16. Epub 2005 Oct 21.
- Gapper C, Dolan L.  
Control of plant development by reactive oxygen species. *Plant Physiol.* 2006 Jun;141(2):341-5.
- Geiger D, Maierhofer T, Al-Rasheid KA, Scherzer S, Mumm P, Liese A, Ache P, Wellmann C, Marten I, Grill E, Romeis T, Hedrich R.  
Stomatal closure by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1. *Sci Signal.* 2011 May 17;4(173):ra32. doi: 10.1126/scisignal.2001346.
- Geiger D, Scherzer S, Mumm P, Marten I, Ache P, Matschi S, Liese A, Wellmann C, Al-Rasheid KA, Grill E, Romeis T, Hedrich R.  
Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca<sup>2+</sup> affinities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Apr 27;107(17):8023-8. doi: 10.1073/pnas.0912030107. Epub 2010 Apr 12.
- Geiger D, Scherzer S, Mumm P, Stange A, Marten I, Bauer H, Ache P, Matschi S, Liese A, Al-Rasheid KA, Romeis T, Hedrich R.  
Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Dec 15;106(50):21425-30. doi: 10.1073/pnas.0912021106. Epub 2009 Dec 2.
- Glebov OO, Bright NA, Nichols BJ.  
Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat Cell Biol.* 2006 Jan;8(1):46-54. Epub 2005 Dec 11.
- Goedhart J, von Stetten D, Noirclerc-Savoye M, Lelimosin M, Joosen L, Hink MA, van Weeren L, Gadella TW Jr, Royant A.  
Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nat Commun.* 2012 Mar 20;3:751. doi: 10.1038/ncomms1738.
- Gong D, Guo Y, Schumaker KS, Zhu JK.  
The SOS3 family of calcium sensors and SOS2 family of protein kinases in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2004 Mar;134(3):919-26.
- Gosti F, Beaudoin N, Serizet C, Webb AA, Vartanian N, Giraudat J.  
ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant Cell.* 1999 Oct;11(10):1897-910.

- Gorter E, Grendel F.  
On bimolecular layers of lipids on the chromocytes of the blood. *Journal of Experimental Medicine*, 1925; 41. 439-443.
- Grabarek Z.  
Structural basis for diversity of the EF-hand calcium-binding proteins. *J Mol Biol*. 2006 Jun 9;359(3):509-25. Epub 2006 Apr 21.
- Griebel T, Zeier J.  
A role for beta-sitosterol to stigmasterol conversion in plant-pathogen interactions. *Plant J*. 2010 Jul;63(2):254-68. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04235.x. Epub 2010 Apr 26.
- Grossmann G, Malinsky J, Stahlschmidt W, Loibl M, Weig-Meckl I, Frommer WB, Opekarová M, Tanner W.  
Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast. *J Cell Biol*. 2008 Dec 15;183(6):1075-88. doi: 10.1083/jcb.200806035. Epub 2008 Dec 8.
- Grossmann G, Opekarová M, Malinsky J, Weig-Meckl I, Tanner W.  
Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. *EMBO J*. 2007 Jan 10;26(1):1-8. Epub 2006 Dec 14.
- Grossmann G, Opekarova M, Novakova L, Stolz J, Tanner W.  
Lipid raft-based membrane compartmentation of a plant transport protein expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*. 2006 Jun;5(6):945-53.
- Guo Y, Halfter U, Ishitani M, Zhu JK.  
Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *Plant Cell*. 2001 Jun;13(6):1383-400.
- Guo FQ, Young J, Crawford NM.  
The nitrate transporter AtNRT1.1 (CHL1) functions in stomatal opening and contributes to drought susceptibility in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2003 Jan;15(1):107-17.
- Gupta N, Wollscheid B, Watts JD, Scheer B, Aebersold R, DeFranco AL.  
Quantitative proteomic analysis of B cell lipid rafts reveals that ezrin regulates antigen receptor-mediated lipid raft dynamics. *Nat Immunol*. 2006 Jun;7(6):625-33. Epub 2006 Apr 30.
- Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, Marbaix G.  
Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature*. 1971 Sep 17;233(5316):177-82.
- Gutierrez-Ford C, Levay K, Gomes AV, Perera EM, Som T, Kim YM, Benovic JL, Berkovitz GD, Slepak VZ.  
Characterization of tescalcin, a novel EF-hand protein with a single Ca<sup>2+</sup>-binding site: metal-binding properties, localization in tissues and cells, and effect on calcineurin. *Biochemistry*. 2003 Dec 16;42(49):14553-65.
- Haest CW.  
Interactions between membrane skeleton proteins and the intrinsic domain of the erythrocyte membrane. *Biochim Biophys Acta*. 1982 Dec;694(4):331-52.

- Hailstones D, Sleer LS, Parton RG, Stanley KK.  
Regulation of caveolin and caveolae by cholesterol in MDCK cells. *J Lipid Res.* 1998 Feb;39(2):369-79.
- Halford NG, Hardie DG.  
SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants? *Plant Mol Biol.* 1998 Jul;37(5):735-48.
- Halford NG, Hey SJ.  
Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. *Biochem J.* 2009 Apr 15;419(2):247-59. doi: 10.1042/BJ20082408.
- Halford NG, Hey S, Jhurrea D, Laurie S, McKibbin RS, Zhang Y, Paul MJ.  
Highly conserved protein kinases involved in the regulation of carbon and amino acid metabolism. *J Exp Bot.* 2004 Jan;55(394):35-42. Epub 2003 Nov 28.
- Halfter U, Ishitani M, Zhu JK.  
The Arabidopsis SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Mar 28;97(7):3735-40.
- Halliwell B, Gutteridge JMC.  
Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford Univ Pr; Auflage: 0004 (8. März 2007)
- Hancock JF, Magee AI, Childs JE, Marshall CJ.  
All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell.* 1989 Jun 30;57(7):1167-77.
- Haney CH, Long SR.  
Plant flotillins are required for infection by nitrogen-fixing bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jan 5;107(1):478-83. doi: 10.1073/pnas.0910081107. Epub 2009 Dec 14.
- Haney CH, Riely BK, Tricoli DM, Cook DR, Ehrhardt DW, Long SR.  
Symbiotic rhizobia bacteria trigger a change in localization and dynamics of the Medicago truncatula receptor kinase LYK3. *Plant Cell.* 2011 Jul;23(7):2774-87. doi: 10.1105/tpc.111.086389. Epub 2011 Jul 8.
- Hao H, Fan L, Chen T, Li R, Li X, He Q, Botella MA, Lin J.  
Clathrin and Membrane Microdomains Cooperatively Regulate RbohD Dynamics and Activity in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2014 Apr 22. [Epub ahead of print]
- Hao M, Mukherjee S, Maxfield FR.  
Cholesterol depletion induces large scale domain segregation in living cell membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Nov 6;98(23):13072-7.
- Harder T, Simons K.  
Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol.* 1997 Aug;9(4):534-42.
- Hardie DG.  
PLANT PROTEIN SERINE/THREONINE KINASES: Classification and Functions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1999 Jun;50:97-131.

- Harmon AC, Gribskov M, Harper JF.  
CDPKs - a kinase for every Ca<sup>2+</sup> signal? Trends Plant Sci. 2000 Apr;5(4):154-9.
- Harmon AC, Yoo BC, McCaffery C.  
Pseudosubstrate inhibition of CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. Biochemistry. 1994 Jun 14;33(23):7278-87.
- Harper JF, Breton G, Harmon A.  
Decoding Ca(2+) signals through plant protein kinases. Annu Rev Plant Biol. 2004;55:263-88.
- Harper JF, Harmon A.  
Plants, symbiosis and parasites: a calcium signalling connection. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005 Jul;6(7):555-66.
- Head BP, Patel HH, Roth DM, Murray F, Swaney JS, Niesman IR, Farquhar MG, Insel PA.  
Microtubules and actin microfilaments regulate lipid raft/caveolae localization of adenylyl cyclase signaling components. J Biol Chem. 2006 Sep 8;281(36):26391-9. Epub 2006 Jul 3.
- Hedrich R, Busch H, Raschke K.  
Ca<sup>2+</sup> and nucleotide dependent regulation of voltage dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. EMBO J. 1990 Dec;9(12):3889-92.
- Hedrich R, Marten I.  
Malate-induced feedback regulation of plasma membrane anion channels could provide a CO<sub>2</sub> sensor to guard cells. EMBO J. 1993 Mar;12(3):897-901.
- Hedrich R, Neher E.  
Cytoplasmic calcium regulates voltage-dependent ion channels in plant vacuoles. Nature. 1987;329:833{836.
- Hell SW, Wichmann J.  
Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. Opt Lett. 1994 Jun 1;19(11):780-2.
- Henty-Ridilla JL, Shimono M, Li J, Chang JH, Day B, Staiger CJ.  
The plant actin cytoskeleton responds to signals from microbe-associated molecular patterns. PLoS Pathog. 2013;9(4):e1003290. doi: 10.1371/journal.ppat.1003290. Epub 2013 Apr 4.
- Hetherington AM, Woodward FI.  
The role of stomata in sensing and driving environmental change. Nature. 2003 Aug 21;424(6951):901-8.
- Himmelbach A, Hoffmann T, Leube M, Höhener B, Grill E.  
Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in Arabidopsis. EMBO J. 2002 Jun 17;21(12):3029-38.
- Hink MA, Bisselin T, Visser AJ.  
Imaging protein-protein interactions in living cells. Plant Mol Biol. 2002 Dec;50(6):871-83.

- Hirayama T, Shinozaki K.  
Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends Plant Sci.* 2007 Aug;12(8):343-51. Epub 2007 Jul 12.
- Hirayama T, Umezawa T.  
The PP2C-SnRK2 complex: the central regulator of an abscisic acid signaling pathway. *Plant Signal Behav.* 2010 Feb;5(2):160-3. Epub 2010 Feb 28.
- Holowka D, Sheets ED, Baird B.  
Interactions between Fc(epsilon)RI and lipid raft components are regulated by the actin cytoskeleton. *J Cell Sci.* 2000 Mar;113 ( Pt 6):1009-19.
- Homann N, Noftz MR, Klingenberg-Noftz RD, Ludwig D.  
Delayed complications after placement of self-expanding stents in malignant esophageal obstruction: treatment strategies and survival rate. *Dig Dis Sci.* 2008 Feb;53(2):334-40. Epub 2007 Jun 28.
- Hooper NM.  
Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae (review). *Mol Membr Biol.* 1999 Apr-Jun;16(2):145-56.
- Hosy E, Vavasseur A, Mouline K, Dreyer I, Gaymard F, Porée F, Boucherez J, Lebaudy A, Bouchez D, Very AA, Simonneau T, Thibaud JB, Sentenac H.  
The Arabidopsis outward K<sup>+</sup> channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Apr 29;100(9):5549-54. Epub 2003 Apr 1.
- Hrabak EM, Chan CW, Gribskov M, Harper JF, Choi JH, Halford N, Kudla J, Luan S, Nimmo HG, Sussman MR, Thomas M, Walker-Simmons K, Zhu JK, Harmon AC.  
The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol.* 2003 Jun;132(2):666-80.
- Huai J, Wang M, He J, Zheng J, Dong Z, Lv H, Zhao J, Wang G.  
Cloning and characterization of the SnRK2 gene family from *Zea mays*. *Plant Cell Rep.* 2008 Dec;27(12):1861-8. doi: 10.1007/s00299-008-0608-8. Epub 2008 Sep 17.
- Hubbard KE, Nishimura N, Hitomi K, Getzoff ED, Schroeder JI.  
Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *Genes Dev.* 2010 Aug 15;24(16):1695-708. doi: 10.1101/gad.1953910.
- Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK.  
Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell.* 2002 Apr;9(4):789-98.
- Hwang J, Gheber LA, Margolis L, Edidin M.  
Domains in cell plasma membranes investigated by near-field scanning optical microscopy. *Biophys J.* 1998 May;74(5):2184-90.

- Ikegami K, Okamoto M, Seo M, Koshiya T.  
Activation of abscisic acid biosynthesis in the leaves of *Arabidopsis thaliana* in response to water deficit. *J Plant Res.* 2009 Mar;122(2):235-43. doi: 10.1007/s10265-008-0201-9. Epub 2008 Dec 16.
- Ikezawa H.  
Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. *Biol Pharm Bull.* 2002 Apr;25(4):409-17.
- Ilangumaran S, Arni S, van Echten-Deckert G, Borisch B, Hoessli DC.  
Microdomain-dependent regulation of Lck and Fyn protein-tyrosine kinases in T lymphocyte plasma membranes. *Mol Biol Cell.* 1999 Apr;10(4):891-905.
- Ilangumaran S, Hoessli DC.  
Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochem J.* 1998 Oct 15;335 ( Pt 2):433-40.
- Ipsen JH, Karlström G, Mouritsen OG, Wennerström H, Zuckermann MJ.  
Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochim Biophys Acta.* 1987 Nov 27;905(1):162-72.
- Jacinto T, Farmer EE, Ryan CA.  
Purification of Potato Leaf Plasma Membrane Protein pp34, a Protein Phosphorylated in Response to Oligogalacturonide Signals for Defense and Development. *Plant Physiol.* 1993 Dec;103(4):1393-1397.
- Jacob T, Ritchie S, Assmann SM, Gilroy S.  
Abscisic acid signal transduction in guard cells is mediated by phospholipase D activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96 (21):12192-12197.
- Jacobson K, Dietrich C.  
Looking at lipid rafts? *Trends Cell Biol.* 1999 Mar;9(3):87-91.
- Jacobson K, Ishihara A, Inman R.  
Lateral diffusion of proteins in membranes. *Annu Rev Physiol.* 1987;49:163-75.
- Jacobson K, Mouritsen OG, Anderson RG.  
Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nat Cell Biol.* 2007 Jan;9(1):7-14.
- Janes PW, Ley SC, Magee AI, Kabouridis PS.  
The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling. *Semin Immunol.* 2000 Feb;12(1):23-34.
- Jarsch IK, Konrad SS, Stratil TF, Urbanus SL, Szymanski W, Braun P, Braun KH, Ott T.  
Plasma Membranes Are Subcompartmentalized into a Plethora of Coexisting and Diverse Microdomains in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell.* 2014 Apr 8. [Epub ahead of print]

- Jarsch IK, Ott T.  
Perspectives on remorin proteins, membrane rafts, and their role during plant-microbe interactions. *Mol Plant Microbe Interact.* 2011 Jan;24(1):7-12. doi: 10.1094/MPMI-07-10-0166.
- Jones AM, MacLean D, Studholme DJ, Serna-Sanz A, Andreasson E, Rathjen JP, Peck SC.  
Phosphoproteomic analysis of nuclei-enriched fractions from *Arabidopsis thaliana*. *J Proteomics.* 2009 Apr 13;72(3):439-51. doi: 10.1016/j.jprot.2009.02.004. Epub 2009 Feb 24.
- Joos H, Timmerman B, Montagu MV, Schell J.  
Genetic analysis of transfer and stabilization of *Agrobacterium* DNA in plant cells. *EMBO J.* 1983;2(12):2151-60.
- Joshi-Saha A, Valon C, Leung J.  
Abscisic acid signal off the STARting block. *Mol Plant.* 2011 Jul;4(4):562-80. doi: 10.1093/mp/ssr055. Epub 2011 Jul 10.
- Jost PC, Griffith OH.  
The lipid-protein interface in biological membranes. *Ann N Y Acad Sci.* 1980;348:391-407.
- Jost PC, Griffith OH, Capaldi RA, Vanderkooi G.  
Evidence for boundary lipid in membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1973 Feb;70(2):480-4.
- Journot-Catalino N, Somssich IE, Roby D, Kroj T.  
The transcription factors WRKY11 and WRKY17 act as negative regulators of basal resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* 2006 Nov;18(11):3289-302. Epub 2006 Nov 17.
- Kabouridis PS, Janzen J, Magee AL, Ley SC.  
Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 2000 Mar;30(3):954-63.
- Kadota Y, Goh T, Tomatsu H, Tamauchi R, Higashi K, Muto S, Kuchitsu K.  
Cryptogein-induced initial events in tobacco BY-2 cells: pharmacological characterization of molecular relationship among cytosolic Ca(2+) transients, anion efflux and production of reactive oxygen species. *Plant Cell Physiol.* 2004 Feb;45(2):160-70.
- Kadota Y, Sklenar J, Derbyshire P, Stransfeld L, Asai S, Ntoukakis V, Jones JD, Shirasu K, Menke F, Jones A, Zipfel C.  
Direct Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD by the PRR-Associated Kinase BIK1 during Plant Immunity. *Mol Cell.* 2014 Apr 10;54(1):43-55. doi: 10.1016/j.molcel.2014.02.021. Epub 2014 Mar 12.
- Kang J, Hwang JU, Lee M, Kim YY, Assmann SM, Martinoia E, Lee Y.  
PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Feb 2;107(5):2355-60. doi: 10.1073/pnas.0909222107. Epub 2010 Jan 25.

- Kangasjärvi J, Jaspers P, Kollist H.  
Signalling and cell death in ozoneexposed plants. *Plant, Cell & Environment*. 2005; 28, 1021-1036.
- Keinath NF, Kierszniowska S, Lorek J, Bourdais G, Kessler SA, Shimosato-Asano H, Grossniklaus U, Schulze WX, Robatzek S, Panstruga R.  
PAMP (pathogen-associated molecular pattern)-induced changes in plasma membrane compartmentalization reveal novel components of plant immunity. *J Biol Chem*. 2010 Dec 10;285(50):39140-9. doi: 10.1074/jbc.M110.160531. Epub 2010 Sep 15.
- Keller T, Damude HG, Werner D, Doerner P, Dixon RA, Lamb C.  
A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca<sup>2+</sup> binding motifs. *Plant Cell*. 1998 Feb;10(2):255-66.
- Kenworthy AK, Edidin M.  
Distribution of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein at the apical surface of MDCK cells examined at a resolution of <100 Å using imaging fluorescence resonance energy transfer. *J Cell Biol*. 1998 Jul 13;142(1):69-84.
- Kenworthy AK, Nichols BJ, Remmert CL, Hendrix GM, Kumar M, Zimmerberg J, Lippincott-Schwartz J.  
Dynamics of putative raft-associated proteins at the cell surface. *J Cell Biol*. 2004 Jun 7;165(5):735-46. Epub 2004 Jun 1.
- Kenworthy AK, Petranova N, Edidin M.  
High-resolution FRET microscopy of cholera toxin B-subunit and GPI-anchored proteins in cell plasma membranes. *Mol Biol Cell*. 2000 May;11(5):1645-55.
- Kerppola TK.  
Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu Rev Biophys*. 2008;37:465-87. doi: 10.1146/annurev.biophys.37.032807.125842.
- Kierszniowska S, Seiwert B, Schulze WX.  
Definition of Arabidopsis sterol-rich membrane microdomains by differential treatment with methyl-beta-cyclodextrin and quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2009 Apr;8(4):612-23. doi: 10.1074/mcp.M800346-MCP200. Epub 2008 Nov 25.
- Kim TH, Böhmer M, Hu H, Nishimura N, Schroeder JI.  
Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO<sub>2</sub>, and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Annu Rev Plant Biol*. 2010;61:561-91. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112226.
- Kim KN, Cheong YH, Grant JJ, Pandey GK, Luan S.  
CIPK3, a calcium sensor-associated protein kinase that regulates abscisic acid and cold signal transduction in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2003 Feb;15(2):411-23.
- Kim KN, Cheong YH, Gupta R, Luan S.  
Interaction specificity of Arabidopsis calcineurin B-like calcium sensors and their target kinases. *Plant Physiol*. 2000 Dec;124(4):1844-53.

Kim JS, Mizoi J, Yoshida T, Fujita Y, Nakajima J, Ohori T, Todaka D, Nakashima K, Hirayama T, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K.

An ABRE promoter sequence is involved in osmotic stress-responsive expression of the DREB2A gene, which encodes a transcription factor regulating drought-inducible genes in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 2011 Dec;52(12):2136-46. doi: 10.1093/pcp/pcr143. Epub 2011 Oct 24.

Kimura S, Kaya H, Kawarazaki T, Hiraoka G, Senzaki E, Michikawa M, Kuchitsu K.

Protein phosphorylation is a prerequisite for the Ca<sup>2+</sup>-dependent activation of Arabidopsis NADPH oxidases and may function as a trigger for the positive feedback regulation of Ca<sup>2+</sup> and reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Feb;1823(2):398-405. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.09.011. Epub 2011 Oct 6.

King, MW.

Mechanisms of Signal Transduction (February 10, 2013).

Kinsella BT, Maltese WA.

rab GTP-binding proteins implicated in vesicular transport are isoprenylated in vitro at cysteines within a novel carboxyl-terminal motif. *J Biol Chem.* 1991 May 5;266(13):8540-4.

Kischel T, Harbers M, Stabel S, Borowski P, Müller K, Hilz H.

Tumor promotion and depletion of protein kinase C in epidermal JB6 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989 Dec 29;165(3):981-7.

Kiselev KV, Turlenko AV, Zhuravlev YN.

Structure and expression profiling of a novel calcium-dependent protein kinase gene PgCDPK1a in roots, leaves, and cell cultures of *Panax ginseng*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult* 2010; 103:197-204

Klein RM, Wolf ED, Wu R, Sanford JC.

High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. 1987. *Biotechnology.* 1992;24:384-6.

Kleine-Vehn J, Wabnik K, Martinière A, Łangowski Ł, Willig K, Naramoto S, Leitner J, Tanaka H, Jakobs S, Robert S, Luschnig C, Govaerts W, Hell SW, Runions J, Friml J.

Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane. *Mol Syst Biol.* 2011 Oct 25;7:540. doi: 10.1038/msb.2011.72.

Klingler JP, Batelli G, Zhu JK.

ABA receptors: the START of a new paradigm in phytohormone signalling. *J Exp Bot.* 2010 Jul;61(12):3199-210. doi: 10.1093/jxb/erq151. Epub 2010 Jun 3.

Kobae Y, Sekino T, Yoshioka H, Nakagawa T, Martinoia E, Maeshima M.

Loss of AtPDR8, a plasma membrane ABC transporter of Arabidopsis thaliana, causes hypersensitive cell death upon pathogen infection. *Plant Cell Physiol.* 2006 Mar;47(3):309-18. Epub 2006 Jan 13.

Kobayashi M, Ohura I, Kawakita K, Yokota N, Fujiwara M, Shimamoto K, Doke N, Yoshioka H.

Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. *Plant Cell.* 2007 Mar;19(3):1065-80. Epub 2007 Mar 30.

- Kobayashi Y, Yamamoto S, Minami H, Kagaya Y, Hattori T.  
Differential activation of the rice sucrose nonfermenting1-related protein kinase2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid. *Plant Cell*. 2004 May;16(5):1163-77. Epub 2004 Apr 14.
- Kohn WD, Mant CT, Hodges RS.  
Alpha-helical protein assembly motifs. *J Biol Chem*. 1997 Jan 31;272(5):2583-6.
- Kojo K, Yaeno T, Kusumi K, Matsumura H, Fujisawa S, Terauchi R, Iba K.  
Regulatory mechanisms of ROI generation are affected by rice spl mutations. *Plant Cell Physiol*. 2006 Aug;47(8):1035-44. Epub 2006 Jul 2.
- Kolb HA, Marten I, Hedrich R.  
Hodgkin-Huxley analysis of a GCAC1 anion channel in the plasma membrane of guard cells. *J Membr Biol*. 1995 Aug;146(3):273-82.
- Kostrewa D, Winkler FK.  
Mg<sup>2+</sup> binding to the active site of EcoRV endonuclease: a crystallographic study of complexes with substrate and product DNA at 2 Å resolution. *Biochemistry*. 1995 Jan 17;34(2):683-96.
- Krecek P, Skupa P, Libus J, Naramoto S, Tejos R, Friml J, Zazimalová E.  
The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biol*. 2009;10(12):249. doi: 10.1186/gb-2009-10-12-249. Epub 2009 Dec 29.
- Krügel U, Veenhoff LM, Langbein J, Wiederhold E, Liesche J, Friedrich T, Grimm B, Martinoia E, Poolman B, Kühn C.  
Transport and sorting of the solanum tuberosum sucrose transporter SUT1 is affected by posttranslational modification. *Plant Cell*. 2008 Sep;20(9):2497-513. doi: 10.1105/tpc.108.058271. Epub 2008 Sep 12.
- Kuchitsu K, Kosaka T, Shiga T, Shibuya N.  
EPR evidence for generation of hydroxyl radical triggered by *N*-acetylchitoooligosaccharide elicitor and a protein phosphatase inhibitor in suspension-cultured rice cells. *Protoplasma* 1995; 188, 138–142.
- Kudla J, Xu Q, Harter K, Grisse W, Luan S.  
Genes for calcineurin B-like proteins in Arabidopsis are differentially regulated by stress signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Apr 13;96(8):4718-23.
- Kuhn JM, Boisson-Dernier A, Dizon MB, Maktabi MH, Schroeder JI.  
The protein phosphatase AtPP2CA negatively regulates abscisic acid signal transduction in Arabidopsis, and effects of abh1 on AtPP2CA mRNA. *Plant Physiol*. 2006 Jan;140(1):127-39. Epub 2005 Dec 16.
- Kuromori T, Miyaji T, Yabuuchi H, Shimizu H, Sugimoto E, Kamiya A, Moriyama Y, Shinozaki K.  
ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Feb 2;107(5):2361-6. doi: 10.1073/pnas.0912516107. Epub 2010 Jan 19.

Kuromori T, Yamamoto M.

Cloning of cDNAs from *Arabidopsis thaliana* that encode putative protein phosphatase 2C and a human Dr1-like protein by transformation of a fission yeast mutant. *Nucleic Acids Res.* 1994 Dec 11;22(24):5296-301.

Kwak JM, Mori IC, Pei ZM, Leonhardt N, Torres MA, Dangl JL, Bloom RE, Bodde S, Jones JD, Schroeder JI.

NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 2003 Jun 2;22(11):2623-33.

Laemmli UK.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

Laloi M, Perret AM, Chatre L, Melser S, Cantrel C, Vaultier MN, Zachowski A, Bathany K, Schmitter JM, Vallet M, Lessire R, Hartmann MA, Moreau P.

Insights into the role of specific lipids in the formation and delivery of lipid microdomains to the plasma membrane of plant cells. *Plant Physiol.* 2007 Jan;143(1):461-72. Epub 2006 Nov 17.

Lang DM, Lommel S, Jung M, Ankerhold R, Petrausch B, Laessing U, Wiechers MF, Plattner H, Stuermer CA.

Identification of *reggie-1* and *reggie-2* as plasmamembrane-associated proteins which cocluster with activated GPI-anchored cell adhesion molecules in non-caveolar micropatches in neurons. *J Neurobiol.* 1998 Dec;37(4):502-23.

Langmuir I.

The Shapes of Group Molecules Forming the Surfaces of Liquids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1917 Apr;3(4):251-7.

Larsson M, Mattiasson B.

Characterization of aqueous two-phase systems based on polydisperse phase forming polymers: Enzymatic hydrolysis of starch in a PEG-starch aqueous two-phase system. *Biotechnol Bioeng.* 1988 Jun 5;31(9):979-83.

Lauwers E, Grossmann G, André B.

Evidence for coupled biogenesis of yeast Gap1 permease and sphingolipids: essential role in transport activity and normal control by ubiquitination. *Mol Biol Cell.* 2007 Aug;18(8):3068-80. Epub 2007 Jun 6.

Leborgne-Castel N, Lherminier J, Der C, Fromentin J, Houot V, Simon-Plas F.

The plant defense elicitor cryptogein stimulates clathrin-mediated endocytosis correlated with reactive oxygen species production in bright yellow-2 tobacco cells. *Plant Physiol.* 2008 Mar;146(3):1255-66. doi: 10.1104/pp.107.111716. Epub 2008 Jan 9.

Lee SC, Lan W, Buchanan BB, Luan S.

A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Dec 15;106(50):21419-24. doi: 10.1073/pnas.0910601106. Epub 2009 Dec 2.

Lefebvre B, Timmers T, Mbengue M, Moreau S, Hervé C, Tóth K, Bittencourt-Silvestre J, Klaus D, Deslandes L, Godiard L, Murray JD, Udvardi MK, Raffaele S, Mongrand S, Cullimore J, Gamas P, Niebel A, Ott T.

A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Feb 2;107(5):2343-8. doi: 10.1073/pnas.0913320107. Epub 2010 Jan 19.

Leung J, Bouvier-Durand M, Morris PC, Guerrier D, Chefdor F, Giraudat J.

Arabidopsis ABA response gene ABI1: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science*. 1994 Jun 3;264(5164):1448-52.

Leung J, Merlot S, Giraudat J.

The Arabidopsis ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (ABI2) and ABI1 genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell*. 1997 May;9(5):759-71.

Levchenko V, Konrad KR, Dietrich P, Roelfsema MR, Hedrich R.

Cytosolic abscisic acid activates guard cell anion channels without preceding Ca<sup>2+</sup> signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Mar 15;102(11):4203-8. Epub 2005 Mar 7.

Li AL, Zhu YF, Tan XM, Wang X, Wei B, Guo HZ, Zhang ZL, Chen XB, Zhao GY, Kong XY, Jia JZ, Mao L.

Evolutionary and functional study of the CDPK gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Mol Biol*. 2008 Mar;66(4):429-43. doi: 10.1007/s11103-007-9281-5. Epub 2008 Jan 9.

Li J, Assmann SM.

An Abscisic Acid-Activated and Calcium-Independent Protein Kinase from Guard Cells of Fava Bean. *Plant Cell*. 1996 Dec;8(12):2359-2368.

Li J, Wang XQ, Watson MB, Assmann SM.

Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. *Science*. 2000 Jan 14;287(5451):300-3.

Li Q, Lau A, Morris TJ, Guo L, Fordyce CB, Stanley EF.

A syntaxin 1, Galpha(o), and N-type calcium channel complex at a presynaptic nerve terminal: analysis by quantitative immunocolocalization. *J Neurosci*. 2004 Apr 21;24(16):4070-81.

Linder B, Raschke K.

A slow anion channel in guard cells, activating at large hyperpolarization, may be principal for stomatal closing. *FEBS Lett*. 1992 Nov 16;313(1):27-30.

Lin J, Weiss A.

T cell receptor signalling. *J Cell Sci*. 2001 Jan;114(Pt 2):243-4.

Lipka U, Fuchs R, Lipka V.

Arabidopsis non-host resistance to powdery mildews. *Curr Opin Plant Biol*. 2008 Aug;11(4):404-11. doi: 10.1016/j.pbi.2008.04.004. Epub 2008 May 20.

- Li S, Du L, Yuen G, Harris SD.  
Distinct ceramide synthases regulate polarized growth in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell*. 2006 Mar;17(3):1218-27. Epub 2006 Jan 4.
- Li X, Wang X, Yang Y, Li R, He Q, Fang X, Luu DT, Maurel C, Lin J.  
Single-molecule analysis of PIP<sub>2</sub>;1 dynamics and partitioning reveals multiple modes of *Arabidopsis* plasma membrane aquaporin regulation. *Plant Cell*. 2011 Oct;23(10):3780-97. doi: 10.1105/tpc.111.091454. Epub 2011 Oct 18.
- Little CHA, Eidt DC.  
Effect of Abscisic Acid on Budbreak and Transpiration in Woody Species. *Nature* 220, 498 - 499 1968 November; doi:10.1038/220498a0
- Liu J, Elmore JM, Fuglsang AT, Palmgren MG, Staskawicz BJ, Coaker G.  
RIN4 functions with plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases to regulate stomatal apertures during pathogen attack. *PLoS Biol*. 2009 Jun 30;7(6):e1000139. doi: 10.1371/journal.pbio.1000139. Epub 2009 Jun 30.
- Liu J, Zhu JK.  
A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science*. 1998 Jun 19;280(5371):1943-5.
- Liu P, Ying Y, Anderson RG.  
Platelet-derived growth factor activates mitogen-activated protein kinase in isolated caveolae. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Dec 9;94(25):13666-70.
- London E.  
Insights into lipid raft structure and formation from experiments in model membranes. *Curr Opin Struct Biol*. 2002 Aug;12(4):480-6.
- London E, Brown DA.  
Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim Biophys Acta*. 2000 Nov 23;1508(1-2):182-95.
- Luan S.  
Protein phosphatases in plants. *Annu Rev Plant Biol*. 2003;54:63-92.
- Luan S.  
The CBL-CIPK network in plant calcium signaling. *Trends Plant Sci*. 2009 Jan;14(1):37-42. doi: 10.1016/j.tplants.2008.10.005. Epub 2008 Dec 4.
- Ludwig AA, Romeis T, Jones JD.  
CDPK-mediated signalling pathways: specificity and cross-talk. *J Exp Bot*. 2004 Jan;55(395):181-8. Epub 2003 Nov 17.
- Ma SY, Wu WH.  
AtCPK23 functions in *Arabidopsis* responses to drought and salt stresses. *Plant Mol Biol*. 2007 Nov;65(4):511-8. Epub 2007 May 31.

- Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E.  
Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science*. 2009 May 22;324(5930):1064-8. doi: 10.1126/science.1172408. Epub 2009 Apr 30.
- MacRobbie EA.  
Signal transduction and ion channels in guard cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1998 Sep 29;353(1374):1475-88.
- Maeda Y, Tashima Y, Houjou T, Fujita M, Yoko-o T, Jigami Y, Taguchi R, Kinoshita T.  
Fatty acid remodeling of GPI-anchored proteins is required for their raft association. *Mol Biol Cell*. 2007 Apr;18(4):1497-506. Epub 2007 Feb 21.
- Malakshah SN, Habibi Rezaei M, Heidari M, Salekdeh GH.  
Proteomics reveals new salt responsive proteins associated with rice plasma membrane. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2007 Sep;71(9):2144-54. Epub 2007 Sep 7.
- Malínská K, Malínský J, Opekarová M, Tanner W.  
Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. *Mol Biol Cell*. 2003 Nov;14(11):4427-36. Epub 2003 Jul 25.
- Malínská K, Malínský J, Opekarová M, Tanner W.  
Distribution of Can1p into stable domains reflects lateral protein segregation within the plasma membrane of living *S. cerevisiae* cells. *J Cell Sci*. 2004 Dec 1;117(Pt 25):6031-41. Epub 2004 Nov 9.
- Malínský J, Opekarová M, Grossmann G, Tanner W.  
Membrane microdomains, rafts, and detergent-resistant membranes in plants and fungi. *Annu Rev Plant Biol*. 2013;64:501-29. doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120103.
- Mankelov TJ, Satchwell TJ, Burton NM. Mankelov TJ, Satchwell TJ, Burton NM.  
Refined views of multi-protein complexes in the erythrocyte membrane. *Blood Cells Mol Dis*. 2012 Jun 15;49(1):1-10. doi: 10.1016/j.bcmd.2012.03.001. Epub 2012 Mar 31.
- Marco E, Wedlich-Soldner R, Li R, Altschuler SJ, Wu LF.  
Endocytosis optimizes the dynamic localization of membrane proteins that regulate cortical polarity. *Cell*. 2007 Apr 20;129(2):411-22.
- Markwardt ML, Kremers GJ, Kraft CA, Ray K, Cranfill PJ, Wilson KA, Day RN, Wachter RM, Davidson MW, Rizzo MA.  
An improved cerulean fluorescent protein with enhanced brightness and reduced reversible photoswitching. *PLoS One*. 2011 Mar 29;6(3):e17896. doi: 10.1371/journal.pone.0017896.
- Marmagne A, Rouet MA, Ferro M, Rolland N, Alcon C, Joyard J, Garin J, Barbier-Brygoo H, Ephritikhine G.  
Identification of new intrinsic proteins in Arabidopsis plasma membrane proteome. *Mol Cell Proteomics*. 2004 Jul;3(7):675-91. Epub 2004 Apr 1.
- Marmagne A, Ferro M, Meinel T, Bruley C, Kuhn L, Garin J, Barbier-Brygoo H, Ephritikhine G.  
A high content in lipid-modified peripheral proteins and integral receptor kinases features in the Arabidopsis plasma membrane proteome. *Mol Cell Proteomics*. 2007 Nov;6(11):1980-96. Epub 2007 Jul 20.

- Marten H, Hedrich R, Roelfsema MR.  
Blue light inhibits guard cell plasma membrane anion channels in a phototropin-dependent manner. *Plant J.* 2007 Apr;50(1):29-39. Epub 2007 Feb 22.
- Martens JR, Navarro-Polanco R, Coppock EA, Nishiyama A, Parshley L, Grobaski TD, Tamkun MM.  
Differential targeting of Shaker-like potassium channels to lipid rafts. *J Biol Chem.* 2000 Mar 17;275(11):7443-6.
- Martín ML, Busconi L.  
Membrane localization of a rice calcium-dependent protein kinase (CDPK) is mediated by myristoylation and palmitoylation. *Plant J.* 2000 Nov;24(4):429-35.
- Martin SW, Konopka JB.  
Lipid raft polarization contributes to hyphal growth in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 2004 Jun;3(3):675-84.
- Martinière A, Lavagi I, Nageswaran G, Rolfe DJ, Maneta-Peyret L, Luu DT, Botchway SW, Webb SE, Mongrand S, Maurel C, Martin-Fernandez ML, Kleine-Vehn J, Friml J, Moreau P, Runions J.  
Cell wall constrains lateral diffusion of plant plasma-membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jul 31;109(31):12805-10. doi: 10.1073/pnas.1202040109. Epub 2012 Jun 11.
- Masserini M1, Ravasi D.  
Role of sphingolipids in the biogenesis of membrane domains. *Biochim Biophys Acta.* 2001 Jun 29;1532(3):149-61.
- Matkó J, Bodnár A, Vereb G, Bene L, Vámosi G, Szentesi G, Szöllösi J, Gáspár R, Horejsi V, Waldmann TA, Damjanovich S.  
GPI-microdomains (membrane rafts) and signaling of the multi-chain interleukin-2 receptor in human lymphoma/leukemia T cell lines. *Eur J Biochem.* 2002 Feb;269(4):1199-208.
- McLaughlin S, Aderem A.  
The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions. *Trends Biochem Sci.* 1995 Jul;20(7):272-6.
- Melcher K, Ng LM, Zhou XE, Soon FF, Xu Y, Suino-Powell KM, Park SY, Weiner JJ, Fujii H, Chinnusamy V, Kovach A, Li J, Wang Y, Li J, Peterson FC, Jensen DR, Yong EL, Volkman BF, Cutler SR, Zhu JK, Xu HE.  
A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature.* 2009 Dec 3;462(7273):602-8. doi: 10.1038/nature08613.
- Melkonian KA, Ostermeyer AG, Chen JZ, Roth MG, Brown DA.  
Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. *J Biol Chem.* 1999 Feb 5;274(6):3910-7.
- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY.  
Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell.* 2006 Sep 8;126(5):969-80.

- Men S, Boutté Y, Ikeda Y, Li X, Palme K, Stierhof YD, Hartmann MA, Moritz T, Grebe M.  
Sterol-dependent endocytosis mediates post-cytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity. *Nat Cell Biol.* 2008 Feb;10(2):237-44. doi: 10.1038/ncb1686. Epub 2008 Jan 27.
- Meyer K, Leube MP, Grill E.  
A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science.* 1994 Jun 3;264(5164):1452-5.
- Meyer S, Lauterbach C, Niedermeier M, Barth I, Sjolund RD, Sauer N.  
Wounding enhances expression of AtSUC3, a sucrose transporter from *Arabidopsis* sieve elements and sink tissues. *Plant Physiol.* 2004 Feb;134(2):684-93. Epub 2004 Jan 22.
- Mikołajczyk M, Awotunde OS, Muszyńska G, Klessig DF, Dobrowolska G.  
Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. *Plant Cell.* 2000 Jan;12(1):165-78.
- Milborrow BV.  
The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *J Exp Bot.* 2001 Jun;52(359):1145-64.
- Minami A, Fujiwara M, Furuto A, Fukao Y, Yamashita T, Kamo M, Kawamura Y, Uemura M.  
Alterations in detergent-resistant plasma membrane microdomains in *Arabidopsis thaliana* during cold acclimation. *Plant Cell Physiol.* 2009 Feb;50(2):341-59. doi: 10.1093/pcp/pcn202. Epub 2008 Dec 23.
- Mishra G, Zhang W, Deng F, Zhao J & Wang X.  
A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in *Arabidopsis*. *Science.* 2006 April 14;312 (5771):264-266.
- Mittelheuser CJ, Steveninck RFM.  
Stomatal Closure and Inhibition of Transpiration induced by (RS)-Abscisic Acid. *Nature* 221, 281 – 282. 1969 January; doi:10.1038/221281a0
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F.  
Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 2004 Oct;9(10):490-8.
- Mitra SK, Clouse SD, Goshe MB.  
Enrichment and preparation of plasma membrane proteins from *Arabidopsis thaliana* for global proteomic analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Methods Mol Biol.* 2009;564:341-55. doi: 10.1007/978-1-60761-157-8\_20.
- Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY.  
Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature.* 1997 Aug 28;388(6645):882-7.
- Miyazono KI, Miyakawa T, Sawano Y, Kubota K, Kang HJ, Asano A, Miyauchi Y, Takahashi M, Zhi Y, Fujita Y, Yoshida T, Kodaira KS, Yamaguchi-Shinozaki K, Tanokura M.  
Structural basis of abscisic acid signalling. *Nature.* 2009 Dec 3; 462 (7273):609-614.

Mizoguchi M, Umezawa T, Nakashima K, Kidokoro S, Takasaki H, Fujita Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.

Two closely related subclass II SnRK2 protein kinases cooperatively regulate drought-inducible gene expression. *Plant Cell Physiol.* 2010 May;51(5):842-7. doi: 10.1093/pcp/pcq041. Epub 2010 Apr 7.

Mongrand S, Morel J, Laroche J, Claverol S, Carde JP, Hartmann MA, Bonneu M, Simon-Plas F, Lessire R, Bessoule JJ.

Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *J Biol Chem.* 2004 Aug 27;279(35):36277-86. Epub 2004 Jun 9.

Monks DE, Aghoram K, Courtney PD, DeWald DB, Dewey RE.

Hyperosmotic stress induces the rapid phosphorylation of a soybean phosphatidylinositol transfer protein homolog through activation of the protein kinases SPK1 and SPK2. *Plant Cell.* 2001 May;13(5):1205-19.

Morales J, Fishburn CS, Wilson PT, Bourne HR.

Plasma membrane localization of G alpha z requires two signals. *Mol Biol Cell.* 1998 Jan;9(1):1-14.

Morandat S, El Kirat K.

Membrane resistance to Triton X-100 explored by real-time atomic force microscopy. *Langmuir.* 2006 Jun 20;22(13):5786-91.

Morel J, Claverol S, Mongrand S, Furt F, Fromentin J, Bessoule JJ, Blein JP, Simon-Plas F.

Proteomics of plant detergent-resistant membranes. *Mol Cell Proteomics.* 2006 Aug;5(8):1396-411. Epub 2006 Apr 28.

Mori IC, Murata Y, Yang Y, Munemasa S, Wang YF, Andreoli S, Tiriack H, Alonso JM, Harper JF, Ecker JR, Kwak JM, Schroeder JI.

CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca(2+)-permeable channels and stomatal closure. *PLoS Biol.* 2006 Oct;4(10):e327.

Mouritsen OG, Bloom M.

Mattress model of lipid-protein interactions in membranes. *Biophys J.* 1984 Aug;46(2):141-53.

Mouritsen OG.

Model answers to lipid membrane questions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Sep 1;3(9):a004622. doi: 10.1101/cshperspect.a004622.

Müller SM, Galliardt H, Schneider J, Barisas BG, Seidel T.

Quantification of Förster resonance energy transfer by monitoring sensitized emission in living plant cells. *Front Plant Sci.* 2013 Oct 29;4:413. doi: 10.3389/fpls.2013.00413.

Mustilli AC, Merlot S, Vavasseur A, Fenzi F, Giraudat J.

Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell.* 2002 Dec;14(12):3089-99.

- Murata Y, Pei ZM, Mori IC, Schroeder J.  
Abscisic acid activation of plasma membrane Ca(2+) channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in *abi1-1* and *abi2-1* protein phosphatase 2C mutants. *Plant Cell*. 2001 Nov;13(11):2513-23.
- Murray D, Ben-Tal N, Honig B, McLaughlin S.  
Electrostatic interaction of myristoylated proteins with membranes: simple physics, complicated biology. *Structure*. 1997 Aug 15;5(8):985-9.
- Murray D, Hermida-Matsumoto L, Buser CA, Tsang J, Sigal CT, Ben-Tal N, Honig B, Resh MD, McLaughlin S.  
Electrostatics and the membrane association of Src: theory and experiment. *Biochemistry*. 1998 Feb 24;37(8):2145-59.
- Mustilli AC, Merlot S, Vavasseur A, Fenzi F, Giraudat J.  
Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell*. 2002 Dec;14(12):3089-99.
- Nakashima K, Fujita Y, Kanamori N, Katagiri T, Umezawa T, Kidokoro S, Maruyama K, Yoshida T, Ishiyama K, Kobayashi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K.  
Three Arabidopsis SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy. *Plant Cell Physiol*. 2009 Jul;50(7):1345-63. doi: 10.1093/pcp/pcp083. Epub 2009 Jun 18.
- Nambara E, Marion-Poll A.  
Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu Rev Plant Biol*. 2005;56:165-85.
- Nebi T, Pestonjamas KN, Leszyk JD, Crowley JL, Oh SW, Luna EJ.  
Proteomic analysis of a detergent-resistant membrane skeleton from neutrophil plasma membranes. *J Biol Chem*. 2002 Nov 8;277(45):43399-409. Epub 2002 Aug 28.
- Negi J, Hashimoto M, and Iba K.  
Characterization of CO<sub>2</sub>-insensitive *Arabidopsis* mutant *cdi3*. In *Plant Cell Physiol*, 2005 pp. 176.
- Negi J, Matsuda O, Nagasawa T, Oba Y, Takahashi H, Kawai-Yamada M, Uchimiya H, Hashimoto M, Iba K.  
CO<sub>2</sub> regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature*. 2008 Mar 27;452(7186):483-6. doi: 10.1038/nature06720. Epub 2008 Feb 27.
- Nelson CJ, Hegeman AD, Harms AC, Sussman MR.  
A quantitative analysis of Arabidopsis plasma membrane using trypsin-catalyzed (18)O labeling. *Mol Cell Proteomics*. 2006 Aug;5(8):1382-95. Epub 2006 Apr 24.
- Neufeld EB, Cooney AM, Pitha J, Dawidowicz EA, Dwyer NK, Pentchev PG, Blanchette-Mackie EJ.  
Intracellular trafficking of cholesterol monitored with a cyclodextrin. *J Biol Chem*. 1996 Aug 30;271(35):21604-13.

- Nicolau DV Jr, Burrage K, Parton RG, Hancock JF.  
Identifying optimal lipid raft characteristics required to promote nanoscale protein-protein interactions on the plasma membrane. *Mol Cell Biol.* 2006 Jan;26(1):313-23.
- Nicolson GL.  
Transmembrane control of the receptors on normal and tumor cells. I. Cytoplasmic influence over surface components. *Biochim Biophys Acta.* 1976 Apr 13;457(1):57-108.
- Nicolson GL.  
The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40years. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Nov 1. pii: S0005-2736(13)00393-3. doi: 10.1016/j.bbamem.2013.10.019. [Epub ahead of print]
- Nishimura N, Hitomi K, Arvai AS, Rambo RP, Hitomi C, Cutler SR, Schroeder JI, Getzoff ED.  
Structural mechanism of abscisic acid binding and signaling by dimeric PYR1. *Science.* 2009 Dec 4;326(5958):1373-9. doi: 10.1126/science.1181829. Epub 2009 Oct 22.
- Nishimura N, Sarkeshik A, Nito K, Park SY, Wang A, Carvalho PC, Lee S, Caddell DF, Cutler SR, Chory J, Yates JR, Schroeder JI.  
PYR/PYL/RCAR family members are major in-vivo ABI1 protein phosphatase 2C-interacting proteins in Arabidopsis. *Plant J.* 2010 Jan;61(2):290-9. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.04054.x. Epub 2009 Oct 26.
- Nishimura N, Yoshida T, Kitahata N, Asami T, Shinozaki K, Hirayama T.  
ABA-Hypersensitive Germination1 encodes a protein phosphatase 2C, an essential component of abscisic acid signaling in Arabidopsis seed. *Plant J.* 2007 Jun;50(6):935-49. Epub 2007 Apr 25.
- Nisole S, Krust B, Hovanessian AG.  
Anchorage of HIV on permissive cells leads to coaggregation of viral particles with surface nucleolin at membrane raft microdomains. *Exp Cell Res.* 2002 Jun 10;276(2):155-73.
- Nolan KE, Saeed NA, Rose RJ.  
The stress kinase gene MtSK1 in *Medicago truncatula* with particular reference to somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 2006 Jul;25(7):711-22. Epub 2006 Mar 4.
- Nour-Eldin HH, Hansen BG, Nørholm MH, Jensen JK, Halkier BA.  
Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(18):e122. Epub 2006 Sep 25.
- Nühse TS, Boller T, Peck SC.  
A plasma membrane syntaxin is phosphorylated in response to the bacterial elicitor flagellin. *J Biol Chem.* 2003 Nov 14;278(46):45248-54. Epub 2003 Aug 28.
- Nühse TS, Bottrill AR, Jones AM, Peck SC.  
Quantitative phosphoproteomic analysis of plasma membrane proteins reveals regulatory mechanisms of plant innate immune responses. *Plant J.* 2007 Sep;51(5):931-40. Epub 2007 Jul 25.

- Nühse TS, Stensballe A, Jensen ON, Peck SC.  
Phosphoproteomics of the Arabidopsis plasma membrane and a new phosphorylation site database. *Plant Cell*. 2004 Sep;16(9):2394-405. Epub 2004 Aug 12.
- Oda T, Hashimoto H, Kuwabara N, Akashi S, Hayashi K, Kojima C, Wong HL, Kawasaki T, Shimamoto K, Sato M, Shimizu T.  
Structure of the N-terminal regulatory domain of a plant NADPH oxidase and its functional implications. *J Biol Chem*. 2010 Jan 8;285(2):1435-45. doi: 10.1074/jbc.M109.058909. Epub 2009 Oct 28.
- Ogasawara Y, Kaya H, Hiraoka G, Yumoto F, Kimura S, Kadota Y, Hishinuma H, Senzaki E, Yamagoe S, Nagata K, Nara M, Suzuki K, Tanokura M, Kuchitsu K.  
Synergistic activation of the Arabidopsis NADPH oxidase AtrbohD by Ca<sup>2+</sup> and phosphorylation. *J Biol Chem*. 2008 Apr 4;283(14):8885-92. doi: 10.1074/jbc.M708106200. Epub 2008 Jan 23.
- Ohvo-Rekilä H, Ramstedt B, Leppimäki P, Slotte JP.  
Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog Lipid Res*. 2002 Jan;41(1):66-97.
- Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP.  
Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem*. 1998 Mar 6;273(10):5419-22.
- Oldfield E, Chapman D.  
Molecular dynamics of cerebroside-cholesterol and sphingomyelin-cholesterol interactions: Implications for myelin membrane structure. *FEBS Lett*. 1972 Apr 1;21(3):303-306.
- Overton, Ernest.  
Studien über die Narkose. Gustav Fischer Verlag, Jena 1901.
- Palevitz BA, O'Kane DJ.  
Epifluorescence and video analysis of vacuole motility and development in stomatal cells of allium. *Science* 1981 214, 443-445.
- Park SY, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow TF, Alfred SE, Bonetta D, Finkelstein R, Provart NJ, Desveaux D, Rodriguez PL, McCourt P, Zhu JK, Schroeder JI, Volkman BF, Cutler SR.  
Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science*. 2009 May 22;324(5930):1068-71. doi: 10.1126/science.1173041. Epub 2009 Apr 30.
- Park YS, Hong SW, Oh SA, Kwak JM, Lee HH, Nam HG.  
Two putative protein kinases from Arabidopsis thaliana contain highly acidic domains. *Plant Mol Biol*. 1993 Jul;22(4):615-24.
- Patterson GH, Piston DW, Barisas BG.  
Förster distances between green fluorescent protein pairs. *Anal Biochem*. 2000 Sep 10;284(2):438-40.

- Peer M, Bach M, Mueller MJ, Waller F.  
Free sphingobases induce RBOHD-dependent reactive oxygen species production in Arabidopsis leaves. FEBS Lett. 2011 Oct 3;585(19):3006-10. doi: 10.1016/j.febslet.2011.08.016. Epub 2011 Aug 16.
- Peitzsch RM, McLaughlin S.  
Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins. Biochemistry. 1993 Oct 5;32(39):10436-43.
- Pelkmans L, Bürli T, Zerial M, Helenius A.  
Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. Cell. 2004 Sep 17;118(6):767-80.
- Perras MR, Abrams SR, Balsevich JJ.  
Characterization of an abscisic acid carrier in suspension-cultured barley cells. Journal of Experimental Botany. 1994 April;45 1565-1573.
- Perraki A, Cacas JL, Crowet JM, Lins L, Castroviejo M, German-Retana S, Mongrand S, Raffaele S.  
Plasma membrane localization of Solanum tuberosum remorin from group 1, homolog 3 is mediated by conformational changes in a novel C-terminal anchor and required for the restriction of potato virus X movement]. Plant Physiol. 2012 Oct;160(2):624-37. doi: 10.1104/pp.112.200519. Epub 2012 Aug 1.
- Peskan T, Westermann M, Oelmüller R.  
Identification of low-density Triton X-100-insoluble plasma membrane microdomains in higher plants. Eur J Biochem. 2000 Dec;267(24):6989-95.
- Peterson KM, Rychel AL, Torii KU.  
Out of the mouths of plants: the molecular basis of the evolution and diversity of stomatal development. Plant Cell. 2010 Feb;22(2):296-306. doi: 10.1105/tpc.109.072777. Epub 2010 Feb 23.
- Pfeffer SR.  
GTP-binding proteins in intracellular transport. Trends Cell Biol. 1992 Feb;2(2):41-6.
- Pietiäinen VM, Marjomäki V, Heino J, Hyypiä T.  
Viral entry, lipid rafts and caveosomes. Ann Med. 2005;37(6):394-403.
- Pilot G, Lacombe B, Gaymard F, Cherel I, Boucherez J, Thibaud JB, Sentenac H.  
Guard cell inward K<sup>+</sup> channel activity in Arabidopsis involves expression of the twin channel subunits KAT1 and KAT2. J Biol Chem. 2001 Feb 2;276(5):3215-21. Epub 2000 Oct 19.
- Pingoud A, Jeltsch A.  
Structure and function of type II restriction endonucleases. Nucleic Acids Res. 2001 Sep 15;29(18):3705-27.
- Piston DW, Kremers GJ.  
Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. Trends Biochem Sci. 2007 Sep;32(9):407-14. Epub 2007 Aug 30.

- Poffenroth M, Green DB, Tallman G.  
Sugar Concentrations in Guard Cells of *Vicia faba* Illuminated with Red or Blue Light : Analysis by High Performance Liquid Chromatography. *Plant Physiol.* 1992 Apr;98(4):1460-71.
- Polge C, Thomas M.  
SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends Plant Sci.* 2007 Jan;12(1):20-8. Epub 2006 Dec 12.
- Ponimaskin E, Schmidt MF.  
Acylation of viral glycoproteins: structural requirements for palmitoylation of transmembrane proteins. *Biochem Soc Trans.* 1995 Aug;23(3):565-8.
- Pralle A, Keller P, Florin EL, Simons K, Hörber JK.  
Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol.* 2000 Mar 6;148(5):997-1008.
- Prior IA, Harding A, Yan J, Sluimer J, Parton RG, Hancock JF.  
GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity. *Nat Cell Biol.* 2001 Apr;3(4):368-75.
- Proszynski TJ, Klemm R, Bagnat M, Gaus K, Simons K.  
Plasma membrane polarization during mating in yeast cells. *J Cell Biol.* 2006 Jun 19;173(6):861-6. Epub 2006 Jun 12.
- Raff MC, Mirsky R, Fields KL, Lisak RP, Dorfman SH, Silberberg DH, Gregson NA, Leibowitz S, Kennedy MC.  
Galactocerebroside is a specific cell-surface antigenic marker for oligodendrocytes in culture. *Nature.* 1978 Aug 24;274(5673):813-6.
- Raffaele S, Bayer E, Lafarge D, Cluzet S, German Retana S, Boubekeur T, Leborgne-Castel N, Carde JP, Lherminier J, Noirot E, Satiat-Jeunemaître B, Laroche-Traineau J, Moreau P, Ott T, Maule AJ, Raymond P, Simon-Plas F, Farmer EE, Bessoule JJ, Mongrand S.  
Remorin, a solanaceae protein resident in membrane rafts and plasmodesmata, impairs potato virus X movement. *Plant Cell.* 2009 May;21(5):1541-55. doi: 10.1105/tpc.108.064279. Epub 2009 May 26.
- Raffaele S, Mongrand S, Gamas P, Niebel A, Ott T.  
Genome-wide annotation of remorins, a plant-specific protein family: evolutionary and functional perspectives. *Plant Physiol.* 2007 Nov;145(3):593-600.
- Raffaele S, Perraki A, Mongrand S.  
The Remorin C-terminal Anchor was shaped by convergent evolution among membrane binding domains. *Plant Signal Behav.* 2013 Mar;8(3):e23207. doi: 10.4161/psb.23207. Epub 2013 Jan 8.
- Rajasekhar VK, Lamb C, Dixon RA.  
Early events in the signal pathway for the oxidative burst in soybean cells exposed to avirulent *Pseudomonas syringae* pv *glycinea*. *Plant Physiol.* 1999 Aug;120(4):1137-46.

- Raschke K, Humble GD.  
No uptake of anions required by opening stomata of *Vicia faba*: Guard cells release hydrogen ions. *Planta*. 1973 Mar;115(1):47-57. doi: 10.1007/BF00388604.
- Raschke K, Shabahang M, Wolf R.  
The slow and the quick anion conductance in whole guard cells: their voltage-dependent alternation, and the modulation of their activities by abscisic acid and CO<sub>2</sub>. *Planta*. 2003 Aug;217(4):639-50. Epub 2003 Apr 24.
- Rawat SS, Viard M, Gallo SA, Rein A, Blumenthal R, Puri A.  
Modulation of entry of enveloped viruses by cholesterol and sphingolipids (Review). *Mol Membr Biol*. 2003 Jul-Sep;20(3):243-54.
- Reiss Y, Brown MS, Goldstein JL.  
Divalent cation and prenyl pyrophosphate specificities of the protein farnesyltransferase from rat brain, a zinc metalloenzyme.
- Reiss Y, Goldstein JL, Seabra MC, Casey PJ, Brown MS.  
Inhibition of purified p21ras farnesyl:protein transferase by Cys-AAX tetrapeptides. *J Biol Chem*. 1992 Mar 25;267(9):6403-8. *Cell*. 1990 Jul 13;62(1):81-8.
- Resh MD.  
Regulation of cellular signalling by fatty acid acylation and prenylation of signal transduction proteins. *Cell Signal*. 1996 Sep;8(6):403-12.
- Resh MD.  
Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Aug 12;1451(1):1-16.
- Resh MD.  
Palmitoylation of ligands, receptors, and intracellular signaling molecules. *Sci STKE*. 2006 Oct 31;2006(359):re14.
- Reverey H, Veit M, Ponimaskin E, Schmidt MF.  
Differential fatty acid selection during biosynthetic S-acylation of a transmembrane protein (HEF) and other proteins in insect cells (Sf9) and in mammalian cells (CV1). *J Biol Chem*. 1996 Sep 27;271(39):23607-10.
- Reymond P, Kunz B, Paul-Pletzer K, Grimm R, Eckerskorn C, Farmer EE.  
Cloning of a cDNA encoding a plasma membrane-associated, uronide binding phosphoprotein with physical properties similar to viral movement proteins. *Plant Cell*. 1996 Dec;8(12):2265-76.
- Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE.  
Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2000 May;12(5):707-20.
- Robatzek S, Chinchilla D, Boller T.  
Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in *Arabidopsis*. *Genes Dev*. 2006 Mar 1;20(5):537-42.

- Robertson JD.  
The ultrastructure of cell membranes and their derivatives. *Biochemical Society Symposia*, 1959; 16. 3-43.
- Roche Y, Gerbeau-Pissot P, Buhot B, Thomas D, Bonneau L, Gresti J, Mongrand S, Perrier-Cornet JM, Simon-Plas F.  
Depletion of phytosterols from the plant plasma membrane provides evidence for disruption of lipid rafts. *FASEB J*. 2008 Nov;22(11):3980-91. doi: 10.1096/fj.08-111070. Epub 2008 Aug 1.
- Roelfsema MR, Hedrich R.  
In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'. *New Phytol*. 2005 Sep;167(3):665-91.
- Roelfsema MR, Levchenko V, Hedrich R.  
ABA depolarizes guard cells in intact plants, through a transient activation of R- and S-type anion channels. *Plant J*. 2004 Feb;37(4):578-88.
- Roelfsema MR, Prins HB.  
The membrane potential of *Arabidopsis thaliana* guard cells; depolarizations induced by apoplastic acidification. *Planta*. 1998 May;205(1):100-12.
- Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG.  
Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*. 1992 Feb 21;68(4):673-82.
- Rothman JE, Kennedy EP.  
Asymmetrical distribution of phospholipids in the membrane of *Bacillus megaterium*. *J Mol Biol*. 1977 Mar 5;110(3):603-18.
- Rothman JE, Lenard J.  
Membrane asymmetry. *Science*. 1977 Feb 25;195(4280):743-53.
- Rubio S, Rodrigues A, Saez A, Dizon MB, Galle A, Kim TH, Santiago J, Flexas J, Schroeder JI, Rodriguez PL.  
Triple loss of function of protein phosphatases type 2C leads to partial constitutive response to endogenous abscisic acid. *Plant Physiol*. 2009 Jul;150(3):1345-55. doi: 10.1104/pp.109.137174. Epub 2009 May 20.
- Rus A, Yokoi S, Sharkhuu A, Reddy M, Lee BH, Matsumoto TK, Koiwa H, Zhu JK, Bressan RA, Hasegawa PM.  
AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na<sup>(+)</sup> entry into plant roots. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Nov 20;98(24):14150-5. Epub 2001 Nov 6.
- Saez A, Apostolova N, Gonzalez-Guzman M, Gonzalez-Garcia MP, Nicolas C, Lorenzo O, Rodriguez PL.  
Gain-of-function and loss-of-function phenotypes of the protein phosphatase 2C HAB1 reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signalling. *Plant J*. 2004 Feb;37(3):354-69.

- Saez A, Robert N, Maktabi MH, Schroeder JI, Serrano R, Rodriguez PL.  
Enhancement of abscisic acid sensitivity and reduction of water consumption in Arabidopsis by combined inactivation of the protein phosphatases type 2C ABI1 and HAB1. *Plant Physiol.* 2006 Aug;141(4):1389-99. Epub 2006 Jun 23.
- Sagi M, Fluhr R.  
Superoxide production by plant homologues of the gp91(phox) NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol.* 2001 Jul;126(3):1281-90.
- Saji S, Bathula S, Kubo A, Tamaoki M, Kanna M, Aono M, Nakajima N, Nakaji T, Takeda T, Asayama M, Saji H.  
Disruption of a gene encoding C4-dicarboxylate transporter-like protein increases ozone sensitivity through deregulation of the stomatal response in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* 2008 Jan;49(1):2-10. Epub 2007 Dec 15.
- Sanchez SA, Gunther G, Tricerri MA, Gratton E.  
Methyl- $\beta$ -cyclodextrins preferentially remove cholesterol from the liquid disordered phase in giant unilamellar vesicles. *J Membr Biol.* 2011 May;241(1):1-10. doi: 10.1007/s00232-011-9348-8. Epub 2011 Apr 6.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.  
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Dec;74(12):5463-7.
- Santiago J, Rodrigues A, Saez A, Rubio S, Antoni R, Dupeux F, Park SY, Márquez JA, Cutler SR, Rodriguez PL.  
Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs. *Plant J.* 2009 Nov;60(4):575-88. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03981.x. Epub 2009 Jul 16.
- Sato A, Sato Y, Fukao Y, Fujiwara M, Umezawa T, Shinozaki K, Hibi T, Taniguchi M, Miyake H, Goto DB, Uozumi N.  
Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase. *Biochem J.* 2009 Dec 10;424(3):439-48. doi: 10.1042/BJ20091221.
- Saxton MJ, Jacobson K.  
Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1997;26:373-99.
- Scheiffele P, Roth MG, Simons K.  
Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. *EMBO J.* 1997 Sep 15;16(18):5501-8.
- Scherzer S, Maierhofer T, Al-Rasheid KA, Geiger D, Hedrich R.  
Multiple calcium-dependent kinases modulate ABA-activated guard cell anion channels. *Mol Plant.* 2012 Nov;5(6):1409-12. doi: 10.1093/mp/sss084. Epub 2012 Aug 29.
- Schmidt C, Schroeder JI.  
Anion Selectivity of Slow Anion Channels in the Plasma Membrane of Guard Cells (Large Nitrate Permeability). *Plant Physiol.* 1994 Sep;106(1):383-391.

- Schmitz G, Grandl M.  
Update on lipid membrane microdomains. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2008 Mar;11(2):106-12. doi: 10.1097/MCO.0b013e3282f44c2c.
- Schroeder RJ, Ahmed SN, Zhu Y, London E, Brown DA.  
Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains. *J Biol Chem*. 1998 Jan 9;273(2):1150-7.
- Schroedern JI, Hagiwara S.  
Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *Nature* 1989; 338, 427-430.
- Schroeder JI, Keller BU.  
Two types of anion channel currents in guard cells with distinct voltage regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Jun 1;89(11):5025-9.
- Schroeder JI, Kwak JM, Allen GJ.  
Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature*. 2001 Mar 15;410(6826):327-30.
- Schroeder R, London E, Brown D.  
Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Dec 6;91(25):12130-4.
- Schütz GJ, Kada G, Pastushenko VP, Schindler H.  
Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. *EMBO J*. 2000 Mar 1;19(5):892-901.
- Schwartz A, Illan N, Assmann SM.  
Vanadate inhibition of stomatal opening in epidermal peels of *Commelina communis* : Cl(-) interferes with vanadate uptake. *Planta*. 1991 Mar;183(4):590-6. doi: 10.1007/BF00194281.
- Schwessinger B, Zipfel C.  
News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Curr Opin Plant Biol*. 2008 Aug;11(4):389-95. doi: 10.1016/j.pbi.2008.06.001. Epub 2008 Jul 3.
- Scolari S, Engel S, Krebs N, Plazzo AP, Almeida RFMD, Prieto M, Veit M, Herrmann A.  
Lateral distribution of the transmembrane domain of influenza virus hemagglutinin revealed by time-resolved uorescence imaging. *J Biol Chem*. 2009; 284 (23):15708{15716.
- Schweighofer A, Hirt H, Meskiene I.  
Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends Plant Sci*. 2004 May;9(5):236-43.
- Seabra MC, Brown MS, Goldstein JL.  
Retinal degeneration in choroideremia: deficiency of rab geranylgeranyl transferase. *Science*. 1993 Jan 15;259(5093):377-81.

- Sedbrook JC, Carroll KL, Hung KF, Masson PH, Somerville CR.  
The Arabidopsis SKU5 gene encodes an extracellular glycosyl phosphatidylinositol-anchored glycoprotein involved in directional root growth. *Plant Cell*. 2002 Jul;14(7):1635-48.
- Sentenac H, Bonneaud N, Minet M, Lacroute F, Salmon JM, Gaymard F, Grignon C.  
Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science*. 1992 May 1;256(5057):663-5.
- Seo M, Koshiba T.  
Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci*. 2002 Jan;7(1):41-8.
- Seo M, Koshiba T.  
Transport of ABA from the site of biosynthesis to the site of action. *J Plant Res*. 2011 Jul;124(4):501-7. doi: 10.1007/s10265-011-0411-4. Epub 2011 Mar 18.
- Shahollari B, Peskan-Berghoefer T, Oelmueller R.  
Receptor kinases with leucine-rich repeats are enriched in Triton X-100 insoluble plasma membrane microdomains from plants. 2004 *Physiol Plant* 122 397–403.
- Shahollari B, Varma A, Oelmüller R.  
Expression of a receptor kinase in Arabidopsis roots is stimulated by the basidiomycete *Piriformospora indica* and the protein accumulates in Triton X-100 insoluble plasma membrane microdomains. *J Plant Physiol*. 2005 Aug;162(8):945-58.
- Shaul PW, Smart EJ, Robinson LJ, German Z, Yuhanna IS, Ying Y, Anderson RG, Michel T.  
Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem*. 1996 Mar 15;271(11):6518-22.
- Sheets ED, Lee GM, Simson R, Jacobson K.  
Transient confinement of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein in the plasma membrane. *Biochemistry*. 1997 Oct 14;36(41):12449-58.
- Shein HM, Enders JF, Levinthal JD.  
Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. II. Cell-virus relationships. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1962 Aug;48:1350-7.
- Sherrier DJ, Prime TA, Dupree P.  
Glycosylphosphatidylinositol-anchored cell-surface proteins from Arabidopsis. *Electrophoresis*. 1999 Jul;20(10):2027-35.
- Shi J, Kim KN, Ritz O, Albrecht V, Gupta R, Harter K, Luan S, Kudla J.  
Novel protein kinases associated with calcineurin B-like calcium sensors in Arabidopsis. *Plant Cell*. 1999 Dec;11(12):2393-405.
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y.  
Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol*. 1962 Jun;59:223-39.

- Shin R, Alvarez S, Burch A.Y, Jez J.M, Schachtman D.P.  
Phosphoproteomic identification of targets of the Arabidopsis sucrose nonfermenting-like kinase SnRK2.8 reveals a connection to metabolic processes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:6460–6465.
- Silvius JR, Bhagatji P, Leventis R, Terrone D.  
K-ras4B and prenylated proteins lacking "second signals" associate dynamically with cellular membranes. *Mol Biol Cell*. 2006 Jan;17(1):192-202. Epub 2005 Oct 19.
- Simon-Plas F, Elmayer T, Blein JP.  
The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J*. 2002 Jul;31(2):137-47.
- Simons K.  
Kai Simons: membrane master. *J Cell Biol*. 2008 Dec 29;183(7):1180-1. doi: 10.1083/jcb.1837pi.
- Simons K, Ikonen E.  
Functional rafts in cell membranes. *Nature*. 1997 Jun 5;387(6633):569-72.
- Simons K, Toomre D.  
Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000 Oct;1(1):31-9.
- Simons K, van Meer G.  
Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*. 1988 Aug 23;27(17):6197-202.
- Simons K, Vaz WL.  
Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2004;33:269-95.
- Simons M, Keller P, De Strooper B, Beyreuther K, Dotti CG, Simons K.  
Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 May 26;95(11):6460-4.
- Singer SJ, Nicolson GL.  
The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 1972; 175. 720-731.
- Sirichandra C, Gu D, Hu HC, Davanture M, Lee S, Djaoui M, Valot B, Zivy M, Leung J, Merlot S, Kwak JM.  
Phosphorylation of the Arabidopsis AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase. *FEBS Lett*. 2009 Sep 17;583(18):2982-6. doi: 10.1016/j.febslet.2009.08.033. Epub 2009 Aug 29.
- Slotte JP.  
Sphingomyelin-cholesterol interactions in biological and model membranes. *Chem Phys Lipids*. 1999 Nov;102(1-2):13-27.
- Smart EJ, Ying YS, Conrad PA, Anderson RG.  
Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation. *J Cell Biol*. 1994 Dec;127(5):1185-97.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC.

Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985 Oct;150(1):76-85.

Somerville C, Browse J.

Plant lipids: metabolism, mutants, and membranes. *Science.* 1991 Apr 5;252(5002):80-7.

Southern EM.

Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 1975 Nov 5;98(3):503-17.

Spira F, Mueller NS, Beck G, von Olshausen P, Beig J, Wedlich-Söldner R.

Patchwork organization of the yeast plasma membrane into numerous coexisting domains. *Nat Cell Biol.* 2012 Apr 29;14(6):640-8. doi: 10.1038/ncb2487.

Stanislas T, Bouyssie D, Rossignol M, Vesa S, Fromentin J, Morel J, Pichereaux C, Monsarrat B, Simon-Plas F.

Quantitative proteomics reveals a dynamic association of proteins to detergent-resistant membranes upon elicitor signaling in tobacco. *Mol Cell Proteomics.* 2009 Sep;8(9):2186-98. doi: 10.1074/mcp.M900090-MCP200. Epub 2009 Jun 13.

Steck TL.

The organization of proteins in the human red blood cell membrane. A review. *J Cell Biol.* 1974 Jul;62(1):1-19.

Stein M, Dittgen J, Sánchez-Rodríguez C, Hou BH, Molina A, Schulze-Lefert P, Lipka V, Somerville S.

Arabidopsis PEN3/PDR8, an ATP binding cassette transporter, contributes to nonhost resistance to inappropriate pathogens that enter by direct penetration. *Plant Cell.* 2006 Mar;18(3):731-46. Epub 2006 Feb 10.

Steuer B, Stuhlfauth T, Fock HP.

The efficiency of water use in water stressed plants is increased due to ABA induced stomatal closure. *Photosynth Res.* 1988 Nov;18(3):327-36. doi: 10.1007/BF00034837.

Stillwell W, Cheng YF, Wassall SR.

Plant sterol inhibition of abscisic acid-induced perturbations in phospholipid bilayers. *Biochim Biophys Acta.* 1990 May 24;1024(2):345-51.

Strádalová V, Stahlschmidt W, Grossmann G, Blazíková M, Rachel R, Tanner W, Malinsky J.

Furrow-like invaginations of the yeast plasma membrane correspond to membrane compartment of Can1. *J Cell Sci.* 2009 Aug 15;122(Pt 16):2887-94. doi: 10.1242/jcs.051227. Epub 2009 Jul 28.

Stulnig TM, Berger M, Sigmund T, Raederstorff D, Stockinger H, Waldhäusl W.

Polyunsaturated fatty acids inhibit T cell signal transduction by modification of detergent-insoluble membrane domains. *J Cell Biol.* 1998 Nov 2;143(3):637-44.

Subczynski WK, Kusumi A.

Dynamics of raft molecules in the cell and artificial membranes: approaches by pulse EPR spin labeling and single molecule optical microscopy. *Biochim Biophys Acta.* 2003 Mar 10;1610(2):231-43.

- Subtil A, Gaidarov I, Kobylarz K, Lampson MA, Keen JH, McGraw TE.  
Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jun 8;96(12):6775-80.
- Sutter JU, Campanoni P, Tyrrell M, Blatt MR.  
Selective mobility and sensitivity to SNAREs is exhibited by the Arabidopsis KAT1 K<sup>+</sup> channel at the plasma membrane. *Plant Cell*. 2006 Apr;18(4):935-54. Epub 2006 Mar 10.
- Takahashi A, Kawasaki T, Henmi K, Shil K, Kodama O, Satoh H, Shimamoto K.  
Lesion mimic mutants of rice with alterations in early signaling events of defense. *Plant J*. 1999 Mar;17(5):535-45.
- Takeda S, Gapper C, Kaya H, Bell E, Kuchitsu K, Dolan L.  
Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells. *Science*. 2008 Feb 29;319(5867):1241-4. doi: 10.1126/science.1152505.
- Tallman G, Zeiger E.  
Light quality and osmoregulation in vicia guard cells : evidence for involvement of three metabolic pathways. *Plant Physiol*. 1988 Nov;88(3):887-95.
- Tanner W, Malinsky J, Opekarová M.  
In plant and animal cells, detergent-resistant membranes do not define functional membrane rafts. *Plant Cell*. 2011 Apr;23(4):1191-3. doi: 10.1105/tpc.111.086249. Epub 2011 Apr 29.
- Tanokura M, Yamada K.  
Heat capacity and entropy changes of calmodulin induced by calcium binding. *J Biochem*. 1984 Mar;95(3):643-9.
- Testerink C, Dekker HL, Lim ZY, Johns MK, Holmes AB, Koster CG, Ktistakis NT, Munnik T.  
Isolation and identification of phosphatidic acid targets from plants. *Plant J*. 2004 Aug;39(4):527-36.
- Tissier AF, Marillonnet S, Klimyuk V, Patel K, Torres MA, Murphy G, Jones JD.  
Multiple independent defective suppressor-mutator transposon insertions in Arabidopsis: a tool for functional genomics. *Plant Cell*. 1999 Oct;11(10):1841-52.
- Titapiwatanakun B, Blakeslee JJ, Bandyopadhyay A, Yang H, Mravec J, Sauer M, Cheng Y, Adamec J, Nagashima A, Geisler M, Sakai T, Friml J, Peer WA, Murphy AS.  
ABCB19/PGP19 stabilises PIN1 in membrane microdomains in Arabidopsis. *Plant J*. 2009 Jan;57(1):27-44. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03668.x. Epub 2008 Oct 4.
- Torres MA, Dangl JL.  
Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr Opin Plant Biol*. 2005 Aug;8(4):397-403.
- Torres MA, Dangl JL, Jones JD.  
Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jan 8;99(1):517-22. Epub 2001 Dec 26.

- Torres MA, Jones JD, Dangl JL.  
Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol.* 2006 Jun;141(2):373-8.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J.  
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 Sep;76(9):4350-4.
- Törnroth-Horsefield S, Wang Y, Hedfalk K, Johanson U, Karlsson M, Tajkhorshid E, Neutze R, Kjellbom P.  
Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature.* 2006 Feb 9;439(7077):688-94. Epub 2005 Dec 7.
- Trouet D, Hermans D, Droogmans G, Nilius B, Eggermont J.  
Inhibition of volume-regulated anion channels by dominant-negative caveolin-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Jun 8;284(2):461-5.
- Trouverie J, Vidal G, Zhang Z, Sirichandra C, Madiona K, Amiar Z, Prioul JL, Jeannette E, Rona JP, Brault M.  
Anion channel activation and proton pumping inhibition involved in the plasma membrane depolarization induced by ABA in *Arabidopsis thaliana* suspension cells are both ROS dependent. *Plant Cell Physiol.* 2008 Oct;49(10):1495-507. doi: 10.1093/pcp/pcn126. Epub 2008 Aug 29.
- Trushina E, Du Charme J, Parisi J, McMurray CT.  
Neurological abnormalities in caveolin-1 knock out mice. *Behav Brain Res.* 2006 Sep 15;172(1):24-32. Epub 2006 Jun 5.
- Umezawa T, Nakashima K, Miyakawa T, Kuromori T, Tanokura M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K.  
Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport. *Plant Cell Physiol.* 2010 Nov;51(11):1821-39. doi: 10.1093/pcp/pcq156. Epub 2010 Oct 26.
- Umezawa T, Sugiyama N, Mizoguchi M, Hayashi S, Myouga F, Yamaguchi-Shinozaki K, Ishihama Y, Hirayama T, Shinozaki K.  
Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Oct 13;106(41):17588-93. doi: 10.1073/pnas.0907095106. Epub 2009 Sep 29.
- Umezawa T, Yoshida R, Maruyama K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.  
SRK2C, a SNF1-related protein kinase 2, improves drought tolerance by controlling stress-responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Dec 7;101(49):17306-11. Epub 2004 Nov 23.
- Underwood W, Somerville SC.  
Perception of conserved pathogen elicitors at the plasma membrane leads to relocalization of the *Arabidopsis* PEN3 transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Jul 23;110(30):12492-7. doi: 10.1073/pnas.1218701110. Epub 2013 Jul 8.

- Urbanus SL, Ott T.  
Plasticity of plasma membrane compartmentalization during plant immune responses. *Front Plant Sci.* 2012 Aug 3;3:181. doi: 10.3389/fpls.2012.00181. eCollection 2012.
- Vahisalu T, Kollist H, Wang YF, Nishimura N, Chan WY, Valerio G, Lamminmäki A, Brosché M, Moldau H, Desikan R, Schroeder JI, Kangasjärvi J.  
SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature.* 2008 Mar 27;452(7186):487-91. doi: 10.1038/nature06608. Epub 2008 Feb 27.
- Vain P, McMullen MD, Finer JJ.  
Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. *Plant Cell Rep.* 1993 Jan;12(2):84-8. doi: 10.1007/BF00241940.
- Valmonte GR, Arthur K, Higgins CM, Macdiarmid RM.  
Calcium-dependent protein kinases in plants: evolution, expression and function. *Plant Cell Physiol.* 2014 Mar;55(3):551-69. doi: 10.1093/pcp/pct200. Epub 2013 Dec 20.
- Van Breusegem F, Dat JF.  
Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiol.* 2006 Jun;141(2):384-90.
- van Meer G, Lisman Q.  
Sphingolipid transport: rafts and translocators. *J Biol Chem.* 2002 Jul 19;277(29):25855-8. Epub 2002 May 13.
- van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW.  
Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Feb;9(2):112-24. doi: 10.1038/nrm2330.
- Varma R, Mayor S.  
GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature.* 1998 Aug 20;394(6695):798-801.
- Veit M, Reverey H, Schmidt MF.  
Cytoplasmic tail length influences fatty acid selection for acylation of viral glycoproteins. *Biochem J.* 1996 Aug 15;318 ( Pt 1):163-72.
- Vereb G, Matkó J, Vámosi G, Ibrahim SM, Magyar E, Varga S, Szöllosi J, Jenei A, Gáspár R Jr, Waldmann TA, Damjanovich S.  
Cholesterol-dependent clustering of IL-2Ralpha and its colocalization with HLA and CD48 on T lymphoma cells suggest their functional association with lipid rafts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 May 23;97(11):6013-8.
- Vielreicher M, Harms G, Butt E, Walter U, Obergfell A.  
Dynamic interaction between Src and C-terminal Src kinase in integrin alpha11beta3-mediated signaling to the cytoskeleton. *J Biol Chem.* 2007 Nov 16;282(46):33623-31. Epub 2007 Sep 12.
- Visser und Rolinski  
Basic Photophysics. <http://www.photobiology.info/Visser-Rolinski.html>

Vlad F, Droillard MJ, Valot B, Khafif M, Rodrigues A, Brault M, Zivy M, Rodriguez PL, Merlot S, Laurière C.

Phospho-site mapping, genetic and in planta activation studies reveal key aspects of the different phosphorylation mechanisms involved in activation of SnRK2s. *Plant J.* 2010 Sep;63(5):778-90. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04281.x.

Vlad F, Rubio S, Rodrigues A, Sirichandra C, Belin C, Robert N, Leung J, Rodriguez PL, Laurière C, Merlot S.

Protein phosphatases 2C regulate the activation of the Snf1-related kinase OST1 by abscisic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2009 Oct;21(10):3170-84. doi: 10.1105/tpc.109.069179. Epub 2009 Oct 23.

Vogel SS, Nguyen TA, van der Meer BW, Blank PS.

The impact of heterogeneity and dark acceptor states on FRET: implications for using fluorescent protein donors and acceptors. *PLoS One.* 2012;7(11):e49593. doi: 10.1371/journal.pone.0049593. Epub 2012 Nov 13.

Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D.

An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 2003 Mar;33(5):949-56.

Wachtler V, Balasubramanian MK.

Yeast lipid rafts?--an emerging view. *Trends Cell Biol.* 2006 Jan;16(1):1-4. Epub 2005 Dec 6.

Wachtler V, Rajagopalan S, Balasubramanian MK.

Sterol-rich plasma membrane domains in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci.* 2003 Mar 1;116(Pt 5):867-74.

Walther TC, Brickner JH, Aguilar PS, Bernales S, Pantoja C, Walter P.

Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature.* 2006 Feb 23;439(7079):998-1003.

Warnecke D, Heinz E.

Recently discovered functions of glucosylceramides in plants and fungi. *Cell Mol Life Sci.* 2003 May;60(5):919-41.

Webb WW, Barak LS, Tank DW, Wu ES.

Molecular mobility on the cell surface. *Biochem Soc Symp.* 1981;(46):191-205.

Wernimont AK, Artz JD, Finerty P Jr, Lin YH, Amani M, Allali-Hassani A, Senisterra G, Vedadi M, Tempel W, Mackenzie F, Chau I, Lourido S, Sibley LD, Hui R.

Structures of apicomplexan calcium-dependent protein kinases reveal mechanism of activation by calcium. *Nat Struct Mol Biol.* 2010 May;17(5):596-601. doi: 10.1038/nsmb.1795. Epub 2010 May 2.

Whiteman SA, Serazetdinova L, Jones AM, Sanders D, Rathjen J, Peck SC, Maathuis FJ.

Identification of novel proteins and phosphorylation sites in a tonoplast enriched membrane fraction of *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics.* 2008 Sep;8(17):3536-47. doi: 10.1002/pmic.200701104.

- Wilcox C, Hu JS, Olson EN.  
Acylation of proteins with myristic acid occurs cotranslationally. *Science*. 1987 Nov 27;238(4831):1275-8.
- Wilhelm Pfeffer.  
Osmotische Untersuchungen. Wilh. Engelmann, Leipzig 1921. (2., unveränderte Aufl. des Erstdrucks von 1877)
- Wilkinson S.  
PH as a stress signal. *Plant Growth Regulation* 1999;29, 87-99.
- Wilkinson S, Davies WJ.  
ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant Cell Environ*. 2002 Feb;25(2):195-210.
- Willemsen V, Friml J, Grebe M, van den Toorn A, Palme K, Scheres B.  
Cell polarity and PIN protein positioning in Arabidopsis require STEROL METHYLTRANSFERASE1 function. *Plant Cell*. 2003 Mar;15(3):612-25.
- Willmer CM, Fricker M.  
Stomata. In *Topics in Plant Functional Biology (Vol 2)* 1996 (Chapman & Hall: London)
- Wilson BS, Steinberg SL, Liederman K, Pfeiffer JR, Surviladze Z, Zhang J, Samelson LE, Yang LH, Kotula PG, Oliver JM.  
Markers for detergent-resistant lipid rafts occupy distinct and dynamic domains in native membranes. *Mol Biol Cell*. 2004 Jun;15(6):2580-92. Epub 2004 Mar 19.
- Windsor ML, Milborrow BV, McFarlane IJ.  
The Uptake of (+)-S- and (-)-R-Abscisic Acid by Suspension Culture Cells of Hopbush (*Dodonaea viscosa*). *Plant Physiol*. 1992 Sep;100(1):54-62.
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ.  
An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One*. 2007 Aug 8;2(8):e718.
- Wouters FS, Verveer PJ, Bastiaens PI.  
Imaging biochemistry inside cells. *Trends Cell Biol*. 2001 May;11(5):203-11.
- Xavier R, Brennan T, Li Q, McCormack C, Seed B.  
Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity*. 1998 Jun;8(6):723-32.
- Xia Z, Liu Y.  
Reliable and global measurement of fluorescence resonance energy transfer using fluorescence microscopes. *Biophys J*. 2001 Oct;81(4):2395-402.
- Xu X, London E.  
The effect of sterol structure on membrane lipid domains reveals how cholesterol can induce lipid domain formation. *Biochemistry*. 2000 Feb 8;39(5):843-9.
- Xu ZS, Liu L, Ni ZY, Liu P, Chen M, Li LC, Chen YF, Ma YZ.  
W55a encodes a novel protein kinase that is involved in multiple stress responses. *J Integr Plant Biol*. 2009 Jan;51(1):58-66. doi: 10.1111/j.1744-7909.2008.00776.x.

- Yamada E.  
The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol.* 1955 Sep 25;1(5):445-58.
- Yamada H, Hanaki N, Imamura A, Ueguchi C, Mizuno T.  
An Arabidopsis protein that interacts with the cytokinin-inducible response regulator, ARR4, implicated in the His-Asp phosphorylay signal transduction. *FEBS Lett.* 1998 Sep 25;436(1):76-80.
- Yeagle PL.  
Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta.* 1985 Dec 9;822(3-4):267-87.
- Yeagle PL.  
Modulation of membrane function by cholesterol. *Biochimie.* 1991 Oct;73(10):1303-10. Review.
- Yoon HW, Kim MC, Shin PG, Kim JS, Kim CY, Lee SY, Hwang I, Bahk JD, Hong JC, Han C, Cho MJ.  
Differential expression of two functional serine/threonine protein kinases from soybean that have an unusual acidic domain at the carboxy terminus. *Mol Gen Genet.* 1997 Jul;255(4):359-71.
- Yoshida R, Hobo T, Ichimura K, Mizoguchi T, Takahashi F, Alonso J, Ecker JR, Shinozaki K.  
ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 2002 Dec;43 1473–1483.
- Yoshida T, Nishimura N, Kitahata N, Kuromori T, Ito T, Asami T, Shinozaki K, Hirayama T.  
ABA-hypersensitive germination3 encodes a protein phosphatase 2C (AtPP2CA) that strongly regulates abscisic acid signaling during germination among Arabidopsis protein phosphatase 2Cs. *Plant Physiol.* 2006 Jan;140(1):115-26. Epub 2005 Dec 9.
- Yoshida S, Uemura M, Niki T, Sakai A, Gusta LV.  
Partition of membrane particles in aqueous two-polymer phase system and its practical use for purification of plasma membranes from plants. *Plant Physiol.* 1983 May;72(1):105-14.
- Yoshida, R., Umezawa, T., Mizoguchi, T., Takahashi, S., Takahashi, F., and Shinozaki, K.  
The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 2006;281, 5310–5318.
- Yoshioka H, Sugie K, Park HJ, Maeda H, Tsuda N, Kawakita K, Doke N.  
Induction of plant gp91 phox homolog by fungal cell wall, arachidonic acid, and salicylic acid in potato. *Mol Plant Microbe Interact.* 2001 Jun;14(6):725-36.
- Yuan C, Johnston LJ.  
Atomic force microscopy studies of ganglioside GM1 domains in phosphatidylcholine and phosphatidylcholine/cholesterol bilayers. *Biophys J.* 2001 Aug;81(2):1059-69.
- Zeiger E, Assmann SM, Meioner H.  
THE PHOTOBIOLOGY OF *Paphiopedilum* STOMATA: OPENING UNDER BLUE BUT NOT RED LIGHT. *Photochemistry and Photobiology* 1983;38, 627-630.

- Zhang FL, Casey PJ.  
Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem.* 1996;65:241-69.
- Zhang W, Qin C, Zhao J, Wang X.  
Phospholipase D alpha 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101 (25):9508-9513.
- Zhang XS, Choi JH.  
Molecular evolution of calmodulin-like domain protein kinases (CDPKs) in plants and protists. *J Mol Evol.* 2001 Sep;53(3):214-24.
- Zhao J, Davis LC, Verpoorte R.  
Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv.* 2005 Jun;23(4):283-333.
- Zhao Z, Stanley BA, Zhang W, Assmann SM.  
ABA-regulated G protein signaling in Arabidopsis guard cells: a proteomic perspective. *J Proteome Res.* 2010 Apr 5;9(4):1637-47. doi: 10.1021/pr901011h.
- Zhao Z, Zhang W, Stanley BA, Assmann SM.  
Functional proteomics of Arabidopsis thaliana guard cells uncovers new stomatal signaling pathways. *Plant Cell.* 2008 Dec;20(12):3210-26. doi: 10.1105/tpc.108.063263. Epub 2008 Dec 29.
- Zheng J, Knighton DR, Xuong NH, Taylor SS, Sowadski JM, Ten Eyck LF.  
Crystal structures of the myristylated catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase reveal open and closed conformations. *Protein Sci.* 1993 Oct;2(10):1559-73.
- Zheng X, He K, Kleist T, Chen F, Luan S.  
Anion channel SLAH3 functions in nitrate-dependent alleviation of ammonium toxicity in Arabidopsis. *Plant Cell Environ.* 2014 Jun 18. doi: 10.1111/pce.12389. [Epub ahead of print]
- Zhu JK.  
Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 2002;53:247-73.
- Zhu SY, Yu XC, Wang XJ, Zhao R, Li Y, Fan RC, Shang Y, Du SY, Wang XF, Wu FQ, Xu YH, Zhang XY, Zhang DP.  
Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2007 Oct;19(10):3019-36. Epub 2007 Oct 5.
- Zou H, Zhang X, Zhao JR, Yang Q, Wu Z, Wang F, Huang C.  
Cloning and characterization of maize *ZmSPK1*, a homologue to nonfermenting1-related protein kinase2. *Afr J Biotechnol.* 2006 March;5 (6), pp. 490-496,
- Zur Hausen H.  
Induction of specific chromosomal aberrations by adenovirus type 12 in human embryonic kidney cells. *J Virol.* 1967 Dec;1(6):1174-85.
- Zurzolo C, van Meer G, Mayor S.  
The order of rafts. Conference on microdomains, lipid rafts and caveolae. *EMBO Rep.* 2003 Dec;4(12):1117-21. Epub 2003 Nov 21.

# Anhang II – Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

## II.1 Tabellen

---

Tabelle 1.1:	Größenangaben von verschiedenen Membrandomänen	13
Tabelle 1.2:	Zusammenfassung der Proteinmodifikationen	22
Tabelle 1.3:	Zusammenfassung der bisherigen DRM-Forschung	35
Tabelle 2.1:	PCR-Amplifikation	74
Tabelle 2.2:	Kolonie-PCR	74
Tabelle 2.3:	PCR-Profile	75
Tabelle 2.4:	USER-Reaktion	77
Tabelle 2.5:	Restriktionsverdau	78
Tabelle 2.6:	DNA-Transfektion von HEK293-Zellen	84
Tabelle 2.7:	Kotransfektion von HEK293-Zellen	84
Tabelle 2.8:	Verwendete Fluoreszenzproteine	92
Tabelle 2.9:	FRAP-Messprotokoll	93
Tabelle 2.10:	Zusammensetzung der selbst gegossenen SDS-Gele	96
Tabelle 2.11:	Verwendete Antikörper	98
Tabelle 2.12:	Verdünnungen für die Proteinquantifizierung	99
Tabelle 2.13:	Verwendete Klonierungsvektoren	103
Tabelle 2.14:	Verwendete Proteine	104
Tabelle 3.1:	Auswahl einiger der identifizierten, sterolabhängigen DRM-Proteine	108
Tabelle 3.2:	Zusammenfassung der durchgeführten Interaktionsanalysen und der identifizierten potentiellen Interaktionspartner	138
Tabelle IV.1:	Die Försterradii der verwendeten Fluorophorpaare	248

## II.2. Abbildungen

---

Abbildung 1.1:	Modell der Plasmamembran nach Gorter und Grendel (1925)	2
Abbildung 1.2:	Modell der Plasmamembran nach Danielli und Davson (1935)	3
Abbildung 1.3:	Modell der Plasmamembran nach Singer und Nicholson (1972)	4

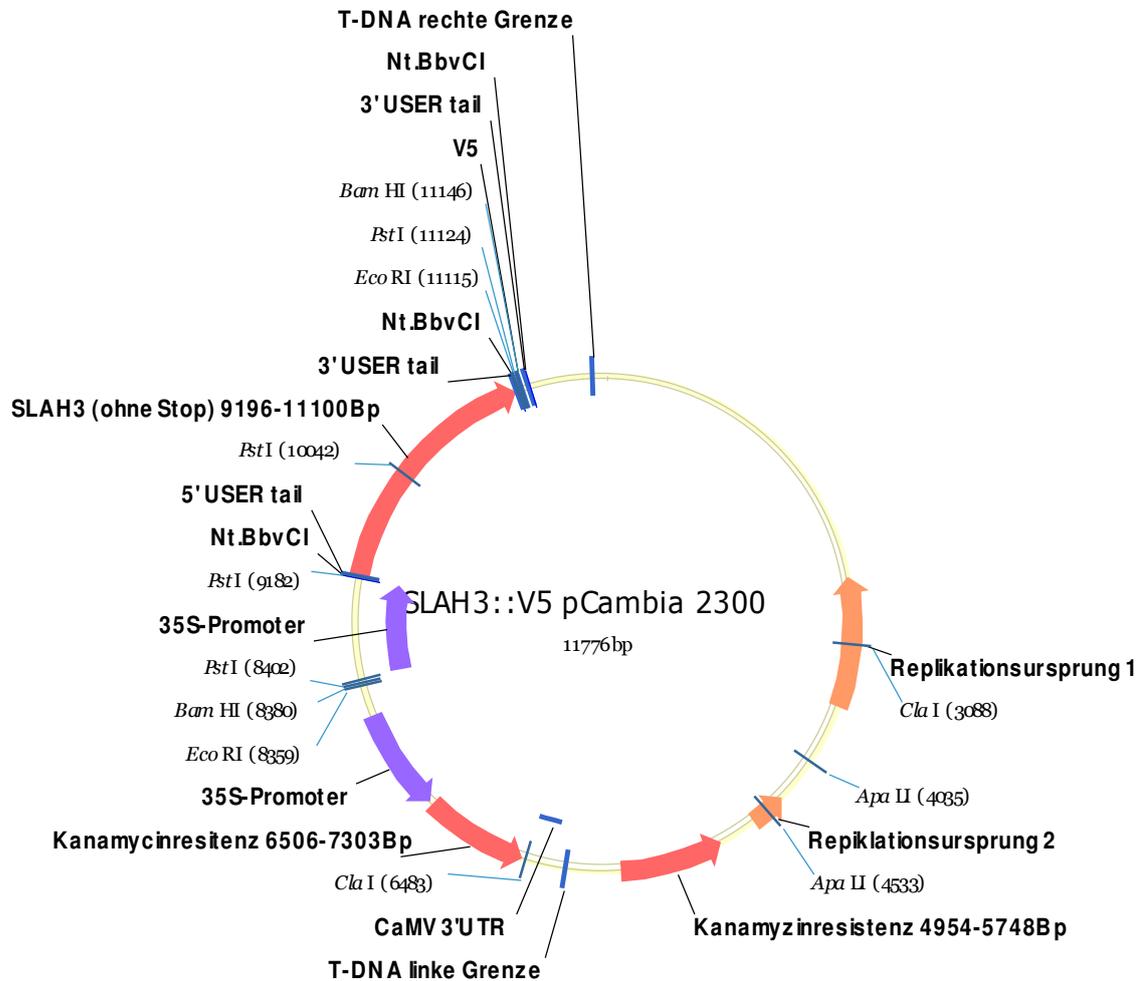
Abbildung 1.4:	Adaptiertes „Flüssigmosaikmodell“ nach Singer und Nicolson	5
Abbildung 1.5:	Model einer allgemeinen Membrandomäne	10
Abbildung 1.6:	Die drei Typen von „Rafts“ in der Plasmamembran	14
Abbildung 1.7:	Interaktion von GAPs und Src-Kinasen	22
Abbildung 1.8:	Organisation von „Lipid Rafts“ und Caveolae	28
Abbildung 1.9:	Anzahl der Publikationen über „Lipid Rafts“	30
Abbildung 1.10:	Proteinstruktur von StRem1.3	37
Abbildung 1.11:	Blaulich-induziertes Öffnen der Stomata	42
Abbildung 1.12:	Charakteristische Proteinstruktur der CPKs	46
Abbildung 1.13:	Phylogenetische Abstammung der Snrk2-Kinasen aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	49
Abbildung 1.14:	Proteinstruktur der Snrk2-Kinasen aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	50
Abbildung 1.15:	Quantifizierung der Abundanz verschiedener Transkripte in Mesophyll und Schließzellen	56
Abbildung 1.16:	Schematische Darstellung der schnellen ABA-Signalwege, die zu einer Aktivierung von SLAC1 und SLAH3 in Schließzellen führen	57
Abbildung 1.17:	AtrbohD und AtrbohF sind nach ABA-Behandlung in Schließzellen hochreguliert	59
Abbildung 1.18:	Putative Proteinstruktur der beiden NADPH-Oxidasen AtrbohD und AtrbohF	62
Abbildung 1.19:	Hypothetisches Model über die rboh-Aktivierung durch Phosphorylierung als Auslöser für einen positiven Regelmechanismus durch Ca <sup>2+</sup> und ROS	63
Abbildung 2.1:	USER-Reaktion	77
Abbildung 2.2:	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)	89
Abbildung 2.3:	Überlappung der Spektren von CFP und YFP	91
Abbildung 2.4:	„Sensitized Emission“-Förster-Resonanzenergietransfer (SE-FRET)	91
Abbildung 2.5:	Peroxidase-katalysierte Luminol-Chemolumineszenztechnik	94
Abbildung 2.6:	Membranisolierung	103
Abbildung 3.1:	MCD-Behandlung von isolierten Plasmamembranfraktionen von <i>Arabidopsis</i> -eGFP:: <i>StRem1.3</i>	108
Abbildung 3.2:	ABI1-abhängige Lokalisierung von CPK21 und SLAH3 in DRMs	109
Abbildung 3.3:	ABA-induzierte Interaktion zwischen SLAH3 und CPK21 in <i>A. thaliana</i> -Protoplasten mittels BiFC	111
Abbildung 3.4:	ABA-induzierte Interaktion zwischen SLAH3 und CPK21 in <i>A. thaliana</i> -Protoplasten mittels SE-FRET	113
Abbildung 3.5:	ABA-induzierte Interaktion zwischen SLAH3 und CPK21 in <i>A. thaliana</i> -Protoplasten mittels AB-FRET	115
Abbildung 3.6:	Die ABA-induzierte Interaktion zwischen SLAH3 und	116

	CPK21 in <i>A. thaliana</i> -Protoplasten mittels AB-FRET tritt vor allem in der Plasmamembran auf	
Abbildung 3.7:	ABA-vermittelter Anstieg der SLAH3-CPK21-Interaktion über die Zeit mittels SE-FRET	116
Abbildung 3.8:	Untersuchung des Einflusses von RCAR1/PYL9::mEos auf AB-FRET-Messungen	118
Abbildung 3.9:	Die ABA-induzierte Interaktion zwischen SLAH3 und CPK21 kann durch ABI1 und RCAR1/PYL9 modifiziert werden	119
Abbildung 3.10:	Membrandomänenlokalisierung der NADPH-Oxidasen AtrbohD und AtrbohF	121
Abbildung 3.11:	Statistische Auswertung der Kollokalisierungsanalysen zwischen AtRem1.3 und AtrbohF/AtrbohD nach transienter Überexpression in Epidermiszellen von <i>Arabidopsis thaliana</i>	121
Abbildung 3.12:	Koexpression von AtrbohF und AtrbohD in Epidermiszellen von <i>Nicotiana benthamiana</i>	122
Abbildung 3.13:	Membrandomänenlokalisierung von AtrbohD	123
Abbildung 3.14:	Membrandomänenlokalisierung der <i>Arabidopsis</i> -Remorine	124
Abbildung 3.15:	Lokalisation der <i>Arabidopsis</i> -Remorine mit AtrbohD	126
Abbildung 3.16:	Koexpression von AtRem1.3 und AtRem1.4 in Epidermiszellen von <i>Nicotiana benthamiana</i>	126
Abbildung 3.17:	Mobilitätsmessung der AtRem1.4-markierten Membrandomänen	127
Abbildung 3.18:	Membrandomänenlokalisierung von AtRem1.4	128
Abbildung 3.19:	Proteinstruktur von AtrbohD	129
Abbildung 3.20:	Lokalisation von AtRem1.4 mit den Phosphorylierungsmutanten von AtrbohD	129
Abbildung 3.21:	Membranlokalisierung von AtrbohD und der Snrk2-Kinasen	131
Abbildung 3.22:	Interaktionsanalyse mittels BiFC in <i>X. laevis</i> -Oozyten	132
Abbildung 3.23:	Interaktionsanalysen mittels BiFC in <i>A. thaliana</i> -Protoplasten	134
Abbildung 3.24:	Interaktionsanalysen mittels SE-FRET in <i>A. thaliana</i> -Protoplasten	136
Abbildung 3.25:	Interaktionsanalysen mittels AB-FRET in <i>A. thaliana</i> -Protoplasten	137
Abbildung 3.26:	Überexpression der Oxidasen und der Kinasen in HEK-Zellen	140
Abbildung 3.27:	Domänen-lokalisierung von AtrbohD und AtrbohF in HEK-Zellen	141
Abbildung 3.28:	Interaktionsanalysen mittels AB-FRET in HEK-Zellen	142
Abbildung 3.29:	MCD-Behandlung von AtrbohD exprimierenden HEK-Zellen	142
Abbildung 3.30:	ROS-Produktion von AtrbohD und AtrbohF in HEK-Zellen	143
Abbildung 3.31:	ROS-Produktion von AtrbohD in HEK-Zellen nach Behandlung mit MCD	144

Abbildung 3.32:	Snrk2.7 kann AtrbohD stärker induzieren als OST1	145
Abbildung 3.33:	Die Snrk2.7-vermittelte Phosphorylierung von AtrbohD erfolgt abhängig von deren Lokalisierung in Membrandomänen	146
Abbildung 4.1:	Model der Interaktion von SLAH3, CPK21 und ABI1 an der pflanzlichen Plasmamembran	158
Abbildung 4.2:	Fünf der Snrk2-Kinasen sind in Blättern und im Mesophyll exprimiert	161
Abbildung 4.3:	Model der lokalisierungsabhängigen Regulierung der NADPH-Oxidase AtrbohD	170
III.1.	SLAH3::V5	227
III.2.	CPK21::YFP	228
III.3.	ABI1::mCherry	229
III.4.	RCAR1/PYL9::mEos pUBQ10	230
III.5.	eGFP::AtrbohD	231
III.6.	DsRed2::AtRem1.3	232
III.7.	AtrbohD::mCherry	233
III.8.	eGFP::AtrbohF	234
III.9.	AtrbohD::YC	235
III.10.	OST1::YN	236
III.11.	AtrbohD::YC	237
III.12.	OST1::YN	238
III.13.	AtrbohD::mTurquoise	239
III.14.	mTurquoise::AtrbohF	240
III.15.	OST1::YFP	241
III.16.	YFP::AtrbohD	242
III.17.	CPK5::mTurquoise	243
III.18.	eGFP::AtRem1.4	244
III.19.	mCherry::AtRem1.3	245
IV.1:	Vergleich der Abhängigkeit des Abstandes zwischen eCFP/eYFP und mTurquoise/mVenus	249
IV.2:	Definition des oberen und unteren EFRET-Wertes in stabil transfizierten HEK-Zelllinien mittels AB-FRET	251
IV.3:	Koexpression von AtrbohD und CPK5 in verschiedenen Verhältnissen in HEK-Zellen	252
IV.4:	Kontrollfaktoren für die Interaktionsanalysen mittels SE-FRET	254
IV.5:	Interaktionsanalysen mittels SE-FRET in HEK-Zellen	255/ 256

## Anhang III - Plasmidkarten

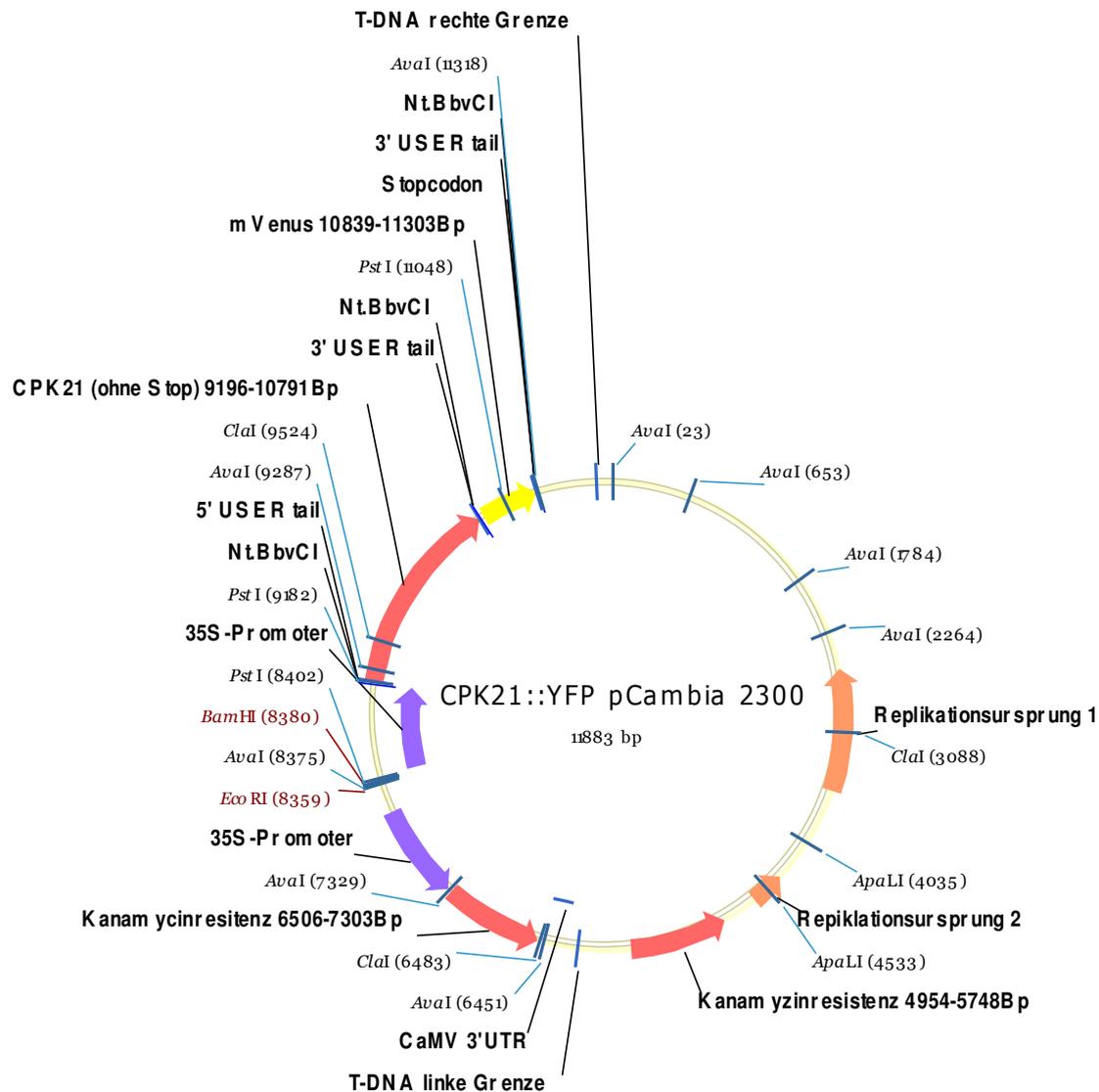
### III.1. SLAH3::V5



**Abbildung III.1: Vektorkarte von SLAH3::V5 in dem binären Vektor pCambia 2300**

SLAH3 (ohne Stopcodon) hat eine Länge von 2004Bp und ist C-terminal mit einem V5-Marker (44Bp) fusioniert. Ein Konstrukt für ABI1 wurde analog dazu hergestellt. Beide Konstrukte wurden für die transiente Transfektion von *Nicotiana benthamiana* und der anschließenden massenspektrometrischen Peptidquantifikation der daraus isolierten DRMs verwendet (Abbildung 3.2, Seite 109).

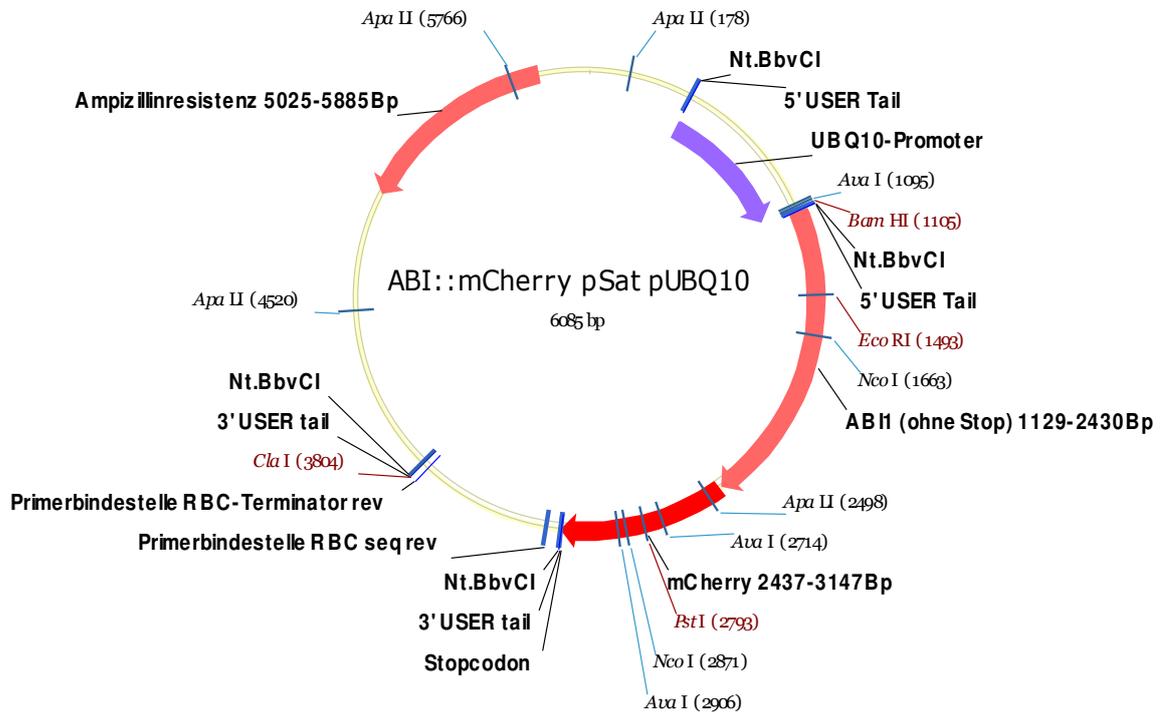
## III.2. CPK21::YFP



**Abbildung III.1: Vektorkarte von CPK21::YFP (mVenus) in dem binären Vektor pCambia 2300**

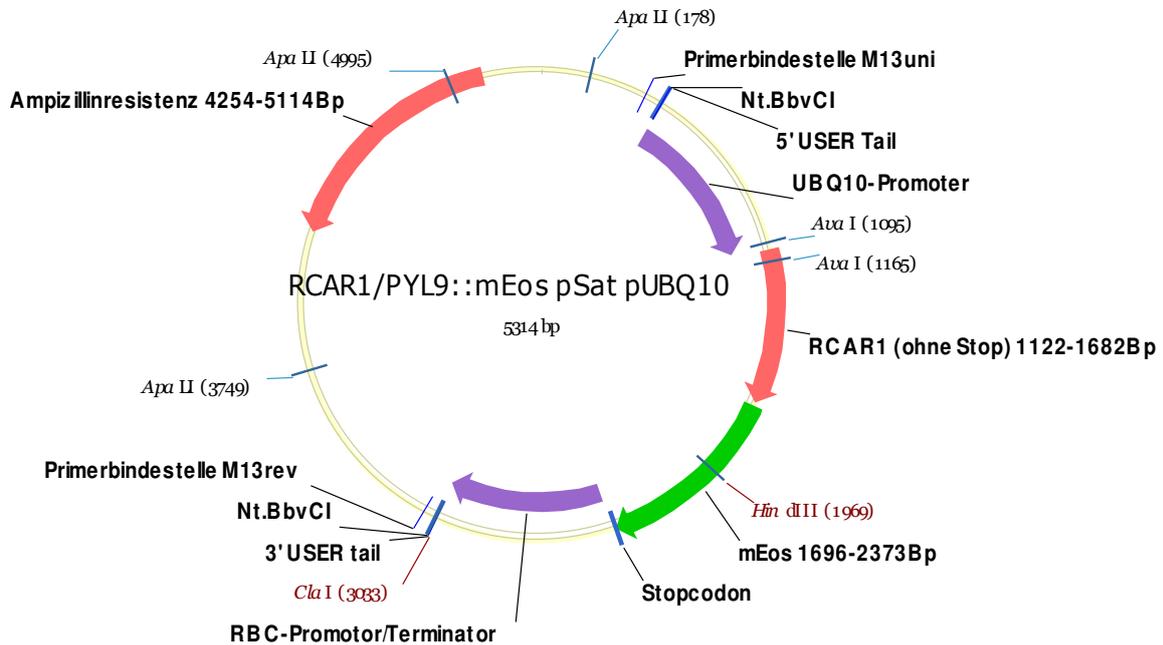
CPK21 (ohne Stopcodon) hat eine Länge von 1595Bp und ist C-terminal mit YFP (mVenus, 719Bp) fusioniert. Dieses Konstrukt wurde für die transiente Transfektion von *Nicotiana benthamiana* und der anschließenden massenspektrometrischen Peptidquantifikation der daraus isolierten DRMs verwendet (Abbildung 3.2, Seite 109). Analog dazu wurden die Konstrukte für die Snrk2-Kinasen Snrk2.2 (1086Bp), 2.3 (1083Bp), 2.7 (1050Bp), 2.8 (1029Bp) und OST1 (952Bp) und die NADPH-Oxidase AtrbohD hergestellt und für Experimente zur Membrandomänenlokalisierung der Proteine in *Nicotiana benthamiana* verwendet (Abbildung 3.21, Seite 131)

## III.3. ABI1::mCherry



**Abbildung III.3. Vektorkarte von ABI1::mCherry in dem Pflanzenvektor pSat pUBQ10**  
 ABI1 (ohne Stopcodon) hat eine Länge von 1301Bp und ist C-terminal mit mCherry (710Bp) fusioniert. Dieses Konstrukt wurde transient in Protoplasten von *Arabidopsis thaliana* exprimiert und fand somit Verwendung bei der Modifikation der SLAH3-CPK21-Interaktion, die mittels AB-FRET untersucht wurde (Abbildung 3.9, Seite 119).

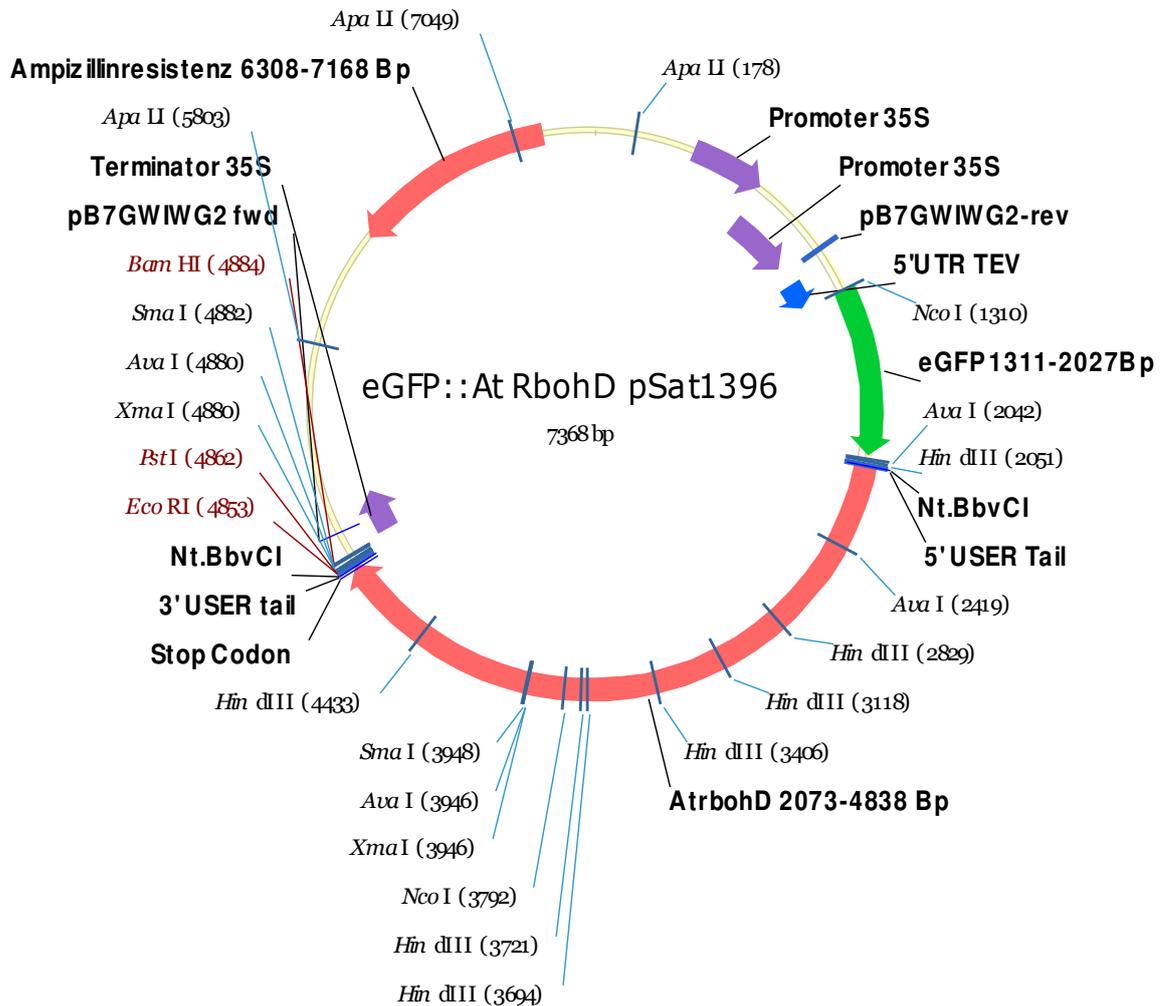
### III.4. RCAR1/PYL9::mEos pUBQ10



**Abbildung III.4. Vektorkarte von RCAR1/PYL9::mEos in dem Pflanzenvektor pSat pUBQ10**

RCAR1/PYL9 (ohne Stopcodon) hat eine Länge von 560Bp und ist C-terminal mit mEos (677Bp) fusioniert. Dieses Konstrukt wurde transient in Protoplasten von *Arabidopsis thaliana* exprimiert und fand somit Verwendung bei der Modifikation der SLAH3-CPK21-Interaktion, die mittels AB-FRET untersucht wurde (Abbildung 3.9, Seite 119).

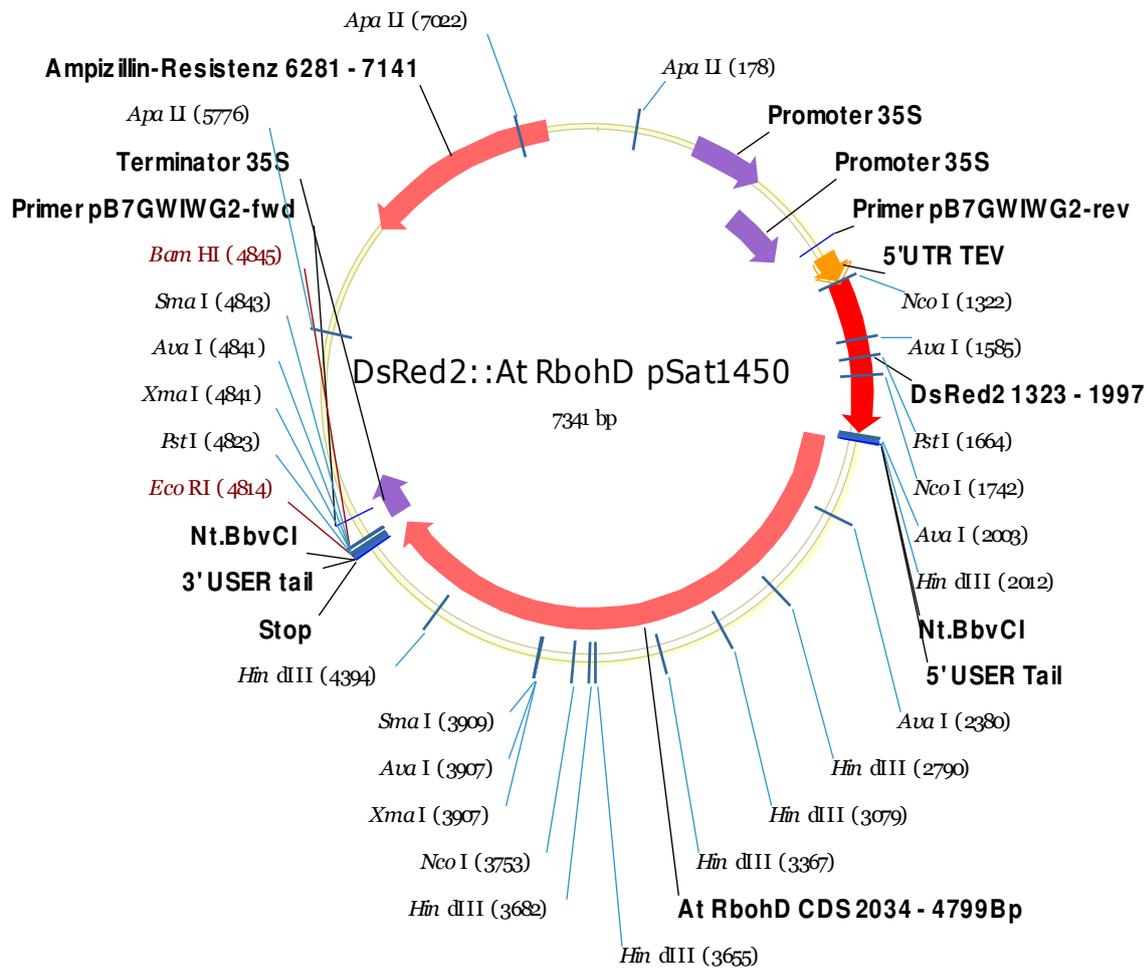
## III.5. eGFP::AtrbohD



**Abbildung III.5. Vektorkarte von eGFP::AtrbohD in dem Pflanzenvektor pSat 1396**

AtrbohD hat eine Länge von 2765Bp und ist N-terminal mit eGFP (ohne Stopcodon, 716Bp) fusioniert. Analog dazu wurde ein ähnliches Konstrukt für AtrbohF (2725Bp) hergestellt. Diese Konstrukte wurde transient via PIG in den Epidermiszellen von *Arabidopsis thaliana* exprimiert und fanden Verwendung bei der Membrandomänenlokalisierung der beiden untersuchten NADPH-Oxidasen AtrbohD und AtrbohF (Abbildung 3.10, Seite 121).

## III.6. DsRed2::AtRem1.3



**Abbildung III.6. Vektorkarte von DsRed2::AtRem1.3 in dem Pflanzenvektor pSat 1450**  
 AtRem1.3 hat eine Länge von 572Bp und ist N-terminal mit DsRed2 (ohne Stopcodon, 674Bp) fusioniert. Dieses Konstrukt wurde transient via PIG in den Epidermiszellen von *Arabidopsis thaliana* exprimiert und fand Verwendung bei der Membrandomänen-lokalisierung der beiden untersuchten NADPH-Oxidasen AtrbohD und AtrbohF (siehe III.5; Abbildung 3.10, Seite 121).

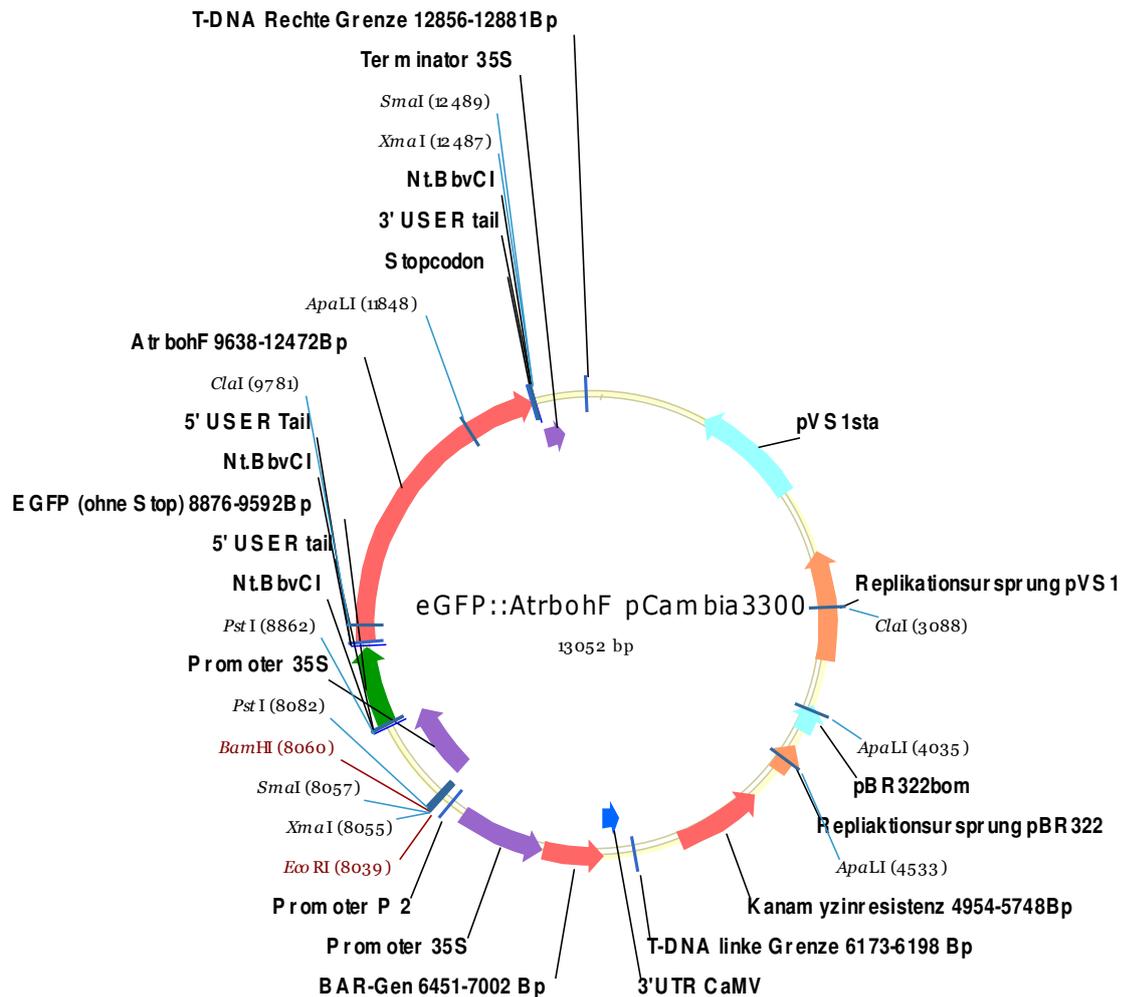
## III.7. AtrbohD::mCherry



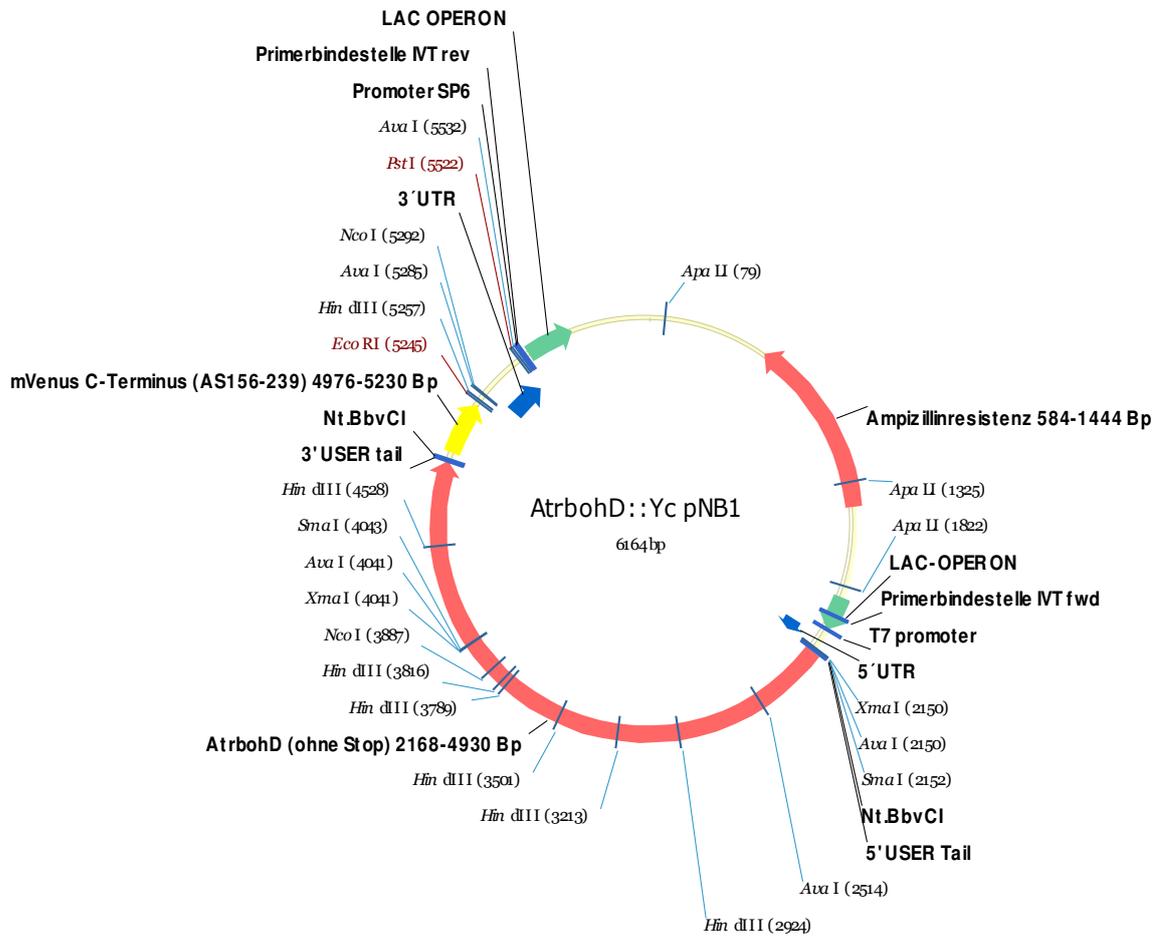
**Abbildung III.7. Vektorkarte von AtrbohD::mCherry in dem binären Vektor pCambia 3300**

AtrbohD (ohne Stopcodon) hat eine Länge von 2765Bp und ist C-terminal mit mCherry (710Bp) fusioniert. Analog dazu wurden die beiden Phosphorylierungsmutanten S343A und S347A (beide Phosphorylierungsstellen sind in der Karte eingetragen) hergestellt und fanden Verwendung für die Koexpression mit dem Remorin eGFP::AtRem1.4 (siehe III.18; Abbildung 3.20, Seite 129). Diese Konstrukte wurde transient in *Nicotiana benthamiana* exprimiert und für die Koexpression mit AtrbohF verwendet (Abbildung 3.12, Seite 122), für den Nachweis des Einflusses von MCD auf die Membrandomänenlokalisierung der AtrbohD (Abbildung 3.13, Seite 122) und für die Lokalisierungsexperimente mit den Remorinen (siehe III.18; Abbildung 3.15, Seite 126).

## III.8. eGFP::AtrbohF

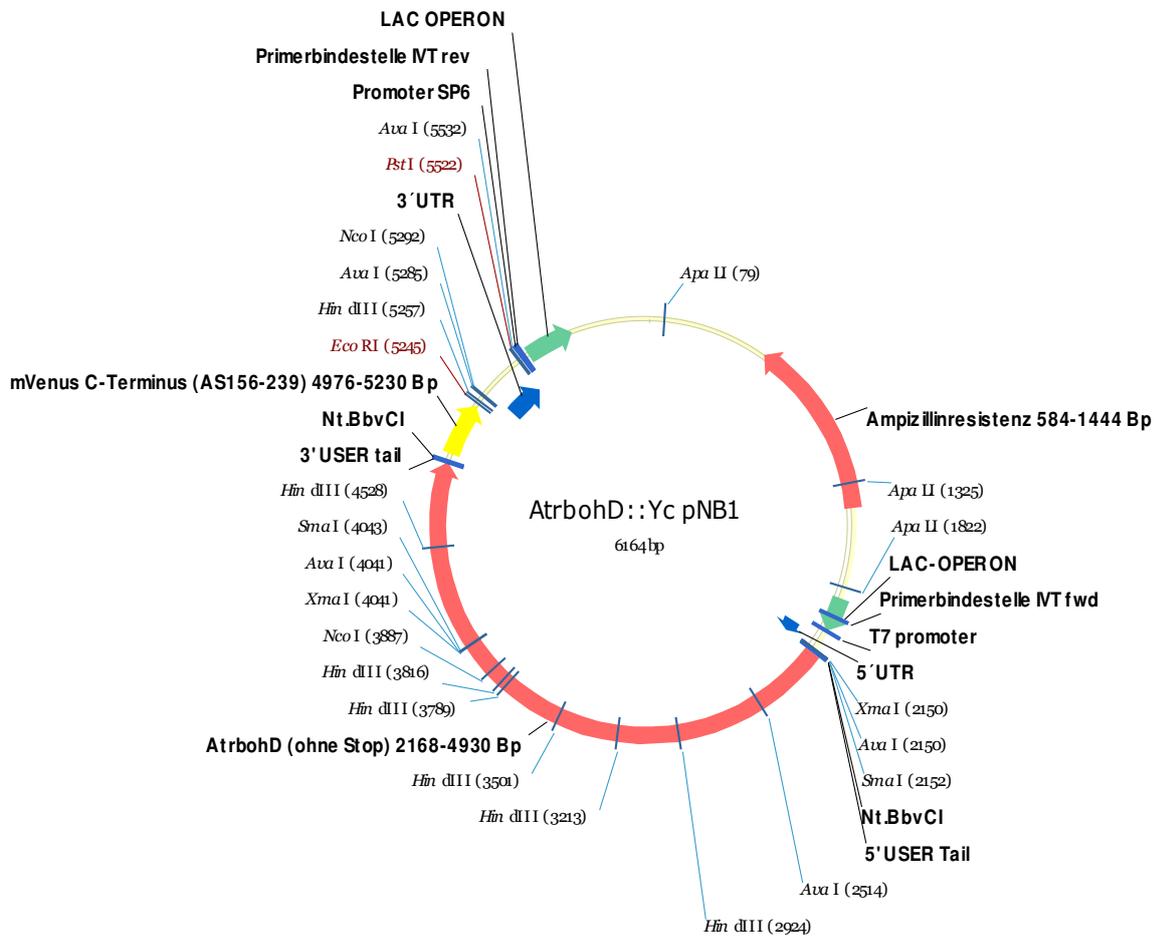


**Abbildung III.8. Vektorkarte von eGFP::AtrbohF in dem binären Vektor pCambia 3300**  
 AtrbohF hat eine Länge von 2834Bp und ist N-terminal mit eGFP (ohne Stopcodon, 716Bp) fusioniert. Dieses Konstrukt wurde transient in *Nicotiana benthamiana* exprimiert und für die Koexpression mit der AtrbohD (siehe III.7) verwendet (Abbildung 3.12, Seite 122).

III.9. AtrbohD::Y<sup>C</sup>

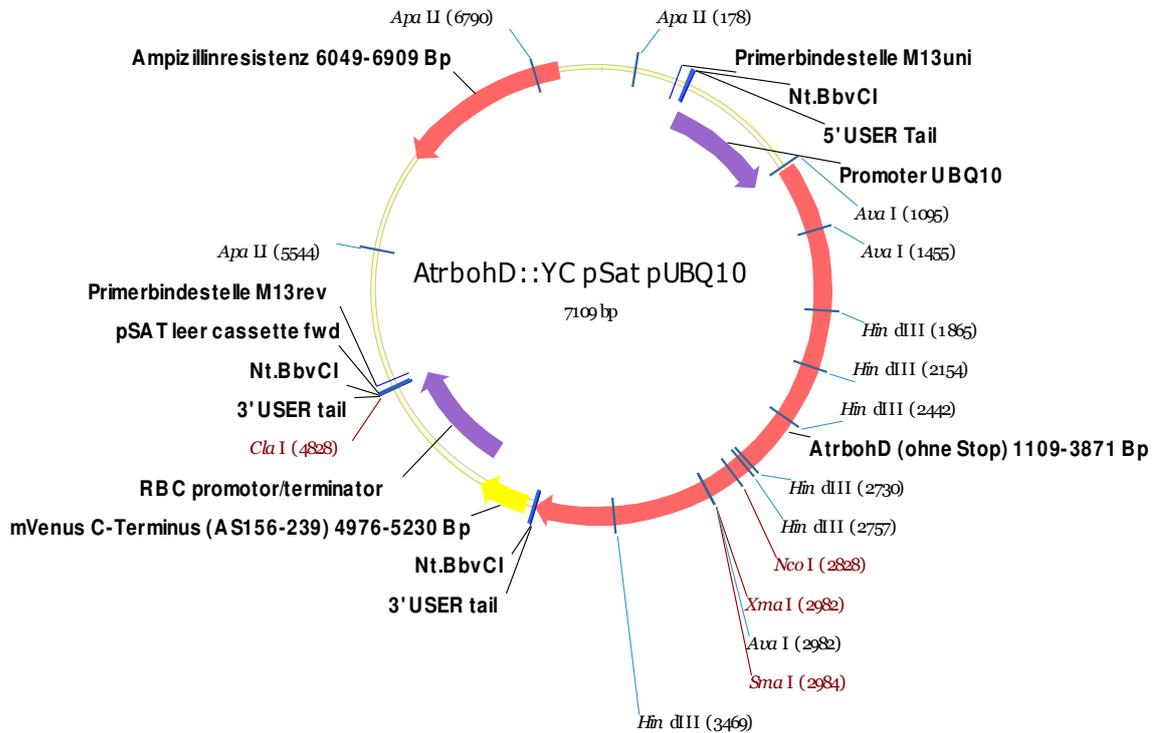
**Abbildung III.9. Vektorkarte von AtrbohD::Y<sup>C</sup> in dem Oozytenvektor pNB1**

AtrbohD (ohne Stopcodon) hat eine Länge von 2765Bp und ist C-terminal mit der C-terminalen Hälfte von YFP (mVenus, 254Bp) fusioniert. Analog zu diesem Konstrukt wurde auch AtrbohF (ohne Stop, 2831Bp) kloniert. Diese Konstrukte wurden transient in Oozyten von *Xenopus laevis* exprimiert und für die BiFC-Experimente mit den Snrk2-Kinasen (siehe III.10) verwendet (Abbildung 3.22, Seite 132).

III.10. OST1::Y<sup>N</sup>

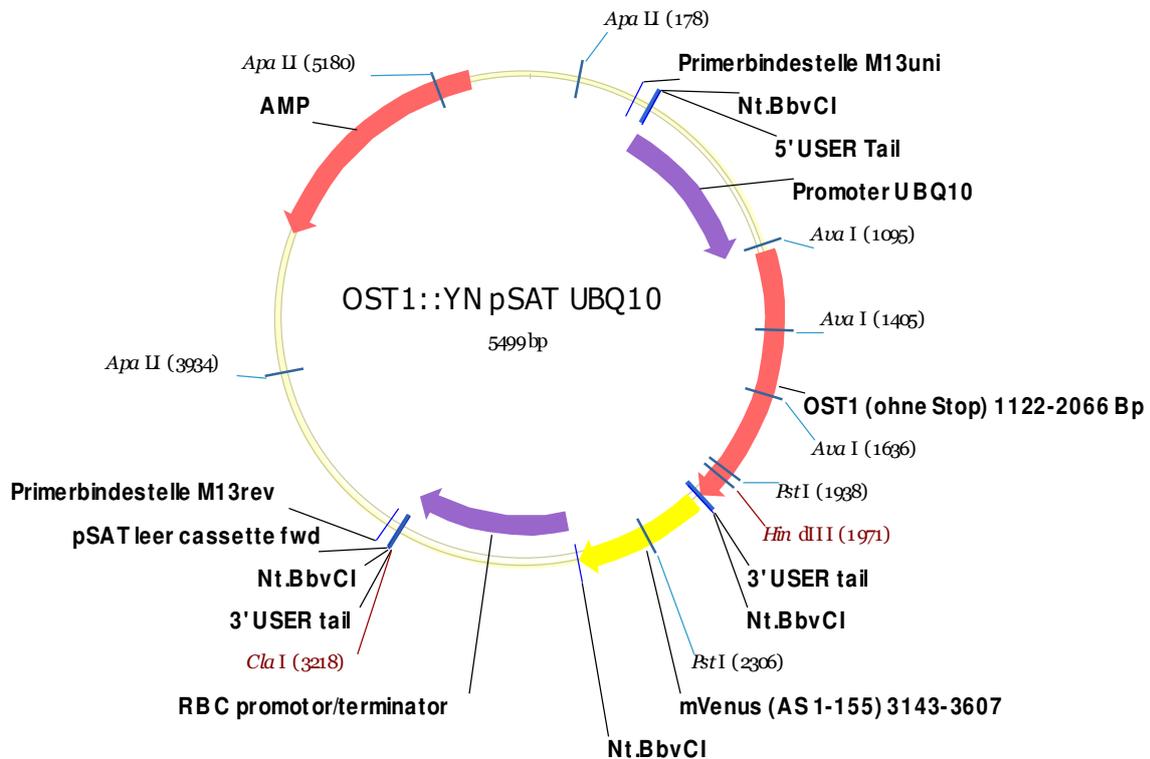
**Abbildung III.10. Vektorkarte von OST1::Y<sup>N</sup> in dem Oozytenvektor pNB1**

OST1 (ohne Stopcodon) hat eine Länge von 952Bp und ist C-terminal mit der N-terminalen Hälfte von YFP (mVenus, 560Bp) fusioniert. Analog dazu wurden die Konstrukte für die Snrk2-Kinasen Snrk2.2 (1086Bp), 2.3 (1083Bp), 2.7 (1050Bp) und 2.8 (1029Bp) hergestellt. Die Konstrukte wurden transient in Oozyten von *Xenopus laevis* exprimiert und für die BiFC-Experimente mit den NADPH-Oxidasen AtrbohD und AtrbohF (siehe III.9) verwendet (Abbildung 3.22, Seite 132).

III.11. AtrbohD::Y<sup>C</sup>

**Abbildung III.11. Vektorkarte von AtrbohD::Y<sup>C</sup> in dem Pflanzenvektor pSat pUBQ10**

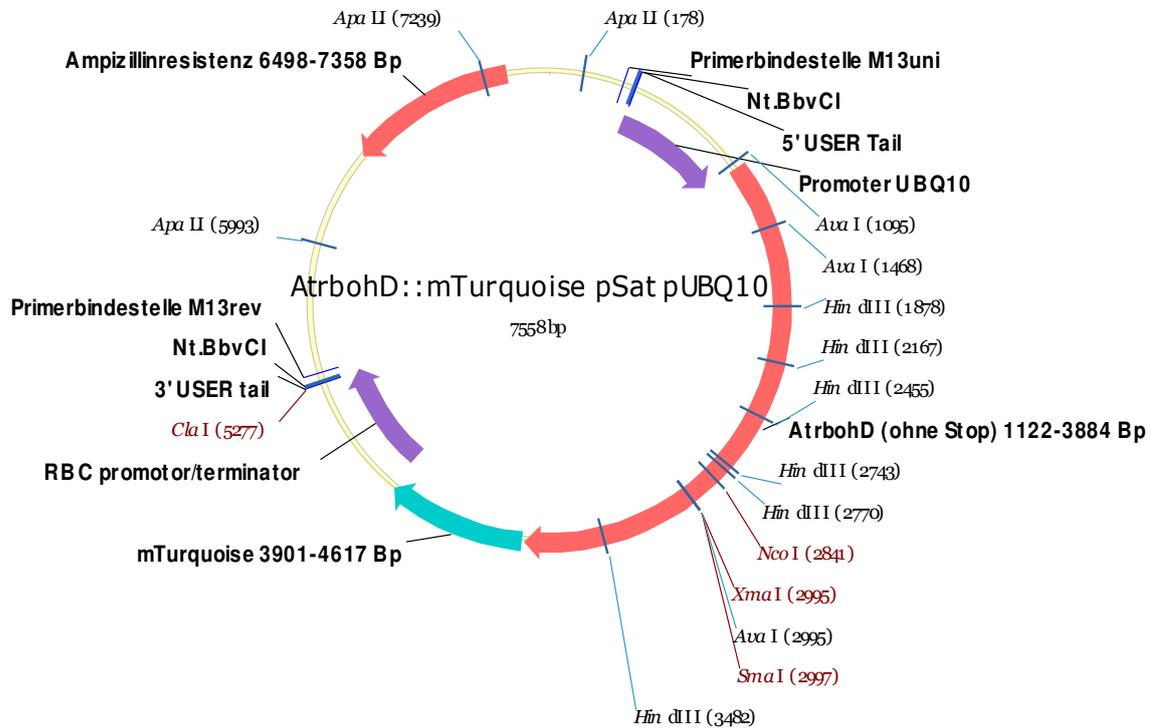
AtrbohD (ohne Stopcodon) hat eine Länge von 2765Bp und ist C-terminal mit der C-terminalen Hälfte von YFP (mVenus, 254Bp) fusioniert. Analog zu diesem Konstrukt wurde auch AtrbohF (ohne Stopcodon, 2831Bp) kloniert. Diese Konstrukte wurden transient in Protoplasten von *Arabidopsis thaliana* exprimiert und für die BiFC-Experimente mit den Snrk2-Kinasen (siehe III.12) verwendet (Abbildung 3.23, Seite 134).

III.12. OST1::Y<sup>N</sup>

**Abbildung III.12. Vektorkarte von OST1::Y<sup>N</sup> in dem Pflanzenvektor pSat pUBQ10**

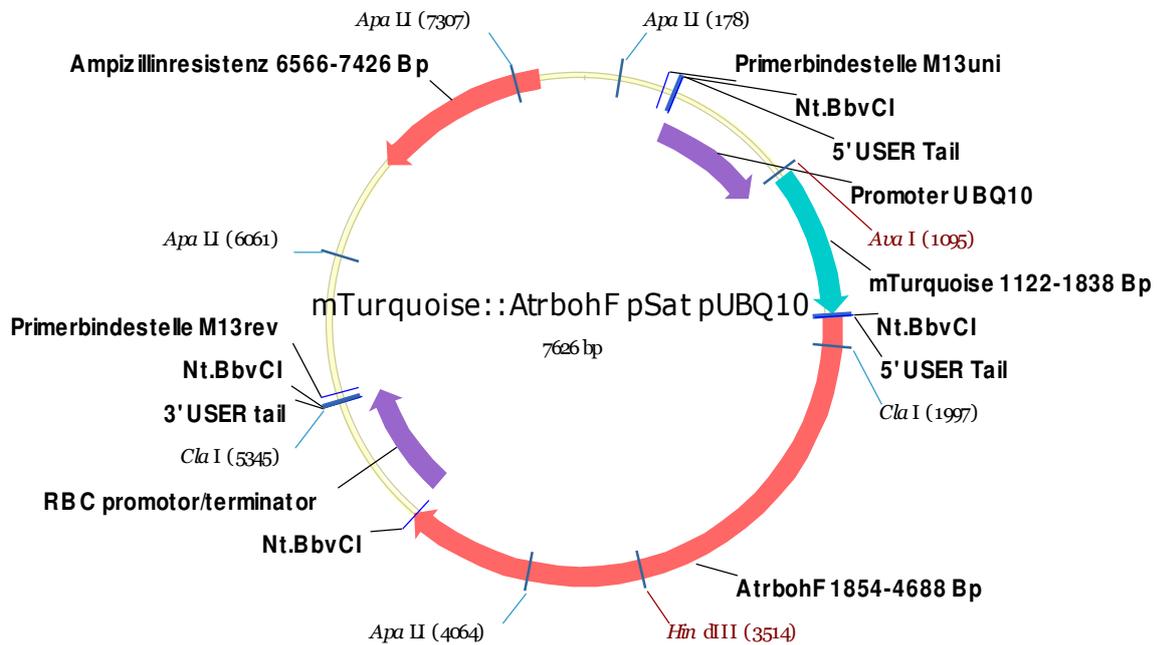
OST1 (ohne Stopcodon) hat eine Länge von 952Bp und ist C-terminal mit der N-terminalen Hälfte von YFP (mVenus, 560Bp) fusioniert. Analog dazu wurden die Konstrukte für die Snrk2-Kinasen Snrk2.2 (1086Bp), 2.3 (1083Bp), 2.7 (1050Bp) und 2.8 (1029Bp) hergestellt. Die Konstrukte wurden transient in Protoplasten von *Arabidopsis thaliana* exprimiert und für die BiFC-Experimente mit den NADPH-Oxidasen AtrbohD und AtrbohF (siehe III.11) verwendet (Abbildung 3.23, Seite 134).

## III.13. AtrbohD::mTurquoise



**Abbildung III.13. Vektorkarte von AtrbohD::CFP in dem Pflanzenvektor pSat pUBQ10**  
 AtrbohD (ohne Stopcodon) hat eine Länge von 2765Bp und ist C-terminal mit CFP (mTurquoise, 716Bp) fusioniert. Dieses Konstrukt wurde transient in Protoplasten von *Arabidopsis thaliana* exprimiert und für die FRET-Experimente mit den Snrk2-Kinasen (siehe III.15) verwendet (Abbildung 3.24, Seite 136 und 3.25, Seite 137).

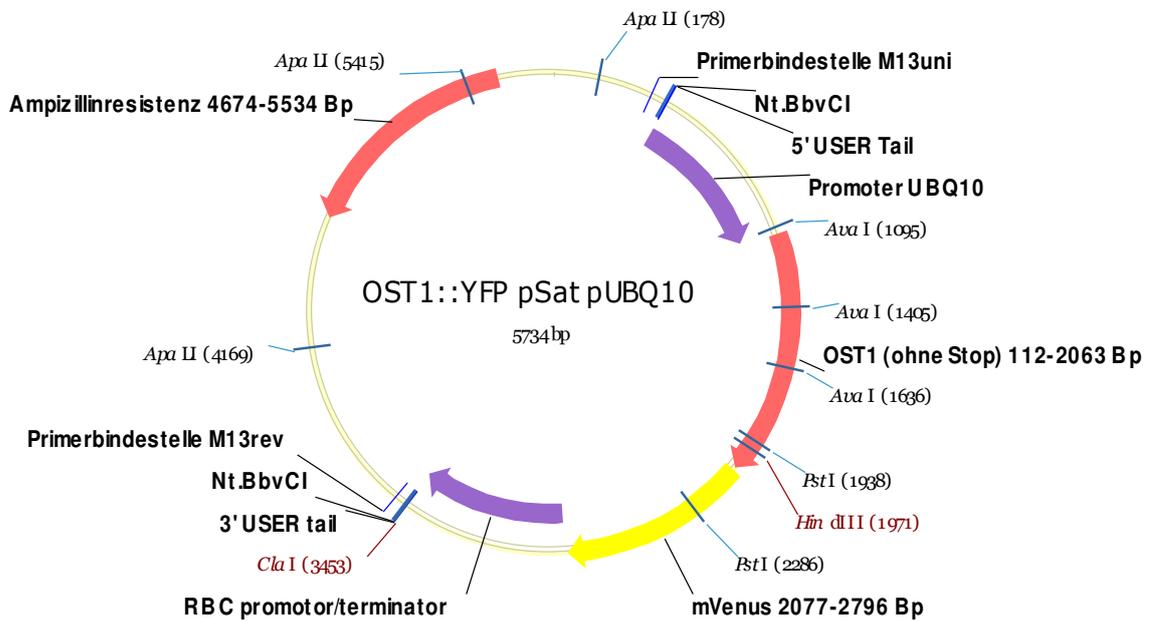
## III.14. mTurquoise::AtrbohF



**Abbildung III.14. Vektorkarte von CFP::AtrbohF in dem Pflanzenvektor pSat pUBQ10**

AtrbohF hat eine Länge von 2834Bp und ist N-terminal mit CFP (mTurquoise, ohne Stopcodon, 716Bp) fusioniert. Dieses Konstrukt wurde transient in Protoplasten von *Arabidopsis thaliana* exprimiert und für die FRET-Experimente mit den Snrk2-Kinasen (siehe III.15) verwendet (Abbildung 3.24, Seite 136 und 3.25, Seite 137).

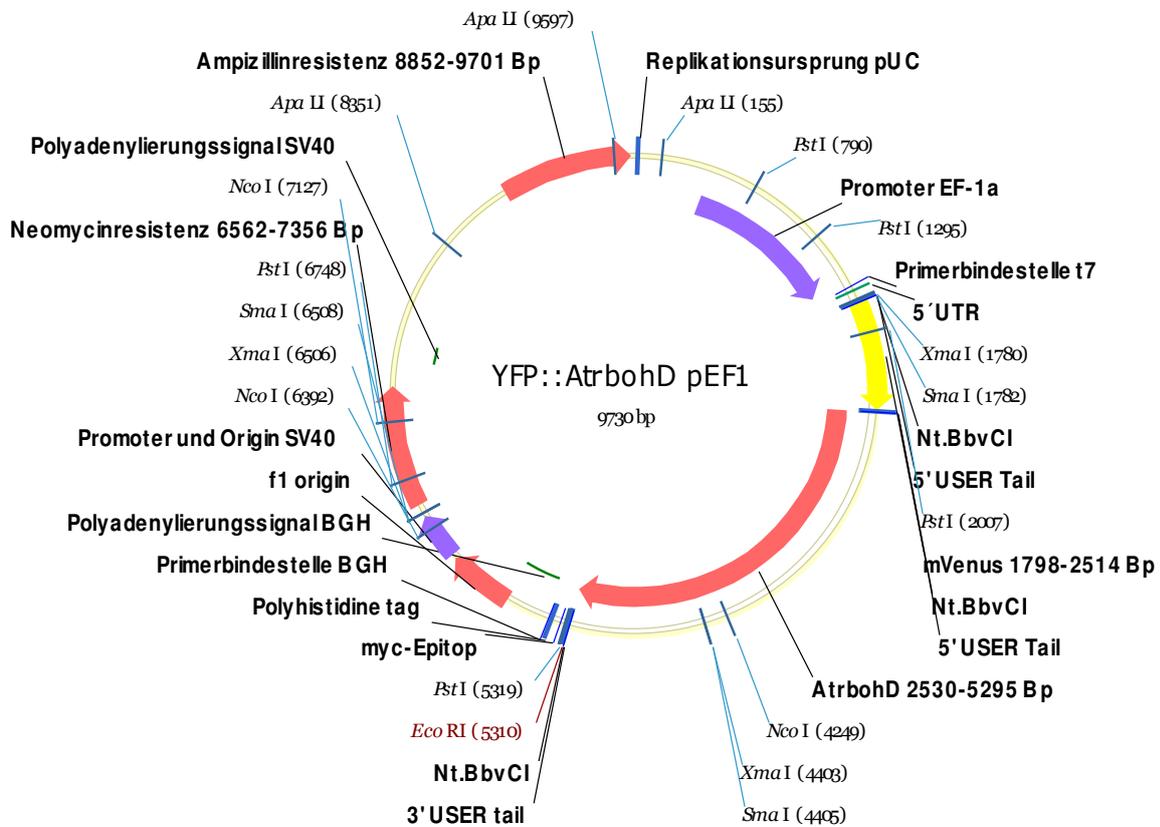
## III.15. OST1::YFP



**Abbildung III.15. Vektorkarte von OST1::YFP in dem Pflanzenvektor pSat pUBQ10**

OST1 (ohne Stopcodon) hat eine Länge von 951Bp und ist C-terminal mit YFP (mVenus, 719Bp) fusioniert. Dieses Konstrukt wurde transient in Protoplasten von *Arabidopsis thaliana* exprimiert und für die FRET-Experimente mit den NADPH-Oxidasen AtrbohD (siehe III.13) und AtrbohF (siehe III.14) verwendet (Abbildung 3.24, Seite 136 und 3.25, Seite 137).

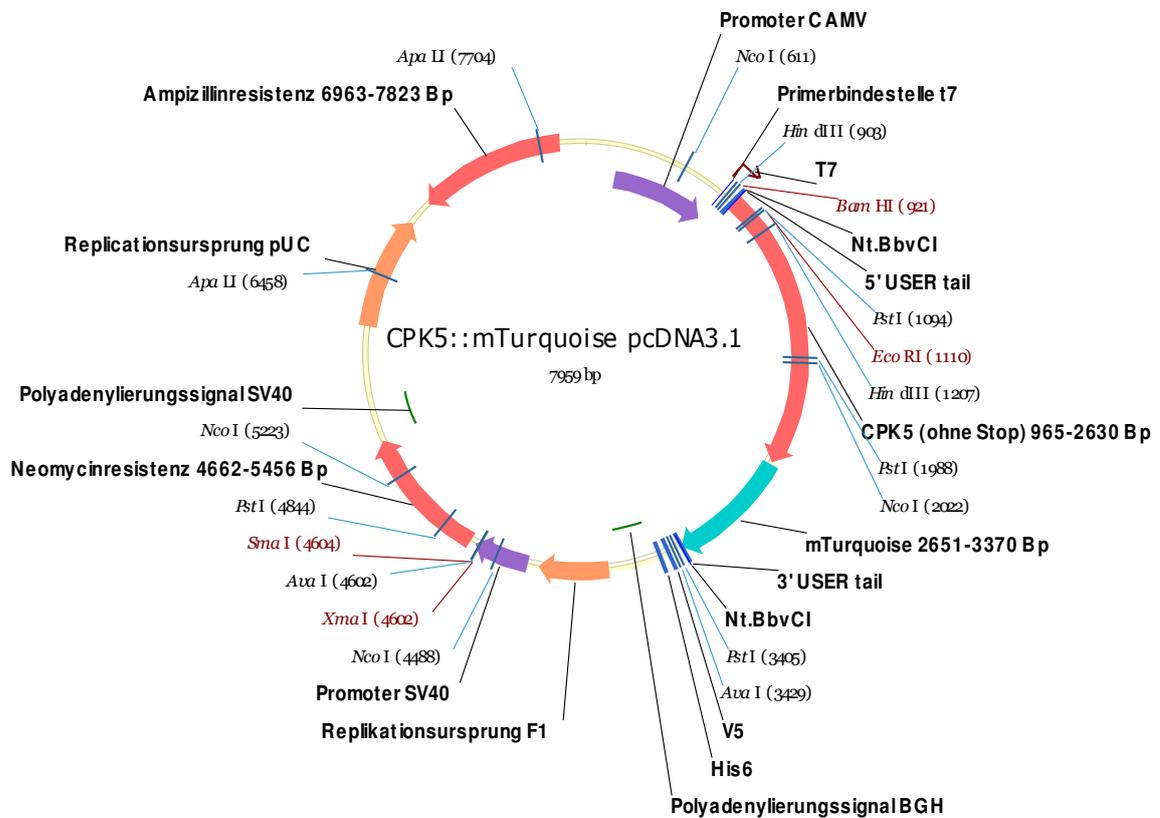
## III.16. YFP::AtrbohD



**Abbildung III.16. Vektorkarte von YFP::AtrbohD in dem Säugervektor pEF1**

AtrbohD hat eine Länge von 2765Bp und ist N-terminal mit YFP (mVenus, ohne Stopcodon, 716Bp) fusioniert. Analog dazu wurde AtrbohF (2834Bp) kloniert. Beide Konstrukte wurden transient in HEK-Zellen exprimiert und für die Lokalisierungsexperimente (Abbildung 3.26, Seite 140; 3.27, Seite 141 und 3.29, Seite 142) und die FRET-Experimente (Abbildung 3.28, Seite 142), die ROS-Messungen (Abbildung 3.30, Seite 143; 3.31, Seite 144 und 3.32, Seite 145) und die Phosphorylierungsanalysen (Abbildung 3.33, Seite 146) mit den Kinasen (siehe III.17) verwendet.

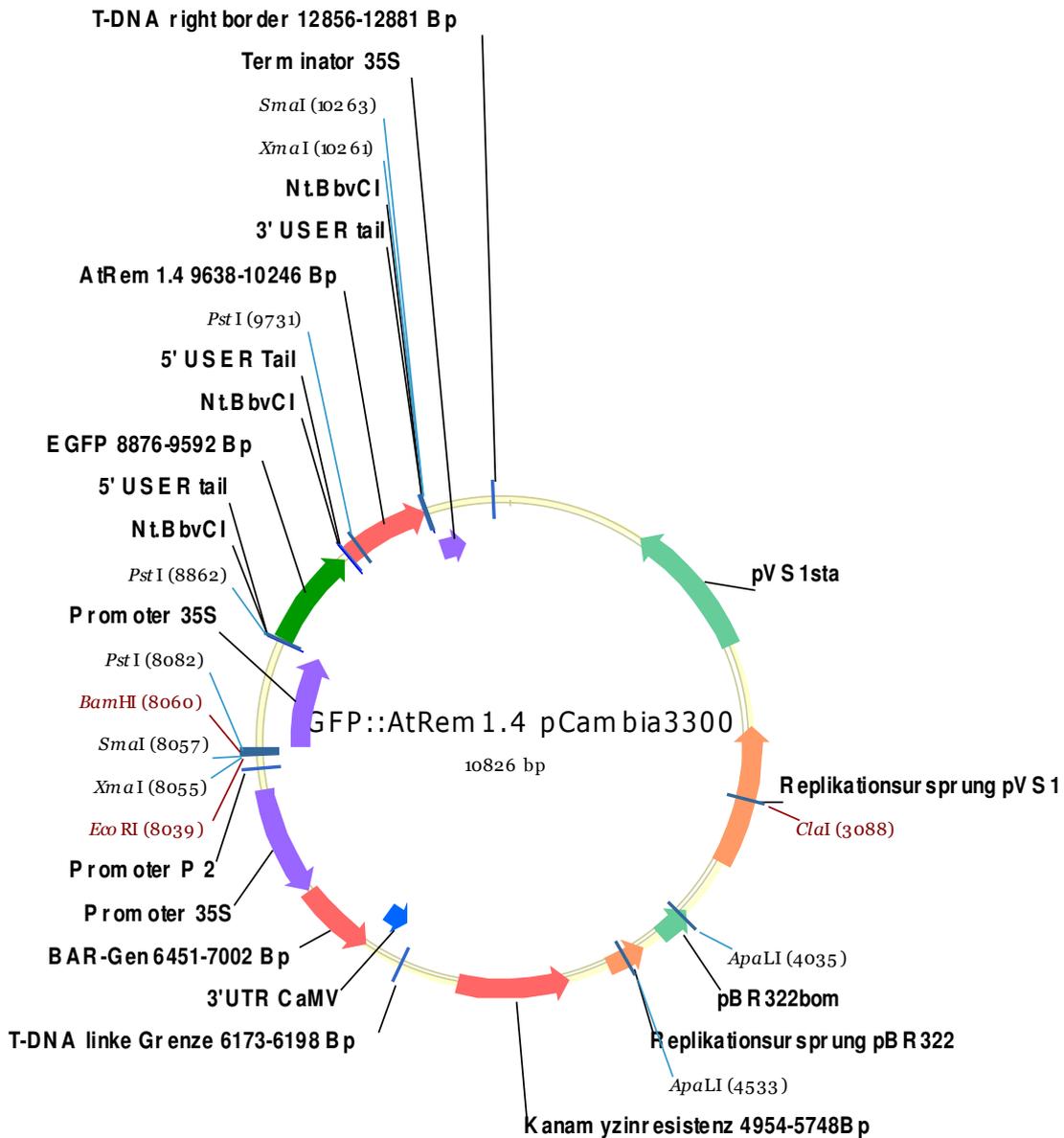
## III.17. CPK5::mTurquoise



**Abbildung III.17. Vektorkarte von CPK5::CFP in dem Säugervektor pCDNA3.1**

CPK5 (ohne Stopcodon) hat eine Länge von 1665Bp und ist C-terminal mit CFP (mTurquoise, 716Bp) fusioniert. Analog dazu wurden die Snrk2-Kinasen kloniert. Diese Konstrukte wurden transient in HEK-Zellen exprimiert und für die Lokalisierungsexperimente (Abbildung 3.26, Seite 140; 3.27, Seite 141 und 3.29, Seite 142) und die FRET-Experimente (Abbildung 3.28, Seite 142), die ROS-Messungen (Abbildung 3.30, Seite 143; 3.31, Seite 144 und 3.32, Seite 145) und die Phosphorylierungsanalysen (Abbildung 3.33, Seite 146) mit den NADPH-Oxidasen (siehe III.16) verwendet.

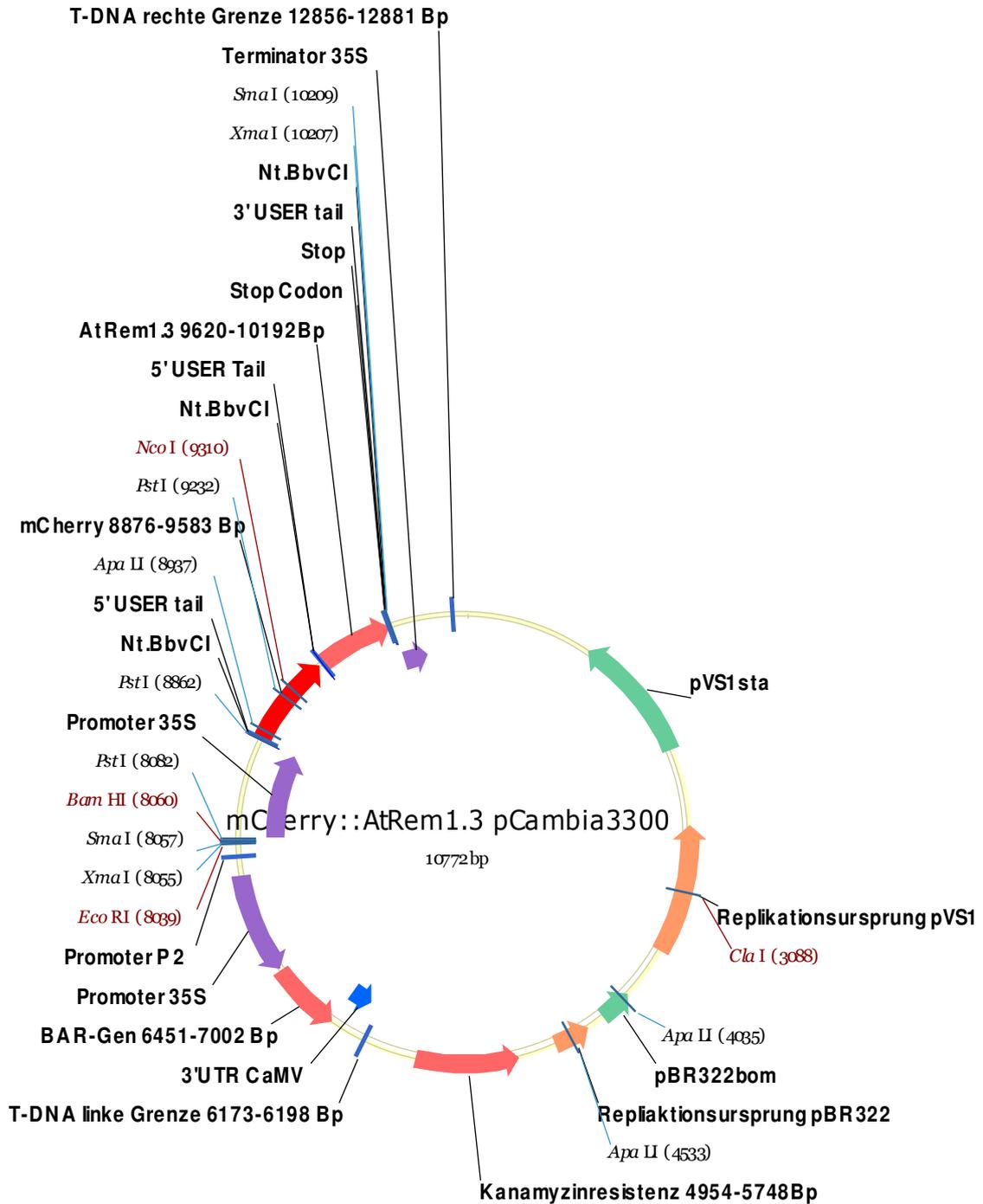
## III.18. eGFP::AtRem1.4



**Abbildung III.18. Vektorkarte von eGFP::AtRem1.4 in dem binären Vektor pCambia 3300**

AtRem1.4 hat eine Länge von 609Bp und ist N-terminal mit eGFP (ohne Stopcodon, 716Bp) fusioniert und fand Verwendung bei der Koexpression mit der NADPH-Oxidase AtrbohD (siehe III.7; Abbildung 3.15, Seite 126 und 3.20, Seite 129), für die Mobilitätsmessung (Abbildung 3.17, Seite 127), für den Nachweis der Abhängigkeit von einem sterolreichen Umfeld (Abbildung 3.18, Seite 128) und für die Koexpression mit mCherry::AtRem1.3 (siehe III.19; Abbildung 3.16, Seite 126). Analog zu diesem Konstrukt wurden auch die *Arabidopsis*-Remorine 1.1 (528Bp), 3.1 (363Bp), 3.2 (372Bp), 4.1 (891Bp), 4.2 (825Bp), 5.1 (1668Bp), 6.1 (1461Bp), 6.2 (1530Bp), 6.4 (1284Bp), 6.6 (1038Bp) und 6.7 (792Bp) kloniert. Diese Konstrukte wurden transient in den Epidermiszellen von *Nicotiana benthamiana* exprimiert und fanden Verwendung bei der Membrandomänenlokalisierung der Remorine (Abbildung 3.14, Seite 124).

## III.19. mCherry::AtRem1.3



**Abbildung III.19. Vektorkarte von mCherry::AtRem1.3 in dem binären Vektor pCambia 3300**

AtRem1.3 hat eine Länge von 572Bp und ist N-terminal mit mCherry (ohne Stopcodon, 707Bp) fusioniert und fand Verwendung bei der Koexpression mit eGFP::AtRem1.4 (siehe III.18; Abbildung 3.16, Seite 126).

### III Plasmidkarten

## Anhang IV – Kontrollmessungen

### IV. 1 der eine Interaktion beschreibende $E_{\text{FRET}}$ -Wert

---

Damit zwischen zwei, mit Fluoreszenzproteinen (Donor und Akzeptor) fusionierten, Proteinen von Interesse ein Förster-Resonanzenergietransfer (FRET; siehe 2.8.2.2, Seite 89) stattfinden kann müssen folgende Grundvoraussetzungen erfüllt sein:

- Die Donoremission und die Akzeptorabsorption müssen zu mindestens 70% überlappen (siehe Abbildung 2.3, Seite 91)
- Die Dipolmomente der Donoremission und die Akzeptorabsorption müssen zueinander in einer passenden (parallelen) Orientierung vorliegen
- Sowohl das Donor- als auch das Akzeptorfluorophor müssen eine hohe Photonenabgabe aufweisen
- Das Donor- und Akzeptorfluorophor müssen sich ausreichend nahe (0,5 bis 10nm) sein

Die Effizienz eines Energietransfers bezieht sich auf die sechste Potenz des Verhältnisses des Abstandes  $R$  zwischen Donor und Akzeptor und dem Försterradius ( $R_0$ ). Der Försterradius selbst bezieht sich auf die kritische Distanz zwischen den beiden Fluorophoren bei der der Energietransfer halbmaximal ist (Hink *et al.*, 2002). Normalerweise liegt  $R_0$  in einem Wertebereich von 0,5-10nm und ist abhängig von verschiedenen Faktoren, wie der Quantenausbeute des Donors, der Absorption des Akzeptors und der spektralen Überlappung dieser beiden Faktoren, sowie von dem Orientierungsfaktor ( $\kappa^2$ ). Um vor allem diesen letzten Punkt zu überprüfen, die Funktion des experimentellen Systems zu verifizieren und den für die, als Donor und Akzeptor verwendeten Fluoreszenzproteine, zu erwartenden Wert, der eine Interaktion beschreibt, zu charakterisieren, müssen zuerst Kontrollmessungen durchgeführt werden.

Für die Berechnung von  $R_0$  wird angenommen, dass die Rotationsdiffusion der Fluoreszenzfarbstoffe schneller ist, als die Lebensdauer des Donors, so dass  $\kappa^2 = \frac{2}{3}$  angenommen werden kann. Für diesen Fall gilt die Voraussetzung, dass der Donor ein relativ kleines Molekül ist und Donor und Akzeptor nicht miteinander verbunden sind. Für Fluorophore gilt im Allgemeinen eine Rotationskorrelationszeit von 20-30 ns und eine Lebensdauer von 1-3 ns (Vogel *et al.*, 2012). Die Annahme, dass  $\kappa^2 = \frac{2}{3}$  ist also für die Berechnung von  $R_0$  von FRET-Paaren nicht geeignet, aber momentan ist dafür keine Alternative verfügbar. Die berechneten  $R_0$ -Werte sind sehr nützlich für den Vergleich von FRET-Paaren, wenn man im Hinterkopf behält, dass diese berechneten Abstände zwischen zwei Fluoreszenzproteinen nicht den realen Tatsachen entsprechen.

$R_0$  wird generell nach folgender Formel bestimmt: 
$$R_0 = \frac{9000 \ln 10 \kappa^2 \phi_D}{128 \pi^5 n^4 N_A} \int_0^\infty \frac{F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) d\lambda}{\lambda^4}$$
 (Patterson *et al.*, 2000).

$R_0$  ist also abhängig von dem Brechungsindex des Mediums  $n$ , dem Orientierungsfaktor  $\kappa^2$ , der Quantenausbeute  $\phi_D$ , dem normalisierten Fluoreszenzspektrum des Donors  $F_D(\lambda)$ , der molaren Absorption des Akzeptors  $\varepsilon_A(\lambda)$  und der Wellenlänge  $\lambda$  in cm.

Das Abstandsspektrum, welches durch FRET-Messungen gemessen werden kann beträgt  $\sim 0,5 R_0 \leq R \leq R_0$  (Gadella *et al.*, 1999). Wenn  $R = 2 \times R_0$  ist, wird die FRET-Effizienz ( $E_{\text{FRET}}$ ) minimal 0,016 und somit vernachlässigbar. Wenn  $R = 0,5 \times R_0$  wird  $E_{\text{FRET}}$  größer als 0,984 und somit maximal (Vogel *et al.*, 2012).

Der wichtigste Faktor für FRET zur Beurteilung einer Protein-Protein-Interaktion ist der Abstand zwischen den beteiligten Proteinen. FRET findet bei einem Abstand von  $\sim 0,5$ -10nm statt (Clegg *et al.*, 2009) und der Durchmesser eines normalen Fluoreszenzproteins mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 30 kDa beträgt  $\sim 3$ nm, so dass der Abstand zwischen den beiden Proteinen, der für FRET entscheidend ist, mit den Dimensionen der Proteine übereinstimmt und diese Art von Messungen für die Analyse von Konformationsdynamiken und Protein-Protein-Interaktionen anwendbar macht (Hink *et al.*, 2002).

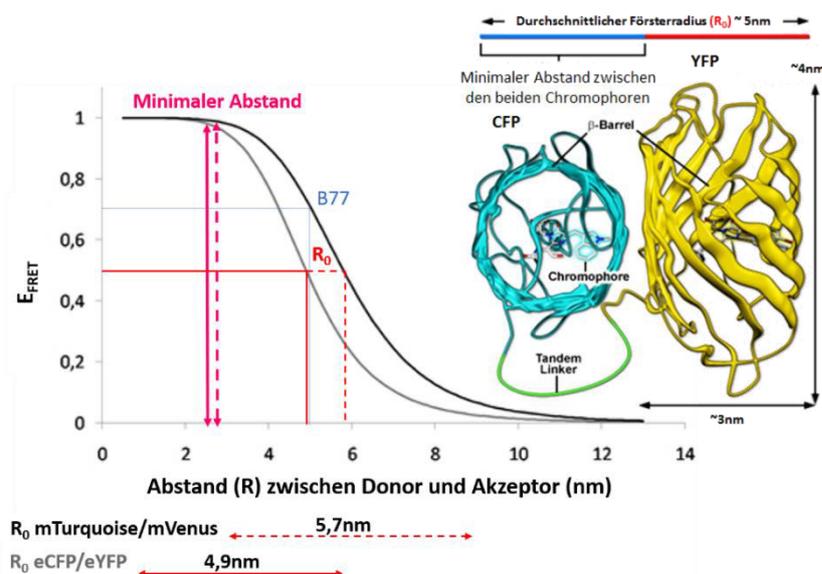
Um nun das experimentelle System zu verifizieren und um den für die verwendeten Fluoreszenzproteine zu erwartenden Wert, der eine stattfindende Interaktion beschreibt, zu charakterisieren, bedient man sich so genannter chimärer Konstrukte, bei denen die verwendeten Fluoreszenzproteine durch kurze oder lange Tandem-Linker miteinander verbunden sind. Vor allem solche kurzen Linker oder Verbindungsstücke, bestehend aus nur wenigen Aminosäuren (z.B. 2 Aminosäuren entsprechen einem kurzen Linker von  $\sim 0,5$ nm Länge). Der Energietransfer zwischen Donor und Akzeptor wird dabei vom Försterradius  $R_0$ , also dem Abstand  $R$  zwischen den beiden Fluorophoren, bei dem zu 50% eine Energieübertragung erfolgt, bestimmt: 
$$E_{\text{FRET}} = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6}$$

Für viele der in FRET-Messungen häufig verwendeten Fluorophore, so auch für CFP und YFP, sind sowohl der jeweilige Försterradius, als auch die dynamischen Abstände zwischen beiden Proteinen bekannt. So auch für die, in den durchgeführten FRET-Messungen, eingesetzten Fluorophore. Bei diesen handelt es sich um mTurquoise, eine Variante des CFP mit verbesserten optischen Eigenschaften und dem mVenus, einer verbesserten Variante des YFP (Tabelle IV.1).

FRET-Fluorophorpaar	$R_0$	Dynamische Abstände	Referenz
eCFP/eYFP	4,9nm	2,5 - 7,3nm	Patterson <i>et al.</i> , 2000
mTurquoise/mVenus	5,7nm	2,9 - 8,6nm	Markward <i>et al.</i> , 2011

**Tabelle IV.1: Die Försterradii der verwendeten Fluorophorpaare**

Der minimale Abstand den die Fluorophore CFP und YFP zueinander haben können, liegt also bei 2,5nm (Patterson *et al.*, 2000) und der zwischen den beiden Fluorophoren mTurquoise und mVenus liegt bei 2,9nm (Markwardt *et al.*, 2011). Berechnet man mit diesen beiden minimalen Abständen die maximale  $E_{\text{FRET}}$  erhält man für beide Fluorophorpaare ähnliche Werte von 0,982 (Abbildung IV.1). Dabei handelt es sich aber immer noch um theoretische Werte. Da zum Beispiel die strukturelle Orientierung der beiden Fluorophore zueinander wie bereits erwähnt nur unzureichend bestimmt werden kann, muss man davon ausgehen, dass die tatsächliche maximale  $E_{\text{FRET}}$ , welche mit den gewählten Fluoreszenzproteinen gemessen werden kann, bis zu 40% geringer ausfallen kann (Piston und Kremers, 2007). Aus diesem Grund müssen zuvor die zu erwartenden  $E_{\text{FRET}}$ -Werte, die eine Interaktion beschreiben, für die verwendeten Fluorophore bestimmt werden. Sind also die beiden verwendeten Fluoreszenzproteine CFP (mTurquoise) und YFP (mVenus) mit einer minimal kurzen Aminosäurekette verbunden, sollte bei Durchführung einer FRET-Messung eine Interaktion zu beobachten sein. Dieser Wert kann dann als der Wert definiert werden, der in den anschließenden Messungen den Messwert darstellt, der eine stattfindende Interaktion bedeutet (Abbildung IV.2). Sind beide Fluorophore über eine lange Aminosäurekette verbunden, wird normalerweise kein Energietransfer zwischen diesen beiden auftreten.



#### IV.1: Vergleich der Abhängigkeit des Abstandes zwischen eCFP/eYFP und mTurquoise/mVenus

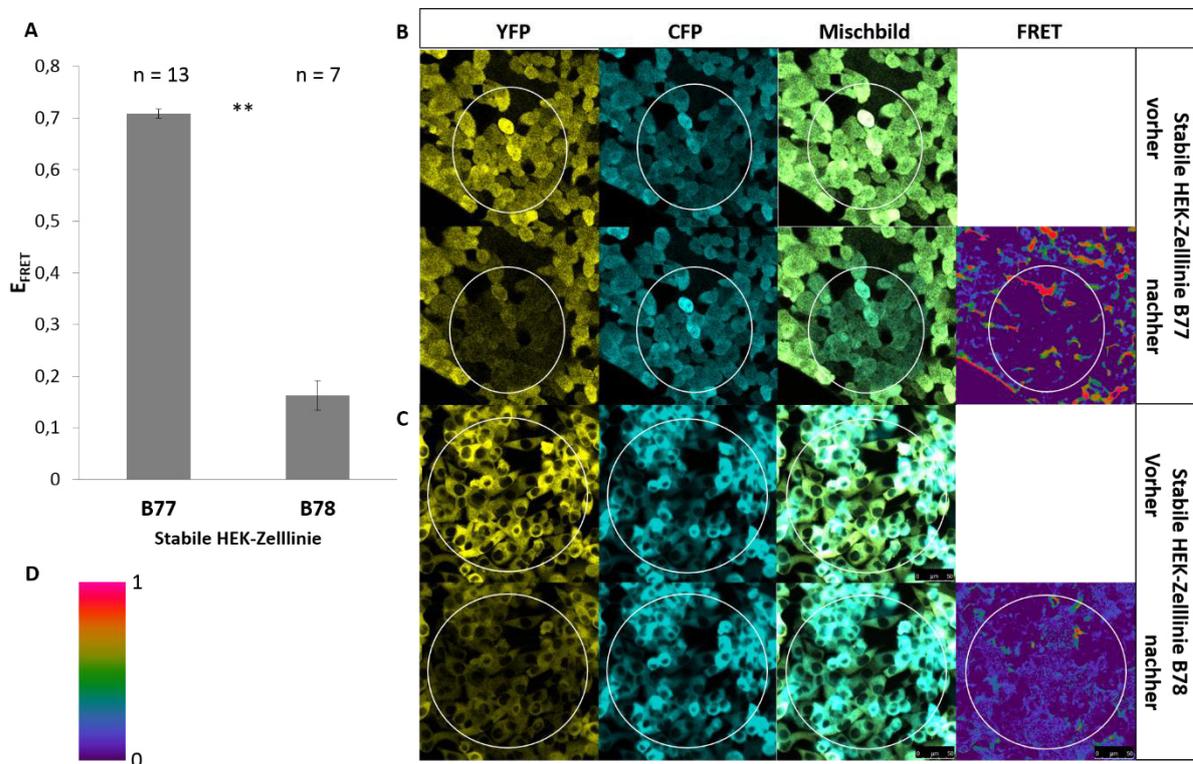
Basierend auf den bekannten  $R_0$ -Werten (in rot eingezeichnet), wurden die  $E_{\text{FRET}}$  gegen die entsprechenden Abstände zwischen Donor- und Akzeptormolekül aufgetragen (Müller *et al.*, 2013). Dargestellt sind die Kurven der FRET-Paare eCFP/eYFP (graue Linie,  $R_0$ : Patterson *et al.*, 2000) und mTurquoise/mVenus (schwarze Linie,  $R_0$ : Markwardt *et al.*, 2011). Der minimal mögliche Abstand (in rosa eingezeichnet) beträgt für eCFP/eYFP 2,5nm und für mTurquoise/mVenus 2,9nm. Aus diesen beiden Werten ergeben sich die maximalen und nur theoretischen Werte für  $E_{\text{FRET}} = 0,982$ . Der tatsächliche maximale Wert der eine Interaktion zwischen eCFP/eYFP, verbunden mit einem minimal kurzen Linker, in den B77-Zellen beschreibt, ist ebenfalls eingezeichnet und zeigt einen Abstand zwischen diesen beiden Fluorophoren von 0,5nm an (in hellblau eingezeichnet).

Für die durchgeführten Kontrollmessungen wurden zwei HEK-Zelllinien verwendet, die jeweils die oben benannten chimären Konstrukte stabil exprimieren. Die Linie B77 exprimiert dabei ein Konstrukt, bei dem die beiden FRET-Fluoreszenzproteine eCFP und eYFP über eine sehr kurze Aminosäurekette miteinander verbunden sind. Die Linie B78 exprimiert dem hingegen ein Konstrukt, bei dem die beiden FRET-Fluorophore über eine lange Aminosäurekette miteinander verbunden sind. Diese stabilen Linien wurden verwendet obwohl in den anschließenden Messungen ausschließlich mTurquoise als Donor- und mVenus als Akzeptorfluorophor verwendet wurden, denn zu diesem Zeitpunkt standen keine stabil transfizierten Zellkulturen zur Verfügung, die diese beiden modifizierten Fluorophore exprimiert hätten. Da die beiden berechneten, theoretischen maximalen  $E_{FRET}$  für beide Fluorophorpaare mit 0,98 aber fast gleich sind, kann auch der bestimmte  $E_{FRET}$ , der eine Interaktion beschreibt, als vergleichbar für beide Fluorophorpaare angesehen werden.

Die Durchführung von „Acceptorbleaching“- (AB)-FRET-Messungen an diesen stabil transfizierten HEK-Zelllinien diente vor allem der Etablierung eines solchen oberen  $E_{FRET}$ -Wertes, für den eine Interaktion zwischen den für die FRET-Messung ausgewählten Fluoreszenzproteinen angenommen werden kann und erfolgte mit dem entsprechenden „LAS AF Application Wizard“ (Leica Microsystems). Diese Applikation berechnet den  $E_{FRET}$ -Wert anhand des „Quenchen“ des Donors, also dem ablöschen von dessen Fluoreszenzintensität durch den Energietransfer auf den Akzeptor. Wird der Akzeptor gebleicht, wird somit ein Energietransfer von Donor auf Akzeptor unterbunden. Diese Differenz zwischen der Fluoreszenzintensität des Donors vor ( $I_{CFP}$ ) und nach ( $I_{CFP_{FRET}}$ ) dem Bleichen des Akzeptors lässt einen direkte Rückschluss auf die Effizienz der stattfindenden Interaktion zu:  $E_{FRET} = 1 - \frac{I_{CFP_{FRET}}}{I_{CFP}}$ . Die Stärke der Energieübertragung von Donor auf Akzeptor und somit die Änderung der Fluoreszenzintensität des Donors nach dem Bleichen des Akzeptors ist direkt abhängig von dem Abstand dieser beiden Fluorophore zueinander. Aus diesem Grund kann die abgewandelte Formel zur Berechnung von  $E_{FRET}$  anhand der sich ändernden Fluoreszenzintensitäten des Donors ebenfalls, zumindest wenn eine fehlerfreie Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten des Donors gewährleistet werden kann, verwendet werden.

So kann anhand der durchgeführten Kontrollmessung ein Wert von 0,7 (Abbildung IV.2) als Wert für eine zu erwartende Interaktion zwischen den beiden zu untersuchenden, Fluoreszenzproteinen angenommen werden. Dieser Wert entspricht zwar nicht dem theoretischen maximalen  $E_{FRET}$ -Wert von 0,982, der bei minimalem Abstand der beiden Fluorophore CFP und YFP zueinander zu erwarten wäre, aber wie bereits oben erwähnt, erlauben verschiedene unberechenbare Faktoren, so vor allem der Orientierungsfaktor  $\kappa^2$  keine genaue Berechnung der maximal zu erwartenden FRET-Effizienz, weshalb überhaupt erst diese Kontrollmessungen durchgeführt werden mussten. Der Wert, der die untere Grenze beschreibt, beträgt 0,1 und ist somit gering genug um den zu großen Abstand zwischen den beiden Fluorophoren und somit die Funktionalität des experimentellen Systems zu demonstrieren. Diese Werte können im Anschluss für die

Bewertung der eigentlichen, an den Proteinen von Interesse durchgeführten Messungen herangezogen werden (Abbildung 3.5, Seite 115; Abbildung 3.9, Seite 119; Abbildung 3.25, Seite 137; Abbildung 3.28, Seite 142).

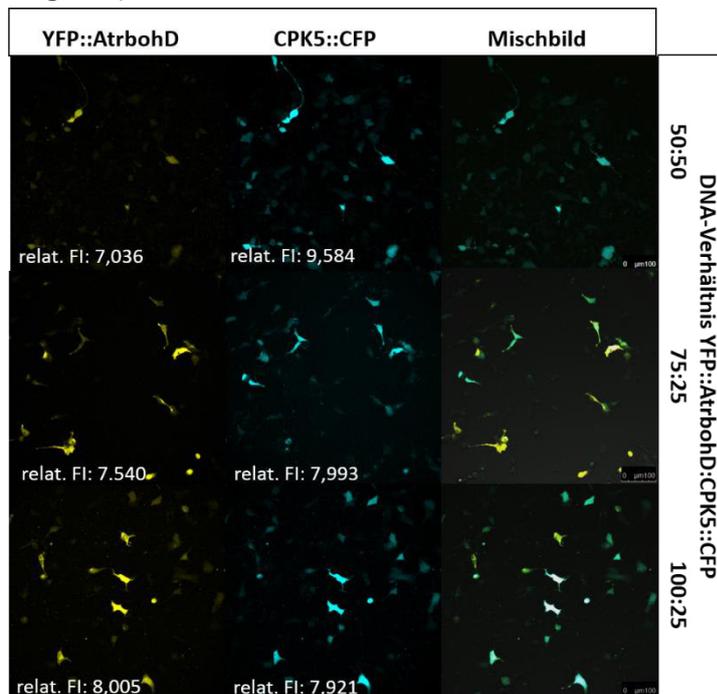


#### IV.2: Definition des oberen und unteren $E_{\text{FRET}}$ -Wertes in stabil transfizierten HEK-Zelllinien mittels AB-FRET

AB-FRET-Messungen durchgeführt an den stabil transfizierten HEK-Zelllinien B77 und B78 dienen der Definition eines unteren und eines oberen  $E_{\text{FRET}}$ -Wertes für die Interaktion zwischen CFP und YFP. Bei B77 handelt es sich um HEK-Zellen, die beide Fluorophore mit einer kurzen Aminosäurekette verknüpft exprimieren, wodurch ein großer FRET erwartet wird und B78 ist eine HEK-Zellkultur, die ein Konstrukt exprimiert, in dem die beiden FRET-Fluorophore mit einer langen Aminosäurekette verknüpft sind, weshalb ein geringer FRET zu erwarten ist. A: Statistische Auswertung der gemessenen  $E_{\text{FRET}}$ -Werte der B77- und B78-Zellen. Für die Positivkontrolle B77 ergibt sich ein Wert von 0,7 ( $n=13$ ,  $\pm\text{MSE}$ ) und für die Negativkontrolle B78 ein minimaler Wert von 0,1 ( $n=7$ ,  $\pm\text{MSE}$ ). Statistisch signifikante Unterschiede ( $p<0,05$ ) sind mit zwei Sternen gekennzeichnet. B und C: Abbildungen der B77- und B78-Zellkulturen vor dem Bleichen des Akzeptorfluorophors (YFP) in den eingezeichneten ROIs („Region of Interest“) und danach. Die in den Mischbildern eingezeichneten Größenskalen gelten auch für die entsprechenden Einzelkanalbilder. Die FRET-Bilder geben die anhand einer Farbskala (D) zu deutenden  $E_{\text{FRET}}$ -Werte zwischen 0-1 und deren Verteilung in den Zellen in den gemessenen ROIs wieder.

## IV.2 Bestimmung des DNA-Verhältnisses zur Kotransfektion von HEK-Zellen

Für die Messung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), produziert durch die phosphorylierungsbedingt aktivierten NADPH-Oxidasen AtrbohD und AtrbohF (siehe 2.9, Seite 93; 3.2.3.1, Seite 143) in HEK-Zellen ist die Kotransfektion der Oxidasen und den als potentielle Interaktionspartner ausgewählten Kinasen notwendig. Um eine gleichmäßig starke Expression beider Proteine in den Zellen und somit vergleich- und verwertbare Messergebnisse zu gewährleisten, wurden  $1,5 \times 10^5$  Zellen/pro ml Medium (2 ml insgesamt) auf runden Objektträgern in 6-Wellplatten ausgesät, 24h bei 37°C inkubiert und danach mit den entsprechenden Plasmiden in verschiedenen Verhältnissen kotransfiziert. Nach weiteren 48h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen auf die Expressioneffizienz und das Expressionsverhältnis beider Proteine hin mikroskopisch untersucht. Es zeigt sich, dass die Kinasen generell stärker exprimiert werden als die Oxidasen (Abbildung IV.3).



### IV.3: Koexpression von AtrbohD und CPK5 in verschiedenen Verhältnissen in HEK-Zellen

Die Koexpression von YFP::AtrbohD und CPK5::CFP in verschiedenen DNA-Verhältnissen in HEK-Zellen ergibt, dass ein DNA-Verhältnis von 100:25 zu einer ausreichend gleichmäßigen und starken Expression beider Proteine führt. Es wurden insgesamt  $3 \times 10^5$  Zellen auf runden Objektträgern ausgesät und transfiziert. Für die Aufnahmen und die Auswertung der Expressionsstärken, wurden immer gleich große Bildausschnitte mit vergleichbarer Zellanzahl ausgewählt und vermessen. Die angegebenen relativen Fluoreszenzintensitäten (relat. FI) entsprechen der detektierbaren Gesamtfluoreszenz aller abgebildeten Zellen. Die abgebildete Koexpression von AtrbohD und CPK5 dient als Beispiel für alle anderen koexprimierten Oxidase-Kinase-Kombinationen. Die in den Mischbildern eingezeichneten Größenskalen gelten auch für die entsprechenden Einzelkanalbilder.

Vor allem bei einem verwendeten DNA-Verhältnis von 50:50 (Oxidase:Kinase) ist dieser Expressionsunterschied der beiden fluoreszent markierten Proteine anhand des Unterschiedes, der für das gesamte Bild bestimmten relativen Fluoreszenzintensität (relat. FI) am deutlichsten zu erkennen. Bei einem DNA-Verhältnis von 75:25 ist dieser Unterschied in dem zu beobachtenden Expressionsverhältnis immer noch sehr deutlich zu erkennen, aber schon geringer. Erst bei einem eingesetzten DNA-Verhältnis von 100:25 zeigt sich, dass die Oxidase und die kotransfizierte Kinase annähernd gleichmäßig stark exprimiert werden. Dieses Verhältnis wurde dann durch die Visualisierung und Bestimmung der relat. FI der fluoreszenten Proteine nach Koexpression aller analysierten Oxidase-Kinase-Kombinationen (exemplarisch wird in Abbildung IV.3 nur die Kotransfektion von AtrbohD und CPK5 gezeigt) in transfizierten HEK-Zellen etabliert und für alle durchgeführten ROS-Messungen eingesetzt (Abbildung 3.28, Seite 142; Abbildung 3.30, Seite 143; Abbildung 3.31, Seite 144; Abbildung 3.33, Seite 146).

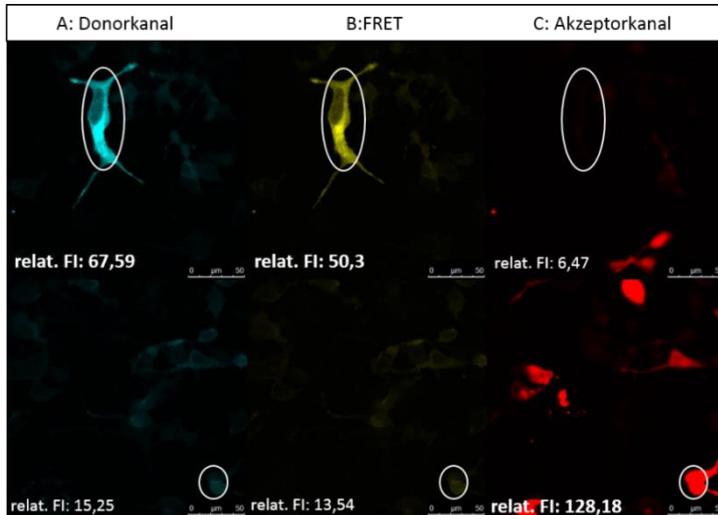
### IV.3 SE-FRET in HEK-Zellen

---

Da jede verfügbare Methode zur Messung der Interaktion zwischen zwei oder mehr Proteinen Vor- aber auch Nachteile hat, reicht die Durchführung von nur einer Methode allein normalerweise nicht aus, um eine untersuchte Interaktion eindeutig bewerten zu können. Aus diesem Grund erfolgte die Verifizierung des für die ROS-Messungen gewählten heterologen HEK-Zellsystems nicht nur durch Wiederholung der zuvor im Protoplastensystem durchgeführten Methode des AB-FRET (siehe Abbildung 3.28, Seite 142), sondern durch zusätzliche Wiederholung der ebenfalls zuvor durchgeführten Methode des SE-FRET. Dafür wurden die HEK-Zellen transient mit der Oxidase AtrbohD und der zuvor als Interaktionspartner identifizierten Kinase CPK5, als Positivkontrolle (Dubiella *et al.*, 2013), sowie mit der potentiell interagierenden Kinase Snrk2.7 transfiziert. Die SE-FRET-Messungen wurden an mehreren Zellen gleichzeitig durchgeführt. Dazu wurden zuerst die Fluoreszenzintensitäten der beiden Fluorophore CFP und YFP bestimmt. Diese Kontrollmessungen, bei denen anhand von einfach transfizierten Zellen entweder nur die Donoremission ohne den Einfluss des Akzeptors, oder nur die Akzeptoremission ohne den Einfluss der Donoremission, sowie der auftretende FRET detektiert wurden, wurde durchgeführt, um die für die eigentlichen Messungen und vor allem für die Auswertung notwendigen Kontrollfaktoren (Abbildung IV.4) zu definieren.

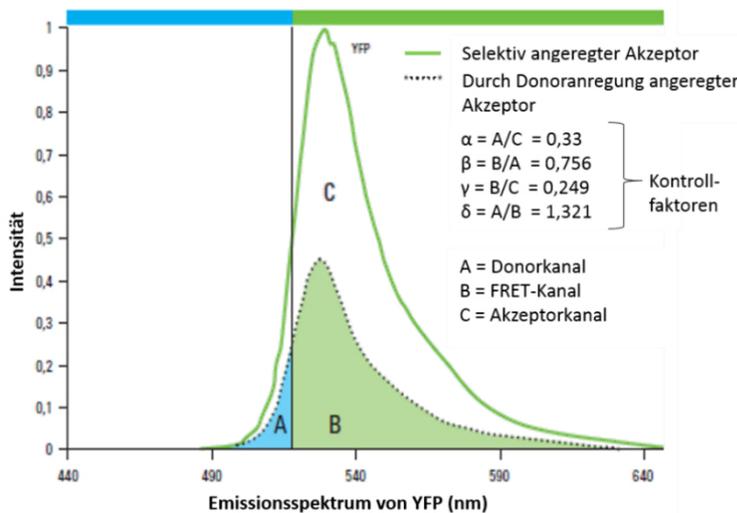
Direkt im Anschluss wurde die Interaktion der Oxidase mit einer der beiden Kinasen in den kotransfizierten Zellen bestimmt. Dann wurden die gleichen Zellen für 30 min mit 50µm MCD behandelt, um die Wirkung von MCD auf die Interaktion der beiden untersuchten Proteine nachzuweisen und erneut auf gleiche Weise wie zuvor vermessen. Die Messung selbst wurde mit dem „SE-FRET-Wizard“ der Leica-Software durchgeführt.

Dafür war es notwendig entsprechende, einmal etablierte Parameter wie Blendenweite, Detektorintensität, Format, Scangeschwindigkeit, etc. bei zu behalten und somit alle SE-FRET-Messungen mit den gleichen Kontrollfaktoren durchzuführen, so dass diese Messungen dann miteinander vergleichbar waren.



#### IV.4: Kontrollfaktoren für die Interaktionsanalysen mittels SE-FRET

Oben: Für die Kontrollmessungen wurden Zellen mit CFP- bzw. YFP transfiziert und die relativen Fluoreszenzintensitäten (relat. FI) innerhalb der markierten ROIs („Region of Interest“) von der Emission im Donorkanal (A), der Detektion des FRET (B) oder der Emission des Akzeptors (C) gemessen. Unten: Die oben gemessenen relat. FI dienen dann der Bestimmung von Kontrollfaktoren ( $\alpha$ - $\delta$ ), die für die Auswertung der anschließenden SE-FRET-Messungen und die Bestimmung der apparenten FRET-Effizienzen ( $E_A(i)$ , Abbildung IV.5) notwendig waren. (Abbildung modifiziert: Leica Microsystems, Confocal Application Letter „LAS AF Application Wizard - FRET Sensitized Emission“ No.20, September 2006)



Die Auswertung und die Bestimmung der apparenten FRET-Effizienzen  $E_A(i)$  entsprechend zu den Intensitäten der in den drei Kanälen aufgezeichneten Signale (Donor, FRET, Akzeptor) erfolgt nach folgender Formel und unter Einbezug der zuvor definierten Kontrollfaktoren (Wouters *et al.*, 2001):

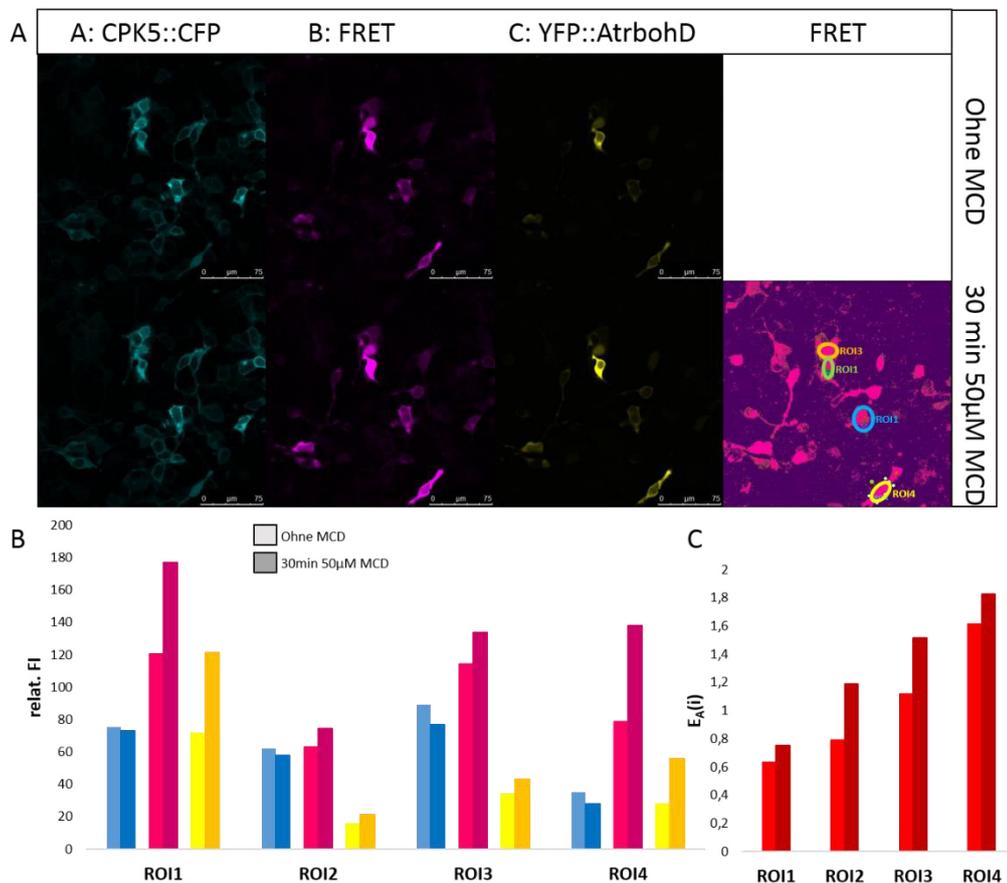
$$E_A(i) = \frac{B - A \times \beta - C \times \gamma}{C}$$

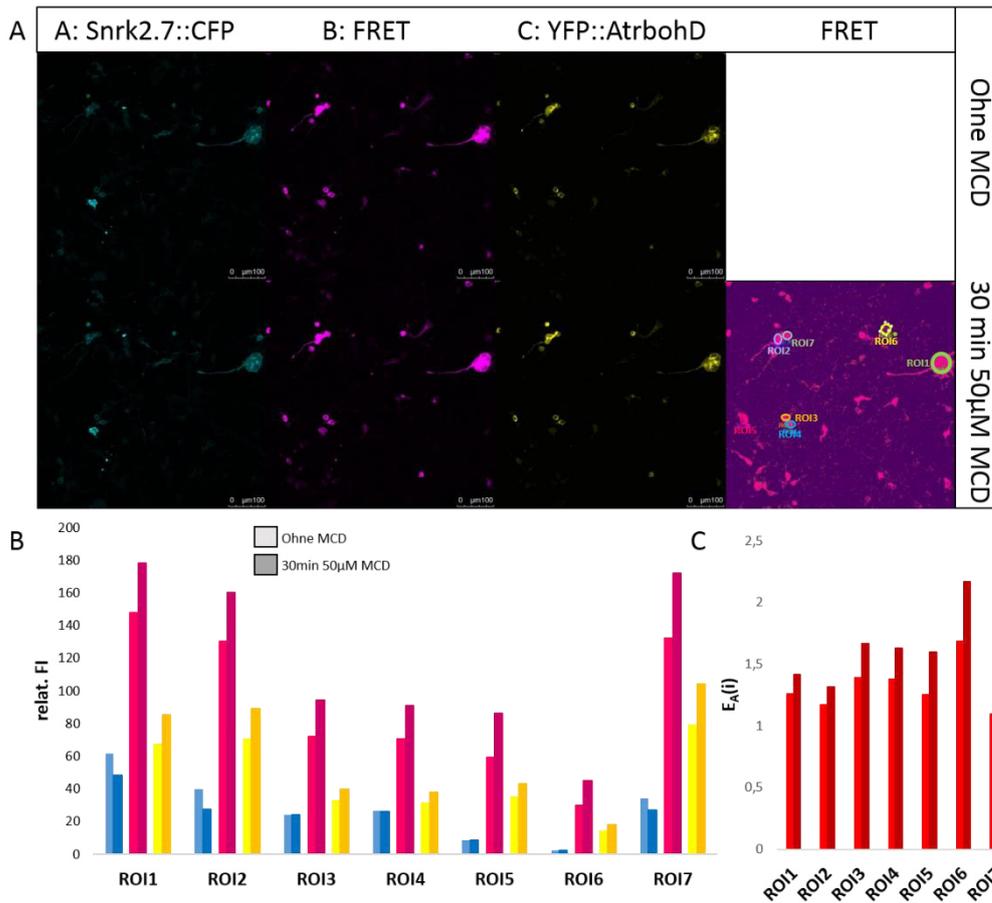
Die auf diese Weise, für die Interaktion zwischen AtrbohD und CPK5 bestimmten  $E_A(i)$ -Werte liegen in dem Bereich von 0,63- 1,61 und bestätigen, wie bereits publiziert, eine deutliche Interaktion der NADPH-Oxidase AtrbohD mit der Kinase CPK5 (Dubiella *et al.*, 2013). Für die Interaktion zwischen AtrbohD und der Kinase Snrk2.7 konnten ähnlich

hohe Werte zwischen 1,09-1,68 gemessen werden, was ebenfalls eine deutliche Interaktion zwischen diesen beide Proteinen bestätigt.

Diese beiden Interaktionen sind, ebenfalls auf einem vergleichbar hohen Niveau, auch mit Hilfe der AB-FRET-Methode in HEK-Zellen nachweisbar (Abbildung 3.28, Seite 142). Dadurch werden einerseits beide Kinasen als Interaktionspartner für die Oxidase AtrbohD bestätigt und andererseits, durch Vergleich mit den zuvor im Protoplastensystem gewonnenen Ergebnissen (Abbildung 3.25, Seite 137), kann die Funktionalität des HEK-Zellsystems für die anschließenden ROS-Messungen (Abbildung 3.30, Seite 143; Abbildung 3.31, Seite 144) und somit für die Charakterisierung der Oxidaseaktivität herangezogen werden können.

Weiterhin zeigt sich deutlich, dass die Interaktion zwischen AtrbohD und sowohl CPK5 als auch Snrk2.7 durch die 30-minütige Behandlung der transfizierten HEK-Zellen mit 50µM MCD gesteigert werden kann (Abbildung IV.5). Die Interaktion zwischen AtrbohD und CPK5 kann durchschnittlich um 29% gesteigert werden und zwischen AtrbohD und Snrk2.7 um 18%. Dadurch zeigt sich weiterhin, dass die Interaktion zwischen AtrbohD und CPK5 etwas, wenn auch nicht signifikant ( $p=0,15$ ) stärker von einer sterolreichen Umgebung abhängig zu sein scheint. Diese Induktion der Interaktion zwischen Oxidase und den beiden Kinasen durch MCD, also durch eine Sterolreduktion, bestätigt damit auch die Verwendung von 50µM MCD als die geeignete Konzentration, mit der im Anschluss die Induktion der Oxidase-vermittelten ROS-Synthese gemessen wurde (Abbildung 3.30, Seite 143; Abbildung 3.31, Seite 144).





**IV.5: Interaktionsanalysen mittels SE-FRET in HEK-Zellen**

Abbildung auf der Vorderseite: Messung der Interaktion zwischen YFP::AtrbohD + CPK5::CFP als Positivkontrolle. A: Abbildung der gemessenen Zellen transfiziert mit CPK5::CFP und YFP::AtrbohD (n=4) in den drei Kanälen für CPF, FRET und YFP ohne Behandlung mit MCD und nach 30-minütiger Behandlung mit 50µM MCD. Die mit ROIs („Region of Interest“) markierten und gemessenen Zellen sind in der Abbildung für die FRET-Kalkulationen eingezeichnet. B: Statistische Auswertung der gemessenen relativen Fluoreszenzintensitäten (relat.FI) der mit ROIs markierten und gemessenen Zellen vor (hellere Balkenfarbe) und nach 30-minütiger Behandlung der derselben Zellen mit 50µM MCD (dunklere Balkenfarbe). Nach MCD-Behandlung ist eine Senkung der relat. FI des Donors und eine Steigerung der relat. FI im FRET- und im Akzeptorkanal zu sehen. C: Statistische Auswertung der berechneten apparenten FRET-Effizienzen (EA(i)) der gemessenen Zellen vor (hellere Balkenfarbe) und nach der Behandlung der transfizierten Zellen mit 50µM MCD (dunklere Balkenfarbe). Es ist ein deutlicher Anstieg der EA(i) nach MCD-Behandlung zu erkennen.

Abbildung auf dieser Seite: Messung der Interaktion zwischen YFP::AtrbohD + Snrk2.7::CFP. A: Abbildung der gemessenen Zellen transfiziert mit Snrk2.7::CFP und YFP::AtrbohD (n=7) in den drei Kanälen für CPF, FRET und YFP ohne Behandlung mit MCD und nach 30-minütiger Behandlung mit 50µM MCD. B: Statistische Auswertung der gemessenen relat.FI der mit ROIs markierten und gemessenen Zellen vor und nach 30-minütiger Behandlung derselben Zellen mit 50µM MCD. Nach MCD-Behandlung ist eine Senkung der relat. FI des Donors und eine Steigerung der relat. FI im FRET- und im Akzeptorkanal zu sehen. C: Statistische Auswertung der berechneten EA(i) der gemessenen Zellen vor und nach der Behandlung der transfizierten Zellen mit 50µM MCD. Es ist ein deutlicher Anstieg der EA(i) nach MCD-Behandlung zu erkennen.

## Anhang V - Abkürzungsverzeichnis

AAO3	„ <u>A</u> bscisic- <u>A</u> ldehyde <u>O</u> xidase 3“
ABA	„ <u>A</u> bscisic <u>A</u> cid“ (Abscisinsäure)
ABA2	„ <u>A</u> BA Deficient 2“
ABFs	„ <u>A</u> BA-responsive element Binding <u>F</u> actor“
ABI1	„ <u>A</u> BA-Insensitive 1“
ABI2	„ <u>A</u> BA-Insensitive 2“
ABRE	„ <u>A</u> BA- <u>R</u> esponsive- <u>E</u> lement“
AFM	„ <u>A</u> tomie <u>F</u> orce <u>M</u> icroscopy“
AHG1	„ <u>A</u> BA- <u>H</u> ypersensitive <u>G</u> ermination 1“
AJ	„ <u>A</u> utoinhibitory <u>J</u> unction“ (autoinhibitorische Verzweigungsstelle)
AMPKs	„ <u>A</u> MP-activated <u>K</u> inase“
APS	<u>A</u> mmoniumperoxodisulfat
BCA	„ <u>B</u> icin <u>h</u> onic <u>A</u> cid“ (Bichinchoninsäure)
BiFC	„ <u>B</u> imolecular fluorescence <u>c</u> omplementation“ ( <u>B</u> imolekulare <u>F</u> luoreszenz <u>k</u> omplementation)
Bp	„ <u>b</u> ase <u>p</u> airs“ (Basenpaare)
BSA	<u>B</u> ovines <u>S</u> erum <u>a</u> lbumin
Bzw.	beziehungsweise
ca.	<u>c</u> irca
CBD	<u>C</u> a <sup>2+</sup> - <u>B</u> indedomäne
CBLs	„ <u>C</u> alcineurin- <u>B</u> like proteins“
CC	„ <u>C</u> orrelation <u>C</u> oefficient“ (Korrelationskoeffizient)
CCV	„ <u>C</u> lathrin- <u>C</u> oated <u>V</u> esicles“ (Clathrin-beschichtete Vesikel)
CD21 und 46	„ <u>C</u> luster of <u>D</u> ifferentiation“ (menschlicher Komplementrezeptor)
Cdi	„ <u>C</u> arbon <u>d</u> ioxide <u>i</u> nsensitive“
CDPKs	„ <u>C</u> alcium- <u>D</u> ependent <u>P</u> rotein <u>K</u> inases“
CFP	„ <u>C</u> yan <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein“
CFTR	„ <u>C</u> ystic <u>F</u> ibrosis conductance <u>R</u> egulator“
CIPKs	„ <u>C</u> BL- <u>I</u> nteracting <u>P</u> rotein <u>K</u> inases“
CLSM	„ <u>C</u> onfokal <u>L</u> aser <u>S</u> canning <u>M</u> icroscopy“
ColO	<u>C</u> olumbia-0
cRNA	„ <u>c</u> oding <u>R</u> NA“ (kodierende RNA)
CT	<u>C</u> - <u>T</u> erminus
d.h.	<u>d</u> as <u>h</u> eißt
DG	<u>D</u> eckgläschen
DGDG	<u>D</u> igalaktosyl <u>d</u> iacylglycerol
DIG	„ <u>D</u> etergent- <u>I</u> nsoluble- <u>G</u> lykolipid enriched membrane“
DMEM	„ <u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium“

DNA	„ <u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid“ (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	<u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ukleosid <u>t</u> riphosphat
DOPC	„1,2- <u>D</u> ioleoyl-sn-glycero-3- <u>p</u> hospho <u>c</u> holin“ (synthetisches Phosphocholin)
DRM	„ <u>D</u> etergent- <u>R</u> esistant <u>M</u> embrane fraction“
dsDNA	„ <u>d</u> ouble <u>s</u> tranded <u>D</u> NA“ (doppelsträngige DNA)
DSF	„ <u>D</u> etergent- <u>S</u> oluble <u>F</u> raction“
DTT	<u>D</u> ithio <u>t</u> hreitol
E <sub>FRET</sub>	FRET-Effizienz
eNOS	<u>e</u> ndotheliale <u>N</u> O (Stickstoffmonoxid)- <u>S</u> ynthase
EPR	„ <u>E</u> lectron <u>P</u> aramagnetic <u>R</u> esonance“ (Elektronenspinresonanz)
etc.	et cetera (und so weiter)
EV1	<u>E</u> cho <u>v</u> irus <u>1</u>
FBS	„ <u>F</u> etale <u>B</u> ovine <u>S</u> erum“
FCS	„ <u>F</u> luorescence <u>C</u> orrelation <u>S</u> pectroscopy“
FRAP	„ <u>F</u> luorescence <u>R</u> ecovery <u>A</u> fter <u>P</u> hoto <u>b</u> leaching
FRET	<u>F</u> örster- <u>R</u> esonanz <u>e</u> nergie <u>t</u> ransfer
fwd	„ <u>F</u> or <u>w</u> ard“ (vorwärts)
GAP	<u>G</u> PI-ver <u>a</u> nkertes <u>P</u> rotein
GEM	„ <u>G</u> lycosphingolipid <u>E</u> nriched <u>M</u> embrane“
GFP	„ <u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein“
GTP	<u>G</u> uanosin <u>t</u> riphosphat
GUV	„ <u>G</u> iant <u>U</u> nilamellar <u>V</u> esicles“
HA	Hämagglutinin des Influenzavirus <u>A</u>
HAB1	„ <u>H</u> omology to <u>AB</u> I <u>1</u> “
HEK-Zellen	„ <u>H</u> uman <u>E</u> mbryonal <u>K</u> idney“ (menschliche embryonale Nierenzellen)
HIV	„ <u>H</u> uman <u>I</u> mmunodeficiency <u>V</u> irus“
HPLC	„ <u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography“ (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HRP	„ <u>H</u> orse <u>r</u> addish <u>P</u> eroxidase“ (Meerrettichperoxidase)
IPP	<u>I</u> sopentenyl <u>p</u> rophosphat
kb	<u>K</u> ilo <u>b</u> asen
kDa	<u>K</u> ilo <u>d</u> alton
l	Liter
LB-Medium	<u>L</u> uria- <u>B</u> ertani-Medium
LRR	„ <u>L</u> eucine- <u>R</u> ich- <u>R</u> epeat“
MAMPs	„ <u>M</u> icrobe- <u>A</u> ssociated <u>M</u> olecular <u>P</u> atterns“
MAP	<u>M</u> itogen <u>A</u> ktiviertes <u>P</u> rotein
MCC	„ <u>M</u> embrane <u>C</u> ompartment of <u>C</u> an1“
MCD	<u>M</u> ethyl- $\beta$ - <u>C</u> yclodextrin
MEP-Weg	<u>M</u> ethylerythritol <u>p</u> hosphatweg

MHC	„ <u>M</u> ajor <u>H</u> istocompatibility <u>C</u> lass I“ (Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I)
MCP	„ <u>M</u> embrane <u>C</u> ompartment of <u>P</u> ma1“
MCS	„ <u>M</u> ultiple <u>C</u> loning <u>S</u> ite“ (Polylinker)
MDR-Protein	„ <u>M</u> ultidrug <u>R</u> esistance“-Protein
MGDG	<u>M</u> onogalaktosyl <u>d</u> iacylglycerol
min	Minute(n)
ml	Milliliter
ms	Millisekunde
MSE	„ <u>M</u> ean <u>S</u> quared <u>E</u> rror“ (Mittlere quadratische Abweichung)
NMR	„ <u>N</u> uclear <u>M</u> agnetic <u>R</u> esonance“ (Kernspinresonanz)
NRT1.1	„ <u>N</u> itrate <u>T</u> ransporter 1.1“
NTP	<u>N</u> ukleotidtriphosphat
ON	„ <u>O</u> ver <u>N</u> ight“ (über Nacht)
p.	pro
PA	„ <u>P</u> hosphatic <u>A</u> cid“ (Phosphatidsäure)
PAA	<u>P</u> olyacrylamid
PAMPs	„ <u>P</u> athogen- <u>A</u> ssociated <u>M</u> olecular <u>P</u> atterns“
PE	<u>P</u> hosphatidylethanolamin
PCR	„ <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction“ (Polymerase Ketten Reaktionen)
PDGF	„ <u>P</u> latelet- <u>D</u> erived <u>G</u> rowth <u>F</u> actor“ (Wachstumsfaktor)
PEG	<u>P</u> olyethylenglykol
PK-D	<u>P</u> roteinkinasedomäne
PI	„complete EDTA-free <u>P</u> rotease <u>I</u> nhibitor cocktail tablets“
PIG	„ <u>P</u> article <u>I</u> nflow <u>G</u> un“ (Gen-Kanone)
PKS	<u>P</u> roteinkinase <u>S</u>
PM	<u>P</u> lasma <u>m</u> embran
PMT	„ <u>P</u> hotomultiplier tube“ (Detektor)
PP2C	<u>P</u> roteinphosphatase <u>2</u> <u>C</u>
PRR	„ <u>P</u> attern <u>R</u> ecognition <u>R</u> eceptors“
PVDF	<u>P</u> olyvinylidenfluorid
PVPP	<u>P</u> olyvinylpolypyrolidon
PVX	„ <u>P</u> otato <u>V</u> irus <u>X</u> “ (Kartoffelvirus X)
PYR1	„ <u>P</u> yrabactin <u>R</u> esistance <u>1</u> “
rev	„reverse“ (rückwärts)
RCAR1/PYL9	„ <u>R</u> egulatory <u>C</u> omponent of <u>A</u> BA <u>R</u> eceptor 1/ PYR1 like 9“
Rcd	„ <u>R</u> adical induced <u>c</u> ell <u>d</u> eath“
RLU	„ <u>R</u> elative <u>L</u> uminescent <u>U</u> nits“ (Relative Lumineszenzeinheiten)
RNA	„ <u>R</u> ibonucleic acid“ (Ribonukleinsäure)
RNase	<u>R</u> ibonuklease
ROI	„ <u>R</u> egion <u>O</u> f <u>I</u> nterest“ (Region von Interesse)
ROS	„ <u>R</u> eactive <u>O</u> xygen <u>S</u> pecies“ (reaktive Sauerstoffspezies)

V Abkürzungsverzeichnis

rpm	„ <u>r</u> evolutions <u>p</u> er <u>m</u> inute“ (Umdrehungen pro Minute)
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
SCS	<u>S</u> nrk2-interagierender <u>C</u> alcium- <u>S</u> ensor
SDS-Page	„ <u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate <u>P</u> oly <u>a</u> crylamide <u>g</u> el <u>e</u> lectrophoresis“
SDT	„ <u>S</u> ingle <u>D</u> ye <u>T</u> racing“
sec	Sekunde(n)
SFV	<u>S</u> emliki- <u>F</u> orest- <u>V</u> irus
SIN	<u>S</u> indbis-Virus
SLAC1	„ <u>S</u> low <u>A</u> nion <u>C</u> hannel-associated <u>1</u> “
SLAH3	„ <u>S</u> LAC1 <u>H</u> omologue <u>3</u> “
SNFs	„ <u>S</u> ucrose <u>N</u> on- <u>F</u> ermenters“
Snrks	„ <u>S</u> NF1-related <u>k</u> inases“
SOD	<u>S</u> uper <u>o</u> xid <u>d</u> ismutase
SOS2	„ <u>S</u> alt <u>O</u> verly <u>S</u> ensitive <u>2</u> “
SRD	<u>S</u> terolreiche <u>D</u> omänen
SRM	„ <u>S</u> electe <u>d</u> <u>R</u> eaction <u>M</u> onitoring“
ssDNA	„ <u>s</u> ingle <u>s</u> tranded <u>D</u> N <u>A</u> “ (einzelsträngige DNA)
STED	„ <u>S</u> timulated <u>E</u> mission <u>D</u> epletion“
SUV	„ <u>S</u> mall <u>U</u> nilamellar <u>V</u> esicles“
SV40	<u>S</u> imian- <u>V</u> irus <u>40</u>
T-DNA	<u>T</u> ransfer-DNA
TEM	<u>T</u> rans <u>e</u> lektronen <u>m</u> ikroskopie
TEMED	<u>T</u> etramethylethylendi <u>a</u> min
Ti-Plasmid	<u>T</u> umor- <u>i</u> nduzierendes Plasmid
TIRFM	„ <u>T</u> otal <u>I</u> nternal <u>R</u> e <u>f</u> lection <u>M</u> icroscopy“
TM	„ <u>T</u> emperature of <u>M</u> elting“ (Schmelztemperatur)
USER	„ <u>U</u> racil <u>S</u> pecific <u>E</u> xcision <u>R</u> eagent“
UZ	<u>U</u> ltrazentrifuge
VRAC	„ <u>V</u> olume- <u>R</u> egulated <u>A</u> nion <u>C</u> hannel“
WB	<u>W</u> estern <u>B</u> lot
YFP	„ <u>Y</u> ellow <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein“
z.B.	zum <u>B</u> eispiel

## Anhang VI – Begriffserklärung

### **14-3-3-Proteine**

sind eine Familie konservierter, regulatorischer Moleküle, die in allen eukaryontischen Zellen exprimiert sind und eine Vielzahl von funktionell diversen Signalproteinen (Kinasen, Phosphatasen, Transmembranrezeptoren) binden können.

### **ABA2**

ist eine Xanthoxindehydrogenase in der Biosynthese von ABA.

### **ABI1**

ist die Proteinphosphatase 2C 56 und wirkt inhibitorisch in ABA-Signalwegen.

### **ABI2**

ist die Proteinphosphatase 2C 77 und wirkt wie ABI1 inhibitorisch in ABA-Signalwegen.

### **ABFs**

sind ABA-induzierbare DNA-bindende Proteine und eine Unterfamilie der bZip-Proteine.

### **Abscisinsäure**

ist ein Phytohormon mit meist antagonistischer Wirkung, wodurch es anderen Phytohormonen, wie den Cytokinen, den Auxinen und Gibberellinen entgegenwirkt.

### **AHG1**

ist eine Proteinphosphatase 2C und wirkt an der ABA-stimulierten Samenkeimung.

### **AKT1**

ist ein einwärtsgerichteter Kaliumkanal.

### **Aquaporine**

sind Proteine, die Kanäle in der Plasmamembran bilden und so den Einstrom von Wasser und kleinen, ungeladenen Molekülen ermöglichen.

### **Auxine**

sind eine Gruppe von natürlichen (dann zu den Phytohormonen gehörend) und synthetischen Wachstumsregulatoren mit multipler Wirkung auf Wachstums- und Differenzierungsprozesse bei Gefäßpflanzen.

### **BY2-Zellen**

Ist eine pflanzliche Zelllinie, generiert aus einem Callus, der auf einem Keimling von *Nicotiana tabacum* cv. BY2 (Kultivar „Bright Yellow“) generiert wurde.

### **Calyculin A**

ist ein Inhibitor von Proteinphosphatasen.

### **Can1**

ist eine Argininpermease in der Plasmamembran von Hefezellen. Sie benötigt Phosphatidylethanolamin (PE) zur Lokalisierung und ist ausschließlich mit Membrandomänen assoziiert.

### **Caveolae**

sind 50 bis 100 Nanometer große, sackförmige Einstülpungen der Plasmamembran vieler Zellarten (außer Neuronen) und werden durch das monomere Protein Caveolin gebildet (Rothberg *et al.*, 1992). Sie sind funktionell beteiligt an Endo- und Exozytose von Transportvorgängen (Pelkmans *et al.*, 2004) und sind abhängig von Cholesterol (Hailstones *et al.*, 1998).

### **CDI**

sind CO<sub>2</sub>-insensitive Mutanten der Modelnpflanze *Arabidopsis thaliana*.

### **CFTR**

ist ein membranintegraler Chloridkanal, der zu den cAMP-regulierten Ionenkanälen gehört.

### **Chelate**

sind Verbindungen, bei denen ein Ligand (Chelator), der mehr als ein freies Elektronenpaar besitzt, mindestens zwei Bindungsstellen des Zentralatoms (meistens ein zweifach geladenes Metallion) einnimmt. Ligand und Zentralatom sind über koordinative Bindungen miteinander verknüpft, was bedeutet, dass das bindende Elektronenpaar allein vom Liganden bereitgestellt wird.

### **Coiled-coil-Domäne**

ist eine stabiles, lineares Proteinstrukturmotiv das aus mindestens zwei ( $\alpha$ -)Einzelhelices besteht. Sie tragen zur Proteindimerisierung bei.

### **CPI1**

ist die Cyclopropylisomerase, die die Umwandlung von pentazyklischen Cyclopropylsterolen zu konventionellen tetrazyklischen Sterolen katalysiert. Sie ist notwendig für die polare PIN2-Lokalisierung und -endozytose.

### **CPKs**

sind eine Familie von Calcium-abhängigen Proteinkinasen.

### **Cryptogein**

ist ein 10kDa großes hydrophiles Protein sezerniert von dem phytopathogenen Pseudopilz *Phytophthora cryptogea* und dafür bekannt Sterole zu binden und zu transportieren.

### **DRMs**

die „Detergent-resistant membranes,“ werden als ein biochemisches Äquivalent zu *in vivo*-„Lipid Rafts“ angesehen und durch Zentrifugation über einen Saccharosegradienten (siehe 2.11.4.3, Seite 102) nach Detergenzbehandlung (siehe 2.11.4.2, Seite 102) isoliert. Auch: DIMs („detergent-insoluble membranes) oder DIGs (detergent-insoluble glycoprotein“).

### **Cytokine**

sind Wachstumsfaktoren, also Proteine, die das Wachstum und die Zelldifferenzierung regulieren.

### **DSF**

die „Detergent-soluble fraction“ ist die gelöste Mehrheit der Membranproteine, die sich nach der DRM-Aufreinigung am Boden des Saccharosegradienten absetzen.

### **Elicitoren**

auch Induktoren oder Botenstoffe genannt, sind Substanzen, die in Pflanzen die Abwehrmechanismen gegen Fraßfeinde und Krankheitserreger auslösen. Endogene Elicitoren sind z.B. Jasmonsäure, Salicylsäure und bestimmte Oligosaccharide. Exogene Elicitoren sind z.B. Sterole aus Pilzen oder Volicitin aus dem Speichel bestimmter Insekten

### **Filipin**

ist eine chemische, antifugale Komponente aus dem Pilz *Streptomyces filipinensis*

### **flg22**

ist ein 22 Aminosäuren langer Teil des konservierten N-Terminus des Flagellins, einem Protein aus dem bakteriellen Flagellum, und dafür bekannt Immunantworten in Pflanzen zu aktivieren. Die Perzeption von Flagellin erfolgt in Pflanzen durch die Rezeptorkinase FLS2 („flagellin-sensitive-2“).

### **Flotilline**

sind weithin exprimierte, evolutionär konservierte Proteine und spielen eine Rolle in der Clathrin-unabhängigen Endozytose (Glebov *et al.*, 2006).

### **Gap1**

ist eine generelle Aminosäurepermease. Sie ist essentiell für das invasive Wachstum pathogener Hefearten.

### **Glyoxylasen**

sind eine Gruppe von Enzymen, die die Detoxifikation von Methylglyoxal und anderen reaktiven Aldehyden, die als Nebenprodukte des normalen Metabolismus entstehen, katalysieren.

### **GPCR-Typ-G-Proteine**

sind ABA-Rezeptoren in *Arabidopsis thaliana*.

### **HAB1**

ist die Proteinphosphatase 2C 16 und wirkt zusammen mit ABI inhibitorisch in ABA-Signalwegen (Saez *et al.*, 2006).

### **Hup1**

ist ein Protonen/Hexose-Symporter der einzelligen Alge *Chlorella kessleri*.

### **Hxt1**

ist ein Glukosetransporter mit geringer Affinität in Hefezellen. Durch Genomverdopplung existiert das Paralogon Hxt6.

***In situ***

bezeichnet einen Prozess während dem sich das System selbst verändert.

***In vitro***

bezeichnet organische Vorgänge die außerhalb eines lebenden Organismus, in einer kontrollierten künstlichen Umgebung stattfinden.

***In vivo***

bezeichnet Prozesse, die in einem lebenden Organismus ablaufen.

**Ionomycin**

ist ein Ionophor und vermag als solches Calciumionen durch biologische Membranen zu transportieren.

**K-252a**

ist ein selektiver Inhibitor der Aktivität von Proteinkinasen.

**KAT1**

ist ein spannungsgesteuerter Kaliumionenkanal.

**MAMPs und PAMPs**

sind für Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten essentielle und hoch konservierte Strukturmodule oder Moleküle, die charakteristisch für dieses breite Spektrum an Mikroorganismen sind und es dem Immunsystem des Wirtes ermöglichen, das Eindringen der Pathogene zu erkennen.

**Mg-Chelatase**

ist ein Enzym aus drei Komponenten und katalysiert die Insertion von  $Mg^{2+}$  in das Protoporphyrin IX.

**PEN1**

oder auch SYP121 genannt, ist ein Syntaxin.

**PEN2**

ist eine Glykosylhydrolase.

**PEN3**

oder auch PDR8 genannt, ist ein ABC- („ATP binding cassette“) Transporter.

**PINs**

„PIN-Formed“ Proteine sind sekundäre Transporter, die den Ausschluss von Auxin aus den Zellen von multizellulären Pflanzen gewährleisten. Sie regulieren auch die asymmetrische Verteilung von Auxin, der für zahlreiche Entwicklungsprozesse notwendig ist (Krecek *et al.*, 2009).

**PIPs**

sind Aquaporine die den Transport von Wasser und kleinen ungeladenen Molekülen über die Plasmamembran gewährleisten.

**pK<sub>a</sub>-Wert**

ist die Säurekonstante, die Aufschluss darüber gibt in welchem Maße ein Stoff in einer Gleichgewichtsreaktion mit Wasser unter Protolyse reagiert.

**Pma1**

ist eine Protonen-ATPase der Plasmamembran und pumpt Protonen aus der Zelle heraus und reguliert so den zytoplasmatischen pH-Wert und das Membranpotential in Hefezellen.

**PP2C-Familie**

ist die Familie der Proteinphosphatasen 2C.

**PYR1**

ist ein dimerer ABA-Rezeptor.

**Pyrabaktin**

4-Bromo-N[Pyridin-2-yl Methyl]Naphthalen-1-Sulfonamid, ist ein synthetisches Sulfonamid, das ABA imitiert.

**Ras**

ist ein monomeres GTP-bindendes Protein und ein zentrales Glied verschiedener Signaltransduktionswege, die Wachstums- und Differenzierungsprozesse regulieren.

**RCAR/PYR/PYL-Familie**

ist eine Familie von insgesamt 14 ABA-Rezeptoren.

**RCD**

ist ein Protein in *Arabidopsis thaliana*, das eine putative Poly(ADP-Ribose)-Polymerase katalytische Domäne und eine WWE-Protein-Protein-Interaktionsdomäne besitzt.

**Ribose-5-phosphat-Isomerase**

ist ein Enzym das Ribose-5-phosphat und Ribulose-5-phosphat ineinander umwandelt.

**R-Typ**

ist eine Art von spannungsabhängigen Anionenkanälen, die schnell aktiviert werden können.

**SLAC1**

Ist ein Anionenkanal vom S-Typ in Schließzellen.

**SLAH3**

Ist ein, dem SLAC1 homologer, Anionenkanal vom S-Typ in Schließzellen und vor allem im Mesophyll.

**SMT1**

ist die Cycloartenol-c-24-Sterolmethyltransferase und kontrolliert die Sterolkonzentration in Pflanzen (Diener *et al.*, 2000).

**Snrks**

sind eine Familie von Calcium-unabhängigen Proteinkinasen.

### **START-Proteine**

sind Proteine die eine „Steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-related lipid-transfer“-Domäne besitzen. Diese Domäne besteht aus ~210 konservierten Aminosäuren, die eine hydrophobe Tasche für Ligandenbindung, formen. Zu diesen Proteinen gehören die Mitglieder der RCAR/PYR/PYL-Familie (Clark, 2011).

### **STED**

ist eine 1999 experimentell realisierte fluoreszenzmikroskopische Technik, deren Auflösung nicht beugungsbegrenzt ist und nach dem RESOLFT-Prinzip arbeitet (Hell und Wichmann, 1999).

### **S-Typ**

ist eine Art von geringfügig spannungsabhängigen Anionenkanälen, die eher langsam aktiviert werden.

### **Sur7**

ist ein Plasmamembranprotein in Hefezellen mit bisher unbekannter Funktion.

### **SUT1**

ist ein membranintegroaler Saccharosetransporter.

### **Transiente Expression**

vorübergehende Expression eines Genes, das zwar von einer Zelle in Form eines Plasmides aufgenommen, aber nicht in das eigene Genom integriert wird. ≠ stabile Expression.

### **Tropismus**

ist eine gerichtete, von einem bestimmten Reiz ausgehende Reaktion einer Pflanze in Form einer Bewegung. Der Gravitropismus beschreibt die Fähigkeit einer Pflanze ihre Organe durch Wachstumskrümmung in eine bestimmte Lage zur Erdbeschleunigung zu bringen.

### **Vortexen**

ist eine Art der wirbelartigen Vermischung von Lösungen in einem Reaktionsgefäß, in dem dieses einer starken Vibration ausgesetzt wird.

## Anhang VII – Publikationsverzeichnis

Demir F, Horntrich C, Blachutzik JO, Scherzer S, Reinders Y, Kierszniowska S, Schulze WX, Harms GS, Hedrich R, Geiger D, Kreuzer I.

Arabidopsis nanodomain-delimited ABA signaling pathway regulates the anion channel SLAH3. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 May 14;110(20):8296-301. doi: 10.1073/pnas.1211667110. Epub 2013 Apr 29.

F. Demir und C. Horntrich haben gleichermaßen zum Entstehen dieser Publikation beigetragen und sind somit gleichwertige Erstautoren.



## Anhang VIII - Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name, Vorname:	Horntrich, Claudia Brigitte
Geburtsdatum:	19.10.1985
Geburtsort:	Dresden
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	BRD

### Promotion

01.10.2013 – 31.12.2013	Finanzierung durch das Frauenstipendium „Chancengleichheit für Frauen in Forschung und Lehre“ der Julius-Maximilian-Universität, Würzburg
04.05.2011	Einschreibung in die „Graduate School of Life Science“, Würzburg als Promotionsstudentin
ab 01.06.2010	Promotion im Zuge eines Doktorandenstipendiums des Graduiertenkollegs 1342 „Lipid Signalling“, in der Arbeitsgruppe Hedrich/Kreuzer, Julius-Von-Sachs-Institut für Biowissenschaften, Lehrstuhl für Botanik I der Julius-Maximilian-Universität, Würzburg  <u>Thema:</u> „Die Funktion von Membranlipidnanodomänen für Signaltransduktionsprozesse in Pflanzen“
12.10. 2009 – 15.04. 2010	Promotionsstelle in der Arbeitsgruppe von Dr. Said Hashemolhosseini, Institut für Biochemie, Emil-Fischer-Zentrum der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg; Auflösungsvertrag (15.04.2010)

### Hochschulbildung

28.01.2010	Abschluss: Diplom
01. 2009 – 10. 2009	Diplomarbeit am Institut für Biochemie I, MTI Jena  <u>Betreuung:</u> Prof. Britta Qualmann, Dr. Michael Kessels, Prof. Claus Liebmann  <u>Thema:</u> „Untersuchung von Syndapin-Proteinkomplexen“
10.2006 – 10.2009	Hauptstudium  Hauptfach: Genetik

## VIII Lebenslauf

Nebenfächer: Mikrobiologie, Pharmakologie, Humananatomie

23.10. 2006

Vordiplom

10. 2004 – 10. 2009

Studium der Biologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

### Schulbildung

01.07.2004

Abitur

08. 1996 – 07. 2004

Erich-Wustmann-Gymnasium, Dresden

08. 1992 – 07. 1996

124. Grundschule, Dresden

# Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbst angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich habe die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Ich habe bislang noch keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den \_\_\_\_\_

---

Claudia Horntrich



# Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen Personen bedanken, durch deren Unterstützung diese Dissertation erleichtert oder überhaupt erst ermöglicht wurde.

Mein besonderer Dank gilt daher:

**Prof. Dr. Rainer Hedrich** für die Bereitstellung der Thematik, der Betreuung und der Finanzierung meiner Doktorarbeit sowie für die kreative Atmosphäre am Lehrstuhl.

Ganz besonders möchte ich mich bei **Dr. Ines Kreuzer** für die freundliche und geduldige Betreuung während meiner gesamten Doktorarbeit bedanken. Sowie für die anregenden Diskussionen und auch die Möglichkeit jederzeit eigene Ideen einbringen und verwirklichen zu können.

I also want to thank **Prof. Dr. Gregory Harms** (Wilkes University Wilkes-Barre, Pennsylvania (USA)) for teaching me all the necessary LSM-techniques, for all the help and advise to improve my results and for all the time offered for discussions.

Mein besonderer Dank gilt **Prof. Dr. Waltraud Schulze** und ihrem Team (Fg. Systembiologie der Pflanze, Universität Hohenheim), die uns mit der Massenspektrometrie gewaltig unter die Arme gegriffen und unseren Ergebnissen den letzten Schliff gegeben haben. Sowie **Dr. Yvonne Reinders** (Lehrstuhl für Biochemie I, Universität Regensburg), die uns bei Fragen und Problemen im Bereich der Biochemie mit Rat und Tat unterstützt hat. Vielen Dank auch an **Dr. Sachie Kimura** (ZMBP – Pflanzenphysiologie, Universität Tübingen), die mir das nötige Werkzeug an die Hand gegeben hat, um die ROS-Messungen durchführen zu können.

Ich danke auch dem **Frauenbüro der Universität Würzburg** für die 3-monatige finanzielle Unterstützung.

**Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls** für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik für die tolle Kollegialität und die große Hilfsbereitschaft. Mein Dank gilt dabei vor allem Prof. Dr. Dietmar Geiger, Dr. Kai Konrad und Prof. Dr. Dirk Becker, die immer Antworten auf meine Fragen hatten.

Vor allem danke ich all meinen **Freunden**, meinen **Eltern** und meinem **Bruder**, die immer hinter mir stehen und auf die ich mich immer verlassen kann. Danke für alles!

**Daniel**, danke ich, dass er diesen langen Weg mit mir gegangen ist und immer die richtigen Worte und die nötige Geduld aufbringen konnte. Danke, dass du immer für mich da bist!

