

**Visualisierung von
Plasmamembran-Domänen
in
*Arabidopsis thaliana***



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

vorgelegt von

Jörg O. Blachutzik

aus Gerolzhofen

Würzburg 2012

Prüfungskommission

Eingereicht am: 27. März 2012

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Wolfgang Rössler

1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Hedrich

2. Gutachter: Prof. Dr. Gregory Harms

Tag des Promotionskolloquiums: 25. Mai 2012

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Danksagung

Gleich zu Beginn ist es mir wichtig, folgenden Menschen ein dickes Dankeschön auszusprechen:

- Meinen Professoren Rainer Hedrich und Gregory S. Harms für die gute Zusammenarbeit, Motivation und die vielen anregend geführten Diskussionen. Ebenso Dr. Ines Kreuzer, Dr. Fatih Demir und Dr. Dietmar Geiger fürs Korrekturlesen und überhaupt, sowie allen Kollegen am LS Botanik 1 für Ihr Engagement, den Wissenstransfer und die stets gute Zusammenarbeit.
- Darüber hinaus bedanke ich mich bei den Kollegen der AG Harms am Bioimaging Zentrum, die mir bei technischen Problemen sowie bei Analysen jedweder Art hilfreich zur Seite standen: Moni, Qiang und Mike. An dieser Stelle nochmal ein spezielles Dankeschön an Greg für die hervorragende Betreuung (die Datenanalyse mitten im Winter bei Eis und Schnee bis morgens um vier eingeschlossen) und Motivation: „*keep it stupid simple*“!

Mit Euch allen hat es Spaß gemacht, wir haben zusammen viel erreicht und dabei viel gelacht - und das jeden Tag aufs Neue. Vielen Dank hierfür.

- Außerdem danke ich allen *Rock* und *Heavy* Bands auf diesem Planeten für Stressabbau und Motivation durch ihre Musik - insbesondere Dimebag Darrell „*hellyeah*“, Peter Steele „*trust and you'll be trusted sais the liar to the fool*“ und Ronnie James Dio: „*catch the rainbow*“!
- Ein herzliches Dankeschön auch an meine Nachbarn, die mich in der Phase des Zusammenschreibens mit warmen Lebensmitteln versorgt haben, meinen Bandkollegen und Freunden. An dieser Stelle nochmal ein besonderer Dank an Silv, Otze und Walter fürs Freundsein, Flüssignahrung, Gespräche jedweder Art und für so unendlich viel Anderem.
- Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie danken, vor allem meinen Eltern. Ihr habt durch Eure Unterstützung all dies erst ermöglicht und immer an mich geglaubt. Dabei wart Ihr über jeden Zweifel erhaben - allezeit.

Ich liebe Euch.

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
‰	Promille
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ABA	Abscisinsäure („ <i>abscisic acid</i> “)
ABI	ABA-insensitiv
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
AS	Aminosäure(n)
ASA	Aminosäure-Austausch
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AUX1	Auxin Influx Transporter 1
BD-SM C ₁₂	Bodipy-Sphingomyelin FL C ₁₂
BHK-Zellen	embryonale Hamster-Nierenzellen („ <i>baby hamster kidney</i> “)
BiFC	bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
Bp	Basenpaar(e)
BP	Bandpass-Filter
BSA	Rinderserum Albumin („ <i>bovine serum albumin</i> “)
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
ca.	Circa
Ca ²⁺	Kalzium
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CaMV	Blumenkohl Mosaik Virus („ <i>cauliflower mosaic virus</i> “)
Can1p	Arginin Permease aus der Bäckerhefe, ein Arginin-Proton-Symporter („ <i>S. cerevisiae plasma membrane arginine 1 permease</i> “)
cDNA	copy DNA
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COS-Zellen	Fibroblasten-Zelllinie aus grünen Meerkatzen (<i>Cercopithecus aethiops</i>)
cpi1-1	Cyclopropylsterol Isomerase1-1 Mutante
CPK	Ca ²⁺ -abhängige Proteinkinase („ <i>calcium-dependent protein kinase</i> “)
CTBX	Cholera Toxin B-Untereinheit
d	Deletion
D	Diffusionskoeffizient
DiD	Diocadecyl-Tetramethylindocarbocyanin-Chlorobenzon-Sulfonat
DiIC ₁₂	Didodecyl-Tetramethyl-Indocarbocyanin Perchlorat
DiIC ₁₈	Diocadecyl-Tetramethyl-Indocarbocyanin Perchlorat
DL	Durchlicht
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonucleinsäure („ <i>deoxyribonucleic acid</i> “)
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
DRM	Detergens-resistente Membranfraktion
DSF	Detergens-lösliche Membranfraktion
dsRed	rot fluoresz. Protein („ <i>Discosoma spec. red</i> “)
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
E-coli	Escherichia coli
eGFP	grün fluoresz. Protein („ <i>enhanced green fluorescing protein</i> “)
engl.	englisch
et al.	und andere (lat: <i>et alii</i>)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
eYFP	gelb fluoresz. Protein („ <i>enhanced yellow fluorescent protein</i> “)
F _i	immobiler Fraktion
F _m	mobiler Fraktion
FM4-64	ein lipophiler Membranfarbstoff
FRAP	Fluoreszenzrückkehr nach dem Ausbleichen („ <i>fluorescence recovery after photobleach</i> “)
Fur4p	Uracil-H ⁺ -Symporter aus <i>Saccharomyces</i> („ <i>uracil permease 4</i> “)
fwd	vorwärts („ <i>forward</i> “)
g	Ortsfaktor/Gramm
GDNF	(„ <i>glial cell line derived neurotrophic factor</i> “)
GM1	Gangliosid 1
GORK	(„ <i>guard cell outward rectifying K⁺-channel</i> “)
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GUV	große unilamellare Vesikel
h	Stunden („ <i>hour</i> “)
H ⁺	Wasserstoff-Ion
HASM-Zellen	menschliche arterielle Muskelzellen („ <i>human arterial smooth muscle</i> “)
HCl	Salzsäure
HEK-Zellen	menschliche embryonale Nierenzellen („ <i>human embryonic kidney</i> “)
HUP1	Hexose-Proton Symporter aus <i>Chlorella</i> („ <i>hexose uptake protein 1</i> “)
K	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
konz.	konzentriert
kp	Kilopascal
l	Liter
lat.	Lateinisch
Laurdan	Lauroyl-Dimethylaminonaphthalen
LB	Luria-Bertani
l _d	ungeordnete Lipidphase („ <i>liquid disordered phase</i> “)
l _o	geordnete Lipidphase („ <i>liquid ordered phase</i> “)
LRB-PE	Lissamin Rhodamin B-Phosphatidylethanolamin

Lsg.	Lösung
LSM	Laser Scanning-Mikroskop(ie)
μ	Mikro
m	Milli/Meter
M	Molar/Mol
MCD	Methyl-β-Cyclodextrin
MCS	multiple Klonierungsstelle („ <i>multiple cloning site</i> “)
MDCK-Zellen	Epithelzellen aus der Niere des Hundes („ <i>Madin-Darby canine kidney epithelial cells</i> “)
min	Minute
n	Nano
NaAc	Natriumacetat
NaOCl	Natriumhypochlorid
NFT	Nebenfarbteiler
OD ₆₀₀	optische Dichte (bei 600nm Wellenlänge)
PCR	Polymerase Kettenreaktion („ <i>polymerase chain reaction</i> “)
PEG	Polyethylenglykol
PEN1	pentazyklische Triterpen-Synthase 1, ein Syntaxin
P _i	anorganisches Phosphat („ <i>inorganic phosphate</i> “)
PIN2	PIN-formed 2, ein Auxin Efflux Carrier aus <i>A. thaliana</i>
PLAP	plazentale alkalische Phosphatase
PM	Plasmamembran
Pma1	Protonen-ATPase aus <i>Saccharomyces</i> („ <i>plasma membrane H⁺ - ATPase 1</i> “)
PPase	Phosphatase
PSF	Punktspreizfunktion
PVX	Kartoffelvirus X („ <i>potato virus X</i> “)
RCAR	regulatorische Komponenten des ABA-Rezeptors („ <i>regulatory components of ABA receptor</i> “)
Rem	Remorin
REM	Rasterelektronenmikroskop(ie)
rev	rückwärts („ <i>reverse</i> “)
RNase	Ribonuklease
ROI	ausgewählter Bereich („ <i>region of interest</i> “)
rpm	Umdrehungen in der Minute („ <i>rounds per minute</i> “)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SEL	Ausschlussgröße für Proteine („ <i>size exclusion limit</i> “)
SLAC1	ein Anionenkanal („ <i>slow anion associated 1</i> “)
SLAH3	ein SLAC1 Homolog („ <i>SLAC1 homologue 3</i> “)
SNARE	(„ <i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i> “)
sog.	sogenannt
St	Solanum tuberosum
STED	stimulierte Emission-Depletion

Taq	Thermicus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-buffered Saline
tDNA	Tumor-DNA
TE	Tris-EDTA
TENS	TE-NaOH-SDS
TEVC	Zwei-Elektroden Spannungsklemme („ <i>two electrode voltage clamp</i> “)
Ti	tumorinduzierend
TPB	Zwei-Phasen-Puffer („ <i>two phase buffer</i> “)
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (auch Tromethamin, Trometamol)
TSAP	alkal. Phosphatase („ <i>thermosensitive shrimps alkaine phosphatase</i> “)
U	Einheit („ <i>unit</i> “)
USER	Uracil-spezifisches Excisions-Reagent
UV	ultraviolett
UZ	Ultrazentrifugation
(v/v)	Volumen/Volumen („ <i>volume/volume</i> “)
WT	Wildtyp
(w/v)	Gewicht/Volumen („ <i>weight/volume</i> “)
(w/w)	Gewicht/Gewicht („ <i>weight/weight</i> “)
z. B.	zum Beispiel

Tabellenverzeichnis

Material und Methoden

Tab. 1	USER-Klonierungsansatz für DNA-Fragmente	21
Tab. 2	Restriktionsverdau der USER-Vektoren mit PacI und Nt.BbvCI	22
Tab. 3	PCR-Ansatz für die BD Advantage 2-Polymerase	24
Tab. 4	PfuCx-Polymerase Standardansatz	25
Tab. 5	Standardprogramm Thermocycler	25
Tab. 6	Ligationsansatz für DNA-Fragmente	29
Tab. 7	Ansatz für den Restriktionsverdau	29
Tab. 8	Zusammensetzung eines Zwei-Phasen-Systems	35
Tab. 9	LSM-Einstellungen für Nebenfarbteiler (NFT) und Bandpass-Filter (BP)	40
Tab. 10	Rezeptur der Protoplasten-Isolationslösung	45

Diskussion

Tab. 11	Diffusionskoeffizienten aus Arabidopsis, Hefe und COS-Zellen	119
Tab. 12	Korrelationskoeffizienten von SLAH3, CPK21 und ABI1 mit AtRem 1.3	132

Abbildungsverzeichnis

Einleitung

Abb. 1.1	Phospholipide	1
Abb. 1.2	Sphingolipide	2
Abb. 1.3	Sterole	3
Abb. 1.4	Abbesche Auflösungsgrenze	16

Material und Methoden

Abb. 2.1	Schematischer Aufbau der „ <i>PIG</i> “	33
Abb. 2.2	STED-Prinzip	43
Abb. 2.3	Spektraleigenschaften Laurdan.....	48
Abb. 2.4	AtRem1.2 Primer-Bindestellen	55
Abb. 2.5	AtRem1.3 Primer-Bindestellen	55
Abb. 2.6	eGFP-StRem 1.3::pK7WGF2-Vektor	56
Abb. 2.7	pSAT-1396 USER-Vektor	56
Abb. 2.8	pSAT-1450 USER-Vektor	57
Abb. 2.9	pSAT-1564 USER-Vektor	57
Abb. 2.10	pSAT-2244 USER-Vektor	58
Abb. 2.11	pUSER039 pCambia 2300 35S N-term YN-Vektor	58
Abb. 2.12	pUSER040 pCambia 2300 35S N-term YC-Vektor	59

Ergebnisse

Abb. 1	eGFP::StRem 1.3-Linie, untere Epidermis	64
Abb. 2	eGFP::StRem 1.3-Linie, Schließzelle	65
Abb. 3	eGFP::StRem 1.3-Linie, Stengelepidermis	65
Abb. 4	eGFP::StRem 1.3-Linie, Mesophyllprotoplast	66
Abb. 5	eGFP::StRem 1.3-Linie, Western Blot	67
Abb. 6	eGFP::StRem 1.3 Expression	69
Abb. 7	eGFP::AtRem 1.2 und dsRed::AtRem 1.3 Koexpression	70
Abb. 8	dsRed::AtRem 1.2 und eGFP::AtRem 1.3 Koexpression	71
Abb. 9	dsRed::AtRem 1.2 und eGFP::StRem 1.3 Koexpression	72
Abb. 10	dsRed::AtRem 1.3 und eGFP::StRem 1.3 Koexpression	73
Abb. 11	FRAP dsRed::AtRem 1.3	75
Abb. 12	FRAP eGFP::StRem 1.3	76
Abb. 13	FRAP eGFP::StRem 1.3 in Protoplasten	77
Abb. 14	Aminosäuren-Alignment der Remorine	78
Abb. 15	Überblick über generierte AtRem 1.2-Mutanten	79
Abb. 16	dsRed::AtRem 1.2-Mutanten <i>in vivo</i>	80
Abb. 17	dsRed::AtRem 1.2-d4 und eGFP::AtRem 1.2 Koexpression	81
Abb. 18	dsRed::AtRem 1.2-ASA und eGFP::AtRem 1.2 Koexpression	82
Abb. 19	dsRed::AtRem 1.2-d15 und eGFP::AtRem 1.2 Koexpression	83
Abb. 20	FRAP dsRed::AtRem 1.2-ASA	84

Abb. 21	Überblick über generierte AtRem 1.3-Mutanten	85
Abb. 22	dsRed::AtRem 1.3-Mutanten <i>in vivo</i>	85
Abb. 23	eGFP::AtRem 1.3-d2 und dsRed::AtRem 1.3 Koexpression	86
Abb. 24	eGFP::AtRem 1.3-d4 und dsRed::AtRem 1.3 Koexpression	87
Abb. 25	eGFP::AtRem 1.3-ASA und dsRed::AtRem 1.3 Koexpression	88
Abb. 26	eGFP::AtRem 1.3-d15 und dsRed::AtRem 1.3 Koexpression	89
Abb. 27	FRAP eGFP::AtRem 1.3-d4	90
Abb. 28	Konfokale- und STED-Aufnahme pflanzlicher Membrandomänen	92
Abb. 29	Korrelationsanalyse eGFP::StRem 1.3 und Atto647N	93
Abb. 30	„Line Analysis“ konfokaler eGFP- und Atto647N-Signale	94
Abb. 31	„Line Analysis“ Domänendurchmesser nebeneinander aufgetragen	94
Abb. 32	Größenbestimmung der Domänen	95
Abb. 33	Plotprofile: konfokaler Modus vs. STED-Modus	96
Abb. 34	Größenverteilung pflanzlicher Membrandomänen	97
Abb. 35	dsRed::AtRem 1.2 und SLAH3::YFP Koexpression	99
Abb. 36	dsRed::AtRem 1.3 und SLAH3::YFP Koexpression	100
Abb. 37	dsRed::AtRem 1.2 und CPK21::YFP Koexpression	101
Abb. 38	dsRed::AtRem 1.3 und CPK21::YFP Koexpression	102
Abb. 39	eGFP::AtRem 1.2 und dsRed::ABI1 Koexpression	103
Abb. 40	eGFP::AtRem 1.3 und dsRed::ABI1 Koexpression	104
Abb. 41	FRAP CPK21::YFP	105
Abb. 42	FRAP SLAH3::YFP	106
Abb. 43	BiFC SLAH3/CPK21	108
Abb. 44	BiFC CPK21/ABI1	109

Diskussion

Abb. 4.1	Posttranslationale Modifikationsstellen der AtRemorine 1.2 und 1.3	122
Abb. 4.2	Mögliche Mechanismen der SLAH3-Aktivierung.....	133
Abb. 4.3	Mögliche Mechanismen der SLAH3-Inaktivierung.....	135

Anhang A.)

Abb. A1	dsRed::AtRem 1.2 und Lipocalin::eGFP Koexpression	162
Abb. A2	dsRed::AtRem 1.3 und SKU5::eGFP Koexpression	163
Abb. A3	Alignment StRem 1.3 C-Terminus mit CAAX	164
Abb. A4	Auflösungsvermögen STED-Mikroskop	164
Abb. A5	SLAH3::YFP Expression	165
Abb. A6	dsRed::CPK21-G2AC3S vs. dsRed::CPK21	166
Abb. A7	dsRed::CPK21-G2AC3S und eGFP::AtRem 1.2 Koexpression	166
Abb. A8	dsRed::CPK21-G2AC3S und SLAH3::YFP Koexpression	167

Anhang B.)

Abb. B1	FM4-64 Färbung	170
Abb. B2	FM4-64 Färbung nach 18h	170
Abb. B3	LRB-PE Färbung	171
Abb. B4	DiIC ₁₂ und DiIC ₁₈ Färbungen	172
Abb. B5	DiD Färbung	173
Abb. B6	BD-SM C ₁₂ Färbung nach 18h	174
Abb. B7	BD-SM C ₁₂ in der DRM-Fraktion	175
Abb. B8	FM4-64 und BD-SM C ₁₂ kombin. Färbung	176
Abb. B9	FM4-64 und BD-SM C ₁₂ kombin. Färbung nach 15h	177
Abb. B10	FM4-64 und BD-SM C ₁₂ kombin. Färbung nach 20h	178
Abb. B11	FM4-64 und BD-SM C ₁₂ Kollokalisationsanalyse	179
Abb. B12	LRB-PE und BD-SM C ₁₂ kombin. Färbung nach 20h	180
Abb. B13	FRAP-Kinetiken der Lipidphasen	181
Abb. B14	Laurdan Färbungen	183
Abb. B15	Trypanblau Färbungen (Vitalitätsnachweise).....	184

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	vi
Tabellenverzeichnis	x
Abbildungsverzeichnis	xi

1. Einleitung1

1.1 Lipide: das Grundgerüst der Plasmamembran	1
1.2 Das Flüssig-Mosaik Modell und dessen Erweiterung	4
1.3 Funktionelle Domänen in der Plasmamembran	5
1.4 <i>Lipid Rafts</i> , Detergens-Resistenz und Membrandomänen	6
1.5 <i>Lipid Raft</i> -Definition	8
1.6 Erkenntnisse aus artifiziell hergestellten Lipidschichten und Einflüsse auf das <i>Lipid Raft</i> -Konzept	8
1.7 Detergens-resistente Membranfraktionen in Pflanzen	11
1.8 Mikrodomänen in der Plasmamembran als Signalplattformen	12
1.9 Etablierung eines pflanzlichen Markers für Domänen in der Plasmamembran	14
1.10 Visualisierung und Größenbestimmung von Membrandomänen	15
1.11 Fragestellung	18

2. Material & Methoden20

2.1 Vektoren und Klonierungsstrategien	20
2.1.1 pK7WGF2	20
2.1.2 USER-Klonierungen	21
2.1.2.1 pSAT-USER	22
2.1.2.2 pUSER039 pCambia 2300 35S N-term YN	22
2.1.2.3 pUSER040 pCambia 2300 35S N-term YC	23
2.2 Die Polymerase-Kettenreaktion („ <i>polymerase chain reaction</i> “, PCR)	23
2.2.1 DNA-Polymerasen	23
2.2.1.1 Standardreaktionsansatz für die BD Advantage 2-Polymerase	24

2.2.1.2	Standardansatz für die PfuCx-Polymerase	24
2.2.2	PCR-Standardprogramm	25
2.2.3	Primerdesign	26
2.2.4	Aufreinigung von PCR-Produkten	26
2.3	Transformation von Bakterienstämmen inkl. Verfahren mit DNA	26
2.3.1	Transformation via Hitzeschock	27
2.3.2	Elektroporation	27
2.3.3	Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien (Miniprep)	28
2.3.4	Aufreinigungssysteme für Plasmid-DNA	28
2.3.5	Ligationen mittels T4 DNA-Ligase	29
2.3.6	Schneiden der DNA mit Restriktionsenzymen	29
2.3.7	Elektrophoretische Auftrennung der DNA	30
2.3.8	DNA-Elution aus Agarosegelen	30
2.3.9	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels UV-Spektrometrie	30
2.3.10	Restriktionsanalyse	31
2.4	Sequenzierungen und Sequenzanalyse	31
2.5	Pflanzentransformationen	31
2.5.1	Stabile Pflanzentransformationen mittels <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	31
2.5.2	Samensterilisation	32
2.5.3	Transiente Pflanzentransformationen mittels „ <i>Particle Inflow Gun</i> “	32
2.6	Isolation der DRM-Fraktion	34
2.6.1	Gewinnung des mikrosomalen Pellets	35
2.6.2	Aufreinigung der Plasmamembran (Zwei-Phasen-Partitionierung)	35
2.6.3	Isolation der DRM-Fraktion aus dem PM-Pool (Flotation-Assay)	36
2.6.4	Western Blot	37
2.7	Einbettung und Fixierung von Arabidopsis Gewebe für die STED-Mikroskopie	37
2.7.1	Schneiden der eingebetteten Blätter	38
2.7.2	Antikörperfärbung DRM-ständiger Proteine	38

2.7.3	Fixierung der antikörperbehandelten Proben auf Objektträger	38
2.8	Fluoreszenzmikroskopie	39
2.8.1	Fluoreszente Proteinversionen	39
2.8.1.1	eGFP: „ <i>enhanced Green Fluorescent Protein</i> “	39
2.8.1.2	eYFP: „ <i>enhanced Yellow Fluorescent Protein</i> “	39
2.8.1.3	dsRed: „ <i>Discosoma spec. Red</i> “	40
2.8.1.4	Filtereinstellungen an den <i>Laser Scanning</i> -Mikroskopen	40
2.8.2	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)	41
2.8.3	Fluoreszenzrückkehr nach dem Photobleichen (FRAP)	41
2.8.4	Stimulierte Emission-Depletion Mikroskopie (STED)	42
2.9	Datenanalyse	43
2.10	Dekonvolution	44
2.11	Korrelationsanalyse	44
2.12	Protoplastengewinnung	45
2.13	Fluoreszente Lipidanaloga und Färbelösungen für die Fluoreszenzmikroskopie	45
2.13.1	FM 4-64	46
2.13.2	LRB-PE	46
2.13.3	DiIC's	46
2.13.4	DiD	47
2.13.5	BD-SM C ₁₂	47
2.13.6	Kombinierte Färbungen	47
2.13.7	Laurdan	48
2.13.8	Trypanblau Färbungen	49
2.14	Lösungen und Reagenzien	50
2.15	Oligonucleotidprimer	53
2.16	Primer-Bindestellen und Vektoren	55
2.17	Herstellerverzeichnis	59
3.	Ergebnisse	63
3.1	Generierung einer transgenen <i>A. thaliana col 0</i> Remorin Linie	63
3.2	Western Blot	66
3.3	Visualisierung von Membrandomänen mit endogen exprimierten Proteinen	68

3.3.1	Remorine aus unterschiedlichen Pflanzenspezies als Markerproteine für Membrandomänen	68
3.3.1.1	Das <i>Solanum tuberosum</i> Remorin	69
3.3.1.2	Die <i>Arabidopsis thaliana</i> Remorine	69
3.3.1.3	Koexpression des <i>Solanum tuberosum</i> Remorins mit den <i>Arabidopsis thaliana</i> Remorinen	72
3.3.2	FRAP-Experimente mit den Remorinen	74
3.3.2.1	FRAP-Experimente an Protoplasten der transgenen StRemorin 1.3-Linie	76
3.4	Posttranslationale Modifikationen an den Remorinen	77
3.4.1	Das <i>Arabidopsis thaliana</i> Remorin 1.2	79
3.4.2	Das <i>Arabidopsis thaliana</i> Remorin 1.3	84
3.5	Stimulierte Emission-Depletion Mikroskopie (STED)	91
3.5.1	Visualisierung pflanzlicher Membrandomänen mittels STED	91
3.5.2	STED-basierte Größenbestimmung der Membrandomänen	92
3.6	DRM-Proteine <i>in planta</i>	98
3.6.1	Der Anionenkanal SLAH3	98
3.6.2	Die kalziumaktivierte Proteinkinase CPK21	101
3.6.3	Die Abscisinsäure-regulierte Proteinphosphatase ABI1	103
3.6.4	FRAP-Experimente mit Proteinen der DRM-Fraktion	105
3.7	Proteininteraktionen in Membrandomänen	107
3.7.1	SLAH3/CPK21-Interaktion	107
3.7.2	CPK21/ABI1-Interaktion	108

4. Diskussion

4.1	Generierung einer transgenen <i>A. thaliana col 0</i> Remorin Linie	112
4.2	Western Blot	112
4.3	Visualisierung von Membrandomänen mit endogen exprimierten Proteinen	113
4.3.1	Remorine aus unterschiedlichen Pflanzenspezies als Markerproteine für Membrandomänen	114
4.3.2	FRAP-Experimente mit den Remorinen und mögliche Einflüsse membranständiger Proteine auf die Stabilität der Domänen	114
4.3.2.1	FRAP-Experimente an Protoplasten	

der transgenen StRemorin 1.3-Linie: Proteindynamik in pflanzlichen Membrandomänen	118
4.4 Posttranslationale Modifikationen an den Remorinen	120
4.5 Stimulierte Emission-Depletion Mikroskopie (STED)	125
4.6 DRM-Proteine <i>in planta</i>	126
4.6.1 Die Anionenkanäle SLAC1/SLAH3 und deren Rolle beim ABA-induzierten Stomaschluß	127
4.6.2 Die kalziumaktivierte Proteinkinase CPK21: Regulationsmechanismen und subzelluläre Lokalisation	128
4.6.3 Die Abscisinsäure-regulierte Proteinphosphatase ABI1: Regulationsmechanismen und subzelluläre Lokalisation	129
4.6.4 FRAP-Experimente mit Proteinen der DRM-Fraktion.....	129
4.7 Proteininteraktionen in Membran-Nanodomänen	131
4.7.1 SLAH3/CPK21-Interaktion: mögliche Mechanismen der SLAH3-Aktivierung	133
4.7.2 CPK21/ABI1-Interaktion: mögliche Mechanismen der SLAH3-Inaktivierung.....	134
4.7.3 Mechanismen der Signalübertragung in Membrandomänen <i>in planta</i> und mögliche Aufgaben der Remorine	136
4.8 Resümee	137
 5. Zusammenfassung	138
 6. Summary	139
 7. Literaturverzeichnis	141
 8. Anhang	162
A.) Ergebnisse	162
B.) Visualisierung von Lipidphasen unterschiedlicher Ordnung in <i>Arabidopsis thaliana</i> Plasmamembranen	169

I. Ergebnisse	169
1. Einzelfärbungen	169
1.1 FM4-64	169
1.2 LRB-PE	171
1.3 DiIC's	171
1.4 DiD	172
1.5 BD-SM C ₁₂	173
1.5.1 BD-SM C ₁₂ Detergens-Resistenz	174
2. Kombinierte Färbungen	175
2.1 FM4-64 und BD-SM C ₁₂	175
2.2 LRB-PE und BD-SM C ₁₂	179
3. FRAP-Experimente mit polarisierten Protoplasten	180
4. Laurdan Färbungen	182
5. Vitalitätsnachweise	184
II. Diskussion	185
III. Resümee	191

9. Eidesstattliche Erklärung	192
---	------------

10. Curriculum Vitae	193
-----------------------------------	------------

11. Publikationen	194
--------------------------------	------------

1. Einleitung

1.1 Lipide: das Grundgerüst der Plasmamembran

Anfang der siebziger Jahre wurde von Singer und Nicolson das Flüssig-Mosaik-Modell zur Beschreibung der Architektur und Organisation biologischer Membranen aufgestellt. Dieses Modell besagt, dass Proteine und Lipide frei durch eine zweidimensionale Lipiddoppelschicht diffundieren können (Singer und Nicolson, 1972). Die Doppelschicht wird von drei Lipidklassen gebildet: Phospholipiden, Sphingolipiden und Sterolen.

Phospholipide sind den Fetten strukturell verwandt mit dem Unterschied, dass sie zwei statt drei Fettsäuren besitzen. Fette sind mit Glycerin veresterte Fettsäuren. Im Unterschied zu den Fetten ist bei den Phospholipiden die dritte Hydroxylgruppe des Glycerins mit einer negativ geladenen Phosphatgruppe verbunden. An die Phosphatgruppe wiederum können verschiedene Reste in Form kleiner geladener oder auch polarer organischer Moleküle wie beispielsweise Cholin und Serin gekoppelt sein, wodurch eine Vielzahl an Phospholipiden erzeugt werden kann. Dabei gibt der angehängte Rest, der die funktionelle Gruppe bildet, der Verbindung den Namen. Folglich bezeichnet man ein Phospholipid mit einem angehängten Cholin als Phosphatidylcholin bzw. mit angehängtem Serin als Phosphatidylserin. Weiterhin können Wasserstoff, Ethanolamin, Inositol oder Glycerin als Rest angehängt sein (vgl. Abb. 1.1). Die Fettsäureketten sind im Falle der Phospholipide typischerweise zwischen 16 (C_{16}) und 20 (C_{20}) Kohlenstoffatome lang. Dabei liegt eine Kette in einem gesättigten, die andere in einem ungesättigten Zustand vor (Mc Mullen *et al.*, 2004).

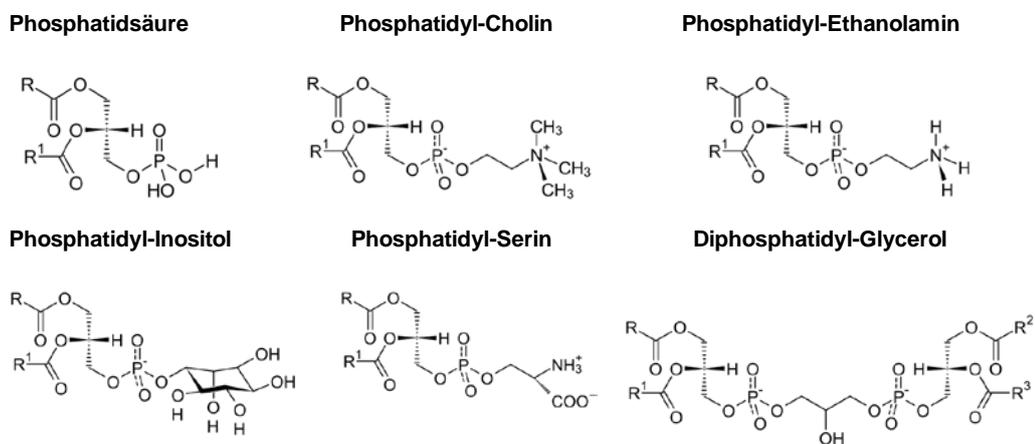


Abb. 1.1 Phospholipide der pflanzlichen Plasmamembran; R-R^x: Fettsäurereste.

Die Sphingolipide sind eine weitere Lipidklasse und leiten sich vom Sphingosin ab, einem Aminoalkohol mit einer einfach ungesättigten C₁₈-Fettsäurekette. Am Hydroxylterminus des Sphingosin Rückgrats können verschiedene Reste gebunden sein. Typischerweise sind dies Ethanolamin, Cholin oder Serin. Über eine Amid-Bindung ist dem Sphingosin eine einzelne Fettsäurekette angehängt, die meist gesättigt ist und aus bis zu 24 C-Atomen bestehen kann. Diese Struktur aus Fettsäurekette und Sphingosin wird Ceramid genannt und ist in allen Sphingolipiden als funktionelle Struktureinheit zu finden.

Wichtige Sphingolipide sind die Sphingomyeline, bei denen ein Phosphocholin oder ein Phosphoethanolamin mit dem Ceramid verestert ist, sowie die Glycosphingolipide. Bei diesen Verbindungen besteht die Kopfgruppe aus einem oder mehreren Zuckerresten. Cerebroside und Ganglioside gehören zu den Glycosphingolipiden (vgl. Abb. 1.2).

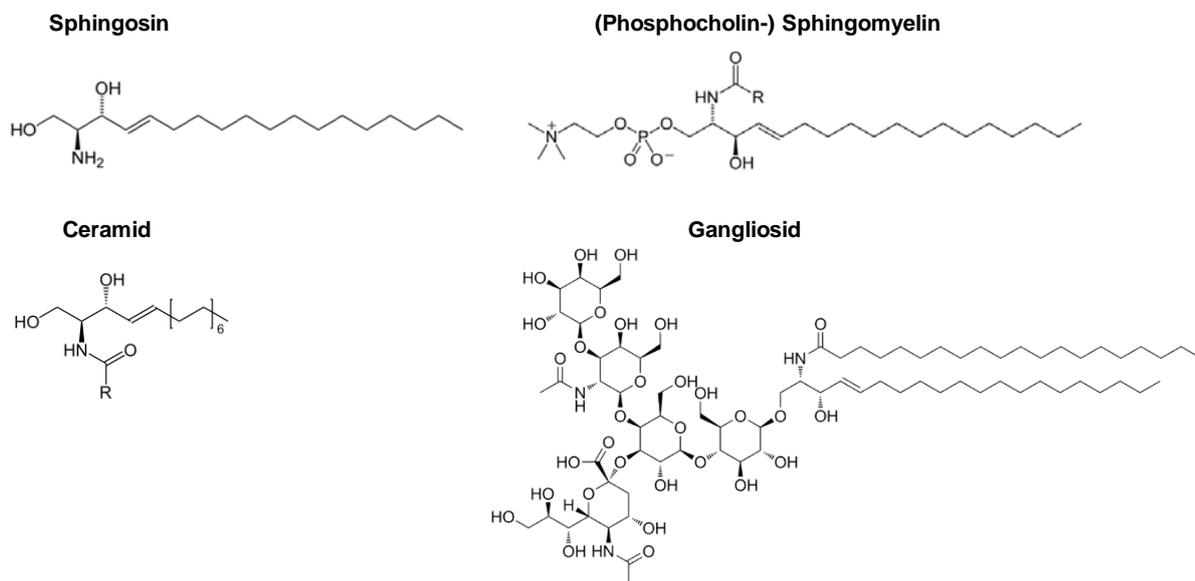


Abb. 1.2 Der Sphingosin-Baustein und darauf aufgebaute Ceramid-Verbindungen sind die struktur- und namensgebenden Bestandteile der Sphingolipide.

Membranen bestehen aus einer weiteren strukturellen Gruppe von Lipiden, den Sterolen. Diese zeichnen sich durch ein Kohlenstoffgerüst von vier miteinander verbundenen Ringen aus. Dabei unterscheiden sich die Steroide durch unterschiedliche funktionelle Gruppen, die kovalent an das Ringsystem gebunden sind. Die in Arabidopsis am häufigsten vorkommenden Sterole sind Cholesterin (Cholesterol), Sitosterol, Stigmasterol und Campesterol (Beck *et al.*, 2007). Das Campesterol ist Ausgangspunkt für die Bildung von Brassinosteroiden, die als Pflanzenhormone biologische Aktivität besitzen (Fujioka und Sakurai, 1997; Grove *et al.*, 1979; vgl. Abb. 1.3).

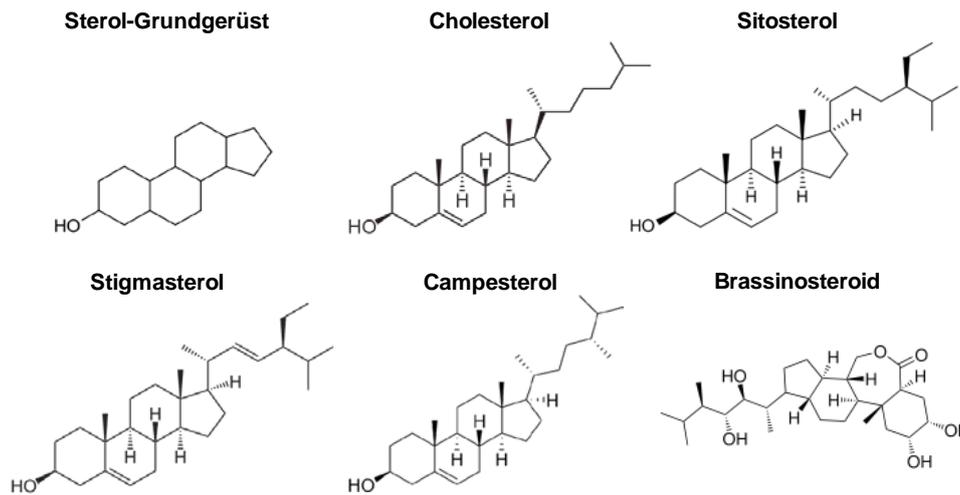


Abb. 1.3 Sterol-Grundgerüst und daraus abgeleitete Verbindungen in *Arabidopsis*.

Die relativen Lipidanteile in eukaryotischen Plasmamembranen variieren, abhängig von der Spezies und vom Zelltyp. In Vertebraten beträgt der ungefähre Cholesterinanteil aller Lipide der Plasmamembran (PM) 30-40mol%, der Anteil an Sphingolipiden ca. 10-20mol% und der Anteil an Phospholipiden 40-60mol% (van Meer, 1989). In höheren Pflanzen wie beispielsweise *Zea mays* beträgt der relative Anteil an Sterolen 40,8mol% während der Anteil an Glycolipiden bei 15,3mol% liegt. Darunter befinden sich 6,8mol% Glycosphingolipide; diese liegen in der PM in Form von Glucocerebrosiden vor. Der Anteil an Phospholipiden liegt bei 43,9mol% (Bohn *et al.*, 2001). In *Arabidopsis* hingegen liegt der Sterolanteil bei 37,7mol%, während der Anteil an Glycolipiden 15,6mol% beträgt. Von diesen 15,6mol% fallen 7,3mol% auf Glycosphingolipide wie beispielweise Cerebroside. 46,7mol% der PM besteht aus Phospholipiden (Uemura *et al.*, 1995). Vergleicht man diese Zahlen miteinander lässt sich feststellen, dass die Anteile der drei Lipidklassen an der Lipidkomposition tierischer und pflanzlicher Plasmamembranen zwar variieren; die relativen Lipidanteile weichen jedoch nicht allzu sehr voneinander ab. Um die Funktionsfähigkeit aufrecht zu erhalten, darf die Lipidzusammensetzung der PM nur in einem begrenzten Umfang und innerhalb eines bestimmten Toleranzbereiches variieren (Nakamura, 1986).

In das aus Lipiden bestehende Grundgerüst der PM sind Proteine ein- und angelagert. Zu den transmembranen (integralen) Proteinen zählen u. a. Ionenkanäle, Transporter, Transmembranrezeptoren, ATPasen und Zelladhäsionsproteine. Membranproteine, welche die PM nicht durchspannen, werden als periphere, bzw. als assoziierte Proteine bezeichnet. Periphere Membranproteine können an Transmembranproteine angelagert sein. Auch gibt es Proteine, die nur eine Hälfte der Phospholipiddoppelschicht durchspannen oder über hydrophobe Lipidanker an die PM angelagert sind. Als Lipidanker können z. B. Palmitoyl-,

Isoprenyl- oder Myristoylreste dienen, die an Cystein- bzw. Glycin-Aminosäuren angeheftet werden (Eastman *et al.*, 2006; Bijlmakers und Marsh, 2003; Farazi *et al.*, 2001). Eine weitere Art der Modifikation sind Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-Anker (Varma und Mayor, 1998). Viele Proteine der Signaltransduktion wie Kinasen und Rezeptor-gekoppelte Proteine können erst nach erfolgten Modifikationen an die PM rekrutiert werden und stehen schließlich über angehängte Lipidanker mit dieser in Verbindung (Cho und Stahelin, 2005; Podell und Gribskov, 2004). Die Membranassoziation von Proteinen nimmt insbesondere bei Signaltransduktionsprozessen eine wichtige Rolle ein, da die Proteindiffusion von drei auf zwei Dimensionen eingeschränkt wird. Dadurch werden Protein-Protein-Interaktionen sowie die Ausbildung von Multiproteinkomplexen erleichtert (Cafiso, 2005).

1.2 Das Flüssig-Mosaik-Modell und dessen Erweiterung

Auf Grundlage des Flüssig-Mosaik-Modells ging man davon aus, dass sowohl Lipide als auch Proteine frei durch die Lipiddoppelschicht diffundieren (Singer und Nicolson, 1972). Eine freie Diffusion impliziert die zufällige Verteilung von Lipiden und Proteinen in der PM. Anfang der achtziger Jahre fand man anhand Untersuchungen PM-ständiger Proteinkomplexe zunehmend Beweise dafür, dass die laterale Bewegung eines Großteils der Proteine nicht auf freier Diffusion durch eine zweidimensionale, viskose Lipiddoppelschicht beruhen kann, sondern dass die Diffusion eingeschränkt ist. Es wurde spekuliert, dass Komponenten des Zytoskeletts einen negativen Einfluss auf die freie Diffusion von Membranproteinen haben könnten (Karnovsky *et al.*, 1982).

Bezüglich der Diffusion von Lipiden wurde beobachtet, dass es in synthetisch generierten Lipid-flüssig- und Lipid-Gel-Mischungen, bedingt durch die Anordnung von ähnlich geladenen Lipiden in Clustern, zu einer Phasentrennung zwischen den eingesetzten Komponenten kommt (Wu und Mc Connell, 1975). Auch wurde gezeigt, dass dem Steroid Cholesterin bei solchen Phasensegregationsprozessen eine wichtige Rolle zu Teil wird (Recktenwald und Mc Connell, 1981). Durch die Phasentrennung erscheint die PM nicht als homogenes Gebilde. Miteinander wechselwirkende Lipide lagern sich zu Domänen zusammen und bilden kompartimentierte Membranbereiche. Diese Bereiche könnten neben Lipid-Lipid-Wechselwirkungen durch Lipid-Protein-Wechselwirkungen stabilisiert sein und die eingeschränkte laterale Diffusion PM-ständiger Proteinkomponenten durch die Lipiddoppelschicht erklären (Karnovsky *et al.*, 1982).

1.3 Funktionelle Domänen in der Plasmamembran

Eine physiologische Relevanz wurde diesen Membrandomänen von Beginn an unterstellt, konnte allerdings erst im Laufe der folgenden Jahre durch weiterführende Experimente verifiziert werden. Anhand von *in vivo* Untersuchungen zur intrazellulären Lipidsynthese und dem Trafficking (engl. „*traffic*“: Verkehr) von Lipiden aus dem Zellinneren an die PM bestätigte sich die Annahme, dass die verschiedenen Lipidspezies der zytoplasmatischen und extrazellulären Seite der Lipiddoppelschicht einer asymmetrischen lateralen Verteilung unterliegen (van Meer, 1989). Diese asymmetrische Verteilung kommt durch molekulare Wechselwirkungen zwischen den Sphingolipiden mit ihren gesättigten Kohlenstoffketten und dem Cholesterin zustande, die sich - umgeben von Phospholipiden - zu Clustern zusammenlagern. Molekulare Wechselwirkungen zwischen den Sphingoid-Basen der Sphingolipide sind dabei ein Grund für die Clusterbildung. Ziehen sich zwei Sphingoid-Basen aufgrund gegenseitiger Wechselwirkungen an, so entstehen kleine Hohlräume zwischen den zugehörigen Fettsäureresten, da die Kopfgruppen größer sind als die Fettsäurereste. Das relativ kleine Cholesterinmolekül besetzt diese Hohlräume, indem es sich zwischen zwei Fettsäurereste einlagert. Somit fungiert das Cholesterin als Platzhalter (engl. „*spacer*“) zwischen den Sphingolipiden (Simons und Ikonen, 1997).

Auf Proteinebene wurden Beweise gefunden, dass sich einzelne Rezeptoren und an der Signaltransduktion beteiligte Proteine reizspezifisch in Membrandomänen ansiedeln. Diese Domänen befinden sich sowohl auf der zytosolischen als auch auf der extrazellulären Seite der Lipiddoppelschicht. Sie beherbergen ein spezifisches Set von Lipiden und Proteinen der Signaltransduktion, wie beispielsweise funktionelle Ganglioside und Rezeptor-gekoppelte Kinasen als aktive Signalkomponenten (Lommerse *et al.*, 2004; Anderson und Jacobson, 2002; Brown und London, 2000; Jacobson und Dietrich, 1999; Edidin, 1997).

Mittlerweile gilt bezüglich der PM-Architektur als bewiesen, dass sowohl die Lipide als auch PM-ständige Proteine nicht homogen, also zufällig verteilt, in der PM vorliegen sondern organisiert in spezialisierten Kompartimenten (Coskun und Simons, 2010; Garcia-Saez und Schwille, 2010; Jacobson *et al.*, 2007; Hancock 2006; Pralle *et al.*, 2000). Diese dynamischen und innerhalb der Lipiddoppelschicht beweglichen Kompartimente wurden als „*Lipid Rafts*“ (engl. „*raft*“: Floß) bezeichnet (Simons und Ikonen, 1997; Simons und van Meer, 1988).

1.4 *Lipid Rafts*, Detergens-Resistenz und Membrandomänen

Ursprünglich diente der Begriff *Lipid Rafts* der Beschreibung von Sterol- und Sphingolipid-reichen Domänen in tierischen Plasmamembranen mit einem Durchmesser von 100-500nm, von denen man annahm, dass sie dynamische Strukturen ausbilden und durch Lipid-Lipid-Interaktionen zusammengehalten werden (Simons und Ikonen, 1997). Mit diesen *Lipid Raft*-Domänen sind spezifische Proteine assoziiert, wie beispielsweise GPI-verankerte und transmembrane Proteine (Danielsen, 1995; Brown und Rose, 1992; Skibbens *et al.*, 1989), vor allem jedoch Proteine der Signalübertragung (Simons und Eehalt, 2002; Simons und Toomre, 2000). *Lipid Rafts* unterscheiden sich aufgrund ihrer Schichtdicke von der Umgebung. Bedingt durch die langen Fettsäurereste der Sphingolipide sind diese Bereiche dicker als angrenzende Areale. Das zu Grunde liegende Phänomen der Phasentrennung der Sterole und Sphingolipide von den Phospholipiden ist im Detail noch unverstanden (Lingwood *et al.*, 2009; Hancock, 2006). Jedoch geht man davon aus, dass durch diese Trennung die freie Energie zwischen den Phasen minimiert wird (Rietveld und Simons, 1998). Der Versatz in der Hydrophobizität an den Phasengrenzen trägt zur Aufrechterhaltung separater Lipidphasen bei (Pike, 2009). Je größer die Unterschiede in der Hydrophobizität an den Phasengrenzen sind, desto größer scheinen die Domänen *in vitro* werden zu können (Garcia-Saez *et al.*, 2007). Allerdings wird deren Größe *in vivo* durch die Vielzahl an existenten Lipiden mit unterschiedlich gesättigten, unterschiedlich langen Fettsäureketten begrenzt. So wird ein fließender Übergang zwischen den Phasen geschaffen (Pike, 2009). Über Hydrophobizitätsunterschiede an den Phasengrenzen könnte möglicherweise die Größe von Raft-Domänen reguliert werden (Garcia-Saez *et al.*, 2007).

Sterole und Sphingolipide sind biochemisch dadurch charakterisiert, dass sie sich im Gegensatz zu den Phospholipiden einer Extraktion durch nicht-ionische Detergenzien bei 4°C widersetzen (Brown und Rose, 1992). Aufgrund dieser Unlösbarkeit bezeichnet man diese Fraktion als Detergens-resistente oder auch als Detergens-unlösliche Membranfraktion (engl.: „*detergent-resistant membrane*“, DRM bzw. „*detergent-insoluble, glycolipid enriched complexes*“, DIG's; London und Brown, 2000; Simons und Ikonen, 1997; Schroeder *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1973). Um die DRM-Fraktion aus einem Membranpool zu extrahieren verwendet man beispielsweise Triton X-100 oder Brij-98, wobei Brij-98 vor allem bei Isolationen tierischer DRM-Fraktionen aus Nervengewebe bzw. Viroiden eingesetzt wird, da es Extraktionen bei physiologisch relevanten Temperaturen von 37°C erlaubt (Campbell *et al.*, 2004).

Die Verfahrensweise, putative Komponenten physiologischer Membrandomänen („*Lipid Rafts*“) unter Isolation entsprechender DRM-Fraktionen zu identifizieren, ist nicht unumstritten. Zum einen könnte die Detergens-Behandlung Einfluss auf die Ausbildung Cholesterin-/Sphingomyelin-reicher Membrandomänen nehmen (Lichtenberg *et al.*, 2005; Heerklotz, 2002; London und Brown, 2000). Zum anderen konnte in Studien nachgewiesen werden, dass Lipid- und Proteinkomponenten in DRM-Isolationen - die alle aus demselben Membranpool generiert wurden, um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können - unter Verwendung verschiedenartiger Detergenzien sehr stark variierten (Schuck *et al.*, 2003). Auch sind DRM-Extraktionen stark von der vorherrschenden Temperatur abhängig; diese nimmt erheblichen Einfluss auf die Protein und Lipidzusammensetzung, da sich das Lösungsverhalten der Lipide entsprechend ändert (F. Demir, Lehrstuhl für molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, persönliche Mitteilung; Bhat und Panstruga, 2005). Zudem stammen isolierte Fraktionen nicht ausnahmslos aus der PM, da subzelluläre Membrankomponenten ebenfalls extrahiert werden (Simons und Ikonen, 1997; Sargiacomo *et al.*, 1993; Skibbens *et al.*, 1989). Physiologisch aktive *Lipid Raft*-Bereiche können daher alleine durch eine Isolation entsprechender DRM-Fraktionen bezüglich ihres Umfangs, ihrer Struktur oder ihrer Komposition nicht vollständig wiedergegeben werden (Heerklotz, 2002).

Dennoch erhält man in DRM-Präparationen aus tierischen Geweben, aus Hefen und aus Pflanzen ähnliche Lipid- sowie Proteinklassen, was für die Konsistenz der verwendeten Extraktionsmethoden mithilfe von nicht-ionischen Detergenzien spricht (Grennan, 2007). Die Detergens-Behandlung ist daher eine überaus wertvolle und die am meisten verwendete Methode, um Protein- und Lipidkomponenten in kompartimentierten PM-Bereichen biochemisch zu identifizieren (Lichtenberg *et al.*, 2005; London und Brown, 2000). Die Cholesterin-/Sphingolipid-Cluster können durch eine 30-minütige Inkubation mit Triton X-100 bei 4°C isoliert werden. Die Cluster sind im Gegensatz zu Phospholipiden unlöslich und formen DRM-Komplexe, welche sich mitsamt assoziierten und integralen Proteinen durch eine Zentrifugation in einem Saccharose-Dichtegradienten weiter aufreinigen, d. h. von anderen Detergens-löslichen Komplexen trennen, und auf diese Weise identifizieren lassen (Parton und Simons, 1995; Brown und Rose, 1992).

Detergens-Behandlungen zerstören intakte PM-Strukturen; betrachtet man DRM's unter dem Rasterelektronenmikroskop, so erscheinen diese als zusammenhängende, jedoch löchrige Strukturen, die in keiner Weise an Membrandomänen erinnern (Munro, 2003). Daher erscheint es sinnvoller, kompartimentierte PM-Bereiche über hochauflösende, bildgebende

Techniken direkt zu visualisieren, als einzelne Lipid- und Proteinkomponenten auf biochemischen Weg zu isolieren bzw. zu charakterisieren (Simons und Gerl, 2010). Zahlreiche innovative Entwicklungen im Mikroskopiesektor ermöglichten im Laufe der letzten Jahre immer höhere Auflösungen. Als Beispiel für eine revolutionäre Neuerung auf dem Gebiet der Mikroskopie sei hier die Technik der stimulierten Emission-Depletion (STED) genannt, die Superresolution bis hinein in den zweistelligen Nanometerbereich erlaubt (Hell, 2003; Klar *et al.*, 2000; Hell und Wichmann, 1994; siehe auch 2.8.4).

1.5 *Lipid Raft-Definition*

Die Existenz verschiedener Proteinsubsets, welche unterschiedliche Lösungsverhalten gegenüber nicht-ionischen Detergenzien zeigen, sowie die variierenden Größen der Domänen in den Organismen (siehe Kap. 1.10) machen eine allgemein gültige *Lipid Raft-Definition* in biochemischer und physiologischer Hinsicht schwierig. Auf einem internationalen Symposium bezüglich der subzellulären Funktion tierischer *Lipid Rafts* einigte man sich dahin gehend, dass diese Gebilde durch eine Größe zwischen 10nm und 200nm definiert sind. Dabei sind in diesen heterogenen, hochdynamischen Domänen vornehmlich Sterole und Sphingolipide angereichert. Durch diese Domänen wird eine Kompartimentierung der PM und der darin stattfindenden zellulären Prozesse erreicht (Pike, 2006).

Das Pflanzenreich betreffend gibt es bislang keine eigene offizielle Definition, doch sind die verwendeten DRM-Isolationsmethoden mit denen aus dem Tierreich identisch (Borner *et al.*, 2005; Peskan *et al.*, 2000). Hinweise auf die Existenz pflanzlicher DRM-Fraktionen wurden bereits erbracht (F. Demir, persönliche Mitteilung; Raffaele *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2005; Bhat *et al.*, 2005; Mongrand *et al.*, 2004). So wurden im Rahmen dieser Arbeit *in vivo* Lokalisationsstudien mit fluoreszenzmarkierten Proteinen aus der Arabidopsis DRM-Fraktion durchgeführt.

1.6 **Erkenntnisse aus artifiziiell hergestellten Lipidschichten und Einflüsse auf das *Lipid Raft-Konzept***

Eukaryotische Zellmembranen bestehen aus drei Lipidklassen: Glycerophospholipiden, Sphingolipiden und Cholesterin oder einem dem Cholesterin strukturell eng verwandten Sterol (Mc Mullen *et al.*, 2004). Eine Möglichkeit, die Eigenschaften verschiedener Lipidkomponenten bezüglich ihrer Anordnung und vorherrschender Lipid-Lipid-

Wechselwirkungen in Membranen zu erforschen, liegt in der Herstellung planarer Lipidschichten und artifizierlicher Vesikel, bestehend aus Mischungen der drei Lipidklassen. Aus Studien an solchen Systemen ging hervor, dass Glycerophospholipide und Sphingolipide unter Abwesenheit von Cholesterin in zwei Zuständen vorliegen können (Mc Mullen *et al.*, 2004). Bei niedrigen Temperaturen befinden sich die Lipide in der Gel-Phase (l_{β}), die Fettsäureketten sind in *all-trans*-Konformation voll ausgestreckt. Die hydrophoben Fettsäurereste liegen in einem geordneten Zustand dicht gepackt nebeneinander, wodurch starke Van-der-Waals Kräfte auftreten und die Lipide zusammenhalten: sie sind unbeweglich. Wird die Temperatur erhöht, unterliegen die Lipide einem Phasenübergang und gehen in die flüssig-kristalline Phase (l_{α}) über. Der lipidspezifische Schmelzpunkt ist überschritten, die Fettsäureketten liegen in einem weniger geordneten Zustand vor und formen lockere Strukturen. Intermolekulare Van-der-Waals Kräfte werden schwächer und mit zunehmender Temperatur zeigen die Lipide eine hohe laterale Bewegung (Silvius, 2003; Vist und Davis, 1990). Dabei besitzen langkettige Lipide aufgrund der Mehrzahl an Atomen größere Interaktionsflächen für intermolekulare Anziehungskräfte als Lipide mit kurzen Fettsäureketten, wodurch lange Fettsäureketten die laterale Lipidbeweglichkeit bei konstanter Temperatur herabsetzen. Gesättigte Fettsäuren weisen höhere Schmelztemperaturen auf als ungesättigte, da eingeführte Doppelbindungen einen „Knick“ in der Kette entstehen lassen. Dadurch bedingt können ungesättigte Fettsäuren im Vergleich zu den Gesättigten nicht so dicht aneinander gepackt werden, die intermolekularen Anziehungskräfte sind schwächer und der Schmelzpunkt bei Lipiden mit ungesättigten Fettsäuren niedriger (Rawicz *et al.*, 2000). Studien an cholesterinfreien intakten Zellmembranen ergaben, dass die Lipiddoppelschicht unter physiologischen Umständen überwiegend - wenn nicht ausschließlich - als flüssig-kristalline (l_{α})-Phase vorliegt (Mc Elhaney, 1984).

Gibt man einer aus Glycerophospholipiden und Sphingolipiden bestehenden Lipiddoppelschicht Cholesterin hinzu, bildet sich eine weitere Phase, die ein Intermediat zwischen der l_{α} - und der l_{β} -Phase darstellt. Diese wird aufgrund der dicht gepackten Lipidkomponenten als „*liquid-ordered*“ (oder „*liquid-crystalline-ordered*“; l_o)-Phase bezeichnet (Vist und Davis, 1990), während die relativ locker gepackten Lipide der flüssig-kristallinen l_{α} -Phase die „*liquid-disordered*“ (oder „*liquid-crystalline-disordered*“; l_d)-Phase bilden (Mc Mullen *et al.*, 2004). Interessanterweise können verschiedene Lipidphasen in Membranen koexistieren, abhängig von der Temperatur und von der Lipidkomposition (Ahmed *et al.*, 1997; Schroeder *et al.*, 1994). In Mischungen aus Phosphatidylcholin, Sphingomyelin und Cholesterin stellte man fest, dass die l_o -Phase angereichert war an Sphingomyelin und Cholesterin, während

die l_d -Phase überwiegend aus Phosphatidylcholin bestand (Ipsen *et al.*, 1989; Ipsen *et al.*, 1987). Dabei fördern Sterole die Ausbildung von l_o -Phasen, indem sie die Enthalpie einer Phasentransition der Lipide von der Gel- in die flüssig-kristalline Phase herabsetzen. Diese Enthalpieunterschiede verschwinden bei einem Cholesteringehalt der PM von 50mol% (Mc Mullen *et al.*, 2004). Der zu Grunde liegende Mechanismus dieser Phasentrennung ist im Detail noch unverstanden (Lingwood *et al.*, 2009; Hancock, 2006).

In Simulationsstudien über molekulare Dynamiken der Atome in Lipiddoppelschichten zeigten Lipide ab einer Cholesterinkonzentration von 30mol% Phasentransition und bildeten l_o -Phasen aus. Unterhalb dieser Konzentration waren die Lipide zufällig verteilt und zeigten andere Eigenschaften hinsichtlich ihrer Struktur und Dynamik (Zidar *et al.*, 2009). Dabei sind l_o -Phasen dicker als andere Bereiche der PM (Rinia *et al.*, 2001) und bezüglich ihres Lösungsverhaltens gegenüber nicht-ionischen Detergenzien resistenter als l_d -Phasen (Lichtenberg *et al.*, 2005). Bedingt durch den Größenunterschied zwischen l_o - und l_d -Phasen entsteht ein Versatz in der Hydrophobizität an den Phasengrenzen, welcher zur Stabilität und Aufrechterhaltung von l_o -Phasen beiträgt (Pike, 2009). Dabei ordnen sich Cholesterinmoleküle bevorzugt in der Grenzregion zwischen l_o - und l_d -Phasen an (Pandit *et al.*, 2004). Mit zunehmender Cholesterineinlagerung wird die Membran mechanisch fester; sie nimmt an Steifigkeit zu und flüssig-kristalline Phospholipid-Bereiche werden dichter aneinander gepackt. Entsprechend nimmt die laterale Diffusionsrate der Lipide mit zunehmender Cholesterineinlagerung ab (Mc Mullen *et al.*, 2004).

Die wichtigsten Stützpfeiler der *Lipid Raft*-Hypothese sind i.) die Existenz von DRM-Fraktionen in tierischen und menschlichen Zellen, ii.) die Infunktionalität biologischer Membranen nach Entfernung der Sterole, und iii.) die spezifische Organisation Raft-assoziiierter Proteine, die keiner zufälligen lateralen Verteilung in der PM unterliegen (Mc Mullen *et al.*, 2004). Biophysikalische Studien an Modellmembranen konnten die Koexistenz von l_o - und l_d -Lipidphasen belegen (Ahmed *et al.*, 1997). Es wurde gezeigt, dass l_o -Phasen resistenter gegenüber nicht-ionischen Detergenzien sind als l_d -Phasen (Lichtenberg *et al.*, 2005). In Untersuchungen an PM-Vesikeln, welche aus den Plasmamembranen kultivierter Säugetierzellen gewonnen wurden und daher ein realistisches Abbild physiologischer Membranen widerspiegeln, wurde trotz der komplexen Lipidzusammensetzung dieses Systems Phasensegregation beobachtet. Zwei koexistierende Phasen formten sich, in denen bevorzugte Assoziationen verschiedener Proteine und Fluoreszenzfarbstoffe detektiert wurden. Dabei zeigten eingesetzte Proteine und Farbstoffe ein ähnlich charakteristisches Verhalten hinsichtlich ihrer lateralen Verteilung wie in Experimenten an

Modellmembranen mit koexistierenden l_o - und l_d -Phasen (Baumgart *et al.*, 2007). Man nimmt daher für physiologische Membrandomänen *in vivo* an, dass geordnete Strukturen existieren, die ähnlich wie l_o -Phasen in Modellmembranen zusammengesetzt sein könnten (Mc Mullen *et al.*, 2004; Edidin, 2003; Pike, 2003).

1.7 Detergens-resistente Membranfraktionen in Pflanzen

Während Cholesterin und Ergosterol die dominierenden Steroide in Vertebraten und in Pilzen sind, übernehmen diese Aufgabe im Pflanzenreich die Phytosterole. Das pflanzliche Sterolprofil ist komplexer als das der übrigen Eukaryonten und besteht neben einem geringen Cholesterinanteil vor allem aus Campesterol, Stigmasterol und Sitosterol (Beck *et al.*, 2007). Die biochemische Isolation pflanzlicher DRM-Fraktionen mit Triton X-100 gelang erstmals mit Tabakblättern und lieferte Hinweise auf kompartimentierte Membranbereiche in höheren Pflanzen. In diesen Untersuchungen wurden GPI-verankerte Membranproteine detektiert (Peskan *et al.*, 2000). GPI-verankerte Proteine wurden zuvor bereits in tierischen DRM-Fraktionen gefunden (Danielsen, 1995; Sargiacomo *et al.*, 1993; Brown und Rose, 1992). Unter Verwendung nicht-ionischer Detergenzien konnten in den letzten Jahren weitere Proteinklassen in pflanzlichen DRM-Fraktionen identifiziert werden. So wurden am Membrantransport und Zellmetabolismus beteiligte Proteine wie ATPasen oder Diesterasen ebenso gefunden wie Proteine der Signalübertragung und Stressantwort, wie etwa Proteinkinasen und Phosphatasen (F. Demir, persönliche Mitteilung; Bhat *et al.*, 2005; Borner *et al.*, 2005; Mongrand *et al.*, 2004).

Auch wenn funktionelle, kompartimentierte PM-Bereiche in Pflanzen und auch in Pilzen zu existieren scheinen ist es überaus wichtig im Auge zu behalten, dass Protein- und Lipidkomponenten in diesen speziellen Arealen nicht gleichzusetzen sind mit isolierten DRM-Fraktionen und daher auch nicht als DRM's bezeichnet werden sollten. Vielmehr sollten diese funktionellen Bereiche in Pflanzen und Pilzen aufgrund ihrer Größe und lateralen Immobilität in Abgrenzung zum tierischen System als Membran-Mikrodomänen bezeichnet werden (Tanner *et al.*, 2011).

Es wird spekuliert, dass unterschiedliche Membrandomänen mit verschiedenen Protein-subsets in Eukaryonten existieren (Malinska *et al.*, 2003; Pike, 2003). In Arabidopsis gibt es Beweise dafür, dass Membranproteine in der PM polar lokalisiert sein können, wie beispielsweise die Auxin Transporter PIN2 („PIN-formed 2“, ein Auxin Efflux Carrier) und AUX1 („auxin influx transporter 1“). Diese transmembranen Proteine werden gezielt in

apikalen bzw. in apikalen und basalen Bereichen der PM gehalten, um den gerichteten Auxinfluss durch die Zelle zu gewährleisten (Swarup *et al.*, 2001; Müller *et al.*, 1998). Die in diesem Falle gezielte Verteilung von Proteinen in der PM unterliegt einem noch unbekanntem Mechanismus, für den Sterole eine tragende Rolle zu spielen scheinen. In der Steroldefizienten Arabidopsis *cpi1-1* Mutante war eine abnorme PIN2-Distribution detektierbar; der Verlust der zellulären PIN2-Polarität kam dadurch zustande, dass PIN2-Proteine vermehrt endozytiert wurden (Zappel und Panstruga, 2008; Valdez-Taubas und Pelham, 2003).

1.8 Mikrodomänen in der Plasmamembran als Signalplattformen

Hinweise auf eine reizspezifische Rekrutierung von Proteinen der Signalübertragung in distinkte PM-Domänen lieferten Untersuchungen an menschlichen Nervenzellen. Dort ist eine Untergruppe der TGF- β Rezeptor Superfamilie exprimiert („*transforming growth factor*“: transformierender Wachstumsfaktor), die GDNF-Ligandenfamilie („*glial cell line-derived neurotrophic factor*“). GFL-Faktoren („*GDNF family of ligands*“; GFL's) fungieren als Überlebens- und Entwicklungsfaktoren für Populationen von dopaminergen Neuronen (Airaksinen und Saarma, 2002). Alle Vertreter der GFL-Familie nutzen dasselbe Rezeptorsystem, die RET-Rezeptor-Tyrosinkinase („*rearranged during transfection*“, Takahashi *et al.*, 1985). Die RET-Kinase bindet spezifisch an GFL-Liganden, benötigt jedoch den GRF α 1-Korezeptor, um durch die Ligandbindung aktiviert werden zu können. Die Aufgabe des GPI-verankerten GRF α -Korezeptors ist es, RET-Kinasen in PM-ständige Signalplattformen zu rekrutieren, unter Ausbildung eines RET/GRF α /GFL-Komplexes. Ohne Ligand ist die RET-Kinase außerhalb der Signaldomänen lokalisiert. Für die Rekrutierung des RET/GRF α /GFL-Komplexes in die Domänen ist der GPI-Anker des Korezeptors essentiell (Tansey *et al.*, 2000). Die Translokation aktivierter RET-Kinasen in distinkte Membranbereiche ermöglicht Interaktionen mit weiteren Proteinen der Signalübertragung, beispielsweise mit Tyrosinkinasen der Src-Familie („*sarcoma*“). Src-Kinasen sind in Domänen auf der zytosolischen Seite der PM lokalisiert und können zahlreiche weitere Proteine wie Adhäsionsproteine, Adaptorproteine, Transkriptionsfaktoren und Signalmoleküle aktivieren (Courtneidge, 2003; Brown und Cooper, 1996). Es konnte aufgezeigt werden, dass die Lokalisation der RET-Kinase in distinkten PM-Domänen essentiell für die Effektivität der Signalweiterleitung ins Zellinnere ist. Wurde die Translokation des aktiven Kinasekomplexes in Membrandomänen durch Mutationen des GPI-Ankers unterbunden, blieb eine GDFN-vermittelte Zellantwort aus. Dies zeigte sich durch eine ungewöhnlich kurze Lebensdauer der

Zellen sowie durch abnehmende Differenzierungsereignisse, höchstwahrscheinlich bedingt durch eine gestörte „*downstream*“-Signalübertragung ins Zellinnere (Tansey *et al.*, 2000). Es konnte nachgewiesen werden, dass diese Membrandomänen essentiell für virale Krankheitserreger sind, um Komponenten in tierische Wirtszellen einzuschleusen, Virionen zusammenzubauen und virale Vesikel aus der Zelle zu transportieren. Für die Einschleusung binden Viren an Rezeptoren der extrazellulären Seite der Lipiddoppelschicht und werden durch Invaginationen der PM ins Zytosol befördert. Sowohl der *Simian Virus 40* (SV40) aus der Familie der Papillomviren als auch der Echovirus Typ1 (EV1) aus der Familie der *Picornaviridae* machen sich einen speziellen tierischen *Lipid Raft*-Typ zu Nutze, um ins Zellinnere zu gelangen: die Caveolae (Chazal und Gerlier, 2003). Diese Bereiche zeichnen sich durch das Protein Caveolin aus und sind verantwortlich für Endo- und Exozytosevorgänge an der PM (Pelkmans, 2005; Li *et al.*, 2005; Frank und Lisanti, 2004).

Analog zum tierischen System gibt es auch in Pflanzen Anhaltspunkte dafür, dass PM-Domänen Einfluss auf die zelluläre Resistenz gegenüber parasitären Organismen nehmen können, ebenso wie auf die Proliferation viraler Krankheitserreger. Der „echte Mehltau“ (*Blumeria graminis*) ist ein parasitärer Pilz, der die Blattoberfläche mit einem weißlich erscheinenden Geflecht überzieht. Dabei bildet der Pilz Haustorien mit Zellen der Epidermis aus, die ihn mit Nährstoffen versorgen. Für die Ausbildung von Haustorien muss der Pilz pflanzliche Zellmembranen durchstoßen um in die Wirtszelle einzudringen. Dies ist ein kritischer Prozess und erfordert die Anwesenheit wirtsspezifischer Proteine, wie der MLO-Proteine („*mildew resistance locus O*“; Panstruga und Schulze-Lefert, 2003; Mengaud *et al.*, 1996). Es wird angenommen, dass pathogene Proteinkomponenten die MLO-Proteine der Wirtszelle manipulieren können, um pflanzliche Abwehrmechanismen gegenüber dem Eindringling zu unterbinden. An den Eintrittsstellen des Pilzes in die Wirtszellen, den Appressorien, wird umgehend die Formation von PM-ständigen Mikrodomänen induziert. Dabei werden MLO-Proteine an den Eintrittsstellen des Pilzes akkumuliert. Diese Rekrutierung der MLO-Proteine scheint unter Ausschluss funktioneller Zytoskelettkomponenten zu erfolgen. Neben den MLO-Proteinen werden positive und negative Regulatoren der Penetrationsabwehr in die PM-Domänen rekrutiert, unter anderem auch Syntaxine. Diese Proteine integrieren sich in Membranen und wirken bei der Membranfusion mit. Der Pilz nutzt schließlich die Syntaxin-vermittelte Membranfusion, um seine Proteine in die Wirtszelle einschleusen. Zudem werden zelluläre Abwehrmechanismen durch die manipulierten MLO-Proteine unterdrückt. Daher erscheint es möglich, dass Pathogene die

Strategie entwickelt haben spezifisch funktionelle Mikrodomänen in der PM zu nutzen, um in Wirtszellen einzudringen (Bhat *et al.*, 2005).

Beim Befall mit viralen Krankheitserregern verhindert ein pflanzenspezifisches Protein die Ausbreitung des „*Potato X*“-Virus (PVX) in Tabakblättern - das Remorin Protein (Jacinto *et al.*, 1993). Das Remorin kann mit dem TGBp1-Protein („*triple gene block protein 1*“; Beck *et al.*, 1991) aus dem PVX-Virus interagieren. Durch diese Interaktion wird die interzelluläre Verbreitung des Virus über einen noch unbekanntem Mechanismus unterdrückt (Raffaele *et al.*, 2009). TGBp-Proteine ermöglichen den Transport viraler Vesikel von Zelle zu Zelle, indem sie eine Vergrößerung der Durchmesser der Plasmodesmata bewirken und so die Ausschlussgröße („*size exclusion limit*“, SEL) für Proteine und Proteinkomplexe heraufsetzen. Ohne das TGBp1-Protein können virale Vesikel aufgrund ihrer Größe nicht durch Plasmodesmata von Zelle zu Zelle gelangen (Howard *et al.*, 2004).

1.9 Etablierung eines pflanzlichen Markers für Domänen in der Plasmamembran

In tierischen Zelltypen konnten in den vergangenen Jahren verschiedene Proteine als Marker für physiologisch aktive Membrandomänen etabliert werden, wie beispielsweise die Cholera Toxin B-Untereinheit (CTXB), welche an das Raft-ständige Glycosphingolipid GM1 (Gangliosid1) bindet oder die plazentale alkalische Phosphatase (PLAP: „*placental alkaline phosphatase*“; Kenworthy *et al.*, 2004; Harder *et al.*, 1998). In Pflanzen können diese Proteine nicht als Marker eingesetzt werden. Zum einen existiert kein Analogon zur tierischen PLAP, zum anderen sind Ganglioside kein Bestandteil pflanzlicher Plasmamembranen (Cherry *et al.*, 1978).

Um Membrandomänen in lebenden Pflanzenzellen sichtbar zu machen, wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Proteinen aus der *Arabidopsis thaliana* DRM-Fraktion gearbeitet. Die Durchführung zahlreicher Expressions- und Lokalisationsstudien mit Kandidatenproteinen sollte dabei helfen, einen physiologischen Marker für funktionelle, kompartimentierte Membranbereiche zu identifizieren. Mit einem geeigneten Markerprotein könnte es möglich sein, vorherrschende Kinetiken und im besten Fall Protein-Protein-Interaktionen in diesen speziellen Bereichen *in vivo* zu studieren.

Ein solches Markerprotein wurde im *Solanum tuberosum* Remorin 1.3 (Reymond *et al.*, 1996) gefunden. Für die pflanzenspezifische Remorin-Proteinfamilie existiert kein Analogon im tierischen System (Bariola *et al.*, 2004; Reymond *et al.*, 1996). StRem 1.3 Homologe konnten in den DRM-Frakturen zahlreicher Gewebe detektiert werden; in *Nicotiana tabacum*

Blättern (Mongrand *et al.*, 2004), in Wurzeln von *Medicago trunculata* (Lefebvre *et al.*, 2007), in *Allium porrum* Keimlingen sowie in *A. thaliana* Keimlingen und Kalli (Laloi *et al.*, 2007; Bhat und Panstruga, 2005; Shahollari *et al.*, 2005). Unter Verwendung des StRemorins 1.3 sowie zweier homologer Vertreter aus Arabidopsis wurden im Verlaufe dieser Arbeit zahlreiche *in vivo* Studien an Membrandomänen durchgeführt.

1.10 Visualisierung und Größenbestimmung von Membrandomänen

In Pflanzen wurden bislang nur wenige Versuche unternommen, mögliche Kandidatenproteine aus DRM-Isolationen auf eine Funktion als physiologische Markerproteine für kompartimentierte Membranbereiche hin zu untersuchen. Zwar wurden bereits Beweise für die Existenz PM-ständiger Domänen erbracht, jedoch handelte es sich dabei um durch Appressorien induzierte Proteinakkumulationen an den Eintrittsstellen pilzartiger Parasiten in die Wirtszellen (Bhat und Panstruga, 2005). Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen bewiesen, dass induzierbare Membrandomänen in höheren Pflanzen existieren. Jedoch kann nicht davon ausgegangen werden, dass es sich bei den durch Pilzbefall induzierten Proteinakkumulationen um die gleichen Membrandomänen handelt wie bei den Remorin-markierten Domänen. Zum einen wird kein Fleckenmuster in der PM ausgebildet, zum anderen nehmen die um die Appressorien akkumulierten Proteine einen Bereich in der PM ein, der deutlich größer ist als einzelne Remorin-markierte Membrandomänen (vgl. Kap. 3.1, Abb. 1; Kap. 3.3, Abb. 7; Bhat und Panstruga, 2005).

Unter Einbeziehung der Rasterelektronenmikroskopie konnten *in vitro* distinkte Domänen in der pflanzlichen PM abgebildet werden. Als Markerprotein diente ein Remorin, das unter Verwendung immunohistochemischer Methoden angefärbt wurde. Für die Domänen wurde eine durchschnittliche Größe von 80nm angegeben, und das verwendete Remorin konnte in Expressionsstudien *in vivo* zweifelsfrei der PM zugeordnet werden. Dabei waren die Remorin-Domänen gleichmäßig über die gesamte PM verteilt (Raffaele *et al.*, 2009).

In Lokalisationsstudien mit StRem 1.3 war dieses Protein in Arabidopsis ebenfalls nicht homogen verteilt und zeigte ein Fleckenmuster (Kap. 3.1, Abb. 1); dieses könnte Domänen widerspiegeln, welche ähnliche Aufgaben innehaben wie die *Lipid Raft*-Bereiche in tierischen Plasmamembranen (Raffaele *et al.*, 2009).

Praktisch erweist es sich als schwierig, eukaryotische Raft-Bereiche größenmäßig einzuordnen. Publierte Größenangaben liegen zum Teil weit auseinander. Neben der physiologischen Situation des Organismus zum Zeitpunkt der Messung können weitere

Faktoren Einfluss auf die relative Größe der Domänen nehmen. Diese hängt sowohl vom verwendeten Gewebe, der gewählten Anfärbeprozedur und damit von der Zuverlässigkeit des Markers ab, als auch von der Einbettungstechnik und der eingesetzten Vermessungsmethode (Anderson und Jacobson, 2002).

Alle gängigen Techniken zum Abbilden und Vermessen von Strukturen im Mikro- und Nanometerbereich weisen Vor- und Nachteile auf. Mit der *Laser Scanning*-Mikroskopie beispielsweise lassen sich Strukturen *in vivo* sehr gut abbilden und vermessen, da für diese Technik fluoreszente, nicht-toxische Proteine existieren, mit denen sich Zellen und Gewebe auf molekularer Ebene problemlos markieren lassen (Zimmer, 2005; Tsien, 1998). Allerdings liegt die Auflösungsgrenze solcher Systeme bei maximal möglichen 200-250nm, unter Verwendung qualitativ hochwertiger Objektive mit hohen numerischen Aperturen (Born und Wolf, 1999). Die Auflösungsgrenze (d_{\min} ; Abb. 1.4) ist vorgegeben durch die Wellenlänge des Lichts (λ) und durch die numerische Apertur (NA) des verwendeten Objektivs. Der kleinste noch wahrnehmbare Abstand zweier benachbarter punktförmiger Objekte (d_{\min}) wird neben der verwendeten Wellenlänge begrenzt durch die Beugung des Lichtes beim Durchtritt durch optische Hindernisse wie beispielsweise (Loch-) Blenden. NA hingegen ist ein dimensionsloser Zahlenwert, der die Eigenschaft eines optischen Elements wiedergibt, einen Lichtfleck minimaler Größe in der Fokusebene abzubilden. Entsprechend errechnet sich die maximale Auflösungsgrenze für Mikroskope bei verwendetem Objektiv mit gegebener NA nach Ernst Abbe (1840-1905) zu:

$$d_{\min} = \frac{\lambda}{2 \cdot NA}$$

Abb. 1.4 Abbesche Auflösungsgrenze.

Andere Techniken ermöglichen weitaus höhere Auflösungen, wie beispielsweise die „*Photonic Force*“-Mikroskopie oder die Rasterelektronenmikroskopie (REM). Mit modernen REM-Geräten lassen sich Ultrastrukturen bis hinein in den einstelligen Nanometerbereich auflösen (Rachel *et al.*, 2010). Jedoch haben diese Techniken den großen Nachteil, dass die Proben vorher auf einen geeigneten Träger wie z. B. Glas fixiert werden müssen. Eine Fixierung lebender Gewebe und Zellen ist nur eingeschränkt möglich und stört physiologische Abläufe. Des Weiteren sind eukaryotische Zellen zu groß um als Ganzes vermessen zu werden; daher wird bei diesen Techniken meist mit Zell- und Gewebefragmenten gearbeitet (El Kirat *et al.*, 2005; Reimer, 1998).

Mit Hilfe der *Laser Scanning*-Technik lassen sich kompartimentierte Membranbereiche *in vivo* vermessen. In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* existieren Membranbereiche, in denen Ergosterol und Sphingolipide angereichert sind. In diesen Bereichen sind Proteine wie die ATPase Pma1p, die Uracil-Permease Fur4p, der H⁺-Symporter Can1p oder der Hexose-Proton-Symporter HUP1 aus der Grünalge *Chlorella kessleri* angereichert, welche aufgrund ihres biochemischen Lösungsverhaltens der DRM-Fraktion zugeordnet werden konnten (Grossmann *et al.*, 2005; Hearn *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2002; Bagnat *et al.*, 2000). Die Domänen wurden als Raft-basierte Membrankompartimente bezeichnet (Malinska *et al.*, 2003). Die Größe der Kompartimente, die von Fur4p und Can1p besetzt waren, betragen durchschnittlich 300nm (Malinska *et al.*, 2004). Die Größe der Kompartimente, welche durch heterolog exprimierte HUP1::GFP-Proteine markiert wurden, betrug ebenfalls 300nm. Dabei bildeten diese Proteine stabile Membrandomänen aus (Grossmann *et al.*, 2005; Malinska *et al.*, 2004, Malinska *et al.*, 2003).

Allerdings kolokalisieren in *Saccharomyces* nicht alle Proteine aus der DRM-Fraktion in den gleichen Domänen. *In vivo* ist die Protonen-ATPase Pma1 beispielsweise nur in Bereichen der PM angesiedelt, welche nicht durch Can1p und Fur4p besetzt sind. Somit existieren in lebenden Hefezellen mindestens zwei unterschiedliche, Raft-ähnliche Kompartimente (Malinska *et al.*, 2004, 2003; Bagnat *et al.*, 2000). Die PM von *Saccharomyces* ist sehr reich an Sterolen und Sphingolipiden und unterscheidet sich diesbezüglich von tierischen und pflanzlichen Plasmamembranen. Ergosterol ist das am häufigsten vorkommende Sterol in Hefezellen. So liegt das Ergosterol-/Phospholipid-Verhältnis in Hefe bei 3,3 (mol/ mol; Zinser *et al.*, 1991), während das Sterol-/Phospholipid-Verhältnis in tierischen und pflanzlichen Plasmamembranen um das 1,5- bis 3-fache niedriger liegt (Bohn *et al.*, 2001; Uemura *et al.* 1995; van Meer, 1989). Dementsprechend scheinen sich die Verhältnisse in *Saccharomyces* nur eingeschränkt auf pflanzliche und tierische Plasmamembranen übertragen zu lassen.

Im tierischen System wurden bislang die meisten Anstrengungen unternommen, die Größe kompartimentierter Membranbereiche zu bestimmen. Über die „*Photonic Force*“-Mikroskopie lassen sich Strukturen auflösen, die kleiner sind als 40nm (Florin *et al.*, 1997). Unter Verwendung dieser Technik wurde die Größe von Cholesterin-/Sphingolipid-reichen Raft-Domänen in lebenden tierischen Fibroblasten mit durchschnittlich 50nm Durchmesser angegeben ($r=26\pm 13\text{nm}$; Pralle *et al.*, 2000). Gemäß den Daten aus BHK-Zellkulturen („*baby hamster kidney*“) würde dies einem PM-Areal entsprechen, in dem circa 3000 Sphingolipide und 20 PM-ständige Proteine Platz hätten. Anhand LSM-gestützter Fluoreszenzpolarisations-

messungen an CHO-Zellkulturen („*chinese hamster ovary*“) wurden Raft-Größen von weniger als 70nm angegeben. In solchen Domänen hätten weniger als 50 GPI-verankerte Proteine Platz (Varma und Mayor, 1998). Aufgrund der relativ niedrigen, mathematisch ermittelten Anzahl von Proteinen in einem distinkten Membrankompartiment erscheint das Auftreten unterschiedlicher Domänen mit verschiedener Proteinzusammensetzung als sehr wahrscheinlich (Simons und Ehehalt, 2002). Im tierischen System gibt es diesbezüglich konkrete Hinweise. Der tierische CD44-Rezeptor (benannt nach einer indischen Blutgruppe) bindet Hyaluronsäure. Dies ist ein Bestandteil der extrazellulären Matrix im Bindegewebe von Wirbeltieren. Der CD44-Rezeptor ist involviert in der Zell-Zell-Kommunikation, in der Zelladhäsion und der Zellmigration. Nach DRM-Isolationen aus Epithelzellen der Maus war nur ein Teil der exprimierten CD44-Rezeptoren in der DRM-Fraktion zu finden, der andere Teil in der Detergens-löslichen Fraktion. Erst nach einer enzymatischen Zerstörung zytoskelettärer Komponenten war letztlich der Großteil der CD44-Rezeptorproteine in der DRM-Fraktion zu finden (Oliferenko *et al.*, 1999). Daher scheinen im Falle dieses Rezeptors möglicherweise zwei Arten von CD44-basierten Membrankompartimenten zu existieren. Solche, in denen Verbindungen zu Komponenten des Zytoskeletts vorliegen und solche, die keiner Assoziation mit dem Zytoskelett unterliegen (Pierini und Maxfield, 2001).

Zusätzlich zu licht- bzw. laserbasierten Detektionsmethoden wurden biochemische *in vitro* Verfahren eingesetzt, um kompartimentierte Membrandomänen zu vermessen. Unter molekularer Quervernetzung DRM-ständiger, GPI-verankerter Proteine ergaben sich in MDCK-Zellen des Hundes („*Madin-Darby canine kidney epithelial cells*“) Größen von weniger als 10nm, ermittelt anhand der Chemilumineszenz quervernetzter Proteine auf Western Blots. In diesen Nanodomänen hätten 15 GPI-verankerte Proteine Platz (Friedrichson und Kurzchalia, 1998).

1.11 Fragestellung

In dieser Arbeit sollte die subzelluläre Lokalisation von Proteinen aus der *A. thaliana* DRM-Fraktion mittels bildgebender Verfahren untersucht werden. Es sollte überprüft werden, ob sich einzelne Proteine unter physiologischen Umständen in PM-ständigen Domänen anlagern. Unter Einbeziehung der *Laser Scanning*-Methodik und verwandter fluoreszenzmikroskopischer Techniken sollten Kandidatenproteine fluoreszenzmarkiert und *in vivo* sichtbar gemacht werden. Möglicherweise könnten diese dabei helfen aufzuklären, ob pflanzliche Plasmamembranen aufgrund der Existenz einer Sterol-/Sphingolipid-reichen

Membranfraktion kompartimentiert sind und Strukturen aufweisen, die denen tierischer *Lipid Rafts* ähnlich sind.

Im Folgenden wird die subzelluläre Lokalisation diverser DRM-Proteine in lebenden Pflanzenzellen dokumentiert und Remorine werden als Marker für membranständige Domänen etabliert. Es werden erste Aussagen bezüglich der in den Domänen vorherrschenden Proteindynamik getroffen und diskutiert, ermittelt über FRAP-Ansätze (engl. „*fluorescence recovery after photobleach*“: Fluoreszenzrückkehr nach dem Ausbleichen: siehe 2.8.3). Der Einfluss von Mutationen auf die PM-Lokalisation der Remorine wird untersucht und die Größe der Domänen mittels STED-Mikroskopie (stimulierte Emission-Depletion) ermittelt. Darüber hinaus werden erste Anhaltspunkte für spezifisch stattfindende, regulatorische Protein-Protein-Interaktionen in Membrandomänen aufgezeigt und daraus resultierende, mögliche physiologische Funktionen dieser Bereiche diskutiert.

Unter Einbeziehung der STED-Mikroskopie wurde für pflanzliche Membrandomänen eine durchschnittliche Größe im hohen zweistelligen Nanometerbereich gemessen (Kap. 3.5). Diese Nanometer-Auflösung ließ sich in den *in vivo* Untersuchungen (Kap. 3.1, 3.3, 3.4, 3.6 und 3.7) nicht mehr erzielen, da für die Bildgebung die *Laser Scanning*-Methodik Anwendung fand, um Beobachtungen von Membrandomänen unter physiologischen Umständen zu ermöglichen.

2. Material & Methoden

Alle nicht näher beschriebenen Lösungen und Reagenzien sind unter 2.14 aufgeführt.

2.1 Vektoren und Klonierungsstrategien

Sämtliche Gene wurden nach der Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR; siehe 2.2) in Plasmidvektoren einkloniert. Plasmidvektoren bestehen aus spezifisch zusammengestellten DNA-Kassetten und unterscheiden sich vor allem hinsichtlich eingebrachter Resistenzen und verwendeter Promotoren. Diese steuern gewebespezifisch und spezieabhängig die Expressionsniveaus einklonierter Gene. Bei den Klonierungen fanden folgende Vektoren Verwendung (Karten siehe 2.16):

pK7WGF2	(Karimi <i>et al.</i> , 2002)
pSAT-USER	(Dr. D. Geiger, Univ. Würzburg)
pUSER039 pCambia 2300 35S N-term YN	(Dr. D. Geiger, Univ. Würzburg)
pUSER040 pCambia 2300 35S N-term YC	(Dr. D. Geiger, Univ. Würzburg)

2.1.1 pK7WGF2

Dieser Vektor ist für stabile Proteinexpressionen in Pflanzen geeignet (Karimi *et al.*, 2002; Bevan, 1984). Er verfügt über ein eGFP-Fluorophor („*enhanced green fluorescent protein*“, siehe 2.8.1.1), welches vor dem 5'-Ende der eingebrachten DNA sitzt. Auf dem Vektor ist eine Spectinomycin-Resistenz für die Selektion von Bakterienzellen sowie eine Kanamycin-Resistenz für die Selektion transformierter Pflanzen kodiert; zudem besitzt pK7WGF2 zahlreiche Schnittstellen für Restriktionsenzyme für die Einbringung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten.

Die Besonderheit dieses Vektors ist, dass die Kanamycin-Resistenz zusammen mit der eingebrachten, eGFP-markierten DNA-Sequenz in sogenannte Ti-Plasmide (engl. „*tumor inducing*“: tumorinduzierend) von Agrobakterien gebracht werden kann. Dies wird ermöglicht durch agrobakterielle DNA-Sequenzen im Vektor, die als linke und rechte Grenze bezeichnet werden. *Agrobacterium tumefaciens* kann durch das Einschleusen seines Ti-Plasmides die tumorinduzierenden Gene zusammen mit der eingebrachten DNA stabil ins Genom integrieren und auf diese Weise Pflanzenzellen stabil transformieren (Valvekens *et al.*, 1988;

siehe 2.5). Beim pK7WGF2-Vektor steht eingebrachte DNA zusammen mit vorgeschaltetem eGFP unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors aus dem Blumenkohlmosaikvirus (engl.: „*cauliflower mosaic virus*“, CaMV; siehe Vektorkarte, 2.16).

2.1.2 USER-Klonierungen

Ein Großteil der DNA-Fragmente wurde über die USER-Klonierungsstrategie in Vektoren eingebracht (USER, engl. „*uracil-specific excision reagent*“: Uracil-spezifisches Excisions-Reagent; Nour-Eldin *et al.*, 2006; siehe Tab.1). Die USER-Klonierung basiert auf der Erzeugung von komplementären, acht Nukleotide langen Überhängen an den 3'-Enden der zu hybridisierenden DNA-Fragmente, mit anschließender Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen 3'- und 5'-Ende. Dabei werden die Überhänge des Inserts bzw. des PCR-Produktes durch Einbau eines Uracils am 3'-Ende generiert, welches in der Primersequenz bereits enthalten sein muss (siehe 2.2.3 und 2.15). Um das Insert mit den uracilhaltigen Primern in einer Polymerase-Kettenreaktion zu amplifizieren, wurde die Uracil-kompatible PfuCx-Polymerase (Stratagene; siehe 2.2.1 ff) benutzt. Uracil wird in der USER-Reaktion durch DNA-Glycolysen entfernt und der charakteristische Überhang von acht Nukleotiden entsteht. Die Überhänge in den USER-Vektoren wurden durch einen Restriktionsverdau der USER-Kassette mit PacI und Nt.BbvCI (New England Biolabs) erzeugt (siehe Tab. 2). Die USER-Kassette mit den Schnittstellen für PacI und Nt.BbvCI kann durch Anwendung herkömmlicher Klonierungsmethoden in beliebige Ausgangsvektoren gebracht werden.

linearisierter Vektor (PacI/Nt.BbvC)	2,0 µl
PCR-Produkt (aufgereinigt)	7,0 µl
USER-Enzym	1,0 µl
TE-Puffer	5,0 µl
Gesamtvolumen	15,0 µl

Tab. 1 USER-Klonierungsansatz für DNA-Fragmente.

Damit die USER-Reaktion stattfinden konnte, musste der Ansatz für 25 Minuten bei 37°C, dann für weitere 25 Minuten bei 25°C inkubiert werden. Dies geschah in den PCR-Cyclern *Mastercycler personal* (Eppendorf) und *Primus 96plus* (MWG Biotech) mit Deckelheizung (100°C).

Plasmid-DNA		10 µg
PacI	(Tag 1)	70 Units
Nt.BbvCI	(Tag 2)	40 Units

Tab. 2 Restriktionsverdau der USER-Vektoren mit PacI und Nt.BbvCI.

Der PacI-Verdau wurde zunächst über Nacht bei 37°C inkubiert, am nächsten Tag mit Nt.BbvCI versetzt und für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert (Nour-Eldin *et al.*, 2006). Danach wurde die linearisierte Plasmid-DNA aufgereinigt (siehe 2.2.4) und in Bakterien transformiert (siehe 2.3).

2.1.2.1 pSAT-USER

Die pSAT-USER-Vektoren sind geeignet für transiente Proteinexpressionen in Pflanzen. Sie besitzen neben einer Ampicillinresistenz das 5'- und das 3'-USER-Tail (engl. „tail“: hinteres Ende, Schweif; Nour-Eldin *et al.*, 2006). Einklonierte Inserts stehen unter CaMV 35S Kontrolle. In den pSAT-USER-Vektoren sitzen diverse Reporterproteine wie eGFP, dsRed2, oder YFP (grün, rot, gelb fluoreszierende Proteine, siehe 2.8.1). Abhängig vom Vektor sitzen diese jeweils vor dem 5'- bzw. hinter dem 3'-Ende des eingebrachten PCR-Fragments, bzw. auf Proteinebene am N- bzw. am C-terminalen Ende (siehe Vektorkarten, 2.16). Die Reporterproteine sind so angeordnet, dass sie im gleichen Leseraster wie das Insert liegen. Auf diese Weise entstehen Fusionsproteine zwischen Reporter und Insert. Alle pSAT-USER-Vektoren wurden von Dr. D. Geiger, Lehrstuhl für molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, bereitgestellt.

- a) pSAT1396-USER: N-terminales eGFP
- b) pSAT1564-USER: C-terminales eGFP
- c) pSAT1450-USER: N-terminales dsRed2
- d) pSAT2244-USER: C-terminales dsRed2

2.1.2.2 pUSER039 pCambia 2300 35S N-term YN

Bei diesem Vektor steht das Insert unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors. Das für USER-Vektoren charakteristische 3'-und 5'-USER-Tail für die Einbringung des Inserts wird „Upstream“ von diversen Restriktionsschnittstellen flankiert. Der Vektor besitzt eine

Kanamycin-Resistenz und ist über seine N-terminale YFP-Hälfte Venus 1-155 (siehe 2.16) zusammen mit dem pUSER40 pCambia 2300 35S N-term YC Vektor für BiFC-Versuche (siehe 2.8.2) geeignet.

2.1.2.3 pUSER040 pCambia 2300 35S N-term YC

Dieser Vektor ist aufgebaut wie der pUSER039 pCambia 2300 35S N-term YN und besitzt den komplementären C-Terminus des YFP, Venus 156-239. Nach Einbringung der Inserts sind die YFP-Hälften an den N-Termini der Fusionsproteine lokalisiert.

2.2 Die Polymerase-Kettenreaktion („*polymerase chain reaction*“, PCR)

Die PCR-Reaktion (Mullis *et al.*, 1986) dient der *in vitro*-Amplifikation von DNA-Fragmenten definierter Länge. Hierzu mussten geeignete *sense*- und *antisense*-Primer generiert werden, die zu bekannten DNA-Sequenzabschnitten komplementär waren (engl. „*sense*“: Sinn; engl. „*primer*“: der erste; siehe 2.2.3 und 2.15). Die Primerlänge betrug im Durchschnitt 25 bis 30 Basenpaare. Die sequenzspezifisch generierten Primerpaare hybridisierten bei definierten Temperaturen mit komplementären DNA-Abschnitten. Voraussetzung für die Primerbindung war eine vorhergehende Denaturierung der DNA-Doppelstränge zu Einzelsträngen. *Taq*-Polymerasen benötigen kurze, doppelsträngige Bereiche um mit der Synthese des komplementären Stranges beginnen zu können. Dabei wird ausgehend von den kurzen Primer-DNA-Doppelsträngen ein zum Matrizenstrang komplementärer Strang in 5'-3'-Richtung synthetisiert.

2.2.1 DNA-Polymerasen

Es wurden mehrere hitzestabile Polymerasen eingesetzt, die allesamt Korrektur-Aktivität besaßen, das sog. „*proofreading*“ (engl. „*proof*“: prüfen; engl. „*read*“: lesen). *Proofreading*-Polymerasen bestehen aus zwei funktionellen Untereinheiten, einem Klenow-Fragment einer thermostabilen *Taq*-Polymerase aus *Thermicus aquaticus* ohne 5'>3'-Exonuclease-Aktivität und einer DNA-Polymerase mit 3'>5'-*Proofreading*-Aktivität (Deep Vent_R DNA-Polymerase, Clontech). Dadurch sind diese Polymerasen in der Lage, falsch eingebaute Basen im *de novo*-Strang gegenüber der Wildtyp-Basensequenz zu erkennen, herauszuschneiden und durch die korrekten Basen zu ersetzen. Die Fehlerquote bei Amplifizierungsreaktionen ist entsprechend niedrig.

Für Klonierungen wurde die BD Advantage 2-Polymerase (Clontech) eingesetzt, sowie die Uracil-kompatible Pfu-TurboTM CxHotstart DNA-Polymerase (Stratagene) für USER-Klonierungen (siehe 2.1.2). Die BD Advantage 2-Polymerase besitzt eine matrizen-unabhängige, terminale Transferaseaktivität (Clark, 1988). An den 3'-Enden des DNA-Doppelstranges wird je ein einzelnes Nukleotid - vorzugsweise ein Adenin - angefügt, wodurch eine anschließende TA-Klonierung des PCR-Produktes mit einzelnen Thymidin-Überhängen an den 5'-Enden möglich ist (Zhou und Gomez-Sanchez, 2000).

2.2.1.1 Standardreaktionsansatz für die BD Advantage 2-Polymerase

PCR-Reaktionen wurden in folgenden Thermocyclern durchgeführt: *Mastercycler personal* (Eppendorf) und *Primus 96plus* (MWG Biotech).

DNA	(5-15 ng)	2,0 µl
dNTP's	(10 mM)	1,0 µl
<i> fwd</i> -Primer	(100 µM)	0,5 µl
<i> rev</i> -Primer	(100 µM)	0,5 µl
BD Adv. Puffer	(10x konz.)	5,0 µl
BD Adv. Polymerase	(5U/µl)	1,0 µl
H ₂ O		40,0 µl
Gesamtvolumen		50,0 µl

Tab. 3 PCR-Ansatz für die BD Advantage 2-Polymerase.

Bei einer Elongationstemperatur von 68°C lag die Synthesegeschwindigkeit nach Herstellerangaben bei ca. 1000 Bp/min.

2.2.1.2 Standardansatz für die PfuCx-Polymerase

Die PfuCx-Polymerase (Stratagene) aus *Pyrococcus furiosus* besitzt *Proofreading*-Aktivität und wurde ausschließlich für die Amplifikation von Genen verwendet, die über die USER-Klonierungsstrategie (2.1.2) stabil in Expressionsvektoren gebracht werden sollten (siehe Tab. 4).

DNA-Template	(5-15 ng)	2,0 µl
dNTP's	(10 mM)	1,0 µl
<i> fwd </i> USER-Primer	(100 µM)	0,5 µl
<i> rev </i> USER-Primer	(100 µM)	0,5 µl
PfuCx Puffer	(10x konz.)	5,0 µl
PfuCx <i> Taq </i> -Polymerase	(5U/µl)	1,0 µl
H ₂ O		40,0 µl
Gesamtvolumen		50,0 µl

Tab. 4 PfuCx-Polymerase Standardansatz.

Die Elongationstemperatur lag nach Herstellerangaben bei 72°C, die Elongationsgeschwindigkeit um die 1000 Bp/min.

2.2.2 PCR-Standardprogramm

Das Thermocycler Standardprogramm wurde für verschiedene DNA-Templates individuell angepasst. Dabei mussten neben den Primer-Hybridisierungstemperaturen (den sog. „*annealing*“-Temperaturen; engl. „*annealing*“: annähern) auch die Elongationszeiten variiert werden. Für ein DNA-Template von tausend Basenpaaren wurde dabei eine Elongationszeit von einer Minute veranschlagt.

PCR-Standardprogramm für DNA-Polymerasen

Zyklus			
1	initiale Denaturierung	95°C	180sec
2 bis 40	Denaturierung	95°C	40sec
	Annealing	50-60°C (Primer-spezif.)	40sec
	Elongation	68-72°C (<i>Taq</i> -spezif.)	1000 Bp/min

Tab. 5 Standardprogramm Thermocycler.

2.2.3 Primerdesign

Beim Generieren von Primerpaaren wurden Computerprogramme zur Berechnung der Schmelztemperaturen und zur Bestimmung der Bindungsenergien verwendet. Für USER-basierte Klonierungen (2.1.2) mussten charakteristische Überhänge an die sequenzspezifischen Primer gehängt werden. Die Basensequenz der Überhänge war 5'-GGCTTAAU-Startcodon-3' für alle *forward*-Primer (engl. „*forward*“: vorwärts) und 5'-GGTTTAAU-Stopcodon-3' für alle *reverse*-Primer (engl. „*reverse*“: rückwärts; Nour-Eldin *et al.*, 2006; siehe auch 2.15). Des Weiteren wurde darauf geachtet, dass die Schmelztemperatur der Primerpaare um mindestens 10% unter der Elongationstemperatur der verwendeten DNA-Polymerase lag. Um eine hohe Stringenz der Primer gegenüber dem DNA-Template zu erzielen, wurden die Primerpaare wenn immer möglich so generiert, dass entweder ein Guanin oder ein Cytosin das 3'-Ende des Primers abschloss. Aufgrund der drei Wasserstoffbrücken zwischen GC-Nucleotiden sind diese thermisch stabiler als Adenin-Thymidin-Paarungen, die zwei Wasserstoffbrücken miteinander ausbilden.

2.2.4 Aufreinigung von PCR-Produkten

Aufreinigungen von PCR-Produkten beruhen wie DNA-Elutionen aus Agarosegelen (2.3.8) auf der reversiblen Bindung der DNA an eine Matrix. Durch diverse Waschschrte wurden Salze, Ionen und Proteine aus dem Ansatz entfernt. Alle PCR-Aufreinigungen erfolgten mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben.

2.3 Transformation von Bakterienstämmen inkl. Verfahren mit DNA

Escherichia coli (E-coli)

Um DNA-Fragmente gezielt zu vermehren, wurde mit Bakterienstämmen gearbeitet. Bakterien vermehren in Vektoren eingebrachte DNA-Konstrukte aufgrund ihrer schnellen Generationsdauer von ca. 20 Minuten sehr stark über Nacht und sind leicht zu kultivieren. In dieser Arbeit wurden sowohl *XLI-blue MRF'* ($\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI}^{\text{q}}\Delta\text{M15 Tn10 (Tet}^{\text{r}}\text{)]}$), Stratagene) als auch *DH5alpha*-Bakterienstämme (*fhuA2* $\Delta(\text{argF-lacZ})\text{U169 phoA glnV44 } \Phi 80 \Delta(\text{lacZ})\text{M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17}$, Invitrogen) benutzt. Beide Stämme stellen Abkömmlinge des *Escherichia coli* Stammes *K12* dar (Lederberg, 1998). Zur

Einbringung genetischen Materials dienten zwei Methoden. Die chemische Transformation via Hitzeschock bei 42°C (2.3.1) sowie die Elektroporation (2.3.2; Neumann *et al.*, 1982).

Agrobacterium tumefaciens

Für die stabile Transformation von Pflanzen wurde der *A. tumefaciens* Stamm *GV3101* benutzt (Bechtold *et al.*, 1993). Die Einschleusung genetischen Materials erfolgte über Elektroporation (2.3.2).

2.3.1 Transformation via Hitzeschock

Bakterienstämme wurden für die Aufnahme von Fremd-DNA chemisch kompetent gemacht (nach Chung *et al.*, 1989) und standen für Transformationen zur Verfügung.

Es wurden stets Plasmidvektoren in Bakterien eingebracht. Hierzu wurden Bakterienaliquots (je 40µl) mit 50 bis 500ng Vektor-DNA versetzt. Die bei -80°C gelagerten Stämme wurden hierfür auf Eis aufgetaut, um einer Regeneration der geschädigten Bakterienzellwand vorzubeugen. Die Vektor-Insert-Konstrukte wurden zu den Bakterienaliquots gegeben und für 10 bis 30 Minuten im Eisbad inkubiert, um eine Diffusion der zugegebenen DNA durch die Bakterienzellwand ins Zytosol zu ermöglichen. Dann wurden die Bakterien für 45 Sekunden einer Temperatur von 42°C ausgesetzt, um die Zellteilung anzuregen. Nach dem Hitzeschock wurden die Bakterienstämme für weitere fünf Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde 450µl SOC-Medium zugegeben (siehe 2.14), das mit 0,4% Glucose (w/v) sehr nährstoffreich war und dafür sorgte, dass die Bakterien schnell regenerierten und sich erneut teilten. Die Transformationsansätze wurden eine Stunde bei 37°C geschüttelt (Thermomixer 5436, Eppendorf) und auf antibiotikahaltige Agarplatten ausplattiert (siehe 2.14). Über Nacht wurden die Bakterien bei 37°C im Wärmeschrank (Inkubator INB, Memmert) inkubiert.

2.3.2 Elektroporation

Die Fremd-DNA wird bei dieser Methode durch eine kurzzeitig angelegte Spannung elektrophoretisch in Bakterienzellen gebracht (Neumann *et al.*, 1982). Hierzu wurden den Bakterienaliquots 100 bis 500ng des DNA-Konstruktes zugegeben und die Ansätze gut durchmischt. Nach dem Überführen der Ansätze in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (2mm, Eppendorf) wurde kurzzeitig eine Spannung von 2500 Volt (*E-coli*), bzw. 1700 Volt (*A. tumefaciens*) angelegt (Elektroporator 2510, Eppendorf), um die negativ geladenen DNA-Moleküle in die Bakterienzellen zu befördern. Nach dem Spannungspuls wurde den Ansätzen 500µl SOC-Medium zugegeben und diese für eine Stunde bei 37°C (*E-colis*), bzw. 28°C

(*A. tumefaciens*) geschüttelt (Thermomixer 5436, Eppendorf). Ausplattieren und Inkubation der Bakterien erfolgte auf antibiotikahaltigen LB- (*E-coli*), bzw. YEB-Agarplatten (*A. tumefaciens*; siehe 2.14).

2.3.3 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien (Miniprep)

Die Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterien beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen (Birboim und Doly, 1979). Zunächst wurden Bakterienkolonien über Nacht auf antibiotikahaltigen Agarplatten angezogen. Dann wurden einzelne Kolonien von den Agarplatten in 15ml FalconTM Tubes (Sarstedt) mit drei bis vier Milliliter antibiotikahaltigem LB-Nährmedium überführt (siehe 2.14) und für 24 Stunden unter ständigem Schütteln bei 37°C inkubiert (Incubator Shaker, New Brunswick Scientific). Danach wurden ca. 1,2ml der Bakteriensuspension in ein 1,5ml Reaktionsgefäß (E-Cup, Eppendorf) überführt und für 30 Sekunden bei 12500g zentrifugiert (Modell 5415D, Eppendorf). Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das sedimentierte Pellet wurde resuspendiert und 300µl TENS/RNase-Lysispuffer zugegeben (siehe 2.14). Nach 2- bis 5-minütiger Inkubationszeit wurden 50µl 3M Natriumacetat-Lösung (NaAc) hinzugegeben, die Lösung gut durchmischt und bei 12500g für vier Minuten zentrifugiert, um die mit der NaAc-Lösung ausgefällten Proteine und Lipide zu pelletieren. Der DNA-haltige Überstand wurde in 600µl Isopropanol überführt, durchmischt und erneut zentrifugiert (5min; 12500g), um die DNA zu pelletieren. Nach entfernen des Überstandes wurden 500µl 70%-igen Ethanol zugegeben und zwei Minuten bei 12500g zentrifugiert, um die DNA zu waschen. Nach Entfernung des Ethanol wurde das Pellet bei 37°C getrocknet und anschließend in 30µl TE-Puffer (siehe 2.14) oder in sterilem Wasser aufgenommen.

2.3.4 Aufreinigungssysteme für Plasmid-DNA

Waren große Ausgangsmengen an Plasmid-DNA mit hohem Reinheitsgrad erforderlich, wurden DNA-Isolationen aus Bakterien mit den *Wizard Plus Midi-Prep*-System (Promega) oder dem *Plasmid-Midi-Kit*-System (Qiagen) durchgeführt. Die DNA wurde nach Herstellerangaben unter Verwendung einer Vakuumpumpe (Modell Laboport, KNF Neuberger) isoliert und in sterilem Wasser oder alternativ in TE-Puffer (siehe 2.14) aufgenommen.

2.3.5 Ligationen mittels T4 DNA-Ligase

Das Enzym T4 Ligase (Fermentas) katalysiert unter ATP-Verbrauch die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-Hydroxylgruppe eines DNA-Fragmentes und der 5'-Phosphatgruppe eines Anderen. Dadurch können zwei DNA-Enden oder auch mehrere DNA-Fragmente unter Ausbildung kovalenter Bindungen miteinander verknüpft werden.

T4 DNA-Ligase Puffer	(10x konz.)	2,0 µl
T4 DNA-Ligase	(1U, Fermentas)	1,0 µl
Vektor-DNA	(0,1-0,3ng/µl)	1,0 µl
Insert-DNA	(0,1-1µg)	16,0 µl
Gesamtvolumen		20,0 µl

Tab. 6 Ligationsansatz für DNA-Fragmente.

Der Ligationsansatz wurde bei 16°C über Nacht inkubiert. Wenn weniger als die maximale Menge an Insert-DNA (16µl) zugegeben wurde, wurde mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Für die Bakterientransformation wurden je 3µl entnommen und entsprechende Stämme transformiert (siehe 2.3).

2.3.6 Schneiden der DNA mit Restriktionsenzymen

Der Restriktionsverdau beruht auf der Eigenschaft der Restriktionsenzyme, doppelsträngige DNA an einer sequenzspezifischen Basenfolge zu spalten. Erkennt das Enzym eine spezielle, palindromische Basenfolge wird innerhalb dieser Sequenz in jedem Strang die spezifische kovalente Phosphodiesterbindung aufgebrochen. Die verwendeten Restriktionsenzyme der Klasse II erkennen Palindrome zwischen vier und acht Nukleotiden Länge.

DNA		2,0 µl
Enzym	(10 U/µl)	0,2 µl
Enzympuffer	(10x konz.)	1,0 µl
H ₂ O		6,8 µl
Gesamtvolumen		10,0 µl

Tab. 7 Ansatz für den Restriktionsverdau.

Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 37°C.

2.3.7 Elektrophoretische Auftrennung der DNA

Die Gelelektrophorese beruht auf der Auftrennung der negativ geladenen DNA im elektrischen Feld, bei einer angelegten Spannung von 65 bis 100 Volt. Vor der Auftragung auf das Agarosegel wurde die DNA mit fünffach konzentriertem DNA-Gelladungspuffer (TRIS-Borat-EDTA-Puffer, TBE) versetzt. Als Laufpuffer wurde einfach konzentriertes TBE benutzt (siehe 2.14). Als Größenstandard diente eine mit dem Enzym PstI restriktionsverdaute Lambda-Phagen-DNA (Fermentas). Um DNA in der Agarosematrix sichtbar zu machen, wurde der noch flüssigen Agarose/TBE-Lösung 1‰ Ethidiumbromid (EtBr, Roth) zugegeben. EtBr fluoresziert bei Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 260 bis 360nm. Nach Interkalation zwischen die Basenstapel doppelsträngiger DNA steigt die Fluoreszenz erheblich an und macht DNA in Agarosegelen sichtbar.

2.3.8 DNA-Elution aus Agarosegelen

Elutionen aus Agarosegelen beruhen auf der reversiblen Bindung der DNA an eine Matrix. Zunächst wurde die Bande gesuchter Größe aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe chaotroper Salze aus dem Gel gelöst. An die Matrix gebunden ließ sich die DNA mit Lösungen verschiedener Ionenkonzentration und Polarität waschen und schließlich mit reinem Wasser von der Matrix ablösen. Sämtliche DNA-Elutionen wurden mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.3.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels UV-Spektrometrie

Die Konzentration an Ribonukleinsäuren wurde mittels UV-Photospektrometrie ermittelt. Das dabei verwendete Gerät (*Gene Quant Pro Spectrometer*, Amersham Biosciences) misst die Absorption bei Licht der Wellenlängen 260nm und 280nm (dies entspricht den Absorptionsmaxima von Nukleinsäuren bzw. Proteinen). Der Quotient der Extinktion von 260nm zu 280nm (E₂₆₀/E₂₈₀) gibt Aufschluss über Proteinverunreinigungen. Bei einer reinen Nukleinsäure ist der Wert des Quotienten 2, da bei 280nm die halbmaximale Absorption des 260nm-Wertes erreicht ist. Nach DNA-Aufreinigungen wurden maximale Quotienten von 1,8 bis 2 erzielt.

2.3.10 Restriktionsanalyse

Um zu überprüfen ob Bakterientransformationen erfolgreich verlaufen sind, wurden DNA-Plasmide aus Übernachtskulturen isoliert (2.3.3) und aufgereinigt (2.3.4). Dann wurden die Plasmide mit geeigneten Restriktionsenzymen (2.3.6) verdaut. Die Verdauung erlaubte Aussagen bezüglich erfolgreicher Klonierungen und Transformationen. In den Restriktionsanalysen wurden je zwei Mikroliter der isolierten Plasmid-DNA eingesetzt.

2.4 Sequenzierungen und Sequenzanalyse

Alle Sequenzierungen wurden von Frau M. Papenfuß und Frau B. Neumann (technische Assistentinnen am Lehrstuhl für molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik der Universität Würzburg) durchgeführt. Die Sequenzierungsreaktionen beruhten auf der Didesoxy-Methode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) und wurden mit einem 3100 Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Rohdaten wurden mit der *DNA Sequencing Analysis SoftwareTM V5.1* (Applied Biosystems) ausgewertet.

2.5 Pflanzentransformationen

Um pflanzliche Zellen zu transformieren wurden zwei Methoden benutzt. Um stabile Arabidopsis-Linien herzustellen wurden Agrobakterien der Gattung *tumefaciens* verwendet (siehe 2.5.1). Die Herstellung transgener Pflanzenlinien erfordert einen hohen Materialaufwand und circa sechs bis acht Monate Zeit (Clough und Bent, 1998). Die transiente Transformation hingegen erfolgt über Nacht. Hierbei bedient man sich einer ballistischen Methode, um DNA in pflanzliche Gewebe zu bringen (Vain *et al.*, 1993; siehe 2.5.3).

2.5.1 Stabile Pflanzentransformationen mittels *Agrobacterium tumefaciens*

Arabidopsis Pflanzen wurden bis zur Ausbildung von Infloreszenzen unter stabilen Gewächshausbedingungen (12 Stunden Licht, 12 Stunden Dunkelheit) hochgezogen. Ebenso wurden *Agrobacterium tumefaciens* Stämme selektiert und angezogen, die gewünschtes DNA-Insert in einem geeigneten binären Expressionsvektor wie beispielsweise dem pK7WGF2-Vektor (siehe 2.16) enthielten. Nach Anzucht selektierter Flüssigkulturen in YEB-Medium mit entsprechenden Antibiotika (2.14) wurden einzelne Agrobaktériensuspensionen nach ein bis zwei Tagen Wachstum bei 28°C unter ständigem Schütteln in einem Inkubator

(Innova 4213, New Brunswick Scientific) durch Zentrifugation pelletiert, in einer 5%-igen Saccharose-YEB-Lösung resuspendiert und auf eine optische Dichte (OD_{600}) von 0,8 eingestellt. Für jeden Transformationsansatz wurden ca. 100ml dieser Suspension hergestellt. Bevor die Agrobakterien mit den Pflanzen in Berührung gebracht wurden, wurde der verdünnten Suspension bei eingestellter OD Silwet L-77 (0,05%, 500 μ l/l; Lehle Seeds) zugegeben. Die Infloreszenzen wurden drei bis fünf Mal für einige Sekunden in die verdünnte Silwet L-77-Agrobaktériensuspension getaucht. Anschließend wurden die Pflanzen bei gemäßigten Lichtverhältnissen (kein direktes Sonnenlicht) und hoher Luftfeuchtigkeit für 16 bis 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert (modifiziertes Protokoll nach Clough und Bent, 1998). Die Pflanzen wurden zur Blüte gebracht, die Samen geerntet, sterilisiert (2.5.2) und auf antibiotikahaltige MS-Platten ausgesät (siehe 2.14). Stabile Transformanten wurden selektiert und nach acht bis zehn Wochen Wachstum von den MS-Platten auf Erde umgesetzt. Die Anzucht der Pflanzen bis zur Samenbildung erfolgte ohne weitere Zugabe von Antibiotika.

2.5.2 Samensterilisation

Die Samen wurden in ein E-Cups gegeben, mit 1,5ml EtOH (98%) überschichtet und für 20 Minuten im Überkopfschüttler (RM-Multi 1, Starlab) inkubiert. Nach kurzer Wartezeit sedimentierten die Samen und der Überstand konnte mit einer Pipette (Pipetman, Abimed) abgenommen werden. Nun wurde den Samen eine 5%-ige Natriumhypochlorid (NaOCl)-Lösung zugegeben, sowie ein Tropfen Triton X-100 (Applichem), und die Mischung für weitere 15 Minuten im Überkopfschüttler inkubiert. Nach erneuter Sedimentation der Samen wurde der Triton-NaOCl-Überstand unter einer Sterilbank abgenommen und die Samen fünf bis sechs Mal mit je 1ml sterilem Wasser gewaschen. Nach den Waschrufen wurden die Samen entweder direkt in geeignete, mit sterilem MS-Agar gefüllte Behältnisse gegeben (siehe 2.14) oder auf sterilem Papier getrocknet und aufbewahrt.

2.5.3 Transiente Pflanzentransformationen mittels „*Particle Inflow Gun*“

Bei der transienten Transformation von Pflanzenzellen mit der „*Particle Inflow Gun*“ (dt.: Partikelschießgewehr, Eigenkonstruktion) beschießt man lebendes pflanzliches Gewebe in einem Vakuum mit DNA-beladenen Wolframpartikeln, nach einem modifiziertem Protokoll von Vain *et al.*, 1993. Als kinetische Triebfeder dient eine unter Druck stehende Heliumgasflasche, die über ein elektrisch auslösbares Ventil (untere Abb. 2.1, 1) mit der Vakuumkammer in Verbindung steht. Direkt an das Ventil angrenzend befindet sich in der

Kammer eine Kartusche, die mit DNA-beschichteten Wolframpartikeln beladen wird (2). Sobald das Ventil geöffnet wird, trifft das Heliumgas mit einem Druck von 8 bis 9bar auf das in der Kartusche befindliche Wolfram und beschleunigt die Partikel. Diese treffen letztlich auf die darunter liegende Probe (3). Gelangen die Wolframpartikel in den Zellkern, kann die eingebrachte DNA von der zellinternen Genexpressionsmaschinerie exprimiert werden. Nach Inkubation der beschossenen Gewebe für 10 bis 14 Stunden in mit Wasser gefüllten Petrischalen bei Dunkelheit waren adulte Proteine in transformierten Zellen über fusionierte Reporterproteine detektierbar.

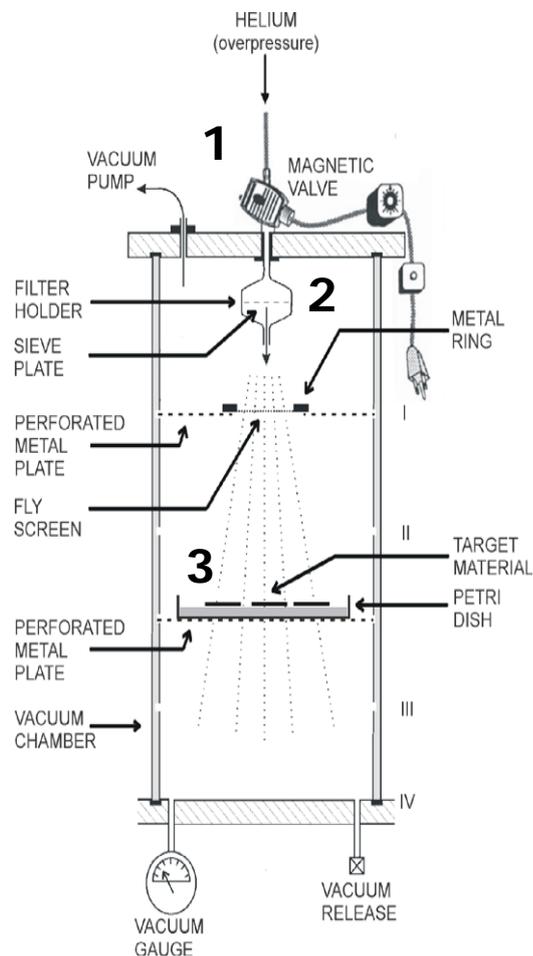


Abb. 2.1 Schematischer Aufbau der „PIG“.

Vorbereitung der Wolframpartikel

Vor dem Beschuss erfolgte die Bindung der DNA-Moleküle an die Wolframpartikel. Hierzu wurden 50mg der Wolframpartikel (0,6 μ m; Thungsten M-17, Biorad) in einem 1,5ml E-Cup eingewogen, 500 μ l EtOH (98%) zugegeben und gevortext, um die Partikel zu sterilisieren. Nach 2-minütiger Zentrifugation (12500g) wurde der Überstand komplett entfernt und die Partikel getrocknet. Nach Zugabe von 1ml salzfreien Wasser wurde eine

finale Wolframkonzentration von $50\mu\text{g}/\mu\text{l}$ erreicht. Für einen Schuss waren $500\mu\text{g}$ Wolfram erforderlich. Die Suspension wurde in $100\mu\text{l}$ Aliquots aufgeteilt; in dieses Ausgangsvolumen wurden die Plasmid-DNA's gegeben und an die Wolframpartikel präzipitiert.

Präzipitation der DNA an Wolframpartikel

Zu $100\mu\text{l}$ Wolframsuspension wurden 8 bis $10\mu\text{g}$ Plasmid-DNA gegeben. Die Zugabe mehrerer Plasmide wie beispielsweise für BiFC-Ansätze (2.8.2) war ebenso möglich. Hierbei wurde darauf geachtet, dass das Endvolumen von $120\mu\text{l}$ nach DNA-Zugabe nicht überschritten war, da nachfolgende Schritte für dieses Maximalvolumen ausgelegt waren. Nach DNA-Zugabe wurden $100\mu\text{l}$ $2,5\text{M}$ CaCl_2 zugeben, dann direkt im Anschluss $40\mu\text{l}$ Spermidin-Lösung ($0,1\text{M}$ in Wasser). Sofort danach war das 3-minütige vortexen (GLW-L46, Hartenstein Laborbedarf) essentiell, um möglichst viele Wolframpartikel mit DNA-Molekülen zu beladen. Nach dem Vortexen wurden jeder Probe $200\mu\text{l}$ kaltes EtOH (98%) zugegeben und kurz mit der Wolfram-DNA-Suspension vermischt. Nun wurden weitere $400\mu\text{l}$ EtOH (98%) zugegeben und durch manuelles Überkopfschütteln mit dem Inhalt vermischt. Durch eine Inkubationsphase von 30 Minuten bei -20°C wurde die DNA gefällt. Nach dieser Zeit wurde kurz zentrifugiert, um das Wolfram zu pelletieren und den ethanolhaltigen Überstand entfernen zu können. Nach Zugabe von $100\mu\text{l}$ salzfreiem Wasser wurden die Wolframpartikel resuspendiert und standen für die Beladung der Kartuschen bereit (Abb. 2.1, 2).

Beschuss pflanzlicher Gewebe

Die Kartuschen wurden vor jedem Schuss nach kurzem Vortexen der Suspension mit je $10\mu\text{l}$ neu beladen. Nach Einsetzen des Gewebes in das Beschussfeld (Abb. 2.1, 3) wurde ein Vakuum von $-0,8\text{bar}$ angelegt und über das elektrisch gesteuerte Ventil der Gaspuls ausgelöst. In Arabidopsis wurden ausnahmslos Epidermiszellen beschossen, bei einem anliegenden Gasdruck von 8 bis $8,5\text{kp}/\text{cm}^2$ ($1\text{kp}/\text{cm}^2 = 0,980665 \text{ bar}$). Als Trägermedium für die Wolframpartikel wurde das Edelgas Helium (Linde AG; München) verwendet.

2.6 Isolation der DRM-Fraktion

Für die Isolierung der DRM-Fraktion aus dem PM-Pool (modifiziertes Protokoll nach Peskan *et al.*, 2000) musste zunächst das mikrosomale Pellet aus frischem Blattmaterial generiert werden. Danach wurden die PM-Komponenten über mehrere Zwei-Phasen-Systeme

aus dem mikrosomalen Pellet isoliert, um in einem letzten Zentrifugationsschritt über Nacht aus dem PM-Pool die DRM-Fraktion zu erhalten.

2.6.1 Gewinnung des mikrosomalen Pellets

Zunächst wurden ca. 300g frisch geerntete Arabidopsis Blätter mit Wasser gewaschen, danach erneut das Frischgewicht bestimmt und die Blätter in einem Waring Blender (Waring Laboratory & Science, Inc.) portionsweise zu je 50g in zugegebenem Homogenisationspuffer (siehe 2.14) zerkleinert. Nach Filtration durch Miracloth-Membranen (EMD Chemicals) ergaben sich aus dem Blattmaterial ca. 600ml an Ausgangsvolumen. Zellkerne, Mitochondrien und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 15000g für 30 Minuten (Avanti-XP, Beckman Coulter) pelletiert und der Überstand in 96ml Ultrazentrifugen (UZ)-Röhrchen überführt. Durch weitere Zentrifugation des Blattextraktes für eine Stunde bei 100.000g (4°C) in der UZ (Optima L-100K, Beckman Coulter) wurde das mikrosomale Pellet gewonnen. Nach Verwerfen des Überstandes wurde dieses in 4ml Zwei-Phasen-Puffer (TPB, siehe 2.14) resuspendiert. Die resuspendierten Mikrosomen wurden in einem Glasplotter homogenisiert, dann auf die Zwei-Phasen-Systeme gegeben.

2.6.2 Aufreinigung der Plasmamembran (Zwei-Phasen-Partitionierung)

Für die Aufreinigung der PM und assoziierter Proteine wurden Zwei-Phasen-Systeme gegossen (Larsson *et al.*, 1988; Yoshida *et al.*, 1983), auf die man bis zu 7g des mikrosomalen Pellets geben konnte. Die Systeme bestanden aus zwei Phasen und ermöglichten die Trennung PM-ständiger Komponenten vom Rest der mikrosomalen Fraktion, bedingt durch die unterschiedlichen Dichten der eingesetzten Komponenten (Tab. 8).

20% (w/w) Dextran T-500	11,34 g
40% (w/w) Polyethylenglykol 3350	5,67 g
43% (w/w) Saccharose	5,94 ml
0,2 M K^+P_i (pH7,8)	675 μ l
2 M KCl (6 mM je System)	41 μ l
H ₂ O	ad 27 g

Tab. 8 Zusammensetzung eines Zwei-Phasen-Systems.

Für die Aufreinigung von 7g mikrosomalen Pellets benötigte man je nach Reinheit der Ausgangsprobe drei bis vier Systeme, die in für die Zentrifugation geeignete 50ml Rörchen (Sarstedt) gegossen wurden. Zum ersten System wurden maximal 7g des mikrosomalen Pellets gegeben, dann auf 36g mit Zwei-Phasen-Puffer (TPB) aufgefüllt. Danach wurden die Systeme durch Invertieren gemischt, bis keine Schlieren mehr in der Lösung sichtbar waren. Durch nachfolgende Zentrifugation bei 1500g (4°C) für 5 Minuten wurden die Phasen separiert. In der oberen Polyethylenglykol (PEG)-Phase reicherten sich Komponenten der PM an, während in der unteren Dextran-Phase die übrigen mikrosomalen und andere Membrankomponenten sowie zytosolische Proteine angereichert wurden. Die PEG-Phase wurde abgenommen, auf das zweite System gegeben, gut durchmischt und erneut zentrifugiert. Nach drei- bis viermaligem Systemwechsel erhielt man die aufgereinigte PM-Fraktion in der PEG-Phase. Nun wurde die PEG-Phase des letzten Systems mit der darin enthaltenen PM-Fraktion in UZ-Rörchen überführt und mit TPB aufgefüllt (96ml Polycarbonatrörchen, Beckman Coulter) und in einem letzten Zentrifugationsschritt (1 Stunde, 100.000g, 4°C) in der UZ die PM pelletiert. Für die Isolation der DRM-Fraktion aus dem aufgereinigten PM-Pool wurde das Pellet in einfach konzentriertem Tris-DTT-Puffer pH 7,4 resuspendiert (siehe 2.14).

2.6.3 Isolation der DRM-Fraktion aus dem PM Pool (Flotation-Assay)

Um die DRM-Fraktion aus dem PM-Pool zu gewinnen, wurden 720µl der PM-Tris-DTT-Suspension mit 80µl (10% v/v) Detergenzlösung (50mg Triton X-100, auf 500mg aufgefüllt mit Tris-DTT) versetzt. Nach Inkubation dieses Ansatzes für 30 Minuten im Eisbad unter gelegentlichem Invertieren wurde die Suspension mit Saccharose versetzt, so dass ein finaler 48%-iger Zuckeranteil erreicht wurde. Diese Lösung wurde schließlich in ein UZ-Rörchen (38ml Swing-Out Polycarbonatrörchen, Beckman Coulter) gegeben und mit einem Saccharosegradienten überschichtet. Dieser wurde mit einem selbst konstruierten Gradientenmischer erzeugt, wobei der gegossene Zuckergradient stufenlos von einem 45- zu einem 15-%igen Saccharoseanteil (v/v) überging. In einem letzten Schritt wurde durch eine 18-stündige Ultrazentrifugation bei 4°C (100.000g) die DRM-Fraktion gewonnen; diese war als flotierender weißer Ring in der Mitte des Zuckergradienten sichtbar. Dort betrug der Zuckeranteil circa 30-35%. Die DRM-Fraktion wurde abgenommen, mit einfach konzentriertem Tris-DTT versetzt und in einem UZ-Rörchen für eine Stunde bei 100.000g zentrifugiert, um Detergen-resistente Lipide und Proteine zu konzentrieren. Die DRM-

Fraktion inklusive darin enthaltener Proteine wurde über SDS-PAGE (Pierce Precast, Thermo Fisher Scientific) größenspezifisch aufgetrennt.

2.6.4 Western Blot

Western Blots wurden durchgeführt, um eGFP::StRem 1.3-Proteine in der Arabidopsis DRM-Fraktion nachzuweisen. Hierzu wurden 15µg der Fraktion in einem Trenngel (Pierce Precast, Thermo Fisher Scientific) elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und immobilisiert. Die Zugabe des primären anti-eGFP Antikörpers (*Rabbit anti-(e)GFP*, Abcam) erfolgte in einer 1:2500 Verdünnung in TBS-Puffer (Tris-Buffered Saline, incl. 0,05% Tween 20). Die Membran und der primäre Antikörper (AK) wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln (30rpm; Polymax 1040, Heidolph) inkubiert. Danach wurde der Blot mehrmals mit Tween 20 versetztem TBS-Puffer gewaschen, um ungebundene AK zu entfernen. Nach dem letzten Waschschrift erfolgte die Zugabe des sekundären AK's (1:25000), ebenfalls in TBS-Medium (versetzt mit final 0,05% Tween 20 und 1% BSA w/v). Der sekundäre AK war an eine Meerrettich-Peroxidase (engl.: „*horseradish peroxidase*“; Thermo Fisher Scientific) gekoppelt, die Luminol und dessen Derivate oxidieren kann. Luminol war in der Blot-Entwicklungslösung enthalten. Bei der Oxidation entsteht Chemilumineszenz, die auf einem Röntgenfilm (Super RX, Fujifilm) als schwarzer Fleck detektiert werden konnte. Die Inkubation des Blots mit dem sekundären AK erfolgte für eine Stunde unter schütteln (30rpm). Vor der Entwicklung des Blots wurden ungebundene, sekundäre AK durch erneutes waschen mit TBS-Medium entfernt. Die Röntgenfilme wurden je nach resultierender Signalstärke unterschiedlich lange belichtet.

2.7 Einbettung und Fixierung von Arabidopsis Gewebe für die STED-Mikroskopie

Das Blattmaterial wurde in Cryofixations-Medium (Neg-50, Apogent) eingebettet. Hierzu wurden Blätter am Blattstiel abgeschnitten und in vorbereitete, mit Fixierungsmedium gefüllte E-Cups gegeben (1 bis 1,2ml/E-Cup). Lufteinschlüsse wurden möglichst vermieden. Durch das Eintauchen der Probe in flüssigen Stickstoff wurden die Blätter im Medium fixiert. Die Cryo-Blöcke wurden bei -80°C aufbewahrt.

2.7.1 Schneiden der eingebetteten Blätter

Zunächst mussten die Cryo-Blöcke mit den fixierten Blättern aus den E-Cups herausgelöst werden. Mit Hilfe eines Mikrotoms (RM2165, Leica Microsystems) wurden von den Neg 50-Cryo-Blöcken 10 bis 30µm dicke Schichten abgetrennt. Nachdem die Blattstücke mehrmals mit entsalztem Wasser gewaschen wurden, um Rückstände des Fixierungsmediums zu entfernen, wurden sie in wässriger Lösung aufbewahrt und standen für nachfolgende Antikörperfärbungen bereit.

2.7.2 Antikörperfärbung DRM-ständiger Proteine

Die Blattstücke wurden zunächst getrocknet und in 0,05% Tween 20, 1% BSA-haltigem (w/v) TBS-Medium umgepuffert, welches zuvor mit einem primären anti-eGFP-AK versetzt worden war (1:2000 *Rabbit anti-(e)GFP*, Abcam). Unter leichtem Schütteln wurde der Ansatz für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) im Taumelschüttler (30rpm; Polymax 1040, Heidolph) inkubiert. Durch mehrmaliges Waschen der Blattstücke mit 0,05%-iger Tween 20-TBS-Lösung für jeweils fünf Minuten unter Schütteln (30rpm) wurden ungebundene AK aus der Lösung entfernt und die Zugabe des sekundären AK (Atto647N, Sigma-Aldrich) erfolgte. Atto647N wurde in einer 1:100 Verdünnung in einer 0,05%-igen Tween 20-TBS-Lösung, der zusätzlich noch Rinderserumalbumin (BSA) zugegeben wurde (3% w/v finale BSA-Konzentration), appliziert. Nach Inkubation für eine Stunde bei RT im Taumelschüttler (30rpm) wurden ungebundene Atto647N-AK durch mehrmaliges Waschen für jeweils fünf Minuten mit 0,05%-iger Tween 20-TBS Lösung entfernt. Die Blattproben wurden getrocknet und für die Fluoreszenzmikroskopie luftdicht auf Objektträger fixiert.

2.7.3 Fixierung der antikörperbehandelten Proben auf Objektträger

Alle AK-behandelten Proben wurden in einem durchsichtigen, nicht fluoreszierenden Fixierungsmedium luftdicht eingebettet. Hierzu wurde das auf Polyvinylalkohol-Basis aufgebaute Mowiol 4-88 (Roth; siehe 2.14) benutzt, welches für die stimulierte Emission-Depletion Mikroskopie (STED; Hell und Wichmann, 1994; siehe 2.8.4) geeignet ist. Die überschichteten Proben härteten über Nacht auf den Objektträgern bei RT aus und standen am nächsten Tag für die STED-Mikroskopie bereit. Die Lagerung der Proben erfolgte bei 4°C.

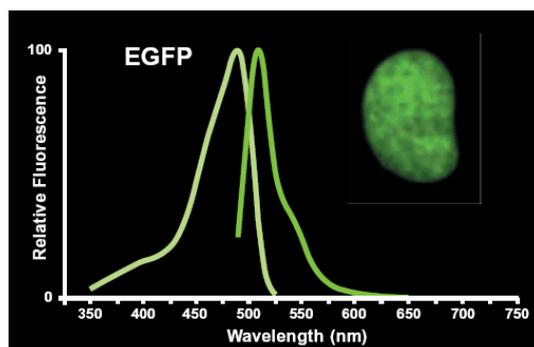
2.8 Fluoreszenzmikroskopie

Die Aufnahmen transformierter Zellen entstanden unter Verwendung konfokaler *Laser Scanning*-Systeme der Firmen Carl Zeiss Microimaging (*LSM 5 Pascal*) und Leica Microsystems (*SP5*). Die Anregung erfolgte fluorophorspezifisch bei 488nm, 510nm oder 543nm (siehe 2.8.1).

2.8.1 Fluoreszente Proteinversionen

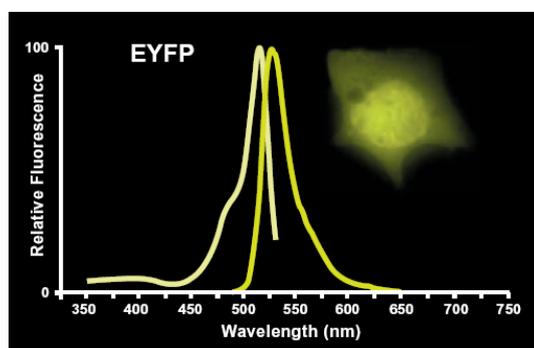
Nachfolgend sind die Anregungs- und Emissionsspektren der verwendeten *in vivo* Reporterproteine eGFP, eYFP und dsRed aufgeführt (Patterson *et al.*, 2001).

2.8.1.1 eGFP: „enhanced green fluorescent protein“



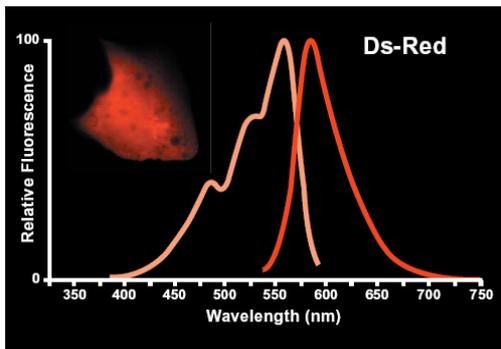
Die Anregung erfolgte bei 488nm; siehe auch 2.8.1.4, Tab. 9.

2.8.1.2 eYFP: „enhanced yellow fluorescent protein“



Die Anregung erfolgte bei 488nm bzw. bei 510nm; siehe auch 2.8.1.4, Tab. 9.

2.8.1.3 dsRed: „*Discosoma spec. Red*“



Die Anregung erfolgte bei 543nm; siehe auch 2.8.1.4, Tab. 9.

2.8.1.4 Filtereinstellungen an den *Laser Scanning*-Mikroskopen

Für das Herausfiltern von Licht unspezifischer Wellenlänge wurden sowohl die mikroskopinternen Bandpässe als auch die Haupt- und Nebenfarteiler jeweils so eingestellt, dass bei bestmöglicher Signalstärke im Detektor kein Durchbluten der Signale zwischen aktivierten Kanälen möglich war (Tab. 9). Die Fluoreszenzaufnahmen entstanden bei einem Lochblendendurchmesser (engl.: „*Pinhole*“) von ca. 1 Airy Einheit. Die Aufnahme mehrerer Fluoreszenzsignale in ein und derselben Zelle erfolgte im sogenannten „*Multitrack*“-Modus. In diesem Modus wurden die Signale koexprimierter Reporterproteine verschiedener Farbe nicht parallel sondern nacheinander spezifisch angeregt und entsprechend aufgezeichnet.

	Anregung (max.)	Emission (max.)	NFT	BP
(e)GFP	484 nm	510 nm	515	505-530
(e)YFP	508 nm	524 nm	545	505-550
dsRed	563 nm	582 nm	615	580-630

Tab. 9 Fluorophorspezifische LSM-Einstellungen für Nebenfarteiler (NFT) und Bandpass-Filter (BP).

Das Aufzeichnen der Bilder erfolgte bei einer Datentiefe von 8bit und einer Auflösung von mindestens 512 x 512 Pixel.

2.8.2 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)

Mit der BiFC-Technik lassen sich Protein-Protein-Interaktionen nachweisen (Kerppola, 2006; Bracha-Drori *et al.*, 2004). Hierzu müssen die interagierenden Proteine auf verschiedenen, speziell konstruierten Plasmiden in einem durchgängigen Leseraster mit dem Fluorophor codiert sein (vgl. 2.1.2.2, 2.1.2.3 und 2.16). Dabei ist ein Protein mit der C-terminalen Hälfte eines YFP-Fluorophors fusioniert, das andere mit der N-terminalen Hälfte. Beide YFP-Hälften sind für sich alleine nicht fluoreszent. Interagieren zwei auf diese Weise fusionierte Proteine kommen sie sich dabei so nahe, dass sich die beiden YFP-Hälften zu einem vollständigen Fluorophor komplementieren. Die Fluoreszenz kann detektiert und das resultierende Signal als Indikator für eine Protein-Protein-Interaktion herangezogen werden.

Ein großer Nachteil dieser Methode liegt möglicherweise in der Irreversibilität der YFP-Komplementation. Haben sich beide Hälften vereinigt, kann man sie nahezu nicht mehr voneinander trennen. Somit sind auch die beiden an die YFP-Hälften fusionierten Proteine unwiederbringlich aneinander gekoppelt (Bracha-Drori *et al.*, 2004).

2.8.3 Fluoreszenzrückkehr nach dem Photobleichen (FRAP)

Um Rückschlüsse auf die laterale Beweglichkeit von Lipiden und Proteinen der PM ziehen zu können, fand die FRAP-Methodik Anwendung (engl. „*fluorescence recovery after photobleach*“). Hier macht man sich das Ausbleichen fluoreszenter Moleküle über die Zeit bei übermäßig starker Belichtung mit einem Laser zu Nutze; dieser Vorgang wird als „*Photobleaching*“ bezeichnet (engl. „*bleach*“: ausbleichen; Meyvis *et al.*, 1999). Beim FRAP wird ein fluoreszenzmarkierter Bereich definierter Größe auf der PM-Oberfläche gezielt durch Laserpulse ausgebleicht. Dann wird die Zeitdauer gemessen die benötigt wird, um den entstandenen, nicht mehr fluoreszierenden Fleck in der PM wieder mit fluoreszenten Molekülen zu füllen. Die Fluoreszenzrückkehr erfolgt gemäß den Vorhersagen des Flüssig-Mosaik-Modells. Dieses besagt, dass Proteine und Lipide einer Membran gegeneinander beweglich sind (u.a. Engelmann, 2005; Gray *et al.*, 2002; Singer und Nicolson, 1972). Bei zytosolischen Komponenten hingegen ist kein FRAP möglich. Während sich membranständige Proteine in der Regel nur in zwei Dimensionen bewegen, bewegen sich zytosolische Proteine in drei Dimensionen. Dies macht FRAP-Experimente unmöglich, da ausgebleichte Regionen augenblicklich wieder mit fluoreszenten Proteinen gefüllt werden. Des Weiteren lässt sich nicht exakt feststellen auf welcher Ebene der FRAP stattfand, da die Eindringtiefe des Einzelphotonen-Lasers in die Probe nicht exakt vorausgesagt werden kann. Anhand von

FRAP-Daten lassen sich die Diffusionskoeffizienten [D] membranständiger Komponenten berechnen.

$$D = \frac{w^2 \ln(2)}{4t_{1/2}}$$

w^2 : Radius der ausgebleichten, zirkulären Region

$t_{1/2}$: Zeit bis zur halbmaximalen Fluoreszenzrückkehr $I_{1/2}$

Diese Formel setzt voraus, dass in der ausgebleichten Region eine mobile und eine immobile Fraktion existiert. Der Anteil der jeweiligen Fraktion lässt sich wie folgt berechnen:

$$\text{Mobile Fraktion} \quad \mathbf{F_m} = (I_E - I_0) / (I_I - I_0)$$

I_E : Endwert der aufgezeichneten Intensität

I_I : initiale Intensität vor dem Ausbleichen („*Prebleach*“)

I_0 : Intensität nach dem Ausbleichen bei $t=0$ („*Postbleach*“)

$$\text{Immobilie Fraktion} \quad \mathbf{F_i} = 1 - F_m$$

2.8.4 Stimulierte Emission-Depletion Mikroskopie (STED)

Die STED-Mikroskopie (engl. „*stimulated emission depletion*“; Hell und Wichmann, 1994) ermöglicht eine drastische Verbesserung des Auflösungsvermögens optischer Systeme. Das Auflösungsvermögen herkömmlicher Mikroskope ist gemäß der Abbeschen Theorie (siehe Einleitung, Abb. 1.4) unter anderem limitiert durch die Größe des Lichtkegels, mit dem man die Probe abtastet. Je kleiner verwendete Wellenlänge ist, desto kleiner ist der Durchmesser des Lichtkegels und umso detaillierter werden zwei nah beieinander liegende Punkte bei gegebener Apertur abgebildet. Weiterhin spielt der Brechungsindex des verwendeten Mediums eine Rolle, sowie der Öffnungswinkel des Objektivs. Dabei gilt im Allgemeinen, dass man zwei benachbarte Punkte solange als getrennt wahrnehmen kann, bis sie sich näher kommen als die Hälfte der Wellenlänge der verwendeten Lichtquelle (Abbe, 1873). Dabei kann die Größe des Lichtkegels durch Verwendung kleiner Anregungswellenlängen verringert und die Auflösung so verbessert werden. Jedoch sind Wellenlängen unter 350nm so energiereich, dass sie nicht mehr geeignet sind um lebendes Gewebe zu vermessen. Ein weiteres, durchaus größeres Problem physikalischer Natur ist die Bündelung

des Laserstrahls. Emittiertes Licht kann nicht beliebig gebündelt werden, um den abtastenden Lichtstrahl beliebig klein und somit Strukturen im Nanobereich sichtbar zu machen. Mit der STED-Technik ist es hingegen möglich, die vorhergesagte Auflösungsgrenze zu brechen. Durch Verwendung eines zweiten, ringförmigen Strahls mit einer Nullstelle im Zentrum (TEM₀₁-Mode; „Doughnut-Mode“) der über den ersten Laserstrahl gelegt wird, wird die Fluoreszenz in der Peripherie des Fokus gelöscht bzw. der angeregte molekulare Zustand der Fluorophore in den Randbereichen entvölkert. Dadurch wird die tatsächlich aus der Probe austretende Fluoreszenz deutlich verringert und Strukturen im zweistelligen Nanometerbereich können mittels STED aufgelöst werden (siehe Abb. 2.2). Die Auflösungsgrenze herkömmlicher *Laser Scanning*-Systeme hingegen liegt um die 200 bis 250nm.

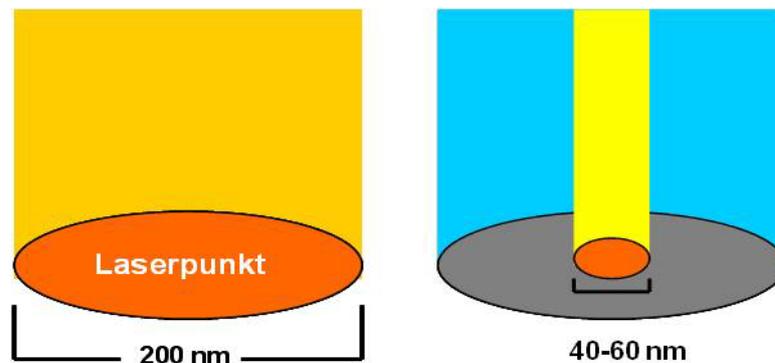


Abb. 2.2 STED-Prinzip.

Alle STED-Daten wurden mit dem *TCS STED*-System (Leica Microsystems) erhoben. Für die Vermessung der Atto647N-markierten Proben wurde eine Anregungswellenlänge von 635nm verwendet. Die Wellenlänge des STED-Lasers betrug 750nm. Sowohl der Anregungslaser (Leica/Pico-Quant) also auch der synchronisierte STED-Laser (Leica/Spectra-Physics) emittierten Lichtpulse im zwei- bis dreistelligen Pikosekundenbereich.

2.9 Datenanalyse

Nach der Akquisition digitaler Fluoreszenzaufnahmen mit den LSM-Systemen wurden Bildanalysen und Bildbearbeitungen durchgeführt. Hierzu wurde die Software *Image J* (V137.c; <http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) verwendet, die Software *LAS AF* (Leica Microsystems), sowie die Software *LSM 5 Pascal* (Carl Zeiss Microimaging). Für Dekonvolutionen (siehe 2.10) wurde die Software *Volocity 64x* (Improvision) verwendet.

2.10 Dekonvolution

Die Dekonvolution digitaler Aufnahmen wurde mit *Volocity 64x* (Improvision) durchgeführt. Als Dekonvolution („*Rückfaltung*“) bezeichnet man in der Signal- und Bildbearbeitung das Schärfen eines digital generierten Bildes. Beim Aufnehmen digitaler Bilder entstehen Unschärfen, insbesondere beim Abbilden kleiner Strukturen nahe der Auflösungsgrenze. Diese Unschärfen sind bedingt durch Abbildungsfehler, die unter anderem durch Beugungserscheinungen an Blenden erzeugt werden. Die Punktspreizfunktion (engl. „*point spread function*“, PSF) beschreibt diese störenden Einflüsse; auch lässt sich mit Hilfe der PSF die maximal mögliche Auflösungsgrenze des Mikroskops bei verwendeter Apertur bestimmen. Mit *Volocity 64x* können Abbildungsfehler aus digital akquirierten Aufnahmen mit Hilfe mathematischer Algorithmen herausgerechnet werden. Über die Software wurde die PSF errechnet, Abbildungsfehler korrigiert und das Signal-Rausch-Verhältnis in den Aufnahmen verbessert. Dies hatte positive Effekte auf die Auflösung sowie auf die Farbtintensität der Aufnahmen.

2.11 Korrelationsanalyse

Die Korrelationsanalysen wurden mit dem „*PSC-Colocalisation Plugin*“ (French *et al.*, 2008) für *Image J* durchgeführt. Dieses Plugin ermöglichte die quantitative statistische Einschätzung überlappender Regionen in zweifarbigem Konfokalaufnahmen. Bildregionen wurden ausgewählt und einem mathematischen Algorithmus unterworfen, welcher den Grad an Kolokalisation kalkuliert und als Pearson- bzw. als Spearman Korrelationskoeffizient wiedergibt. Beide Koeffizienten rangieren zwischen (-1) und (+1). Liegen die Koeffizienten bei Null, ist keine Korrelation der Signale vorhanden. Bei (-1) herrscht negative, bei (+1) positive Korrelation.

Korrelation (r) beschreibt den Zusammenhang zweier oder auch mehrerer statistischer Variablen. Liegt eine positive Korrelation ($r = +1$) vor, kann in diesem Zusammenhang von einer perfekten Kolokalisation zweier Bildpunkte bzw. desselben markierten Bildbereichs in einer zweifarbigem Fluoreszenzaufnahme gesprochen werden. Bei negativer Korrelation ($r = -1$) entsprechend von einer perfekten Separation (d.h. zwei Regionen überlappen zu keinem Zeitpunkt, sind stets getrennt). Liegen die Korrelationskoeffizienten genau bei Null ($r = 0$), sind die Merkmale statistisch unabhängig und somit zufällig verteilt. Bei der Interpretation der Korrelationskoeffizienten gilt zudem je höher die Stichprobenanzahl n und das Signifikanzniveau ist, desto niedriger darf der Absolutbetrag der Koeffizienten sein, um

von einem linearen Zusammenhang ($r > 0$ oder $r < 0$) zu sprechen (<http://www.mathe-online.at>).

2.12 Protoplastengewinnung

Für das Anfärben pflanzlicher Zellen mit diversen fluoreszenzmarkierten Lipidanaloga und Färbelösungen (siehe 2.13) wurden Protoplasten aus Arabidopsis Blättern isoliert. Um die Zellwände zu verdauen wurde folgende Enzymlösung benutzt:

Zellulase (Onozuka R-10)	0,8% (w/v)
Pectolyase (Sigma)	0,1% (w/v)
Rinderserumalbumin	0,5% (w/v)
Polyvinylpyrolidone	0,5% (w/v)
Kalziumchlorid	1mM

Tab. 10 Rezeptur der Protoplasten-Isolutionslösung.

Die Osmolarität der Lösung wurde auf 280 Milliosmol/kg mit Sorbitol eingestellt, der pH-Wert auf 5,6 (MES-TRIS-Puffersystem). Das Blattgewebe wurde unmittelbar vor Zugabe der Enzymlösung in kleine Streifen geschnitten (ca. 1x1cm) und für ein bis zwei Stunden unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur (30rpm; Polymax 1040) inkubiert. Größere Gewebereste wurden durch Zentrifugation (90g, 10min, 4°C) von den Protoplasten getrennt. Diese standen unmittelbar nach dem Verdau der Zellwand für Experimente bereit.

2.13 Fluoreszente Lipidanaloga und Färbelösungen für die Fluoreszenzmikroskopie

In den Experimenten mit fluoreszenten Lipidanaloga und geeigneten Färbelösungen für die Fluoreszenzmikroskopie wurde ausnahmslos mit Arabidopsis Protoplastensuspensionen gearbeitet. Im speziellen wurde darauf geachtet, dass die AnfärbeprozEDUREN die Vitalität der Protoplasten nicht negativ beeinträchtigten. Die Vitalität wurde über Trypanblau Färbungen (2.13.8) festgestellt.

2.13.1 FM 4-64

(N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino)phenyl)hexatrienyl)pyridiumdibroide; Betz *et al.*, 1996; 1992).

Der lipophile FM4-64 Farbstoff basiert auf einer Polyethylenverbindung und dient dazu, Plasmamembranen anzufärben. Laut Herstellerangaben (Invitrogen) ist FM4-64 nicht toxisch für lebende Zellen. Der Farbstoff wurde in einer Stockkonzentration von 1mg/ml in entsalztem Wasser gelöst und in einer finalen Konzentration von 0,5% (v/v) benutzt. Um eine gute Färbung zu erzielen, reichte eine Inkubationsdauer von 10 bis 15 Minuten aus. Die Protoplasten blieben dabei intakt und konnten über einen Zeitraum von mehr als 20 Stunden für Experimente verwendet werden. FM4-64 ist bei einer Wellenlänge von 543nm anregbar; das Emissionsmaximum liegt bei 640nm.

2.13.2 Lissamin Rhodamin B-Phosphatidylethanolamin (LRB-PE)

(9-[4-(chlorosulphonyl)-2-sulphonatophenyl]-3,6-bis(diethylamino)xanthylium)

Dieser Farbstoff wurde benutzt, um Sterol-arme Regionen der PM anzufärben. Dazu wurde LRB-PE (Avanti Polar Lipids) in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst (1mg/ml). Die finale Konzentration des Farbstoffs betrug 0,25% (v/v). Für 20 Minuten wurden die Protoplasten bei Raumtemperatur inkubiert. LRB-PE wurde bei einer Wellenlänge von 543nm angeregt, die emittierte Fluoreszenz wurde unter Verwendung eines Bandpassfilters (560-630nm) mit den LSM-Systemen aufgezeichnet.

2.13.3 DiIC's

(DiIC₁₂ { 1,1'-didodecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate };

DiIC₁₈ { 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate })

Die lipophilen Farbstoffe DiIC₁₂ und DiIC₁₈ (Invitrogen) wurden in DMSO gelöst, zu Stockkonzentrationen von 1mg/ml. Um Protoplasten anzufärben, waren Endkonzentrationen von 0,5% (v/v) DiIC/DMSO in den Protoplastenmedien ausreichend. Nach Inkubationszeiten von 20 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Protoplasten mit den LSM-Systemen vermessen. Die Anregungswellenlänge betrug 543nm, während die Emission der DiIC's zwischen 560 und 620nm aufgezeichnet wurde (Emissionsmax.: 565nm).

2.13.4 DiD

(1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine 4-chlorobenzene-sulfonate salt)

Der lipophile DiD Farbstoff (Invitrogen) wurde in DMSO zu einer Stockkonzentration von 1mg/ml gelöst. Um Protoplasten anzufärben, wurden finale Konzentrationen zwischen 0,25 bis hin zu 3% DiD/DMSO (v/v) eingesetzt. Trotz unterschiedlicher Konzentrationen und variierender Inkubationszeiten von bis zu 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde DiD nur spärlich in pflanzliche Plasmamembranen integriert. DiD wurde mit einem 633nm Laser angeregt, das Emissionsmaximum lag bei 665nm.

2.13.5 Bodipy-Sphingomyelin FL C₁₂ (BD-SM C₁₂)

(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-dodecanoic acid)

Dieses amphiphile Sphingolipid besteht aus einem Sphingosin, einer Fettsäure und einer Phosphatgruppe. Dabei ist das Sphingosin über eine Amidbindung (an der C₂-Aminogruppe) mit einer C₁₂-Fettsäure verknüpft. Die Phosphatgruppe ist kovalent über eine Phosphoesterbindung an die C₁-Hydroxylgruppe des Sphingosins gebunden. Das Sphingomyelin ist kovalent an ein fluoreszentes Bodipy-Fluorophor (BD) gebunden. Laut Herstellerangaben (Invitrogen) besitzt dieses Lipid analog trotz des fluoreszenten BD-Labels die gleiche stereochemische Konformation wie natürliche Sphingolipide (<http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp01154.pdf>). Das BD-Fluorophor ist bei einer Wellenlänge von 488nm anregbar, die Emission liegt im Bereich von 500-550nm. Damit weist BD ähnliche spektrale Eigenschaften auf wie das eGFP-Fluorophor (vgl. Tab. 9). Es wurde eine Stocklösung von 1mg/ml BD-SM C₁₂ in DMSO hergestellt. Für die Färbungen wurden probenabhängig 1-5% (v/v) der Stocklösung zur Protoplastensuspension gegeben und die Zellen für mindestens 20 Minuten inkubiert.

2.13.6 Kombinierte Färbungen

In den kombinierten Färbungen mit FM4-64 und BD-SM C₁₂ bzw. mit LRB-PE und BD-SM C₁₂ wurden Protoplasten zeitgleich mit zwei Farbstoffen angefärbt. Die Stockkonzentrationen der eingesetzten Komponenten lag bei 1mg/ml. Für kombinierte Färbungen wurden 0,5% FM4-64 (v/v) und 1,0% BD-SM C₁₂ (v/v) bzw. 0,25% LRB-PE und 1,0% BD-SM C₁₂ eingesetzt. Die Protoplasten wurden nach 20 Minuten Inkubation vermessen.

2.13.7 Laurdan

(6-lauroyl-2-dimethylaminonaphthalene)

Laurdan (synthetisiert von Weber und Farris, 1979) ist ein lipophiler Farbstoff, dessen Emissionsmaximum stark von der Polarität der Lipidumgebung abhängt. Daher kann Laurdan dazu verwendet werden, um Phasenübergänge in Membranen zu detektieren. Mit zunehmender Apolarität des Lösungsmittels verschiebt sich sowohl die Anregungs- wie auch die Emissionswellenlänge des Fluorophors mehr und mehr in den blauen Spektralbereich. Erhöht sich die Polarität des Lösungsmittels bzw. die Polarität in der Umgebung des Fluorophors, wird die Anregung und die Emission langwelliger und verschiebt sich in den roten Spektralbereich (Parasassi *et al.*, 1994; 1991). Sind viele Sterole in der Umgebung des Fluorophors eingelagert, nimmt die Polarität in diesen Bereichen ab, da die zunehmende Einlagerung von Sterolen und ähnlichen Verbindungen zu einer Reduzierung des Hydratationsgrades führt. Somit sind Bereiche der PM, in denen vornehmlich Sterole eingelagert sind, apolar (Levine und Wilkins, 1971). Dies führt zu kurzwelligeren Anregungs- und Emissionswellenlängen. Für tierische *Lipid Raft*-Bereiche, die reich an Sterolen sind, werden Emissionen zwischen 400 und 440nm angenommen. Für Sterol-arme PM-Bereiche Emissionen zwischen 490 und 550nm (Abb. 2.3; Gaus *et al.*, 2003, Parasassi *et al.*, 1998). Die Filtersets am Fluoreszenzmikroskop (SP5, Leica Microsystems) wurden entsprechend eingestellt. Für die Anregung wurde ein Multiphoton-Laser (Coherent) verwendet, bei Anregungswellenlängen zwischen 800 und 1000nm.

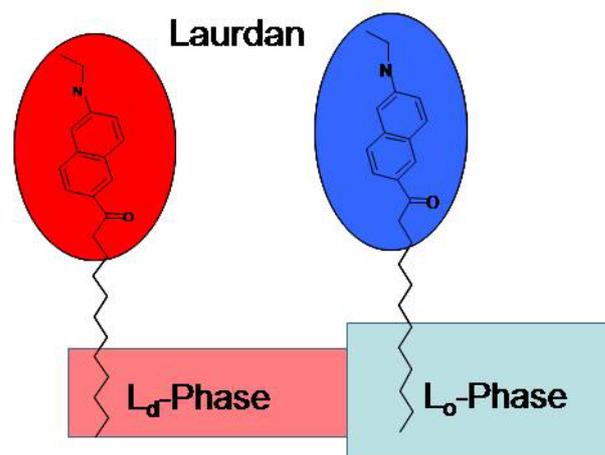


Abb. 2.3 Spektraleigenschaften des Laurdan Farbstoffs in ungeordneten Regionen der PM (L_d -Phase) und in Sterol-reichen, geordneten Bereichen (L_o -Phase).

Laurdan wurde in einer Konzentration von 60mM in einem 17%-igen EtOH/DMSO Gemisch angesetzt. Dieses wurde den Protoplasten zugegeben, bis eine finale Konzentration von 5mM Laurdan erreicht wurde. Nach 30 Minuten Inkubation konnten die Zellen vermessen werden.

Laurdan Pixel für Pixel Datenanalyse

Der Ordnungsgrad der Lipide in der Membran wurde durch Berechnung des GP-Wertes (engl.: „*generalised polarisation*“: allgemeine Polarisation) anhand einer Pixel zu Pixel Analyse kurz- und langwelliger Laurdan Fluoreszenzsignale berechnet (Dietrich *et al.*, 2001; Parasassi *et al.*, 1997; Parasassi *et al.*, 1991). Dabei wurde folgende Formel zu Grunde gelegt (vgl. Dietrich *et al.*, 2001):

$$\text{Intensität blau} - \text{Intensität rot} / \text{Intensität blau} + \text{Intensität rot} = \text{GP-Wert}$$

Der GP-Wert ist dimensionslos und rangiert von -1 (niedriger Ordnungsgrad, polare Lipidumgebung, Laurdan Emission ist in den langwelligeren Lichtbereich verschoben) bis +1 (hoher Ordnungsgrad, apolare Lipidumgebung, Laurdan Emission ist in den kurzwelligen Lichtbereich verschoben; vgl. Abb. 2.3).

2.13.8 Trypanblau Färbungen

Trypanblau (0,4%; Lonza) wurde als Indikator für Zellvitalität eingesetzt. Trypanblau wurde zu Stockkonzentrationen von 1mg/ml in 0,6M Mannitol gelöst. Beschädigte oder tote Zellen absorbierten den Farbstoff und erschienen blau, während intakte Zellen den Farbstoff nicht ins Zytosol aufnahmen. Trypanblau wurde den Protoplastensuspensionen direkt zugegeben. Um einen guten schwarz-weiss-Kontrast für mikroskopische Anwendungen zu gewährleisten, wurden Konzentrationen von bis zu 20% (v/v) eingesetzt. Eine 10-minütige Inkubation reichte aus, um beschädigte bzw. tote Protoplasten mit den bildgebenden Systemen zu detektieren.

2.14 Lösungen und Reagenzien

1% TBE-Agarosegel

4,0g	Agarose
400ml	TBE-Puffer
4,0µl	Ethidiumbromid (EtBr)

Der Ansatz wurde in der Mikrowelle zum Kochen gebracht; nach Abkühlen auf ca. 60°C wurde EtBr hinzugegeben.

3% TBE-Agarosegel

Siehe 1% EtBr-Agarosegel; statt 4g Agarose 12g in 400ml TBE.

10x MEN (MOPS-EDTA-NaAc)-Puffer

0,2M	Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)
0,01M	Ethylendiamintetraacetat (EDTA)
0,05M	Natriumacetat

Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt.

10x TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer

900mM	Tris (108,9g/l)
900mM	Borsäure (55,7g/l)
20mM	EDTA, pH 8 (40ml)

Mit Aqua bidest. wurde auf 1l aufgefüllt, der pH-Wert auf 8,3 eingestellt.

10x TBS (Tris-Buffered Saline)-Puffer

87,66g/l	NaCl
12,11g/l	Tris
4ml/l	HCl

Der pH-Wert wurde auf 8,0 eingestellt.

DNA-Probenpuffer (Gel-Laufpuffer)

0,25%	Bromphenolblau
0,25%	Xylen Cyanol FF
50,0% (w/v)	Glycerin

DRM-Isolation

Homogenisationspuffer-Lösung

330mM	Saccharose
50mM	Tris-HCl (Stock: 1M, pH 8)
3mM	EDTA (Stock: 0,5M)
1mM	DTT (Dithiothreitol)

Zwei-Phasen-Puffer („two phase buffer“, TPB; 200ml Ges.Vol.)

44ml	Saccharose (43% w/v)
600µl	KCl (2M)
5ml	K ⁺ P _i (0,2M; pH 7,8)
4 Stück	Inhibitor Cocktail, EDTA-frei (Roth)

Lambda-Pst-Marker (Größenstandard)

30,0µl	Lambda-DNA (Fermentas, 10µg)
5,0µl	PstI-Puffer (Fermentas)
5,0µl	PstI (Fermentas, 20U)
10,0µl	Aqua bidest.

LB (*Luria Bertani*)-Agarplatten

In einem Liter LB-Medium wurde 15g Agarose gelöst und die Suspension autoklaviert. Nach Abkühlen der Lösung auf 40-60°C wurde Antibiotika (50mg/ml) in Verhältnis 1:1000 zugegeben und die Platten gegossen. Nach Aushärten der Platten standen diese für Bakterienselektionen bereit. Hierzu wurden einzelne Bakteriensuspensionen gleichmäßig über die Platten verteilt (ca. 50µl Bakteriensuspension/Platte).

LB (*Luria Bertani*)-Medium

10,0g	Tryptone
5,0g	Yeast Extract
10,0g	NaCl

Der Ansatz wurde auf 1l mit Aqua bidest. aufgefüllt. Sollten Bakterienkolonien in flüssigem LB-Medium über Nacht angezogen und selektiert werden, wurde im Verhältnis 1:1000 Antibiotikum (50mg/ml) zugegeben.

Mowiol 4-88 (Einbettungsmedium für die STED-Mikroskopie)

6g Glycerol wurden zunächst mit 2,4g Mowiol 4-88 (Roth) versetzt und der Ansatz für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) gut durchmischt. Danach wurden 6ml Wasser zugeben und eine weitere Stunde bei RT unter Schütteln inkubiert. Nun wurden 12ml 0,2M Tris-HCl (pH 8,5) zugeben und der Ansatz für zwei Stunden bei 50°C inkubiert. Dabei wurde der Ansatz alle 20 Minuten für zwei Minuten umgerührt. Danach wurde 15 Minuten bei 5000g zentrifugiert und der Überstand für die Einbettung benutzt. Die Aufbewahrung der Aliquots erfolgte bei -20°C.

MS-Medium und Agarplatten

4,33g/l	Musashige und Skoog-Medium mit Vitaminen (Duchefa)
30,0g/l	Saccharose (w/v)
0,1mg/l	1-NAA (1-Naphtalene-4-t-acetic acid)
1mg/l	BAP (6-Benzylaminopurin)
1mg/	Thiamin
10g/l	Kobe 1-Agar (Roth)

Der pH-Wert wurde auf 5,8 mit KOH eingestellt, im Anschluß daran autoklaviert.

Für die Herstellung von Agarplatten wurde dem Ansatz vor dem autoklavieren 10g/l Kobe 1-Agar hinzugegeben. Nach Abkühlen der Lösung wurden die Ansätze zur Pflanzenselektion mit diversen Antibiotika (50-100mg/l) versetzt.

SOB-Medium

20,0g	Trypton
5,0g	Hefeextrakt
5,0g	MgSO ₄ * 7 H ₂ O
0,5g	NaCl

Der Ansatz wurde auf 1l mit Aqua bidest. aufgefüllt.

SOC-Medium

SOB-Medium, versetzt mit 0,4% Glucose (22mM).

TE (Tris-EDTA)-Puffer

10,0mM	Tris-HCL, pH 7,5
1,0mM	EDTA

Gelöst in sterilem Wasser.

TENS (TE-NaOH-SDS)/RNase-Lysispuffer

9,2ml	TE Puffer
500µl	10% SDS
100µl	NaOH (10M)
200µl	RNase (Fermentas; 10mg/ml)

Tris-DTT (Dithiothreitol)-Puffer

1M	Tris
0,04%	Dithiothreitol (DTT; w/v)

Der pH-Wert wurde auf 8,0 eingestellt.

YEB-Medium und Agarplatten

5g/l	Hefeextrakt
5g/l	Trypton
5g/l	Saccharose
50mM	MgSO ₄
10g/l	Agar (Agarplatten)

Nach Abkühlen der autoklavierten Lösung wurden die Ansätze zur Bakterienselektion mit diversen Antibiotika (50-100mg/l) versetzt.

2.15 Oligonukleotidprimer

***Solanum tuberosum* Remorin 1.3**

StRem USER-fwd:

5'-GGC TTA AUA TGG CAG AAT TGG AAG CTA AGG-3'

StRem USER-rev:

5'-GGT TTA AUT TAG TTA AAT ATT CCA AGG ATT TCC TTT G-3'

***Arabidopsis thaliana* Remorine 1.2 und 1.3**

AtRem 1.2-USER fwd:

5'-GGC TTA AUA TG GCG GAG GAA CAG AAG ATA G-3'

AtRem 1.2-USER rev:

5'-GGT TTA AUT TAG AAA CAT CCA CAA GTT GCC TTT G-3'

AtRem 1.3-USER fwd:

5'-GGC TTA AUA TGG CGG AGG AGC AAA AGA C-3'

AtRem 1.3-USER rev:

5'-GGT TTA AUT TAG AAA CAT CCA CAC GTT GC-3'

Arabidopsis thaliana Remorine 1.2 und 1.3 Deletionen (d) und Mutationen (ASA)

AtRem 1.2-USER **d4** rev:

5'-GGT TTA AUT TA AGTTGCCTTTGGAACAATTCCAG-3'

AtRem 1.2 **d15**-USER rev:

5'-GGT TTA AUT TAT TTA GCA GCC GTT TCT TCT GC-3'

AtRem 1.3-USER **d4** rev:

5'-GGT TTA AUT TA CGTTGCCTTTGGTACTACACCAG-3'

AtRem1.3 **d15**-USER rev:

5'-GGT TTA AUT TAC TTA GCA CCC ATT TCT TCA GC-3'

AtRem 1.2- und 1.3-USER **d2** rev:

5'-GGT TTA AUT TA TCCACACGTTGCCTTTGG-3'

AtRem 1.2- und 1.3-USER **ASA** rev:

(2 Cysteine -TGT- werden zu Alaninen-GCT)

5'-GGT TTA AUT TA GAAAGCTCCAGCCGTTGCCTTTGG

Andere Vektorkonstrukte

Die Vektorkonstrukte für SLAH3, CPK21 und ABI1 wurden von der AG Geiger (LS für molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik der Universität Würzburg) kloniert und bereitgestellt.

2.16 Primer-Bindestellen und Vektoren

AtRem 1.2: Überblick Primer-Bindestellen

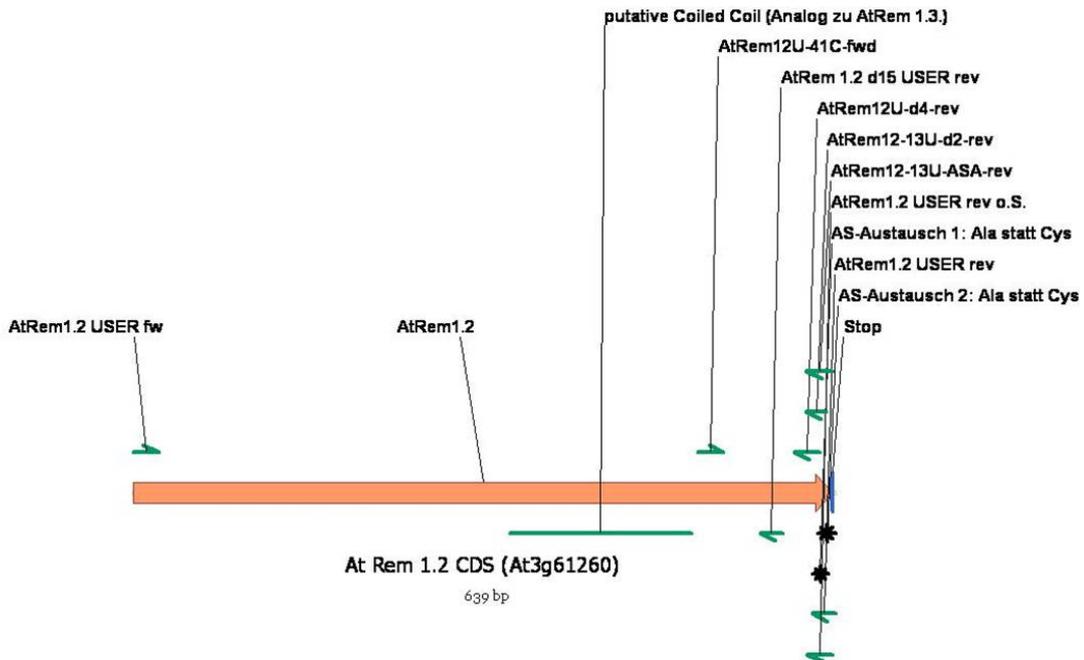


Abb. 2.4 Für Klonierungen wurden Amplifizierungsreaktionen mit den AtRem 1.2 USER fwd (fw)- und AtRem1.2 USER rev-Primern durchgeführt und die PCR-Fragmente in USER-Vektoren kloniert.

AtRem 1.3: Überblick Primer-Bindestellen

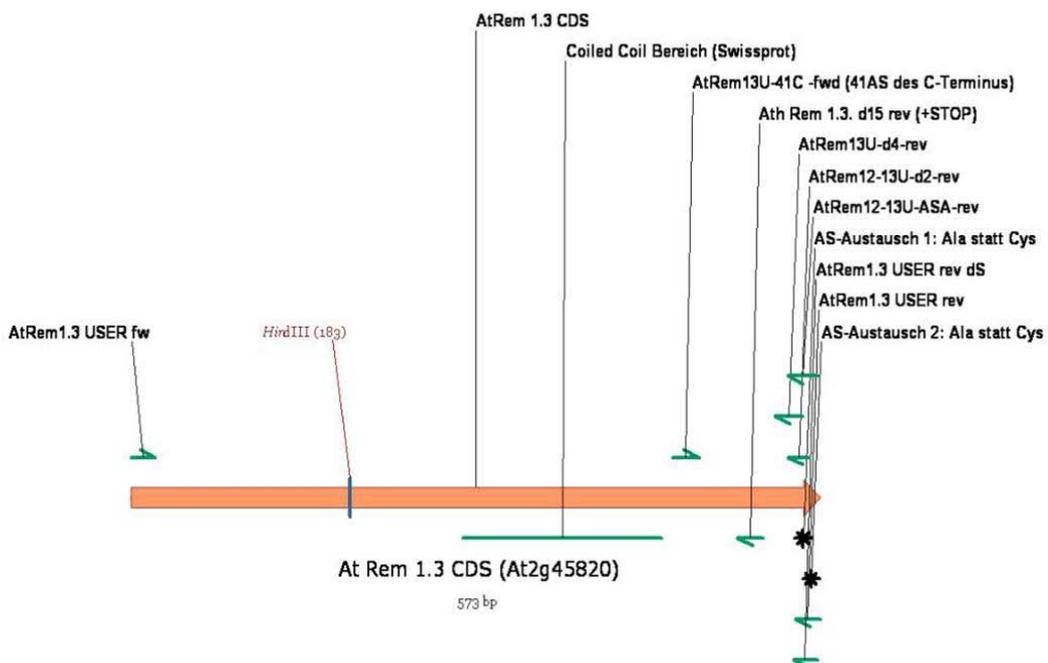


Abb. 2.5 Für Klonierungen wurden Amplifizierungsreaktionen mit den AtRem 1.3 USER fwd (fw)- und AtRem1.3 USER rev-Primern durchgeführt und die PCR-Fragmente in USER-Vektoren kloniert.

eGFP-StRem 1.3:: pK7WGF2

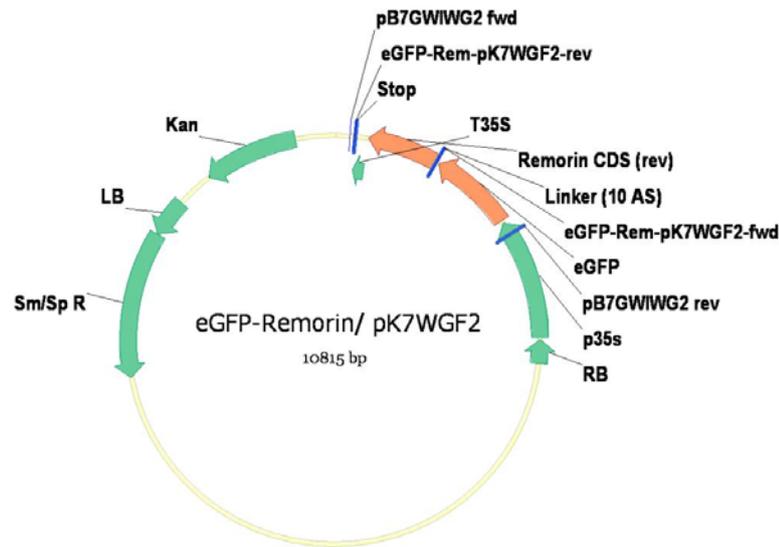


Abb. 2.6 StRem 1.3 wurde nach Amplifikation der DNA sowohl in USER-Vektoren als auch über Restriktionsverdau in den pK7WGF2-Vektor kloniert; die pB7GWIWG2-Primer dienten der Sequenzierung.

USER-Vektoren

pSAT 1396-USER

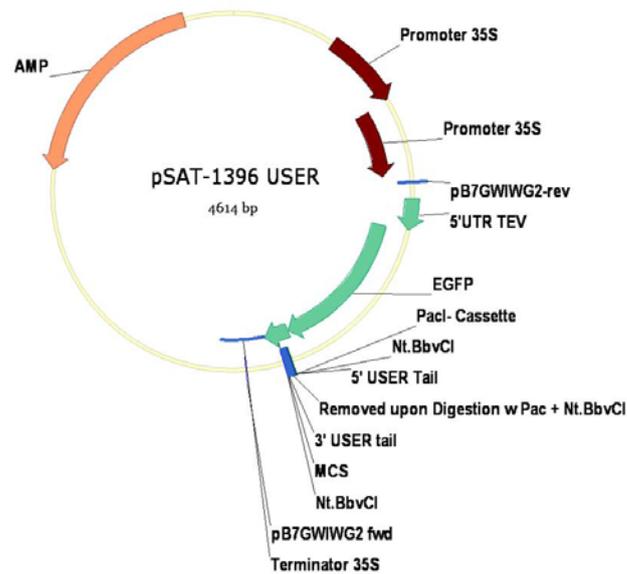


Abb. 2.7 Remorine der Gruppe 1b wurden nach DNA-Amplifikation über die USER-Reaktion in den pSAT-1396 USER-Vektor gebracht. Es entstanden N-terminale eGFP-Fusionsproteine.

pSAT 1450-USER

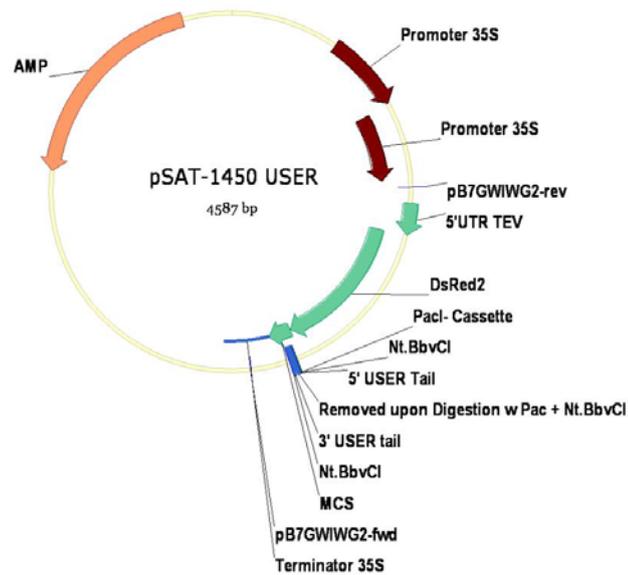


Abb. 2.8 Remorine der Gruppe 1b wurden nach DNA-Amplifikation über die USER-Reaktion in den pSAT-1450 USER-Vektor gebracht. Es entstanden N-terminale dsRed-Fusionsproteine.

pSAT 1564-USER

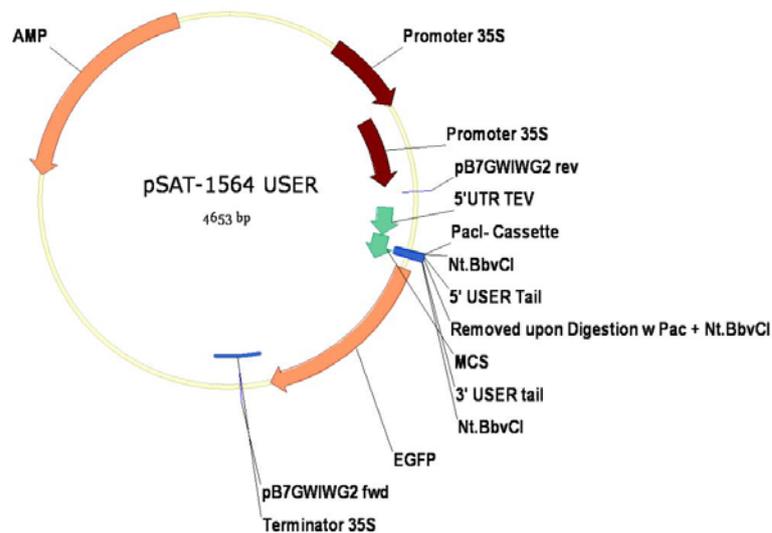


Abb. 2.9 Kodierende DNA's von Kandidatenproteinen der DRM-Fraktion wurden nach PCR-Amplifikation über die USER-Reaktion in den pSAT-1564 USER-Vektor gebracht. Es entstanden C-terminale eGFP-Fusionsproteine.

pSAT 2244-USER

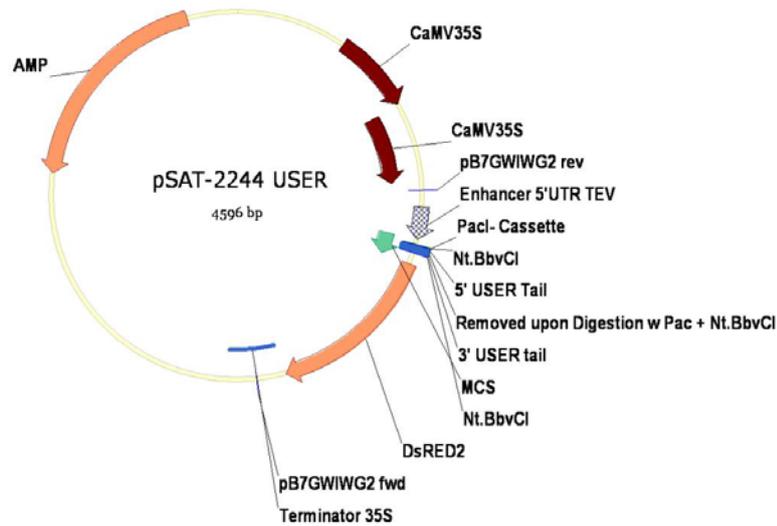


Abb. 2.10 Kodierende DNA's von Kandidatenproteinen der DRM-Fraktion wurden nach PCR-Amplifikation über die USER-Reaktion in den pSAT-2244 USER-Vektor gebracht. Es entstanden C-terminale dsRed-Fusionsproteine.

pUSER039 pCambia 2300 35S N-term YN

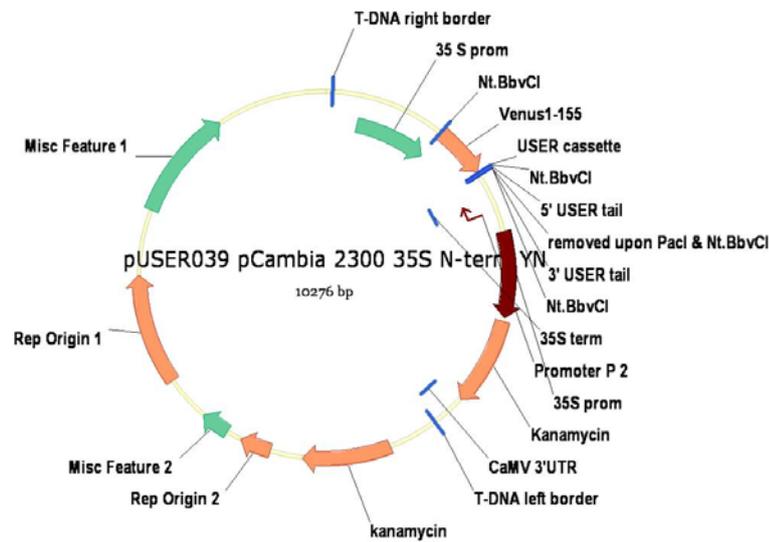


Abb. 2.11 Für BiFC-Experimente wurden kodierende DNA's von Kandidatenproteinen der DRM-Fraktion nach PCR-Amplifikation über die USER-Reaktion in den pUSER039 pCambia 2300 35S N-term YN-Vektor gebracht. Dieser codiert die N-terminale YFP-Hälfte (Venus 1-155).

pUSER040 pCambia 2300 35S N-term YC

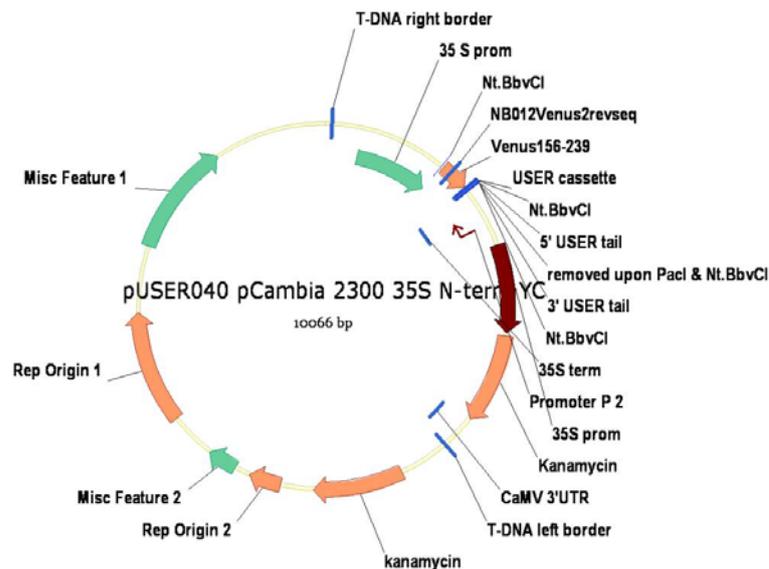


Abb. 2.12 Für BiFC-Experimente wurden kodierende DNA's von Kandidatenproteinen der DRM-Fraktion nach PCR-Amplifikation über die USER-Reaktion in den pUSER040 pCambia 2300 35S N-term YC-Vektor gebracht. Dieser codiert die C-terminale YFP-Hälfte (Venus 156-239).

2.17 Herstellerverzeichnis

Geordnet nach Hersteller

Abcam	Cambridge, England
Abimed	Langenfeld
Amersham Biosciences	Little Chalfont, England
Apogent	Braunschweig
Applichem	Darmstadt
Applied Biosystems	Darmstadt
Avanti Polar Lipids	Alabaster, USA
Beckman Coulter	Krefeld
Biorad	Kalifornien, USA
Carl Zeiss Microimaging	Jena
Clontech	Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
Coherent	Dieburg
Duchefa	Haarlem, Niederlande
EMD Chemicals	Gibbstown, New Jersey, USA

Eppendorf	Hamburg
Fermentas	St. Leon-Rot
Fujifilm	Tokjo, Japan
Hartenstein Laborbedarf	Würzburg
Heidolph	Schwabach
Invitrogen	Karlsruhe
KNF Neuberger	Freiburg
Lehle Seeds	Texas, USA
Leica Microsystems	Mannheim
Linde	München
Lonza	Walkersville, USA
Memmert	Schwabach
MWG Biotech	Ebersberg
New Brunswick Scientific	Edison, USA
New England Biolabs Europe	Frankfurt a. M.
Perkin Elmer (inkl. Improvision)	Massachusetts, USA
Pico-Quant	Berlin
Promega	Mannheim
Qiagen	Hilden
Roth	Karlsruhe
Sarstedt	Nümbrecht
Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Spectra-Physics	Santa Clara, USA
Starlab	Ahrensburg
Stratagene	Waldbronn
Thermo Fisher Scientific	Rochester, USA
Waring Laboratory & Science Inc.	Torrington, USA

Geordnet nach Material/Gerät

3100 Avant Genetic Analyser	Applied Biosystems
38ml Swing-Out Polycarbonatröhrchen	Beckman Coulter
Anti-(e)GFP Antikörper	Abcam
Atto647N (sek. Antikörper)	Sigma-Aldrich
Avanti-XP (Zentrifuge)	Beckman Coulter

BD Advantage 2-Polymerase	Clontech
BD-Sphingomyelin FL C ₁₂	Invitrogen
Deep Vent _R DNA-Polymerase	Clontech
DH5 alpha <i>Escherichia coli</i> Stamm	Invitrogen
DiD	Invitrogen
DiIC ₁₂	Invitrogen
DiIC ₁₈	Invitrogen
DNA Sequencing Analysis Software V5.1.	Applied Biosystems
E-Cup (1,5ml)	Eppendorf
Elektroporationsküvetten (2mm)	Eppendorf
Elektroporator 2510	Eppendorf
Etidiumbromid	Roth
Falcon Tubes	Sarstedt
FM4-64	Invitrogen
Gene Quant Pro Spectrometer	Amersham Biosciences
GLW-L46 (Vortexer)	Hartenstein Laborbedarf
Helium	Linde
Horse Raddish Peroxidase	Thermo Fisher Scientific
Image J (http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html)	Open Source
Incubator Shaker (37° Schüttler)	New Brunswick Scientific
Inkubator INB	Memmert
Innova 4213 (28° Schüttler)	New Brunswick Scientific
Laboport (Vakuumpumpe)	KNF Neuberger
LAS-AF (Software)	Leica Microsystems
Lissamin Rhodamin B-PE	Avanti Polar Lipids
LSM 5 Pascal (Konfokalmikroskop)	Carl Zeiss Microimaging
LSM 5 Pascal (Software)	Carl Zeiss Microimaging
LSM Image Browser (Software)	Carl Zeiss Microimaging
Mastercycler Personal (PCR-Cycler)	Eppendorf
Miracloth-Membranen	EMD Chemicals
Mowiol 4-88	Roth
MRF' <i>Escherichia coli</i> Stamm	Stratagene
MS-Medium	Duchefa
Multiphoton-Laser	Coherent

Neg-50 (Cryofixations-Medium)	Apogent
Nt.BbvCI (Restriktionsenzym)	New England Biolabs Europe
Optima L-100K (Ultrazentrifuge)	Beckman Coulter
PacI (Restriktionsenzym)	New England Biolabs Europe
PfuCx-Polymerase	Stratagene
Phagen DNA (Lambda)	Fermentas
Pierce Precast (Protein-Trenngel)	Thermo Fisher Scientific
Pipetman Pipette	Abimed
Plasmid-Midi-Kit System	Qiagen
Polymax 1040 (Taumelschüttler)	Heidolph
Primus 96plus (PCR-Cycler)	MWG Biotech
PS-Laser (Emission)	Pico-Quant
PS-Laser (Depletion)	Spectra-Physics
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
RM2165 (Mikrotom)	Leica Microsystems
RM-Multi 1 (Überkopfschüttler)	Starlab
Röntgenfilm Super RX	Fujifilm
Silwet L-77	Lehle Seeds
SP5 (Konfokalmikroskop)	Leica Microsystems
T4 Ligase	Fermentas
TCS STED (STED-Mikroskop)	Leica Microsystems
Thermomixer 5436	Eppendorf
Thungsten M-17 (Wolframpartikel)	Biorad
Triton X-100	Applichem
Trypanblau	Lonza
Volocliy 64x Software	Improvision (Perkin Elmer)
Waring Blender	Waring
Wizard Plus Midi-Prep-System	Promega
Zentrifuge 5415D	Eppendorf

3. Ergebnisse

Die Erforschung und Charakterisierung pflanzlicher Membrandomänen stand im Fokus dieser Arbeit. In den Domänen lagerten sich Proteine an, die biochemisch der DRM-Fraktion zugeordnet werden konnten. Eines dieser Proteine war das Remorin 1.3 aus *Solanum tuberosum* (Raffaele *et al.*, 2009; Mongrand *et al.*, 2004).

Es gelang eine transgene Linie zu generieren, die ein fluoreszenzmarkiertes StRem 1.3-Protein stabil exprimiert. Anhand von Plasmamembran (PM)-Isolationen aus Blättern transgener Pflanzen wurde die Teilnahme des Remorins an der DRM-Fraktion bestätigt. Die Verteilung dieses und weiterer Remorin Homologe in Plasmamembranen von *A. thaliana* wurde dokumentiert. Remorine der taxonomischen Gruppe 1b konnten als Markerproteine für PM-ständige Domänen etabliert werden, in denen höchstwahrscheinlich auch Sterole und Sphingolipide angereichert sind.

In weiterführenden Untersuchungen wurden die Remorine auf posttranslationale Modifikationen hin untersucht, die ihnen Assoziationen mit der PM gestatten. Die Größe der Remorin-markierten Membrandomänen wurde mittels STED-Mikroskopie („stimulierte Emission-Depletion“) vermessen.

Regulatorische DRM-Proteine wurden auf eine mögliche Lokalisation in PM-ständigen Domänen hin überprüft, sowie auf diese Bereiche beschränkte Proteinkolokalisationen und Protein-Protein-Interaktionen *in planta* anhand nicht invasiver, fluoreszenzmikroskopischer Techniken dokumentiert. Biophysikalische Messungen der Protein- und Lipiddynamik sollten zudem Aufschluss bezüglich der Organisation einzelner Komponenten in den Domänen erbringen.

3.1 Generierung einer transgenen *A. thaliana col 0* Remorin Linie

Homologe des StRemorins 1.3 aus der Kartoffel (*Solanum tuberosum*) waren in DRM-Fraktionen zahlreicher pflanzlicher Gewebe stark angereichert (Laloi *et al.*, 2007; Lefebvre *et al.*, 2007; Morel *et al.*, 2006; Mongrand *et al.*, 2004). Neben einer Detergens-Resistenz zeigte StRem 1.3 *in vitro* eine ausgeprägte Abhängigkeit von Sterolen (Raffaele *et al.*, 2009). Daher sollte eine fluoreszenzmarkierte Version als Markerprotein für PM-ständige Domänen in *Arabidopsis* herangezogen werden. Hierzu musste sichergestellt sein, dass das eGFP::StRem 1.3-Fusionsprotein in der DRM-Fraktion vertreten ist. Für die Isolation von DRM-Fraktionen aus Plasmamembranen waren große Ausgangsmengen an Pflanzenmaterial erforderlich,

welche allein über transiente Expressionsansätze nicht generiert werden konnten. Es war daher nötig, eine transgene Arabidopsis Linie zu erzeugen, die das eGFP::StRem 1.3-Protein stabil exprimiert.

Durch Agrobakterium-vermittelten Gentransfer (2.5.1) ist es gelungen, eine solche Linie zu generieren. Die Membrandomänen wurden in verschiedenen Gewebetypen unter Einsatz der konfokalen *Laser Scanning*-Mikroskopie abgebildet (Abb. 1 ff; siehe auch 2.8).

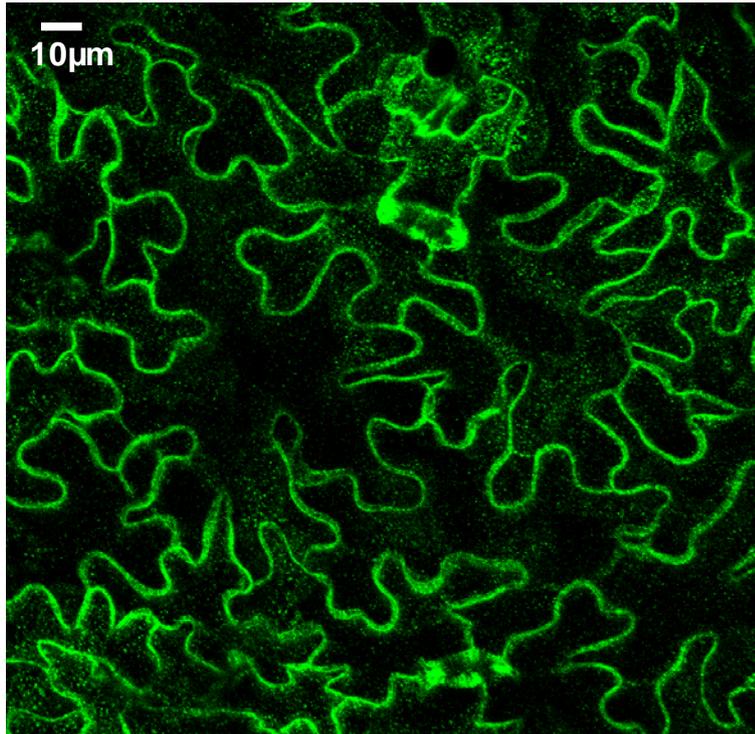


Abb. 1 Stabile eGFP::StRem 1.3-Linie, untere Epidermis; StRem 1.3 unterliegt einer inhomogenen Verteilung in der PM von Arabidopsis.

In der Blattepidermis unterlag eGFP::StRem 1.3 einer inhomogenen Verteilung und akkumulierte in PM-ständigen Domänen (Abb. 1). Aufgrund der Tatsache, dass StRem 1.3 eine Abhängigkeit von Sterolen zeigt (Raffaele *et al.*, 2009) nimmt man an, dass in diesen Domänen Sterole und Sphingolipide angereichert sind.

Auch in Schließzellen war StRem 1.3 exprimiert, wo es ebenfalls in PM-ständigen Domänen erschien (Abb. 2).

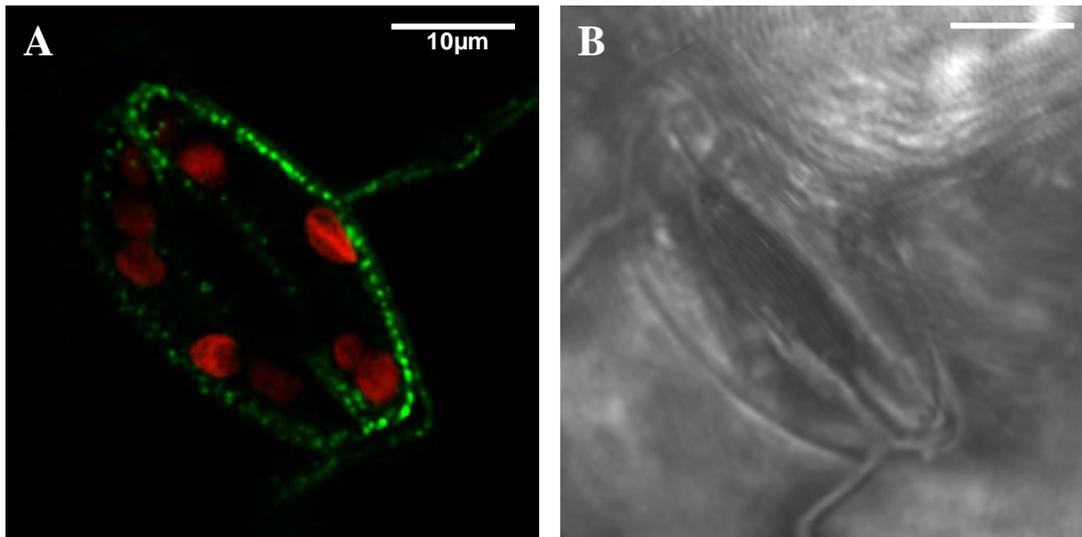


Abb. 2 Stabile eGFP::StRem 1.3-Linie, Schließzelle; eGFP::StRem 1.3 (A); Durchlicht (B); rote Strukturen in (A): Chlorophyllfluoreszenz der Chloroplasten; die eGFP-markierten Domänen zeigten über die Zeit keine lateralen Bewegungen in der PM.

Ebenso war eGFP::StRem 1.3 in der Stengelepidermis exprimiert (Abb. 3).

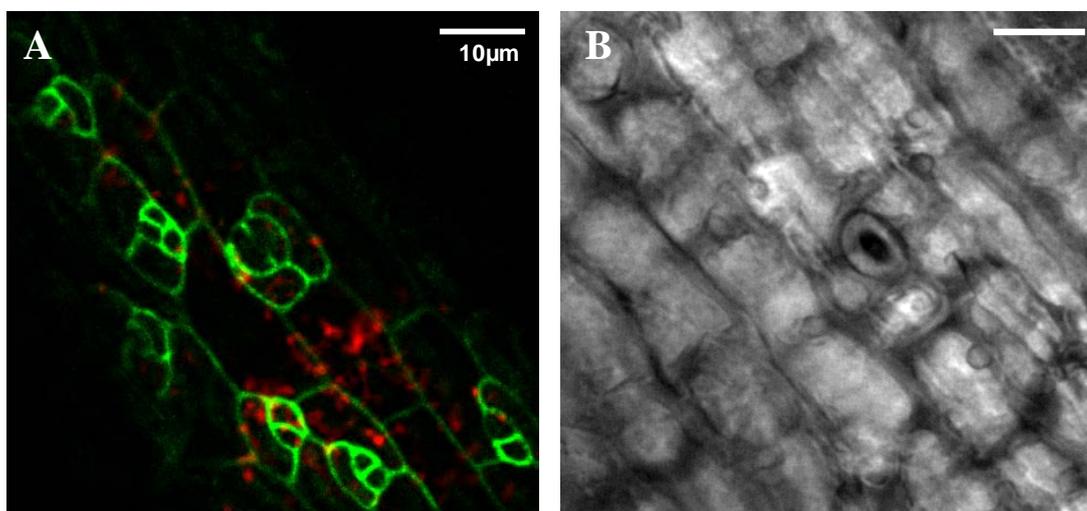


Abb. 3 eGFP::StRem 1.3-Linie, Stengelepidermis: eGFP::StRem 1.3 (A); Durchlicht (B); die rote Eigenfluoreszenz der Chloroplasten aus tieferen Zellschichten war erkennbar (A, B).

In der Blatt- (Abb. 1) und der Stengelepidermis (Abb. 3) wurden spezifische eGFP-Signale detektiert. In tiefer gelegenen Zellschichten konnten die Membrandomänen aufgrund der starken Chlorophyllfluoreszenz nicht mehr befriedigend aufgelöst werden. Daher wurde eine Protoplastensuspension aus Blättern der stabilen Remorin Linie hergestellt (siehe 2.12) und mit dem LSM abgebildet (Abb. 4).

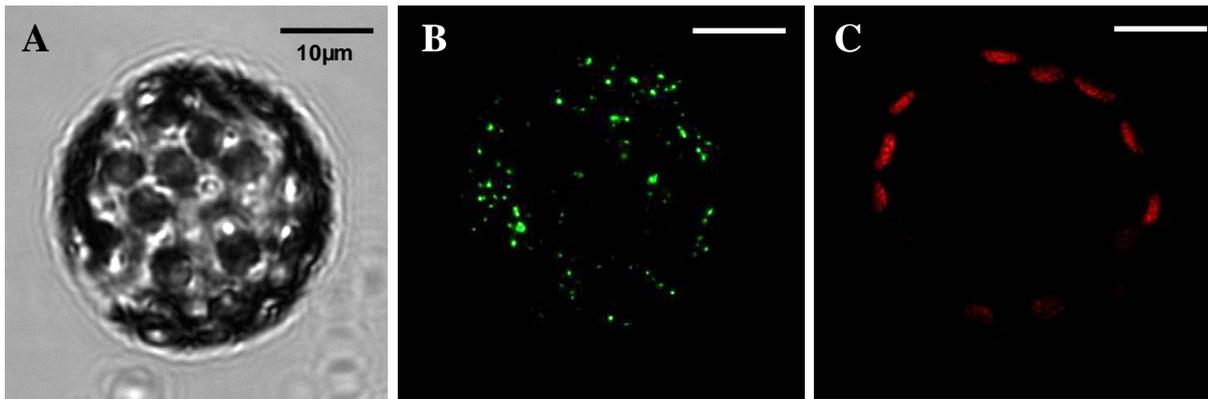


Abb. 4 Stabile eGFP::StRem 1.3-Linie, Mesophyllprotoplast; (A) Durchlicht, (B) eGFP-, (C) Chlorophyll-Fluoreszenz; die Domänen zeigten auch nach dem Verdau der Zellwand keine lateralen Bewegungen.

In Protoplasten (Abb. 4, A; Durchlicht) waren die Domänen in der PM nun deutlich zu erkennen (B); störende Einflüsse der Chlorophyllfluoreszenz (C) auf die Bildgebung konnten vernachlässigt werden. Erneut zeigten die Domänen keine lateralen Bewegungen.

In der transgenen Linie wurde das eGFP-Signal in allen überirdischen Pflanzenteilen detektiert (Abb. 1 bis 4). Aus dem Wurzelgewebe wurde hingegen kein spezifisches eGFP-Signal empfangen (nicht gezeigt).

3.2 Western Blot

Mit der stabilen Linie war es möglich, genügend Pflanzenmaterial zu akquirieren um daraus Plasmamembranen zu isolieren. Für die Isolation wurden überirdische Pflanzenteile homogenisiert. Nach Erhalt des mikrosomalen Pellets wurde dieses über mehrere Zwei-Phasen-Systeme zur PM aufgereinigt und die DRM-Fraktion isoliert („*detergent resistant membrane*“, siehe 2.6 ff). Die DRM-Fraktion inklusive darin enthaltener Proteine wurde über SDS-PAGE größenspezifisch aufgetrennt und das ans StRemorin 1.3 fusionierte eGFP über einen anti-eGFP Antikörper (AK) im Western Blot (2.6.4) nachgewiesen. Das StRem 1.3-Protein besitzt eine Größe von 34kD (Jacinto *et al.*, 1993). Zusammen mit dem eGFP-Fluorophor betrug die Größe 55kD (Abb. 5).

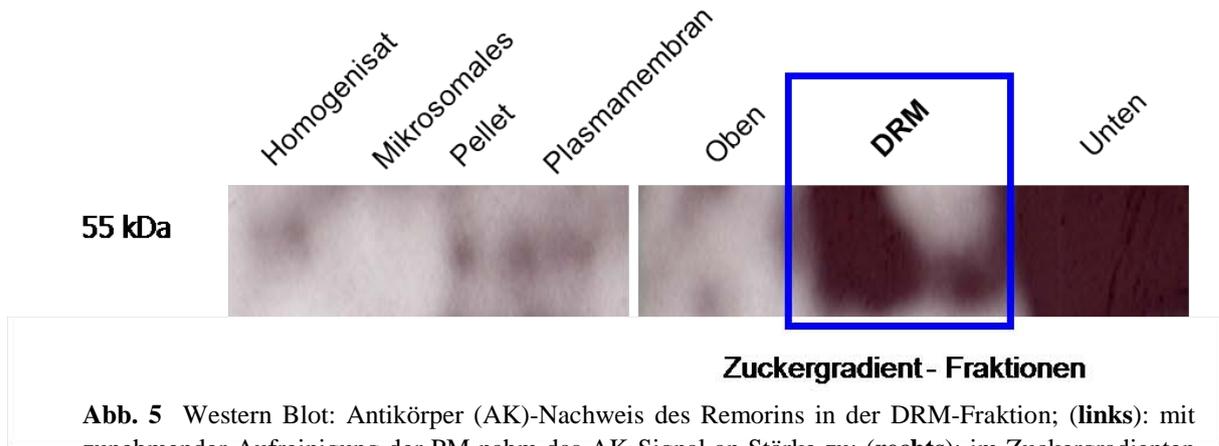


Abb. 5 Western Blot: Antikörper (AK)-Nachweis des Remorins in der DRM-Fraktion; (**links**): mit zunehmender Aufreinigung der PM nahm das AK-Signal an Stärke zu; (**rechts**): im Zuckergradienten akkumulierte eGFP::StRem 1.3 in der DRM-Fraktion.

Im Blatthomogenisat wurde zunächst ein schwaches Signal mit dem AK detektiert, welches mit Generierung des mikrosomalen Pellets hin zur aufgereinigten PM an Stärke zunahm (Abb. 5, links). Nach Aufreinigung der PM wurde Triton X-100 zugegeben und der Ansatz auf einen Dichtegradienten gegeben. In einer 18-stündigen Ultrazentrifugation wurde die DRM-Fraktion von der Detergens-löslichen Fraktion getrennt. Die DRM-Fraktion war als weißer Ring in der Mitte des UZ-Röhrchens auszumachen; dort betrug der Zuckeranteil circa 30-35%. Das eGFP-Signal konnte in dieser Fraktion lokalisiert werden (Abb. 5 rechts, blaue Markierung). In der „Unten“-Fraktion wurde ebenfalls ein Signal detektiert. In diese Region hoher Dichte (der Zuckeranteil betrug hier circa 40-45%) lagern sich Komponenten der Detergens-löslichen Fraktion ein (F. Demir, Lehrstuhl für molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, persönliche Mitteilung). Die Stärke des eGFP-Signals in diesem Bereich war auf eine unvollständige Trennung von Membrankomponenten im Dichtegradienten zurückzuführen; die unvollständige Trennung wurde höchstwahrscheinlich durch die Überexpression des Remorins noch verstärkt (siehe Diskussion, 4.2).

Über eine Methyl- β -Zyklodextrin (MCD)-Behandlung konnte nachgewiesen werden, dass StRem 1.3 einen hohen Anteil an Sterolen in seiner Lipidumgebung benötigt. MCD löst Sterole aus DRM-Fractionen heraus, indem es diese komplexiert und die Solubilität Sterol-artiger Verbindungen in wässrigen Lösungen erhöht. Aufgrund dieser Eigenschaft kann MCD dazu benutzt werden, Sterole von den übrigen Lipiden der DRM-Fraktion zu trennen. Weiterhin lässt sich die Sterol-Abhängigkeit von Proteinen auf diese Weise bestimmen (Ilangumaran und Hoessli, 1998). Die MCD-Behandlung führte im Falle des Remorins zu

einer signifikanten Abnahme des eGFP-Signals in der DRM-Fraktion, bei einer gleichzeitigen Anreicherung in der Detergens-löslichen Fraktion (F. Demir, persönliche Mitteilung).

Daraus ließ sich schlussfolgern, dass eGFP::StRem1.3 eine starke Sterol-Abhängigkeit besitzt. In einem ähnlichen Ansatz zeigten auch die Arabidopsis Remorine AtRem 1.2 (At3g61260) und AtRem 1.3 (At2g45820) eine ausgeprägte Abhängigkeit von Sterolen (Kierszniowska *et al.*, 2009). Die Einlagerung von Sterolen und Sphingolipiden in Plasmamembranen induziert sowohl in Pflanzen, in Pilzen, als auch in tierischen Organismen die Ausbildung von Membran-Heterogenitäten (Domänen), bedingt durch die räumliche Zusammenlagerung der Sterole und Sphingolipide zu Clustern (Xu *et al.*, 2001).

3.3 Visualisierung von Membrandomänen mit endogen exprimierten Proteinen

Um die subzelluläre Lokalisation nativer Arabidopsis Remorine zu überprüfen und um mögliche Kolo-kalisationen mit StRem 1.3-Proteinen in Membrandomänen aufzudecken, wurden Epidermiszellen von Arabidopsis Blättern transient transformiert (2.5.3). Transformierte Zellen wurde mit den *Laser Scanning*-Mikroskopen (*LSM 5 Pascal*, Carl Zeiss Microimaging; *SP5*, Leica Microsystems) detektiert und konfokale Aufnahmen akquiriert. Diese wurden bei einem definierten Lochblendendurchmesser (ca. 1 Airy Einheit) aufgezeichnet. Die fluorophorspezifischen Anregungs- und Emissionswellenlängen wurden an den LSM-Systemen entsprechend eingestellt (2.8). Waren mehrere Fluoreszenzsignale in einem Ansatz zu detektieren, wurden diese nacheinander im „*Multitrack*“-Modus aufgezeichnet um Nebensignaleffekte (engl.: „*crossstalk*“) zwischen den Fluorophoren zu vermeiden.

3.3.1 Remorine aus unterschiedlichen Pflanzenspezies als Markerproteine für Membrandomänen

Als Markerproteine wurden zwei AtRemorine sowie das StRemorin 1.3 (Kap. 3.1) verwendet. Diese wurden an fluoreszente Proteine fusioniert und in Epidermiszellen transient exprimiert. Als Fluorophore wurden grün fluoreszierende eGFP-, gelb fluoreszierende eYFP-, sowie rot fluoreszierende dsRed-Proteine verwendet (siehe 2.8.1.1 ff). Das eYFP-Fluorophor wurde darüber hinaus für den Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen herangezogen, unter Anwendung der BiFC-Technik (bimolekulare Fluoreszenzkomplementation, siehe 2.8.2). Hierzu wurde jeweils die N- bzw. die C-terminale Hälfte eines eYFP-Fluorophors an Proteine fusioniert (siehe 2.1.2.2, 2.1.2.3 und 2.16).

3.3.1.1 Das *Solanum tuberosum* Remorin

StRem 1.3 wurde als DRM-partizipierendes Protein identifiziert (Raffaele *et al.*, 2009). In der transgenen Linie zeigten fluoreszente eGFP::StRem 1.3-Proteine eine inhomogene Verteilung in der PM (Abb. 1-4) und erschienen in der DRM-Fraktion (Abb. 5). Darüber hinaus zeigte StRem 1.3 eine Abhängigkeit von Sterolen (Kap. 3.2). Somit eignete sich dieses Protein hervorragend als *in vivo* Marker für Membrandomänen.

Nach transienter Expression in *Arabidopsis* war artfremdes StRem 1.3 ausschließlich an der PM lokalisiert (Abb. 6).

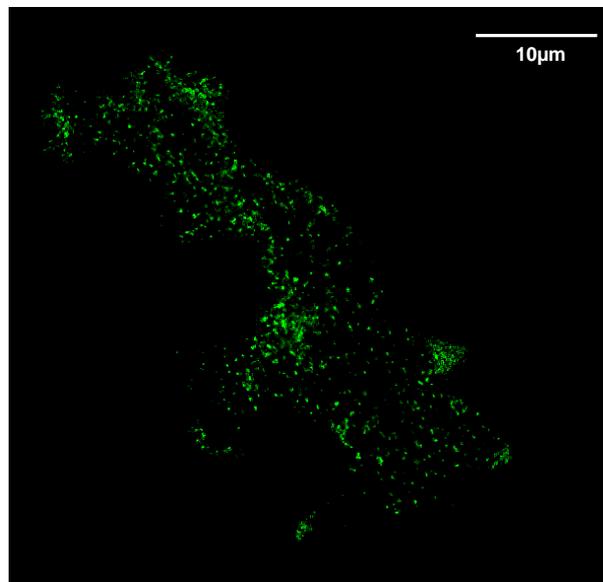


Abb. 6 Transiente eGFP::StRem 1.3 Expression in *A. thaliana* Epidermiszellen.

Bei näherer Betrachtung fielen Domänen in der PM auf, die über die gesamte Oberfläche verteilt waren (Abb. 6). StRem 1.3-Proteine zeigten wie bereits in der stabilen Linie (Abb. 1-4) ein Fleckenmuster (engl. „*patchy pattern*“). Über die Zeit betrachtet verharrten die Domänen stabil an ihren Stellen in der PM.

3.3.1.2 Die *Arabidopsis thaliana* Remorine

Als weitere Markerproteine wurden zwei Remorine aus *Arabidopsis* etabliert, das AtRem 1.2 (At3g61260) und das AtRem 1.3 (At2g45820). Beide wurden in der DRM-Fraktion detektiert, zeigen Sterol-Abhängigkeit (Kierszniowska *et al.*, 2009) und sind auf Aminosäure (AS)-Basis zu 62,6% (AtRem 1.2), bzw. zu 63,4% (AtRem 1.3) homolog zu StRem 1.3. Untereinander sind die AtRemorine zu 75% homolog und unterscheiden sich

hinsichtlich ihrer AS-Abfolge hauptsächlich im N-terminalen Bereich. AtRem 1.2 und 1.3 gliedern sich in die gleiche taxonomische Gruppe ein wie das StRem 1.3. Remorine dieser Gruppe 1b sind ausnahmslos mit Membranen assoziiert, stammen aus dikotylen Pflanzen und weisen an den N-Termini zahlreiche Proline auf (Raffaele *et al.*, 2007). Vergleicht man AtRem 1.2, AtRem 1.3 und StRem 1.3 hinsichtlich konservierter Aminosäuren miteinander, so liegt der Wert mit 83% sehr hoch. Die größten Unterschiede sind dabei erneut im Bereich der N-Termini zu finden (vgl. Kap. 3.4, Abb. 14).

Die AtRemorine 1.2 und 1.3 wurden zunächst als fluoreszente Proteinversionen auf ihre subzelluläre Lokalisation hin überprüft (Abb. 7).

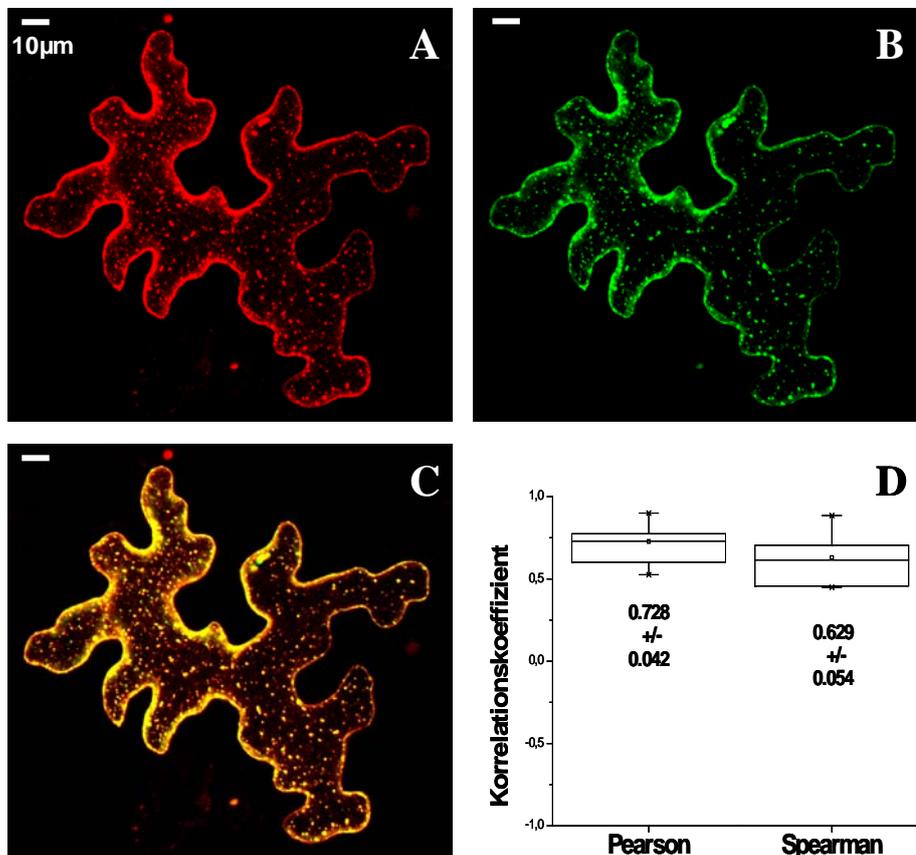


Abb. 7 Transiente Expression in *A. thaliana* Epidermiszellen: dsRed::AtRem 1.3 (A) und eGFP::AtRem 1.2 (B); beide Remorine lagerten sich in Domänen an (C); dabei zeigten sie ein hohes Maß an Kolo-kalisation (D).

Nach der Expression waren deutlich ausgeprägte Domänen auf der Oberfläche der PM zu erkennen (Abb. 7). Diese waren mit AtRem 1.2 (B) als auch mit AtRem 1.3 (A) stark ausgeprägt und zeigten eine ähnlich inhomogene Verteilung in der PM wie eGFP::StRem 1.3 (Abb. 6). In der Überlagerung der Fluoreszenzsignale war eine ausgeprägte Kolo-kalisation beider AtRemorine festzustellen, insbesondere in PM-ständigen Domänen sowie in PM-

Bereichen des Zellrandes (C). Korrelationsanalysen (French *et al.*, 2008; siehe 2.11) bestätigten die Kolo-kalisation, statistisch belegt durch hohe Pearson und Spearman Koeffizienten von 0,728 und 0,629 (Abb. 7, D; n=8).

Um mögliche Einflüsse der Fluorophore auf die (Ko-) Lokalisation der AtRemorine zu untersuchen wurden diese gegeneinander ausgetauscht, die Fusionsproteine exprimiert und erneut Korrelationsanalysen durchgeführt (Abb. 8).

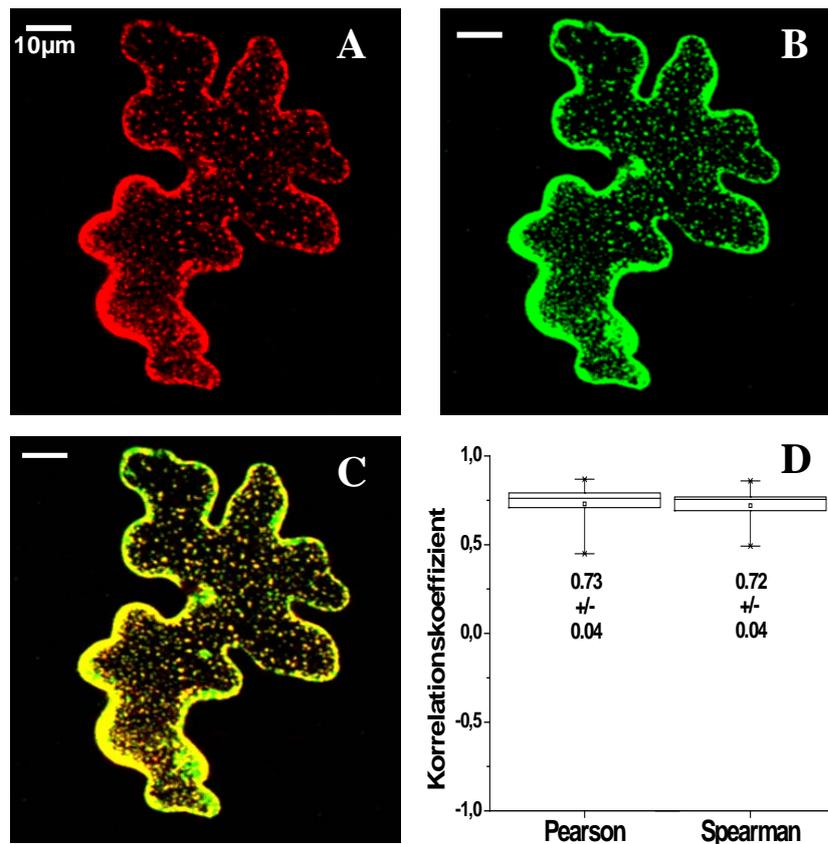


Abb. 8 Ein Austausch der Fluorophore hatte keinen Einfluss auf die Kolo-kalisation der Remorine; dsRed::AtRem 1.2 (A) und eGFP::AtRem 1.3 (B) lagerten sich erneut in Domänen an (C, D).

Nach dem Austausch der Fluorophore und Expression der dsRed::AtRem 1.2 (Abb. 8, A) und eGFP::AtRem 1.3 (B) Konstrukte in Epidermiszellen reicherten sich beide Proteine erneut in Domänen an (C). Zugehörige Korrelationskoeffizienten lagen mit 0,73 (Pearson) und 0,72 (Spearman, Abb. 8, D; n=9) ähnlich hoch wie die in Abb. 7 D (mit 0,728 und 0,629) und deuteten die starke Tendenz der Remorine an, in PM-Domänen zu akkumulieren. Ein Einfluss der Fluorophore auf die subzelluläre Lokalisation wurde nicht festgestellt.

3.3.1.3 Koexpression des *Solanum tuberosum* Remorins mit den *Arabidopsis thaliana* Remorinen

Um zu überprüfen, ob Remorine aus verschiedenen Pflanzenspezies in den gleichen Membrandomänen akkumulieren, wurde StRem 1.3 mit den AtRemorinen koexprimiert.

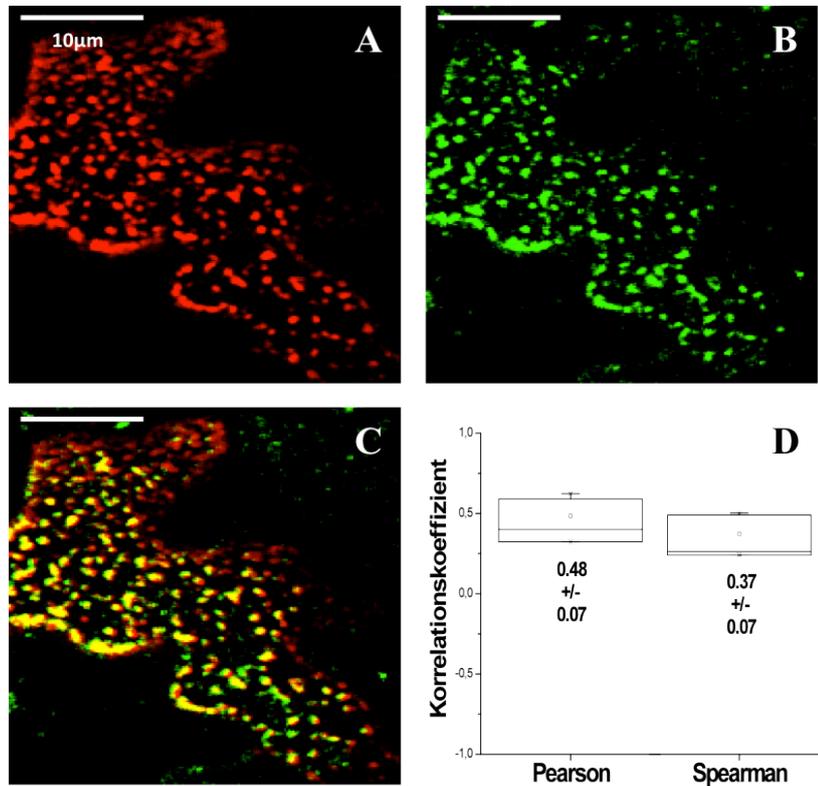


Abb. 9 Expression in *A. thaliana* Epidermiszellen; dsRed::AtRem 1.2 (A) und eGFP::StRem 1.3 (B) zeigten Kolokalisation in PM-Domänen (C, D).

EGFP::StRem 1.3 (Abb. 9, B) und dsRed::AtRem 1.2 (A) akkumulierten erneut in PM-Domänen und zeigten dort Kolokalisation (C, gelbe Bereiche). Korrelationsanalysen ergaben hohe Pearson und Spearman Koeffizienten für diese Proteinkonstellation (D; n=4).

StRem 1.3 zeigte auch mit AtRem 1.3 Kolokalisation in membranständigen Domänen (Abb. 10).

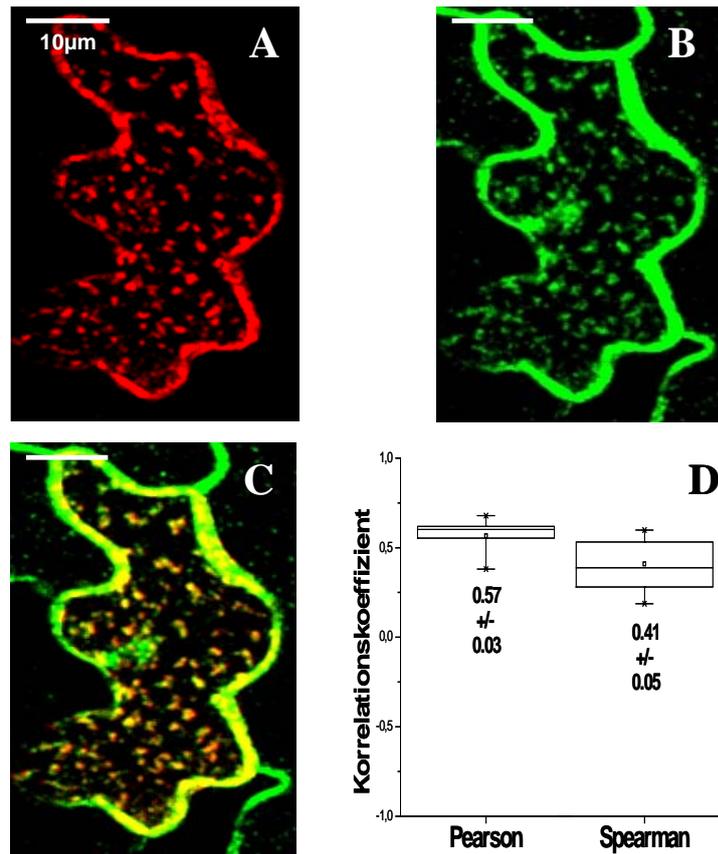


Abb. 10 Transiente Koexpression von dsRed::AtRem 1.3 (A) mit eGFP::StRem 1.3 (B); erneut zeigten die Remorine in den Domänen (C) Kolokalisation (D).

Es wurde eine hohe Korrelation bei Koexpressionen von AtRem 1.3 (Abb. 10, A) mit StRem 1.3 (B) ermittelt. Erneut lagerten sich die aus unterschiedlichen Pflanzenfamilien stammenden Remorine in distinkten PM-Domänen zusammen (C und D; n= 9).

Die Koexpressionsstudien indizierten, dass sich AtRem 1.2 und AtRem 1.3 in Domänen zusammenlagern (Abb. 7 und 8). Wurde das artfremde StRem 1.3 mit einem der AtRemorine zusammen zur Expression gebracht, schienen die Proteine über einen bislang noch unbekanntem Mechanismus in dieselben Membrandomänen rekrutiert zu werden (Abb. 9 und 10). Basierend auf den Korrelationsdaten (Abb. 9 und 10, D) konnten sowohl das StRem 1.3 als auch die AtRemorine 1.2 und 1.3 der taxonomischen Gruppe 1b als Marker für PM-ständige Domänen in Pflanzen herangezogen werden. Möglicherweise sind in solchen Domänen Sterole angereichert, da alle drei Remorine *in vitro* eine starke Sterol-Abhängigkeit zeigten (Kap. 3.2; Raffaele *et al.*, 2009; Kierszniowska *et al.*, 2008).

3.3.2 FRAP-Experimente mit den Remorinen

Beim FRAP (siehe 2.8.3) bleicht man fluoreszenzmarkierte Bereiche der PM über starke Lichtpulse aus und dokumentiert die Rückkehr der Fluoreszenz. Sterol-/Sphingolipid-reiche Areale weisen eine höhere strukturelle Ordnung auf als andere Bereiche der PM (Pike, 2006; Simons und Toomre, 2000; Simons und Ikonen, 1997). An künstlich hergestellten Lipidschichten wurde mittels FRAP gezeigt, dass zunehmende Steroleinlagerungen zu einer Verlangsamung der Diffusionskoeffizienten der Lipide führen (Ladha *et al.*, 1996). Auf Proteinebene wurden in FRAP-Experimenten unter physiologischen Umständen ähnliche Resultate erzielt. Beispielsweise zeigten Raft-assoziierte, integrale Hämagglutinin Proteine eingeschränkte Diffusion im Vergleich zu anderen PM-Bereichen. Nach einer Cholesterinextraktion verschwanden diese Unterschiede in den Diffusionskoeffizienten (Shvartsman *et al.*, 2003). Eine eingeschränkte Diffusion in Sterol-/Sphingolipid-reichen Arealen wurde sowohl für membranassoziierte als auch für transmembrane Proteine beschrieben; dabei können Proteine über Zeiträume von einigen Sekunden bis hin zu mehreren Minuten mit Membrandomänen assoziiert sein (Niv *et al.*, 2002; Schütz *et al.*, 2000; Jacobson und Dietrich, 1999; Sheets *et al.*, 1997). Die Domänen können innerhalb der PM als Einheit beweglich sein (Pralle *et al.*, 2000) oder wie im Falle der Caveolae auch unbeweglich (Thomsen *et al.*, 2002; Pelkmans *et al.*, 2001).

Die Proteinkinetik der Fluoreszenzrückkehr ist von zwei Parametern abhängig, dem Diffusionskoeffizienten $[D]$ und der mobilen Fraktion $[M_f]$. $[D]$ ist ein Maß für die Beweglichkeit von Teilchen und lässt sich anhand der zurückgelegten Wegstrecke des Teilchens (bzw. des Proteins) pro Zeiteinheit ermitteln. Dabei gibt $[D]$ die Diffusionsgeschwindigkeit ohne aktive Transportprozesse an. $[M_f]$ dagegen spiegelt die Fraktion fluoreszenter Komponenten wider, die innerhalb eines bestimmten Zeitraumes in den gebleichten Bereich hinein diffundieren oder auch transportiert werden. Falls ein Proteintransport stattfindet, kann dieser aktiv erfolgen oder anderweitig beschleunigt sein (Lippincott-Schwartz *et al.*, 2001). In FRAP-Versuchen mit einem fluoreszenzmarkierten H-Ras Membran-Ankermotiv wurden *in vivo* tierische *Lipid Raft*-Domänen auf der zytosolischen Seite der PM markiert. Dort existierte eine immobile Fraktion, die über mehrere Sekunden stabil in den Domänen verblieb (Lommerse *et al.*, 2004). Für die Remorine ist kein Membran-Ankermotiv bekannt (Nelson *et al.*, 2006); dennoch waren sie nach der Expression in *Arabidopsis* ausnahmslos an der PM lokalisiert (Abb. 6 und 7). Daher könnten posttranslationale Modifikationen an den Remorinen erfolgen, um Assoziationen mit der PM zu ermöglichen (siehe Kap. 3.4).

Um Rückschlüsse auf vorherrschende Proteinkinetik in den Membrandomänen zu ziehen, wurden transiente Koexpressionen mit den Remorinen in Arabidopsis Epidermiszellen vorgenommen. Durch das Arbeiten mit unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Remorinen war es möglich ein Fluorophor auszubleichen, während das andere als Referenzregion für die Fluoreszenzrückkehr fungierte. Selektiv wurden dsRed- bzw. eGFP-Fluorophore ausgebleicht (Abb. 11 bis 13).

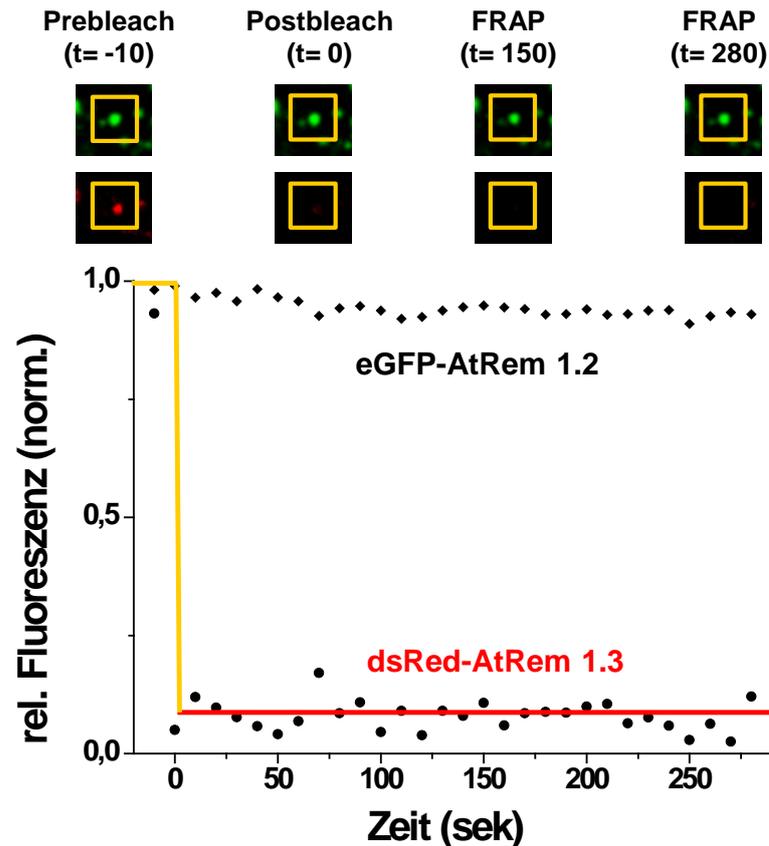


Abb. 11 FRAP des dsRed-Fluorophors in Epidermiszellen, fusioniert ans AtRem 1.3; als Referenzregion für die Fluoreszenzrückkehr dienten eGFP-markierte AtRem 1.2 Proteine (vgl. Insets).

Nach der Kolo-kalisation in Domänen wurde ein Großteil der dsRed-Fluorophore durch Laserpulse ausgebleicht, die relative Fluoreszenz lag knapp über null (Abb. 11, bei $t=0$ sek). Das eGFP blieb nach den Laserpulsen weitestgehend fluoreszent und konnte als Referenzregion für eine Fluoreszenzrückkehr des dsRed-Fluorophors fungieren, welches ans AtRem 1.3 fusioniert war (Abb. 11). Nach dem Ausbleichen kehrte keine Fluoreszenz (dsRed-spezifisch zwischen 580 und 630nm) in die Domänen zurück, die relative Fluoreszenz blieb innerhalb des Detektionszeitraumes von 280 Sekunden stabil auf dem Niveau des Ausgangswertes (bei $t = 0$ sek; $n=4$).

In FRAP Experimenten mit AtRem 1.2 unterblieb die Fluoreszenzrückkehr innerhalb einer Zeitspanne von mehr als 240 Sekunden ebenfalls; als Referenzregion dienten fluoreszente AtRem 1.3-Proteine (nicht gezeigt).

FRAP-Experimente wurden auch mit eGFP::StRem 1.3-Fusionsproteinen durchgeführt. Es wurde ebenfalls keine Fluoreszenzrückkehr detektiert (Abb. 12).

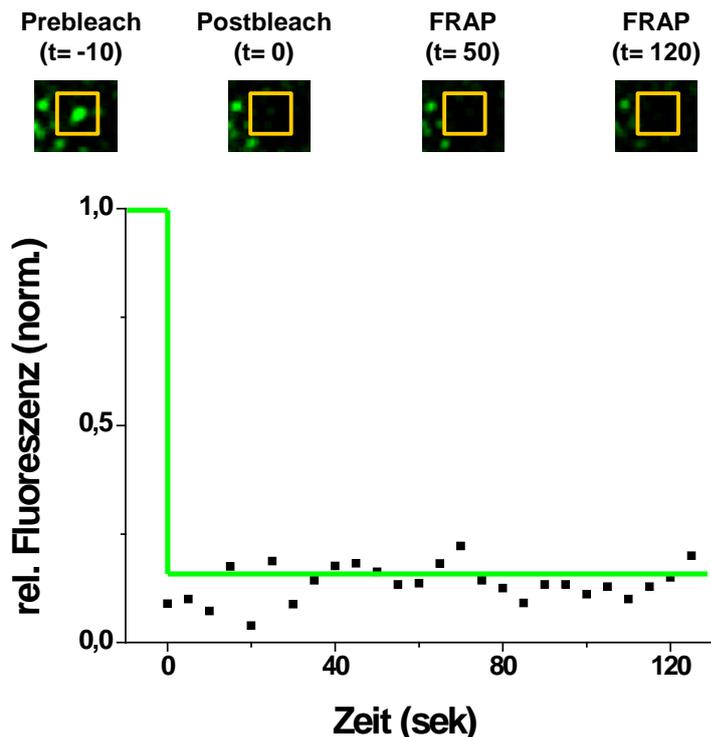


Abb. 12 FRAP des eGFP-Fluorophors in Epidermiszellen, fusioniert ans StRem 1.3; die Fluoreszenz kehrte nicht zurück, sondern verblieb stabil auf dem Ausgangswert nach dem Ausbleichen ($t=0$).

Nach den Laserpulsen hatte die relative Fluoreszenz auf 0,14 abgenommen. Innerhalb des dokumentierten Zeitraums von 130 Sekunden verblieb die Fluoreszenz stabil auf diesem Niveau (Abb. 12; $n=3$).

3.3.2.1 FRAP-Experimente an Protoplasten der transgenen StRemorin 1.3-Linie

Neben FRAP-Versuchen an Epidermiszellen mit intakter Zellwand wurden FRAP-Versuche an Protoplasten durchgeführt, isoliert aus Blättern transgener eGFP::StRem 1.3-Pflanzen. Nach dem vollständigen, enzymatischen Verdau der Zellwand (2.12, Tab. 10) wurden einzelne Domänen in der PM ausgebleicht.

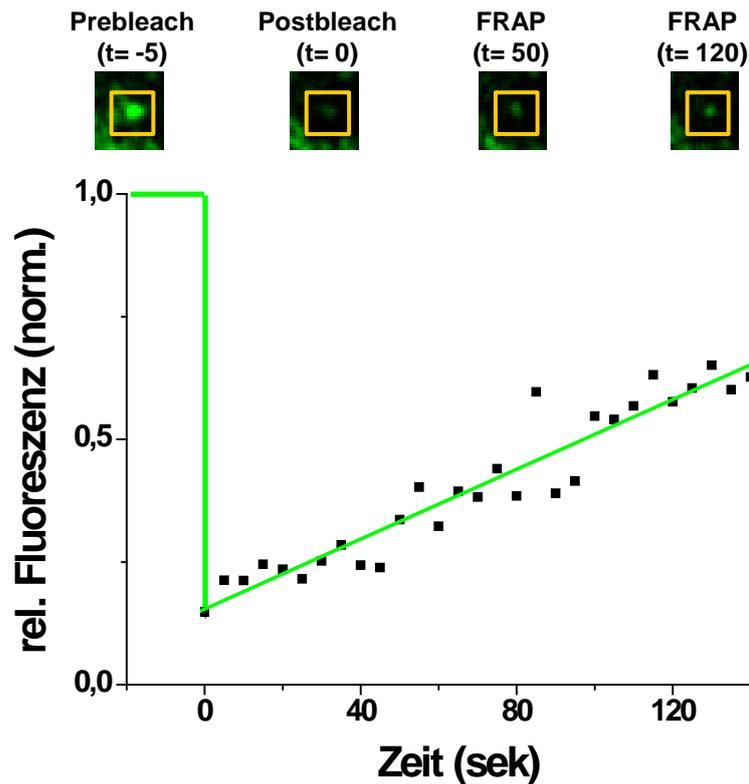


Abb. 13 FRAP Experiment mit eGFP::StRem 1.3-Protoplasten, generiert aus Blättern der stabilen Linie; das Remorin zeigte im Gegensatz zu Zellen mit intakter Zellwand eine partielle Fluoreszenzrückkehr.

Nach dem Ausbleichen von eGFP-Proteinen ging die Fluoreszenz erwartungsgemäß zurück (Abb. 13, $t=0$), stieg danach jedoch sofort wieder an. Die Fluoreszenzrückkehr setzte sich über den gesamten dokumentierten Zeitraum von 130 Sekunden fort und erreichte einen maximalen Fluoreszenzwert von 0,63 (zum Vergleich: 0,15 bei $t=0$). Dies entsprach einer relativen Fluoreszenzrückkehr von 69% und indizierte, dass Remorine in PM-ständigen Domänen in Protoplasten beweglicher waren als in Epidermiszellen mit intakter Zellwand (vgl. Abb. 11 und 12). Die halbmaximale Fluoreszenzrückkehr war nach 106 Sekunden erreicht (Abb. 13; $n=3$). Der Diffusionskoeffizient $[D]$ errechnete sich zu $5,14 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$ (siehe 2.8.3) und könnte andeuten, dass Remorine indirekt mit Komponenten der Zellwand in Verbindung stehen (siehe Diskussion, 4.3.2 und 4.3.2.1).

3.4 Posttranslationale Modifikationen an den Remorinen

Die AtRemorine 1.2 und 1.3 besitzen in ihrer Aminosäuresequenz kein bekanntes Motiv, welches ihnen eine Anlagerung an die PM ermöglichen würde (Online-Datenbank Recherche: www.uniprot.org; Nelson *et al.*, 2006). Zudem besitzen Remorine aufgrund ihrer

Polarität einen eher hydrophilen Charakter (Raffaele *et al.*, 2007). Dennoch erschienen sie nach transients Expression ausnahmslos an der PM (Kap. 3.3.1). Dies ließ vermuten, dass die Remorine entweder posttranslationalen Modifikationen unterliegen, oder an PM-ständige Proteine binden. Bereits in den neunziger Jahren wurde spekuliert, dass der C-Terminus des StRemorins 1.3 aufgrund seiner vorhergesagten „Coiled coil“ Struktur (engl. „coil“: Spule, Wendel) bei der Interaktion mit anderen Makromolekülen eine wichtige Rolle einnehmen könnte (Reymond *et al.*, 1996). Auch könnte dieser Bereich posttranslationalen Modifikationen unterliegen, die eine PM-Anlagerung ermöglichen. Dies war im Einklang mit der Beobachtung, dass sowohl StRem 1.3 als auch AtRem 1.2 und AtRem 1.3 im Zytosol exprimiert waren, sobald deren C-Termini durch Fusion mit fluoreszenten Proteinen artifiziell verlängert wurden (nicht gezeigt). Die C-Termini der Remorine schienen für eine erfolgreiche Anlagerung an die PM essentiell zu sein.

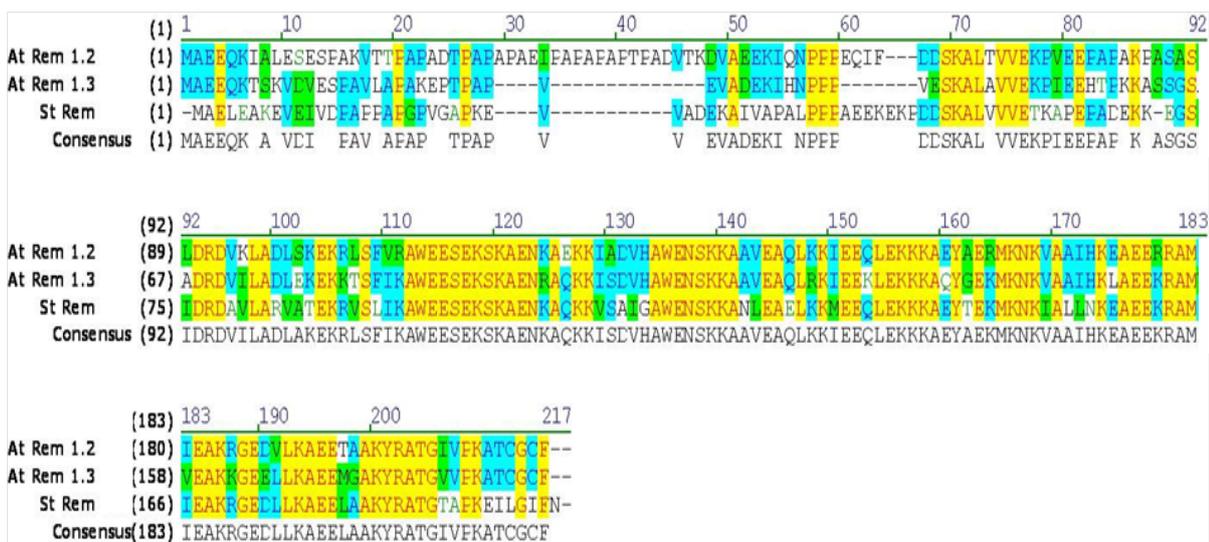


Abb. 14 Aminosäuren-Alignment der Remorine (ohne Stop-Codons).

Aus dem Alignment der Aminosäuren ging hervor, dass die Remorine am N-Terminus weniger stark konservierte Bereiche besitzen als am C-Terminus (vgl. Abb. 14). Ein Alignment des StRemorins mit dem tierischen CAAX-Motiv wies Homologie in der Abfolge C-terminaler Aminosäuren auf (Abb. A3, Anhang A). Daher könnten dort posttranslationale Modifikationen erfolgen, die für die Anlagerung der Remorine an die PM von Bedeutung sind. Das CAAX-Motiv (C: Cystein, A: aliphatische Aminosäure, X: beliebige Aminosäure) ist unter anderem in tierischen Ras-Proteinen (Ras: „*rat sarcoma*“) zu finden, einer Familie von Proto-Onkogenen (Valencia *et al.*, 1991). Ras-Proteine müssen auf der zytosolischen Seite der PM angeheftet sein um biologisch aktiv zu werden (Apolloni *et al.*, 2000). Um dies

zu bewerkstelligen, wird das CAAX-Motiv am Cystein posttranslational farnesyliert, woraufhin die Abspaltung des carboxyterminalen AAX-Restes erfolgt. Im Anschluss daran wird das C-terminale, farnesylierte Cystein carboxylmethyliert. Dadurch entsteht aus einem hydrophilen C-Terminus ein hydrophober. Dieser verankert das Ras-Protein in der Membran (Hancock *et al.*, 1990).

Aufgrund der Homologie zwischen dem StRem C-Terminus und dem CAAX-Motiv (Abb. A3, Anhang A), sowie den stark konservierten C-Termini der Remorine (Abb. 14), wurden C-terminale Deletionsmutanten konstruiert. Weiterhin wurden zwei putative Palmitoylierungsstellen am C-Terminus über einen Aminosäure-Austausch mutiert.

3.4.1 Das *Arabidopsis thaliana* Remorin 1.2

Für AtRem 1.2 wurden drei mutante Proteinversionen generiert. Ein deletiertes AtRem 1.2-d4 Protein, ein Aminosäure-Austausch-Protein (ASA) und ein weiteres Deletionsprotein, AtRem 1.2-d15. Bei den Deletionsmutanten wurden die letzten vier (-d4) bzw. die letzten 15 (-d15) C-terminalen Aminosäuren (AS) deletiert. Im ASA-Protein wurden die beiden Cysteine an den Stellen 209 und 211, die mögliche Palmitoylierungsstellen darstellten, durch Alanine ersetzt (AtRem1.2-C209A-C211A; siehe Abb. 15). Alanine bilden kein bekanntes Motiv für posttranslationale Modifikationen.

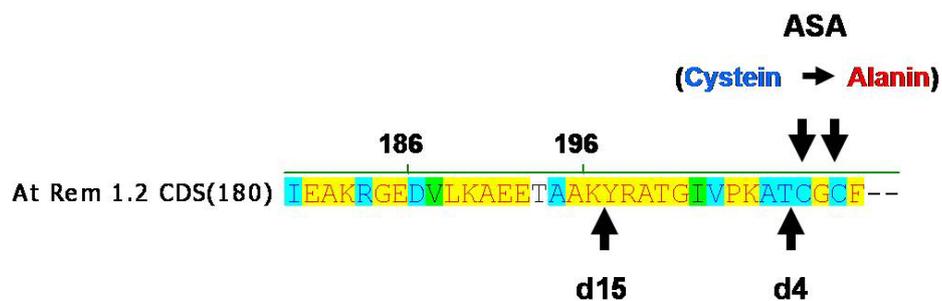


Abb. 15 Überblick über generierte AtRem 1.2-Mutanten (ohne Stop-Codon an Pos. 213).

Die mutanten Proteine wurden in *Arabidopsis* Epidermiszellen exprimiert (Abb. 16).

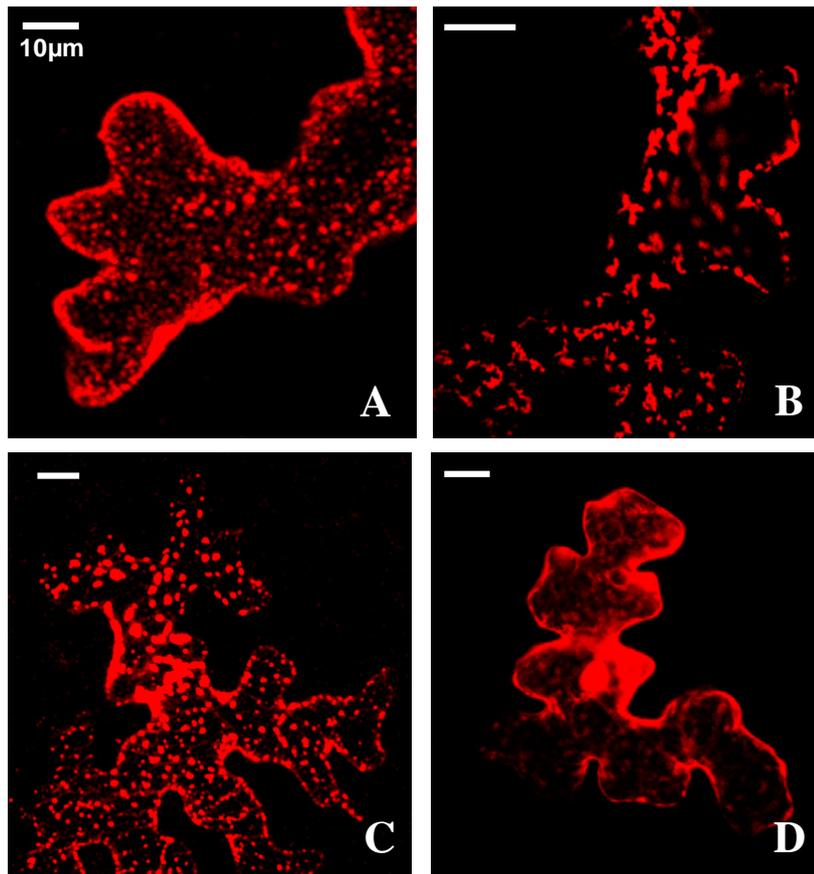


Abb. 16 DsRed::AtRem 1.2-Mutanten *in vivo*: Volllänge (A), d4- (B), ASA- (C) und d15- (D) Mutanten; in der d15-Mutante war das spezifische Fleckenmuster verloren gegangen.

Abbildung 16 zeigt die subzelluläre Lokalisation der AtRem 1.2-Vollänge (A), im Vergleich zu mutanten Proteinversionen (B-D). Nach AtRem 1.2-d4 Expression war eine PM-Lokalisation auszumachen (Abb. 16, B). ASA-Proteine waren ebenfalls an der PM zu finden (C). Gleichzeitig waren Strukturen erkennbar, die auf eine partiell zytosolische Distribution hindeuteten (C; Bildmitte). Im Falle der Deletionsmutante AtRem 1.2-d15 war keine PM-Lokalisation detektierbar; stattdessen zeichneten sich zytosolische Strukturen ab (D, Bildmitte).

Die Mutanten wurden im Anschluss zusammen mit der Volllänge exprimiert, um eine Kolokalisation in Membrandomänen zu prüfen.

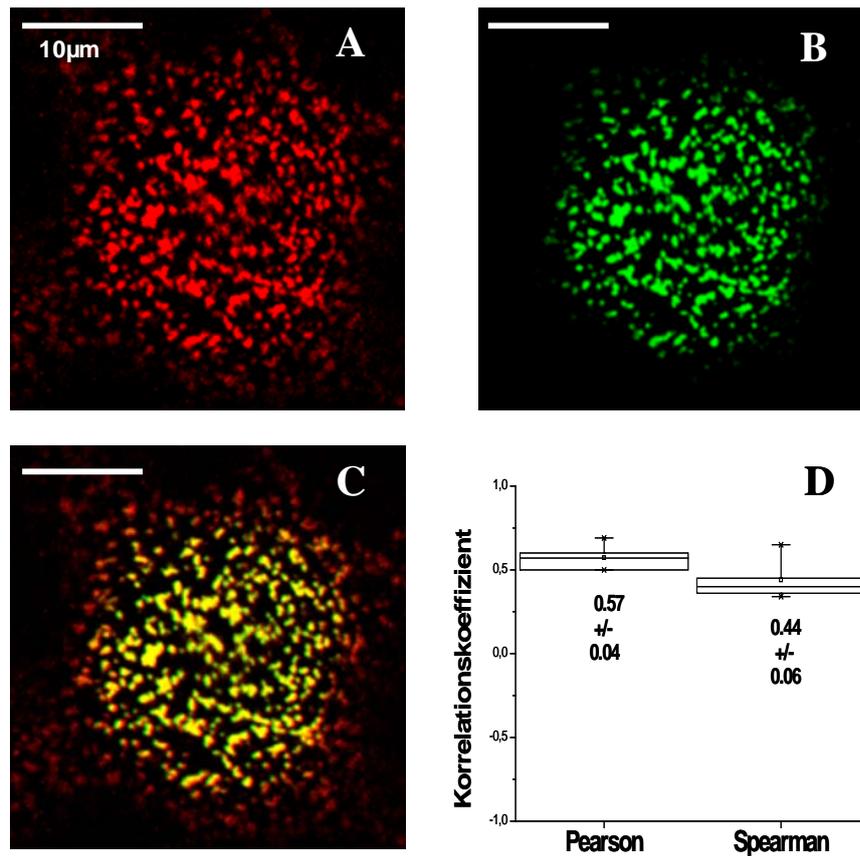


Abb. 17 DsRed::AtRem 1.2-d4 (A) wurde mit der eGFP::AtRem 1.2-Volllänge (B) koexprimiert; beide Proteine zeigten Kolokalisation in Membrandomänen (C, D).

Wurde das Deletionsprotein AtRem 1.2-d4 zusammen mit der Volllänge zur Expression gebracht (Abb. 17, A und B), erfolgte eine Anordnung in PM-ständigen Domänen (C). Die Korrelationskoeffizienten (D; n=5) lagen knapp unter den Werten wildtypischer AtRem 1.2- und AtRem 1.3-Proteine (vgl. Abb. 7).

Eine ähnlich hohe Kolokalisation ergab sich nach der Expression des AtRemorins 1.2 mit der Mutante AtRem 1.2-ASA (Abb. 18).

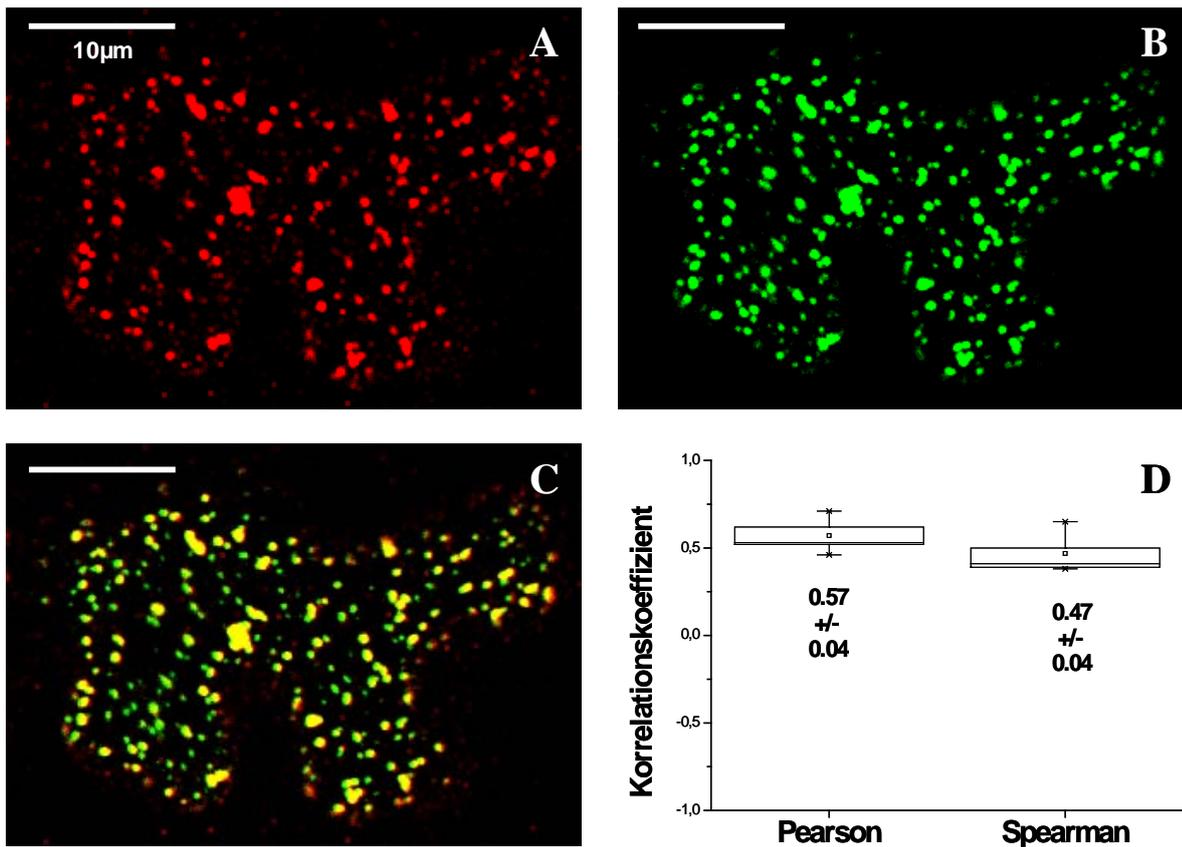


Abb. 18 DsRed::AtRem 1.2-ASA-Mutante (A), koexprimiert mit der eGFP::AtRem 1.2-Vollänge (B); beide Proteine kolokalisierten in PM-ständigen Domänen (C, D).

Im Falle der AtRem 1.2-ASA-Mutante wurden zwei C-terminale Cysteine an der zweit- und der viertletzten Stelle der AS-Folge gegen Alanine ausgetauscht (vgl. Abb. 15). Diese bilden kein bekanntes Motiv für posttranslationale Modifikationen. Die AtRem 1.2-Vollänge wurde ebenfalls exprimiert (B). Trotz des AS-Austausches kolokalisierten AtRem 1.2-ASA und AtRem 1.2 in hohem Maße (C), angezeigt durch die Korrelationskoeffizienten (D; n=6).

Das Deletionsprotein AtRem 1.2-d15 wurde ebenfalls zusammen mit der Vollänge exprimiert und die Korrelationskoeffizienten bestimmt (Abb. 19).

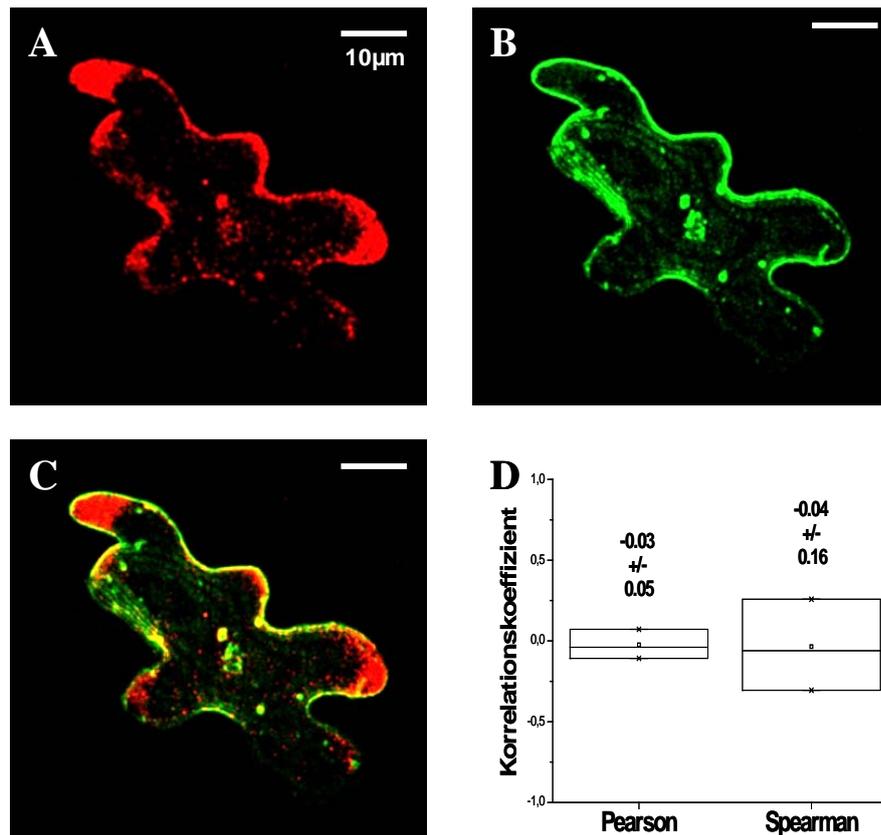


Abb. 19 Wurde die Deletionsmutante dsRed::AtRem 1.2-d15 (A) zusammen mit der eGFP::AtRem 1.2-Volllänge (B) exprimiert, waren beide Proteine nicht kolokalisiert (C, D); eine partiell zytosolische Expression mutanter Proteine war erkennbar.

Nach der Koexpression verblieben AtRem1.2-d15-Proteine im Zytosol; ob ein Teil der Proteine die PM erreicht hatte, war nicht zweifelsfrei festzustellen (Abb. 19, A). FRAP-Versuche blieben jedoch ohne Erfolg, was eine überwiegend zytosolische Lokalisation mutanter Proteine andeutete (siehe auch 2.8.3). Das wildtypische eGFP::AtRem 1.2-Protein war PM-ständig (B), kolokalisierte jedoch nicht mehr mit d15-Proteinen (C). Die Koeffizienten signalisierten, dass die grünen und roten Fluoreszenzsignale nicht miteinander korrelierten (Abb. 19, D; $n=3$) und einer zufälligen subzellulären Verteilung unterlagen (siehe 2.11).

Nach den Experimenten mit Proteinmutanten sollte anhand einer weiteren Methode bewiesen werden, dass sich mutante und wildtypische AtRem 1.2-Proteine in den gleichen Kompartimenten der PM befanden. Auch sollte überprüft werden, ob sich eingeführte Mutationen auf die Dynamik der Remorine in den Domänen auswirkten. Aus diesem Grund wurden FRAP-Experimente (2.8.3) durchgeführt, wiederum in transient transformierten Arabidopsis Epidermiszellen (Abb. 20).

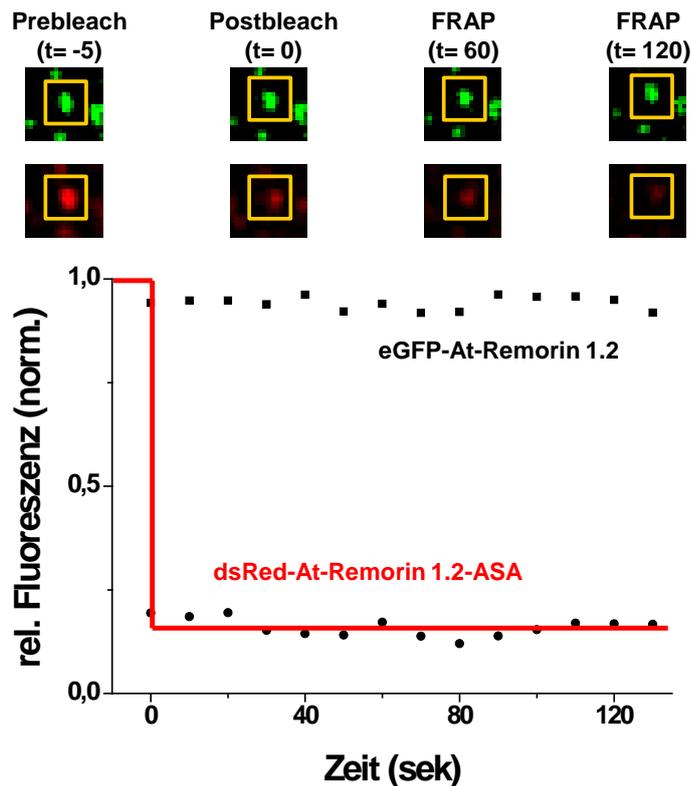


Abb. 20 FRAP des dsRed-Fluorophors; das Vollängenprotein eGFP::AtRem 1.2 diente als Referenzregion für die Fluoreszenzrückkehr; mutante ASA-Proteine zeigten innerhalb des Beobachtungszeitraums keine Fluoreszenzrückkehr.

Nach dem Ausbleichen von dsRed-Fluorophoren kehrte über den dokumentierten Zeitraum von 130 Sekunden keine Fluoreszenz in die Referenzregion zurück (Abb. 20; n=4). Fluoreszente AtRem 1.2-d4-Proteine zeigten in FRAP-Experimenten gleiches Verhalten (nicht gezeigt).

Die eingeführten Mutationen am C-Terminus hatten im Vergleich zum Wildtyp keine über die FRAP-Methodik detektierbaren Auswirkungen auf die Proteindynamik in den Membrandomänen. FRAP-Versuche mit der d15-Mutante schlugen fehl, höchstwahrscheinlich bedingt aufgrund einer zytosolischen Lokalisation.

3.4.2 Das *Arabidopsis thaliana* Remorin 1.3

Neben AtRem 1.2 wurden auch für AtRem 1.3 Proteinmutanten generiert, um putative posttranslationale Modifizierungsstellen zu identifizieren. Aufgrund der Konsensus-Bereiche beider AtRemorine im C-terminalen Bereich (vgl. Abb. 14) wurden beim AtRem 1.3-Protein an entsprechenden Stellen C-terminale Mutationen eingeführt. Die Deletionsmutanten AtRem 1.3-d4 und -d15, sowie die Aminosäure-Austauschmutante AtRem 1.3-ASA (AtRem 1.3-C187A-C189A; Abb. 21) wurden generiert. Zusätzlich wurde eine weitere Mutante

hergestellt, AtRem 1.3-d2. Bei dieser wurden die letzten beiden C-terminalen AS deletiert (Abb. 21).

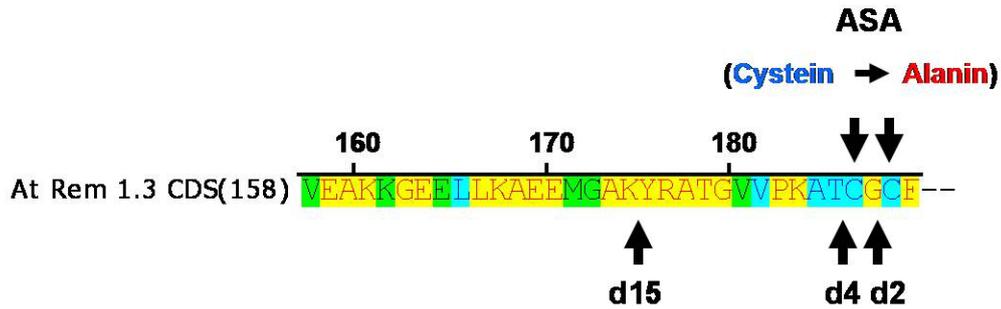


Abb. 21 Überblick über mutante AtRem 1.3-Proteinversionen (ohne Stop-Codon an Pos. 191).

Zunächst wurden die AtRem 1.3-Mutanten separat in *A. thaliana* Epidermiszellen exprimiert (Abb. 22).

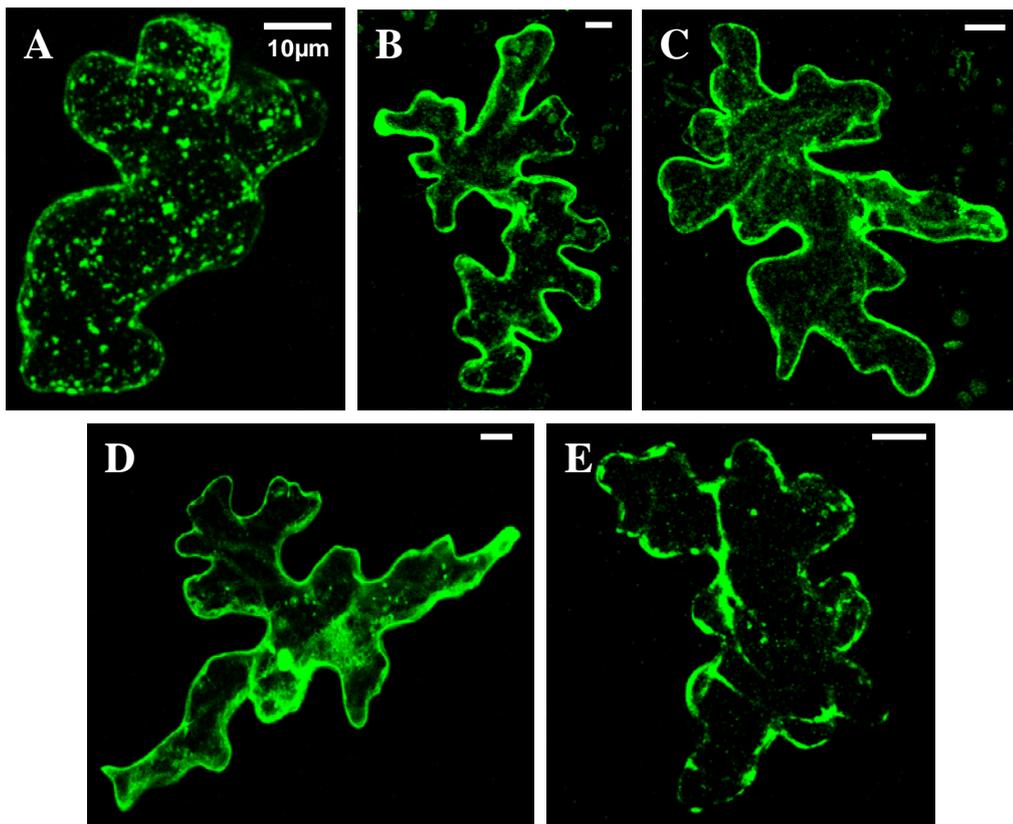


Abb. 22 Die eGFP::AtRem 1.3-Volllänge (A) war an der PM lokalisiert; im Vergleich zur Volllänge zeigten die Proteinmutanten eGFP::AtRem 1.3-d2 (B), -d4 (C), -ASA (D) und -d15 (E) allesamt eine zytosolische Lokalisation.

Im Gegensatz zu AtRem 1.2-Mutanten (vgl. Abb. 16) gelangten AtRem 1.3-Mutanten nicht an die PM (Abb. 22, B-E). Während das Vollängenprotein PM-Ständigkeit zeigte (A), verblieben sowohl die Deletionsmutanten AtRem 1.3-d2, -d4, -d15 (B, C, E), als auch die

ASA-Mutante (D) im Zytosol. Es waren keine Domänen erkennbar. Ein Indiz für die PM-Ständigkeit von Proteinen ist, dass man sie über starke Laserpulse ausbleichen kann (2.8.2). Mutante AtRem 1.3-Proteinversionen ließen sich nicht ausbleichen (nicht gezeigt).

Erfolgte eine gleichzeitige Koexpression des AtRem 1.3-Vollängenproteins, kehrten mutante Proteinversionen an die PM zurück. Zunächst wurde die Kolo­kalisierung der AtRem 1.3-Vollänge mit der d2-Deletionsmutante untersucht.

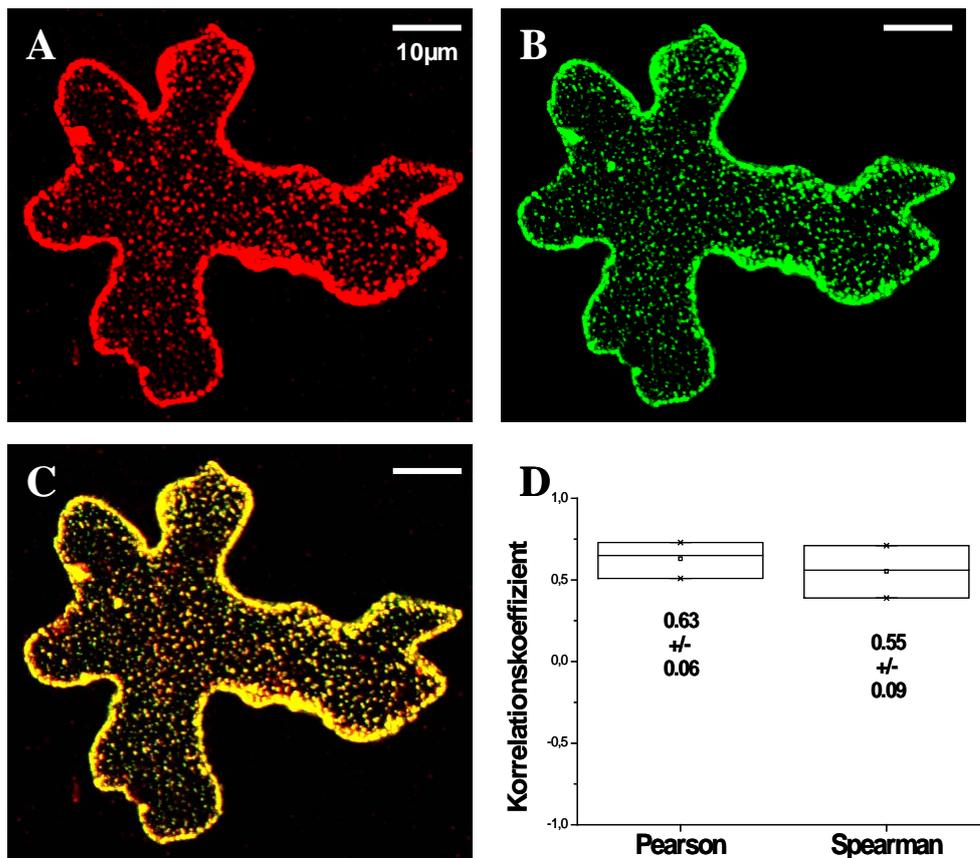


Abb. 23 DsRed::AtRem 1.3-Vollänge (A), koexprimiert mit eGFP::AtRem 1.3-d2 (B); die gleichzeitige Expression der Volllänge brachte das mutante Protein an die PM zurück (C); dort kolokalisierten beide Proteine in Domänen (D).

Das dsRed::AtRem 1.3-Vollängenprotein war an der PM lokalisiert (Abb. 23, A). Die eGFP::AtRem 1.3-d2-Mutante hingegen verblieb nicht länger im Zytosol (vgl. Abb. 22, B), sondern zeigte wie das wildtypische Protein ein Fleckenmuster an der PM (Abb. 23, B). In der Überlagerung der Fluoreszenzbilder erschienen die Domänen in einem gelben Farbton (C; Falschfarbe). In diesen Bereichen waren beide Proteine kolokalisiert, indiziert durch hohe Pearson und Spearman Koeffizienten von 0,63 und 0,55 (Abb. 23, D; n=3).

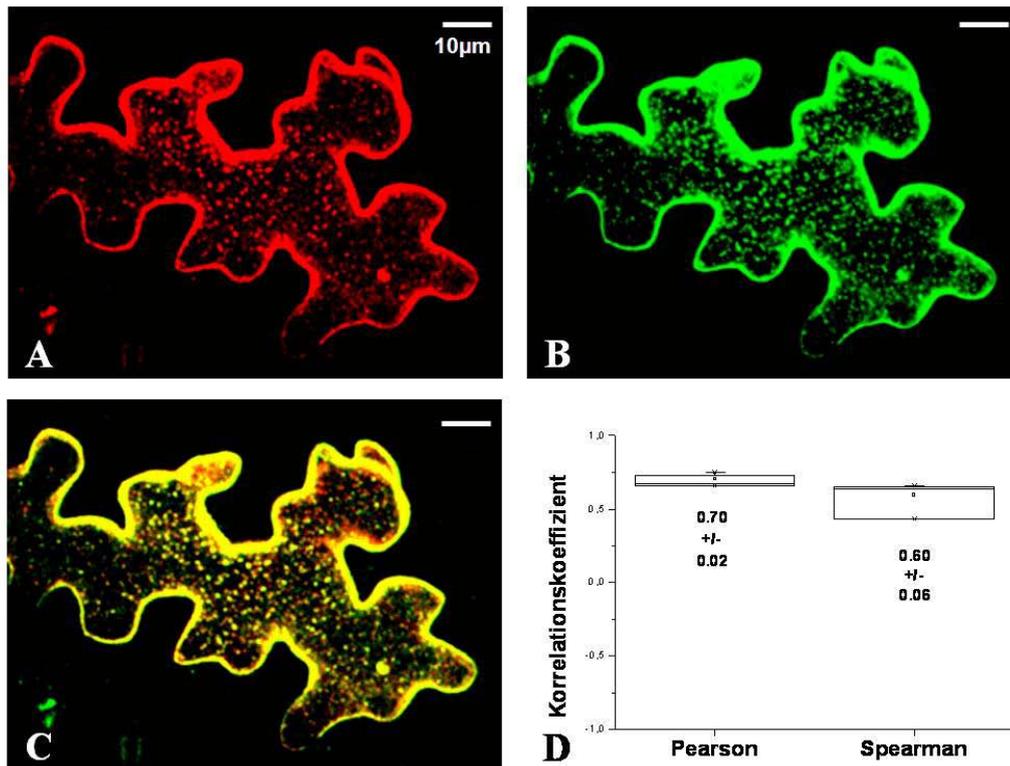


Abb. 24 DsRed::AtRem 1.3-Vollänge (A), koexprimiert mit der Deletionsmutante eGFP::AtRem 1.3-d4 (B); wiederum führte die Koexpression der Vollänge zu einer Rückkehr mutanter Proteine an die PM (C, D).

Auch nach Koexpression von dsRed::AtRem 1.3 (Abb. 24, A) mit der eGFP-markierten Mutante AtRem 1.3-d4 (B) lagerten sich die Proteine in Membrandomänen an (C). Einhergehende Korrelationskoeffizienten lagen bei 0,7 (Pearson) und 0,6 (Spearman, D; n=4).

Gleicher Sachverhalt zeigte sich bei der Koexpression nativer AtRemorin 1.3-Proteine mit der Aminosäure-Austauschmutante AtRem 1.3-ASA (Abb. 25, A und B).

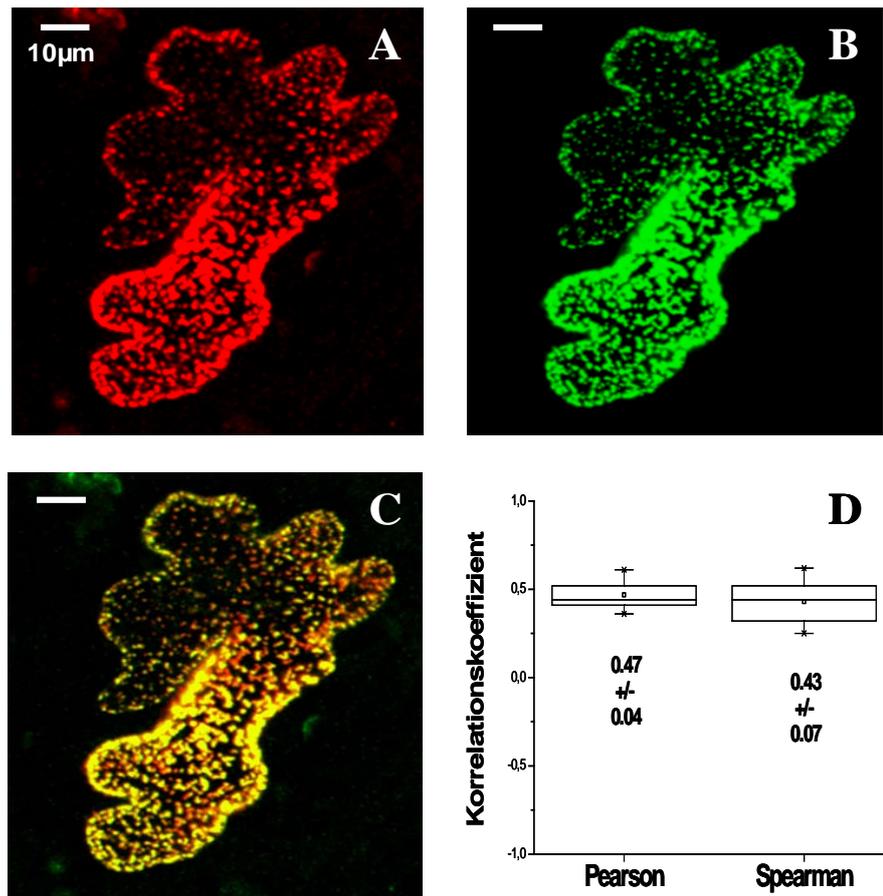


Abb. 25 Die dsRed::AtRem 1.3-Vollänge (A), koexprimiert mit der eGFP::AtRem 1.3-ASA-Mutante (B); beide Proteine kolokalisierten an der PM (C, D).

Hohe Korrelationskoeffizienten (Abb. 25, D; $n=4$) sowie der gelbe Farbton in der Überlagerung der Einzelfluoreszenzen (C) deuteten eine Kolokalisation mutanter ASA-Proteine mit der AtRem 1.3-Vollänge an. Die im Zytosol lokalisierten ASA-Proteine (vgl. Abb. 22, D) wurden unter dem Einfluss der Vollänge über einen unbekanntem Mechanismus an die PM rekrutiert.

Zu guter Letzt erfolgte die Koexpression der AtRem 1.3-Vollänge mit der d15-Mutante (Abb. 26).

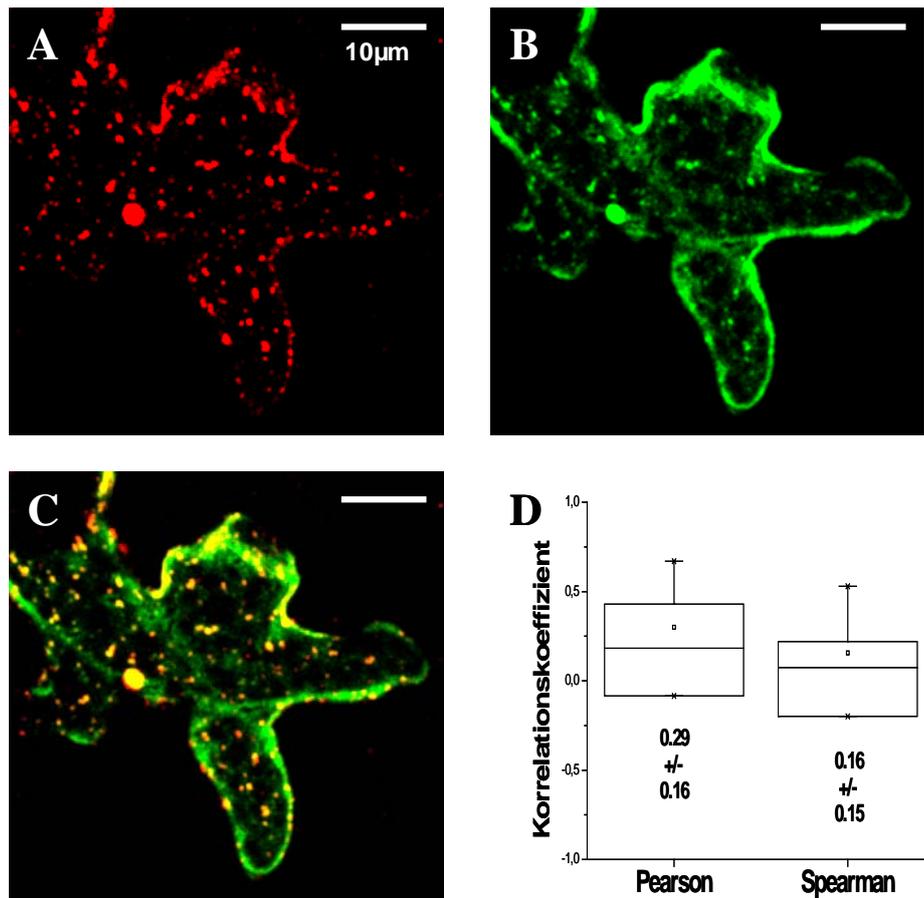


Abb. 26 DsRed::AtRem 1.3-Vollänge (A), koexprimiert mit eGFP::AtRem 1.3-d15 (B); partielle Lokalisation des d15-Proteins an der PM; dort kolokalisierten mutante Proteine mit der Vollänge (C, D). Die deutlich sichtbaren zytosolischen Strukturen in (B) und (C) deuteten an, dass nicht alle mutanten Proteine die PM erreichten.

Die eGFP::AtRem 1.3-d15-Mutante zeigte bei alleiniger Expression eine zytosolische Lokalisation (Abb. 22, E). Erfolgte eine simultane Expression der Vollänge (Abb. 26, A), gelangte ein Teil der d15-Proteine an die PM (B). Zur gleichen Zeit waren zytosolische Strukturen sichtbar (B und C). Kalkulierte Korrelationskoeffizienten lagen bei 0,29 (Pearson) bzw. 0,16 (Spearman; Abb. 26, D; $n=4$). Dabei lag die Standardabweichung in beiden Koeffizienten sehr hoch (gleiche Abb.). Dies indizierte, dass ein Teil der mutanten Proteine mit wildtypischen AtRem 1.3-Proteinen in PM-Domänen kolokalisierte, während der andere Teil eine zytosolische Expression zeigte und nicht mit der Vollänge kolokalisiert war.

Um die PM-Ständigkeit der Mutanten zu testen und gegebenenfalls Unterschiede hinsichtlich der Proteindynamik im Vergleich zum Wildtyp aufzudecken, wurden FRAP-Experimente durchgeführt. Sowohl die d2-, die d4- als auch die ASA-Mutante ließen sich bei gleichzeitiger Koexpression der dsRed::AtRem 1.3-Vollänge ausbleichen. Auch der PM-ständige Teil der d15-Mutante konnte ausbleichen werden. Dabei zeigte keines der mutanten

Proteine eine Fluoreszenzrückkehr (Abb. 27, FRAP-Graph der eGFP::AtRem 1.3-d4 Deletionsmutante; n=3; d2-, d15- und ASA-Mutanten nicht gezeigt).

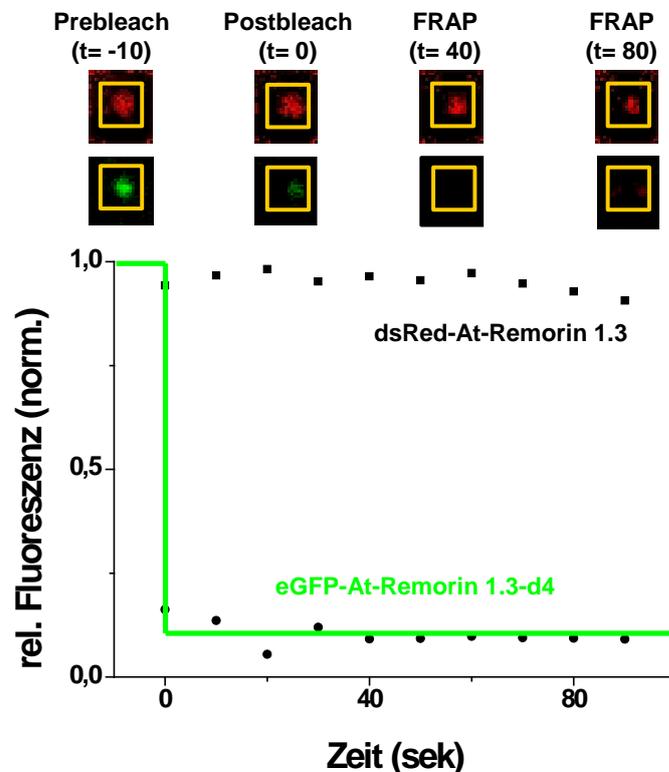


Abb. 27 FRAP der eGFP::AtRem 1.3-d4-Proteinmutante; es kehrte keine Fluoreszenz in den ausgebleichten Bereich zurück.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die ausschließlich am C-Terminus veränderten AtRem 1.3-Mutanten allesamt einer zytosolischen Lokalisation unterlagen (Abb. 22). Erfolgte die gleichzeitige Expression der AtRem 1.3-Volllänge, zeigten untersuchte Mutanten eine Lokalisation in PM-ständigen Domänen (Abb. 23 bis 25). Dort ließen sie sich ausbleichen (Abb. 27). Eine Ausnahme bildete die d15-Mutante (Abb. 26), bei der sich entsprechend nur der PM-ständige Teil der Proteine ausbleichen ließ. Die Mutationen nahmen keinen Einfluss auf die Proteindynamik; wie bereits zuvor in Experimenten mit den Remorin-Vollängenproteinen festgestellt, erfolgte keine Fluoreszenzrückkehr (vgl. Abb. 11 und 12).

Es konnte nicht abschließend geklärt werden, auf welche Weise die Proteinmutanten ihren Weg zurück an die PM fanden. Jedoch könnten Interaktionen mit Vollängenproteinen eine mögliche Ursache hierfür sein (siehe Diskussion, 4.4).

3.5 Stimulierte Emission-Depletion Mikroskopie (STED)

Mit dem Remorin als etabliertem Markerprotein für PM-ständige Domänen wurde die Größe dieser Bereiche bestimmt. Die Strukturen lagen deutlich unter der Auflösungsgrenze konfokaler Systeme, was eine präzise Größenbestimmung mit herkömmlichen LSM-Systemen unmöglich machte.

Mit Hilfe der stimulierten Emission-Depletion Technik (STED; Hell 2003; Klar *et al.*, 2000; Hell und Wichmann, 1994) ist es möglich, die Abbesche Auflösungsgrenze zu unterschreiten (siehe 2.8.4). Mit modernen STED-Systemen lassen sich Auflösungen von unter 10nm erzielen (Rittweger *et al.*, 2009). Um biologische Proben mit dem STED-Mikroskop (*TCS STED*; Leica Microsystems) vermessen zu können, mussten diese mit geeigneten Antikörpern wie dem rot fluoreszierenden Atto647N angefärbt werden (siehe 2.7 ff). Dessen Fluorophor ist zu einem hohen Grad photostabil, um die bei der STED-Mikroskopie auftretenden hohen Lichtintensitäten von bis zu 3 GW/cm² (Klar *et al.*, 2000) für geraume Zeit ohne sofortiges Ausbleichen zu tolerieren.

3.5.1 Visualisierung pflanzlicher Membrandomänen mittels STED

Mit dem verwendeten STED-Mikroskop ließen sich in entsprechend behandelten Proben (2.7 ff) Strukturen von bis zu 60nm noch auflösen (Abb. A4, Anhang A). Hierzu wurde Mesophyllgewebe aus Blättern der transgenen eGFP::*StRem* 1.3-Linie eingebettet und geschnitten (2.7.1), um das Gewebe für nachfolgende Antikörper (AK)-Behandlungen zugänglich zu machen. Das Anfärben des Blattgewebes erfolgte mit primären anti-eGFP- und sekundären Atto647N-Antikörpern (2.7.2). Danach wurden die Proben auf Objektträgern fixiert (2.7.3) und konnten mit dem STED-Mikroskop vermessen werden. Über transiente Transformationsansätze wäre die Detektion von Membrandomänen mittels STED nur schwer erreichbar gewesen, da die Transformationseffizienz zu niedrig lag um transformierte Zellen nach AK-Behandlung und anschließender Fixierung auf den Objektträgern wieder zu finden.

In Abb. 28 ist die Aufnahme einer AK-markierten PM-Oberfläche einer Mesophyllzelle gezeigt. In Abb. (A) im regulären LSM-Modus ohne zugeschalteten Depletionslaser. In Abb. 28 (B) ist derselbe PM-Bereich gezeigt, mit zugeschaltetem Depletionslaser im STED-Modus.

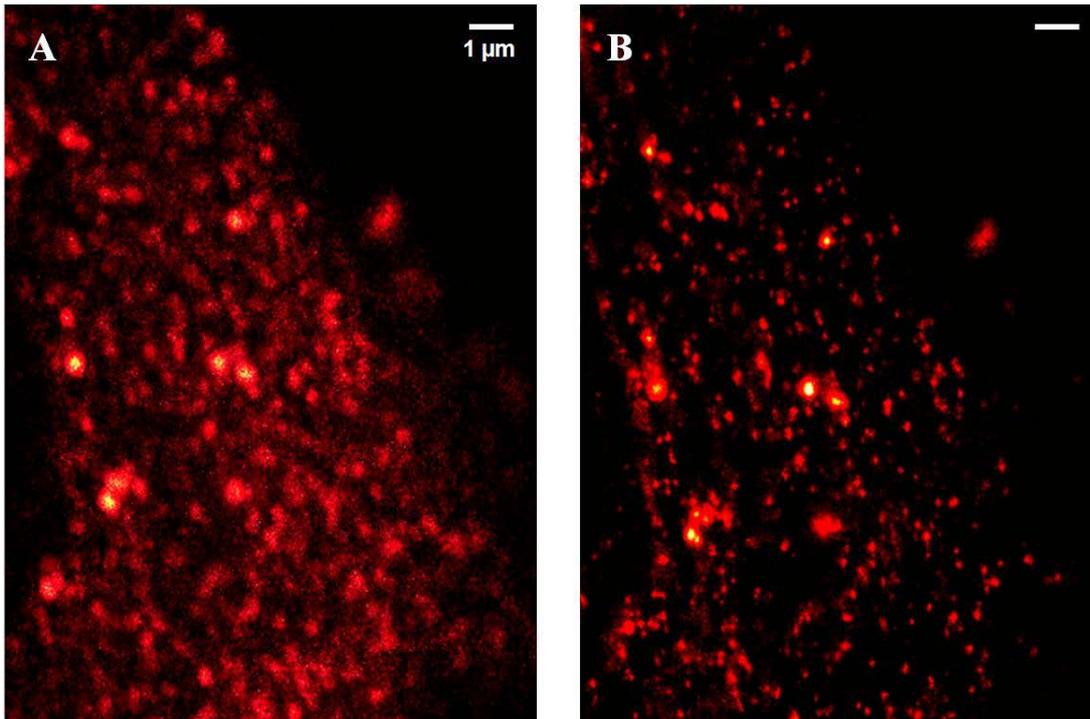


Abb. 28 Konfokale- (A) und STED-Aufnahme (B) pflanzlicher Membrandomänen; die Wirkung des Depletionslasers auf das Auflösungsvermögen wurde deutlich und ermöglichte Superresolution (B).

Während beide Aufnahmen eindrücklich das Remorin-spezifische Fleckenmuster in der PM zeigen, sind die Strukturen in (B) unter Verwendung des Depletionslasers um ein Vielfaches feiner aufgelöst als in (A). Auch war das Hintergrundrauschen in (B) im Vergleich zu (A) nahezu verschwunden, was eine präzise Größenanalyse der Domänen ermöglichte.

3.5.2 STED-basierte Größenbestimmung der Membrandomänen

Um die Größenbestimmung der Domänen erfolgreich durchführen zu können musste sichergestellt sein, dass die STED-Fluoreszenzsignale aus den vermessenen Geweben spezifisch waren und nicht durch Eigenfluoreszenz oder sonstige Artefakte entstanden. Um dies sicherzustellen wurde zunächst eine Kollokalisationsanalyse des roten (resultierend vom Atto674N-AK) und des grünen Signals (resultierend von eGFP::StRem 1.3-Fusionsproteinen) im konfokalen LSM-Modus durchgeführt (Abb. 29).

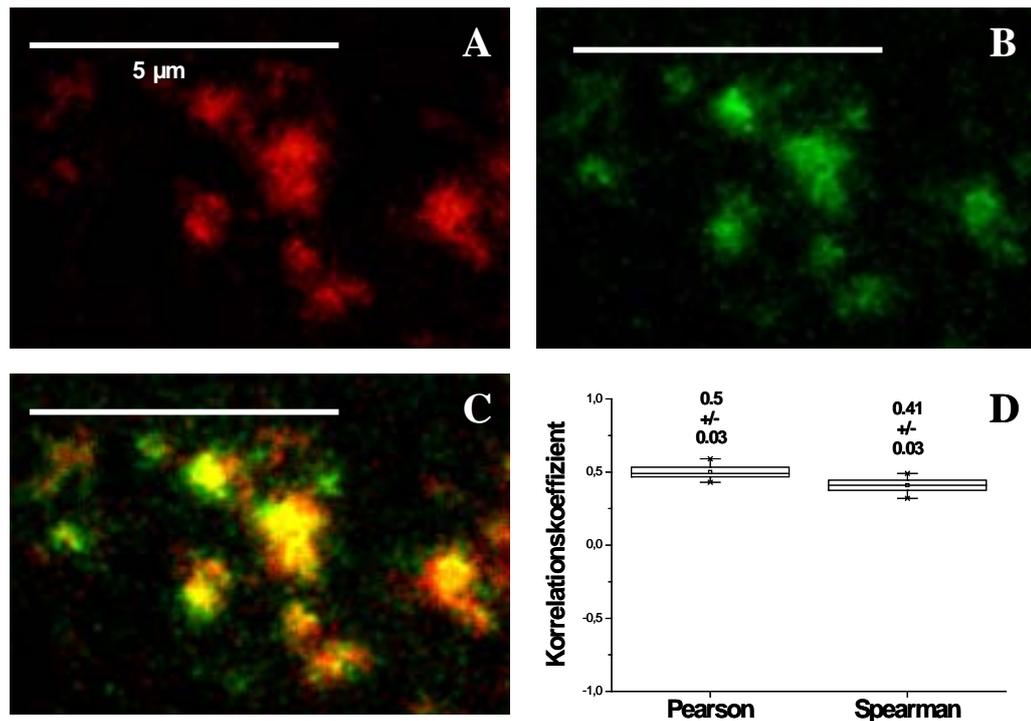


Abb. 29 Korrelationsanalyse: eGFP::StRem 1.3 (A) und Atto647N (B); beide Signale überlappten (C); die Koeffizienten indizieren eine hochspezifische AK-Bindung ans eGFP (D).

Die eGFP- und Atto647N-Signale wurden bei entsprechenden Anregungswellenlängen aufgenommen (Abb. 29, A und B; siehe 2.8 ff). Hohe Pearson und Spearman Koeffizienten (D; n=4) zeigten an, dass beide Signale überlappten. Dies indizierte eine hochspezifische Bindung des sekundären Antikörpers (Atto647N) an den primären (anti-eGFP). Dennoch lagen die Korrelationskoeffizienten deutlich unter eins (Abb. 29, D; siehe auch 2.11). Die abgebildeten Membranstrukturen lagen unterhalb der Auflösungsgrenze des Systems, welches im konfokalen LSM-Modus betrieben wurde, um die eGFP-Fluoreszenz durch eine Inbetriebnahme des STED-Lasers nicht auszubleichen. Hierdurch war die Auflösung auf ca. 220nm beschränkt, die Punkte erschienen aufgrund der sehr hohen Vergrößerung nicht mehr voneinander getrennt und wurden ungenau abgebildet (Abb. 29). Dies beeinflusste das Ergebnis der Kollokalisierung negativ.

Um die Spezifität der Fluoreszenzsignale aus den Proben mit einer weiteren Methode zu verifizieren, wurde zusätzlich zur Kollokalisationsanalyse eine „Line Analysis“ (dt.: Linienanalyse) zufällig ausgewählter Domänen durchgeführt. Grüne eGFP- und rote Atto647N-Signale wurden im konfokalen *Multitrack*-Modus (2.8.1.4) aufgenommen (Abb. 30). EGFP-markierte Regionen wurden vermessen (Abb. 30, A; weiße Linien) und die jeweiligen Bildpositionen gespeichert, um exakt dieselben Regionen in der akquirierten Atto647N-LSM-Aufnahme (B) wieder zu finden und dort entsprechend zu vermessen. Die Durchmesser der

Domänen wurden übereinander aufgetragen und zeigten eine nahezu perfekte Übereinstimmung (Abb. 30, C). Die roten und grünen Signale stammten aus denselben Domänen.

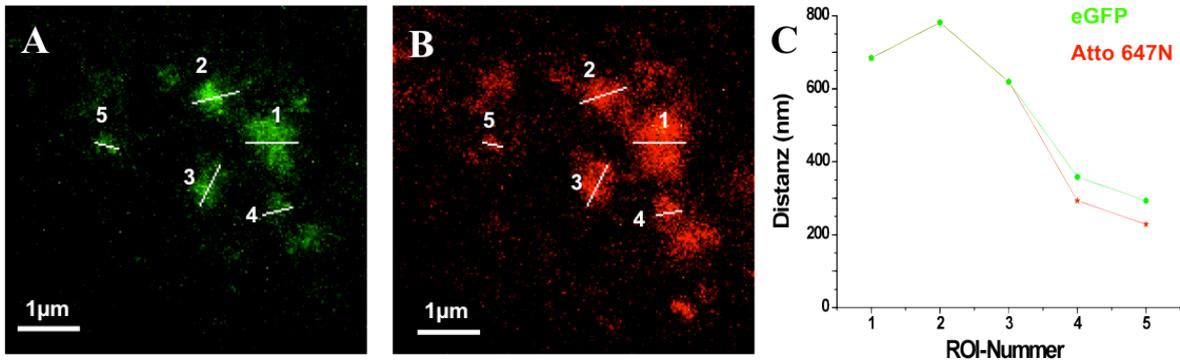


Abb. 30 „Line Analysis“ des konfokalen eGFP- (A) und Atto647N-Signals (B); die AK-Bindung an das eGFP erfolgte hochspezifisch, beide Fluoreszenzsignale überlappten (C).

Durch die „Line Analysis“ konnte der Grad an Überlappung zwischen beiden Signalen dargestellt werden (Abb. 30, C), ohne die automatisierten Algorithmen der Kollokalisationsanalyse zu verwenden. Aus verschiedenen Gewebeproben wurden von diversen grün (eGFP) bzw. rot (Atto647N) markierten Bereichen die Durchmesser bestimmt und deren Werte nebeneinander aufgetragen (Abb. 31; n=17), wie in Abb. 30 exemplarisch dargestellt. Alle Aufnahmen wurden im konfokalen LSM-Modus akquiriert.

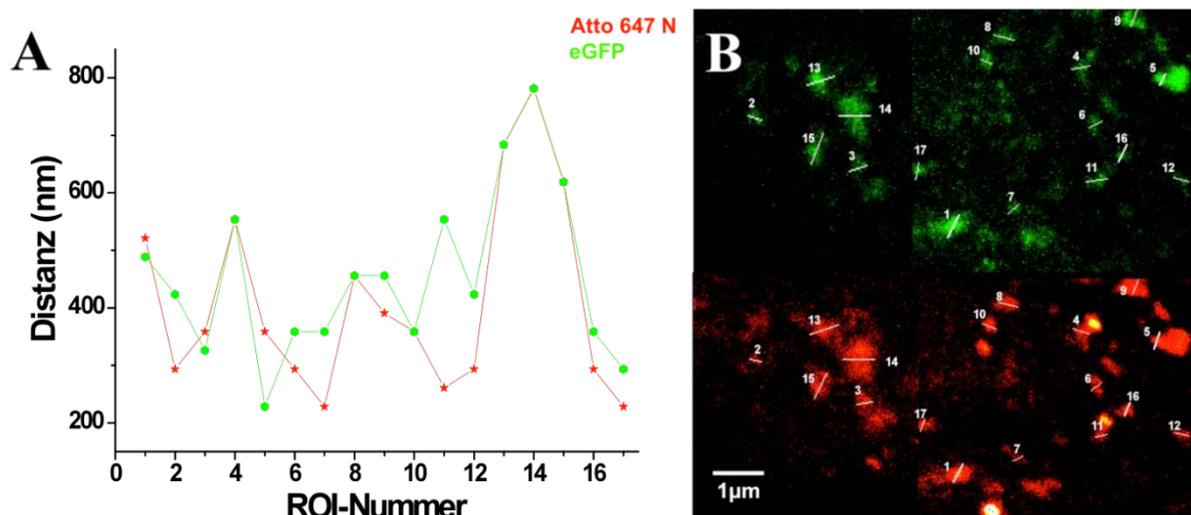


Abb. 31 „Line Analysis“; (A): ermittelte Durchmesser der Domänen, nebeneinander aufgetragen; (B): zugehörige ROI's; das eGFP-Signal überlappte mit dem Atto647N-Signal, die AK-Bindungen erfolgten hochspezifisch.

Die Signale waren erneut zu einem hohen Grad deckungsgleich (>80%; Abb. 31). Die Durchmesser sind gegen die vermessenen Domänen (engl.: „regions of interest“, ROI's; Abb.

31, A) aufgetragen. Neben den Korrelationsanalysen (Abb. 29) indizierten auch die Linienanalysen (Abb. 30, 31) die hochspezifische Atto647N-Bindung an eGFP::StRem 1.3.

Nachdem sichergestellt war, dass das Atto674N-Signal mit dem eGFP-Signal übereinstimmt, wurde damit begonnen die Membrandomänen zu vermessen. Dies geschah anhand akquirierter STED-Aufnahmen mit der Software *LAS AF* (Leica Microsystems; Abb. 32). Für die Vermessung wurden ROI's aus konfokal generierten Aufnahmen ausgewählt, gespeichert und vermessen (Abb. 32, A). Dieselben ROI's wurden dann nach Zuschaltung des Depletionslasers im STED-Modus erneut vermessen (B). Die ermittelten Größen der ROI's im konfokalen und im STED-Modus wurden miteinander verglichen um sicherzustellen, dass es sich nicht um Artefakte handelte, z.B. um autofluoreszierende subzelluläre Strukturen. Es wurden möglichst vereinzelt gelegene Domänen in der PM ausgewählt, um deren individuelle Größen so exakt wie möglich zu bestimmen (Abb. 32).

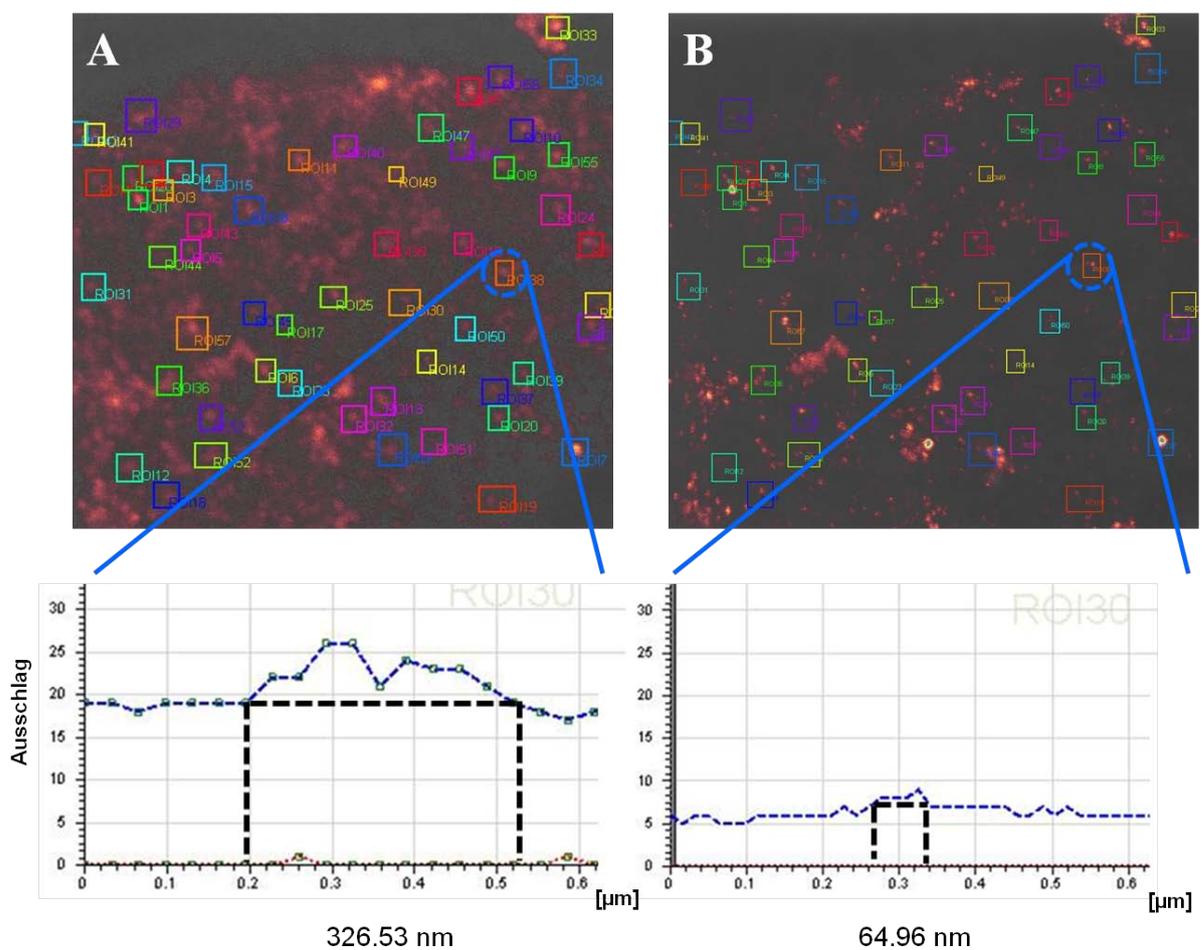


Abb. 32 Größenbestimmung der Domänen mit der *LAS AF*-Software, ermittelt anhand ausgewählter ROI's; **oberer Bildbereich (A)**: Größenmessung einer einzelnen Domäne (ROI) im konfokalen Modus; **(B)**: Größenbestimmung derselben Domäne im STED-Modus. **Unterer Bildbereich**: exemplarische Darstellung der ROI; die Größe der Domäne im konfokalen Modus betrug 326,53nm; im STED-Modus 64,96nm.

Um zu überprüfen, ob die gemessenen Durchmesser die tatsächlichen Größenverhältnisse reflektieren, wurden die Bereiche mit weiteren Programmen analysiert und daraus resultierende Daten miteinander verglichen. Für die Vermessung der Domänen wurde neben der Software *LAS AF* das „open source“ Programm *Image J* (V1.37c), sowie *Volocity 64x* (Improvision) verwendet. Des Weiteren wurde ein Plotprofil erstellt, um den STED-Effekt und die dadurch bedingte bessere Auflösung mit der konfokalen Aufnahme vergleichen und graphisch darzustellen zu können (Abb. 33). Die Auflösungsgrenze des verwendeten STED-Mikroskops lag bei 60nm (siehe Anhang A, Abb. A4).

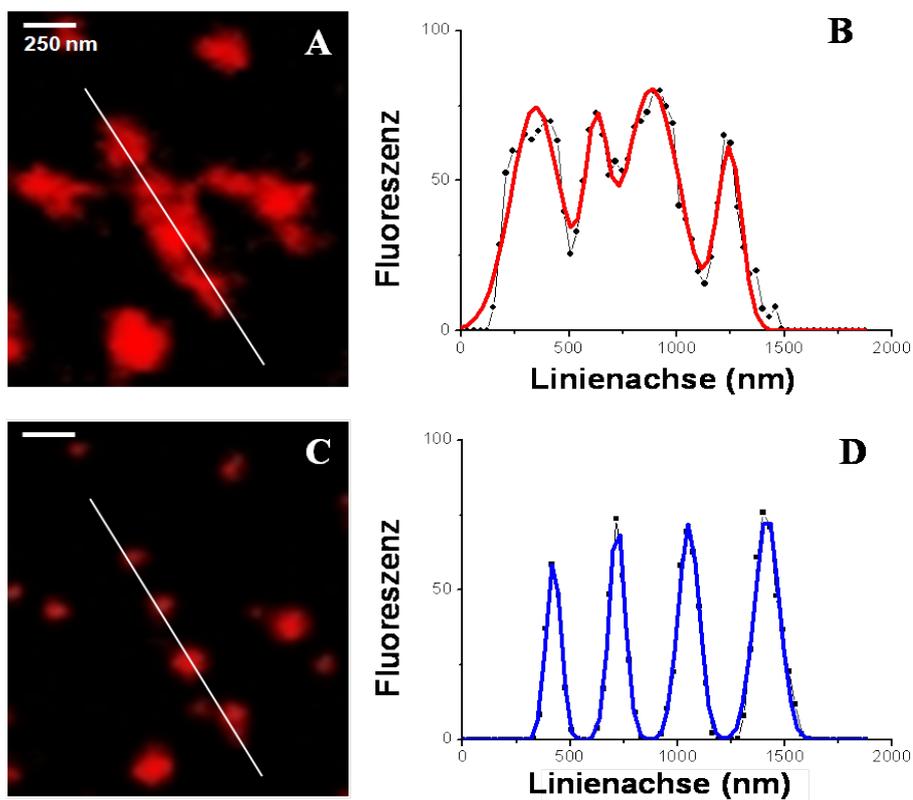


Abb. 33 Plotprofile, konfokaler Modus (A, B) und STED-Modus (C, D); das verbesserte STED-Auflösungsvermögen wurde anhand der reduzierten Durchmesser der Membrandomänen ersichtlich (D).

Obige Abbildung zeigt denselben Membranbereich, akquiriert im konfokalen Modus (A), sowie mit zugeschaltetem Depletionslaser im STED-Modus (C). Ebenso wie bei der Größenbestimmung mit *LAS AF* (Abb. 32) wurden die in den verschiedenen Modi generierten Aufnahmen miteinander verglichen. In Abb. 33 sind die Plotprofile von vier nebeneinander liegenden Domänen aufgetragen (entlang den weißen Linien in Abb. 33, A und C), im konfokalen Modus (B) und im STED-Modus (D). Es wird deutlich, dass diese Bereiche in der konfokal akquirierten Aufnahme nicht weiter aufgelöst werden können (A und B). Die

Wirkung des Depletionslasers auf die Auflösung wird anhand des STED-Bildes und des zugehörigen Plotprofils ersichtlich (Abb. 33, C und D); die Strukturen erscheinen getrennt voneinander als einzelne Domänen.

Unter Verwendung dreier unabhängiger Programme (*LAS AF*, *Image J* und *Velocity 64x*) zur Validierung der individuellen Durchmesser der Membrandomänen wurde folgende durchschnittliche Größenverteilung ermittelt (Abb. 34).

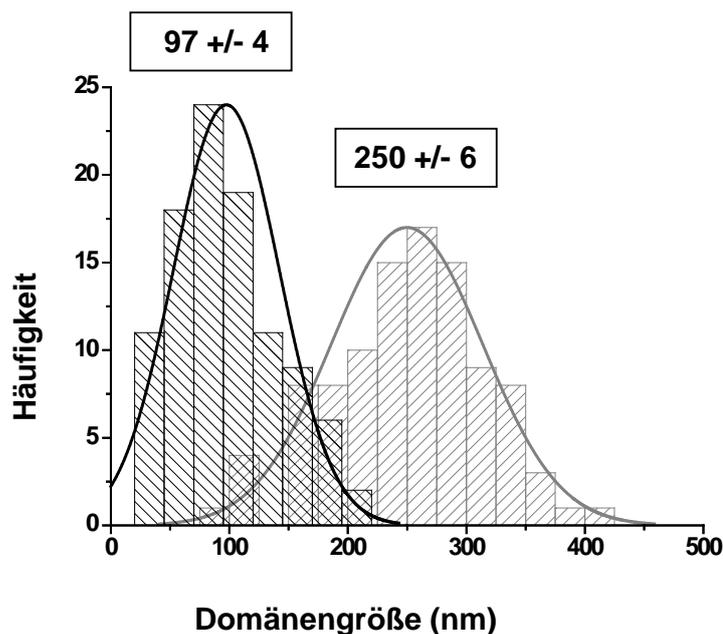


Abb. 34 Größenverteilung der Membrandomänen in Arabidopsis Blättern; (**links**): STED-Modus; (**rechts**): konfokaler Modus.

Abb. 34 zeigt die empirische Größenverteilung PM-ständiger Nanodomänen in Blättern der transgenen eGFP::StRem 1.3-Linie (vgl. Abb. 1). Die im konfokalen Modus ermittelte Größe (rechts) lag mit einem Durchschnitt von 250 ± 6 nm über der Abbeschen Auflösungsgrenze verwendeter *Laser Scanning*-Mikroskope von ca. 220 nm (*LSM 5 Pascal*; *SP5*). Mit der STED-Technik (links) konnte die Größe weiter verifiziert werden und lag im Durchschnitt bei 97 ± 4 nm, bei einem Auflösungsvermögen des STED-Mikroskops von 60 nm (siehe Abb. A4, Anhang A). Im Vergleich zu anderen hochauflösenden Techniken wie beispielsweise der REM-Mikroskopie war für die STED-Mikroskopie kein Überschichten der Proben oder eine Trocknung nötig. Lebendes Gewebe konnte direkt eingebettet und im Anschluss daran über Antikörper markiert werden (siehe 2.7 ff). Daher entspricht die ermittelte Größenverteilung mit hoher Wahrscheinlichkeit der *in vivo* Situation dieser Domänen in Plasmamembranen von *Arabidopsis thaliana* ($n > 100$).

3.6 DRM-Proteine *in planta*

Die Remorine stellten sich als zuverlässige *in vivo* Markerproteine für Membrandomänen heraus (Kap. 3.3). Nun sollten mögliche physiologische Aufgaben dieser kompartimentierten Bereiche erforscht werden. Im Projekt A3 des Graduiertenkollegs 1342 „Lipid Signaling“ der Univ. Würzburg wurden Proteine der Arabidopsis DRM-Fraktion isoliert und massenspektrometrischen Analysen unterzogen. In diesen Analysen wurden sowohl die kalziumaktivierte Proteinkinase CPK21 („calcium activated protein kinase 21“; At4g04720) als auch die Abscisinsäure-regulierte Proteinphosphatase ABI1 („ABA-insensitive 1“; At4g26080) gefunden (F. Demir, persönliche Mitteilung). Beide Proteine sind an der Regulation des Anionenkanals SLAH3 beteiligt (*Slac1 Homologue 3*; At5g24030; Geiger *et al.*, 2009). SLAH3 repräsentiert eines von vier Homologen des SLAC1-Gens. SLAC1 („slow anion associated 1“; At1g12480) ist am Stomaschluß in Arabidopsis beteiligt (Negi *et al.*, 2008), indem dieser Anionenkanal Chlorid und Nitrat aus den Schließzellen befördert (Vahisalu *et al.*, 2008). Daher könnten die Domänen eine Rolle bei der ABA-vermittelten Trockenstressantwort einnehmen.

SLAH3, CPK21 sowie ABI1 wurden *in planta* zusammen mit den Remorinen koexprimiert und der Grad an Koloekalisation anhand der Pearson und Spearman Koeffizienten bestimmt (French *et al.*, 2008; siehe auch 2.11). Zur besseren Darstellung von Proteinkoloekalisationen sind in den folgenden Abbildungen alle YFP-Fluoreszenzsignale in einem grünen Farbton dargestellt.

3.6.1 Der Anionenkanal SLAH3

Der transmembrane Anionenkanal SLAH3 ist ubiquitär in *A. thaliana* Geweben zu finden (Geiger *et al.*, 2011) und ist neben Chlorid und Nitrat permeabel für Malat, Fumarat und Kalium (Geiger *et al.*, 2009). SLAH3 ist ein Homolog des schließzellspezifisch exprimierten SLAC1-Kanals (Negi *et al.*, 2008). Für SLAC1 und SLAH3 konnte eine Aktivierung durch die Proteinkinasen CPK21 und CPK23 aus der CDPK-Familie gezeigt werden. Die Koexpression der ABI1-Phosphatase bzw. dem ABI2-Homolog führte in TEVC-Messungen in *Xenopus*-Oozyten zu einer Inaktivierung des SLAH3-Kanals, höchstwahrscheinlich durch eine ABI1-vermittelte Deaktivierung von CDPK-Kinasen (Geiger *et al.*, 2010). Sowohl ABI1 als auch CPK21 wurden in DRM-Isolationen detektiert (F. Demir, persönliche Mitteilung).

Aufgrund der postulierten Interaktion von regulatorischen Proteinen der DRM-Fraktion mit SLAH3 sollte ein *in vivo* Ansatz Aufschluss darüber erbringen, ob sich SLAH3 in PM-

Domänen anlagert. In zwei separaten Ansätzen ein SLAH3::YFP-Konstrukt mit dsRed::AtRem 1.2 bzw. mit dsRed::At-Rem 1.3 in Arabidopsis Epidermiszellen zur Expression gebracht.

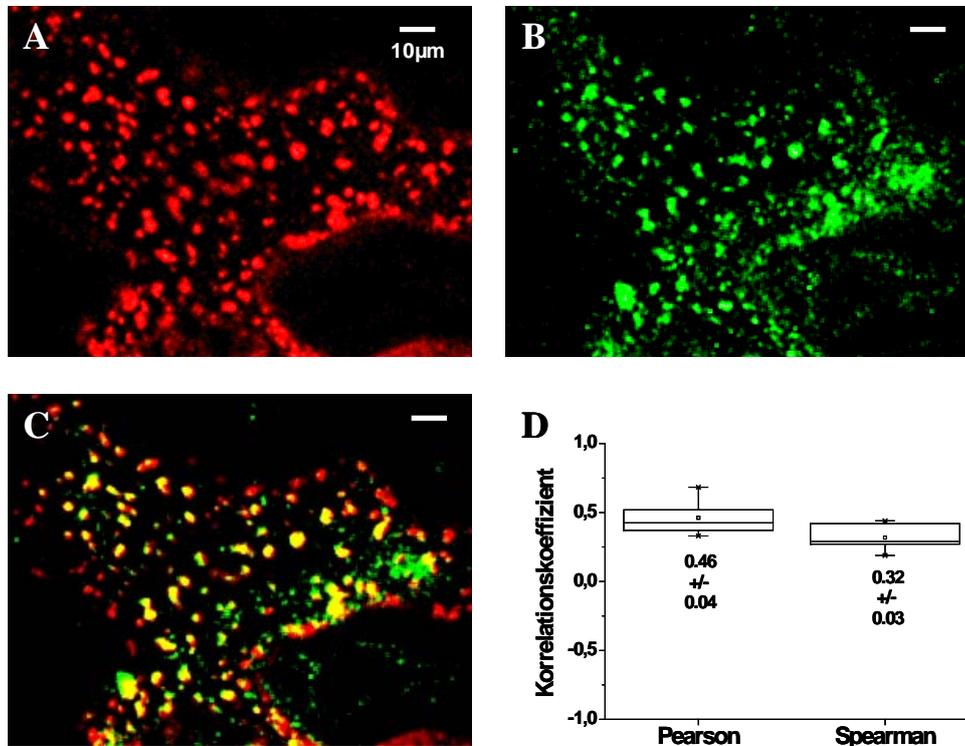


Abb. 35 Etabliertes Markerprotein dsRed::AtRem 1.2 (A) und SLAH3::YFP (B); die Proteine kolokalisierten in PM-ständigen Domänen (C), was ermittelte Korrelationskoeffizienten belegten (D).

AtRem 1.2 zeigte das charakteristische „*patchy pattern*“ in der PM (Abb. 35, A). SLAH3 war ebenfalls inhomogen in der PM verteilt (B) und zeigte Kolokalisation mit AtRem 1.2 (C, gelbe Bereiche; Falschfarbe). Die Korrelationskoeffizienten (D; n=7) lagen niedriger als bei der transienten Koexpression zweier Remorine (Abb. 7 bis 10), indizierten aber die Tendenz von SLAH3 mit AtRem 1.2 in Membran-Nanodomänen zu kolokalisieren.

Wurde das SLAH3::YFP-Fusionsprotein alleine exprimiert war ebenfalls ein Fleckenmuster in der PM sichtbar (siehe Anhang A, Abb. A5). Jedoch erschienen die Domänen nicht so deutlich ausgeprägt wie in Abb. 35 (B). Es war davon auszugehen, dass ein Großteil der Domänen in Abb. A5 unter der Auflösungsgrenze von ca. 220nm lag; die Strukturen ließen sich nicht zufriedenstellend mit den LSM-Systemen auflösen.

In einem weiteren Ansatz wurde SLAH3::YFP zusammen mit AtRem 1.3 exprimiert (Abb. 36).

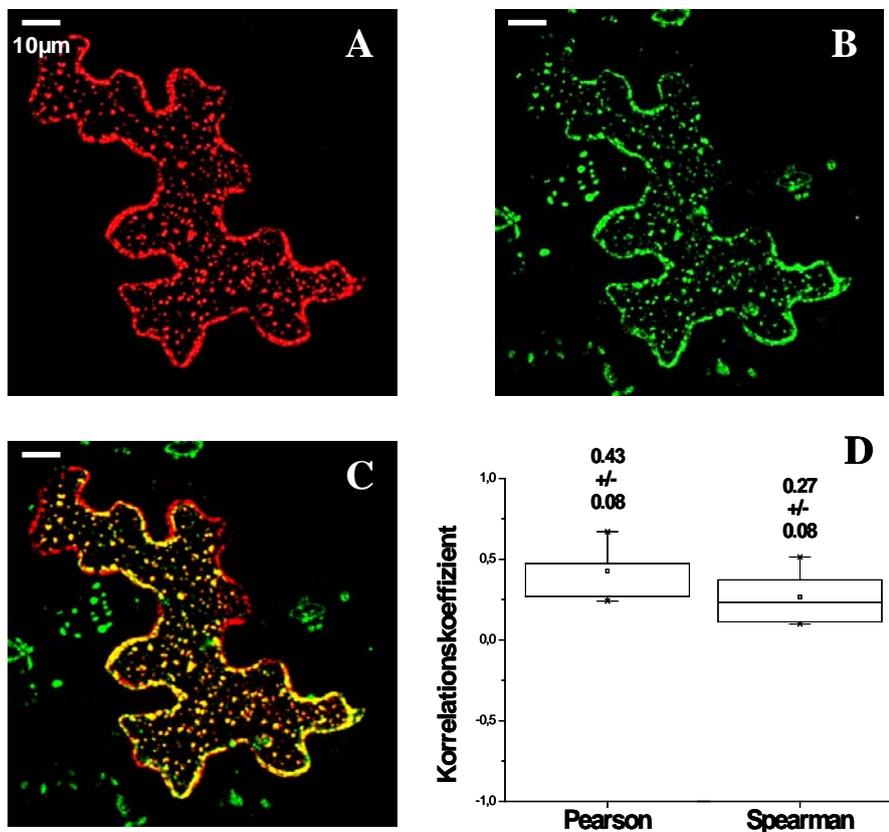


Abb. 36 DsRed::AtRem 1.3 (A) und SLAH3::YFP (B) zeigten in *A. thaliana* Epidermiszellen Kolokalisation in PM-Domänen (C und D).

AtRem 1.3 zeigte erneut das „*patchy pattern*“ (Abb. 36, A). Der Anionenkanal SLAH3 war wie bereits zuvor in Koexpressionen mit AtRem 1.2 (Abb. 35) ungleichmäßig in der PM verteilt (Abb. 36, B). In der Überlagerung beider Fluoreszenzsignale fielen zahlreiche gelb erscheinende Domänen auf (C; Falschfarbe). Die Korrelationsanalyse ergab Koeffizienten von 0,43 (Pearson) und 0,27 (Spearman) und zeigte damit die Tendenz beider Proteine an, miteinander zu kolokalisieren (D; n=5).

SLAH3-Proteine zeigten in Koexpressionsstudien mit beiden Arabidopsis Remorinen eine ausgeprägt inhomogene Verteilung in der PM. Kolokalisationsanalysen belegten die Tendenz des SLAH3-Anionenkanals, sich *in planta* in Remorin-markierten Nanodomänen anzureichern (Abb. 35 und 36).

3.6.2 Die kalziumaktivierte Proteinkinase CPK21

CPK21 ist eine kalziumaktivierte Serin-Threonin-Proteinkinase aus der CDPK-Familie („*calcium-dependend protein kinases*“), welche in Arabidopsis aus 34 Genen besteht. CDPK-Proteinkinasen werden überall im Pflanzenreich gefunden, angefangen bei den Grünalgen bis hin zu den Angiospermen. Für ein Mitglied der CDPK-Familie aus *Daucus carota* konnte *in vitro* gezeigt werden, dass dessen kalziumabhängige Substratphosphorylierung durch Anwesenheit spezifischer Lipide noch gesteigert wurde. Dabei könnten unterschiedliche CDPK-Kinasen ein unterschiedliches Set an Lipiden benötigen (Farmer und Choi, 1999). CPK21 und die homologe CPK23-Kinase (At4g04740) sind unter anderem an der Regulierung von Anionenkanälen wie SLAC1 und dessen Homolog SLAH3 beteiligt (Geiger *et al.*, 2010). CPK21 wurde in der DRM-Fraktion detektiert und verschwand nach MCD-Behandlung aus dieser (F. Demir, persönliche Mitteilung). Wie im Falle der Remorine (vgl. Kap. 3.2) deutete dies eine mögliche Sterol-Abhängigkeit der Kinase an.

Zunächst wurde CPK21 als YFP-Fusionsprotein zusammen mit je einem der beiden AtRemorine in Arabidopsis Epidermiszellen zur Expression gebracht. Zuerst erfolgte die Koexpression mit AtRem 1.2 (Abb. 37).

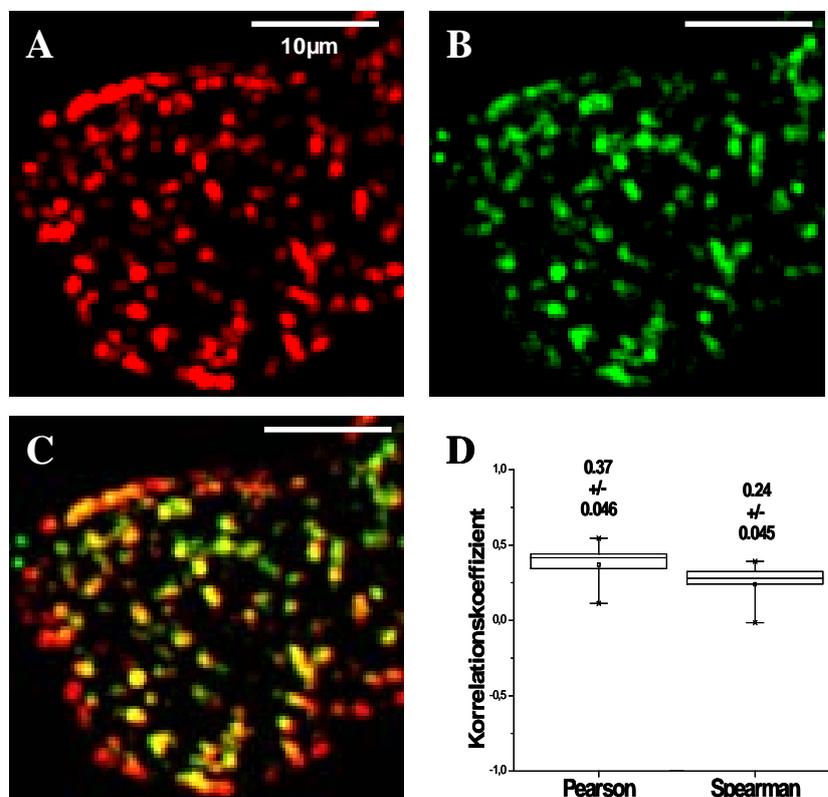


Abb. 37 DsRed::AtRem 1.2 (A), koexprimiert mit CPK21::YFP (B) in Arabidopsis Epidermiszellen. CPK21-Proteine kolokalisierten mit AtRem 1.2 in PM-Domänen (C, D).

Ein Großteil der CPK21::YFP-Proteine (Abb. 37, B) kolokalisierte mit AtRem 1.2 (A) in Membran-Nanodomänen (C). Einhergehende Korrelationskoeffizienten lagen bei 0,37 bzw. 0,24 (D; n=9).

Auch bei Koexpression mit AtRem 1.3 (Abb. 38, A) zeigte CPK21 (B) Kolokalisation (D); in der Überlagerung der Einzelfluoreszenzen waren gelbe Bereiche zu erkennen (C). Entsprechend lag der Pearson Koeffizient bei 0,26; der Spearman Koeffizient zeigte mit 0,19 eine ebenso positive Korrelation (Abb. 38, D; n=6).

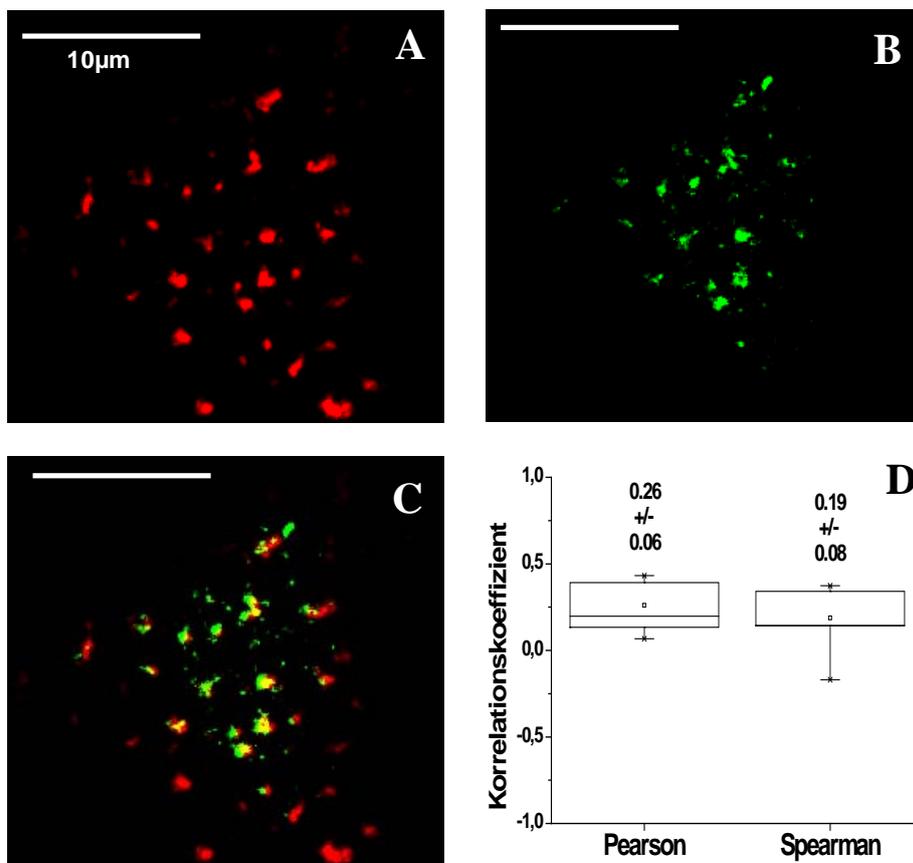


Abb. 38 DsRed::AtRem 1.3 (A) mit CPK21, fusioniert an ein YFP (B); erneut zeigten beide fluoreszenzmarkierte Proteine die Tendenz in Domänen zu kolokalisieren (C, D).

Die Korrelationskoeffizienten (Abb. 37 und 38, D) deuteten eine Anlagerung von CPK21-Proteinkinasen in Nanodomänen an.

3.6.3 Die Abscisinsäure-regulierte Proteinphosphatase ABI1

Abscisinsäure (ABA) wird in Wurzeln und in Blättern gebildet, um den Wasserverlust über die Stomata bei Trockenstress einzudämmen. ABA leitet als Trockenstresshormon weitreichende Signaltransduktionskaskaden ein und bewirkt den Stomaschluß (Zhu, 2002).

ABI1 ist eine Abscisinsäure-regulierte Serin-Threonin-Phosphatase vom Typ PP2C und ist ein negativer Regulator ABA-vermittelter Signaltransduktionskaskaden (Gosti *et al.*, 1999). ABI1 und dessen Homolog ABI2 werden in Anwesenheit von ABA inaktiviert; die Inaktivierung wird vermittelt durch zytosolische ABA-Rezeptorproteine aus der PYR/PYL/RCAR-Genfamilie (RCAR: „*regulatory components of ABA receptor*“, Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009). Aktive ABI1/ABI2 Phosphatasen unterbinden die Aktivität der kalziumabhängigen CPK-Kinasen 21 und 23, sowie die der kalziumunabhängigen Kinase OST1 (Geiger *et al.*, 2011; 2010; OST1: „*open stomata 1*“, Mustilli *et al.*, 2002).

Massenspektrometrische Analysen lieferten Indizien für eine mögliche Assoziation von ABI1 in Membrandomänen. Daher wurde überprüft, ob die Phosphatase mit den Markerproteinen kolokalisiert. Hierzu wurde ein dsRed::ABI1-Fusionsprotein zusammen mit den AtRemorinen 1.2 bzw. 1.3 exprimiert.

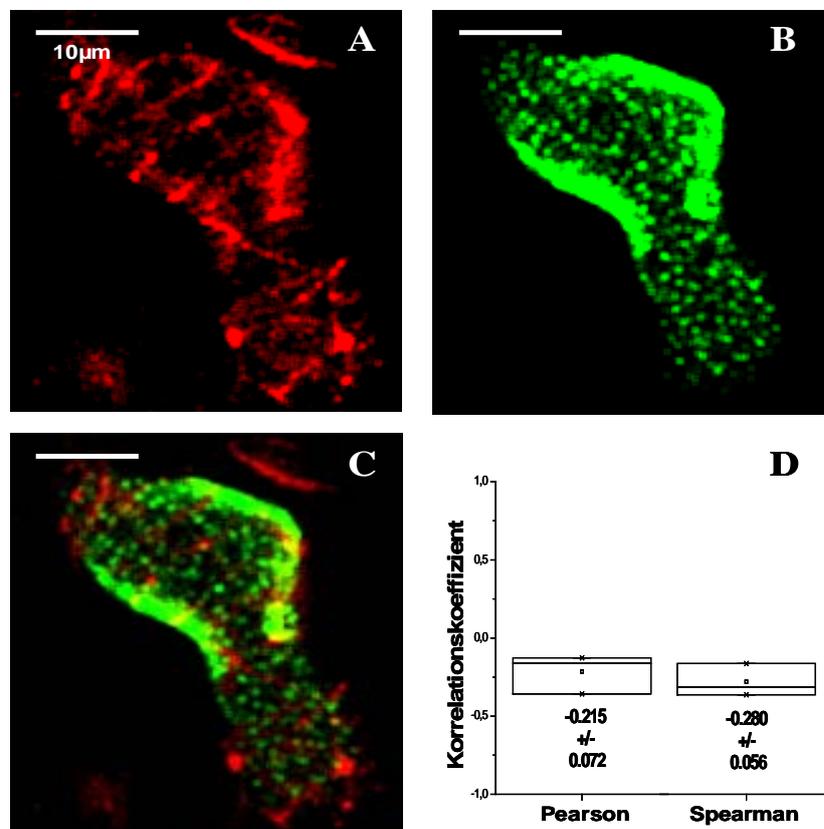


Abb. 39 Z-Projektion; Koexpression von dsRed::ABI1 (A) mit eGFP::AtRem 1.2 (B). ABI1 war im Zytosol lokalisiert und weitestgehend separiert von den Membrandomänen (C, D).

Nach der Koexpression mit eGFP::AtRem 1.2 war ABI1 im Zytosol lokalisiert (Abb. 39). Es zeichneten sich zytosolische Strukturen ab, die an Filamente des Zytoskeletts erinnerten (Abb. 39, A; dargestellt als Z-Projektion). Das Remorin im Gegenzug war ausschließlich PM-ständig (B). In der Überlagerung der Einzel fluoreszenzen erschienen beide Proteine nicht kolokalisiert (C), die Pearson und Spearman Koeffizienten zeigten negative Korrelation und deuteten auf eine Separation der Proteine hin (Abb. 39, D; n=3; siehe 2.11).

In weiteren Experimenten wurden dsRed::ABI1 und AtRem 1.3 koexprimiert, was zu ähnliche Resultaten führte (Abb. 40).

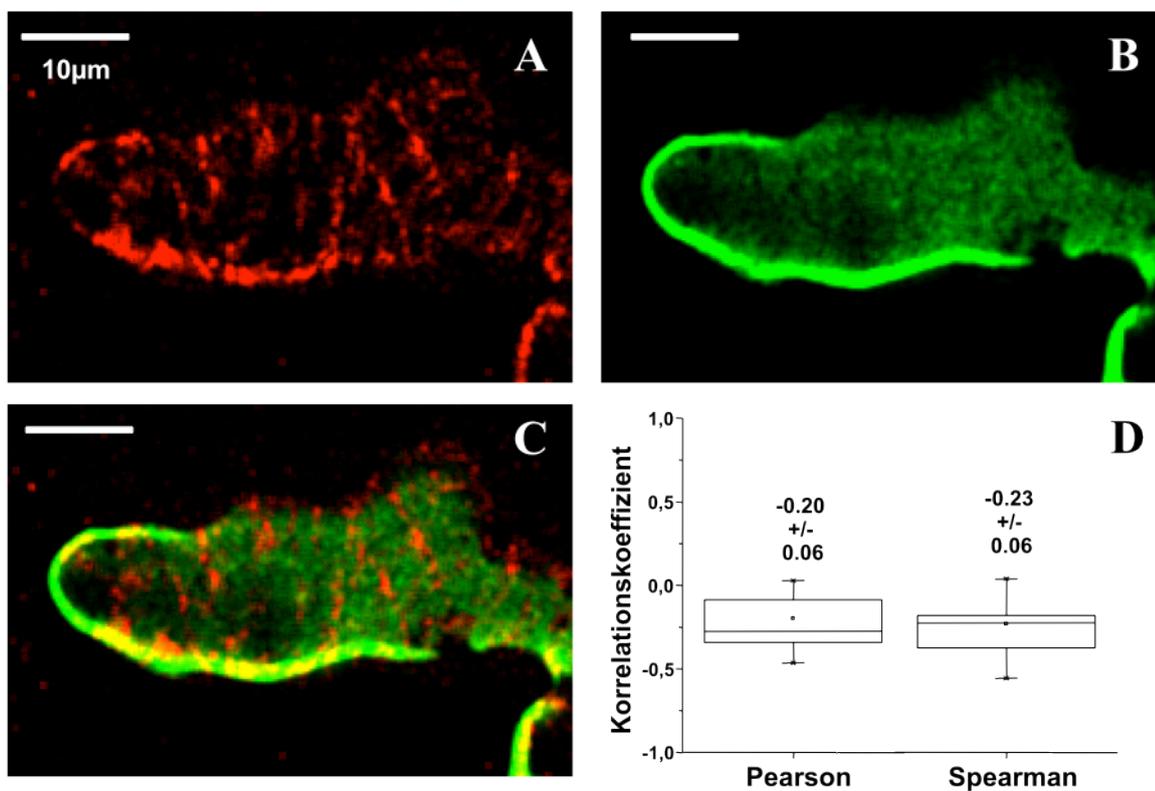


Abb. 40 DsRed::ABI1 (A) und AtRem 1.3 als eGFP-Fusion (B), koexprimiert in Arabidopsis; die Korrelationskoeffizienten waren negativ (D), aufgrund einer zytosolischen ABI1-Lokalisation (A, C).

ABI1 erschien nach Koexpression mit AtRem 1.3 im Zytosol (Abb. 40). Es waren erneut filamentartige subzelluläre Strukturen erkennbar (Abb. 40, A). AtRem 1.3-Proteine erreichten die PM (B). In der Überlagerung beider Fluoreszenzen ließen sich kaum gelbe Bereiche auf der PM-Oberfläche ausmachen (C; Falschfarbe). Die Korrelationsanalyse ergab negative Koeffizienten (D; n=8); ABI1 und AtRem 1.3 waren demzufolge separiert.

ABI1 lagerte sich nicht mit den AtRemorinen in Domänen zusammen; ein Großteil der ABI1-Proteine verblieb im Zytosol. Die Korrelationskoeffizienten waren negativ und indizierten eine räumliche Trennung zytosolischer ABI1-Proteine von den Remorin-markierten PM-Nanodomänen (Abb. 39 und 40, C-D).

3.6.4 FRAP-Experimente mit Proteinen der DRM-Fraktion

FRAP-Experimente mit den Remorinen belegten, dass in Pflanzenzellen mit intakter Zellwand keine Fluoreszenzrückkehr erfolgt (vgl. Abb. 11 und 12). Die Nanodomänen als Ganzes zeigten während der Beobachtungszeiträume über mehrere Minuten keine lateralen Bewegungen, auch nicht nach dem Entfernen der Zellwand (vgl. Abb. 13). Die laterale Bewegungsfähigkeit von CPK21 und SLAH3 wurde in FRAP-Experimenten getestet um zu überprüfen, ob diese Proteine einer anderen Kinetik unterliegen wie die Remorine.

Erneut wurden Kotransformationen in Epidermiszellen durchgeführt, zunächst mit YFP-markierten CPK21-Proteinen und dem dsRed::AtRem1.3 als Marker.

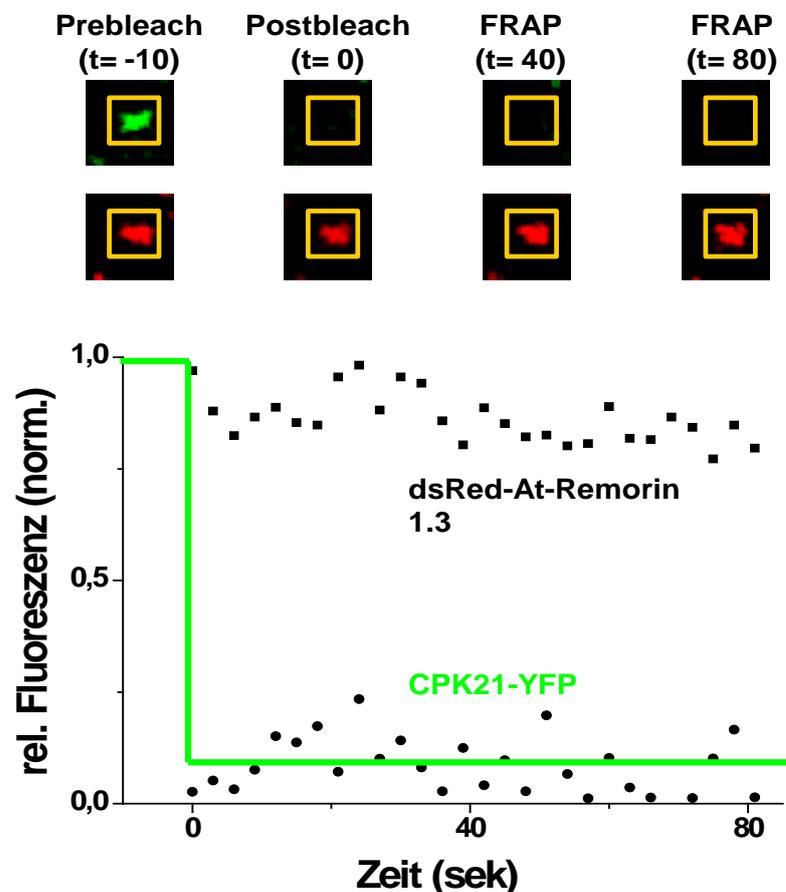


Abb. 41 FRAP von CPK21::YFP-Proteinen in dsRed::AtRem 1.3-markierten Domänen; die Fluoreszenz kehrte nicht zurück.

Beide Fusionsproteine kolokalisierten in Membran-Nanodomänen. DsRed::*AtRem* 1.3 fungierte als Referenzregion für die Bestimmung der Fluoreszenzrückkehr (Abb. 41 oben, siehe Insets). Nach dem Ausbleichen des YFP-Fluorophors war während einer Zeitspanne von mehr als 80 Sekunden keine Fluoreszenzrückkehr zu detektieren (Abb. 41; $n=3$). Gleiches Experiment wurde mit transient exprimierten *SLAH3*::YFP-Proteinen durchgeführt, mit dem *AtRem* 1.2 als Marker (Abb. 42).

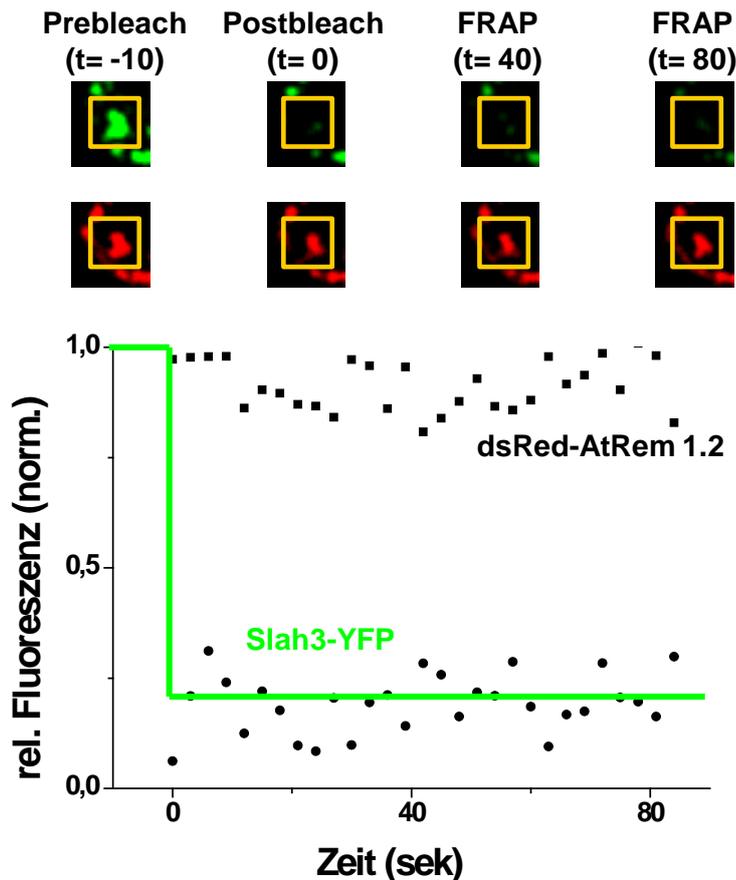


Abb. 42 FRAP von *SLAH3*::YFP-Proteinen; es war keine Rückkehr der Fluoreszenz zu detektieren.

Nach der Kolokalisation in Domänen wurde das YFP-Fusionsprotein ausgebleicht, während das *dsRed*::*AtRem* 1.2 als Referenzregion fungierte. Innerhalb einer Zeitspanne von mehr als 80 Sekunden konnte keine Fluoreszenzzunahme detektiert werden (Abb. 42; $n=3$). Unter Verwendung des *AtRemorins* 1.3 als Referenzregion für die Fluoreszenzrückkehr wurde dieses Ergebnis für *SLAH3*::YFP bestätigt (nicht gezeigt).

Aus den FRAP-Daten wurde ersichtlich, dass *CPK21* und *SLAH3* keine Fluoreszenzrückkehr nach dem Ausbleichen zeigten (Abb. 41 und 42). Auf die laterale Bewegung von Proteinen in den Membrandomänen könnten die Remorine sowie

Komponenten der Zellwand einen stabilisierenden Einfluss haben (siehe Diskussion, Kap. 4.3.2 und 4.3.2.1).

3.7 Proteininteraktionen in Membrandomänen

SLAH3 und regulierende Proteinkomponenten kolokalisierten in PM-ständigen Nanodomänen mit den Remorinen (Kap. 3.6). In *Xenopus*-Oozyten wurden Interaktionen der CPK-Kinasen 21 und 23 mit SLAH3 nachgewiesen (Geiger *et al.*, 2010). CPK-Kinasen unterliegen ihrerseits Regulationen durch ABI1/ABI2-Phosphatasen. CPK21 und ABI1 wurden wie die Remorine in der Arabidopsis DRM-Fraktion detektiert, jedoch war ABI1 *in planta* nicht mit den Remorinen kolokalisiert (Abb. 39 und 40). Es galt die Hypothese zu testen, ob Proteine wie ABI1 auf individuelle Stimuli hin in die Domänen rekrutiert werden können. Der Versuch, spezifische Protein-Protein-Interaktionen zwischen SLAH3, CPK21 und ABI1 in Arabidopsis durch bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC; siehe 2.8.2) zu detektieren, wurde unternommen. Hierzu wurden die Proteine an je eine Hälfte eines gelb fluoreszierenden Proteins (YFP) fusioniert und zusammen zur Expression gebracht. Beide YFP-Hälften sind alleine nicht fluoreszent. Interagieren zwei auf diese Weise markierte Proteine miteinander, komplementiert sich die YFP-Fluoreszenz und ein Signal kann detektiert werden. Anhand dieser Methode lässt sich eine physikalische Interaktion zwischen zwei Partnern nachweisen. Ein großer Nachteil liegt in der Irreversibilität der YFP-Komplementation. Haben sich zwei Interaktionspartner gefunden, sind die Fusionsproteine unwiederbringlich aneinander gebunden (Bracha-Drori *et al.*, 2004). Transiente Proteininteraktionen ließen sich mit dieser Methode daher nicht detektieren.

Im Folgenden wurde die YFP-Fluoreszenz erneut in grüner Farbe dargestellt, um Proteinkolokalisationen deutlich sichtbar zu machen.

3.7.1 SLAH3/CPK21-Interaktion

SLAH3- und CPK21-Proteine akkumulierten *in planta* mit den Remorinen in Domänen (Kap. 3.6). Es lag die Vermutung nahe, dass die spezifische SLAH3/CPK21-Interaktion in Membran-Nanodomänen erfolgen könnte. Um dies zu testen wurden YFP-BiFC-Konstrukte generiert (siehe 2.1.2.2, 2.1.2.3, 2.8.2 und 2.16). Diese wurden zusammen mit dsRed::*AtRem* 1.3 in Arabidopsis Epidermiszellen zur Expression gebracht (Abb. 43).

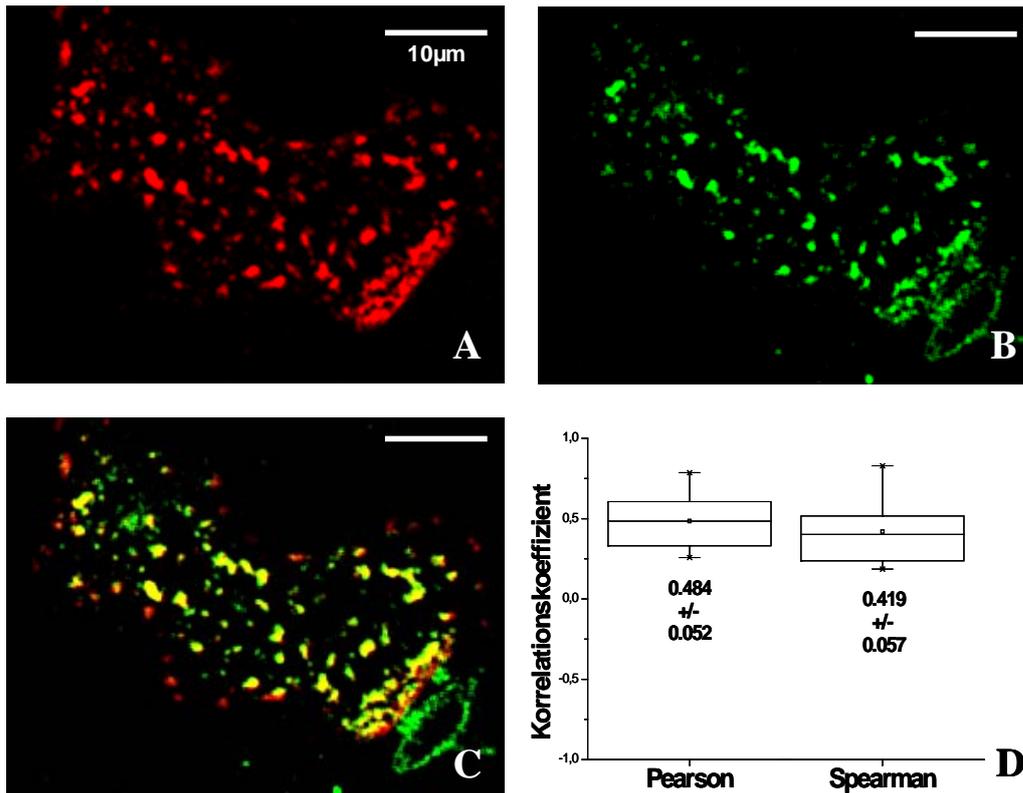


Abb. 43 DsRed::AtRem 1.3-Signal (A); BiFC-Signal interagierender SLAH3- und CPK21-Proteine (B); beide Signale waren an der PM kolokalisiert (C; D).

Während dsRed::AtRem 1.3 das bekannte Fleckenmuster in der PM zeigte (Abb. 43, A), interagierte die Proteinkinase CPK21 mit dem Anionenkanal SLAH3. Es kam ein ausgeprägt starkes BiFC-Signal zustande (B), welches sich mit dem Fluoreszenzsignal des Remorins überlagerte (C). Die Kolokalisationsanalyse belegte die Tendenz der Proteine, spezifisch in PM-ständigen Nanodomänen miteinander zu interagieren (Abb. 43, D; n=11).

3.7.2 CPK21/ABI1-Interaktion

Nachdem erste Indizien einer spezifischen SLAH3/CPK21-Interaktion in Nanodomänen erbracht waren (Abb. 43), wurden BiFC-Experimente mit CPK21 und ABI1 durchgeführt - mit dem AtRem 1.3 als etabliertem Marker für Membrandomänen. Die ABI1-Phosphatase unterbindet die Aktivität der CPK's 21 und 23 durch eine Inhibierung ihrer Autophosphorylierungsaktivität (Geiger *et al.*, 2011; 2010).

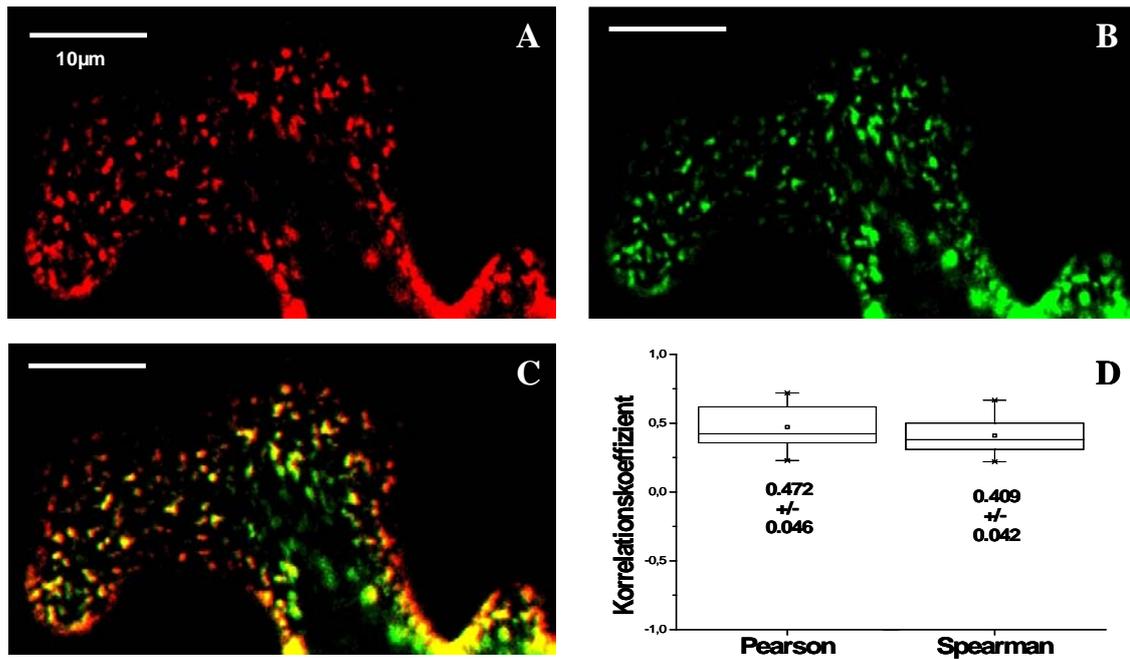


Abb. 44 DsRed::AtRem 1.3 (A) und CPK21/ABI1 als BiFC-Ansatz (B); erneut fanden die Interaktionspartner ihren Weg in die Remorin-markierten Domänen (C, D).

In vorangegangenen Experimenten zeigte ABI1 nach Koexpression mit AtRem 1.3 eine größtenteils zytosolische Lokalisation, mit einhergehend negativen Pearson und Spearman Koeffizienten von -0,20 und -0,23 (Abb. 40, D). Beide Proteine waren räumlich separiert.

Die Koexpression von CPK21 mit ABI1 führte hingegen zu einer PM-Lokalisation der Phosphatase (Abb. 44, B). Das BiFC-Signal der CPK21/ABI1-Proteininteraktion war dabei kolokalisiert mit dem Remorin-Signal (Abb. 44, A und C), angezeigt durch hohe Korrelationskoeffizienten (D; n=13). Die Daten indizierten die hochspezifische Interaktion von ABI1 mit CPK21 in Membrandomänen.

Interaktionen von SLAH3 mit CPK21 (Abb. 43) wie auch von CPK21 mit ABI1 (Abb. 44) scheinen gezielt in PM-Nanodomänen stattzufinden. Die ermittelten Korrelationskoeffizienten lagen mit Interaktionspartner (SLAH3/CPK21, Abb. 43, D; CPK21/ABI1, Abb. 44, D) stets höher als bei transienter Expression der Einzelproteine ohne den entsprechenden Interaktionspartner (SLAH3 mit AtRem 1.3, Abb. 36 D; CPK21 mit AtRem 1.3, Abb. 38 D; ABI1 mit AtRem 1.3, Abb. 40 D).

Die als Markerproteine für Membrandomänen etablierten Remorine zeigten *in vitro* eine starke Sterol-Abhängigkeit. Daher scheint in diesen PM-Bereichen eine geordnete Lipidumgebung vorzuherrschen, hervorgerufen durch eine Anreicherung von Sterolen und Sphingolipiden (siehe hierzu auch Kap. B im Anhang: „Visualisierung von Lipidphasen unterschiedlicher Ordnung in *Arabidopsis thaliana* Plasmamembranen“). Es gibt erste

Hinweise darauf, dass Membranlipide Protein-Protein-Interaktionen induzieren können (Casuso *et al.*, 2010). In tierischen Zellen gibt es experimentelle Beweise einer reizspezifischen Rekrutierung von Proteinen in kompartimentierte, Sterol- und Sphingolipidreiche Areale der PM (Courtneidge, 2003; Tansey *et al.*, 2000; Brown und Cooper, 1996). Dort sind diese Strukturen als *Lipid Rafts* bzw. als *Membrane Rafts* definiert (Brown und London, 2000; Simons und Toomre, 2000; Simons und Ikonen, 1997). In pflanzlichen Plasmamembranen scheinen ähnliche Strukturen zu existieren.

4. Diskussion

Die Hauptstrukturkomponenten tierischer *Lipid Rafts* sind Sphingomyelin und Cholesterin. In Pflanzen ist das Cholesterin kein Hauptbestandteil der Plasmamembran (PM) und wird durch Sitosterol, Campesterol und Stigmasterol ersetzt (Beck *et al.*, 2007). Sterole und Sphingolipide aus Pflanzen, Pilzen und Tieren sind dazu in der Lage, Lipiddomänen zu formen (Xu und London, 2000). Sterol- und Sphingolipidkomponenten der PM lassen sich auf relativ einfache Weise isolieren, da sich diese Verbindungen im Gegensatz zu Phospholipiden nicht durch Behandlungen mit milden, nicht-ionischen Detergenzien wie Triton X-100 aus dem PM-Pool entfernen lassen. Sterole und Sphingolipide bilden die sogenannte Detergens-resistente Membranfraktion (DRM; London und Brown, 2000). Einzelnen Komponenten daraus können über massenspektrometrische Verfahren identifiziert werden. Die Detergens-Behandlung ist eine überaus wertvolle Methode, um Aufschluss über Lipid- und Protein-komponenten in biologischen Membranen zu erhalten (Lichtenberg *et al.*, 2005).

Das Löslichkeitsverhalten gegenüber Detergenzien wurde im Laufe der Jahre trotz anhaltender Kritik zunehmend als *das* Hauptkriterium für die Raft-Ständigkeit von Proteinen und Lipiden herangezogen. Jedoch bestehen berechtigte Zweifel an dieser Definition (Tanner *et al.*, 2011; Lichtenberg *et al.*, 2005; Munro, 2003; Heerklotz, 2002; siehe auch Kap. 1.4). Aufgrund der Entwicklung immer leistungsfähigerer bildgebender Techniken erscheint die Erforschung kompartimentierter PM-Bereiche an intakten biologischen Systemen über eine direkte Visualisierung sinnvoller zu sein als Versuche, einzelne Komponenten daraus auf biochemischem Weg zu identifizieren und zu charakterisieren (Simons und Gerl, 2010). Daher wurden DRM-Proteine *in planta* exprimiert, um zum einen deren Teilnahme an kompartimentierten Membranbereichen zu überprüfen und zum anderen, um die Proteindynamik in diesen speziellen Bereichen zu erforschen.

Viele DRM-Proteine zeigen eine Sterol-Abhängigkeit. Sterole sind für die Phasentrennung und somit für die Existenz kompartimentierter Membranbereiche unabdinglich und lassen sich über eine Methyl- β -Zyklodextrin (MCD)-Behandlung entfernen. Die MCD-Behandlung liefert Anhaltspunkte, wie stark Proteine und Proteinkomplexe von Sterolen bzw. von Sterol-reichen Lipidumgebungen abhängen. Überdurchschnittlich viele Proteine mit GPI-Anker, sowie die Remorine StRem 1.3, AtRem 1.2 und AtRem 1.3 zeigten in Studien eine starke Sterol-Abhängigkeit (Raffaele *et al.*, 2009; Kierszniowska *et al.*, 2008). In DRM-Fractionen wurden ebenfalls regulatorische Proteine wie Kinasen und Phosphatasen detektiert, was auf eine physiologische Signifikanz dieser Domänen hindeutet. Im Folgenden

wird diskutiert, welche pflanzlichen DRM-Proteine in Arabidopsis in Membrandomänen lokalisiert sind und welche Rolle die Remorine möglicherweise bei der Organisation dieser spezialisierten Bereiche einnehmen. Auswirkungen der Clusterbildung PM-ständiger Proteine auf physiologische Ereignisse werden erläutert und anhand der Regulation des Anionenkanals SLAH3 explizit dargestellt.

4.1 Generierung einer transgenen *A. thaliana col 0* Remorin Linie

In transgenen eGFP::StRem 1.3-Pflanzen wurden spezifische eGFP-Signale in allen überirdischen Pflanzenteilen detektiert, wie etwa in der Blattepidermis (Abb. 1), den Spaltöffnungen (Abb. 2), der Stengelepidermis (Abb. 3) und in Mesophyllprotoplasten (Abb. 4). Dabei unterlag das Remorin einer charakteristischen, inhomogenen Verteilung in der PM und zeigte ein Fleckenmuster (das sog. „*patchy pattern*“). Die Domänen zeigten unabhängig vom Gewebe und vom Beobachtungszeitraum keinerlei lateralen Bewegungen, auch nicht in Protoplasten. In Wurzeln wurde keine eGFP-Fluoreszenz detektiert (nicht gezeigt), möglicherweise bedingt durch eine sehr schwache Expression des Fusionsproteins. Die könnte am Insertionsort der t-DNA im Arabidopsis Genom gelegen haben und muss nicht physiologischen Ursprungs gewesen sein, da native Remorine der taxonomischen Gruppe 1b in Arabidopsis Wurzeln exprimiert sind (Raffaele *et al.*, 2007).

Das StRem 1.3 wurde einst als Uronide-bindendes Protein beschrieben (Reymond *et al.*, 1996), welches in Gegenwart von Oligogalacturoniden phosphoryliert wird (Farmer *et al.*, 1991). In Hefe wurde gezeigt, dass StRem 1.3 direkt mit dem TGBp1 Protein („*triple gene block protein 1*“) des Kartoffelvirus X interagiert. TGBp1 ist *in planta* am Transport des Virus von Zelle zu Zelle beteiligt; diese Funktion wurde durch die Anwesenheit des Remorins negativ beeinflusst (Raffaele *et al.*, 2009). In Arabidopsis existieren 16 native Remorine, deren Funktionen weitestgehend unbekannt sind (Raffaele *et al.*, 2007).

4.2 Western Blot

StRem 1.3 Homologe wurden in DRM-Fractionen verschiedener pflanzlicher Zelltypen gefunden (Laloi *et al.*, 2007; Lefebvre *et al.*, 2007; Morel *et al.*, 2006; Mongrand *et al.*, 2004). Dabei lagern sich Remorine der taxonomischen Gruppe 1b *in vivo* höchstwahrscheinlich auf der zytosolischen Seite der Lipiddoppelschicht an (Raffaele *et al.*, 2009).

Um zu belegen, dass auch eGFP::*StRem 1.3*-Fusionsproteine in der DRM-Fraktion vertreten sind und das Fluorophor keinen weiteren Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation nimmt, wurde die DRM-Fraktion aus transgenen Pflanzenlinien isoliert. Unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers wurde das eGFP-Signal auf dem Western Blot mit zunehmender Reinheit der PM stärker (Abb. 5, links). Nach der Dichtegradienten-Zentrifugation hatte sich eGFP::*StRem 1.3* in verschiedenen Fraktionen angereichert (Abb. 5, rechts). Ein großer Teil des AK-Signals auf dem Blot stammte aus der DRM-Fraktion (Abb. 5, Inset). Es zeigte sich ebenfalls eine Lokalisation des Fusionsproteins in der Detergens-löslichen Fraktion (Abb. 5 „Unten“). Eine unvollständige Extraktion hatte das eGFP-Signal in dieser Fraktion verstärkt, da zum einen nicht alle Detergens-resistenten Komponenten der Membran über die Triton X-100-Behandlung isoliert werden können (F. Demir, Lehrstuhl für molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, persönliche Mitteilung). Zum anderen ist eine alleinige Lokalisation vom eGFP::*StRem 1.3* nur in Membrandomänen, auch aufgrund der starken Überexpression durch Verwendung des CamV 35S Promotors, unwahrscheinlich. Zusammen führte dies zu einem ausgeprägten eGFP-Signal in der Detergens-löslichen Fraktion.

Die Remorine *StRem 1.3*, *AtRem 1.2* und *1.3* zeigten in Experimenten mit MCD eine ausgeprägte Abhängigkeit von Sterolen (Raffaele *et al.*, 2009; Kierszniowska *et al.*, 2008). Zudem erschienen sie in der DRM-Fraktion (Abb. 5; F. Demir, persönliche Mitteilung). Dies legt nahe, dass die als Markerproteine für Membrandomänen etablierten Remorine Sterolreiche Lipidumgebungen bevorzugen (siehe auch Kap. 4.3.1).

4.3 Visualisierung von Membrandomänen mit endogen exprimierten Proteinen

Nach heterologer Expression in *Arabidopsis* akkumulierte eGFP::*StRem 1.3* in PM-Domänen (Abb. 6). Ebenso zeigten die nativen *Arabidopsis* Remorine *AtRem 1.2* und *AtRem 1.3* Kolokalisation in Domänen (Abb. 7, C und D). Ein möglicher Einfluss der Fluorophore auf die (Ko-) Lokalisation war nicht festzustellen (Abb. 8), die Pearson und Spearman Koeffizienten verblieben nach Austausch der Fluorophore auf hohem Niveau und indizierten eine gleichbleibend starke Korrelation (Abb. 8, D). Die Domänen verblieben über Minuten stabil an den gleichen Stellen in der PM, ohne laterale Bewegungen zu zeigen.

4.3.1 Remorine aus unterschiedlichen Pflanzenspezies als Markerproteine für Membrandomänen

Remorine aus verschiedenen Pflanzenfamilien lagern sich in Arabidopsis in PM-ständigen Kompartimenten zusammen (Abb. 9 und 10). Dabei zeigte StRem 1.3 sowohl mit AtRem 1.2, als auch mit AtRem 1.3 Korrelation (Abb. 9 und 10, D). Gemäß biochemisch ermittelter Daten sind in solchen Kompartimenten mit hoher Wahrscheinlichkeit Sterole und Sphingolipide angereichert (Abb. 5; Kierszniowska *et al.*, 2008; Mongrand *et al.*, 2004). Um dies zu überprüfen, wurde nach einem Marker für Sterol-arme Bereiche der PM gesucht. In biochemischen Studien wurde ein PM-ständiges Lipocalin aus Arabidopsis als mögliches Markerprotein für Sterol-arme Bereiche identifiziert. Das Lipocalin (At5g58070) wurde in PM-Isolationen detektiert, erschien jedoch nicht in der DRM-Fraktion, wohl aber in der Detergens-löslichen Fraktion (F. Demir, persönliche Mitteilung). Lipocaline sind in nahezu allen Spezies existent und werden in Pflanzen u.a. als Reaktion auf niedrige Temperaturen gewebespezifisch exprimiert. Lipocaline sind wie die Remorine mit der PM assoziiert (Frenette Charron *et al.*, 2005; Kawamura und Uemura, 2003).

Nach der Koexpression in Arabidopsis lagerten sich das Remorin und das Lipocalin deutlich separiert voneinander an der PM an (Anhang A, Abb. A1). Dabei zeigten beide Proteine stark negative Korrelationskoeffizienten (Abb. A1, D). Aufgrund der biochemisch ermittelten Daten war davon auszugehen, dass sowohl das St- als auch die AtRemorine Sterol-reiche Lipidumgebungen bevorzugen (siehe Abb. 5 und Kap. 4.2; Kierszniowska *et al.*, 2009). Die Lipocalin Koexpression bestätigte diesen Befund *in planta* (Abb. A1).

4.3.2 FRAP-Experimente mit den Remorinen und mögliche Einflüsse membranständiger Proteine auf die Stabilität der Domänen

Die über fluoreszente Remorinversionen markierten Membrandomänen zeigten weder in Mesophyllzellen mit intakter Zellwand (Abb. 11 und 12, Insets), noch in Protoplasten (Abb. 13, Insets) laterale Bewegungen. Daher mussten einzelne Proteine die Stabilität der Domänen aufrechterhalten, indem sie Verbindungen mit Zellwand- wie auch mit Zytoskelettkomponenten herstellten. Dass Proteine in den Domänen mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit mit zytoskelettären Komponenten assoziiert sind, wurde aus Beobachtungen in Protoplasten deutlich. Dort wurde die Zellwand enzymatisch entfernt und vorhandene Membran-Zellwand-Kopplungen auf diese Weise zerstört. Bei einer alleinigen Stabilisierung über Assoziationen mit Zellwandkomponenten hätten die Domänen in der PM laterale Diffusion zeigen müssen. Dies wurde jedoch zu keinem Zeitpunkt beobachtet (vgl. Abb. 11

und 13, Insets). Der experimentelle Beweis einer Assoziation der Domänen mit zytoskelettären Komponenten konnte nicht erbracht werden, da es in keinem Gewebe gelungen ist Komponenten des Zytoskeletts spezifisch anzufärben - beispielsweise unter Einsatz Aktin bindender, fluoreszenzmarkierter Phalloidine - und diese zusammen mit den Remorinen abzubilden.

Für Komponenten der Zellwand hingegen konnte gezeigt werden, dass sie Proteinen in den Domänen Stabilität vermitteln. Dies wurde in FRAP-Versuchen an Protoplasten der stabilen eGFP::*StRem* 1.3-Linie deutlich. Dort kehrte die eGFP-Fluoreszenz nach dem Ausbleichen fluoreszenter Remorine einer distinkten Nanodomäne zurück (Abb. 13), wohingegen in Zellen mit intakter Zellwand keine Fluoreszenzrückkehr beobachtet wurde (Abb. 11 und 12). Komponenten der Zellwand nahmen einen stabilisierenden Einfluss auf die Proteinkinetik der Remorine in den Domänen (siehe auch 4.3.2.1). Auf welche Weise dies geschieht, bleibt spekulativ. Da Remorine kein Transmembranmotiv besitzen (Nelson *et al.*, 2006; Online-Datenbank Recherche: www.uniprot.org), sind sie höchstwahrscheinlich über Lipidanker auf der zytosolischen Seite der Lipiddoppelschicht angeheftet. Diesbezüglich wurden konkrete Hinweise auf posttranslationale Modifikationen an den Remorin C-Termini gefunden, die bei der Anheftung von Bedeutung sind (Kap. 4.4). Aufgrund des Fehlens eines Transmembranmotivs erschienen direkte Interaktionen der Remorine mit Komponenten der Zellwand aufgrund der räumlichen Trennung durch die PM als höchst unwahrscheinlich. Es mussten weitere Proteine bei der stabilen Verankerung involviert sein, wie etwa Transmembranproteine. Diese könnten einen stabilen Kontakt zur Zellwand herstellen und aufgrund ihrer integralen Membranständigkeit kompartimentierte PM-Bereiche sowohl auf der extrazellulären wie auch auf der dem Zytosol zugewandten Seite der Lipiddoppelschicht stabilisieren. Ebenso könnten extrazellulär verankerte Proteine den Kontakt zur Zellwand herstellen und unter Einbeziehung weiterer Proteine Stabilität hinsichtlich der lateralen Beweglichkeit der Domänen vermitteln.

In biochemischen Studien konnten sowohl Tetraspanine als auch GPI-verankerte Proteine als mögliche Adaptorproteine der Membrandomänen mit festen Strukturen ermittelt werden. Die Daten indizierten eine Lokalisation der Tetraspanine 3 (At3g45600) und 8 (At2g23810), sowie des GPI-verankerten Proteins SKU5 (At4g12420) in der Arabidopsis DRM-Fraktion (F. Demir, persönliche Mitteilung). Tetraspanine besitzen vier Transmembrandomänen, zytosolische N- und C-Termini sowie zwei konservierte extrazelluläre Domänen. Sie sind in nahezu allen Spezies zu finden und in tierischen Organismen an der Zell-Zell-Kommunikation, an der Signaltransduktion sowie an Interaktionen zwischen der PM und der

extrazellulären Matrix beteiligt (Huang *et al.*, 2005). Tetraspanine interagieren mit PM-ständigen Rezeptoren und intrazellulären Proteinen der Signalübertragung und können in tierischen Plasmamembranen zu Komplexen aggregieren. Diese bestehen aus mindestens sechs Tetraspaninen und assoziierten Proteinen. Mehrere dieser Komplexe können sich transient zusammenlagern und als eine PM-ständige Mikrodomäne agieren (Yunta *et al.*, 2003), vermutlich um Signalübertragungen von der extrazellulären Matrix ins Zellinnere zu ermöglichen (Hemler, 2003; Boucheix *et al.*, 2001; Maecker *et al.*, 1997). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass Ganglioside eine stabilisierende Wirkung auf die Interaktion zwischen Tetraspaninen ausüben (Odintsova *et al.*, 2006) und einzelne Tetraspanine direkt mit Gangliosiden interagieren (Xu *et al.*, 2009). Ganglioside sind Bestandteile tierischer *Lipid Rafts* (Thomas *et al.*, 2003). Tetraspanine werden in mehrzelligen Organismen als allgemeine Adaptorproteine zwischen dem Zytoskelett und der extrazellulären Matrix gehandelt (Baluska *et al.*, 2003). In *A. thaliana* sind Tetraspanine an der Regulation von Zelldifferenzierungsvorgängen beteiligt (Olmos *et al.*, 2003). Die Tetraspanine 3 und 8 wurden in der Arabidopsis DRM-Fraktion detektiert (F. Demir, persönliche Mitteilung). Aufgrund ihrer Funktion als Adaptorproteine in tierischen Zellen galt es die Hypothese zu testen, ob pflanzliche Tetraspanine zur Stabilität der Membrandomänen beitragen, indem sie Verbindungen mit festen Strukturen wie dem Zytoskelett herstellen.

Die Fusion von fluoreszenten Proteinen an die C- als auch an die N-Termini führte jedoch zu zytosolischen Lokalisationen der Tetraspanine (nicht gezeigt). Diese Bereiche könnten für Protein-Protein-Interaktionen essentiell sein; während der C-Terminus Interaktionen mit Komponenten des Zytoskeletts zu unterliegen scheint, könnten Cysteinreiche Bereiche des N-Terminus Ausgangsstellen für Palmitoylierungen bilden (Stipp *et al.*, 2003). Nach der Koexpression mit den Remorinen verblieben die Tetraspanine ausschließlich im Zytosol, wo sie große Vesikel formten. Manche dieser Vesikel bewegten sich entlang fester Strukturen, möglicherweise entlang zytoskellärer Komponenten (nicht gezeigt). Die Fusion fluoreszenter Proteine könnte sterische Hinderungen an den Tetraspaninen eingeführt und Proteininteraktionen unterbunden haben. Ähnliche Beobachtungen wurden bei der Fusion fluoreszenter Proteine an die C-Termini des StRemorins 1.3 sowie der beiden AtRemorine gemacht - die Fusionsproteine erschienen im Zytosol (nicht gezeigt).

Neben den Tetraspaninen könnte die Stabilität der Remorin-markierten Domänen auf GPI-verankerte Proteine zurückzuführen sein. Für GPI-Anker wurde in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* spekuliert, dass deren Rolle darin bestehen könnte, PM-ständige Proteine mit der Zellwand zu verankern, da viele der nativen Proteine mit GPI-Anker mit der

Zellwand verbunden sind. Als Beispiel wäre das Gas1p-Protein („*GPI-anchored plasma membrane glycoprotein 1*“) zu nennen, eine Beta-1,3-Glucanosyl-Transferase, die für den Aufbau der Zellwand erforderlich ist (De Sampaio *et al.*, 1999). Ein fluoreszenzmarkiertes Derivat des Gas1p-Proteins war nach dessen Expression irreversibel mit der Zellwand assoziiert und zeigte keine Fluoreszenzrückkehr nach dem Ausbleichen (Valdez-Taubas *et al.*, 2003).

In Arabidopsis wurde die Existenz GPI-verankerter Proteine ebenfalls nachgewiesen und bereits erste GPI-Proteine in DRM-Fraktionen gefunden, wie etwa GPDL1 („*glycerophosphodiesterase-like 1*“; At5g55480), das an der Formation der Zellwand beteiligt ist, oder HIPL1 („*hedgehog-interacting protein-like 1*“; At1g74790), ein Protein unbekannter Funktion (Bhat *et al.*, 2005). SKU5 ist ein GPI-verankertes Protein der DRM-Fraktion (Borner *et al.*, 2005) und gehört zur SKS-Genfamilie („*SKU5-similar*“), welche in Arabidopsis aus 19 Mitgliedern besteht. Diese Genfamilie zeigt strukturelle Ähnlichkeiten mit Kupfer- bzw. Ascorbat-Oxidasen und Laccasen. SKU5 scheint an Wachstumsprozessen beteiligt zu sein und nimmt eine Rolle bei der Zellwandexpansion ein. SKU5-Proteine sind sowohl in der PM als auch in der Zellwand lokalisiert (Sedbrook *et al.*, 2002), sind Sterol-abhängig (Kierszniowska *et al.*, 2008) und kolokalisierten *in planta* mit den Remorinen in PM-ständigen Domänen (Abb. A2, Anhang A). Über GPI-verankerte Proteine wie SKU5 könnten die Domänen mit stabilen (Zellwand-) Strukturen in Verbindung stehen (siehe auch Kap. 4.7).

Auch wenn ein direkter Kontakt der Remorine zu Komponenten der Zellwand als sehr unwahrscheinlich anzusehen ist sei an dieser Stelle erwähnt, dass für StRem 1.3 *in situ* gezeigt wurde, dass es Oligogalakturone und fraktioniertes Pektin binden kann (Reymond *et al.*, 1996). Dies sind Bestandteile pflanzlicher Zellwände (Jamet *et al.*, 2006; Cassab und Varner, 1988). In den Koexpressionsstudien wurde beobachtet, dass die Anwesenheit der Remorine dazu führte, dass Proteinkolokalisationen in Membrandomänen deutlicher ausgeprägt waren. Es gilt als sehr wahrscheinlich, dass die Remorine aufgrund ihrer vorhergesagten „*Coiled coil*“ Struktur (engl. *coil*: Spule, Wendel) am C-Terminus mit anderen Proteinen interagieren können (Reymond *et al.*, 1996) und dabei möglicherweise makromolekulare Strukturen wie Filamente formen (Bariola *et al.*, 2004). Für eine spezifische Remorin-Remorin-Interaktion gibt es erste Indizien (Kap. 4.4). Somit könnten die Remorine auf der zytosolischen Seite der Lipiddoppelschicht ein filamentartiges Netzwerk ausbilden, in das sich weitere Proteine einlagern (siehe auch Kap. 4.7, Abb. 4.2 und 4.3).

4.3.2.1 FRAP-Experimente an Protoplasten der transgenen StRemorin 1.3-Linie: Proteindynamik in pflanzlichen Membrandomänen

Der Diffusionskoeffizient [D] des eGFP::StRem 1.3-Proteins in Protoplasten errechnete sich zu $5,14 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Abb. 13). Ähnliche *in vivo* Datensätze mit pflanzlichen Proteinen der DRM-Fraktion existieren derzeit nicht. Vergleicht man den Diffusionskoeffizienten des StRemorins mit denen tierischer Organismen, so gibt es grundlegende Unterschiede (Tab. 11, folgende Seite). Unter Verwendung einer modifizierten, GPI-verankerten Hydrolase aus Kaninchen wurden nach transienter Expression in COS-Zellen bei 37°C zwei Populationen des GFP::GPI-Fusionsproteins ausgemacht; während ein Teil der Proteine homogen in der PM verteilt war, war der andere Teil in Clustern organisiert - den *Lipid Rafts*. Das [D] der homogen verteilten Proteine lag bei $3,9 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$, während der Diffusionskoeffizient der Proteine in den Clustern zu $6 \times 10^{-9} \mu\text{m}^2/\text{s}$ errechnet wurde. Gleiche Messung wurde erneut bei Raumtemperatur ($\sim 19^\circ\text{C}$) durchgeführt, was zu einer dramatischen Abnahme der Diffusionskoeffizienten der aggregierten Proteine führte. [D] nahm gegenüber den Messungen bei 37°C um mehr als das Fünffache ab und lag nun bei $1 \times 10^{-9} \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Tab. 11). Die Autoren schlussfolgerten, dass die GPI-verankerten Proteine in den Domänen sehr dynamisch sind, deren Diffusionskoeffizienten jedoch stark von der vorherrschenden Temperatur abhängen (Nohe *et al.*, 2006).

Auch in Hefe existieren kompartimentierte, Raft-ähnliche Membranbereiche. Das SNARE-Protein Sso1 aus *Saccharomyces* ist bei der Fusion sekretorischer Vesikel mit der PM beteiligt (Aalto *et al.*, 1993) und sowohl in Hefezellen als auch in tierischen COS-Zellen in der PM akkumuliert. Nach dem Ausbleichen von Regionen der PM-Oberfläche war in *Saccharomyces* ein [D] von $0,0025 \mu\text{m}^2/\text{s}$ auszumachen, die halbmaximale Fluoreszenzrückkehr war nach mehr als einer Minute erreicht. Unter gleichen Umständen wurde in COS-Zellen ein [D] von $0,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ermittelt, bei einer halbmaximalen Fluoreszenzrückkehr von nur zwei Sekunden (Valdez-Taubas *et al.*, 2003). Es gestaltet sich daher als schwierig, FRAP-Daten aus *Saccharomyces* und *Arabidopsis* mit FRAP-Daten aus dem tierischen System zu vergleichen. Eventuell liegen diese deutlichen Unterschiede in den Diffusionskoeffizienten neben der Lipidzusammensetzung der PM am Einfluss von Komponenten der Zellwand auf die Diffusionsgeschwindigkeit der Proteine, sowie an der Art der Membranverankerung. Um diese Unterschiede zwischen pflanzlichen und tierischen Organismen zu verdeutlichen sei an dieser Stelle der Diffusionskoeffizient GPI-verankerter, Raft-ständiger K-Ras GTPasen in COS-Zellen von $1,01-1,13 \mu\text{m}^2/\text{s}$ genannt (Kenworthy *et al.*, 2004).

Protein	Organismus	[D]
Remorin	Arabidopsis	$5,14 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$
Sso1 (SNARE-Protein)	Saccharomyces	$2,5 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$
Sso1 (SNARE-Protein)	COS-Zellen	$0,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$
K-RAS GTPase	COS-Zellen	$1,01-1,13 \mu\text{m}^2/\text{s}$
GPI-verankerte Hydrolase	COS-Zellen	$6 \times 10^{-9} \mu\text{m}^2/\text{s}$ (37°C)
GPI-verankerte Hydrolase	COS-Zellen	$1 \times 10^{-9} \mu\text{m}^2/\text{s}$ (19°C)

Tab. 11 Vergleich der Diffusionskoeffizienten [D] aus Arabidopsis und Hefe mit denen tierischer COS-Zellen.

Pflanzen unterliegen aufgrund ihrer sessilen Lebensweise standortbedingt zum Teil starken Temperaturschwankungen und könnten daher Mechanismen entwickelt haben, um dieser Abhängigkeit der Proteinkinetik von der Temperatur entgegenzuwirken. Neben einer veränderten Lipidzusammensetzung pflanzlicher Plasmamembranen gegenüber tierischen stellt die Strategie, Raft-ähnliche Signalplattformen stabil in der PM zu verankern möglicherweise eine Anpassung dar, um Signalübertragungen ins Zellinnere auch bei niedrigen Temperaturen zu gewährleisten. Hierfür müsste, wie auch für tierische *Lipid Raft*-Domänen vermutet wird (Pike, 2009), stets ein Subset von Proteinen der Signaltransduktion in den Domänen gehalten werden (siehe auch Kap. 4.7).

Vergleicht man die Diffusionskoeffizienten miteinander, so liegt das [D] des StRem 1.3 in Arabidopsis mit $D=0,00514 \mu\text{m}^2/\text{s}$ mehr als doppelt so hoch wie das [D] des SNARE-Proteins Sso1 in Saccharomyces mit $D=0,0025 \mu\text{m}^2/\text{s}$. In FRAP-Experimenten mit der Protonen-ATPase Pma1 aus Saccharomyces war dieses Protein ebenfalls innerhalb kompartimentierter PM-Bereiche mobil; dort lag die mobile Fraktion bei 0,77. Die halbmaximale Fluoreszenz war nach 130 Sekunden zurückgekehrt (Malinska *et al.*, 2004; der ausgebleichte Spot hatte einen Durchmesser von ca. $0,5 \mu\text{m}$; die Autoren führen keine Werte für [D] auf). Für das StRemorin wurde in Protoplasten die mobile Fraktion zu 0,62 bestimmt. Die Zeit der halbmaximalen Fluoreszenzrückkehr betrug 106 Sekunden; dabei hatte der ausgebleichene Spot einen Durchmesser von einem Mikrometer (Abb. 13).

Interessanterweise waren die Kompartimente in Saccharomyces ebenso wie die Membrandomänen in Arabidopsis lateral nicht in der PM beweglich. Can1p ist ein H^+ -Symporter, der neben Pma1 als Marker für Raft-ähnliche Membrankompartimente in Hefe gehandelt wird, dabei jedoch andere Kompartimente in der PM besetzt. Mit Can1p zeigte akkumuliertes Aktin nahe der PM keine Korrelation. Ein Einfluss der Mikrotubuli auf die Stabilität der Domänen konnte unter Verwendung Mikrotubuli-destabilisierender Chemikalien ebenfalls ausgeschlossen werden, weshalb die Autoren schlussfolgerten, dass

das Zytoskelett keinen stabilisierenden Einfluss auf die Domänen in der PM in *Saccharomyces* hat (Malinska *et al.*, 2004). Jedoch konnte im Falle eines weiteren Proteins aus *Saccharomyces*, dem integralen Sur7 Protein - ebenfalls ein H⁺-Symporter - nachgewiesen werden, dass sich die Kompartimente nach dem Verdau der Zellwand auflösten, was zu einer diffusen Sur7::GFP Fluoreszenz in der PM führte. Vor dem Verdau der Zellwand war die Sur7::GFP- Fluoreszenz in PM-ständigen Domänen sichtbar (Young *et al.*, 2002). Diese Beobachtung konnte jedoch in späteren Experimenten nicht bestätigt werden (Malinska *et al.*, 2004). Daher bleibt der Ursprung der Stabilität der Domänen in *Saccharomyces* spekulativ, während in *Arabidopsis* ein stabilisierender Einfluß der Zellwand auf die Proteinkinetik der Remorine in Membrandomänen aufgedeckt werden konnte.

4.4 Posttranslationale Modifikationen an den Remorinen

Mitglieder der pflanzenspezifischen Remorin-Genfamilie wurden sowohl in Gymno- und Angiospermen, als auch in Laubmoosen (Bryophyta) nachgewiesen. Remorine bestehen aus zwei großen funktionellen Domänen; der N-Terminus ist mit zahlreichen Prolinen bestückt und bietet putative Phosphorylierungsstellen, die möglicherweise die Funktionalität dieser Proteine beeinflussen (Raffaele *et al.*, 2007). Die C-Termini hingegen formen ausnahmslos „*coiled coil*“ Domänen (dt.: Doppelwendel; Bariola *et al.*, 2004; Reymond *et al.*, 1996). Das „*coiled coil*“ Strukturmotiv spielt bei Protein-Protein- und Protein-DNA-Interaktionen eine Rolle. Dabei werden zwei bis fünf Alphahelices zu einer großen, üblicherweise linksgerichteten Wendel verdrillt. Dies geschieht durch intramolekulare, elektrostatische Wechselwirkungen hydrophober Aminosäuren und wirkender Van-der-Waals Kräfte. Bei der Interaktion von Proteinen können solche Motive einzelne Untereinheiten durch intermolekulare Wechselwirkungen zusammenbringen und auf diese Weise Homo- wie auch Heteromere formen (Mason und Arndt, 2004; Kohn *et al.*, 1997).

Viele Transkriptionsfaktoren besitzen „*coiled coil*“ Domänen, wie beispielsweise bZip-Transkriptionsfaktoren den Leucin-Zipper, was diesen Proteinen eine Bindung an DNA ermöglicht (Landschulz *et al.*, 1988). So wurde das AtRem 1.3 erstmals als DNA-bindendes Protein beschrieben, dessen Genprodukt einer Regulation durch Auxin unterliegt (Alliotte *et al.*, 1989). Die DNA-Bindungsstudien mit dem AtRem 1.3, welches von den Autoren ursprünglich als Dbp-Protein („*DNA-binding protein*“) beschrieben wurde, wurden auf einem bakteriellen Expressionssystem basierend durchgeführt. In Bakterien finden keine komplexen posttranslationalen Modifikationen wie z. B. Acylierungen statt. Bleiben diese Modifikatio-

nen aus, können Proteine einer falschen subzellulären Lokalisation unterliegen, da sie sich aufgrund der fehlenden hydrophoben Ladungen nicht mehr in Membranen ein- bzw. an Membranen anlagern können. Auch können Proteine hinsichtlich ihrer Thermostabilität und ihrer dreidimensionalen Struktur verändert sein und Fehlfunktionen zeigen (Resh, 1999). In den hier durchgeführten Untersuchungen waren AtRem 1.3-Proteine unter keinen Umständen im Zellkern lokalisiert, sondern erschienen nach ihrer Expression *in planta* ausschließlich an der PM (Abb. 7, 8, 10, 11, 22-26, 36, 38, 40).

In Arabidopsis existieren 16 Remorine, deren Funktionen weitestgehend unbekannt sind. Sie besitzen kein bekanntes Membran-Ankermotiv und sind gemäß ihrer Aminosäurefolge von hydrophiler Natur - aber trotzdem imstande sich an der PM anzuheften (Raffaele *et al.*, 2007; Reymond *et al.*, 1996). Aus diesem Grund müssen die AtRemorine 1.2 und 1.3, sowie das StRemorin 1.3 posttranslationalen Modifikationen unterliegen oder an PM-ständige Proteine binden. In einem Aminosäurealignment fiel auf, dass die C-terminalen Bereiche höhere Homologien aufwiesen als die N-terminalen Bereiche (Abb. 14), angezeigt durch einen gelben Hintergrund (alle drei Remorine zeigten Übereinstimmung in der Aminosäurefolge) bzw. einen blauen Hintergrund (zwei von drei Remorinen zeigten Übereinstimmung). Dabei wiesen die AtRemorine mehr Homologie untereinander auf als gegenüber dem StRemorin (Abb. 14).

StRem 1.3 zeigte Homologie mit dem CAAX-Motiv (Anhang A, Abb. A3); dieses Motiv ist Ausgangspunkt für Prenylierungen bzw. Farnesylierungen an C-terminalen Cysteinresten (Casey, 1995). Die AtRemorine hingegen zeigten weitaus weniger Homologie mit dem CAAX-Motiv (nicht dargestellt). Dennoch bestand bei beiden AtRemorinen gemäß computergestützter Vorhersagen (Maurer-Stroh und Eisenhaber, 2005) die Wahrscheinlichkeit einer Farnesylierung bzw. Geranyl-Geranylierung an den C-Termini, genauer an den Cysteinen an Position 209 (AtRem 1.2) bzw. 187 (AtRem 1.3). Allerdings scheint die alleinige Anheftung einer Prenylgruppe aufgrund der weit verzweigten Struktur der Lipidkette dazu zu führen, dass sich Proteine nicht in geordnete, kompartimentierte Bereiche der PM einlagern können. Daher könnten weitere Modifikationen erfolgen, um Proteine in geordnete, Sterol-reiche Membranbereiche einzulagern (Melkonian *et al.*, 1999).

Am C-Terminus wurden weitere Aminosäuren (AS) ausgemacht, die posttranslationalen Modifikationen unterliegen könnten. So könnten die Cysteinreste an den Stellen 209 und 211 (AtRem 1.2; Abb. 15 und Abb. 4.1, folgende Seite) bzw. 187 und 189 (AtRem 1.3; Abb. 21 und Abb. 4.1) putative Palmitoylierungsstellen darstellen. Weiterhin befanden sich in beiden Proteinen Glycinreste an den Stellen 210 (AtRem 1.2) bzw. 188 (AtRem 1.3), die

posttranslationalen Myristoylierungen unterliegen könnten (siehe Abb. 4.1, siehe unten). Es wurden verschiedene mutante Proteinversionen hergestellt, um mögliche Modifikationsstellen zu identifizieren (siehe Abb. 15 und 21).

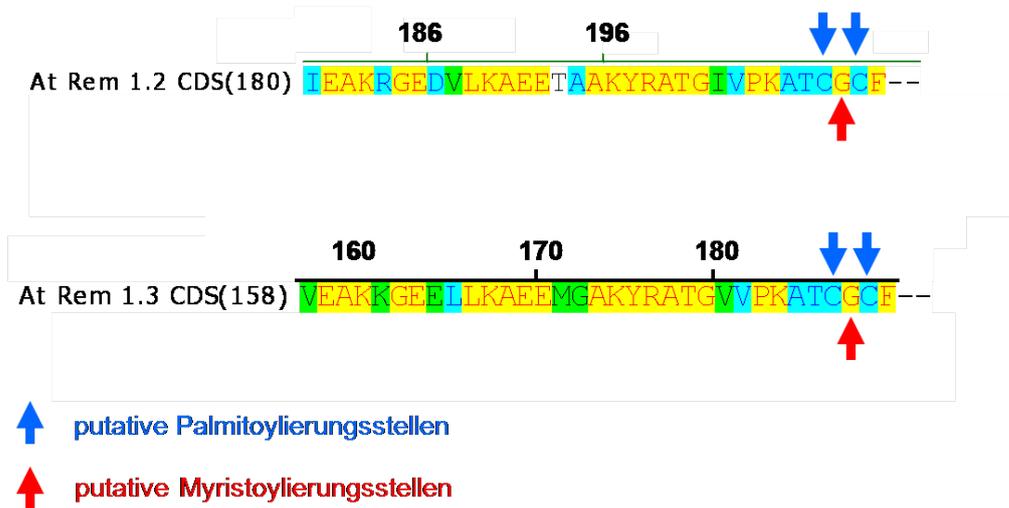


Abb. 4.1 Putative posttranslationale Modifikationsstellen der AtRemorine 1.2 und 1.3.

Palmitoylierungen sind reversible Modifikationen, die posttranslational erfolgen. Für eine Palmitoylierung ist kein spezieller AS-Kontext nötig, jedoch erfolgt diese Art der Modifikation vorwiegend an Cysteinresten. Dabei wird Palmitat, eine gesättigte Fettsäure bestehend aus 16 Kohlenstoffatomen, über eine Thioesterbindung durch eine Palmitoyl-Acyl-Transferase angehängt. Eine zuvor erfolgte Myristoylierung ist jedoch Voraussetzung für eine Palmitoylierung (Alland *et al.*, 1994).

Myristoylierungen sind irreversible Proteinmodifikationen, die überwiegend an Glycinresten auftreten und durch das Enzym N-Myristoyltransferase vermittelt werden. Diese Modifikationen können sowohl ko- als auch posttranslational erfolgen. Dabei wird Myristat, eine gesättigte Fettsäure bestehend aus 14 Kohlenstoffatomen, kovalent an einen Glycinrest in einem spezifischen AS-Kontext angehängt. Das modifizierende Enzym, die N-Myristoyltransferase, besitzt in Pflanzen, in Pilzen sowie im Tierreich hochkonservierte Funktionen (Resh, 1999).

Myristoylierungen können die Stabilität von Proteinen beeinflussen und die Fähigkeit erhöhen, mit anderen hydrophoben Proteindomänen oder der PM zu interagieren (Olsen und Kaarsholm, 2000; Resh, 1999; Zeng *et al.*, 1993). Kovalent ans Protein gebunden führt die Modifikation dazu, dass Proteine an die PM angeheftet werden können. Auch kann durch die Myristoylierung eine Rekrutierung des modifizierten Proteins in endogene Membranen

erfolgen, wie in das endoplasmatische Retikulum oder andere subzelluläre Membransysteme (Podell und Gribkov, 2004).

Eine Myristoylierung alleine genügt jedoch nicht, um ein Protein an der PM anzuheften. In biophysikalischen Studien wurde nachgewiesen, dass die Bindeenergie welche vom Myristat ausgeht nicht ausreicht, um Proteine vollständig in der PM zu verankern. Ein zweites Signal innerhalb des myristoylierten Proteins ist daher für eine effiziente PM-Bindung des Zielproteins nötig. Dieses zweite Signal kann entweder eine spezifische AS-Abfolge innerhalb des Proteins sein oder eine Palmitoylierung (Resh, 1999).

Beide Modifikationen unterliegen dynamischen Regulierungen. Im Falle der reversiblen Palmitoylierung können angeheftete Palmitatreste durch Palmitoyl-Thioesterasen abgespalten werden. Myristoylierungen jedoch erfolgen irreversibel. Dabei ist die Orientierung des Myristatrestes gegenüber dem Protein nicht statisch, sondern kann zwei Konformationen einnehmen. In der ersten Konformation wird der Myristatrest von einer hydrophoben Tasche des Proteins umschlossen und hat nahezu keinen Kontakt zum Zytosol. In einer zweiten Konformation steht der Myristatrest in Verbindung mit dem Zytosol und kann mit anderen geladenen Molekülen wechselwirken. Diesen Vorgang bezeichnet man auch als „*myristol-switch*“ (dt. Myristat-Schalter). Viele Proteine die diesen Schalter besitzen zeigen reversible PM-Bindungen (Resh, 1999). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass Myristoylierungen und Palmitoylierungen eine Rolle bei der Assoziation tierischer Proteine mit *Lipid Raft*-Domänen einnehmen. Ein Beispiel hierfür sind Flotillin-Proteine. Flotilline sind an der Aktivierung von T-Zellen beteiligt. Myristoylierungen und multiple Palmitoylierungen ermöglichen eine Anheftung dieser Proteine an die PM, wo sie mit Raft-Domänen assoziieren. Für eine *Lipid Raft*-Assoziation scheint neben posttranslationalen Modifikationen die Oligomerisierung von Flotillinen eine Rolle zu spielen (Neumann-Giesen, 2004).

Im Falle des AtRemorins 1.2 zeigte sowohl die d4-Mutante (Abb. 16, B) als auch die Aminosäure-Austauschmutante (ASA; C) eine PM-ständige Lokalisation, während die d15-Mutante nahezu vollständig im Zytosol zu finden war (D). Die Domänen erschienen bei d4- und ASA-Mutanten als „*patchy pattern*“ in der PM (Abb. 16, B und C). Gleichzeitig erschienen in manchen Bereichen makroskopische Proteincluster, die auf eine partiell zytosolische Lokalisation hindeuteten (Abb. 16 C, Bildmitte).

Bei d4- (Abb. 16, B und 17) sowie ASA-Mutanten (Abb. 16, C und 18) führte die gleichzeitige Expression wildtypischer Remorine zu Kollokationen an der PM. Im Falle der ASA-Mutante waren die Proteincluster größtenteils verschwunden (vgl. Abb. 16, C und 18). Die gestörte PM-Lokalisation dieser Mutante ließ sich durch eine Koexpression des

Vollängen-Konstrukts weitestgehend wiederherstellen (Abb. 18). Die d15-Mutante hingegen verblieb auch nach Koexpression der AtRem 1.2-Vollänge im Zytosol (Abb. 16, D und 19). Die Ergebnisse deuteten mögliche Remorin-Remorin-Interaktionen an und indizierten eine Dimerisierung oder auch eine Oligomerisierung von AtRem 1.2-Proteinen.

Klarer zeichnete sich die Möglichkeit einer Remorin-Remorin-Interaktion im Falle des AtRemorins 1.3 ab. Eingeführte Mutationen (d2, d4, ASA und d15; siehe Abb. 21) führten in allen Fällen zu einer zytosolischen Lokalisation (Abb. 22, B-E). Die Vollänge hingegen erreichte erwartungsgemäß die PM und bildete das „*patchy pattern*“ aus (Abb. 22, A). Erfolgte die Koexpression der Vollänge mit AtRem 1.3-Mutanten, gelangten mutante Proteinversionen zurück an die PM (Abb. 23-25), mit Ausnahme der d15-Mutante. Dort verblieb ein Teil des deletierten Proteins im Zytosol, während gleichzeitig Domänen in der PM sichtbar waren, in denen mutante Proteine mit der Vollänge kolokalisiert waren (Abb. 26, B und C).

Für die Remorin C-Termini wurde eine „*coiled coil*“ Struktur vorhergesagt (Bariola *et al.*, 2004). Hinsichtlich der Protein-Protein-Interaktion schien die Funktion dieses Motivs bei den d15-Mutationen negativ beeinträchtigt. Sowohl AtRem 1.2-d15 als auch ein Teil der AtRem 1.3-d15-Mutante verblieb bei gleichzeitiger Expression der entsprechenden Remorin-Vollängen im Zytosol (Abb. 19 und 26). Die Vollängen hingegen erreichten ausnahmslos die PM (gleiche Abb., A). Die d15-Versionen wiesen unter allen Remorin-Mutationen den geringsten Grad an Kolokalisation mit den Vollängen auf (Abb. 19, D und 26, D). Daher scheint das gemeinsame, hoch konservierte AS-Motiv AKYRATG (vgl. Abb. 14 und Abb. 4.1), von denen die Aminosäuren YRATG in den d15-Versionen deletiert sind (Abb. 15 und 21), eine essentielle Rolle bei der Protein-Protein-Interaktion der AtRemorine zu spielen.

Für das AtRem 1.2 schienen sich die posttranslationalen Modifikationen an den Stellen 209 bis 211 (vgl. Abb. 15) bedingt auf die PM-Lokalisation auszuwirken, es befand sich nur ein kleiner Teil der Proteine im Zytosol (Abb. 16, C). Daher ist es wahrscheinlich, dass weitere Modifikationen erfolgen, die eine PM-Assoziation bewirken.

Von den letzten 15 C-terminalen AS des AtRemorins 1.3 scheint das Cystein an Stelle 187, das Cystein an Stelle 189 sowie das Glycin an Stelle 188 posttranslationalen Modifikationen zu unterliegen (vgl. Abb. 21 und Abb. 4.1). Sowohl die Deletion als auch der Austausch einer oder mehrerer dieser AS führten zu einer zytosolischen Lokalisation (Abb. 22). Möglicherweise werden die Cysteine an den Stellen 187 und 189 am C-Terminus des AtRemorins 1.3 palmitoyliert, während das Glycin an Stelle 188 einer Myristoylierung unterliegen könnte. Eine Dithiothreitol-Behandlung von Proteinen entfernt Palmitoylierungen

(Coskun und Simons, 2010). Im Falle der Remorine wäre dies eine Möglichkeit zu testen, ob beide Modifikationsarten für eine PM-Anheftung nötig sind - dies wurde aber in dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt.

FRAP-Experimente mit den mutierten Remorinen ergaben, dass keines der Proteine eine Fluoreszenzrückkehr in die Membrandomänen zeigte (Abb. 20 und 27). Eingeführte Mutationen hatten keine detektierbaren Auswirkungen auf die Proteindynamik im Vergleich zum Wildtyp (vgl. Abb. 11). FRAP-Versuche mit der AtRem 1.2-d15-Mutante (Abb. 19) schlugen fehl, vermutlich aufgrund einer zytosolischen Lokalisation. Im Falle der AtRem 1.3-d15-Mutante konnten nur die mit dem WT-Remorin kolokalisierten Proteine an der PM ausgebleichen werden. Diese zeigten ebenfalls keine Fluoreszenzrückkehr (nicht gezeigt).

Zusammen mit den Lokalisationsstudien mutanter Remorine indizierten die Ergebnisse aus den FRAP-Versuchen die Ausbildung makromolekularer Strukturen wie Filamente in den Membrandomänen. Diese könnten durch spezifische Remorin-Remorin-Interaktionen entstehen.

4.5 Stimulierte Emission-Depletion Mikroskopie (STED)

Mit Generierung der stabilen Remorin Linie (Abb. 1-4) stand die Tür für die Einbeziehung der STED-Mikroskopie offen. Unter Verwendung eines geeigneten sekundären Antikörpers (AK), der eine geringe Stokes-Verschiebung (engl.: „*Stokes-shift*“) aufwies und hohe Photostabilität sowie Fluoreszenzintensität besaß, wurden Gewebeproben erfolgreich angefärbt. Der Unterschied zwischen regulärer konfokaler *Laser Scanning*-Mikroskopie (Abb. 28, A) gegenüber der STED-Mikroskopie (Abb. 28, B) wurde anhand des stark verbesserten Auflösungsvermögens deutlich. Nach dem Aufzeichnen der eGFP- und Atto647N-Signale im konfokalen Modus (Abb. 29, A und B) wurde zunächst deren Kolokalisation überprüft (C, D). Beide Signale resultierten aus den gleichen Domänen und indizierten die erfolgreiche Bindung des primären AK an eGFP::StRem 1.3, bzw. die spezifische Bindung des sekundären Atto647N-AK an den Primären (Abb. 29, D). Anhand einer „*Line Analysis*“ (dt.: Linienanalyse) wurden nun die Durchmesser der Membrandomänen bestimmt. Die in grüner (eGFP) und roter (Atto647N) Farbe fluoreszierenden Bereiche wurden vermessen (Abb. 30, A und B) und deren Durchmesser gegeneinander aufgetragen (C). Diese waren in beiden Aufnahmen identisch (Abb. 30, C). Aus akquirierten Aufnahmen wurden weitere Membrandomänen zufällig ausgewählt und Linienanalysen durchgeführt. EGFP- und Atto647N-Signale waren

nahezu deckungsgleich (Abb. 31) und indizierten eine hochspezifische Atto647N-Bindung an eGFP::StRem 1.3.

Die Größenbestimmung der Membrandomänen erfolgte unter Verwendung der *LAS AF*, der *Image J*, und der *Volocity 64x* Software. Mit *LAS AF* wurden dieselben Membranbereiche („regions of interest“, ROI's) vor und nach dem Anschalten des Depletionslasers vermessen, um unspezifische Signale auszusortieren (Abb. 32). Plotprofil-Analysen (Abb. 33) machten deutlich, dass die Membranstrukturen deutlich unter der Auflösungsgrenze herkömmlicher konfokaler Systeme von circa 220nm lagen. In der konfokal generierten Aufnahme waren die Domänen nicht als einzelne Bereiche aufzulösen (Abb. 33, A mit zugehörigem Plotprofil, B). Im STED-Modus hingegen waren die Domänen als einzelne, getrennte Bereiche auszumachen (Abb. 33, C), das zugehörige Plotprofil zeigte vier distinkte Fluoreszenzpeaks für die vier Domänen an (D, gleiche Abbildung; die Durchmesser der Domänen sind anhand der Linienachse ersichtlich). Das Auflösungsvermögen des STED-Systems lag um die 60nm (siehe Anhang, Abb. A4).

Für PM-ständige, Remorin-markierte Nanodomänen wurde eine empirische Größenverteilung von 97 ± 4 nm Durchmesser ermittelt (Abb. 34; STED-Modus). Dieser Wert spiegelt aufgrund der verwendeten Einbettungstechnik (siehe Kap. 3.5.2 und 2.7 ff) mit hoher Wahrscheinlichkeit die tatsächlichen Größenverhältnisse der Nanodomänen in Arabidopsis Plasmamembranen wieder.

In *Saccharomyces* wurden Membrandomänen beschrieben, die ähnliche Eigenschaften aufwiesen wie die Remorin-markierten Domänen. Deren Größe betrug 300nm, gemessen mit einem konfokalen *Laser Scanning*-System (Grossmann *et al.*, 2007). REM-Messungen kompartimentierter Membranbereiche in Tabakblättern ergaben Größen um die 80nm, ebenfalls unter Verwendung des StRemorins 1.3 als Markerprotein (Raffaele *et al.*, 2009). Vergleicht man die STED- und die REM-Datensätze aus Arabidopsis und Tabak miteinander, so liegen die mit verschiedenen bildgebenden Systemen ermittelten Größen in einem identischen Bereich und untermauern die Existenz kompartimentierter Membranbereiche in Pflanzen.

4.6 DRM-Proteine in planta

Neben den AtRemorinen wurden weitere Proteine der Arabidopsis DRM-Fraktion mit biochemischen Techniken identifiziert. Um die Lokalisation dieser Proteine in Nanodomänen zu überprüfen, wurden sie zusammen mit den Remorinen als etablierte Markerproteine für

kompartimentierte Membranbereiche *in planta* koexprimiert und der Grad an Kolokalisation bestimmt. Mögliche physiologische Aufgaben der Nanodomänen sollten erforscht werden.

4.6.1 Die Anionenkanäle SLAC1/SLAH3 und deren Rolle beim ABA-induzierten Stomaschluß

SLAH3 repräsentiert eines von vier zu SLAC 1 homologen Genen in Arabidopsis. Im Gegensatz zum schließzellspezifisch exprimierten Anionenkanal SLAC1 ist SLAH3 ubiquitär in der Pflanze zu finden (Geiger *et al.*, 2011). Hohe CO₂-Partialdrücke in der Luft und das Phytohormon ABA führen in wildtypischen Arabidopsis Pflanzen innerhalb weniger Minuten zum Schließen der Stomata. Verlustmutanten zeigten allerdings weder einen schnellen CO₂-bedingten Stomaschluß, noch reagierten sie auf ABA (Negi *et al.*, 2008). ABA wird bei Trockenstress in der Wurzel und zum Teil auch in Blättern synthetisiert und über das Xylem in oberirdische Pflanzenteile transportiert (Zhu, 2002). Dort wird ABA von zytosolischen Rezeptorproteinen aus der PYR/PYL/RCAR-Genfamilie erkannt (Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009).

Die Identifizierung dieser ABA-Rezeptoren und der SLAC1 Anionenkanal-Familie führte in den letzten Jahren zur Aufdeckung des schnellen, Transkriptions-unabhängigen ABA-Signaltransduktionsweges, der sich in einen kalziumunabhängigen und einen kalziumabhängigen Weg aufzweigt (Geiger *et al.* 2011; 2010; 2009). Dieser Signalweg umfasst vier Stufen: i) ABA-Perzeption durch PYR/PYL/RCAR-Rezeptoren, ii) Inhibierung von Proteinphosphatasen der PP2C-Familie (ABI1 und ABI2) durch Interaktion mit ABA-Rezeptoren, iii) dadurch löst sich die Inhibierung der kalziumunabhängigen Kinase OST1 und von kalziumabhängigen Kinasen aus der CDPK-Familie durch ABI1 und ABI2, iv) Aktivierung von SLAC1/SLAH3 mittels Phosphorylierung durch OST1 bzw. CPK's. Aktive Anionenkanäle entlassen Chlorid und Nitrat, was schließlich zur Depolarisation der Schließzellularmembran führt. Der Depolarisations-aktivierte Kaliumkanal GORK wird daraufhin aktiv und entlässt Kalium aus den Schließzellen. Der Verlust an osmotisch aktiven Ionen führt schließlich zu einem Abfall des Schließzellturgors und damit zum Stomaschluß.

Für SLAH3 wurde gezeigt, dass dieser Anionenkanal inhomogen in der PM verteilt ist und in Nanodomänen erscheint (Abb. A5, Anhang A). Wurde SLAH3 zusammen mit AtRem 1.2 exprimiert, kolokalisierten beide Proteine in Nanodomänen (Abb. 35). Die Pearson und Spearman Koeffizienten lagen bei 0,46 und 0,32 (Abb. 35, D) und deuteten eine Korrelation an. Mit AtRem 1.3 zeigte SLAH3 ähnlich stark ausgeprägte Korrelation (Abb. 36), was durch Pearson und Spearman Koeffizienten von 0,43 und 0,27 deutlich wurde (gleiche Abb., D).

4.6.2 Die kalziumaktivierte Proteinkinase CPK21: Regulationsmechanismen und subzelluläre Lokalisation

CPK21 ist eine Serin-Threonin-Proteinkinase aus der CDPK-Familie, die durch Kalziumbindung aktiviert wird, jedoch weiteren Regulationen über (De-)Phosphorylierungen unterliegen kann (Romeis *et al.*, 2001; 2000). Mitglieder der CDPK-Familie verfügen über vier distinkte Proteindomänen: eine variable N-terminale Domäne, eine Proteinkinase-Domäne, eine autoinhibitorische Domäne und eine Calmodulin-ähnliche Domäne, welche über EF-Hände verfügt. EF-Hände binden freies Kalzium und ermöglichen eine direkte Aktivierung. Dabei sind CDPK-Proteine als Monomere funktionell (Cheng *et al.*, 2002).

Bei niedrigen Konzentrationen an freiem Kalzium wird die autoinhibitorische Domäne von der Kinasedomäne gebunden und dadurch die Kinaseaktivität stark eingeschränkt. Steigt die freie zytosolische Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ an, wird freies Kalzium durch die EF-Hände gebunden. Kalzium kann aus intrazellulären Speichern wie dem endoplasmatischen Retikulum oder der Vakuole freigesetzt werden, oder auch über die PM einströmen. Es finden Konformationsänderungen statt und das Pseudosubstrat wird nicht länger von der Kinasedomäne gebunden, wodurch die Proteinkinase aktiviert wird (Harmon *et al.*, 1994; Harper *et al.*, 1994). Zusätzlich zur Kalziumbindung kann eine Regulation von CDPK-Kinasen über (De-) Phosphorylierungen erfolgen. Für die NtCDPK2 Kinase aus Tabak muss sowohl eine Kalziumbindung als auch eine Phosphorylierung erfolgen, damit diese aktiv werden kann (Romeis *et al.*, 2001; 2000). Auch könnte die Anwesenheit spezifischer Lipide Einfluss auf die Kinaseaktivität nehmen (Farmer und Choi, 1999).

Für CPK21 wurde eine direkte Interaktion mit dem Anionenkanal SLAH3 gezeigt (Geiger *et al.*, 2010). CPK21 wurde in DRM-Isolationen gefunden und verschwand nach Entfernung der Sterole durch MCD-Behandlung vollständig aus dieser (Kap. 3.6.2).

Lokalisationsstudien zeigten, dass CPK21 sowohl mit AtRem 1.2 in Membran-Nanodomänen kolokalisierte (Abb. 37), als auch mit AtRem 1.3 (Abb. 38). Neben aktiven CPK21-Kinasen wurde auch die CPK21-Mutante G2AC3S Lokalisationsstudien unterworfen (siehe Anhang A, Abb. A6, A). In dieser Mutante sind zwei Aminosäuren ausgetauscht, die posttranslationalen Myristoylierungen unterliegen (Chen *et al.*, 2002). Aufgrund der fehlenden Myristoylierung verblieb die CPK21-Mutante im Zytosol (Abb. A6, A), während wildtypische Kinasen an der PM lokalisiert waren (gleiche Abb., B) und dort eine inhomogene Verteilung zeigten (C). Koexpressionsstudien mit der CPK21-G2AC3S-Mutante und AtRem 1.2 (Abb. A7, Anhang A) lieferten negative Korrelationskoeffizienten, beide Proteine waren voneinander separiert (Abb. A7, D). Die gleichzeitige AtRem 1.2-Expression

hatte keine Auswirkung auf die Lokalisation von CPK21-G2AC3S was andeutet, dass die Proteine auf dem Weg in die PM nicht miteinander interagieren.

4.6.3 Die Abscisinsäure-regulierte Proteinphosphatase ABI1: Regulationsmechanismen und subzelluläre Lokalisation

CDPK-Proteinkinasen unterliegen Regulationen durch Serin-Threonin-Phosphatasen des Typs PP2C, deren Aktivität von der vorherrschenden intrazellulären Magnesiumkonzentration abhängig ist (Ingebritsen und Cohen, 1983). Die den SLAC1-Anionenkanal regulierenden CPK-Kinasen 21 und 23 unterliegen ihrerseits Regulationen durch die PP2C-Phosphatasen ABI1 und ABI2 („*ABA insensitive*“; At4g26080; At5g57050; Leung *et al.*, 1997; Armstrong *et al.*, 1995). ABI1 konnte ebenso wie CPK21 in der Arabidopsis DRM-Fraktion detektiert werden (Kap. 3.6). ABI1 ist ein negativer Regulator ABA-vermittelter Signaltransduktionskaskaden und wird in Anwesenheit von ABA durch zytosolische PYR/PYL/RCAR-Rezeptoren inaktiviert (Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009). In TEVC-Messungen in *Xenopus*-Oozyten wurden nach simultan erfolgter SLAC1- und CPK23-Expression SLAC1-vermittelte Ionenströme gemessen. Diese waren stark reduziert, sobald die ABI1-Phosphatase zusätzlich exprimiert wurde (Geiger *et al.*, 2010). Die Regulation von SLAH3 erfolgte analog zur Regulation von SLAC1 (Geiger *et al.*, 2011).

In planta war ABI1 weder mit AtRem 1.2 (Abb. 39) noch mit AtRem 1.3 an der PM kolokalisiert (Abb. 40), sondern verblieb im Zytosol. Es waren Strukturen sichtbar, bei denen es sich in Teilen um Zytoplasmastränge gehandelt haben könnte (Abb. 39 und 40, A). Eine Assoziation mit Komponenten des Zytoskeletts schien denkbar und wurde bereits für andere Mitglieder der PP2C-Proteinfamilie beschrieben (Koh *et al.*, 2002; Waelkens *et al.*, 2000). Die Korrelationskoeffizienten waren negativ und zeigten die Tendenz der Phosphatase an, sich weitestgehend von den Membran-Nanodomänen zu separieren (Abb. 39 und 40, D).

4.6.4 FRAP-Experimente mit Proteinen der DRM-Fraktion

FRAP-Experimente mit CPK21 und SLAH3 brachten zu Tage, dass diese Proteine stabil in den Domänen gehalten werden. Mit CPK21 konnte innerhalb einer Zeitspanne von 80 Sekunden keine Fluoreszenzrückkehr detektiert werden (Abb. 41). Auch SLAH3 zeigte keine Fluoreszenzrückkehr (Abb. 42). Dies ließ vermuten, dass die laterale Bewegungsfreiheit beider Proteine in den Domänen eingeschränkt ist. Im Falle des StRemorins 1.3 wurde in Protoplasten eine partielle Fluoreszenzrückkehr nachgewiesen, was die Existenz einer mobilen Fraktion in den Domänen signalisierte. Proteine dieser Fraktion scheinen

Assoziationen mit Komponenten der Zellwand zu unterliegen (siehe Kap. 4.3.2, 4.3.2.1 und Abb. 13). In Epidermiszellen mit intakter Zellwand hingegen unterblieb die Fluoreszenzrückkehr (Abb. 12). Möglicherweise werden SLAH3 und CPK21 in Epidermiszellen durch Interaktionen mit makromolekularen Strukturen an ihren Stellen in den Domänen gehalten.

In FRAP-Messungen an tierischen und pflanzlichen Zellen wurden für PM-ständige Proteine unterschiedlich lange Zeitspannen bezüglich einer Fluoreszenzrückkehr gemessen. In tierischen Zellen liegen die Zeiten der halbmaximalen Fluoreszenzrückkehr von Proteinen in *Lipid Raft*-Bereichen im einstelligen Sekundenbereich (Rotblat *et al.*, 2010; Eisenberg *et al.*, 2006; Causeret *et al.* 2005; Kenworthy *et al.*, 2003). In Pflanzen hingegen scheint die Fluoreszenzrückkehr von Proteinen in kompartimentierten PM-Bereichen meist langsamer zu verlaufen (vgl. Tab. 11, Kap. 4.3.2.1). AtPEN1-Proteine („*pentazyklische Triterpen-Synthase I*“) beispielsweise akkumulieren rund um die Eintrittsstellen pathogener Pilze in der PM und formen Domänen. Die Proteine in den Domänen sind dabei sehr stabil und zeigten in FRAP-Versuchen mit einem GFP::PEN1 Fusionsprotein auch sechs Stunden nach dem Ausbleichen keine Rückkehr der Fluoreszenz (Bhat *et al.*, 2005). In Bereichen der PM in denen kein Pathogenbefall vorlag war PEN1 gleichmäßig verteilt; dort kehrte die GFP-Fluoreszenz nach 25 Minuten zurück. PEN1 wurde in der Arabidopsis DRM-Fraktion detektiert (Zappel und Panstruga, 2008). Der Kaliumkanal KAT1 ist in Tabak Epidermiszellen in stabilen PM-ständigen Clustern lokalisiert, die über Beobachtungszeiträume von 20 Minuten stationär in der PM verharrten. In „*Pulse-Chase*“-Experimenten mit einem photoaktivierbaren GFP-Protein wurde gezeigt, dass KAT1 während der Beobachtungszeiträume von 300 Sekunden keine lateralen Bewegungen in den Domänen zeigte. Daher könnte KAT1 über Proteinassoziationen mit stabilen Strukturen in Verbindung stehen, möglicherweise durch Interaktionen mit Q-SNARE Proteinen (Sutter *et al.*, 2006). In Experimenten an *Vicia faba* Schließzellen stimmte das charakteristische, radiale KAT1::GFP Streifenmuster in der PM mit der Anordnung der Zellulosemikrofibrillen überein. Nach dem Verlust des Turgors ging das Muster verloren und konnte durch eine Re-Plasmolyse wiederhergestellt werden. Das charakteristische radiale KAT1-Muster könnte aus dem engen Kontakt der PM zur Zellwand resultieren (Homann *et al.*, 2007). Die FRAP-Versuche mit CPK21 und dem Anionenkanal SLAH3 deuteten ebenfalls eine Assoziation mit stabilen Strukturen an.

4.7 Proteininteraktionen in Membran-Nanodomänen

Für SLAC1 wurde eine direkte Interaktion mit den Serin-Threonin-Proteinkinasen CPK21 und CPK23 gezeigt (Geiger *et al.*, 2010). Das SLAC1-Homolog SLAH3 wird sowohl in Schließzellen, als auch insbesondere im Mesophyllgewebe exprimiert. In TEVC-Messungen an *Xenopus*-Oozyten wurde festgestellt, dass SLAH3/CPK21 Koexpressionen zu größeren SLAH3-vermittelten Anionenströmen führten als Koexpressionen von SLAH3 mit CPK23 (Geiger *et al.*, 2011). Daher wurde für Versuche hinsichtlich der Aktivierung von SLAH3 *in planta* die CPK21 Proteinkinase fokussiert. Neben den Schließzellen wird ABA im Mesophyllgewebe perzipiert und induziert dort zahlreiche Signaltransduktionsketten (Kline *et al.*, 2010). CPK21 und dessen Regulator, die ABA-abhängige ABI1-Phosphatase, sind in Schließzellen und im Mesophyllgewebe abundant (Geiger *et al.* 2011). Die Regulationsmechanismen, denen SLAH3 durch (De-) Phosphorylierungen unterliegen könnte, konnten daher an intaktem Arabidopsis Mesophyllgewebe studiert werden. In diesem Gewebetyp erschien SLAH3 in Membrandomänen (Abb. A5, Anhang A) und kolokalisierte mit AtRemorinen (Abb. 35 und 36), ebenso wie die CPK21-Kinase (Abb. 37 und 38). Möglicherweise könnten spezifische Protein-Protein-Interaktionen auf PM-Nanodomänen beschränkt sein.

Über einen BiFC-Ansatz sollten Interaktionen zwischen SLAH3 und CPK21 *in planta* aufgedeckt werden. Das BiFC-Signal zeigte eine physikalische Interaktion zwischen SLAH3 und CPK21 an; dabei war das Signal auf distinkte PM-Bereiche beschränkt (Abb. 43, B). Das BiFC-Signal überlappte mit dem Remorin Signal (Abb. 43, C), was die Korrelationskoeffizienten belegten (gleiche Abb., D). Um die Spezifität der SLAH3/CPK21-Interaktion in PM-ständigen Domänen zu überprüfen, wurden Kolokalisationsstudien mit der CPK21 Mutante G2AC3S unternommen. Im Falle der Mutante unterblieb eine PM-ständige Lokalisation, sehr wahrscheinlich aufgrund des Fehlens einer Myristoylierungsstelle am N-Terminus (siehe Anhang, Abb. A6, A). Es wurde weder eine Kolokalisation mit AtRem 1.2 (Abb. A7, Anhang A), noch mit SLAH3 (Abb. A8, Anhang A) beobachtet. Dies deutete an, dass für eine SLAH3/CPK21-Interaktion die PM-Assoziation der Kinase essentiell ist. Die Ergebnisse indizierten, dass die spezifische SLAH3/CPK21-Interaktion in Nanodomänen auf der zytosolischen Seite der Lipiddoppelschicht stattfindet.

Für den Nachweis der Interaktion zwischen CPK21 und dessen Regulator, der Proteinphosphatase ABI1, wurden ebenfalls BiFC-Konstrukte hergestellt. In Koexpressionsstudien mit AtRem 1.3 wurde für diese Proteinkonstellation ein starkes BiFC-Signal detektiert (Abb. 44, B). Das Signal war dabei, ebenso wie bei der spezifischen SLAH3/CPK21-

Interaktion, nicht homogen in der PM verteilt. Die CPK21/ABI1-Interaktion fand in distinkten Bereichen der PM statt, in denen sich auch das Remorin Markerprotein befand (Abb. 44, A und C). Durchgeführte Analysen lieferten hohe Korrelationskoeffizienten von 0,472 und 0,409 (gleiche Abb., D).

Es fiel auf, dass der Grad an Kolo­kalisierung zwischen AtRem 1.3 und den Interaktionspartnern SLAH3 und CPK21 bzw. CPK21 und ABI1 signifikant höher lag als bei der Koexpression einzelner Proteinversionen mit AtRem 1.3 (Tab. 12):

	SLAH3	CPK21	ABI1	SLAH3::CPK21	CPK21::ABI1
Pearson	0.43	0.26	-0.20	0.48	0.47
Spearman	0.27	0.19	-0.23	0.42	0.41

Tab.12 Korrelation mit AtRem 1.3; (**links**): Korrelationskoeffizienten einzelner Proteine mit AtRem 1.3; (**rechts**): Korrelation der BiFC-Interaktionspartner mit AtRem 1.3.

Besonders deutlich spiegelten sich die Unterschiede in den Werten der Korrelationskoeffizienten der Phosphatase ABI1 wider. Nach transienter Expression von ABI1 mit AtRem 1.3 lagen diese im negativen Bereich - ein Indiz für die Separation beider Proteine (Tab. 12, Zahlen rot markiert). Erfolgte eine CPK21/ABI1 Koexpression, stieg die Tendenz der Proteine sich in Remorin-markierten Domänen anzusiedeln signifikant an (Tab. 12, rechts). Ebenso stiegen die Werte der Korrelationskoeffizienten nach Koexpressionen von SLAH3 mit CPK21 an (Tab. 12; aufgezeigte Werte beziehen sich auf korrelierte AtRem 1.3 Markerproteine).

Die Daten aus den Korrelationsanalysen indizierten spezifische Proteininteraktionen zwischen SLAH3/CPK21 und CPK21/ABI1 in Nanodomänen. An dieser Stelle sei noch einmal darauf verwiesen, dass die BiFC-Detektionsmethode zu irreversiblen Bindungen zwischen den beteiligten Proteinen führen kann (Bracha-Drori *et al.*, 2004). Daher könnte es sein, dass die Korrelationskoeffizienten nativer Proteinversionen mit anderen Detektionsmethoden wie beispielsweise einem Fluoreszenz-Energietransfer (FRET; Clegg, 2009; Stryer, 1978; Förster, 1947) *in planta* etwas niedriger liegen, da die Protein-Protein-Interaktionen mit hoher Wahrscheinlichkeit transient erfolgen.

4.7.1 SLAH3/CPK21-Interaktion: mögliche Mechanismen der SLAH3-Aktivierung

Basierend auf Daten, die durch transiente Überexpression fluoreszenzmarkierter Proteine in Arabidopsis gewonnen wurden scheint es sich im Falle der kalziumabhängigen, ABA-regulierten SLAH3-Aktivierung so zu verhalten, dass aktivierte CPK21-Kinasen in Anwesenheit von ABA mit dem Anionenkanal interagieren und im Bereich des N-Terminus an Serin-Threonin-Resten phosphorylieren/aktivieren, wie es auch für SLAC1 gezeigt wurde (Geiger *et al.*, 2011; 2010). Hierzu werden CPK21-Proteine verstärkt in die Domänen rekrutiert (Tab. 12). Für die Aktivierung von CPK21-Kinasen ist eine vorausgehende Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels nötig (Cheng *et al.*, 2002). Darüber hinaus können CDPK-Kinasen weiteren Regulierungen durch Phosphorylierungen unterliegen (Romeis *et al.*, 2001). Es kommt zu einer physikalischen Interaktion aktivierter CPK21-Kinasen mit SLAH3 (Abb. 43). Für diese Interaktion scheint die PM-Assoziation der Kinase essentiell zu sein (siehe Anhang A, Abb. A8). Ein möglicher Mechanismus der SLAH3-Aktivierung ist in Abb. 4.2 dargestellt.

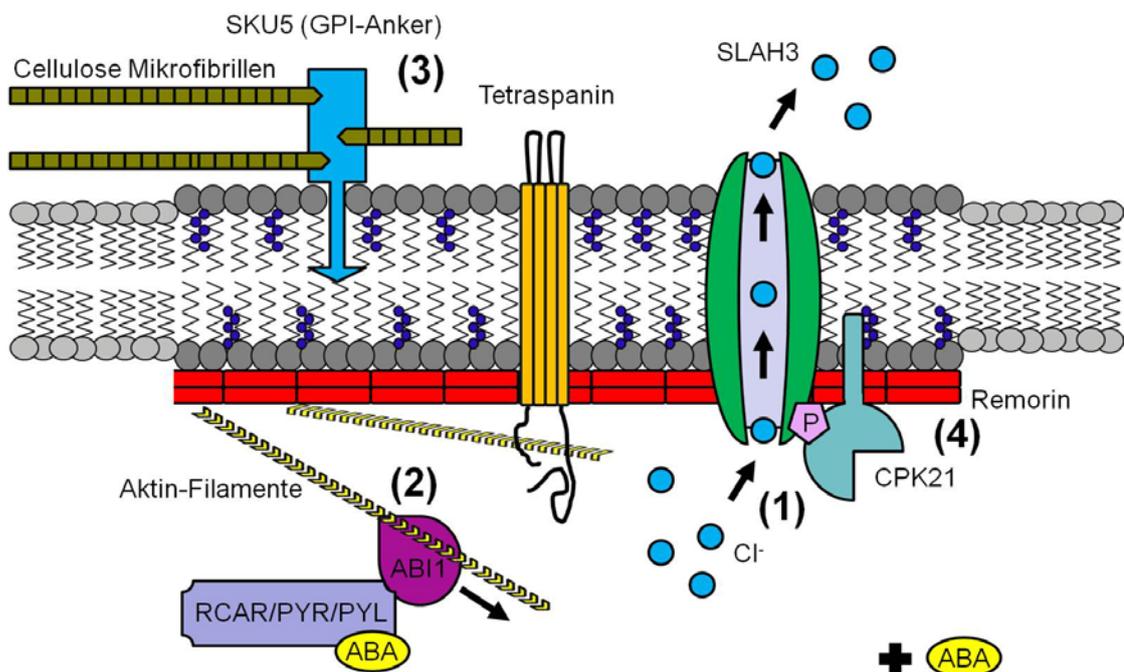


Abb. 4.2 Ein möglicher Mechanismus der SLAH3-Aktivierung in Anwesenheit von ABA; (1): aktive CPK21-Kinasen vermögen SLAH3 an der PM durch Phosphorylierung zu aktivieren, aufgrund einer ABA-induzierten räumlichen Trennung der ABI1-Phosphatase von der Nanodomäne, vermittelt durch zytosolische ABA-Rezeptoren (2); (3): stabilisierende Proteine; SKU5 ist auf der extrazellulären Seite der PM verankert und steht daher höchstwahrscheinlich nicht direkt mit zytosolischen Komponenten in Kontakt; weitere Proteine müssen bei der stabilen Verankerung der Domänen in der PM involviert sein, wie möglicherweise die Tetraspanine; (4): Remorine könnten auf der dem Zytosol zugewandten Seite der PM ein filamentartiges Netzwerk ausbilden und zusätzlich Stabilität vermitteln.

Für SLAH3-vermittelte, kalziumabhängige und ABA-regulierte Transportprozesse über die PM muss eine physikalische Interaktion aktivierter CPK21-Kinasen mit dem Anionenkanal erfolgen; dies erfolgt in Anwesenheit von ABA und hohen Konzentrationen an freiem zytosolischen Kalzium (Abb. 4.2, 1). Elektrophysiologische Messungen belegen, dass CPK21-Kinasen nur dann aktiv sind, solange ABI1-Phosphatasen abwesend bzw. räumlich von diesen getrennt sind (Geiger *et al.*, 2010). Um eine räumliche Trennung zwischen CPK21 und ABI1 zu gewährleisten, erscheinen Interaktionen von ABI1 mit Komponenten des Zytoskeletts wahrscheinlich, während aktive Kinasen mit der PM assoziiert sind (Abb. 4.2, 2). Assoziationen von Phosphatasen des Typs PP2C, zu denen ABI1 gehört, mit zytoskelettären Komponenten wurden bereits beschrieben (Koh *et al.*, 2002; Waelkens *et al.*, 2000). Für die räumliche Trennung von ABI1 und CPK21 könnte ABA von entscheidender Bedeutung sein. ABA wird zunächst von zytosolischen RCAR/PYR/PYL-Rezeptoren gebunden, welche dann unter Einbindung weiterer Komponenten die ABI1-Bindung an zytoskelettale Komponenten bewirken könnten (Abb. 4.2, 2). ABI1 verlässt schliesslich die Nanodomäne und wird ins Zytosol transloziert. Die Nanodomänen scheinen in der PM durch GPI-verankerte Proteine wie SKU5 sowie von transmembranen Proteinen stabilisiert zu sein (Abb. 4.2, 3), welche laterale Bewegungen der Domänen unterbinden. SKU5-Proteine, die mit den Remorinen *in planta* Korrelation zeigten (siehe Anhang A, Abb. A2), sind mittels GPI-Modifikation auf der extrazellulären Seite der PM verankert. Da SKU5-Proteine sehr wahrscheinlich mit Komponenten der Zellwand in Verbindung stehen, müssen weitere Proteine involviert sein, um die Zellwand-vermittelte Stabilität auf die zytosolische Seite der PM zu übertragen. Möglicherweise sind Tetraspanine dabei involviert. Die Remorine könnten zur Stabilität der Domänen beitragen, indem sie ein filamentartiges Netzwerk auf der dem Zytosol zugewandten Seite der PM ausbilden (Abb. 4.2, 4). Dieses Netzwerk könnte die verschiedenen, in die Domänen eingelagerten Komponenten an Ort und Stelle halten und möglicherweise Proteininteraktionen zwischen membranständigen und mobilen Komponenten erleichtern, wie beispielsweise Interaktionen von CPK21-Kinasen mit ABI1 (siehe auch nachfolgende Abb. 4.3).

4.7.2 CPK21/ABI1-Interaktion: mögliche Mechanismen der SLAH3-Inaktivierung

Für die ABA-regulierte SLAH3-Inaktivierung muss eine physikalische Interaktion zwischen CPK21 und ABI1 erfolgen (Geiger *et al.*, 2010). In Abwesenheit von ABA ist ABI1 aktiv. Erfolgt ein ABA-Signal wird ABI1 inaktiviert, sehr wahrscheinlich vermittelt durch

zytosolische RCAR/PYR/PYL-Rezeptoren (Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009). Die subzelluläre Lokalisation eines Großteils der ABI1-Phosphatasen war in Koexpressionsexperimenten mit den Remorinen zytosolisch. Möglicherweise werden inaktive ABI1-Phosphatasen bei hohen subzellulären ABA-Konzentrationen unter Einfluss von RCAR/PYR/PYL-Rezeptoren von der PM ins Zytosol transloziert. Hierbei scheinen ABI1-Proteine Assoziationen mit Komponenten des Zytoskeletts zu unterliegen (vgl. Abb. 39, 40 und Abb. 4.2). Bei niedrigen physiologischen ABA-Konzentrationen wird ABI an die PM rekrutiert und erscheint in Nanodomänen. Möglicherweise erfolgt der Transport an die PM dabei wiederum entlang zytoskelettärer Komponenten. Die ABI1-vermittelte Dephosphorylierung von CPK21 findet in Nanodomänen statt (Tab. 12); die Kinase wird inaktiviert. Ein möglicher Mechanismus der SLAH3-Inaktivierung ist in Abb. 4.3 dargestellt.

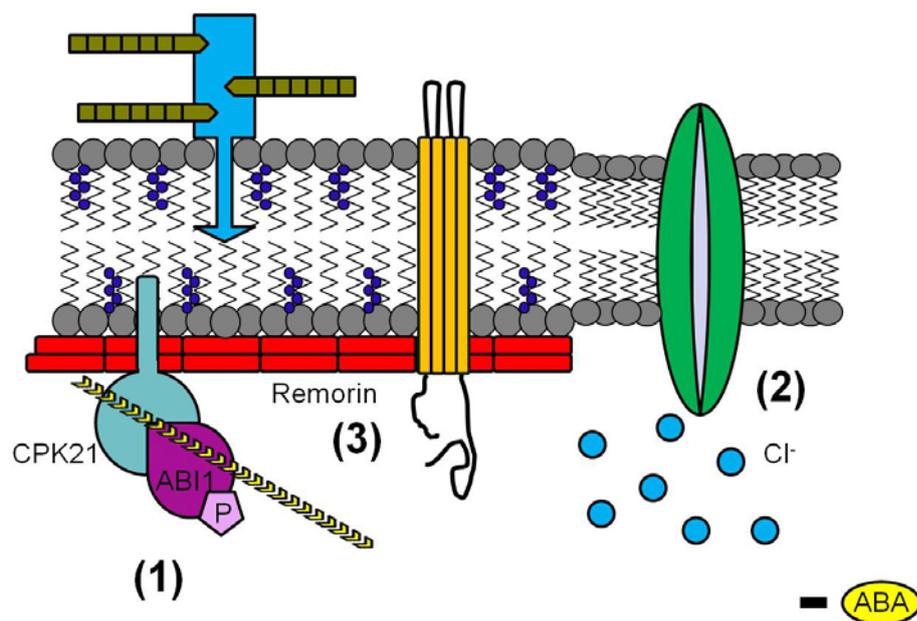


Abb. 4.3 Möglicher Mechanismus der SLAH3-Inaktivierung in Abwesenheit von ABA; (1): aktive ABI1-PPasen interagieren in Nanodomänen mit PM-assozierten CPK21-Kinasen, welche daraufhin ihre Aktivität verlieren und nicht länger mit SLAH3 interagieren; SLAH3 verliert seine Kanalaktivität und verlässt die Nanodomäne (2); (3): stabilisierende Remorine, Tetraspanine und SKU5 (analog zu Abb. 4.2).

Die Interaktion von ABI1 mit CPK21 erfolgt in Nanodomänen. Aktivierte ABI1-Proteine werden bei niedrigen zytosolischen ABA-Konzentrationen an die PM rekrutiert und dephosphorylieren CPK21 (Abb. 4.3, 1). SLAH3 ist aufgrund inaktivierter CPK21-Kinasen nicht länger aktiv und verlässt die Nanodomäne (Abb. 4.3, 2). Die Domänen könnten auf der zytosolischen Seite von den Remorinen stabilisiert sein (Abb. 4.3, 3). Remorine nehmen dabei keinen Einfluß auf stattfindende Proteininteraktionen. In elektrophysiologischen Studien wurden bei Interaktionen zwischen SLAH3/CPK21 und CPK21/ABI1 keine Auswirkungen der Remorine detektiert (Dr. D. Geiger, persönliche Mitteilung).

4.7.3 Mechanismen der Signalübertragung in Membrandomänen *in planta* und mögliche Aufgaben der Remorine

Die Ergebnisse der Interaktionsstudien mit SLAH3, CPK21 und ABI1 deuten darauf hin, dass am Membrantransport beteiligte sowie regulatorische Proteine aktiv in PM-ständigen Nanodomänen gehalten werden. Hinweise lieferten der Anionenkanal SLAH3 und die Proteinkinase CPK21, die inhomogen in der PM verteilt waren (siehe Anhang A, Abb. A5, B; Abb. A6, C). Dort akkumulierten sie in Domänen, welche unter der Auflösungsgrenze konfokaler Systeme lagen (gleiche Abb.) Ebenso werden nicht-regulatorische, Sterol-abhängige Proteine wie die Remorine in Domänen gehalten, wo sie möglicherweise über Remorin-Remorin-Interaktionen filamentartige Strukturen ausbilden und eine Proteinmatrix formen. Diese Matrix könnte sowohl der Aufrechterhaltung der Stabilität der Domänen in der PM dienen als auch bei der Organisation von Proteinen in den Domänen beteiligt sein (siehe Kap. 4.3.2, 4.3.2.1 und 4.4). Hierfür spricht, dass bei gleichzeitiger Überexpression der Remorine sowohl die Lokalisation von SLAH3-Proteinen (siehe Abb. 35 und 36 im Vergleich zu Abb. A5, Anhang A), wie auch die von CPK21-Proteinen in Nanodomänen (siehe Abb. 37 und 38 im Vergleich zu Abb. A6, C; Anhang A) deutlich stärker ausgeprägt war.

Daneben existieren weitere Proteine, die transient an den Nanodomänen teilnehmen - wie beispielsweise ABI1, das nur bei der Interaktion mit CPK21 an der PM erschien (siehe Tab. 12, Kap. 4.7). ABI1 wurde in DRM-Isolationen detektiert; dabei ist ABI1 kein „Core“-Mitglied der DRM-Fraktion (engl. „core“: Kern) wie die AtRemorine 1.2 und 1.3, die stets in DRM-Fraktionen gefunden werden (F. Demir, persönliche Mitteilung). Die hier erhobenen Daten belegen, dass ABI1-Proteine Rekrutierungen unterliegen und transient an den Domänen teilnehmen.

Ein möglicher Aspekt der Proteinakkumulation in einem begrenzten PM-Kompartiment könnte sein, dass Protein-Protein-Interaktionen effizienter ablaufen. Eine Assoziation von Proteinen mit der PM schränkt die Diffusion von drei auf zwei Dimensionen ein, was Interaktionen und das Ausbilden von Multiproteinkomplexen erleichtert (Cafiso, 2005). In tierischen Organismen scheinen Proteine spezifisch in Membrandomänen akkumuliert werden zu können. Bei adrenergen Rezeptoren wurde eine Bindestelle für Cholesterin entdeckt (Cherezov *et al.*, 2007), die für eine Anlagerung der Rezeptoren in *Lipid Raft*-Domänen verantwortlich sein könnte (Lingwood und Simons, 2010). Die Wahrscheinlichkeit, dass sich zwei PM-Proteine finden und spezifisch miteinander interagieren können, wird durch eine Akkumulation in membranständigen Domänen drastisch erhöht. Insbesondere dann, wenn die beteiligten Proteine einem niedrigen Expressionsniveau unterliegen (Nicolau *et al.*, 2006).

4.8 Resümee

Die Resultate dieser Arbeit belegen die Existenz von Nanodomänen in der PM von Pflanzen, welche tierischen „*Lipid Raft*“ (auch „*Membrane Raft*“)-Domänen ähnlich sind. Pflanzliche Nanodomänen zeichnen sich dadurch aus, dass i) dort *in vivo* vorwiegend Sterol-abhängige Proteine wie z. B. Remorine angereichert sind, ii) sie in Arabidopsis einen Durchmesser von $97 \pm 4\text{nm}$ aufweisen, iii) sie in der PM keine lateralen Bewegungen zeigen - möglicherweise bedingt durch die stabilisierende Wirkung eines molekularen Netzwerks aus Proteinen, die die Nanodomänen mit stabilen Strukturen verankern, iv) dort spezifische regulatorische Protein-Protein-Interaktionen stattfinden, welche im Falle der CDPK-Kinase CPK21 kalziumabhängig sind bzw. im Falle der Proteinphosphatase ABI1 Regulierungen durch ABA unterliegen und v) Proteine transient an den Domänen teilnehmen können - wie für ABI1 gezeigt.

5. Zusammenfassung

Unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Remorine der taxonomischen Gruppe 1b wurden Nanodomänen in Arabidopsis Plasmamembranen (PM) unter Verwendung hoch auflösender *Laser Scanning*-Systeme sichtbar gemacht. In diesen kompartimentierten Membranbereichen lagerten sich Sterol-abhängige Remorine aus verschiedenen Pflanzenfamilien zusammen und zeigten dort Kolokalisation. Dies wurde statistisch belegt durch hohe Pearson und Spearman Korrelationskoeffizienten. Remorine konnten schließlich als pflanzliche Markerproteine für kompartimentierte Membranbereiche etabliert werden. Die Nanodomänen zeigten zu keinem Zeitpunkt laterale Bewegungen in der PM und scheinen sowohl von zytoskelettären Strukturen als auch von Komponenten der Zellwand stabilisiert zu werden. Möglicherweise spielen transmembrane Tetraspanine sowie GPI-verankerte SKU5-Proteine eine Rolle bei der stabilen Verankerung.

Für zwei native Arabidopsis Remorine wurden posttranslationale Modifikationsstellen aufgedeckt, die der Anheftung dieser hydrophilen Proteine an die PM dienen. Weiterhin scheinen gleichartige Remorine miteinander zu interagieren. Beispielsweise waren im Zytosol lokalisierte Remorin-Mutanten bei einer gleichzeitigen Expression der entsprechenden Vollängenproteine erneut an der PM zu finden. Für die Remorine wurde postuliert, dass sie mit anderen Proteinen interagieren und dabei makromolekulare Strukturen ausbilden. Den Remorinen könnte daher eine Aufgabe bei der molekularen Organisation pflanzlicher Membrandomänen zukommen, indem sie ein filamentartiges Netzwerk innerhalb distinkter Domänen ausbilden, das möglicherweise zur Stabilität und Aufrechterhaltung dieser spezialisierten Bereiche beiträgt.

Unter Einbeziehung der STED-Mikroskopie wurde eine empirische Größenverteilung von 97 ± 4 nm Durchmesser für PM-ständige Domänen in Arabidopsis ermittelt.

Hinsichtlich der physiologischen Relevanz konnte gezeigt werden, dass die Domänen eine Rolle bei der ABA-vermittelten, kalziumabhängigen Regulation des Anionenkanals SLAH3 einnehmen. SLAH3 wird durch kalziumabhängige Kinasen aus der CDPK-Familie aktiviert, im Speziellen durch CPK21 und CPK23. Beide Kinasen werden durch die ABA-sensitiven Phosphatasen ABI1 und ABI2 reguliert. Die spezifisch stattfindenden Interaktionen zwischen SLAH3 und CPK21, sowie zwischen CPK21 und ABI1 waren auf Nanodomänen beschränkt und wurden durch die Methodik der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation erstmals *in planta* nachgewiesen, mit Remorinen der taxonomischen Gruppe 1b als etablierte Markerproteine für Membrandomänen.

6. Summary

In this work, membrane nanodomains have been visualized *in planta* via confocal microscopy of group 1b Remorin proteins fused to fluorescent proteins. Within these nanodomains, sterol-dependent Remorins originating from different plant species accumulated as shown by multiple color colocalization microscopy, and through which it was statistically verified by high Spearman and Pearson correlation coefficients. Thus, group 1b Remorins were established here as reliable marker proteins for plasma membrane (PM) nanodomains in plants. Since individual domains did not exhibit any kind of lateral movement within the plane of the membrane, a stabilization of them from cytoskeletal components as well as from components of the cell wall was presumed. Other proteins such as transmembrane Tetraspanins and GPI-anchored proteins like SKU5 were ruled out as possible candidates being involved in the maintenance of domains' lateral stability.

For two Remorins originating from *Arabidopsis thaliana*, sites of posttranslational lipid modifications, which allow the proteins to anchor to the plasma membrane, were revealed. In experiments using truncated Remorins with these modification sites deleted, the mutant Remorins appeared to be no longer located at the PM but rather within the cytosol. Truncated Remorins re-appeared at the PM as soon as the full length Remorin proteins were co-expressed. In close proximity to the sites of lipid modifications a highly conserved C-terminal region, whose likely role is to facilitate homo-Remorin protein interactions, was uncovered. Therefore Remorins could possibly be involved in the molecular organization of a filamentous protein structure that could help mediate the stability and maintenance of individual domains.

As well, the sizes of individual nanodomains were empirically measured in *Arabidopsis thaliana* mesophyll cells with STED microscopy, which allowed for optical measurements of domains with 60nm resolution, and were narrowly distributed in a histogram of domain diameters with an average diameter of 97 ± 4 nm.

One possible physiological role of PM-based nanodomains was demonstrated to be the ABA-mediated, calcium-dependent regulation of the SLAH3 anion channel. At the inception of the regulation, SLAH3 becomes activated upon phosphorylation by calcium-dependent protein kinases of the CDPK-family, CPK21 and CPK23. Both CPK's in turn are regulated by the ABA-dependent phosphatases ABI1 and ABI2. As visualized by fluorescence colocalization microscopy for the first time, the interactions between SLAH3 and CPK21, as well as interactions between CPK21 and ABI1 were restricted to PM compartments. As well,

these protein interactions were corroborated by also imaging them *in planta* using the bimolecular fluorescence complementation technique - involving group 1b Remorins as the established marker proteins for PM nanodomains.

7. Literaturverzeichnis

- Aalto, M. K.; Ronne, H.; Keränen, S. (1993):** „Yeast syntaxins Sso1p and Sso2p belong to a family of related membrane proteins that function in vesicular transport.” *EMBO J.* **11:** 4095-4104.
- Ahmed, S. N.; Brown, D. A.; London, E. (1997):** „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* **36:** 10944-10953.
- Airaksinen, M.; Saarma, M. (2002):** „The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value.” *Nat. Rev. Neurosci.* **3 (5):** 383-394.
- Alland, L.; Peseckis, S. M.; Atherton, R. E.; Berthiaume, L.; Rech, M. D. (1994):** „Dual myristoylation and palmitoylation of Src family member p59fyn affects subcellular localization.“ *J. Biol. Chem.* **269:** 16701-16705.
- Alliotte, S.; Tire, C.; Engler, G.; Peleman, J.; Caplan, A.; Van Montagu, M.; Inze, D. (1989):** „An auxin-regulated gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a DNA-binding protein.” *Plant Physiol.* **89:** 743-752.
- Almeida, P. F. F.; Vaz, W. L. C.; Thompson, T. E. (2005):** „Lipid diffusions, free area, and molecular dynamics simulations.” *Biophys. J.*, **88:** 4434-4438.
- Anderson, R. G. W.; Jacobson, K. (2002):** „A Role for Lipid Shells in Targeting Proteins to Caveolae, Rafts, and Other Lipid Domains.” *Science* **296 (7):** 1821-1825.
- Apajalahti, T.; Niemelä, P.; Govindan, P. N.; Miettinen, M. S.; Salonen, E.; Marrink, S.-J.; Vattulainen, I. (2010):** „Concerted diffusion of lipids in raft-like membranes.” *Faraday Discussions* **144:** 411-430.
- Apolloni, A.; Prior, I. A.; Lindsay, M.; Parton, R. G.; Hancock, J. F. (2000):** „H-ras but Not K-ras Traffics to the Plasma Membrane through the Exocytic Pathway.” *Molecular and Cell Biology* **20 (7):** 2475-2487.
- Armstrong, F.; Leung, J.; Grabov, A.; Brearley, J.; Giraudat, J.; Blatt, M. R. (1995):** „Sensitivity to abscisic acid of guard-cell K⁺ channels is suppressed by *abil-1*, a mutant *Arabidopsis* gene encoding a putative protein phosphatase.” *PNAS* **92:** 9520-9524.
- Asai, T.; Stone, J. M.; Head, J. E.; Kovtun, Y.; Yorgey, P.; Sheen, J.; Ausubel, F. M. (2000):** „Fumonisin B1-induced cell death in *Arabidopsis* protoplasts requires jasmonate-, ethylene, and salicylate-dependent signaling pathways.” *Plant Cell* **12:** 1823-1835.
- Bagnat, M.; Keranen, S.; Shevchenko, A.; Simons, K. (2000):** „Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast.” *PNAS* **97:** 3254-3259.
- Baluska, F.; Samaj, J.; Wojtaszek, P.; Volkmann, D., Menzel, D. (2003):** „Cytoskeleton-Plasma Membrane-Cell Wall Continuum in Plants. Emerging Links Revisited.“ *Plant Physiology* **133:** 482-491.

- Bariola, P. A.; Retelska, D.; Stasiak, A.; Kammerer, R. A.; Fleming, A.; Hijri, M.; Frank, S.; Farmer, E.E. (2004):** „Remorins form a novel family of coiled coil-forming oligomeric and filamentous proteins associated with apical, vascular and embryonic tissues in plants.” *Plant Molecular Biology* **55**: 579–594.
- Baumgart, T.; Hammond, A. T.; Sengupta, P.; Hess, S. T.; Holowka, D. A.; Baird, B. A.; Webb, W. W. (2007):** „Large-scale fluid/fluid phase separation of proteins and lipids in giant plasma membrane vesicles.” *PNAS* **104 (9)**: 3165-3170.
- Bechtold, N.; Ellis, J.; Pelletier, G. (1993):** „In Planta Agrobacterium - mediated gene transfer by infiltration of adult Arabidopsis thaliana plants.” *C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences* **316**: 1194-1199.
- Beck, D. L.; Guilford, P. J.; Voot, D. M.; Andersen, M. T.; Forster, R. L. S. (1991):** „Triple gene block proteins of white clover mosaic potexvirus are required for transport.“ *Virology* **183**: 695-702.
- Beck, J. G.; Mathieu, D.; Loudet, C.; Buchoux, S.; Dufourc, E. J. (2007):** „Plant sterols in “rafts”: a better way to regulate membrane thermal shocks.” *The FASEB Journal Express Article* fj.06-7809com.
- Betz, W. J.; Mao, F.; Bewick, G. S. (1992):** „Activity-dependent fluorescent staining and destaining of living vertebrate motor nerve terminals.“ *J. Neurosci.* **12**: 363-375.
- Betz, W. J.; Mao, F.; Smith, C. B. (1996):** „Imaging exocytosis and endocytosis.” *Curr. Opin. Neurobiol.* **6**: 365-371.
- Bevan, M. (1984):** „Binary Agrobacterium vectors for plant transformation.” *Nucleic Acids Research* **12 (22)**: 8711-8721.
- Bhat, R. A.; Miklis, M.; Schmelzer, E.; Schulze-Lefert, P.; Panstruga, R. (2005):** „Recruitment and interaction dynamics of plant penetration resistance components in a plasma membrane microdomain.” *PNAS* **102 (8)**: 3135-3140.
- Bhat, R. A.; Panstruga, R. (2005):** „Lipid rafts in Plants.” *Planta* **223**: 5-19.
- Bijlmakers, M. J.; Marsh, M. (2003):** „The on-off story of protein palmitoylation.” *Trends Cell Biol.* **13 (1)**: 32-42.
- Bille, J.; Weiser, T.; Bentrup, F-W. (1992):** „The lysolipid sphingosine modulates pyrophosphatase activity in tonoplast vesicles and isolated vacuoles from a heterotrophic cell suspension culture of *Chenopodium rubrum*.” *Physiologia Plantarum* **84**: 250-254.
- Birnboim, H. C.; Doly, J. A. (1979):** „A rapid alkaline extraction method for screening recombinant plasmid DNA.” *Nucl. Acid. Res.* **7**: 1513-1523.
- Bohn, M.; Heinz, E.; L uthje, S. (2001):** „Lipid Composition and Fluidity of Plasma Membranes Isolated from Corn (*Zea mays* L.) Roots.” *Archives of Biochemistry and Biophysics* **387 (1)**: 53-40.

- Bolte, S.; Talbot, C; Boutte, Y.; Catrice, O.; Read, N. D.; Satiat-Jeunemaitre, B. (2004):** „FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells.” *Journal Of Microscopy* **214** (2): 159-173.
- Born, M; Wolf, E. (1999):** „Principles Of Optics.” Cambridge University Press; ISBN 0521642221
- Borner, G. H. H.; Sherrier, D. J.; Weimar, T.; Michaelson, L. V.; Hawkins, N. D.; MacAskill, A.; Napier, J. A.; Beale, M. H.; Lilley, K. S.; Dupree, P. (2005):** „Analysis of Detergent-Resistant Membranes in Arabidopsis. Evidence for Plasma Membrane Lipid Rafts.” *Plant Physiology* **137**: 104–116.
- Boucheix, C.; Rubinstein, E. (2001):** „Tetraspanins.” *Cell. Mol. Life Sci.* **58**: 1189-1205.
- Bracha-Drori, K.; Shichrur, K.; Katz, A.; Oliva, M.; Angelovici, R.; Yalovsky, S.; Ohad, N. (2004):** „Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation.” *Plant J.* **40**: 419-427.
- Briolay, A.; Bouzenzana, J.; Guichardant, M.; Deshayes, C.; Sindt, N.; Bessueille, L.; Bulone, V. (2009):** „Cell Wall Polysaccharide Synthases Are Located in Detergent-Resistant Membrane Microdomains in Oomycetes.” *Applied And Environmental Microbiology* **75** (7): 1938-1949.
- Brown, M. T.; Cooper, J. A. (1996):** „Regulation, substrates and functions of Src.” *Biochim. Biophys. Acta* **1287**: 121-149.
- Brown, D. A.; London, E. (1998):** „Functions of lipid rafts in biological membranes.” *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**: 111-136.
- Brown, D. A.; London, E. (1998):** „Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes.” *Journal Of Membrane Biology* **15**: 103-114.
- Brown, D. A.; London, E. (2000):** „Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts.” *J. Biol. Chem.* **275**: 17221-17224.
- Brown, D. A.; Rose, J. K. (1992):** „Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface.” *Cell* **68**: 533-544.
- Cafiso, D. S. (2005):** „Structure and interactions of C2 domains at membrane surfaces.” In: *Protein-Lipid Interactions: From Membrane Domains to Cellular Networks*. Editor: Tamm, L. K.; John Wiley & Sons: 403-422. ISBN 3-527-31151-3.
- Campbell, S.; Gaus, K.; Bittman, R.; Jessup, W.; Crowe, S.; Mak, J. (2004):** „The raft-promoting property of virion-associated cholesterol, but not the presence of virion-associated Brij 98 rafts, is a determinant of human immunodeficiency virus type 1 infectivity.” *J. Virol.* **78** (19): 10556-10565.
- Casey, P. J. (1995):** „Protein lipidation in cell signaling.” *Science* **268** (5208): 221-225.
- Cassab, G. I.; Varner, J. E. (1988):** „Cell Wall Proteins.” *Ann. Rev. of Plant Phys. and Plant Molec. Biol.* **39**: 321-353.

- Casuso, I.; Sens, P.; Rico, F.; Scheuring, S. (2010):** „Experimental Evidence for Membrane-Mediated Protein-Protein Interaction.” *Biophysical Journal* **99**: L47-49.
- Causeret, M.; Taulet, N.; Comunale, F.; Favard, C.; Gauthier-Rouviere, C. (2005):** „N-Cadherin Association with Lipid Rafts Regulates Its Dynamic Assembly at Cell-Cell Junctions in C2C12 Myoblasts.” *Molecular Biology of the Cell* **16**: 2168-2180.
- Chazal, N.; Gerlier, D. (2003):** „Virus Entry, Assembly, Budding, and Membrane Rafts.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: 226-237.
- Cheng, S.-H.; Willmann, M., R.; Chen, H.-C.; Sheen, J. (2002):** „Calcium Signaling through Protein Kinases. The Arabidopsis Calcium-Dependent Protein Kinase Family.” *Plant Physiol.* **129**: 469-485.
- Cherry, J. M; Buckhout, T. J.; Morre, D. J. (1978):** “The absence of gangliosides in a higher plant.” *Cellular and Molecular Life Sciences* **34 (11)**: 1433-1434.
- Cherezov, V.; Rosenbaum, D. M.; Hanson, M. A.; Rasmussen, S. G. F.; Thian, F. S.; Kobilka, T. S.; Choi, H.-J.; Kuhn, P.; Weis, W. I.; Kobilka, B. K.; Stevens, R. C. (2007):** „High-Resolution Crystal Structure of an Engineered Human β_2 -Adrenergic G Protein-Coupled Receptor.” *Science* **318**: 1258-1265.
- Cho, W.; Stahelin, R. V. (2005):** „Membrane-protein interactions in cell signaling and membrane trafficking.” *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **34**: 119-151.
- Chung, C. T.; Niemela, S. L.; Miller, R. H. (1989):** „One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution.” *PNAS* **86 (7)**: 2172-2175.
- Clark, J. M. (1988):** „Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases.” *Nucl. Acid. Res.* **16**: 9677-9686.
- Clegg, R. M. (2009):** „Forster resonance energy transfer - FRET what is it, why do it, and how it's done.” Theodor W. J. Gadella (Hrsg.): *FRET and FLIM techniques*; Elsevier (ISBN 0-08-054958-6).
- Clough, S. J.; Bent, A. F. (1998):** „Floral Dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*.” *Plant J.* **16**: 735-43.
- Coskun, Ü.; Simons, K. (2010):** „Membrane rafting: From apical sorting to phase segregation.” *FEBS Lett.*; doi: 10.1016/j.febslet.2009.12.043.
- Courtneidge, S. A. (2003):** „Isolation of novel Src substrates.” *Biochem. Soc. Trans.* **31**: 25-28.
- Cove, D. J.; Quatrano, R. S.; Hartmann, E. (1996):** „The alignment of the axis of asymmetry in regenerating protoplasts of the moss, *Ceratodon purpureus*, is determined independently of axis polarity.” *Development* **122**: 371-379.

- Danielsen, E. M. (1995):** „A transferrin-like GPI-linked iron-binding protein in detergent-insoluble noncaveolar microdomains at the apical surface of fetal intestinal epithelial cells.“ *Biochemistry* **34**: 1596-1605.
- De Sampaio, G.; Bourdineaud, J. P.; Lauquin, G. J. (1999):** „ A constitutive role for GPI anchors in *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall targeting.” *Mol. Microbiol.* **34**: 247–256.
- Dietrich, C.; Bagatolli, L.A.; Volovyk, Z. N.; Thompson, N. L.; Levi, M.; Jacobson, K.; Gratton, E. (2001):** „Lipid Rafts Reconstituted in Model Membranes.” *Biophys. J.* **80**: 1417-1428.
- Eastman, R. T.; Buckner, F. S; Yokoyama, K.; Gelb, M. H.; Van Voorhis, W. C. (2006):** „Thematic review series: lipid posttranslational modifications. Fighting parasitic disease by blocking protein farnesylation.” *Journal Of Lipid Research* **47 (2)**: 233-240.
- Edidin, M. (2003):** „The state of lipid rafts: from model membranes to cells.” *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **32**: 257-283.
- Edidin, M. (1997):** „Lipid microdomains in cell surface membranes.” *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**: 528-532.
- Eggeling, C.; Ringemann, C.; Medda, R.; Schwarzmann, G.; Sandhoff, K.; Polyakova, S.; Belov, V. N.; Hein, B.; von Middendorff, C.; Schönle, A.; Hell, S. W. (2009):** „Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell.” *Nature* **457**: 1159-1163.
- Eisenberg, S.; Shvartsman, D. E.; Ehrlich, M.; Henis, J. I. (2006):** „Clustering of Raft-Associated Proteins in the External Membrane Leaflet Modulates Internal Leaflet H-Ras Diffusion and Signaling.” *Molecular and Cellular Biology*: 7190–7200.
- El Kirat, K.; Burton, I.; Dupres, V.; Dufrene, Y. F. (2005):** „Sample preparation procedures for biological atomic force microscopy.“ *Journal of Microscopy* **218 (3)**: 199-207.
- Engelmann, D. M. (2005):** „Introduction Membranes are more mosaic than fluid.” *Nature* **438**: 578-580.
- Farazi, T. A.; Waksman, G.; Gordon, J. I. (2001):** „The biology and enzymology of protein N-myristoylation.” *J. Biol Chem.* **276 (43)**: 39501-39504.
- Farmer, P. K.; Choi, J. H. (1999):** „Calcium and phospholipid activation of a recombinant calcium-dependent protein kinase (*DcCPK1*) from carrot (*Daucus carota* L.).” *Biochim. Biophys. Acta* **1434**: 6–17.
- Farmer, E. E.; Moloshok, T. D.; Saxton, M. J.; Ryan, C. A. (1991):** „Oligosaccharide signaling in plants. Specificity of oligouronide-enhanced plasma membrane protein phosphorylation.” *J. Biol. Chem.* **266**: 3140–3145.
- Filippov, A.; Orädd, G.; Lindblom, G. (2004):** „Lipid Lateral Diffusion in Ordered and Disordered Phases in Raft Mixtures.” *Biophysical Journal* **86**: 891-896.

- Florin, E.-L.; Pralle, A.; Hörber, J. K. H.; Stelzer, E. H. K. (1997):** „Photonic Force Microscope Based on Optical Tweezers and Two-Photon Excitation for Biological Applications.“ *Journal of Structural Biology* **119**: 202-211.
- Förster, T. (1948):** „Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz.“ *Annalen der Physik* **437**: 55-75.
- Frank, P.; Lisanti, M. (2004):** „Caveolin-1 and caveolae in atherosclerosis: differential roles in fatty streak formation and neointimal hyperplasia.“ *Curr. Opin. Lipidol.* **15 (5)**: 523-529.
- French, A. P.; Mills, S.; Swarup, R.; Bennett, M. J.; Pridmore, T. P. (2008):** „Colocalization of fluorescent markers in confocal microscope images of plant cells.“ *Nature Protocols* **3 (4)**: 619-628.
- Frenette Charron, J. B.; Ouellet, F.; Pelletier, M.; Danyluk, J.; Chauve, C.; Sarhan, F. (2005):** „Identification, Expression, and Evolutionary Analyses of Plant Lipocalins.“ *Plant Physiology* **139**: 2017-2028.
- Friedrichson, T.; Kurzchalia, T. V. (1998):** „Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking.“ *Nature* **394**: 802-805.
- Fujioka, S.; Sakurai, A. (1997):** „Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids.“ *Physiologia Plantarum* **100**: 710-715.
- Garcia-Saez, A. J.; Chiantia, S.; Schwille, P. (2007):** „Effect of Line Tension on the Lateral Organization of Lipid Membranes.“ *J. Biol. Chem.* **282**: 33537-33544.
- Garcia-Saez, A. J.; Schwille, P. (2010):** „Stability of lipid domains.“ *FEBS Letters* **584**: 1653-1658.
- Gaus, K.; Gratton, E.; Kable, E. P.; Jones, A. S.; Gelissen, I.; Kritharides, L.; Jessup, W. (2003):** „Visualizing lipid structure and raft domains in living cells with two-photon microscopy.“ *PNAS* **100**: 15554-15559.
- Geiger, D.; Maierhofer, T.; Al-Rasheid, K. A. S.; Scherzer, S.; Mumm, P.; Liese, A.; Ache, P.; Wellmann, C.; Marten, I.; Grill, E.; Romeis, T.; Hedrich, R. (2011):** „Stomatal Closure by Fast Abscisic Acid Signaling Is Mediated by the Guard Cell Anion Channel SLAH3 and the Receptor RCAR1.“ *Sci. Signal.* **4 (173)**: ra32.
- Geiger, D.; Scherzer, S.; Mumm, P.; Marten, I.; Ache, P.; Matschi, S.; Liese, A.; Wellmann, C.; Al-Rasheid, K. A. S.; Grill, E.; Romeis, T.; Hedrich, R. (2010):** „Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺ affinities.“ *PNAS* **107 (17)**: 8023-8028.
- Geiger, D.; Scherzer, S.; Mumm, P.; Stange, A.; Marten, I.; Bauer, H.; Ache, P.; Matschi, S.; Liese, A.; Al-Rasheid, K. A. S.; Romeis, T.; Hedrich, R. (2009):** „Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair.“ *PNAS* **106 (50)**: 21425-21430.

- Gervasio, O. L.; Whitehead, N. P.; Yeung, E. W.; Phillips, W. D.; Allen, D. G. (2008):** „Influence of caveolin-3 upon membrane raft lipids and its implications for trafficking in muscle.” *Journal of Cell Science* **121**: 2246-2255.
- Gordeliy, V. I.; Kiselev, M. A.; Lesieur, P.; Pole, A. V.; Texeira, J. (1998):** „Lipid membrane structure and interactions in dimethyl sulfoxide/water mixtures.” *Biophys. J.*, **75**: 2343-2351
- Gosti, F.; Beaudoin, N.; Serizet, C; Webb, A. A. R.; Vartanian, N.; Giraudat, J. (1999):** „ABI1 Protein Phosphatase 2C Is a Negative Regulator of Abscisic Acid Signaling.” *The Plant Cell* **11**: 1897-1909.
- Gray, J.; Groeschler, S.; Le, T.; Gonzalez, Z. (2002):** „Membrane Structure.” *Davidson College* (<http://www.bio.davidson.edu/people/maccampbell/111/memb-swf/membranes.swf>).
- Grennan, A. K. (2007):** „Lipid Rafts in Plants.” *Plant Physiology* **143**: 1083-1085.
- Grossmann, G.; Opekarova, M.; Malinsky, J.; Weig-Meckl, I.; Tanner, W. (2007):** „Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast.” *The EMBO Journal* **26** (1): 1-8.
- Grossmann, G.; Opekarova, M.; Novakova, L.; Stolz, J.; Tanner, W. (2005):** „Lipid Raft-Based Membrane Compartmentation of a Plant Transport Protein Expressed in *Saccharomyces cerevisiae*.” *Eucaryotic Cell* **5** (6): 945-953.
- Grove, M. D.; Spencer, G. F.; Rohwedder, W. K.; Mandava, N.; Worley, J. F.; Warthen, J. D.; Steffens, G. L.; Flippen-Anderson, J. L.; Cook, J. C. (1979):** „Brassins: A new family of plant hormones from rape pollen.” *Nature* **225**: 1065-1066.
- Gupta, N.; Wollscheid, B.; Watts, J. D.; Scheer, B.; Aebersold, R.; De Franco, A. L. (2006):** „Quantitative proteomic analysis of B cell lipid rafts reveals that ezrin regulates antigen receptor-mediated lipid raft dynamics.” *Nat. Immunol.* **7** (6): 625- 633.
- Gurtovenko, A. A.; Anwar, J. (2007):** „Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide.” *J. Phys. Chem. B*, **111**: 10453-10460.
- Hancock, J. F. (2006):** „Lipid Rafts: contentious only from simplistic standpoints.” *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **7**: 456-462.
- Hancock, J. F.; Paterson, H.; Marshall, C. J. (1990):** „A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane.” *Cell* **63**: 133-139.
- Hannun, Y.A.; Loomis, C. R.; Merrill, A. H. Jr.; Bell, R. M. (1986):** „Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding *in vitro* in human platelets.” *Journal of Biological Chemistry* **261**: 12604-12609.

- Harder, T.; Scheiffele, P.; Verkade, P.; Simons, K. (1998):** „Lipid Domain Structure of the Plasma Membrane Revealed by Patching of Membrane Components.” *The Journal of Cell Biology* **141** (4): 929-942.
- Harmon, A. C.; Yoo, B.-C.; Mc Caffery, C. (1994):** „Pseudosubstrate inhibition of CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain.” *Biochemistry* **33**: 7278-7287.
- Harper, J. F.; Huang, J.-F.; Lloyd, S. J. (1994):** „Genetic identification of an autoinhibitor in CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain.” *Biochemistry* **33**: 7267-7277.
- Hearn, J. D.; Lester, R. L.; Dickson, R. C. (2003):** „The uracil transporter Fur4p associates with lipid rafts.” *J. Biol. Chem.* **278**: 3679-3686.
- Heerklotz, H. (2002):** „Triton Promotes Domain Formation in Lipid Raft Mixtures.” *Biophysical Journal* **83**: 2693-2701.
- Hell, S. W. und Wichmann, J. (1994):** „Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy.” *Opt. Letters* **19** (11): 780-782.
- Hell, S. W. (2003):** „Toward fluorescence nanoscopy.” *Nature Biotechnology* **21** (11): 1347-1355.
- Hemler, M. E. (2003):** „Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain.” *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**: 397-422.
- Homann, U.; Meckel, T.; Hewing, J.; Hutt, M. T.; Hurst, A. C. (2007):** „Distinct fluorescent pattern of KAT1::GFP in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells.” *European Journal of Cell Biology* **86** (8): 489-500.
- Horine, R. K.; Ruesink, A. W. (1972):** „Cell Wall Regeneration around Protoplasts Isolated from *Convolvulus* Tissue Culture.” *Plant Physiology* **50**: 438-445.
- Howard, A. R.; Heppler, M. L.; Ju, H. J.; Krishnamurthy, K.; Payton, M. E.; Verchot-Lubicz, J. (2004):** „Potato virus X TGBp1 induces plasmodesmata gating and moves between cells in several host species whereas CP moves only in *N. benthamiana* leaves.” *Virology* **328**: 185-197.
- Huang, S.; Yuan, S.; Dong, M.; Su, J.; Yu, C.; Shen, Y.; Xie, X.; Yu, Y.; Yu, X.; Chen, S.; Zhang, S.; Pontarotti, P.; Xu, A. (2005):** „The phylogenetic analysis of tetraspanins projects the evolution of cell–cell interactions from unicellular to multicellular organisms.” *Genomics* **86**: 674-684.
- Ilangumaran, S.; Hoessli, D. C. (1998):** „Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane.” *Biochem. Journal* **335**: 433-440.
- Ingebritsen, T. S.; Cohen, P. (1983):** „The protein phosphatases involved in cellular regulation.” *Science* **221**: 331-337.

- Ipsen, J. H.; Karlstrom, G.; Mouritsen, O. G.; Wennerstrom, H.; Zuckermann, M. J. (1987):** „Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system.” *Biochim. Biophys. Acta* **905**: 162-172.
- Ipsen, J. H.; Mouritsen, O. G.; Zuckermann, M. J. (1989):** „Theory of thermal anomalies in the specific heat of lipid bilayers containing cholesterol.” *Biophys. J.* **56**: 661-667.
- Jacinto, T.; Farmer, E. E.; Ryan, C. A. (1993):** „Purification of potato leaf plasma membrane protein pp34, a protein phosphorylated in response to oligogalacturonide signals for defense and development.” *Plant Physiol.* **103**: 1393-1397.
- Jacob, F.; Monod, J. (1961):** „Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins.“ *J. Mol. Biol.* **3**: 318-356.
- Jacobson, K.; Dietrich, C. (1999):** „Looking at lipid rafts ?” *Trends Cell Biol.* **9**: 87-91.
- Jacobson, K.; Mouritsen, O. G.; Anderson, R. G. W. (2007):** „Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics.” *Nature Cell Biology* **9** (1): 7-14.
- Jamet, E.; Canut, H.; Boudard, G.; Pont-Lezica, R. F. (2006):** Cell wall proteins: a new insight through proteomics.” *Trends Plant Sci.* **11** (1): 33-39.
- Juhasz, J.; Davis, J. H.; Sharom, F. J. (2010):** „Fluorescent probe partitioning in giant unilamellar vesicles of ‘lipid raft’ mixtures.” *Biochem. J.* **430**: 415-423.
- Kahya, N. (2010):** „Light on fluorescent lipids in rafts: a lesson from model membranes.” *Biochem. J.* **430**: e7-e9.
- Kahya, N.; Scherfeld, D.; Bacia, K.; Poolman, B.; Schwille, P. (2003):** „Probing Lipid Mobility of Raft-exhibiting Model Membranes by Fluorescence Correlation Spectroscopy.” *The Journal of Biological Chemistry* **278** (30): 28109-28115.
- Karimi, M.; Inze, D.; Depicker, A. (2002):** „Gateway vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation.” *Trends Plant Sci.* **7**(5): 193-195.
- Karnovsky, M. J.; Kleinfeld, A. M.; Hoover, R. L.; Klausner, R. D. (1982):** „The Concept of Lipid Domains in Membranes.” *The Journal of Cell Biology* **94**: 1-6.
- Kawamura, Y.; Uemura, M. (2003):** „Mass spectrometric approach for identifying putative plasma membrane proteins of Arabidopsis leaves associated with cold acclimation.” *The Plant Journal* **36**: 141-154.
- Kenworthy, A. K.; Nichols, B. J.; Remmert, C. L.; Hendrix, G. M.; Kumar, M.; Zimmerberg, J.; Lippincott-Schwartz, J. (2004):** „Dynamics of putative raft-associated proteins at the cell surface.” *The Journal of Cell Biology* **165** (5): 735-746.
- Kerppola, T. K. (2006):** „Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells.” *Nat. Protoc.* **1**: 1278-1286.

- Kierszniowska, S.; Seiwert, B.; Schulze, W. X. (2008):** „Definition of *Arabidopsis* Sterol-rich Membrane Microdomains by Differential Treatment with Methyl- β -cyclodextrin and Quantitative Proteomics.” *Mol. & Cell. Proteomics* **8** (4): 612-623.
- Klar, T. A.; Jakobs, S.; Dyba, M.; Egner, A.; Hell, S. W. (2000):** „Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission.” *PNAS* **97**: 8206-8210.
- Kline, K. G.; Barrett-Wilt, G. A.; Sussman, M. R. (2010):** „In planta changes in protein phosphorylation induced by the plant hormone abscisic acid.” *PNAS* **107**: 15986-15991.
- Koh, C.-G.; Tan, E.-J.; Manser, E.; Lim, L. L. (2002):** „The p21-Activated Kinase PAK Is Negatively Regulated by POPX1 and POPX2, a Pair of Serine/Threonine Phosphatases of the PP2C Family.” *Current Biology* **12** (4): 317-321.
- Kohn, W. D.; Mant, C. T.; Hodges, R. S. (1997):** „Alpha-helical protein assembly motifs.” *J. Biol. Chem.* **272**: 2583-2586.
- Kreimer, G. (2001):** „Comprehensive Series in Photosciences Volume 1.” *Elsevier*: 193-227.
- Kurzchalia, T.V.; Hartmann, E.; Dupree, P. (1995):** „Guilt by insolubility: does a protein's detergent insolubility reflect a caveolar location ?“ *Trends Cell Biol.* **5**: 187-189.
- Ladha, S.; Mackie, A. R.; Harvey, L. J.; Clark, D. C.; Lea, E. J. A.; Brullemans, M.; Duclouhier, H. (1996):** „Lateral Diffusion in Planar Lipid Bilayers: A Fluorescence Recovery after Photobleaching Investigation of Its Modulation by Lipid Composition, Cholesterol, or Alamethicin Content and Divalent Cations.” *Biophysical Journal* **71**: 1364-1373.
- Laloi, M.; Perret, A. - M.; Chatre, L.; Melser, S.; Cantrel, C.; Vaultier, M. - N.; Zachowski, A.; Bathany, K.; Schmitter, J.-M.; Vallet, M.; Lessire, R.; Hartmann, M.-A.; Moreau, P. (2007):** „Insights into the role of specific lipids in the formation and delivery of lipid microdomains to the plasma Membrane of plant cells.” *Plant Physiol.* **143**: 461-472.
- Landschulz, W. H.; Johnson, P. F.; McKnight, S. L. (1988):** „The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA-binding proteins.” *Science* **40**: 1759-1764.
- Larsson, C.; Widell, S.; Sommarin, M. (1988):** „Inside-out plant plasma membrane vesicles of high purity obtained by aqueous two-phase partitioning.” *FEBS* **229** (2): 289-292.
- Lee, M. C.; Hamamoto, S.; Schekman, R. (2002):** „Ceramide biosynthesis is required for the formation of the oligomeric H₂-ATPase Pma1p in the yeast endoplasmic reticulum.” *J. Biol. Chem.* **277**: 22395-22401.
- Lederberg, J. (1998):** „*Escherichia coli*: an historical encyclopedia”. *Instruments of science*: 230-232; editiert von R. Bud und D.J. Warner; Garland Publishing, New York, USA.

- Lefebvre, B.; Furt, F.; Hartmann, M. A.; Michaelson, L. V.; Carde, J. P.; Sargueil-Boiron, F.; Rossignol, M.; Napier, J. A.; Cullimore, J.; Bessoule, J. J.; Mongrand, S. (2007):** „Characterization of lipid rafts from *Medicago truncatula* root plasma membranes: A proteomic study reveals the presence of a raft-associated redox system.“ *Plant Physiol.* **144**: 402-418.
- Leung, J.; Bouvier-Durand, M.; Morris, P.-C.; Guerrier, D.; Cheddor, F.; Giraudat, J. (1994):** „Arabidopsis ABA-response gene *ABI7*: Features of a calcium-modulated protein phosphatase.“ *Science* **264**: 1448-1452.
- Leung, J.; Merlot, S.; Giraudat, J. (1997):** „The Arabidopsis Abscisic Acid-insensitive (*ABI2*) and *ABI1* genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction.“ *Plant Cell* **9** (5): 759-771.
- Levine, Y. K.; Wilkins, M. H. F. (1971):** „Structure of oriented lipid bilayers.“ *Nature New Biol.* **230**: 69-72.
- Li, X.; Everson, W.; Smart, E. (2005):** „Caveolae, lipid rafts, and vascular disease.“ *Trends Cardiovasc. Med.* **15** (3): 92-96.
- Lichtenberg, D.; Goni, F. M.; Heerklotz, H. (2005):** „Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts.“ *Trends Biochem. Sci.* **30** (8): 430-436.
- Lingwood, D.; Kaiser, H.-J.; Levental, I.; Simons, K. (2009):** „Lipid Rafts as functional heterogeneity in cell membranes.“ *Biochemical Society Transactions* **37**: 955-960.
- Lingwood, D.; Simons, K. (2010):** „Lipid Rafts As a Membrane Organizing Principle.“ *Science* **327**: 46-50.
- Lippincott-Schwartz, J.; Snapp, E.; Kenworthy, A. (2001):** „Studying Protein Dynamics in living Cells.“ *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2**: 444-456.
- Lommerse, P. H. M.; Blab, G. A.; Cognet, L.; Harms, G. S.; Snaar-Jagalska, B. E.; Spaink, H. P.; Schmidt, T. (2004):** „Single-Molecule Imaging of the H-Ras Membrane-Anchors Reveals Domains in the Cytoplasmic Leaflet of the Cell Membrane.“ *Biophysical Journal* **86**: 609-616.
- London, E.; Brown, D. A. (2000):** „Insolubility of lipids in Triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol Membrane domains (rafts).“ *Biochim. Biophys. Acta.* **1508**: 182-195.
- Lynch, D. V.; Dunn, T. M. (2004):** „An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function.“ *New Phytologist* **161**: 677-702.
- Ma, Y.; Szostkiewicz, I.; Korte, A.; Moes, D.; Yang, Y.; Christmann, A.; Grill, E. (2009):** „Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors.“ *Science* **324** (5930): 1064-1068.
- Maecker, H. T.; Todd, S. C.; Levy, S. (1997):** “The tetraspanin superfamily: molecular facilitators.“ *FASEB J.* **11**: 428-442.

- Malinska, K.; Malinsky, J.; Opekarova, M.; Tanner, W. (2003):** „Visualization of Protein Compartmentation within the Plasma Membrane of Living Yeast Cells.” *Molecular Biology of the Cell* **14**: 4427-4436.
- Malinska, K.; Malinsky, J.; Opekarova, M.; Tanner, W. (2004):** „Distribution of Can1p into stable domains reflects lateral protein segregation within the plasma membrane of living *S. cerevisiae* cells.” *Journal of Cell Science* **117**: 6031-6041.
- Martin, M. L.; Busconi, L. (2000):** „Membrane localization of a rice calcium-dependent protein kinase (CDPK) is mediated by myristoylation and Palmitoylation.” *The Plant Journal* **24** (4): 429-435.
- Martin, S. W.; Beverley, J. G.; Davies, J. M. (2005):** „Lipid microdomains - plant membranes get organised.” *Trends in Plant Science* **10** (6): 263-265.
- Mason, J. M.; Arndt, K. M. (2004):** „Coiled Coil Domains: Stability, Specificity, and Biological Implications.” *Chem. Bio. Chem.* **5**: 170-176.
- Maurer-Stroh, S.; Eisenhaber, F. (2005):** „Refinement and prediction of protein prenylation motifs.” *Genome Biology*, 6:R55 doi:10.1186/gb-2005-6-6-r55.
- Mc Elhaney, R. N. (1984):** „The relationship between membrane lipid fluidity and phase state and the ability of bacteria and mycoplasmas to grow and survive at various temperatures.” In: Kates, M.; Manson, L.; Editors. *Biomembranes*. Academic Press, 1984: 249-278.
- Mc Mullen, T. P. W.; Lewis, R. N. A. H.; Mc Elhaney, R. N. (2004):** „Cholesterol-phospholipid interactions, the liquid-ordered phase and lipid rafts in model and biological membranes.” *Current Opinion in Colloid and Interface Science* **8**: 459-468.
- Melkonian, K. A.; Ostermeyer, A. G.; Chen, J. Z.; Roth, M. G.; Brown, D. A. (1999):** „Role of Lipid Modifications in targeting Proteins to Detergent-resistant Membrane Rafts.” *Journal of Biol. Chem.* **274** (6): 3910-3917.
- Mengaud, J.; Ohayon, H.; Gounon, P.; Mege, R.-M.; Cossart, P. (1996):** „E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells.” *Cell* **84** (6): 923-932.
- Meyvis, T. K.; De Smedt, S. C.; Van Oostveldt, P.; Demeester, J. (1999):** „Fluorescence recovery after photobleaching: a versatile tool for mobility and interaction measurements in pharmaceutical research.” *Pharm Res.* **16**(8): 1153-1162.
- Mongrand, S.; Morel, J.; Laroche, J.; Claverol, S.; Carde, J.-P.; Hartmann, M.-A.; Bonneau, M.; Simon-Plas, F.; Lessire, R.; Bessoule, J.-J. (2004):** „Lipid Rafts in Higher Plant Cells.” *The Journal Of Biological Chemistry* **279** (35): 36277-36286.
- Morel, J.; Claverol, S.; Mongrand, S.; Furt, F.; Fromentin, J.; Bessoule, J. J.; Blein, J. P.; Simon-Plas, F. (2006):** „Proteomics of plant detergent-resistant membranes.” *Mol. Cell. Proteomics* **5**: 1396-1411.

- Müller, A.; Guan, C.; Gälweiler, L.; Tänzler, P.; Huijser, P.; Marchant, A.; Parry, G.; Bennett, M.; Wisman, E.; Palme, K. (1998):** „*AtPin2* defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control.” *EMBO Journal* **17**: 6903-6911.
- Mullis, K. B.; Faloona, F. A.; Scharf, S.; Saiki, R. K.; Horn, G.; Erlich, H. A. (1986):** „Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.” *ColdSpringHarbor Symposia on Quantitative Biology*.
- Munro, S. (2003):** „Lipid Rafts: Elusive or Illusive ?” *Cell* **115**: 377-388.
- Mustilli, A-C.; Merlot, S.; Vavasseur, A.; Fenzi, F.; Giraudat, J. (2002):** „Arabidopsis OST1 Protein Kinase Mediates the Regulation of Stomatal Aperture by Abscisic Acid and Acts Upstream of Reactive Oxygen Species Production.” *The Plant Cell* **14**: 3089-3099.
- Nagata, T.; Nemoto, Y.; Hasezawa, S. (1992):** „Tobacco BY-2 cell line as the "HeLa" cell in the cell biology of higher plants.” *International Review of Cytology* **132**: 1-30.
- Nakamura, H. (1986):** „Metabolic evolution and origin of eukaryotic cell-membrane evolution theory.” *Origins Of Life And Evolution Of Biospheres*, Springer; DOI: 10.1007/BF02422092.
- Negi, J.; Matsuda, O.; Nagasawa, T.; Oba, Y.; Takahashi, H.; Kawai-Yamada, M.; Uchimiya, H.; Hashimoto, M.; Iba, K. (2008):** „CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells.” *Nature* **452**: 483-486.
- Nelson, C. J.; Hegeman, A. D.; Harms, A. C.; Sussman, M. R. (2006):** „A Quantitative Analysis of *Arabidopsis* Plasma Membrane Using Trypsin-catalyzed ¹⁸O Labeling.” *Molecular & Cellular Proteomics* **5**: 1382-1395.
- Neumann, E.; Schaefer-Ridder, M.; Wang, Y.; Hofschneider, P. H. (1982):** „Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields.” *The Embo J.* **1** (7): 841-845.
- Neumann-Giesen, C.; Falkenbach, B.; Beicht P.; Claasen, S.; Lüers, G.; Stuermer, C. A. O.; Herzog, V.; Tikkanen, R. (2004):** „Membrane and raft association of *reggie-1/flotillin-2*: role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression.” *Biochem. J.* **378**: 509-518.
- Nicolau, D. V. Jr.; Burrage, K.; Parton, R. G.; Hancock, J. F. (2006):** „Identifying Optimal Lipid Raft Characteristics Required To Promote Nanoscale Protein-Protein Interactions On The Plasma Membrane.” *Molecular and Cellular Biology* **26** (1): 313-323.
- Niemela, P.; Ollila, S.; Hyvonen, M. T.; Karttunen, M.; Vattulainen, I. (2007):** „Assessing the Nature of Lipid Raft Membranes.” *PLoS Computational Biology* **3**: 304-312.
- Niv, H.; Gutman, O.; Kloog, Y.; Henis, Y. I. (2002):** „Activated K-Ras and H-Ras display different interactions with saturable nonraft sites at the surface of live cells.” *J. Cell Biol.* **157**: 865-872.

- Nohe, A.; Keating, E.; Fivaz, M.; Gisou, F.; Gisou van der Goot, F.; Petersen, N. O. (2006):** „Dynamics of GPI-anchored proteins on the surface of living cells.” *Nanotechnology, Biology, and Medicine* **2**: 1-7.
- Nour-Eldin, H. H.; Hansen, B. G.; Norholm, M. H. H.; Jensen, J. K.; Halkier, B. A. (2006):** „Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments.” *Nucleic Acids Research* **34 (18)**: doi:10.1093/nar/gkl635.
- Odintsova, E.; Butters, T. D.; Monti, E.; Sprong, H.; Van Meer, G.; Berditchevski, F. (2006):** „Gangliosides play an important role in the organization of CD82-enriched microdomains.” *Biochem. J.* **400**: 315-325.
- Olmos, E.; Reiss, B.; Dekker, K. (2003):** „The *ekeko* mutant demonstrates a role for tetraspanin-like protein in plant development.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* **310 (4)**: 1054-1061.
- Olsen, H. B.; Kaarsholm, N. C. (2000):** „Structural effects of protein lipidation as revealed by LysB29-myristoyl, des(B30) insulin.” *Biochemistry* **39**:11893-11900.
- Pagano, R. E.; Chen, C.-S. (1998):** “Use of BODIPY-labeled Sphingolipids to Study Membrane Traffic along the Endocytic Pathway.” *Annals of the New York Academy of Sciences* **845**: 152-160.
- Pandit, S. A.; Jakobsson, E.; Scott, H. L. (2004):** „Simulation of the early stages of nanodomain formation in mixed bilayers of sphingomyelin, cholesterol, and dioleoylphosphatidylcholine.” *Biophys. J.* **87 (5)**: 3312-3322.
- Panstruga, R.; Schulze-Lefert, P. (2003):** „Corruption of host seven-transmembrane proteins by pathogenic microbes: a common theme in animals and plants?” *Microbes And Infection* **5 (4)**: 429-437.
- Parasassi, T.; Stasio, G. D.; d’Ubaldo, A.; Gratton, E. (1990):** „Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by LAURDAN fluorescence.” *Biophys. J.* **57**: 1179-1186.
- Parasassi, T.; De Stasio, G.; Ravagnan, G.; Rusch, R. M.; Gratton, E. (1991):** „Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of laurdan fluorescence.” *Biophys. J.* **60**:179-180.
- Parasassi, T.; Di Stefano, M.; Loiero, M.; Ravagnan, G.; Gratton, E. (1994):** „Cholesterol Modifies Water Concentration and Dynamics in Phospholipid Bilayers: A Fluorescence Study Using Laurdan Probe.” *Biophysical Journal* **66**: 763-768.
- Parasassi, T.; Gratton, E.; Yu, W.; Wilson, P.; Levi, M. (1997):** „Two photon fluorescence microscopy of LAURDAN generalized polarization domains in model and natural membranes.” *Biophys. J.* **72**: 2413-2429.
- Parasassi, T.; Krasnowska, E. K.; Bagatolli, L.; Gratton, E. (1998):** „Laurdan and Prodan as Polarity-Sensitive Fluorescent Membrane Probes.” *Journal of Fluorescence* **8 (4)**: 365-373.

- Park, S.-Y.; Fung, P.; Nishimura, N.; Jensen, D. R.; Fujii, H.; Zhao, Y.; Lumba, S.; Santiago, J.; Rodrigues, A.; Chow, T. F.; Alfred, S. E.; Bonetta, D.; Finkelstein, R.; Provart, N. J.; Desveaux, D.; Rodriguez, P. L.; Mc Court, P.; Zhu, J.-K.; Schroeder, J. I.; Volkman, B. F.; Cutler, S. R. (2009):** „Abscisic acid inhibits PP2Cs via the PYR/PYL family of ABA-binding START proteins.” *Science* **324 (5930)**: 1068-1071.
- Parton, R. G.; Simons, K. (1995):** „Digging into caveolae.“ *Science* **269 (5229)**: 1398-1399.
- Patra, S. K.; Alonso, A.; Arrondo, J. L. R.; Goni, F. M. (1999):** „Liposomes containing sphingomyelin and cholesterol: detergent solubilization and infrared spectroscopic studies.” *J. Liposome Res.* **9**: 247-260.
- Patterson, G.; Day, R. N.; Piston, D. (2001):** „Fluorescent protein spectra.” *Journal of Cell Science* **114**: 837-838.
- Pelkmans, L.; Kartenbeck, J.; Helenius, A. (2001):** „Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER.” *Nat. Cell Biol.* **3**: 473-483.
- Pelkmans, L. (2005):** „Secrets of caveolae- and lipid raft-mediated endocytosis revealed by mammalian viruses.” *Biochim. Biophys. Acta* **1746 (3)**: 295-304.
- Perez-Gomez, J.; Moore, I. (2007):** „Plant Endocytosis: It Is Clathrin after All.” *Curr. Biol.* **17 (6)**: R217-R219.
- Peskan, T.; Westermann, M.; Oelmüller, R. (2000):** „Identification of low-density Triton X-100-insoluble plasma membrane microdomains in higher plants.” *Eur. J. Biochem.* **276**: 6989-6995.
- Pierini, L. M.; Maxfield, F. R. (2001):** „Flotillas of lipid rafts fore and aft.” *PNAS* **98 (17)**: 9471-9473.
- Pike, L. J. (2003):** „Lipid rafts: bringing order to chaos.” *Journal of Lipid Research* **44**: 655-667.
- Pike, L. J. (2006):** „Rafts defined: a report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function.” *Journal of Lipid Research* **47**: 1597-1598.
- Pike, L. J. (2008):** „The Challenge Of Lipid Rafts.” *The Journal Of Lipid Research*, Oktober 2008: 1-17.
- Podell, S.; Gribskov, M. (2004):** „Predicting N-terminal myristoylation sites in plant proteins.” *BMC Genomics*, **5 (37)**: doi:10.1186/1471-2164-5-37.
- Pralle, A.; Keller, P.; Florin, E.-L.; Simons, K.; Hörber, J. K. H. (2000):** „Sphingolipid-Cholesterol Rafts Diffuse as Small Entities in the Plasma Membrane of Mammalian Cells.” *The Journal of Cell Biology* **148 (5)**: 997-1006.
- Rachel, R.; Meyer, C.; Klingl, A.; Gürster, S.; Heimerl, T.; Wasserburger, N.; Burghardt, T.; Küper, U.; Bellack, A.; Schopf, S.; Wirth, R.; Huber, H.; Wanner, G. (2010):** „Analysis of the Ultrastructure of *Archaea* by Electron Microscopy.” *Methods In Cell Biology* **96**: 47-69.

- Raffaele, S.; Bayer, E.; Lafarge, D.; Cluzet, S.; Retana, S. G.; Boubekour, T.; Leborgne-Castel, N.; Carde, J.-P.; Lherminier, J.; Noiroto, E.; Satiat-Jeunemaitre, B.; Laroche-Traineau, J.; Moreau, P.; Ott, T.; Maule, A. J.; Reymond, P.; Simon-Plas, F.; Farmer, E. E.; Bessoule, J.-J.; Mongrand, S. (2009):** „Remorin, a Solanaceae Protein Resident in Membrane Rafts and Plasmodesmata, Impairs Potato virus X Movement.” *The Plant Cell*, www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.108.064279.
- Raffaele, S.; Mongrand, S.; Gamas, P.; Niebel, A.; Ott, T. (2007):** „Genome-Wide Annotation of Remorins, a Plant-Specific Protein Family: Evolutionary and Functional Perspectives.” *Plant Physiol.* **145**: 593-600.
- Rawicz, W.; Olbrich, K. C.; McIntosh, T.; Needham, D.; Evans, E. (2000):** „Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers.” *Biophysical Journal.* **79**: 328-339.
- Recktenwald, D. J., Mc Connell, H. M. (1981):** „Phase equilibria in binary mixtures of phosphatidylcholine and cholesterol.“ *Biochemistry* **20**: 4505-4510.
- Reimer, L. (1998):** „Scanning Electron Microscopy.” Springer, 1998.
- Reits, E. A. J.; Neefjes, J. (2001):** „From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells.” *Nature Cell Biology* **3**: E145-E147.
- Resh, M. D. (1999):** „Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins.” *Biochim. Biophys. Acta* **1451**: 1-16.
- Reymond, P.; Kunz, B.; Paul-Pletzer, K.; Grimm, R.; Eckerskorn, C.; Farmer, E. E. (1996):** „Cloning of a cDNA Encoding a Plasma Membrane-Associated, Uronide Binding Phosphoprotein with Physical Properties Similar to Viral Phosphoprotein Movement Proteins.” *The Plant Cell* **8**: 2265-2276.
- Rietveld, A.; Simons, K. (1998):** „The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts.” *Biochim. Biophys. Acta* **1376 (3)**: 467-479.
- Rinia, H. A.; Snel, M. M.; van der Eerden, J. P.; de Kruijff, B. (2001):** „Visualizing detergent resistant domains in model membranes with atomic force microscopy.” *FEBS Lett.* **501(1)**: 92-96.
- Rittweger, E.; Young Han, K.; Irvine, S. E.; Eggeling, C.; Hell, S. W. (2009):** „STED microscopy reveals crystal colour centres with nanometric Resolution.” *Nature Photonics* **3**: 144-147.
- Roche, Y.; Gerbeau-Pissot, P.; Buhot, B.; Thomas, D.; Bonneau, L.; Gresti, J.; Mongrand, S.; Perrier-Cornet, J.-M.; Simon-Plas, F. (2008):** „Depletion of phytosterols from the plasma membrane provides evidence for disruption of lipid rafts.” *The FASEB J.* **22 (11)**: 3980-3991.
- Romeis, T.; Ludwig, A. A.; Martin, R.; Jones, J. D. G. (2001):** „Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response.” *EMBO J.* **20**: 5556-5567.

- Romeis, T.; Piedras, P.; Jones, J. D. G. (2000):** „Resistance-gene dependent activation of a calcium-dependent protein kinase in the plant defense response.” *Plant Cell* **12**: 803-815.
- Rotblat, B.; Belanis, L.; Liang, H.; Haklai, R.; Elad-Zefadia, G.; Hancock, J. F.; Kloog, Y.; Plowman, S. J. (2010):** „H-Ras Nanocluster Stability Regulates the Magnitude of MAPK Signal Output.” *PLoS One* **5** (8): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2916832/>.
- Roudier, F.; Schindelman, G.; De Salle, R.; Benfey, P. N. (2003):** „The COBRA Family of Putative GPI-Anchored Proteins in Arabidopsis. A New Fellowship in Expansion.” *Plant Physiology* **130**: 538-548.
- Samaj, J.; Baluska, F.; Voigt, B.; Schlicht, M.; Volkmann, D.; Menzel, D. (2004):** „Endocytosis, Actin Cytoskeleton, and Signaling.” *Plant Physiol.* **135**: 1150-1161.
- Samsonov, A. V.; Mihalyov, I.; Cohen, F. S. (2001):** „Characterization of Cholesterol-Sphingomyelin Domains and Their Dynamics in Bilayer Membranes.” *Biophys. J.* **81**: 1486-1500.
- Sanchez, S. A.; Tricerri, M. A.; Gunther, G.; Gratton, E. (2007):** „Laurdan generalized polarization: from cuvette to microscope.” *Modern Research and Educational Topics in Microscopy (Formatex)*: 1007-1014.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977):** „DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.” *PNAS* **74** (12): 5463-5467.
- Sargiacomo, M.; Sudol, M.; Tang, Z.; Lisanti, M. P. (1993):** „Signal transducing molecules and GPI-linked proteins from a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells.” *J. Cell Biol.* **122**: 789-807.
- Scheel, D.; Wasternack, K. (2002):** „Plant Signal Transduction.” *Oxford University Press*, ISBN 0199638802.
- Schroeder, R., E.; London, E.; Brown, D. A. (1994):** „Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidyl-inositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior.” *PNAS* **91**: 12130-12134.
- Schuck, S.; Honsho, M.; Ekroos, K.; Shevchenko, A.; Simons, K. (2003):** „Resistance of cell membranes to different detergents.” *PNAS* **100** (10): 5795-5800.
- Schütz, G. J.; Kada, G.; Pastushenko, V. P. Schindler, H. (2000):** „Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy.” *The EMBO Journal* **19** (5): 892-901.
- Sedbrook, J. C.; Carroll, K. L.; Hung, K. F.; Masson, P. H.; Somerville, C. R. (2002):** „The Arabidopsis SKU5 Gene Encodes an Extracellular Glycosyl Phosphatidylinositol-Anchored Glycoprotein Involved in Directional Root Growth.” *The Plant Cell* **14**: 1635-1648.

- Shahollari, B.; Peskan-Berghöfer, T.; Oelmüller, R. (2004):** „Receptor kinases with leucine-rich repeats are enriched in Triton X-100 insoluble plasma membrane microdomains from plants.” *Physiologia Plantarum* **122**: 397-403.
- Shahollari, B.; Varma, A.; Oelmüller, R. (2005):** „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.” *Journal of Plant Physiology* **162**: 945-958.
- Sharma, P.; Varma, R.; Sarasij, R.C.; Ira; Gousset, K.; Krishnamoorthy, G.; Rao, M.; Mayor, S. (2004):** „Nanoscale Organization of Multiple GPI-Anchored Proteins in Living Cell Membranes.” *Cell* **116**: 577-589.
- Sheen, J. (2001):** „Signal Transduction in Maize and Arabidopsis Mesophyll Protoplasts.” *Plant Physiology* **127**: 1466-1475.
- Sheets, E. D.; Holowka, D.; Baird, B. (1999):** „Critical Role for Cholesterol in Lyn-mediated Tyrosine Phosphorylation of FcRI and Their Association with Detergent-resistant Membranes.” *J. Cell Biol.* **145 (4)**: 877-887.
- Sheets, E. D.; Lee, G. M.; Simson, R.; Jacobson, K. (1997):** „Transient confinement of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein in the plasma membrane.” *Biochemistry*. **36**: 12449-12458.
- Shvartsman, D. E.; Kotler, M.; Tall, R. D.; Roth, M. G.; Henis, Y. I. (2003):** „Differently anchored influenza hemagglutinin mutants display distinct interaction dynamics with mutual rafts.” *J. Cell Biol.* **8**: 879-888.
- Silvius, J. R. (2003):** „Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems.” *Biochim. Biophys. Acta* **1610**: 174-183.
- Simons, K.; Ehehalt, R. (2002):** „Cholesterol, lipid rafts and disease.” *The Journal of Clinical Investigation* **110 (5)**: 597-603.
- Simons, K.; Gerl, M. J. (2010):** „Revitalizing membrane rafts: new tools and insights.” *Nature Reviews* **11**: 688-699.
- Simons, K.; Ikonen, E. (1997):** „Functional rafts in cell membranes.” *Nature* **387**: 569-572.
- Simons, K.; Toomre, D. (2000):** “Lipid Rafts And Signal Transduction.” *Molec. Cell Biology* **1**: 31-41.
- Simons, K.; van Meer, G. (1988):** „Lipid sorting in epithelial cells.” *Biochemistry* **27 (17)**: 6197-202.
- Simons, K.; Vaz, W. L. (2004):** „Model systems, lipid rafts, and cell membranes.” *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **33**: 269-295.
- Singer, S. J.; Nicolson, G. L. (1972):** „The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.” *Science* **175 (23)**: 720-731.

- Skibbens, J. E.; Roth, M. G.; Matlin, K. S. (1989):** „Differential extractibility of influenza virus hemagglutinin during intracellular transport in polarized epithelial cells and nonpolar fibroblasts.” *J. Cell Biol.* **108**: 821-832.
- Snyers, L.; Umlauf, E.; Prohaska, R. (1999):** „Cysteine 29 is the major palmitoylation site on stomatin.” *FEBS Lett.* **449**: 101-104.
- Stipp, C. S.; Kolesnikova, T. V.; Hemler, M. E. (2003):** „Functional domains in tetraspanin proteins.” *Trends in Biochemical Sciences* **28 (2)**: 106-112.
- Stryer, L. (1978):** „Fluorescence Energy Transfer As A Spectroscopic Ruler.” *Annu. Rev. Biochem.* **47**: 819-846.
- Sutter, J. U.; Campanoni, P.; Tyrrell, M.; Blatt, M. (2006):** „Selective Mobility and Sensitivity to SNAREs Is Exhibited by the Arabidopsis KAT1 K⁺ Channel at the Plasma Membrane.” *The Plant Cell* **18**: 935-954.
- Swarup, R.; Friml, J.; Marchant, A.; Ljung, K.; Sandberg, G.; Palme, K.; Bennett, M. (2001):** „Localisation of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex.” *Genes and Development* **15**: 2648-2653.
- Takahashi, M.; Ritz, J.; Cooper, G. M. (1985):** „Activation of a novel human transforming gene, RET, by DNA rearrangement.” *Cell* **42 (2)**: 581-588.
- Tanner, W.; Malinsky, J.; Opekarova, M. (2011):** „In Plant and Animal Cells, Detergent-Resistant Membranes Do Not Define Functional Membrane Rafts.” *The Plant Cell*; www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.111.086249.
- Tansey, M. G.; Baloh, R. H.; Milbrandt, J.; Johnson Jr., E. M. (2000):** „GFR α -Mediated Localisation of RET to Lipid Rafts is Required for Effective Downstream Signaling, Differentiation, and Neuronal Survival.” *Neuron* **25**: 611-623.
- Tennant, J. R. (1964):** „Evaluation of the Trypan Blue Technique for Determination of Cell Viability.” *Transplantation* **2 (6)**: 685-694.
- Thomas, S.; Kumar, R. S.; Casares, S.; Brumeanu, T. D. (2003):** „Sensitive detection of GM1 lipid rafts and TCR partitioning in the T cell membrane.” *J. Immunol Methods* **275**: 161-168.
- Thomsen, P.; Roepstorff, K.; Stahlhut, M.; van Deurs, B. (2002):** „Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking.” *Mol. Biol. Cell.* **13**: 238-250.
- Tsien, R. Y. (1998):** „The Green Fluorescent Protein.” *Annual Reviews Of Biochemistry* **67 (1)**: 509-544.
- Uemura, M.; Joseph, R. A.; Steponkus, P. L. (1995):** „Cold Acclimation of *Arabidopsis thaliana*.” *Plant Physiology* **109**: 15-30.

- Umlauf, E.; Mairhofer, M.; Prohaska, R. (2006):** „Characterization of the Stomatin Domain Involved in Homo-oligomerization and Lipid Raft Association.” *The Journal of Biological Chemistry* **281 (33):** 23349-23356.
- Vahisalu, T.; Kollist, H.; Wang, Y. F.; Nishimura, N.; Chan, W. Y.; Valerio, G.; Lamminmaki, A.; Brosche, M.; Moldau, H.; Desikan, R.; Schroeder, J. I. Kangasjarvi, J. (2008):** „SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling.” *Nature* **452:** 487-491.
- Vain, P.; Keen, N.; Murillo, J. (1993):** „Development of the particle inflow gun.” *Plant Cell* **33 (3):** 237-246.
- Valdez-Taubas, J.; Pelham, H. R. (2003):** „Slow diffusion of proteins in the yeast plasma membrane allows polarity to be maintained by endocytic cycling.“ *Curr. Biol.* **13:** 1636-1640.
- Valencia, A.; Chardin, P.; Wittinghofer, A.; Sander, C. (1991):** „The *ras* Protein Family: Evolutionary Tree and Role of Conserved Amino Acids.” *Perspectives in Biochemistry* **30 (19):** 4637-4648.
- Valvekens, D.; van Montagu, M.; van Lijsebettens, M. (1988):** „*Agrobacterium tumefaciens*- mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection.” *PNAS* **85:** 5536-5540.
- Van Amstel, T. N. M.; Kengen, H. M. P. (1996):** „Callose deposition in the primary wall of suspension cells and regenerating protoplasts, and its relationship to patterned cellulose synthesis.” *Can. J. Bot* **74:** 1040-1049.
- Van Meer, G. (1989):** „Lipid traffic in animal cells.” *Annu Rev Cell Biol* **5:** 247-275.
- Varma, R.; Mayor, S. (1998):** “GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface.” *Nature* **394:** 798-801.
- Vist, M. R.; Davis, J. H. (1990):** „Phase equilibria of cholesterol/ dipalmitoyl-phosphatidylcholine mixtures: ²H nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry.” *Biochemistry* **29:** 451-464.
- Waelkens, E.; de Corte, V.; Merlevede, W.; Vandekerckhove, J.; Gettemans, J. (2000):** „A Novel Endogenous PP2C-like Phosphatase Dephosphorylates Casein Kinase II-Phosphorylated *Physarum* Fragmin.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* **279 (2):** 438-444.
- Weber, G.; Farris, F. J. (1979):** „Synthesis and spectral properties of a hydrophobic fluorescent probe: 6-propionyl-2-(dimethylamino)-naphthalene.” *Biochemistry* **18:** 3075-3078.
- Wu, S. H.; Mc Connell, H. M. (1975):** „Phase separations in phospholipid membranes.“ *Biochemistry* **14:** 847-854.
- Xu, C.; Zhang, Y. H.; Thangavel, M.; Richardson, M. M.; Liu, L.; Zhou, B.; Zheng, Y.; Ostrom, R. S.; Zhang, X. A. (2009):** „CD82 endocytosis and cholesterol-dependent reorganization of tetraspanin webs and lipid rafts.” *FASEB J.* **23 (10):** 3273-3288.

- Xu, X.; Bittman, R.; Duportail, G.; Heissler, D.; Vilcheze, C.; London, E. (2001):** „Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/ sterol domains (rafts).” *Journal Of Biological Chemistry* **276**: 33540-33546.
- Xu, X.; London, E. (2000):** „The effect of sterol structure on membrane lipid domains reveals how cholesterol can induce lipid domain formation.” *Biochemistry* **39**: 843-849.
- Yoshida, S.; Uemura, M.; Niki, T.; Sakai, A.; Gusta, L. V. (1983):** „Partition of membrane particles in aqueous two-polymer phase system and its practical use for purification of plasma membranes from plants.” *Plant Physiol.* **72**: 105-114.
- Young, M. E.; Karpova, T. S.; Brügger, B.; Moschenross, D. M.; Wang, G. K.; Schneider, R.; Wieland, F. T.; Cooper, J. A. (2002):** „The Sur7p Family Defines Novel Cortical Domains in *Saccharomyces cerevisiae*, Affects Sphingolipid Metabolism, and Is Involved in Sporulation.” *Mol. Cell. Biol.* **22 (3)**: 927-934.
- Yu, J.; Fishman, D. A.; Steck, T. L. (1973)** „Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents.” *J. Supramol. Struct.* **3**: 233-247.
- Yunta, M.; Lazo, P. A. (2003):** „Tetraspanin proteins as organisers of membrane microdomains and signalling complexes.” *Cell Signalling* **15**: 559-564.
- Zappel, N. F.; Panstruga, R. (2008):** „Heterogeneity and lateral compartmentalization of plant plasma membranes.” *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 632-640.
- Zheng, J; Knighton, D. R.; Xuong, N. H.; Taylor, S. S.; Sowadski, J. M.; Ten Eyck, L. F. (1993):** „Crystal structures of the myristoylated catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase reveal open and closed conformations.” *Protein Sci.* **2**: 1559-1573.
- Zhou, M. Y.; Gomez-Sanchez, C. E. (2000):** „Universal TA-cloning.” *Curr. Issues Mol. Biol.* **2**: 1-7.
- Zhu, J. K. (2002):** „Salt and drought stress signal transduction in plants.” *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**: 247-273.
- Zidar, J.; Merzel, F.; Hodosek, M.; Rebolj, K.; Sepcic, K.; Macek, P.; Janezic, D. (2009):** „Liquid-Ordered Phase Formation in Cholesterol/Sphingomyelin Bilayers: All-Atom Molecular Dynamics Simulations.” *J. Phys. Chem. B* **113**: 15795-15802.
- Zimmer, M. (2005):** „Glowing genes. A Revolution in Biotechnology” Prometheus Books, Buffalo, N.Y.; ISBN 1591022533.
- Zinser, E.; Sperka-Gottlieb, C. D. M.; Fasch, E.-V.; Kohlwein, S. D.; Paltauf, F.; Daum, G. (1991):** „Phospholipid Synthesis and Lipid Composition of Subcellular Membranes in the Unicellular Eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*.” *Journal of Bacteriology* **173 (6)**: 2026-2034.

8. Anhang

A.) Ergebnisse

AtRemorin 1.2 und Lipocalin Koexpression

Das Lipocalin (At5g58070) wurde in biochemischen Studien in der Detergens-löslichen Fraktion isolierter Arabidopsis Plasmamembranen detektiert (F. Demir, persönliche Mitteilung). Im Gegensatz zu den Remorinen sollte das Lipocalin als Markerprotein für Sterol-arme PM-Bereiche herangezogen werden. Das Lipocalin ist temperaturinduziert, mit der PM assoziiert und an der Thermotoleranz beteiligt (Frenette Charron *et al.*, 2005). Koexpressionsstudien mit dem AtRem 1.2 sollten Aufschluss darüber erbringen, ob beide Proteine *in planta* separiert voneinander vorliegen (Abb. A1).

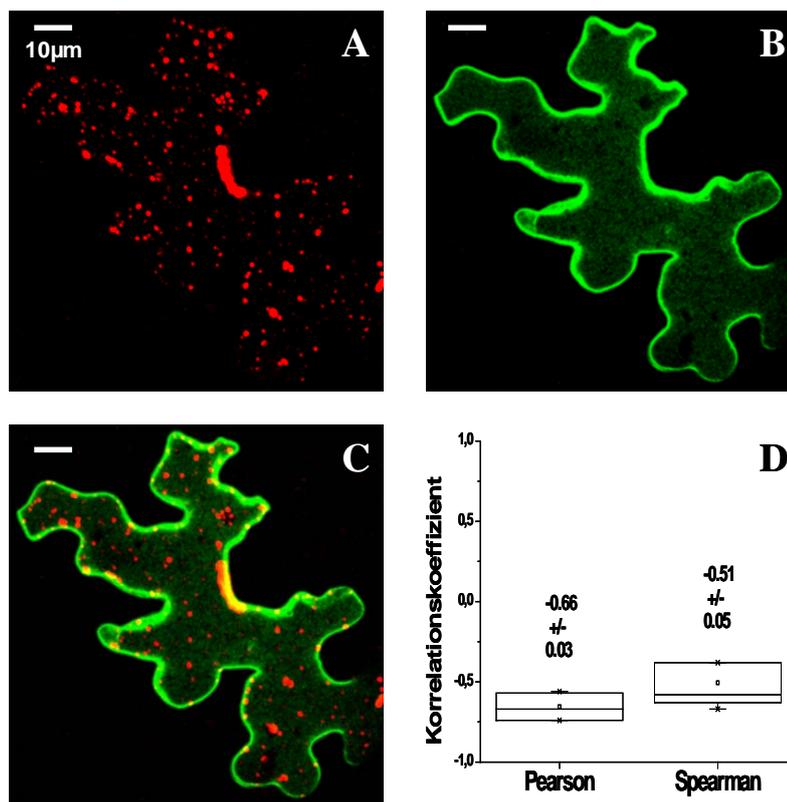


Abb. A1 DsRed::AtRem 1.2 (A) und Lipocalin::eGFP (B) Koexpression; beide Proteine waren nicht in Domänen kolokalisiert (C) und zeigten stark negative Korrelationskoeffizienten (D).

Nach der Koexpression waren beide Proteine an der PM lokalisiert (Abb. A1, A und B). In der Überlagerung der Einzel fluoreszenzen fiel auf, dass diejenigen Bereiche in denen das Lipocalin angesiedelt war, nicht von dsRed::AtRem 1.2-Proteinen besetzt waren (C). Die Remorine schienen gänzlich von den Lipocalin-reichen Arealen ausgeschlossen (Abb. A1, C).

Die Korrelationskoeffizienten indizierten eine Separation beider Proteine (gleiche Abb., D; n=6).

AtRemorin 1.3 und SKU5 Koexpression

AtRem 1.3 wurde mit dem nativen, GPI-verankerten *A. thaliana* Protein SKU5 koexprimiert, um eine Lokalisation in Membrandomänen zu prüfen (Abb. A2). SKU5 gehört zur SKS-Genfamilie („SKU5-similar“; Sedbrook *et al.*, 2002) und wurde in DRM-Isolationen gefunden (Borner *et al.*, 2005).

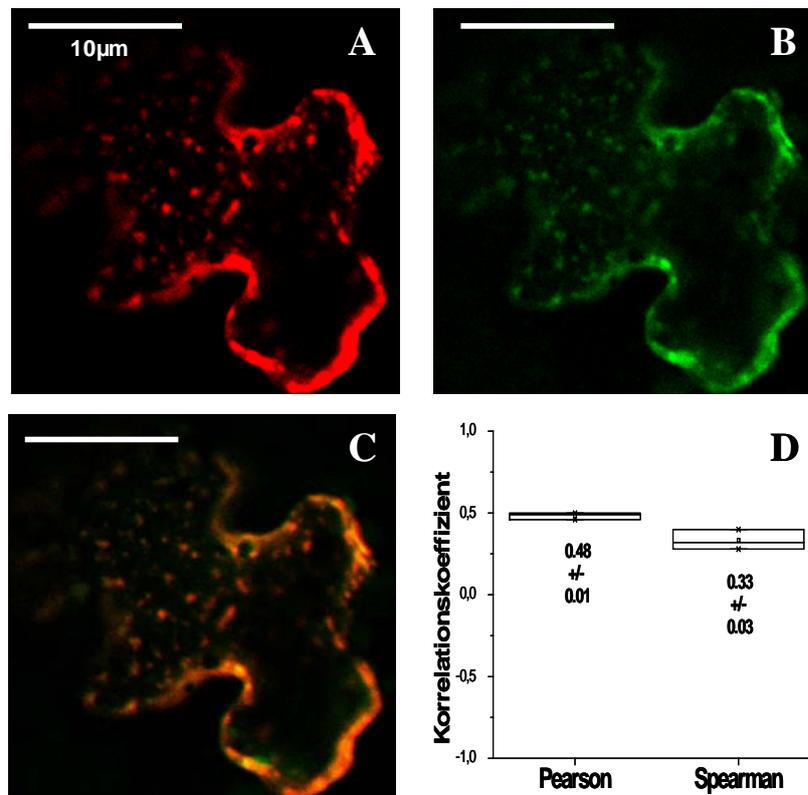


Abb. A2 DsRed::AtRem 1.3 (A) und das GPI-verankerte SKU5::eGFP-Protein (B); nach der Koexpression (C) waren beide Proteine in Domänen kolokalisiert (D).

Sowohl das Remorin (Abb. A2, A) als auch SKU5 (B) waren PM-ständig. Dabei zeigten beide Proteine Kolokalisation (C und D; n=3). Möglicherweise tragen GPI-verankerte Proteine wie SKU5 zur Stabilität der Nanodomänen in der PM bei (siehe Kap. 4.3.2).

Alignment des StRemorins 1.3 mit dem CAAX-Motiv

Ein Alignment des StRemorins mit dem tierischen CAAX-Motiv brachte zu Tage, dass Homologie in der Abfolge C-terminaler Aminosäuren hinsichtlich ihrer Polarität besteht (Abb. A3).

		182				199
CAAX Domain	(1)	-----	G	C	M	S
St-Remorin 1.3	(1)	A	K	R	A	T
Consensus	(1)		A	K	I	L

Abb. A3 Alignment des StRem 1.3 C-Terminus mit dem CAAX-Motiv.

Ausgehend von dieser Homologie wurden Deletions-, sowie Aminosäure-Austausch-Mutanten für die Remorine generiert (siehe Kap. 3.4).

Auflösungsvermögen STED-Mikroskop

Um das Auflösungsvermögen des STED-Mikroskops (*TCS STED*, Leica Microsystems) zu bestimmen, wurden mit dem Atto647N-Fluorophor überzogene, 40nm große Latex-Kügelchen („Beads“) abgebildet (Abb. A4).

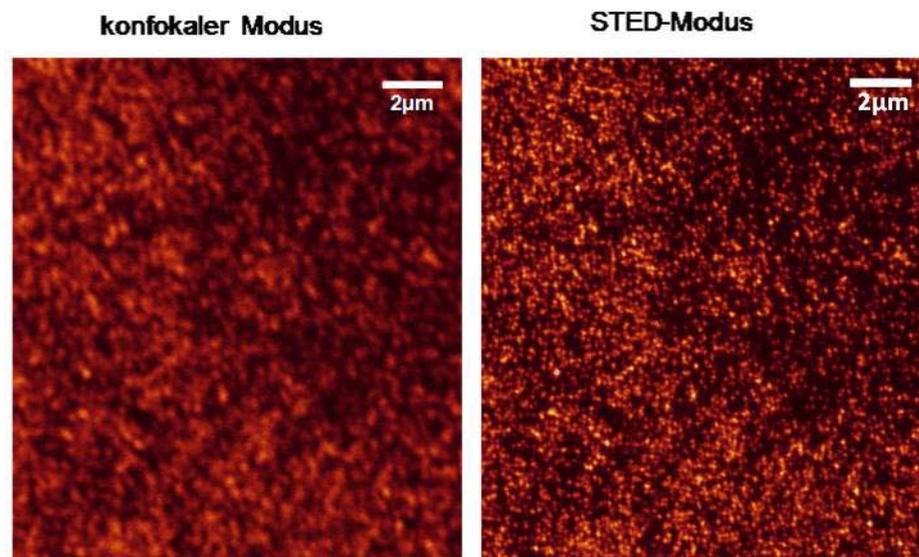


Abb. A4 Auflösungsvermögen des STED-Mikroskops; (**links**) die Auflösung ohne zugeschalteten Depletionslaser lag bei ~220nm; im STED-Modus bei ~60nm (**rechts**).

Ohne zugeschalteten Depletionslaser waren einzelne Beads nicht aufzulösen (links, konfokaler Modus). Im STED-Modus (rechts) waren die Beads als diskrete, runde Strukturen wahrnehmbar. Einzelne 40nm-Beads konnten dennoch nicht vollständig aufgelöst werden.

SLAH3::YFP Expression

Um die Distribution in der PM zu prüfen, wurde SLAH3 als YFP-Fusion transient in Arabidopsis Epidermiszellen exprimiert (Abb. A5; dargestellt in Falschfarbe).

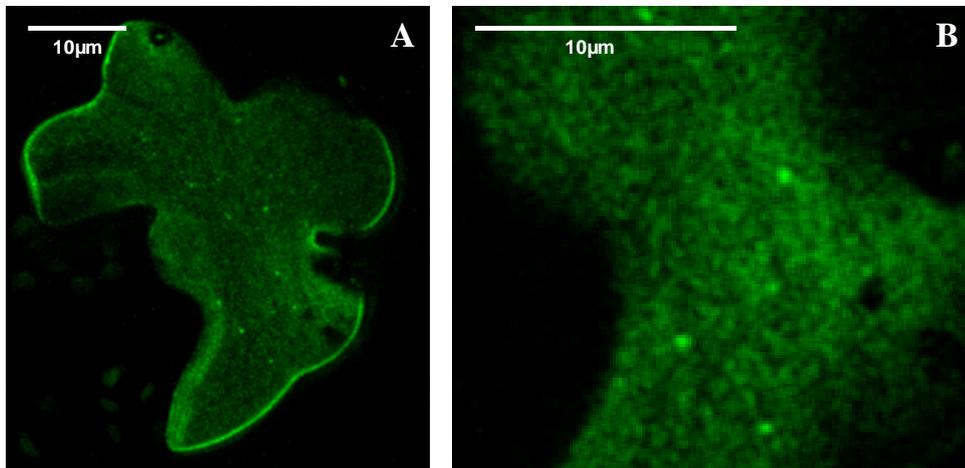


Abb. A5 (A) SLAH3::YFP war in der PM lokalisiert; dort war SLAH3 bei näherer Betrachtung in Domänen lokalisiert (B; Zoom auf die PM-Oberfläche; Falschfarbe).

SLAH3 akkumulierte an einigen Stellen in der PM zu größeren Domänen, in anderen Bereichen war ebenfalls eine inhomogene Verteilung zu detektieren (Abb. A5, A). Bei starker Vergrößerung fiel auf, dass sowohl große als auch kleinere Domänen existierten, die sich unter der Auflösungsgrenze befanden und mit den LSM-Systemen nicht zufriedenstellend auflösbar waren (B).

CPK21 und CPK21-G2AC3S Expression

Neben funktionellen CPK21-Kinasen wurde die CPK21-Mutante G2AC3S eingesetzt (bereitgestellt von Dr. D. Geiger, Lehrstuhl für molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik der Julius-Maximilians-Universität Würzburg). In der G2AC3S-Mutante sind die Aminosäuren Glycin und Cystein an der zweiten und dritten Stelle durch ein Alanin bzw. ein Serin ersetzt. Das Glycin an der zweiten Stelle unterliegt einer posttranslationalen Myristoylierung, für die das Cystein an der dritten Stelle wichtig ist (Cheng *et al.*, 2002). Die subzelluläre Lokalisation mutanter (Abb. A6, A) und nativer CPK21-Proteine (B) wurde überprüft. Beide Proteine wurden als dsRed-Fusion für sich alleine in *A. thaliana* exprimiert.

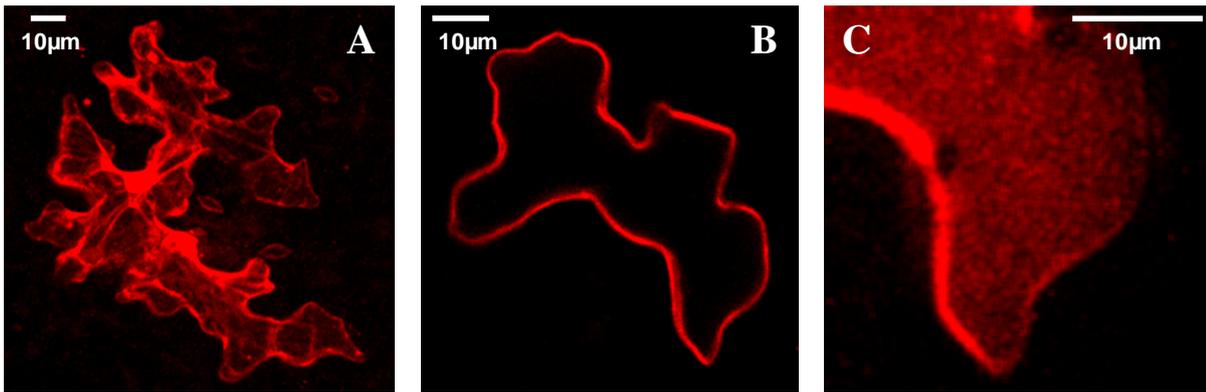


Abb. A6 Subzelluläre Lokalisation der CPK21-Mutante G2AC3S (A) im Vergleich zu wildtypischen CPK21-Kinasen (B); (C) dsRed::CPK21 an der PM, stark vergrößert.

Die G2AC3S-Mutante war ausschließlich im Zytosol lokalisiert (Abb. A6, A), während wildtypische CPK21-Proteine die PM erreichten (B) und dort eine weitestgehend inhomogene Verteilung zeigten (C). Die Domänen lagen unter der Auflösungsgrenze.

CPK21-G2AC3S und AtRem 1.2 Koexpression

In Koexpressionsstudien mit der Mutante CPK21-G2AC3S und dem AtRem 1.2 wurde überprüft, ob das Remorin die PM-Ständigkeit der Mutante wieder herstellen kann (Abb. A7). Funktionelle CPK21-Kinasen zeigten mit den Remorinen Kolokalisation an der PM (siehe Kap. 3.6.2).

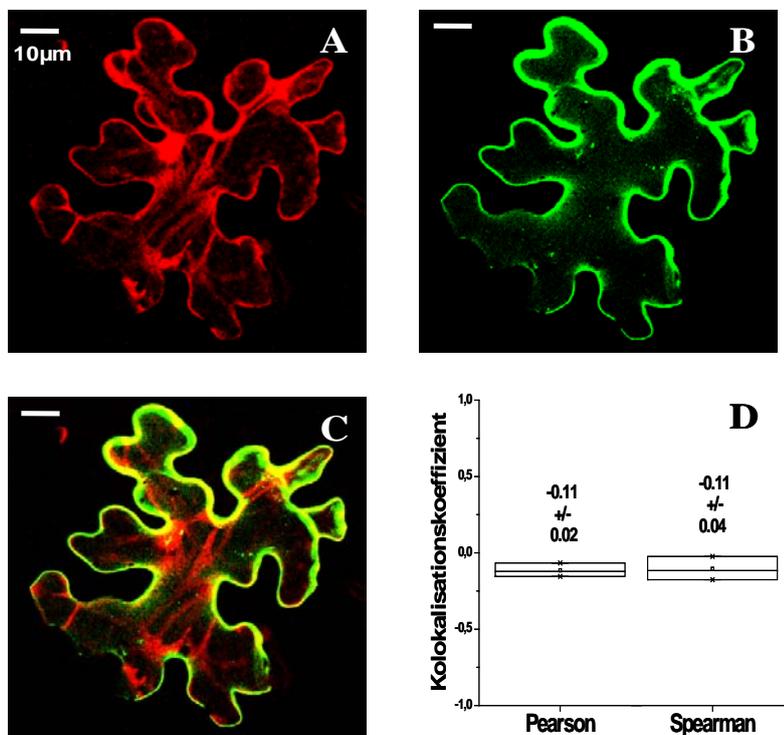


Abb. A7 DsRed::CPK21-G2AC3S-Mutante (A), koexprimiert mit eGFP::AtRem 1.2 (B). Die Mutante war im Zytosol lokalisiert und zeigte keine Kolokalisation mit dem Remorin (C, D)

CPK21-G2AC3S erschien im Zytosol (Abb. A7, A), während eGFP::AtRem 1.2 PM-ständig war (B). In der Überlagerung der Fluoreszenzbilder erschienen keine gelben Bereiche auf der PM-Oberfläche (C). Die Korrelationskoeffizienten waren negativ und deuteten eine Separation beider Proteine an (D; n=3). Die Koexpression des AtRemorins 1.2 brachte die CPK21-G2AC3S Mutante nicht an die PM zurück. Dies deutete an, dass beide Proteine nicht miteinander interagierten.

CPK21-G2AC3S und SLAH3 Koexpression

CPK21-G2AC3S wurde zusammen mit SLAH3 koexprimiert, um eine mögliche Kollokalisierung zu untersuchen. Funktionelle CPK21-Proteine interagierten mit SLAH3 in Membran-Nanodomänen (Kap. 3.7.1). Im Gegensatz zur funktionellen CPK21-Version kollokalisierte die G2AC3S-Mutante nicht mit SLAH3 an der PM (Abb. A8).

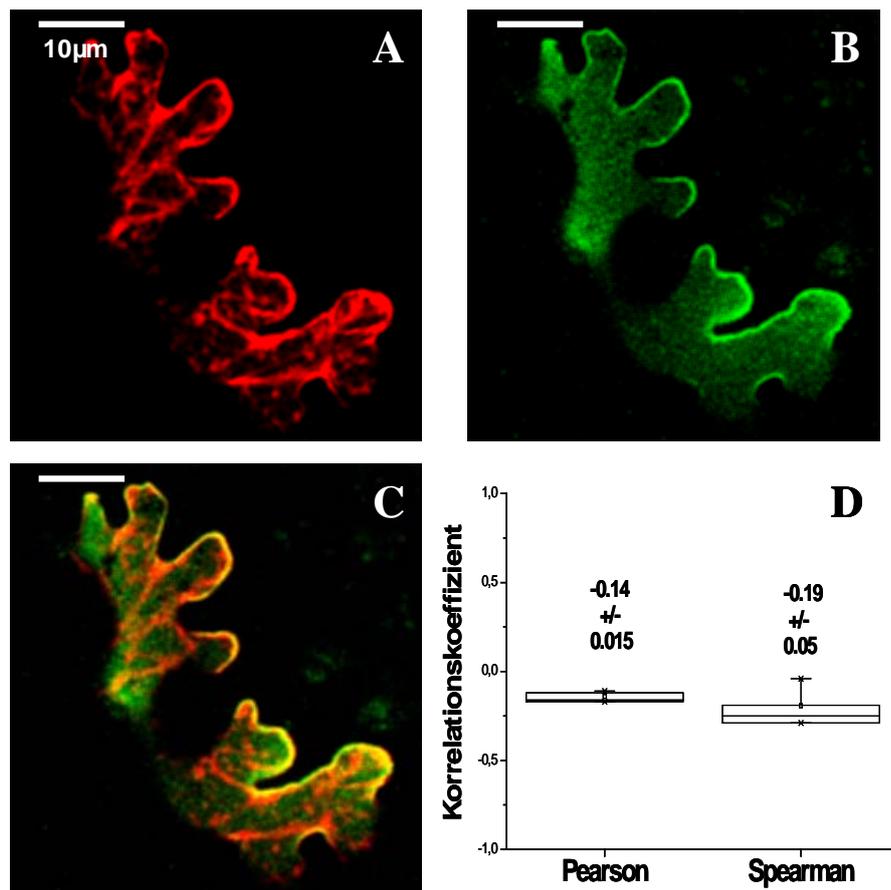


Abb. A8 DsRed::CPK21-G2AC3S-Proteine (A) verblieben im Zytosol, während SLAH3::YFP-Proteine PM-ständig waren (B); beide Proteine waren voneinander separiert (C und D).

Während SLAH3::YFP an der PM in Domänen lokalisiert war (Abb. A8, B), war die dsRed::CPK21-G2AC3S-Mutante im Zytosol vorzufinden (A). Beide Proteine waren nicht

kolokalisiert (Abb. A8, C). Die Korrelationskoeffizienten deuteten auf eine Separation der beiden Fusionsproteine hin (D; n=4). Die Ergebnisse legten nahe, dass CPK21 ausschließlich an der PM mit SLAH3 interagieren kann (siehe Kap. 4.7).

B.) Visualisierung von Lipidphasen unterschiedlicher Ordnung in *Arabidopsis thaliana* Plasmamembranen

I. Ergebnisse

Die Lipidkomposition der Plasmamembran (PM) von Protoplasten sollte durch die Verwendung fluoreszenter Lipidanaloga und Fluoreszenzfarbstoffe sichtbar gemacht werden. Basierend auf der Clusterbildung von Sterolen und Sphingolipiden in Membranen sollte versucht werden, Sterol-reiche Bereiche („*liquid ordered*“, l_o -Phasen) *in vivo* anzufärben und sie fluoreszenzmikroskopisch von Phospholipid-Phasen („*liquid disordered*“, l_d -Phasen) abzugrenzen. FRAP-basierte Messungen der Kinetik der Lipide in den Phasen sollten dabei helfen, Unterschiede in der Lipidkomposition der PM aufzudecken.

Für die Färbungen wurden Protoplasten aus *A. thaliana col 0* Mesophyllgewebe generiert. Als Protoplast bezeichnet man den von der PM umgebenen, plasmatischen Inhalt einer Zelle, bei der die strukturgebende Zellwand enzymatisch entfernt wurde. Protoplasten sind verhältnismäßig einfach in großer Zahl zu generieren (siehe 2.12), und die PM ist frei für Chemikalien zugänglich. Die Färbungen wurden durchgeführt wie in Kap. 2.13 beschrieben. Als fluoreszente Marker für Lipidphasen dienen FM4-64 (Abb. B1 und B2), LRB-PE (Abb. B3), DiIC₁₂ (Abb. B4); DiIC₁₈ (Abb. B4); DiD (Abb. B5), BD-SM C₁₂ (Abb. B6) und Laurdan (Abb. B14). Die Verteilung der Lipidanaloga und Fluoreszenzfarbstoffe wurde fluoreszenz-mikroskopisch dokumentiert.

1. Einzelfärbungen

Es wurde damit begonnen, die Verteilung verschiedener Farbstoffe in der PM über die Zeit zu dokumentieren. Um sicherzustellen, dass die eingesetzten Farbstoffkonzentrationen die Vitalität der Protoplasten nicht negativ beeinflussten, wurden Vitalitätsnachweise über Trypanblau Behandlungen erbracht (siehe Abb. B15 und 2.13.8).

1.1 FM4-64

Der FM4-64 Farbstoff (Invitrogen) ist eine wasserlösliche, lipophile Phenylethen-Verbindung. FM4-64 lagert sich in die exoplasmatische Seite der Lipiddoppelschicht ein und entwickelt dort eine intensive Fluoreszenz (Bolte *et al.*, 2004). Der Farbstoff wurde bei einer Wellenlänge von 543nm angeregt, die Emission zwischen 580-650nm mit den *Laser Scanning*-Mikroskopen detektiert (*LSM 5 Pascal; SP 5*).

Nach Färbungen mit FM4-64 (2.13.1) erschienen alle Bereiche der Protoplasten-PM gleichmäßig gefärbt (Abb. B1).

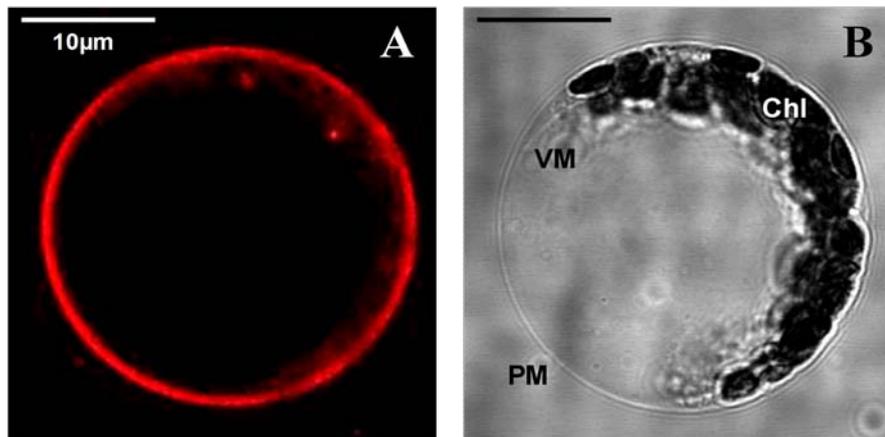


Abb. B1 *A. thaliana col 0* Protoplast, FM4-64 Färbung (A); (B): Durchlicht (DL); VM: Vakuolenmembran, PM: Plasmamembran, Chl: Chloroplasten.

Nach 30- bis 60-minütiger FM4-64 Inkubation tritt in intaktem Blattgewebe, in BY2-Zellkulturen, sowie in BY2-Protoplastensuspensionen aus Tabak (*Nicotiana tabacum cultivar bright yellow 2*; Nagata *et al.*, 1992) Endozytose auf. Da FM-Farbstoffe die PM aufgrund ihres lipophilen Charakters nicht durchdringen können, wird dies höchstwahrscheinlich durch aktive Transportprozesse vermittelt. So werden FM-Moleküle durch Invaginationen der PM als Vesikelabschnürungen in die Zellen befördert (Bolte *et al.*, 2004).

In Protoplasten erfolgte die FM4-64 Endozytose ebenfalls in diesem Zeitraum, im Zytosol erschienen bereits nach 20 Minuten Inkubation erste fluoreszente Vesikel (Abb. B1, A). Die Vitalität der Protoplasten wurde mittels Trypanblau überprüft (Abb. B15, A).

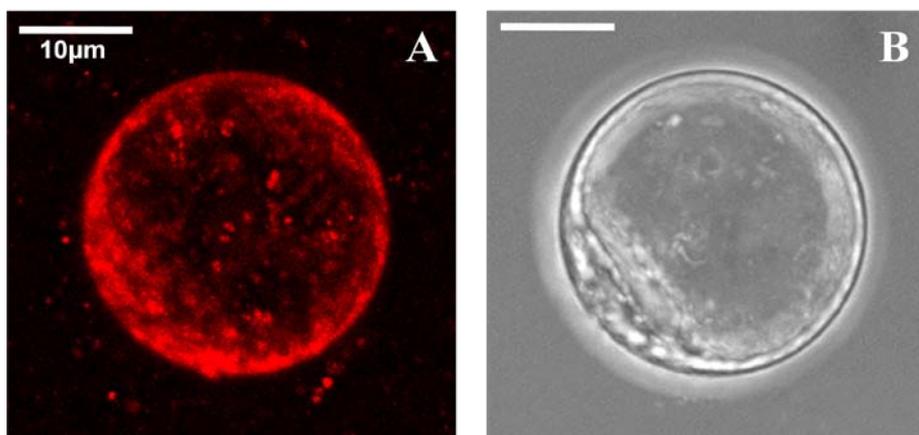


Abb. B2 FM4-64 endozytischer Protoplast, nach 18h Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff (A); (B): Durchlichtaufnahme, DL.

Nach 18-stündiger Inkubation mit FM4-64 hatte die Anzahl fluoreszenter Vesikel im Zytosol stark zugenommen (Abb. B2, A).

1.2 Lissamin Rhodamin B-Phosphatidylethanolamin (LRB-PE)

In künstlich hergestellten Membranen lagert sich LRB-PE (Avanti Polar Lipids) bevorzugt in l_d -Phasen ein (Juhasz *et al.*, 2010). Das Anregungsmaximum dieses Lipidanalogs liegt bei 557nm, das Emissionsmaximum bei 583nm. LRB-PE wurde als Marker für Sterol-arme Bereiche verwendet (siehe 2.13.2).

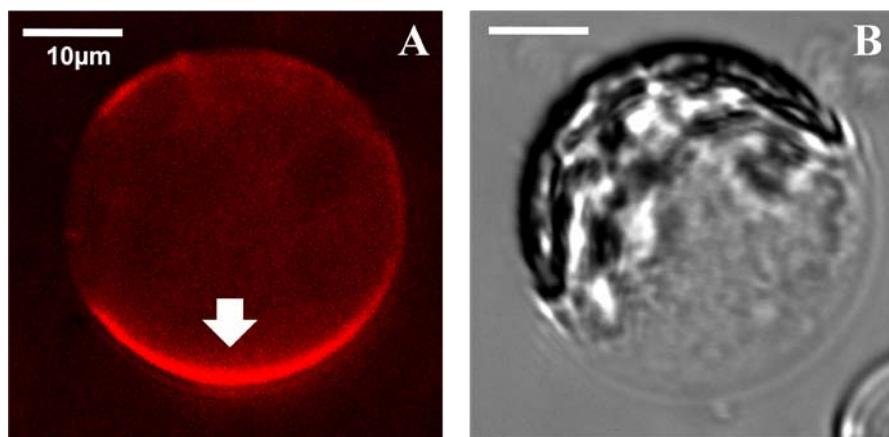


Abb. B3 LRB-PE Färbung (A); in einigen Protoplasten waren schwache Polarisationen auszumachen (A, Pfeil); im DL-Bild ist die PM zu erkennen (B).

Nach der Einlagerung in die PM zeigte LRB-PE eine weitestgehend homogene Verteilung. Dennoch konnten in einigen Protoplasten schwache Polarisationen detektiert werden (Abb. B3, A).

1.3 DiIC's

In dieser Studie wurden zwei DiIC-Farbstoffe verwendet, DiIC₁₂ und DiIC₁₈. In künstlich hergestellten Modellmembranen fand man DiIC₁₂ in l_d -Phasen vor (Juhasz *et al.*, 2010), während das um sechs Kohlenstoffatome längere DiIC₁₈ sowohl in l_d - als auch in l_o -Phasen zu finden war. Dabei war DiIC₁₈ gleichmäßig zwischen den Phasen verteilt. Die unterschiedliche Verteilung der DiIC's könnte daher rühren, dass in Molekülen mit kurzen Lipidketten ein höherer Grad an Unordnung herrscht als in Molekülen mit längeren Ketten. Moleküle mit langen Fettsäureresten wie beispielsweise DiIC₁₈ zeigen daher eine gewisse

Tendenz sich in l_o -Phasen einzulagern (Kahya, 2010). In zwei Separaten Ansätzen wurden Protoplasten mit DiIC₁₂ (Abb. B4, A) bzw. mit DiIC₁₈ (Abb. B4, C) angefärbt (2.13.3).

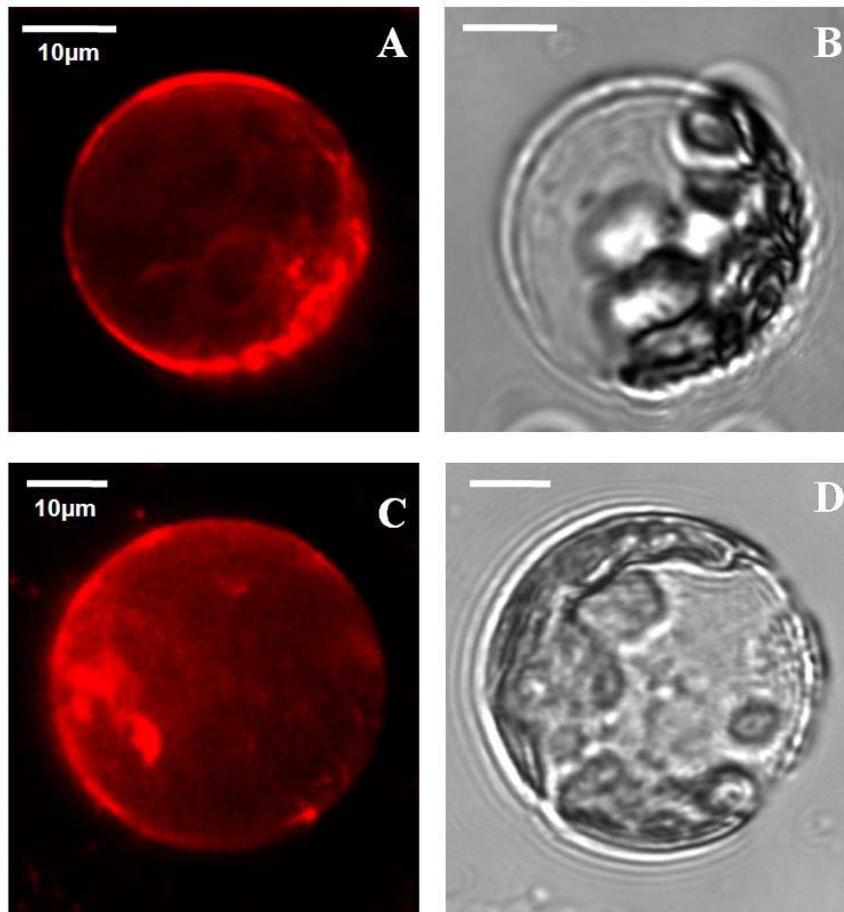


Abb. B4 DiIC₁₂ (A) und DiIC₁₈ (C) Färbung; mit den DiIC-Farbstoffen traten Endozytosevorgänge an der PM auf; (B, D): DL-Aufnahmen.

Weder mit DiIC₁₂ (Abb. B4, A) noch mit DiIC₁₈ (gleiche Abb., C) war eine Anfärbung distinkter Lipidphasen detektierbar, beide Farbstoffe waren homogen in der PM verteilt. Mit beiden Farbstoffen traten Endozytosevorgänge auf; innerhalb eines Beobachtungszeitraums von mehr als einer Stunde hatte die Anzahl an fluoreszenten Vesikeln im Zytosol stark zugenommen (nicht gezeigt).

1.4 DiD

DiD ist ein fluoreszenter Farbstoff, der sich in Modellmembranen in l_d -Phasen einlagert (Kahya, 2010). Nach zahlreichen Versuchen mit unterschiedlichen Konzentrationen (siehe 2.13.4) stellte sich heraus, dass sich die PM von Protoplasten kaum mit DiD anfärben ließ. Dies indizierte, dass sich DiD in Arabidopsis nur spärlich in Membranen einlagert (Abb. B5).

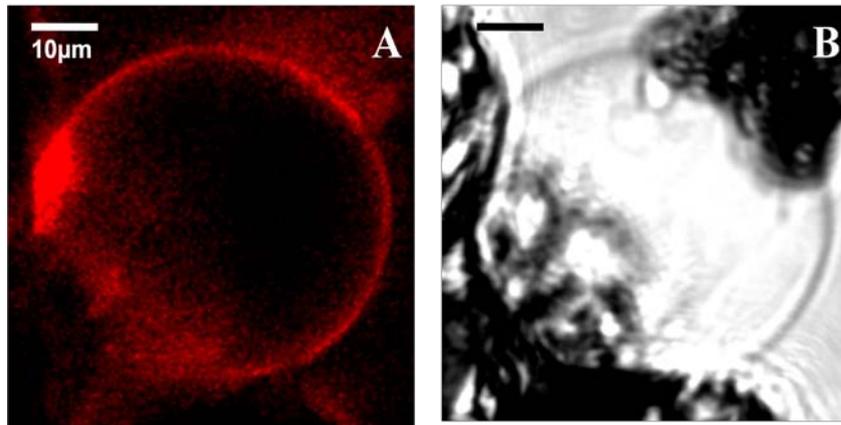


Abb. B5 DiD (A) Färbung; (B): DL-Aufnahme; DiD wurde nur spärlich in die PM aufgenommen.

In den wenigen erfolgreichen Versuchen war eine homogene Färbung der PM auszumachen (Abb. B5).

1.5 Bodipy-Sphingomyelin FL C₁₂ (BD-SM C₁₂)

Sphingolipide sind an Signaltransduktionsprozessen in tierischen Zellen beteiligt, beispielsweise an der Inaktivierung der Proteinkinase C (PKC) in menschlichen Blutplättchen (Hannun *et al.*, 1986). Im Pflanzenreich konnte dem Sphingolipid-Bestandteil D-Sphingosin eine Beteiligung an Signaltransduktionsprozessen nachgewiesen werden, indem es eine vakuoläre Pyrophosphatase aus *Chenopodium rubrum* (roter Gänsefuß) zu stimulieren vermag (Bille *et al.*, 1992). Sphingolipide und Cholesterin lagern sich zu Clustern zusammen. Diesen Clustern wird eine Rolle bei der Organisation tierischer *Lipid Raft*-Domänen auf der extrazellulären Seite der Lipiddoppelschicht zugeschrieben (Simons und Toomre, 2000). Versuche an Modellmembranen ergaben, dass sich Lipide mit gesättigten bzw. nahezu gesättigten Fettsäureresten wie im Falle der Sphingomyeline eher in l_o-Phasen anlagern. Auf diese Weise zeigen sie Phasenseparation und trennen sich von Lipiden der Phospholipid-Phase, welche mehr ungesättigte Fettsäuren aufweisen (Simons und Vaz, 2004).

Sterole und Sphingolipide können auch in pflanzlichen Membranen Lipiddomänen formen (Xu und London, 2000). Pflanzen der Gattung *Arabidopsis* besitzen einen Sphingolipid-Metabolismus und verfügen über funktionelle Sphingolipide (www.plantsphingolipids.org). Es wurde daher versucht, Sterol-reiche l_o-Phasen der PM mit dem fluoreszenten Sphingolipid Bodipy-Sphingomyelin FL C₁₂ (BD-SM C₁₂; Invitrogen) *in vivo* anzufärben.

Nach Inkubation der Protoplasten mit BD-SM C₁₂ (2.13.5) wurde die Fluoreszenz aufgezeichnet (Abb. B6).

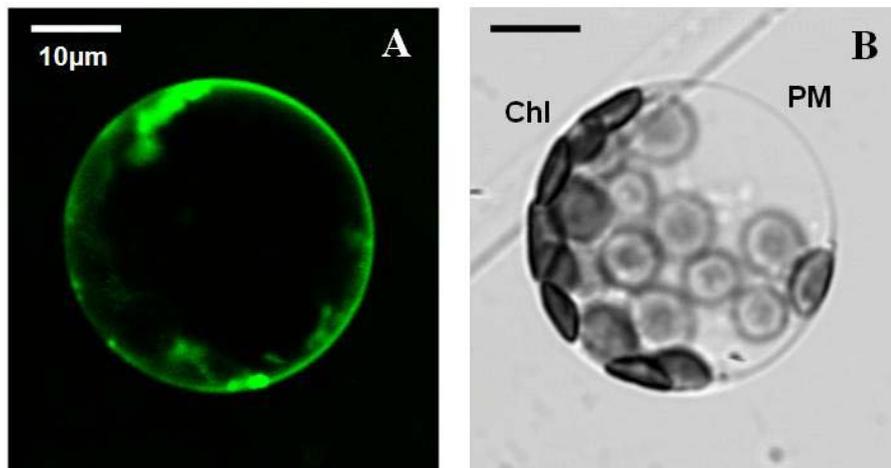


Abb. B6 BD-SM C₁₂ gefärbter Protoplast, 18h nach der Färbung (A); in der DL-Aufnahme (B) sind Chloroplasten (Chl) erkennbar; (PM): Plasmamembran.

Der Farbstoff hatte sich gleichmäßig in die PM eingelagert. Es waren weder Strukturen wie etwa Lipidcluster auf der PM-Oberfläche zu erkennen, noch ausgeprägte Lipidphasen. Im Falle der Remorin-markierten Areale lagen die Domänen mit einer Größe von 97 ± 4 nm (Abb. 34) deutlich unterhalb der Auflösungsgrenze von *Laser Scanning*-Mikroskopen von ca. 220 nm. Möglicherweise liegen Sterol-reiche Lipidcluster ebenfalls in diesem Größenbereich und sind daher über klassische fluoreszenzmikroskopische Ansätze nicht aufzulösen.

Mit dem amphiphilen BD-SM C₁₂ Farbstoff traten Invaginationsvorgänge an der PM auf, ein geringer Teil fluoreszenter Lipide wurde in Vesikeln endozytiert (Abb. B6). Dass mit BD-SM C₁₂ Endozytosevorgänge an der PM auftreten können wurde auch in Experimenten an tierischen Zellkulturen beschrieben (Pagano und Chen, 1998).

1.5.1 Bodipy-Sphingomyelin FL C₁₂ Detergens-Resistenz

Um zu überprüfen, ob sich BD-SM C₁₂ in Sterol-reiche Lipidphasen einlagert, wurde das Lipidanalogue zunächst zu aufgereinigten Arabidopsis Plasmamembranen (2.6.2) hinzugegeben. Dann wurde über eine Behandlung mit Triton X-100 und anschließender Ultrazentrifugation im Zuckergradienten die Detergens-resistente Membranfraktion (DRM) generiert (2.6.3). Der DRM-Fraktion wurde ein Aliquot entnommen und unter dem LSM hinsichtlich der charakteristischen Bodipy-Fluoreszenz (vgl. 2.13.5) analysiert.

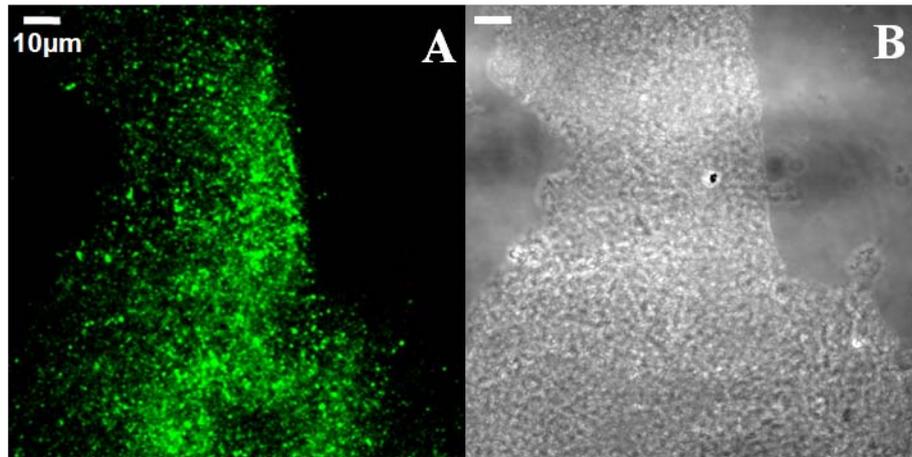


Abb. B7 BD-SM C₁₂ erschien in der DRM-Fraktion; **(A)** spezifische BD-Fluoreszenz eines Membran-Fragments der DRM-Fraktion; **(B)** Durchlicht.

Ein starkes, Bodipy-spezifisches Fluoreszenzsignal wurde detektiert (Abb. B7, A). In pflanzlichen DRM-Fractionen sind Phytosphingolipide und Sterol-artige Verbindungen stark angereichert (Beck *et al.*, 2007; Borner *et al.*, 2005). Mit BD-SM C₁₂ bestand die hohe Wahrscheinlichkeit, spezifisch Sterol-reiche PM-Regionen anzufärben.

2. Kombinierte Färbungen

Um Sterol-reiche l_o-Phasen von Phospholipid-Phasen mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Methoden abgrenzen zu können, wurden kombinierte Färbungen durchgeführt (2.13.6). In vorausgegangenen Experimenten stellte sich heraus, dass die zuverlässigsten PM-Färbungen unter Verwendung von FM4-64 (Abb. B1), LRB-PE (Abb. B3) und BD-SM C₁₂ (Abb. B6) erzielt wurden. DiD im Gegensatz lagerte sich nur schwach in die PM ein (Abb. B5), während DiIC₁₂ und DiIC₁₈ vermehrt ins Zytosol aufgenommen wurden (Abb. B4). Dies führte zu abnehmenden Fluoreszenzsignalen an der PM. Daher wurden in zwei separaten Ansätzen FM4-64 sowie LRB-PE als Marker für l_d-Phasen verwendet, während BD-SM C₁₂ als Marker für l_o-Phasen fungierte.

2.1 FM4-64 und BD-SM C₁₂

Anhand kombinierter Färbungen sollten Unterschiede in der Lipidzusammensetzung *in planta* detektiert werden. Frisch isolierte Protoplasten wurden gleichzeitig mit FM4-64 und mit BD-SM C₁₂ inkubiert (Abb. B8).

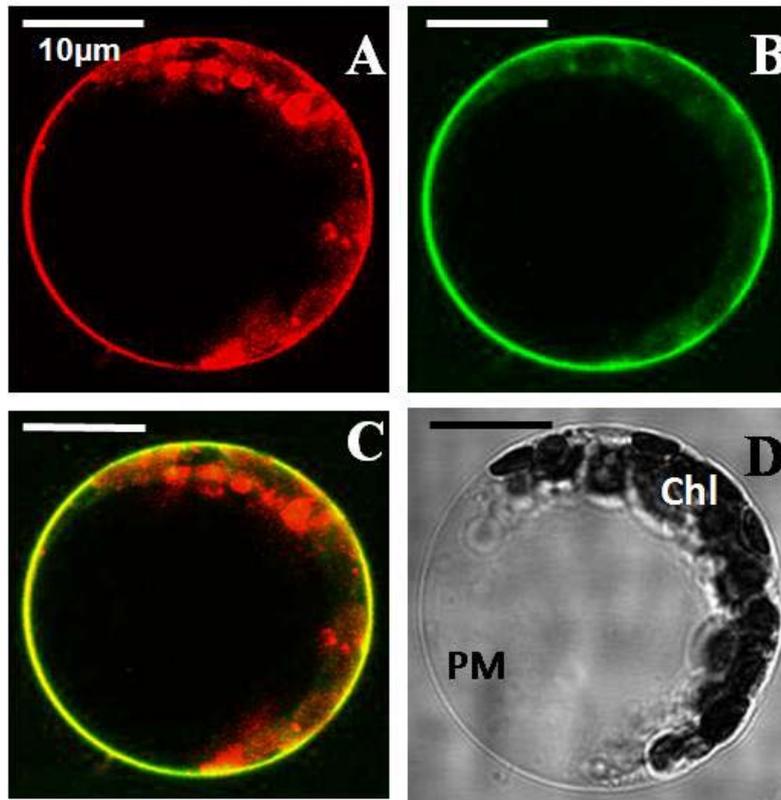


Abb. B8 Protoplasten, 1h nach der kombinierten Färbung mit FM4-64 (A) und BD-SM C₁₂ (B); beide Farbstoffe waren homogen verteilt (C); PM: Plasmamembran, chl: Chloroplasten.

Nach einer Stunde Inkubation war mit FM4-64 (Abb. B8, A) und BD-SM C₁₂ (B) eine homogene Färbung der PM sichtbar. Bei Anregung mit 547nm stach eine Eigenfluoreszenz intrazellulärer Bestandteile ins Auge (A und C). Bei diesen Strukturen handelte es sich um Chloroplasten, deren Chlorophylle ein ähnliches Anregungs- und Emissionsspektrum aufwiesen wie FM4-64. Beide Farbstoffe waren gleichmäßig über die PM verteilt; diese erschien in der Überlagerung der Einzelfluoreszenzen in einem gelben Farbton (Abb. B8, C). Der Protoplast war makroskopisch durch die Anfärbeprozedur nicht weiter beeinträchtigt und zeigte eine intakte PM nebst Zytoplasmaströmung (D). Einhergehende Trypanblau Färbungen konnten die Vitalität bestätigen (Abb. B15, B).

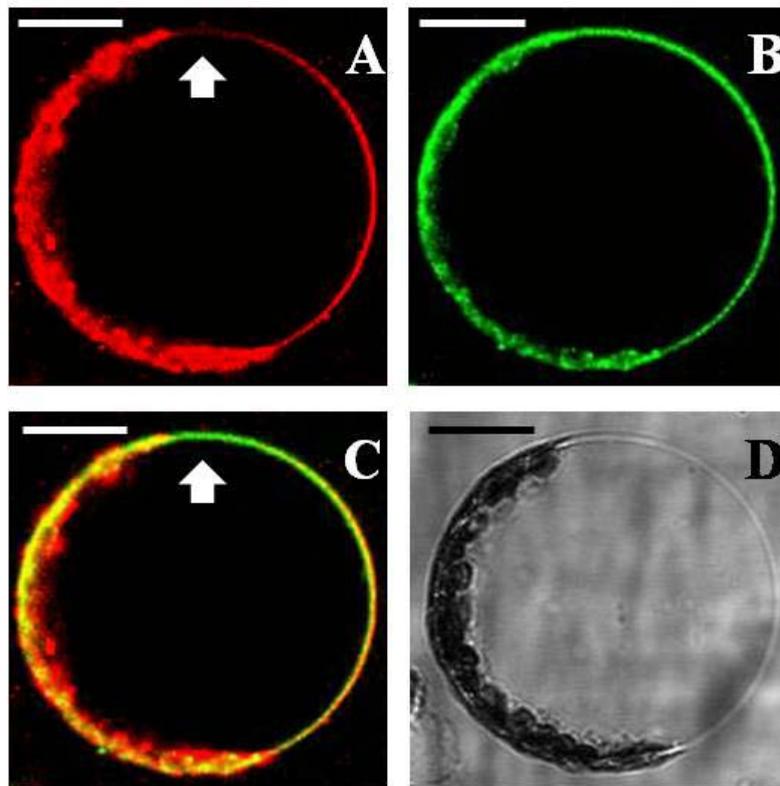


Abb. B9 15h nach kombinierter Färbung mit FM4-64 (A) und BD-SM C₁₂ (B) zeigte der Protoplast eine beginnende Polarisation (C, Pfeile).

15 Stunden nach Inkubationsstart war bereits ein weiter Teil der PM polarisiert. An den Polen hatte sich FM4-64 ab- bzw. BD-SM C₁₂ angereichert (Abb. B9, B und C; Pfeile). Dies indizierte eine Umverteilung der Lipide. Diese zeigten Phasenseparation und akkumulierten zu vermeintlich Sterol-armen und Sterol-reichen Phasen (C).

20 Stunden nach Inkubationsstart wurde die Umverteilung der Lipidanaloga in der PM deutlich sichtbar (Abb. B10, C; Pfeil). An gegenüberliegenden Polen hatte sich FM4-64 (A) ab-, bzw. BD-SM C₁₂ (B) angereichert (C, Pfeil). Eine Beeinträchtigung der Protoplasten war nicht auszumachen (D), bestätigt durch die Zugabe von Trypanblau (Abb. B15, B).

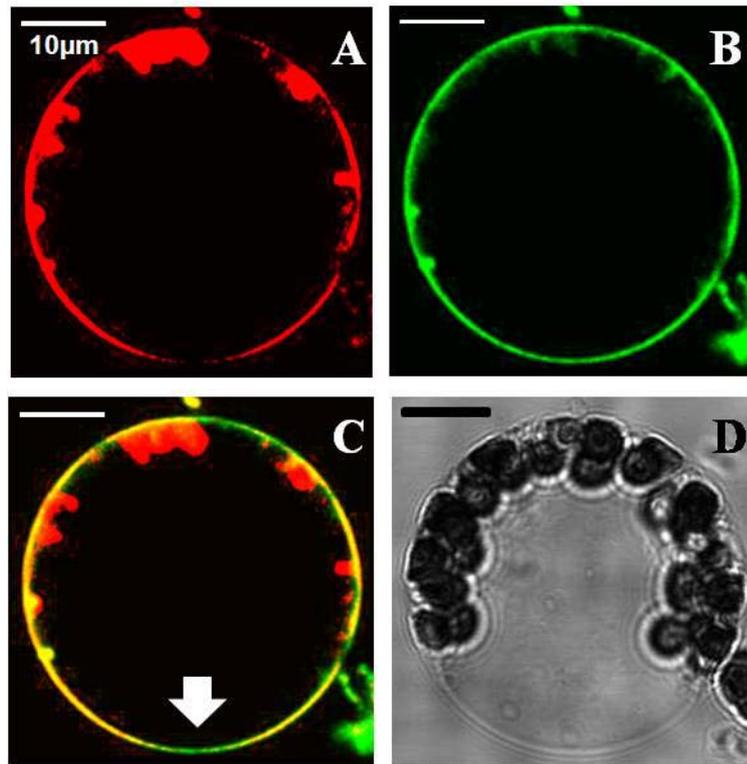


Abb. B10 Ausgeprägte Polarisation der Protoplasten-PM (**C, Pfeil**), nach 20h kombinierter Färbung mit FM4-64 (**A**) und BD-SM C₁₂ (**B**).

Protoplasten schienen über die Zeit ihre Lipidkonstellation zu verändern. 15 bis 20 Stunden nach dem Verdau der Zellwand fand eine Umverteilung der Lipide in der PM statt (Abb. B9 und B10). Vor diesem Zeitraum waren keine Veränderungen detektierbar (Abb. B8).

Um die Polarisation der Membran statistisch zu belegen wurden Korrelationsanalysen durchgeführt (siehe 2.11). Hierzu wurden verschiedene PM-Regionen („*region of interest*“, ROI) in FM4-64/BD-SM C₁₂ gefärbten Protoplasten analysiert (Abb. B11). Während ROI1 den Grad an Kolo-kalisation in weitestgehend unpolarisierten Membranbereichen reflektiert, spiegelt ROI2 die Kolo-kalisation in polarisierten PM-Bereichen wider.

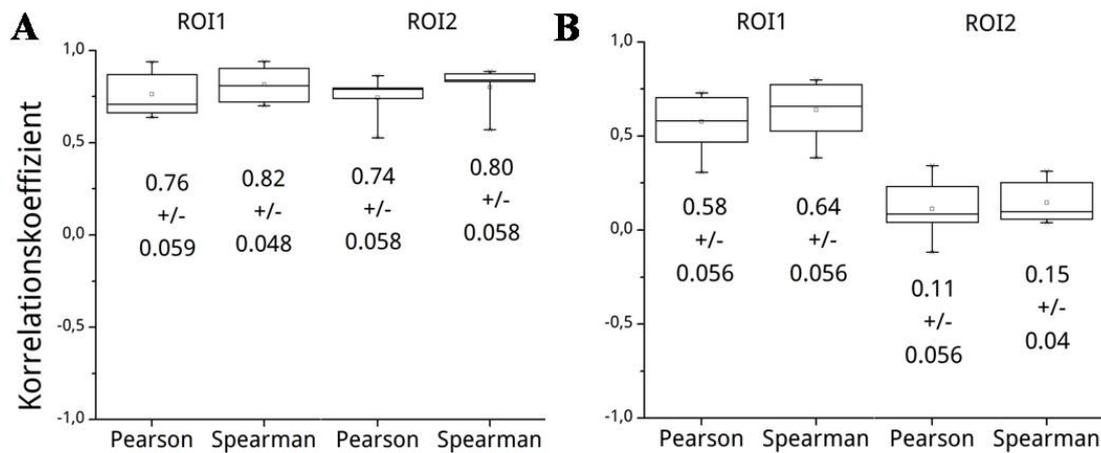


Abb. B11 Kolokalisationsanalyse; in frisch isolierten Protoplasten waren FM4-64 und BD-SM C₁₂ kolokalisiert (A); nach 15h hatten die Korrelationskoeffizienten stark abgenommen (B) und deuteten die zunehmende Separation der Fluoreszenzsignale an.

Nach einer Stunde Inkubation korrelierten die Fluoreszenzsignale von FM4-64 und BD-SM C₁₂ zunächst, die Pearson und Spearman Koeffizienten lagen zwischen 0,74 und 0,82 und indizierten eine Kolokalisation beider Farbstoffe in der PM (Abb. B11, A). 15 Stunden nach dem enzymatischen Verdau der Zellwand waren beide Farbstoffe zunehmend separiert, die Pearson und Spearman Koeffizienten hatten in polarisierten Membranbereichen auf 0,11 und 0,15 abgenommen (B, gleiche Abb.). Die geringer werdenden Korrelationskoeffizienten über die Zeit konnten eine Umverteilung FM4-64 bzw. BD-SM C₁₂ markierter Lipide in der PM statistisch belegen (n=5).

2.2 LRB-PE und BD-SM C₁₂

In Färbungen mit FM4-64 wurde deutlich, dass unter Verwendung dieses Farbstoffs Endozytose stattfindet (Abb. B1 und B2). Endozytose ist ein essentieller Mechanismus, um die Lipid- sowie die Proteinkomposition der PM zu regulieren (Gomez und Moore, 2007). Es gibt konkrete Hinweise darauf, dass bei Endozytoseereignissen an pflanzlichen Plasmamembranen die Anwesenheit von Sterolen erforderlich ist (Samaj *et al.*, 2004); FM4-64 könnte daher die Verteilung von Sterolen direkt beeinflusst haben. Um dies zu überprüfen, wurden Protoplasten mit LRB-PE angefärbt. Im Gegensatz zu FM4-64 wurde LRB-PE kaum endozytiert (Abb. B3). BD-SM C₁₂ wurde erneut eingesetzt, um l_o-Phasen anzufärben. In den kombinierten Färbungen mit LRB-PE und BD-SM C₁₂ fand nur in geringem Umfang Endozytose statt (Abb. B12).

Die Protoplasten zeigten 20 Stunden nach dem Verdau der Zellwand erneut eine Umverteilung PM-ständiger Lipide (Abb. B12).

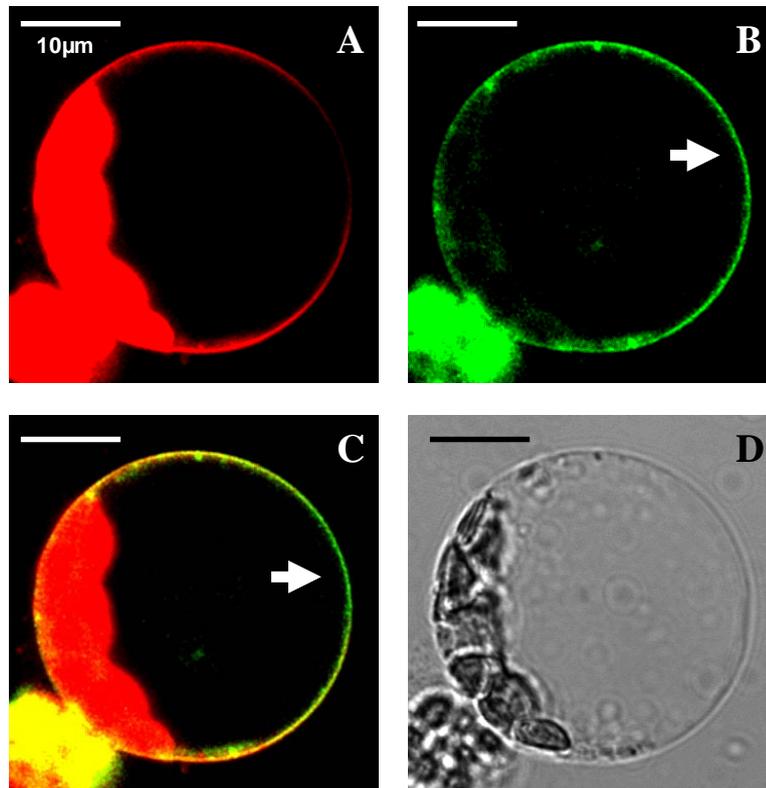


Abb. B12 Kombinierte Färbung mit LRB-PE (A) und BD-SM C₁₂ (B), 20h nach dem Anfärben; eine ausgeprägte Polarisation war erkennbar (C, Pfeil).

Es hatten sich Pole ausgebildet (Abb. B12). Dabei zeigte sich eine Akkumulation von BD-SM C₁₂ am lateralen Pol (B, Pfeil), während die LRB-PE Fluoreszenz in diesem Bereich abgenommen hatte (A). In der Überlagerung beider Fluoreszenzbilder deutete das ausgeprägte Bodipy-Signal eine Anhäufung von Sphingolipiden an (Abb. B12, C; Pfeil). Die starke Rotfluoreszenz in (A) und (C) kam durch die Eigenfluoreszenz der Chlorophylle zustande (vgl. Abb. B8 und B9).

3. FRAP-Experimente mit polarisierten Protoplasten

In Plasmamembranen von Arabidopsis Protoplasten schienen 15 bis 20 Stunden nach dem enzymatischen Verdau der Zellwand Lipid-Umverteilungen stattzufinden (Kap. 2). Eine nichtinvasive Methode um festzustellen, ob es sich bei den Lipiden in den polarisierten Bereichen um unterschiedliche Phasen handelt, ist das Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe

mittels starker Laserpulse (das sog. FRAP: „*fluorescence recovery after photobleach*“; siehe 2.8.3). Aufgrund der lateralen Beweglichkeit der Lipide in der PM werden ausgebleichte Bereiche nach geraumer Zeit wieder aufgefüllt. Durch das Messen der dazu benötigten Zeitspanne kann man Rückschlüsse auf die vorherrschende Lipidkinetik und daraus auf den molekularen Charakter der Lipide sowie der Proteine schließen (Reits und Neefjes, 2001). Aufgrund der Anordnung von Sphingolipiden und Sterolen zu dicht gepackten Clustern zeigen diese Bereiche andere Eigenschaften hinsichtlich der Lipid-Beweglichkeit im Vergleich zu Phospholipid-reichen l_d -Phasen, in denen die Lipide weniger dicht gepackt sind. In künstlich hergestellten Lipiddoppelschichten führte die Einlagerung des Sterols Cholesterin zu einem starken Rückgang der lateralen Bewegungsfreiheit der Lipide, angezeigt durch abnehmende Werte der Diffusionskoeffizienten (Ladha *et al.*, 1996).

Nach der Polarisation FM4-64/BD-SM C_{12} gefärbter Protoplasten wurden in FRAP-Versuchen zeitliche Unterschiede in der Fluoreszenzrückkehr aufgedeckt. Nach Auswertung entsprechender Lipidkinetiken ergaben sich erste Hinweise auf zwei unterschiedliche Phasen an den Polen (Abb. B13).

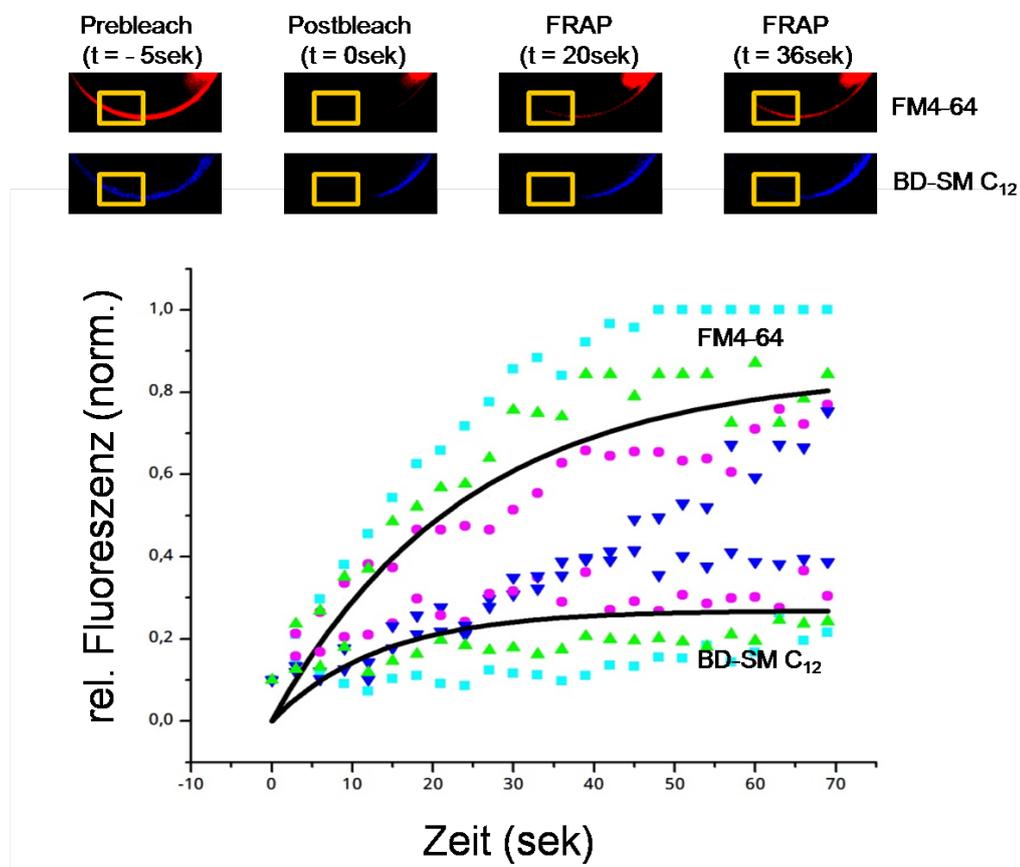


Abb. B13 FRAP-Kinetiken BD-SM C_{12} - bzw. FM4-64-markierter Lipidphasen; in beiden Phasen kehrte die Fluoreszenz zurück.

Nach dem Ausbleichen eines definierten Bereiches des FM4-64 gefärbten Pols kehrte die Fluoreszenz nach 15 Sekunden auf den halbmaximalen Fluoreszenz-Ausgangswert zurück (Abb. B13) und stieg innerhalb eines Beobachtungszeitraums von 70 Sekunden auf 0,8 an (gleiche Abb.). Der Diffusionskoeffizient $[D]$ errechnete sich entsprechend zu $0,084\mu\text{m}^2/\text{s}$. Lipidphasen in denen sich BD-SM C₁₂ eingelagert hatte, zeigten hingegen nach 70 Sekunden eine relative Fluoreszenzrückkehr von 0,275 (Abb. B13; n=4). Dies entspricht einem $[D]$ von $8,01\times 10^{-4}\mu\text{m}^2/\text{s}$. Somit bewegten sich Lipide der FM4-64 markierten Phase mehr als zehnmals so schnell wie Lipide in BD-SM C₁₂ markierten Bereichen. Dies deutete auf zwei koexistierende Lipidphasen unterschiedlicher Komposition hin, selektiv angefärbt durch FM4-64 und BD-SM C₁₂.

4. Laurdan Färbungen

Die FRAP-Daten (Abb. B13) bestätigten zeitlich bedingte Lipid-Umverteilungen in Plasmamembranen von Arabidopsis Protoplasten. Aufgrund der Tatsache, dass die in den verschiedenen Messungen verwendeten Farbstoffe endozytiert wurden (Abb. B1-B3, B6) schien es möglich, dass die Endozytosevorgänge die Lipidkomposition der PM und damit die Polarisation beeinflussten. Daher wurden Protoplasten mit dem lipophilen Laurdan Farbstoff angefärbt (Weber und Farris, 1979; siehe auch 2.13.7). Zum einen wurden mit Laurdan keine Endozytosevorgänge in Arabidopsis Protoplasten detektiert (siehe nachfolgende Abb.), zum anderen ist dieser Farbstoff aufgrund seiner spektralen Eigenschaften dazu in der Lage, Unterschiede zwischen I_o- und I_d-Phasen aufzudecken. Laurdan stellte somit eine weitere Möglichkeit dar, Polarisationsvorgänge in Protoplasten fluoreszenzmikroskopisch zu erfassen.

Trifft ein polarisierter Lichtstrahl mit konstanter Ausbreitungsrichtung auf eine Lipidschicht, kann diese die Polarisation des Lichtstrahles durch Wassereinlagerungen positiv oder negativ verändern. Durch Kalkulation der dabei auftretenden Phasenunterschiede kann der relative Hydratationsgrad errechnet werden. Dieser kann als Indikator für den Ordnungsgrad der Lipide herangezogen werden. Sterol-reiche Domänen zeichnen sich in künstlich erzeugten Lipidmixturen durch einen hohen Ordnungsgrad aus, aufgrund der Abnahme des Hydratationsgrades durch die zunehmende Einlagerung von Sterolen (Ahmed *et al.*, 1997; Schroeder *et al.*, 1994, Parasassi *et al.*, 1994). In solchen apolaren, dicht gepackten Lipidumgebungen ist das Emissionsspektrum des fluoreszenten Naphtalen-Restes des Laurdan Farbstoffs in den blauen Bereich verschoben. In locker gepackten, polaren

Phospholipid-Phasen mit einem hohen Hydratationsgrad hingegen mehr in den roten Spektralbereich (Gaus *et al.*, 2003; Parasassi *et al.*, 1998). Um die spezifischen spektralen Verschiebungen zu quantifizieren, berechnet man den Polarisationswert (GP-Wert; engl.: „generalized polarization value“; Dietrich *et al.*, 2001; Parasassi *et al.*, 1997; siehe 2.13.7).

$$\text{GP-Wert} = \frac{\text{Intensität blau} - \text{Intensität rot}}{\text{Intensität blau} + \text{Intensität rot}}$$

Ein GP-Wert von -1 zeugt von einer wässrigen Phase, ein GP-Wert von +1 von einer reinen Sterol-Phase ohne Hydratation (siehe GP-Skala, Abb. B14, P). Die Fluoreszenzsignale im kurzwelligen, blauen Spektralbereich wurden zur besseren Kenntlichmachung der Polarisation in grüner Farbe dargestellt (Abb. B14, B, G, L).

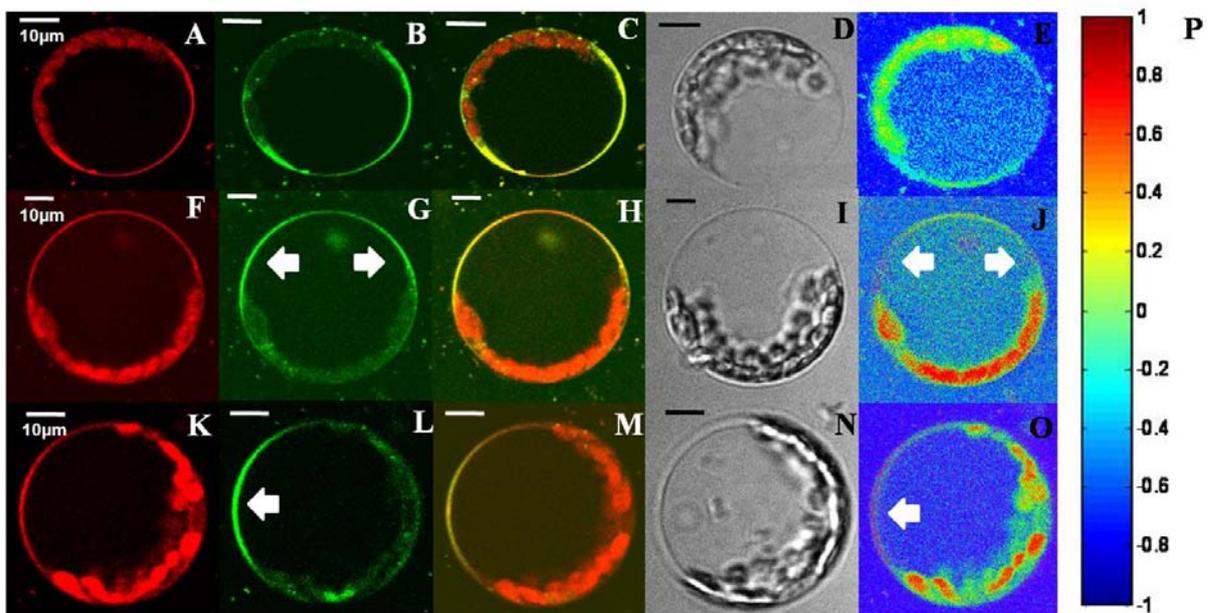


Abb. B14 Laurdan Färbungen; Protoplasten unterschiedlichen Alters: 1h (A-E), 15h (F-J), 20h (K-O). (E, J, O): GP-Werte mit zugehöriger Skala (P). Die zeitabhängige Polarisation der PM führte zur Ausbildung von Lipidbereichen höherer Ordnung (E, J, O; Pfeile).

Nach einer Stunde Laurdan Inkubation war die PM homogen eingefärbt. Zu diesem Zeitpunkt war keine Polarisation detektierbar (B14, A-E). Sowohl die im langwelligen Spektralbereich fluoreszierenden, polaren Membranbereiche (putative Phospholipid-Bereiche, A), als auch die im kurzwelligen Spektralbereich fluoreszierenden, apolaren Bereiche (putativ Sterol-reiche Areale, B) durchzogen die PM gleichmäßig (C). Die GP-Werte bewegten sich zwischen -0,2 und +0,2 (Abb. B14, E). Nach 15 Stunden wurde eine Umverteilung der Lipide detektiert, eine Polarisation der PM zeichnete sich ab (F-I; Pfeile). Berechnete GP-Werte indizierten laterale PM-Bereiche, in denen der Ordnungsgrad der Lipide auf 0,6 bis 0,8

zugenommen hatte (J; Pfeile). Innerhalb dieses Zeitraums wurden bereits zuvor Lipid-Umverteilungen detektiert (Abb. B9). Nach 20 Stunden war die Polarisation weiter ausgeprägt (K-O). Es wurde ein weiter PM-Bereich auf der basalen Seite detektiert, in dem ein sehr hoher Ordnungsgrad von 0,8 herrschte (O; Pfeil). Für angrenzende PM-Regionen wurden geringere Hydratationsgrade ermittelt, die GP-Werte bewegten sich hier zwischen 0 und 0,2 (Abb. B14, O). Die Vitalität der Protoplasten nach 20 Stunden wurde über Trypanblau Behandlungen bestätigt (Abb. B15, C).

5. Vitalitätsnachweise

Um die Vitalität der Protoplasten nach den Anfärbeprozeduren zu überprüfen, wurden Protoplastensuspensionen mit Trypanblau versetzt (2.13.8). Trypanblau wird von intakten Zellen nicht ins Zytosol aufgenommen (Tennant, 1964).

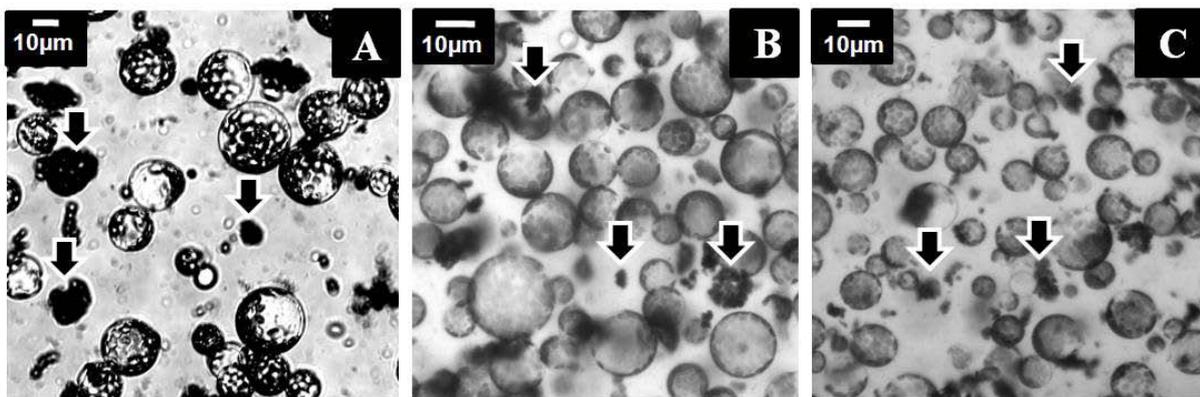


Abb. B15 Trypanblau Färbungen; Arabidopsis Protoplasten nach 1h FM4-64 Inkubation (A), bzw. nach 20h FM4-64/BD-SM C₁₂ Färbung (B), sowie nach 20h Laurdan Inkubation (C). Nur in wenigen Zellen ließen sich Spuren von Trypanblau im Zytosol detektieren (Pfeile); diese waren stark deformiert und zumeist kollabiert.

Die wenigen Zellen, in denen Spuren von Trypanblau im Zytosol entdeckt wurden, hatten nicht länger die gewohnt runde Form intakter Protoplasten. Stattdessen war das Zytosol dieser Zellen zumeist kollabiert und die PM daher nicht mehr eindeutig auszumachen. Die vermeintlich toten Zellen wirkten insgesamt stark deformiert (Abb. B15, Pfeile in A bis C). Für die überwiegende Mehrheit der Zellen in den Protoplastensuspensionen ließ sich weder nach 1 Stunde FM4-64 (Abb. B15, A), noch nach 20 Stunden kombinierter FM4-64/BD-SM C₁₂ Färbung (B) Spuren von Trypanblau im Zytosol detektieren. Auch nach 20 Stunden Laurdan Inkubation waren nur wenige blau gefärbte Zellen zu entdecken (C); diese erschienen wiederum stark deformiert (Abb. B15, C; Pfeile).

II. Diskussion

Abhängig von der Lipidkomposition und der Temperatur können geordnete und weniger geordnete Lipidphasen in Membranen koexistieren (Ahmed *et al.*, 1997; Schroeder *et al.*, 1994). Geordnete Lipidphasen („*liquid ordered*“, l_o -Phasen) zeichnen sich durch eine Anhäufung von Sterolen und Sphingolipiden aus und formen Domänen, aufgrund molekularer Wechselwirkungen zwischen den Sphingoid-Basen. Ziehen sich zwei Sphingolipide gegenseitig an, so entstehen Hohlräume zwischen den zugehörigen, meist gesättigten Fettsäureresten, da die Kopfgruppen größer sind als die Fettsäurereste. Die Hohlräume werden durch Sterole, wie in tierischen Zellen beispielsweise durch das kleine Cholesterinmolekül, besetzt (Simons und Ikonen, 1997). Die Domänen sind von Phospholipiden umgeben. Phospholipide können - bedingt durch die sperrigen, ungesättigten Fettsäurereste - weniger dicht aneinander gepackt werden und bilden im Gegensatz zu den Sterolen und Sphingolipiden weniger geordnete Lipidphasen („*liquid disordered*“, l_d -Phasen) aus.

Lipidphasen in Membranen lassen sich mit kommerziell erhältlichen Farbstoffen und fluoreszenzmarkierten Lipidanaloga anfärben (Kahya, 2010). Idealerweise ließen sich l_o - und l_d -Phasen in pflanzlichen Plasmamembranen spezifisch markieren. Da l_o -Phasen einen hohen Anteil an Sterolen und Sphingolipiden besitzen und diese Lipidklassen auch in pflanzlichen Membranen Domänen formen können (Xu und London, 2000), wurde ein fluoreszenzmarkiertes Sphingomyelin in Protoplasten als Marker für geordnete Lipidphasen getestet. Als Chromophor dienten Bodipy-Moleküle, die kovalent an das Sphingomyelin, bestehend aus einem Sphingosin und einer C_{12} -Fettsäurekette, gekoppelt waren (Bodipy-Sphingomyelin FL C_{12} ; BD-SM C_{12}). Da nahezu alle Färbeprotokolle für tierische Zelltypen und artifiziell hergestellte Membranen ausgelegt waren, wurden die Protokolle für pflanzliche Zellen optimiert. Als Marker für Sterol-arme l_d -Phasen sollten FM4-64, LRB-PE, DiIC₁₂ und DiD dienen (siehe 2.13). Der Farbstoff DiIC₁₈ war in Modellmembranen sowohl in l_o - als auch in l_d -Phasen zu finden (Kahya, 2010) und wurde ebenso an Protoplasten getestet wie Laurdan - ein Fluoreszenzfarbstoff der dazu geeignet ist, Unterschiede im Hydratisierungsgrad und somit im Ordnungsgrad der Lipide fluoreszenzmikroskopisch zu detektieren (siehe 2.13.7).

Zunächst wurden Einzelfärbungen (Anhang B.I.1) durchgeführt, um das Verhalten der Farbstoffe über die Zeit zu dokumentieren. Dabei erwiesen sich FM4-64, LRB-PE sowie BD-SM C_{12} als stabilste PM-Marker. Zwar traten hier Endozytosevorgänge auf (Abb. B1, B2, B3; B6), jedoch in einem geringeren Ausmaß als in den Färbungen mit DiIC₁₂ (Abb. B4, A) und DiIC₁₈ (gleiche Abb., C). Die vermehrte Endozytose führte im Falle der DiIC Farbstoffe zu einer Abnahme des Fluoreszenzsignals in der PM (Abb. B4). DiD im Gegensatz wurde kaum

in Plasmamembranen inkorporiert (Abb. B5) und eignete sich nicht zum Anfärben von Lipidphasen in Pflanzen. Nach den Färbeprozeduren wurde die Vitalität der Protoplasten durch Trypanblau Zugaben bestätigt (Abb. B15, A). Trypanblau kann die PM intakter Zellen nicht durchqueren (Tennant, 1964).

Neben Färbungen mit nur einem Farbstoff wurden kombinierte Färbungen (Anhang B.I.2) mit FM4-64 und BD-SM C₁₂ (Abb. B8, B9, B10) und mit LRB-PE und BD-SM C₁₂ (Abb. B12) durchgeführt mit dem Zweck, verschiedene Lipidphasen zeitgleich anzufärben und deren Distribution *in vivo* zu dokumentieren. Es stellte sich heraus, dass in Arabidopsis Protoplasten eine Umverteilung PM-ständiger Lipide stattfindet; innerhalb eines Zeitraums von 15 Stunden begann die PM zu polarisieren (vgl. Abb. B8 und B9). Nach 20 Stunden hatten sich die Pole deutlich ausgebildet (Abb. B10 und B12). Eine Korrelationsanalyse der Fluoreszenzsignale in FM4-64/BD-SM C₁₂ gefärbten Protoplasten belegte die zeitlich bedingte Polarisation (Abb. B11). Kurz nach dem Anfärben frisch isolierter Protoplasten waren beide Farbstoffe in der PM kolokalisiert, indiziert durch hohe Pearson und Spearman Koeffizienten von über 0,7 bzw. von 0,8 und darüber (gleiche Abb., A). 15 Stunden nach dem enzymatischen Verdau der Zellwand hatten die Korrelationskoeffizienten signifikant abgenommen (Abb. B11, B). In unpolarisierten Bereichen der PM (ROI1) fielen diese von 0,76 bzw. 0,82 auf 0,58 bzw. 0,64; in polarisierten Bereichen (ROI2) von 0,74 bzw. 0,80 auf 0,11 bzw. 0,15 (gleiche Abb.). Die Abnahme der Pearson und Spearman Koeffizienten indizierte eine zunehmende Separation des FM4-64 und des BD-SM C₁₂ Fluoreszenzsignals. Dies deutete auf eine Akkumulation von Lipiden in distinkte Phasen hin.

In DRM-Fractionen aus Arabidopsis und aus Tabak sind Sterole und Sphingolipide stark angereichert (Borner *et al.*, 2005; Lynch und Dunn, 2004, Mongrand *et al.*, 2004). Laut Herstellerangaben besitzt das BD-SM C₁₂ Lipidanalogs trotz des fluoreszenten Bodipy-Labels die gleiche stereochemische Konformation wie native, biologisch aktive Sphingolipide (<http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp01154.pdf>). Das BD-SM C₁₂ Fluoreszenzsignal wurde in der Arabidopsis DRM-Fraktion detektiert (Abb. B7). Es war daher als sehr wahrscheinlich anzusehen, dass am BD-SM C₁₂ gefärbten Pol native Phytosphingolipide und auch Sterole akkumulierten. In Modellmembranen wurde für Sphingomyeline gezeigt, dass die gesättigten Fettsäurereste die Ausbildung Raft-ähnlicher, geordneter Phasen fördern; diese vereinigten sich zu größeren Domänen (Samsonov *et al.*, 2001). BD-SM C₁₂ wurde daher als *in vivo* Marker für Sterol-/Sphingolipid-reiche Phasen in Pflanzen herangezogen.

Außer FM4-64 wurden alle Farbstoffe in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Für die Färbungen wurden Gemische bestehend aus DMSO/Wasser bzw. DMSO/Puffer hergestellt

(vgl. 2.13). DMSO kann selbst nach starker Verdünnung die Struktur von Membranen beeinflussen, indem es möglicherweise Wasser aus Lipiddoppelschichten verdrängt (Gordeliy *et al.*, 1998). Abhängig von der vorherrschenden DMSO-Konzentration kann zudem sowohl die Dicke von Membranen verändert sein, als auch die Formation von Wasserporen induziert werden (Gurtovenko und Anwar, 2007). In den Experimenten wurden DMSO-Konzentrationen von 0,25 bis 3% verwendet. In begleitenden Kontrollexperimenten war bei DMSO-Konzentrationen von bis zu 3% nach mehr als 20 Stunden Inkubation kein Einfluss auf die Vitalität der Protoplasten festzustellen (Abb. B15, C). Es wurde bereits anderswo berichtet, dass Arabidopsis Protoplasten bis zu 48 Stunden ohne Vitalitätsverlust in Lösung gehalten werden können (Sheen 2001; Asai *et al.*, 2000). Es war davon auszugehen, dass die Polarisation der PM auf einen physiologischen Ursprung zurückzuführen war und nicht durch DMSO oder andere verwendete Substanzen in den Medien herbeigeführt wurde.

Die Umverteilung PM-ständiger Lipide konnte in weiteren kombinierten Färbungen mit LRB-PE und BD-SM C₁₂ (Abb. B12), sowie anhand von FRAP-Experimenten (Anhang B.I.3) belegt werden. Dabei stellte sich heraus, dass Lipide der BD-SM C₁₂ markierten Phase eine langsamere Fluoreszenzrückkehr zeigten als Lipide der FM4-64 markierten Phase (Abb. B13). *In vitro* Daten an künstlich hergestellten Membranen belegen, dass zunehmende Steroleinlagerungen eine Abnahme der Diffusionskoeffizienten bewirken (Filippov *et al.*, 2004). In FRAP-Versuchen an künstlich hergestellten GUV's („*giant unilamellar vesicles*“; dt.: große unilamellare Vesikel) konnte über SPT-Messungen („*single particle tracking*“) mit Goldpartikeln gezeigt werden, dass eine Zunahme der Cholesterinkonzentration auf bis zu 50% des Gesamt-Lipidanteils zu einer bis zu 2-fachen Reduktion der Diffusionskoeffizienten führt (Ladha *et al.*, 1996). Bei gegebener Temperatur wird [D] stark beeinflusst durch Bewegungen benachbarter Lipide und hängt zudem vom Beobachtungszeitraum ab. In l_d-Phasen von Modellmembranen wurden bei sehr kurzen Beobachtungszeiträumen im Nanosekundenbereich große Diffusionskoeffizienten von 10⁻⁶cm²/s gemessen. Diese nahmen auf 10⁻⁷cm²/s bis auf 10⁻⁸cm²/s ab, sobald längere Beobachtungszeiträume gewählt wurden (Apajalahti *et al.*, 2010; Niemela *et al.*, 2007). Bei einem [D] von 10⁻⁷cm²/s würde ein einzelnes Lipid innerhalb eines Zeitraums von 1µs eine laterale Distanz von 6nm zurücklegen. Die in dieser Arbeit angewandte FRAP-Technik zur Bestimmung der lateralen Diffusionskoeffizienten einzelner Lipidphasen in Protoplasten hingegen konnte eine solch hohe Zeit- und Längenauflösung nicht erbringen. Zum einen ist die Auflösung dieser auf optischen Systemen basierende Technik limitiert durch die Lichtbeugung, zum anderen durch die relativ langsame Fluoreszenzdetektion über einen Linienscanner. Daher sind die

akquirierten FRAP-Daten aus Protoplasten nicht direkt mit Daten aus Computersimulationen zu vergleichen, die die Diffusion von Lipiden in Modellmembranen widerspiegeln (Apajalahti *et al.*, 2010). Dennoch lassen sich mit Hilfe der FRAP-Technik Lipid-Diffusionskoeffizienten bestimmen. In reinen l_d -Phasen, bestehend aus Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC), wurde ein $[D]$ von $7,5 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ bei 35°C gemessen. $[D]$ nahm auf $6,0 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ ab, sobald die Temperatur auf 26°C fiel. Wurde dem System Cholesterol zugegeben, bildete sich die l_o -Phase aus. Bei einer Temperatur von 35°C lag $[D]$ nun bei $3,0 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ in der l_o -Phase und hatte bei einer Temperatur von 26°C auf $1,8 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ abgenommen (Almeida *et al.*, 2005).

Der Diffusionskoeffizient $[D]$ der Lipide des BD-SM C_{12} gefärbten Pols errechnete sich zu $8,01 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$, der des FM4-64 gefärbten Pols zu $0,084 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Dem zufolge können sich FM4-64 markierte Lipide mehr als zehn Mal so schnell in der PM bewegen wie BD-SM C_{12} markierte Lipide. Dies wurde auch aus der Berechnung der mobilen (F_m) bzw. der immobilen Fraktion (F_i) der Lipide in den polarisierten Bereichen deutlich (siehe 2.8.3). Während die Lipide des FM4-64 markierten Pols eine mobile Fraktion von 0,985 aufwiesen ($F_i=0,015$), wiesen die Lipide des BD-SM C_{12} gefärbten Pols eine mobile Fraktion von 0,186 auf (F_i errechnete sich entsprechend zu 0,814). Anhand dieser Unterschiede wurde ersichtlich, dass es sich in den polarisierten Bereichen der PM um verschiedene Lipidphasen handeln musste. Die FRAP-Messungen an Protoplasten wurden bei Temperaturen zwischen 22°C und 24°C durchgeführt und sind diesbezüglich mit entsprechenden FRAP-Messungen an Modellmembranen vergleichbar. Betrachtet man die nackten Zahlen, so liegen die Diffusionskoeffizienten in Protoplasten um zwei bis drei Zehnerpotenzen niedriger als die in artifiziell hergestellten Membranen. Da physiologisch aktive Plasmamembranen aus einer Vielzahl an unterschiedlichen Phospholipiden, Sterolen und Sphingolipiden bestehen, wird deren Lipidkomposition niemals über die alleinige Herstellung von Modellmembranen zu generieren sein. Daher sind Vergleiche der Werte der Diffusionskoeffizienten zwischen lebenden und artifiziellen Systemen nicht sehr aussagekräftig. Dennoch können solche Vergleiche als Referenz dienen um Tendenzen von Lipidphasen zu bestimmen, wie beispielsweise der Reduktion von $[D]$ durch eine zunehmende Einlagerung von Sterolen. In tierischen Zelllinien wurde für Phosphoethanolamin, ein Lipid der l_d -Phase, ein $[D]$ von $(5 \pm 2) \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ gemessen, wohingegen $[D]$ für einen Teil der Sphingomyelin-Portion um das 1,5- bis 2,5-fache geringer lag. Der andere, weitaus größere Teil der Sphingomyeline zeigte hingegen eine mehr als 10-fach langsamere Diffusion in lebenden Zellen (Eggeling *et al.*, 2009). In Protoplasten bewegten sich Lipide der BD-SM C_{12} markierte Phase ebenfalls um ein

Zehnfaches langsamer als die der FM4-64 markierten Phase. Die Resultate aus den FRAP-Versuchen bekräftigten die Vermutung, dass BD-SM C₁₂ dazu herangezogen werden kann, geordnete Lipidphasen in pflanzlichen Plasmamembranen zu markieren.

Laurdan Färbungen bestätigten eine Polarisierung (Abb. B14). Die zeitabhängige Umverteilung von Lipiden wurde durch Berechnungen des Ordnungsgrades der Lipide belegt, den GP-Wert (Abb. B14, P). Ein GP-Wert von -1 zeugt von einer wässrigen Phase, während ein GP-Wert von +1 von einer reinen Sterolphase zeugt (Dietrich *et al.*, 2001; Parasassi *et al.*, 1997). In Abb. B14 (E) bewegten sich die GP-Werte frisch isolierter Protoplasten zwischen -0,2 und 0,2. Experimentell hängen diese Werte von der Lipidkomposition und von der Temperatur ab. In der flüssigen Phase von Modellmembranen bewegten sich die GP-Werte zwischen -0,3 und 0,3; in Sterol-reichen L_o-Phasen typischerweise zwischen 0,5-0,6 (Sanchez *et al.*, 2007). In künstlich hergestellten Liposomen mit gleichem molekularem Verhältnis an Phosphatidylcholin, Cholesterin und Sphingomyelin rangierten die GP-Werte von L_d-Phasen zwischen -0,05 und 0,25; die von L_o-Phasen zwischen 0,25 und 0,55 (Gaus *et al.*, 2003). Die GP-Werte lebender Zellen sind dabei nicht immer direkt mit denen aus artifiziellen Systemen vergleichbar. Allerdings können sie dazu herangezogen werden, um Unterschiede in der Fluidität der Plasmamembran zu detektieren (Gaus *et al.*, 2003).

Innerhalb von 15 Stunden nach dem Zellwandverdau zeigten Arabidopsis Protoplasten eine Redistribution PM-ständiger Lipide (Abb. B14, F-H). Gemäß den spektralen Eigenschaften von Laurdan war in den verschiedenen Regionen der PM ein unterschiedlicher Wassergehalt auszumachen; laterale PM-Bereiche wiesen GP-Werte zwischen 0,6 und 0,8 auf und indizierten einen geringen Hydratationsgrad (Abb. B14, J; Pfeile). Nach 20 Stunden war die Polarisierung weiter fortgeschritten (K-M, gleiche Abb.). Für einen weiten PM-Bereich auf der basalen Seite wurden nun GP-Werte von bis zu 0,8 ermittelt (Abb. B14, O). In Tabak Protoplasten wurden bei Temperaturen unter 20°C GP-Werte von mehr als 0,55 festgestellt. Wurde diese Temperatur überschritten, stellten sich GP-Werte zwischen 0,25 und 0,55 ein (Roche *et al.*, 2008). Die Laurdan Experimente wurden ebenfalls bei Temperaturen unter 20°C durchgeführt und indizierten die Existenz von Lipidphasen ähnlich hoher Ordnung in Arabidopsis.

Eine zeitabhängige Polarisierung in Protoplasten konnte durch Färbeexperimente (Anhang B.I.2), FRAP-Versuche (Anhang B.I.3), sowie durch Laurdan-basierte Messungen des Hydratationsgrades der Lipide (Anhang B.I.4) bestätigt werden. Der physiologische Ursprung der Polarisierung bleibt unklar. Experimente an *Ceratodon purpureus* Protoplasten (purpurstielziges Hornzahnmoos) brachten zu Tage, dass die Zellen wenige Stunden nach dem

Verdau der Zellwand damit begannen, diese durch Ausbildung von Filamenten zu regenerieren. Hierzu werden zelluläre Bestandteile umverteilt und eine Regenerationsachse ausgebildet. Die Regenerationsachse ordnet sich dabei in Richtung des einfallenden Lichtes an und die Protoplasten zeigen asymmetrisches Wachstum nach 15-48 Stunden (Cove *et al.*, 1996). Innerhalb eines Zeitraums von bis zu 24 Stunden nach Verdau der Zellwand waren in *Arabidopsis* Protoplasten keinerlei Asymmetrien feststellbar (Abb. B9; B10; B12; B14, F-O). *Nicotiana tabacum* Protoplasten zeigen ebenfalls Zellwandregeneration; hier regeneriert die Zellwand nach 6 bis 16 Stunden, abhängig von verwendeter Isolationsmethode. Einhergehend mit der Zellwandregeneration kam es in Tabak Protoplasten zu transienten Kalloseablagerungen. Diese erfolgten quer zur Protoplastenachse und die Ablagerungen waren nahe der PM lokalisiert (van Amstel und Kengen, 1996). Um die Zellulosemikrofibrillen in passender Textur anzuordnen muss eine koordinierte, geordnete Deposition erfolgen. Dies geschieht über transmembrane Zellulosesynthase-Komplexe, die direkt mit dem Zytoskelett in Verbindung stehen. Einige Komponenten dieser Komplexe sind in Sterol-reichen Bereichen der PM angesiedelt. So wurde für Chitin- und β -D-Glykan-Synthasen in Zellwand-bildenden Oomyzeten eine Resistenz gegenüber dem Detergens Triton X-100 nachgewiesen, wie sie auch tierische *Lipid Raft*-Proteine zeigen (Briolay *et al.*, 2009).

Möglicherweise findet in *Arabidopsis* Protoplasten eine Umverteilung der Lipide statt um Prozesse zu initiieren, die der Zellwandregeneration dienen. In den Kulturmedien generierter *A. thaliana* Protoplasten befanden sich bedingt durch den Isolationsprozess (vgl. 2.12, Tab. 10) mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit noch aktive Zellulasen und Pektolyasen. In Versuchen an Protoplasten der Ackerwinde *Convolvus arvensis* wurde nachgewiesen, dass die Fähigkeit eine Zellwand auszubilden in Anwesenheit proteolytischer Enzyme stark eingeschränkt war (Horine und Ruesink, 1972). Dies könnte erklären, dass innerhalb der Beobachtungszeiträume von bis zu 24 Stunden keine Zellwandregenerationen zu detektieren waren (Abb. B9; B10; B12; B14, F-O).

III. Resümee

Das Wissen bezüglich des Verhaltens von Lipiden in Membranen beruht zum Großteil auf Experimenten an artifiziellen Systemen, von denen man die exakte Lipidzusammensetzung kennt. Die Lipidkomposition physiologisch aktiver Plasmamembranen hingegen variiert und das Verhalten der Lipide physiologischer Membranen ist nicht bis ins Detail verstanden. Gegenstand aktueller Forschung ist es, Zusammenhänge zwischen der Komposition und dem Verhalten von Lipiden zu verstehen. Lipophile Fluoreszenzfarbstoffe und Lipidanaloga könnten dabei helfen, das generierte Wissen aus Modellmembranen auf funktionelle Membranen zu übertragen. Alle hier präsentierten Fluoreszenzfärbungen wurden für pflanzliche Zellen maßgeschneidert, da existente Protokolle für tierische Zelltypen konzipiert wurden. Deren Lipidzusammensetzung weicht stark von der pflanzlichen ab, was eine direkte Anwendung dieser Protokolle nicht gestattete. Innerhalb der letzten Jahre rückte die Erforschung von Lipidkomponenten pflanzlicher Plasmamembranen verstärkt in den Fokus, da hier kompartimentierte Membranbereiche und geordnete Lipidphasen zu existieren scheinen, wie sie bereits aus dem Tierreich bekannt sind.

Die in dieser Studie unter Verwendung der Farbstoffe FM4-64, LRB-PE, DiIC₁₂, DiIC₁₈, DiD, BD-SM C₁₂ und Laurdan erhobenen Daten liefern Indizien für die Existenz geordneter Lipidphasen in pflanzlichen Plasmamembranen. In Arabidopsis Protoplasten schienen innerhalb eines Zeitrahmens von 15 bis 20 Stunden nach dem Verdau der Zellwand Lipid-Umverteilungen in der PM stattzufinden, die vermutlich zelluläre Bestrebungen darstellten, initiale Prozesse der Zellwandregeneration einzuleiten. Es sind weitere Experimente nötig, um das Phänomen der Membranpolarisation näher zu erforschen.

Die für pflanzliche Zellen maßgeschneiderten *in vivo* Färbeprotokolle für Fluoreszenzfarbstoffe und Lipidanaloga ermöglichen es, Studien hinsichtlich der Lipidzusammensetzung und der Lipiddynamik von pflanzlichen Plasmamembranen unter Einsatz der konfokalen *Laser Scanning*-Mikroskopie und verwandter Techniken in Echtzeit durchzuführen.

9. Eidesstattliche Erklärung

(gemäß §4 Abs. 3 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Universität Würzburg)

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die Dissertation in allen Teilen selbstständig angefertigt habe. Dabei habe ich weder einen Promotionsberater zu Rate gezogen, noch habe ich andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Vorliegende Dissertation wurde bisher weder vollständig noch in Teilen einer anderen Hochschule oder in einem anderen Prüfungsfach vorgelegt mit dem Ziel, einen akademischen Grad zu erwerben.

Am 29. Juni 2006 wurde mir von der Universität Würzburg der akademische Grad „Diplom-Biologe Univ.“ verliehen. Weitere akademische Grade habe ich weder erworben noch zu erwerben versucht.

Würzburg, im März 2012

Jörg O. Blachutzik

10. Curriculum Vitae

Persönliche Angaben

Name	Jörg O. Blachutzik
Geburtstag	9. März 1978
Geburtsort	Werneck
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch
E-Mail	blachutzik.joerg@arcor.de

Akademische Ausbildung

PhD	05/2007 – 06/2010	<p>Julius-von-Sachs-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik (Universität Würzburg); <i>in Kollaboration mit dem</i> Rudolf-Virchow-Zentrum für experimentelle Biomedizin (BioImaging-Center, Universität Würzburg)</p> <p>Thema: Visualisierung von Plasmamembran-Domänen <i>in Arabidopsis thaliana</i> (Studying of lipid raft formation and size, dynamics in lipid rafts and interacting molecules within the rafts)</p> <p>Gutachter: Prof. Dr. Rainer Hedrich Prof. Dr. Gregory S. Harms; Dr. Ines Kreuzer</p>
Diplom	06/2006	<p>Julius-von-Sachs-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik (Universität Würzburg)</p> <p>Thema: Vergleichende Analyse von Kaliumkanälen der Pappel</p> <p>Studium: 04/1999 - 03/2006</p> <p>Gutachter: Prof. Dr. Rainer Hedrich</p> <p>Hauptfach: Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik</p> <p>Nebenfächer: Genetik, Physiologische Chemie</p>

Schulische Ausbildung

Abitur	Juni 1997	Franken-Landschulheim Schloß Gaibach
--------	-----------	--------------------------------------

11. Publikationen

Jörg O. Blachutzik; Fatih Demir; Ines Kreuzer; Rainer Hedrich; Gregory S. Harms: „Visualization of putative liquid (dis-)ordered domains with fluorescent dyes and lipid analogues *in planta*: evidence for lipid polarization in Arabidopsis protoplasts.”
Submitted to Plant Methods.

Fatih Demir; Jörg O. Blachutzik; Sönke Scherzer; Dietmar Geiger; Yvonne Reinders; Gregory S. Harms; Rainer Hedrich; Ines Kreuzer: „Arabidopsis plasma membrane nanodomain-delimited ABA phosphatase/kinase signalling regulates the anion channel SLAH3.”
In preparation.