Die Funktion einer E3 Ubiquitin-Ligase in der Bildung von Membran-Membran-Kontaktflächen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Biologie

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Tim Lienemann

Hamburg, 20.09.2024

Vorsitzender der Prüfungskommission:	PD Dr. Hartwig Lüthen
1. Gutachter:	Prof. Dr. Stefan Hoth
2. Gutachter:	Prof. Dr. Julia Kehr
Datum der Disputation:	24.01.2025

"Nur wenn ich die Bedürfnisse meiner Mitmenschen kenne, kann ich sie motivieren"

Vera F. Birkenbihl

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1 Die pflanzliche Immunantwort	1
1.1.1 Pflanzliche Verteidigungsmechanismen	2
1.1.2 Auslösen einer systemischen Immunantwort	
1.1.3 Pattern- und effector-triggered immunity	5
1.2 Lipidabhängige Membraneigenschaften und Vesikeltransport	
1.2.1 Vesikel in Pflanzen	9
1.2.2 Exocytose und Endocytose	
1.2.3 Funktionen von Vesikeln in pflanzlichen Zellen	
1.2.4 Multivesikuläre Körperchen	
1.3 Phosphatidylinositole und ihre Funktion in Pflanzen	
1.4 Die SENESZENZ-ASSOZIIERTE E3-UBIQUITIN-LIGASE 1 (SAUL1)	
1.5 Zielsetzung	
2. Material und Methoden	
2.1 Geräte	
2.2 Software	
2.3 Dienstleistungen	
2.4 Pflanzliches Material	
2.5 Mikroorganismen	
2.6 Antikörper	
2.7 Vektoren und Genkonstrukte	
2.7.1 Genkonstrukte für die SAUL1-Effektor-Interaktionsexperimente	
2.7.2 Genkonstrukte zur Identifizierung der SAUL1-Membranaffinität	
2.7.3 Genkonstrukte zur Untersuchung von SAUL1-Membranflecken	
2.7.4 Genkonstrukte für die Expression rekombinanter SAUL1-Proteine	
2.8 Primer	
2.8.1 Primer zur Generation der Hefe-2-Hybrid Genkonstrukte	
2.8.2 Primer zur Herstellung verkürzter SAUL1 Genkonstrukte	
2.8.3 Primer zum Einbringen von Punktmutationen in SAUL1	
2.8.4 Primer zur Herstellung von rekombinanten Expressions-Konstrukten	

2.9 Herstellung von Genkonstrukten	30
2.9.1 pDONR™221_ <i>SAUL1</i> und pDONR™223_ <i>SAUL1</i> Konstrukte	30
2.9.2 Zielgerichtete Mutagenese zum Einbringen von Punktmutationen	30
2.9.3 Herstellung von DNA-Konstrukten in pMDC- und pEG-Vektoren	30
2.9.4 pENTR™-D/TOPO_ <i>SAUL1</i> und pDEST22_ <i>SAUL1</i> Konstrukte	31
2.9.5 Herstellung von pGEX_6P_1_SAUL1 _{R736A}	31
2.10 Anzuchtmedien	31
2.11 Antibiotika	32
2.12 Methoden zur Arbeit mit Pflanzen	32
2.12.1 Anzucht von Arabidopsis thaliana	32
2.12.2 Extraktion und Transformation von A. thaliana Mesophyllprotoplasten	33
2.12.2.1 PAMP-Behandlung zur Induktion von biotischem Stress	34
2.12.2.2 Erniedrigung der Umgebungstemperatur	34
2.12.2.3 Anfärbung von Membranen mit dem Styrillfarbstoff FM4-64	35
2.12.3 Infiltration von N. benthamiana mit A. tumefaciens	35
2.12.4 Stabile Transformation von A. thaliana durch A. tumefaciens	36
2.12.5 BASTA [®] -Selektion von transformierten A. thaliana Keimlingen	36
2.12.6 Hygromycin B Selektion von transformierten A. thaliana Keimlingen	37
2.13 Molekularbiologische Methoden	37
2.13.1 Extraktion genomischer DNA aus A. thaliana	37
2.13.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	38
2.13.3 Polymerasekettenreaktionen (PCR)	38
2.13.3.1 Phusion™ DNA-Polymerase Reaktion zur Gen-Amplifikation	38
2.13.3.2 SDM-PCR zum Einbringen von Punktmutationen	39
2.13.3.3 Kolonie-PCR und PCR zur Genotypisierung von A. thaliana	39
2.13.4 Klonierungsstrategien	40
2.13.4.1 Gateway [®] Klonierung	40
2.13.4.2 Restriktions-Ligations-Klonierung	42
2.13.5 Agarosegelelektrophorese von DNA	43
2.13.6 Aufreinigung von Nukleinsäuren und Plasmiden aus Agarosegelen	43
2.13.7 Plasmidminipräparation	44
2.13.8 Plasmidmidipräparation	44

2.13.9 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	44
2.13.10 Herstellung elektrokompetenter A. tumefaciens Zellen	45
2.13.11 Transformationsmethoden	45
2.13.11.1 Hitzeschock-Transformation von <i>E. coli</i>	45
2.13.11.2 Elektroporation von A. tumefaciens	45
2.13.11.3 Transformation von S. cerevisiae	46
2.13.12 Hefe-2-Hybrid-Effektor Interaktionsexperimente	47
2.13.13 Herstellung von Glycerindauerkulturen	47
2.13.14 Sequenzierung	47
2.13.15 In silico Sequenzanalyse und Primerdesign	48
2.14 Proteinbiochemische Methoden	48
2.14.1 Expression von rekombinanten Proteinen in <i>E. coli</i>	48
2.14.2 Aufreinigung von rekombinanten Proteinen	48
2.14.3 Proteindetektionsmethoden	49
2.14.3.1 Denaturierende Polyacrylamidgelektrophorese (SDS-PAGE)	49
2.14.3.2 Colloidale Coomassie G-250 Färbung	50
2.14.3.3 Westernblotting	50
2.14.3.4 Protein-Lipid-Overlay Assay	51
2.14.3.5 CD-Spektroskopie	52
2.15 Bildgebende Methoden	52
2.15.1 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie	52
2.15.2 Transmissionselektronenmikroskopie	53
3. Ergebnisse	54
3.1 SAUL1 interagiert nicht mit pathogen-assoziierten Effektoren	54
3.2 SAUL1s Eigenschaften und Verhalten an der Plasmamembran	57
3.2.1 SAUL1 benötigt eine intakte ARM ₇₋₁₁ Domäne zur Membranassoziation	57
3.2.2 N-terminale Modifikationen am SAUL1-Protein führen zur Bildung von	
Membranflecken	60
3.2.3 Die positiv geladene Region um R736 ist essentiell die	
SAUL1-Membranfleckenbildung	64
3.2.4 Die SAUL1-Membranfleckenbildung benötigt eine geladene Aminosäure an	
Position 736	69

3.2.5 Der Bereich um R736 bedingt die SAUL1-Plasmamembranaffinität	73
3.2.6 SAUL1-Membranflecken treten nur selten in intakten A. thaliana Gewebe auf	75
3.2.7 Stressstimuli induzieren die Bildung von SAUL1-Membranflecken	77
3.2.7.1 PAMPs haben einen Einfluss auf die Bildung von SAUL1-Membranflecken	78
3.2.7.2 Temperaturen unter 20 °C können die Bildung von SAUL1-Membranflecken	
beeinflussen	80
3.2.7.3 Die SAUL1-Membranfleckenbildung wurde durch die Protoplastierung erhö	nt . 82
3.2.8 GFP-SAUL1 Membranflecken können auch in Mutantenlinien mit Verbindung z	um
saul1-1 Phänotyp gebildet werden	84
3.2.9 GFP-SAUL1 Membranflecken verdrängen andere membranständige Proteine	86
3.2.10 SAUL1-Membranflecken sind dynamische Strukturen an der Plasmamembran	89
3.3 Die SAUL1-Überexpression kann zu einer konzentrationsabhängigen Vesikelbildun	g
führen	91
3.3.1 SAUL-bedingte Vesikel werden auch in planta gebildet	96
3.3.2 Punktmutiertes SAUL1 bildet in <i>N. benthamiana</i> vermehrt Vesikel	98
3.4 Lokalisation von punkmutierten YFP-SAUL1 Fusionsproteinen in transgenen	
<i>A. thaliana</i> Pflanzen	100
3.4.1 Eine N-terminale YFP-Fusion beeinträchtigt die SAUL1-Funktion in A. thaliana	102
3.4.1 Eine N-terminale YFP-Fusion beeinträchtigt die SAUL1-Funktion in <i>A. thaliana</i> 3.4.2 Punktmutiertes SAUL1 ist funktionsfähig und kann den <i>saul1-1</i> Phänotyp	102
 3.4.1 Eine N-terminale YFP-Fusion beeinträchtigt die SAUL1-Funktion in A. thaliana 3.4.2 Punktmutiertes SAUL1 ist funktionsfähig und kann den saul1-1 Phänotyp überwiegend aufheben 	102 104
 3.4.1 Eine N-terminale YFP-Fusion beeinträchtigt die SAUL1-Funktion in A. thaliana 3.4.2 Punktmutiertes SAUL1 ist funktionsfähig und kann den saul1-1 Phänotyp überwiegend aufheben 3.5 Analyse der Proteineigenschaften von rekombinantem GST-SAUL1 	102 104 107
 3.4.1 Eine N-terminale YFP-Fusion beeinträchtigt die SAUL1-Funktion in <i>A. thaliana</i> 3.4.2 Punktmutiertes SAUL1 ist funktionsfähig und kann den <i>saul1-1</i> Phänotyp überwiegend aufheben 3.5 Analyse der Proteineigenschaften von rekombinantem GST-SAUL1 3.5.1 Expression von rekombinantem punktmutierten GST-SAUL1 	102 104 107 107
 3.4.1 Eine N-terminale YFP-Fusion beeinträchtigt die SAUL1-Funktion in <i>A. thaliana</i> 3.4.2 Punktmutiertes SAUL1 ist funktionsfähig und kann den <i>saul1-1</i> Phänotyp überwiegend aufheben	102 104 107 107 110
 3.4.1 Eine N-terminale YFP-Fusion beeinträchtigt die SAUL1-Funktion in <i>A. thaliana</i> 3.4.2 Punktmutiertes SAUL1 ist funktionsfähig und kann den <i>saul1-1</i> Phänotyp überwiegend aufheben	102 104 107 107 110 112
 3.4.1 Eine N-terminale YFP-Fusion beeinträchtigt die SAUL1-Funktion in <i>A. thaliana</i> 3.4.2 Punktmutiertes SAUL1 ist funktionsfähig und kann den <i>saul1-1</i> Phänotyp überwiegend aufheben	102 104 107 107 110 112
 3.4.1 Eine N-terminale YFP-Fusion beeinträchtigt die SAUL1-Funktion in <i>A. thaliana</i> 3.4.2 Punktmutiertes SAUL1 ist funktionsfähig und kann den <i>saul1-1</i> Phänotyp überwiegend aufheben	102 104 107 107 110 112 115
 3.4.1 Eine N-terminale YFP-Fusion beeinträchtigt die SAUL1-Funktion in <i>A. thaliana</i> 3.4.2 Punktmutiertes SAUL1 ist funktionsfähig und kann den <i>saul1-1</i> Phänotyp überwiegend aufheben	102 104 107 107 110 112 115 118
 3.4.1 Eine N-terminale YFP-Fusion beeinträchtigt die SAUL1-Funktion in <i>A. thaliana</i> 3.4.2 Punktmutiertes SAUL1 ist funktionsfähig und kann den <i>saul1-1</i> Phänotyp überwiegend aufheben	102 104 107 107 110 112 115 118 118
 3.4.1 Eine N-terminale YFP-Fusion beeinträchtigt die SAUL1-Funktion in <i>A. thaliana</i> 3.4.2 Punktmutiertes SAUL1 ist funktionsfähig und kann den <i>saul1-1</i> Phänotyp überwiegend aufheben	102 104 107 107 110 112 115 118
 3.4.1 Eine N-terminale YFP-Fusion beeinträchtigt die SAUL1-Funktion in <i>A. thaliana</i> 3.4.2 Punktmutiertes SAUL1 ist funktionsfähig und kann den <i>saul1-1</i> Phänotyp überwiegend aufheben	102 104 107 107 110 112 115 118 118
 3.4.1 Eine N-terminale YFP-Fusion beeinträchtigt die SAUL1-Funktion in <i>A. thaliana</i> 3.4.2 Punktmutiertes SAUL1 ist funktionsfähig und kann den <i>saul1-1</i> Phänotyp überwiegend aufheben	102 104 107 107 110 112 115 118 118 121 124

4.2.3 Bei SAUL1-Membranflecken könnte es sich um Biokondensate handeln
4.2.4 Das Arginin R736 ist essentiell für die Lokalisation von SAUL1 und der
Membranfleckenbildung133
4.2.4.1 Rekombinates SAUL1 und SAUL1 _{R736A} sind strukturidentisch
4.2.4.2 Punktmutiertes SAUL1 $_{R736K}$ und SAUL1 $_{R736E}$ konnten Membranflecken bilden 134
4.3 Die Bildung von SAUL1-Membranflecken benötigt einen Stimulus 136
4.3.1 Ein biotischer Stimulus induzierte die Bildung von SAUL1-Membranflecken
4.3.2 Temperaturen unter 25 °C scheinen einen Einfluss auf die Bildung von
SAUL1-Membranflecken zu haben138
4.3.3 Ein enzymatischer Verdau der Zellwand induziert die Bildung von
SAUL1-Membranflecken140
4.4 SAUL1-Membranflecken scheinen einen Bezug zur Exocytose zu haben
4.4.1 Eine hohe Expressionsmenge von SAUL1 führt zur Bildung von Vesikeln
4.4.2 Die Fähigkeit zur Membranfleckenbildung scheint keine Voraussetzung für die
Vesikelbildung zu sein146
4.5 Punktmutiertes SAUL1 hebt den <i>saul1-1</i> Autoimmunphänotyp auf
4.5.1 Modifikationen am N-Terminus von SAUL1 beeinflussen die Entwicklung von
A. thaliana148
4.5.2 Lokalisation von punktmutierten SAUL1-Fusionsproteinen in A. thaliana
4.5.3 SAUL1-Membranflecken treten nur selten in Pflanzen auf
4.5.4 In Schließzellen ist die Bildung von SAUL1-Membranflecken begünstigt 155
4.5.5 SAUL1-bedingte Vesikel treten <i>in planta</i> auf156
4.5.6 In N. benthamiana wurde eine verstärkte SAUL1 Vesikelbildung beobachtet 157
4.6 Rekombinantes GST-SAUL1 und GST-SAUL1 _{R736A} binden verschiedene
Membranlipide157
5. Zusammenfassung
Abstract
6. Literaturverzeichnis
7. Anhang
8. Danksagung
9. Eidesstattliche Versicherung

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
хg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
2YT	2x Hefe und Trypton Medium
3-AT	3-Amino-1,2,4-Triazol
A	Alanin
Abb.	Abbildung
ABI1	ABA INSENSITIVE 1
ACA	AUTOINHIBITED CA ²⁺ -ATPASE
ACK6	ARABIDOPSIS CASEIN KINASE 1-LIKE 6
AD	Aktivierungsdomäne
ALD	AGD2-LIKE DEFENSIVE RESPONSIVE PROTEIN 1
AGD7	ARF-GAP DOMAIN 7
AP2	ADAPTOR PROTEIN 2
ARA7	ARABIDOPSIS RAB GTPASE HOMOLOG F2B
ARF	ADP riboylation factor
ARM	armadillo-like-repeats
A. thaliana	Arabidospsis thaliana
AtFH2	Arabidopsis thaliana FORMIN 2
ATL	ARABIDOPSIS TOXICUS EN LEVADURA
att	attachement
A. tumefaciens	Agrobacterium tumefaciens
Avr	avirulence
BAK1	BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1
BBS	BARDET-BIEDL SYNDROME
bp	Basenpaare
BD	Bindedomäne
BON1	BONZAI 1
BR	Brassinosteroid
BRI1	BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1
BSA	bovine serum albumin
BUC	BUCKY BALL
CAMTA3	CALMODULIN-BINDING TRANSCRIPTION ACTIVATOR 3
CaMV	cauliflower mosaic virus
CASP	cdk5 and abl enzyme substrate protein
CC	coiled coil
ccdB	control of cell death B
CD	Circulardichroismus
CDS	kodierende Sequenz
CERK1	CHITIN ELICITOR RECEPTOR KINASE 1

CHS1	CHILLING-SENSITIVE 1
CNGA2	CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED 2
СРК	CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE
CPR1	CONSTITUTIVE EXPRESSOR OF PR1 GENES
CPS	conventional protein secretion
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COI1	CORONATINE INSENSITIVE 1
Co-IP	Kooperative Immunopräzipitation
Col-0	Columbia-0
CTR1	CONSTITUTIVE TRIPLE RESPSONE
CUE	Clathrin-unabhängige Endocytose
CV	Säulenvolumen
CVE	Clathrin-vermittelte Endocytose
CVV	clathrin-coated vesicles
DAMP	damage associated molecular pattern
DNA	Desoxyribulosenukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosid triphosphat
DUB	Deubiquitinierendes Enzym
E	Glutaminsäure
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin-Ligase
E. coli	Escherichia coli
EDS1	ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1
EE	early endosomes
EFR	EF-TU RECEPTOR
ELF3	EARLY FLOWERING 3
ELKS	ELKS-reiches Protein
EGP2	ECTOPIC P GRANULES PROTEIN 2
EPS1	EPSIN 1
ER	endoplasmatischen Retikulum
ESCRT	ENDOSOMAL SORTING COMPLEXES REQUIRED FOR TRANSPORT
et al.	et alii
ETI	effector-triggered-immunity
EF-Tu	elongation factor thermos unstable
ETS	effector-triggered-susceptibility
EV	extrazelluläre Vesikel
EXO70	EXOCYST SUBUNIT 70
F. graminearum	Fusarium graminearum
flg22	flagellin-peptide 22
FLOT1	FLOTILLIN 1
FLS2	FLAGELLIN-SENSITIVE 2

FMO1	FLAVIN-DEPENDENT-MONOOXYGENASE 1
FUS	FUSED IN SARCOMA
FYVE	Fab1p, YOTB, Vac1p and EEA1
g	Gramm
GAP	GTPase-activating protein
gDNA	genomische Desoxynukleinsäure
GEF	guanin nucleotide exchange factor
GFP	green fluorescent protein
GPC	Größenausschlusschromatographie
GSL	GLUCAN SYNTHASE-LIKE
GST	GLUTATHION-S-TRANSFERASE
Н	Histidin
HECT	homologous to the E6-AP carboxyl terminus
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HOPS	HOMOTYPIC FUSION AND PROTEIN SORTING
HR	hypersensitive reaction
H. arabidopsidis	Hyaloperonospora arabidopsidis
ILV	Intralumenale Vesikel
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactosid
JA	Jasmonsäure
JAZ	JASMONATE ZIM DOMAIN
К	Lysin
kDa	Kilodalton
KEG	KEEP ON GOING
KIN5b	KINESIN5b
KLSM	konfokale Laser Scanning Mikroskopie
L	Leucin
L	Liter
LB	lysogeny broth
LD	lipid droplet
LIPA	LIPID DROPLET PLASMA MEMBRANE ADAPTOR
LLPS	Flüssig-Flüssig-Phasentrennung, liquid-liquid-phase separation
LPLC	low pressure liquid chromatography
LRR	leucin-rich repeat
Μ	Molar
mA	Milliampere
mAU	milli-absorbance unit
mg	Milligramm
Min	Minute
MIN7	HOPM INTERACTOR 7
mL	Milliliter

MLO	MILDEW LOCUS O
mM	Millimolar
МРК	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE
MVB	multi-vesicular bodies
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μm	Mikromolar
UPL	UBIQUITIN-PROTEIN LIGASE 1
NDR1	NON-RACE SPECIFIC DISEASE RESISTANCE 1
ng	Nanogramm
NHR	non-host resistance
N. benthamiana	Nicotiana benthamiana
NBS	nucleotide-binding site
NHP	N-Hydroxy-Pipecolinsäure
NHR	non-host resistance
NLR	nod-like receptor
nm	Nanometer
O ₂	Sauerstoff
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PA	Phosphatidsäure
PAB	POLYADENYLATE-BINDING PROTEIN
PAD4	PHYTOALEXINE DEFICIENT 4
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PBS	Phosphate buffered saline
P. capsici	Phytophtora capsici
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PdBG	PLASMODESMATA-LOCATED β-1,3-GLUCANASE ENZYME
PepT1	Peptidtransporter 1
PGL	GUANYL-SPECIFIC RIBONUCLEASE
рН	pondus hydrogenii
РН	pleckstrin homology
Ptdin	Phosphatidylinositol
PI4K	PHOSPHATIDYLINOSITOL 4-KINASEN
Рір	Pipecolinsäure
PLD	PHOSPHOLIPASE D
PM	Plasmamembran
PR1	PATHOGENESIS-RELATED GENE 1
PRR	pattern recognition receptor
PS	Phosphatidylserin
P. syringae	Pseudomonas syringae
РТІ	pattern-triggered immunity

PTM	post-translationale Modifikationen
Pto	Pseudomonas syringae pv. tomato
PUB	PLANT U-BOX PROTEIN
PX Domäne	phagocyte oxidase homology domain
Q	Glutamin
R	Arginin
RABF2a	RAS-RELATED PROTEIN 2a
Raf-1	Raf-like kinase 1
RBOHD	RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOGUE D
R-Gen	Resistenz-Gen
R-Proteine	resistance Proteine
RIM	RAB3-INTERACTING MOLECULE
RIM-BP	RIM BINDING PROTEIN
RIN4	RPM1 INTERACTING PROTEIN 4
RING	REALLY INTERESTING NEW GENE
RLP	receptor-like protein
rpm	rounds per minute
RPM1	RESISTANCE TO PSEUDOMONAS SYRINGAE PV. MACULICOLA 1
RPS2	RESISTANCE TO PSEUDOMONAS SYRINGAE 2
RPT2	RESISTANCE TO PSEUDOMONAS SYRINGAE PV. TOMATO 2
RT	Raumtemperatur
RTNLB	RETICULAN LIKE PROTEIN B
SA	Salicylsäure
SAG101	SENESCENE ASSOCIATED GENE 101
SAND1	Sp100, AIRE-1, NucP41/75, DEAF-1 1
SAR	systemic-acquired-resistance
SARD4	SAR-DEFICIENT 4
SAUL1	SENESZENZ-ASSOZIIERTE E3 UBIQUITIN-LIGASE 1
S. cerevisiae	Saccharomyces cerevisiae
SEPA-1	SUPPRESSOR OF ECTOPIC P GRANULES IN AUTOPHAGY 1
SDM	site-directed mutagenesis
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEC-SAXS	size exclusion small-angle-X-ray scattering
SLDP	SEED LD PROTEIN
SNAP	SOLUBLE N-ETHYLMALEIMIDE-SENSITIVE FACTOR ADAPTOR PROTEIN
SNARE	SOLUBLE N-ETHYLMALEIMIDE-SENSITIVE FACTOR ADAPTOR RECEPTOR
SNC1	SUPPRESSOR OF NPR1-1 CONSTITUTIVE
SOC3	SUPPRESSION OF CHILLING-SENSITIVE 1-3
Tab.	Tabelle
TBS	Tris buffered saline
TBS-T	Tris buffered saline + Tween
тс	Tocopherol

Tdrd6a	Tudor domain containing 6a
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TGF-α	HUMAN TRANSFORMING GROWTH FACTOR-A
TIR	toll-interleukin-receptor
TGN	Trans-Golgi Netzwerk
TMV	Tabakmosaikvirus
TN2	TIR-NBS 2
UBC	UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME
UPS	unconvetional protein secretion
UV	Ultraviolett
VAC8P	VACUOLE-SPECIFIC MYO2P RECEPTOR
vgl.	vergleiche
VPS	VACUOLAR PROTEIN SORTING
W	Tryptophan
WT	Wildtyp
Y2H	Hefe-2-Hybrid
YFP	yellow fluorescent protein
YPDA	yeast peptone dextrose adenine media

1. Einleitung

Als sessile Organismen sind Pflanzen an ihren Standort gebunden und benötigen ein präzises Anpassungssystem, um auf die kontinuierlich wechselnden Umweltbindungen sowie auf abiotischen und biotischen Stress zu reagieren. Abiotische Umweltfaktoren, wie Temperatur, Nährstoff- und Wasserverfügbarkeit beeinflussen die Entwicklung und das Wachstum der Pflanze. Biotischer Stress hingegen entsteht aus Interaktionen mit Herbivoren oder Krankheitserregern, die sowohl direkte Schäden verurasachen als auch schwere Pflanzenkrankheiten hervorrufen können. Die Pathogene können dabei eine biotrophe, hemibiotrophe oder nekrotrophe Lebensweise besitzen. Biotrophe Knöllchenbakterien (Rhizobium spec.) gehen beispielsweise eine Symbiose mit Fabaceae ein, um Kohlenhydrate im Austausch gegen Stickstoff zu erhalten. Der Arabidopsis thaliana (A. thaliana) besiedelnde Oomycet Hyaloperonospora arabidopsidis (H. arabidopsidis) lebt hemibiotroph und löst keine Nekrosen aus (Mims et al. 2014, Coates und Beynon 2010). Im Gegensatz dazu verursachen nekrotrophe Pathogene durch das Lysieren von Zellen Nekrosen im infizierten Pflanzengewebe. Bekannte Vertreter sind Phytophtora infestans, welcher die Kartoffelfäule auslöst und Pseudomonas syringae (P. syringae), dessen unterschiedliche Pathovare diverse Nutzpflanzen befallen und jährlich zu großen Verlusten in der Landwirtschaft führen (Hok et al. 2010, Lindeberg et al. 2012). Da Pflanzen Infektionen nicht ausweichen können, müssen sie einen Kompromiss zwischen Wachstum und Verteidigung eingehen, da beide Prozesse einen großen Energiebedarf aufweisen.

1.1 Die pflanzliche Immunantwort

Im Vergleich zu Säugetieren besitzen Pflanzen kein adaptives, sondern nur ein angeborenes Immunsystem, die so genannte *non-host resistance* (NHR), welche eine effektive Resilienz gegen eine Vielzahl von Pathogenen bietet (Jones und Dangl 2006). Zu Beginn einer Infektion müssen Pathogene die Cuticula auf der pflanzlichen Oberfläche überwinden. Diese besteht aus der namensgebenden wachsartigen Substanz Cutin und der cellulosesreichen pflanzlichen Zellwand, die zusammen eine physikalische Schutzschicht bilden. Pathogene können diese Barriere entweder durchdringen oder über Öffnungen wie Stomata und Wunden umgehen (Liu *et al.* 2009, Hok *et al.* 2010, Ziv *et al.* 2018). Pilzhyphen bilden hierfür Appressorien aus, die mit einem Enzymcocktail aus cutinolytischen Enzymen die physikalische Barriere schwächen, um die Cuticula und Epidermis mit einem punktuellen hohen Druck zu durchdringen (Kubicek *et al.* 2014, Hou *et al.* 2019). Anschließend durchwachsen Infektionshyphen apoplastisch das Mesophyllgewebe im Blatt und bilden Haustorien aus oder lysieren Zellen, um Nährstoffe zu erhalten (Mims *et al.* 2004, Coates *et al.* 2010).

Bakterien hingegen sind nicht in der Lage, die Cuticula zu durchdringen und gelangen über Öffnungen wie Verletzungen oder Stomata in die Pflanze (Hok *et al.* 2010, Gimenez-Ibanez *et al.* 2016). Aus diesem Grund ist die Regulation der Stomata für die Immunantwort von entscheidender Bedeutung. Beispielsweise hemmt das Protein RPM1 INTERACTING PROTEIN 4 (RIN4) die autoinhibierende C-terminale H⁺-ATPase Domäne, wodurch das Wasserpotential innerhalb den Schließzellen sinkt und deren Schließung zur Verteidigung bewirkt (Liu *et al.* 2009, Wilton *et al.* 2010). Um den Stomataschluss zu verhindern und eine erfolgreiche Infektion zu ermöglichen, überträgt *P. syringae* das Toxin Coronatin, welches die bioaktive Jasmonsäure JA-Isoleucin imitiert und von den F-Box Proteinen CORONATINE INSENSITIVE 1 (COI1) und JASMONATE ZIM DOMAIN (JAZ) erkannt wird (Xie *et al.* 1998, Grant *et al.* 2006, Melotto *et al.* 2006, Sheard *et al.* 2010). Bei einer erfolgreichen Infektion verfügen Pflanzen über eine Vielzahl spezifischer Rezeptorsysteme zur Erkennung von Pathogenen und können vielseitige Verteidigungsmechanismen induzieren (Jones und Dangl 2006).

1.1.1 Pflanzliche Verteidigungsmechanismen

Die aus Cellulose und Hemicellulose bestehende pflanzliche Zellwand kann während einer Infektion durch die Einlagerung von Callose sowie weiteren Metaboliten verdickt und verstärkt werden, um die Verbreitung von Pathogenen zu verhindern (Gómez-Gómez 1999, Zhang *et al.* 2007, Bacete *et al.* 2018, Rui *et al.* 2020, Gigli-Bisceglia *et al.* 2020). Callose wird als totipotentes Material beim Wundverschluss, der Organbildung, aber besonders auch bei der Regulation von Plasmodesmata benötigt (Rinne *et al.* 2011, Maule *et al.* 2012, Xu *et al.* 2017). Durch das Verschließen der Plasmodesmata wird der interzelluläre Transport zwar eingeschränkt, jedoch auch die symplastische Verbreitung eines Pathogens effektiv verhindert (Faulkner *et al.* 2013, Cheval *et al.* 2020). Die apoplastische Verbreitung wird hiervon nicht beeinflusst, sodass spezifische Mechanismen, wie das Sezernieren von Metaboliten in den Extrazellularraum, initiiert werden. Hierfür werden cytotoxische Moleküle wie Wasserstoffperoxid (H₂O₂) oder lytische Enzyme in den Apoplasten freigesetzt, wo sie oft von Pathogenen über extrazelluläre Vesikel aufgenommen werden, was zu einer Selbstvergiftung des Pathogens führt (Xu *et al.* 2017, Baille *et al.* 2020, Prinz *et al.* 2020, Rossini *et al.* 2020).

Innerhalb der pflanzlichen Zelle wird die Pathogenabwehr über molekulare posttranslationalen Modifikation von Mechanismen der Proteinen (PTM), wie Phosphorylierung oder Dephosphorylierung von Seitenketten, reguliert (Kulikov et al. 2005, Yang et al. 2006, Zhou und Zeng 2017). Weitere Modifikationsmöglichkeiten umfassen die Myristoylierung oder die Ubiquitinierung. Bei der Ubiquitinierung wird Ubiquitin an das Zielprotein ligiert, um dessen Aktivität oder intrazelluläre Lokalisation zu beeinflussen oder es zum Abbau im 26S-Proteasom zu markieren (Vierstra 2009, Truillo 2018). Die Ubiquitinierung erfolgt unter ATP-Verbrauch, wobei Ubiquitin an das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) gebunden wird, welches dieses an das Ubiquitin-konjugierende Enzym (E2) überträgt (Sigismund et al. 2004, Ikeda und Dikic 2008, Vierstra 2009). Das Ubiquitin-beladene E2-Enzym assoziiert anschließend mit einer Ubiquitin-Ligase (E3), um das Ubiquitin auf das Zielsubstrat zu transferieren (Schulmann und Harper 2009, Ye und Rape 2009). Hierbei gibt es zwei Prozesse, wie das Ubiquitin an das Substrat gebunden werden kann. Zum einem können über eine RING- oder U-box Domäne einer Ubiquitin-Ligase das Ubiquitin-beladene E2-Enzym und das Substrat zusammengeführt werden, sodass das Ubiquitin vom E2-Enzym direkt auf einen Lysinrest des Substrats übertragen werden kann (Berndsen und Wollberger 2014). Zum anderen können HECT-Typ Ubiquitin-Ligasen das Ubiquitin vom E2-Enzym übernehmen, welches an die HECT-Domäne des E3-Enzyms gebunden und von dort auf das Zielsubstrat übertragen wird (Berndsen und Wollberger 2014). Je nach Art der Ubiquitinierung können unterschiedliche Funktionen induziert werden. Beispielsweise führt eine Ubiquitinierung über Lys48 zum Abbau des Zielproteins im 26S-Proteasom, während eine Ubiquitinierung über Lys63 die Endocytose bewirken kann (Clague und Urbe 2010). Dazu kommen die Deubiquitinasen (Deubiquitinating enzymes, DUBs), welche die Ubiquitin-Ligasen deubiquitinieren und somit die Ubiquitinierungsreaktionen präzise regulieren und Ubiquitin regenerieren können (Reyes-Turco et al. 2009, Callis 2014).

1.1.2 Auslösen einer systemischen Immunantwort

Während eines lokalen Pathogenbefalls können noch uninfizierte Teile der Pflanze durch den Langstreckentransport molekularer Signale auf eine bevorstehende Infektion vorbereitet werden. Dieser Prozess wird als systemic acquired resistance (SAR) bezeichnet. Er umfasst die Induktion der Produktion von Salicylsäure (SA), Pipecolinsäure (Pip), Jasmonsäure (JA) und Brassinosteroiden induziert, welche eine basale Immunantwort im gesamten Organismus ermöglichen (Conrath et al. 2006, Jones und Dangl 2006, Pieterse und Dicke 2007, Boutrot et al. 2010, Fu und Dong 2013, Couto und Zipfel 2016, Yu et al. 2017, Petra et al. 2021). Die Langstrecken-Signalweiterleitung erfolgt durch SA sowie Pip und insbesondere deren Derivat N-Hydroxy-Pipecolinsäure (NHP), die zusätzlich antimikrobiell wirken (Návarová et al. 2012, Zeier 2013, Hartmann et al. 2018, Lim et al. 2020, Shine et al. 2022). Durch eine NHP-Behandlung wurde sowohl in den behandelten als auch in entfernten Blättern eine Akkumulation von extrazellulärem NAD(P), welches für eine systemische Immunität erforderlich ist, beobachtet (Li et al. 2023). Während einer Infektion akkumuliert SA im infizierten Gewebe schneller und in höherer Konzentration als Pip und NHP, was eine direkte Immunantwort gegen das Pathogen induziert. In entfernten Blättern hingegen erfolgt zuerst eine Akkumulation von NHP, die zu einer verstärkten Produktion von SA führt. Somit ist NHP früher vorhanden, was die systemische Biosynthese von SA induziert und eine erfolgreiche SAR garantiert (Hartmann et al. 2018, Hartmann und Zeier 2019).

Durch die SAR wird die Expression spezifischer Gene induziert, deren Genprodukte die Resistenz der Pflanze gegenüber Krankheitserregern verstärken. Ein Beispiel hierfür ist die Biosynthese von NHP, die bei biotischem Stress hochreguliert wird und über AGD2-LIKE DEFENSIVE RESPONSIVE PROTEIN 1 (ALD1), SAR-DEFICIENT 4 (SARD4) und FLAVIN-DEPENDENT-MONOOXYGENASE 1 (FMO1) vermittelt wird (Jones und Dangl 2006, Zeier 2021). Dabei wurde gezeigt, dass eine exogene Behandlung mit Pip ebenfalls zur SAR führte und die behandelten Pflanzen resistenter gegenüber *P. syringae* waren (Bernsdorff 2016, Hartmann und Zeier 2018). Hierfür sind die Biosynthese und Wahrnehmung von SA sowie die SA-Signalweiterleitung von großer Bedeutung. Eine Beeinträchtigung dieser Prozesse macht die betroffenen Pflanzen anfälliger gegenüber Infektionen, während hohe SA-Level die Resistenz signifikant verbessern (Wu *et al.* 2012, Fu und Dong 2013, Torrens-Spence *et al.* 2019). SA kann die SAR jedoch nur zusammen mit Pip, NHP und JA auslösen (Chanda *et al.* 2011, Lim *et al.* 2020, Shields *et al.* 2022). Trotz der Effizienz der NHR-bedingten Verteidigung gegenüber Krankheitserregern wird eine weitere durch Resistenz-Gene (R-Gene) ausgelöste Immunantwort benötigt (Singh *et al.* 2013, Piquerez *et al.* 2014).

1.1.3 Pattern- und effector-triggered immunity

Pathogen-assozierte molekulare Strukturen (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs) sind Bestandteil der bakteriellen Zellwand oder auf dieser lokalisiert. Dazu gehören das Peptid flg22 vom bakteriellen Flagellum, 1,3-β-Glucan der bakteriellen Zellwand, der prokaryotische Elongationsfaktor EF-Tu oder das Chitin der pilzlichen Zellwand (Nimchuk, 2003, Boller und Felix 2009). PAMPs werden von spezialisierten *pattern recognition receptors* (PRRs) erkannt und lösen eine Signalkaskade aus, die zur ersten moderaten Immunantwort führt (Jones und Dangl 2006). Eine gut untersuchte Ligand-Rezeptor-Kombination ist das membranständige FLAGELLIN-SENSITIVE 2 (FLS2) und das Peptid flg22. Nach der Bindung von Flagellin wird FLS2 internalisiert entweder an der Plasmamembran wiederverwertet oder in der Vakuole abgebaut (Robatzek *et al.* 2006, Choi *et al.* 2013, Couto und Zipfel 2016, Yu *et al.* 2017). FLS2 bildet nach der Bindung von flg22 mit der BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE (BAK1) einen Immunrezeptorkomplex und induziert eine Signalkaskade über BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 (BRI1). Diese Signalkaskade führt zur Expression von Immunantwort-relevanten Genen und zur Auslöung der *pattern-triggered immunity* (PTI) (Jones und Dangl 2006, Chinchilla *et al.* 2007, Boller und Felix 2009).

Zusätzlich zu PAMPs induzieren auch *damage associated molecular pattern* (DAMPs) wie Xyloglucan, Methanol, Peptide und Proteine, extrazelluläre Nukleotide sowie Abbauprodukte von Cutin und Cellulose die PTI (Kubicek *et al.* 2014, Ziv *et al.* 2018, Hou *et al.* 2019). Um eine einheitliche Immunantwort zu gewährleisten, werden die DAMP- und PAMP-Signale häufig über BAK1 als Korezeptor integriert (Tang *et al.* 2015, Yasuda *et al.* 2017). Die schnelle Reaktion von der Detektion eines Pathogens bis zur PTI wurde am FLS2/BAK1-Komplex gezeigt. Innerhalb von zwei Minuten nach einer flg22-Behandlung bildete sich dieser Komplex und induzierte mehr als 1100 Gene in *A. thaliana*, darunter 28 Gene für *leucin-rich repeat* (LRR)-Kinasen und 56 Gene für *receptor-like proteins* (RLP) (Jones und Dangl 2006, Chichilla *et al.* 2007).

Pathogene können die moderate PTI über Effektoren hemmen, welche meist über das Typ-3-Sekretionssystem in die Zelle eingeschleust werden (Zaharik et al. 2002, Alfano et al. 2004). H. arabidopsidis benötigt beispielsweise für eine erfolgreiche Infektion ein Repertoire von mindestens 130 unterschiedlichen RLXR-Effektoren (Slusarenko et al. 2003, Coates et al. 2010). Im molekulargenetisch hergestellten Pseudomonas-Stamm Pst DC3000, welcher nur die 30 für eine Infektion essentiellen Effektoren trägt, konnte die Wirkweise einzelner Effektoren untersucht werden (Schechter et al. 2006). Die Pseudomonas-Effektoren AvrPto, PtoA, PtoB und PtoAB inhibieren PRRs wie EFR, FLS2, BAK1 und CERK1, wodurch die PAMP-Wahrnehmung sowie die darauffolgende Signalkaskade inhibiert werden und die PTI zum Erliegen kommt (Guo et al. 2009, Block und Alfano 2011, Collmer et al. 2012). AvrRpt2, AvrRpm1 und AvrB1 hingegen induzieren RIN4 und verhindern den Stomataschluss (Fonseca et al. 2009, Collmer et al. 2012, Gimenez-Ibanez et al. 2016). HopM1 inhibiert beispielsweise AtMIN7, welches für die Bildung von Vesikeln und deren Transport benötigt wird. Dabei können Effektoren die Wirtsproteine durch PTMs wie Dephosphorylierung oder Ubiquitinierung beeinflussen (Howden und Huitema 2012, Lindenberg et al. 2012). Diese effector-triggered susceptibility (ETS) schwächt die pflanzliche Immunantwort, sodass das Pathogen weitere Teile der Pflanze infizieren kann (Nimchuck et al. 2003, Alfano und Collmer 2004, Schechter et al. 2006, Ntoukakis et al. 2009).

Die Effektoren können von *resistance* (R)-Proteinen innerhalb der Zelle erkannt werden, was die stärkere *effector-triggered immunity* (ETI) auslöst (Jones und Dangl 2006, Bent und Mackey 2007). Dabei ist die Familie der *nucleotide binding site-leucine-rich repeat* (NBS-LRR)-Proteine in der pflanzlichen und tierischen Immunantwort am häufigsten vertreten (Dangl und Jones 2001, Martin *et al.* 2003, Strober *et al.* 2006). Um deren Spezifizität zu verbessern, besitzen R-Proteine zusätzliche Domänen wie die *toll-interleukin-recpetor-like* (TIR)-Domäne in SUPRESSOR OF NPR1-1 CONSTITUTIVE (SNC1) oder die *coiled coil* (CC)-Domäne in RESISTANCE TO PSEUDOMONAS SYRINGAE 2(RPS2. SNC1 und RPS2 bilden einen Rezeptorkomplex, der für die Regulation von *constitutive expressor of PR1* genes (CPR1) benötigt wird (Cheng *et al.* 2011, Gou *et al.* 2012).

6



Abbildung 1: Schematischer Ablauf der pflanzlichen Immunantwort (in Anlehnung an Jones und Dangl, 2006). Pathogene besitzen *pathogen associated molecular pattern* (PAMP), welche von *pattern recognition receptor* (PRR, blau) erkannt werden und eine Signalkaskade auslösen. Dies führt zur Expression von Immunantwort-relevanten Genen und zur Induktion der erste Immunantwort, der *pattern triggered immunity* (PTI). Pathogene schwächen diese Reaktion durch das Einschleusen von von Effektoren (rot) über ein Typ-3-Sekretionssystem, was zu einer *effector-triggered susceptibility* (ETS) führt und ihnen ermöglicht, sich zu vermehren. R-Proteine (grün) erkennen die Effektoren und eine zweite stärkere Immunantwort, die *effector triggered immunity* (ETI), wird ausgelöst.

R-Proteine erkennen Effektoren gemäß der Gen-für-Gen Theorie, wobei jedes R-Protein spezifisch einen bestimmten Effektor erkennt und dadurch die Immunantwort weiter vorantreibt (Martin et al. 2003, Nimchuk et al. 2003). Die R-Proteine können Effektoren direkt oder indirekt erkennen. Im direkten Interaktionsmodell interagiert das R-Protein direkt mit dem Effektor und induziert eine Signalkaskade, welche zur Expression von Immunantwort-relevanten Genen führt. Beim indirekten guard model fungieren die R-Proteine als quards, welche die Funtkiontalität und Integrität eines zu schützenden Proteins, dem guardee, überwachen. Wird der guardee durch einen Effektor strukturell verändert, wird dies vom guard erkannt, was die ETI initiiert (Grant et al. 2006). Im decoy model imitiert das R-Protein ein potentielles Zielprotein oder enthält bevorzugte Zieldomänen der Effektoren, wodurch es selbst zum Ziel wird und die ETI auslöst (Narusaka et al. 2009, Griebel et al. 2014, Williams et al. 2014). Im molekularen Wettrüsten zwischen Pathogen und Pflanze treten abwechselnd ETS und ETI auf, bis die Pflanze eine hypersensitive reaction (HR) auslöst, um das Pathogen durch induzierten Zelltod im infizierten Gewebe zu isolieren (Martin et al. 2003, Alfano und Collmer 2004). Die einzelnen Schritte der pflanzlichen Immunantwort nach einer Infektion sind in Abbildung 1 zusammengefasst.

1.2 Lipidabhängige Membraneigenschaften und Vesikeltransport

Die Doppellipidschicht der Plasmamembran besteht aus bipolaren Phospholipiden und wird bei Pflanzen von der Zellwand umgeben. Phospholipide besitzen einen hydrophilen Kopf mit einem negativ geladenen Phosphorsäurerest sowie eine hydrophobe Kohlenwasserstoffkette, wodurch das Innere der Plasmamembran hydrophobe und der Außenbereich im Cytoplasma und Apoplasten hydrophile Eigenschaften aufweist. Aufgrund der Membrankrümmung können die hydrophilen Phosphorsäurereste jedoch keinen lückenlosen Abschluss bilden, sodass hydrophobe Innenbereiche teilweise frei liegen (Leikin *et al.* 1996, Fuller und Rand 2001, Kooijman *et al.* 2003, Martens und McMahon 2008). Um die Bildung solcher Lücken durch die Membrankrümmung zu minimieren, besteht die Plasmamembran aus Phospholipiden unterschiedlicher Geometrien, wie zylindrischen, konischen oder revers-konischen Formen. Abbildung 2 zeigt die schematisch, wie verschiedene Phospholipidformen die Membrankrümmung beeinflussen (Joardar *et al.* 2022).



Abbildung 2: Darstellung von konisch, zylindrisch und revers-konischen Phospholipiden. Konische Phospholipide verursachen eine positive Membrankrümmung, während zylindrisch geformte keine Auswirkung haben. Revers-konische Phoshpholipide hingegen führen zu einer negativen Membrankrümmung.

Konisch Phospholipide Lysophosphatidylcholin, geformte wie Oleinsäure und Lysophophatidinsäure bewirken eine positive Krümmung der Membran, während das zylindrische Phosphatidylcholin keinen Einfluss auf die Membrankrümmung. Hingegen tragen Revers-konische Phospholipide wie Cholesterol, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidsäure zu einer negativen Membrankrümmung bei (Joardar et al. 2022). Aufgrund dieser Eigenschaften der Plasmamembran wird der Transmembrantransport von geladenen oder polaren Teilchen erschwert, weshalb spezialisierte Transportproteine wie Kanäle und Carrier oder Mechanismen wie die Endo- und Exocytose von Vesikeln benötigt werden (Viotti *et al.* 2010, Uemura 2016, Liang *et al.* 2019). Die Lipidzusammensetzung der Membran spielt dabei eine entscheidende Rolle, indem sie entweder die Bindung von Transportproteine begünstigt oder die Vesikelbildung erleichtert (Kooijman *et al.* 2003, Martens und McMahon 2008). Abbildung 3 zeigt mechanistische Beispiele der Vesikelbildung an der Membran (Chabanon *et al.* 2017).



Abbildung 3: Mechanismen der Vesikelbildung. (A) Generelle Vesikelbildung, (B) Lipid Asymmetrie, (C) *Scaffolding*, (D) *Crowding*, (E) Oligomerisation, (F) Hydrophobe Insertion

1.2.1 Vesikel in Pflanzen

Vesikel besitzen ebenfalls eine Doppellipidschicht und transportieren eine Vielzahl von Molekülen, wie Proteine, Lipide, Polysaccharide, Zellwandkomponente sowie Metabolite zur Pathogenabwehr an spezifische Zielorte. Ein Beispiel hierfür ist der Transport von Membranproteinen, wie FLS2, die im endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und über das Trans-Golgi Netzwerk (TGN) zur Plasmamembran transportiert werden. Dieser Transportprozess von FLS2 wird durch die Proteine RETICULAN LIKE PROTEIN B1 (RTNLB1) und RTNLB2 reguliert (Lee *et al.* 2011). Zusätzlich bildet EPSIN 1 (EPS1) Clathrin-bedingte Vesikel am TGN und unterstützt somit den Transport von PRRs, wie FLS2, zur Plasmamembran (Couto und Zipfel 2016, Trempel *et al.* 2016, Yu *et al.* 2017). In *eps1* Mutanten ist die Menge an PRRs in der Plasmamembran reduziert, wodurch bakterielles Flagellin schlechter erkannt wird und die Pflanzen anfälliger für Infektionen sind (Collins *et al.* 2020).

1.2.2 Exocytose und Endocytose

Die Exocytose ermöglicht den Transport von intrazellulärem Material in den Apoplasten (Kanazawa und Ueda 2017) und lässt sich in zwei Haupttypen unterteilen: Die conventional protein secretion (CPS) und die unconvetional protein secretion (UPS). Während die CPS neu synthetisierte Proteine vom ER über das TGN zur Plasmamembran oder in den extrazellulären Raum, steht die UPS in Zusammenhang mit abiotischem und biotischem Stress und tansportiert leaderless secretory oder signal peptid-containing Proteine (Wang et al. 2016, Cabanillas et al. 2018). Während einer Infektion kann eine UPS durch multi-vesicular body (MVB) ausgelöst werden, die Exosomen mit Zellwandkomponenten und antimikrobiellen Stoffen in infizierte Papillae sezernieren (Nielsen und Thordal-Christensen 2013). In einem von SOLUBLE N-ETHYLMALEIMIDE-SENSITIVE FACTOR ADAPTOR PROTEIN 33 (SNAP33) und PATHOGENESIS RELATED 1 (PR1) induzierten Verteidigungsmechanismus, fusionieren sekretorische Vakuolen mit der Plasmamembran zur Abwehr von Infektionsstellen (Wick et al. 2003, Hatsugai et al. 2009). Exocytotische Prozesse während der pflanzlichen Immunantwort werden über SOLUBLE N-ETHYLMALEIMIDE-SENSITIVE FACTOR ADAPTOR RECEPTOR (SNARE)-Komplexe ermöglicht, von denen in A. thaliana 60 bekannt sind (Sanderfoot et al. 2000, Robatzek 2006). SNARE-Proteine vermitteln die Andockung von Vesikeln an die Zielmembran und fördern die notwendige Membranfusion für die Sekretion (Parlati et al. 2000, Wang et al. 2005). Vesikel, die am Golgi-Apparat gebildet wurden, können über den Exocyst-Komplex in den Apoplasten transportiert werden und dort ihre Funktion ausüben (Wang et al. 2016, Liang et al. 2019).

Endocytose hingegen ermöglicht den Import von Plasmamembranmaterial oder Apoplasteninhalt in die Zelle durch die Bildung von Endosomen, die sich ei vom *early* zum *late endosome* entwickeln (Fan *et al.* 2015, Liang *et al.* 2019, Goodman *et al.* 2020). Diese können durch den Clathrin-abhängigen Komplex mittels Einstülpung der Plasmamembran als Vesikel abgetrennt werden (Ohno *et al.* 1995, Bonifacino und Dell'Angelica 1999, Fan *et al.* 2015, Goodman *et al.* 2020). Die Clathrin-vermittelte Endocytose (CVE) findet häufig während bakterieller Infektionen statt, wobei das an der Plasmamembran lokalisierte FLS2 nach der Bindung von flg22 internalisiert und über den Ubiquitin-Proteasom-Degradationsweg abgebaut wird (Choi *et al.* 2013, Mbengue *et al.* 2016). Alternativ wird FLS2 über den Exocyst-Komplex wiederverwertet und zur Plasmamembran zurücktransportiert werden. Dies und die FLS2-Homöostase wird überwiegend durch die Untereinheiten EXOCYST SUBUNIT 70B1 (EXO70B1) und EXOCYST SUBUNIT 70B2 (EXO20B2) Untereinheiten reguliert (Wang *et al.* 2020).

Neben der Clatrhrin-vermittelten Endocytose existiert die Clathrin-unabhängigen Endocytose (CUE), die auf spezifische Membranmikrodomänen beruht, in denen FLOTILLIN 1 (FLOT1) angereichert ist oder durch ENDOSOMAL SORTING COMPLEXES REQUIRED FOR TRANSPORT (ESCRT)-Proteine unterstützt wird (Buono *et al.* 2016, Goodman *et al.* 2020). Dieser Clathrin-unabhängige Mechanismus findet auch bei der Exocytose statt. Die ESCRT-vermittelte endosomale Vesikelbildung wird primär über Ubiquitin reguliert, wobei ubiquitinierte Proteine in intraluminale Vesikel (ILV) transportiert werden, die sich in konzentrierten *budding profiles* ansammeln und ins Cytoplasma abgeschnürt werden (MacDonald *et al.* 2012, Schuh und Audhya 2014, Paez Valencia *et al.* 2016). Die Dynamik von Membranproteinen, wie der Arabidopsis NADPH-Oxidase RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOGUE D (RBOHD), wird sowohl von der CVE als auch durch Membranmikrodomänen reguliert (Hao *et al.* 2015). Zudem wird BRI durch exogene Brassinosteroide (BR) in Membranmikrodomänen durch FLOT1-vermitteltes CUE internalisiert (Wang *et al.* 2015).

1.2.3 Funktionen von Vesikeln in pflanzlichen Zellen

Der vesikuläre Transport von Proteinen wird häufig durch Ubiquitinierung reguliert, um den biosynthetisch-sekretorischen Weg zur Plasmamembran von dem endocytotischen Transport zur Vakuole zu unterschieden (Scita und Di Fiore 2010). Zu degradierende Proteine werden überwiegend über multivesikuläre Körperchen und dem ESCRT-Komplex transportiert (Isono *et al.* 2010, Kasai *et al.* 2011). In diesem Prozess fungieren das TGN und die *early endosomes* (EE) als zentrale Schaltstellen, die den Proteintransport zwischen Sekretion, vakuolärem Transport sowie Endo- und Exocytose steuern. Jeder dieser Transportwege nutzt spezifische Vesikel, die aufgrund ihrer charakterischen Zusammensetzung für definierte Transportwege ausgestattet sind (Viotti *et al.* 2010, Gendre *et al.* 2015, Uemura 2016). Sowohl die Lipid- als auch die Proteinzusammensetzung der Vesikel beeinflusst deren Dynamik an der Plasmamembran, wodurch die Signaltransduktion und -verarbeitung an der Zelloberfläche reguliert werden (Paez Valencia *et al.* 2016, Liang *et al.* 2019). So wird beispielsweise die Transportrate von FLS2 an der Plasmamembran reguliert, um bei einer Infektion eine rasche

Immunantwort zu ermöglichen (Trempel *et al.* 2016, Wang *et al.* 2017). Wie in Abschnitt 1.1.3 beschrieben, spielt der vesikuläre Transport eine zentrale Rolle in der pflanzlichen Immunantwort und wird von Pathogenen gezielt über verschiedene Mechanismen angegriffen. Der Pilz *Alternaria carthami* produziert das Toxin Brefeldin A, welches den retrogarden Proteintransport vom Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum induziert. Dadurch kommt es zu einer Protein-Akkumulation im ER, wodurch die Vesikelbildung am Golgi-Apparat gestört wird (Klausner *et al.* 1992, Driouich *et al.* 1997). Mehltaupilze manipulieren den Vesikeltransport des Wirts, um die Bildung von Haustorien zu fördern, indem sie die MILDEW LOCUS O (MLO)-Proteine des Wirts angreifen (Consonni *et al.* 2006). Der Effektor HopM1 von *P. syringae* dringt in das Endomembransystem der Pflanze ein und greift dort AtMIN7 an, welches für die Regulation der Vesikelbildung und den intrazellulären Transport benötigt wird und ebenfalls durch Brefeldin A gehemmt wird (Nomura *et al.* 2006).

1.2.4 Multivesikuläre Körperchen

Multivesikuläre Körperchen, im Folgenden als *multi-vesicular bodies* (MVBs) bezeichnet, transportieren Material zur Pathogenabwehr oder Zellwandsynthese zur Plasmamembran, wo sie über Proteine gebunden werden (Dettmer *et al.* 2006, Scheuring *et al.* 2011, Nielsen und Thordal-Christensen 2013, González Solís *et al.* 2022). Dabei entstehen Membran-Membran-Kontaktflächen, die in Interaktionsstudien durch die Bindung von lipid- und membranassoziierten Proteinen charakterisiert wurden (Colombo *et al.* 2014, Tao *et al.* 2019). Diese Protein-Protein-Interaktionen führten zur Bildung von Membranflecken, wodurch alle an der Plasmamembran lokalisierten Proteine verdrängt und eine potentielle Plattform für den Vesikeltransport gebildet wurde (Chiaruttini *et al.* 2015, Tao *et al.* 2019, Pfitzner *et al.* 2020). Abbildung 5 zeigt den schematischen Mechanismus einer proteinvermittelten Membran-Membran-Kontaktfläche (Martens und McMahon 2008).



Abbildung 5: Der Andockmechanismus zweier Membranen involviert periphere Membranproteine (pink) und integrale Membranproteine (blau), die ein Interaktionsgerüst bilden, um Membran-Membran-Kontaktflächen zu schaffen.

An der Plasmamembran werden Andockstellen für eine regulierte Bindung von Vesikeln benötigt, sodass der interzelluläre Transport initiiert werden kann (Parlati et al. 2000, Martens und McMahon 2008). SNARE- und Exocyst-Komplexe tragen hierbei eine entscheidende Rolle, indem sie in Hefe-, pflanzlichen und tierischen Zellen beispielsweise RAB GTPase-Kaskaden aktivieren, welche den Vesikeltransport steuern (Pang et al. 2022). In Pflanzen regulieren diese Komplexe Prozesse wie das Wurzelwachstum und die Kaliumhomöostase, während sie im tierischen System für die Bindung von Vesikeln in der Präsynapse und deren Transport in die Postsynapse verantwortlich sind (Ullah et al. 2021, Kusick et al. 2022, Luo et al. 2022, Pang et al. 2022). Ein für diese Arbeit relevanter Hinweis auf den Zusammenhang zwischen Membranflecken als potentielle Andockstellen für MVBs und der pflanzlichen Immunantwort wurde in einem Experiment mit fluoreszenzmarkiertem *Phytophtora capsici (P. capsici) in Nicotiana benthamiana (N. benthamiana) gezeigt werden.* In N. benthamiana Epidermiszellen, die mit einem YFP-SAUL1 Fusionsprotein transformiert wurden, konnte nach einer P. capsici Infektion eine verstärkte Bildung von YFP-SAUL1 Membranflecken im infizierten Gewebe beobachtet werden. Dies deutet möglicherweise auf eine spezifische Abwehrreaktion gegen P. capsici hin (Tao et al. 2019). SAUL1 ist eine plasmamembranständige Ubiquitin-Ligase, die das Potential besitzt, sich in Membranflecken anzusammeln (Drechsel et al. 2011, Knop et al. 2021). Im nekrotischen Gewebe nach der Infektion konnte jedoch kein YFP-SAUL1 Fluoreszenzsignal festgestellt werden, welches als Maß der Vesikelbildung und Immunantwort genutzt wurde. Im nicht infizierten Gewebe traten trotz intensiver Fluoreszenzsignale keine YFP-SAUL1 Membranflecken auf. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Membranflecken zur Bindung von Vesikeln mit Metaboliten zur

Pathogenabwehr an der Plasmamembran beitragen (Sanderfoot *et al.* 2000, Robatzek *et al.* 2006, Nielsen und Thordal-Christensen 2013, Erwig *et al.* 2017). Die Spezifizität der MVBs in der Immunantwort wird durch ihre Lipidzusammensetzung, insbesondere durch verschiedene Phosphatidylinositolen, bestimmt, welche eine besondere Familie von Phospholipiden in Organismen darstellen.

1.3 Phosphatidylinositole und ihre Funktion in Pflanzen

Die Plasmamembran kann durch Anpassungen der Lipidzusammensetzung während einer Infektion modifizert und gezielt zur Pathogenabwehr optimiert werden (Urbanus und Ott 2012, Barbosa et al. 2016, Cheval et al. 2020). In diesem Zusammenhang spielen Phosphatidylinositole (PtdIns) eine bedeteunde Rolle. Diese Phospholipide sind durch eine Verknüpfung ihres Inositolrings mit Diacylglycerol in der Lipidmembran verankert. Im Gegensatz zu anderen Phospholipiden können PtdIns an den Kohlenstoffatomen D-3, D-4 und D-5 des Inositolrings reversibel phosphoryliert werden. Diese Eigenschaft ermöglicht die Bildung von sieben verschiedenen Phosphorylierungs-Kombinationen, wobei PtdIns(4)P der am häufigsten vorkommende Vertreter ist und zur negativen Ladung der pflanzlichen Plasmamembran beiträgt (Sato et al. 2001, Simon et al. 2016). Spezifische Signale an der Plasmamembran entstehen durch das dynamische Zusammenspiel von Kinasen, Phosphatasen und Lipasen, welche die Phosphorylierung oder den Abbau der PtdIns regulieren. PtdIns sind ebenfalls in membranumschlossenen Organellen vorhanden, deren Lipidzusammensetzung sich jedoch von derjenigen der Plasmamembran unterscheidet (Sato et al. 2001, Balla 2013, Heilmann 2016). Für die Signaltransduktion und den Vesikeltransport zwischen verschiedenen Membranen benötigen Proteine das inositol lipid binding motif, welches Protein-Lipid- und Protein-Protein-Interaktionen ermöglicht (Balla 2005, Cho und Stahelin 2005). Beispielsweise interagiert die PX-Domäne spezifisch mit D-3 phosphorylierten PtdIns (PtdIns(3)P) und ist oft Bestandteil von Proteinen, die an der Proteinsortierung, dem vesikulären Transport und dem Phospholipid-Metabolismus beteiligt sind (Sato et al. 2001, Balla 2005).

Neben der PX-Domäne interagiert auch die *pleckstrin homology* (PH)-Domäne mit Phosphatidylinositolen und bevorzugt das D-4, D-5 diphosphorylierte PtdIns(4,5)P₂. Diese Domäne ist häufig in Kinasen wie den *guanin nucleotide exchange factors* (GEFs) und *GTPase-activating proteins* (GAPs) zu finden, welche den Transport von Lipiden, Proteinen und Phospholipasen regulieren (Cozier *et al.* 2004). Auch die FYVE-Domäne, vertreten durch Proteine wie Fab1p, YOTB, Vac1p und EEA1, interagiert mit PtdIns(3)P und ist in Proteinen der vakuolären Sortierung und der Endocytose zu finden (Stenmark und Assland 1999, Balla 2005). Die Interaktion zwischen den negativ geladenen Phospholipiden, wie PtdIns oder Phosphatidylsäure (PA), und positiv geladenen Proteinbereichen, die reich an Lysin (K) und Arginin (R) sind, fördert die spezifische Bindung von Proteinen an die Plasmamembran (Brzeska *et al.* 2010, Jaillais *et al.* 2011, Hammond und Balla 2015). Abbildung 4 stellt die ladungsabhängige Interaktion zwischen Plasmamembran und Proteinen sowie MVBs schematisch dar.



Abbildung 4: Elektrostatische Wechselwirkung der Plasmamembran (schwarz) zwischen positiv geladenen Proteinen oder MVBs.

Phosphatidylinositole wie PtdIns(3)P, PtdIns(3,5)P₂, PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P₂ regulieren den Membrantransport und das pflanzliche Wachstum. PtdIns(4,5)P₂ ist beispielsweise ein Schlüsselregulator in mehreren Phasen der Exocytose und aktiviert dabei Proteine des Exocyst- und SNARE-Komplexes (Antignani *et al.* 2015, Hirano *et al.* 2015, Hirano *et al.* 2017, Platre *et al.* 2018). Speziell interagiert PtdIns(4,5P)₂ mit der EXO70-Untereinheit an der Plasmamembran, wobei eine Störung dieser Interaktion zu Defekten im exocytotischen Transport führt. Auch im endocytotischen Transport ist PtdIns(4,5)P₂ ein zentrales Phospholipid, indem es die Bildung von *clathrin-coated vesicles* (CVV) durch den AP2-Adapter und weiteren akzessorischen Proteinen ermöglicht (Martin 2015). Diese Interaktionen zwischen Phosphatidylinositolen und Membranproteinen können zur Entstehung von Membran-Membran-Kontaktflächen führen, an denen sich Membranflecken bilden, die den vesikulären Transport beeinflussen (Tao *et al.* 2019).

1.4 Die SENESZENZ-ASSOZIIERTE E3 UBIQUITIN-LIGASE 1 (SAUL1)

Als Plasmamembran-assoziiertes Protein hat die SENESZENZ-ASSOZIIERTE E3 UBIQUITIN-LIGASE 1 (SAUL1) das Potential, eine Rolle bei der Integration von Membran-Membran-Kontaktflächen und der damit verbundenen interzellulären Signaltransduktion zu spielen. SAUL1 gehört zur Familie der Plant-U-box Proteine und trägt zur Proteinhomöostase sowie die Regulation zellulärer Funktionenen, wie der pflanzlichen Immunantwort, bei (Mudgil et al. 2004, Disch et al. 2016, Tong et al. 2017, Liang et al. 2019). Die namensgebende U-box Domäne am N-Terminus ermöglicht die Interaktion mit E2-Enzymen und trägt zur Multimerisierung von SAUL1 bei (Aravind und Koonin 2000, Pruneda et al. 2012, Knop et al. 2021). Auf die U-box folgen 11 armadillo-like-repeats (ARM-Domäne) und der C-Terminus, dem keine spezifische Domäne zugeordnet werden kann. Die ARM₁₋₆ Domäne dient möglicherweise Protein-Protein-Interaktionen und trägt ebenfalls zu der Multimerisierung von SAUL1 bei. Die darauffolgende ARM₇₋₁₁ Domäne ist für die Membranaffinität von SAUL1 relevant und ermöglicht die Assoziation mit der Plasmamembran (Mudgil et al. 2004, Drechsel et al. 2011, Vogelmann et al. 2014). Das verkürzte Fusionsprotein GFP-SAUL1_{DARM7-11} verlor seine Membranaffinität und zeigte eine cytoplasmatische Verteilung, während GFP-ARM₇₋₁₁ weiterhin an der Plasmamembran lokalisiert war, was die Relevanz der ARM₇₋₁₁ Domäne für die Membranaffinität von SAUL1 bestätigte (Drechsel et al. 2011).

In den letzten Jahren wurde SAUL1 als positiver Regulator der pflanzlichen Immunantwort identifiziert, dessen Homöostase gemäß dem *guard model* von zwei NLR-Komplexen überwacht wird. Dies führt dazu, dass sowohl die SAUL1-Überexpression als auch der *saul1-1 knock-out* Merkmale einer Autoimmunantwort zeigen, die durch ein reduziertes Wachstum und eine erhöhte Expression von Immunmarkergenen wie PATHOGENESIS RELATED 1 (PR1), ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1 (EDS1) und PHYTOALEXIN DEFICIENT 4 (PAD4) charakterisiert wird (Disch *et al.* 2016, Tong *et al.* 2017, Liang *et al.* 2019). Besonders *saul1-1* Pflanzen, welche kein funktionsfähiges SAUL1-Protein produzieren konnten, zeigten einen starken temperaturbedingten Autoimmunphänotyp bei Temperaturen unter 25 °C, der zu einem Wachstumsarrest und gelben Verfärbungen aller oberirdischen Organe führte (Disch *et al.* 2016). Interessanterweise unterliegen die Phänotypen der Überexpression und *knock-out* Mutante unterschiedlichen Signalwegen,

16

sodass auf eine zentrale regulative Rolle von SAUL1 geschlossen werden kann (Tong *et al.* 2017, Liang *et al.* 2019, Liang *et al.* 2020). Bei der Überexpression von *SAUL1* wurde die Autoimmunantwort durch einen NLR-Komplex aus TIR-NBS2 (TN2) und SUPPRESSOR OF CHILLING SENSITIVE 1 3 (SOC3) über den Exocyst-Signalweg induziert. Die Autoimmunantwort bei *saul1-1 knock-out* Pflanzen hingegen wird durch einen NLR-Komplex aus CHILLING SENSITIVE 1 (CHS1) und SOC3 ausgelöst, welcher die Expression von *EDS1* und *PAD4* induziert. Hierbei wird eine starke Immunantwort in Form der ETI ausgelöst, wodurch die ausgeprägten Symptome des Phänotyps entstehen. Scheinbar überwachen die NLR-Komplexe den Zustand von SAUL1 und lösen beim Auftreten einer gestörten Homöostase eine Immunantwort aus. (Tong *et al.* 2017, Liang *et al.* 2019).

Der saul1-1 Phänotyp zeigt sich erst nach 72 Stunden bei Temperaturen unter 25 °C und kann durch Temperaturen von über 25 °C in den der ersten 48 Stunden der Kältebehandlung verhindert werden. Danach ist die Erholung nicht mehr möglich und es kommt zur Ausprägung des Autoimmunphänotyps mit einer Akkumulation von Callose, wodurch die Zellwände verdickt und möglicherweise Plasmodesmata verschlossen werden (Hessler *et al.* 2021). Durch die eingeschränkte Zell-Zell-Kommunikation und den fehlenden Austausch des Cytoplasmas könnte die Schwere des Phänotyps erklärt werden, da beide Mechanismen als Reaktion auf Pathogenbefall auftreten und wohlmöglich in der HR enden (Jones und Dangl 2006, Maule *et al.* 2012).

Der *saul1-1* Phänotyp konnte durch die Komplementation mit *35S::SAUL1-GFP* aufgehoben werden, was somit die Bedeutung der E3-Ligase Funktion von SAUL1 für *A. thaliana* zeigte (Tong *et al.* 2017). Eine Komplementation mit SAUL1_{C29A} war nicht möglich, da der Austausch des Cysteins an Aminosäureposition 29 durch Alanin die Interaktion mit Ubiquitin-konjugierenden Enzymen verhindert. Durch die Beeinträchtigung der Proteinfunktion ist keine fuktionelle Wiederherstellung des Phänotyps möglich, sodass sogar Wildtyp-Pflanzen, die SAUL1_{C29A} exprimierten, einen *saul1-1* ähnlichen Phänotyp ausprägten (Tong *et al.* 2017). Durch *size exclusion small-angle-X-ray scattering* (SEC-SAXS) basierte Modellierung von SAUL1 konnte ein positiv geladener Bereich am Ende der ARM₇₋₁₁ Domäne identifiziert und auf die drei Arginine R736, R737 und R775 zurückgeführt werden. Besonders R736 hat eine essentielle Rolle für die Bildung von SAUL1-Membranflecken (Knop *et al.* 2021). GFP-SAUL1 war in 60% der untersuchten Protoplasten in Membranflecken an der Plasmamembran verteilt (Knop *et al.* 2021). Bei diesen Membranflecken handelt es sich

17

um Membran-Membran-Kontaktflächen, die von SAUL1 als potentielles Gerüst zusammengehalten werden (Tao *et al.* 2019). Wurde R736 durch ein ungeladenes Alanin ersetzt, konnten keine GFP-SAUL1_{R736A} Membranflecken mehr gebildet werden, wohingegen die Punktmutanten GFP-SAUL1_{R737A} und GFP-SAUL1_{R775A} keine signifikante Veränderung der Membranfleckenbildung aufwiesen (Knop *et al.* 2021). Die in *Tao et al.* (2019) gezeigte YFP-SAUL1 Membranfleckenbildung nach einer *P. capsici* Infektion in *N. benthamiana* weist darauf hin, dass SAUL1 ein großes Potential als Bindeglied der interzellulären Kommunikation und Verteidigung während des Pathogenbefalls besitzt.

1.5 Zielsetzung

Die an der Plasmamembran lokalisierte E3-Ubiquitin-Ligase SAUL1 spielt eine wichtige Rolle als positiver Regulator der pflanzlichen Immunantwort in *A. thaliana* und könnte auch an der interzellulären Signalübertragung beteiligt sein. Die Homöostase von SAUL1 wird von zwei unterschiedlichen Immunrezeptorkomplexen aus CHS1/SOC3 beziehungsweise TN2/SOC3 bewacht. Damit stellte sich die Frage, ob SAUL1 ein direktes Ziel für Pathogen-assoziierte Effektoren ist und ob durch solche Interaktionen eine Veränderung von SAUL1 hervorgerufen wird, die über die Aktivierung der Immunrezeptorkomplexe zu einer starken Immunantwort führt. Um dieser Fragestellung nachzugehen, sollten mittels des Hefe-2-Hybrid Systems mögliche Interaktionen zwischen SAUL1 und Effektoren der Pathogene *Pseuodomonas syringae* und *Hyaloperonospora arabidopsidis* untersucht werden.

Zellbiologische Studien haben gezeigt, dass SAUL1 über seine C-terminale ARM₇₋₁₁ Domäne, die eine positive Oberflächenladung aufweist, an der Plasmamembran lokalisiert ist. Wie genau SAUL1 an der Plasmamembran assoziiert ist, ist jedoch noch nicht bekannt. Um die Membranaffinität von SAUL1 genauer zu untersuchen, sollte die dafür relevante ARM₇₋₁₁ Domäne in ihre Teildomänen aufgeteilt und deren Affinität zur Plasmamembran bestimmt werden. In der ARM₇₋₁₁ Domäne befinden sich für das positive Ladungsprofil relevante Arginine, welche über elektrostatische Wechselwirkungen mit negativ geladenen Phospholipiden für die Membranaffinität von SAUL1 und seine Membranfleckenbildung verantwortlich sein könnten. Um diese Hypothese zu testen, sollten Punktmutationen und Verkürzungen an den spezifischen Aminosäurepositionen 736, 737 und 775 durchgeführt und die Membranaffinität der hergestellten modifizierten Proteine überprüft werden. Ein weiterer Aspekt der Untersuchung der Membranaffinität von SAUL1 und seiner punktmutierten Varianten war die Analyse der Protein-Lipid-Interaktion mit spezfischen Phospholipiden der Plasmamembran und Vesikel. Zu diesem Zweck sollten rekombinant exprimierte SAUL1-Proteine isoliert und in Protein-Lipid-Overlay Experimenten verwendet werden, um mögliche Unterschiede zwischen den nativen und punktmutierten SAUL1-Proteinen zu identifizieren. Mögliche Unterschiede könnten Hinweise auf den Mechanismus der Membranassoziation von SAUL1 liefern.

Das Phänomen der Membranfleckenbildung in Pflanzen ist im Vergleich zum tierischen System, wo es insbesondere beim Transport von Neurotransmittern in den Synapsen eine Rolle spielt, bislang wenig erforscht. Zur Charakterisierung der *in planta* Funktion der SAUL1-Membranflecken sollte in dieser Arbeit die Dynamik und Induzierbarkeit der Membranflecken sowie deren potentieller Zusammenhang mit dem vesikulären Transport in Pflanzenzellen unter Verwendung bildgebender Methoden untersucht werden. Darüber hinaus sollte die Bedeutung der Membranfleckenbildung für die gesamte Pflanze untersucht werden, um die Funktionalität von punktmutiertem SAUL1 in *A. thaliana* zu überprüfen.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte

- ÄKTA[™] pure 25L system (GE Healthcare, jetzt Cytiva, Chicago, USA)
- Bioruptor[®] Pico (Diagenode, Seraing, Belgium)
- Branson Sonifier[®] S250A/S450A Cell Disruptor (Emerson, Saint Louis, USA)
- ChemiDoc[™] Touch Imaging System (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
- Eporator (Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
- Epson Perfection V700 Photo Scanner (Epson Deutschland GmbH, Meerbusch, Deutschland)
- Extend Präzisionswaage (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)
- Fastblot Semi-Dry Blotter (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland)
- High Performance Zentrifuge Avanti J-E (Beckman Coulter, Brea, USA)
- Heraeus Fresco21 Microzentrifuge (Thermo Fisher Scientific GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- Heraeus HERAsafe[®] Sicherheitswerkbank (Thermo Fisher Scientific GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- Inkubator 1000 (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland)
- JB Nova Wasserbad (GRANT Instruments, Royston, UK)
- Klimaschrank Modell Select 41L (CLF Plant Climatics, Wertingen, Deutschland)
- LA 120S Präzisionswaage (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)
- Leica TCS SP8 konfokale Plattform (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland)
- Magnetrührer IKA REO (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland)
- Makro-Zoom Forschungsmikroskop MVX10 (Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg, Deutschland)
- Mikrozentrifuge 22R (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland)
- Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell Systems (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
- MSC-Advantage[™] Mikrobiologische Sicherheitswerkbank (Thermo Fisher Scientific GmbH, Darmstadt, Deutschland)

- Multitron Schüttler (Infors AG, Bottmingen, Schweiz)
- NanoDrop2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- Netzgerät Power Source 300 V (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- Netzgerät peqPower 300 V (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- peqSTAR Thermocycler (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- ph530 digitales Labor pH-Meter (Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, WTW, Weilheim, Deutschland)
- Power Pac 200 (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
- Professional Thermocycler TRIO (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland)
- Rotilabo[®]-Mini-Zentrifuge (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Schüttler Unimax 1010 (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland)
- Schüttler KS10 (Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland)
- Schüttler 3005 (Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland)
- Schüttler 3015 (Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland)
- Thermal Shake lite (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- Thermomixer Compact (Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
- Tissue Lyser (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- Unichromat 900 (Uniequip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH, Martinsried, Deutschland)
- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, New York, USA)
- Zentrifuge 5810R (Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
- Zentrifuge 5424 (Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
2.2 Software

- CloneManager Professional 9 (Scientific and Educational Software, Morrisville, USA)
- LAS X (für TCS SP8) (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland)
- Microsoft Office (Excel, Power Point, Word) (Microsoft Corporation, Redmond, USA)
- Unicorn[™] 7.0 (GE Healthcare, jetzt Cytiva, Chicago, USA)

2.3 Dienstleistungen

- Synthese von Oligonukleotiden (Eurofins Genomics, Anzinger, Deutschland)
- Sanger-Sequenzierung (GeneWiz von Azenta Life Sciences, Leipzig, Deutschland)

2.4 Pflanzliches Material

In dieser Arbeit wurde der Modellorganismus *A. thaliana* verwendet. Die einzelnen Pflanzenlinien sind in den folgenden Tabellen 1 bis 4 aufgeführt.

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Wildtyp-Linien.

Linie	Abkürzung	Referenz	
Columbia-0	Col-0	Arabidopsis Sequenzierungsprojekt,	
		LEHLE SEEDS, Round Rock, USA	

Tabelle 2: Auflistung	der	verwendeten	genetisch	modifizierten	Linien.
	aci	verwendeten	Serieusen	mountrefferten	Ennern.

Mutiertes Gen	Ökotyp	Gen ID	Referenz
saul1-1	Col-0	At1g20780	SALK_063974
saul1-1_35S::SAUL1	Col-0	At1g20780	Sabine Raab 2008
bon1	Col-0	At5g61900	SALK_070435
pub43 saul1-1 soc3	Col-0	At1g76390,	Liang <i>et al.</i> 2019
		At1g20780,	
		At1g17600	
AtKRP125 (kin5b)	Col-0	At1g08125	SALK_124644
tn2-1	Col-0	At1g17615	SALK_062069
exo70b1	Col-0	At5g58430	SALK_037570

 Tabelle 3: Die in dieser Arbeit verwendeten Proteinüberexpressionslinien.

Linie	Ökotyp	Konstrukt	Referenz
SAUL1-GFP	saul1-1	pK7FWG2.0_35S::SAUL1-GFP	Raab <i>et al.</i> 2009

Linie	Ökotyp	Konstrukt
YFP-SAUL1(Col-0)	Col-0	pEG104_35S::YFP-SAUL1
YFP-SAUL1(saul1-1)	saul1-1	pEG104_35S::YFP-SAUL1
YFP-SAUL1 _{R736A}	saul1-1	pEG104_35S::YFP-SAUL1 _{R736A}
YFP-SAUL1 _{R737A}	saul1-1	pEG104_35S::YFP-SAUL1 _{R737A}
YFP-SAUL1 _{R775A}	saul1-1	pEG104_35S::YFP-SAUL1 _{R775A}
YFP-SAUL1 _{R736,737,775A}	saul1-1	pEG104_35S::YFP-SAUL1 _{R736,737,775A}
YFP-SAUL1∆736fl	saul1-1	pEG104_35S::YFP-SAUL1 _{Δ736fl}
35S:: SAUL1 _{R736A}	saul1-1	pEG100_35S::SAUL1 _{R736A}
35S:: SAUL1 _{R737A}	saul1-1	pEG100_35S::SAUL1 _{R737A}
35S:: SAUL1 _{R775A}	saul1-1	pEG100_35S::SAUL1 _{R775A}
35S:: SAUL1 _{R736,737,775A}	saul1-1	pEG100_35S::SAUL1 _{R736A}
35S::SAUL1 _{∆736fl}	saul1-1	pEG100_35S::SAUL1 _{Δ736fl}

Tabelle 4: Auflistung der in dieser Arbeit hergestellten und untersuchten transgenen Pflanzenlinien.

2.5 Mikroorganismen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterien- und Hefestämme sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Bezeichnung	Genotyp	Referenz
Escherichia coli	F- mcrA Δ(<i>mrr-hsd</i> RMS- <i>mcr</i> BC)	Thermo Fisher
One Shot [®] Top10	φ80 <i>lac</i> ZΔM15 Δ <i>lac</i> X74 recA1 araD139	Scientific, Darmstadt,
	∆(ara-leu)7697	Deutschland
	<i>gal</i> U <i>gal</i> K λ– rpsL(StrR) <i>end</i> A1 <i>nup</i> G	
Escherichia coli	F- <i>ompT hsdS</i> (rB-, mB-)	Thermo Fisher
BL21 Star™ (DE3)	galdcmrne131 (DE3)	Scientific, Darmstadt,
		Deutschland
Agrobacterium	pGV2260 in C58C1	Deblaere <i>et al</i> . 1985
tumefaciens C58C1		
Saccharomyces	MATa, leu2-3, 112 trp1-901 his3-200 ura3-	James <i>et al.</i> 1996
cerevisiae	52 gal4Δ gal80Δ GAL2-ADE2 LYS2::GAL1-	
Y8800	HIS3 MET2::GAL7-lacZ cyh2 ^R	
Saccharomyces	MATα, leu2-3, 112 trp1-901 his3-200 ura3-	James <i>et al.</i> 1996
cerevisiae	52 gal4Δ gal80Δ GAL2-ADE2 LYS2::GAL1-	
Y8894	HIS3 MET2::GAL7-lacZ cyh2 ^R	

Tabelle 5: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

2.6 Antikörper

Die in dieser Arbeit zur Proteindetektion verwendeten Antikörper sind in Tabelle 6 aufgelistet.

-		
Name	Epitop	Referenz
GST Tag Antibody	GST (In Kaninchen hergestellt)	Sigma-Aldrich, München,
		Deutschland
Anti Rabbit-HRP	Polyklonal Kaninchen (in Ziege hergestellt)	Carl Roth GmbH + Co.KG,
		Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 6: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper.

2.7 Vektoren und Genkonstrukte

Alle in dieser Arbeit verwendeten Klonierungsvektoren zum Herstellen von Genkonstrukten sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Bezeichnung	Resistenz	Referenz	
pDONR™221	Kanamycin	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt,	
		Deutschland	
pDONR™223	Spectinomycin	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt,	
		Deutschland	
pENTR™-D/TOPO	Kanamycin	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt,	
		Deutschland	
pGEX_6P_1	Ampicillin	GE Healthcare, jetzt Cytiva, Chicago,	
		USA	
pEG100	Kanamycin	Earley et al. 2006	
pEG104	Kanamycin	Earley et al. 2006	
pMDC43	Kanamycin	IPMB Universität Zürich	
pDEST22	Ampicillin	Guide to Yeast Genetics and	
		Molecular Biology	

 Tabelle 7: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Klonierungsvektoren.

2.7.1 Genkonstrukte für die SAUL1-Effektor-Interaktionsexperimente

In der folgenden Tabelle sind die für die SAUL1-Effektor-Interaktionsexperimente hergestellten Hefe-2-Hybrid-Konstrukte aufgeführt.

Vektor	Genkonstrukt	ID
pENTR™-D/TOPO	SAUL1	gTL 170
pENTR™-D/TOPO	SAUL1 _{ΔΝΔC}	gTL 179
pDEST22	SAUL1	gTL 178
pDEST22	SAUL1 _{ΔUbox}	gTL 180
pDEST22	SAUL1ΔΝΔC	gTL 182

Tabelle 8: Auflistung der in dieser Arbeit hergestellten Hefe-2-Hybrid-Konstrukte.

2.7.2 Genkonstrukte zur Identifizierung der SAUL1-Membranaffinität

Die in dieser Arbeit hergestellten verkürzten *SAUL1_{ARM}* Genkonstrukte zur Analyse der Membranaffinität sind Tabelle 9 aufgelistet.

Vektor	Genkonstrukt	ID
pDONR™221	SAUL1ARM7	gTL 285
pDONR™221	SAUL1ARM ₇₋₈	tJA 13
pDONR™221	SAUL1ARM ₇₋₉	gTL 286
pDONR™221	SAUL1ARM ₇₋₁₀	gTL 287
pDONR™221	SAUL1ARM ₈	tJA 10
pDONR™221	SAUL1ARM ₈₋₉	gTL 304
pDONR™221	SAUL1ARM ₈₋₁₀	gTL 303
pDONR™221	SAUL1ARM ₈₋₁₁	gTL 302
pDONR™221	SAUL1ARM ₉	gTL 289
pDONR™221	SAUL1ARM ₉₋₁₀	gTL 291
pDONR™221	SAUL1ARM ₉₋₁₁	gTL 296
pDONR™221	SAUL1ARM ₁₀	tJA 11
pDONR™221	SAUL1ARM ₁₀₋₁₁	gTL 297
pDONR™221	SAUL1ARM ₁₁	gTL 298
pMDC43	35S::GFP-SAUL1ARM7	gTL 310
pMDC43	35S::GFP-SAUL1ARM ₇₋₈	tJA 19
pMDC43	35S::GFP-SAUL1ARM ₇₋₉	gTL 311
pMDC43	35S::GFP-SAUL1ARM ₇₋₁₀	gTL 324
pMDC43	35S::GFP-SAUL1ARM ₈	tJA 20
pMDC43	35S::GFP-SAUL1ARM ₈₋₉	tJA 12

Tabelle 9: Auflistung der verkürzten SAUL1_{ARM} Konstrukte.

Vektor	Genkonstrukt	ID
pMDC43	35S::GFP-SAUL1ARM ₈₋₁₀	gTL 320
pMDC43	35S::GFP-SAUL1ARM ₈₋₁₁	gTL 323
pMDC43	35S::GFP-SAUL1ARM9	gTL 319
pMDC43	35S::GFP-SAUL1ARM ₉₋₁₀	gTL 313
pMDC43	35S::GFP-SAUL1ARM ₉₋₁₁	gTL 314
pMDC43	35S::GFP-SAUL1ARM ₁₀	gTL 317
pMDC43	35S::GFP-SAUL1ARM ₁₀₋₁₁	gTL 309
pMDC43	35S::GFP-SAUL1ARM ₁₁	gTL 318

Tabelle 9: Fortsetzung

2.7.3 Genkonstrukte zur Untersuchung von SAUL1-Membranflecken

In der folgenden Tabelle 10 sind alle hergestellten *SAUL1* Genkonstrukte zur Analyse von Membranflecken aufgelistet.

Vektor	Genkonstrukt	ID
pDONR™221	SAUL1 _{R736A}	gTL 336
pDONR™221	SAUL1 _{R737A}	gTL 353
pDONR™221	SAUL1 _{R775A}	gTL 338
pDONR™221	SAUL1 _{R736,737A}	gTL 355
pDONR™221	SAUL1 _{R736,775A}	gTL 340
pDONR™221	SAUL1 _{R737,775A}	gTL 359
pDONR™221	SAUL1 _{R736,737,775A}	gTL 356
pDONR™221	SAUL1 _{DAA736}	gTL 427
pDONR™221	SAUL1 _{DAA737}	gTL 429
pDONR™221	SAUL1 _{DAA775}	gTL 425
pDONR™221	SAUL1 _{ΔΑΑ736fl}	gTL 476
pDONR™223	SAUL1 _{R736A}	gTL 503
pDONR™223	SAUL1 _{R737A}	gTL 515
pDONR™223	SAUL1 _{R775A}	gTL 497
pDONR™223	SAUL1 _{R736,737,775A}	gTL 502
pDONR™223	SAUL1 _{daa736fi}	gTL 499
pDONR™223	SAUL1 _{R736K}	gTL 545
pDONR™223	SAUL1 _{R736E}	gTL 540
pMDC43	35S::GFP-SAUL1 _{R736A}	gTL 341
pMDC43	35S::GFP-SAUL1 _{R737A}	gTL 363
pMDC43	35S::GFP-SAUL1 _{R775A}	gTL 343
pMDC43	35S::GFP-SAUL1 _{R736,737A}	gTL 365

Tabelle 10: Liste der Genkonstrukte zur Untersuchung von SAUL1-Membranflecken.

Vektor	Genkonstrukt	ID
pMDC43	35S::GFP-SAUL1 _{R736,775A}	gTL 350
pMDC43	35S::GFP-SAUL1 _{R737,775A}	gTL 360
pMDC43	35S::GFP-SAUL1 _{R736,737,775A}	gTL 366
pMDC43	35S::GFP-SAUL1 _{ΔАА736}	gTL 440
pMDC43	35S::GFP-SAUL1 _{ΔАА737}	gTL 442
pMDC43	35S::GFP-SAUL1 _{ΔАА775}	gTL 431
pMDC43	35S::GFP-SAUL1 _{ΔАА736f} i	gTL 485
pMDC43	35S::GFP-SAUL1 _{R736K}	gTL 550
pMDC43	35S::GFP-SAUL1 _{R736E}	gTL 555
pEG100	35S::SAUL1 _{R736A}	gTL 531
pEG100	35S::SAUL1 _{R737A}	gTL 525
pEG100	35S::SAUL1 _{R775A}	gTL 509
pEG100	35S::SAUL1 _{R736,737,775A}	gTL 533
pEG100	35S::SAUL1 _{ΔАА736fl}	gTL 520
pEG104	35S::YFP-SAUL1 _{R736A}	gTL 521
pEG104	35S::YFP-SAUL1 _{R737A}	gTL 524
pEG104	35S::YFP-SAUL1 _{R775A}	gTL 511
pEG104	35S::YFP-SAUL1 _{R736,737,775A}	gTL 529
pEG104	35S::YFP-SAUL1 _{ΔАА736fl}	gTL 536
pEG104	35S::YFP-SAUL1 _{R736K}	gTL 548
pEG104	35S::YFP-SAUL1 _{R736E}	gTL 552

Tabelle 10: Fortsetzung

2.7.4 Genkonstrukte für die Expression rekombinanter SAUL1-Proteine

In Tabelle 11 sind die Konstrukte zur Expression von rekombinanten SAUL1-Proteinen aufgelistet.

Tabelle 11: Auflistung der verwendeten Expressionskonstrukte von rekombinanten SAUL1-Proteinen.

Vektor	Genkonstrukt	ID
pGEX_6P_1	GST-SAUL1	gTL 330
pGEX_6P_1	GST-SAUL1 _{R736A}	gTL 394

2.8 Primer

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und projektbezogen in Tabelle 12 bis 15 aufgelistet.

2.8.1 Primer zur Herstellung der Hefe-2-Hybrid Genkonstrukte

In Tabelle 12 sind die Primer zur Amplifikation der Hefe-2-Hybrid Genkonstrukte aufgelistet.

Primer	Sequenz (5' zu 3')	ID
SAUL1 Volllänge fw	CACCATGCATATCTATGAAGCATT	CB64
SAUL1 Vollänge rev	GGCAGCATCATTCCTGGATCTCCA	CB65
SAUL1 ΔUbox fw	CACCATGGGGAATGCTGAGACAGATATTTTG	887
SAUL1 ΔN fw	CACCATGGAGAGCAAGGCGATAGTA	GD274
SAUL1 ΔC rev	GCTCAGGCTCTGTTCCTCTGCCAC	JB27

Tabelle 12: Liste der verwendeten Primer zur Generation der Hefe-2-Hybrid Genkonstrukte.

2.8.2 Primer zur Herstellung verkürzter *SAUL1* Genkonstrukte

Die zur Herstellung von verkürzten *SAUL1* Genkonstrukten verwendete Primer sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Primer	Sequenz (5' zu 3')	ID
BP SAUL1 ARM7 fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATATGGACTTT	TL29
	GACAAAGCCACTCTTG	
BP SAUL1 ARM7 rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATGGTGAGTCC	TL131
	AACAAGAACCTCCAAC	
BP SAUL1 ARM8 fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATATGACAGTT	TL30
	CCAAAAGTTGTTTATG	
BP SAUL1 ARM8 rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCAGAATGGG	TL31
	GAAAGGTTATG	
BP SAUL1 ARM9 fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATATGCAACTC	TL32
	GGAAGCCTTGTTGC	
BP SAUL1 ARM9 rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCAAAATTCA	TL33
	GCTAAGAGCCCAGC	
BP SAUL1 ARM10 fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATATGAAAGAG	TL34
	GCTCGGGCCATTAAC	
BP SAUL1 ARM10 rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCAAAGTGAA	TL35
	AGATTCTCTAAAGCC	
BP SAUL1 ARM11 fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATATGTATGTT	TL36
	CATTAAGAGAAACA	
BP SAUL1 ARM12 rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCAAAGCAAG	TL38
	ATCCTTTCCACCATC	
B2_SAUL1_AA735 rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCATGTCAGC	TL83
	CTCTCTGTTCGGTTCTC	

Tabelle 13: Auflistung der verwendeten Primer zur Herstellung verkürzter SAUL1 Genkonstrukte.

Tabelle 13: Fortsetzung

Primer	Sequenz (5' zu 3')	ID
B2_SAUL1_AA736 rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCACCTTGTC	TL84
	AGCCTCTCTGTTCGGTTC	
B2_SAUL1_AA775 rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCAAAAATCA	TL85
	GCGTTTTGGAAAGCG	

2.8.3 Primer zum Einbringen von Punktmutationen in SAUL1

In Tabelle 14 sind die Primer zum Einbringen von Punktmutationen in die kodierende Sequenz von SAUL1 durch zielgerichtete Mutagenese (*site-directed mutagenesis,* SDM) aufgelistet.

Primer	Sequenz (5' zu 3')	ID
SDM_SAUL1R736+737A fw	GAGAGGCTGACAGCGGCAGCGGTTTGGATG	TL55
SDM_SAUL1R736+737A rev	CATCCAAACCGCTGCCGCTGTCAGCCTCTC	TL56
SDM SAUL1R737A fw	CCACCATCCAAACCGCGCTCCTTGTCAGCCTCTCTG	TL58
SDM SAUL1R737A rev	CAAAACGCTGATTTTGCAACGAGACAGATCG	TL59
SDM SAUL1R775A fw	CAAAACGCTGATTTTGCAACGAGACAGATCG	TL60
SDM SAUL1R775A rev	CGATCTGTCTCGTTGCAAAATCAGCGTTTTG	TL61
SDM SAUL1R736A fw	GAACAGAGAGGCTGACAGCGAGAGCGGTTTGG	TL67
SDM SAUL1R736A rev	CAAACCGCTCTCGCTGTCAGCCTCTCTGTTC	TL68
SAUL1R736E_fw	CAGAGAGGCTGACAGAGAGAGCGGTTTGG	TL143
SAUL1R736E_rev	CCACCATCCAAACCGCTCTCTCTGTCAGCC	TL144
SAUL1R736K_fw	GAACCGAACAGAGAGGCTGACAAAGAGAGC	TL150
SAUL1R736K_rev	CCACCATCCAAACCGCTCTCTTTGTCAGCC	TL151
SDM_WithoutAA736 fw	CCGAACAGAGAGGCTGACAAGAGCGGTTTG	TL112
SDM_WithoutAA736 rev	CATCCAAACCGCTCTTGTCAGCCTCTCTGT	TL110

Tabelle 14: Primerliste der in dieser Arbeit verwendeten Mutagenese Primern.

2.8.4 Primer zur Herstellung von rekombinanten Expressions-Konstrukten

In Tabelle 15 sind die zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für die Herstellung von Expressions-Konstrukten verwendete Primer aufgeführt.

Primer	Sequenz (5' zu 3')	ID
SAUI1fl_BamHl fw	GCGGATCCATGGTTGGAAGCTCGGATGG	TL42
SAUL1ΔN BamHl fw	GCGGATCCGTGGAGATCCAGGAATG	TL79
SAUL1∆ARM1-6 BamHl fw	GCGGATCCATTAGCAACACAGGTCC	TL80
SAUL1fl_Xhol rev	GCCTCGAGCTATGCGATGTTTGGG	TL41

Tabelle 15: Liste der für die Herstellung von Expressions-Konstrukten verwendete Primer.

2.9 Herstellung von Genkonstrukten

2.9.1 pDONR[™]221_SAUL1 und pDONR[™]223_SAUL1 Konstrukte

Die kodierende Sequenz von *SAUL1* wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter der Verwendung des B1_SAUL1_fw (TK257) und B2_SAUL1_rev (MPP1276) Primerpaars amplifiziert. Die für die Herstellung verkürzter *SAUL1_{ARM}* Genkonstrukte benötigten Primer sind in Tabelle 13 aufgeführt. Um die für das Gateway®Cloning System benötigten *attachment sites attB1* und *attB2* an das Zielgen zu fusionieren, wurden spezifische *forward* und *reverse* Primer anhand des Gateway®Technology Manuals (invitrogen, Thermo Fisher Scientific GmbH, Darmstadt, Deutschland) erstellt. Die PCR-Fragmente wurden mittels BP-Clonase®-Reaktion (2.13.4.1) in den pDONR™221- oder den pDONR™223-Vektor eingebracht. Die erhaltenen *Entry*-Klone wurden durch Sanger-Seqenzierung auf ihre Korrektheit überprüft.

2.9.2 Zielgerichtete Mutagenese zum Einbringen von Punktmutationen

Um eine Punktmutation in die *SAUL1* Sequenz einzubringen, wurden die pDONR™221_SAUL1 *Entry*-Klone für die *site-directed mutagenesis* (SDM) verwendet. Dabei wurde das Kodon für Arginin an Position 736 in ein Kodon für Alanin, Lysin oder Glutaminsäure umgewandelt, während die Kodons an den Positionen 737 sowie 775 ausschließlich in solche für Alanin konvertiert wurden. Diese Sequenzmodifikationen wurden mit den Primerpaaren aus Tabelle 14 eingebracht. Anschließend wurde der verwendete Ausgangsvektor mit der Endonuklease *DpnI* gemäß den Herstellerangaben (Thermo Fisher Scientific GmbH, Darmstadt, Deutschland) endonukleolytisch verdaut und der durch die SDM modifizierte Vektor in chemisch kompetente *E. coli* Zellen mittels Hitzeschock-Transformation (2.13.11.1) eingebracht.

2.9.3 Herstellung von DNA-Konstrukten in pMDC- und pEG-Vektoren

Die zuvor etablierten pDONR[™]221_SAUL1 und pDONR[™]223_SAUL1 Konstrukte wurden durch eine LR-Clonase[®]-Reaktion (2.13.4.1) in die entsprechenden Expressionsvektoren eingebracht. In den verwendeten pMDC43 und pEG104 Vektorsystemen wurde an die SAUL1 Genkonstrukte ein *GFP*- oder *YFP*-Tag N-terminal fusioniert. Für Überexpressionskonstrukte ohne Reporter wurde der pEG100 Expressionsvektor verwendet. In allen Vektorsystemen erfolgte die Genexpression unter Kontrolle des *355::*Promotors, wobei im pEG104 zusätzlich eine *TMV Enhancer* Region zur Verstärkung dieser vorhanden war (Earley *et al.* 2006). Das erfolgreiche Einbringen in die Expressionsvektoren wurde durch Sanger-Sequenzierung bestätigt.

2.9.4 pENTR[™]-D/TOPO_SAUL1 und pDEST22_SAUL1 Konstrukte

Für das pENTR[™]-D/TOPO Klonierungs-System benötigten die Amplifkate einen spezifischen "CACC" Überhang, welcher mittels *forward* Primer am N-Terminus des PCR-Fragments hinzugefügt wurde (Tab.12). Die amplifizierte kodierende *SAUL1*-Sequenz wurde anschließend in den pENTR[™]-D/TOPO Vektor kloniert und durch eine LR-Clonase[®]-Reaktion in den Hefe Vektor pDEST22 transferiert (2.13.4.1). Zur Überprüfung der Richtigkeit der *SAUL1*-Sequenz in den Vektoren wurden sowohl der pENTR[™] als auch der pDEST22-Vektor sequenziert.

2.9.5 Herstellung von pGEX_6P_1_SAUL1_{R736A}

Um die für den pGEX_6P_1 benötigten *BamHI* und *Sall* Restriktionsschnittstellen an die kodierende Sequenz von *SAUL1* zu fusionieren, wurde *SAUL1* mit dem Primerpaar BamHI_SAUL1_fw und Sall_SAUL1_rev amplifiziert (Tab.15). Anschließend wurde das Amplifikat mittels endonukleolytischen Verdau und anschließender T4-Ligase Ligation in den pGEX_6P_1 Vektor kloniert und durch Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft. Die verwendeten Endonukleasen und T4-Ligase wurden von Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland) bezogen und gemäß den Herstellerangaben verwendet.

2.10 Anzuchtmedien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Anzuchtmedien wurden mit ddH₂O auf das angegebene Endvolumen aufgefüllt und nach dem Autoklavieren bei 4 °C gelagert.

> LB-Medium (500 mL) Trypton 5 g Hefeextrakt 2,5 g NaCl 5 g

LB-Agar-Festmedium LB Medium 500 mL Agar (Kobe I) 7,5 g

2YT-Medium	ledium (500 mL) YPDA-Medium (500 m		0 mL)
Trypton	8 g	Pepton	10 g
Hefeextrakt	5 g	Hefeextrakt	5 g
NaCl	2,5 g	Glucose 20%	50 mL
		Adeninhemisulfat 0,2%	7,5 mL

2.11 Antibiotika

Alle Antibiotika, die zur Selektion von transformierten Bakterien in flüssigem und auf festem Medium verwendet wurden, sind mit den jeweiligen Konzentrationen in Tabelle 16 aufgeführt.

Antibiotikum	Konzentration	Stocklösung
Ampicillin	100 μg/mL	100 mg/mL
Kanamycin	50 μg/mL	50 mg/mL
Spectinomycin	100 μg/mL	100 mg/mL
Hygromycin B	30 μg/mL	50 mg/mL

Tabelle 16: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika.

2.12 Methoden zur Arbeit mit Pflanzen

2.12.1 Anzucht von Arabidopsis thaliana

Für die Anzucht von *A. thaliana* wurde ein Substratgemisch aus 65% Classic Profi Substrat EinheitsErde[®] (Sinntal-Altengronau, Deutschland), 25% Sand und 10% Blähton verwendet. Nach der Vorbereitung der Anzuchtgefäße wurde das Substratgemisch mit einer BioMück-Lösung (0,5 g/L) gegossen und über Nacht bei Raumtemperatur mit einer Plastikhaube abgedeckt einwirken gelassen. Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung mit einer 0,25%-igen Previcur-Lösung. Anschließend wurden die Arabidopsis Samen einzeln auf dem Substrat ausgebracht und für 48 Stunden bei 4 °C im Dunkeln stratifiziert. Die Pflanzenanzucht erfolgte bei 25 °C unter Langtagbedingungen mit 12 Stunden Licht und einer Lichtquantenmenge von etwa 100 µmol m⁻² s⁻¹. Abweichende Anzuchtbedingungen sind in den entsprechenden Experimenten des Ergebnisteils aufgeführt.

2.12.2 Extraktion und Transformation von A. thaliana Mesophyllprotoplasten

Für die Extraktion von Mesophyllprotoplasten wurden mindestens sechs Wochen alte *A. thaliana* Pflanzen verwendet, die unter Kurztagbedingungen bei 20 °C oder für Mutantenlinien (3.2.8) unter Langtagbedingungen bei 25 °C angezogen wurden. Das zur Protoplastierung vewendete Blattmaterial wurde in kleine Streifen geschnitten und in eine Petrischale mit MCP-Puffer (1:1 mit ddH₂O) überführt, bis die Oberfläche mit Blattstreifen bedeckt war. Anschließend wurde der MCP-Puffer durch eine frisch angesetzte Enzymlösung ersetzt, die Petrischale in Aluminiumfolie eingewickelt und für mindestens zwei Stunden bei 26 °C und 60 rpm inkubiert. Die extrahierten Protoplasten wurden durch ein mit MaMg-Puffer angefeuchtetes 50 μm Nylonnetz gefiltert und in ein 50 mL Falkongefäß überführt. Die Protoplasten wurden dann für drei Minuten bei 100 x g und 23 °C zu zentrifugiert, wobei alle Zentrifugationsschritte mit einer Beschleunigungs- und Bremseinstellung von "4" durchgeführt wurden, um ein Platzen der Ptozoplasten zu vermeiden. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Protoplasten vorsichtig in 20 mLMaMg-Puffer aufgenommen. Nach einer zweiten Zentrifugation wurden die Protoplasten mit 200 μL MaMg-Puffer pro Transformation versetzt.

Für die PEG-CaCl₂ Transformation wurden 15 bis 25 μg Plasmid-DNA in ein 15 mL Greiner-Inkubationsröhrchen vorgelegt und mit 200 μL Protoplastensuspension gemischt. Nach gründlicher Durchmischung wurden 165 μL PEG-CaCl₂-Lösung hinzugegeben und die Suspension durch vorsichtiges Drehen homogenisiert. Die Transformationsansätze wurden für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und anschließend mit W5-Puffer sukzessiv auf 3 mL aufgefüllt, gemischt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Protoplasten in 3 mL W5-Puffer resuspendiert und zentrifugiert. Danach wurde das Protoplastenpellet in 3 mL W5-Puffer aufgenommen und zur Lagerung in kleine Petrischalen überführt, die über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert wurden (Yoo *et al.* 2007). Bei Temperaturexperimenten wurde die Inkubationstemperatur gemäß den Angaben im Ergebnisteil angepasst. Am folgenden Tag wurden die transformierten Protoplasten am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (KLSM) untersucht. Alle verwendeten Puffer sind auf der folgenden Seite aufgeführt.

33

MCP Puffer (200 mL)

Sorbit 18,22 g CaCl₂ (1 M) 200 μL MES (0,5 M, pH 5,7) 4 mL pH 5,6 mit KOH einstellen und bei 4 °C lagern

Enzymlösung (20 mL in MCP)

Macerozym R-10 50 mg Cellulase R-10 200 mg 10 Minuten bei 55 °C inkubieren

MaMg Puffer (200 mL)

Sorbit 16,4 g MgCl₂ (1 M) 4 mL MES (0,5 M, pH 5,7) 2 mL autoklavieren und bei 4 °C lagern

W5 Puffer (200 mL)

NaCl (5 M) 6,16 mL CaCl₂ (1 M) 25 mL KCl (2 M) 200 μL MES (0,5 M, pH 5,7) 800 μL autoklavieren und bei 4 °C lagern

PEG-CaCl₂ Lösung (6,5 mL)

PEG 4000 4 g ddH₂O 3 mL Mannitol (0,8 M) 2,5 mL CaCl₂ (1 M) 1 mL

2.12.2.1 PAMP-Behandlung zur Induktion von biotischem Stress

Zur Induktion von biotischem Stress wurden mit *35S::GFP-SAUL1* transformierte *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten mit dem Flagellin-Protein flg22, Chitosan und Mycelium von *Fusarium graminearum* (AG Heinze, Universität Hamburg) behandelt. Die Protoplasten wurden zunächst für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit dem PAMP behandelt und anschließend für eine zweite Analyse über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die behandelten Protoplasten wurden anschließend mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie (KLSM) untersucht.

2.12.2.2 Erniedrigung der Umgebungstemperatur

Mit *35S::GFP-SAUL1* transformierte *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten wurden zur möglichen Induktion der SAUL1-Membranfleckenbildung bei Temperaturen unter 25 °C inkubiert. Hierfür wurden die frisch transformierten Protoplasten über Nacht bei 25 °C, RT, 20 °C, 18 °C oder 15 °C inkubiert. Zusätzlich wurde ein zweistündiger Transfer von 25 °C auf 18 °C getestet.

2.12.2.3 Anfärbung von Membranen mit dem Styrillfarbstoff FM4-64

Die Plasmamembran und SAUL1-bedingte Vesikel wurden mit Hilfe des lipophilen Membranmarker FM4-64 (Anregungs-/Emissionsmaximum ~ 515/640 nm, invitrogen, Thermo Fisher Scientific GmbH, Darmstadt, Deutschland) gemäß Herstellerangaben eingefärbt und am KLSM untersucht. Der Farbstoff wurde in einer Endkonzentration von 1 bis 5 μ M der transformierten Protoplastensuspension zugesetzt und zur Färbung der Plasmamembran für 10 Minuten beziehungsweise zur Färbung von Vesikeln für 20 Minuten inkubiert.

2.12.3 Infiltration von N. benthamiana mit A. tumefaciens

Zur Infiltration von N. benthamiana Epidermiszellen mit A. tumefaciens wurden 5 mL LB-Medium (2.10) mit dem entsprechenden Antibiotikum (2.11) versetzt und mit 50 µL Glycerindauerkultur inokuliert. Die Kulturen wurden über Nacht bei 28 °C auf einem Schüttler bei 180 rpm inkubiert. Für jedes Infiltrationsexperiment wurde zusätzlich ein A. tumefaciens Stamm mit dem pBIN61_35S::p19 Plasmid angeimpft und koinfiltriert. Das sogenannte P19-Protein unterdrückt das post-transkriptionelle gene-silencing von N. benthamiana, wodurch die Expression des Zielproteins erhöht wird (Voinett et al. 2003). Die Übernachtkulturen wurden mit 4000 rpm für 15 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen, sodass das Pellet in 5 mL Infiltrationslösung aufgenommen werden konnte. Diese Infiltrationssuspension wurde für drei Stunden unter leichtem Schütteln bei 28 °C inkubiert und anschließend im Verhältnis 1:1 mit der P19-Suspension gemischt. Für die Infiltration wurden 4 bis 8 Wochen alte und nicht blühende N. benthamiana Pflanzen verwendet. Die Infiltrationssuspension wurde dabei mehrfach mit einer kanülenlosen Spritze in die Blattunterseite injiziert, woraufhin die Expression des Zielproteins für drei Tage bei Raumtemperatur erfolgte. Nachfolgend wurde Fluoreszenz des jeweiligen Fusionsproteins mittels KLSM untersucht.

Infiltrationslösung (5 mL)

Natriumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,1) 100 μL Acetosyringon (0,1 M) 20 μL MgCl₂ (2 M) 50 μL

2.12.4 Stabile Transformation von A. thaliana durch A. tumefaciens

Zur stabilen Transformation von *A. thaliana* mit *A. tumefaciens* wurden 50 mL LB-Medium (2.10) mit 50 μL einer *A. tumefaciens* Glycerindauerkultur inokuliert und über Nacht bei 28 °C auf einem Schüttler bei 180 rpm inkubiert. Am Folgetag wurden die Kulturen mit 4000 rpm für 20 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Bakterienpellet in 20 mL Transformationslösung resuspendiert und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Am Tag der Transformation wurden alle Blüten und sich öffnenden Knospen von den *A. thaliana* Pflanzen entfernt, um die Transformationsrate zu erhöhen. Daraufhin wurden die vorbereiteten Pflanzen für drei Minuten in die Transformationslösung getaucht und leicht bewegt. Nach der Transformation wurden die Pflanzen für 24 Stunden mit kleinen Autoklavenbeuteln bedeckt und anschließend unter Standardbedingungen bis zur Samenernte angezogen.

Transformationslösung (500 mL)

MS Salze 1,1 g Sucrose 25 g pH auf 5,7 mit KOH, auf 4 °C kühlen Benzylaminopurin (4,4 mM) 5 μL Silwet L-77 150 μL

2.12.5 BASTA[®]-Selektion von transformierten A. thaliana Keimlingen

Für die Selektion mit dem Herbizid BASTA® (Glufosinat) wurde das Saatgut der Pflanzen, die mit pEG100/104-basierten Konstrukten transformiert wurden, breitflächig auf Erde ausgesät und für 2 Wochen bis zum fortgeschrittenen Zweiblatt-Stadium angezogen. Anschließend wurden die Pflanzen zweimal mit einer 200 mM BASTA®-Lösung besprüht. Alle Pflanzen, die diese Behandlung überlebten, galten als potentiell tranformiert und wurden in neue Töpfe umgesetzt. Der Genotyp der Pflanzen sowie das Vorhandensein des eingebrachten Genkonstrukts wurden mittels PCR (2.13.3) nachgewiesen. Homozygote Wildtyp- oder *saul1-1* Pflanzen, die positiv auf das eingebrachte Genkonstrukt getestet wurden, sind bis zur Samenernte für Folgeexperimente weiter angezogen worden.

2.12.6 Hygromycin B Selektion von transformierten A. thaliana Keimlingen

Die mit pMDC43-basierten Konstrukten transformierten Pflanzen wurden mit einer Hygromycin B Selektion auf ein erfolgreiches Einbringen der Genkonstrukte hin untersucht. Dazu wurden 0,06 g der zu selektierenden Samen in ein 50 mL Falcontube überführt und mit einem Gemisch aus 15 mL Klorix, 15 mL ddH₂O und drei Tropfen Triton-X100 versetzt. Nach einer Inkubation von fünf Minuten bei Raumtemperatur wurden die Samen für 60 Sekunden mit 4000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Unter sterilen Bedingungen wurden die Samen fünfmal mit sterilem ddH₂O gewaschen und in Top-Agar aufgenommen, um anschließend auf Bottom-Agar Platten verteilt zu werden. Daraufhin wurden die Platten in Aluminiumfolie eingewickelt und für zwei Tage bei 4 °C stratifiziert. Die Samen wurden anschließend für sechs Stunden in einer Anzuchtkammer bei 25 °C mit Licht inkubiert, gefolgt von zwei weiteren Tagen in Dunkelheit. Sobald die Hypokotyle gut sichtbar waren, wurden die Keimlinge für 24 Stunden im Licht inkubiert und in Erde transferiert.

Bottom-Agar (500 mL)Top-Agar (500 mL)MS Salze1,25 gMS Salze1,25 gSucrose5 g (1%)Phyto Agar2 g (0,4%)Phyto Agar4 g (0,8%)pH 5,7 mit KOH einstellen, autoklavierenpH 5,7 mit KOH einstellen, autoklavierenHygromycin B 25 µL/50 mL Medium

2.13 Molekularbiologische Methoden

2.13.1 Extraktion genomischer DNA aus A. thaliana

Zur Extraktion von genomischer DNA (gDNA) aus *A. thaliana* wurde das Blattmaterial mit 200 μL Lysis-Puffer in einem 1,5 mL Reaktiongefäß homogenisiert. Um das restliche Blattmaterial zu entfernen, wurde das Homogenat für fünf Minuten bei 14.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktiongefäß mit 150 μL Isopropanol überführt, um die gDNA für fünf Minuten bei Raumtemperatur zu fällen. Dieses Gemisch wurde anschließend für acht Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert, wodurch das gDNA-Pellet entstand. Der Überstand wurde verworfen und das gDNA-Pellet mit 1 mL 75%-igem Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation für drei Minuten mit 14.000 rpm bei 4 °C wurde der Überstand abgenommen und das gDNA-Pellet für 10 Minuten auf einem Heizblock bei 50 °C getrocknet. Daraufhin wurde das gDNA-Pellet in 50 μL ddH₂O aufgenommen und durch eine Inkubation für 15 Minuten bei 50 °C mit 500 rpm gelöst. Nach einer finalen Zentrifugation für drei Minuten mit 14.000 rpm bei Raumtemperatur wurde der gDNA-haltige Überstand in ein neues Reaktiongefäß überführt und bei 4 °C gelagert.

Lysis-Puffer (10 mL)

Tris-HCl (1 M, pH 7,8 – 8) 2 mL NaCl (1 M) 2,5 mL EDTA (1 M, pH 8) 0,25 mL SDS (10%) 0,5 mL

2.13.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration isolierter Nukleinsäuren und Plasmide erfolgte mit dem NanoDrop 2000. Dabei wurden die Absorptionen bei 230, 260 und 280 nm gemessen, um die Konzentration und Reinheit der Probe anhand der 260/280 und 260/230 Quotienten zu bestimmen.

2.13.3 Polymerasekettenreaktionen (PCR)

2.13.3.1 Phusion[™] DNA-Polymerase Reaktion zur Gen-Amplifikation

Alle DNA-Fragmente von kodierenden Genbereichen, die für Klonierungen benötigt wurden, wurden mit der Phusion[™] DNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific GmbH, Darmstadt, Deutschland) amplifiziert. Ein Phusion PCR Ansatz bestand aus folgenden Komponenten:

Phusion PCR Ansatz (50 μL)		
ddH₂O	37,8 μL	
Phusion™ HF/GC Puffer (5x)	4,0 μL	
dNTPs (10 mM)	0,4 μL	
<i>forward</i> Primer (10 μM)	1,0 μL	
<i>reverse</i> Primer (10 μM)	1,0 μL	
DMSO	0,6 μL	
Phusion [™] DNA-Polymerase (2 U/µL)	0,2 μL	
DNA(50-200 ng)	5,0 μL	

Phusion PCR Programm (30 Zyklen)

Initiale Denaturierung	98 °C	30 Sekunden
Zyklische Denaturierung	98 °C	10 Sekunden
Annealing	50 bis 60 °C (*)	30 Sekunden
Elongation	72 °C	30 Sekunden/Kilobase
Finale Elongation	72 °C	5 Minuten
Lagerung	4 °C	∞

* = Die Temperatur wurde abhängig vom Primerpaar gewählt

2.13.3.2 SDM-PCR zum Einbringen von Punktmutationen

Zum Einbringen einer Punktmutation in der kodierenden Gensequenz von *SAUL1* wurde eine *site-directed mutagenesis* (SDM)-PCR mit der Phusion™ DNA-Polymerase durchgeführt. Eine SDM-PCR setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Site-directed Mutagenesis PCR Ansatz (20 µL)

- ddH₂O 3,5 μL
- Phusion™ HF/GC Puffer (5x) 2,0 μL
 - dNTPs (10 mM) 1,0 μL
 - *forward* Primer (10 μM) 5,2 μL
 - *reverse* Primer (10 μM) 5,2 μL
 - DMSO 0,6 μL
- Phusion[™] DNA-Polymerase (2 U/µL) 0,5 µL
 - Plasmid DNA (100-200 ng) 2,0 μL

Site-directed Mutagenesis PCR Programm (18 Zyklen)

Initiale Denaturierung	98 °C	30 Sekunden
Zyklische Denaturierung	98 °C	10 Sekunden
Annealing	50 °C	30 Sekunden
Elongation	68 °C	12 Minuten
Finale Elongation	72 °C	5 Minuten
Lagerung	4 °C	~

2.13.3.3 Kolonie-PCR und PCR zur Genotypisierung von A. thaliana

Um positiv transformierte Bakterienkolonien oder den Genotyp von *A. thaliana* Pflanzen zu identifizieren, wurde folgender Reaktionsansatz für eine DreamTaq[™] DNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific GmbH, Darmstadt, Deutschland) PCR verwendet:

DreamTaq PCR Ansatz (20 μL)

ddH₂O 13,5 μL

- DreamTaq[™] Green Buffer (10x) 2,0 μL
 - dNTPs (10 mM) 0,4 μL
 - forward Primer (10 μ M) 1,0 μ L
 - *reverse* Primer (10 μM) 1,0 μL
- DreamTaq[™] DNA-Polymerase (5 U/µL) 0,1 µL
 - DNA (N/A) 2,0 μL

DreamTaq PCR Programm (30 Zyklen)

Initiale Denaturierung	94 °C	3 Minuten
Zyklische Denaturierung	94 °C	30 Sekunden
Annealing	48-60 °C (*)	30 Sekunden
Elongation	72 °C	1 Minute/Kilobase
Finale Elongation	72 °C	5 Minuten
Lagerung	4 °C	~

* = Die Temperatur wurde abhängig vom Primerpaar gewählt

2.13.4 Klonierungsstrategien

2.13.4.1 Gateway® Klonierung

Das Gateway[®] Cloning System (invitrogen, Thermo Fisher Scientific GmbH, Darmstadt, Deutschland) basiert auf dem Rekombinationsmechanismus des *Escherichia-Virus Lambda*, welcher durch die Rekombination spezifischer *attachment sites* sein genetisches Material in das *E. coli* Genom überträgt. Im Labor wird dieses System zur Erstellung von *Entry-Vektoren* verwendet, um in weiteren Klonierungsschritten Genkonstrukte in Zielvektoren einzubringen. Zur Erstellung von *Entry-Vektoren* wurde die TOPO-Klonierung in den pENTR™/D-TOPO Vektor durchgeführt. Dabei wurde mit Hilfe des jeweiligen *forward* Primers (Tab.12) die notwendige Topoisomerase I-Erkennungssequenz "CACC" an das 5'-Ende des Amplifikats angehängt, sodass dieses gerichtet in den Vektor eingebracht wurde. Der Reaktionsansatz einer TOPO-Klonierung setzte sich wie folgt zusammen:

TOPO-Klonierung

Amplifikat mit 5'-CACC Überhang 2 μL Salzlösung 0,5 μL pENTR™ /D-TOPO 0,5 μL Dieser Ansatz wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mittels Hitzeschock-Transformation (3.10.11.1) in chemisch kompetente *E. coli* One Shot[®] Top10 Zellen eingebracht. Im erzeugten *Entry-Vektor* wurde die eingebrachte kodierende Gensequenz von den *attachement sites attL1* und *attL2* flankiert, welche den Transfer in die Zielvektoren ermöglichen. Die Zielvektoren verfügen über die *attachement sites attR1* und *attR2*, die im "Leer-Vektor" das *ccdB*-Suizidgen umgeben. Mit Hilfe einer LR-Rekombinase wurden die *attachement sites*, und somit auch das *ccdB*-Gen durch das Genkonstrukt des *Entry-Vektors* ausgetauscht. Zur Durchführung LR-Clonase[®]-Reaktion (invitrogen, Thermo Fisher Scientific GmbH, Darmstadt, Deutschland) wurden folgende Komponenten verwendet:

LR-Clonase[®]-Reaktion (10 µL)

Entry-Vektor (150 – 300 ng) 3 μL Zielvektor (150 ng) 1 μL LR-Clonase®II Enzymmix 1 μL TE-Puffer (pH 8,0) 5 μL

Dieser Reaktionsansatz wurde bei 18 °C über Nacht inkubiert und am Folgetag mittels Hitzeschock-Transformation (3.10.11.1) in chemisch kompetente *E. coli* One Shot[®] Top10 Zellen eingebracht.

Alternativ wurden *Entry-Vektoren* durch BP-Clonase[®]-Reaktionen (invitrogen, Thermo Fisher Scientific GmbH, Darmstadt, Deutschland) erstellt. Dabei wurde mittels des verwendeten Primerpaars (Tab.14) an das 5'-Ende und 3'-Ende des Amplifikats eine *attB1* und *attB2 attachement site* angehängt. Diese können homolog zur LR-Reaktion durch eine Rekombination mit spezifischen *attP1* und *attP2 attachemenet sites* im *Entry-Vektor* ausgetauscht werden. Eine BP-Clonase[®]-Reaktion wurde folgendermaßen angesetzt:

BP-Clonase[®]-Reaktion (10 μL)

- PCR-Produkt (80 ng) 2 μL Entry-Vektor (150 ng) 1 μL
- BP-Clonase[®]II Enzymmix 1 μL
 - TE-Puffer (pH 8,0) 7 μL

Der Reaktionsansatz wurde bei 18 °C über Nacht inkubiert und anschließend durch Hitzeschock-Transformation (3.10.11.1) in chemisch kompetente *E. coli* One Shot® Top10 Zellen eingebracht. Bei der BP-Clonase®-Reaktion entstehen im *Entry-Vektor attL1* und *attL2 attachement sites*, wodurch diese Vektoren für eine darauffolgende LR-Clonase®-Reaktion zur Erstellung des Zielvektors verwendet werden konnten.

2.13.4.2 Restriktions-Ligations-Klonierung

Die rekombinanten SAUL1-Expressionskonstrukte im pGEX_6P_1 Expressionsvektor wurden durch Klonierung mittels endonukleolytischen Verdau mit gefolgter Ligation erstellt. Dazu wurden die *sticky end* Endonukleaseschnittstellen von *BamHl* und *Xhol* durch das verwendete Primerpaar (Tab.15) an das 5'- und 3'-Ende des Amplifikats angehängt. Sowohl das Amplifikat als auch das pGEX_6P_1 Plasmid wurden mit den Endonukleasen *BamHl* und *Xhol* endonukleolytisch verdaut und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.13.5). Die erwarteten Fragmente des Amplifikats und des Plasmids wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mittels des NucleoSpin®Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt (2.10.6). Ein Restriktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Restriktionsansatz (20 µL)

FastDigest Buffer (10x) 2 μL BamHl 1 μL Xhol 1 μL PCR-Produkt/Plasmid (200 ng/1 μg) 5 μL /2 μL

Der Restriktionsansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend wie beschrieben verwendet. Nach einem erfolgreichen Verdau wurde das Amplifikat mittels einer Ligationsreaktion in den geschnittenen pGEX_6P_1 eingebracht. Diese Reaktion setzte sich wie folgt zusammen:

T4-Ligase Reaktion (10 μL)

T4-Ligase Buffer (10x) 1 μL

T4-Ligase 1 μL

Verdautes PCR-Produkt 4 µL

Verdautes Plasmid 2 µL

Der Ligationsansatz wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für die Hitzeschock-Transformation (3.10.11.1) von chemisch kompetente *E. coli* One Shot[®] Top10 Zellen verwendet.

2.13.5 Agarosegelelektrophorese von DNA

Endonukleolytisch verdaute DNA-Fragmente und PCR-Amplifikate wurden in 1,0%-igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurde die Agarose in 1x TAE-Puffer vollständig in einer Mikrowelle aufgelöst, in einem Gelträger mit 6 µL einer Ethidiumbromidlösung (1 mg/L) versetzt und mit der benötigten Anzahl von Kämmen versehen. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurde es zusammen mit dem Gelträger in eine mit 1x TAE-Puffer befüllte Elektrophoresekammer gelegt. DNA-Proben ohne Ladepuffer wurden mit 1/6 Volumen eines 6x DNA-Ladepuffers versetzt und die gesamte Probe vollständig in die Taschen des Gels pipettiert. Als Größenstandard diente die GeneRuler 1 kb Plus DNA-Leiter (Thermo Fisher Scientific GmbH, Darmstadt, Deutschland). Die Proben wurden anschließend für 40 bis 60 Minuten bei einer Spannung von 120 Volt aufgetrennt und mit dem Geldokumentationssystem E-BOX VX2 dokumentiert.

50x Tris-Acetat EDTA (TAE)-Puffer (2 L)

Tris-HCl 484 g Essigsäure 114,2 mL EDTA 18,6 g pH auf 8,3 bis 8,5 mit HCl einstellen

2.13.6 Aufreinigung von Nukleinsäuren und Plasmiden aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten und Plasmiden aus einem Agarosegel erfolgte gemäß der Herstellerangaben durch das NucleoSpin[®]Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht detektiert und mit einem Skapell ausgeschnitten. Zur Elution der DNA wurden die Säulen für zwei Minuten mit 25 μL ddH₂O, das auf 70 °C erhitzt wurde, inkubiert.

2.13.7 Plasmidminipräparation

Die Präparation von Plasmiden erfolgte aus 4 mL einer Übernachtkultur der benötigten *E. coli*s gemäß der Herstellerangaben durch das NucleoSpin[®] Plasmid EasyPure Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) und die Konzentration des erhaltenen Plasmids wurde anschließend am NanoDrop 2000 Spektrophotometer (2.13.2) bestimmt.

2.13.8 Plasmidmidipräparation

Für die Transformation von Protoplasten (3.9.2) wurden jeweils 15 bis 20 µg DNA verwendet, wodurch größere Mengen der Plasmide mit dem NucleoBond[®] Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) gemäß der Herstellerangaben extrahiert wurden. Um die Plasmidausbeute zu erhöhen, wurde die Zentrifugation zum Pelletieren der Plasmid-DNA für eine Stunde bei 4000 rpm und 4 °C durchgeführt.

2.13.9 Herstellung chemisch kompetenter E. coli Zellen

Zur Herstellung von chemisch kompetenten Top10 und BL21 Star Zellen wurden 2 mL LB-Medium (2.10) mit dem jeweiligen *E. coli* Stamm inokuliert und über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler bei 180 rpm inkubiert. Diese Vorkultur wurde in 100 mL LB-Medium überführt und bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,5 bei 37 °C und 180 rpm weiterkultiviert. Anschließend wurde die Kultur auf zwei 50 mL Falkongefäße aufgeteilt und für 10 Minuten auf Eis gekühlt, um sie daraufhin mit 4000 rpm bei 4 °C für 10 Minuten zu zentrifugieren. Der Überstand wurde verworfen, und die Pellets jeweils in 40 mL Inoe-Puffer aufgenommen und erneut für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die Pellets jeweils in 3,75 mL Inoe-Puffer gelöst und vereint. Anschließend wurden 600 µL DMSO zu der Bakteriensuspension gegeben und die chemisch kompetenten Zellen als 100 µL Aliquots in 1,5 mL Eppendorfgefäßen überführt und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

Inoe-Puffer (1L)

MnCl₂ 10,88 g (55 mM) CaCl₂ 2,2 g (15 mM) PIPES (0,5 M, pH 6,7) 20 mL (10 mM) Durch 0,45 μm Filter steril filtrieren

2.13.10 Herstellung elektrokompetenter A. tumefaciens Zellen

Für die Herstellung elektrokompetenter C58C1 Zellen wurden die Agrobakterien in 5 mL LB-Medium (2.10) über Nacht bei 28 °C mit 200 rpm schüttelnd inkubiert. Die Vorkultur wurde zur Inokulation der Hauptkultur verwendet und bei 28 °C mit 200 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,5 weiterkultiviert. Anschließend wurde die Kultur auf zwei 50 mL Falkongefäße aufgeteilt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die gekühlten Bakterien wurden für 10 Minuten mit 4000 rpm bei 4 °C zentrifugiert und die Pellets in jeweils 10 mL Glycerin (10%) resuspendiert. Die Suspensionen wurden vereint und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 15 mL Glycerin (10%) gelöst, erneut zentrifugiert und in 10 mL Glycerin (10%) aufgenommen. Nach der finalen Zentrifugation wurde das Pellet in 2 mL Glycerin (10%) aufgenommen und als 80 μ L Aliquots in 1,5 mL Eppendorfgefäßen überführt. Die Aliquots wurden sofort im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.13.11 Transformationsmethoden

2.13.11.1 Hitzeschock-Transformation von E. coli

Für die Transformation von *E. coli* Zellen wurden 100 μL chemisch kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit 100 ng Plasmid gemischt. Der Ansatz wurde 15 Minuten auf Eis inkubiert, gefolgt von einem 30-sekündigen Hitzeschock bei 42 °C. Anschließend wurden die Zellen für zwei Minuten auf Eis inkubiert und mit 300 μL LB-Medium (2.10) zur Regeneration versetzt, die eine Stunde bei 37 °C mit 450 rpm erfolgte. Danach wurden 50 μL und 100 μL der Zellen auf LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Gewachsene Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR (2.10.3.3) auf das Vorhandensein des eingebrachten Plasmids überprüft.

2.13.11.2 Elektroporation von A. tumefaciens

Für die Transformation von *A. tumefaciens* Zellen wurden 80 μL elektrokompetente Zellen auf Eis aufgetaut und in einer Elektroküvette mit 100 ng Plasmid gemischt. Der Ansatz wurde 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend in den Eppendorf Eporator eingelegt. Die Transformation erfolgte durch einen Stromimpuls bei 1440 Volt. Zur Regeneration wurden die Bakterien in 400 μL LB-Medium (2.10) aufgenommen und für zwei Stunden bei 28 °C mit 500 rpm inkubiert. Anschließend wurden 50 μ L und 100 μ L der Transformationsansätze auf LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und für 48 Stunden bei 28 °C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR (2.10.3.3) auf das Vorhandensein des eingebrachten Plasmids überprüft.

2.13.11.3 Transformation von S. cerevisiae

Für die Transformation von Saccharomyces cerevisiae (S. cerevisiase) wurden 5 mL YPD-Medium (2.10) mit einer einzelnen Kolonie des AH109-Stammes inokuliert und über Nacht bei 30 °C und 250 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurde diese Vorkultur zum Animpfen einer 100 mL YPD-Hauptkultur verwendet, die bei 30 °C und 250 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 weiterkultiviert wurde. Anschließend wurde die Kultur auf 50 mL Falkongefäße verteilt und mit 1000 rpm für acht Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstands wurde das Pellet in 25 mL sterilem TE-Puffer aufgenommen, erneut zentrifugiert, und der Überstand wieder verworfen. Das erhaltene Pellet wurde in 1,5 mL 1x TE/1x LiAc-Puffer resuspendiert und bis zur Transformation gelagert. Für die Transformation wurden 0,1 µg des Plasmids mit 0,1 g carrier DNA in ein 1,5 mL Reaktiongefäß gemischt. Jeder Transformationsansatz wurde mit 100 µL der kompetenten S. cerevisiae Zellen gemischt und anschließend mit 600 µL sterilen PEG(50%)/LiAc versetzt. Die Transformationsansätze wurden 30 Minuten bei 30 °C und 200 rpm inkubiert, dann mit 70 µL DMSO versetzt und einem Hitzeschock bei 42 °C für 15 Minuten unterzogen. Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen für zwei Minuten auf Eis inkubiert, fünf Sekunden mit 14000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand verworfen, und das Pellet in 100 µL TE-Puffer aufgenommen. Die transformierten Hefezellen wurden schließlich auf Selektionsmedium ausgestrichen und für zwei Tage bei 30 °C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR (2.10.3.3) auf das Vorhandensein des eingebrachten Plasmids überprüft.

2.13.12 Hefe-2-Hybrid-Effektor Interaktionsexperimente

Für die in Warwick (Ntoukakis Lab) durchgeführten Hefe-2-Hybrid-Effektor Interaktionsexperimente wurden die in pDEST22 eingebrachten SAUL1 Genkonstrukte (Tab.8) mit der vom Ntoukakis Lab bereitgestellten Effektor libraries von P. syringae und *H. arabiodpsidis* untersucht. Hierfür wurden 15 μL von pDEST22_SAUL1, pDEST22_SAUL1_{ΔUbox} und pDEST22 SAUL1_{ΔNΔC} tragenden Y8800 S. cerevisiae zusammen mit den pDEST32 Effektor tragenden Y8894 S. cerevisiae in YPDA-Medium (2.10) kultiviert, um ein erfolgreiches "Mating" der Hefen zu ermöglichen. Die kombinierten Hefen wurden in einer 96-Well Platte in 100 µL YPDA-Medium gegeben und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden diese in Selektionsmedium überführt und erneut über Nacht bei 30 °C inkubiert. Hierfür wurden jeweils 100 µL von fünf verschiedenen Nährmedien mit dem "Mating-Ansatz" inokuliert: eine H₂O-Kontrolle, SD -LW, SD -LWH, SD -LWH + 1 mM 3-AT und SD -LWH + 5 mM 3-AT. Am folgenden Tag wurde das Hefewachstum anhand der OD₆₀₀ mittels Platereader ermittelt, eine OD₆₀₀ > 0,6 galt als positives Wachstum. Potentielle Interaktionen wurden anschließend durch einen Tröpfeltest auf Selektionsplatten SD -LWH + 1 mM 3-AT und eine SD -LW Wachstumskontrollplatte überprüft, um die Interaktion zu bestätigen.

2.13.13 Herstellung von Glycerindauerkulturen

Zur Langzeitlagerung der hergestellten transformierten *E. coli, A. tumefaciens* und *S. cerevisiae* Zellen wurden 650 μ L einer Übernachtkultur mit 350 μ L Glycerol (80%) versetzt und gemischt. Anschließend wurden diese bei -80 °C gelagert.

2.13.14 Sequenzierung

Die generierten DNA-Konstrukte wurden als Plasmid mithilfe des GeneWiz Sequenzierungsservice verfiziert. Hierfür wurden 5 μ L des DNA-Templates mit einer Konzentration von 80 ng/ μ L mit 5 μ L des benötigten Primers (10 μ M) versetzt und bei der Firma in Auftrag gegeben.

2.13.15 In silico Sequenzanalyse und Primerdesign

Die *in silico* Klonierung, das Erstellen von Vektorkarten und Primer sowie die Auswertung von Sequenzanalysen wurde mit dem Programm CloneManager Professional 9 durchgeführt.

2.14 Proteinbiochemische Methoden

2.14.1 Expression von rekombinanten Proteinen in E. coli

Die Expression von rekombinanten SAUL1-Proteinen in *E. coli* wurde basierend auf der Dissertation von Jan Knop (2019) durchgeführt. Es wurden 1 L 2YT-Medium (2.10) mit einer 2 mL Übernachtkultur inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. Nach Erreichen der OD₆₀₀ wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 M Isopropyl-β-thiogalactosid (IPTG) induziert und die Kultur für 20 Stunden bei 18 °C mit 180 rpm inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend in zwei 250 mL Zentrifugenflaschen mit 8000 rpm bei 4 °C für 20 Minuten abzentrifugiert und das Pellet wurde bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

2.14.2 Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

Das in Abschnitt 2.14.1 erhaltene Bakterienpellet wurde für die Extraktion von rekombinantem GST-SAUL1 oder GST-SAUL1_{R736A} in 40 mL SAUL1-Puffer aufgenommen, mit 1 mg/mL Lysozym versetzt und für zwei Stunden bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss mittels Sonifizierung. Dabei wurde die Bakteriensuspension für 10 Zyklen mit 30-sekündiger Sonifizierung bei einem Output von 50% aufgebrochen. Nach dem Zellaufschluss wurde die Suspension in ein Zentrifugengefäß überführt und bei 4 °C mit 18000x g für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen 45 µm Filter filtriert und in einen 50 mL Superloop gefüllt. Für die folgende Affinitätschromatographie wurde das ÄKTA™ pure 25L System mit einer GST-Trap™ 4B Säule verwendet. Die Proteinlösung wurde mit SAUL1-Puffer und einer Flussrate von 0,1 mL/min auf die Säule geladen und anschließend mit drei Säulenvolumen (CV) SAUL1-Puffer gewaschen. Zur Elution der gebundenen rekombinanten SAUL1-Proteine wurde die Säule mit drei CV SAUL1-Elutionspuffers gespült und die Eluate in 2 mL Fraktionen gesammelt. Die Proteinkonzentration wurde am Nanodrop

2000 Spektrophotometer unter Verwendung des Extinktionsfaktors und Molekulargewichts des rekombinanten Proteins bestimmt und für weitere Experimente verwendet.

Zum Entfernen des GST-Tags wurde ein Verdau mit 10 U PreScission[™] Protease/1 mg Protein (GE Healthcare, jetzt Cytiva, Chicago, USA) durchgeführt. Diese Protease schneidet in der spezifischen LeuGluValLeuPheGln/GlyPro Sequenz zwischen den Gln- und Gly-Resten. Anschließend wurde das rekombinante SAUL1 oder rekombinante SAUL1_{R736A} mittels Größenausschlusschromatographie (GPC) auf einer HiLoad[™] 16/600 200 column (GE Healthcare, jetzt Cytiva, Chicago, USA) weiter gereinigt. Dabei wurde das Protein mit einer Flussrate von 1 mL/min anhand der Größe aufgetrennt und in 2 mL Fraktionen gesammelt.

SAUL1-Puffer Tris-HCl 50 mM NaCl 250 mM AEBSF 0,1 mM pH 9,0 mit NaOH

SAUL1-Elutionspuffer Tris-HCl 50 mM NaCl 250 mM AEBSF 0,1 mM

Glutathion 50 mM pH 9,0 mit NaOH

2.14.3 Proteindetektionsmethoden

2.14.3.1 Denaturierende Polyacrylamidgelektrophorese (SDS-PAGE)

Aufgereinigte rekombinante Proteine wurden anhand ihrer Molekülmasse mittels SDS-PAGE analysiert. Hierfür wurden 10%-ige Trenngele vorbereitet, anschließend mit 5%-igen Sammelgelen überschichtet und mit Kämmen versehen. Die für die SDS-PAGE verwendeten Proben wurden im Verhältnis 1:6 mit 6x Laemmli-Puffer versetzt und für fünf Minuten bei 95 °C inkubiert. Als Größenstandard wurde die 5 µL PageRuler™Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific GmbH, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V für 90 Minuten. Nach der Elektrophorese wurde das SDS-Gel dreimal für jeweils 10 Minuten in ddH₂O gewaschen und anschließend für weitere Analysen verwendet.

Sammelgel (10%) (4 Gele)

ddH₂O 8 mL 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) 5,2 mL 30% Acryl/bisacrylamid Mix 37,5:1 6,8 mL SDS 10% 200 μL APS 10% 200 μL TEMED 20 μL

Trenngel (5%) (4 Gele)

ddH₂O 5,44 mL 1M Tris-HCl (pH 6,8) 1,04 mL 30% Acryl/bisacrylamid Mix 37,5:1 1,36 mL SDS 10% 80 μL APS 10% 80 μL TEMED 8 μL

10x SDS-Laufpuffer pH 8,3 (1 L)

Tris-HCl	30,3 g
Glycin	144,1 g
SDS	10 g

2.14.3.2 Colloidale Coomassie G-250 Färbung

Nach dem Waschen der SDS-Gele wurden diese in eine Schale überführt und mit colloidaler Coomassie-Färbelösung versetzt und für 12 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Gele mit ddH₂O oder Entfärbelösung behandelt, bis die Proteinbanden klar zu erkennen waren. Die Coomassie-Färbelösung wurde gemäß Dyballa und Metzger 2009 angesetzt.

Colloidale Coomassie G-2	50 Färbelösung (2	L) Entfärbelösung (1 L)
CBB G-250	0,4 g	Ethanol (96%)	100 mL
Aluminiumsulfat	100 g	Orthophosphorsäure (85%)	23,5 mL
Ethanol (96%)	200 mL		
Orthophosphorsäure (85%)	47 mL		

2.14.3.3 Westernblotting

Zur Immundetektion von aufgereinigten rekombinanten Proteinen wurden diese nach einer SDS-PAGE mittels Semi-dry Westernblot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dafür Lagen Whatman-Papier, wurde ein Sandwich aus zwei gefolgt von der Nitrocellulosemembran, dem SDS-Gel und von zwei weiteren Lagen Whatman-Papier zusammengesetzt. Alle Lagen wurden zuvor mit 1x Westernblottransferpuffer angefeuchtet. Die Proteine wurden bei 60 mA für 75 Minuten auf die Nitrocellulosemembran transferiert. Anschließend wurde die Membran mit 1x TBS gewaschen und über Nacht freie Bindestellen auf der Membran mit Hilfe einer Blocking-Lösung bei 4 °C blockiert. Am nächsten Tag wurde die Blocking-Lösung entfernt und die Membran zweimal für fünf Minuten mit 1x TBS-T gewaschen. Danach wurde die Membran für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit der ersten Antikörperlösung (Tab.6) inkubiert. Nach dem Entfernen der ersten Antikörperlösung wurde die Membran erneut zweimal für fünf Minuten mit 1x TBS-T gewaschen und anschließend für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit der zweiten Antikörperlösung inkubiert. Nach der Inkubation mit der zweiten Antikörperlösung wurde diese entfernt, die Membran mit 1x TBS-T gewaschen und für die Detektion der Chemilumineszenz vorbereitet. Für diese wurde das Pierce™ ECL Westerm Blotting Substrat (Thermo Fisher Scientific GmbH, Darmstadt, Deutschland) gemäß der Herstellerangaben verwendet und am ChemiDoc™ Touch Imaging System (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland) detektiert.

10x Westernt	ransferpuffer (1L)	10x TBS (1 L)
Tris-HCl (pH 8,3)	30,3 g	Tris-HCl (pH 7,6)	60,57 g
Glycin	144,1 g	NaCl	87,66 g
Zu 1x Lösung 80 mL E	thanol (96%) hinzugeben		

1x TBS-T (1L) 10x TBS 100 mL Tween-20 250 μL Blocking-Lösung Magermilchpulver 2 g 1x TBS-T 50 mL

Antikörper-Lösung Magermilchpulver 0,5 g 1x TBS-T 50 mL Antikörper hinzugeben

2.14.3.4 Protein-Lipid-Overlay Assay

Für den Protein-Lipid-Overlay Assay mit rekombinanten SAUL1-Proteinen wurden kommerziell erhältliche PIP-Strip-Membranen (invitrogen, Thermo Fisher Scientific GmbH, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Membranen wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einer TBS-T BSA Blocking-Lösung inkubiert und anschließend dreimal mit TBS-T gewaschen. Auf die Membran wurde eine Lösung von 10 mL TBS-T mit 20 µg/mL des aufgereinigten GST-SAUL1 oder GST-SAUL1_{R736A} gegeben und über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal mit TBS-T BSA Blocking-Lösung gewaschen und für die zuvor beschriebene Detektion der Chemilumineszenz vorbereitet.

TBS-T Blocking-Lösung (100 mL) Tris-HCl (pH 8) 0,12 g NaCl 0,88 g BSA (Fettsäurenfrei) 3 g

2.14.3.5 CD-Spektroskopie

Die strukturelle Analyse von rekombinanten SAUL1 und SAUL1_{R736A} wurde in Kooperation von Sven Falke (DESY) durchgeführt (Knop *et al.* 2021).

2.15 Bildgebende Methoden

2.15.1 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

Zur Untersuchung der SAUL1-Membranaffinität von ARM-Teildomänen sowie der Analyse von SAUL1-Membranflecken und Vesikeln wurde die Leica TCS SP8 konfokale Plattform (Leica Micyrosystems) verwendet. Mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie wurde die subzelluläre Lokalisation der Fluorophor-Fusionsproteine in A. thaliana Mesophyllprotoplasten, N. benthamiana Epidermiszellen und A. thaliana Pflanzengewebe untersucht. Dabei wurden GFP-Fusionsproteine mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm angeregt und im Detektionsfenster von 495 bis 510 nm detektiert. YFP-Fusionsproteine wurden mit einer Anregungswellenlänge von 514 angeregt und ihre Fluoreszenz in einem Detektionsfenster von 520 bis 535 nm aufgenommen. Für die Anregung von FM4-64 mCherry-Fusionsproteinen des Membranmarkers und wurde eine Anregungswellenlänge von 587 beziehungsweise 515 nm verwendet. Die Fluoreszenz von FM4-64 wurde im Detektionsfenster von 555 bis 562 nm und von mCherry von 605 bis 615 nm aufgenommen. Die Chlorophyllfluoreszenz wurde in einem Detektionsfenster von 680 bis 700 nm erfasst.

Zur Erstellung der Videos für die Untersuchung der Membranfleckendynamik wurde ein xyt-Scan über einen Zeitraum von 30 Minuten durchgeführt. Dafür wurden dynamische Bereiche ausgewählt und alle 30 Sekunden automatisch Bilder aufgenommen, die zu einem Video zusammengefügt wurden.

52

2.15.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurden 1 cm² große Blattschnitten mit Fixans (2,5 % Glutaraldehyd in PBS) vorfixiert. Anschließend wurden die Proben im HPI (UKE Hamburg) von Carola Schneider nach den Methoden von Reynolds (1963) und Spurr (1969) für die TEM-Experimente präpariert und durchgeführt.

3. Ergebnisse

Die membranständige Ubiquitin-Ligase SENESZENZ-ASSOZIIERTE UBIQUITIN-LIGASE 1 (SAUL1) ist in Arabidopsis thaliana ein positiver Regulator der pflanzlichen Immunantwort (Disch et al. 2016 Tong et al. 2017, Liang et al. 2019). Der genaue Wirkmechanismus konnte bisher nicht entschlüsselt werden, daher ist die Untersuchung der Funktion von SAUL1 an der Plasmamembran für das Verständnis der pflanzlichen Immunantwort von großer Bedeutung. Die Homöostase von SAUL1 wird von zwei NLR-Komplexen aus TIR-NBS2 (TN2) und SUPPRESSOR OF CHILLING SENSITIVE 1 3 (SOC3), sowie CHILLING SENSITIVE 1 (CHS1) und SOC3 überwacht. Dabei bedienen sich beide Komplexe unterschiedlicher Signalwege bei denen die Expression von Immunmarkergene wie ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1 (EDS1) und PHYTOALEXIN DEFICIENT 4 (PAD4) induziert wird (Disch et al. 2016 Tong et al. 2017, Liang et al. 2019). Eine gestörte Homöostase von SAUL1, wie in saul1-1 knock-out Mutanten oder bei dessen Überexpression, wird von CHS1/SOC3 oder TN2/SOC3 als quards des SAUL1-Proteins erkannt und löst eine Immunantwort aus. Daher scheint SAUL1 als positiver Regulator der pflanzlichen Immunantwort ein potentielles Ziel für pathogen-assoziierte Effektoren darzustellen. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden Hefe-2-Hybrid-Effektor Interaktionsexperimente mit SAUL1 und Effektoren aus Pseuodomonas syringae (P. syringae) und Hyaloperonospora arabidopsidis (H. arabidopsidis) durchgeführt.

3.1 SAUL1 interagiert nicht mit pathogen-assoziierten Effektoren

Mittels der Hefe-2-Hybrid-Effektor Interaktionsexperimente (2.10.12) wurde die mögliche Interaktion des SAUL1-Proteins mit pathogen-assoziierten Effektoren in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerivisae* (*S. cerivisae*) getestet. Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit dem Labor von Vardis Ntoukakis (University Warwick, UK) durchgeführt, welches die Effektor *libraries* von *P. syringae pv. tomato* und von *H. arabidopsidis* zur Verfügung stellte. Im Hefe Bindedomänen (BD)-Vektor wurden die Effektoren C-terminal mit der Bindedomäne des Transkriptionsfaktors fusioniert, der die Expression des Histidinsynthasegens von *S. cerevisiae* induziert. In den Vorarbeiten wurden das SAUL1 Volllängenprotein sowie die verkürzten Proteine SAUL1_{ΔNΔC} und SAUL1_{ΔUbox} in den Hefe Aktivierungsdomänen (AD)-Vektor pDEST22 kloniert und in den *mating*-kompatiblen Hefestamm *S. cerevisiae* Y8800 transformiert (2.10.11.3). Beim *mating* handelt es sich um eine Methode zur Transformation von Hefe, bei der durch Zellfusionierungen das genetische Material sowie die Plasmide in einer Tochterzelle vereint werden. Ähnlich zum BD-Vektor wurden die SAUL1-Konstrukte C-terminal mit der Aktivierungsdomäne des gleichen Transkriptionsfaktors fusioniert. Bei einer Interaktion zwischen den untersuchten Proteinen kommen BD- und AD-Domänen des Transkriptionsfaktors so nahe zueinander, dass die Transkription des Histidinsynthasegens aktiviert wird und die Hefen auf Histidin-Mangelmedium überleben.

In der Interaktionsstudie wurden die potentiellen Interaktionen der drei SAUL1-Proteine gegen 25 *P. syringae* und 181 *H. arabidopsidis* Effektoren getestet. Nach dem *mating* wurden die Hefen auf Medium ohne Leucin (L) und Tryptophan (W) überführt, um den erfolgreichen Transfer der Plasmide in die Tochterhefen nachzuweisen (2.13.12). Nur Hefen die beide Vektoren trugen und die entsprechenden Kandidatenproteine für die Interaktionsstudie exprimierten, konnten auf dem -LW Medium wachsen (Abb.6). Anschließend wurden die BD- und AD-fusionierten Proteine auf eine potentielle Interaktion auf Medium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin (-LWH) untersucht. Hierfür wurde das Wachstum der Hefen photometrisch anhand der OD₆₀₀ bestimmt. Eine potentiell positive Interaktion wurde definiert, wenn das Hefewachstum eine OD₆₀₀ > 0,6 erreichte. Nach dreimaliger Durchführung des Experiments konnten die in Tabelle 16 beschriebenen potentiellen Interaktionen von SAUL1 und einem Effektor gefunden werden.

Potentielle Interaktionen		
Effektor	SAUL1 Konstrukt	
PtoHopO1-1	SAUL1 Volllänge, SAUL1 $_{\Delta N\Delta C}$, SAUL1 Δ_{Ubox}	
PtoHopM1	SAUL1 Volllänge, SAUL1 _{ANAC}	
HaRxL22	SAUL1 Volllänge, SAUL1∆Ubox	
HaRxL101	SAUL1 Volllänge, SAUL1 _{ΔΝΔC} , SAUL1 _{ΔUbox}	
HaRxL110	SAUL1 Volllänge, SAUL1 _{ΔΝΔC} , SAUL1 _{ΔUbox}	
HaRxLL471	SAUL1 Volllänge, SAUL1 _{∆Ubox}	
gene id 809201 (A3)	SAUL1 Volllänge	
ATR1-EMOY2	SAUL1 _{AUbox}	
HaRxLL448	SAUL1 _{AUbox}	
HaRxLL449	SAUL1 $_{\Delta N \Delta C}$, SAUL1 $_{\Delta U box}$	
HpRxLL214	SAUL1 _{∆∪box}	

Fabelle 16: Potentielle Interaktionen von SAUL1 und	d einem <i>P. syringae</i> oder <i>I</i>	H. arabidopsidis Effektor.
---	--	----------------------------

Potentielle Interaktionen sollten anschließend zusammen mit den in Warwick etablierten Positiv- und Negativkontrolle auf selektivem Festmedium (2.10.12) bestätigt werden (Abb.6). Alle getesteten Kombinationen wuchsen auf dem -LW Selektionsmedium, was ein erfolgreiches *mating* bestätigte. Jedoch war auf dem -LWH 3-AT Medium im Vergleich zu den verwendeten Positivkontrollen nur begrenztes Hefewachstum zu beobachten (Abb.6). Eine Interaktion von SAUL1 mit einem der getesteten Effektoren konnte demnach nicht bestätigt werden.



Abbildung 6: Hefewachstumstest zur Überprüfung potentieller Interaktionen von SAUL1 mit *P. syringae* oder *H. arabidopsidis* Effektoren. Gezeigt sind die Wachstumskontrollen für das *mating* (-LW) sowie die Interaktionsplatten (-LWH 3-AT). Anhand der Wachstumskontrollen wurde das Vorhandensein der rekombinanten SAUL1-Proteine und Effektoren nachgewiesen. Auf den Selektionsplatten konnte neben den Positivkontrollen nur bei Verwendung unverdünnter Hefekulturen Wachstum bei potentiellen Interaktionen von SAUL1 mit Pseudomonas Effektoren beobachtet werden. Bei niedrigeren Titern war kein Wachstum und keine Interaktion nachweisbar.

Im Hefe-2-Hybdrid-System wurde keine Interaktion zwischen den rekombinanten SAUL1-Proteinen und den Effektoren von *P. syringae* oder *H. arabidopsidis* Effektoren nachgewiesen. Möglicherweise führte die Ubiquitin-Ligase Aktivität von SAUL1, einem pflanzlichen Gen, das in *S. cerevisiae* exprimiert wurde, zu Problemen im Expressionssystem. Zur Umgehung dieses Problems wurden Co-Immunopräzipitationsstudien (Co-IP) in Tabakepidermiszellen durchgeführt. Dabei wurden *P. syringae* Effektoren im Expressionsvektor pGWB605 C-terminal mit GFP fusioniert und in *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*) Epidermiszellen transient exprimiert. Im Rahmen der von mir betreuten Masterarbeit von Maria Sindalovskaya wurde die Interaktion zwischen SAUL1 und den

Effektoren PtoAB2, PtoM1 und PtoN1 untersucht (Sindalovskaya, 2021). Während die Expression der jeweiligen Proteine in Westernblot Experimenten gezeigt werden konnte, wurde keine Interaktion von SAUL1 mit den Effektorproteinen nachgewiesen.

3.2 SAUL1s Eigenschaften und Verhalten an der Plasmamembran

3.2.1 SAUL1 benötigt eine intakte ARM₇₋₁₁ Domäne zur Membranassoziation

Das SAUL1-Protein fungiert membranständige E3-Ubiquitin-Ligase und ist über seine Armadillo-ähnliche ARM₇₋₁₁ Domäne an der Plasmamembran assoziiert (Drechsel *et al.* 2011). Experimente mit dem verkürzten GFP-SAUL1 Δ ARM₇₋₁₁ Protein, bei dem die ARM₇₋₁₁ deletiert wurde, zeigten einen Verlust der Membranassoziation. Im Gegensatz dazu wurde das GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ Protein, das aussschließlich die ARM₇₋₁₁ Domäne umfasst, vollständig an der Plasmamembran lokalisiert. Demzufolge ist die ARM₇₋₁₁ Domäne für die Membranaffinität von SAUL1 von entscheidender Bedeutung. Abbildung 7 zeigt die Lokalisation verschiedener GFP-SAUL1 Fusionsproteine (2.12.1) in *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten (2.9.2).



Abbildung 7: Lokalisation von GFP-SAUL1 Fusionsproteinen in transient transformierten *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten. Das Fluoreszenzsignal der Fusionsproteine ist in Grün und die Chlorophyllfluoreszenz in Rot dargestellt. Einzelbilder zeigen das Fluoreszenzsignal einer Ebene für (**A**) GFP-SAUL1, (**B**) GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁, (**C**) GFP-SAUL1ΔARM₇₋₁₁ dessen cytoplasmatisches Signal mit einem Pfeil markiert ist, (**D**) freies GFP, sowie die Maximumsprojektion (**E**) von GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ und (**F**) GFP-SAUL1ΔARM₇₋₁₁. Die ARM₇₋₁₁ Domäne ist für die Assoziation von SAUL1 an der Plasmamembran erforderlich. Die Messbalken entsprechen 10 μm.
Das GFP-SAUL1 Protein und das verkürzte GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ Protein waren an der Plasmamembran der Protoplasten lokalisiert (Abb.7 A, B). Durch das Fehlen der ARM₇₋₁₁ Domäne im verkürzten GFP-SAUL1ΔARM₇₋₁₁ Protein konnte SAUL1 nicht an der Plasmamembran assoziieren und lag ähnlich wie freies GFP im Cytoplasma des Protoplasten vor (Abb.7 C, D). In der Maximumsprojektion von GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ konnte eine ungleichmäßige Verteilung des Proteins an der Plasmamembran gezeigt werden (Abb.7 E). Im Vergleich dazu lag GFP-SAUL1ΔARM₇₋₁₁ frei im Cytoplasma vor (Abb.7 F). Aus diesen Ergebnissen konnte abgeleitet werden, dass die ARM₇₋₁₁ Domäne zur Assoziation von SAUL1 an der Plasmamembran erfordelich ist.

Daraufhin stellte sich die Frage, welcher Teil der ARM₇₋₁₁ Domäne für die Plasmamembranassoziation von SAUL1 relevant ist. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurden Verkürzungen an der ARM₇₋₁₁ Domäne in ihre Teildomänen vorgenommen und auf deren Affinität zur Plasmamembran untersucht (2.6.1). Die dabei durchgeführten Veränderungen der ARM₇₋₁₁ Domäne sind schematisch in Abbildung 8 dargestellt.



Abbildung 8: Schematische Darstellung der kodierenden Sequenz der ARM₇₋₁₁ Domäne. Zur Identifizierung der für die Membranassoziation relevanten Bereiche der ARM₇₋₁₁ Domäne wurden verkürzte GFP-Fusionsproteine hergestellt, bei denen einzelne Domänen entfernt wurde. Diese wurden auf ihre Affinität zur Plasmamembran untersucht. Der Maßstab ist in 100 bp angegeben.

Experimentell wurde die gesamte ARM₇₋₁₁ Domäne in ihre Teildomänen ARM₇ und ARM₁₁ sowie zusammenhängende Kombinationen, bei denen entweder ARM₇ oder ARM₁₁ fehlten, verkürzt. Hierfür wurden durch die Verwendung spezifischer Primerpaare (Tab.13) ein

ATG-Startkodon und ein TAA-Stopkodon mittels PCR (2.13.3.1) an die entsprechenden ARM-Domänen angefügt. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden anschließend mittels BP-Reaktion in den pDONR[®]221-Vektor kloniert. Für die Lokalisationsexperimente wurden die ARM₇₋₁₁ Teildomänen in den pflanzlichen Expressions-Vektor pMDC43 übertragen und dabei N-terminal mit GFP fusioniert (2.10.4.1). Abbildung 9 zeigt die Lokalisation der GFP-fusionierten ARM-Teildomänen in repräsentativen Mesophyllprotoplasten.



Abbildung 9: Lokalisation von verkürzten GFP-ARM₇₋₁₁ Proteinen in *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten. Das Fluoreszenzsignal der Fusionsproteine ist in Grün und die Chlorophyllfluoreszenz in Rot dargestellt. Gezeigt sind (A) GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁, (B) GFP-SAUL1ARM₇₋₁₀, (C) GFP-SAUL1ARM₈₋₁₁, (D) GFP-SAUL1ARM₈₋₁₀, (E) GFP-SAUL1ARM₇ und (F) GFP-SAUL1ARM₁₁. Durch das Entfernen einer einzelnen ARM-Teildomäne verlor SAUL1 seine Affinität zur Plasmamembran. Die Messbalken entsprechen 10 μm.

Bereits die Verkürzung um eine einzelne Teildomäne der ARM₇₋₁₁ Domäne von SAUL1 führte zum Verlust der Membranaffinität, denn nur das GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ Fusionsprotein mit der vollständigen ARM₇₋₁₁ Domäne konnte an der Plasmamembran lokalisiert werden (Abb.9 A). Das Fehlen einer einzelnen Teildomäne führte bei den GFP-SAUL1ARM₇₋₁₀ und GFP-SAUL1ARM₈₋₁₁ Proteinen zum Verlust der Affinität zur Plasmamembran, sodass nur ein cytoplasmatisches Fluoreszenzsignal detektiert wurde (Abb.9 B, C). Auch bei den einzelnen Teildomänen GFP-SAUL1ARM₇ und GFP-SAUL1ARM₁₁ waren die Fusionsproteine nur im Cytoplasma lokalisiert (Abb.9 E, F). Die Verkürzung um die ARM₇ und ARM₁₁ Domäne in GFP-SAUL1ARM₈₋₁₀ resultierte ebenfalls im Verlust der Membranaffinität (Abb.9 D). Bereits in Drechsel *et al.* (2011) konnte das Auftreten einer ungleichmäßigen Verteilung von GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ und von GFP-SAUL1 in etwa 25% aller transformierten Protoplasten an der Plasmamembran in Form von Membranflecken gefunden werden (vgl. Abb.7 E und Abb. 9 A). Diese Eigenschaft wurde noch bei keinem weiteren membranständigen Protein in Pflanzen beobachtet und könnte auf eine SAUL1-spezifische Funktion und möglicherweise auf dessen Mechanismus in der pflanzlichen Immunantwort hinweisen, die im Folgenden untersucht werden sollte.

3.2.2 N-terminale Modifikationen am SAUL1-Protein führen zur Bildung von Membranflecken

Die von Drechsel *et al.* (2011) beobachteten SAUL1-Membranflecken in *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten wurden durch Tao *et al.* (2019) in den Kontext der Abwehr gegenüber Oomyzeten gestellt. Nach einer Infektion mit *Phytophtora capsici* (*P. capsici*) in *N. benthamiana* wurden SAUL1-Membranflecken beobachtet, die mit dem *tethering* der Plasmamembran mit Multivesikulären Körperchen (MVBs) und/oder dem Tonoplasten in Verbindung gebracht wurden. Um die Entstehung von SAUL1-Membranflecken besser zu verstehen, wurden in dieser Dissertation die Vorrausetzungen zur Bildung von SAUL1-Membranflecken untersucht. Hierfür wurde zunächst die subzelluläre Lokalisation und Membranfleckenbildung der GFP-SAUL1 und GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ Fusionsproteine in *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten im Detail betrachtet (Abb.10).



Abbildung 10: Lokalisation und Membranfleckenbildung von GFP-SAUL1 an der Plasmamembran in *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten. Das Fluoresenzsignal der Fusionsproteine ist in Grün und die Chlorophyllfluoreszenz in Rot dargestellt. Gezeigt sind (**A**) gleichmäßig verteiltes GFP-SAUL1, (**B**) ungleichmäßig verteiltes GFP-SAUL1, (**C**) die ungleichmäßige Verteilung von GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁, sowie die Maximumsprojektionen (**D**, **E**, **F**) der in **A**, **B** und **C** gezeigten Protoplasten. Bei einer ungleichmäßigen Verteilung der Fluoreszenzproteine kam es zu SAUL1-Membranflecken. Die Messbalken entsprechen 10 μm.

Aufgrund der Beobachtungen konnten die GFP-SAUL1 und GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ Fusionsproteine in *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten in zwei Verteilungsmuster eingeteilt werden. GFP-SAUL1 war in 40% der transformierten Protoplasten gleichmäßig an der Plasmamembran verteilt (Abb.10 A, D). Die übrigen 60% zeigten eine ungleichmäßige Verteilung des GFP-SAUL1 Proteins mit Bildung von SAUL1-Membranflecken (Abb.10 B, E). Das GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ Fusionsprotein war ebenfalls in Membranflecken an der Plasmamembran zu finden (Abb.10 C, F). Dabei war das Fusionsprotein entweder gleichmäßig über die gesamte Plasmamembran des Protoplasten verteilt oder zeigte eine ungleichmäßige Verteilung, die zur Bildung unterschiedlich großer SAUL1-Membranflecken führte (Abb.10 D - F).

Da in diesem Experiment nur Proteine mit N-terminaler GFP-Fusion verwendet wurden, stellte sich die Frage, ob die Bildung der SAUL1-Membranflecken mit der N-terminalen Fusion zusammenhing. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die Experimente mit *355::YFP-SAUL1*, *355::SAUL1-GFP* und *355::SAUL1ARM*₇₋₁₁-*GFP* wiederholt, um die Membranfleckenbildung zu untersuchen (Abb. 11).



Abbildung 11: Membranfleckenbildung von YFP-SAUL1, SAUL1-GFP und SAUL1ARM₇₋₁₁-GFP in *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten. Das Fluoreszenzsignal der Fusionsproteine ist in Gelb (YFP) oder Grün (GFP) dargestellt, während die Chlorophyllfluoreszenz in Rot gezeigt wird. YFP-SAUL1 zeigte sowohl eine gleichmäßige (**A**) als auch ungleichmäßige (**B**) Verteilung an der Plasmamembran. Im Gegensatz dazu war SAUL1-GFP (**C**) stets gleichmäßig an der Plasmamembran verteilt. SAUL1ARM₇₋₁₁-GFP (**D**) hingegen bildete SAUL1-Membranflecken. Die Maximumsprojektionen (**E** - **H**) verdeutlichten die Beobachtungen. Die Bildung von SAUL1-Membranflecken war nicht vom Fluorophor, sondern von der Ausrichtung der Fusion abhängig. Die Messbalken entsprechen 10 μm.

Die Lokalisationsexperimente der Fusionsproteine zeigten, dass YFP-SAUL1, ähnlich wie GFP-SAUL1, sowohl eine gleichmäßige als auch ungleichmäßige Verteilung an der Plasmamembran aufwies (Abb.11 A, B, E, F). Die ungleichmäßige Verteilung führte zur Bildung von SAUL1-Membranflecken, was darauf hindeutet, dass der verwendete Fluorophor keinen Einfluss auf die Verteilung oder die damit verbundene Membranfleckenbildung hatte. Im Gegensatz dazu war SAUL1-GFP in allen transformierten Protoplasten gleichmäßig an der Plasmamembran verteilt (Abb.11 C, G), was darauf hinweist, dass die Position des Fluorophors entscheidend für die Verteilung von SAUL1 und die Membranfleckenbildung war. Eine N-terminale Fusion begünstigte oder induzierte die Bildung von SAUL1-Membranflecken, während eine C-terminale Fusion diese verhinderte.

Trotz des C-terminal lokalisierten Fluorophors im SAUL1ARM₇₋₁₁-GFP Fusionsprotein wurden SAUL1-Membranflecken an der Plasmamembran gebildet (Abb.11 D, H), was auf eine regulative Funktion der N-terminalen U-box Domäne von SAUL1 bei der Bildung von Membranflecken hindeutet. Das Fehlen oder die Maskierung dieser Domäne scheint die Bildung von SAUL1-Membranflecken zu begünstigen. Um zu überprüfen, ob die U-box Domäne die Membranfleckenbildung reguliert, wurde das SAUL1-Ubox-GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ Fusionsprotein mit intakter U-box und internem GFP generiert und in *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten untersucht (Abb. 12).



Abbildung 12: Membranfleckenbildung von SAUL1-Ubox-GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ in *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten. Das Fluoreszenzsignal des Fusionsproteins ist in Grün und die Chlorophyllfluoreszenz in Rot dargestellt. Die Kontrollen (**A**) GFP-SAUL1 und (**B**) GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ zeigten die erwartete Verteilung der Fusionsproteine an der Plasmamembran. (**C**) Das SAUL1-Ubox-GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ Fusionsprotein mit intakter U-box Domäne und internen GFP war ähnlich dem nativen SAUL1-Protein gleichmäßig an der Plasmamembran verteilt, ohne dass SAUL1-Membranflecken auftraten. Die Messbalken entsprechen 10 μm.

Wie erwartet, waren GFP-SAUL1 und GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ gleichmäßig an der Plasmamembran verteilt oder in Membranflecken zu finden (Abb. 12 A, B). Im Gegensatz dazu war das SAUL1-Ubox-GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ Fusionsprotein ausschließlich gleichmäßig an der Plasmamembran verteilt (Abb.12 C). Die U-box Domäne schien demnach die Bildung von SAUL1-Membranflecken zu verhindern, sodass möglicherweise die N-terminalen Modifikationen der Auslöser zur Membranfleckenbildung waren.

SAUL1-Membranflecken könnten durch eine Interaktion von SAUL1 mit Membranlipiden entstehen, die über eine positive Oberflächenladung der ARM₁₁ Domäne und am C-Terminus vermittelt werden (Knop *et al.* 2021). Diese positiv geladenen Bereiche können mit dem in das Cytoplasma ragenden, negativ geladenen Phosphorsäureresten der Phospholipide interagieren und so zur Assoziation von SAUL1 an der Plasmamembran beitragen. Eine Veränderung der Ladung könnte die Affinität gegenüber geladenen Molekülen beeinflussen, was die Funktion und Lokalisation des Proteins verändern kann. Um die Bedeutung der positiv geladenen Region von SAUL1 für die Membranassoziation zu bestimmen, wurden diese modifiziert und die Lokalisation sowie Membranfleckenbildung der punktmutierten Proteine untersucht.

3.2.3 Die positiv geladene Region um R736 ist essentiell für die SAUL1-Membranfleckenbildung

Die Aufklärung der Raumstruktur von SAUL1 zeigte, dass die positiv geladene Region in SAUL1 aus drei Argininen besteht. Die Arginine R736 und R737 befinden sich am Ende der ARM₁₁ Domäne, während R775 28 Aminosäuren hinter dieser liegen (Knop et al. 2021). Diese Arginine könnten über elektrostatische Wechselwirkungen mit Phospholipiden für die Membranaffinität von SAUL1 und seine Membranfleckenbildung verantwortlich sein. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden die Arginine mittels zielgerichteter Mutagenese (2.10.3.2) durch das ungeladene Alanin (A) ersetzt. Auf diese Weise wurden die einfach punktmutierten SAUL1_{R736A}, SAUL1_{R737A}, SAUL1_{R775A}, die zweifach punktmutierten SAUL1_{R736,737A}, SAUL1_{R736.775A}, SAUL1_{R737,775A} sowie das dreifach punktmutierte SAUL1_{R736,737,775A} hergestellt und N-terminal mit GFP oder YFP fusioniert (Tab.10). Anschließend wurde die Lokalisation und Fähigkeit zur Membranfleckenbildung der punktmutierten SAUL1-Proteine untersucht. In Abbildung 13 ist dies für GFP-SAUL1_{R736A}, GFP-SAUL1_{R737A} und GFP-SAUL1_{R775A} Fusionsproteine in repräsentativen A. thaliana Mesophyllprotoplasten dargestellt.



Abbildung 13: Lokalisation der einfach punktmutierten GFP-SAUL1_{R736A}, GFP-SAUL1_{R737A} und GFP-SAUL1_{R775A} in *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten. Das Fluoreszenssignal des Fusionsproteins ist in Grün und die Chlorophyllfluoreszenz in Rot dargestellt. Gezeigt sind (**A**) GFP-SAUL1_{R736A}, (**B**) GFP-SAUL1_{R737A} und (**C**) GFP-SAUL1_{R775A} sowie die dazugehörigen Maximumsprojektionen (**D**, *E*, *F*). Nur der Austausch von R736 mit Alanin führte zum Verlust der Bildung von SAUL1-Membranflecken, ohne die Lokalisation zu beeinträchtigen. Die Messbalken entsprechen 10 µm.

Der Aminosäureaustausch von R736 durch Alanin hatte keine Auswirkung auf die Lokalisation von SAUL1 an der Plasmamembran (Abb.13 A, D). Das GFP-SAUL1_{R736A} Fusionsprotein war stets gleichmäßig an dieser verteilt, und bildete keine SAUL1-Membranflecken. Im Gegensatz dazu zeigten GFP-SAUL1_{R737A} und GFP-SAUL1_{R775A} im Vergleich zu GFP-SAUL1 keine Veränderungen in der Lokalisation oder Verteilung an der Plasmamembran. Beide Fusionsproteine waren überwiegend in SAUL1-Membranflecken zu finden (Abb.13 B, C, E, F). Diese Ergebnisse zeigten, dass R736 im Vergleich zu R737 und R775 scheinbar für die Bildung von SAUL1-Membranflecken benötigt wird. Im darauffolgenden Experiment wurden die zweifach und dreifach punktmutierten Fusionsproteine GFP-SAUL1_{R736,737A}, GFP-SAUL1_{R736,775A}, GFP-SAUL1_{R737,775A} und GFP-SAUL1_{R736,737,775A} in Α. thaliana Mesophyllprotoplasten untersucht (Abbildung 14).



Abbildung 14: Lokalisation von zweifach und dreifach punktmutierten GFP-SAUL1 Fusionsproteinen in *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten. Das Fluoreszenzsignal des Fusionsproteins ist in Grün und die Chlorophyllfluoreszenz in Rot dargestellt. Gezeigt sind (**A**) GFP-SAUL1_{R736,737A}, (**B**) GFP-SAUL1_{R736,775A}, (**C**) GFP-SAUL1_{R737,775A}, (**D**) GFP-SAUL1_{R736,737,775A} sowie die dazugehörigen Maximumsprojektionen (**E, F, G, H**). In allen Kombinationen mit ausgetauschten R736 war das Fusionsprotein gleichmäßig an der Plasmamembran verteilt, sodass nur GFP-SAUL1_{R737,775A} SAUL1-Membranflecken bilden konnte. Die Messbalken entsprechen 10 µm.

Der Austausch der Arginine R736 und R737 durch Alanin in GFP-SAUL1_{R736,737A} hatte keinen Einfluss auf die Membranaffinität von SAUL1, führte jedoch zum Verlust der Membranfleckenbildung (Abb.14 A, E). Ebenso führte der Aminosäureaustausch in GFP-SAUL1_{R736,775A} zum Verlust der SAUL1-Membranfleckenbildung an der Plasmamembran (Abb.14 B, F). Im Gegensatz dazu war das GFP-SAUL1_{R737,775A} Fusionsprotein weiterhin in SAUL1-Membranflecken an der Plasmamembran verteilt (Abb.14 C, G). Selbst der Austausch aller drei Arginine durch Alanin in GFP-SAUL1_{R736,737,775A} hatte keinen Einfluss auf die Lokalisation von SAUL1, sodass dieses weiterhin gleichmäßig an der Plasmamembran verteilt war (Abb.14 D, H). Basierend auf diesen Beobachtungen resultierte der Austausch von R736 durch Alanin im Verlust der SAUL1-Membranflecken, während die Mutationen von R737 und R775 scheinbar keinen Einfluss auf die Membranfleckenbildung von SAUL1 hatten.

Ob sich der R736A-Austausch auf die SAUL1-Plasmamembranaffinität auswirkte, wurde mit dem Membranmarker FM4-64 getestet (2.9.2.3). Hierfür wurden *35S::GFP-SAUL1* oder *35S::GFP-SAUL1_{R736,737,775A}* exprimierende *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten mit FM4-64 behandelt und die Färbung der Plasmamembran sowie die dazugehörige Lokalisation der SAUL1-Membranflecken untersucht (Abbildung 15).



Abbildung 15: Lokalisation von GFP-SAUL1 und GFP-SAUL1_{R736,737,775A} mit dem Membranmarker FM4-64 in A. thaliana Mesophyllprotoplasten. Das Fluoreszenzsignal des Fusionsproteins ist in Grün, das Signal des Membranmarker FM4-64 in Rot und die Chlorophyllfluoreszenz in Blau dargestellt. Bei einer Überlagerung von GFP und FM4-64 entsteht ein gelbes Signal. (A) Darstellung aller aufgenommenen Kanäle von GFP-SAUL1. (B) Ungleichmäßige Verteilung von GFP-SAUL1 an der Plasmamembran. (C) Gleichmäßige Verteilung von FM4-64. (D) Chlorophyllfluoreszenz. (E) Überlagerung von GFP-SAUL1_{R736,737,775A} und FM4-64. (F) Gleichmäßig verteiltes GFP-SAUL1_{R736,737,775A}. (**G**) FM4-64 gefärbte Plasmamembran. (H) Chlorophyllfluoreszenz. Die Messbalken entsprechen 10 µm.

Durch den Einsatz des Membranmarker FM4-64 konnte die Lokalisation von GFP-SAUL1 Membranflecken an der Plasmamembran bestätigt werden. Bei einer Überlagerung von GFP und FM4-64 entstand ein gelbes Signal, das in den Bereichen mit SAUL1-Membranflecken vollständig überlagerte (Abb.15 A, E). In GFP-SAUL1-freien Bereichen

war nur das Signal von FM4-64 zu erkennen (Abb.15 B, C). Trotz der ungleichmäßigen Verteilung war GFP-SAUL1 an der Plasmamembran assoziiert, und es wurde kein cytoplasmatisches Fluoreszenzsignal detektiert. Auch das Fluoreszenssignal des dreifach punktmutierten Fusionsproteins GFP-SAUL1_{R736,737,775A} überlagerte vollständig mit dem von FM4-64 (Abb.15 E). Beide Fluoreszenzsignale waren gleichmäßig an der Plasmamembran verteilt (Abb. 15 F, G). Somit hatte der Austausch von Arginin durch Alanin keine Auswirkung auf die Plasmamembranaffinität von SAUL1, verhinderte jedoch spezifisch die Bildung von SAUL1-Membranflecken.

Wie in Drechsel *et al.* (2011) beschrieben und in dieser Arbeit reproduziert, zeigten die GFP- und YFP-SAUL1 Fusionsproteine nicht in allen transformierten Protoplasten die gleiche Verteilung. Stattdessen bildeten sich zwei Populationen, von denen eine Membranflecken bilden konnte in der anderen nur eine gleichmäßige Verteilung des Fusionsproteins auftrat. Um das Verhältnis zwischen diesen beiden Populationen zu bestimmen, wurden Protoplasten mit und ohne SAUL1-Membranflecken gezählt und statistisch ausgewertet. Für dieses Experiment wurden die Fusionsproteine GFP-SAUL1 (n = 4228) als Kontrolle, GFP-SAUL1_{R736}, (n = 3054), GFP-SAUL1_{R736}, (n = 3514), GFP-SAUL1_{R737}, (n = 3514), GFP-SAUL1_{R7377}, (n = 3624), GFP-SAUL1_{R736}, (n = 3669), GFP-SAUL1_{R737775A} (n = 3912) sowie GFP-SAUL1_{R736}, (n = 3659) in *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten exprimiert und die Protoplasten anhand der Membranfleckenbildung am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop gezählt (Abb.16 und Tab.17).



Abbildung 16: Anteil von Protoplasten mit und ohne SAUL1-Membranflecken. In drei unabhängigen Experimenten wurden A. thaliana Mesophyllprotoplasten mit GFP-SAUL1, den einfach punktmutierten R736A, R737A und R775A sowie den zweifach und dreifach punktmutierten GFP-Fusionsproteinen transformiert und mindestens 3000 Protoplasten betrachtet. 60% der GFP-SAUL1 transformierten Protoplasten zeigten die Bildung von SAUL1-Membranflecken. Protoplasten mit GFP-SAUL1_{R736A} zeigten nur in 3% der Zellen eine Membranfleckenbildung. Mit GFP-SAUL1_{R737A} bildeten 53% der Protoplasten Membranflecken. GFP-SAUL1_{R775A} führte in 69% der transformierten Protoplasten zur Membranfleckenbildung. Bei mit GFP-SAUL1_{R736,737A} und GFP-SAUL1_{R736,775A} transformierten Protoplasten zeigten jeweils nur 3% SAUL1-Membranflecken. GFP-SAUL1_{R737,775A} hingegen bildete in 37% der Protoplasten Membranflecken. Mit GFP-SAUL1_{R736,737,775A} transformierte Protoplasten zeigten in nur 1% der Zellen Membranflecken.

Die GFP-SAUL1 Kontrolle war in 60% der Protoplasten in Membranflecken an der Plasmamembran verteilt. Der Austausch von Arginin 736 durch Alanin in GFP-SAUL1_{R736A} verhinderte die Membranfleckenbildung nahezu vollständig, da nur in 3% der Protoplasten membranfleckenartigen Strukturen gefunden wurden. Bei den einfach punktmutierten GFP-SAUL1_{R737A} und GFP-SAUL1_{R775A} wurde nur eine geringfügige Veränderung im Anteil der Protoplasten mit Membranfleckenbildung beobachtet. GFP-SAUL1_{R737A} zeigte eine leichte Abnahme auf 53% der Protoplasten mit Membranflecken, während GFP-SAUL1_{R775A} einen leichten Anstieg auf 69% aufwies.

Die zweifach punktmutierten GFP-SAUL1 Fusionsproteine folgten einem ähnlichen Muster, wobei in allen Kombinationen mit einem R736A Austausch fast keine SAUL1-Membranfleckenbildung auftrat. Sowohl GFP-SAUL1_{R736,737A} als auch GFP-SAUL1_{R736,775A} bildeten in jeweils nur 3% der Protoplasten Membranflecken. Bei GFP-SAUL1_{R737,775A} wurde ebenfalls eine Reduktion beobachtet, wobei nur 37% der Protoplasten Membranflecken aufwiesen. Die stärkste Abnahme auf nur 1% Protoplasten mit Membranfleckenbildung wurde bei GFP-SAUL1_{R736,737,775A} festgestellt.

Diese Ergebnisse verdeutlichen die Bedeutung von R736 für die Bildung von SAUL1-Membranflecken. Obwohl GFP-SAUL1_{R737,775A} im Vergleich zur GFP-SAUL1 Kontrolle mehr Protoplasten mit Membranflecken hervorbrachte, wurde die Membranfleckenbildung durch den R736A Austausch in den GFP-SAUL1_{R736A}, GFP-SAUL1_{R736,737A}, GFP-SAUL1_{R736,737A}, und GFP-SAUL1_{R736,737,775A} Fusionsproteinen nahezu vollständig unterbunden. Dennoch konnte in allen Fällen sowohl eine gleichmäßige als auch eine ungleichmäßige Verteilung beobachtet werden, was darauf hinweist, dass die Bildung von SAUL1-Membranflecken keine "entweder… oder…" Antwort darstellt. Besonders da die GFP-SAUL1 Kontrolle in nur 60% der Protoplasten Membranflecken gebildet hat, ließ vermuten, dass die Membranfleckenbildung möglicherweise durch einen spezifischen Stimulus ausgelöst wird. Bevor die Suche nach diesem potentiellen Stimulus aufgenommen wurde, wurden zunächst die Eigenschaften der positiv geladenen Domäne um Arginin 736 genauer untersucht.

3.2.4 Die SAUL1-Membranfleckenbildung benötigt eine geladene Aminosäure an Position 736

Beim Austausch des positiv geladenen Arginin R736 durch das ungeladene Alanin wurde die lokale Ladung des SAUL1-Proteins verändert, was zum Verlust der Membranfleckenbildung führte. Zunächst wurde überprüft, ob das Fehlen dieser positiven Ladung die Proteinstruktur von SAUL1 beeinflusst hat. Zu diesem Zweck wurde das rekombinante SAUL1_{R736A} Protein in *E. coli* BL21 Star Zellen exprimiert und mittels des ÄKTA[™] pure 25L System aufgereinigt (2.14.2). In Zusammenarbeit mit Sven Falke (Deutsches Elektronen Synchrotron, Hamburg) wurde die strukturelle Zusammensetzung des rekombinanten SAUL1_{R736A} Proteins mittels Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie bestimmt. Die erhaltenen Spektraldaten wurden mit den Ergebnissen der strukturellen Analyse des rekombinanten SAUL1-Proteins aus Knop *et al.* (2021) verglichen (Abb. 17).



Abbildung 17: CD-Spektroskopie zum Vergleich von rekombinantem SAUL1 (rot) und rekombinantem SAUL1_{R736A} (blau). Die Darstellung zeigt die Änderung des mittleren residuellen elliptischen Winkels θ_{MRE} im Wellenlängenbereich von 190 bis 260 nm. Die Spektren von SAUL1 und SAUL1_{R736A} verliefen nahezu identisch und deuteten auf keinen strukturellen Unterschied zwischen den beiden Proteinen hin.

Die erhaltenen CD-Spektren der rekombinanten SAUL1 und SAUL1_{R736A} Proteine zeigten keine Unterschiede in ihrer Absorption. Dies deutet darauf hin, dass beide Proteine eine identische Chiralität haben. Folglich wurde eine strukturelle Veränderung von des SAUL1_{R736A} Proteins als Ursache für den Verlust der Membranfleckenbildung ausgeschlossen. Eine naheliegende Ursache für die Abwesenheit von Membranflecken bei SAUL1_{R736A} könnte die Ladungsänderung an Aminosäureposition 736 sein. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden GFP- und YFP-Fusionen mit SAUL1_{R736K} und SAUL1_{R736E} generiert. Wenn die Fähigkeit zur Membranfleckenbildung von SAUL1 von der positiven Ladung des Arginins R736 abhängt, sollte ein Austausch von R736 durch die ebenfalls positiv geladene Aminosäure Lysin (K) keine Auswirkung auf die Membranfleckenbildung haben. Im Gegensatz dazu könnte das Einbringen der negativ geladenen Glutaminsäure (E) die Membranfleckenbildung beeinträchtigen. Die Fusionsproteine wurden in *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten exprimiert, um die Lokalisation und Fähigkeit zur Membranfleckenbildung zu untersuchen (Abb. 18).



Abbildung 18: Lokalisation und Membranfleckenbildung von GFP- und YFP- SAUL1_{R736K} und SAUL1_{R736E} in *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten. Das Fluoreszenzsignal der Fusionsproteine ist in Gelb (YFP) beziehungsweise Grün (GFP) gezeigt, während die Chlorophyllfluoreszenz in Rot dargestellt ist. Gezeigt sind die Maximumsprojektionen mit Membranfleckenbildung von (**A**) GFP-SAUL1_{R736E}, (**B**) YFP-SAUL1_{R736E}, (**C**) GFP-SAUL1_{R736K} und (**D**) YFP-SAUL1_{R736K}. Hingegen zeigten (**E**) GFP-SAUL1_{R736E}, (**F**) YFP-SAUL1_{R736E}, (**G**) GFP-SAUL1_{R736K} und (**H**) YFP-SAUL1_{R736K} eine Gleichverteilung des Fusionsproteins. Nur der Austausch von R736 durch Lysin hatte eine Auswirkung auf die Form der SAUL1- Membranflecken. Die Messbalken entsprechen 10 μm.

Der Austausch von Arginin R736 durch die negativ geladene Glutaminsäure sowie durch das ebenfalls positiv geladene Lysin hatte keinen Einfluss auf die Membranaffinität von SAUL1, da punktmutierten Fusionsproteine GFP-SAUL1_{R736K} und YFP-SAUL1_{R736K} die sowie GFP-SAUL1_{R736K} und YFP-SAUL1_{R736E} an der Plasmamembran der A. thaliana Mesophyllprotoplasten lokalisert werden konnten (Abb.18). Die Fusionsproteine waren unabhängig vom GFP- oder YFP-Tag ungleichmäßig an der Plasmamembran verteilt. Dennoch konnte ein Unterschied zwischen den Membranflecken von SAUL1_{R736K} im Vergleich zu SAUL1 oder SAUL1_{R736E} gefunden werden (vgl. Abb.10 E und Abb.18 A, B, C, D). SAUL1 und SAUL1_{R736E} Membranflecken waren normalerweise mittelgroß und rundlich (Abb.18 A, B), während die SAUL1_{R736K} Membranflecken vermehrt gebildet wurden und klein sowie spitz erschienen (Abb.18 C, D).

Um den Unterschied in der Membranfleckenbildung zwischen SAUL1_{R736K} und SAUL1_{R736E} genauer zu erfassen, wurde der Anteil von Protoplasten mit und ohne Membranflecken für GFP-SAUL1 (n = 4228), GFP-SAUL1_{R736A} (n = 3054), GFP-SAUL1_{R736E} (n = 4509) sowie GFP-SAUL1_{R736K} (n = 4435) ermittelt und statistisch ausgewertet (Abb.19 und Tab.18).



Abbildung 19: Bestimmung des Anteils von *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten mit und ohne GFP-SAUL1_{R736K} sowie GFP-SAUL1_{R736E} Membranflecken. In drei unabhängigen Experimenten wurden *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten mit GFP-SAUL1_{R736K} und GFP-SAUL1_{R736E} transformiert und mindestens 3000 Protoplasten betrachtet. Die bereits erhaltenen Werte für GFP-SAUL1 und GFP-SAUL1_{R736A} aus Abbildung 16 wurden als Vergleichswerte herangezogen. GFP-SAUL1 bildete in 60% der Protoplasten Membranflecken. Durch den R736A Austausch reduzierte sich die Membranfleckenbildung auf nur 3% der Protoplasten. Bei GFP-SAUL1_{R736K} in 70% der Protoplasten zu Membranflecken führte.

Die statistische Auswertung der Membranfleckenbildung von GFP-SAUL1_{R736K} und GFP-SAUL1_{R736E} deutete darauf hin, dass eine positive Ladung an Aminosäureposition 736 die SAUL1-Membranfleckenbildung begünstigt. Interessanterweise hatte der Austausch von Arginin durch Glutaminsäure einen geringeren Einfluss auf die Membranfleckenbildung als der Austausch durch Alanin (Abb.19). Trotz der negativen Ladung an Aminosäureposition 736 bildeten immer noch 18% der Protoplasten GFP-SAUL1_{R736E} Membranflecken, was 15% mehr sind im Vergleich zu GFP-SAUL1_{R736A} (vgl. Abb.16). Durch den Austausch mit dem positiv geladenen Lysin konnte ein leichter Anstieg der Membranfleckenbildung beobachtet werden. 70% der mit GFP-SAUL1_{R736K} transformierten Protoplasten bildeten SAUL1-Membranflecken, was einem Anstieg von 10% im Vergleich zu GFP-SAUL1 entspricht (Abb.19, vgl. Abb.16). Diese Ergebnisse unterstützten die Hypothese, dass die Ladung an der Aminosäureposition 736 für die Bildung von SAUL1-Membranflecken ausschlaggebend ist. Möglicherweise lässt sich die leicht erhöhte Bildung von kleineren und spitzeren Membranflecken durch den strukturellen Unterschied zwischen Arginin und Lysin erklären.

3.2.5 Die Region um Arginin R736 bedingt die SAUL1-Plasmamembranaffinität

Im Abschnitt 3.2 wurde beschrieben, dass die intakte ARM₇₋₁₁ Domäne für die Interaktion von SAUL1 mit der Plasmamembran erforderlich ist, und das Entfernen einzelner ARM-Domänen zum Verlust der Membranlokalisation führte (Abb.9). Die Arginine R736 und R737 befinden sich am Ende der ARM₇₋₁₁ Domäne (Abb.13) und könnten durch ihre positive Ladung die Membranlokalisation unterstützen. Da in den vorherigen Experimenten nur die Ladungsänderung an diesen Positionen untersucht wurde, wurden im folgenden Experiment verkürzte SAUL1-Proteine generiert, um die Auswirkung einer Deletion von R736 oder eine Verkürzung bis zur Aminosäureposition 735 auf SAUL1 zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden die Konstrukte *355::GFP-SAUL1_{AA735}, 355::GFP-SAUL1_{AA736}* und *355::GFP-SAUL1_{AA774}* generiert, die zu einer Verkürzung des SAUL1-Proteins bis zur jeweiligen Aminosäure führen. Ergänzend wurde *355::GFP-SAUL1_{Δ736/1}* erstellt, bei dem nur das Arginin R736 fehlt (Abb.20).



Abbildung 20: Schematische Darstellung der *SAUL1* CDS und der kodierten Domänen. Die Pfeile markieren die Arginine und die Größe der verkürzten *SAUL1* Genkonstrukte. Bei *SAUL1*_{Δ736fl} wurde nur R736 entfernt.

Die generierten GFP-Fusionsproteine GFP-SAUL1_{$\Delta736fl}$, GFP-SAUL1_{AA735}</sub>, GFP-SAUL1_{AA736}</sub> und GFP-SAUL1_{<math>AA774} wurden anschließend in *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten exprimiert und mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie untersucht (Abb.21).</sub></sub></sub>



Abbildung 21: Subzelluläre Lokalisation und Membranfleckenbildung von Arginin-Deletionsmutanten in *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten. Das Fluoreszenzsignal der Fusionsproteine ist in Grün und die Chlorophyllfluoreszenz in Rot dargestellt. (**A** - **D**) Querschnittsbilder und (**E** - **H**) Maximumsprojektionen der Protoplasten. Gezeigt sind (**A**, **E**) GFP-SAUL1_{A736fl}, (**B**, **F**) GFP-SAUL1_{AA735}, (**C**, **G**) GFP-SAUL1_{AA736} und (**D**, **H**) GFP-SAUL1_{AA774}. Bei einer Verkürzung bis zur Aminosäure 735 verlor GFP-SAUL1 seine Membranaffinität. Die Fähigkeit zur Membranfleckenbildung ging bereits bei einer Verkürzung bis zur Aminosäure 774 verloren. Die Deletion von R736 hatte den geringsten Einfluss auf die Eigenschaften von GFP-SAUL1. Die Messbalken entsprechen 10 μ m.

Mit den Fusionsproteinen GFP-SAUL1_{AA735}, GFP-SAUL1_{AA736} und GFP-SAUL1_{AA774} konnte der für die Plasmamembran-Assoziation relevante Bereich der ARM7-11 Domäne weiter eingegrenzt werden. Bei Verkürzungen des C-Terminus veränderten sich die Eigenschaften von GFP-SAUL1 an der Plasmamembran, sodass GFP-SAUL1AA735, GFP-SAUL1AA736 und GFP-SAUL1AA774 keine Membranflecken mehr bilden konnten (Abb.21 B, C, D, F, G, H). Nur bei GFP-SAUL1AA774 konnten neben der gleichmäßigen Verteilung noch in geringem Umfang potentielle Membranflecken gefunden werden (Abb.21 D, H). Diese Ergebnisse zeigten, dass der C-Terminus von SAUL1 für die Verteilung an der Plasmamembran und die Membranfleckenbildung benötigt wird. Interessanterweise zeigte GFP-SAUL1_{AA735} neben einer teilweisen Lokalisation an der Plasmamembran auch ein cytoplasmatisches Fluoreszenzsignal (Abb.21 B, F). Im Gegensatz dazu blieb die Lokalisation von GFP-SAUL1_{AA736} an der Plasmamembran unverändert. Demzufolge schien der Bereich um R736 in der ARM7-11 Domäne für die Lokalisation und Membranfleckenbildung von SAUL1 an der Plasmamembran entscheidend zu sein. Trotz der Deletion von R736 bei GFP-SAUL1_{Δ736fl}, was potentiell die Proteinstruktur beeinflussen könnte, war das Fusionsprotein weiterhin der an Plasmamembran assoziiert und konnte Membranflecken bilden (Abb.21 A, E).

3.2.6 SAUL1-Membranflecken treten nur selten in intakten *A. thaliana* Gewebe auf

SAUL1-Membranflecken wurden überwiegend im *A. thaliana* Protoplastensystem betrachtet. Folglich war es essentiell, die Membranfleckenbildung *in vivo* in *A. thaliana* zu untersuchen, um den Mechanismus und deren Funktion aufzuklären. Hierfür wurden stabile transgene *35S::YFP-SAUL1* Linien im *A. thaliana* Col-0 Wildtyp (WT) und im *saul1-1* Mutanten-Hintergrund generiert, phänotypisch untersucht, und anschließend die *in vivo* Membranfleckenbildung analysiert. Das *35S::YFP-SAUL1* Genkonstrukt wurde mit Hilfe des pEG104-Vektors über eine *A. tumefaciens* vermittelte Transfektion in WT- und *saul1-1* Pflanzen eingebracht (2.12.4). Im Gegensatz zum pMDC43-Vektor, in dem die Genexpression durch zwei aufeinanderfolgende *CaMV35S*-Promotoren reguliert wird, wird diese im pEG104-Vektor durch einen einzelnen *CaMV35S*-Promotor induziert und durch einen *TMV-Enhancer* verstärkt (Early *et al.* 2006). Dieser Unterschied in der Genexpression kann zu unterschiedlichen Expressionsmengen führen, die einen Einfluss auf die streng überwachte Proteinhomöostase von SAUL1 in der Pflanze haben können. Innerhalb dieser Arbeit konnte kein GFP-SAUL1 Fluoreszenzsignal *in vivo* nachgewiesen werden, wodurch sich auf die YFP-SAUL1 Fusionsproteine konzentriert wurde.

Anschließend wurden die Samen ausgesät und die jungen Keimlinge mit BASTA[®] selektiert (2.12.5). Positive Transformanten überlebten diese Behandlung durch die vom pEG104 eingebrachte BASTA[®]-Resistenz-Kassette und wurden mittels PCR auf das Vorhandensein des *35S::YFP-SAUL1* Genkonstrukts und deren Genotyp überprüft (2.13.3.3). Die für den WT oder *saul1-1* homozygoten und zusätzlich *35S::YFP-SAUL1* positiven Pflanzen wurden weiter kultiviert und die darauffolgende Generation erneut mit BASTA[®] selektiert. Diese resistenten Pflanzen wurden für die Folgeexperimente verwendet. Dabei wurden am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop die Lokalisation und Verteilung des YFP-SAUL1 Fusionsproteins im Blattgewebe untersucht (Abb.22).



Abbildung 22: Lokalisation und Membranfleckenbildung von YFP-SAUL1 in transgenem *A. thaliana* Blattgewebe. Das Fluoreszenzsignal des Fusionsproteins ist in Gelb dargestellt. (**A - C**) Col-0 *355::YFP-SAUL1* (**D - F**) *saul1-1 355::YFP-SAUL1*. (**A**, **D**) Gleichmäßig verteiltes YFP-SAUL1 an der Plasmamembran. (**B**, **E**) Vereinzelte Zellen zeigten SAUL1-Membranflecken, die auch in Schließzellen auftraten. (**C**, **F**) Gleichmäßige Verteilung und Membranfleckenbildung von YFP-SAUL1 in Blättern von Pflanzen, die für sieben Tage bei 18 °C inkubiert wurden. Es konnten nur in wenigen Blattzellen ähnliche SAUL1-Membranflecken wie in Mesophyllprotoplasten gefunden werden. Die Messbalken entsprechen 10 μm.

In den untersuchten Zellen der transgenen Col-0 *35S::YFP-SAUL1* und *saul1-1 35S::YFP-SAUL1* Pflanzen konnte eine hohe Expression von gleichverteilten Fusionsprotein gefunden werden (Abb.22 A, D). Vereinzelt wurde jedoch eine ungleichmäßige Verteilung von YFP-SAUL1 beobachtet, die in wenigen Zellen zu Membranflecken führte (Abb.22 B, E). Eine verstärkte Bildung von Membranflecken wurde in Zellen von Pflanzen beobachtet, die zuvor für sieben Tage bei 18 °C inkubiert worden waren (Abb.22 C, F). Sowohl in den *saul1-1* Pflanzen als auch in den Col-0 Pflanzen wurden vermehrt SAUL1-Membranflecken in den Schließzellen beobachtet (Abb.22 B, E) Aufgrund dieser Beobachtung wurde die Membranfleckenbildung in den Schließzellen von Col-0 *35S::YFP-SAUL1* Pflanzen näher untersucht (Abb.23).



Abbildung 23: Verteilung von YFP-SAUL1 in *A. thaliana* Col-O Schließzellen. Das Fluoreszenzsignal des Fusionsproteins ist in Gelb dargestellt. (**A**) Zwei Spaltöffnungen und umliegende Zellen mit und ohne YFP-SAUL1 Membranflecken. (**B**) Gleichverteiltes YFP-SAUL1 an den Kontaktflächen beider Schließzellen sowie zusätzliche Membranflecken. (**C**) Schließzelle mit YFP-SAUL1 Membranflecken. Die in den Schließzellen beobachteten Membranflecken zeigten eine große Ähnlichkeit mit den in Protoplasten dokumentierten Membranflecken auf. Die Messbalken entsprechen 10 μm.

In *A. thaliana* wurden YFP-SAUL1 Membranflecken nur selten gebildet, traten jedoch vermehrt in Schließzellen auf (Abb. 23). Die umliegenden Zellen zeigten dagegen eine gleichmäßige Verteilung von YFP-SAUL1 an der Plasmamembran (Abb.24 A). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass selbst bei einer gleichmäßigen Verteilung von YFP-SAUL1 im Blattgewebe die Bildung von Membranflecken speziell in Schließzellen möglich war. Die unterschiedliche Verteilung von YFP-SAUL1 in Mesophyll- und Schließzellen könnte auf zelltypabhängige Funktionen von SAUL1 und seinen Membranflecken hinweisen.

3.2.7 Stressstimuli induzieren die Bildung von SAUL1-Membranflecken

In Tao *et al.* (2019) wurde die Induzierbarkeit der SAUL1-Membranfleckenbildung durch eine Infektion mit *P. capsici* in *N. benthamiana* beobachtet. Insbesondere verstärkte sich die Membranfleckenbildung in infiziertem, jedoch nicht nekrotischem Gewebe, was von den Autoren auf die *membrane tethering* Funktion von SAUL1 zurückgeführt wurde. Beim *tethering* werden zwei Membranen wie die Plasmamembran und beispielweise die Membran von Multivesikulären Körperchen (MVBs) zusammengehalten, sodass zellulärer Transport reguliert werden könnte. Interessanterweise zeigten nicht infizierte Gewebeschichten lediglich eine gleichmäßige Verteilung des YFP-SAUL1 Fusionsproteins. Dies gab Hinweise darauf, dass die SAUL1-Membranflecken möglicherweise für die pflanzliche Immunantwort bei Infektionen benötigt werden. Um diese Funktion und weitere Stimuli für die Induktion der SAUL1-Membranfleckenbildung zu identifizieren, wurden Experimente mit unterschiedlichen Behandlungen durchgeführt. Bei den verfolgten Ansätzen wurde einerseits durch PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) biotischer Stress induziert und andererseits die Umgebungstemperatur auf unter 25 °C gesenkt, um diese als möglichen Stimulus für die Membranfleckenbildung zu untersuchen.

3.2.7.1 PAMPs haben einen Einfluss auf die Bildung von SAUL1-Membranflecken

Während einer Infektion erkennen pflanzliche Zellen Oberflächenstrukturen von Pathogenen, wie das Flagellin der bakteriellen Geißeln oder das Chitin der pilzlichen Zellwand, die als *pathogen associated molecular pattern* (PAMPs) bezeichnet werden. Deren Erkennung führt zur Induktion einer ersten Immunantwort, die als *pattern triggered immunity* (PTI) bekannt ist. Bei der in Tao *et al.* (2019) gezeigten Infektion, mit dem Oomyceten *P. capsici*, wurde die Bildung von SAUL1-Membranflecken induziert, sodass PAMPs wie Chitin, ein möglicher Stimulus sein könnten. Da eine direkte Infektion im Protoplastensystem nicht möglich war, wurde die Anwesenheit eines Pathogens durch Zugabe von PAMPs wie dem Flagellin-Protein flg22 oder dem Chitinderivat Chitosan simuliert (2.12.2.1). Die zur Erkennung von PAMPs benötigten Rezeptoren befinden sich in der Plasmamembran der Protoplasten, wobei die Rezeptordomäne in das umgebene Medium hineinragt. Durch die Behandlung mit PAMPs können diese Rezeptoren die entsprechenden Moleküle erkennen und die PTI auslösen (Jen Sheen 2001, He *et al.* 2007). Somit könnten diese PAMPs auch ein Auslöser für die Bildung von SAUL1-Membranflecken sein.

In dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche PAMP-Behandlungen zur potentiellen Induktion der SAUL1-Membranfleckenbildung durchgeführt. Dazu wurden extrahierte und mit *35S::GFP-SAUL1* transformierte *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten mit den PAMPs Chitosan und flg22 oder mit Mycelium von *Fusarium graminearum (F. graminearum*) behandelt. Die Proben wurden jeweils 20 Minuten nach der Behandlung sowie am darauffolgenden Tag am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop untersucht (Abb.24).



Abbildung 24: Induktion der SAUL1-Membranfleckenbildung nach einer PAMP-Behandlung in *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten. Das Fluoreszenzsignal des Fusionsproteins ist in Grün und die Chlorophyllfluoreszenz in Rot dargestellt. (A) 20-minütige Behandlung mit Chitosan. (B) 20-minütige Behandlung mit flg22. (C) 20-minütige Behandlung mit *F. graminearum* Mycelium. (D) Übernachtinkubation mit Chitosan. (E) Übernachtinkubation mit flg22. (F) Übernachtinkubation mit *F. graminearum* Mycelium. Die PAMPs schienen als Stimulus die SAUL1-Membranflecken zu induzieren, wobei intaktes Mycelium den stärksten Effekt zeigte. Die Messbalken entsprechen 10 μm.

Die PAMP-Behandlung schien die SAUL1-Membranfleckenbildung in Mesophyllprotoplasten zu beeinflussen. Nach einer 20-minütigen Inkubationszeit zeigte sich im Vergleich zu unbehandelten GFP-SAUL1 Protoplasten (Abb.10 E) eine erhöhte Anzahl von Membranflecken pro Zelle (Abb.24 A, B, C,F). Die Behandlung mit Chitosan oder Fusarium Mycelium führte zur Bildung zahlreicher kleiner Membranflecken. Im Vergleich dazu induzierte flg22 zwar die Membranfleckenbildung, beeinflusste jedoch nicht deren Größe. Interessanterweise nahm die Anzahl an Membranflecken am Folgetag in der mit Chitosan und flg22 behandelten Probe wieder ab (Abb.24 D, E). Nur bei den mit Mycelium behandelten Protoplasten blieb auch nach 24 Stunden eine erhöhte Anzahl kleiner Membranflecken und kondensierter Bereiche mit hoher Proteinmenge bestehen (Abb.24 F). Diese zeitliche Abnahme der Wirkung könnte mit der Stabilität der verwendeten PAMPs zusammenhängen. Möglicherweise waren Chitosan und flg22 im verwendeten W5-Puffer (2.9.2) weniger stabil als das Fusarium Mycelium, wodurch der Effekt dieser PAMPs innerhalb von 24 Stunden nachließ. Durch die Stabilität des Myceliums führte dies zu einer längeren Exposition des Stressstimulus und verstärkte die Bildung von SAUL1-Membranflecken über einen längeren Zeitraum.

3.2.7.2 Temperaturen unter 20 °C können die Bildung von SAUL1-Membranflecken beeinflussen

Temperaturen als abiotische Faktoren haben einen Einfluss auf den ganzen Organismus und können sowohl den Metabolismus als auch Moleküle direkt beeinflussen. Da die SAUL1-Membranfleckenbildung möglicherweise von Wechselwirkungen verschiedener Membranen und Proteinen abhängig ist, könnte hier eine Reduktion der Temperatur regulative Eigenschaften besitzen. Um den möglichen Einfluss von Temperaturen unter 25 °C auf die Induktion von Membranflecken zu untersuchen, wurden mit GFP-SAUL1 transformierte *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten bei 25 °C beziehungsweise 18 °C über Nacht inkubiert und am Folgetag die SAUL1-Membranfleckenbildung untersucht (Abb. 25).



Abbildung 25: Temperaturabhängige GFP-SAUL1 Membranfleckenbildung in *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten. Das Fluoreszenzsignal des Fusionsproteins ist in Grün und die Chlorophyllfluoreszenz in Rot dargestellt. (**A**, **B**) Membranfleckenbildung bei 25 °C und (**C**, **D**) bei 18 °C. Die Inkubation bei 18 °C führte im Vergleich zu 25 °C zu einer verstärkten Bildung kleinerer Membranflecken. Die Messbalken entsprechen 10 μm.

Im gezeigten Experiment hatte die Inkubationstemperatur einen Einfluss auf die Bildung von SAUL1-Membranflecken, sodass bei einer Inkubationstemperatur von 25 °C (Abb.25 A, B) im Vergleich zu 18 °C (Abb.25 C, D) weniger, jedoch größere Membranflecken gebildet wurden. Um Temperaturen als Stimulus für die SAUL1-Membranfleckenbildung zu überprüfen, wurde die Membranfleckenbildung in Protoplasten nach Inkubationen bei 18 °C (n = 3767), 25 °C (n = 6620), 15 °C (n = 2859), Raumtemperatur (RT) (n = 3614) und nach einem zweistündigen Transfer von 25 °C auf 18 °C (n = 3087) nach der Übernachtinkubation bestimmt (Abb.26 und Tab.19).



Abbildung 26: Auswertung der temperaturabhängigen GFP-SAUL1 Membranfleckenbildung in *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten. In drei unabhängigen Experimenten wurde der Anteil von Protoplasten mit und ohne Membranflecken ermittelt. Hierfür wurden mindestens 2800 Protoplasten betrachtet. Die mit GFP-SAUL1 transformierten Protoplasten wurden über Nacht bei verschiedenen Temperaturen inkubiert und am Folgetag auf Membranfleckenbildung untersucht. Bei Raumtemperatur bildeten 53% der Protoplasten SAUL1-Membranflecken. Eine Inkubation bei 25 °C führte bei 44% der Protoplasten zur Membranfleckenbildung. Nach einem zweistündigen Transfer von 25 °C auf 18 °C nach der Übernachtinkubation wurden bei 49 % der Protoplasten Membranflecken gefunden. Protoplasten, die bei 18 °C inkubiert wurden, zeigten SAUL1-Membranflecken nur in 59% der Zellen. Durch eine Inkubation bei 15 °C wurden in 60% der Protoplasten Membranflecken gebildet. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Temperaturen unter 20 °C die Bildung von SAUL1-Membranflecken induzieren könnten.

Im durchgeführten Experiment konnte die Temperatur als abiotischer Stimulus die SAUL1-Membranfleckenbildung leicht beeinflussen (Abb.26). Dabei führten Temperaturen unter 20 °C zu einer erhöhten Bildung kleinerer SAUL1-Membranflecken (Abb.25 D). Eine Inkubation bei Raumtemperatur (20 °C bis 28 °C) oder 25 °C reduzierte hingegen die SAUL1-Membranfleckenbildung. Bei Raumtemperatur zeigten 53% der Protoplasten Membranflecken, während unter Kontrollbedingungen bei 25 °C in 44% der Protoplasten SAUL1-Membranflecken gefunden wurden. Eine zweistündige Reduktion der Temperatur von 25 °C auf 18 °C erhöhte den Anteil leicht auf 49%. Eine weitere Zunahme der Membranfleckenbildung wurde bei 18 °C und 15 °C beobachtet, wobei in 59% beziehungsweise 60% der Protoplasten Membranflecken auftraten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die SAUL1-Membranfleckenbildung möglicherweise leicht von der Temperatur beeinflusst wird.

3.2.7.3 Die SAUL1-Membranfleckenbildung wurde durch die Protoplastierung erhöht

Ein weiterer potentieller Stimulus für die Membranfleckenbildung könnte der enzymatische Zellwandverdau während der Protoplastierung sein, welcher ähnliche Effekte wie eine Infektion aufweist. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Mesophyllprotoplasten aus transgenen Col-0 *35S::YFP-SAUL1* Pflanzen isoliert und über den Zeitraum von drei Tagen täglich am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop untersucht (Abb.27).



Abbildung 27: Zeitreihenexperiment mit Mesophyllprotoplasten aus Col-0 *355::YFP-SAUL1* Pflanzen. Das Fluoreszenzsignal des Fusionsproteins ist in Gelb und die Chlorophyllfluoreszenz in Rot dargestellt. (A - C) Querschnitte und (D - F) Maximumsprojektionen der untersuchten Protoplasten. (A, D) Protoplast mit YFP-SAUL1 Membranfleckenbildung direkt nach der Extraktion. (B, E) Verteilung von YFP-SAUL1 am zweiten Tag (C, F) Verteilung von YFP-SAUL1 am dritten Tag. Die Protoplastierung von Col-0 *355::YFP-SAUL1* Pflanzen induzierte die Membranfleckenbildung, welche über drei Tage stabil blieb. Die Messbalken entsprechen 10 μm.

Im Zeitreihenexperiment konnte gezeigt werden, dass trotz der seltenen Bildung von YFP-SAUL1 Membranflecken *in planta* eine große Anzahl von Protoplasten SAUL1-Membranflecken aufwies (Abb.27). Im Verlauf von drei Tagen nahm die Größe der Membranflecken zu, während ihre Anzahl abnahm (Abb.27 D, E, F). Zusätzlich wurden punktförmige Strukturen mit starkem Fluoreszenzsignal innerhalb der Membranflecken gefunden (Abb.27 D, E, F). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Protoplastierung von Col-0 *35S::YFP-SAUL1* Pflanzen als Stimulus für die SAUL1-Membranfleckenbildung wirken könnte. Zur Quantifizierung dieser Beobachtung, wurde der Anteil an Protoplasten mit

YFP-SAUL1 Membranflecken an Tag 1 (n = 2782), Tag 2 (n = 3542) und Tag 3 (n = 3121) bestimmt (Abb.28 und Tab.20).



Abbildung 28: Dynamik der SAUL1-Membranfleckenbildung in protoplastierten Col-0 *35S::YFP-SAUL1* Pflanzen. Die Anzahl der Protoplasten mit SAUL1-Membranflecken wurde über einen Zeitraum von drei Tagen in drei unabhängigen Experimenten bestimmt. Hierfür wurden mindestens 2700 Protoplasten betrachtet. Direkt nach der Protoplastierung wiesen 82% der Protoplasten Membranflecken auf. Am zweiten Tag reduzierte sich dieser Anteil auf 60%, und am dritten Tag wurden nur noch bei 32% der Protoplasten Membranflecken gefunden. Somit hat sich die Anzahl an Protoplasten mit YFP-SAUL1 Membranflecken innerhalb von drei Tagen stark reduziert.

Die quantitative Auswertung der Zeitreihe zeigte eine Induktion von YFP-SAUL1 Membranflecken in den aus Col-0 *35S::YFP-SAUL1* Pflanzen isolierten Protoplasten, wobei die Anzahl von Zellen mit Membranflecken im Verlauf der Zeit kontinuierlich abnahm. Direkt nach der Protoplastierung wiesen 82% der Protoplasten Membranflecken auf. Innerhalb von 24 Stunden nahm dieser Anteil um 22% ab, sodass am Folgetag noch 60% Protoplasten Membranflecken zeigten. Am dritten Tag sank dieser Anteil erneut um 28%, wodurch nur noch in 32% der Protoplasten YFP-SAUL1 Membranflecken gefunden wurden. Obwohl die Anzahl der Protoplasten mit Membranflecken zurückging, nahm deren Größe im Laufe der Zeit zu, was auf mögliche Fusionsereignissen hinwies. Besonders bemerkenswert war, dass 24 Stunden nach der Protoplastierung 60% der Protoplasten Membranflecken aufwiesen. Dieses Verhältnis entsprach dem in mit *35S::GFP-SAUL1* transient transformierten Protoplasten beobachtet Anteil von Zellen mit Membranflecken (vgl. Abb.16).

3.2.8 GFP-SAUL1 Membranflecken können auch in Mutantenlinien mit Verbindung zum *saul1-1* Phänotyp gebildet werden

Der Mechanismus hinter der SAUL1-Membranfleckenbildung ist bislang wenig erforscht. Insbesondere ist unklar, ob die ungleichmäßige Verteilung von SAUL1 an der Plasmamembran durch Wechselwirkung mit anderen Proteinen beeinflusst wird. Um diesen Zusammenhang zu untersuchen, wurden *knock-out* Mutanten von Kandidatengenen, deren Genprodukte mit SAUL1 in Zusammenhang stehen könnten, zur Protoplastierung mit anschließender Transformation verwndet.

Dabei wurden die folgenden Linien zur Transformation mit 35S::GFP-SAUL1 herangezogen: bon1, exo70b1, kin5b, saul1-1/pub43/soc3 und tn2-10. BON1 ist ein Plasmamembran-assoziiertes Protein, das eine Funktion in Ca²⁺-abhängigen Signalwegen während der Immunantwort von A. thaliana hat (Yang et al. 2017, Wang et al. 2020). KIN5b kodiert für ein Kinesin, welches in Co-Immunopräzipitationsansätzen mit SAUL1 gefunden wurde und vermutlich eine Funktion im Cytoplasma besitzt (Brieske, 2017, Strauß et al. 2021). EXO70B1 und TN2 sind wichtige Bestandteile der Exocytose. Das intrazelluläre Rezeptorprotein TN2 bildet mit SOC3 einen Immunrezeptorkomplex und überwacht die SAUL1 Homöostase, besonders bei einer Überexpression (Liang et al. 2019). Die Abwesenheit einer SOC3-Expression in saul1-1/pub43/soc3 Dreifachmutanten führte zur vollständigen Komplementation des temperaturbedingten saul1-1 Autoimmunphänotyps (Tong et al. 2017). PUB43 ist das engste Paralog von SAUL1 und übernimmt eine redundante Funktion zu SAUL1 (Tong et al. 2017). Falls eines dieser Genprodukte im Zusammenhang mit der Bildung von SAUL1-Membranflecken steht, könnte ein Fehlen des funktionsfähigen Proteins in den entsprechenden Mutanten zu einer Veränderung der Verteilung von SAUL1 an der Plasmamembran führen. Abbildung 29 zeigt die GFP-SAUL1 Verteilung in Mesophyllprotoplasten der genannten knock-out Linien.



Abbildung 29: GFP-SAUL1 Membranfleckenbildung in *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten aus *knock-out* Mutantenlinien. Das Fluoreszenzsignal des Fusionsproteins ist in Grün und die Chlorophyllfluoreszenz in Rot dargestellt. (**A**) SAUL1-Membranfleckenbildung in *saul1-1/pub43/soc3* Dreifachmutanten, (**B**) in *kin5b* Mutanten, (**C**) in *bon1* Mutanten, (**D**) in *exo70b1* Mutanten und (**E**) in *tn2* Mutanten. (**F** - **J**) zeigen die Maximumsprojektionen der beschriebenen Protoplasten aus der oberen Bildreihe. Obwohl die SAUL1-Membranfleckenbildung nicht von einem der untersuchten Proteine abhängig war, wurde sie in *exo70b1* und *tn2* Protoplasten dennoch beeinflusst. Die Messbalken entsprechen 10 μm.

Das Fehlen von potentiell SAUL1-assoziierten Genprodukten hat die Membranfleckenbildung beeinflusst, jedoch nicht verhindert. In *saul1-1/pub43/soc3* und *kin5b* Protoplasten war GFP-SAU1 in Membranflecken an der Plasmamembran verteilt (Abb.29 A, B, F, G). Bei Verwendung der *bon1* Mutantenlinie war GFP-SAUL1 überwiegend in Membranflecken lokalisiert, jedoch konnte auch ein schwaches, gleichmäßig verteiltes Fluoreszenzsignal an der Plasmamembran detektiert werden (Abb.29 C, H). Auch Protoplasten von *exo70b1* wiesen SAUL1-Membranflecken auf, wobei der Großteil von GFP-SAUL1 gleichmäßig an der Plasmamembran verteilt war (Abb.29 D, I). Besonders auffällig war die GFP-SAUL1 Verteilung in *tn2* Protoplasten. In diesen war das Fusionsprotein überwiegend gleichmäßig verteilt, und nur vereinzelt wurden Membranflecken gebildet (Abb.29 E, J). Die Membranflecken erschienen fragmentierter und kleinere Flecken wurden an der Plasmamembran gefunden. Demnach schien die fehlende *TN2*-Expression eine Auswirkung auf die Bildung von SAUL1-Membranflecken zu haben. Ähnliche Beobachtungen in den *exo70b1* Protoplasten (Abb.29 D, I) gaben einen weiteren Hinweis darauf, dass der vesikuläre Membrantransport und die SAUL1-Membranflecken in Zusammenhang stehen könnten.

3.2.9 GFP-SAUL1 Membranflecken verdrängen andere membranständige Proteine

Da die SAUL1-Membranfleckenbildung scheinbar von TN2 und EXO70b1 beeinflusst wird, stellte sich die ob andere membranständige Proteine den Frage, in SAUL1-Membranflecken zu finden sind. Zu diesem Zweck wurden die Membranflecken-bildenden Konstrukte 35S::GFP-SAUL1 und 35S::GFP-SAUL1ARM7-11 zusammen mit 35S::SAUL1-mCherry, welches keine Membranflecken bilden kann, sowie Kombinationen aus 35S::GFP-SAUL1 und 35S::BON1-mCherry exprimiert. Um zu untersuchen, ob mögliche Interaktionspartner in die SAUL1-Membranflecken rekrutiert werden können, wurde zusätzlich 35S::GFP-SAUL1 mit dem cytosolischen potentiellen Interaktionspartner 35S::CHS1-mCherry exprimiert. In Abbildung 30 ist die Verteilung der Fusionsproteine in Querschnitten repräsentativer Protoplasten gezeigt.



Abbildung 30: Verdrängung von membranständigen Proteinen durch GFP-SAUL1 Membranflecken in *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten. Die Fluoreszenzsignale der Fusionsproteine sind in Grün und Rot dargestellt, während die Chlorophyllfluoreszenz in Blau gezeigt ist. (A, E, I) Koexpression von GFP-SAUL1 und CHS1-mCherry. (B, F, J) Koexpression von GFP-SAUL1 und BON1-mCherry. (C, G, K) Koexpression von GFP-SAUL1 und SAUL1-mCherry. (D, H, L) Koexpression von GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ und SAUL1-mCherry. Keines der getesteten Proteine zeigte eine Kolokalisation mit den SAUL1-Membranflecken. Die Messbalken entsprechen 10 μm.

In den SAUL1-Membranflecken konnten nur GFP-SAUL1 oder GFP-SAUL1ARM7-11 und keine weiteren Proteine gefunden werden (Abb.30). In der Kombination aus GFP-SAUL1 und CHS1-mCherry zeigte das GFP-SAUL1 Fusionsprotein eine Lokalisation in Membranflecken an der Plasmamembran, während das CHS1-mCherry Fluoreszensignal überwiegend im Cytoplasma lokalisiert war und keine Überlappung mit GFP-SAUL1 aufwies (Abb.30 A, E, I). Obwohl die beiden Fusionsproteine GFP-SAUL1 und BON1-mCherry an der Plasmamembran lokalisiert waren, gab es nur an den Rändern der Membranflecken eine schwache Überlagerung der Floureszenssignale. Das BON1-mCherry Fluoreszenzsignal war gleichmäßig an der Plasmamembran verteilt und umschloss die SAUL1-Membranflecken (Abb.30 B, F, J). Die Koexpression von GFP-SAUL1 und SAUL1-mCherry führte zu GFP-SAUL1 Membranflecken, in denen ein schwaches mCherry-Signal zu erkennen war (Abb.30 C, G, K). In Bereichen, in denen beide Fusionsproteine gleichmäßig verteilt waren, kam es zu einer starken Überlagerung der Fluoreszenssignale. Ähnliches wurde mit GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ und SAUL1-mCherry beobachtet, wobei GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ Membranflecken mit einem schwachen mCherry-Signal auftraten (Abb.32 D, H, L). SAUL1-mCherry hingegen war gleichmäßig an der Plasmamembran verteilt, an der es nur eine schwache Überlagerung mit dem GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ Fluoreszensignal gab. Zur besseren Darstellung sind in Abbildung 31 die Maximumsprojektionen gezeigt.



Abbildung 31: Maximumsprojektionen der Verdrängung von membranständigen Proteinen durch GFP-SAUL1 Membranflecken. Die Fluoreszenzsignale der Fusionsproteine sind in Grün und Rot dargestellt, während die Chlorophyllfluoreszenz in Blau gezeigt wird. (**A**, **D**, **G**) Koexpression von GFP-SAUL1 und BON1-mCherry. (**B**, **E**, **H**) Koexpression von GFP-SAUL1 und SAUL1-mCherry. (**C**, **F**, **I**) Koexpression von GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ und SAUL1-mCherry. Es konnten klare Abgrenzungen zwischen den einzelnen Fusionsproteinen beobachtet werden. Die Messbalken entsprechen 10 μm.

Die GFP-SAUL1 und BON1-mCherry Fluoreszenzsignale waren klar voneinander abgegrenzt, sodass keine Überlagerung innerhalb von Membranflecken zu erkennen war (Abb.31 A, D, G). BON1-mCherry war gleichmäßig an der Plasmamembran verteilt und wurde von GFP-SAUL1 aus den Membranflecken verdrängt. Bei der Koexpression von GFP-SAUL1 und SAUL1-mCherry kam es zur erwarteten GFP-SAUL1 Membranfleckenbildung, wobei zusätzlich gleichmäßig verteiltes SAUL1-mCherry Fluoreszenzsignal detektiert ein wurde (Abb.30 B, E, H). Dabei kam es in Bereichen, in denen beide Fusionsproteine gleichmäßig verteilt waren, zu einer leichen Überlagerung beider Fluoreszenzsignale. In der Kombination aus GFP-SAUL1ARM7-11 und SAUL1-mCherry wurden GFP-SAUL1ARM7-11 Membranflecken gebildet, welche von einem SAUL1-mCherry Fluoreszenzsignal umschlossen wurden (Abb.31 C, F, I).

3.2.10 SAUL1-Membranflecken sind dynamische Strukturen an der Plasmamembran

GFP-SAUL1 und GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ Membranflecken waren unterschiedlich groß und verschieden geformt (Abb.10 E, F), was die Dynamik ihrer Entstehung und deren Mobilität von Interesse machte. Um diese zu untersuchen, wurden in Langzeitaufnahmen die Bewegung der Membranflecken sowie potentielle Teilungs- und Fusionsereignisse dokumentiert, welche ihre Dynamik beschreiben könnten. Für diese Experimente wurden in *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten die GFP-SAUL1- und GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ Membranflecken über einen Zeitraum von 30 Minuten alle 30 Sekunden bildlich erfasst (2.12.1) (Abb.32).



Abbildung 32: Dynamik der GFP-SAUL1 Membranflecken in *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten. Zwischen den Bildern lagen jeweils 30 Sekunden. Das Fluoreszenzsignal des Fusionsproteins ist in Grün dargestellt und dynamische Bereiche wurden mit Pfeilen markiert. Es konnte eine generelle Bewegung der GFP-SAUL1 Membranflecken als Ganzes beobachtet werden. Die Messbalken entsprechen 5 µm.

Die GFP-SAUL1 Membranflecken waren frei an der Plasmamembran beweglich, zeigten jedoch bei der Bewegung keine Veränderung ihrer Form (Abb.32 oberer Pfeil). Beim Kontakt von zwei oder mehreren Membranflecken kam es zu keiner Verschmelzung der einzelnen Flecken, da diese scheinbar in sich abgeschlossen und strukturell voneinander getrennt blieben (Abb.32 unterer Pfeil). Im Vergleich zu den GFP-SAUL1 Membranflecken zeigten die von GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ eine weichere, runde Form (Abb.10 F). In entsprechenden Langzeitaufnahmen wurde untersucht, ob dieses Erscheinungsbild ebenfalls die Dynamik der Membranflecken beeinflusste (Abb. 33).



Abbildung 33: Dynamik der GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ Membranflecken in *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten. Zwischen den Bildern lagen jeweils 30 Sekunden. Das Fluoreszenzsignal des Fusionsproteins ist in Grün dargestellt und dynamische Bereiche wurden mit Pfeilen markiert. GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ Membranflecken bewegten sich fluide an der Plasmamembran und konnten ihre Form verändern. Dabei traten Auftrennungen in kleinere Membranflecken oder Verschmelzungen zweier Membranflecken auf. Die Messbalken entsprechen 5 μm.

GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ Membranflecken bewegten sich fluide an der Plasmamembran und veränderten dabei ihre Form (Abb.33 oberer Pfeil). Im Gegensatz zu den GFP-SAUL1 und konnten Teilungs-Fusionsereignisse Membranflecken beobachtet werden (Abb.33 unterer Pfeil), bei denen sich die Membranflecken annäherten und nach kurzer Zeit miteinander verschmolzen sind. Protoplasten sind ein artifizielles System von Pflanzenzellen ohne Zellwand, sodass die Dynamik der SAUL1-Membranflecken ebenfalls in N. benthamiana Epidermiszellen untersucht wurde. Hierfür wurde GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ mittels Agrobakterien Infiltration in den Tabak eingebracht, und die Dynamik der Membranflecken analysiert (2.9.3). Da keine GFP-SAUL1 Membranfleckenbildung in N. benthamiana beobachtet werden konnte, waren Experimente zu dessen Dynamik nicht möglich. Abbildung 34 zeigt eine repräsentative Zeitreihe der GFP-SAUL1ARM7-11 Dynamik in N. benthamiana.



Abbildung 34: Dynamik der GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ Membranflecken in *N. benthamiana* Epidermiszellen. Zwischen den Bildern lagen jeweils 30 Sekunden. Das Fluoreszenzsignal des Fusionsprotein ist in Grün dargestellt und dynamische Bereiche wurden mit Pfeilen markiert. Die GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ Membranflecken lagen in *N. benthamiana* Zellen unbeweglich an einer festen Position vor, sodass dynamische Veränderungen der Membranflecken nur in Form von reversiblen Einbuchtungen innerhalb der Membranflecken beobachtet werden konnten. Dabei kam es zu keinen Abschnürungen oder Fusionsereignissen. Die Messbalken entsprechen 2 μm.

Die GFP-SAUL1ARM7-11 Membranflecken in N. benthamiana waren im Vergleich zu den im Protoplastensystem beobachteten unbeweglich an der Plasmamembran lokalisiert (Abb.34). Dennoch traten dynamische Einbuchtungen und Ausdehnungen auf, welche jedoch nicht zu einer Auftrennung eines größeren Membranflecks oder zu einer Verschmelzung von kleineren Flecken führten (Abb.34 Pfeile). Diese Ergebnisse zeigten, dass sich die Membranfleckenbildung und ihre Dynamik zwischen A. thaliana Protoplasten und N. benthamiana Epidermiszellen unterschieden.

3.3. Die SAUL1-Überexpression kann zu einer konzentrationsabhängigen Vesikelbildung führen

SAUL1-Membranflecken traten in zwei unterschiedlichen Erscheinungsbildern auf, wobei die GFP-SAUL1 Membranflecken stabile, kantig wirkende Strukturen vorlagen als (vgl. Abb.32) während die GFP-SAUL1ARM7-11 Membranflecken ein weiches und fluides Erscheinungsbild zeigten (vgl. Abb.33). Der Grund hierfür könnte mit dem Fehlen des N-Terminus im verkürzten GFP-SAUL1ARM7-11 zusammenhängen, da durch das Fehlen der Domäne eine potentielle Multimerisierungsstelle verloren gegangen U-box ist (Knop et al. 2021).

Diese Beobachtungen führten zur Frage, was bei einer Koexpression von GFP-SAUL1 und GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ passieren würde. Dabei wurden zwei Hypothesen aufgestellt: (i) Die Koexpression führt zu zwei unterschiedlichen Arten von Membranflecken, die gemeinsam auftreten, wobei möglicherweise vermehrt Verschmelzungen stattfinden. (ii) Die Bildung eines Membranfleckentyps wird begünstigt, sodass der andere verloren geht. Für dieses Experiment wurde GFP-SAUL1 beziehungsweise YFP-SAUL1 mit GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ in Mesophyllprotoplasten koexprimiert und am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop untersucht (Abb.35). GFP-SAUL1 und YFP-SAUL1 wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen Expressionsstärke verwendet.



Abbildung 35: Koexpression von GFP- sowie YFP-SAUL1 mit GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ in *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten. Das Fluoreszenzsignal der Fusionsproteine ist in Grün und die Chlorophyllfluoreszenz in Rot dargestellt. (**A**) Koexpression von GFP-SAUL1 und GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁. (**B**) Koexpression von YFP-SAUL1 und GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁. (**C**) Vergrößerte Darstellung von YFP-SAUL1 und GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ Vesikeln. (**D**) Membranfleck auf Vesikel. Durch die Überexpression von SAUL1 wurden teilweise SAUL1-bedingte Vesikel gebildet. Die Messbalken in (**A**) und (**B**) entsprechen 10 μm, die in (**C**, **D**) 5 μm.

Die Koexpression von GFP-SAUL1 und GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ resultierte in einer überwiegend gleichmäßigen Verteilung mit fluiden Membranflecken (Abb.35 A). Bei der Koexpression von YFP-SAUL1 und GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ wurde eine überwiegend gleichmäßige Verteilung der Fusionsproteine beobachtet, wobei nur vereinzelte Membranflecken gefunden wurden (Abb.35 B). Überraschenderweise wurden bei den Koexpressionen vesikuläre Strukturen an der Plasmamembran gebildet. Die Koexpression von GFP-SAUL1 und GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ führte zu einer moderaten Anzahl (Abb.35 A), während die Koexpression von YFP-SAUL1 und GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ eine erhöhte Anzahl unterschiedlich großer Vesikel bildete, die im Vergleich zu den GFP-SAUL1 Vesikeln leer erschienen (Abb.35 B). Bei genauerer Betrachtung dieser Vesikel konnte vereinzelt eine Membranfleckenbildung auf ihrer Oberfläche festgestellt werden (Abb.35 C, D).

Um herauszufinden, ob die Vesikel aus Bestandteilen der Plasmamembran bestehen, wurden die mit YFP-SAUL1 und GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ kotransformierten Protoplasten mit FM4-64 behandelt (2.12.2.3). Durch seine Affinität zu Membranlipiden würde eine Einfärbung der SAUL1-bedingten Vesikel für ihren potentiellen Ursprung aus der Plasmamembran sprechen. Abbildung 36 zeigt repräsentative Protoplasten nach der FM4-64 Färbung.



Abbildung 36: Einfärbung von SAUL1-bedingten Vesikel mit dem Membranmarker FM4-64 in *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten. Das Fluoreszenzsignal der Fusionsproteine ist in Grün, FM4-64 in Rot und die in Chlorophyllfluoreszenz Blau dargestellt. (**A** - **C**, **D** - **F**) Repräsentative Protoplasten mit SAUL1-bedingter Vesikelbildung und FM4-64 Färbung. (**A**, **D**) Überlagerung der Fluoreszensignale von YFP-SAUL1 und GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ mit dem Membranmarker FM4-64. (**B**, **E**) Das Fluoreszenzsignal der Fusionsproteine und (**G**, **H**) das FM4-64 Fluoreszenzsignal. YFP-SAUL1 und GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ kolokalisierte in den Vesikeln mit FM4-64. Die Messbalken entsprechen 10 μm.

Der Membranmarker FM4-64 kolokalisierte mit den YFP-SAUL1 und GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ Vesikeln, sodass diese Vesikel potentiell aus Plasmamembranmaterial bestehen könnten (Abb.36). Die Bildung SAUL1-bedingter Vesikel wurde bisher nur in Koexpressionen von GFP- und YFP-SAUL1 mit SAUL1ARM₇₋₁₁ gezeigt. Um zu überprüfen, ob die Vesikelbildung ausschließlich von dieser spezifischen Kombination aus Fusionsproteinen abhängt, wurden weitere Kombinationen von SAUL1-Fusionsproteinen auf eine potentielle Vesikelbildung untersucht. Hierfür wurden 35S::GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ und 35S::GFP-SAUL1_{R736,737,775A}, 35S::GFP-SAUL1 und 35S::GFP-SAUL1_{R736,737,775A} sowie 35S::GFP-SAUL1 und 35S::YFP-SAUL1 koexprimiert und die Verteilung der Fusionsproteine untersucht (Abb. 37).


Abbildung 37: SAUL1-bedingte Vesikelbildung in *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten. Das Fluoreszenzsignal der Fusionsproteine ist in Grün und die Chlorophyllfluoreszenz in Rot dargestellt. (A) Koexpression von GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ und GFP-SAUL1_{R736,737,775A}. (B) Koexpression von GFP-SAUL1 und GFP-SAUL1_{R736,737,775A}. (C) Koexpression von GFP-SAUL1 und YFP-SAUL1. In allen Kombinationen wurden SAUL1-bedingte Vesikel gefunden. Die Messbalken entsprechen 10 μm.

In den Koexpressionen von GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ und GFP-SAUL1_{R736,737,775A}, GFP-SAUL1 und GFP-SAUL1_{R736,737,775A} sowie GFP-SAUL1 und YFP-SAUL1 wurden SAUL1-bedingte Vesikel gebildet. Demnach ist die Vesikelbildung nicht exklusiv für GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ (Abb.37 A, B, C). Im Gegensatz zum nativen SAUL1-Protein wurden in den Kombinationen mit GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ zusätzlich zur Vesikelbildung auch Membranflecken gefunden. Durch die Koexpressionen mit GFP-SAUL1_{R736,737,775A} konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit zur Membranfleckenbildung keine Vorraussetzung für die Bildung von SAUL1-bedingten Vesikeln war, da auch mit GFP-SAUL1_{R736,737,775A} SAUL1-bedingte Vesikel gebildet wurden. Allerdings war die Anzahl der Vesikel im Vergleich zu den anderen Koexpressionen geringer (Abb.37 B). Interessanterweise zeigten die GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ und GFP-SAUL1_{R736,737,775A} Vesikel (Abb.37 A) ähnlich wie die von GFP-SAUL1 und GFP-SAUL1_{R736,737,775A} Vesikel Fluoreszenzsignal in ihrem Inneren (Abb.37 A).

Die SAUL1-bedingte Vesikelbildung scheint nicht von der Struktur eines Fusionsproteins abhängig zu sein, sondern möglicherweise von anderen Parametern beeinflusst zu werden. Da die Vesikelbildung zuerst bei der Koexpression von GFP-SAUL1 und YFP-SAUL1 beobachtet wurde, lässt sich vermuten, dass dieses Phänomen von der Expressionsmenge induziert worden sein könnte. Interessanterweise kam es bei Koexpressionen von SAUL1 mit weiteren membranständigen Proteinen wie BON1, nicht zu einer Vesikelbildung. Dies deutete darauf hin, dass die SAUL1-bedingte Vesikelbildung eine spezifische Eigenschaft von SAUL1 und seiner Expressionsmenge sein könnte.

94

Zur Überprüfung der Hypothese, dass die Expressionsmenge die Ursache für die SAUL1-bedingte Vesikelbildung ist, wurden Mesophyllprotoplasten mit den möglicherweise stärker exprimierten YFP-SAUL1 Fusionsproteine auf SAUL1-bedingte Vesikel untersucht. In Abbildung 38 sind repräsentative Protoplasten, gezeigt die YFP-SAUL1_{R736A}, YFP-SAUL1_{R736E} oder YFP-SAUL1_{R737A} Vesikel hervorbringen.



Abbildung 38: Vesikelbildung von YFP-SAUL1 Fusionsproteinen in *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten. Das Fluoreszenzsignal der Fusionsproteine ist in Gelb und die Chlorophyllfluoreszenz in Rot dargestellt. (A) YFP-SAUL1_{R736A} Vesikel. (B) YFP-SAUL1_{R736E} Vesikel. (C) YFP-SAUL1_{R737A} Vesikel. Auch einzelne SAUL1-Fusionsproteine waren in der Lage Vesikel zu bilden. Die Messbalken entsprechen 10 μ m.

Anhand der YFP-SAUL1_{R736A}, YFP-SAUL1_{R736E} und YFP-SAUL1_{R737A} Fusionsproteine wurde gezeigt, dass einzelne Fusionsproteine unabhängig von der Membranfleckenbildung SAUL1-bedingte Vesikel bilden konnten (Abb.38 A, B, C). Demzufolge werden SAUL1-bedingte Vesikel nicht von der Membranfleckenbildung bedingt. Durch die stärkere Expression der pEG104-basierten YFP-SAUL1 Fusionsproteine konnten erstmals SAUL1-bedingte Vesikel allein durch die Expression einzelner SAUL1-Fusionsproteine beobachtet werden, die bei einer pMDC43-basierten Expression nicht auftraten. Die Expressionsmenge schien daher ausschlaggebend für die Vesikelbildung zu sein. In Abschnitt 3.2.7.3 konnten innerhalb der YFP-SAUL1 Membranflecken punktförmige Anreicherungen, die möglicherweise kleine Vesikel darstellen, beobachtet werden (Abb.27). Diese punktförmigen Strukturen wurden ebenfalls in den YFP-SAUL1_{R736E} und YFP-SAUL1_{R737A} Maximumsprojektionen zusätzlich zu den großen Vesikeln beobachtet (Abb.38 B, C). Die Bestimmung der Durchmesser ergab eine durchschnittliche Größe von 1 μm für die punktförmigen Vesikel und 3 μm für die vergrößerten Vesikel.

3.3.1 SAUL-bedingte Vesikel werden auch in planta gebildet

Ähnlich wie in den Mesophyllprotoplasten, konnte auch in transgenen *35S::YFP-SAUL1* Pflanzen eine SAUL1-bedingte Vesikelbildung beobachtet werden. Abbildung 39 zeigt repräsentative Zellen mit YFP-SAUL1-bedingten Vesikeln Col-0 WT-Pflanzen.



Abbildung 39: Bildung von YFP-SAUL1-bedingten Vesikeln in Col-O *35S::YFP-SAUL1* Pflanzen. Das Fluoreszenzsignal des Fusionsproteins ist in Gelb und die Chlorophyllfluoreszenz in Rot dargestellt. (A) Gleichmäßige Verteilung von YFP-SAUL1 mit Vesikelbildung, die eine Abschnürung von der Plasmamembran zeigte. (B) Zwei SAUL1-bedingte Vesikel mit einem potentiellen Fusionsereignis. (C) YFP-SAUL1 Vesikel in der Einstülpungs- und Abschnürungsphase. (D) Interaktionsstelle eines Vesikels mit der Plasmamembran. In *A. thaliana* konnten SAUL1-bedingte Vesikel in verschiedenen Stadien gefunden werden. Die Messbalken entsprechen in (A - C) 10 μm und in (D) 5 μm.

In Mesophyllprotoplasten traten SAUL1-bedingte Vesikel nur bei hohen Expressionsmengen von SAUL1-Fusionsproteinen auf. Diese Überexpression kann in transgenen *A. thaliana* Linien mittels regulativer Mechanismen wie *silencing* und Proteinabbau reduziert werden, sodass durch eine moderate Proteinmenge weniger Vesikel gebildet werden. Dennoch wurden auch in *A. thaliana* Gewebe SAUL1-bedingte Vesikel gefunden (Abb.39). Diese befanden sich überwiegend an der Plasmamembran und nur selten im Cytoplasma. An der Plasmamembran wurden dabei verschiedene Stadien der Vesikelbildung identifiziert. So konnten frühe Stadien während der Einstülpung der Plasmamembran (Abb.39 C) sowie Stadien während des Schließens und dem darauffolgenden Abschnüren der Vesikel (Abb.39 A, D) gefunden werden.

Ergänzend zu den direkten Interaktionen mit der Plasmamembran schienen die Vesikel auch eine Affinität zueinander zu haben, was zu einer potentiellen Verschmelzung zweier Vesikel führte (Abb.39 B, D).

Für eine höhere Auflösung der Vesikel und potentielle Folgeexperimente wurden in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Rudolph Reimer (Leibniz-Institut für Virologie, Hamburg) transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahmen von Col-0 WT und Col-0 *355::YFP-SAUL1* Blattschnitten erstellt. Hierfür wurden die *355::YFP-SAUL1* Keimlinge mit BASTA® vorselektiert, nach drei Wochen auf ihre YFP-Fluoreszenz untersucht und die positiven Pflanzen für die Fixierung vorbereitet (2.15.2). Die Proben wurden anschließend zum Leibniz-Institut für Virologie gebracht, wo durch Carola Schneider die Durchführung des TEM-Experiments stattfand. In Abbildung 40 sind repräsentative TEM-Aufnahmen der Col-0 Kontrolle und *355::YFP-SAUL1* Überexpression gezeigt.



Abbildung 40: Transmissionselektronenmikroskopie von Col-0 WT und *355::YFP-SAUL1 A. thaliana* Blattgewebe. (**A** - **C**) Col-0 WT Kontrolle. (**D** - **F**) Col-0 *355::YFP-SAUL1* Überexpressionslinie. Wichtige Zellbestandteile sind markiert: Zw = Zellwand, Pm = Plasmamembran, C = Chloroplast, MVB = *Multivesicular Body* (SAUL1-bedingte Vesikel). (**A** - **C**) Das Col-0 Material zeigte keine außergewöhnlichen Auffälligkeiten. (**B**) Zellwand mit einzelnen Zellulosefibrillen. (**C**) Weitere Zellorganellen wie Chloroplasten. (**D** - **F**) *35S::YFP-SAUL1* Material mit von der intakten Zellwand abgelösten Plasmamembran und vesikelartigen Strukturen. Die gefundenen Vesikel zeigten eine tendenziell einheitliche Größe, dennoch traten auch vereinzelte kleinere Exemplare auf. Zusätzlich wurden potentielle Abschnürungen von der Plasmamembran und das Trennen einzelner Vesikel voneinander dokumentiert. Mit Hilfe der TEM-Aufnahmen konnte durch eine zweite unabhängige Methode hochauflösende Bilder von SAUL1-bedingten Vesikeln generiert werden. Interessanterweise zeigten die Col-0 WT-Proben im Vergleich zu den 35S::YFP-SAUL1 Proben keinerlei Ablösungen der Plasmamembran von der Zellwand (Abb.40 B, D, F). Zudem wurden keine Vesikel oder vesikelartigen Strukturen in Col-O Proben gefunden, diese traten ausschließlich in den 35S::YFP-SAUL1 Proben auf. Im Vergleich zur Kontrolle zeigten die 35S::YFP-SAUL1 Proben Ablösungen der Plasmamembran von der intakten Zellwand (Abb.40 D - F). Ergänzend zu den Ablösungen wurden SAUL1-bedingte Vesikel gefunden, die von mehreren Membranen umschlossen waren. Diese Beobachtungen unterstützten die Hypothese zur Bildung von SAUL1-bedingten Vesikeln, indem sie nahelegen, dass das Membranmaterial beim Abtrennen der Plasmamembran von der Zellwand möglicherweise zu Vesikel geformt wird. Da diese Ablösungen und Vesikel nur in 35S::YFP-SAUL1 Proben beobachtet wurden, scheint die Expressionsmenge oder das N-terminal fusionierte YFP eine Rolle bei diesem Mechanismus zu spielen. Sowohl das Auftreten als auch die Größe der Vesikel lieferten neue Einblicke in die mögliche Funktion von SAUL1 im interzellulären Vesikeltransport. Die beobachteten Vesikelgrößen der in planta TEM-Aufnahmen (200 bis 1000 nm) war mit denen aus Mesophyllprotoplasten (1 bis 3 μ m) vergleichbar.

3.3.2 Punktmutiertes SAUL1 bildet in N. benthamiana vermehrt Vesikel

Um die punktmutierten SAUL1-Proteine *in planta* zu untersuchen, wurden die in Abschnitt 3.2.3 beschriebenen Genkonstrukte im pMDC43- und pEG104-Vektor mittels *A. tumefaciens* transient in *N. benthamiana* und stabil in *A. thaliana* eingebracht (2.9.3 und 2.9.4). Abbildung 41 zeigt Maximumsprojektionen mit repräsentativer Verteilung von punktmutierten GFP-SAUL1 Fusionsproteinen in *N. benthamiana* Epidermiszellen.



Abbildung 41: Verteilung von punktmutierten GFP-SAUL1 Fusionsproteinen in *N. benthamiana* Epidermiszellen. Das Fluoreszenzsignal der Fusionsproteine ist in Grün und die Chlorophyllfluoreszenz in Rot dargestellt. (A) GFP-SAUL1, (B) GFP-SAUL1_{R736A}, (C) GFP-SAUL1_{R737A}, (D) GFP-SAUL1_{R775A}, (E) GFP-SAUL1_{R736,737A}, (F) GFP-SAUL1_{R736,775A}, (G) GFP-SAUL1_{R737,775A} und (H) GFP-SAUL1_{R736,737,775A}. In *N. benthamiana* Epidermiszellen konnte nur bei GFP-SAUL1_{R775A} die Bildung von Membranflecken beobachtet werden. Mit GFP-SAUL1_{R736,737A}, GFP-SAUL1_{R736,775A} und GFP-SAUL1_{R737,775A} wurden vermehrt punkartige, potentielle Vesikel gebildet. Die Messbalken entsprechen 10 μ m.

Die GFP-SAUL1 Kontrolle zeigte in *N. benthamiana* Epidermiszellen eine überwiegend gleichmäßige Verteilung an der Plasmamembran (Abb.41 A). Vereinzelt traten Streifen ohne Fluoreszenzsignal auf, die wahrscheinlich auf Bestandteile des Cytoskeletts wie kortikale Mikrotubuli zurückzuführen waren. Weder GFP-SAUL1_{R736A} noch GFP-SAUL1_{R737A} wiesen Auffälligkeiten in ihrer Verteilung an der Plasmamembran auf (Abb.41 B, C). Im Gegensatz dazu konnte GFP-SAUL1_{R775A} Membranflecken bilden (Abb.41 D). Bei den zweifach punktmutierten GFP-SAUL1_{R736,737A}, GFP-SAUL1_{R736,775A} und GFP-SAUL1_{R737,775A} wurden zusätzlich zu der gleichmäßigen Verteilung punktförmigen Strukturen beobachtet, die möglicherweise auf SAUL1-bedingte Vesikel hinweisen (Abb.41 E, F, G). Besonders bei GFP-SAUL1_{R736,737,775A} Fusionsprotein zeigte eine gleichmäßige Verteilung an der Plasmamembran und bildete vereinzelt SAUL1-bedingte Vesikel (Abb.41 H).

Angesichts der vereinzelten Vesikelbildung bei den GFP-SAUL1 Fusionsproteinen wurden die stärker exprimierten YFP-SAUL1 Varianten genauer auf ihre Fähigkeit zur Vesikelbildung untersucht. Zusätzlich wurde das verkürzte YFP-SAUL1_{Δ736fl} in *N. benthamiana* exprimiert und am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop analysiert (Abb. 42).



Abbildung 42: Lokalisation und Vesikelbildung von YFP-SAUL1 Fusionsproteinen in *N. benthamiana*. Das Fluoreszenzsignal des Fusionsproteins ist in Gelb und die Chlorophyllfluoreszenz in Rot dargestellt. **(A)** YFP-SAUL1_{R736}, **(B)** YFP-SAUL1_{R775A}, **(C)** YFP-SAUL1_{R736},737,775A</sub> und **(D)** YFP-SAUL1_{Δ736fl}. Mit Ausnahme von YFP-SAUL1_{R775A} zeigten die YFP-SAUL1 Fusionsproteine eine vermehrte SAUL1-bedingte Vesikelbildung. Die Messbalken entsprechen 10 µm.

Die YFP-SAUL1 Fusionsproteine konnten in *N. benthamiana* Epidermiszellen an der Plasmamembran, wo sie sich teilweise in Vesikeln befanden, lokalisiert werden. Besonders die punktmutierten YFP-SAUL1_{R736A}, YFP-SAUL1_{R736,737,775A} Fusionsproteine und die YFP-SAUL1_{Δ736f1} Deletionsmutante zeigten eine verstärkte Bildung von SAUL1-bedingte Vesikeln, die unterschiedliche Größen aufwiesen (Abb.42 A, C, D). Interessanterweise war YFP-SAUL1_{R775A} im Vergleich zur GFP-Variante gleichmäßig an der Plasmamembran verteilt und wies keine Membranfleckenbildung auf (Abb.42 B). Zusätzlich zum Fluoreszenzsignal an der Plasmamembran waren kleine punktförmige Bereiche ohne Fluoreszenzsignal erkennbar. Diese könnten auf eine mögliche schwache ungleichmäßige Verteilung oder Wechselwirkungen mit Bestandteilen des Cytoskeletts hinweisen.

3.4 Lokalisation von punktmutierten YFP-SAUL Fusionsproteine in transgenen *A. thaliana* Pflanzen

Nach der Betrachtung von den punktmutierten YFP-SAUL1 Fusionsproteinen in *N. benthamiana* wurden diese in *A. thaliana* eingebracht. Dabei wurden *saul1-1 knock-out* Mutanten mit *35S::YFP-SAUL1_{R736A}*, *35S::YFP-SAUL1_{R775A}* sowie *35S::YFP-SAUL1_{Δ736f1}* transformiert um den Mutantenhintergrund zu komplementieren (2.12.4). Die Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen bei 25 °C für vier Wochen angezogen, und anschließend Blattmaterial zur Untersuchung der Lokalisation und Verteilung von YFP-SAUL1_{R736A}, YFP-SAUL1_{Δ736f1} sowie ihre Fähigkeit zur Vesikelbildung analysiert (Abb.43).



Abbildung 43: Lokalisation und Verteilung von punktmutierten YFP-SAUL1 Fusionsproteinen in transgenen *A. thaliana saul1-1* Komplementationslinien. Das Fluoreszenzsignal des Fusionsproteins ist in Gelb und die Chlorophyllfluoreszenz ist in Rot dargestellt. (**A**, **D**) Gleichmäßige Verteilung von YFP-SAUL1_{R736A} mit starken kondensierten Fluoreszenzsignalen an den Grenzflächen zwischen drei Zellen. (**B**, **E**) Gleichverteiltes YFP-SAUL1_{R775A}. (**C**, **F**) YFP-SAUL1_{Δ736fl} zeigte eine nahezu gleichmäßige Verteilung an der Plasmamembran, wobei nur einzelne Bereiche ein schwächeres Fluoreszenzsignal aufwiesen. Die Messbalken entsprechen 10 μm.

YFP-SAUL1_{R736A}, YFP-SAUL1_{R775A}, und YFP-SAUL1_{Δ736fl} konnten erfolgreich in den untersuchten transgenen *saul1-1* Komplementationslinien nachgewiesen werden. YFP-SAUL1_{R736A} war gleichmäßig an der Plasmamembran verteilt und zeigte punktuelle, starke Fluoreszenzsignale an den Kontaktflächen zwischen drei Zellen (Abb.43 A, D). YFP-SAUL1_{R775A} war ebenfalls gleichmäßig an der Plasmamembran lokalisiert und zeigte keine Auffälligkeiten (Abb.43 B, E). Trotz der Deletion des Arginin R736 in YFP-SAUL1_{Δ736fl} war dieses Fusionsprotein überwiegend gleichmäßig an der Plasmamembran verteilt, wobei nur einzelne Bereiche mit einem schwächeren Fluoreszenzsignal gefunden wurden (Abb.43 C, F).

3.4.1 Eine N-terminale YFP-Fusion beeinträchtigt die SAUL1-Funktion in *A. thaliana*

Das funktionsfähige SAUL1-Protein ist für die Regulation der pflanzlichen Immunantwort von großer Bedeutung, sodass ein Fehlen wie in der *saul1-1 knock-out* Mutante zu einer temperaturbedingten Autoimmunantwort bei Temperaturen unter 25 °C führt. Um die Reversibilität des Autoimmunphänotyps und die spezifische Funktion von SAUL1 bei diesem Phänomen zu untersuchen, wurden Komplementationslinien mit YFP-SAUL1 Fusionsproteinen generiert. Dadurch sollte getestet werden, inwiefern die verschiedenen in Rahmen der Dissertation hergestellten Deletionen und Punktmutationen sich auf die Fähigkeit zur Komplementation der *saul1-1* Mutante auswirken. Als experimentelle Grundlage sind in Abbildung 44 repräsentative Col-0 Wildtyp- und *saul1-1 knock-out* Pflanzen gezeigt, welche drei Wochen lang bei 25 °C angezogen wurden und anschließend einer Kältebehandlung bei 18 °C für eine Woche ausgesetzt waren.



Abbildung 44: Temperaturbedingter Autoimmunphänotyp von *A. thaliana saul1-1 knock-out* Pflanzen. Die Pflanzen wurden für drei Wochen unter Langtagbedingungen bei 25°C angezogen und anschließend für eine Woche mit 18 °C behandelt. (A) Breitflächig ausgesäte Col-0 Wildtyp-Pflanzen. (B) Habitus einer Col-0 Pflanze. Es wurden keine Auffälligkeiten in der Entwicklung oder Verfärbungen beobachtet. (C) Im Vergleich zum Col-0 Wildtyp zeigten die *saul1-1 knock-out* Pflanzen eine starke Veränderung in ihrem Phänotyp. (D) Die *saul1-1* Pflanzen zeigten ein stark reduziertes Wachstum und Gelbfärbung aller oberirdischen Organe. Die Messbalken entsprechen 2 cm.

Mit den in dieser Arbeit verwendeten Wachstumsbedingungen und der Kältebehandlung zur Induktion der Autoimmunantwort konnten die bereits publizierten Beobachtungen bezüglich der temperaturabhängigen Autoimmunität von *saul1-1* reproduziert werden (Abb.44, Disch *et al.* 2016). Col-0 WT-Pflanzen wurden durch eine Temperatursenkung von 25 °C auf 18 °C nicht beeinflusst und entwickelten sich normal weiter ohne Verfärbungen (Abb.44 A, B). Im Gegensatz dazu entwickelten *saul1-1* Pflanzen nach der Temperatursenkung einen Autoimmunphänotyp mit reduziertem Wachstum und gelblicher Verfärbung aller oberirdischen Organe (Abb.44 C, D).

Grundcharakterisierung der saul1-1 Nach der Linie wurden die in dieser Arbeit generierten 35S::YFP-SAUL1, 35S::YFP-SAUL1_{R736A}, 35S::YFP-SAUL1_{R775A}, 35S::YFP-SAUL1_{R736,737,775A} und 35S::YFP-SAUL1_{ΔR736/1} Genkonstrukte in Pflanzen des saul1-1 knock-out eingebracht. Zusätzlich wurde 35S::YFP-SAUL1 Hintergrund eine Überexpressionslinie im Col-0 WT-Hintergrund hergestellt (2.9.4). Nach der Selektion und Genotypisierung wurden positiv getestete Pflanzen vermehrt und für die temperaturassoziierten Experimente verwendet (2.12.5 und 2.13.3.3). Als Positivkontrolle wurde die bereits etablierte saul1-1 35S::SAUL1-GFP Komplementationslinie verwendet, welche den temperaturbedingten saul1-1 Autoimmunphänotyp aufhebt. In Abbildung 45 sind repräsentative Pflanzen der saul1-1 35S::SAUL1-GFP, saul1-1 35S::YFP-SAUL1 und Col-0 35S::YFP-SAUL1 Linien nach der einwöchigen Kältebehandlung bei 18 °C gezeigt.



45: saul1-1 SAUL1-GFP YFP-SAUL1 Abbildung Phänotypische Analyse von und Komplementations- sowie Col-0 YFP-SAUL1 Überexpressionslinien. Die Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen für drei Wochen bei 25°C angezogen und anschließend für eine Woche mit 18 °C behandelt. (A) saul1-1 35S::SAUL1-GFP Positivkontrolle. (B, C) saul1-1 35S::YFP-SAUL1 mit unterschiedlicher Aufhebung des saul1-1 bedingten Autoimmunphänotyps. (D) Col-0 35S::YFP-SAUL1 zeigt eine normale Entwicklung wie der WT. (E) Col-0 35S::YFP-SAUL1 mit gelblicher Verfärbung. (F) Col-0 35S::YFP-SAUL1 mit reduziertem Wachstum und teilweise gelblichen Verfärbungen an leicht verformten Blättern. Die Messbalken entsprechen 2 cm.

Eine Komplementation des temperaturbedingten *saul1-1* Autoimmunphänotyps war durch das Einbringen von SAUL1-Fusionsproteinen generell möglich. Die Effektivität der

Komplementation unterschied sich jedoch zwischen den verschiedenen Linien. Die *saul1-1 35S::SAUL1-GFP* Pflanzen zeigten kein reduziertes Wachstum und nur selten gelbliche Verfärbungen oder zusammengerollte Blätter (Abb.45 A). Im Vergleich dazu zeigte die in dieser Arbeit generierte *saul1-1 35S::YFP-SAUL1* Linie nur teilweise eine Aufhebung des temperaturbedingten *saul1-1* Autoimmunphänotyps (Abb.45 B, C). Einige Pflanzen dieser Linie verfärbten sich nach der Temperaturbehandlung bei 18 °C gelb und wiesen eine leichte Reduktion im Wachstum auf. Zudem wurden Pflanzen mit einem Mischphänotyp identifiziert, die keine Reduktion im Wachstum zeigten, jedoch eine leichte bis moderate Gelbfärbung und teilweise aufgerollte Blätter aufwiesen. Interessanterweise zeigten Pflanzen der Col-0 *35S::YFP-SAUL1* Überexpressionslinie ähnliche Phänotypen wie die *saul1-1 35S::YFP-SAUL1* Pflanzen, obwohl diese Pflanzen das funktionsfähige SAUL1-Protein besitzen. Durch die Überexpression des YFP-SAUL1 Fusionsproteins schien ein *saul1-1* ähnlicher Phänotyp hervorgerufen zu werden. Dabei traten vermehrt Pflanzen mit zusammengerollten und teilweise gelben Blättern auf (Abb.45 D, F).

3.4.2 Punktmutiertes SAUL1 ist funktionsfähig und kann den *saul1-1* Phänotyp überwiegend aufheben

Nachdem gezeigt werden konnte, dass 35S::YFP-SAUL1 den temperaturbedingten saul1-1 Phänotyp zumindest teilweise aufheben kann, wurden auch die saul1-1 35S::YFP-SAUL1_{R736A}, 35S::YFP-SAUL1_{R736,737,775A} saul1-1 35S::YFP-SAUL1_{R775A}, saul1-1 und saul1-1 *35S::YFP-SAUL1*_{*DR736fl*} Linien untersucht. Dabei stellte sich die Frage, ob die Membranfleckenbildung für die in planta Funktion von SAUL1 relevant ist, das heißt, ob bei Komplementation mit 35S::YFP-SAUL1_{R736A}, welches keine Membranflecken bilden kann (3.2.3), der saul1-1 Autoimmunphänotyp aufgehoben wird. Die Pflanzen wurden hierfür unter beschriebenen Anzuchtbedingungen den angezogen und der entsprechenden Kältebehandlung unterzogen. In Abbildung 46 sind repräsentative Pflanzen von saul1-1 35S::YFP-SAUL1_{R736A}, saul1-1 35S::YFP-SAUL1_{R775A}, saul1-1 35S::YFP-SAUL1_{R736,737,775A} und saul1-1 35S::YFP-SAUL1_{DR736f} gezeigt.



Abbildung 46: Phänotypische Analyse von *saul1-1* Komplementationslinien mit punktmutierten *355::YFP-SAUL1*. Die Pflanzen wurden für drei Wochen unter Langtagbedingungen bei 25°C angezogen und anschließend für eine Woche mit 18 °C behandelt. (**A**, **B**) *saul1-1 355::YFP-SAUL1_{R736A}* mit stark reduziertem Wachstum und teilweiser Aufhebung des temperaturbedingten *saul1-1* Autoimmunphänotyps. (**C**, **D**) *saul1-1 355::YFP-SAUL1_{R775A} mit teilweiser Aufhebung des saul1-1* Autoimmunphänotyps (**E**, **F**) *saul1-1 355::YFP-SAUL1_{R736,737,775A} mit stark reduziertem Wachstum und teilweiser bis gänzlicher Gelbfärbung der oberirdischen Organe. (G, H) <i>saul1-1 355::YFP-SAUL1_{ΔR736/1} mit Aufhebung der gelben Verfärbung, jedoch einem stark reduzierten Wachstum und veränderter Blattmorphologie. Die Messbalken entsprechen 2 cm.*

Die Komplementation des temperaturbedingten saul1-1 Phänotyps mit den punktmutierten 35S::YFP-SAUL1 Genkonstrukten war teilweise möglich. Demnach schien die Membranfleckenbildung nur teilweise für die Aufhebung des Autoimmunphänotyps benötigt zu werden. Die Komplementation mit 35S::YFP-SAUL1_{R736A}, 35S::YFP-SAUL1_{R736,737,775A} und 35S::YFP-SAUL1_{R775A} führte zu einer teilweisen Aufhebung des saul1-1 Autoimmunphänotyps (Abb.46 A - F). Anhand der Effizienz der Komplementation verdeutlichte sich die Bedeutung der Region von R736 bis R775 für die Funktionalität von SAUL1, da 35S::YFP-SAUL1_{R736A} oder 35S::YFP-SAUL1_{R775A} den Autoimmunphänotyp besser aufheben konnten als 35S::YFP-SAUL1_{R736,737,775A}. Interessanterweise wurde der saul1-1 Autoimmunphänotyp sehr gut durch 35S::YFP-SAUL1_{AR736fl} aufgehoben (Abb.46 G, H). Trotz der Deletion des Arginin R736 blieben die Pflanzen während der Behandlung bei 18 °C grün; dennoch war das Wachstum stark eingeschränkt und die Blätter teilweise zusammengerollt.

Eine einwöchige Behandlung bei 18 °C führte bei der Col-0 *35S::YFP-SAUL1* Überexpressionslinie zu Pflanzen mit einem ausgeprägten *saul1-1* Autoimmunphänotyp, der möglicherweise durch die N-terminale Fusion von SAUL1 und YFP verursacht wurde. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden *35S::SAUL1_{R736A}*, *35S::SAUL1_{R775A}*, *35S::SAUL1_{R736,737,775A}* und *35S::SAUL1*_{ΔR736fl} ohne N-terminalen Reporter in die *saul1-1 knock-out* Linie eingebracht, um punktmutiertes SAUL1 ohne fluorophorbedingte strukturelle Veränderung in der Pflanze zu exprimieren. In Abbildung 47 sind repräsentative Bilder der reporterlosen *saul1-1* Komplementationslienien nach einwöchiger Behandlung bei 18 °C gezeigt.



Abbildung 47: Phänotypische Analyse der Komplementation von saul1-1 durch 35S::SAUL1_{R736A}, 35S::SAUL1_{R736,737,775A} und35S::SAUL1_{ΔR736fl}. Die Pflanzen wurden für drei Wochen unter Langtagbedingungen bei 25°C angezogen und anschließend für eine Woche mit 18 °C behandelt.
(A, B) Komplementationslinien saul1-1 35S::SAUL1_{R736A} 2-3 und saul1-1 35S::SAUL1_{R736A} 3-2.
(C) Komplementation mit 35S::SAUL1_{R775A}. (D, E) saul1-1 Komplementation mit 35S::SAUL1_{R736fl} Komplementation. Punktmutiertes SAUL1 konnte den saul1-1 bedingten Autoimmunphänotyp größtenteils aufheben. Die Messbalken entsprechen 2 cm.

35S::SAUL1_{R736A} und 35S::SAUL1_{R775A} konnten den temperaturbedingten saul1-1 Autoimmunphänotyp aufheben, sodass diese Pflanzen wieder eine wildtypähnliche Entwicklung zeigten (Abb.47 A, B, C). Pflanzen der unabhängigen Komplementationslinien saul1-1 35S::SAUL1_{R736A} 2-3 und saul1-1 35S::SAUL1_{R736A} 3-2 sowie saul1-1 35S::SAUL1_{R775A} zeigten bei Temperaturen von 18 °C keine Wachstumsreduktion und keine Verfärbung der oberirdischen Organe. Diese Beobachtung deutete darauf hin, dass die Aufhebung des saul1-1 Autoimmunphänotyp unabhängig von der Fähigkeit zur Membranfleckenbildung möglich war. Sowohl SAUL1_{R736A}, welches keine Membranflecken bilden kann, als auch SAUL1_{R775A}, das Membranflecken bilden kann, konnten den saul1-1 Autoimmunphänotyp aufheben. Dass die Arginine dennoch für die SAUL1-Funktion benötigt werden, konnte mit SAUL1_{R736,737,775A} gezeigt werden, da die Komplementation mit 35S::SAUL1_{R736A} nur zu einer teilweisen Aufhebung des *saul1-1* Autoimmunphänotyps führte (Abb.47 D, E). Diese Pflanzen waren im Vergleich kleiner und wiesen teilweise gelbe Verfärbungen auf. *35S::SAUL1*_{ΔR736fl} konnte den *saul1-1* Autoimmunphänotyp ebenfalls teilweise aufheben, sodass nur ein reduziertes Wachstum und selten leichte gelbliche Verfärbungen der Blätter auftraten (Abb.47 F).

3.5 Analyse der Proteineigenschaften von rekombinantem GST-SAUL1

Die Affinität von SAUL1 zur Plasmamembran kann durch mehrere Mechanismen zustande kommen. Das SAUL1-Protein könnte sowohl mit plasmamembran-assoziierten oder in der Plasmamembran verankerten Proteinen interagieren als auch durch elektrostatische Wechselwirkungen an der Plasmamembran gebunden sein. Direkte Interaktionspartner von SAUL1 sind nicht bekannt. Hingegen wird eine Assoziation an der Plasmamembran durch die repetitive Struktur der ARM-Domänen begünstigt. Die Membranassoziation könnte durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der positiv geladenen Proteindomäne und den negativ geladenen Phospholipiden der Membran vermittelt werden. Um die Affinität von SAUL1 gegenüber Lipiden zu untersuchen, wurden Protein-Lipid-Overlay Experimente mit rekombinant exprimiertem GST-SAUL1 durchgeführt. Hierfür mussten zunächst die Expressionsbedingungen sowie das optimale Puffersystem zur Aufreinigung von GST-SAUL1 an die punktmutierten Proteine angepasst werden.

3.5.1 Expression von rekombinantem punktmutierten GST-SAUL1

Im Rahmen der Dissertation von Jan Knop (2019) wurde eine Methode zur Aufreinigung und Expression von rekombinantem SAUL1 etabliert und für *in vitro* Experimente zur strukturellen Aufklärung des Proteins genutzt (Knop *et al.* 2021). Die in dieser Arbeit etablierten SAUL1-Punktmutanten sollten analog exprimiert und aufgereinigt werden. Um rekombinante GST-SAUL1_{R736A}, GST-SAUL1_{R737A}, GST-SAUL1_{R775A} und GST-SAUL1_{R736,737,775A} Proteine erfolgreich zu exprimieren und aufzureinigen, mussten auf Basis des etablierten Protokolls für SAUL1 zunächst die optimalen Expressionsbedingungen für das jeweilige Protein ermittelt werden (2.14.1). In dieser Arbeit wurde das pGEX_6P_1-Vektorsystem in Kombination mit dem *E. coli* BL21 Star Expressionsstamm zur Expression eingesetzt. Der verwendete Vektor

107

ermöglicht eine N-terminale Fusion des jeweiligen rekombinanten SAUL1-Proteins mit einem GST-Tag, welcher bei Bedarf enzymatisch entfernt werden kann (2.14.2). Die punktmutierten rekombinanten GST-SAUL1 Proteine zeigten eine optimale Expression bei einer finalen Isopropyl-β-thiogalactosid (IPTG) Konzentration von 1 mM im Anzuchtmedium. In Abbildung 48 ist das Coomassie-gefärbte SDS-Gel zur Bestimmung der optimalen Expressionstemperatur und einer Expressionsdauer von 18 Stunden gezeigt (2.14.3.1 und 2.14.3.2).



Abbildung 48: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel des Expressionstests rekombinanter GST-SAUL1 Punktmutanten in *E. coli* BL21 Star Zellen. Die Expression wurde nach dem Erreichen einer OD₆₀₀ von 1,0 mit 1 mM IPTG induziert und für 18 Stunden bei 18 °C oder 37 °C inkubiert. Gezeigt sind Proben vor der IPTG-Induktion (BI) und nach der 18-stündigen Expression bei 18 °C (18) sowie 37 °C (37). Das rekombinante GST-SAUL1-Protein hatte eine Größe 115,2 kDa. In der ersten Tasche wurde der Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) als Größenstandard aufgetragen und die relevanten Banden bei 70 und 100 kDa markiert. In den darauffolgenden Taschen wurden die Expressionstestreihen von GST-SAUL1_{R736A}, GST-SAUL1_{R737A}, GST-SAUL1_{R775A} und GST-SAUL1_{R736,737,775A} aufgetragen. Nach der IPTG-Induktion und einer 18-stündigen Expressionszeit konnte bei allen rekombinanten GST-SAUL1-Proteinen eine Bande mit der erwarteten Größe von 115,2 kDa gefunden werden.

Rekombinantes GST-SAUL1_{R736A}, GST-SAUL1_{R737A}, GST-SAUL1_{R775A} und GST-SAUL1_{R736,737,775A} konnte erfolgreich bei 18 °C oder 37 °C exprimiert werden (Abb.48). Nach einer Expressionszeit von 18 Stunden konnte bei beiden Temperaturen eine starke Bande mit der für GST-SAUL1 erwarteten Größe von 115,2 kDa identifiziert werden. Da eine Proteinexpression bei 18 °C zu weniger tote Zellen und einer besseren Proteinfaltung führt, wurden die rekombinanten GST-SAUL1-Proteine für alle folgenden Experimente bei einer OD₆₀₀ von 1,0 mit 1 mM IPTG induziert und für 18 Stunden bei 18 °C exprimiert. Nach dem Etablieren der Expressionsbedingungen, wurde für die rekombinanten Proteine ein Löslichkeitstest zum Identifizieren des optimalen Puffers durchgeführt. Hierfür wurde der für GST-SAUL1 etablierte SAUL1-Puffer (2.14.2) verwendet, da die rekombinanten GST-SAUL1-Punktmutanten ähnliche Proteineigenschaften wie das etablierte GST-SAUL1 aufweisen sollten. Dementsprechend wurde rekombinantes GST-SAUL1_{R736A}, GST-SAUL1_{R737A}, GST-SAUL1_{R775A} und GST-SAUL1_{R736,737,775A} exprimiert und ein Zellaufschluss mittels enzymatischen Verdaus mit Lysozym und anschließender Sonifizierung durchgeführt (2.14.2). Das nach einer Zentrifugation erhaltene Pellet wurde daraufhin im SAUL1-Puffer gelöst. In Abbildung 49 sind die Coomassie-gefärbten SDS-Gele des Löslichkeitstest mit dem SAUL1-Puffer gezeigt.



Coomassie-gefärbte SDS-Gele des Abbildung 49: Löslichkeitstest der rekombinanten GST-SAUL1-Punktmutanten. Gezeigt sind die Proben vor der Induktion mit 1 mM IPTG (BI), nach einer 18-stündigen Expression bei 18 °C (AI), die Pellet-Probe (P) und der Überstand (S). In der ersten Tasche wurde der Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) (M) als Größenstandard aufgetragen. In den darauffolgenden Taschen wurden die BI, AI, P und S Proben von GST-SAUL1_{R736A}, GST-SAUL1_{R737A}, GST-SAUL1_{R775A} und GST-SAUL1_{R736,737,775A} aufgetragen. In den BI-Proben konnte kein rekombinantes GST-SAUL1 bei einer Größe von 115,2 kDa nachgewiesen werden. Nach der Induktion und einer Expressionsdauer von 18 Stunden (AI) wurde für alle GST-SAUL1-Proteine eine starke Bande bei der erwarteten Höhe identifiziert. Diese wurde ebenfalls in den Pellet-Proben (P) und in den Überstands-Probe (S) aller GST-SAUL1-Punktmutanten gefunden. Die rekombinanten Proteine waren demzufolge im SAUL1-Puffer löslich.

Im durchgeführten Löslichkeitstest konnten GST-SAUL1_{R736A}, GST-SAUL1_{R737A}, GST-SAUL1_{R775A} und GST-SAUL1_{R736,737,775A} erfolgreich im etablierten SAUL1-Puffer gelöst werden (Abb.49). Nach der Induktion mit 1 mM IPTG trat eine starke Bande bei 115,2 kDa auf, welche sowohl im Pellet als auch im Überstand gefunden werden konnte. Nach der Lyse und dem Aufschluss verblieb ein Großteil der rekombinanten GST-SAUL1-Proteine im Pellet. Dennoch war eine ausreichende Menge des jeweiligen Proteins im SAUL1-Puffer löslich und konnte für weiterführende Experimente verwendet werden.

3.5.2 Chromatographische Aufreinigung von rekombinanten GST-SAUL1_{R736A}

In dieser Arbeit sollten insbesondere die rekombinanten GST-SAUL1 und GST-SAUL1_{R736A} Proteine exprimiert und bezüglich ihrer Fähigkeit zur Lipidbindung miteinander verglichen werden. Nachdem die Expression von GST-SAUL1_{R736A} etabliert worden war, konnte das Protein mit dem ÄKTApure 25L System aufgereinigt werden (2.14.2). Das ÄKTApure 25L System ist eine automatisierte *low pressure liquid chromatography* (LPLC), mit der ein standardisiertes Aufreinigungsprotokoll für rekombinante Proteine erstellt werden kann. Für die Aufreinigung von GST-SAUL1_{R736A} wurde das für GST-SAUL1 etablierte Protokoll verwendet. In Abbildung 50 ist das Chromatogramm der Affinitätschromatographie gezeigt, in dem die Peaks von GST-SAUL1 und GST-SAUL_{R736A} in der Aufreinigung verglichen werden.



Abbildung 50: Chromatogramm der Affinitätschromatographie zum Vergleich der Aufreinigung von rekombinanten GST-SAUL1 (grau) und GST-SAUL1_{R736A} (schwarz). Auf der Abszisse ist das verwendete Volumen in Milliliter und auf der Ordinate die Absorption der Proteine in mAU angegeben. Der Verlauf beider Graphen war nahezu identisch. Es wurde mit der E3 Fraktion von 60 bis 63 mL weitergearbeitet.

Rekombinantes GST-SAUL1 und GST-SAUL1_{R736A} konnten mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Die Chromatogramme wiesen kaum Unterschiede auf, was darauf hindeutet, dass beide Proteine eine starke strukturelle Ähnlichkeit und vergleichbare Eigenschaften besitzen (vgl. Abb.17). Die Elution der Proteine begann bei 57,5 mL und erreichten ihr Maximum nach 62,5 mL Gesamtvolumen bei 420 mAU für GST-SAUL1 und 375 mAU für GST-SAUL1_{R736A}. Unterschiede in der Peakhöhe waren durch die Menge des Ausgangsmaterials bedingt. Ein auffälliger Unterschied trat bei GST-SAUL1_{R736A} nach 64 mL Gesamtvolumen auf, als am Ende der Elution des Proteins ein Ausläufer zu einem zweiten 110 Peak führte. Um das aufgereinigte rekombinante GST-SAUL1_{R736A} zu verifizieren, wurde ein Westernblot mit den Elutionsfraktionen E3 (60 - 63 mL) und E4 (63 - 66 mL) sowie den BI, AI, S und P-Proben durchgeführt (2.14.3.2). Abbildung 51 zeigt einen exemplarischen Westernblot für das rekombinante GST-SAUL1_{R736A}.



Abbildung 51: Westernblot zum Nachweis von GST-SAUL1_{R736A}. Gezeigt sind die Proben vor der Induktion (BI), nach der Expression (AI), des Überstands (S), des Pellets (P), der Elutionsfraktionen E3 und E4 sowie einer Positivkontrolle (Posi-Tag Eptiope Tag Control Protein PK). Die Membran wurde Anti-GST-Antikörper (Maus) gefolgt von einem zuerst mit einem HRP-konjugierten Anti-Maus-Antikörper (Ziege) inkubiert. In der ersten Tasche ist der Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) (M) mit relevanten Größen in kDa zu sehen. In den darauffolgenden BI- und AI-Proben konnte die Expression des rekombinanten GST-SAUL1_{R736A} durch eine starke Bande bei der erwarteten Größe von 115,2 kDa bestätigt werden. Auch in der S- und P-Probe wurde die GST-SAUL1_{R736A} Bande zusammen mit kleineren Banden im Bereich von 25 bis 70 kDa gefunden. In den Elutionsfraktionen E3 und E4 konnte eine starke Anreicherung von GST-SAUL1_{R736A} nachgewiesen werden, was auf eine erfolgreiche Aufreinigung hindeutet. Die verwendete Positivkontrolle zeigte eine Bande zwischen 40 und 55 kDa, welche den Herstellerangaben von 45 kDa entsprach.

Durch den Westernblot konnte die erfolgreiche Expression und Aufreinigung von rekombinantem GST-SAUL1_{R736A} mittels Anti-GST- und Anti-Maus-Antikörpern mit einer Bande bei 115,2 kDa bestätigt werden. Das rekombinante GST-SAUL1_{R736A} konnte in der Al-Probe wie auch im Pellet und im Überstand nachgewiesen werden. Ergänzend konnten mit dem verwendeten Primärantikörper zusätzliche Proteine zwischen 25 und 70 kDa identifiziert werden, die möglicherweise Abbauprodukte des rekombinanten Proteins oder GST-Mono- und -Multimere darstellen. Für GST-Monomere wäre eine Größe von 26,5 kDa zu erwarten, aus denen sich etwa 50 kDa große Dimere und 75 kDa große Trimere bilden könnten. In den Elutionsfraktionen E3 und E4 konnte eine erfolgreiche Aufreinigung und Anreicherung des rekombinanten GST-SAUL1_{R736A} anhand einer starken Bande mit der erwarteten Größe nachgewiesen werden, der Großteil von unspezifischen Banden wurde

durch die Aufreinigung entfernt. Als Positivkontrolle wurde die Posi-Tag Epitope Tag Control verwendet, die eine Vielzahl rekombinanter Protein-Tags, einschließlich GST, enthält. Laut Herstellerangabe sollte das rekombinante Posi-Tag-Protein etws 45 kDa groß sein, was auch mit der erhaltenen Bande im Westernblot übereinstimmte.

3.5.3 Größenauschlusschromatographie von SAUL1 und SAUL1_{R736A}

Zum Vergleich der beiden rekombinanten SAUL1-Proteine wurde der GST-Tag mittels PreScission[™]-Protease-Verdau vom SAUL1-Protein entfernt (2.14.2). Anschließend wurden die rekombinanten Proteine SAUL1 und SAUL1_{R736A} über Größenausschlusschromatographie (GPC) anhand ihrer unterschiedlichen Größen isoliert. In Abbildung 52 sind die Chromatogramme der GPC vom rekombinanten SAUL1 und SAUL1_{R736A} gezeigt.



Abbildung 52: Vergleich der Größenausschlusschromatographie von rekombinanten SAUL1 (grau) und SAUL1_{R736A} (schwarz). Die Abszisse zeigt das verwendete Gesamtvolumen in Milliliter und die Ordinate die Absorption der Proteine in mAU. Peak 1 (P1) trat nach einem Retentionsvolumen von 310 bis 314 mL auf und zeigte eine Absorption von 4 bis 10 mAU. Nach 328 bis 340 mL wurde Peak 2 (P2) mit einer Absorption von 11 mAU für SAUL1_{R736A} und 33 mAU für SAUL1 detektiert. Der größte Peak (P3) erschien zwischen 342 und 354 mL und erreichte eine maximale Absorption von 111 mAU bei SAUL1_{R736A} und 158 mAU bei SAUL1. Ausläufer Peak (P4) bei einem Volumen von 356 bis 361 mL mit einer Absorption von 9 mAU bei SAUL1_{R736A} und 10 bei SAUL1. Peak (P5) erschien bei einem Volumen von 373 bis 386 mL und erreichte bei beiden Proteinen eine maximale Absorption von 18 und 38 mAU. Die Chromatogramme der beiden Proteine waren sich demnach ähnlich.

Die gezeigten GPC-Chromatogramme nach dem PreScission™-Protease-Verdau der rekombinanten Proteine GST-SAUL1 und GST-SAUL1_{R736A} wiesen starken Ähnlichkeiten zueinander auf. In beiden Aufreinigungen wurde die verwendete Proteinprobe der Affinitätschromatographie in fünf definierte Peaks aufgetrennt. Nach einem Retentionsvolumen von 45 mL erschien der erste Peak mit den größten Proteinen, welche die verwendete Säule (2.14.2) am schnellsten passierten. Dabei handelte es sich um unverdautes GST-SAUL1 oder GST-SAUL1_{R736A}, die mit einem Molekulargewicht von 115,2 kDa das höchste Gewicht in der Probe aufwiesen. Im zweiten Peak, der zwischen 62 und 70 mL auftrat, befanden sich die rekombinanten SAUL1 und SAUL1_{R736A} Proteine, die nach dem Abtrennen des GST-Tags ein Molekulargewicht von 88,7 kDa besaßen. Der größte Peak, der im Volumenbereich von 75 bis 87 mL erschien, bestand aus dem abgetrennten GST-Tag. Freies GST hat ein Molekulargewicht von 26,5 kDa und verblieb daher länger in der GPC-Säule als die rekombinanten SAUL1-Proteine. Die wesentlich stärkere Amplitude für GST (158 mAU) im Vergleich zu den rekombinanten SAUL1-Proteinen (33 mAU) resultierte aus dem höheren Anteil aromatischer Aminosäuren im GST, wodurch GST eine höhere Absorption am UV-Detektor als SAUL1 aufweist. In den nachfolgenden Peaks 4 und 5 wurden vermutlich ungefaltete oder degradierte Proteine detektiert, die von der GPC-Säule gespült wurden. Relevante Elutionsproben der einzelnen Peaks wurden anschließend mittels SDS-PAGE und darauffolgender Coomassie-Färbung untersucht, um die Proteinfraktionen anhand der Größe zu identifizieren (2.14.3.1 und 2.14.3.2). Eine spezifischere Verifizierung mittels Westernblot war in diesem Schritt nicht mehr möglich, da kein Antikörper gegen das SAUL1-Protein verfügbar war. In Abbildung 53 sind die relevanten Fraktionen der einzelnen Peaks für die Aufreinigung des rekombinanten SAUL1_{R736A} Proteins gezeigt.



Abbildung 53: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel der SAUL1_{R736A} Aufreinigung nach der durchgeführten Größenausschlusschromatographie. Gezeigt sind die Proben nach der Expression (AI), die Überstandsprobe (S), der Affinitätschromatographie (AC) und den Elutionsfraktionen der GPC-Peaks 1 bis 5. Als Größenstandard wurde die Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) verwendet (M). In der AI- und S-Probe wurde die erwartete Bande des rekombinanten GST-SAUL1_{R736A} Proteins bei 115,2 kDa nachgewiesen. Zusätzliche Proteine waren nach der Affinitätschromatographie nicht mehr vorhanden. In der AC-Probe waren nur noch GST-assoziierte Proteinbanden nachweisbar. In der Elutionsfraktion 23 des ersten GPC-Peaks konnte keine Bande detektiert werden. Die Fraktionen 33 und 35 von Peak 2 zeigten Banden im Bereich zwischen 70 und 100 kDa, die dem aufgereinigten SAUL1 mit einer Größe von 88,7 kDa zugeordnet werden konnten. In den Fraktionen 40 und 42 von Peak 3 befand sich das abgetrennte GST-Tag, dessen erwartetes Molekulargewicht 26,5 kDa beträgt. Allerdings waren die Banden kleiner als das erwartete Molekulargewicht. Die ungefalteten Proteine aus Peak 4 und Peak 5 waren nur als schwache Banden in Fraktion 56 und 58 auf dem Gel zu erkennen.

Durch den PreScission™-Protease-Verdau und anschließender GPC konnte das rekombinante SAUL1_{R736A} Protein erfolgreich aufgereinigt und aufkonzentriert werden. In den Proben vor der Affinitätschromatographie wurden zusätzlich zu rekombinanten GST-SAUL1_{R736A} bei 115,2 kDa unspezifische Proteinbanden SDS-Gel auch im nachgewiesen. Die Affinitätschromatographie entfernte einen Großteil dieser unspezifischen Proteine, sodass nur noch GST-assoziierte Proteine im SDS-Gel sichtbar waren. Mit dem anschließenden Protease-Verdau und der GPC wurden alle Proteine der Probe anhand ihrer Größe aufgetrennt. Dies wurde sowohl im Chromatogramm der GPC als auch in der SDS-PAGE nachgewiesen. Die Proteine wurden in fünf Peaks aufgetrennt wovon repräsentative Elutionsfraktionen aufgetragen wurden. In der Fraktion 23, die die größten Proteine enthalten sollte, wurde unverdautes GST-SAUL1_{R736A} erwartet, jedoch konnte es im SDS-Gel nicht nachgewiesen werden. Die geringe Amplitude von Peak 1 (P1) deutete darauf hin, dass die Proteinmenge für die Coomassie-Färbung zu niedrig war. In den Fraktionen 33 und 35 des zweiten Peaks wurde das rekombinante SAUL1_{R736A} ohne GST-Tag erwartet, welches in beiden Fraktionen durch eine Bande mit dem erwarteten Molekulargewicht von 88,7 kDa detektiert wurde. Das abgetrennte GST-Tag wurde im dritten Peak mit der größten Amplitude in der GPC erwartet. In den Fraktionen 40 und 42 war zwar eine Bande im SDS-Gel sichtbar, jedoch wies sie eine abweichende Größe von den erwarteten 26,5 kDa auf. Peaks 4 und 5 enthielten vermutlich ungefaltete Proteine, deren Größen unbekannt waren. Aufgrund ihrer niedrigen Konzentration waren sie im SDS-Gel nur schwer nachweisbar. Schwache Banden waren nur in den Fraktionen 56 und 58 von Peak 5 zu erkennen. Das aufgereinigte SAUL1_{R736A} sowie Proben der anderen Peaks wurden anschließend für eine CD-spektroskopische Untersuchung verwendet, die von Sven Falke in der Biochemie (Universität Hamburg) durchgeführt wurde (vgl. 3.2.4).

3.5.4 SAUL1 zeigt eine Affinität zu Plasmamembran-assoziierten Lipiden und zu verschiedenen Phosphatidylinositolen

Lipide als Hauptbestandteil der Membranen aller Organismen tragen eine zentrale Rolle beim interzellulären Transport und bei der Kommunikation. Membranen oder Vesikel können aus unterschiedlichen Lipiden bestehen, was zu deren spezifischen Eigenschaften und Funktion führt. Konisch oder revers-konisch geformte Phospholipide, wie Lysophosphatidsäure oder Phosphatidsäure, bewirken eine Krümmung der Plasmamembran, wodurch Einbuchtungen und Bindestellen für Proteine geschaffen oder Vesikel abgeschnürt werden können. Besonders bei der Vesikelbildung bilden sich frühe Endosomen, die sich zu späten Endosomen entwickeln und dabei die Lipidzusammensetzung verändern (Podinovskaia und Spang 2018). Frühe Endosomen enthalten eine höhere Konzentration von PtdIns(3)P, das wichtig für die Rekrutierung von Proteinen für die Sortierung und dem Transport von Membrankomponenten ist, welches während der Reifung zu späten Endosomen durch PtdIns(3,5)P2 ausgetauscht wird, um beispielsweise die Fusion mit Lysosomen zu ermöglichen (Ikonomov et al. 2006, Podinovskaia et al. 2021).

Um die Affinität von SAUL1 gegenüber Lipiden zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit PIP-Strips (Invitrogen) verwendet. Mit diesen wurden Protein-Lipid-Overlay Assays durchgeführt, um potentielle Interaktionen zu identifizieren (2.14.3.3). Dazu wurden 20 μg/mL der rekombinanten GST-SAUL1 und GST-SAUL1_{R736A} Proteine über Nacht auf den PIP-Strips inkubiert. Am folgenden Tag wurde mittels Westernblot untersucht, ob GST-SAUL1 mit einem spezifischen Lipid interagiert (2.14.3.2). Abbildung 54 zeigt tabellarisch die getesteten Lipide sowie den schematischen Aufbau eines PIP-Strips. Zusätzlich sind repräsentative PIP-Strips zu den jeweiligen rekombinanten SAUL1-Proteinen gezeigt.



Abbildung 54: Aufbau einer PIP-Strip-Membran und Protein-Lipid-Affinität von rekombinanten GST-SAUL1 und GST-SAUL1_{R736A}. Die Tabelle zeigt die auf der PIP-Strip-Membran gebundenen Lipide sowie deren Anordnung, die schematisch auf dem Layout dargestellt ist. Nach einer Übernachtinkubation der Membran mit 20 µg/mL der aufgereinigten rekombinanten Proteine wurde eine potentielle Interaktion mit Hilfe eines Anti-GST-Antikörper nachgewiesen. GST-SAUL1 zeigte eine moderate bis starke Affinität zu den Lipiden 4, 5, 6, 11 und 14 und eine schwache Affinität zu den Lipiden 12, 13 und 15. Das rekombinante GST-SAUL1_{R736A} wies eine Affinität zu den Lipiden 4, 5, 6, 14 und 15 auf, wobei die stärksten Interaktionen bei den Lipiden 14 und 15 zu gefunden wurde. In der GST-Kontrolle wurde keine Interaktion von GST und einem Lipid nachgewiesen. Die Protein-Lipid Interaktionsanalyse wurde fünfmal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

Mit den PIP-Strips konnte eine Interaktion der rekombinanten Proteine GST-SAUL1 und GST-SAUL1_{R736A} mit Lipiden der Plasmamembran und vesikulären Membranen nachgewiesen werden. Die GST-Kontrolle zeigte, dass GST keine Affinität gegenüber den untersuchten Lipiden aufwies, wodurch die gefundenen Interaktionen auf SAUL1 zurückzuführen waren. Sowohl GST-SAUL1 als auch GST-SAUL1_{R736A} zeigten eine positive Interaktion mit den Phosphatidylinositol (PtdIns) Monophosphaten PtdIns(3)P, PtdIns(4)P und PtdIns(5)P. Zusätzlich zeigte GST-SAUL1 eine Affinität zu den PtdIns(3,5)P₂, PtdIns(4,5)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃ Di- und Triphosphaten, zu denen GST-SAUL1_{R736A} keine Bindung aufwies.

PtdIns sind häufig Bestandteile von vesikulären Membranen und könnten auf eine Affinität von SAUL1 zu Vesikeln hinweisen. Darüber hinaus konnte für beide Proteine eine Affinität gegenüber Phosphatidsäure (PA) und um Phosphatidylserin (PS), die Bestandteile der Plasmamembran sind, gezeigt werden. Dies deutete darauf hin, dass die Membranassoziation von SAUL1 möglicherweise durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Phospholipiden und der C-terminalen, positiv geladenen Region von SAUL1 wird.

4. Diskussion

Die in dieser Arbeit untersuchte SENESZENZ-ASSOZIIERTE E3 UBIQUITIN-LIGASE 1 (SAUL1) spielt eine essenzielle Rolle in der Regulation der pflanzlichen Immunantwort, jedoch ist der genaue Wirkmechanismus von SAUL1 nicht bekannt (Tong *et al.* 2017, Liang *et al.* 2019, Hessler *et al.* 2021). Basierend auf die SEC-SAXS-Analysen modellierte Proteinstruktur konnte eine positiv geladene Region in SAUL1 identifiziert werden, die Hinweise auf mögliche Funktionen von SAUL1 bietet (Knop *et al.* 2021).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die direkte Interaktion zwischen SAUL1 und *Pseudomonas syringae* sowie *Hyaloperonospora arabidopsis* Effektoren untersucht. Zudem wurden zellbiologische Experimente zur SAUL1-bedingten Membranflecken- und Vesikelbildung durchgeführt. Besonders die Membranfleckenbildung stellt eine mögliche Funktion von SAUL1 innerhalb der pflanzlichen Immunantwort dar und präsentiert neue, noch nicht verstandene Eigenschaften dieses Proteins. Um diese besser zu verstehen, wurde die Armadillo-like Domäne 7-11 in ihre Unterdomänen zerlegt und deren Affinität zur Plasmamembran untersucht. Darüber hinaus wurde die positiv geladene Region innerhalb dieser Domäne modifiziert und die Funktionalität des SAUL1-Proteins in *Arabidopsis thaliana* Mesophyllprotoplasten, *Nicotiana benthamiana* Epidermiszellen und transgenen *Arabidopsis thaliana* Pflanzen analysiert. Mit Hilfe von Protein-Lipid-Overlay Experimenten konnte erstmals die Affinität von rekombinanten SAUL1-Proteinen zu Bestandteilen der Plasmamembran und zu Vesikeln gezeigt werden, wodurch ein möglicher Mechanismus zur Membranassoziation von SAUL1 und zur Bildung der Membranflecken gefunden wurde.

4.1 SAUL1 ist kein direktes Ziel von pathogen-assoziierten Effektoren

Das Hefe-2-Hybrid-Effektor Interaktionsexperiment zeigte zwar potentielle Interaktionen zwischen *P. syringae* und *H. arabidopsidis* Effektoren mit SAUL1, diese konnten jedoch in weiteren Hefeexperimenten nicht bestätigt werden (Tab.16 und Abb.6). Es besteht die Möglichkeit, dass die pflanzliche E3-Ubiquitin-Ligase SAUL1 innerhalb der Hefe als Fremdprotein identifiziert und entweder inhibiert oder abgebaut wurde. Aus diesem Grund wurden gezielt Effektoren der im Hefescreening gefundenen Interaktionen zusätzlich durch Co-Immunopräzipitation (Co-IP) im pflanzlichen System untersucht.

Hierfür wurden durch die Bestimmung der Lokalisation von P. syringae Effektoren in N. benthamiana Epidermiszellen die Effektoren PtoAB2, PtoM1, und PtoN1 aufgrund ihrer Lokalisation and der Plasmamembran ausgewählt und von Maria Syndalovskaya im Rahmen ihrer Masterarbeit mittels Co-IP auf eine Interaktion mit SAUL1 hin untersucht. Auch in diesem Ansatz konnte keine Interaktion zwischen SAUL1 und einem Effektor festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass SAUL1 kein direktes Ziel der untersuchten Effektoren von P. syringae ist. Dies schließt jedoch nicht aus, dass pathogen-assoziierte Effektoren keinen Einfluss auf SAUL1 haben. Sie könnten den Proteinkomplex, in dem sich SAUL1 möglicherwiese an der Plasmamembran befindet, modifizieren und dadurch die pflanzliche Immunantwort über CHILLING-SENSITIVE 1 (CHS1) und SUPPRESSION OF CHILLING-SENSITIVE 1-3 (SOC3) induzieren (Liang et al. 2019). Dieser Komplex folgt dem guard Modell und überwacht nicht nur die SAUL1-Homöostase, sondern auch dessen Zustand. Falls eine Veränderung von SAUL1 durch einen Effektor ausgelöst wird, wird diese von CHS1 und SOC3 erkannt und eine Signalkaskade über ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1 (EDS1) induziert, welche die effector-triggered-immunity (ETI) auslöst (Liang et al. 2019). EDS1 könnte dabei ein Knotenpunkt in der Signalweiterleitung und Spezialisierung darstellen. PHYTOALEXINE DEFICIENT 4 (PAD4) und SENESCENE ASSOCIATED GENE 101 (SAG101), weitere essentielle Proteine der Immunantwort, interagieren über konservierte Aminosäurereste mit EDS1 und bilden Dimere. Diese spielen eine entscheidende Rolle bei der Signalübertragung und ermöglichen eine präzise Regulation der Immunantwort (Dongus et al. 2022). Ähnliches kann bei der NDR1-bedingten Induktion der ETI beobachtet werden. AvrRpt2 und AvrRpm1 werden von P. syringae durch das Typ-3-Sekretionssystem in die Pflanzenzelle eingeschleust, um die Funktion von RIN4 zu beeinträchtigen (Collmer et al. 2012, Gimenez-Ibanez et al. 2016). Diese Effektoren werden von den CC-NLRs RESISTANCE TO PSEUDOMONAS SYRINGAE 2 (RPS2) und RESISTANCE TO PSEUDOMONAS SYRINGAE PV. MACULICOLA 1 (RPM1) erkannt, wodurch eine NDR1- beziehungsweise EDS1-bedingte Signaltransduktion über die MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE MPK3 und MPK6 induziert werden kann, um die Expression von weiteren NLR-Proteinen zu aktivieren (Lang et al. 2022). Im Kontext von SAUL1 könnten Effektoren jedoch auch Bestandteile der Plasmamembran oder andere Proteine modifizieren, wodurch die Funktion von SAUL1 beeinträchtigt und keine Immunantwort mehr ausgelöst werden kann. Die Pseudomonas-Effektoren PtoA, PtoB und PtoAB inhibieren beispielsweise die PRRs EF-TU RECEPTOR (EFR), FLAGELLIN-SENSITIVE 2 (FLS2), BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1 (BAK1) und CHITIN ELICITOR RECEPTOR KINASE 1 (CERK1), wodurch die Detektion von Pathogenen stark beeinträchtigt wird und eine mögliche Signalkaskade mit SAUL1 inhibiert werden könnte (Robatzek *et al.* 2006, Gimenez-Ibanez *et al.* 2009, Lu *et al.* 2011, Macho und Zipfel 2015). Dass die Ubiquitinierung eine Rolle in der Regulation der pflanzlichen Immunantwort spielt, konnte anhand von unterschiedlichen Ubiquitin-Ligasen gezeigt werden, die von Gao *et al.* (2022) zusammengefasst wurden. Weitere Effektoren wie HopM1, HopA1, HopPtoD1, oder AvrPto beeinträchtigen das 26S-Proteasom und den vesikulären Transport, um die Proteinhomöostase innerhalb der Zelle zu stören (Üstün *et al.* 2016). Diese Effektoren können direkt mit dem Proteasom interagieren, wodurch dessen Aktivität beeinträchtigt wird und keine normale Funktion mehr möglich ist. Alternativ beeinträchtigen Effektoren die Ubiquitinierung von Substraten, wodurch es zu einer Akkumulation von ubiquitinierten Proteinen kommt und letztendlich die Pflanzen anfälliger gegenüber Infektionen werden (Üstün *et al.* 2016). Als Ubiquitin-Ligase könnte SAUL1 ein Ziel von Effektoren, die spezifisch E3-Ligasen beeinträchtigen, sein.

Die Rolle von PUB-E3-Ligasen in der pflanzlichen Immunantwort konnte für die an BAK1 assoziierten E3-Ligasen PUB12 und PUB13 gezeigt werden, die BAK1 nach einer Behandlung mit flg22 ubiquitinieren. Diese führen ebenfalls zu einer durch Flagellin induzierten Degradation von FLS2 (Lu et al. 2011). Zusätzlich ist PUB13 an der Regulation des Chitin-Rezeptors LYSIN MOTIF RECEPTOR KINASE 5 (LYK5) beteiligt (Laio et al. 2017). BIK1 ist für die Phosphorylierung von FLS2 zuständig und wird von PUB25 und PUB26 mittels Ubiquitinierung für den proteasomalen Abbau markiert. Die E3-Ligasen PUB22, PUB23 und PUB24 sind negative Regulatoren von Zelltod und Immunantworten (Trujillo et al. 2008). Vor kurzem konnte auch für die Ubiquitin-Ligasen ARABIDOPSIS TOXICUS EN LEVADURA 31 (ATL31) und ATL6 eine Funktion für die Regulation der Immunantwort gezeigt werden (Liu et al. 2022). Dabei interagieren diese mit CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE 28 (CPK28) an der Plasmamembran um dieses zu ubiquitinieren und dessen Abbau über das 26S-Proteasom einzuleiten. Da CPK28 normalerweise den Abbau von BIK1 durch PUB25 und PUB26 fördert, wirken ATL31 und ATL6 als positive Regulatoren von BIK1, indem sie den Abbau von CPK28 verstärken (Wang et al. 2018, Liu et al. 2022). Generell zeigen pub Mutanten eine reduzierte Anfälligkeit gegenüber Infektionen, was auf deren regulative Funktion in der pflanzlichen Immunantwort hinweist (Wang et al. 2018). Demzufolge besteht die Möglichkeit, dass auch SAUL1 als PUB-Protein und positiver Regulator der PTI ein Ziel von Effektoren ist.

4.2 Die Membranaffinität von SAUL1 benötigt eine intakte ARM₇₋₁₁ Domäne und deren positive Ladung

Die Plasmamembran ist der Ort für die inter- und intrazelluläre Kommunikation, über die durch Transportproteine, Rezeptoren und vesikulären Transport wichtige Informationen übermittelt werden (McKenna et al. 2014, Wu et al. 2015, Liang et al. 2019). Eine Art der Signaltransduktion sind posttranslationale Proteinmodifikationen wie die Ubiquitinierung. Durch die ubiquitinierte Zielproteine aktiviert, relokalisiert oder degradiert werden können (Kulikov et al. 2005, Zhou und Zeng 2017, Trujillo 2018). Oft werden durch Ubiquitinierung Proteine für den Abbau über das 26S-Proteasom markiert. Hierfür werden die Ubiquitineinheiten über eine E-Lysin 48 Verkettung an das spezifische Zielprotein gebunden, welches anschließend abgebaut wird (Ikeda und Dikic 2008, Trujillo 2018). Somit könnte SAUL1 als Ubiquitin-Ligase ein noch unbekanntes Zielprotein ubiquitinieren, um Signale an der Plasmamembran von Pflanzenzellen zu integrieren. Anhand der Struktur von E3-Ubiquitin-Ligasen kann man diese in vier unterschiedliche Klassen unterteilen. Dazu gehören die HECT-Ubiquitin-Ligasen mit der homologous to E6-associated protein C-terminus die interesting Domäne, really new gene (RING)-Ubiquitin-Ligasen, cullin-RING-Ubiquitin-Ligasen und die U-box Ubiquitin-Ligasen, zu denen auch SAUL1 gehört (Vierstra 2009, Zhou und Zheng 2017). Zum Beispiel liegen die HECT-Ubiquitin-Ligasen UPL1, UPL3 und UPL5 im Cytosol vor und sind für die Regulation der Salicylsäure-induzierten Genexpression und der daraus resultierenden Immunität von großer Bedeutung. Besonders UPL3 interagiert direkt mit dem *regulatory particle* des 26S-Proteasom, wodurch es UPL3 ermöglicht Substrate zu polyubiquitinieren (Furniss et al. 2018). Im Gegensatz dazu nehmen SAUL1 und die dazugehörigen Paraloge PUB43 und PUB42 durch ihre erhöhte Anzahl von ARM-repeats eine spezielle Rolle in der PUB-Familie ein. Denn gerade diese ARM-Domänen ermöglichen den Proteinen eine Affinität zur Plasmamembran aufzubauen und an dieser zu lokalisieren (Mudgil et al. 2004). SAUL1 ist nicht nur aufgrund seiner Lokalisation, sondern auch aufgrund der strengen Überwachung seiner Homöostase und Integrität besonders und spielt dadurch möglicherweise eine zentrale Rolle in der pflanzlichen Immunantwort (Tong et al 2016, Liang et al. 2019). Angesichts dieser Rolle als an der Plasmamembran assoziierter positiver Regulator der PTI könnte das unbekannte Substrat von SAUL1 ein Protein sein, welches die Immunantwort moduliert (Tong et al. 2018, Liang et al. 2019). Die

Assoziation von SAUL1 an der Plasmamembran über die ARM₇₋₁₁ Domäne konnte bereits von Drechsel *et al.* (2011) gezeigt werden, jedoch blieb unklar, wie die Affinität zwischen ARM-Domäne und Plasmamembran zustande kommt.

In dieser Arbeit konnte die bereits beschriebene Lokalisation von SAUL1-GFP, GFP-SAUL1, GFP-SAUL1∆ARM7-11 und GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ reproduziert werden (Abb.7, Drechsel et al. 2011). Durch das Fehlen der ARM7-11 Domäne war SAUL1 nicht mehr an der Plasmamembran assoziiert, sondern frei im Cytoplasma verteilt. Im Gegensatz dazu ist die ARM₇₋₁₁ Domäne allein ausreichend, um die Plasmamembranassoziation zu ermöglichen. Die ARM-*repeats* dieser Domäne bestehen aus mehreren α -Helices, die eine generelle Affinität zur Plasmamembran und anderen Proteinen aufweisen (Huber et al. 1997, Mudgil et al. 2004, Coates 2003). In dieser Arbeit wurde die Membranaffinität der ARM₇₋₁₁ Domäne untersucht. ARM-Domänen können entweder direkt an Membranen assoziieren oder durch posttranslationale Modifikationen wie Myristoylierung oder Palmitoylierung eine Affinität zu Membran aufbauen. Eine solche Interaktion konnte mit dem Armadillo Repeat Protein VAC8P gezeigt werden, das in S. cerevisiae für das Andocken und Fusionieren von Vakuolen benötigt wird (Wang et al. 2001). Dass die Struktur für eine solche Motivbildung notwendig ist, konnte anhand der Myristoylierung von BON1 beschrieben werden. Die Myristoylierung und damit verbundene Membranlokalisation, ist durch das Glycin an Aminosäureposition 2 bedingt. Wird dieses Glycin durch Alanin ausgetauscht, ist keine Myristoylierung mehr möglich und BON1 verliert seine Affinität zur Plasmamembran (Li et al. 2010). Auch wenn SAUL1 nicht über eine Myristoylierung oder Palmitoylierung an der Plasmamembran assoziiert ist, können Modifikationen in den ARM-Teildomänen sowie Verkürzungen dazu führen, dass SAUL1 seine Affinität zur Plasmamembran verliert. Die generierten verkürzten Fusionsproteine GFP-SAUL1ARM7-11, GFP-SAUL1ARM₈₋₁₁, GFP-SAUL1ARM7, GFP-SAUL1ARM₁₁, GFP-SAUL1ARM₈₋₁₀ und GFP-SAUL1ARM₇₋₁₀ wurden in A. thaliana Mesophyllprotoplasten exprimiert und intrazellulär lokalisiert. Bereits eine weitere Verkürzung der ARM7-11 Domäne führte zum Verlust der Plasmamembranaffinität (Abb.9). Dabei spielte es keine Rolle, ob Teildomäne ARM7 oder ARM11 entfernt wurde. Auch die Fusionsproteine der einzelnen Teildomänen, GFP-SAUL1ARM7 und GFP-SAUL1ARM11, waren im Cytoplasma lokalisiert. Diese stark verkürzten ARM-Teildomänen könnten aufgrund ihrer modifizierten Struktur fehlerhaft gefaltet sein, was eine Assoziiation an der Plasmamembran möglicherweise verhindert.

Der Verlust der Plasmamembranaffinität könnte durch eine veränderte Oberflächenladung der verkürzten SAUL1-Proteine zustande kommen. In Knop et al. (2021) wurde auf Grundlage von SEC-SAXS Experimenten ein Modell der SAUL1-Raumstruktur mit dem Profil der Oberflächenladung erstellt. Dadurch konnte eine positiv geladene Region identifiziert werden, die vom Ende der ARM₇₋₁₁ Domäne bis zum C-Terminus reicht. Durch die Verkürzung der ARM₇₋₁₁ Domäne wird die positiv geladene Region von SAUL1 beeinträchtigt, sodass elektrostatische Wechselwirkungen zwischen SAUL1 und negativ geladenen Molekülen der Plasmamembran, wie beispielsweise Phosphatidylinositol-4-Phosphat (PtdIns(4)P), gestört sein könnten (Simon et al. 2016). Viele periphere Membranproteine können über spezifische Lipidbindedomänen wie der FYVE- oder PH-Domäne mit Phosphatidylinositolen (PtdIns) von Membranen interagieren (Hammod und Balla 2015). Diese elektrostatischen Wechselwirkungen basieren häufig auf den positiven Ladungen in den Seitenketten der Aminosäuren Lysin (K) und/oder Arginin (R), welche mit den PtdIns und der Phosphatidsäure (PA) interagieren (Brzeska et al. 2010, Jaillais et al. 2011). Die positiv geladene Region in SAUL1 umfasst die drei Arginine R736, R737 und R775, welche in dieser Arbeit modifiziert und bezüglich ihrer Bedeutung für Proteineigenschaften von SAUL1 untersucht wurden. R736 und R737 befinden sich am Ende der ARM₁₁ Domäne, welche bis zur Aminosäureposition 747 reicht, und werden scheinbar für die Plasmamembranaffinität von SAUL1 benötigt (vgl.3.2.5). Zusätzlich zu der gleichmäßigen Verteilung von GFP-SAUL1_{AA774} traten vereinzelt schwache Membranflecken und Aggregate auf, welche möglicherweise durch das Fehlen des C-Terminus und daraus resultierenden strukturellen Veränderungen ausgelöst wurden. Hierdurch könnte Ladungsveränderung im C-Terminus auftreten und zum Verlust von für eine Membran-Membran-Kontaktflächen benötigte Interaktionen geführt haben.

Das Fusionsprotein GFP-SAUL1_{AA736} zeigte ähnliche Eigenschaften und war ohne Membranflecken mit vereinzelten Aggregaten gleichmäßig an der Plasmamembran verteilt (Abb.21). Interessanterweise lag nach dem zusätzlichen Entfernen von R736 in GFP-SAUL1_{AA735} das Fusionsprotein überwiegend im Cytoplasma und nur vereinzelt an der Plasmamembran vor, sodass der Verlust des Arginin R736 in Zusammenhang mit der Membranaffinität von SAUL1 gebracht werden konnte (Abb.21). Da GFP-SAUL1_{AA735} nur die letzten 12 Aminosäuren der ARM₁₁ Domäne fehlen, sind schwerwiegende strukturelle Beeinträchtigungen der Domäne unwahrscheinlich und der Verlust der Plasmamembranaffinität könnte durch eine Veränderung der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen SAUL1 und den

123

Phospholipiden der Plasmamembran bedingt sein (Brzeska *et al.* 2010, Jaillais *et al.* 2011). In Anbetracht der verkürzten ARM-Teildomänen schien die Aminosäure R736 der kritische Punkt für die Membranassoziation von SAUL1 zu sein. Lilian Klein und Marie Vollmost konnten im Rahmen ihrer Bachelorarbeit und Projektstudie die Fusionsproteine GFP-SAUL1_{AA732}, GFP-SAUL1_{AA729} und GFP-SAUL1_{AA726} generieren, die gänzlich im Cytoplasma detektiert wurden und somit die Relevanz des Bereichs um R736 für die Membranfleckenbildung und Plasmamembranaffinität für SAUL1 untermauerten. Diese wurde durch die positive Ladung von R736 und die strukturelle Intaktheit der ARM₇₋₁₁ Domäne bedingt (Knop *et al.* 2021).

Interessanterweise lokalisierte das GFP-SAUL1_{A736fl} Fusionsprotein trotz der Deletion des Arginin R736 an der Plasmamembran. Dies deutet darauf hin, dass R736 zwar ein kritischer Punkt für die Membranaffinität ist, jedoch auch andere Bereiche des Proteins zur Assoziation von SAUL1 an der Plasmamembran beitragen. Somit hatte die Deletion von R736 eine geringere Auswirkung auf die Eigenschaften des SAUL1-Proteins als der Aminosäureaustausch durch das ungeladene Alanin. Womöglich übernimmt das Arginin R737 die Funktion von R736 in GFP-SAUL1_{A736fl}, sodass es tatsächlich nicht zu einem Ladungsunterschied an der Aminosäureposition 736 kommt, weil R737 diese einnimmt. Diese Beobachtungen ließen darauf schließen, dass sowohl die Gesamtstruktur der ARM₇₋₁₁ Domäne als auch deren elektrostatische Eigenschaften um Arginin R736 entscheidend für die Affinität zu Bestandteilen der Plasmamembran sind. Um die Bedeutung von R736 für die Membranassoziierung weiter zu klären, könnte zusätzlich zur Deletion von R736 auch R737 entfernt werden, sodass R737 nicht die Funktion von R736 übernehmen kann. Ist dies der Fall würde das Fusionsprotein überwiegend im Cytoplasma lokalisert sein und keine Membranflecken bilden.

4.2.1 SAUL1 bildet Membranflecken, die andere Membranproteine verdrängen

In Knop *et al.* (2021) und dieser Arbeit konnte das Auftreten von SAUL1-Membranflecken in 60% der mit GFP-SAUL1 transformierten *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten beobachtet werden. Diese Membranflecken wurden in Tao *et al.* (2019) mit Membran-Membran-Kontaktflächen von zwei Membranen in Zusammenhang gebracht. Dabei interagierten lipidbindende Proteine aus unterschiedlichen Kompartimenten, sodass sich die Plasmamembran (PM) und der Tonoplast (TP) oder Vesikel wie MVBs annähern konnten. So konnten Membranflecken durch PM-MVB/TP *tethering* mit den Plasmamembran-bindenden Proteinen StREM1.3, BIK1, PBS1 und CPK21 sowie den PtdIns(4)P-bindenden Proteinen FAPP1 und Osh2 gefunden werden. Auch durch MVB/TP-bindende Proteine bildeten sich Membranflecken mit ARA6, ARA7, RHA1, RABG3f und den PtdIns(3)P-bindenden Proteinen Vamp7 und Hrs-2xFYVE. Zusätzlich zeigte eine RFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ eine vollständige Überlagerung Koexpression mit mit den Membran-Membran-Kontaktflächen, wodurch SAUL1 scheinbar eine Funktion für diese besitzt. SAUL1 könnte die Membranfleckenbildung unterstützen, indem es mit Gerüstproteinen interagiert oder selbst zwei Membranen zusammenführt und an der Bildung der Membran-Membran-Kontaktfläche beteiligt ist (Gui et al. 2016, Tao et al. 2019, Baillie et al. 2020, Rossini et al. 2020). Solche Gerüstproteine können beispielsweise im homotypic fusion and proteins sorting (HOPS)-Komplex gefunden werden, in dem diese Proteine Membranen von Vesikeln und Vakuolen zusammenbringen. Dies ermöglicht es dem zu transportierende Material seinen Zielort zu erreichen. Die HOPS-Untereinheiten VPS41 und VPS33 spielen eine essentielle Rolle bei der Regulation des vakuolären Transports sowie der beeinflussen Membranfusion und unter anderem das vegetative Wachstum (Brillada et al. 2018, Jiang et al. 2022). Dabei wird die Lokalisation von VPS41 über Phosphatidylinositolen kontrolliert. GST-VPS41 und GST-VPS33 zeigten in einem lipid strip assay eine Affinität zu den meisten PtdIns, insbesondere zu den dominanten Vertretern PtdIns(3)P und PtdIns(3,5)P, der Endosomen und Vakuolen. VPS41 lokalisiert an Unterdomänen des Tonoplasten, wo es zur Bildung von Biokondensaten kommt. Diese Biokondensate ragen in das Cytoplasma, befinden sich in der Nähe der Vakuole oder sind mit dem ER assoziiert (Jiang et al. 2022).

Um die Membranfleckenbildung von SAUL1 genauer zu untersuchen und mögliche Hinweise auf eine *tethering*-Funktion zu finden, wurden die unterschiedlichen Fusionsproteinen YFP-SAUL1, SAUL1-GFP, GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ und SAUL1ARM₇₋₁₁-GFP in *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten sowie *N. benthamiana* Epidermiszellen exprimiert und untersucht. YFP-SAUL1 und GFP-SAUL1 zeigten keine Unterschiede in ihrer subzellulären Lokalisation oder Membranfleckenbildung (Abb.11). Interessanterweise traten die Membranflecken nur bei einer N-terminalen Fusion mit dem Fluorophor auf, sodass SAUL1-GFP immer gleichmäßig an der Plasmamembran verteilt war (Abb.11). Demnach scheint die N-terminale Fusion eine Veränderung in der SAUL1-Proteinstruktur auszulösen

125

oder die lokale Ladung zu verändern, wodurch Membran-Membran-Kontaktflächen leichter gebildet werden können (Zheng *et al.* 2002, Willems *et al.* 2004, Tong *et al.* 2017, Knop *et al.* 2021).

In Knop *et al.* (2021) wurde eine potentielle Multimerisierung von SAUL1 über die N-terminale U-box- und ARM₁₋₆ Domäne postuliert. Eine Fusion des N-Terminus mit einem Fluorophor könnte die U-box maskieren, was möglicherweise die Multimerisierung beeinträchtigt und die Bildung von Membranflecken begünstigt. Änliche Effekte wurden bei anderen membranständigen PUB E3-Ligasen beobachtet, bei denen die Dimerisierung die Proteinaktivität beeinflusste. Beispielsweise konnte für PUB22 eine *in vivo* Dimerisierung, die über dessen U-box vermittelt wird, gezeigt werden (Furlan *et al.* 2017). Eine Dimerisierung über eine ARM-Domäne konnte *in vitro* bei PUB10 beobachtet werden (Jung *et al.* 2015). In beiden Fällen war die Aktivität der PUBs von der Dimerisierung abhängig, sodass PUB10 nur als Homodimer aktiv war, und nur monomerisches PUB22 konnte sein Substrat binden. Lag PUB22 als Homodimer vor, hat sich dieses selbst ubiquitiniert, wodurch dessen Proteinmenge reguliert wurde (Jung *et al.* 2015, Furlan *et al.* 2017). Diese Beispiele deuten daraufhin, dass die Multimerisierung auch die Aktivität von SAUL1 regulieren und möglicherweise die Bildung von Membran-Membran Kontaktlächen beeinflussen könnte.

Hier stellte sich die Frage, inwiefern die N-terminale Fusion mit einem Fluorophor die Funktion von SAUL1 beeinträchtigt. Diese Fusion könnte möglicherweise die Interaktion von SAUL1 mit einem Ubiquitin-konjugierenden Enzym (UBC) nachahmen. Tatsächlich wurde durch die Interaktion von SAUL1 mit UBC10, UBC28, UBC29 oder UBC30 eine SAUL1-Membranfleckenbildung induziert (Knop *et al.* 2021). Diese Interaktion benötigt das in der U-box Domäne lokalisierte Cystein C29. Ein Austausch von C29 durch Alanin führte zum Verlust der UBC/SAUL1 Interaktion, was die SAUL1-Funktion beeinträchtigte und der *saul1-1* Autoimmunphänotyp auslöste (Tong *et al.* 2017). Weitere Hinweise zur Bedeutung des N-Terminus für die Membranfleckenbildung lieferten die Fusionsproteine GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ und SAUL1ARM₇₋₁₁-GFP (Abb.7, Knop *et al.* 2021). GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ zeigte eine häufigere Membranfleckenbildung im Vergleich zu GFP-SAUL1, was darauf hindeutet, dass das Fehlen des N-Terminus einen positiven Effekt auf die Membranfleckenbildung hat. Da in GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ und SAUL1ARM₇₋₁₁-GFP sowohl die U-box als auch ARM₁₋₆ Domäne fehlen, könnte die ausbleibende SAUL1-SAUL1-Interaktion ein möglicher Grund sein, der die Membranfleckenbildung fördert. Im Vergleich dazu könnten die UBCs möglicherweise die Multimerisierung von SAUL1 durch ihre Interaktion mit der U-box verhindern, was die Membranfleckenbildung begünstigen könnte. Folglich schien jede Modifikation am N-Terminus von SAUL1 die Bildung von Membranflecken zu begünstigen.

Da die GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ und SAUL1ARM₇₋₁₁-GFP Fusionsproteine ausschließlich die ARM-Domäne umfassen, könnten diese eine verstärkte Affinität zu Lipiden haben. Diese erhöhte Affinität könnte die simultane Bindung von zwei Membranen begünstigen und dadurch zur Bildung von Membran-Membran-Kontaktflächen führen (Huber *et al.* 1997, Drechsel *et al.* 2011, Tao *et al.* 2019). Die am Ende der ARM₁₁ Domäne lokalisierten Arginine R736 und R737, wovon besonders R736 für die Affinität zur Plasmamembran und Membranfleckenbildung benötigt wurde (Knop *et al.* 2021, diese Arbeit), könnten elektrostatische Interaktionen mit negativ geladenen Lipiden begünstigen (Brzeska *et al.* 2010, Jaillais *et al.* 2011). Interessanterweise zeigte das chimäre Fusionsprotein U-box-GFP-ARM₇₋₁₁, bei dem das GFP zwischen der U-box und der ARM₇₋₁₁ Domäne lag, eine gleichmäßige Verteilung an der Plasmamembran. Dies lässt vermuten, dass der N-Terminus und die U-box nicht durch das interne Fluorophor beeinträchtigt und somit die Membranfleckenbildung nicht begünstigt wurde. Dies unterstützte die Annahme, dass eine N-terminale Modifikation vor der U-box Domäne ein Auslöser für die Membranfleckenbildung ist.

Zusammengenommen könnten diese Beobachtungen auf eine duale Funktion von SAUL1 hinweisen. Dabei trägt der N-Terminus mit U-box zur Ubiquitinierungskette und Signaltransduktion bei, während der C-Terminus mit der ARM₇₋₁₁ Domäne zur Membranassoziation und Bildung von Membran-Membran-Kontaktflächen benötigt wird (Drechsel *et al.* 2011, Tong *et al.* 2017, Knop *et al.* 2021). Diese Funktionen könnten sich ergänzen. Durch eine UBC-SAUL1 Interaktion könnte die SAUL1-Membranfleckenbildung begünstigt werden, wodurch mehr Membran-Membran-Kontakte entstehen. Dies könnte die Bildung von Vesikeln sowie die Prozesse der Endo- und Exocytose durch Ubiquitinierung regulieren und dadurch möglicherweise die Signaltransduktion modulieren. SAUL1 könnte dabei Proteine ubiquitinieren, um Transportprozesse zu regulieren, Proteine zu aktivieren oder sie für den Abbau zu markieren (Isono *et al.* 2010, Trujillo 2018, Liang *et al.* 2019).

In den durchgeführten KLSM-Experimenten konnte mit dem Membranmarker FM4-64 nachgewiesen werden, dass die SAUL1-Membranflecken an der Plasmamembran assoziiert waren (Abb.15). Diese Beobachtung unterstützte die Theorie, dass sich SAUL1 zwischen der Plasmamembran und einer weiteren intrazellulären Membran als Mediator befindet und diese Membran-Membran-Kontaktfläche zusammenhält (Baillie et al. 2020, Prinz et al. 2020, Krawczyk et al. 2022). Ein Beispiel für eine Proteinfamilie, die die Bildung von Membran-Membran-Kontakten fördert, sind die Golgine (Witkos und Lowe 2016). Es konnte gezeigt werden, dass CASP Golgi-Komponenten an das ER binden. In casp-Mutanten, bei denen die für die ER-Interaktion notwendige coiled-coil Domäne modifiziert wurde, wurde eine verringerte Bewegungsgeschwindigkeit der Golgi-Komponenten am ER beobachtet. Diese verlangsamte Bewegung wurde als schwächeres tethering interpretiert (Oesterrieder et al. 2017). Des Weiteren bindet der LIPID DROPLET PLASMA MEMBRANE ADAPTOR (LIPA) über seine C-terminale Region an die Plasmamembran und interagiert über eine coiled-coil Domäne mit dem SEED LD PROTEIN (SLDP). Diese Interaktion ermöglicht die Bindung von Lipidtröpfchen (lipid droplets, LDs) an die Plasmamembran (Krawczyk et al. 2022). Anhand von Tocopherol (TC) und Enzymen der Carotenoid-Biosynthese konnte gezeigt werden, dass ein direkter Transport zwischen zwei Organellen möglich ist (Mehrshahi et al. 2013). Tocopherol kann nur in den Chloroplastenmembranen gefunden werden, aber dennoch sind TC-Subastrate für das ER-Lumen verfügbar, was auf einen direkten Austausch zwischen diesen Organellen hinweist (Mehrshahi et al. 2013).

In Abschnitt 3.2.10 wurde gezeigt, dass SAUL1-mCherry, BON1-mCherry und CHS1-mCherry aus GFP-SAUL1 und GFP-SAUL1ARM7-11 Membranflecken ausgeschlossen wurden. Im Gegensatz dazu kam es bei einer gleichmäßigen Verteilung zu einer vollständigen Kolokalisation jeweils beider Fusionsproteine. Die Membranflecken schienen somit alle anderen Membranproteine, die nicht Teil dieses Komplexes sind, aus den Membran-Membran-Kontaktflächen zu verdrängen (Abb.30 und Abb.31) (Konrad et al. 2014, Tao et al. 2019, Yu et al. 2020). Möglicherweise können sich GFP-SAUL1 und SAUL1-mCherry nicht vermischen, da die Multimerisierung der Fusionsproteine durch das N-terminal fusionierte GFP verhindert wird, was die SAUL1-SAUL1-Interaktion beeinträchtigt (Knop et al. 2021). Die Koexpression von GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ und SAUL1-mCherry zeigte eine stärkere Exklusion von SAUL1-mCherry aus den GFP-SAUL1ARM7-11 Membranflecken, da durch das zusätzliche Fehlen der U-box- und der ARM₁₋₆ Domäne im GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ Fusionsprotein die für die SAUL1-SAUL1-Interkation relevanten Domänen fehlten.

128

4.2.2 SAUL1-Membranflecken sind dynamische Strukturen

In dieser Arbeit wurden SAUL1-Membranflecken als dynamisch bewegliche Strukturen an der Plasmamembran identifiziert. Dabei zeigten GFP-SAUL1 und GFP-SAUL1ARM7-11 Unterschiede in ihrer Dynamik, die in A. thaliana Mesophyllprotoplasten oder N. benthamiana Epidermiszellen beobachtet wurden. GFP-SAUL1 Membranflecken zeigten in Protoplasten ein kompaktes Erscheinungsbild und bewegten sich als Einheit an der Plasmamembran, ohne ihre Form zu verändern (Abb.32). Es konnten weder Fusionen noch Zerfälle dieser Membranflecken beobachtet werden. Scheinbar wurde auch die Dynamik vom U-box **N-Terminus** beeinflusst, die tragenden sodass mögliche SAUL1-SAUL1oder SAUL1-UBC-Interaktion zu der kompakten Membranfleckenstruktur führte (Tong et al. 2017, Knop et al. 2021). Aufgrund des stärkeren Zusammenhalts innerhalb der Membranflecken Einheit bewegten sich diese als geschlossene und könnten dabei Membran-Membran-Kontaktflächen stabilisieren, die möglicherweise als Andockstelle für Vesikel dienen (Parlati et al. 2000, Martens und McMahon 2008). Hier könnte SAUL1 mit Komponenten von Endo- und Exocystose-Proteinkomplexen, wie HOPS, SNARE oder dem Exocyst, interagieren während es selbst an der Plasmamembran assoziiert ist (Brillada et al. 2018, Pang et al. 2022). Da keine Fusionen oder Abtrennungen beobachtet werden konnten, schien keine Interaktion zwischen GFP-SAUL1 Membranflecken möglich zu sein.

Dies könnte besonders für die Entstehung und das Wachstum von Membranflecken relevant sein, da für diesen Prozess entweder kleinere Membranflecken zu größeren verschmelzen oder kleine Membranflecken zu großen heranwachsen sollten (Jia *et al.* 2013, Tao *et al.* 2019). Die in Jia *et al.* (2013) beschriebenen vergrößerten MVBs sind möglicherweise auf homotypische Verschmelzungen zurückzuführen, die durch die Q69L Mutation in ARA7 begünstigt werden. Durch die Q69L Punktmutation ist ARA7 konstitutiv aktiv, wodurch es vermehrt zu Membranfusionen kommt. Dabei akkumuliert ARA7_{Q69L} an der Tonoplastenmembran und große Vesikel entstehen (Jia *et al.* 2013). Ähnliches könnte auch das Wachstum der SAUL1-Membranflecken auslösen, sodass eine Akkumulation des Fusionsproteins zu Membranflecken führt, welche durch weitere Anlagerungen von SAUL1 wachsen. Dieses Wachstum könnte thermodynamisch limitiert sein, wodurch die Membranflecken ab einer gewissen Größe instabil werden und ein weiteres Wachstum nicht
mehr möglich ist (Fanelli und McKane 2008). Alternativ könnten die Membranflecken einen Reifungsprozess durchlaufen, der ihre Fähigkeit zur weiteren Vergrößerung beeinträchtigt (Patel *et al.* 2015, Woodruff *et al.* 2017, Peskett *et al.* 2018).

Im Vergleich zum Volllängenprotein wiesen die GFP-SAUL1ARM7-11 Membranflecken ein weiches tropfenähnliches Erscheinungsbild auf und bewegten sich fluide an der Plasmamembran (Abb.33). Dabei veränderten sie teilweise stark ihre Form, fusionierten zu größeren Membranflecken oder zerfielen in kleinere Flecken. Durch das Fehlen des N-Terminus und der U-box Domäne war die SAUL1-SAUL1-Interaktion in GFP-SAUL1ARM7-11 scheinbar schwächer oder gar nicht möglich, was zu einem verminderten Zusammenhalt zwischen den einzelnen GFP-SAUL1ARM7-11 Molekülen führen könnte (Leckband 2000). Hier könnten sowohl unspezifische Interaktionen, wie elektrochemische Doppelschichtkräfte, Van-der-Waals-Kräfte und sterische Kräfte, als auch spezifische Interaktionen über die Protein-Protein-Affinität beeinflusst sein. Von diesen Möglichkeiten erscheint die letztere durch das Fehlen, der für die Interaktion benötigten Domäne, am wahrscheinlichsten (Leckband 2000). Dennoch könnte auch durch die Verkürzung von SAUL1 die Oberflächenladung derart modifiziert sein, dass native Interaktionen nicht möglich sind und neue auftreten könnten. Da nur die für die Membranassoziation benötigte ARM₇₋₁₁ Domäne vorhanden war, hat GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ eine hohe Affinität zur Plasmamembran. Dafür ist die Affinität zu UBCs oder zu sich selbst in diesem Fusionsprotein stark reduziert. Die Fusion mehrerer Membranflecken weist auf einen potentiellen Wachstumsmechanismus hin, bei dem zunächst viele kleine Membranflecken an Startkeimen gebildet werden und anschließend zu größeren fusionieren.

Im Vergleich zu den Protoplasten waren die GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ Membranflecken in *N. benthamiana* Epidermiszellen unbeweglich und veränderten nur ihre Form (Abb.36). Dabei könnten sie vom Cytoskelett, wie kortikalen Mikrotubuli oder Aktinfilamenten, an einer Stelle der Plasmamembran fixiert werden (Lv *et al.* 2017, Tao *et al.* 2019). Von Tao *et al.* (2019) konnte gezeigt werden, dass in einigen Fällen Membranflecken durch ARABIDOPSIS CASEIN KINASE 1-LIKE 6 (ACK6) markierte kortikale Mikrotubuli in zwei kleinere Membranflecken geteilt wurden. Ähnliches konnten sie mit dem Aktin Marker *At*FIMBRIN1 zeigen, welches zusätzlich eine dünne Netzschicht unter den Membranflecken gebildet hat. Hier besteht die Möglichkeit, dass die in *N. benthamiana* Epidermiszellen beobachteten Veränderungen der Membranflecken durch das Cytoskelett entstehen.

4.2.3 Bei SAUL1-Membranflecken könnte es sich um Biokondensate handeln

Die SAUL1-Membranflecken könnten im Zusammenhang mit biomolekularen Kondensaten stehen (Emenecker et al. 2021). Durch die Überexpression der GFP-SAUL1 Fusionsproteine könnte es zu einer von der Proteinkonzentration ausgelösten Flüssig-Flüssig-Phasentrennung (Liquid-Liquid-Phase Separation, LLPS) aufgrund der hohen Proteinkonzentration kommen, was zur Bildung der Membranflecken führen könnte. Die SAUL1-Membranflecken wären somit der energetisch-günstigere Zustand für das normalerweise gleichmäßigverteilte Protein (Emenecker et al. 2021). Unter nativen Bedingungen könnte SAUL1 ein Gerüstprotein für Membran-Membran-Interaktionen darstellen, welche jedoch nur sehr kleine Oberflächen benötigen (Zhao und Zhang 2020). Die in 4.2.1 berschriebenen VPS41-Biokondensate wurden als kleine Punktae am Tonoplasten für den vesikulären Transport beobachtet (Jiang et al. 2022). In Synapsen bilden sich molekülreiche Biokondensate, die sich an der postsynaptischen Membran anlagern und zur strukturellen Stabilität der Synapsen und deren Aktivität beitragen können (Nicoll et al. 2006, Wu et al. 2020). Die Organisation von präsynaptischen aktiven Zonen und der damit verbundenen Fusion von Vesikeln mit der Synapsenmembran, wird durch scaffolding Proteine wie Rab3-interacting molecule (RIM), RIM binding protein (RIM-BP) und ELKS reguliert. Dabei bilden sich RIM und RIM-BP Biokondensate an der Synapsenmembran, wodurch der gezielte Vesikeltransport ermöglicht wird (Acuna et al. 2016, Tang et al. 2016, Wu et al. 2020). Es wurde gezeigt, dass diese Phasenseperation von membranassoziierten Proteinen eine Funktion beim intra- und interzellulären Transport haben kann. Hierbei können vorübergehend vermehrt Vesikel an Membranen gebunden werden, um eine kontrollierte Fusion und Lagerung zu ermöglichen, oder es können membranlose Kondensate auf den Membranen von Organellen bewegt oder transportiert werden (Lyon et al. 2021, Wang et al. 2023). Diese Prozesse können die Sortierung von Cargos und das Andocken an die Membranen erleichtern, wodurch der anschließende Transport ermöglicht wird (Milovanovic et al. 2018, Liao et al. 2019, Rozelle et al. 2020). Diese Mechanismen wurden beispielweise beim Transport von Neurotransmittern von der Präsynapse zur Postsynapse beobachtet (Chen et al. 2020, Wu et al. 2020). Ergänzend zum Transport können Biokondensate auch Membranen umformen, wodurch neue Interaktionsräume geschaffen werden. Diese Umformung kann auch zu Einbuchtungen der Plasmamembran führen, die dann zur Bildung von Vesikeln beitragen können (Mondal und Baumgart 2023, Wang *et al.* 2023).

Biokondensate müssen nicht zwingend ihre flüssigkeitsähnlichen Eigenschaften behalten und können während des Reifungsprozesses verschiedene Zustände von viskös-flüssig über viskös-elastisch bis zu einem festen, soliden Zustand durchlaufen. Die flüssigkeitsähnlichen Tropfen verlieren durch die Reifung ihre dynamischen Eigenschaften und nehmen solide Eigenschaften an (Patel et al. 2015, Woodruff et al. 2017, Boeynaems et al. 2018, Peskett et al. 2018). FUSED IN SARCOMA (FUS) Biokondensate zeigten in vivo bei Photobleichungs-Experimenten eine flüssigkeitsähnliche Eigenschaft, indem sich das FUS-GFP Fusionsprotein innerhalb der Biokondensate in den gebleichten Bereichen wieder verteilen konnte und ein gleichmäßiges Fluoreszenzsignal zu beobachten war. In vitro hingegen bildeten sich bei einer Konzentration von 500 µM FUS-GFP, die etwa 100-mal höher ist als die physiologische Konzenration, gelartige Biokondensate (Patel et al. 2015). Ähnliches könnte auch bei den SAUL1-Membranflecken der Fall sein. Generell handelt es sich bei diesen um dynamische Strukturen, welche möglicherweise ein zeitabhängiges Wachstum durch Fusionsereignisse aufweisen (Roovers et al. 2018, Snead und Gladfelter 2019, Zhao und Zhang 2020). Das Rezeptor Protein SEPA-1 in Caenorhabditis elegans begünstigt die LLPS von Keimgranula, dessen Größe und Konsistenz durch ECTOPIC P GRANULES PROTEIN 2 (EPG2) bestimmt wird. Dabei konnte auch gezeigt werden, dass die Methylierung von Argininen innerhalb von PGL-1 und PGL-3 die LLPs inhibiert, sodass methylierte Proteinversionen weniger und kleinere Keimgranula bilden konnten (Zhang et al. 2018). Dass die Membranflecken durch Fusionen wachsen, könnte ähnlich verlaufen wie bei dem Tudor domain containing 6a (Tdrd6a) Protein, welches die Löslichkeit und Mobilität von BUCKY BALL (BUC) und BARDET-BIEDL SYNDROME (BBS) reguliert sowie das Wachstum von BBS in größere Strukturen ermöglicht (Roovers et al. 2018). Möglicherweise führt das Fehlen des N-Terminus in GFP-SAUL1ARM7-11 dazu, dass der Reifungsprozess der SAUL1-Biokondensate nicht vollständig ablaufen kann und die Membranflecken dynamischer bleiben.

4.2.4 Das Arginin R736 ist essentiell für die Lokalisation von SAUL1 und der Membranfleckenbildung

Die positiv geladene Region von SAUL1 umfasst die Arginine R736, R737 und R775 (Knop *et al.* 2021) und könnte durch elektrostatische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Phosphorsäureresten der Membranlipide interagieren (Brzeska *et al.* 2010, Jaillais *et al.* 2011). Nach dem Einbringen von den Punktmutationen in *35S::GFP-SAUL1_{R736A}, 35S::GFPSAUL1_{R737A}, 35S::GFPSAUL1_{R736}, 35S::GFPSAUL1_{R736}, 35S::GFPSAUL1_{R736}, and <i>35S::GFPSAUL1_{R736}, 35S::GFPSAUL1_{R736}, 35S::GFPSAUL1_{R737}, nud 35S::GFPSAUL1_{R736}, nud 35S::GFPSAUL1_{R736}, nud 35S::GFPSAUL1_{R736}, and nud die Auswirkung auf die Membranfleckenbildung zu untersuchen (Abb.13, Abb.14).*

Beim Austausch R737 und/oder R775 durch Alanin zeigten 52% der GFP-SAUL1_{R737A} und 69% der GFP-SAUL1_{R775A} Protoplasten Membranflecken. Im Vergleich dazu führte das Wildtyp-Protein GFP-SAUL1 in 60% der Protoplasten zur Membranfleckenbildung (Abb.16). GFP-SAUL1_{R737,775A} hingegen verringerte die Membranfleckenbildung auf 35% der Protoplasten Membranflecken. Ein Austausch von Arginin durch Alanin an Aminosäureposition 737 und 775 führte zu keiner signifikanten Veränderung der Membranfleckenbildung. Im Vergleich dazu bildeten nach einem Austausch von R736 durch Alanin nur noch 3% der Protoplasten Membranflecken. Dies deutete daruf hin, dass Aminosäureposition 736 eine wichtige Bindestelle für Proteine, Lipide oder andere geladene Moleküle darstellt, welche durch den Verlust der positiven Ladung verloren geht (Klumpp et al. 2003, Balla 2005, Jaillais et al. 2011). Hiermit wurde gezeigt, dass nicht nur die Modifikation des N-Terminus, sondern auch die positive Ladung von R736 für die Membranfleckenbildung entscheidend ist und durch Modifikation des N-Terminus begünstigt wird. Interessanterweise hat das benachbarte R737 nur einen geringen Effekt auf die Membranfleckenbildung und scheint nicht direkt damit assoziiert zu sein. Zusammenfassend ist dieser Bereich am Ende der ARM₁₁ Domäne für die SAUL1-Funktion an der Plasmamembran notwendig. Im weiteren Verlauf wurde untersucht, ob sich die Strukturen von SAUL1_{R736A} und SAUL1 unterschieden.

4.2.4.1 Rekombinantes SAUL1 und SAUL1_{R736A} sind strukturidentisch

In dieser Arbeit wurde das von Jan Knop (2019) etablierte System zur Expression und Aufreinigung von rekombinantem SAUL1 verwendet und für GST-SAUL1_{R736A}, GST-SAUL1_{R737A}, GST-SAUL1_{R775A} sowie GST-SAUL1_{R736,737,775A} optimiert. Aufgrund des Verlusts der Membranfleckenbildung von SAUL1_{R736A} wurde der Fokus der weiteren Analysen auf das rekombinante GST-SAUL1_{R736A} gelegt, welches unter der Verwendung des für GST-SAUL1 etablierten Protokoll aufgereinigt werden konnte. Die von Sven Falke durchgeführten CD-spektroskopischen Analysen der rekombinanten Proteine SAUL1 und SAUL1_{R736A} zeigten, dass sich beide Proteine strukturell nicht unterscheiden (Abb.17). Der Verlust der Fähigkeit zur Membranfleckenbildung bei der punktmutierten Variante SAUL1_{R736A} ist somit nicht auf strukturelle Veränderungen, sondern auf die Substitution von dem positiv geladenen Arginin R736 durch das ungeladene Alanin zurückzuführen.

4.2.4.2 Punktmutiertes SAUL1_{R736K} und SAUL1_{R736E} konnten Membranflecken bilden

Mit dem Austausch von R736 durch Lysin (K) oder Glutaminsäure (E) wurde der Zusammenhang zwischen Membranfleckenbildung und der positiven Ladung des Arginins weiter untersucht. Nach dem Austausch von Arginin durch das positiv geladene Lysin waren die GFP-SAUL1_{R736K} und YFP-SAUL1_{R736K} Fusionsproteine an der Plasmamembran lokalisiert und bildete in 70% der transformierten Protoplasten kleine SAUL1-Membranflecken (Abb.18). Der Verlust der Fähigkeit zur Membranfleckenbildung bei GFP-SAUL1_{R736A} schien demnach mit der Ladungsänderung zusammenzuhängen. Dennoch beeinflusste das Lysin die Menge und Größe der Membranflecken, was auf den strukturellen Unterschied zwischen Arginin und Lysin zurückgeführt werden könnte (Brzeska et al. 2010, Jaillais et al. 2011). Dieser könnte möglicherweise die Affinität zu anderen Proteinen, Lipiden oder Molekülen beeinflussen, wodurch die veränderte Membranfleckenform begünstigt wird. Da Lysin im Vergleich zu eine Aminogruppe ist die Fähigkeit zur Bildung Arginin nur besitzt, von Wasserstoffbrückenbindungen reduziert, was die Interaktionsmöglichkeiten einschränkt (Betts und Russel 2003).

Die Relevanz von positiv geladenen Aminosäuren für die Proteinfunktion sowie die Auswirkung von einem Austausch durch das ungeladene Alanin konnte beispielsweise an SWITCH I, welches ein essentielles strukturelles Element im aktiven Zentrum von Kinesinen, Myosinen und G-Proteinen ist, gezeigt werden. Die *switch I* (R210A) Mutation im konventionellen Kinesin von *Drosophila melanogaster* führt zu einer reduzierten Affinität zu Mikrotubuli, einem Verlust der Kooperativität zwischen Motor-Domänen sowie zu einem Defekt in der ATP-Hydrolyse. Diese Funktionen konnten durch einen Austausch der Aminosäure 210 durch Lysin teilweise wiederhergestellt werden. Obwohl die ATP-Hydrolyse weiterhin nicht möglich war, wurden alle anderen Funktionen am Mikrotubuli wiederhergestellt (Klumpp *et al.* 2003). Weitere Hinweise darauf, dass Arginin und Lysin trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit und vergleichbaren Ladung nicht einfach austauschbar sind, ergeben sich aus dem Austausch von Lysin durch Arginin im HUMAN TRANSFORMING GROWTH FACTOR-A (TGF- α). Dieser Aminosäureaustausch führte zum Verlust der Aktivität von TGF- α , ohne die Integrität der internen Disulfidbrücken-Bindungen zu beeinträchtigen (Defeo-Jones *et al.* 1989).

Interessanterweise konnte der Austausch von R736 durch die negativ geladene Glutaminsäure der GFP-SAUL1_{R736E} und YFP-SAUL1_{R736E} Fusionsproteine noch in 18% der transformierten Protoplasten Membranflecken bilden. Im Gegensatz zum Austausch durch Lysin zeigten die GFP-SAUL1_{R736E} und YFP-SAUL1_{R736E} Membranflecken keinen veränderten Phänotyp im Vergleich zu GFP-SAUL1. Im Vergleich zum Austausch durch das ungeladene Alanin, bei dem nur 3% der Protoplasten Membranflecken zeigten, war der Effekt der R736E Punktmutation bedeutend schwächer. Dies deutet darauf hin, dass eine negativ geladene Aminosäure an Position 736 scheinbar einen geringeren Einfluss auf die Funktion der Membranfleckenbildung hat als eine ungeladene. Dass die Proteinfunktion trotz Aminosäureaustausch, der zu einer Veränderung der Ladung führt, möglich ist, wurde durch den Austausch von Arginin R282 durch Glutaminsäure im Kaninchen PepT1 (PepT1_{R282E}) gezeig. Die PepT1_{R282E} Punktmutation entkoppelte die Aufnahme des Modell Dipeptids D-Phe-L-Gln vom Protonen-Kotransport. Zusätzlich führte die Punktmutation dazu, dass PepT1 als Peptid-abhängiger Kationenkanal fungiert hat (Meredith 2004). In einem weiteren Beispiel führte der Austausch der negativ geladenen Glutaminsäure durch eine positiv geladene Aminosäure zu einer Änderung der Kation-Anion-Selektivität der α-Untereinheit des CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED (CNGA2) Kanals. Dieser Kanal war grundlegend funktsionsfähig,

jedoch wechselte durch die Punktmutationen E342K und E342R die Ionen-Selektivität des Kanals von Kationen zu Anionen (Qu *et al.* 2006). Im Gegensatz zu den geladenen Aminosäuren trägt Alanin als kleine ungeladene Aminosäure nur selten zur Struktur und Funktion von Proteinen bei. Es ist möglich, dass die negativ geladene Seitenkette der Glutaminsäure durch elektrostatische Wechselwirkungen mit mit Kationen, Protonen oder anderen positiv geladenen Molekülen eine partielle positive Ladung bildet, die bei Alanin nicht vorhanden ist (Betts und Russel 2003). Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass die Bildung von Membran-Membran-Kontaktflächen von der positiven Ladung an Aminosäure Position 736 in SAUL1 abhängig ist.

4.3 Die Bildung von SAUL1-Membranflecken benötigt einen Stimulus

4.3.1 Ein biotischer Stimulus induziert die Bildung von SAUL1-Membranflecken

Da in nur 60% der transformierten Protoplasten SAUL1-Membranflecken gebildet wurden, wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein zusätzlicher Stimulus zur Induktion der Membranfleckenbildung erforderlich sein könnte. Ein möglicher Stimulus in N. benthamiana Epidermiszellen war eine P. capsici Infektion (Tao et al. 2019), welche jedoch in Protoplasten schwer durchzuführen ist. Alternativ wurde eine Infektion simuliert, indem die Protoplasten mit pathogen associated molecular pattern (PAMPs) behandelt wurden (He et al. 2007). Diese Moleküle werden von den Immunrezeptoren in der Plasmamembran erkannt und lösen eine Immunantwort aus (He et al. 2006, Boller und Felix 2009, Collins et al. 2020). In dieser Arbeit wurden A. thaliana Mesophyllprotoplasten sowohl mit Chitosan und Fusarium graminearum Mycelium behandelt, um eine pilzliche Infektion zu simulieren, als auch mit dem Flagellin-Protein flg22, um eine bakterielle Infektion nachzubilden (Abb.24 B, E) (Nimchuk et al. 2003, He et al. 2007, Denoux et al. 2008, Boller und Felix 2009). Alle Behandlungen beeinflussten die Membranfleckenbildung und deren Morphologie, sodass nach der 20-minütigen PAMP-Behandlung viele kleine Membranflecken in einigen der transformierten Protoplasten gefunden wurden. Abhängig vom verwendeten PAMP verringerte sich am Folgetag die Anzahl der Membranflecken, während deren Größe zunahm. Somit wirkte die PAMP-Behandlung als Stimulus für die Membranfleckenbildung, wobei die Membranflecken möglicherweise über Nacht fusionierten (Uemura 2016, Underwood 2016).

Die Induktion durch das bakterielle Flagellin-Protein flg22 war im Vergleich zu Chitosan und dem Fusarium Mycelium schwächer (Abb.24), was auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der Bildung von Membranflecken und einer pilzlichen Infektion hinweist. Möglicherweise spielt die vom pathogentypabhängige Immunantwort der Pflanze eine Rolle ob Membranflecken gebildet werden. Bei einer bakteriellen Infektion werden häufig als erste Verteidigungsmaßnahme reactive oxygen species (ROS) durch die NADPH-Oxidase RBOHD produziert und in den Apoplasten abgegeben. Nach dem erkennen von von flg22 phosphoryliert BIK1 RBOHD, wodurch dieses O₂⁻ produziert, welches anschließend von einer Superoxid-Dismutase in H₂O₂ im Apoplasten umgewandelt wird (Li et al. 2014, Podgórska et al. 2017). H₂O₂ kann auch in die pflanzliche Zelle gelangen und die cytosolische Ca²⁺-Konzentation erhöhen und weitere Schritte der Immunantwort induzieren (Yuan et al. 2017). In diesem Zusammenhang wären nur für einen kurzen Zeitraum vermehrt Membran-Membran-Kontaktflächen erforderlich, um den interzellulären Transport zu untserstützen. Im Falle einer pilzlichen Infektion, die im Experiment durch Chitosan und das Fusarium Mycelium simuliert wurde, könnte verstärkt eine zellwandbezogene Immunantwort ausgelöst werden. Hierbei ist zu beachten, dass die Protoplasten keine Zellwand besitzen, wodurch diese Antwort verstärkt ablaufen könnte. Diese Reaktion könnte darauf abzielen, die die Zellwand zu regenerieren und diese durch Einlagerungen von Lignin, Suberin sowie Callose zu verstärken (Bacete et al. 2018, Rui et al. 2020, Gigli-Bisceglia et al. 2020). Für diesen Prozess wären zahlreiche Membran-Membran-Kontaktflächen erforderlich, um über die gesamte Protoplastenoberfläche Andockstellen für Vesikel zu schaffen und den vesikulären Transport zu verstärken. Da die Protoplasten nicht in der Lage waren ihre Zellwand zu regenerieren, wurden auch am Folgetag der Mycelium-Behandlung eine Vielzahl von kleinen Membranflecken mit potentiellen Vesikeln gefunden (Abb.24 C, F). Dies lässt vermuten, dass im Gegensatz zum Chitosan und Flagellin das Fusarium Mycelium als ganzes Gewebe stabiler als die anderen Moleküle war und eine kontinuierliche Immunantwort ausgelöst wurde.

Eine weitere allgemeine Immunantwort ist die Produktion und Abgabe von Phytoalexinen, die antimikrobielle Eigenschaften besitzen, und beispielsweise das Wachstum von Pilzen, Nematoden und Bakterien hemmen (Kaur *et al.* 2022). Bei der Abgabe von Molekülen, wie dem Phytoalexin, in den Apoplasten können auch Membran-Membran-Kontaktflächen für den Transport benötigt werden. Diese wären unabhängig vom Pathogentyp vorhanden und würden von der Dauer des Stimulus bedingt werden. Ein Verteidigungsmechanismus, der insbesondere bei einer Oomyceten-Infektion beobachten werden konnte, ist die Sekretion von extrazellulären Vesikeln (EV), welche vom Pathogen aufgenommen werden können und dieses beispielsweise abtöten (Regente *et al.* 2017). Auch für diesen Prozess sind Membran-Membran-Kontaktflächen erforderlich, wie möglicherweise durch die Infektion mit *P. capsici* in Tao *et al.* (2019) gezeigt wurde. Regente *et al.* (2017) konnten über die extrazelluläre Flüssigkeit aus Sonnenblumen (*Helianthus annuus*) Keimlingen EVs isolieren und eine Vielzahl von Proteinen der Immunabwehr identifizieren. Die erhaltenen EVs wurden anschließend mit FM4-64 behandelt und deren Aufnahme von dem Oomyceten *Sclerotinia sclerotiorum* nachgewiesen. Die Aufnahme der EVs inhibierte das Pilzwachstum und führte zum Zelltod des Pathogens (Regente *et al.* 2017).

Zusätzlich wurden nach den PAMP-Behandlungen auch punktförmige Strukturen beobachtet, bei denen es sich um Vesikel handeln könnte (Abb.24 B, F). Möglicherwiese werden an den Membranflecken die Membran-Membran-Kontaktflächen für den vesikulären Transport genutzt (Wang *et al.* 2015, Tao *et al.* 2019). Zusammengefasst scheinen die SAUL1-Membranflecken durch biotischen Stress induzierbar zu sein. Um den beobachteten Effekt zu bestätigen, müssen diese Ergebnisse jedoch reproduziert und statistisch ausgewertet werden.

4.3.2 Temperaturen unter 25 °C scheinen einen Einfluss auf die SAUL1-Membranfleckenbildung zu haben

Abiotische Faktoren wie Temperatur, Salzkonzentration und pH-Wert beeinflussen Moleküle wie Proteine, wodurch ihre Struktur, Funktionalität und Dynamik modifiziert werden können. Dies spielt besonders bei der LLPS zur Bildung von Biokondensaten eine signifikante Rolle (Emmenecker *et al.* 2021). In Abhängigkeit der genannten Faktoren, können Proteine in der Lösung gelöst bleiben, ausfallen oder Biokondensate sowie Aggregate bilden (Villegas *et al.* 2022). Besonders die Temperatur könnte ein Stimulus für die Membranfleckenbildung darstellen, da diese nicht nur die Fluiditiät von Membranen beeinflusst, sondern auch einen Einfluss auf den pH-Wert der Lösung und die Löslichkeit von Molekülen hat. Ein Beispiel zur temperaturbedingten LLPS ist das POLYADENYLATE-BINDING PROTEIN 1 (PAB1), welches ein Bestandteil von Stress-Granula ist. Die temperaturabhängige Selbstorganisation von PAB1 in Stress-Granula erfolgt dabei 160-mal schneller als bei normalen biologischen Reaktionen (Riback *et al.* 2017). In Pflanzen trägt EARLY FLOWERING 3 (ELF3) zur Temperaturwahrnehmung bei (Jung *et al.* 2020). ELF3 durchläuft ebenfalls eine temperaturabhängige LLPS, wodurch sich Biokondensate im Nukleus bilden. Diese durch die Temperatur ausgelöste LLPS, sowie deren Reversibilität konnte ebenfalls *in vitro* nachgewiesen werden (Jung *et al.* 2020).

Eine Reduktion der Inkubationstemperatur auf unter 25 °C führte zu einer vermehrten Bildung von kleineren GFP-SAUL1 Membranflecken (Abb.25). Das Auftreten dieser kleineren Membranflecken bei Temperaturen unter 20 °C könnte durch einen langsameren Metabolismus ausgelöst werden. Wie in der Van-'t-Hoff-Gleichung beschrieben, führt eine Erhöhung der Temperatur um 10 °C zu einer Verdopplung bis Vervierfachung der Reaktionsgeschwindigkeit. Demzufolge können niedrige Temperaturen zwar die Bildung der Membranflecken induzieren, jedoch erfolgt diese aufgrund der reduzierten Reaktionsgeschwindigkeit und geringere Menge an Fusionsproteinen langsamer. Während die Inkubation bei 25 °C dazu führte, dass in 44% der Protoplasten GFP-SAUL1 Membranflecken gebildet wurden, konnte nach Inkubation bei 18 °C in 59% der Protoplasten eine Membranfleckenbildung beobachtet werden. Die weiteren getesteten Temperaturen folgten einem ähnlichen Muster, was darauf hinweist, dass Temperaturen unter 20 °C als ein schwacher Stimulus zur Induktion der SAUL1-Membranfleckenbildung beitragen könnten. Da sich Membranflecken durch Membran-Membran-Kontaktflächen bilden, könnten diese von der temperaturbedingten Fluidität der Plasmamembran abhängig sein (Yu et al. 2020). Bei Temperaturen über 22 °C könnte die Plasmamembran im Vergleich zu Temperaturen unter 20 °C für Membranfleckenbildung von GFP-SAUL1 zu fluide sein, sodass diese energetisch ungünstiger ist als die gleichmäßige Verteilung (Berry et al. 2018, Boeynaems et al. 2018). Temperaturen von unter 20 °C könnten zudem auch den TN2/SOC3-Komplex stimulieren, wodurch dieser strenger die Homöostase von SAUL1 überwacht. Da in den untersuchten Protoplasten eine Überexpression von GFP-SAUL1 stattgefunden hat, könnte durch die Veränderung der SAUL1-Homöostase der TN2/SOC3-Komplex eine Immunantwort aulösen. Diese könnte zu einer erhöhten Bildung von SAUL1-Membranflecken führen, da zusätzliche Membran-Membran-Kontaktflächen zur "Abwehr" gebildet werden. EPSIN1 moduliert beispielsweise die Menge von FLS2 an der Plasmamembran, welches über Vesikelandockstellen zur Plasmamembran gebracht werden kann (Collins et al. 2020). Besonders da auch die transgenen Col-0 *35S::YFP-SAUL1* Pflanzen nach einer Inkubation bei 18 °C in stark gestressten Geweben eine Induktion der Membranfleckenbildung zeigten, scheint der Zusammenhang vom Temperaturstimulus und einer ausgelösten Stressreaktion der Membranfleckenbildung möglich.

4.3.3 Ein enzymatischer Verdau der Zellwand induziert die Bildung von SAUL1-Membranflecken

Die Protoplastierung von transgenen Col-0 *355::YFP-SAUL1* Pflanzen führte zur Induktion der Membranfleckenbildung, welche über einen Zeitraum von drei Tagen wieder abnahm (Abb.27). Die Membranfleckenbildung verlief dabei ähnlich wie die die durch eine PAMP-Behandlung induziert wurde (Abb.24). Am zweiten und dritten Tag erschienen die Membranflecken teilweise segmentiert. Möglicherweise wurden die Membranflecken wie in Tao *et. al* (2019) gezeigt von Bestandteilen des Cytoskeletts geteilt (Lv *et al.* 2017, Tao *et al.* 2019). Besonders interessant war, dass die Protoplastierung als Stimulus die Membranfleckenbildung induzierte. Bezüglich der Erklärung kann man zwei Hypothesen aufstellen. (i) Der enzymatische Verdau der Zellwand und Mittellamelle ähnelt einem biotischen Stimulus für die Membranfleckenbildung. (ii) Der Verlust der Zellwand führt zur Induktion der Membranfleckenbildung, um die Zellwand zu regenerieren.

Die erste Theorie erscheint angesichts des Verlaufs des Experiments wahrscheinlicher, da die Anzahl an Protoplasten mit Membranflecken über die Zeit abnahm. Dabei nahm das Verhältnis der Protoplasten mit Membranflecken vom ersten Tag (82%) bis zum dritten Tag (32%) täglich um mindestens 20% ab. Interessanterweise wiesen am zweiten Tag 60% der Protoplasten Membranflecken auf, was den Beobachtungen von mit GFP-SAUL1 transformierten Protoplasten entspricht, die nach einer Inkubationszeit von etwa 24 Stunden untersucht wurden. Diese Abnahme deutet darauf hin, dass der enzymatische Verdau eine Immunantwort auslöste, welche durch den fehlenden Stimulus über die Zeit nicht weiter in den Protoplasten induziert wurde. An den Folgetagen nach der Protoplastierung könnten molekulare Prozesse zur Zellwandregeneration aktiviert sein, wodurch die Membranflecken nicht mehr als Andockstelle für MVBs zur Pathogenabwehr benötigt werden, sondern für den Transport Zellwandmaterial.

In einer Arabidopsis-Protoplasten Zellkultur konnten neben den für die Zellwandregeneration benötigten apoplastischen Proteine auch welche zur Pathogenabwehr gefunden werden (Kwon et al. 2005, Xu et al. 2021). Dazu gehörten die Chitinase At2g43610 sowie die β-Glucanasen At1g66280 und At3g09260. Dabei wird vermutet, dass diese durch die präventiv Protoplastierung induziert wurden, oder diese zeitgleich mit zellwandregenierenden Proteine synthetisiert werden (Kwon et al. 2005). Hier wäre es interessant ebenfalls das apoplastische Proteom von den in dieser Arbeit extrahierten Col-0 sowie saul1-1 35S::YFP-SAUL1 Protoplasten über den Zeitraum von drei Tagen zu untersuchen. Dabei könnten möglicherweise Proteine, die spezifisch über die SAUL1-Membranflecken in den Apoplasten gelangen, identifiziert werden. Es wäre möglich, mittels qPCR-Experimenten die Transkriptmenge von Markergenen der Zellwandregeneration sowie der Immunantwort zu untersuchen, um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Menge der Membranflecken und den potentiell transportierten Proteinen zu finden. Dies könnte Hinweis auf die biologische Funktion der Membranflecken liefern.

4.4 SAUL1-Membranflecken scheinen einen Bezug zur Exocytose zu haben

Um eine mögliche Verknüpfung zwischen der Membranfleckenbildung und den Immunantworts- und SAUL1-assoziierten Genen BON1, EXO70B1, KIN5b, PUB43, SOC3 sowie TN2 zu untersuchen, wurden Mesophyllprotoplasten aus A. thaliana knock-out Pflanzen, welche die entsprechenden Gene nicht exprimieren, mit 35S::GFP-SAUL1 transformiert. Durch das Fehlen der funktionsfähigen Proteine war die Bildung von SAUL1-Membranflecken unterschiedlich stark beeinflusst (Abb.29 Α, C). In saul1-1/pub43/soc3 Mesophyllprotoplasten, die kein funktionsfähiges SAUL1, PUB43 und SOC3 bilden, wurden normale Membranflecken ohne Auffälligkeiten gefunden. PUB43 als engstes Paralog zu SAUL1 kann teilweise dessen Funktion in der PTI übernehmen (Mudgil et al. 2004, Tong et al. 2017). SOC3 überwacht wie in 1.4 beschrieben zusammen mit CHS1 die Homöostase des SAUL1-Proteins (Disch et al. 2015, Tong et al. 2017, Liang et al. 2019). Da die Membranfleckenbildung in saul1-1/pub43/soc3 nicht beeinflusst wurde, scheint diese nicht von der SOC3-induzierten Immunantwort abhängig zu sein und benötigt kein funktionsfähiges SAUL1, PUB43 oder SOC3 Protein.

Ähnliches ließ sich in kin5b und bon1 Mesophyllprotoplasten beobachten (Abb.29 B, C, G, H). Beide Proteine wurden in einem Co-IP Experiment als potentielle Interaktionspartner von SAUL1 gefunden, jedoch konnte die Interaktion nicht mit unabhängigen Methoden bestätigt werden (Brieske 2017, Lienemann 2017, Niessen 2019, Strauß 2020). KIN5b ist ein im Nukleus und teilweise im Cytoplasma lokalisiertes Kinesin, welches als Motorprotein über Mikrotubuli Cargo intrazellulär transportiert (Strauß 2020, Strauß et al. 2021). BON1 ist über eine Myristoylierung des Glycins an Aminosäureposition 2 mit der Plasmamembran verbunden, wo es mit der autoinhibierenden Domäne der ACA8 und ACA10 Calciumpumpen interagiert und diese reguliert. Somit hat BON1 einen Einfluss auf die Ca²⁺-bedingte Signaltransduktion während einer Immunantwort (Yang et al. 2017, Wang et al. 2020). Da auch in Protoplasten dieser knock-out Linien eine SAUL1-Membranfleckenbildung möglich war, scheint diese nicht von KIN5b oder BON1 abhängig zu sein. Durch die Beobachtungen von Tao et al. (2019) scheint jedoch ein Cytoskelett Zusammenhang SAUL1 Membranflecken und dem von möglich (Konopka et al. 2006, Bucherl et al. 2017, Lv et al. 2017). Da Mikrotubuli für den Vesikeltransport innerhalb der Zelle erforderlich sind, könnten sie SAUL1 in den Membran-Membran-Kontaktflächen stabilisieren. Dies würde es ermöglichen, dass Zellwandmaterial oder Glucan-Synthasen wie GSL5 oder PMR4, welche Callose synthetisieren, sowie der Cellulose-Synthase-Komplex von ihrem Syntheseort im ER mittels Vesikel zur Plasmamembran und zu den SAUL1-Membranflecken transportiert werden (An et al. 2006, Bashline et al. 2014, Rui und Dinneny 2020). Des Weiteren könnten auch wie in 1.1.1 und 1.2.1 beschrieben, für die Pathogenabwehr benötigte Metabolite transportiert werden, welche über Exocytose in den Apoplasten abgegeben werden (Liang et al. 2019, Baillie et al. 2020, Prinz et al. 2020, Rossini et al. 2020). BON1 war ebenfalls nicht für die SAUL1-Membranfleckenbildung erforderlich. Dennoch sind Ca²⁺-abhängige Signalketten für die Regulation der pflanzlichen Immunantwort notwendig, sodass diese durchaus von Membran-Membran-Kontaktflächen profitieren könnten. An den Membranflecken könnten neue Calcium-Kanäle in die Plasmamembran eingebaut werden, sodass diese möglicherweise einen Einfluss auf den Ca²⁺ In- und Efflux haben könnten (Couto und Zipfel 2016, Yu et al. 2017, Wang und Luan 2024).

Interessanterweise war die Verteilung und Membranfleckenbildung von GFP-SAUL1 in Protoplasten der Exocytose-assoziierten exo70b1 und tn2 Mutanten stärker betroffen. TN2 reguliert den vesikulären Transport und überwacht wie in 1.4 beschrieben die Expressionsmenge von SAUL1 (Antignani et al. 2015, Liang et al. 2019). Eine erhöhte Expressionsmenge von SAUL1 induziert eine durch TN2/SOC3 regulierte Autoimmunantwort, die zu einem ähnlichen Autoimmunphänotyp wie in saul1-1 führt (Liang et al. 2019). In den exo70b1 Protoplasten wurde neben der Bildung von Membranflecken auch eine gleichmäßige Verteilung des GFP-SAUL1 Fusionsproteins an der Plasmamembran beobachtet (Abb.29 D, I). Demnach scheint das Fehlen von funktionsfähigen EXO70B1 die Membran-Membran-Kontaktflächen zu beeinflussen, jedoch nicht deren Bildung zu bedingen. In exo70b1 Mutanten ist der extrazelluläre Transport beeinträchtigt, wodurch möglicherweise weniger Membran-Membran-Kontaktflächen benötigt oder gebildet werden (Martin 2015). Es wurde gezeigt, dass in exo70b 1-3 Mutanten die Homöostase von FLS2 an der Plasmamembran gestört ist, sodass FLS2 an dieser mehr vorhanden ist und die Antwort auf flg22 stark eingeschränkt wird. Die EXO70B1- und EXO70B2-Untereinheiten sind somit essentiell für einen funktionierenden Vesikeltransport zur und von der Plasmamembran (Wang et al. 2020). EXO70B1 könnte zusammen mit SAUL1 das Gerüst für die Membranen innerhalb von Membran-Membran-Kontaktflächen bilden (Gui et al. 2016). Dadurch könnte der Verlust von EXO70B1 zu einer schwächeren Bindung der Membranen durch SAUL1 führen und SAUL1 vermehrt gleichverteilt vorliegen.

In den *tn2* Protoplasten war GFP-SAUL1 überwiegend gleichmäßig verteilt und es konnten nur wenige, teilweise sehr kleine Membranflecken gefunden werden (Abb.29 E, J). Demnach scheint TN2 die Verteilung von SAUL1 und dessen Membranfleckenbildung zu beeinflussen. TN2 überwacht in einem Signaling-Komplex mit CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE 5 (CPK5) und CALMODULIN-BINDING TRANSCRIPTION ACTIVATOR 3 (CAMTA3) die Integrität von EXO70B1 und induziert bei dessen Modifikationen oder Verlust eine Immunantwort (Zhao *et al.* 2015, Wang *et al.* 2021, Liu *et al.* 2024). Dies deutet auf einen parallelen Mechanismus zur TN2-bedingten Überwachung der SAUL1-Expression hin (Liang *et al.* 2019). Da ein Fehlen von TN2 generell zu einer abgeschwächten Immunantwort führt und gerade diese ein möglicher Stimulus für die Membranfleckenbildung darstellt, könnten in den *tn2 knock-out* Mutanten weniger Membranflecken gebildet und die gleichmäßige Verteilung bevorzugt werden.

4.4.1 Eine hohe Expressionsmenge von SAUL1 führt zur Bildung von Vesikeln

Bei einer Koexpression von zwei SAUL1-Fusionsproteinen konnte innerhalb der Protoplasten die Bildung vesikelartiger Strukturen beobachtet werden, welche teilweise ein starkes Fluoreszenzsignal in ihrem Inneren oder selbst Membranflecken auf ihrer Oberfläche aufwiesen (Abb.35). Die Vesikelbildung schien unabhängig von der Membranfleckenbildung zu sein, da Vesikel sowohl in Protoplasten mit Membranflecken als auch in solchen ohne aufgetreten sind.

Die beobachteten SAUL1-bedingten Vesikel waren mit Größen von 200 nm bis 5 µm ungewöhnlich groß. Im Vergleich dazu haben typische Vesikel wie *apoptotic bodies* (500 nm – 3 µm), Mikrovesikel (100 nm – 1 µm) und Endosomen normalerweise eine Größe von 200 bis 500 nm und sind daher schwer mittels KLSM zu identifizieren (Hause *et al.* 2006, von Wangenheim *et al.* 2016). Während der Entwicklung von Wurzelhaaren wurde die Verteilung der intrazellulären endosomalen Körperchen anhand von YFP-RabF2a oder GFP-2xFYVE-markierten Vesikeln untersucht. Dabei wurde ein Wachstum von frühen Endosomen mit einer Größe von 154 nm und 251 nm, mit einer durchschnittlichen Größe von 197 ± 20,7 nm, zu späten Endsomonen mit einer Größe von 336 ± 72 nm sowie 339 ± 79 nm für die jeweiligen Fusionsproteine festgestellt (von Wangenheim *et al.* 2016). Bei den gefundenen punktfömige Strukturen von SAUL1-Fusionsproteinen könnte es sich um vergrößerte Vesikel handeln. Eine Modifikation am N-Terminus von SAUL1 könnte den Vesikeltransport, ähnlich wie bei der Punktmutation des ARA7_{Q69L} Proteins, stören und dadurch ein verlängertes Vesikelwachstum ermöglichen (Jia *et al.* 2013).

Dass es sich bei diesen Strukturen möglicherweise um Vesikel oder MVBs handelt, könnte durch die Konversion von Rab-GTPasen erklärt werden. Diese Konversion führt entweder zur Fusion von MVBs mit der Vakuole oder zur Reifung von MVBs am TGN und frühen Endosomen (Scheuring *et al.* 2011, Singh *et al.* 2014). TGN-bedingte MVBs reifen am trans-Golgi-Netzwerk von punktförmigen zu sphärischen Strukturen heran, die schließlich abgeschnürt werden. Wird dieser Prozess durch einen Inhibitor gehemmt, entstehen ungewöhnlich geformte und vergrößerte MVBs. Durch die Markierung dieser MVBs mit verschiedenen Markern für ESCRT-Komponenten konnten sowohl deren Reifung am TGN als auch den frühen Endsomonen nachgewiesen werden. Zudem wurden ihre punktförmigen oder vergrößerten Strukturen sichtbar gemacht (Scheuring *et al.* 2011).

GFP-ARA7 markierte MVBs waren in *sand-1* Mutanten im Vergleich zu WT-Pflanzen vergrößert und teilweise gruppiert. SAND vermittelt die Konversion von Rab5 zu Rab7, welches für die Fusion von MVBs mit der Vakuole benötigt wird. In *sand-1* Mutanten kann dieser Prozess nicht mehr stattfinden, was zu einer Akkumulation von MVBs an der Vakuole und deren Reifung zu größeren Strukturen führt (Singh *et al.* 2014). Ähnlich könnten die SAUL1-bedingten Vesikel an Membran-Membran-Kontaktflächen entstehen, wo sie länger gebunden sind und zu größeren Strukturen heranreifen. Alternativ könnte die erhöhte Proteinmenge der Überexpression von zwei SAUL1-Fusionsprotein oder der TMV-verstärkten Überexpression (Earley *et al.* 2006) zu einer LLPS führen, wodurch sich Biokondensate bilden, die aufgrund ihrer hohen Affinität zur Plasmamembran dort gebunden sind.

Daraus lässt sich ableiten, dass eine hohe SAUL1-Proteinmenge zu einer Zunahme von Membran-Membran-Kontaktflächen führen könnte, an denen vermehrt SAUL1-bedingte Vesikel entstehen können. Die Vesikelbildung könnte durch eine Kombination aus einem gleichverteilten SAUL1-Fusionsprotein und einem membranfleckenbildenden Fusionsprotein begünstigt werden. Wie in 3.2.9 gezeigt, werden gleichmäßig verteilte SAUL1-Fusionsproteine aus den SAUL1-Membranflecken ausgeschlossen. Dadurch könnte an den Rändern der Membranflecken durch eine veränderte Membranzusammensetzung die Vesikelbildung stattfinden (Konrad et al. 2014, Gronnier et al. 2017, Yu et al. 2020). Zum Beispiel bildet StREM1.3 an der Plasmamembran geordnete Nanodomänen, die durch Sterole und PtdIns(4)P vermittelt werden. Eine Veränderung der Sterolzusammensetzung in der Plasmamembran ermöglichte zwar weiterhin die Lokalisation von YFP-StREM1.3 an der Plasmamembran, verhinderte jedoch die Bildung von Nanodomäenen. Eine Reduktion von PtdIns(4)P in der Plasmamembran führte hingegen zu einer verminderten Assoziation von YFP-StREM1.3 mit der Plasmamembran und ebenfalls zur ausbleibenden Bildung von Nanodomänen (Gronnier et al. 2017). PtdIns(4)P tritt vermehrt auf der Innenseite der pflanzlichen Plasmamembran auf und trägt somit zur negativen Ladung dieser bei (Simon et al. 2016). Demnach könnte durch die unterschiedliche Verteilung von SAUL1 die Lipidzusammensetzung der Plasmamembran beeinflusst werden, was somit die Bildung von Nano- und Mikrodomänen beeinträchtigt und möglicherweise die Bildung von Vesikel begünstigen könnte. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die unterschiedlich verteilten SAUL1-Fusionsproteine unterschiedlich stark zur LLPS neigen. Dadruch könnten die Membranflecken als Biokondensate das gleichmäßig verteilte SAUL1 umschließen und dabei teilweise Plasmamembranmaterial aufnehmen. Dass die SAUL1-bedingten Vesikel aus Plasmamembranmaterial bestehen, konnte durch den Einsatz des Membranmarker FM4-64 nachgewiesen werden (Abb.36). Alternativ könnte es sich bei den SAUL1-bedingten Vesikeln um Autophagosomen handeln, die aus abgeschnürtem Membranmaterial bestehen, das SAUL1 enthält. Diese könnten dazu dienen, überschüssiges Fusionsproteins zu entfernen (Ohno *et al.* 1995, Scita *et al.* 2010, William *et al.* 2011).

4.4.2 Die Fähigkeit zur Membranfleckenbildung scheint keine Voraussetzung für die Vesikelbildung zu sein

Wie in 3.3 gezeigt und in 4.4.1 diskutiert, sind die SAUL1-bedingten Vesikel von der Proteinmenge abhängig, sodass diese nur bei der Koexpression von zwei SAUL1-Fusionsproteinen oder bei einer durch einen TMV-Verstärker induzierten Expression von YFP-SAUL1 Fusionsproteinen beobachtet werden konnten. In den Koexpressionen wurden Vesikel unabhängig von membranfleckenbildenden und gleichverteilten SAUL1-Fusionsproteinen gefunden (Abb.37). Demnach scheint die Fähigkeit zur Membranfleckenbildung keine Grundvoraussetzung für die Vesikelbildung zu sein. Dennoch zeigten die Koexpressionen mit GFP-SAUL1_{R736,737,775A} generell weniger Vesikel als die Koexpression mit einfach punktmutierten GFP-SAUL1 Fusionsproteinen. Möglicherweise wird durch die dreifache Punktmutation und der darausfolgenden Verändungerung von Oberflächenladung und Struktur weniger Vesikel gebildet. Dabei können die wie in 4.2.3 und 4.2.3.2 beschriebenen elektrostatischen Effekte durch den Aminosäureaustausch auftreten (Betts und Russel 2003).

Die Untersuchung mit den Fusionsproteinen YFP-SAUL1_{R736A} und YFP-SAUL1_{R736E} zeigte, dass die Vesikelbildung nicht ausschließlich von der positiven Ladung vom Arginin R736 abhängig ist, sondern nur beeinflusst wurde. Besonders da YFP-SAUL1_{R736E} zu einer verstärkten Bildung zahlreicher kleiner SAUL1-bedingten Vesikel führte (Abb.38 B). Möglicherweise verändert sich durch die negative Ladung der Glutaminsäure die Affinität zu Interaktionspartnern (vgl.4.2.3.2), wodurch die Vesikelgröße oder ihre Bildung beeinträchtigt wurde. Im Gegensatz dazu bildete YFP-SAUL1_{R737A} weniger und moderat große Vesikel als YFP-SAUL1_{R736E}. Dies legt nahe, dass die negative Ladung an der Aminosäureposition R736 einen positiven Effekt auf die Vesikelbildung hat.

Dennoch bleibt die Frage wieso die SAUL1-bedingte Vesikelbildung so stark durch die Proteinmenge beeinflusst wird. Möglicherweise könnte die erhöhte Menge von SAUL1-Fusionsproteinen dazu führen, dass durch Endocytose und Autophagie Mechanismen zur Wiederherstellung die SAUL1-Homöostase an der Plasmamembran induziert werden. Es könnte sich jedoch auch um ein Phänomen der Immunantwort handeln. PRRs wie FLS2 befinden sich oft in Mikrodomänen an der Plasmamembran und werden über EXO70B1, EXO70B2 und TN2 an der Membran recycelt (Wang *et al.* 2020). Da TN2 sowohl die SAUL1-Proteinmenge überwacht als auch die Integrität von EXO70B2 kontrolliert, könnte ein Zusammenhang zwischen der Überwachung der SAUL1-Proteinmenge und dem vesikulären Transport von PRRs bestehen (Zhao *et al.* 2015, Liang *et al.* 2019 Wang *et al.* 2021, Liu *et al.* 2024). TN2 könnte eine hohe SAUL1-Proteinmenge als Signal für eine Immunantwort interpretieren und die Internalisierung von PRRs induzieren.

4.5 Punktmutiertes SAUL1 hebt den saul1-1 Autoimmunphänotyp auf

Überprüfen der Funktionalität von 35S::YFP-SAUL1_{R736A}, 35S::YFP-SAUL1_{R775A}, Zum 35S::YFP-SAUL1_{R736,737,775A} und 35S::YFP-SAUL1_{AR736fl}, wurden diese in Pflanzen der saul1-1 knock-out Mutantenlinie eingebracht und konnten den saul1-1 Autoimmunphänotyp teilweise aufheben (Abb.46). Die Phänotypen dieser Pflanzen wiesen Ähnlichkeiten mit denen der Col-0 35S::YFP-SAUL1 Linie auf, die häufig kleine Pflanzen mit gelblich verfärbten Blättern hervorbrachte. Dabei korrelierte die Ausprägung des Phänotyps mit der Intensität des Fluoreszenzsignals, was den bereits beschriebenen Dosis-Effekt der von TN2/SOC3 überwachten SAUL1-Homöostase widerspiegelt. Zusätzlich könnte das am N-Terminus fusionierte Fluorophor die Funktion der U-box Domäne beeinflussen, was zu einer beeinträchtigten Entwicklung der Pflanzen führt (Tong et al. 2017, Liang et al. 2019). Die Bedeutung der U-box für die Funktion von SAUL1 konnte in der Komplementation von *saul1-1* Pflanzen mit dem 35S::SAUL1_{AU-box} und 35S::SAUL1_{C29A} Genkonstrukt gezeigt werden. In beiden Fällen war keine Komplementation möglich, sodass die Pflanzen weiterhin den saul1-1 Autoimmunphänotyp ausprägten. Zusätzlich wurde durch das Stören der SAUL1-Homöostase in Col-0 WT-Pflanzen ein schwerer Autoimmunphänotyp ausgelöst (Tong et al. 2017). Um zu überprüfen, ob die teilwese Komplementation von saul1-1 durch die Genkonstrukte 35S::YFP-SAUL1_{R736A}, 35S::YFP-SAUL1_{R775A}, 35S::YFP-SAUL1_{R776}, und *35S::YFP-SAUL1*_{ΔR736fl} auf die Expressionmenge und die damit verbundenen gestörten SAUL1-Homöostase zurückzuführen ist und nicht durch das Fluorophor selbst bedingt wird, könnte dies durch native Promotor-Konstrukte untersucht werden. Hier wäre zu erwarten, dass, sofern das N-terminal fusionierte Fluorophor keinen Einfluss auf die Funktionalität von SAUL1 hat, der Autoimmunphänotyp von *saul1-1* vollständig komplementiert wird.

Komplementation des *saul1-1* Autoimmunphänotyps durch Die teilweise 35S::YFP-SAUL1_{R736A} und 35S::YFP-SAUL1_{R736,737,775A} (Abb.46) deutet darauf hin, dass die Funktionen von SAUL1 möglicherweise entkoppelt sind. Demnach führt eine Hemmung der tethering-Funktion nicht zu einer Beeinträchtigung der Ubiquitin-Ligase-Funktion. Das Verlusts punktmutierte bleibt daher trotz Protein des der Fähigkeit zur Membranfleckenbildung weiterhin funktionsfähig. Wie auch in den Protoplasten zeigte die Punktdeletion des Arginin R736 in saul1-1 35S::YFP-SAUL1_{DR736fl} ein Verhalten, das dem des Volllängenproteins ähnlich war und somit die vorangegangenen Vermutungen, dass R737 die Funktion von R736 *in planta* übernimmt unterstützt (Abb.21).

4.5.1 Modifikationen am N-Terminus von SAUL1 beeinflussen die Entwicklung von *A. thaliana*

In den Komplementationsexperimenten mit punktmutierten *35S::YFP-SAUL1* zeigte sich, dass das N-terminal fusionierte Fluorophor möglicherweise die Proteinfunktion beeinträchtigte, was eine vollständige Komplementation des *saul1-1* Autoimmunphänotyps verhinderte. Im Vergleich zu *35S::YFP-SAUL1* konnte *35S::SAUL1-GFP* den Autoimmunphänotyp besser aufheben. Dennoch war auch bei der Expression von *35S::SAUL1-GFP* keine vollständige Komplementation möglich (Drechsel *et al.* 2011, diese Arbeit). RNA-Sequenzierungsanalysen und Genexpressionsstudien haben gezeigt, dass in *A. thaliana* Col-0 Wildtyp-Pflanzen nur geringe Mengen von *SAUL1* exprimiert werden (Knop 2019, Amelung und Hoth unveröffentlicht). Somit kann durch die SAUL1-Überexpression in *saul1-1 35S::SAUL1-GFP* und *saul1-1 35S::YFP-SAUL1* die SAUL1-Homöostase derart beeinflusst sein, dass eine TN2/SOC3-vermittelte Immunantwort ausgelöst wird (Liang *et al.* 2019).

Um die Auswirkung von N-terminalen Modifikationen durch ein Fluorophor-Tag zu vermeiden, wurden die reporterlosen Genkonstrukte *35S::SAUL1_{R736A}, 35S::SAUL1_{R775A}*, *35S::SAUL1_{R736,737,775A}* und *35S::SAUL1_{ΔR736f}* in *A. thaliana saul1-1* Mutanten und in Col-0

Wildtyp-Pflanzen eingebracht. Die einfach punktmutierten Genkonstrukte konnten unabhängig von der Fähigkeit zur Membranfleckenbildung den saul1-1 Autoimmunphänotyp im Vergleich zu 35S::SAUL1_{R736,737,775A} und 35S::SAUL1_{ΔR736fl} vollständig aufheben (Abb.47). Interessanterweise schien 35S::SAUL1_{R736A} und 35S::SAUL1_{R775A} die Überwachung der SAUL1-Homöostase von TN2/SOC3 auszuweichen, da im Vergleich zu Tong et al. (2017) kein Autoimmunphänotyp ausgelöst wurde (Abb.47). Es ist möglich, dass der TN2/SOC3-Komplex nicht direkt die Proteinmenge von SAUL1 überwacht, sondern dessen Funktionalität beziehungsweise die Integrität des N-Terminus kontrolliert. Bei den Genkonstrukten 35S::SAUL1_{AU-box} und 35S::SAUL1_{C29A} ist keine Interaktion mit einer UBC möglich, was bedeutet, dass auch keine Ubiquitinierung erfolgen kann. Ein ähnliches Szenario kann bei der N-terminalen Fusion mit einem Fluorophor auftreten. Auch hier kann die U-box Domäne beeinträchtigt sein, was zu einer reduzierten Funktionalität von SAUL1 führen könnte. Trotz des potentiellen Verlusts der Membranfleckenbildung, welcher aufgrund des fehlenden Reporters nicht nachgewiesen werden konnte, wuchsen die Pflanzen der Linien saul1-1 35S::SAUL1_{R736A} 2-3 und saul1-1 35S::SAUL1_{R736A} 3-2 normal und zeigten keine Verfärbungen.

Mit den etablierten Pflanzenlinien können in Anlehnung an Tao et al. (2019) die Relevanz von SAUL1-Membranflecken in der Immunantwort von A. thaliana während einer Infektion untersucht werden. Durch den Verlust der Fähigkeit zur Membranfleckenbildung sollten die saul1-1 35S::SAUL1_{R736A} Pflanzen im Vergleich zu Col-0 Wildtyp-Pflanzen anfälliger für Infektionen sein, da aufgrund der fehlenden Membranflecken weniger Andockstellen für Vesikel an der Plasmamembran vorhanden sind. In einer Kooperation mit Marcel Wiermer wird nun die Bedeutung von SAUL1-Membranflecken in der pflanzlichen Immunantwort in A. thaliana untersucht. Hierzu werden die Pflanzenlinien Col-0 WT, saul1-1 knock-out, Col-0 35S::SAUL1, saul1-1 35S::SAUL1-GFP und saul1-1 35S::SAUL1_{R736A} mit dem Oomyceten H. arabidopsidis infiziert, um ihre Anfälligkeit gegenüber diesem Pathogen zu testen. Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass N-terminale Modifikationen, insbesondere an der U-box Domäne von SAUL1, die Entwicklung von A. thaliana negativ beeinflussen. Dies könnte entweder durch eine Beeinträchtigung der Ubiquitin-Ligase-Funktion von SAUL1 oder durch eine gestörte Überwachung der SAUL1-Homöostase durch die guard-Komplexe aus TN2/SOC3 und CHS1/SOC3 bedingt sein. Solche Störungen könnten zu einer Umverteilung der Ressourcen von Wachstum zu Verteidigung führen.

4.5.2 Lokalisation von punktmutierten SAUL1-Fusionsproteinen in A. thaliana

In dieser Arbeit konnten die Fusionsproteine YFP-SAUL1, YFP-SAUL1_{R736A}, YFP-SAUL1_{R775A} und YFP-SAUL1_{0736fl} in *A. thaliana* an der Plasmamembran lokalisiert werden (Abb.43). Im Vergleich zu den untersuchten Mesophyllprotoplasten wurden jedoch nur selten Membranflecken gefunden (Abb.43, vgl. Abb.13). Interessanterweise zeigte YFP-SAUL1_{R736A} im Blattgewebe eine punktuelle Akkumulation des Fluoreszenzsignal an Kontaktflächen von drei benachbarten Zellen (Abb.43 A, D), während YFP-SAUL1_{R775A} keine solche Akkumulation des Fluoreszenssignals an diesen Zell-Zell-Kontaktflächen aufwies. Dies deutet darauf hin, dass die unerwartete Lokalisation des YFP-SAUL1_{R736A} Fusionsproteins nicht auf das Einbringen der punktmutierten 35S::YFP-SAUL1 zurückzuführen ist. Vielmehr scheint die veränderte Oberflächenladung YFP-SAUL1_{R736A} spezifische von eine Interaktion mit Zell-Zell-Kontaktflächen beeinflusst. Eine Störung der normalen Proteinlokalisation durch die R736A-Punktmutation erscheint hier unwahrscheinlich, insbesonderse da YFP-SAUL1_{R736A} eine vergleichbare Verteilung an der Plasmamembran wie YFP-SAUL1 oder YFP-SAUL1_{R775A} aufwies und im Protoplastensystem keine Auffälligkeiten beobachtet wurden. Zusätzlich bestätigten die CD-spektroskopischen Analysen des rekombinanten SAUL1_{R736A} die korrekte Faltung und Strukturidentität im Vergleich zum rekombinanten SAUL1. Demnach könnte die R736A-Punktmutation in planta eine gain of function Mutation darstellen.

Kontaktflächen könnten In diesen vermehrt Zell-Zell-Verbindungen wie Plasmodesmata vorhanden sein. Es ist möglich, dass YFP-SAUL1_{R736A} aufgrund der veränderten Oberflächenladung eine erhöhte Affinität zu diesen Zell-Zell-Verbindungen oder in deren Nähe lokalisierten Proteinen aufweist, was zu einer Akkumulation des Fusionsproteins führen könnte (Gronnier et al. 2018). Gegen diese Hypothese spricht, dass Plasmodesmata über die gesamte Zellwand verteilt sind, während die Akkumulation von YFP-SAUL1_{R736A} ausschließlich an den spezifischen Zell-Zell-Kontaktflächen auftritt. Es erscheint unwahrscheinlich, dass SAUL1 eine erhöhte Affinität zu Lipiden der Plasmodesmenmembran aufweist, da diese Membran nur einen geringen Anteil (< 10%) Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol und Phosphatidsäure enthält (Grison et al. 2015) zu denen SAUL1 in den durchgeführten PIP-Strip Experimenten eine Affinität zeigte (Abb.54). Zu den Hauptbestandteilen der Plasmodesmenmembran, Phosphatidylethanolamin (45%) und Phosphatidylcholin (20%) (Grison et al. 2015), zeigten das rekombinante SAUL1 und SAUL1_{R736A} hingegen keine Affinität.

Neben den für die Plasmodesmatabildung benötigten Proteinen sind auch Callosesynthasen wie GSL12 oder Callosehydrolasen wie PdBG1/2/3 an diesen lokalisiert, um die Öffnung der Plasmodesmata und den damit verbundenen interzellulären Transport zu regulieren (Vatén et al. 2011, Benitez-Alfonso et al. 2013). In Hessler et al. (2021) wurde gezeigt, dass SAUL1 möglicherweise im Zusammenhang mit Calloseeinlagerungen in der Zellwand und Plasmodesmata steht und dabei einen Einfluss auf die pflanzliche Immunantwort ausübt. Während einer Temperaturbehandlung bei 18 °C bildeten sich in saul1-1 Pflanzen über einen Zeitraum von drei Tagen Zellwandverdickungen mit Calloseeinlagerungen, wobei auch eine mögliche Verschließung der Plasmodesmata beobachtet wurde. Diese durch Calloseeinlagerung ausgelösten Zellwandverdickungen waren auch bei weiteren Autoimmunmutanten wie snc1, cpn1-1 und chs1-2 zu beobachten. Die Intensität der Calloseeinlagerung war jedoch besonders stark bei saul1-1 und chs1-2 ausgeprägt (Hessler et al. 2021). Möglicherweise könnte funktionsfähiges SAUL1 erforderlich sein, um entweder die Ubiquitinierung von Callosesynthasen oder die Aktivierung von Callosehydrolasen zu ermöglichen. Dies könnte entscheidend sein, um die Calloseeinlagerung an der Membran und gegebenfalls den Plasmodesmata zu regulieren. Der point of no return des saul1-1 Autoimmunphänotyp könnte demnach ebenfalls auf die Calloseeinlagerung zurückgeführt werden (Hessler et al. 2021). Das Plasmodesmata besonders bei der Abwehr beziehungsweise der Verbreitung von Viren eine Rolle spielen konnte an Arabidopsis thaliana FORMIN 2 (AtFH2) gezeigt werden (Diao et al. 2018). AtFH2 reguliert den Zell-Zell-Transport, indem es das Verschließen und Stabilisieren von Plasmodesmata durch Aktinfilamente vermittelt. Diese Aktinfilamente assoziieren über AtFH2 mit den über die Zellwand verteilten Plasmodesmata und helfen bei deren Schließung. Dabei wurde gezeigt, dass atfh2 Mutanten zwar keine Einschränkungen in ihrer Entwicklung aufwiesen, jedoch aufgrund der Permeabilität ihrer Plasmodesmata anfälliger für Virusinfektionen sind (Diao et al. 2018).

Alternativ kann die beobachtete Protein-Akkumulation ein Indikator für eine Stress- oder Immunantwort sein. Durch die R736A-Punkmutation ist das YFP-SAUL1_{R736A} Fusionsprotein nicht nur stark überexprimiert, was zur TN2/SOC3-bedingten Immunantwort führen kann, sondern auch nicht in der Lage Membranflecken zu bilden. Der TN2/SOC3-Immunrezeptorkomplex könnte die Immunantwort induzieren, wodurch SAUL1 seine potentielle Funktion bei der Zellwandverdickung und dem Verschließen der Plasmodesmata durch Callose ausüben könnte. Da jedoch YFP-SAUL1_{R736A} im Vergleich zu YFP-SAUL1 und YFP-SAUL1_{R775A} keine Membran-Membran-Kontaktflächen ausbilden kann, kommt es zu einer Fehlakkumulation an den beobachteten Zell-Zell-Kontaktflächen. Um diese mögliche Funktion zu untersuchen, könnten die YFP-SAUL1 Fusionsproteine in Plasmodesmata oder Callosesynthase Marker-Linien exprimiert werden, um eine mögliche Kolokalisation nachzuweisen. Dies könnte Hinweise auf die Funktion von SAUL1-Membranflecken liefern.

4.5.3 SAUL1-Membranflecken treten nur selten in Pflanzen auf

Wie in Abschnitt 4.5.2 beschrieben, wurden in Pflanzen, welche das *35S::YFP-SAUL1* Genkonstrukt exprimieren, nur selten Membranflecken beobachtet. Um daher die SAUL1-Membranflecken *in planta* zu charakterisieren, wurden GFP- und YFP-SAUL1 Fusionsproteine transient in *N. benthamiana* Epidermiszellen sowie in transgenen *A. thaliana* Pflanzen untersucht. In *N. benthamiana* Epidermiszellen wurden Membranflecken ausschließlich bei der Verwendung des verkürzten GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ Fusionsprotein gefunden (Abb.34). Demnach scheint ein zusätzlicher Stimulus, wie die in Tao *et al.* (2019) durchgeführte Infektion mit *P. capsici*, für die Membranfleckenbildung *in planta* erforderlich zu sein. Während einer Infektion könnte ein erhöhter Vesikeltransport zur Plasmamembran induziert werden, um eine verstärkte Pathogenabwehr zu ermöglichen (Gu und Innes 2011, Gu und Innes 2012, Ekanayake *et al.* 2019).

Das KEEP ON GOING (KEG) Protein in *A. thaliana* ist am trans-Golgi-Netzwerk und Endosomen lokalisiert, wo es eine entscheidende Rolle bei verschiedenen intrazellulären Transportprozessen spielt (Gu und Innes 2011, Gu und Innes 2012). Die Relevanz von KEG für die Immunantwort wurde anhand der Sekretion von apoplastischen Proteinen nachgewiesen. Dabei wurden die beiden apoplastischen Immunproteine C14-RFP, der Tomate, und PR1-mCherry in Col-0 Wildtyp und *keg* Mutanten-Pflanzen exprimiert und lokalisiert. In Wildtyp-Pflanzen akkumulierten die Fusionsproteine im Apoplasten, während nur ein schwaches Fluoreszenzsignal in der Vakuole detektiert wurde. Im Gegensatz dazu wurden die beiden Fusionsproteine in den *keg-1* und *keg-2* Mutanten fast vollständig im Lumen der Vakuole lokalisiert, während sie nur in sehr geringen Mengen im Apoplasten gefunden werden konnten. In einer Infektionsstudie mit dem Mehltaupilz *Golovinomyces cichoracearum* wurde daraufhin gezeigt, dass sich KEG-sYFP 15 bis 18 Stunden nach der Infektion an den Penetrationsstellen des Pilzes akkumuliert. Dies deutet darauf hin, dass KEG für die Verteidigung gegen frühe Infektionsstadien benötigt wird. Zudem wurde beobachtet, dass das KEG-sYFP Fluoreszenzsignal in infizierten Zellen über die Zeit abnahm, was ein Hinweis dafür ist, dass *Golovinomyces cichoracearum* KEG degradiert. Dadurch könnte die Sekretion von Immunantworts-relevanten Proteinen oder Metaboliten inhibiert werden, was dem Pathogen eine effektivere Verbreitung ermöglicht (Gu und Innes 2012). Daraus lässt sich schließen, dass der Vesikeltransport eine entscheidende Rolle in der pflanzlichen Immunantwort spielt und bei einer Infektion schnell aktiviert wird. An den Membran-Membran-Kontaktflächen könnten Vesikel andocken, die anschließend von SAUL1 ubiquitiniert werden. Diese Ubiquitinierung könnte eine gezielte Sekretion von Vesikel regulieren und somit die präzise Steuerung der pflanzlichen Abwehrmechanismen ermöglichen.

Das Andocken von Vesikeln an der Zielmembran wird über Rab-GTPasen und *"tethering*-Faktoren" reguliert, während SNARE-Proteine die Fusion der Vesikel mit der Zielmembran ermöglichen. RabA4B befindet sich an TGN-vermittelten Vesikeln und reguliert den polaren Membrantransport in Wurzelhaarzellen (Kang *et. al* 2011). Dabei wurde gezeigt, dass RabA4B mit den Phosphatidylinositol 4-Kinasen Pl4Kα1 und Pl4Kβ2 sowie PUB13 assoziiert ist (Antignani *et al.* 2015). PUB13 interagiert dabei direkt mit Rab4AB, während Rab4AB über seine C-terminale Domäne mit den Phosphatidylinositolen PtdIns(3)P, PtdIns(4)P, PtdIns(3,5)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃ interagiert. Dies könnte zur Rekrutierung von PUB13 in Membran-Mirkodomänen führen (Antignani *et al.* 2015). Die vesikulären SNARE-Proteine und Zielmembran-SNARE-Proteine ermöglichen die Fusion von Vesikel- und Zielmembran (Bassham und Blatt 2008). Da SAUL1 eine Affinität gegenüber den PtdIns(3)P, PtdIns(4)P, PtdIns(5)P sowie PtdIns(3,5)P₂, PtdIns(4,5)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃ zeigt, könnten die SAUL1-Membranflecken mit RabA- oder SNARE-Mikrodomänen assoziieren und durch Ubiquitinierung deren Funktionalität regulieren.

Da dem verkürzten GFP-SAUL1ARM₇₋₁₁ Fusionsprotein der für die Multimerisierung postulierte N-Terminus fehlt, könnten Protein-Protein-Interaktionen eingeschränkt sein, wodurch SAUL1 als aktives Monomer vorliegen könnte und keinen weiteren Stimulus benötigt (Jung *et al.* 2015, Furlan *et al.* 2017). Hypothetisch könnte SAUL1 im *steady-state* als Multimer vorliegen, welches keine Membranflecken bilden kann. Während einer Infektion könnte sich dieses Multimer auflösen, was SAUL1 ermöglicht, mit einem Ubiquitin-konjugierenden Enzym zu interagieren und Membran-Membran-Kontaktflächen zu bilden (Knop *et al.* 2021).

Eine mögliche Regulation der Aktivität von PUBs durch deren Multimerisierungszustand konnte anhand von PUB10 und PUB22, wie in 4.2.1, beschrieben, gezeigt werden (Jung *et al.* 2015, Furlan *et al.* 2017). Diese Proteine liegen ebenfalls als Dimere vor und zeigen in diesem Zustand eine unterschiedliche Aktivität (Jung *et al.* 2015, Furlan *et al.* 2017).

Pflanzliche Zellen sind von einer Zellwand umgegeben, die essentielle Proteine für die interzelluläre Kommunikation und den Transport enthält (Piquerez et al. 2014, Wu et al. 2014, Gendre et al. 2015). Diese strukturgebende Funktion der Zellwand könnte die Membranfleckenbildung hemmen, da, wie 4.3.3 beschrieben, im Gegensatz zu Protoplasten keine Membran-Membran-Kontaktflächen zur Regeneration der Zellwand erforderlich sind (Kwon et al. 2005, Xu et al. 2021). In Xu et al. (2021) wurde das Transkriptom von Protoplasten sowie von Mikrocalli unmittelbar nach der Protoplastierung und nach 4, 11 22 und 30 Tagen analysiert und mit dem Transkriptom intakter Blattzellen verglichen. Direkt nach der Protoplastierung wiesen 7558 Gene eine veränderte Expression im Vergleich zum intakten Gewebe auf, wobei 508 dieser Gene über den Zeitraum von 30 Tagen weiterhin höher exprimiert waren. Die Genexpressionsprofile veränderten sich signifikant während des Regenerationsprozesses. Gene-Ontology-Analysen zeigten, dass zu allen Zeitpunkten nach der Protoplastierung Gene mit Funktionen in der Stressantwort und in Stoffwechselprozessen verstärkt exprimiert wurden. Im späteren Verlauf der Regeneration nahm die Expression von Genen zu, die an biosynthetischen Prozessen der pflanzlichen Entwicklung beteiligt sind. Während der Regeneration wurden insgesamt 3978 Gene konstitutiv exprimiert, von denen viele eine Funktion in Zellwachstum und in Stoffwechsel aufwiesen (Xu et al. 2021). Obwohl keine spezifischen Gene oder Genprodukte im Zusammenhang mit der Zellwandsynthese oder der Immunantwort gezeigt wurden, lässt sich vermuten, dass solche Gene innerhalb der stress- und stoffwechselbezogenen Transkripte vorhanden sind. Die Daten deuten auf eine Transition von Stressantwort und Regeneration zu Wachstum und Entwicklung hin. Diese Erkenntnisse unterstützen die Möglichkeit, dass die SAUL1-Membranflecken sowohl eine Stressantwort auf die Protoplastierung darstellen als auch eine Beteiligung an Regenerationsprozessen widerspiegeln könnten. Die Bildung der YFP-SAUL Membranflecken in Col-0 35S::YFP-SAUL1 und saul1-1 35S::YFP-SAUL1 Pflanzen trat besonders in älteren, teilweise seneszenten Geweben sowie nach einer Temperaturbehandlung bei 18 °C auf (Abb.23 D, H). In diesen älteren und seneszenten Geweben könnten Degradationsprozesse an der Plasmamembran zur Membranfleckenbildung beitragen.

4.5.4 In Schließzellen ist die Bildung von SAUL1-Membranflecken begünstigt

Die Bildung von SAUL1-Membranflecken wurde vermehrt in Schließzellen beobachtet (Abb.23). Da Stomata eine direkte Schnittstelle zwischen dem Inneren der Pflanze und der Außenwelt bilden, stellen die Schließzellen bevorzugte Eintrittspunkte für Pathogene wie Bakterien oder Pilze dar, die versuchen, in die Pflanze einzudringen. Dies könnte die vermehrte Bildung von Membranflecken in Schließzellen im Vergleich zu anderen Zelltypen erklären (Montillet und Hirt 2013, Du *et al.* 2014, Gimenez-Ibanez *et al.* 2016). Pathogene dringen bevorzugt durch Öffnungen wie Stomata in die Pflanze ein, um enzymatische Prozesse zur Durchdringung der Cuticula und Epidermis zu umgehen und so eine durch DAMPs induzierte PTI zu vermeiden (Ellinger *et al.* 2013, Gimenet-Ibanez *et al.* 2016, Souza *et al.* 2017, Hou *et al.* 2019). Demnach könnten die Schließzellen entweder bereits durch Pathogenkontakt einen Stimulus zur Membranfleckenbildung erhalten haben, oder sich in einem *ready-state* befinden, der eine schnelle Aktivierung von Verteidigungsmechanismen ermöglicht (Gimenez-Ibanez *et al.* 2016, Tao *et al.* 2019).

Es ist bekannt, dass JAZ2 konstitutiv in Schließzellen exprimiert wird und die Stomatabewegung während bakterieller Infektionen reguliert. Durch das Fehlen von funktionsfähigen JAZ2 in jaz2-3 Mutanten sind diese Pflanzen nach einer Behandlung mit einem Pto DC3000-Extrakt nicht in der Lage die Stomata effektiv zu schließen. Im Gegensatz dazu zeigen Jasmonsäure-insensitive JAZAJas Mutanten, die eine konstitutiv aktive Form des JAZ-Proteins besitzen, eine effektivere Schließung der Stomata während einer Infektion mit P. syringae und sind daher resistenter (Gimenez-Ibanez et al. 2016). Demzufolge können in den Schließzellen unterschiedliche Prozesse der Pathogenabwehr stattfinden, darunter die bereits beschriebene Sekretion von Metaboliten und die Verstärkung der Zellwand. Ein spezifischer Verteidigungsmechanismus der Stomata ist das osmotisch regulierte Schließen der Schließzellen (Liu et al. 2009, Wilton et al. 2010). In diesem Zusammenhang könnten Membran-Membran-Kontaktflächen eine Rolle bei der Regulation des osmotischen Potentials spielen, um das Schließen der Stomata zu erleichtern. Pflanzliche Sterole könnten dabei an diese Kontaktstellen transportiert werden, um die Wasserdurchlässigkeit der Plasmamembran zu modulieren (Hodzic et al. 2008, Liu et al. 2009, Wilton et al. 2010).

4.5.5 SAUL1-bedingte Vesikel treten in planta auf

In transgenen Col-0 35S::YFP-SAUL1 Pflanzen wurde ebenfalls eine durch SAUL1 induzierte Vesikelbildung beobachtet (3.3.1, Abb.39), was darauf hinweist, dass diese Phänomene keine Artefakte des Protoplastensystems darstellen. Die SAUL1-bedingten Vesikel konnten an der Plasmamembran gefunden werden, wobei sie sich möglicherweise in der Phase der Membraneinstülpung oder -abschnürung sowie in potentiellen Fusionsprozessen zwischen Vesikeln befanden (Abb.39). Die Vesikelbildung beginnt typischerweise mit der Einstülpung der Plasmamembran, des Tonoplasten, des TGN, oder des ER (Roth 2008, Foresti und Denecke 2008, Collins *et al.* 2020). Dass die Vesikel ausschließlich an der Plasmamembran lokalisiert wurden, deutet darauf hin, dass sie möglicherweise während der Exocytose mit der Plasmamembran verschmelzen oder für den intrazellulären Transport abgeschnürt werden (Lam *et al.* 2007, Liang *et al.* 2019). Bei den beobachteten potentiellen Fusionen kam es zur Verschmelzung von zwei oder mehreren Vesikeln oder von Vesikeln mit einer anderen Membran (Martens und McMahon 2008, Hanson und Cashikar 2012, Liang *et al.* 2019).

Um die Auflösung und Vergrößerung der SAUL1-bedingten Vesikel zu verbessern, wurde in einer Kooperation mit Carola Schneider (AG Thünauer, HPI) Blattgewebe von Col-0 und Col-0 35S::YFP-SAUL1 mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) untersucht. Dabei wurden wesentliche Unterschiede gefunden. Im Vergleich zur Col-0 Kontrolle zeigten die 35S::YFP-SAUL1 Proben eine vermehre Ablösung der Plasmamembran von der Zellwand. Zudem wurden in den 35S::YFP-SAUL1 Proben Vesikel gefunden, die teilweise an der Plasmamembran oder anderen Vesikeln assoziiert waren. Es erscheint unwahrscheinlich, dass die Ablösungen der Plasmamembran von der Zellwand Artefakte der Fixierung und Herstellung der TEM-Schnitte sind, da die Col-0 und Col-0 35S::YFP-SAUL1 Proben identisch behandelt wurden und diese Ablösungen nur im transgenen Gewebe auftraten. Möglicherweise führen die Vesikelbildung und Membranflecken zu Modifikationen der Plasmamembran, welche die Zellwand spröde oder unflexibel machen. Beispielsweise könnten durch Calloseeinlagerungen (Ellinger et al. 2013) diese Ablösungen schneller auftreten. Eine solche Modifikation erscheint plausibel, da in saul1-1 knock-out Mutanten während der Ausprägung des Autoimmunphänotyps Calloseeinlagerungen in der Zellwand beobachtet wurden (Hessler et al. 2021).

4.5.6 In *N. benthamiana* wurde eine verstärkte SAUL1 Vesikelbildung beobachtet

Die punktmutierten Genkonstrukte 35S::GFP-SAUL1_{R736,737A}, 35S::GFP-SAUL1_{R736,775A}, 35S::GFP-SAUL1_{R737,775A} sowie 35S::GFP-SAUL1_{R736,737,775A} wurden ausschließlich in N. benthamiana in planta untersucht und mit den einfach punktmutierten 35S::GFP-SAUL1 Versionen verglichen. Dabei wurden im Gegensatz zu den Beobachtungen in A. thaliana Mesophyllprotoplasten vermehrt punktförmige Strukturen gefunden, bei denen es sich möglicherweise um Vesikel handelt. Diese Strukturen wurden sowohl bei den einfach punktmutierten GFP-SAUL1_{R736A}, als auch bei den zweifach punktmutierten GFP-SAUL1_{R736,737A}, GFP-SAUL1_{R736,775A} und GFP-SAUL1_{R737,775A} sowie dem dreifach punktmutierten GFP-SAUL1_{R736,737,775A} gefunden (Abb.41). Auch in N. benthamiana wurde durch die verstärkte Expression der SAUL1-Fusionsproteine mithilfe des Expressionsvektors pEG104 (Earley et al. 2006) die SAUL1-bedingte Vesikelbildung induziert. Allerdings zeigte das YFP-SAUL1_{R775A} keine Vesikelbildung. Stattdessen wurden fluoreszenzfreie Bereiche an der Plasmamembran beobachtet, die möglicherweise durch kortikale Mikrotubuli oder Aktinfilamente verursacht werden, welche das Fusionsprotein verdrängen können (Bucherl et al. 2017, Tao et al. 2019). Das YFP-SAUL1_{A736fl} Fusionsprotein bildete an der Plasmamembran ebenfalls SAUL1-bedingte Vesikel (Abb.42 D), wodurch die in N. benthamiana Epidermiszellen gewonnenen Beobachtungen, die in A. thaliana Mesophyllprotoplasten und in planta gemachten, unterstützten.

4.6 Rekombinantes GST-SAUL1 und GST-SAUL1_{R736A} binden verschiedene Membranlipide

Zur Untersuchung der Affinität von SAUL1 gegenüber Lipiden wurden Protein-Lipid-Overlay Assays mit PIP-Strips durchgeführt (2.14.3.4). Diese Experimente zeigten eine potentielle Interaktion von SAUL1 mit Lipiden der Plasmamembran sowie mit Lipiden aus multivesikulären Körperchen (Abb.54). Insbesondere die starke Affinität der rekombinanten GST-SAUL1-Proteine zu Phosphatidylsäure (PA) und Phosphatidylserin (PS) lieferte erste Hinweis darauf, wie SAUL1 an der Plasmamembran assoziiert sein könnte. Bislang konnte SAUL1 lediglich an der Plasmamembran lokalisiert werden und der HDEL-Weg als Transportmechanismus des Proteins über das ER ausgeschlossen werden (Drechsel et al. 2011). Interaktionen mit anderen plasmamembranständigen Proteinen konnten nicht nachgewiesen werden, was die Annahme unterstützt, dass SAUL1 elektrostatische Wechselwirkungen mit PS und Phosphatidylinositolen (PtdIns) eingeht, die zur negativen Ladung der Plasmamembran beitragen. Im tierischen System ist bekannt, dass insbesondere PS zur negativen Oberflächenladung der inneren Membranschicht beiträgt (Leventis und Grinstein 2010). PA ist ein konisch-geformtes Phospholipid, welches eine Verdrängung anderer Membranlipide bewirken kann, sodass sich Proteine an die Plasmamembran anlagern können.

Es sind für die Interaktion mit PA keine spezifischen Domänen bekannt, sodass Proteine häufig über positiv geladene Aminosäuren wie Arginin und Lysin mit PA interagieren. Dennoch können auch Motive aus polybasischen Aminosäuren oder hydrophoben Aminosäuren gebildet werden, wie etwa bei der Proteinkinase Raf-1, die ein 35 Aminosäuren umfassendes Motiv besitzt, welches auch in ABI1 oder CTR1 vorkommt (Rizzo et al. 2000, Zhang et al. 2004, Wang et al. 2006, Testerink et al. 2007). Durch PA kann die Membranzusammensetzung und Membrankrümmung beeinflusst werden, was die Bindung von Proteinen an die Membran erleichtert, insbesondere von solchen mit hydrophoben Proteindomänen (Wang et al. 2006, Roth 2008). Ein Zusammenhang von PA mit dem Vesikeltransport wurde anhand der Interaktion mit AGD7 gezeigt. AGD7 ist ein ADP riboylation factor (ARF) GTPase-activating protein (GAP) Homolog in A. thaliana und hydrolysiert am ARF gebundenes GTP zu GDP (Min et al. 2007, 2013). Dabei wird beispielsweise die Phospholipase D aktiviert und vermehrt PA an der Membran produziert, wodurch weitere Proteine zur Vesikelbildung, zum Vesikelbudding und zur Endo-/Exocytose rekrutiert werden (Li und Xue 2007, Wang et al. 2014). Es ist daher möglich, dass SAUL1 entweder direkt durch PA oder als Teil eines scaffolding-Komplexes an der Plasmamembran am Vesikeltransport beteiligt ist.

Darüber hinaus zeigte SAUL1 eine potentielle Affinität zu verschiedenen Vertretern der Phosphatidylinositol-Familie, die vermehrt in Vesikeln und MVBs vorkommen. GST-SAUL1 und GST-SAUL1_{R736A} interagierten mit den Phosphatidylinositol-Monophosphaten PtdIns(3)P, PtdIns(4)P und PtdIns(5)P. Zusätzlich zeigte GST-SAUL1 eine Affinität zu PtdIns(3,5)P₂, PtdIns(4,5)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃, während GST-SAUL1_{R736A} keine Bindung an diese Di- und Triphosphate aufwies (Abb.54). Der Unterschied in der Lipidaffinität zwischen den

rekombinanten SAUL1-Proteinen resultiert wahrscheinlich aus der Veränderung des Ladungsmotivs der Aminosäure R736 durch den Austausch mit dem ungeladenen Alanin. Während GST-SAUL1_{R736A} noch an PtdIns-Monophosphate bindet, können keine Di- und Triphosphate mehr gebunden werden. Die Beziehung von PtdIns zu Membranflecken wurde durch Interaktionen von den plasmamembranbindenden Proteinen StREM1.3, BIK1, PBS1 und CPK21 mit den PtdIns(4)P-bindenden Proteinen FAPP1 und Osh2 gezeigt. Für PtdIns(3)P wurden solche Interaktionen bei ARA6, ARA7, RHA1, RABG3f in Verbindung mit Vamp7 und Hrs-2xFYVE gefunden (Tao et al. 2019). Als Regulator der pflanzlichen Immunantwort und membranständige Ubiquitin-E3-Ligase könnte SAUL1 Vesikel, wie MVBs, deren Membranen überwiegend aus PtdIns bestehen, an der Plasmamembran binden. Diese Vesikel könnten sich an den Membran-Membran-Kontaktflächen ansammeln, gelagert oder weiter transportiert werden. Alternativ könnte auch das Internalisieren von PRRs oder anderen membranständigen Proteinen über diese Bindestellen stattfinden und durch vesikulären Transport subzellulär verteilt werden. Um die potentiellen SAUL1-Lipid-Interaktionen zu bestätigen und in vivo zu untersuchen, werden diese im Labor von Sylvie Friant (Universität Straßburg) in S. cerevisiae getestet.

5. Zusammenfassung

Die pflanzliche Immunantwort ist präzise reguliert, sodass selbst geringfügige Veränderungen die Fitness einer Pflanze erheblich beeinflussen können. In diesem Zusammenhang spielen Ubiquitin-Ligasen, wie die SENESZENZ-ASSOZIIERTE E3 UBIQUITIN-LIGASE 1 (SAUL1), eine zentrale Rolle bei der Regulation von stressinduzierten Reaktionen in *Arabidopsis thaliana*. Während Temperaturen unter 23 °C eine Autoimmunantwort in *saul1-1 knock-out* Pflanzen induzieren, zeigen diese Pflanzen, durch eine konstitutive basale Immunantwort, bei 25 °C eine erhöhte Resistenz gegenüber bakteriellen Infektionen. Der genaue Mechanismus, durch den SAUL1 die pflanzliche Immunantwort reguliert, ist jedoch bisher ungeklärt.

In dieser Arbeit wurden strukturelle Modifikationen am SAUL1-Protein vorgenommen, um die Funktionalität der rekombinanten Proteine zu untersuchen. Insbesondere wurde die Affinität der Armadillo-like Domäne 7-11 zur Plasmamembran untersucht, indem verkürzte Teildomänen generiert und untersucht wurden. Dabei wurde gezeigt, dass die vollständige ARM₇₋₁₁ Domäne für die Lokalisation von SAUL1 an der Plasmamembran notwendig ist. Darüber hinaus wurden gezielte Modifikationen in der positiv geladenen Region dieser Domäne durchgeführt. Hierbei wurden die drei Arginine R736, R737 und R775 durch die ungeladene Aminosäure Alanin, das positiv geladene Lysin oder die negativ geladene Glutaminsäure ausgetauscht. R736 trägt eine entscheidende Rolle bei der Lipid-Lipid-Interaktion von SAUL1. Im Vergleich zu GFP-SAUL1 war GFP-SAUL1_{R736A} nicht in der Lage Membranflecken zu bilden. Dieses Phänomen wurde mithilfe von einfach, zweifach und dreifach punktmutierten SAUL1 in A. thaliana Mesophyllprotoplasten untersucht. Dabei konnte eine Dynamik der Membranflecken, ihre Induzierbarkeit sowie eine scheinbar konzentrationsabhängige Bildung von SAUL1-Vesikeln festgestellt werden. Für in vivo Experimente wurden transgene Arabidopsis thaliana Pflanzen mit den generierten Arginin zu Alanin Punktmutanten erstellt und sowohl phänotypisch als auch mikroskopisch untersucht.

Das rekombinante Protein SAUL1_{R736A} wurde exprimiert, aufgereinigt und mittels CD-Spektroskopie mit dem Wildtyp-Protein SAUL1 verglichen, wobei keine strukturellen Unterschiede festgestellt wurden. Anschließend wurden beide rekombinanten Proteine für Protein-Lipid-Interaktionsexperimente verwendet, bei denen eine Affinität von SAUL1 zu spezifischen Plasmamembranlipiden sowie Lipiden der Phosphatidylinositol-Familie nachgewiesen werden konnte.

Abstract

Plant immunity is tightly regulated, with even minor changes significantly impacting plant fitness. The SENESCENCE-ASSOCIATED E3 UBIQUITIN LIGASE 1 (SAUL1) has been shown to play a crucial regulatory role in stress-related responses in *Arabidopsis thaliana*. Notably, *saul1-1 knock-out* plants exhibit susceptibility to temperatures below 23 °C, triggering an autoimmune response. However, these plants demonstrate increased resistance to bacterial infections due to a constitutive basal immune response that inhibits bacterial growth. Despite these observations, the precise mechanism by which SAUL1 regulates the immune responses remains unclear.

In this thesis, structural modifications were made to the SAUL1 protein, sand the functionality of the newly generated recombinant proteins was assessed. Truncated versions of the SAUL1 protein were generated to investigate the plasma membrane affinity of the armadillo-like domain 7-11. The results revealed that the complete ARM₇₋₁₁ domain is necessary for the plasma membrane localization of SAUL1. Additionally, the positively charged region within this domain, which includes the arginines R736, R737 and R775, was analyzed. These arginines were substituted with either uncharged alanine, positively charged lysine, or negatively charged glutamic acid. Among these, R736 was found to play a critical role in the lipid-lipid interactions of SAUL1. Comparative analysis between GFP-SAUL1 and GFP-SAUL1_{R736A} demonstratet that the latter was unable to form membrane patches. This phenomenon was further investigated in single, double and triple point mutated SAUL1, revealing the dynamics of membrane patches and a novel concentration-dependent vesicle formation ability of SAUL1. Moreover, these membrane patches were inducible by both abiotic and biotic stresses. Stable transgenic Arabidopsis thaliana lines carrying the point mutated SAUL1 proteins were generated and analyzed both phenotypically and microscopically.

The recombinant SAUL1_{R736} protein was expressed, purified and compared with the wild-type SAUL1 using CD-spectroscopy, which revealed no structural differences between the two proteins. Both proteins were subsequently utilized in protein-lipid interaction studies, which demonstrated that SAUL1 has a specific affinity for plasma membrane lipids, as well as for lipids from the phosphatidylinositol family.

6. Literaturverzeichnis

Acuna C, Liu X, Südhof TC (2016). How to Make an Active Zone: Unexpected Universal Functional Redundancy between RIMs and RIM-BPs. *Neuron Volume 91, ISSUE 4, P792-807 https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.07.042*

Alfano JR, Collmer A, (2004). TYPE III SECRETION SYSTEM EFFECTOR PROTEINS: Double Agents in Bacterial Disease and Plant Defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 385

An Q, Ehlers K, Kogel KH, van Bel AJ, Hückelhoven R (2006). Multivesicular compartments proliferate in susceptible and resistant MLA12-barley leaves in response to infection by the biotrophic powdery mildew fungus. *New Phytol.* 172(3):563-76. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01844.x.

Antignani V, Klocko AL, Bak G, Chandrasekaran SD, Dunivin T, Nielsen E (2015). Recruitment of PLANT U-BOX13 and the PI4Kbeta1/beta2 phosphatidylinositol-4 kinases by the small GTPase RabA4B plays important roles during salicylic acid-mediated plant defense signaling in Arabidopsis. *Plant Cell*, 27(1), 243–261. https://doi.org/10.1105/tpc.114.134262

Aravind L and Koonin EV (2000). The U box is a modified RING finger—a common domain in ubiquitination. *Curr. Biology 10, R132–R134*

Bacete L, Mélida H, Miedes E, Molina A (2018). Plant cell wall-mediated immunity: cell wall changes trigger disease resistance responses. *The Plant Journal 93, 614–636.*

Baillie AL, Falz AL, Müller-Schüssele SJ, Sparkes I (2020). It started with a kiss: monitoring organelle interactions and identifying membrane contact site components in plants. *Front Plant Sci 11: 517*

Balla T (2005). Inositol-lipid binding motifs: signal integrators through protein-lipid and protein-protein interactions. *Journal of Cell Science 118, 2093-2104 doi:10.1242/jcs.02387*

Balla T (2013). Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation. *Physiol. Rev. 93, 1019-1137*

Barbosa ICR, Shikata H, Zourelidou M, Heilmann M, Heilmann I, Schwechheimer C (2016). Phospholipid composition and a polybasic motif determine D6 PROTEIN KINASE polar association with the plasma membrane and tropic responses. *Development 143, 4687-4700 doi:10.1242/dev.137117*

Bashline L, Li S, Gu Y (2014). The trafficking of the cellulose synthase complex in higher plants. Annals of Botany, Volume 114, Issue 6, Pages 1059–1067, https://doi.org/10.1093/aob/mcu040

Benitez-Alfonso Y, Faulkner C, Pendle A, Miyashima S, Helariutta Y, Maule A (2013). Symplastic intercellular connectivity regulates lateral root patterning. *Dev Cell 2013; 26:136 - 47; http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2013.06.010* **Bent AF and Mackey D (2007).** Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a life time supply of questions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45, 399–436.

Berndsen CE and Wolberger C (2014). New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism. *Nature Structural & Molecular Biology 21: 301–307*

Bernsdorff F, Döring AC, Gruner K, Schuck S, Bräutigam A, Zeier J (2016). Pipecolic Acid Orchestrates Plant Systemic Acquired Resistance and Defense Priming via Salicylic Acid-Dependent and -Independent Pathways. *The Plant Cell, Vol. 28: 102–129, January 2016, http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.15.00496*

Berry J, Brangwynne CP, Haataja M (2018). Physical principles of intracellular organization via active and passive phase transitions. Rep. Prog. Phys. 81 046601 DOI 10.1088/1361-6633/aaa61e

Betts MJ and Russell RB (2003). Amino acid properties and consequences of subsitutions. *Bioinformatics for Geneticists, M.R. Barnes, I.C. Gray eds, Wiley, 2003*

Block, A und Alfano JR (2011). Plant targets for Pseudomonas syringae type III effectors: virulence targets or guarded decoys? *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 39–46

Boeynaems S, Alberti S, Fawzi NL, Mittag T, Polymenidou M, Rousseau F, Schymkowitz J, Shorter J, Wolozin B, van Den Bosch L, Tompa P, Fuxreiter M (2018). Protein phase separation: a new phase in cell biology. *Trends Cell Biol* 28:420–35 https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.004

Boller T, and Felix G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol. 60, 379–406.*

Bonifacino JS, and Dell'Angelica, EC (1999). Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J. Cell Biol.* 145: 923–926

Boutrot F, Segonzac C, Chang KN, Qiao H, Ecker JR, Zipfel C, Rathjen JP (2010). Direct transcriptional control of the Arabidopsis immune receptor FLS2 by the ethylene-dependent transcription factors EIN3 and EIL1. *Proc Natl Acad Sci USA 107: 14502–14507*

Brillada C, Zheng J, Krüger F, Rovira-Diaz E, Askani JC, Schumacher K, Rojas-Pierce M (2018). Phosphoinositides control the localization of HOPS subunit VPS41, which together with VPS33 mediates vacuole fusion in plants. *PNAS 115 (35) E8305-E8314 https://doi.org/10.1073/pnas.1807763115*

Brzeska H, Guag J, Remmert K, Chacko S, Korn ED (2010). An experimentally based computer search identifies unstructured membrane-binding sites in proteins: application to class I myosins, PAKS, and CARMIL. *J. Biol. Chem. 285, 5738-5747.*

Bucherl CA, Jarsch IK, Schudoma C, Segonzac C, Mbengue M, Robatzek S, MacLean D, Ott T, Zipfel C (2017). Plant immune and growth receptors share common signalling components but localise to distinct plasma membrane nanodomains. *Elife 6. doi:10.7554/eLife.25114*

Buono RA, Paez-Valencia J, Miller ND, Goodman K, Spitzer C, Spalding EP, Otegui MS (2016). Role of SKD1 Regulators LIP5 and IST1-LIKE1 in Endosomal Sorting and Plant Development. *Plant Physiol. 171: 251–64.*

Cabanillas DG, Jiang J, Movahed N, Germain H, Yamaji Y, Zheng H, Laliberté JF (2018). Turnip mosaic virus uses the SNARE protein VTI11 in an unconventional route for replication vesicle trafficking. *Plant Cell 30: 2594–2615.*

Callis J (2014). The ubiquitination machinery of the ubiquitin system. *Arabidopsis Book 12:e0174*

Chabanon M, Stachowiak JC, Rangamani P (2017). Systems biology of cellularmembranes: a convergence with biophysics. WIREs Syst. Biol. Med. 2017, e01386. doi: 10.1002/wsbm.1386

Chanda B, Xia Y, Mandal MK, Yu K, Sekine KT, Gao OM, Selote D, Hu Y, Stromberg A, Navarre D, Kachroo A, Kachroo P (2011). Glycerol-3-phosphate is a critical mobile inducer of systemic immunity in plants. *Nat. Genet.* 43:421-427.

Chen X, Wu X, Wu H, Zhang M (2020). Phase separation at the synapse. *Nat. Neurosci. 23,* 301–310

Cheng YT, Li Y, Huang S, Huang Y, Dong X, Zhang Y, Li X (2011). Stability of plant immune receptor resistance proteins is controlled by SKP1-Cullin1-F-box(SCF)-mediated protein degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108, 14694–14699.*

Cheval C, Johnston M, Samwald S, Liu X, Bellandi A, Breakspear A, Kadota Y, Zipfel C and Faulkner C (2020). Chitin perception in plasmodesmata identifies subcellular, context-specific 1 immune signalling in plants. *PNAS* 117 (17) 9621-9629 https://doi.org/10.1073/pnas.1907799117

Chiaruttini N, Redondo-Morata L, Colom A, Humbert F, Lenz M, Scheuring S, Roux A (2015). Relaxation of loaded ESCRT-III spiral springs drives membrane deformation. *Cell.* 2015;163:866–79

Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nürnberger T, Jones JD, Felix G, Boller T (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature 448: 497–500*

Cho W, Stahelin RV (2005). Membrane-protein interactions in cell signaling and membrane trafficking. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 34, 119-151

Choi SW, Tamaki T, Ebine K, Uemura T, Ueda T, Nakano A (2013). RABA members act in distinct steps of subcellular trafficking of the FLAGELLIN SENSING2 receptor. *Plant Cell 25:* 1174–1187

Clague MJ and Urbe S (2010). Ubiquitin: same molecule, different degradation pathways. *Cell 143: 682–685*

Coates JC (2003). Armadillo repeat proteins: beyond the animal kingdom. *Trends in Cell Biology* 13, 463–471

Coates ME and Beynon JM (2010). Hyaloperonospora arabidopsidis as a Pathogen Model. *Annu. Rev. Phytopathol. 2010.* 48:329–45

Conrath U, Beckers GJM, Flors V, Garcia-Agustin P, Jakab G, Mauch F, Newmann MA, Pieterse CMJ, Poinssot B, Pozo MJ, Pugin A, Schaffrath U, Ton J, Wendehenne D, Zimmerli L, Mauch-Mani B (2006). Priming: getting ready for battle. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:1062–71

Consonni C, Humphry ME, Hartmann HA, Livaja M, Durner J, Westphal L, Vogel J, Lipka V, Kemmerling B, Schulze-Lefert P, Somerville SC, Panstruga R (2006). Conserved requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis. *Nat Genet 38: 716–720*

Collins CA, LaMontagne ED, Anderson JC, Ekanayake G, Clarke AS, Bond LN, Salamango DJ, Cornish PV, Peck SC, Heese A (2020). EPSIN1 Modulates the Plasma Membrane Abundance of FLAGELLIN SENSING2 for Effective Immune Responses. *Plant Physiol. Vol. 182, 2020 1762-1775*

Colombo M, Raposo G, Théry C (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 255–289. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326

Couto D and Zipfel C (2016). Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nat. Rev. Immunol. 16: 537–552*

Cozier GE, Carlton J, Bouyoucef D, Cullen PJ (2004). Membrane targeting by pleckstrin homology domains. *Curr. Top. Microbiol. Immunol. 282, 49-88.*

Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, Tannetta DS, Ferguson DJP, Hole P, Carr B, Redman CWG, Harris AL, Dobson PJ, Harrison P, Sargent IL (2011). Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine 7 (2011) 780–788*

Dangl JL and Jones JDG (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature 411, 826*

Defeo-Jones D, Tai JY, Vuocolo GA, Wegrzyn RJ, Schofield TL, Riemen MW, Oliff A (1989). Substitution of Lysine for Arginine at Position 42 of Human Transforming Growth Factor-α Eliminates Biological Activity without Changing Internal Disulfide Bonds. *Molecular and Cellular Biology, 9:9, 4083-4086, DOI:10.1128/mcb.9.9.4083-4086.1989*
Denoux C, Galletti R, Mammarella N, Gopalan S, Werck D, De Lorenzo G, S Ferrari S, Ausubel FM, Julia Dewdney J (2008). Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in Arabidopsis seedlings. *Mol.Plant 1,423–445*

Dettmer J, Hong-Hermesdorf A, Stierhof YD, Schumacher K (2006). Vacuolar H⁺-ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2006;18:715–30

Diao M, Ren S, Wang Q, Qian L, Shen J, Liu Y, Huang S (2018). Arabidopsis formin 2 regulates cell-to-cell trafficking by capping and stabilizing actin filaments at plasmodesmata. *Elife. 2018 Aug 16;7:e36316. doi: 10.7554/eLife.36316*

Disch EM, Tong M, Kotur T, Koch G, Wolf CA, Li X, Hoth S (2016). Membrane-associated ubiquitin ligase SAUL1 suppresses temperature- and humidity-dependent autoimmunity in Arabidopsis. *Mol. Plant Microbe Interact. 2016, 29, 69–80*

Dong CH, Agarwal M, Zhang Y, Xie Q, Zhu JK (2006). The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1. *Proc Natl Acad Sci USA, 103 (2006), pp. 8281-8286*

Dongus JA, Bhandari DP, Penner E, Lapin D, Stolze SC, Harzen A, Patel M, Archer L, Dijkgraaf L, Shah J, Nakagami H, Parker JE (2022). Cavity surface residues of PAD4 and SAG101 contribute to EDS1 dimer signaling specificity in plant immunity. *The plant journal Vol. 110, Issue 5: 1415-1432. https://doi.org/10.1111/tpj.15747*

Drechsel G, Bergler J, Wippel K, Sauer N, Vogelmann K, Hoth S (2011). C-terminal armadillo repeats are essential and sufficient for association of the plant U-box armadillo E3 ubiquitin ligase SAUL1 with the plasma membrane. *J. Exp. Bot. 62:775-785*

Driouich A, Jauneau A, Staehelin LA (1997). 7-Dehydrobrefeldin A, a naturally occurring brefeldin A derivative, inhibits secretion and causes a cis-to-trans breakdown of Golgi stacks in plant cells. *Plant Physiol.* 113: 487–492

Du M, Zhai Q, Deng L, Li S, Li H, Yan L, Huang Z, Wang B, Jiang H, Huang T, Li CB, Wie J, Kang L, Li J, Li Chuanyou (2014). Closely related NAC transcription factors of tomato differentially regulate stomatal closure and reopening during pathogen attack. *Plant Cell 26: 3167–3184*

Earley KW, Haag JR, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K, Pikaard CS (2006). Gatewaycompatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant Journal*, 45(4), 616– 629. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02617.x

Ekanayake G, LaMontagne ED, Heese A (2019). Never walk alone: Clathrin-coated vesicle (CCV) components in plant immunity. *Annu. Rev. Phytopathol. 57: 387–409*

Ellinger D, Naumann M, Falter C, Zwikowics C, Jamrow T, Manisseri C, Somerville SC, Voigt CA (2013). Elevated early callose deposition results in complete penetration resistance to powdery mildew in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 161: 1433–1444

Emenecker RJ, Holehouse AS, Strader LC (2021). Biological Phase Separation and Biomolecular Condensates in Plants. *Annu. Review of Plant Biology Vol.* 72:17-46 *https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-081720-015238*

Ernst AM, Contreras FX, Brugger B, Wieland F (2010). Determinants of specificity at the protein-lipid interface in membranes. *FEBS Lett.* 584:1713–1720

Erwig J, Ghareeb H, Kopischke M, Hacke R, Matei A, Petutschnig E, Lipka V (2017). Chitininduced and CHITIN ELICITOR RECEPTOR KINASE1 (CERK1) phosphorylation-dependent endocytosis of Arabidopsis thaliana LYSIN MOTIF-CONTAINING RECEPTOR-LIKE KINASE5 (LYK5). *New Phytol. 215:382–396. doi:10.1111/nph.14592*

Fan L, Li R, Pan J, Ding Z, Lin J (2015). Endocytosis and its regulation in plants. *Trends in Plant Science 20: 388–397.*

Fanelli D and McKane AJ (2008). Thermodynamics of vesicle growth and instability. *Phys. Rev. E 78, 051406 https://doi.org/10.1103/PhysRevE.78.051406*

Faulkner C, Petutschnig E, Benitez-Alfonso Y, Beck M, Robatzek S, Lipka V, Maule AJ (2013). LYM2-dependent chitin perception limits molecular flux via plasmodesmata. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 110, 9166–9170.doi:10.1073/pnas.1203458110*

Fink GR und Guthrie C (2004). Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology. *Elsevier Science* (*ISBN: 978-0-08-057513-1*)

Fonseca S, Chini A, Hamberg M, Adie B, Porzel A, Kramell R, Miersch O, Wasternack C, Solano R (2009). (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology 5: 344–350.*

Foresti O and Denecke J (2008). Intermediate organelles of the plant secretory pathway: Identity and function. *Traffic 9: 1599–1612*

Fu ZQ and Dong X (2013). Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annu. Rev. Plant Biol. 64, 839–863. doi: 10.1146/annurevarplant-042811-105606*

Fuller N and Rand RP (2001). The influence of lysolipids on the spontaneous curvature and bending elasticity of phospholipid membranes. *Biophys J. 2001 Jul; 81(1): 243–254. doi: 10.1016/S0006-3495(01)75695-0*

Furlan G, Nakagami H, Eschen-Lippold L, Jiang X, Majovsky P, Kowarschik K, Hoehenwarter W, Lee J, Trujillo M (2017). Changes in PUB22 ubiquitination modes triggered by MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE3 dampen the immune response. *Plant Cell 2017, 29, 726–745*

Furniss JJ, Grey H, Wang Z, Nomoto M, Jackson L, Tada Y, Spoel SH (2018). Proteasomeassociated HECT-type ubiquitin ligase activity is required for plant immunity. PLoS Pathog.14(11) e1007447. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007447 Gao C, Tang D, Wang W (2022). The Role of Ubiquitination in Plant Immunity: Fine-Tuning Immune Signaling and Beyond. *Plant and Cell Physiology, Volume 63, Issue 10, Pages 1405–1413, https://doi.org/10.1093/pcp/pcac105*

Gendre D, Jonsson K, Boutté Y, Bhalerao RP (2015). Journey to the cell surface: The central role of the trans-Golgi network in plants. *Protoplasma 252: 385–398*

Gigli-Bisceglia N, Engelsdorf T, Hamann T (2020). Plant cell wall integrity maintenance in model plants and crop species-relevant cell wall components and underlying guiding principles. *Cellular and Molecular Life Sciences 77, 2049–2077*

Gimenez-Ibanez S, Hann DR, Ntoukakis V, Petutsching E, Lipka V, Rathjen JP (2009). AvrPtoB Targets the LysM Receptor Kinase CERK1 to Promote Bacterial Virulence on Plants. *Current Biology 19, 423–429 https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.01.054*

Gimenez-Ibanez S, Boter M, Ortigosa A, García-Casado G, Chini A, Lewsey MG, Ecker JR, Ntoukakis V and Solano R (2016). JAZ2 controls stomata dynamics during bacterial invasion. *New Phytologist (2017) 213: 1378–1392 doi: 10.1111/nph.14354*

Gómez-Gómez L, Felix G, Boller T (1999). A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal 18, 277–284*

González Solís A, Berryman E, Otegui MS (2022). Plant endosomes as protein sorting hubs. *FEBS Letters (2022) doi:10.1002/1873-3468.14425*

Goodman K, Otegui M, Pennington J (2020). Electron Tomography to Analyze Vesiculation in Plant Endosomes. *Microsc. Microanal. 26 (Suppl 2), 2020 doi:10.1017/S1431927620013562*

Gou M, Shi Z, Zhu Y, Bao Z, Wang G, Hua J (2012). The F-box protein CPR1/CPR30 negatively regulates R protein SNC1 accumulation. *Plant J. 69, 411–420*

Grant SR, Fisher EJ, Chang JH, Mole BM, Dangl, JL (2006). Subterfuge and manipulation: Type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol. 60:425-449*

Griebel T, Maekawa T, Parker JE (2014). NOD-like receptor cooperativity in effector-triggered immunity. *Trends in Immunology 35: 562–570*

Gronnier J, Crowet JM, Habenstein B, Nasir MN, Bayle V, Hosy E, Platre MP, Gouguet P, Raffaele S, Martinez D, Grelard A, Loquet A, Simon-Plas F, Gerbeau-Pissot P, Der C, Bayer EM, Faillais Y, Deleu M, Germain V, Lins L, Mongrand S (2017). Structural basis for plant plasma membrane protein dynamics and organization into functional nanodomains. *Elife* 6:e26404

Gronnier J, Gerbeau-Pissot P, Germain V, Mongrand S, Simon-Plas F (2018). Divide and Rule: Plant Plasma Membrane Organization. *Trends Plant Sci 23:899–917. doi:* 10.1016/j.tplants.2018.07.007 **Gu Y, Innes RW (2011).** The KEEP ON GOING protein of Arabidopsis recruits the ENHANCED DISEASE RESISTANCE1 protein to trans-Golgi network/early endosome vesicles. *Plant Physiol* 155: 1827–1838

Gu Y, Innes RW (2012). The KEEP ON GOING protein of Arabidopsis regulates intracellular protein trafficking and is degraded during fungal infection. *Plant Cell 24: 4717–4730*

Gui J, Zheng S, Liu C, Shen J, Li J, Li L (2016). OsREM4.1 Interacts with OsSERK1 to coordinate the Interlinking between abscisic acid and brassinosteroid signaling in rice. *Dev. Cell 38:* 201–213

Guo M, Tian F, Wamboldt Y, Alfano JR (2009). The Majority of the Type III Effector Inventory of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 Can Suppress Plant Immunity. *Mol Plant Microbe Interact. 2009 Sep; 22(9): 1069–1080. doi: 10.1094/MPMI-22-9-1069*

Hammond GR, Balla T (2015). Polyphosphoinositide binding domains: key to inositol lipid biology. *Biochim. Biophys. Acta 1851, 746-758*

Hanson PI, Cashikar A (2012). Multivesicular body morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28, 337–362. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154152

Hao H, Fan L, Chen T, Li R, Li X, He Q, Botella MA, Lin J (2014). Clathrin and membrane microdomains cooperatively regulate RbohD dynamics and activity in Arabidopsis. *Plant Cell* 26: 1729–1745

Hartmann M and Zeier J (2018). L-lysine metabolism to N-hydroxypipecolic acid: an integral immune-activating pathway in plants. *Plant J. 96:5-21*

Hartmann M, Zeier T, Bernsdorff F, Reichel-Deland V, Kim D, Hohmann M, Scholten N, Schuck S, Bräutigam A, Hölzel T, Ganter C, Zeier J (2018). Flavin monooxygenase-generated N-hydroxypipecolic acid is a critical element of plant systemic immunity. *Cell* 173:456-469

Hartmann M and Zeier J (2019). N-hydroxypipecolic acid and salicylic acid: a metabolic duo for systemic acquired resistance. *Curr. Opin. Plant Bio.* 50:44-57 *https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.02.006*

Hatsugai N, Iwasaki S, Tamura K, Kondo M, Fuji K, Ogasawara K, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2009). A novel membrane fusion-mediated plant immunity against bacterial pathogens. *Genes & Development 23: 2496–2506.*

Hause G, Šamaj J, Menzel D, Baluska F (2006). Fine Structural Analysis of Brefeldin A-Induced Compartment Formation After High-Pressure Freeze Fixation of Maize Root Epidermis: Compound Exocytosis Resembling Cell Plate Formation during Cytokinesis. *Plant Signaling & Behavior, 1(3), 134–139. https://doi.org/10.4161/psb.1.3.2996*

He P, Shan L, Lin NC, Martin GB, Kemmerling B, Nürnberger T (2006). Specific Bacterial Suppressors of MAMP Signaling Upstream of MAPKKK in Arabidopsis Innate Immunity. *Cell 125, Issue 3, 563–575 https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.047*

He P, Shan L, Sheen J (2007). The Use of Protoplasts to Study Innate Immune Responses. In: Ronald, P.C. (eds) Plant-Pathogen Interactions. *Methods in Molecular Biology, vol 354. Humana Press. https://doi.org/10.1385/1-59259-966-4:1*

Heilmann I (2016). Phosphoinositide signaling in plant development. *Development 143: 2044-2055*

Hessler G, Portheine SM, Gerlach EM, Lienemann T, Koch G, Voigt CA, Hoth S (2021). POWDERY MILDEW RESISTENT4-dependent cell wall deposition is a consequence but not the cause of temperature-induced autoimmunity. *Journal of Experimental Botany, Vol. 72, No. 21 pp. 7549–7563, 2021 https://doi.org/10.1093/jxb/erab423*

Hirano T, Munnik T, Sato MH (2015). Phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase, FAB1/PIKfyve kinase mediates endosome maturation to establish endosomecortical microtubule interaction in Arabidopsis. *Plant Physiology 169: 1961–1974*

Hirano T, Munnik T, Sato MH (2017). Inhibition of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate production has pleiotropic effects on various membrane trafficking routes in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology 58: 120–129*

Hodzic A, Rappolt M, Amenitsch H, Laggner P, Pabst G (2008). Differential modulation of membrane structure and fluctuations by plant sterols and cholesterol. *Biophys. J. 94:* 3935–3944

Hok S, Attard A, and Keller H (2010). Getting the Most from the Host: How Pathogens Force Plants to Cooperate in Disease. *MPMI Vol. 23, No. 10, 2010, pp. 1253–1259. doi:10.1094* /*MPMI -04-10-0103*

Hou S, Liu Z, Shen H and Wu D (2019). Damage-Associated Molecular Pattern-Triggered Immunity in Plants. *Frontiers in Plant Science Volume 10 Article 646*

Howden AJM and Huitema E (2012). Effector-triggered post-translational modifications and their role in suppression of plant immunity. *Front. Plant Sci. 3:160. doi:10.3389/fpls.2012.00160*

Huber AH, Nelson WJ, Weis WI (1997). Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell 90, 871–882*

Ikeda F, and Dikic I (2008). Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. '*Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects 'review series. EMBO Rep. 9, 536–542*

Ikonomov OC, Sbrissa D, Shisheva A (2006). Localized PtdIns 3,5-P2 synthesis to regulate early endosome dynamics and fusion. *American Journal of Physiology-Cell Physiology 2006 291:2, C393-C404 https://doi.org/10.1152/ajpcell.00019.2006*

Inês CR Barbosa, Hiromasa Shikata, Melina Zourelidou, Mareike Heilmann, Ingo Heilmann and Claus Schwechheimer (2016). Phospholipid composition and a polybasic motif determine D6 PROTEIN KINASE polar association with the plasma membrane and tropic responses. *Development 143, 4687-4700 doi:10.1242/dev.137117*

Isono E, Katsiarimpa A, Muller IK, Anzenberger F, Stierhof YD, Geldner N, Chory J, Schwechheimer C (2010). The deubiquitinating enzyme AMSH3 is required for intracellular trafficking and vacuole biogenesis in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell 22, 1826–1837*

Jaillais Y, Hothorn M, Belkhadir Y, Dabi T, Nimchuk ZL, Meyerowitz EM, Chory J (2011). Tyrosine phosphorylation controls brassinosteroid receptor activation by triggering membrane release of its kinase inhibitor. *Genes Dev.* 25, 232-237. https://doi.org/10.1007/s00232-022-00233-1

James P, Halladay J, Craig EA (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144, 1425–1436

Jia T, Gao C, Cui Y, Wang J, Ding Y, Cai Y, Ueda T, Nakano A, Jiang L (2013). ARA7(Q69L) expression in transgenic Arabidopsis cells induces the formation of enlarged multivesicular bodies. *Journal of Experimental Botany, Vol. 64, No. 10, pp. 2817–2829, 2013 doi:10.1093/jxb/ert125*

Jiang D, He Y, Zhou Y, Cao Z, Pang L, Zhong S, Jiang L, Li R (2022). Arabidopsis HOPS subunit VPS41 carries out plant-specific roles in vacuolar transport and vegetative growth. *Plant Physiology, Volume 189, Issue 3, July 2022, Pages 1416–1434, https://doi.org/10.1093/plphys/kiac167*

Joardar A, Pattnaik GP, Chakraborty H (2022). Mechanism of Membrane Fusion: Interplay of Lipid and Peptide. *The Journal of Membrane Biology (2022) 255:211-224*

Jones JD, and Dangl JL (2006). The plant immune system. Nature 444, 323–329

Jung C, Zhai P, Seo JS, Mitsuda N, Deng S, Chua NH (2015). PLANT U-BOX PROTEIN10 regulates MYC2 stability in Arabidopsis. *Plant Cell 2015, 27, 2016–2031*

Jung JH, Barbosa AD, Hutin S, Kumita JR, Gao M, Derwort D, Silva CS, Lai X, Pierre E, Geng F, Kim SB, Baek S, Zubieta C, Jaeger KE, Wigge PA (2020). A prion-like domain in ELF3 functions as a thermosensor in Arabidopsis. Nature 585, 256–260 https://doi.org/10.1038/s41586-020-2644-7

Kanazawa T, Ueda T (2017). Exocytic trafficking pathways in plants: why and how they are redirected. *New Phytologist 215: 952–957*

Kang BH, Nielsen E, Preuss ML, Mastronarde D, Staehelin LA (2011). Electron tomography of RabA4b- and PI-4Kβ1-labeled trans Golgi network compartments in Arabidopsis. *Traffic. 2011 Mar;12(3):313-29. doi: 10.1111/j.1600-0854.2010.01146.x.*

Kasai K, Takano J, Miwa K, Toyoda A, Fujiwara T (2011). High boron-induced ubiquitination regulates vacuolar sorting of the BOR1 borate transporter in Arabidopsis thaliana. *J. Biol.Chem. 286, 6175–6183.*

Kaur S, Samota MK, Choudhary M, Chooudhary M, Pandey AK, Sharma A, Thakur J (2022). How do plants defend themselves against pathogens-Biochemical mechanisms and genetic interventions. *Physiol Mol Biol Plants 28(2):485–504 https://doi.org/10.1007/s12298-022-*01146-y

Klausner RD, Donaldson JG, Lippincott-Schwartz J (1992). Brefeldin A: Insights into the Control of Membrane Traffic and Organelle Structure. *J Cell Biol.* 1992 Mar 1; 116(5): 1071–1080.doi: 10.1083/jcb.116.5.1071

Klumpp LM, Mackey AT, Farrell CM, Rosenberg Jm, Gilbert SP (2003). Kinesin Switch I Arginine to Lysine Mutation Rescues Microtubule Function. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 278, No. 40, pp. 39059–39067 DOI 10.1074/jbc.M304250200*

Knop J, Lienemann T, El-Kilani H, Falke S, Krings C, Sindalovskaya M, Bergler J, Betzel C, Hoth S (2021). Structural Features of a Full-Length Ubiquitin Ligase Responsible for theFormation of Patches at the Plasma Membrane. *Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 9455. https://doi.org/10.3390/ijms22179455*

Konopka CA, Schleede JB, Skop AR, Bednarek SY (2006). Dynamin and cytokinesis. *Traffic 7: 239–247*

Konrad SS, Popp C, Stratil TF, Jarsch IK, Thallmair V, Folgmann J, Marin M, Ott T (2014). S-acylation anchors remorin proteins to the plasma membrane but does not primarily determine their localization in membrane microdomains. *New Phytol.* 203:758–769

Kooijman EE, Chupin V, de Kruijff B, Burger KN (2003). Modulation of membrane curvature by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Traffic 4, 162–174*

Krawczyk HE, Sun S, Doner NM, Yan Q, Lim MSS, Scholz P, Niemeyer PW, Schmitt K, Valerius O, Pleskot R, Hillmer S, Braus GH, Wiermer M, Mullen RT, Ischebeck T (2022). SEED LIPID DROPLET PROTEIN1, SEED LIPID DROPLET PROTEIN2, and LIPID DROPLET PLASMA MEMBRANE ADAPTOR mediate lipid droplet–plasma membrane tethering. *THE PLANT CELL 2022: 00:* 1–25 https://doi.org/10.1093/plcell/koac095

Kubicek CP, Starr TL and Glass NL (2014). Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52, 427–451. doi: 10.1146/annurev-phyto-102313-045831

Kwon HK, Yokoyama R, Nishitani K (2005). A Proteomic Approach to Apoplastic Proteins Involved in Cell Wall Regeneration in Protoplasts of Arabidopsis Suspension-cultured Cells. *Plant Cell Physiol.* 46(6): 843–857 doi:10.1093/pcp/pci089 Kwon C, Neu C, Pajonk S, Yun HS, Lipka U, Humphry M, Bau S, Straus M, Kwaaitaal M, Rampelt H, El Kasmi F, Jürgens G, Parker J, Panstruga R, Lipka V, Schulze-Lefert P (2008). Cooption of a default secretory pathway for plant immune responses. *Nature. 2008 Feb* 14;451(7180):835-40. doi: 10.1038/nature06545

Kulikov R, Boehme KA, Blattner C (2005). Glycogen synthase kinase 3-dependent phosphorylation of Mdm2 regulates p53 abundance. *Mol. Cell. Biol. 25, 7170*

Kusick GF, Ogunmowo TH, S Watanabe (2022). Transient docking of synaptic vesicles: Implications and mechanisms. *Current Opinion in Neurobiology Volume 74, https://doi.org/10.1016/j.conb.2022.102535*

Lang J, Genot B, Begeard J, Colcombet J (2022). MPK3 and MPK6 control salicylic acid signaling by up-regulating NLR receptors during pattern- and effector-triggered immunity. *Journal of Experimental Botany, Volume 73, Issue 7, 5 April 2022, Pages 2190–2205, https://doi.org/10.1093/jxb/erab544*

Lam SK, Siu CL, Hillmer S, Jang S, An G, Robinson DG, Jiang L (2007). Rice SCAMP1 defines clathrin-coated, trans-Golgi-located tubular-vesicular structures as an early endosome in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell. 2007;19: 296–319*

Leckband D (2000). Measuring The Forces That Control Protein Interactions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 2000. 29:1–26. https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.29.1.1*

Lee H, Xiong L, Gong Z, Ishitani M, Stevenson B, Zhu JK (2001). The Arabidopsis HOS1 gene negatively regulates cold signal transduction and encodes a RING finger protein that displays cold-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning. *Genes Dev* 15: 912–924

Lee HY, Bowen CH, Popescu GV, Kang HG, Kato N, Ma S, Dinesh-Kumar S, Snyder M, Popescu SC (2011). Arabidopsis RTNLB1 and RTNLB2 reticulon-like proteins regulate intracellular trafficking and activity of the FLS2 immune receptor. *Plant Cell 23: 3374–3391*

Lee IH, Lee IC, Kim J, Kim JH, Chung EH, Kim HJ, Park SJ, Kim YM, Kang SK, Namb HG, Woo HR, Lim PK (2016). NORE1/SAUL1 integrates temperature-dependent defense programs involving SGT1b and PAD4 pathways and leaf senescence in Arabidopsis. *Physiologia Plantarum 158: 180–199. doi:10.1111/ppl.12434*

Leikin S, Kozlov MM Fuller NL, Rand RP (1996). Measured effects of diacylglycerol on structural and elastic properties of phospholipid membranes. *Biophys J. 1996 Nov; 71(5): 2623–2632. doi: 10.1016/S0006-3495(96)79454-7*

Leventis PA and Grinstein Sergio (2010). The Distribution and Function of Phosphatidylserine in Cellular Membranes. *Annual Reviews 2010 Vol. 39:407-427 https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.093008.131234*

Li G and Xue HW (2007). Arabidopsis PLDζ2 regulates vesicle trafficking and is required for auxin response. *Plant Cell* 19:281–295

Li Y, Gou M, Sun Q, Hua J (2010). Requirement of Calcium Binding, Myristoylation, and Protein-Protein Interaction for the Copine BON1 Function in Arabidopsis. Journal of Biological Chemistry. Vol. 285 Issue 39 https://doi.org/10.1074/jbc.M109.066100

Li R, Liu P, Wan Y, Chen T, Wang Q, Mettbach U, Baluska F, Samaj J, Fang X, Lucas WJ, Lin J (2012). A membrane microdomain-associated protein, Arabidopsis Flot1, is involved in a clathrin-independent endocytic pathway and is required for seedling development. *Plant Cell* 24: 2105–2122.

Li L, Li M, Yu L, Zhou Z, Liang X, Liu Z, Cai G, Gao L, Zhang X, Wang Y, Chen S, Zhou JM (2014). The FLS2- associated kinase BIK1 directly phosphorylates the NADPH oxidase RbohD to control plant immunity. *Cell Host Microbe 15, 329–338. doi: 10.1016/j.chom.2014.02. 009*

Li Q, Zhou M, Chhajed S, Yu F, Chen S, Zhan Y, Mou Z (2023). N-hydroxypipecolic acid triggers systemic acquired resistance through extracellular NAD(P). *Nat Commun 14, 6848 (2023). https://doi.org/10.1038/s41467-023-42629-0*

(a)Liang Z, Jingjing X, Jinxing L (2019). At the intersection of exocytosis and endocytosis in plants. *New Phytologist (2019) 224: 1479–1489 doi: 10.1111/nph.16018*

(b)Liang W, van Wersch S, Tong M, Li X (2019). TIR-NB-LRR immune receptor SOC3 pairs with truncated TIR-NB protein CHS1 or TN2 to monitor the homeostasis of E3 ligase SAUL1. *New Phytol. 2019, 221, 2054–2066.*

Liao D, Cao Y, Sun X, Espinoza C, Nguyen CT, Liang Y, Stacey G (2017). Arabidopsis E3 ubiquitin ligase PLANT U-BOX13 (PUB13) regulates chitin receptor LYSIN MOTIF RECEPTOR KINASE5 (LYK5) protein abundance. *New Phytol. 2017, 214, 1646–1656*

Liao YC, Fernandopulle MS, Wang GZ, Choi H, Hao L, Drerup CM, Patel R, Qamar S, Nixon-Abell J, Shen Y, Meadow W, Vendruscolo M, Knowles TPJ, Nelson M, Czekalska MA, Musteikyte G, Gachechiladze MA, Stephen CA, Pasolli MA, Forresst LR, Michael EW (2019). RNA granules hitchhike on lysosomes for long-distance transport, using annexin A11 as a molecular tether. *Cell 179, 147–164.e20*

Lim GH, Liu H, Yu K, Liu R, Shine MB, Fernandez J, Burch-Smith T, Mobley JK, McLetchi N, Kachroo A, Kachroo P (2020). The plant cuticle regulates apoplastic transport of salicylic acid during systemic acquired resistance. *Sci. Adv. 6:eaaz0478*

Lindeberg M, Cunnac S, Collmer A (2012). Pseudomonas syringae type III effector repertoires: last words in endless arguments. *Trend in Microbiology Vol 20 No 4 199-208*

Liu J, Elmore JM, Fuglsang AT, Palmgren MG, Staskawicz BJ, Coaker G (2009). RIN4 functions with plasma membrane H⁺-ATPases to regulate stomatal apertures during pathogen attack. *PLoS Biol. 7:e1000139. Published online*

Liu X, Zhou Y, Du M, Liang X, Fan F, Huang G, Zou Y, Bai J, Lu D (2022). The calcium-dependent protein kinase CPK28 is targeted by the ubiquitin ligases ATL31 and ATL6 for proteasomemediated degradation to fine-tune immune signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell, Volume 34, Issue 1, January 2022, Pages 679–697, https://doi.org/10.1093/plcell/koab242*

Liu N, Jiang X, Zjonh G, Wang W, Hake K, Matschi S, Lederer S, Hoehenwarter W, Sun Q, Lee J, Romeis T, Tang D (2024). CAMTA3 repressor destabilization triggers TIR domain protein TN2-mediated autoimmunity in the Arabidopsis exo70B1 mutant. *The Plant Cell, Volume 36, Issue 5, May 2024, Pages 2021–2040, https://doi.org/10.1093/plcell/koae036*

Lu D, Lin W, Gao X, Wu S, Cheng C, Avila J, Heese A, Devarenne TP, He P, Shan L (2011). Direct ubiquitination of pattern recognition Receptor FLS2 attenuates plant innate immunity. *Science* 332, 1439–1442

Luo C, Shi Y, Xiyan Y (2022). SNAREs Regulate Vesicle Trafficking During Root Growth and Development. *Front. Plant Sci., 14 March 2022, https://doi.org/10.3389/fpls.2022.853251*

Lv X, Jing Y, Xiao J, Zhang Y, Zhu Y, Julian R, Lin J (2017). Membrane microdomains and the cytoskeleton constrain AtHIR1 dynamics and facilitate the formation of an AtHIR1-associated immune complex. *Plant J 90:3–16*

Lyon AS, Peeples WB, Rosen MK (2021). A framework for understanding the functions of biomolecular condensates across scales. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 22, 215–235 (2021). https://doi.org/10.1038/s41580-020-00303-z*

MacDonald C, Buchkovich NJ, Stringer DK, Emr SD, Piper RC (2012). Cargo ubiquitination is essential for multivesicular body intralumenal vesicle formation. *EMBO Rep.* 13:331–338. http://dx.doi.org/10.1038/embor.2012.18

Macho AP und Zipfel C (2015). Targeting of plant pattern recognition receptor-triggered immunity by bacterial type-III secretion system effectors. *Curr. Opin. in Microbiol. Volume 23, February 2015, Pages 14-22*

Grison MS, Brocard L, Fouillen L, Nicolas W, Wewer V, Dörmann P, Nacir H, Benitez-Alfonso Y, Claverol S, Germain V, Boutté Y, Mongrand S, Bayer EM (2015). Specific Membrane Lipid Composition Is Important for Plasmodesmata Function in Arabidopsis. *The Plant Cell, Volume 27, Issue 4, Pages 1228–1250, https://doi.org/10.1105/tpc.114.135731*

Martens S and McMahon HT (2008). Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *nature reviews: molecular cell biology Volume 9 543-556*

Martin GB, Bogdanove AJ, Sessa G (2003). Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54:23–61

Martin TF (2015). PI(4,5)P2-binding effector proteins for vesicle exocytosis. *Biochimica et Biophysica Acta 1851: 785–793*

Maule A, Faulkner C and Benitez-Alfonso Y (2012). Plasmodesmata "in communicado". *frontiers in plant science Volume3 Article30 doi: 10.3389/fpls.2012.00030*

Mbengue M, Bourdais G, Gervasi F, Beck M, Zhou J, Spallek T, Bartels S, Boller T, Ueda T, Kuhn H, Robatzek S (2016). Clathrin-dependent endocytosis is required for immunity mediated by pattern recognition receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 113: 11034–11039*

McKenna JF, Tolmie AF, Runions J (2014). Across the great divide: the plant cell surface continuum. *Curr. Opin. Plant Biol.* 22:132–140

Mehrshahi P, Stefano G, Andaloro JM, Brandizzi F, Froehlich JE, DellaPenna D (2013). Transorganellar complementation redefines the biochemical continuity of chloroplasts. PNAS 110 (29) 12126-12131 endoplasmic reticulum and https://doi.org/10.1073/pnas.1306331110

Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell 126:969-980*

Meredith D (2004). Site-directed Mutation of Arginine 282 to Glutamate Uncouples the Movement of Peptides and Protons by the Rabbit Proton-peptide Cotransporter PepT1. *J Biol Chem. 2004 Apr 16;279(16):15795-8. doi: 10.1074/jbc.M313922200*

Milovanovic D, Wu Y, Bian X, De Camilli P (2018). A liquid phase of synapsin and lipid vesicles. *Science 361, 604–607*

Min MK, Kim SJ, Miao Y, Shin J, Jiang L, Hwang I (2007). Overexpression of Arabidopsis AGD7 causes relocation of Golgi-localized proteins to the endoplasmic reticulum and inhibits protein trafficking in plant cells. *Plant. Physiol.* 143:1601–1614

Min MK, Jang M, Lee M, Lee J, Song K, Lee Y, Choi KY, Robinson DG, Hwang I (2013). Recruitment of Arf1-GDP to Golgi by Glo3p-type ArfGAPs is crucial for golgi maintenance and plant growth. *Plant. Physiol.* 161:676–691

Mims CW, Richardson EA, Holt BF III, Dangl JL (2004). Ultrastructure of the host-pathogen interface in Arabidopsis thaliana leaves infected by the downy mildew Hyaloperonospora parasitica. *Can. J. Bot. 82:1001–8*

Mondal S und Baumgart T (2023). Membrane reshaping by protein condensates. *Biochimica* et *Biophysica Acta* (*BBA*) – *Biomembranes Volume* 1865, *Issue* 3, *March* 2023, 184121 https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2023.184121

Mongrand S, Morel J, Laroche J, Claverol S, Carde JP, Hartmann MA, Bonneu M, Simon-Plas F, Lessire R, Bessoule JJ (2004). Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 279:36277–36286

Montillet JL and Hirt H (2013). New checkpoints in stomatal defense. *Trends in Plant Science* 18: 295–297

Mudgil Y, Shiu SH, Stone SL, Salt JN, Goring DR (2004). A large complement of the predicted Arabidopsis ARM repeat proteins are members of the U-box E3 ubiquitin ligase family. *Plant Physiology 134, 59–66*

Narusaka M, Shirasu K, Noutoshi Y, Kubo Y, Shiraishi T, Iwabuchi M, Narusaka Y (2009). RRS1 and RPS4 provide a dual Resistance-gene system against fungal and bacterial pathogens. *The Plant Journal 60: 218–226*

Návarová H, Bernsdorff F, Döring AC, Zeier J (2012). Pipecolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity. *Plant Cell* 24:5123-5141

Nicoll RA, Tomita S, Bredt DS (2006). Auxiliary Subunits Assist AMPA-Type Glutamate Receptors. *Science Vol. 311, No. 765 1253–1256 DOI: 10.1126/science.1123339*

Nielsen ME and Thordal-Christensen H (2013). Transcytosis shuts the door for an unwanted guest. *Trends in Plant Science 18: 611–616*

Nimchuk Z, Eulgem T, Holt BE, Dangl JL (2003). Recognition and response in the plant immune system. *Annu. Rev. Genet.* 37:579–609

Nomura K, Debroy S, Lee YH, Pumplin N, Jones J, He SY (2006). A bacterial virulence protein suppresses host innate immunity to cause plant disease. *Science 313: 220–223*

Ntoukakis V, Mucyn TS, Gimenez-Ibanez S, Chapman HC, Gutierrez JR, Balmuth AL, Jones AME, Rathjen JP (2009). Host Inhibition of a Bacterial Virulence Effector Triggers Immunity to Infection. *Science 324 (5928), 784-787. DOI: 10.1126/science.1169430*

Osterrieder A, Sparkes IA, Botchway SW, Ward A, Ketelaar T, De Ruijter NCA, Hawes C (2017). Stacks off tracks: a role for the golgin AtCASP in plant endoplasmic reticulum–Golgi apparatus tethering. *J Exp Biol 2017, 68:3339-3350 https://doi.org/10.1101/115840*

Ohno H, Stewart J, Fournier MC, Bosshart H, Rhee I, Miyatak, S, Saito T, Gallusser A, Kirchhausen T, Bonifacino, JS (1995). Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin associated proteins. *Science 269: 1872–1875*

Paez Valencia J, Goodman K, Otegui MS (2016). Endocytosis and endosomal trafficking in plants. *Annu. Rev. Plant Biol. 67: 309–335*

Pang L, Ma Z, Zhang X, Huang Y, Li R, Miao Y, Li R (2022). The small GTPase RABA2a recruits SNARE proteins to regulate the secretory pathway in parallel with the exocyst complex in Arabidopsis. *Mol. Plant Volume 15, ISSUE 3, P398-418, https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.11.008*

Parlati F, McNew JA, Fukuda R, Miller R, Sollner TH, Rothman JE (2000). Topological restriction of SNARE-dependent membrane fusion. *Nature 407: 194–198*

Patel A, Lee HO, Jawerth L, Maharana S, Jahnel M, Hein MY, Stoynov S, Mahamid J, Saha S, Franzmann TM, Pozniakovski A, Poser I, Maghellli N, Royer LA, Weigert M, Myers EW, Grill S, Drechsel D, Hyman AA, Alberti S (2015). A Liquid-to-Solid Phase Transition of the ALS Protein FUS Accelerated by Disease Mutation. *Cell* 162, 1066–1077 https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.047

Peskett TR, Rau F, O'Driscoll J, Patani R, Lowe AR, Saibil HR (2018). A Liquid to Solid Phase Transition Underlying Pathological Huntingtin Exon1 Aggregation. *Molecular Cell 70, 588–601 https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.04.007*

Petra J, Michaela N, Tetiana K, Olga V, Martin J (2021). Regulation of the microsomal proteome by salicylic acid and deficiency of phosphatidylinositol-4-kinases β1 and β2 in Arabidopsis thaliana. *Proteomics, 21, e2000223. https://doi.org/10.1002/pmic.202000223*

Pfitzner AK, Mercier V, Jiang X, Moser von Filseck J, Baum B, Šarić A, Roux A (2020). An ESCRT-III polymerization sequence drives membrane deformation and fission. *Cell.* 2020;182:1140–55.e1118

Pieterse CMJ, Dicke M (2007). Plant interactions with microbes and insects: from molecular mechanisms to ecology. *Trends Plant Sci.* 12:564–69

Piquerez SJM, Harvey SE, Beynon JL, Ntoukakis V (2014). Improving crop disease resistance: lessons from research on Arabidopsis and tomato. *Frontiers in Plant Science Volume 5 Article* 671

Platre MP, Noack LC, Doumane M, Bayle V, Simon MLA, Maneta-Peyret L, Fouillen L, Stanislas T, Armengot L, Pejchar P, CAillaud MC, Potocký, Čopič A, Moreau P, Jaillais Y (2018). A combinatorial lipid code shapes the electrostatic landscape of plant endomembranes. *Developmental Cell* 45: 465–480

Podgórska A, Burian M, Szal B (2017). Extra-cellular but extra-ordinarily important for cells: apoplastic reactive oxygen species metabolism. *Front. Plant Sci. 8:1353. doi:* 10.3389/fpls.2017.01353

Podinovskaia M and Spang A (2021). The Endosomal Network: Mediators and Regulators of Endosome Maturation. In: Lamaze, C., Prior, I. (eds) Endocytosis and Signaling. Progress in Molecular and Subcellular Biology, vol 57. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-96704-2_1

Podinovskaia M, Prescianott-Baschong C, Buser DP, Spang A (2021). A novel live-cell imaging assay reveals regulation of endosome maturation. *eLife 10:e70982. https://doi.org/10.7554/eLife.70982*

Prinz WA, Toulmay A, Balla T (2020). The functional universe of membrane contact sites. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21: 7–24

Pruneda JN, Littlefield PJ, Soss SE, Nordquist KA, Chazin WJ, Brzovic PS, Klevit RE (2012). Structure of an E3:E2~Ub complex reveals an allosteric mechanism shared among RING/U-box ligases. *Mol. Cell 2012, 47, 933–942*

Qi Y, Tsuda K, Nguyen le V, Wang X, Lin J, Murphy AS, Katagiri F (2011). Physical association of Arabidopsis hypersensitive induced reaction proteins (HIRs) with the immune receptor RPS2. *Journal of Biological Chemistry, 286(36), 31297–31307. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.211615*

Qu W, Moorhouse AJ, Chandra M, Pierce KD, Lewis TM, Barry PH (2006). A single P-loop glutamate point mutation to either lysine or arginine switches the cation-anion selectivity of the CNGA2 channel. *J Gen Physiol. 375-89. doi: 10.1085/jgp.200509378*

Raab S, Drechsel G, Zarepour M, Hartung W, Koshiba T, Bittner F, Hoth S (2009). Identification of a novel E3 ubiquitin ligase that is required for suppression of premature senescence in Arabidopsis. *Plant J.* 59:39-51

Regente M, Pinedo M, San Clemente H, Balliau T, Jamet E, de la Canal L (2017). Plant extracellular vesicles are incorporated by a fungal pathogen and inhibit its growth. *Journal of Experimental Botany, Vol. 68, No. 20 pp. 5485–5496 doi:10.1093/jxb/erx355*

Reynolds ES (1963). The Use of Lead Citrate at a High pH as an Electron Opaque Stain in Electron Microscopy. *Journal of Cell Biology, 17, 208-212*

Reyes-Turcu FE, Ventii KH Wilkinson KD (2009). Regulation and cellular roles of ubiquitinspecific deubiquitinating enzymes. *Annu. Rev. of Biochemistry 78: 363–397*

Rinne PL, Welling A, Vahala J, Ripel L, Ruonala R, Kangasjarvi J, van der Schoot C (2011). Chilling of dormant buds hyper induces FLOWERING LOCUS T and recruits GA-inducible 1,3beta-glucanases to reopen signal conduits and release dormancy in Populus. *Plant Cell* 23:130–146. doi:10.1105/tpc.110.081307

Rizzo MA, Shome K, Watkins SC, Romero G (2000). The recruitment of Raf-1 to membranes is mediated by direct interaction with phosphatidic acid and is independent of association with Ras. *J. Biol. Chem.* 275:2391–2398

Robatzek S (2006). Vesicle trafficking in plant immune responses. *Cellular Microbiology (2007) 9(1), 1–8 doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00829.x*

Robatzek S, Chinchilla D, Boller T (2006). Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in Arabidopsis. *Genes Dev. 20, 537–542*

Roovers EF, Kaaij LJT, Redl S, Bronkhorst AW, Wiebrands K, de Jesus Domingues AM, Huang HY, Han CT, Riemer S, Dosch R, Salvenmoser W, Grün D, Butter F, van Oudenaarden A, Keeing RF (2018). Tdrd6a Regulates the Aggregation of Buc into Functional Subcellular Compartments that Drive Germ Cell Specification. *Developmental Cell Volume 46, ISSUE 3, P285-301.e9, https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.07.009*

Rossini M, Pizzo P, Filadi R (2020). Better to keep in touch: investigating inter-organelle cross-talk. *FEBS J. 288: 740–755*

Roth MG (2008). Molecular mechanisms of PLD function in membrane traffic. *Traffic 9,* 1233–1239

Rozelle AL, Machesky LM, Yamamoto M, Driessens MH, Insall RH, Roth MG, Luby-Phelps K, Marriott G, Hall A, Yin HL (2000). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3. *Curr. Biol.* 10, 311–320

Rui Y, Dinneny JR (2020). A wall with integrity: surveillance and maintenance of the plant cell wall under stress. *New Phytologist 225, 1428–1439*

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

Sato TK, Overduin M, Emr SD (2001). Location, location, location: membrane targeting directed by PX domains. *Science 294, 1881-1885 DOI:10.1126/science.1065763*

Schechter LM Vencato M, Jordan KL, Schneider SE, Schneider DJ, Collmer A (2006). Multiple Approaches to a Complete Inventory of Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 Type III Secretion System Effector Proteins. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19, 1180

Scheuring D, Viotti C, Krüger F, Künzl F, Sturm S, Bubeck J, Hillmer S, Frigerio L, Robinson DG, Pimpl P, Schumacher K (2011). Multivesicular bodies mature from the trans-golgi network/early endosome in Arabidopsis. *Plant Cell 23, 3463–3481.doi:* 10.1105/tpc.111.086918

Schuh AL and Audhya A (2014). The ESCRT machinery: From the plasma membrane to endosomes and back again. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 49:242–261. *http://dx.doi.org/10.3109/10409238.2014.881777*

Scita G and Di Fiore PP (2010). The endocytic matrix. Nature 463, 464–473

Schulman BA and Harper JW (2009). Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 10: 319–331*

Sheen J (2001). Signal Transduction in Maize and Arabidopsis Mesophyll Protoplasts. *Plant Physiology, Volume 127, Issue 4, December 2001, Pages 1466–1475, https://doi.org/10.1104/pp.010820*

Shields A, Shivnauth V, Castroverde CDM (2022). Salicylic acid and N-hydroxypipecolic acid at the fulcrum of the plant immunity-growth equilibrium. *Front. Plant Sci.* 13:841688

Shine MB, Zhang K, Liu H, Lim GH, Xia F, Yu K, Hunt AG, Kachroo A, Kachroo P (2022). Phased small RNA–mediated systemic signaling in plants. *Sci. Adv. 8:eabm8791*

Sheard LB, Tan X, Mao H, Withers J, Ben-Nissan G, Hinds TR, Kobayashi Y, Hsu FF, Sharon M, Browse J, He SY. Rozp J, Howe GA, Zheng N (2010). Jasmonate perception by inositolphosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature 468: 400–405*

Sigismund S, Polo S, Di Fiore PP (2004). Signaling through monoubiquitination. *Curr. Topics in Microbioogy and Immunology 286, 149–185*

Simon MLA, Platre MP, Marquès-Bueno MM, Armengot L, Stanislas T, Bayle V, Caillaud MC, Jaillais Y (2016). A PtdIns(4)P-driven electrostatic field controls cell membrane identity and signalling in plants. *Nat. Plants 2, 16089*

Singh AK, Sharma V, Pal AK, Acharya V, Ahuja PS (2013). Genome-wide organization and expression profiling of the NAC transcription factor family in potato (Solanum tuberosum L.). *DNA Res. 20, 403–423.doi:10.1093/dnares/dst019*

Singh MK, Kruger F, Beckmann H, Brumm S, Vermeer JEM, Munnik T, Mayer U, Tierhof YD, Grefen C, Schumacher K, Jürgens G (2014). Protein delivery to vacuole requires SAND proteindependent Rab GTPase conversion for MVB-vacuole fusion. *Curr. Biol. 24, 1383–1389. doi:* 10.1016/j.cub.2014.05.005

Slusarenko AJ, Schlaich NL (2003). Downy mildew of Arabidopsis thaliana caused by Hyaloperonospora parasitica (formerly Peronospora parasitica). *Mol. Plant Pathol.* 4:159–70

Snead WT and Gladfelter AS (2019). The Control Centers of Biomolecular Phase Separation: How Membrane Surfaces, PTMs, and Active Processes Regulate Condensation. *Molecular Cell Volume 76, Issue 2, 17 October 2019, Pages 295-305 https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.016*

Souza CA, Li S, Lin AZ, Boutrot F, Grossmann G, Zipfel C, Somerville SC (2017). Cellulosederived oligomers act as damage-associated molecular patterns and trigger defense-like responses. *Plant Physiol.* 173, 2383–2398. doi: 10.1104/pp.16.01680

Spurr AR (1969). A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research 26, 31-43 https://doi.org/10.1016/S0022-5320(69)90033-1*

Stenmark H and Aasland R (1999). FYVE-finger proteins – effectors of an inositol lipid. *Journal of Cell Science 112, 4175-4183*

Strauß T, Schattner S, Hoth S, Walter WJ (2021). The Arabidopsis thaliana Kinesin-5 AtKRP125b Is a Processive, Microtubule-Sliding Motor Protein with Putative Plant-Specific Functions. *Int. J. Mol. Sci. 2021, 22(21), 11361; https://doi.org/10.3390/ijms222111361*

Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T (2006). Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat. Rev. Immunol. 6, 9*

Tang J, Han Z, Sun Y, Zhang H, Gong X, Chai J (2015). Structural basis for recognition of an endogenous peptide by the plant receptor kinase PEPR1. *Cell Res. 25: 110–120*

Tang AH, Chen H, Li TP, Metzbower SR, MacGillavry, Blanpied (2016). A trans-synaptic nanocolumn aligns neurotransmitter release to receptors. *Nature 536, 210–214 (2016). https://doi.org/10.1038/nature19058*

Tao K, Waletich, JR, Wise H, Arredondo F, Tyler BM (2019). Tethering of multi-vesicular bodies and the tonoplast to the plasma membrane in plants. *Front. Plant Sci. 2019, 10, 636*

Testerink C, Larsen PB, van der Does D, van Himbergen JA, Munnik T (2007). Phosphatidic acid binds to and inhibits the activity of Arabidopsis CTR1. *J. Exp. Bot.* 58:3905–3914

Tong M, Kotur T, Liang W, Vogelmann K, Kleine T, Leister D, Brieske C, Yang S, Lüdke D, Wiermer M, Zhang Y, Li X, Hoth, S (2017). E3 ligase SAUL1 serves as a positive regulator of PAMP-triggered immunity and its homeostasis is monitored by immune receptor SOC3. *New Phytol.* 2017, 215, 1516–1532.

Torrens-Spence MP, Bobokalonova A, Carballo V, Glinkerman CM, Pluskal T, Shen A, Weng JK (2019). PBS3 and EPS1 complete salicylic acid biosynthesis from isochorismate in Arabidopsis. *Mol. Plant 12:1577-1586*

Trempel F, Kajiura H, Ranf S, Grimmer J, Westphal L, Zipfel C, Scheel D, Fujiyama K, Lee J (2016). Altered glycosylation of exported proteins, including surface immune receptors, compromises calcium and downstream signaling responses to microbe-associated molecular patterns in Arabidopsis thaliana. *BMC Plant Biology 16:e31*

Trujillo M, Ichimura K, Casais C, Shirasu K (2008). Negative regulation of PAMP-triggered immunity by an E3 ubiquitin ligase triplet in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 18:1396-1401

Trujillo M (2018). News from the PUB: Plant U-box type E3 ubiquitin ligases. *J. Exp. Bot. 2018, 69, 371–384*

Uemura M, Joseph RA, Steponkus PL (1995). Cold Acclimation of Arabidopsis thaliana (effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions). *Plant Physiol. 109, 15–30.*

Uemura T, Ueda T (2014). Plant vacuolar trafficking driven by RAB and SNARE proteins. *Curr. Opin. Plant Biol. 22: 116–121*

Uemura T (2016). Physiological roles of plant post-Golgi transport pathways in membrane trafficking. *Plant Cell Physiol. 57: 2013–2019*

Ullah N, Maaiden EE, Uddin S, Ashraf G (2021). Synaptotagmin-1: A Multi-Functional Protein Mediates Vesicle Docking, Priming, that and Fusion. Current Protein and Peptide Science, Volume 22, Number 6, 2021, pp. 470-478(9), https://doi.org/10.2174/1389203722666210325110231

Underwood W (2016). Contributions of host cellular trafficking and organization to the outcomes of plant-pathogen interactions. *Semin. Cell Dev. Biol.* 56: 163–173

Üstün S, Sheikh A, Gimenez-Ibanez S, Jones A, Ntoukakis V, Börnke F (2016). The Proteasome Acts as a Hub for Plant Immunity and Is Targeted by Pseudomonas Type III Effectors. *Plant Physiology Vol. 172 1941-1958*

Urbanus, SL and Ott T (2012). Plasticity of plasma membrane compartmentalization during plant immune responses. *Front. Plant Sci. 3:181. doi:10.3389/ fpls.2012.00181*

Vatén A, Dettmer J, Wu S, Stierhof YD, Miyashima S, Yadav SR, Roberts CJ, Campilho A, Bulone V, Lichtenberger R, Lehesranta S, Mähönen AP,, Kim J-Y, Jokitalo E, Sauer N, Scheres B, Nakajima K, Carlsbecker A, Gallagher KL, Leariutta Y (2011). Callose biosynthesis regulates symplastic trafficking during root development. *Dev Cell 2011; 21:1144 - 55; http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2011.10.006*

Vierstra RD (2009). The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 385–397

Villegas JA, Heidenreich M, Levy ED (2022). Molecular and environmental determinants of biomolecular condensate formation. *Nat Chem Biol* 18, 1319–1329 *https://doi.org/10.1038/s41589-022-01175-4*

Viotti C, Bubeck J, Stierhof YD, Krebs M, Langhans M, van den Berg W, van Dongen W, Richter S, Geldner N, Takano J, Jürgens G, de Vries SC, Robinson DG, Karin Schumacher (2010). Endocytic and secretory traffic in Arabidopsis merge in the trans-Golgi network/early endosome, an independent and highly dynamic organelle. *Plant Cell 22: 1344–1357*

Vogelmann K, Drechsel G, Bergler J, Subert C, Philippar K, Soll J, Engelmann JC, Engelsdorf T, Voll LM, Hoth S (2012). Early senescence and cell death in Arabidopsis saul1 mutants involves the PAD4-dependent salicylic acid pathway. *Plant Phys.* 159:1477-1487

Vogelmann K, Subert C, Danzberger N, Drechsel G, Bergler J, Kotur T, Burmester T, Hoth S (2014). Plasma membrane-association of SAUL1-type plant U-box armadillo repeat proteins is conserved in land plants. *Front. Plant Sci. 5:37*

Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe (2003). Retracted: An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant Journal (2003) 33, 949–956*

Wang YX, Kauffmann EJ, Duex JE, Weismann LS (2001). Fusion of Docked Membranes Requires the Armadillo Repeat Protein Vac8p. *Journal of Biological Chemistry Vol. 276 Issue 37 https://doi.org/10.1074/jbc.M103937200*

Wang D, Weaver ND, Kesarwani M, Dong X (2005). Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance. *Science 308: 1036–1040*

Wang X, Devaiah SP, Zhang W, Welti R (2006). Signaling functions of phosphatidic acid. *Prog. Lipid. Res.* 45:250–278

Wang X, Su Y, Liu Y, Kim SC, Fanella B (2014). Phosphatidic Acid as Lipid Messenger and Growth Regulators in Plants. *Phospholipases in Plant Signaling, Signaling and Communication in Plants 20, DOI 10.1007/978-3-642-42011-5_4*

Wang L, Li H, Lv X, Chen T, Li R, Xue Y, Jiang J, Jin B, Baluska F, Samaj J, Wang X, Lin J (2015). Spatiotemporal dynamics of the BRI1 receptor and its regulation by membrane microdomains in living Arabidopsis cells. *Molecular Plant 8: 1334–1349*

Wang H, Zhuang X, Wang X, Law AH, Zhao T, Du S, Loy MM, Jiang L (2016). A distinct pathway for polar exocytosis in plant cell wall formation. *Plant Phys. 172: 1003–101*

Wang P, Zhang X, Ma X, Sun Y, Liu N, Li F, Hou Y (2017). Identification of CkSNAP33, a gene encoding synaptosomal-associated protein from Cynanchum komarovii, that enhances Arabidopsis resistance to Verticillium dahliae. *PLoS ONE 12: e0178101*

Wang J, Grubb LE, Wang J, Liang X, Li L, Gao C, Ma M, Feng F, Li M, Li L, Zhang X, Yo F, Xie Q, Chen S, Zipfel C, Monaghan J, Zhous JM (2018). A regulatory module controlling homeostasis of a plant immune kinase. *Mol. Cell 2018, 69, 493–504.*

Wang Q, Jiang M, Isupov MN, Chen Y, Littlechild JA, Sun L, Wu Y, Qang Q, Yang W, Chen L, Li Q, Wu Y (2020). The crystal structure of Arabidopsis BON1 provides insights into the copine protein family. *Plant J. 2020 Aug;103(3):1215-1232. doi: 10.1111/tpj.14797*

Wang W, Liu N, Gao C, Cai H, Romeis T, Tang D (2020). The Arabidopsis exocyst subunits EXO70B1 and EXO70B2 regulate FLS2 homeostasis at the plasma membrane. *New Phytologist* (2020) 227:529–544 doi: 10.1111/nph.16515

Wang W, Liu N, Gao C, Rui L, Jiang Q, Chen S, Zhang Q, Zhong G, Tang D (2021). The truncated TNL receptor TN2-mediated immune responses require ADR1 function. *The Plant Journal* (2021)108,672–689 doi: 10.1111/tpj.15463

Wang HY, Chan SH, Dey S, Castello-Serrano I, Rosen MK, Ditley JA, Levental KR, Levental I (2023). Coupling of protein condensates to ordered lipid domains determines functional membrane organization. *Science Advances 26 Apr 2023 Vol 9, Issue 17 doi:* 10.1126/sciadv.adf6205

Wang C and Luan S (2024). Calcium homeostasis and signaling in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology 2024, 77:102485 https://doi.org/10.1016/j.pbi.2023.102485*

Wangenheim von D, Rosero A, Komis G, Šamajová O, Ovečka M, Voigt B and Šamaj J (2016). Endosomal Interactions during Root Hair Growth. *Front. Plant Sci.* 6:1262. doi: 10.3389/fpls.2015.01262

Wick P, Gansel X, Oulevey C, Page V, Studer I, Durst M, Sticher L (2003). The expression of the t-SNARE AtSNAP33 is induced by pathogens and mechanical stimulation. *Plant Phys. 132:* 343–351.

Willems AR, Schwab M, Tyers M (2004). A hitchhiker's guide to the cullin ubiquitin ligases: SCF and its kin Biochim. *Biophys. Acta. 1695, 133*

Williams SJ, Sohn KH, Wan L, Bernoux M, Sarris PF, Segonzac C, Ve T, Ma Y, Saucet SB, Ericsson DJ, Casey Lw, Lonhienne T, Winzor DJ, Zhang X, Coerdt A, Parker JE, Dodds PN, Kobe B, Jones JDG (2014). Structural basis for assembly and function of a heterodimeric plant immune receptor. *Science* 344: 299–303

Wilton M, Subramaniam R, Elmore J, Felsensteiner C, Coaker G, Desveaux D (2010). The type III effector HopF2Pto targets Arabidopsis RIN4 protein to promote Pseudomonas syringae virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107:2349-2354

Witkos TM and Lowe M (2016). The Golgin Family of Coiled-Coil Tethering Proteins. Front. Cell Dev. Biol., 11 https://doi.org/10.3389/fcell.2015.00086

Woodruff JB, Gomes BF, Widlund PO, Mahamid J, Honigmann A, Hyman AA (2017). The Centrosome Is a Selective Condensate that Nucleates Microtubules by Concentrating Tubulin. *Cell 169, 1066–1077 https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.028*

Wu Y, Zhang D, Chu JY, Boyle P, Wang Y, Brindle ID, De Luca V, Després C (2012). The Arabidopsis NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylicacid. *Cell Rep.* 1:639-647

Wu LG, Hamid E, Shin W, Chiang HC (2014). Exocytosis and endocytosis: modes, functions, and coupling mechanisms. *Annual Review of Physiology 76: 301–331*

Wu G, Liu S, Zhao Y, Wang W, Kong Z, Tang D (2015). ENHANCED DISEASE RESISTANCE4 associates with CLATHRIN HEAVY CHAIN2 and modulates plant immunity by regulating relocation of EDR1 in Arabidopsis. *Plant Cell 27: 857–873*

Wu XD, Cai QX, Feng Z, Zhang MJ (2020). Liquid-liquid phase separation in neuronal development and synaptic signalling. *Dev. Cell 55, Issue 1 18-29*

Xie DX, Feys BF, James S, Nieto-Rostro M, Turner JG (1998). COI1: an Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science 280: 1091–1094*

Xu B, Cheval C, Laohavisit A, Hocking B, Chiasson D, Olsson TSG, Shirasu K, Faulkner C, Gilliham M (2017). A calmodulin-like protein regulates plasmodesmata closure during bacterial immune responses. *New Phytol.* 215:77–84. doi:10.1111/nph.14599

Yang C, Zhou W, Jeon MS, Demydenko D, Harada Y, Zhou H, Liu YC (2006). Negative regulation of the E3 ubiquitin ligase itch via Fyn-mediated tyrosine phosphorylation. *Mol. Cell* 21, 135

Yang DL, Shi Z, Bao Y, Yan J, Yang Z, Yu H, Li Y, Gou M, Wang S, Zou B, Xu D, Ma Z, Kim J, Hua J (2017). Calcium Pumps and Interacting BON1 Protein Modulate Calcium Signature, Stomatal Closure, and Plant Immunity. *Plant Physio., Volume 175, Issue 1, September 2017, Pages 424–437, https://doi.org/10.1104/pp.17.00495*

Yasuda S, Okada K, Saijo Y (2017). A look at plant immunity through the window of the multitasking coreceptor BAK1. *Curr. Opin. Plant Biol.* 38: 10–18

Ye Y and Rape M (2009). Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10: 755–764

Yoo SD, Cho YH, Sheen J (2007). Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc 2, 1565–1572 (2007). https://doi.org/10.1038/nprot.2007.199*

Yu X, Feng B, He P, Shan L (2017). From chaos to harmony: Responses and signaling upon microbial pattern recognition. *Annu. Rev. Phytopathol.* 55: 109–137

Yu M, Cui Y, Zhang X, Li R, Ling J (2020). Organization and dynamics of functional plant membrane microdomains. *Cellular and Molecular Life Sciences* (2020) 77:275–287 *https://doi.org/10.1007/s00018-019-03270-7*

Yuan P, Jauregui E, Du L, Tanaka K, Poovaiah B (2017). Calcium signatures and signaling events orchestrate plant-microbe interactions. *Curr. Opin. Plant Biol. 38, 173–183. doi:* 10.1016/j.pbi.2017.06.003

Zaharik ML, Gruenheid S, Perrin AJ, Finlay BB (2002). Delivery of dangerous goods: Type III secretion in enteric pathogens. *Int. J. Med. Microbiol. 291, 593 (2002)*

Zeier J (2013). New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways. *Plant Cell Environ.36:2085-2103*

Zeier J (2021). Metabolic regulation of systemic acquired resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 62:102050

Zhang W, Qin C, Zhao J, Wang X (2004). Phospholipase Dα1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:9508–9513*

Zhang J, Shao F, Li Y, Cui H, Chen L, Li H, Zou Y, Long C, Lan L, Chai J, Chen S, Tang X, Thou JM (2007). A Pseudomonas syringae effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host & Microbe 1, 175–185*

Zhang G, Wang Z, Du Z, Zhang H (2018). mTOR Regulates Phase Separation of PGL Granules to Modulate Their Autophagic Degradation. *Cell Volume 174, ISSUE 6, P1492-1506.e22 https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.006*

Zhao T, Rui L, Li Juan, Nishimura MT, Vogel JP, Liu N, Liu S, Zhao Y, Dang JI, Tang D (2015). A Truncated NLR Protein, TIR-NBS2, Is Required for Activated Defense Responses in the exo70B1 Mutant. *PLoS Genet.* 11(1):e1004945 doi:10.1371/journal.pgen.1004945

Zhao YG and Zhang H (2020). Phase Separation in Membrane Biology: The Interplay between Membrane-Bound Organelles and Membraneless Condensates. *Developmental Cell Volume 55, Issue 1, 12 October 2020, Pages 30-44 https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.06.033*

Zheng N, Schulman BA, Song L, Miller JJ, Jeffrey PD, Wang P, Chu C, Koepp DM, Elledge SJ, Pagano M, Conaway RC, Conaway JW, Harper JW, Pavletich NP (2002). Structure of the Cul1– Rbx1–Skp1–F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature 416, 703*

Zhou B. and Zeng, L. (2017). Conventional and unconventional ubiquitination in plant immunity. *Mol. Plant Pathol. 2017, 18, 1313–1330*

Ziv, C., Zhao, Z., Gao, Y. G., and Xia, Y. (2018). Multifunctional roles of plant cuticle during plant-pathogen interactions. *Front. Plant Sci. 9:1088. doi: 10.3389/fpls.2018.01088*

7. Anhang

	Anzahl	Protoplasten	Protoplasten	Relation
	Protoplasten	mit Membranflecken	ohne Membranflecken	mit zu ohne
GFP-SAUL1	4228	2556	1672	0,60 zu 0,40
GFP-SAUL1 _{R736A}	3054	89	2965	0,03 zu 0,97
GFP-SAUL1 _{R737A}	3514	1868	1646	0,53 zu 0,47
GFP-SAUL1 _{R775A}	3194	2205	989	0,69 zu 0,31
GFP-SAUL1 _{R736,737A}	3624	117	3507	0,03 zu 0,97
GFP-SAUL1 _{R736,775A}	3669	108	3561	0,03 zu 0,97
GFP-SAUL1 _{R737,775A}	3912	1438	2474	0,37 zu 0,63
GFP-SAUL1 _{R736,737,775A}	3659	51	3608	0,01 zu 0,99

 Tabelle 17. Membranfleckenbildung von GFP-SAUL1 Punktmutanten

Tabelle 18. Membranfleckenbildung von GFP-SAUL1_{R736K} und GFP-SAUL1_{R736E}

	Anzahl	Protoplasten	Protoplasten	Relation
	Protoplasten	mit Membranflecken	ohne Membranflecken	mit zu ohne
GFP-SAUL1	4228	2556	1672	0,60 zu 0,40
GFP-SAUL1 _{R736A}	3054	89	2965	0,03 zu 0,97
GFP-SAUL1 _{R736E}	4509	799	3710	0,18 zu 0,82
GFP-SAUL1 _{R775K}	4425	3086	1339	0,70 zu 0,30

	Anzahl	Protoplasten	Protoplasten	Relation
	Protoplasten	mit Membranflecken	ohne Membranflecken	mit zu ohne
Raumtemperatur	3614	1920	1694	0,53 zu 0,47
25 °C	6620	2939	3681	0,44 zu 0,56
Transfer 25 °C \rightarrow 18 °C	3087	1502	1585	0,49 zu 0,51
18 °C	3767	2212	1555	0,59 zu 0,41
15 °C	2859	1706	1153	0,60 zu 0,40

Tabelle 20. Membranfleckenbildung nach enzymatischen Verdau von Col-0 35S::YFP-SAUL1 über einenZeitraum von drei Tagen

	Anzahl	Protoplasten	Protoplasten	Relation
	Protoplasten	mit Membranflecken	ohne Membranflecken	mit zu ohne
Tag 1	2782	2300	482	0,83 zu 0,17
Tag 2	3542	2100	1442	0,60 zu 0,40
Tag 3	3121	1021	2100	0,33 zu 0,67

8. Danksagung

Endlich ist es geschafft und mit diesem letzten Kapitel meiner Dissertation möchte ich die Gelegenheit nutzen, all jenen zu danken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt zunächst Prof. Dr. Stefan Hoth, der mir seit meiner Bachelorarbeit die Möglichkeit gegeben hat, in seinem Labor zu forschen. Seine Unterstützung hat es mir ermöglicht, mich wissenschaftlih weiterzuentwickeln und viele Herausforderungen, inklusiver einer Pandemie, zu bewältigen. SAUL1 war dabei stets ein treuer, wenn auch nicht immer einfacher Begleiter, der uns oft durch seine überraschenden Eigenschaften zur Verzweiflung brachte.

Ein herzlicher Dank geht auch an Prof. Dr. Julia Kehr, die meinen Werdegang stets wohlwollend begleitet hat und sich, trotz SAUL1, bereit erklärt hat als Zweitgutachterin diese Arbeit zu lesen und zu bewerten. Ich bin außerdem dankbar für die vielen Möglichkeiten, mich in genetischen Praktika einzubringen und ihre Lehre aktiv unterstützen zu dürfen.

Besonders danke ich Prof. Vardis Ntoukakis, der mir in seinem Labor in Warwick es ermöglicht hat, die Hefe-2-Hybrid Experimente durchzuführen und während der Zeit viele Ideen mit auf den Weg gegeben hat. Ein großer Dank gilt auch Carola Schneider für ihre Unterstützung bei den TEM-Experimenten, die neue Einblicke in die Membranflecken und Vesikel ermöglichten.

Ohne die großartige Arbeitsgruppe und deren Grundpfeiler wäre ich nicht in der Lage gewesen im Labor zu überleben, geschweige diese Arbeit anzufertigen. Ein besonderer Dank geht an unsere technischen Assistentinnen Judith Mehrmann, Wenke Bahnsen, Wiebke Hellmeyer und Teresa Wulf. Ihre Unterstützung bei der Pflanzenanzucht, Mikroskopie oder der Aufrecherhaltung des Labors, war für meinen Werdegang und dieser Arbeit unersetzlich. Sie haben mich nicht nur fachlich, sondern auch menschlich begleitet, und mich dabei hin und wieder daran erinnert, dass mir so ein weißer Kittel gar nicht mal so schlecht steht und ich ihn gerne häufiger mal tragen kann.

Auch ohne meine Mitstreiterinnen Lisa Amelung, Julia Lohmann, Monique Liebers, Cloe de Luxán-Hernández, Mareike Jaeckel und Linn von Pein wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Wir haben viel Zeit im Labor und außerhalb davon verbracht und uns in allen Lebenslagen unterstützt. Ohne euch wäre die Pandemie eine viel größere Herausforderung gewesen, und die Zeit im Labor wäre nicht nur langweiliger, sondern auch weniger kulinarisch abwechslungsreich gewesen. Besonders unsere Freitage waren stets unterhaltsam und wissenschaftlich bereichernd - So manche "Schnappsidee" wurde verfolgt und führte zu Ergebnissen, die Abbildungen dieser Arbeit ihren Platz gefunden haben. Ebenso danke ich allen Studenten/innen, die mich begleitet haben und ich bei ihren ersten Schritten in der Wissenschaft begleiten durfte. Ihr habt über die Jahre viel beigetragen, wofür ich endlos dankbar bin.

Ein besonderer Dank gilt Hartwig Lüthen und Olaf Döring, die mich seit meinem Bachelor im pflanzenphysiologischen Praktikum begleitet haben. Sie haben mich sowohl wissenschaftlich als auch in der Lehre immer unterstützt, sodass ich heute mit Freude und Sicherheit den Studierenden die Grundlagen der Pflanzenphysiologie vermitteln kann und teilweise ihr Feuer für diesen Bereich der Biologie zu entfache.

Außerdem möchte ich mich bei Kristina Rosenzweig, Oliver Herzog, Kim Lühmann und Linda Wansig für ihre Unterstützungen, die inspirierenden wissenschaftlichen Diskussionen und die schöne gemeinsame Zeit bedanken. Ebenso danke ich Cornelia Heinze und Birgit Hadeler, die stet ein offenes Ohr und Zeit für jedes Anliegen hatten. Ihr beiden wart nicht nur immer für mich da, sondern habt uns auch Lea Schmidt als Verstärkung der technischen Assistenz beschert, die mich in meiner Arbeit unterstützt hat.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich auf meinem gesamten Weg begleitet haben. Ohne eure Unterstützung wäre mein Werdegang nicht möglich gewesen.

9. Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt zu haben.

Sofern im Zuge der Erstellung der vorliegenden Dissertationsschrift generative Künstliche Intelligenz (gKI) basierte elektronische Hilfsmittel verwendet wurden, versichere ich, dass meine eigene Leistung im Vordergrund stand und dass eine vollständige Dokumentation aller verwendeten Hilfsmittel gemäß der Guten wissenschaftlichen Praxis vorliegt. Ich trage die Verantwortung für eventuell durch die gKI generierte fehlerhafte oder verzerrte Inhalte, fehlerhafte Referenzen, Verstöße gegen das Datenschutz- und Urheberrecht oder Plagiate

Time Lin

Hamburg, den 20.09.2024

Tim Lienemann