

**Die Funktion der Gene *Suppressor of saul1-1 1*
und *SNOWY COTYLEDON4* in *Arabidopsis thaliana***

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
an der Fakultät für
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Tanja Kotur

aus Kassel

Hamburg, Mai 2016

1. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Hoth
2. Gutachter: Prof. Dr. Arp Schnittger

Tag der Disputation: 20. Juli 2016

Diese Arbeit entstand im Zeitraum von Oktober 2012 bis Mai 2016 am Biozentrum Klein Flottbek der Universität Hamburg in der Abteilung Molekulare Pflanzenphysiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Stefan Hoth.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Die Funktion der Chloroplasten und die Anpassung an hohe Lichtintensitäten....	1
1.1.1 Die Anpassung an hohe Lichtintensitäten	1
1.1.2 Die Chloroplastenbiogenese	3
1.1.3 Die <i>snowy cotyledon</i> Mutanten	6
1.2 Der Einfluss von biotischen Stressfaktoren auf Pflanzen	9
1.2.1 Die generelle Reaktion von Pflanzen auf Pathogenbefall.....	9
1.2.2 Die PAMP-vermittelte Immunantwort	10
1.2.3 Die Effektor-vermittelte Immunantwort	12
1.2.4 Ubiquitinierung von Proteinen in der pflanzlichen Immunabwehr.....	18
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit	22
2 Material und Methoden.....	23
2.1 Allgemeine Puffer und Medien	23
2.2 Organismen.....	24
2.2.1 Bakterien- und Hefestämme.....	24
2.2.2 <i>Arabidopsis thaliana</i>	25
2.3 Vektoren	26
2.4 Molekularbiologische Methoden	28
2.4.1 Molekularbiologische Standardmethoden	28
2.4.2 Anzucht von Bakterien	28
2.4.3 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien.....	29
2.4.4 Transformation von Bakterien	30

INHALTSVERZEICHNIS

2.4.5	Schnelle Isolierung genomischer DNA	31
2.4.6	Isolierung genomischer DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion	31
2.4.7	Isolierung von RNA mittels TriFast™	33
2.4.8	Herstellung von cDNA mittels Reverser Transkriptase	33
2.4.9	Polymerase-Ketten-Reaktion	34
2.4.10	Quantitative Echtzeit-PCR	35
2.4.11	Sequenzanalyse von DNA nach Sanger	36
2.4.12	Klonierungsstrategien	37
2.4.13	Herstellung relevanter Konstrukte	39
2.5	Proteinbiochemische Methoden	42
2.5.1	Isolierung von Gesamtprotein aus Tabak	42
2.5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	43
2.5.3	Immunoblot	43
2.6	Methoden zur Arbeit mit Pflanzenmaterial	44
2.6.1	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> und <i>Nicotiana benthamiana</i>	44
2.6.1	Sterile Anzucht von <i>A. thaliana</i> auf MS-Festmedium	46
2.6.2	Arbeit mit T-DNA Insertionslinien	46
2.6.3	Induktion des Phänotyps bei <i>saul1-1</i> Mutanten	46
2.6.4	Transformation von <i>A. thaliana</i>	46
2.6.5	Selektion transgener <i>Arabidopsis thaliana</i> -Pflanzen	47
2.6.6	Protoplastenisolierung und Transformation	47
2.6.7	Transiente Expression in <i>N. benthamiana</i>	49
2.7	Bildgebende Verfahren	50
2.7.1	Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie	50
2.7.2	Histochemischer Nachweis von β -Glucuronidase-Aktivität	51
2.7.3	Klärung von Samen nach Hoyer	51
2.8	Interaktionsstudien	52
2.8.1	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)	52

2.8.2	Hefe-Zwei-Hybrid System	53
2.9	Durchführung eines Suppressor Screens.....	55
2.9.1	Randomisierte Mutagenese mit Ethylmethansulfonat (EMS).....	55
2.9.2	Rückkreuzung der Suppressorlinien in den <i>saul1-1</i> Hintergrund	55
2.9.3	Bestimmung des Segregationsverhaltens der Suppressorlinien	56
2.9.4	Grobe Chromosomenkartierung (<i>genetic mapping</i>)	56
2.9.5	Komplementationsstudien.....	56
2.9.6	Kopplungsanalyse	57
2.9.7	Identifizierung eines Suppressor-Allels.....	57
2.10	Verwendete Software und Datenbanken.....	58
3	Ergebnisse	59
3.1	Untersuchung von <i>SNOWY CODYLEDON4 (SCO4)</i>	60
3.1.1	Charakterisierung der T-DNA Insertionsmutante <i>sco4-2</i>	60
3.1.2	Komplementation des <i>sco4-2</i> Phänotyps	63
3.1.3	Subzelluläre Lokalisierung von SCO4	73
3.2	Suppressor-Screen von <i>saul1-1</i> Mutanten	75
3.2.1	Identifizierung des <i>saul1-1</i> Suppressor-Allels.....	76
3.2.2	Charakterisierung von SUS1	90
4	Diskussion	106
4.1	Die Charakterisierung der <i>sco4-2</i> Mutante	106
4.1.1	Der embryonale Phänotyp der <i>sco4-2</i> Mutante.....	106
4.1.2	Der dosisabhängiger Blattphänotyp in komplementierten Pflanzen	109
4.1.3	Die Funktion von SCO4 in Entwicklungsprozessen	114
4.1.4	Die Lokalisierung von SCO4 in plastidären Strukturen	115
4.2	Die Identifizierung und Charakterisierung des Suppressors von <i>saul1-1</i>	117
4.2.1	Der Suppressor von <i>saul1-1</i> kodiert für ein TIR-NBS-LRR Protein.....	117
4.2.2	Die Charakterisierung von SUS1	122

INHALTSVERZEICHNIS

4.2.3 SAUL1 als positiver Regulator in der basalen Immunantwort.....	127
5 Zusammenfassung	130
6 Literaturverzeichnis	133
7 Anhang	154
Danksagung.....	183
Publikationsliste.....	185
Eidesstattliche Versicherung.....	186

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
% (w/v)	Gewicht/Volumen-Prozent
3-AT	3-Amino-1,2,4-triazol
A	Adenin
aa	<i>amino acid</i>
AD	Aktivierungsdomäne
ADP	Adenosin-di-phosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-tri-phosphat
BC	<i>back cross</i> ; Rückkreuzung
BD	Bindedomäne
BiFC	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaMV	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i>
CC	<i>Coil Coiled</i>
cDNA	codierende Desoxyribonukleinsäure
CDS	codierende DNA-Sequenz
CO ₂	Kohlendioxid
<i>Col-0</i>	Columbia-0
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMS	Ethylmethansulfonat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alii, et aliae</i> (und andere)
ETI	<i>effector-triggered immunity</i>
ETS	<i>effector-triggered susceptibility</i>
G	Guanin
g	Gramm
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
GFP	grün fluoreszierendes Protein

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

GUS	β-Glucuronidase
H ⁺	Proton
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HA	Hämagglutinin
HR	hypersensitive Reaktion
Hz	Hertz
ID	Identifikator (Kennung)
IR	<i>intron retention</i>
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
Ler	Landsberg <i>erecta</i>
LiAc	Lithiumacetat
LRR	<i>Leucine-rich repeats</i>
M	Molar; mol pro Liter
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
mL	Milliliter
mM	Millimolar; mmol pro Liter
MS	Murashige-Skoog
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NB-ARC	<i>nucleotide binding adaptor shared by Apaf1, resistance proteins and CED4</i>
ng	Nanogramm
NLR	<i>NOD-like receptor</i>
nm	Nanometer
nt	Nukleotid(e)
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PAMP	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PM	Plasmamembran
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
PTI	<i>PAMP-triggered immunity</i>
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RFP	rot fluoreszierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde(n)
SAUL1	SENESCENCE-ASSOCIATED E3 UBIQUITIN LIGASE1
SCO4	SNOWY COTYLEDON4
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
SSLP	<i>simple sequence length ploymorpsim</i>
SUSA1	Suppressor of <i>saul1-1</i> 1
SV	Spleißvariante
T	Thymin
T-DNA	transfer Desoxyribonukleinsäure
TIR	Toll/Interleukin1 Rezeptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
UTR	untranslatierte Region
V	Volt
WT	Wildtyp
Y2H	Hefe-Zwei-Hybrid System (<i>yeast two hybrid</i>)
YFP	gelb fluoreszierendes Protein
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base (without amino acids)</i>

1 Einleitung

Aufgrund ihrer sessilen Lebensweise haben Pflanzen spezifische Mechanismen entwickelt, um sich auf die ständig ändernden Einflüsse in ihrer Umgebung einstellen zu können. Dabei müssen sie ein Gleichgewicht zwischen der Minimierung des Schadens und dem Erhalt der Ressourcen für das Wachstum und die Reproduktion finden. Pflanzen sind ständigen Wetteränderungen mit Hitze- und Kälteperioden sowie wechselnden Lichtintensitäten ausgesetzt und müssen auf Trockenheit, hohe Salzkonzentrationen im Boden und Nährstoffmangel reagieren. Zusätzlich sind sie ständigen Angriffen von Pathogenen und Insekten ausgeliefert. Generell handelt es sich bei der Reaktion auf abiotische und biotische Stressfaktoren um ein komplexes zelluläres Signalnetzwerk, das der Pflanze ermöglicht, sich den wechselnden Umweltfaktoren in ihrem Lebensraum anzupassen (Übersicht: Atkinson und Urwin 2012).

In den folgenden Kapiteln werden einige Beispiele für Anpassungsmechanismen an abiotische und biotische Stressfaktoren in Pflanzen beschrieben. Im Vordergrund steht zunächst die Anpassung an hohe Lichtintensitäten, für welche die Chloroplastenfunktion und -biosynthese von zentraler Bedeutung ist. Der zweite Teil der Einleitung thematisiert die pflanzliche Pathogenabwehr und hier im Besonderen die molekularen Mechanismen der Immunantwort.

1.1 Die Funktion der Chloroplasten und die Anpassung an hohe Lichtintensitäten

1.1.1 Die Anpassung an hohe Lichtintensitäten

Pflanzen sind photoautotrophe Organismen und mit Hilfe von Wasser und Lichtenergie in der Lage in den Chloroplasten CO_2 zu fixieren und Zucker herzustellen. Bei der Photosynthese wird die Energie des Lichtes genutzt, um $\text{NADPH}+\text{H}^+$ als Reduktionsmittel für die Fixierung des

CO₂ bereitzustellen. Für diesen Prozess sind das Photosystem II (PSII) mit assoziierten Lichtsammelkomplexen (*light harvesting complex*, LHC), der Cytochrom b/f-Komplex und das Photosystem I (PSI) als integrale Membranproteinkomplexe von großer Bedeutung.

Für die Anpassung an niedrige oder an hohe Lichtbedingungen sind getrennte Mechanismen verantwortlich, um eine jeweils optimale Photosynthesefunktion zu gewährleisten (Bailey *et al.*, 2001). Aufgrund des hohen Schadens durch starke Lichtintensitäten ist die Anpassung an diese Bedingung sehr wichtig. Dabei hat die Pflanze mehrere Möglichkeiten auf temporäre Lichtunterschiede effizient zu reagieren.

Durch die verbundenen Pigmente der Lichtsammelkomplexe kommt es zu einer effizienten Absorption und Weiterleitung der Photonenenergie zum Reaktionszentrum des PSII. Bei hohen Lichtintensitäten kann es zu einer Übersättigung des Reaktionszentrums kommen. Diese sogenannte Photoinhibierung führt zu einer nachhaltigen Abnahme der Elektronentransportrate. Bei überschüssiger Energie geht das Chlorophyll des Reaktionszentrums in einen Tripletzustand über. Es entsteht reaktiver Singulett-Sauerstoff und benachbarte Pigmente und Aminosäuren werden durch Oxidation geschädigt. Zum Schutz vor der Photoinhibierung haben Pflanzen diverse Mechanismen entwickelt, um die überschüssige Energie zu reduzieren. Dabei spielt die Bewegung der Blätter und die Anzahl der Chloroplasten eine entscheidende Rolle (Übersicht: Ruban *et al.*, 2012). Auf molekularer Ebene wird zwischen der lang- und kurzfristigen Anpassung an hohe Lichtintensitäten unterschieden. Die langfristige Akklimatisierung ist ein Resultat der lichtabhängigen Regulation von Genen und Proteinen (Kloppstech 1997). Dieser Prozess hat allerdings eine limitierte photoprotektive Wirkung. Bei der kurzfristigen Reaktion auf hohe Lichtintensitäten wird über Kontrollmechanismen der Energietransfer überwacht. Bei einer Überproduktion von ATP kommt es zu einer Anreicherung von Protonen im Lumen. Dies hat eine Inhibierung der Redoxenzyme und somit eine verringerte Elektronentransportrate zur Folge. Zusätzlich wird die überschüssige Energie in Wärme abgeführt. Dieser Prozess wird als nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung (*Non Photochemical Quenching*, NPQ) bezeichnet. Dabei kommt es zu einer Umstrukturierung des PSII und des LHCII, gefolgt von einer Reorganisation des Elektronentransfers (Kargul und Barber

2008; Dietzel *et al.*, 2011). Diese Umstrukturierung wird u.a. durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert. An dieser Regulation sind die Kinase STN7 (Pesaresi *et al.*, 2009) und die Phosphatase PPH1/TAP38 (Pribil *et al.*, 2010; Shapiguzov *et al.*, 2010) beteiligt. Trotz dieser Schutzmechanismen kann es unter hohen Lichtintensitäten zur Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies kommen. Diese werden u.a. durch Carotinoide abgefangen (Cazzonelli *et al.*, 2009).

1.1.2 Die Chloroplastenbiogenese

Die Chloroplastenentwicklung ist der Grundstein für das photoautotrophe Leben von Pflanzen. Chloroplasten bestehen aus einer Thylakoidmembran, die in stapelartigen Strukturen angeordnet ist. Diese Struktur wird auch als Grana bezeichnet. In der Thylakoidmembran befinden sich die Proteinkomplexe der Photosynthese (Übersicht: Pribil *et al.*, 2014).

In Pflanzen unterscheidet man zwischen drei Arten von Plastiden, welche alle aus den Proplastiden hervorgehen. Leukoplasten gehören zu den farblosen Plastiden und übernehmen eine Speicherfunktion. Dazu zählen die Lipid-speichernden Elaioplasten, die Stärke-speichernden Amyloplasten und die Protein-speichernden Proteinoplasten. Eine weitere Gruppe der Plastiden bilden die Chromoplasten, die durch Carotinoide eine gelb bis orange Farbe haben. Diese untergliedern sich zusätzlich in die Gerontoplasten, welche für die Färbung der Blüten verantwortlich sind. Die dritte Gruppe bilden die grünen Chloroplasten, die durch die Photosynthese das photoautotrophe Leben ermöglichen (Übersicht: Pogson *et al.*, 2015).

Im Dunklen wird die Bildung von Etioplasten, einer Vorstufe der Chloroplasten, induziert. Sie entstehen aus Proplastiden und sind in der Lage sich durch Lichteinfluss zu Chloroplasten weiter zu entwickeln. Dabei zeichnen sie sich durch Prolamellarkörper (*prolamellar body*, PLB) aus, die als eine Vorstufe von Thylakoidmembranen angesehen werden können. Durch Lichteinfluss können sich diese Strukturen zu Thylakoiden mit den Proteinkomplexen des Photosyntheseapparates zusammensetzen (Pogson *et al.*, 2015).

1.1.2.1 Der Einfluss der Chloroplastenbiogenese auf die Embryoentwicklung

Die Chloroplastenentwicklung setzt eine intakte Kommunikation zwischen Chloroplasten und Zellkern voraus. Es sind rund 3000 Kern-codierte Proteine in Chloroplasten lokalisiert. In *Arabidopsis thaliana* findet die Chloroplastenbiogenese während der Embryoentwicklung ab dem globulären Stadium statt. Die photosynthetisch aktiven Chloroplasten de-differenzieren zu sogenannten Eoplasten, welche sich nach der Keimung erneut zu funktionsfähigen Plastiden entwickeln (Mansfield und Briarty 1991). Neben der Photosynthese sind Chloroplasten auch für weitere Stoffwechselprozesse in Embryonen von Bedeutung. Dabei spielt die Biosynthese von Fettsäuren, Aminosäuren und Vitaminen eine entscheidende Rolle. Durch die Bereitstellung von Zucker aus dem Endosperm können Fettsäuren synthetisiert werden. Das dadurch entstandene CO₂ wird durch den photosynthetischen Prozess erneut fixiert (Ruuska *et al.*, 2004). Somit werden metabolische Ausgangsstoffe und die benötigte Energie für die Keimung bereitgestellt.

Durch die Charakterisierung von rund 400 *EMB* (*EMBRYO DEFECTIVE*) Genen konnten ca. 30% Chloroplasten-lokalisierte Proteine identifiziert werden. Bei vielen *emb*-Mutanten ist eine gestörte Embryoentwicklung zwischen dem globulären und dem Herzstadium zu beobachten (Meinke *et al.*, 2008; Bryant *et al.*, 2011). Die mit einem embryolethalen Phänotyp assoziierten Gene lassen sich in drei Gruppen von Chloroplasten-lokalisierten Proteinen unterteilen. Ein Typ von Proteinen ist für den Import, die Modifikation und die Lokalisierung von Proteinen verantwortlich. Dazu zählen u.a. Hitzeschockproteine (HSP), die als Chaperone die Faltung von Proteinen unterstützen. Beispielsweise interagiert HSP90c mit Pre-Proteinen und hilft beim post-translationellen Import von chloroplastidären Proteinen. Die Embryolethalität durch den Funktionsausfall von HSP90c unterstreicht die Wichtigkeit des Proteinimports (Inoue *et al.*, 2013). Eine zweite Gruppe von Proteinen ist für die Synthese Chloroplasten-codierter Proteine von Bedeutung. Dabei spielt der chloroplastidäre Elongationsfaktor G (*SCO1*) eine wichtige Rolle. Durch T-DNA Insertionen im Gen *SCO1* ist die entsprechende Mutante ebenfalls embryolethal, weil für wichtige metabolische Prozesse die notwendigen Proteine nicht vorhanden sind (Ruppel und Hangarter 2007). Die dritte Gruppe bilden Enzyme, die an der Biosynthese von Fettsäuren, Vitaminen, Nukleotiden und Aminosäuren beteiligt sind. 22% der

EMB-Proteine gehören zu dieser Gruppe. Durch einen Ausfall dieser Enzyme können essentielle Metabolite nicht für die pflanzliche Zelle zur Verfügung gestellt werden (Bryant *et al.*, 2011).

1.1.2.2 Die Chloroplastenentwicklung während der Keimung

Während der Keimung unterscheidet sich die Chloroplastenbiogenese zwischen Monokotyledonen und Dikotyledonen. Bei Monokotyledonen bildet sich in Blättern ein Gradient der Chloroplastenentwicklung von unten nach oben. Zusätzlich scheint es einen Unterschied in der genetischen Regulation der adaxialen und der abaxialen Chloroplastenbiogenese zu geben. Dafür ist in Reis der CHROMATIN REMODLING FACTOR4 (CHR4) verantwortlich. Die *chr4*-Mutante zeigt auf der adaxialen Seite des Blattes einen Albino-Phänotyp (Zhao *et al.*, 2012). Hingegen führt in Reis eine Mutation in dem Kalium-Efflux-Antiporter (KEA) *Albino midrib1 (AM1)* zu grün-weißen Farbvariation in jüngeren Blättern und zu einem Albino-Phänotyp der Mittelrippe in älterem Gewebe (Sheng *et al.*, 2014). In Dikotyledonen befinden sich in den Keimblättern Etioplasten, die sich durch eine Licht-vermittelte Entwicklung, die sogenannte Photomorphogenese, zu Chloroplasten umwandeln (Han *et al.*, 2007). In Folgeblättern findet die Biogenese der Chloroplasten im Sprossmeristem und in den Blattprimordien statt. Anschließend verteilen sich die Chloroplasten durch Teilung (Charuvi *et al.*, 2012).

Durch Photorezeptoren, sogenannte Phytochrome, wird die Photomorphogenese aktiviert (Jarvis und López-Juez 2013). Phytochrom B (PhyB) besitzt eine inaktive Form, die im Zytoplasma lokalisiert ist. Durch Lichtinduktion kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteins und das Signalpeptid für die Kernlokalisierung wird freigelegt. Im Zellkern kann PhyB weitere Gene für die Photomorphogenese aktivieren (Chen *et al.*, 2005). Der Unterschied in der Chloroplastenentwicklung zwischen Keim- und Folgeblättern ist deutlich an der Arabidopsis-Mutante *var2 (variegated2)* zu beobachten. Die Keimblätter dieser Mutante sind durchgehend grün, wiederum haben die Folgeblätter chlorotische Veränderungen. Es sind 13 allelische *var2* Mutanten bekannt, welche sich in der Ausprägung des Phänotyps unterscheiden. Zusätzlich treten phänotypische Unterschiede bei Licht- und Temperaturunterschieden auf.

VAR2 gehört zu der FtsH-Proteinfamilie der Metalloproteasen und ist für den Abbau des D1-Proteins, einer Untereinheit des PSII, verantwortlich (Martinez-Zapater 1993; Liu *et al.*, 2010; Sakamoto *et al.*, 2004). Gegenteilige Beispiele stellen die *snowy cotyledon* (*sco*) Mutanten dar, welche eine weißliche Färbung der Keimblätter zeigen und wiederum grüne Folgeblätter ausbilden (Albrecht *et al.*, 2006, 2008; Albrecht *et al.*, 2010).

1.1.3 Die *snowy cotyledon* Mutanten

Zur Aufklärung der Chloroplastenbiogenese in Keimblättern wurde in der Arbeitsgruppe um Veronica Albrecht-Borth (Australian National University (Prof. Barry Pogson) und ETH Zürich (Prof. Klaus Apel)) ein genetischer Screen in *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp *Landsberg erecta*) durchgeführt. Dabei wurde nach Mutanten selektiert, die eine Beeinträchtigung der Chloroplastenfunktion in den Keimblättern aufweisen, was sich durch hellgrüne bis weiße Keimblätter äußert. Wiederum zeigen die Folgeblätter der Mutanten eine normale grüne Morphologie. Aufgrund der weißen Keimblätter werden die Mutanten *snowy cotyledon* (*sco*) bezeichnet. Im Folgenden werden die vier *sco* Mutanten und deren Funktion erläutert. Dabei handelt es sich um verschiedene Proteine, die unabhängig voneinander eine Aufgabe in der Chloroplastenbiogenese und der Anpassung an Lichtintensitäten besitzen.

Die erste charakterisierte *sco*-Mutante *sco1* zeigt den typischen *snowy cotyledon* Phänotyp und zeichnet sich durch eine verzögerte Keimung aus. Neben den auffälligen Keimblättern ist auch eine verspätete generelle Entwicklung der Pflanzen beschrieben. Es kommt zu einer verzögerten Blütenentwicklung und Reduzierung der Samenanzahl. Die Pflanzen weisen zudem einen reduzierten Pigmentgehalt und eine geringere Biomasse im Vergleich zu Wildtyp (WT) Pflanzen auf (Albrecht *et al.*, 2006). Somit hat die Beeinträchtigung der Chloroplastenentwicklung einen langfristigen Einfluss auf die Pflanze. Bei der *sco1* Mutante liegt eine Punktmutation in einer GTPase-Domäne des chloroplastidären Elongationsfaktors G (cpEF-G) vor. Demnach zeigt die *sco1* Mutante auch ein reduziertes Proteinlevel von chloroplastidären Proteinen. So spielt SCO1/cpEF-G eine entscheidende Rolle in der Photomorphogenese, in der eine hohe Proteinsyntheserate für die Chloroplastenbiogenese sorgt (Albrecht *et al.*, 2006).

SCO2 ist als Disulfid-Isomerase beschrieben und spielt potentiell in der Proteinfaltung und der Assemblierung der Thylakoidmembranen in Chloroplasten eine Rolle. SCO2 ist ebenfalls in den Chloroplasten lokalisiert und sämtliche co-exprimierte Gene haben eine Funktion in Chloroplasten und der Chlorophyllbiosynthese. In Interaktionsstudien konnten das Chlorophyll-bindende Protein LHCB1 und Untereinheiten von PSI und PSII als Interaktionspartner identifiziert werden (Tanz *et al.*, 2012; Muranaka *et al.*, 2012). Die *sco2* Mutante zeigt die typischen weißen Keimblätter. Da die Embryoentwicklung in dieser Mutante normal abläuft, ist scheinbar ausschließlich die Photomorphogenese in den Keimblättern gestört (Albrecht *et al.*, 2008).

Im Gegensatz zu den anderen beschriebenen SCO-Proteinen ist SCO3 in der Peripherie der Peroxisomen lokalisiert. Die T-DNA Insertionsmutante ist embryolethal und die Punktmutante *sco3-1* besitzt eine abnormale Chloroplastenmorphologie. Es kommt zu einem reduzierten Chlorophyllgehalt und einer Beeinträchtigung der Thylakoidstruktur. Hohe CO₂-Konzentrationen führen zu einer Photoinhibierung in den Folgeblättern. Zusätzlich tritt ein verändertes Zytoskelett auf. Generell scheint das Peroxisom-assoziierte Protein SCO3 eine unerwartete Aufgabe in der Chloroplastenbiogenese zu haben (Albrecht *et al.*, 2010). Durch einen Suppressor Screen von *sco3-1* konnte das Phytochrom PhyB als Suppressor identifiziert werden. Demnach wird ein Zusammenspiel der SCO3- und PhyB-Signalwege in der Chloroplastenentwicklung erwartet (Ganguly *et al.*, 2015).

Das letzte charakterisierte SCO-Protein SCO4 ist als neue Endopeptidase in Chloroplasten beschrieben (Albrecht-Borth *et al.*, 2013). Das Protein besitzt begrenzt Homologien zu CAAX-Proteasen, die eine Funktion in der post-translationalen Modifikation von Proteinen haben. CAAX-Proteasen unterstützen die Prenylierung von Zielproteinen, die anschließend durch einen Prenylanker an Membranen assoziiert werden können (Bracha-Drori *et al.*, 2008). SCO4 besitzt keine typische CAAX-Proteaseaktivität und könnte somit zu einer unbekanntenen Gruppe von Proteasen in höheren Pflanzen gehören. SCO4 ist in der Regulation von Photosyntheseproteinen involviert, die bei der Toleranz gegen extreme Lichtbedingungen eine Rolle spielt. Die *sco4-1* Punktmutante besitzt im Vergleich zu den restlichen *sco* Mutanten einen durch moderate bis hohe Lichtintensitäten (90 – 230 $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$) induzierbaren Phänotyp. Dabei zeigt *sco4-1* gelbe Keimblätter. Unter kontinuierlichem Lichteinfluss bleichen auch die

Folgeblätter aus. Der induzierte Phänotyp ist in Keimlingen nicht reversibel und die Mutante hat zudem einen reduzierten Chlorophyllgehalt. *sco4-1* Pflanzen sind in der kurzfristigen Reaktion auf hohe Lichtintensitäten beeinträchtigt. Dabei kommt es zum Stillstand des Elektronentransfers, was einen Einfluss auf die Aktivität von PSI und PSII hat. Durch reaktive Sauerstoffspezies kommt es auch zu einer Akkumulation von H_2O_2 in der Mutante. Der Anstieg an H_2O_2 korreliert mit den gebleichten Blättern in Keimlingen wie auch in adulten Pflanzen. Generell beeinflusst SCO4 die kurzfristige Anpassung an hohe Lichtintensitäten (Albrecht-Borth *et al.*, 2013).

Zusammenfassend sind die SCO-Proteine unabhängig von einander in der Chloroplastenentwicklung der Keimblätter involviert. Dabei reguliert SCO1 den Translationsprozess in Chloroplasten und SCO2 ist für die Fusion der Thylakoidmembranen und die Assemblierung des Photosynthesekomplexes beteiligt. SCO3 regelt wiederum die Chloroplastenbiogenese über die Phytochrome und SCO4 fördert die Entwicklung bei hohen Lichtintensitäten (Abbildung 1-1).

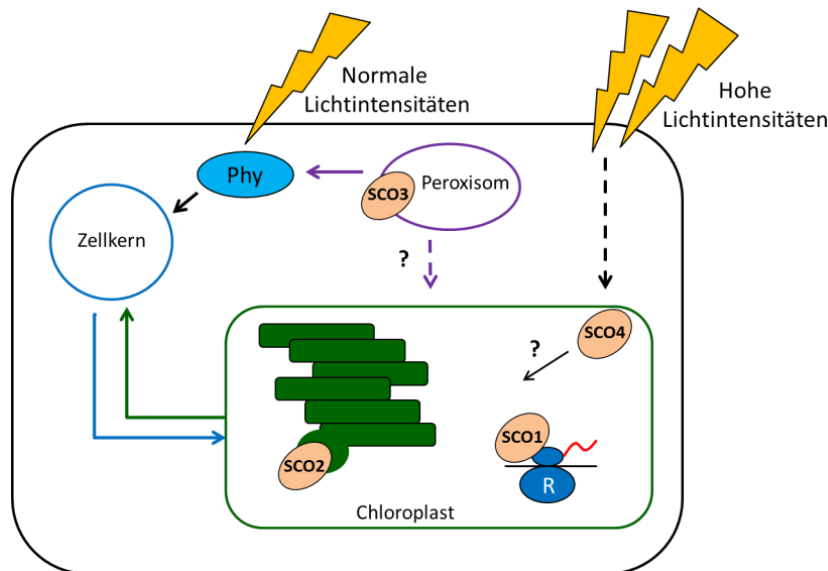


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Funktionen der SCO-Proteine in der Chloroplastenentwicklung. Punktmutationen in diesen Genen führen zu einem *snowy cotyledon* Phänotyp. SCO1 ist als Elongationsfaktor im Translationsprozess in den Chloroplasten beteiligt (R: Ribosom). SCO2 spielt bei der Assemblierung der Thylakoidmembran und der Proteinkomplexe für die Photosynthese eine entscheidende Rolle. SCO3 steuert wiederum über die Peroxisomen die Photorezeptoren (Phytochrome, Phy) und beeinflusst auf noch unbekanntem Wege die Chloroplastenbiogenese. SCO4 ist in der Anpassung an hohe Lichtintensitäten beteiligt. Generell spielen bei der Chloroplastenentwicklung die Signalwege zwischen Zellkern und Chloroplasten eine entscheidende Rolle.

1.2 Der Einfluss von biotischen Stressfaktoren auf Pflanzen

1.2.1 Die generelle Reaktion von Pflanzen auf Pathogenbefall

Neben abiotischen Stressfaktoren müssen Pflanzen auf eine Reihe von Pathogenangriffen reagieren können. Das angeborene Immunsystem von Pflanzen verfügt im Vergleich zu dem der Vertebraten nicht über zirkulierende Immunzellen, die unerwünschte Pathogene erkennen und diese eliminieren. Trotzdem besitzt die Pflanze mehrere spezifische Mechanismen zur Abwehr von Pathogenen. Eine der ersten Barrieren der pflanzlichen Zelle ist die Zellwand. Bei Pathogenbefall kann diese durch Calloseablagerungen zusätzlich verstärkt werden (Ellinger *et al.*, 2013).

Die Erkennung von Pathogenen erfolgt durch Rezeptoren in der Plasmamembran der Zelle. Diese *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) erkennen Pathogen-assoziierte Moleküle (*pathogen/microorganism associated molecular patterns*, PAMPs oder MAMPs) und können dadurch einen Signalweg in der Zelle einleiten, der zu einer basalen Immunantwort führt. Die PRR-vermittelte Immunantwort wird als PAMP-vermittelte Immunität (*PAMP/pattern triggered immunity*, PTI) beschrieben. Einige Pathogene sind jedoch in der Lage diesen Signalweg durch Sekretion sogenannter Effektoren in die Wirtszelle zu unterbinden. Dieser Prozess wird als Effektor-vermittelte Suszeptibilität (*effector-triggered susceptibility*, ETS) bezeichnet. Pflanzen haben spezifische Resistenzproteine, sogenannte *NOD-like receptors* (NLRs) entwickelt, die direkt oder indirekt diese Effektoren erkennen und eine starke Immunantwort auslösen. Dieser Mechanismus wird Effektor-vermittelte Immunität (*effector-triggered immunity*, ETI) genannt und kann schließlich zum Absterben der infizierten und benachbarten Zellen führen. Dieser Prozess wird als hypersensitive Reaktion (*hypersensitive response*, HR) bezeichnet. Durch diese Art des Zelltods wird den biotrophen Pathogenen die Möglichkeit der Ausbreitung genommen, da Ressourcen und Nährstoffe dafür fehlen (Abbildung 1-2 und Übersicht: Spoel und Dong 2012; Kazan und Lyons 2014; Jones und Dangl 2006).

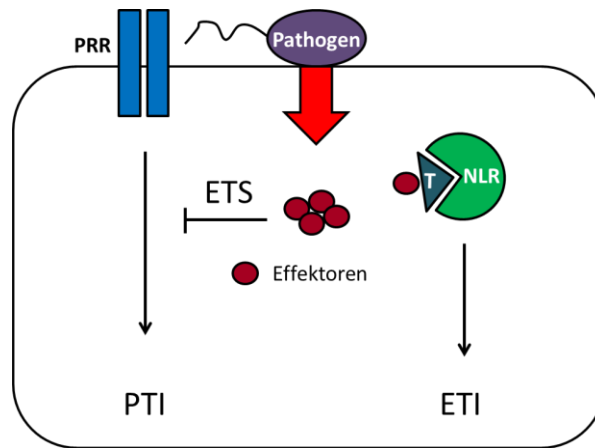


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der grundlegenden Signalwege nach der Infektion mit Pathogenen. Pathogene werden zunächst durch Pathogenrezeptoren (PRR) erkannt, was die PAMP-vermittelte Immunantwort (PTI) auslöst. Einige Pathogene können Effektoren in die Pflanze schleusen, die den PTI Signalweg unterdrücken (ETS). Diese Effektoren können direkt oder meistens indirekt über ein weiteres Zielprotein (Traget, T) von Resistenzproteinen (NLR) erkannt werden. Eine Veränderung des Zielproteins (T) löst wiederum die Effektor-vermittelten Immunantwort (ETI) aus.

1.2.2 Die PAMP-vermittelte Immunantwort

Eine schnelle und sensitive Reaktion auf potentiell gefährliche Pathogene wird durch die PAMP-vermittelte Immunantwort erzeugt. Dabei erkennen Pathogenrezeptoren (PRR) Pathogen-assoziierte Moleküle und leiten den Signalweg für die Immunreaktion ein. Bei PRR handelt es sich um Rezeptorkinasen (RKs) oder Rezeptor-ähnliche Proteine (*receptor-like proteins*, RLPs). RKs bestehen aus einer Ligand-bindenden Ektodomäne, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Kinasedomäne. Letztere ist wichtig für die Weiterleitung des extrazellulären Signals ins Innere der Zelle. An der weiteren Signaltransduktion sind zytoplasmatische Kinasen (*receptor-like cytoplasmic kinases*, RLCK) beteiligt (Übersicht: Zipfel 2014; Macho und Zipfel 2014). Ein gut beschriebenes Beispiel ist die Interaktion der Rezeptorkinasen FLS2 (FLAGELLIN-SENSITIVE 2) und BAK1 (BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE) in der Plasmamembran. Dabei erkennt FLS2 das bakterielle Flagellin flg22. Dadurch kommt es zur Rekrutierung des Co-Rezeptors BAK1, der für die Aktivierung des Signalwegs von Bedeutung ist (Gómez-Gómez und Boller 2000; Zipfel *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2013; Chinchilla *et al.*, 2007). Die zytoplasmatische Kinase BIK1 (BOTRYTIS-INDUCED KINASE1) wird von BAK1 phosphoryliert und unterstützt auf diese Weise die Signalweiterleitung des

FLS2-BAK1 Komplexes (Lu *et al.*, 2010). Durch diese Aktivierung kann BIK1 wiederum durch Phosphorylierung die NADPH-Oxidase RBOHD aktivieren und es kommt zu einer apoplastischen ROS-Produktion zur Abwehr der Pathogene. Dieser Prozess wird durch den Anstieg von zytoplasmatischem Calcium und Calcium-abhängigen Proteinkinasen (CPKs) unterstützt (Kadota *et al.*, 2014). Dabei fördert CPK5 ebenfalls durch Phosphorylierung die Aktivität von RBOHD und es folgt eine ROS-vermittelte Signalweiterleitung in benachbarte Zellen und Gewebe (Dubiella *et al.*, 2013). Zur Kontrolle der Immunantwort wird BIK1 durch CPK28 wiederum negativ reguliert (Monaghan *et al.*, 2014; Monaghan *et al.*, 2015).

Neben dem bakteriellen flg22 ist auch der N-terminale Bereich des bakteriellen Elongationsfaktors EF-Tu als Elicitor für die Rezeptorkinase EFR (EF-TU RECEPTOR) beschrieben (Kunze *et al.*, 2004; Zipfel *et al.*, 2006). Zusätzlich werden auch Liposaccharide gram-negativer Bakterien von pflanzlichen Rezeptoren erkannt. Zu dieser Gruppe gehört die Lectin S-Domänen Rezeptorkinase LORE (*lipooligo-saccharide-specific reduced elicitation*) (Ranf *et al.*, 2015).

Die Signalweiterleitung von der Plasmamembran zum Zellkern erfolgt durch MAPK (MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE) Kaskaden. Bei diesen Kaskaden wird durch die Aktivierung einer MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAP3K) eine MAP-Kinase-Kinase (MAP2K) durch Phosphorylierung aktiviert. Daraus folgt wiederum die Aktivierung einer MAP-Kinase. Dadurch kommt es zu einer Potenzierung des Signals und es folgt die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren im Zellkern (Übersicht: Meng und Zhang 2013).

Eine bekannte MAPK-Kaskade beginnt mit der Phosphorylierung von MEKK1 (MAP3K), welche anschließend über MKK1 und MKK2 (MAP2K) die MAP-Kinase MPK4 aktiviert (Ichimura *et al.*, 2006; Suarez-Rodriguez *et al.*, 2007). Eine weitere Kaskade aktiviert die MAP-Kinasen MPK3 und MPK6. Dabei verläuft der Signalweg über die MAP2K MKK4 und MKK5 (Asai *et al.*, 2002). Generell resultieren diese Kaskaden in der Aktivierung Abwehr-relevanter Gene u.a. zur Modifikation der Zellwand, zum Schließen der Stomata und zur Produktion von ROS, Phytoalexinen und Ethylen (Meng und Zhang 2013). Zusätzlich führt der Signalweg zur Akkumulation von Salicylsäure (SA), welches die Weiterleitung der Immunabwehr in benachbarte Zellen und Gewebe und die Induktion der systemisch akquirierten Resistenz (SAR) positiv beeinflusst. Dabei spielt die Regulation des transkriptionellen Co-Faktors NPR1 (*nonexpressor of PR genes 1*) eine entscheidende Rolle. Durch ein erhöhtes SA-Level in der Zelle

werden NPR1 Oligomere in Monomere umgewandelt und in den Kern transportiert. Dort aktiviert NPR1 Transkriptionsfaktoren, die die SA-assoziierte Immunantwort fördern (Mou *et al.*, 2003; Tada *et al.*, 2008). Dabei bildet NPR1 mit dem transkriptionellen Repressor TGA2 ein Enhancersom und aktiviert dadurch die Transkription von *PR1* (*PATHOGENESIS-RELATED GENE1*) (Rochon *et al.*, 2006; Boyle *et al.*, 2009). Durch dieses komplexe Signalnetzwerk sind Pflanzen in der Lage auf einen akuten Pathogenbefall reagieren zu können.

1.2.3 Die Effektor-vermittelte Immunantwort

Einige Bakterien sind in der Lage Effektoren (oder Virulenzfaktoren, kurz: Avr) über das Typ III Sekretionssystem in Pflanzenzellen zu schleusen. Diese Effektoren inhibieren Signalwege der Immunabwehr. Dadurch wird die Abwehr der Wirtszelle unterdrückt und die Virulenz der Bakterien gesteigert (Übersicht: Jones und Dangl 2006; Mudgett 2005). Das Bakterium *Pseudomonas syringae* ist in der Lage mittels Effektoren die Immunantwort durch Inhibierung des PTI-Signalwegs zu unterbinden. Beispielsweise inhibieren die Effektoren AvrPto und AvrPtoB (aus *Pseudomonas syringae*) in Arabidopsis die MAPK-Kaskade des PTI Signalwegs und unterdrücken dadurch die Immunabwehr (He *et al.*, 2006). Zudem konnte gezeigt werden, dass AvrPtoB eine E3 Ubiquitinligaseaktivität besitzt und durch das Imitieren pflanzlicher Ubiquitinligaseaktivität die Immunabwehr ausschalten kann (Janjusevic *et al.*, 2006).

Zur gezielten Verteidigung gegen die sekretierten Effektoren besitzen Pflanzen Resistenz (R) Gene, die für NB-LRR (*nucleotide binding-leucine rich repeats; NOD-like receptors, NLRs*) Proteine kodieren. NLR-Proteine gehören zu der STAND (*signal transduction ATPase with numerous domains*) Superfamilie und besitzen eine zentrale NB-ARC (*nucleotide binding adaptor shared by Apaf1, resistance proteins and CED4*) Domäne mit einer P-Loop ATPase. N-terminal sind LRR (*Leucine-rich Repeats*) Motive zu finden. Aufgrund von zwei unterschiedlichen C-terminalen Domänen wird zwischen TIR-NB-LRR und CC-NB-LRR Proteinen unterschieden. TIR-NB-LRRs besitzen eine C-terminale Toll/Interleukin1 Rezeptor (TIR) Domäne und CC-NB-LRRs wiederum eine Coiled-Coil (CC) Domäne. (Übersicht: Li *et al.*, 2015; Qi und Innes 2013). NLRs sind für die direkte oder indirekte Erkennung der Effektoren zuständig und

leiten dadurch eine starke Immunabwehr ein, die zur hypersensitiven Reaktion führt. Dabei besitzen NLRs eine aktive und eine inaktive Konformation. In der inaktiven Form kommt es zu einer Autoinhibierung durch eine intramolekulare Interaktion und einer bevorzugten Bindung von ADP. Bei einer Aktivierung durch einen Effektor kommt es zu einer Konformationsänderung und einer bevorzugten Assoziation mit ATP (Williams *et al.*, 2011).

1.2.3.1 Die *Guard* und *Decoy* Hypothesen

Für die Erkennung von Effektoren sind drei verschiedene Modelle beschrieben. Bei der *Guard*-Hypothese ist ein NLR mit einem für die Immunabwehr relevanten Protein assoziiert. Wird dieses Protein durch Effektoren negativ beeinflusst, erfolgt eine Aktivierung des ETI-Signalweges (Dangl und Jones 2001). Im *Decoy-Model* hingegen hat das assoziierte Protein keine Relevanz in der basalen Immunantwort. Eine negative Beeinflussung durch einen Effektor führt trotzdem zur Aktivierung des ETI-Signalweges (van der Hoorn und Kamoun 2008). Das Prinzip des *Guard*- und *Decoy*-Modells verläuft ähnlich. Da in einigen Fällen eine eindeutige Aussage über die Funktion des vom Effektor beeinflussten Proteins in der Immunantwort noch nicht gezeigt werden konnte, ist nicht immer eine Einteilung in *Guard*- und *Decoy*-Model möglich. Ein gut beschriebenes Beispiel ist die Interaktion zwischen den Plasmamembran-assoziierten Proteinen RIN4 (RPM1-INTERACTING PROTEIN4) und den NLRs RPM1 (RESISTANCE TO *P. SYRINGAE* PV MACULICOLA 1) und RPS2 (RESISTANT TO *P. SYRINGAE* 2). Generell beeinflusst RIN4 zusammen mit der H⁺-ATPase die Stomata während eines Pathogenbefalls (Liu *et al.*, 2009). Durch eine Infektion mit *P. syringae* wird u.a. die Cysteinprotease AvrRpt2 in die pflanzliche Zelle sekretiert, wodurch es zum Abbau von RIN4 kommt. Anschließend folgt die Aktivierung des NLR-Proteins RPS2 und es kommt zur Einleitung des ETI-Signalweges (Axtell *et al.*, 2003; Axtell und Staskawicz 2003; Mackey *et al.*, 2003). Parallel kann RIN4 auch mit dem NLR-Protein RPM1 interagieren. Durch die Sekretion der Effektoren AvrB und/oder AvrRpm1 von *P. syringae* kommt es zur Phosphorylierung von RIN4 durch die zytoplasmatische Kinase RIPK (RPM1-INDUCED PROTEIN KINASE). Durch diese Phosphorylierung wird der RPM1 abhängige ETI-Signalweg aktiviert (Mackey *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2011; Chung *et al.*, 2011). Ein weiterer gut beschriebener Effektor AvrPto ist ein Kinaseinhibitor und beeinflusst

die Funktion der RKs FLS2 und EFR zur Unterdrückung des PTI-Signalwegs (Xiang *et al.*, 2008). In Tomaten ist aufgrund der Ähnlichkeit zu Rezeptorkinasen auch die zytoplasmatische Kinase Pto ein Zielprotein dieses Effektors. Durch die Inhibierung von Pto wird das assoziierte NLR-Protein Prf aktiviert (Mucyn *et al.*, 2006). Aufgrund der konkurrierenden Interaktion von FLS2 und Pto mit dem Effektor AvrPto wird hier von einem kompetitiven *Decoy*-Model gesprochen. Einige NLRs besitzen zusätzliche Domänen, die zur direkten Effektorerkennung dienen. Dabei imitieren diese Domänen eigentliche Effektorziele und werden daher als integrierte *Decoys* bezeichnet (Cesari *et al.*, 2014). Das NLR-Protein RRS1 besitzt eine zusätzliche C-terminale WRKY-Domäne, die Ähnlichkeiten mit den WRKY-Transkriptionsfaktoren hat. RRS1 (RESISTANT TO RALSTONIA SOLANACEARUM 1; auch RRS1-R) bildet mit dem R-Protein RPS4 (RESISTANT TO P. SYRINGAE 4) ein Heterodimer, wobei RRS1 ausschließlich eine Rezeptorfunktion besitzt und RPS4 für die Signalweiterleitung verantwortlich ist (Williams *et al.*, 2014). Das Bakterium *Ralstonia solanacearum* sekretiert u.a. den Effektor PopP2 in pflanzliche Zellen, der durch Acetylierung von WRKY-Transkriptionsfaktoren im Zellkern die Immunantwort inhibiert. Durch die Acetylierung der WRKY-Proteine können diese nicht mehr an die DNA binden, wodurch die transkriptionelle Aktivierung von Abwehrmechanismen unterdrückt wird. Parallel wird auch die WRKY-Domäne von RRS1-R acetyliert und die RPS4 vermittelte Immunabwehr aktiviert (Le Roux *et al.*, 2015; Sarris *et al.*, 2015). Zusätzlich gibt es auch einige NLRs, die ohne zusätzliche *Decoy*-Domäne Effektoren direkt erkennen und eine Reaktion auslösen. Dazu zählt das NLR-Protein N-Faktor in Tabak. Der N-Faktor interagiert mit der Helikasedomäne p50 des Tabak-Mosaik-Virus. Durch die Hydrolyse von ATP kommt es zur Aktivierung der Immunabwehr (Ueda *et al.*, 2006).

1.2.3.2 Der ETI-Signalweg und die hypersensitive Reaktion

Der durch aktivierte NLRs resultierende Signalweg zur Aktivierung der hypersensitiven Reaktion ist zum größten Teil noch unklar. Ein wichtiger Knotenpunkt sind die Lipase-ähnlichen Proteine PAD4 (PHYTOALEXIN DEFICIENT 4), EDS1 (ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1) und SAG101 (SENESCENCE ASSOCIATED GENE 101). EDS1 bildet mit PAD4 und SAG101 unabhängige Heterodimere. Diese Komplexe fördern dabei die transkriptionelle Reprogrammierung und den

Pathogen-induzierten Zelltod. Dabei ist für die Immunantwort die Aktivität der Lipasedomänen der Proteine nicht von Bedeutung (Wagner *et al.*, 2013). EDS1 ist zusätzlich auch mit den NLRs RPS4 und RPS6 assoziiert und auch Zielprotein für die Effektoren AvrRps4 und HopA1. Der EDS1-RPS4 Komplex ist durch eine Kern-Zytoplasma-Koordination für die transkriptionelle Reprogrammierung und die Amplifikation der Immunantwort verantwortlich (Bhattacharjee *et al.*, 2011; Heidrich *et al.*, 2011). EDS1 fördert dadurch den durch NLRs eingeleiteten Signalweg, welcher in der hypersensitiven Reaktion resultiert kann.

Die hypersensitive Reaktion löst in den infizierten und benachbarten Zellen den Zelltod aus. Der programmierte Zelltod (PCD) wird in Pflanzen morphologisch in vakuolären und nekrotischen Zelltod eingeteilt. Der vakuoläre Zelltod ist ein langsamer Prozess, der bei Organ- und Gewebemorphogenese sowie Seneszenz beschrieben wird. Dabei werden zytoplasmatische Strukturen in die Vakuole aufgenommen und recycelt. Es kommt zu einer Vergrößerung der Vakuole und anschließend zum Freisetzen von Hydrolasen. Der nekrotische Zelltod wird wiederum bei abiotischem und biotischem Stress ausgelöst. Dabei verliert die Plasmamembran an Integrität und die ROS-Produktion steigt an. Interessanterweise kann die hypersensitive Reaktion infolge einer Infektion mit Pathogenen nicht in diese beiden PCD-Gruppen eingeteilt werden. Bei der HR ist neben dem Verlust der Membranintegrität auch eine Vergrößerung der Vakuole zu beobachten (Übersicht: van Doorn *et al.*, 2011). Durch eine Analyse von Transkriptomdaten, die mit diversen Formen des Zelltods assoziiert sind, konnten differenzierte Gruppen von regulativen Genen zwischen entwicklungsbedingten und umweltbedingten PCD identifiziert werden (Olvera-Carrillo *et al.*, 2015). Der entwicklungsbedingte PCD (*developmental PCD*; dPCD) unterteilt sich in die Kategorien Seneszenz und differenzierungsbedingter Zelltod. Die Gruppe des umweltbedingten PCD (*environmental PCD*; ePCD) dagegen umfasst sieben Kategorien, die durch biotische und abiotische Stressfaktoren induziert werden. In der Kategorie des biotisch-induzierten PCD sind viele Gene u.a. des SA-Signalweges hoch reguliert. Zusätzlich konnten in dieser Gruppe Seneszenz-assoziierte Markergene identifiziert werden. Dieses deutet auf einen konservierten Prozess zwischen der Reaktion auf Pathogene und dem Prozess der Seneszenz hin. Wiederum konnten in seneszenten Organen biotische, osmotische und entwicklungsbedingte Markergene

identifiziert werden. Somit kann vermutet werden, dass der Seneszenzprozess eine Kombination von Signalwegen aktiviert (Olvera-Carrillo *et al.*, 2015).

1.2.3.3 Die Regulation der NLR-abhängigen Immunantwort

Die Regulation von NLR-Proteinen ist von enormer Bedeutung, weil eine Dysregulation des Signalweges in einigen Arabidopsis-Mutanten zu auto-aktivierten Immunreaktionen führt. Eine Punktmutation in dem NLR-Protein SNC1 (SUPPRESSOR OF NPR1, CONSTITUTIVE1) führt zu einer konstitutiven Aktivierung des Proteins und somit zu einem kleinwüchsigen, autoimmunen Phänotyp (Zhang *et al.*, 2003). Das Calcium-abhängige Protein BONZAI1 (BON1) interagiert mit den Rezeptorkinasen BAK1 und BIR1 (BAK1-INTERACTING RECEPTOR-LIKE KINASE 1) und reguliert dadurch den immunabhängigen Zelltod (Wang *et al.*, 2011). Die *bon1* Mutante zeigt ebenfalls einen kleinwüchsigen Phänotyp und hat unregelmäßige Läsionen an den Blättern (Jambunathan *et al.*, 2001). Ein weiteres Beispiel wird durch eine Mutation im R-Gen *CHS1* (CHILLING SENSITIVE 1) deutlich, welche ebenfalls zu einem Zelltod-Phänotyp führt (Wang *et al.*, 2013; Zbierzak *et al.*, 2013).

Viele der autoimmunen Reaktionen in diesen Mutanten sind temperaturabhängig. Dabei führt eine moderat erhöhte Temperatur zu einer Inhibierung der NLR-vermittelten Resistenz (Wang *et al.*, 2009). Dieses wird an der *chs1* Mutante deutlich, die oberhalb von 24°C einen WT-ähnlichen Phänotyp zeigt (Zbierzak *et al.*, 2013). Ähnliches ist auch bei der *snc1-1* und *bon1* Mutante zu beobachten. Diese zeigen einen autoimmunen Phänotyp ausschließlich unterhalb von 28°C (Yang und Hua 2004). Zur Untersuchung des Phänomens wurde eine Mutagenese von *snc1* Mutanten durchgeführt und nach *int* (*insensitive to temperature*) Mutanten mit einem autoimmunen Phänotyp bei 22°C und 28°C selektiert (Zhu *et al.*, 2010). In der *int102 snc1-1* Mutante (auch *snc1-4* genannt) konnte eine weitere Mutation in *SNC1* festgestellt werden. Somit ist das NLR-Protein selbst für die Temperatursensitivität verantwortlich. Dabei konnte zusätzlich gezeigt werden, dass bei erhöhten Temperaturen die Temperatur-insensitive SNC1-4 allerdings nicht die SNC1-1 Proteinvariante im Zellkern akkumuliert. Daraus lässt sich eine temperaturabhängige Relokalisierung von SNC1 schließen (Zhu *et al.*, 2010). Ein ähnlicher Screen wurde ebenfalls mit der *bon1* Mutante durchgeführt. Die resultierende *int173* Mutante

besitzt eine Mutation in dem Gen *ABA2*, was zu einem Abszisinsäure (ABA) Defizit in den Pflanzen führt. Durch das geringe ABA-Level wird zusätzlich die Akkumulation von *SNC1* im Zellkern bei niedrigen sowie höheren Temperaturen gefördert. Somit konnte ein neuer Knotenpunkt zwischen dem ABA-Signalweg und der NLR-vermittelten Immunantwort gezeigt werden, unterstrichen durch die antagonistische Reaktion der Pflanze auf biotische und abiotische Faktoren (Mang *et al.*, 2012).

Die zelluläre Regulation von NLRs findet auf den Ebenen der Transkription, RNA-Prozessierung, Proteinfaltung und des Proteinabbaus statt. Eine wichtige Ebene ist die epigenetische Regulation. Durch Methylierung und Monoubiquitinierung von Histonen an einem R-Gen Locus wird die Expression u.a. von *SNC1* reguliert (Zou *et al.*, 2014; Xia *et al.*, 2013). Zusätzlich sind für viele NLRs mehrere Spleißvarianten beschrieben. So konnten für *RPS4* acht verschiedene Transkriptvarianten identifiziert werden. Dabei wird von einer kombinierten Funktion der verkürzten und regulären Proteinvarianten ausgegangen (Zhang und Gassmann 2003). Zusätzlich ist der alternative Spleißvorgang von *RPS4* auch bei der Reaktion auf Pathogenbefall zu beobachten. Durch die verschiedenen Transkripte kommt es zur Feinabstimmung der *RPS4*-abhängigen Immunantwort (Zhang und Gassmann 2007). Auf post-translationeller Ebene werden einige NLRs durch den Ubiquitin 26S Proteasom Signalweg abgebaut. *SNC1* wird durch die SCF (SKP1-CULLIN1 F-BOX) E3 Ligase ubiquitiniert, was zum Abbau des Proteins führt (Cheng *et al.*, 2011). Zusätzlich fördert die E4 Ligase MUSE3 (*Mutant, snc1-enhancing 3*) die Polyubiquitinierung von *SNC1* (Huang *et al.*, 2014b). Es wird davon ausgegangen, dass das Co-Chaperon SGT1 (suppressor of G2 allele of SKP1) zusammen mit den zytosolischen Hitzeschockproteinen HSP90.2 und HSP90.3 für die Rekrutierung des SCF E3 Ligasekomplexes verantwortlich ist. Dadurch kann das Proteinlevel von NLRs durch den Abbau im 26S Proteasom kontrolliert werden (Huang *et al.*, 2014a). Neben der negativen Regulation von SGT1 in der Immunantwort spielt dieses Co-Chaperon im Komplex mit HSP90s und RAR (required for MLA12 resistance) auch eine positive Rolle in der Proteinfaltung von NLRs. Dabei interagiert HSP90 mit den beiden Co-Chaperonen RAR und SGT1 und fördert die Stabilisierung u.a. von *RPS2* und *RPM1* (Takahashi *et al.*, 2003; Hubert *et al.*, 2003).

1.2.4 Die Ubiquitinierung von Proteinen in der pflanzlichen Immunabwehr

Wie schon in den vorigen Kapiteln an einigen Beispielen erläutert wurde, spielt die Proteinmodifikation durch Ubiquitinierung in der pflanzlichen Immunantwort eine entscheidende Rolle. Für diese post-translationelle Modifikation sind drei Enzyme notwendig. Das *Ubiquitin Activating Enzym* (UBA oder E1) bindet unter ATP-Verbrauch kovalent ein Ubiquitin. Dieses wird auf das *Ubiquitin Conjugating Enzym* (UBC oder E2) übertragen. Die E3 Ubiquitinligase ist für die Substratspezifität zuständig und kann durch Assoziation mit dem Enzym E2 das Zielprotein ubiquitinieren. Dabei kann das Ubiquitin direkt vom E2 auf das Substrat übertragen werden oder das Ubiquitin bindet zunächst an die E3 Ligase und wird anschließend weiter auf das Substrat transferiert (Übersicht: Callis 2014).

Arabidopsis thaliana hat zwei E1-Enzyme, von denen das E1-Enzym UBA1/MOS5 als Suppressor des konstitutiv aktivierten *snc1* gefunden wurde. UBA1/MOS5 wird somit als positiver Regulator der Immunabwehr beschrieben (Goritschnig *et al.*, 2007). Es sind zudem 37 E2-Enzyme und ca. 1400 E3 Ubiquitinligasen beschrieben. Die E3 Ubiquitinligasen unterteilen sich in HECT, RING, Cullin-RING und U-Box E3 Ligasen. Die U-Box E3 Ligasen werden auch als *Plant U-Box* (PUB) E3 Ligasen bezeichnet und haben eine 70 Aminosäure lange U-Box Domäne. Neben einer U-Box können die PUB-Proteine u.a. Armadillo (ARM) Motive besitzen (Übersicht: Callis 2014; Azevedo *et al.*, 2001; Mudgil *et al.*, 2004).

Bei dieser post-translationelle Proteinmodifikation wird zwischen der Polyubiquitinierung, der Monoubiquitinierung und der Multiubiquitinierung unterschieden. Polyubiquitinierungen ab einer Ubiquitinlänge von mindestens vier K48-verknüpften (Lysin 48) Ubiquitinmolekülen führen zum Abbau des Zielproteins durch das 26S Proteasom. Andere Ubiquitinierungsarten können Signalwege auslösen oder führen zu einer Relokalisierung von Proteinen. Ubiquitinierte plasmamembranständige Proteine können nach Endozytose über Endosomen zur Vakuole transportiert und dort degradiert werden. Welche Arten oder Kombinationen von Ubiquitinierung bei plasmamembranständigen Proteinen zur Internalisierung und zum Abbau in der Vakuole führen, ist nicht vollständig entschlüsselt (Übersicht: Korbei und Luschnig 2013). Ein Beispiel ist der K63-Polyubiquitinierungsprozess des BRI1 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1) Rezeptors, welcher durch diese Modifikation internalisiert und anschließend über die frühen

Endosomen und das *trans*-Golgi Netzwerk zu der Vakuole transportiert wird. Dabei spielt die Modifikation neben der Einleitung zur Endozytose auch eine entscheidende Rolle im Sortierungsprozess auf dem Weg von den Endosomen zur Vakuole (Martins *et al.*, 2015).

1.2.4.1 Die PUB E3 Ubiquitinligasen in der pflanzlichen Immunabwehr

Die Gruppe der PUB E3 Ubiquitinligasen spielen beim Ubiquitinierungsprozess in der pflanzlichen Immunantwort eine wichtige Rolle. Die E3 Ligasen PUB12 und PUB13 sind verantwortlich für die Ubiquitinierung der Pathogen-Rezeptorkinase FLS2. Dabei sind die E3 Ligasen mit der Rezeptorkinase BAK1 assoziiert. Durch eine flg22-Induktion werden PUB12 und PUB13 phosphoryliert, was anschließend die Ubiquitinierung von FLS2 zur Folge hat. Dadurch kommt es zum flg22-induzierten FLS2-Abbau (Lu *et al.*, 2011a). Alternativ wurde die Internalisierung der Rezeptorkinase FLS2 beschrieben. Bei Anwesenheit von Pathogenen kommt es zur Modifikation von FLS2 und anschließend zur Internalisierung und zum Abbau in der Vakuole. Ohne Pathogenbefall wird der Rezeptor ausschließlich zwischen frühen Endosomen und Plasmamembran recycelt. Eine Modifikation durch Ubiquitinierung wird dabei nicht ausgeschlossen (Robatzek *et al.*, 2006; Beck *et al.*, 2012). Ob in diesem Prozess die E3 Ligasen PUB12 und PUB13 involviert sind, ist allerdings noch unklar. Die E3 Ligase PUB17 aus Kartoffel fördert die Immunantwort nach einer Infektion mit *Phytophthora infestans*. Pflanzen mit einem geringeren PUB17 Proteinlevel haben dadurch eine höhere Empfindlichkeit gegenüber diesem Pathogen (Ni *et al.*, 2010; He *et al.*, 2015). In Arabidopsis sind die drei E3 Ligasen PUB22, PUB23 und PUB24 als negative Regulatoren des PTI-Signalwegs beschrieben. Die dreifache Mutante *pub22 pub23 pub24* zeigt eine stark ausgeprägte Immunreaktion durch den Einfluss von PAMPs. Durch eine hohe transkriptionelle Aktivität und eine hohe ROS-Produktion ist diese Mutante auch resistenter gegenüber Bakterien und Oomyzeten (Trujillo *et al.*, 2008). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass PUB22 für die Ubiquitinierung der Untereinheit Exo70B2 des Exozystkomplexes verantwortlich ist. Der Exozystkomplex ist für die Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran notwendig. Dieser Prozess spielt eine wichtige Rolle bei der Reprogrammierung der Zelle bei Pathogenbefall und wird durch PUB22 negativ beeinflusst (Stegmann *et al.*, 2012). Neben der Funktion von PUB22 und PUB23 in der Reaktion auf

biotischen Stress konnte auch eine negative Regulation auf abiotische Stressfaktoren beschrieben werden. Dabei sind die Mutanten *pub22* und *pub23* resistenter gegenüber Trockenstress-Situationen. Zusätzlich konnte die Ubiquitinierung der Untereinheit RPN6 des 26S Proteasoms durch PUB22 und PUB23 gezeigt werden (Cho *et al.*, 2008; Cho *et al.*, 2015). Die Aufgaben der PUB E3 Ligase vermitteln somit die Reaktion auf biotische und abiotische Stressfaktoren und beeinflussen dadurch die Entwicklung der Pflanze.

1.2.4.2 Das PUB-Protein SAUL1

Auch die PUB E3 Ubiquitinligase SAUL1 (SENESCENCE-ASSOCIATED E3 UBIQUITIN LIGASE1; PUB44) steuert die abiotische und biotische Stressantwort (Raab *et al.*, 2009; Vogelmann *et al.*, 2012; Disch *et al.*, 2016). SAUL1 besteht aus einer N-terminalen U-Box und 11 ARM-Motiven. Durch Deletionen diverser ARM-Motive konnte gezeigt werden, dass die fünf C-terminalen ARM-Motive für die Assoziation mit der Plasmamembran (PM) von Bedeutung sind (Drechsel *et al.*, 2011). Diese C-terminalen ARM-Motive konnten auch in den paralogen Proteinen AtPUB42 und AtPUB43 gefunden werden. Auch in diesen beiden Proteinen sind diese Motive für die PM-Lokalisierung verantwortlich. Diese Proteinfamilie ist in Pflanzen konserviert und besitzt wahrscheinlich eine wichtige Aufgabe an der Plasmamembran bei Ubiquitinierungsprozessen (Vogelmann *et al.*, 2014; Drechsel *et al.*, 2011).

Unter niedrigen Lichtbedingungen konnte ein verfrühter Seneszenz- und Zelltodphänotyp in den *saul1-1* und *saul1-2* T-DNA Insertionsmutanten, welche kein funktionelles SAUL1 mehr produzieren können, identifiziert werden. Dabei zeigten die Pflanzen nach dem Umstellen auf niedrige Lichtbedingungen unter $40 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ eine gelbliche Verfärbung der Blätter und einen Abbau des Chlorophylls. Bei der Untersuchung konnte ein hoher ABA-Gehalt und eine Akkumulation der Aldehydoxidase AAO3, die zur Biosynthese von ABA notwendig ist, dokumentiert werden. Zudem konnten transiente Interaktionen zwischen SAUL1 und AAO3 beobachtet werden (Raab *et al.*, 2009). In weiteren Studien konnten Temperatur- und Luftfeuchteunterschiede als entscheidende Parameter für die Induktion des *saul1-1* Phänotyps beschrieben werden. Dabei ist eine Temperatur unterhalb von 25°C für die Induktion des

Zelltods maßgeblich verantwortlich. Auch eine Luftfeuchtigkeit unterhalb von 40% löst den Zelltod in *saul1-1* Mutanten aus (Disch *et al.*, 2016). In Genexpressionsstudien konnte eine erhöhte relative Expression der Seneszenz-assoziierten Genen *SAG12*, *SAG13* (*SENESCENCE-ASSOCIATED GENE 12/13*) und *ORE1* (*ORESARA1*) gezeigt werden, so dass eine negative Regulation des Seneszenz-assoziierten Zelltods von SAUL1 vermuten werden kann (Raab *et al.*, 2009; Vogelmann *et al.*, 2012). In einer Microarray Studie von *saul1-1* Mutanten zeigten sich bereits 6 Stunden nach Verringerung der Lichtintensität eine signifikante Erhöhung von SA-abhängigen Genen. Dabei war auch ein Anstieg der Expression der Gene *PAD4*, *EDS1*, *PR1* und *EDS16* zu beobachten, die u.a. eine Funktion in der Pathogenabwehr besitzen (Vogelmann *et al.*, 2012). Eine Messung des SA-Gehalts in *saul1-1* Mutanten bestätigte auch den Anstieg von SA bei Ausprägung des Phänotyps. Der in *saul1-1* Mutanten induzierte Zelltod kann durch weitere Mutationen in den Genen *PAD4* oder *EDS1* aufgehoben werden. Die Doppelmutanten *saul1-1 pad4-1* und *saul1-1 eds1-2* weisen keinen *saul1-1* Phänotyp auf. Die Doppelmutanten *saul1-1 npr1* und *saul1-1 sag101-1* sind wiederum nicht in der Lage den Phänotyp aufzuheben (Vogelmann *et al.*, 2012; Disch *et al.*, 2016). Durch den Transfer von *saul1-1* Pflanzen von 25°C auf 20°C kann eine deutliche Chloroplastendegeneration beobachtet werden. Dabei verliert die Thylakoidmembran an Integrität und die Größe der Plastogloboli zur Speicherung von Proteinen und Lipiden steigt an. Zusätzlich ist eine enorme Zellwandverdickung in *saul1-1* Pflanzen zu beobachten. Bei Infektion von *saul1-1* Mutanten mit dem Bakterium *P. syringae* und dem Oomyzeten *H. arabidopsis* Noco2 wurde zudem eine gesteigerte Resistenz im Vergleich zu WT-Pflanzen beobachtet, so dass eine weitere Funktion von SAUL1 in der Regulation der Immunantwort vermutet werden kann (Disch *et al.*, 2016). Dabei agiert SAUL1 oberhalb des Signalweges von PAD4 und EDS1 und ist dabei unabhängig vom NPR1-Signalweg. Generell beeinflusst SAUL1 den Mechanismus des Zelltods, der sowohl bei der Abwehr von Pathogenen wie auch in der Seneszenz von enormer Bedeutung ist. Dabei ist die Feinabstimmung zwischen der Reaktion auf abiotische und biotische Stressfaktoren nicht zu vernachlässigen. Zur Identifizierung des Zusammenspiels dieser Mechanismen kann die weitere Charakterisierung der Funktion von SAUL1 beitragen.

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Reaktion auf abiotische und biotische Stressfaktoren ist in Pflanzen ein wichtiger Mechanismus zur Minimierung von Schäden und zum Erhalt der Ressourcen für das Wachstum und die Reproduktion. Dabei spielt das Ubiquitinsystem für die post-translationelle Modifikation von Proteinen eine wichtige Rolle. Die PUB-ARM E3 Ubiquitinligase SAUL1 ist in der temperaturabhängigen Regulation des Zelltods eingebunden und übt dabei eine Funktion an der Plasmamembran aus. Aufgrund der noch unbekanntenen Regulation des Zelltods sollte in dieser Arbeit die Signaltransduktion des Proteins SAUL1 analysiert werden. Dafür wurde eine EMS-Mutagenese mit *saul1-1* Mutanten durchgeführt, um anschließend nach supprimierten *saul1-1* Pflanzen zu selektieren. Das Hauptprojekt dieser Arbeit sollte sich mit der Identifizierung von Suppressoren von *saul1-1* beschäftigen. Dabei sollte mit genetischen und molekularbiologischen Methoden der Chromosomenbereich des Suppressors eingegrenzt werden, um anschließend durch eine Tiefensequenzierung den Suppressor identifizieren zu können. Durch weitere Lokalisierungs- und Interaktionsstudien sollte die Charakterisierung des Suppressors erfolgen, um Rückschlüsse auf die Funktion von SAUL1 zu erhalten.

In einem weiteren Projekt im Rahmen der Doktorarbeit sollten co-exprimierte Gene von SAUL1 identifiziert und untersucht werden. Es sollte durch Lokalisierung der Genprodukte und durch Phänotypisierung von Genverlustmutanten geprüft werden, ob diese Teil des SAUL1-Netzwerkes sind. Im Folgenden wurde insbesondere die Funktion des *SCO4*-Gens untersucht. Der Fokus lag dabei auf der Analyse des Phänotyps und die anschließende Komplementation der *sco4-2* T-DNA Insertionsmutante. Zusätzlich sollten erste Erkenntnisse über die Promotoraktivität von *SCO4* und die Lokalisierung des Genprodukts gewonnen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeine Puffer und Medien

Die verwendeten Medien wurden durch Autoklavieren sterilisiert.

TE-Puffer (pH 7,5 mit HCl)

Tris	10 mM
EDTA	1 mM

LB-Medium

Trypton	1% (w/v)
NaCl	0,5% (w/v)
Hefeextrakt	0,5% (w/v)
Agar-Agar (optional)	0,8% (w/v)

SOB-Medium

Trypton	2% (w/v)
NaCl	0,05% (w/v)
Hefeextrakt	0,5% (w/v)
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM

SOC-Medium

Trypton	2% (w/v)
NaCl	0,05% (w/v)
Hefeextrakt	0,5% (w/v)
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
Glucose	20 mM

MS-Medium (pH 5,7)

MS-Medium	0,44% (w/v)
MES	0,05% (w/v)
Sucrose	1%(w/v)
Phytoagar	0,8% (w/v)

YPD-Medium (pH 5,8 mit HCl)

Hefeextrakt	1% (w/v)
Pepton	2% (w/v)
Glucose	2% (w/v)

SCAD-Medium (pH 5,8 mit KOH)

YNB	0,66% (w/v)
Aminosäure-Mix	0,066% (w/v)
Glucose	2% (w/v)

Die Zusammensetzung des Aminosäure-Mix ist im Anhang in Tabelle 7-1 aufgelistet.

2.2 Organismen

2.2.1 Bakterien- und Hefestämme

Tabelle 2-1: Auflistung der verwendeten *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* Stämme für molekularbiologische Standardmethoden und Hefe-Zwei-Hybrid System

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5α (<i>E. coli</i>)	F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20</i> φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17(r_K⁻m_K⁺)</i> , λ ⁻	Hanahan 1983
One Shot® Top10 (<i>E. coli</i>)	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 nupG recA1 araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1</i> λ ⁻	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
AH109 (<i>S. cerevisiae</i>)	<i>MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 : : GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3 : : MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i>	James <i>et al.</i> , 1996

Tabelle 2-2: Auflistung der verwendeten *Agrobacterium tumefaciens* Stämme für die Transformation von *Arabidopsis* und Tabak

Stamm	Genotyp	Referenz
C58C1	C58	Deblaere <i>et al.</i> , 1985
GV3101	C58 (Rif ^R), pMP90 (Gent ^R)	Koncz und Schell 1986

2.2.2 *Arabidopsis thaliana*

Tabelle 2-3: Auflistung der verwendeten Ökotypen von *Arabidopsis thaliana*

Ökotyp	Abkürzung	Referenz
Columbia-0	<i>Col-0</i>	NASC The European Arabidopsis Stock Centre, Nottingham, Großbritannien
Landsberg <i>erecta</i>	<i>Ler</i>	NASC The European Arabidopsis Stock Centre, Nottingham, Großbritannien

Tabelle 2-4: Auflistung der verwendeten T-DNA Insertionslinien von *Arabidopsis thaliana*

Linie	Bezeichnung	Betroffenes Gen	ML ID	Referenz
SALK_063974	<i>saul1-1</i>	At1g20780	-	Raab <i>et al.</i> , 2009
SALK_035460	<i>sco4-2</i>	At5g60750	ML015	Savage <i>et al.</i> , 2013
SALK_069931	<i>susa1-14</i>	At1g17600	ML093	Tong <i>et al.</i> ; eingereicht

Tabelle 2-5: Auflistung der in dieser Arbeit hergestellten transgenen *Arabidopsis thaliana* Linien

Linie	Vektor	Agrobakterium	Selektion
<i>sco4-2/pSCO4::SCO4-HA</i>	SCO4 pEarlygate301	C58C1	BASTA®
<i>sco4-2/pSCO4::SCO4-GFP</i>	SCO4 pMDC107	C58C1	Hygromycin
<i>sco4-2/pSCO4::SCO4-GUS</i>	SCO4 pMDC163	C58C1	Hygromycin
<i>saul1-1 susa1-7/35S::GFP-SUSA1</i>	SUSA1 pMDC43	C58C1	Hygromycin

2.3 Vektoren

Tabelle 2-6: Auflistung der verwendeten Vektoren für die transiente Co-Lokalisierung in Arabidopsis-Protoplasten und Tabakzellen

Name	Basisvektor	Promotor	Konstrukt	Referenz
pD1-Ubi-GFP	pD1-AF (DNA Cloning Service, Hamburg)	pUbi1 (Mais)	GFP (mit STLS1 Intron)	Dirk Becker, Universität Hamburg
pBIN19-35S::GFP	pBIN19	CaMV 35S	GFP	Tan <i>et al.</i> , 2012
Wave1RmCherry pNIGEL	pNIGEL 17	pUBQ10 (<i>A. thaliana</i>)	mCherry	Geldner <i>et al.</i> , 2009
ER-rk CD3-959 (ER-Marker)	pBIN20	CaMV 35S	Signalpeptid AtWAK2- mCherry-HDEL	Nelson <i>et al.</i> , 2007
SAUL1 pH7RWG2.0 [JB49]	pH7RWG2.0	CaMV 35S	SAUL1-RFP	Johannes Bergler (FAU Erlangen und Universität Hamburg)

Tabelle 2-7: Auflistung der verwendeten Ausgangsvektoren für die Klonierungen mit der Gateway®-Technologie

Vektorname	Verwendung	Resistenz	Referenz
pENTR™/D-TOPO®	Ausgangsvektor für Gateway® Technologie	Kanamycin	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
pDONR™ 221-P1P4	Ausgangsvektor für MultiSite Gateway® Technologie	Kanamycin	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
pDONR™ 221-P3P2	Ausgangsvektor für MultiSite Gateway® Technologie	Kanamycin	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 2-8: Auflistung der verwendeten Zielvektoren für die Klonierung mit der Gateway®-Technologie

Vektor	Promotor	N-Terminus	C-Terminus	Resistenz	Referenz
pK7FWG2.0	CaMV 35S	-	eGFP	Spectinomycin Streptomycin	Karimi <i>et al.</i> , 2007
pMDC43	CaMV 35S	GFP	-	Kanamycin	Curtis und Grossniklaus 2003
pMDC107	-	-	GFP-His	Kanamycin	Curtis und Grossniklaus 2003
pMDC163	-	-	GUS	Kanamycin	Curtis und Grossniklaus 2003
pEarlygate301	-	-	HA-Tag	Kanamycin	Earley <i>et al.</i> , 2006
pBiFct-2in1-CC	CaMV 35S	-	nYFP/cYFP	Spectinomycin Streptomycin	Grefen und Blatt 2012
pBiFct-2in1-NN	CaMV 35S	nYFP/cYFP	-	Spectinomycin Streptomycin	Grefen und Blatt 2012
pBiFct-2in1-CN	CaMV 35S	cYFP	nYFP	Spectinomycin Streptomycin	Grefen und Blatt 2012
pBiFct-2in1-NC	CaMV 35S	nYFP	cYFP	Spectinomycin Streptomycin	Grefen und Blatt 2012
pGBT9	pADH	BD	-	Ampicillin	FAU Erlangen (Fischer <i>et al.</i> , 2013)
pGAD424	pADH	AD	-	Ampicillin	FAU Erlangen (Fischer <i>et al.</i> , 2013)
pGAD-CF	pADH	-	AD	Ampicillin	FAU Erlangen (Fischer <i>et al.</i> , 2013)

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Sämtliche molekularbiologische Standardmethoden wie Restriktion von DNA, Isolierung von Plasmiden, Auftrennung von DNA-Fragmenten über Agarosegelelektrophorese, Anzucht und Transformation von *E. coli* für die Vermehrung von Plasmiden wurden nach dem Handbuch „Molecular Cloning, A Laboratory Manual“ durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). Die verwendeten Kits für die Aufreinigung und Isolierung von Plasmiden, DNA-Fragmenten sowie RNA und gDNA sind in Tabelle 2-9 aufgelistet und wurden nach Herstellerangaben verwendet.

Tabelle 2-9: Auflistung der verwendeten Kits zur Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

Kit	Firma	Verwendungszweck
NucleoSpin® Plasmid	Machery-Nagel (Düren, Deutschland)	Plasmidisolierung im kleinen Maßstab
NucleoBond® Xtra Midi	Machery-Nagel (Düren, Deutschland)	Plasmidisolierung im großen Maßstab
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Machery-Nagel (Düren, Deutschland)	Gelaufreinigung von PCR-Produkten
innuPREP Plant RNA Kit	Analytik Jena AG (Jena, Deutschland)	RNA-Isolierung

2.4.2 Anzucht von Bakterien

E. coli wurde je nach verwendetem Vektor zur Selektion in LB-Medium mit geeigneten Antibiotika (Tabelle 2-10) kultiviert. Für Kleinkulturen wurden 5 mL LB-Medium mit einer Kolonie angeimpft. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37 °C und 180 rpm. Für einee Großkultur wurden 100 mL LB-Medium mit geeignetem Antibiotikum mit 100 µL einer angezogenen Kleinkultur oder einer Glycerindauerkultur angeimpft.

Die Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens* erfolgte ebenfalls in LB-Medium mit entsprechender Selektion. Die Kultivierung in Flüssigmedium wurde über Nacht bei 28°C und 200 rpm durchgeführt. Auf Festmedium dauerte die Anzucht von einzelnen Klonen etwa 2 Tage.

Für die Kultivierung wurden die Schüttler Infors Multitron Type AJ 120 (Infors AG, Schweiz) und Heidolph Unimax 1010 (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Deutschland) verwendet.

Die langfristige Lagerung von *E. coli* und Agrobakterien erfolgte durch Glycerindauerkulturen bei -80°C. Dafür wurden 300 µL 80% steriles Glycerin mit 700 µL Bakteriensuspension einer Kleinkultur gemischt und eingefroren.

Tabelle 2-10: Auflistung der verwendeten Antibiotika für die Selektion von Bakterien

Antibiotikum	Konzentration	Stocklösung
Ampicillin (Amp)	100 µg/mL	100 mg/mL in H ₂ O
Kanamycin (Kan)	50 µg/mL	50 mg/mL in H ₂ O
Spectinomycin (Spec)	100 µg/mL	100 mg/mL in H ₂ O
Streptomycin (Strep)	100 µg/mL	100 mg/mL in H ₂ O
Rifampicin (Rif)	50 µg/mL	50 mg/mL in DMSO

2.4.3 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien

E. coli

Für die Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen musste zunächst eine Kleinkultur angeimpft werden. Am folgenden Tag wurde eine 100 mL Kultur mit SOB-Medium angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert. Die Zellen wurden auf 50 mL Reaktionsgefäße verteilt, auf Eis 10 min inkubiert und für weitere 10 min bei 3220 x g und 4°C zentrifugiert. Die Pellets wurden in 40 mL TB-Puffer aufgenommen, erneut für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend wie oben beschrieben zentrifugiert. Beide Pellets wurden insgesamt in 7,5 mL TB und 600 µL DMSO resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die kompetenten Zellen in 100 µL Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

TB-Puffer

PIPES (pH 7,0)	10 mM
MnCl ₂	55 mM
CaCl ₂	15 mM
KCl	250 mM

A. tumefaciens

Für die Herstellung kompetenter Agrobakterien wurde eine 5 mL Vorkultur angeimpft. Am folgenden Tag wurde aus der Vorkultur eine 50 mL Hauptkultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-1 angezogen. Die Bakterien wurden in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 3220 x g für 10 min bei 4°C pelletiert. Das Pellet wurde mit 1 mL eiskalter 20 mM CaCl₂-Lösung gewaschen, 5 min auf Eis inkubiert und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Die Zellen wurden erneut in 1 mL 20 mM CaCl₂ aufgenommen und in 100 µL Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.4.4 Transformation von Bakterien

E. coli

Die Transformation von *E. coli* erfolgte über einen Hitzeschock. Dabei wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und mit 10 ng Plasmid oder mit einem Klonierungsansatz versetzt. Die Zellen wurden für 15-30 min auf Eis inkubiert und anschließend einem Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden unterzogen. Die transformierten Zellen wurden mit 250 µL SOC-Medium versetzt und für eine Stunde bei 37°C und 450 rpm inkubiert. Nach der Regeneration der Bakterien wurden diese auf LB-Platten mit entsprechender Selektion ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

A. tumefaciens

Bei der Transformation von Agrobakterien wurden auf die noch gefrorenen kompetenten Zellen 500 ng Plasmid gegeben und diese für 5 min bei 37°C inkubiert. Dabei wurden die Zellen ein bis zwei Mal invertiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert und mit 200 µL

SOC-Medium versetzt. Die Regeneration erfolgte bei 28°C für 1-2 Stunden bei 450 rpm. Die Agrobakterien wurden auf LB-Festmedium mit entsprechender Selektion ausplattiert und für 2 bis 3 Tage bei 28°C inkubiert.

2.4.5 Schnelle Isolierung genomischer DNA

Für die Isolierung genomischer DNA (gDNA) wurde Pflanzenmaterial in 1,5 mL Reaktionsgefäßen mit einem Pistill zermahlen und 200 µL Lysis-Puffer hinzugegeben. Die Proben wurden 5 min bei 20000 x g zentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß mit 150 µL Isopropanol überführt und gemischt. Die gDNA wurde bei -20°C für 15 min gefällt und anschließend für 10 min bei 20000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µL 70% Ethanol durch Zentrifugation gewaschen und anschließend bei 50°C getrocknet. Die gDNA wurde in 40-60 µL ddH₂O aufgenommen und bei 50°C für 20 min resuspendiert. Die isolierte gDNA wurde bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Lysis-Puffer

Tris (pH7,5 mit HCl)	200 mM
NaCl	250 mM
EDTA (pH 8,0)	25 mM
SDS	0,5%

2.4.6 Isolierung genomischer DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion

Qualitativ hochwertige genomische DNA wurde mit Hilfe einer Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert. Dafür wurden Blattproben mit einem Durchmesser von 1,5 cm von 10 Pflanzen in ein 2 mL Reaktionsgefäß mit Stahlkugel überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden mit der Schwingmühle (Tissue Lyser, Qiagen, Hilden, Deutschland) für 2 min bei 28 Hz zermahlen. Zu dem gemörserten Material wurde 800 µL Extraktionspuffer hinzugegeben und für mehrere Sekunden stark gemischt (Vortex-Genie2). Anschließend wurden weitere 800 µL Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) hinzugefügt und ein weiteres Mal auf dem

MATERIAL UND METHODEN

Vortex-Genie2 gemischt. Die Proben wurden für 10 min bei 13500 x g zentrifugiert und die obere Phase wurde anschließend in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Für die Fällung der gDNA wurden 80 µL 3 M Natriumacetat und 800 µL Isopropanol hinzugefügt und anschließend bei -20°C für 30 min inkubiert. Die gDNA wurde durch Zentrifugation bei 4°C und 13500 x g für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 mL 80% Ethanol durch Zentrifugation für 5 min bei 13500 x g gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Die gDNA wurde in 50 µL R100 (RNase A 100 µg/mL in TE-Puffer) resuspendiert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Zum Entfernen der RNase A wurden die Proben erneut mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) im Verhältnis 1:1 gemischt und für 10 min bei 13500 x g zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß überführt und anschließend mit gleichem Volumen Chloroform versetzt und gemischt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 5 min bei 13500 x g wurde der wässrige Überstand noch zwei weitere Male mit Chloroform gewaschen, um restliches Phenol zu entfernen. Die Ethanolfällung erfolgte mit 1/10 Volumen 3M Natriumacetat und 2,5 Volumen Ethanol für 4 Stunden bei -80°C. Die gDNA wurde für 30 min bei 4°C und 13500 x g pelletiert und danach zwei Mal mit 80% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µL ddH₂O aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde am NanoDrop™ 2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt und die Qualität auf einem 1 % Agarosegel kontrolliert. Die isolierte gDNA wurde bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Extraktionspuffer

N-Lauryl-Sarkosin	1%
Tris (pH 8,0 mit HCl)	100 mM
EDTA (pH 8,0)	10 mM
NaCl	100 mM

R100

RNaseA Stock	10 µL
TE-Puffer (pH 7,5)	90 µL

RNase A Stocklösung

RNase A	100 mg
NaCl	15 mM
Tris (pH 8,0 mit HCl)	10 mM

2.4.7 Isolierung von RNA mittels TriFast™

Die Isolierung von Ribonukleinsäuren (RNA) wurde mit Hilfe des peqGOLD TriFast™ Reagenz (PEQLAB, Erlangen, Deutschland) durchgeführt. Dafür wurden 100 – 200 mg Pflanzenmaterial mit einer Stahlkugel in ein 2 mL Reaktionsgefäß gegeben und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden anschließend in der Schwingmühle (Tissue Lyser, Qiagen, Hilden, Deutschland) für 2min bei 28 Hz gemahlen. Zu dem pulverisierten Pflanzenmaterial wurde 1 mL peqGOLD TriFast™ hinzugefügt und für 5 min auf einem Tischschüttler (Thermomixer, Eppendorf, Deutschland) bei 1400 rpm inkubiert. Anschließend wurden 200 µL Chloroform dazu gegeben, bis zur Homogenität auf dem VortexGenie2 gemischt und für 8 min auf Eis inkubiert. Nachdem Die Proben für 10 min bei 13500 x g und 4°C zentrifugiert wurden, konnte die obere wässrige Phase in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß mit 500 µL Isopropanol überführt werden. Die RNA wurde für 30 min bei -20°C gefällt und erneut zentrifugiert (siehe oben). Das Pellet wurde mit 1 mL 80% Ethanol gewaschen, anschließend für 5 min bei 13500 x g zentrifugiert und danach der Überstand entfernt. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur unter dem Abzug getrocknet und anschließend in 50 µL RNase-freiem ddH₂O bei 58°C resuspendiert. Die RNA-Konzentration wurde am NanoDrop™ 2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt und die Qualität auf einem 1,5 % Agarosegel kontrolliert. Die isolierte RNA wurde bei -20°C oder für längere Lagerung bei -80°C aufbewahrt.

2.4.8 Herstellung von cDNA mittels Reverser Transkriptase

Für die Herstellung von codierender DNA (cDNA) für qPCR-Analysen wurde das *QuantiTect® Reverse Transcription Kit* von Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Für diverse Klonierungen wurde die cDNA mit dem *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) nach Angaben des Herstellers synthetisiert. Pro Reaktion wurden 0,5 bis 1 µg RNA eingesetzt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

2.4.9 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*Polymerase Chain Reaction*; PCR) ermöglicht eine enzymatische Vervielfältigung einer DNA-Sequenz aufgrund von definiert flankierenden Oligonukleotiden (auch Primer genannt) (Mullis und Faloona 1987). Für die Genotypisierung von T-DNA Insertionsmutanten wurde die DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Herstellerangaben in einem 20 µL Ansatz verwendet. Als Template wurden 2 µL gDNA (siehe 2.4.5) eingesetzt. Für die Amplifikation von Klonierungsfragmenten wurde die Phusion Highfidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Angaben des Herstellers in einem 20 µL Ansatz eingesetzt, wobei als Template 1 µL cDNA oder gDNA verwendet wurden. In den folgenden drei Tabellen (Tabelle 2-11, Tabelle 2-12, Tabelle 2-13) sind die verwendeten PCR-Programme dargestellt.

Tabelle 2-11: PCR-Programm für eine Standard-PCR mit der DreamTaq Polymerase

Temperatur	Zeit	Zyklen
98°C	3 – 5 min	1
98°C	30 s	30
55 – 58°C	30 s	
72°C	1 min/kb	
72°C	5 min	1
10°C	Pause	1

Tabelle 2-12: PCR-Programm für die Verwendung der Phusion Highfidelity DNA Polymerase

Temperatur	Zeit	Zyklen
98°C	3 – 5 min	1
98°C	30 s	40
T _m + 3°C	30 s	
72°C	30 s/kb	
72°C	5 min	1
10°C	Pause	1

Tabelle 2-13: Zwei-Phasen-PCR-Programm für die Verwendung der Phusion Highfidelity DNA Polymerase

Temperatur	Zeit	Zyklen
98°C	3 – 5 min	1
98°C	30 s	
T _m + 3°C	30 s	10
72°C	30 s/kb	
98°C	30 s	
72°C	30 s/kb + 30 s	30
72°C	5 min	1
10°C	Pause	1

2.4.10 Quantitative Echtzeit-PCR

Für die relative Bestimmung von Transkriptmengen wurde eine quantitative Echtzeit-PCR (*quantitative realtime-PCR*, qPCR) durchgeführt. Dafür wurde das QuantiTect SYBR® Green und der Thermocycler Rotor-Gene Q 2000 der Firma Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland) verwendet. Die eingesetzte cDNA wurde 1:2 mit ddH₂O verdünnt. Als Referenz diente die Expression des Genes *POLYUBIQUITIN10 (UBI10)* und für jeden Ansatz wurden zwei technische Replikate angesetzt. Je nach Fragestellung wurden bis zu drei biologische Replikate angefertigt. Eine Übersicht der verwendeten Oligonukleotide ist im Anhang in Tabelle 7-3 zu finden.

qPCR-Ansatz:

2x SYBR®Green	5 µL
Primer fw [10 µM]	0,4 µL
Primer rev [10 µM]	0,4 µL
cDNA	0,5 µL
ddH ₂ O	3,5 µL

Tabelle 2-14: qPCR-Programm für Amplifikatgrößen von ca. 100 bp

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	5 min	1
95°C	10 s	40
60°C	30 s	
60 - 95°C	Schmelztest	1

Die Auswertung der relativen Expression erfolgte mit dem Programm Rotor-Gene Q Series Software (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland). Dafür wurde der *Threshold* der Fluoreszenz auf 0,04 festgelegt und somit der Ct-Wert (*cycle threshold*) für jede Reaktion bestimmt. Der Ct-Wert gibt den Zyklus an, in dem die Fluoreszenz beginnt exponentiell zu steigen. Die Amplifikationsrate wurde auf 1,8 festgelegt. Der Ct-Mittelwert der technischen Replikate wurde in Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA) importiert, um anschließend den ΔCt -Wert wie folgt zu bestimmen.

$$\Delta Ct = \frac{1,8^{Ct[UBI10]}}{1,8^{Ct[GOI]}}$$

Aus den ΔCt -Werten biologischer Replikate wurden der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt und graphisch dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Students T-Tests für zwei Stichproben.

2.4.11 Sequenzanalyse von DNA nach Sanger

Bei sämtlichen Klonierungen wurden die Ausgangsvektoren mit den Oligonukleotiden M13 uni (-21) und M13 rev (-29) bei der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) mittels Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) kontrolliert. Bei Konstrukten mit einer Größe ab ca. 1200 bp wurden zusätzliche Sequenzierprimer erstellt, um eine komplette Abdeckung zu gewährleisten. Die Auswertung erfolgte über eine Sequenzassemblierung mit dem Programm Clone Manager 9 Professional Edition (Scientific and Educational Software).

2.4.12 Klonierungsstrategien

Sämtliche Klonierungs- und Sequenzierprimer sind bei der jeweiligen Klonierungsbeschreibung in dem Kapitel 2.4.13 aufgelistet. Die verwendeten Ausgangs- und Zielvektoren wurden in Tabelle 2-7 und Tabelle 2-8 zusammengefasst.

2.4.12.1 Gateway® - Technologie

Die für diese Arbeit relevanten Konstrukte wurden mittels Gateway® - Technologie (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) hergestellt. Dabei werden spezifische Rekombinationsstellen in den Vektoren genutzt, um aus einem Ausgangsvektor in diverse Zielvektoren klonieren zu können. Bei der Amplifikation der jeweiligen Gene wurde an das 5'-Ende die Sequenz CACC angehängt, so dass eine gerichtete Klonierung in den Ausgangsvektor pETNTR™/D-TOPO® mit Hilfe der kovalent gebundenen Topoisomerase erfolgen konnte. Der Ausgangsvektor verfügt über die flankierenden Rekombinationsstellen *attL1* und *attL2* und kann so für eine Rekombination des jeweiligen Gens in einen Zielvektor genutzt werden. Die Zielvektoren enthalten neben den Rekombinationsstelle *attR1* und *attR2* das *ccdB*-Gen, welches zur negativen Selektion dient. Mittels LR-Clonase™ kann das Gen von Interesse von dem Ausgangsvektor in diverse Zielvektoren mit unterschiedlichen Fusionsproteinen und Promotoren rekombiniert werden. Die Klonierung in den Ausgangsvektor wurde in einem halben Ansatz nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die LR-Clonase™ Reaktion wurde dem Ansatz ein Viertel bis die Hälfte der angegebenen Menge des Enzyms hinzugefügt. Weitere Schritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Verfügten der Zielvektor sowie der Ausgangsvektor über eine identische Selektionskassette, wurde der Ausgangsvektor zunächst mit dem Restriktionsenzym *MluI* geschnitten. Das Fragment mit dem Gen von Interesse wurde über ein Agarosegel aufgereinigt und anschließend für die LR-Clonase™ Reaktion nach Herstellerangaben eingesetzt.

2.4.12.2 MultiSite Gateway® - Technologie zur Herstellung der BiFC Vektoren

Für die Klonierung der 2in1 BiFC-Vektoren (Grefen und Blatt 2012) wurde die MultiSite Gateway®-Technologie (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Wie bei der

Gateway®-Technologie wurden Rekombinationsstellen genutzt, um in diesem Fall zwei Gene von Interesse in den Zielvektor zu klonieren. Dafür wurden Oligonukleotide mit den Rekombinationsstellen *attB1* und *attB4* bzw. *attB3* und *attB2* erstellt, so dass die in einer Zwei-Phasen-PCR (2.4.9) entstandenen Amplifikate in eine Rekombinationsreaktion eingesetzt werden konnten. Als Ausgangsvektoren dienten zwei pDONR221TM-Vektoren, welche sich in den Rekombinationsstellen unterschieden (*attP1* und *attP4* bzw. *attP3* und *attP2*). Das Amplifikat mit den Rekombinationsstellen *attB1* und *attB4* wurde mittels BP-ClonaseTM in den pDONR221TM P1P4 und das zweite Gen von Interesse mit den Rekombinationsstellen *attB3* und *attB2* in den pDONR221TM P3P2 kloniert. Beide Ausgangsvektoren wurden mittels LR-ClonaseTM in den jeweiligen BiFC-Vektoren rekombiniert. Dabei wurden die jeweiligen Gene im Vektor pDONR221TM P3P2 mit dem nYFP und die Gene im Vektor pDONR221TM P1P4 mit dem cYFP fusioniert. Je nach BiFC-Vektor konnten die splitYFP-Fusionen N- oder C-terminal erfolgen.

2.4.12.3 Klonierung mit der *wobble*-Base

Für die N- oder C-terminale Fusion von diversen Fluoreszenzproteinen oder Markern an ein Zielprotein muss bei N-terminaler Fusion das Zielgen mit einem Stoppcodon aufhören. Wiederum wird bei C-terminaler Fusion das Stoppcodon am Zielgen entfernt. Um für eine Klonierung mit oder ohne Stoppcodon keine zwei Oligonukleotide zu benötigen und zwei unabhängige Klonierungen durchzuführen, wurde an den reversen Primer des Zielgens die Sequenz 5`-GGATC**M**-3` angehängt. Das PCR-Produkt endete in diesem Fall mit der Sequenz **K**GATCC, wobei für das K ein G oder ein T eingebaut wurde. Im Fall eines G entstand die *Bam*HI Restriktionsschnittstelle GGATCC, wurde allerdings ein T eingebaut entstand ein Stoppcodon (**T**GATCC). Bei der Klonierung in den Ausgangsvektor pENTRTM/D-TOPO® (2.4.12.1) entstanden in einer Klonierung zwei unterschiedliche Plasmide, welche durch eine Restriktion mit *Bam*HI und *Not*I unterschieden werden konnten. Die Bestätigung erfolgte zusätzlich über die Sanger-Sequenzierung bei der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland).

2.4.13 Herstellung relevanter Konstrukte

Sämtliche Ausgangsvektoren wurden mittels Sanger-Sequenzierung (2.4.11) auf deren Richtigkeit überprüft. Als Referenz dienten die annotierten Sequenzen der TAIR10 Datenbank (www.arabidopsis.org). Die Vektorkarten der hergestellten Konstrukte sind im Anhang 7.1 zu finden.

GFP-Fusionskonstrukte von *SCO4* (bTK7 und bTK8)

Für die Herstellung der GFP-Fusionskonstrukte von *SCO4* für die Lokalisierung wurden die Oligonukleotide der Tabelle 2-15 verwendet. Für die Amplifikation wurde cDNA als Template verwendet, so dass die codierende DNA-Sequenz (CDS) des Gens *SCO4* (At5g60750) in den Ausgangsvektor pENTR™/D-TOPO® kloniert werden konnte. Anschließend wurden die Konstrukte mittels Gateway®-Technologie in die Zielvektoren pK7FWG2.0 und pMDC43 kloniert.

Tabelle 2-15: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide für die Klonierung des Gens *SCO4*

ID [pTK]	Name	Sequenz [5' --> 3']	Verwendungszweck
5	At5g60750c+1_CACC_s	CACCATGTTGACCTCTTCTTGCTC	Klonierung in pENTR
6	At5g60750c+1044_wob_as	GGATC <u>M</u> TTCGCATCAATTCCATG	Klonierung in pENTR
13	At5g60750c+410s	GTTTCATGGATGATCCCATTC	Sequenzierung

SCO4 Komplementationskonstrukte (bTK65, bTH66 und bTK67)

Für die Herstellung der *SCO4*-Komplementationskonstrukte wurde eine Promotorregion 1747 Nukleotide inklusive 5'UTR stromaufwärts des Startcodons ausgewählt und zusammen mit der genomischen Region von *SCO4* ohne Stoppcodon in den Ausgangsvektor kloniert. Als Zielvektoren dienten die Vektoren pMDC107 (GFP-Fusion), pMDC163 (GUS-Fusion) und pEarlygate301 (HA-Fusion). Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2-16 dargestellt.

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 2-16: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide für die Klonierung des Komplementationskonstrukts pSCO4::SCO4

ID [pTK]	Name	Sequenz [5' --> 3']	Verwendungszweck
144	At5g60750g-1747s	CACCGCAGCAATCTTACCATATGTTCC	Klonierung in pENTR
137	At5g60750g+2125as	TCGCATCAATTCCATGAATACAAAG	Klonierung in pENTR
138	At5g60750g-1406s	CATCCAGGCTCACATCCAGAC	Sequenzierung
139	At5g60750g-746s	CAAGGAGACATTAGACAATTG	Sequenzierung
140	At5g60750g-14s	CAGATTCCCATCCCATGTTG	Sequenzierung
141	At5g60750g+745s	GTTAGGACTGCAGCAGAATC	Sequenzierung

GFP-Fusionskonstrukt von SUS A1

Für die Herstellung der GFP-Fusionskonstrukte für die Lokalisierung von SUS A1 wurden die Oligonukleotide aus Tabelle 2-17 verwendet. Die Amplifikation erfolgte auf gDNA- und cDNA-Ebene, so dass die genomische Sequenz wie auch die CDS des Gens *SUS A1* (At1g17600) in den Ausgangsvektor pENTR™/D-TOPO® kloniert werden konnte (bTK84 und bTK85: SUS A1g pENTR; bTK115 und bTK116: SUS A1c pENTR). Anschließend wurde der genomische Teil von *SUS A1* mittels Gateway®-Technologie in den Zielvektor pMDC43 kloniert (bTK72: SUS A1 pMDC43).

Die Ausgangsvektoren mit der CDS des Gens *SUS A1* dienten der Klonierung in die Hefe-Zwei-Hybrid-Vektoren pGBT9 (bTK135), pGAD-cF und pGAD424 (Jara Oppenheimer, Masterarbeit, Universität Hamburg, AG Prof. Dr. Hoth).

Tabelle 2-17: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide für die Klonierung des Gens *SUS A1*

ID [pTK]	Name	Sequenz [5' --> 3']	Verwendungszweck
245	At1g17600g+1f_CACC	CACCATGGTGTCTCTCTGCAC	Klonierung in pENTR
246	At1g17600g+3547r_wob	GGATCMCTTGAAAACACGCAGGAG	Klonierung in pENTR
249	At1g17600g+46f	CTCAGCTCCGTGGAGAAGAC	Sequenzierung
250	At1g17600g+919f	GTGGAAGCTGGATGCCAAGAG	Sequenzierung
251	At1g17600g+1714f	CCTGACCTGACGAGTTTCTG	Sequenzierung
252	At1g17600g+2571f	CCCATTATATCGGCGATGAGTC	Sequenzierung
261	At1g17600c+1626f	CATGGAGGCCAGTGTTGTTG	Sequenzierung

Klonierung der SUS A1-Domänen

Für die Interaktionsstudie (BiFC) der einzelnen SUS A1-Domänen wurden folgende Konstrukte definiert (Tabelle 2-18):

Tabelle 2-18: Definierte Bereiche der SUS A1 Domänen für die Klonierung der BiFC Konstrukte

Domänen	CDS Position	Aminosäureposition	Kommentar
SUS A1-TIR	1-462 (Exon1)	1-154	-
SUS A1-LRR	1567-3150 (ab Exon3)	523-1050	-
SUS A1-TIR-NBS	1-1566	1-522	mit Intron

BiFC-Konstrukte von SUS A1 mit SAUL1 bzw. CHS1

Für die Interaktionsstudien zwischen SUS A1 und SAUL1 bzw. CHS1 (At1g17610) wurden mit Hilfe der MultiSite Gateway®-Technologie 2in1-BiFC Konstrukte (Grefen und Blatt 2012) hergestellt. Dafür wurde die CDS von SAUL1 und CHS1 bzw. der genomische Teil und die CDS von SUS A1 in die Ausgangsvektoren pDONR221 P1P4 bzw. pDONR221 P3P2 kloniert. Anschließend wurden die Ausgangsvektoren in unterschiedlichen Kombinationen in die BiFC-Zielvektoren transferiert. Die verwendeten Oligonukleotide und die verschiedenen pDONR221-Vektoren mit den verwendeten Primerkombinationen sind der Tabelle 7-4 und Tabelle 7-5 (Anhang) zu entnehmen und die daraus resultierenden BiFC-Konstrukte sind in Tabelle 2-19 zu finden.

Tabelle 2-19: Auflistung der hergestellten BiFC Konstrukte mit Hilfe der MultiSite Gateway® - Technologie

ID [bTK]	pBiFCt-2in1	nYFP	cYFP
96	BiFC NC	SUS A1 (gDNA)	SAUL1
97	BiFC CN	SAUL1	SUS A1 (gDNA)
81	BiFC CC	SAUL1	SUS A1(CDS)
82	BiFC CC	SUS A1 (gDNA)	SAUL1
83	BiFC CC	SAUL1	SUS A1 (gDNA)
123	BiFC CC	SAUL1	SUS A1-TIR
124	BiFC CN	SAUL1	SUS A1-TIR

Tabelle 2-19: Auflistung der hergestellten BiFC Konstrukte mit Hilfe der MultiSite Gateway® Technologie
(Fortsetzung)

ID [bTK]	pBiFCt-2in1	nYFP	cYFP
125	BiFC CC	SAUL1	SUSA1-TIR-NBS
126	BiFC CN	SAUL1	SUSA1-TIR-NBS
127	BiFC CC	SAUL1	SUSA1-LRR
98	BiFC CC	SAUL1	SAUL1
128	BiFC CC	CHS1	SAUL1
129	BiFC NC	CHS1	SAUL1
130	BiFC CN	CHS1	SUSA1 (gDNA)

Hefe-Zwei-Hybrid (Y2H) Vektoren von SAUL1

Der Y2H-Vektor SAUL1 Δ N Δ C pGBT9 wurde von Johannes Bergler (Diplomarbeit, FAU Erlangen, AG Hoth) zur Verfügung gestellt. Der Vektor SAUL1 Δ N Δ C pGAD424 wurde in dieser Arbeit durch die Gateway®-Technologie hergestellt (bTK136). Dabei stand der Ausgangsvektor SAUL1 Δ N Δ C pENTR in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hoth zur Verfügung (Drechsel *et al.*, 2011).

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Isolierung von Gesamtprotein aus Tabak

Zur Isolierung von Gesamtprotein aus infiltriertem Tabak wurden die infiltrierten Blattstellen in ein Reaktionsgefäß mit Stahlkugel gegeben und mit Hilfe von flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Material wurde mit der Schwingmühle (Tissue Lyser, Qiagen, Hilden, Deutschland) für 2 min bei 28 Hz zerkleinert. Es wurden anschließend 700 μ L Phenol (pH 8,0) und 700 μ L *Crude*-Extrakt-Puffer (30% Sucrose, 2% SDS, 5% DTT) hinzugegeben und gemischt. Zur Phasentrennung wurden die Proben bei 10000 x g für 5 min zentrifugiert. 300 μ L der oberen wässrigen Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1,5 mL 0,1M Ammoniumacetat (in Methanol) versetzt. Es folgte eine Fällung bei -20°C für 45 min. Anschließend wurde das Gesamtprotein bei 10000 x g für 8 min pelletiert. Das Pellet wurde zweimal mit 800 μ L 0,1M Ammoniumacetat (in Methanol) und zwei Mal

mit 800 μ L 80% Aceton gewaschen. Das Pellet wurde unter dem Abzug getrocknet und in 100 μ L 6x Probenpuffer aufgenommen.

6x Probenpuffer

125 mM	Tris (pH 6,8 mit HCl)
6 %	SDS
0,03 %	Bromphenolblau
48 %	Glycerol
9 %	2-Mercaptoethanol

2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Durchführung einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Gele *TruPAGE™ Precast Gels* mit einem Acrylamid-Gradienten von 4-20% (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Die Proben wurden in 1x Probenpuffer aufgetragen und bei 120 V für 1,5 Stunden im Gel aufgetrennt. Als Größenstandard wurde die *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Anschließend wurde das Gel für einen Immunoblot verwendet oder mit einer Coomassie-Blau Färbung gefärbt (Coomassie Färbung R-250, Biorad, Hercules, USA).

2.5.3 Immunoblot

Für die Immunodetektion von Fusionsproteinen wurden die Proteine durch einen *semidry*-Transfer auf eine Nitrozellulosemembran (Roti®-NC; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) transferiert. Dafür wurden die Membran und Whatman-Papier (Whatman 3MM Chr; GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) in Transferpuffer (50 mM Tris, 40 mM Glycin, 20 % Methanol) äquilibriert. Der Transfer der Proteine erfolgte mit dem Fastblot B43 (Biometra, Göttingen, Deutschland) bei 60 mA für 1 Stunde und 15 min.

Anschließend wurde die Membran in TBS-T-Puffer (50 mM Tris (pH 7,6 mit HCl), 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20®) für 5 min gewaschen und anschließend in 5% Milchpulver (in TBS-T) über Nacht bei 4°C unter Schwenken blockiert. Am folgenden Tag wurde die Membran zwei Mal mit TBS-T gewaschen und anschließend mit dem Antikörper Anti-GFP (IgG aus Kaninchen; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:3500 in TBS-T mit 1% Milchpulver versetzt. Die Inkubation erfolgte für 2 Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken. Die Membran wurde dann erneut drei Mal mit TBS-T gewaschen und mit dem 2. Antikörper Ziege-Anti-Kaninchen-HRP (*Goat Anti-Rabbit IgG Antibody, Peroxidase Conjugated*; Merck Millipore, Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:5000 in TBS-T mit 1% Milchpulver versetzt. Die Inkubation erfolgte ebenfalls für 2 Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken. Anschließend wurde die Membran in TBS-T gewaschen und bis zur Detektion in ddH₂O aufbewahrt.

Zur Erzeugung eines Chemilumineszenz-Signals wurde die Membran in 5 mL Lösung 1 (3 µL 50% H₂O₂ in 5 mL 100 mM Tris-HCl, pH 8,5) und 5 mL Lösung 2 (72 µL Coumarinsäure-Lösung (90 mM Coumarinsäure und 250 mM Luminol) in 5 mL 100 mM Tris-HCl, pH 8,5) für 1 min unter Schwenken inkubiert. Die Chemilumineszenz konnte anschließend am LAS-3000 (*Luminescent Image Analyzer*; Fujifilm, Tokyo, Japan) detektiert werden.

2.6 Methoden zur Arbeit mit Pflanzenmaterial

2.6.1 Anzucht von *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana benthamiana*

Für die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* auf Erde wurde ein Erde/Sand/Blähton Gemisch im Verhältnis 6,5:2,5:1 verwendet und mit Neudomück® (1 mL/L) und Previcur® (2,5 mL/L) behandelt. Die Samen wurden einzeln auf der Erde ausgebracht und anschließend für 2 bis 3 Tage bei 4°C gelagert. Die Anzucht der *Arabidopsis*-Mutanten und Suppressorlinien erfolgte unter Langtagbedingungen in einem Klimaschrank (Percival, Plant Climatics, Wertingen, Deutschland) oder einer Klimakammer (Weiss Klimatechnik GmbH, Reiskirchen-Lindenstruth, Deutschland). Die Wildtyp-Pflanzen (*Col-0*) für die Protoplastenisolierung wurden unter Kurztagbedingungen angezogen. Die Anzucht von *Nicotiana benthamiana* erfolgte bei 18°C im Gewächshaus.

Die Dokumentation der Temperatur und Luftfeuchte in den Kammern und Schränken erfolgte mit Datenloggern (OM-EL-USB-2-LCD-PLUS, OMEGA Engineering Inc., Deckenpfronn, Deutschland) und das Licht wurde mit dem Lichtmessgerät LI-250A *light meter* mit einem Quantumsensor (LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Deutschland) gemessen.

Tabelle 2-20: Darstellung der Wachstumsbedingungen in einem Klimaschrank (Percival)

Wachstumsbedingungen in einem Klimaschrank

Temperatur	24-25°C oder 20°C
Luftfeuchte	60-80%
Licht	120 $\mu\text{M/s}\cdot\text{m}^2$
Lichtperiode	16 Stunden

Tabelle 2-21: Darstellung der Wachstumsbedingungen in einer Klimakammer unter Langtagbedingungen

Wachstumsbedingungen in einer Klimakammer (Langtag)

Temperatur	22-24°C
Luftfeuchte	35-50%
Licht	100 $\mu\text{M/s}\cdot\text{m}^2$
Lichtperiode	16 Stunden

Tabelle 2-22: Darstellung der Wachstumsbedingungen in einer Klimakammer unter Kurztagbedingungen

Wachstumsbedingungen in einer Klimakammer (Kurztag)

Temperatur	18-23°C
Luftfeuchte	70-80%
Licht	90 $\mu\text{M/s}\cdot\text{m}^2$
Lichtperiode	8 Stunden

2.6.1 Sterile Anzucht von *A. thaliana* auf MS-Festmedium

Für die sterile Anzucht von *Arabidopsis* wurden die Samen für 4 Stunden in einem Exsikkator mit Chlorgas (60 mL 32% Salzsäure und 3 mL Natriumhypochlorid) sterilisiert. Anschließend wurden die Samen einzeln mit einem sterilen Zahnstocher auf MS-Festmedium ausgebracht und für 2-3 Tage bei 4°C gelagert. Daraufhin wurden die Platten je nach Versuchsaufbau in Klimaschränken mit einer Temperatur von 24°C oder 20°C (Percival, Plant Climatics, Wertingen, Deutschland) unter Langtagbedingungen kultiviert.

2.6.2 Arbeit mit T-DNA Insertionslinien

Die verwendeten T-DNA Insertionslinien wurden beim *European Arabidopsis Stock Centre* (NASC, Nottingham, Großbritannien) bestellt und mit den durch die Internetpräsenz T-DNA Express vorgegebenen Oligonukleotiden genotypisiert (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>). Dabei wurden die LP- und RP-Primer für das WT-Allel kombiniert, wobei für das Allel der T-DNA die Oligonukleotide RP und LBa1 verwendet wurden. Die Oligonukleotide sind im Anhang in der Tabelle 7-2 zu finden.

2.6.3 Induktion des Phänotyps bei *saul1-1* Mutanten

Die Anzucht der *saul1-1* Mutanten erfolgte auf Erde unter Langtagbedingungen in einem Klimaschrank. Zur Induktion des *saul1-1* spezifischen Phänotyps wurden die *saul1-1* Mutanten 12-14 Tagen bei 24-25°C angezogen und anschließend in einen Klimaschrank mit einer Temperatur von 20°C umgestellt.

2.6.4 Transformation von *A. thaliana*

Mit der von Clough und Bent (1998) entwickelten *Floral-Dip* Methode wurde die Transformation von *A. thaliana* durchgeführt. Dafür wurden die Pflanzen wie oben beschrieben in

einer Klimakammer mit Langtagbedingungen angezogen (Tabelle 2-21). Nachdem die Pflanzen mehrere Infloreszenzen aufwiesen, wurden die bestehenden Blüten abgeschnitten, damit 2-4 Tage später geschlossene Blüten für die Transformation zur Verfügung standen. Für die Transformation wurde eine 200 mL Kultur von Agrobakterien mit dem jeweiligen Konstrukt über Nacht bei 28°C und 200 rpm angezogen. Die Zellen wurden am folgenden Tag für 10 min bei 3220 x g zentrifugiert und anschließend in 5% Saccharose-Lösung mit 0,05% Silwet-77 resuspendiert. Die Blütenstände wurden für 45 Sekunden in die Bakteriensuspension gedippt und anschließend wurden die Pflanzen in eine Schale mit feuchten Tüchern gelegt und mit einer Haube abgedeckt. Die Pflanzen wurden 24 Stunden unter einem Tisch in der Klimakammer aufbewahrt. Nach einer Wiederholung der Transformation nach 7 Tagen wurden die Pflanzen für 1 bis 2 Wochen kultiviert und anschließend für einen Monat zum Abreifen getrocknet.

2.6.5 Selektion transgener *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen

Die Selektion transgener Arabidopsis-Pflanzen erfolgte je nach Selektionsmarker auf Erde oder auf MS-Festmedium mit entsprechendem Antibiotikum. Für eine BASTA®-Selektion wurden die Samen auf Erde in einer großen Schale großzügig ausgebracht und in einer Klimakammer unter Kurztagbedingungen herangezogen. 4 Tage nach der Keimung wurden die Keimlinge im Abstand von 4 Tagen zweimal mit BASTA® (200 mg/L) besprüht. Die Selektion mit Hygromycin B erfolgte auf MS-Festmedium mit einer Konzentration von 20 mg/L. Die Samen wurden steril ausgebracht und für 2-3 Wochen in einem Klimaschrank bei 24°C kultiviert. Resistente Pflanzen wurden vereinzelt, auf Erde umgesetzt und bis zur Reife kultiviert.

2.6.6 Protoplastenisolierung und Transformation

Für die Herstellung von Mesophyllprotoplasten aus *Arabidopsis thaliana* wurden Blätter sechs Wochen alter Pflanzen (Anzucht unter Kurztagbedingungen) auf der Unterseite mit Sandpapier angeraut und in eine Schale mit 0,5fachen MCP-Puffer gelegt. Die Blätter wurden in einer Enzymlösung für 1,5 Stunden bei 50 rpm und 26°C im Dunklen inkubiert. Die Protoplasten wurden

anschließend durch ein Nylonnetz (50 µm) gefiltert, in einem 50 mL Reaktionsgefäß aufgefangen und bei 100 x g für 5 min ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 20 mL MaMg-Puffer resuspendiert und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Die pelletierten Protoplasten wurden in 1 mL MaMg-Puffer aufgenommen und in 150 µL Aliquots pro Transformationsansatz verteilt. Für die Transformation wurden 20 µg Plasmid und 165 µL PEG-Ca-Puffer zu den Protoplasten gegeben und unter vorsichtigem Drehen der Probe gemischt. Die Transformationsansätze wurden für 30 min bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Zum Stoppen der Transformation wurde anschließend in drei Schritten 500 µL, 1 mL und 1,5 mL W5-Puffer hinzugefügt und die Proben bei 60 x g für 3 min ohne Bremse zentrifugiert. Die Protoplasten wurden erneut in 3 mL W5-Puffer gewaschen, zentrifugiert (60 x g für 3 min) und in 3 mL W5-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert und am folgenden Tag mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie (2.7.1) analysiert.

Zur Kontrolle der Transformation von Protoplasten wurde freies GFP unter der Kontrolle des Ubi1-Promotors verwendet. Dafür wurde der Vektor pD1-Ubi-GFP eingesetzt, welcher von Dr. Dirk Becker (Universität Hamburg) zur Verfügung gestellt wurde.

MCP-Puffer

Sorbitol	500 mM
CaCl ₂	1 mM
MES (pH 5,7)	10 mM

Enzymlösung

MCP-Puffer	10 mL
Macerozym R10	0,25% (w/v)
Cellulase R10	1% (w/v)

MaMg-Puffer (pH 5,7)

Sorbitol	450 mM
MgCl ₂	15 mM
MES	5 mM

PEG-Ca-Puffer

PEG 4000 (Fluka)	40% (w/v)
Mannitol	200 mM
CaCl ₂	100 mM

W5-Puffer

NaCl	154 mM
CaCl ₂	125 mM
KCl	5 mM
Glukose	5 mM
MES (pH 5,7)	1,5 mM

2.6.7 Transiente Expression in *N. benthamiana*

Für die transiente Expression von Fusionsproteinen in Tabakblättern wurden 10 mL einer Agrobakterienkultur mit dem jeweiligen Konstrukt über Nacht bei 28°C kultiviert. Die Bakterien wurden am folgenden Tag für 10 min bei 3220 x g pelletiert und in 10 mL Infiltrationslösung resuspendiert. Die Suspension wurde für 2 Stunden bei 28°C und 150 rpm inkubiert. Für die Infiltration der Agrobakterien wurden 6 Wochen alte Tabakpflanzen verwendet. Die Bakterien wurden mit einer Spritze in die Unterseite der Blätter infiltriert, wobei pro Expressionskonstrukt zwei Pflanzen infiltriert wurden. Die infiltrierten Blätter konnten nach 2-3 Tagen mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie (2.7.1) untersucht werden. Zur Unterdrückung der RNA-Interferenz wurde eine Co-Infiltration mit dem P19-Protein durchgeführt (Lakatos *et al.*, 2004).

<u>Infiltrationslösung:</u>	0,1 M	Natrium-Phosphat Puffer (pH 6,0)
	10 mM	MgCl ₂
	0,01 mM	Acetosyringon

2.7 Bildgebende Verfahren

2.7.1 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

Für die subzelluläre Lokalisierung von Fusionsproteinen in Arabidopsis-Protoplasten und Tabakzellen sowie die Analyse der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC) wurde die Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie unter der Verwendung der Leica TCS SP8 konfokalen Plattform (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) und des CLSM (*confocal laser scanning microscope*, LSM780, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt. Zur Detektion von GFP-Fusionskonstrukten wurden die Zellen mit der Wellenlänge 488 nm angeregt, um anschließend die GFP-Fluoreszenz im Detektionsfenster von 496 nm bis 511 nm (bzw. von 495 nm bis 527 nm) aufzunehmen. Für die Co-Lokalisation mit dem freien *mCherry* Marker Wave1RmCherryNIGEL (Geldner *et al.*, 2009) und dem *mCherry* Marker ER-rk CD3-959 für die Lokalisierung im endoplasmatischem Retikulum (Nelson *et al.*, 2007) wurden die Proben mit der Wellenlänge 561 nm angeregt und die Fluoreszenz im Detektionsfenster 569 nm bis 591 nm aufgenommen. Die Autofluoreszenz der Chloroplasten wurde im Bereich von 690 nm bis 708 nm detektiert, wobei die Anregung mit der Wellenlänge 488 nm oder 561 nm erfolgte. Die Anregung von mit Propidiumjodid gefärbten Wurzeln wurde bei 488 nm vorgenommen, wobei die Detektion im Bereich von 597 nm bis 649 nm durchgeführt wurde.

Für die Analyse der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation wurde ein sequenzieller Scan pro Linie durchgeführt. Dafür wurde in der ersten Sequenz mit der Laserwellenlänge 514 nm angeregt und im Detektionsfenster von 531 nm bis 544 nm die YFP-Fluoreszenz detektiert. Ein weiteres Detektionsfenster von 708 nm bis 737 nm wurde für die Aufnahme von Chlorophyllautofluoreszenz genutzt. In der zweiten Sequenz wurde mit 561 nm die RFP-Fluoreszenz angeregt und im Detektionsfenster von 580 nm bis 595 nm detektiert und parallel die Transmission aufgenommen.

Für die Aufnahmen mit Differentialinterferenzkontrast (*differential interference contrast*, DIC) wurden die Proben mit der Wellenlänge von 561 nm angeregt und die Transmission detektiert. Durch die DIC-Aufnahmen lassen sich transparente Objekte sichtbar machen, wobei die unterschiedlichen Weglängen des Lasers in Helligkeitsunterschiede umgewandelt werden.

2.7.2 Histochemischer Nachweis von β -Glucuronidase-Aktivität

Für eine Promotoranalyse wurde die β -Glucuronidase-Aktivität durch eine GUS-Färbung nachgewiesen. Dabei wird das Substrat X-GlcA in Glucuronsäure und 5-Brom-4-chlor-indoxyl umgesetzt. Durch den Luftsauerstoff wird 5-Brom-4-chlor-indoxyl zu 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert, welches als blauer Farbstoff sichtbar wird (Jefferson *et al.*, 1987). Für den histochemischen Nachweis der β -Glucuronidase-Aktivität wurden Pflanzen mit einem GUS-Konstrukt auf Erde und auf MS-Medium kultiviert und in unterschiedlichen Altersstufen auf deren GUS-Färbung in den unterschiedlichen Organen getestet. Dafür wurde das jeweilige Pflanzenmaterial in 0,1M Natriumphosphatpuffer gelegt, welche anschließend durch 500 μ L GUS-Lösung ersetzt wurde. Die Färbung erfolgte für 2 bis 5 Stunden (je nach Material und Pflanzenlinie) bei 37°C. Die GUS-Lösung wurde anschließend entfernt und das Pflanzenmaterial mit Ethanol/Essigsäure-Gemisch (1:1) entfärbt. Die Lagerung erfolgte bis zur Dokumentation am Makroskop (Olympus MVX10, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) in Ethanol.

Für eine bessere Auflösung von GUS-gefärbtem Pflanzenmaterial konnte nach der GUS-Färbung eine Klärung der Proben mit der Hoyer's Lösung durchgeführt werden (Stangeland und Salehian 2002).

<u>GUS-Lösung</u>		<u>Hoyer's Lösung</u>	
10 mM	Natriumphosphatpuffer	2,5 mL	Glycerin
3 mM	Ferricyanid	58 g	Chloralhydrat
0,5%	Triton-X-100	15 mL	ddH ₂ O
1 mg/mL	X-Gluc in DMSO		

2.7.3 Klärung von Samen nach Hoyer

Für die Klärung von Samen wurde das *Hoyer's Mounting Medium* verwendet. Dabei wurden die Schoten am Makroskop (Olympus MVX10, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) auf Objektträgern präpariert und in dem *Hoyer's Mounting Medium* mit einem

Deckglas eingebettet. Am folgenden Tag konnten die geklärten Samen am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) mit der Differentialinterferenzkontrastierung analysiert werden. Das Protokoll wurde der Homepage <http://www.seedgenes.org/index.html> entnommen.

Hoyer's Mounting Medium

3,75 g	Gum Arabicum
2,5 mL	Glycerin
58 g	Chloralhydrat
15 mL	ddH ₂ O

2.8 Interaktionsstudien

2.8.1 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)

Bei der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (*bimolecular fluorescence complementation*, BiFC) handelt es sich um eine Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktion. Dafür werden zwei potentielle Interaktionspartner an Split-nYFP bzw. Split-cYFP fusioniert. Durch eine Interaktion der beiden Proteine entsteht ein intaktes Fluorophor, welches durch Anregung detektiert werden kann (Hu *et al.*, 2002).

Für die Interaktionsstudien wurden in dieser Arbeit 2in1 pBiFC-Vektoren (Grefen und Blatt 2012) verwendet, in welche beide Proteine kloniert werden konnten. Zusätzlich enthalten die Vektoren ein RFP unter dem CaMV 35S-Promotor, welches als Transformationskontrolle dient. Die BiFC-Vektoren wurden, wie in den Klonierungsstrategien beschrieben (2.4.12), hergestellt und anschließend über eine Transformation von Protoplasten transient exprimiert (2.6.6). Die Analyse der Interaktion durch die Anregung des YFP erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie (2.7.1).

2.8.2 Hefe-Zwei-Hybrid System

Das Hefe-Zwei-Hybrid System ermöglicht die Untersuchung von Interaktionen zwischen zwei Proteinen (Gietz *et al.*, 1997). Der verwendete Hefestamm AH109 besitzt unter der Kontrolle des *GAL4*-Promotors das Reporter-gen *HIS3*, welches das Enzym Imidazolglycerol-Phosphatdehydratase exprimiert und somit zur Synthese von Histidin beiträgt. Zur Aktivierung der Histidinsynthese ist der Transkriptionsfaktor GAL4 erforderlich. Die Bindedomäne (BD) des GAL4 wird mit dem ersten Protein von Interesse fusioniert und die Aktivierungsdomäne (AD) des GAL4 mit dem zweiten Protein von Interesse. Kommt es zu einer Interaktion der beiden Proteine, kann der Transkriptionsfaktor GAL4 die Histidinsynthese aktivieren und die Hefe wächst auf Selektionsmedium ohne Histidin. Beide Domänen des GAL4-Transkriptionsfaktors sind auf zwei Vektoren aufgeteilt, wobei der BD-Vektor zusätzlich die Gene für die Tryptophansynthese und der AD-Vektor die Gene für die Leucinsynthese enthält. Nach einer Co-Transformation beider Vektoren wächst die Hefe auf Selektionsmedium ohne Tryptophan und Leucin (-L -W). Die Interaktionsstudie findet zusätzlich auf Selektionsmedium ohne Histidin satt (-L -W -H). Durch die Zugabe von 0,5 mM 3-Amino-1,2,4-triazole (3-AT) kann die Spezifität der Interaktion erhöht werden, da das Enzym Imidazolglycerol-Phosphatdehydratase für die Histidinsynthese durch 3-AT inhibiert wird. Bei starken Interaktionen reicht allerdings die Histidinsynthese trotz 3-AT für das Wachstum der Hefen aus.

2.8.2.1 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Für die Transformation von Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) wurden 10 mL YPD-Medium mit dem Stamm AH109 angeimpft und über Nacht bei 29°C und 200 rpm inkubiert. Nach dem Anwachsen der Hefe wurde die Kultur in 2 mL Reaktionsgefäße aliquotiert und für 10 min bei 2348 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 1 mL sterilem ddH₂O gewaschen. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und der Überstand verworfen. Die Hefezellen wurden in 500 µL sterilem 0,1 M Lithiumacetat (LiAc) aufgenommen und erneut bei 2348 x g für 30 s zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 µL 0,1 M LiAc aufgenommen und auf 100 µL Aliquots verteilt. Die Aliquots wurden für 30 s bei 2348 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen auf Eis gelagert. Für die Transformation wurde der folgende Master-Mix pipettiert

und auf die Zellen gegeben. Die Carrier-DNA musste vor jedem Gebrauch bei 95°C für 10 min aufgekocht werden.

Master-Mix

240 µL 50% PEG

36 µL 1M LiAc

1 µL Carrier-DNA (20ng/µL Heringsperma)

1 µg BD-Vektor

1 µg AD-Vektor

Mit ddH₂O auf ein Endvolumen von 360 µL auffüllen

Die Transformation erfolgte für 30 min bei 30°C und anschließend für weitere 20 min bei 42°C auf einem Heizblock (Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die Proben wurden für 1 min bei 2348 x g zentrifugiert und das Pellet in 100 µL 0,9% NaCl aufgenommen. Die Zellen wurden auf SCAD-Mediumplatten (-L -W) ausplattiert und für 2-3 Tage bei 29°C inkubiert.

2.8.2.2 Tröpfeltest

Je 2 Kolonien einer Co-Transformation (2.8.2.1) wurden in je 3 mL SCAD (-L -W) angeimpft und über Nacht bei 29°C und 200 rpm inkubiert. Die Hefekultur wurde auf eine OD₆₀₀ = 4 im Endvolumen von 500 µL eingestellt und für 1 min bei 2348 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 500 µL 0,9% NaCl resuspendiert. Von jeder Co-Transformation wurden drei Verdünnungen von OD₆₀₀ = 4 bis OD₆₀₀ = 0,004 in 0,9% NaCl hergestellt, von denen jeweils 5 µL auf zwei verschiedene Selektionsplatten geträpelt wurden. Die Platten wurden bei 29°C 2-3 Tage inkubieren.

1. SCAD -L -W → Wachstumskontrolle der Co-Transformation
2. SCAD -L -W -H + 0,5mM 3AT → Selektion auf die Interaktion

2.9 Durchführung eines Suppressor-Screens

2.9.1 Randomisierte Mutagenese mit Ethylmethansulfonat (EMS)

Die Ethylmethansulfonat (EMS) Mutagenese ruft in Pflanzen willkürliche Punktmutationen hervor. Aufgrund von einer Acetylierung des Guanins (G) in der DNA können mit der gegenüberliegenden Base nur noch zwei Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden, was während der nächsten Replikationsphase zu einem Einbau von Thymin (T) führt. Für die EMS-Mutagenese von *saul1-1* Mutanten wurden 500 mg Samen in 0,3% EMS für 15 Stunden bei leichtem Schütteln inkubiert. Die Samen wurden anschließend 10 mal in ddH₂O gewaschen und anschließend zur Selektion des Phänotyps auf Erde ausgebracht. Die EMS-Mutagenese wurde von Tatjana Kleine (LMU München; AG Prof. Dr. Dario Leister) durchgeführt. Die Angaben beruhen auf persönlicher Mitteilung von Tatjana Kleine.

2.9.2 Rückkreuzung der Suppressorlinien in den *saul1-1* Hintergrund

Die durch EMS mutagenisierten *saul1-1* Samen (M1) wurden ausgebracht und geselbstet. Die daraus resultierende M2-Generation wurde individuell nach dem *saul1-1* Phänotyp selektiert, wobei Pflanzen ohne Phänotyp erneut geselbstet wurden. Daraus resultierten unabhängige Suppressorlinien (M3-Generation), welche zweimal in den *saul1-1* Hintergrund rückgekreuzt wurden. Die Rückkreuzungen erfolgten mit *saul1-1* heterozygoten Pflanzen. Der Genotyp musste daher in jedem Schritt mit den Primerpaaren *saul1-1_LP* und *saul1-1_RP* bzw. LBa1 und *saul1-1_RP* überprüft werden (Primer siehe Anhang: Tabelle 7-2). Die Rückkreuzung der Suppressorlinien wurde von Katja Vogelmann (Universität Hamburg, AG Prof. Dr. Stefan Hoth) im Rahmen ihrer Promotion und von Tatjana Kleine (LMU München; AG Prof. Dr. Dario Leister) durchgeführt. Die Angaben beruhen auf einer persönlichen Mitteilung von Katja Vogelmann.

2.9.3 Bestimmung des Segregationsverhaltens der Suppressorlinien

Für die Analyse der Suppressorlinien wurde die F2-Generation der 2. Rückkreuzung (BC2F2) von Katja Vogelmann (Universität Hamburg, AG Prof. Dr. Stefan Hoth) und Tatjana Kleine (LMU München; AG Prof. Dr. Dario Leister) zur Verfügung gestellt. Die Samen (BC2F2) wurden oberflächensterilisiert und ca. 100-150 Samen auf MS-Platten ausgebracht. Die Pflanzen wurden für 8 Tage bei 25°C angezogen und anschließend auf eine Temperatur von 20°C umgestellt. Die Phänotypen wurden fotografisch dokumentiert und ausgezählt.

2.9.4 Grobe Chromosomenkartierung (*genetic mapping*)

Für die Eingrenzung des Suppressors auf bestimmte Chromosomenbereiche wurde eine PCR-basierte Chromosomenkartierung (*genetic mapping; positional cloning*) durchgeführt (Jander *et al.*, 2002). Dafür wurden die Suppressorlinien mit *saul1-1* Mutanten im Landsberg *erecta* (*Ler*) Hintergrund ausgekreuzt. Aufgrund von genomischen Unterschieden der Ökotypen *Col-0* und *Ler* in repetitiven Sequenzabschnitten lassen sich mittels SSLP-Markern (*simple sequence length polymorphism*) Rekombinationsfrequenzen bestimmen. Dafür wurde eine Kartierungspopulation (F2-Generation nach Auskreuzung in einen anderen Ökotyp) ausgebracht und gDNA (2.4.5) von im Phänotyp supprimierten Pflanzen isoliert. Die verwendeten Schlüsselmarker wurden der Homepage <http://amp.genomics.org.cn/> (Hou *et al.*, 2010) entnommen und sind im Anhang (Tabelle 7-6) aufgelistet.

2.9.5 Komplementationsstudien

Ob die Suppressorlinien allelisch sind, lässt sich durch eine Kreuzung der unterschiedlichen Linien untereinander testen. Die F1-Generation wurde für 2 Wochen bei 25°C angezogen und zur Induktion des Phänotyps für eine weitere Woche bei 20°C kultiviert. Die resultierenden Phänotypen wurden fotografisch dokumentiert.

2.9.6 Kopplungsanalyse

Zur Analyse, ob eine gekoppelte Vererbung zwischen dem Suppressor-Allel und der T-DNA Insertion im Gen *SAUL1* vorliegt, wurden die Suppressor-Linien in den WT *Col-0* gekreuzt. Es wurden für diesen Versuch jeweils 104 Pflanzen der F2-Generation nach der Kreuzung in *Col-0* ausgebracht und genotypisiert. Die Pflanzen wurden fotografisch dokumentiert, um anschließend Genotyp und Phänotyp zu vergleichen.

2.9.7 Identifizierung eines Suppressor-Allels

Für die Tiefensequenzierung (Illumina HiSeq, *paired-end* und 80-fache Abdeckung; Re-Sequenzierung des *Arabidopsis thaliana* Genoms) der Suppressorlinien wurden 1040 Pflanzen der F2-Generation der 2. Rückkreuzung auf Erde ausgebracht (Ausnahme: Tiefensequenzierung der Linie E3; Pool aus 10 Pflanzen der F3-Generation) und für 14 Tage bei 25°C herangezogen und anschließend in einen Klimaschrank mit 20°C transferiert. Für die Bestimmung des Suppressors mittels Illumina-Sequenzierung („mapping-by-sequencing“; (James *et al.*, 2013)) wurden 150 bis 200 im Phänotyp supprimierte Pflanzen gepoolt und deren gDNA isoliert (2.4.6). Die genomische DNA wurde anschließend zu der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) geschickt, die die Herstellung der Bibliothek, die Illumina HiSeq Sequenzierung und die bioinformatische Auswertung übernahm. Die Sequenzierungsdaten wurden dabei gegen das Genom von *Arabidopsis thaliana* Columbia-0 (TAIR10) assembliert.

Für die Identifizierung des Suppressor-Allels wurden aus den Daten der Variantanalyse ausschließlich homozygote aus der EMS-Mutagenese resultierende SNPs (*single nucleotide polymorphism*) in annotierten Genen betrachtet. Anschließend wurde nach resultierenden Aminosäureänderungen selektiert. Die verbliebenen SNPs wurden unter den verschiedenen Suppressorlinien verglichen und identische SNPs verworfen. Aufgrund von Ergebnissen aus Kopplungsanalyse und Komplementationsstudien konnte ein Locus definiert werden.

2.10 Verwendete Software und Datenbanken

Tabelle 2-23: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Programme und Datenbanken

Programm	Referenz/Hersteller
Clone Manager 9 Professional Edition	Scientific and Educational Software, Morrisville, USA
Microsoft Office (Excel, Word, Power Point)	Microsoft Corporation, Redmond, USA
IGV (Integrative Genomics Viewer)	Thorvaldsdóttir <i>et al.</i> , 2013
CDD (Conserved Domain Database)	Marchler-Bauer <i>et al.</i> , 2015
NetGene2	Hebsgaard <i>et al.</i> , 1996
Vector NTI®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
LAS X (für TCS SP8)	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
ZEN Imaging Software (für LSM780)	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Rotor-Gene Q Series Software	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
TSSP (Promotorvorhersagen in Pflanzen)	Softberry Inc., Mount Kisco, USA
Genevestigator	NEBION AG, Zürich, Schweiz
TAIR (Arabidopsis Information Resource)	www.arabidopsis.org ; (Lamesch <i>et al.</i> , 2011)
eFP Browser	Winter <i>et al.</i> , 2007
ChloroP	Emanuelsson <i>et al.</i> , 1999
ATTED-II	Obayashi <i>et al.</i> , 2007; Obayashi und Kinoshita 2010
Venny2.1	(Oliveros 2007-2015) http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html

3 Ergebnisse

Die E3 Ubiquitinligase SAUL1 aus *Arabidopsis thaliana* wurde in vorigen Studien im Zusammenhang mit Seneszenz und Zelltodprozessen beschrieben. Es konnte in weiteren Projekten gezeigt werden, dass die *saul1-1* Mutante einen höheren Salicylsäuregehalt besitzt und der temperaturabhängige Phänotyp sich durch Mutationen in den Genen *PAD4* oder *EDS1* aufheben lässt (Raab *et al.*, 2009; Vogelmann *et al.*, 2012; Disch *et al.*, 2016). Für die Charakterisierung und Identifizierung des SAUL1-Signalweges wurden in dieser Arbeit zwei Projekte verfolgt.

Im ersten Projekt wurden auf Grundlage der Datenbank ATTED-II (Stand: 2012; Obayashi *et al.*, 2007; Obayashi und Kinoshita 2010) co-exprimierte Gene von SAUL1 untersucht. Dabei wurden die Genprodukte hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisierung analysiert. Zusätzlich wurde eine Phänotypstudie diverser Arabidopsis-Mutanten der co-exprimierten Gene von SAUL1 durchgeführt. Eine Zusammenfassung der co-exprimierten Gene von SAUL1 ist im Anhang unter 7.4 zu finden. Interessanterweise konnte in der Phänotypstudie eine noch nicht charakterisierte Mutante identifiziert werden. Durch die Charakterisierung dieser T-DNA Insertionslinie konnte kein Zusammenhang zu SAUL1 gezeigt werden, so dass die Ergebnisse dieses Projekts unabhängig von der SAUL1-Funktion vorgestellt und diskutiert werden.

Im Hauptprojekt dieser Arbeit wurde ein Suppressor-Screen mit der *saul1-1* Mutante durchgeführt. Dafür wurden *saul1-1* Pflanzen einer EMS-Mutagenese unterzogen. Anschließend wurde nach Pflanzen mit supprimiertem Phänotyp selektiert. Diese sogenannten Suppressor-Linien wurden mittels genetischer Methoden und einer Tiefensequenzierung analysiert. Der Suppressor von *saul1-1* (*suppressor of saul1-1*; SUSA) wurde durch Interaktions- und Lokalisierungsstudien charakterisiert.

3.1 Untersuchung von *SNOWY CODYLEDON4 (SCO4)*

Das in dieser Arbeit untersuchte Gen *SCO4* (At5g60750) codiert für eine potentielle CAAX-Protease. *SCO4* wurde zuvor von Albrecht-Borth *et al.* (2013) als ein chloroplastidäres Protein beschrieben, welches in der Photosynthese involviert ist und die Anpassung an unterschiedliche Lichtintensitäten beeinflusst.

3.1.1 Charakterisierung der T-DNA Insertionsmutante *sco4-2*

Für die Charakterisierung von *SCO4* wurde eine T-DNA Insertionsmutante (*sco4-2*; SALK_035460; At5g60750) betrachtet. Dafür wurde zunächst der T-DNA Insertionslocus bestimmt und der Phänotyp der *sco4-2* Arabidopsis-Pflanzen analysiert.

Für die Identifizierung des exakten T-DNA Insertionslocus wurden die flankierenden Regionen um die vorhergesagte Insertion im 4. Exon mit Hilfe der T-DNA spezifischen Oligonukleotide LBa1 für die *left border* und SALK_RB für die *right border* mit genspezifischen Oligonukleotiden kombiniert. Die Amplifikate wurden durch eine Sanger-Sequenzierung analysiert und es konnte eine Deletion von 60 nt zwischen den Positionen +1846 und +1906 ausgehend vom Startcodon ATG durch die T-DNA Insertion festgestellt werden. In Abbildung 3-1 ist der Locus der T-DNA schematisch dargestellt.

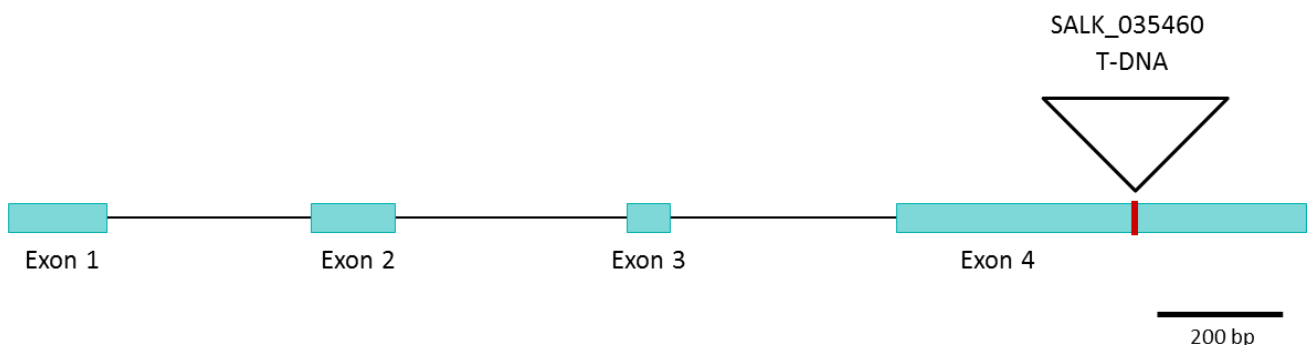


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung des genomischen Bereichs des Gens *SCO4*. Das Gen *SCO4* besteht aus 4 Exons und hat eine Gesamtlänge von 2128 bp. Die untersuchte T-DNA Insertion konnte zwischen den Positionen +1846 und +1906 identifiziert werden. Dabei wurde eine Deletion von 60 nt festgestellt. Die Darstellung erfolgte mit dem Programm Clone Manager 9 Professional Edition (Scientific and Educational Software).

Bei der Genotypisierung der Mutantenlinie *sco4-2* wurde deutlich, dass keine homozygoten Pflanzen regeneriert werden konnten. Von 108 Nachkommen einer heterozygoten Pflanze konnten lediglich 27 segregierende WT (*SCO4-2/SCO4-2*) und 58 heterozygote Pflanzen (*sco4-2/SCO4-2*) identifiziert werden. Weitere 28 Pflanzen keimten nicht. Beispielhaft ist in Abbildung 3-2A eine Genotypisierungs-PCR von drei individuellen Pflanzen dargestellt. Bei der Pflanze #1 konnte ausschließlich das WT-Allel identifiziert werden, so dass es sich bei dieser Pflanze um einen segregierenden WT handelte. Die Pflanzen #2 und #3 zeigten ein PCR-Produkt für das WT sowie das T-DNA Insertionsallel und waren somit heterozygote *sco4-2* Mutanten. Um diese Beobachtung zu vertiefen, wurden die Schoten von *sco4-2/SCO4-2* und *SCO4-2/SCO4-2* Pflanzen präpariert und die Samen phänotypisch analysiert. Die Schoten heterozygoter Pflanzen zeigten neben grünen auch weiße Samen (Abbildung 3-2, D und E), welche in älteren Schoten kollabiert waren (Abbildung 3-2F) und sich braun färbten (Abbildung 3-2G). Schoten des segregierenden WT zeigten diesen Phänotyp nicht (Abbildung 3-2C; *Col-0* WT: Abbildung 3-2B).

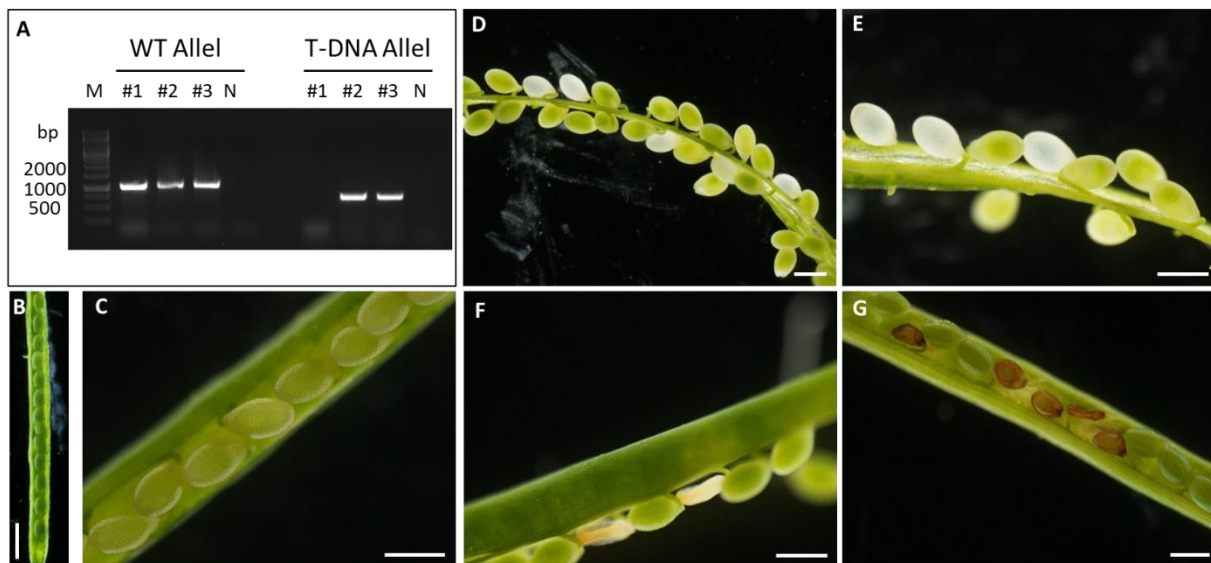


Abbildung 3-2: Fotografische Darstellung des Samenphänotyps der Mutante *sco4-2* in heterozygoten Schoten im Vergleich zu WT Pflanzen. A: Beispielhafte Darstellung einer Genotypisierungs-PCR individueller *sco4-2* Pflanzen (#1, #2 und #3). Es handelt sich um ein 1%iges Agarosegel. M = *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA); N = Negativkontrolle; Das PCR-Produkt des WT-Allels entspricht 1091 bp und das PCR-Produkt des T-DNA Insertionsallels entspricht 832 bp. B: Fotografische Darstellung einer Schote einer *Col-0* WT Pflanze. Alle Samen waren grün und zeigten keinen auffälligen Phänotyp. Maßstab = 1 mm. C: Fotografische Darstellung einer Schote des segregierenden WT. Alle Samen waren grün und zeigten keinen auffälligen Phänotyp. Maßstab = 500 μ m. D und E: In den Schoten heterozygoter *sco4-2/SCO4-2* Pflanzen wurden grüne und weiße Samen beobachtet. Maßstab = 500 μ m. F und G: Schoten heterozygoter *sco4-2/SCO4-2* Pflanzen. In älteren Schoten waren die weißen Samen kollabiert und wurden braun. Maßstab = 500 μ m.

Aufgrund dieser Auffälligkeit wurde der Anteil weißer und grüner Samen in den Schoten bestimmt. Dafür wurden insgesamt Samen von 50 Schoten 10 heterozygoter Pflanzen und Samen von 35 Schoten 6 segregierender WT-Pflanzen gezählt. Es konnte kein Unterschied in der Gesamtanzahl von Samen pro Schote zwischen WT und heterozygoten Pflanzen beobachtet werden (Abbildung 3-3A). Im Unterschied zu dem segregierendem WT waren 22,21% der Samen in heterozygoten Schoten weiß (Abbildung 3-3B).

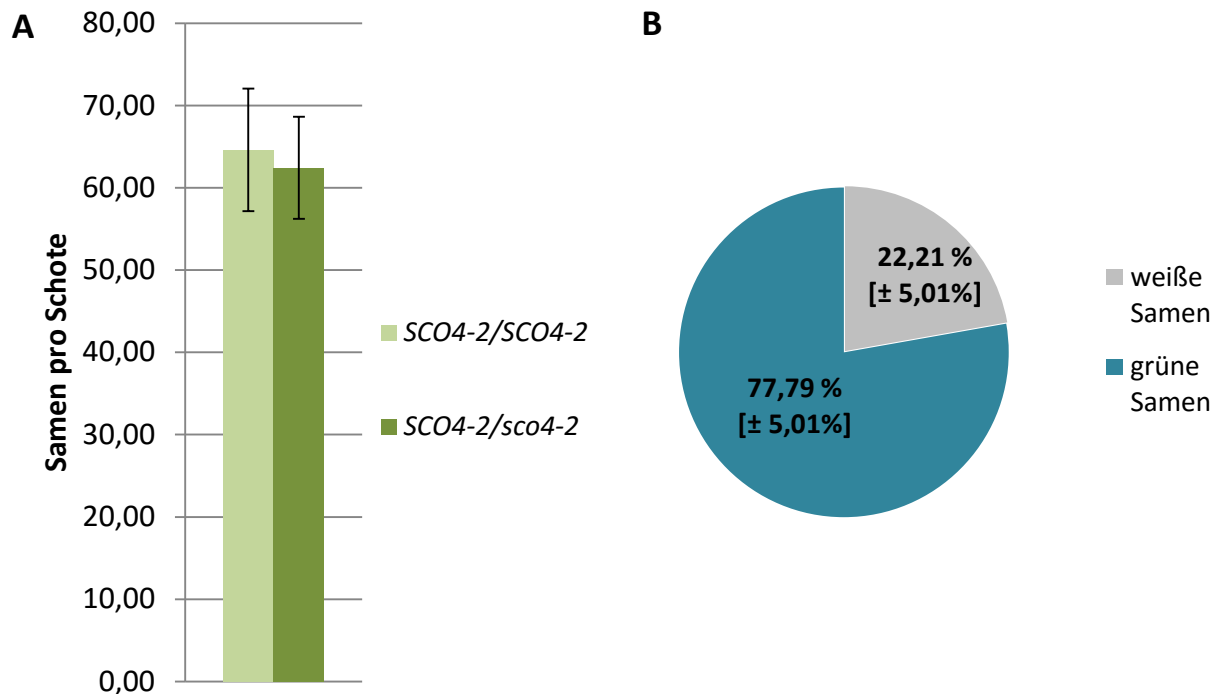


Abbildung 3-3: Graphische Darstellung der ausgezählten Samen in *SCO4-2/SCO4-2* (WT) und *sco4-2/SCO4-2* Pflanzen. *SCO4-2/SCO4-2* (WT): n=35 Schoten; *sco4-2/SCO4-2*: n=50; Es ist die Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. A: Graphische Darstellung der Gesamtanzahl von Samen in einer Schote von WT und heterozygoten *sco4-2* Pflanzen. Die Anzahl der Samen pro Schote unterschied sich dabei nicht. B: Graphische Darstellung des prozentualen Anteils von weißen und grünen Samen in heterozygoten *sco4-2* Schoten. Die weißen Samen machen Rund ¼ des Gesamtanteils an Samen aus.

Aufgrund der Segregation heterozygoter Pflanzen könnte es sich bei den weißen Samen um potentielle Samen homozygoter *sco4-2* Mutanten handeln. Demnach könnte die Entwicklung des Embryos bei homozygoten *sco4-2* Mutanten eingeschränkt sein. Zur Kontrolle der Embryoentwicklung wurden die Samen heterozygoter Pflanzen mittels Hoyer's Lösung entfärbt (mit freundlicher Unterstützung durch Teresa Bisdorf, AG Prof. Dr. Hoth). So konnte mit Hilfe der Differentialinterferenzkontrastierung (*differential interference contrast*, DIC) am konfokalen

Laser-Scanning Mikroskop die Entwicklung der Embryonen dokumentiert werden. In Abbildung 3-4 sind exemplarisch Embryonen aus weißen und grünen Samen einer Schote in unterschiedlichen Entwicklungsstadien gegenüber gestellt. Dabei war zu erkennen, dass die Embryonen aus den weißen Samen (jeweils linkes Bild) im globulären Stadium stagnierten und sich nicht, wie die Embryonen in den grünen Samen (jeweils rechtes Bild), vom globulären Stadium über das Herz- und Torpedo-Stadium zum reifen Embryo entwickelten (Abbildung 3-4). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass es sich bei *sco4-2* um eine embryonale Mutante handeln könnte.

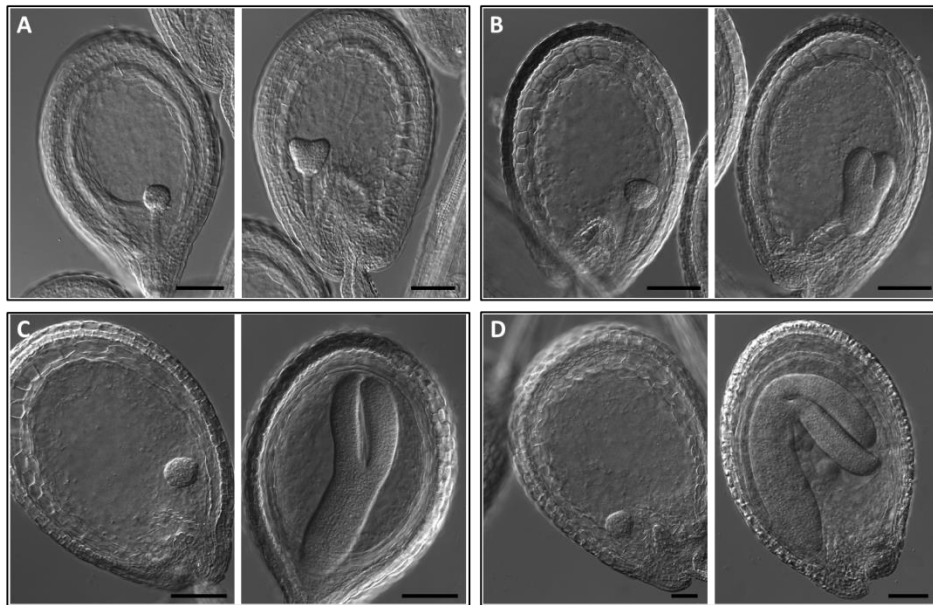


Abbildung 3-4: DIC-Aufnahmen von Embryonen heterozygoter *sco4-2* Pflanzen. Mit Hilfe der Differentialinterferenzkontrastierung am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop konnten die Entwicklungsstadien der Embryonen sichtbar gemacht werden. Es sind je zwei Samen mit Embryonen einer heterozygoten *sco4-2* Schote gegenüber gestellt, wobei es sich bei den linken Bildern um weiße Samen und in den rechten Bildern um grüne Samen handelte. A: linkes Bild zeigt einen Embryo in weißen Samen (globuläres Stadium). Rechts ist im Vergleich ein Embryo (frühes Herzstadium) in einem grünen Samen zu sehen. B: (links) in der Entwicklung stagnierter Embryo (globuläres Stadium), (rechts) Embryo im Übergang vom späten Herzstadium zum frühen Torpedo-Stadium. C: (links) in der Entwicklung stagnierter Embryo (globuläres Stadium), (rechts) Embryo im Torpedo-Stadium. D: (links) in der Entwicklung stagnierter Embryo (globuläres Stadium), (rechts) Embryo im späten Torpedo-Stadium. Maßstabe: A = 75 µm; B = 100 µm; C = 100 µm; D (links) = 50 µm; D (rechts) = 75 µm

3.1.2 Komplementation des *sco4-2* Phänotyps

Zum Nachweis, dass *sco4-2* zu einem embryonalen Phänotyp führt, wurden Komplementationskonstrukte hergestellt. Die Komplementationskonstrukte enthielten den

pSCO4-Promotor (1747 nt inklusive 5'UTR), das 5'UTR und den gesamten genomischen Bereich des Gens *SCO4*. Dieses Konstrukt wurde zunächst in den TOPOTM/pENTR[®] Vektor kloniert und anschließend mit Hilfe der Gateway[®]-Technologie in drei verschiedene Zielvektoren rekombiniert. Dadurch entstanden die drei Konstrukte *pSCO4::SCO4-HA*, *pSCO4::SCO4-GUS* und *pSCO4::SCO4-GFP* jeweils unter der Kontrolle des nativen *pSCO4*-Promotors. Anschließend erfolgte eine Agrobakterien-vermittelte Transformation heterozygoter *sco4-2* Pflanzen. Die Samen der T0-Generation wurden ausgebracht und selektiert. Es konnten für die Komplementationslinie *sco4-2/pSCO4::SCO4-HA* 17, für die Linie *sco4-2/pSCO4::SCO4-GUS* 7 und für die Linie *sco4-2/pSCO4::SCO4-GFP* 10 Pflanzen regeneriert werden. Die jeweiligen Genotypen dieser Komplementationslinien bezüglich der T-DNA Insertion im Gen *SCO4* sind in Tabelle 3-1 dargestellt.

Tabelle 3-1: Auflistung der Komplementationslinien von *sco4-2* mit der Anzahl der jeweiligen T-DNA Insertionsgenotypen.

Linie	<i>sco4-2/sco4-2</i>	<i>sco4-2/SCO4-2</i>	<i>SCO4-2/SCO4-2</i>	gesamt
<i>sco4-2/pSCO4::SCO4-HA</i>	3	8	6	17
<i>sco4-2/pSCO4::SCO4-GUS</i>	-	5	2	7
<i>sco4-2/pSCO4::SCO4-GFP</i>	2	5	3	10

3.1.2.1 Charakterisierung der Komplementationslinie *sco4-2/pSCO4::SCO4-HA*

Bei der Analyse der Komplementationslinie *sco4-2/pSCO4::SCO4-HA* wurde der komplementierte Samenphänotyp betrachtet und erneut die Anzahl der weißen Samen bestimmt. Zusätzlich wurde die Blattmorphologie der komplementierten Pflanzen beobachtet und die relative Expression des Komplementationskonstruktes bestimmt.

Wie in der Tabelle 3-1 dargestellt, konnten von den 17 unabhängigen *sco4-2/pSCO4::SCO4-HA* Komplementationslinien bezüglich der *sco4-2* T-DNA Insertion 3 homozygote, 8 heterozygote und 6 WT-Pflanzen mit dem Komplementationskonstrukt nachgewiesen werden. Exemplarisch werden die Ergebnisse von 5 Komplementationslinien dargestellt. Es handelt sich dabei um die Linien *sco4-2/pSCO4::SCO4-HA_#4WT*,

sco4-2/pSCO4::SCO4-HA_#6homozygot, *sco4-2/pSCO4::SCO4-HA_#10homozygot*, *sco4-2/pSCO4::SCO4-HA_#11heterozygot* und *sco4-2/pSCO4::SCO4-HA_#14heterozygot*, die zur leichteren Darstellung der Ergebnisse im Folgenden als *sco4-2/HA#4WT*, *sco4-2/HA#6ho*, *sco4-2/HA#10ho*, *sco4-2/HA#11he* und *sco4-2/HA#14he* bezeichnet werden. Der Genotyp in der Linienbezeichnung bezieht sich ausschließlich auf die T-DNA Insertion im Gen *SCO4*. Da die Linie *sco4-2/HA#4WT* als segregierender WT keine T-DNA Insertion enthielt, diente diese in folgenden Darstellungen als Kontrolle.

In der T₀-Generation konnten in der Komplementationslinie *sco4-2/HA#10ho* phänotypische Veränderungen in der Blattfärbung festgestellt werden (Abbildung 3-5A). Diese Linie zeigte nach der Selektion hellgrüne bis weiße Blätter, was bei den weiteren vier Linien nicht zu beobachten war. Die Nachkommen (T₁) der Linie *sco4-2/HA#10ho* segregierten wiederum in Pflanzen mit weißlichen Blättern und Pflanzen mit normaler Blattfärbung. Dabei waren die Pflanzen mit der weißen und veränderten Blattmorphologie im Wachstum reduziert (Abbildung 3-5B). Ein ähnlicher, nicht so stark ausgeprägter Phänotyp war auch bei einem Teil der Nachkommen der Linie *sco4-2/HA#6ho* zu beobachten (nicht dargestellt). Ebenfalls zeigten einige homozygote T₁-Nachkommen der heterozygoten Linien *sco4-2/HA#11he* und *sco4-2/HA#14he* hellgrüne Blätter.



Abbildung 3-5: Fotografische Darstellung der Komplementationslinien. A: Darstellung der T₀-Generation der fünf Komplementationslinien *sco4-2/pSCO4::SCO4-HA#4WT*, *sco4-2/pSCO4::SCO4-HA#6ho*, *sco4-2/pSCO4::SCO4-HA#10ho*, *sco4-2/pSCO4::SCO4-HA#11he* und *sco4-2/pSCO4::SCO4-HA#14he* nach der Selektion. Die Linie *sco4-2/HA#10ho* zeigte eine hellgrüne Blattfärbung im Vergleich zu den anderen vier Linien. B: T₁-Generation der Linie *sco4-2/HA#10ho*; es ist eine Aufspaltung in WT-ähnliche Pflanzen und Pflanzen mit einer hellgrünen Blattfärbung und reduziertem Wachstum zu beobachten.

Um den auftretenden Blattphänotyp in den Komplementationslinien *sco4-2/HA#6ho* und *sco4-2/HA#10ho* näher charakterisieren zu können, wurde die relative Expression des Komplementationskonstrukts in der T1-Generation bestimmt. Dafür wurden Pflanzen mit und ohne Blattphänotyp aufgrund der relativen Expression des Komplementationskonstrukts verglichen. Es konnte ein signifikanter Unterschied in der relativen Expression des Komplementationskonstrukts zwischen „weißen“ und „grünen“ Pflanzen der Linie *sco4-2/HA#10ho* festgestellt werden (Abbildung 3-6). Der Expressionsunterschied bei der Linie *sco4-2/HA#6ho* zwischen den unterschiedlichen Phänotypen war nicht signifikant, jedoch war auch hier eine Reduzierung der relativen Expression bei hellgrünen Pflanzen sichtbar (Abbildung 3-6). Dabei ist auch zu beachten, dass der Phänotyp der Linie *sco4-2/HA#6ho* nicht so stark ausgeprägt war. Somit scheint eine geringere Expression des Komplementationskonstrukts eine Auswirkung auf die Blattfärbung homozygoter Komplementationslinien zu haben.

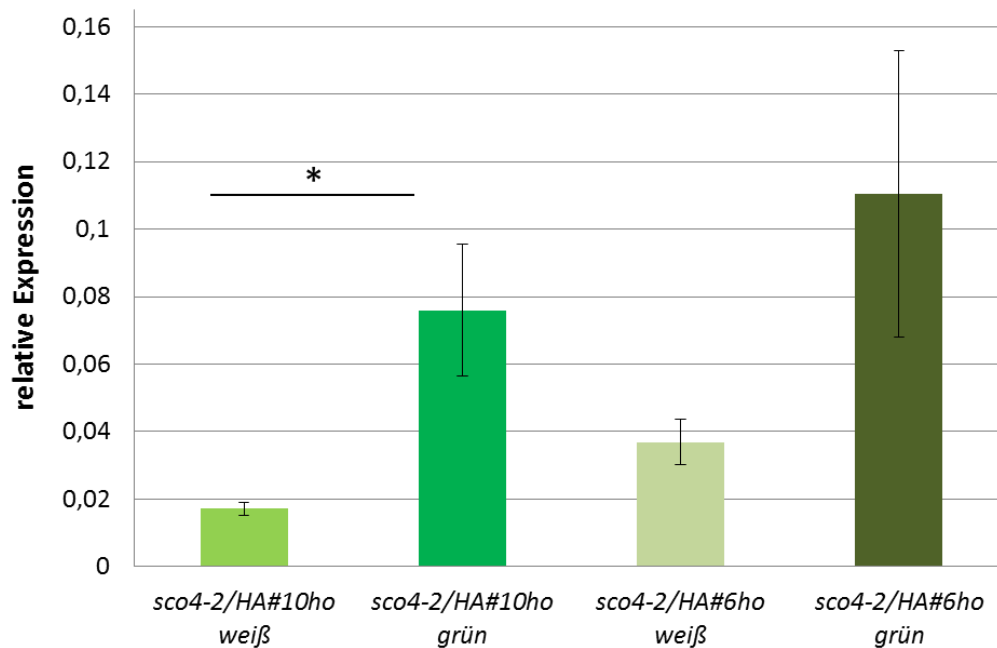


Abbildung 3-6: Graphische Darstellung der relativen Expression des Komplementationskonstrukts der F1-Nachkommen der Linien *sco4-2/HA#6ho* und *sco4-2/HA#10ho*. Die relative Expression wurde von Pflanzen mit und ohne Blattphänotyp bestimmt und gegenübergestellt. Pflanzen mit hellgrünen Blättern zeigen eine reduzierte relative Expression des Komplementationskonstrukts im Vergleich zu Pflanzen mit WT-ähnlicher Morphologie; Es ist der Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben; Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Students T-Test; n = 3; * p < 0,5.

Zur Überprüfung, ob das Komplementationskonstrukt den embryolethalen Phänotyp aufheben konnte, wurde die T1-Generation der genannten 5 Komplementationslinien ausgebracht und genotypisiert. Anschließend wurden im adulten Stadium die Schoten präpariert und der Samenphänotyp untersucht. Dabei war zu beobachten, dass die heterozygoten Nachkommen der beiden Linien *sco4-2/HA#11he* und *sco4-2/HA#14he* keinen Samenphänotyp zeigten (Abbildung 3-7). Vereinzelt waren weiße oder braune Samen in den heterozygoten Schoten sowie in WT-Schoten zu finden.

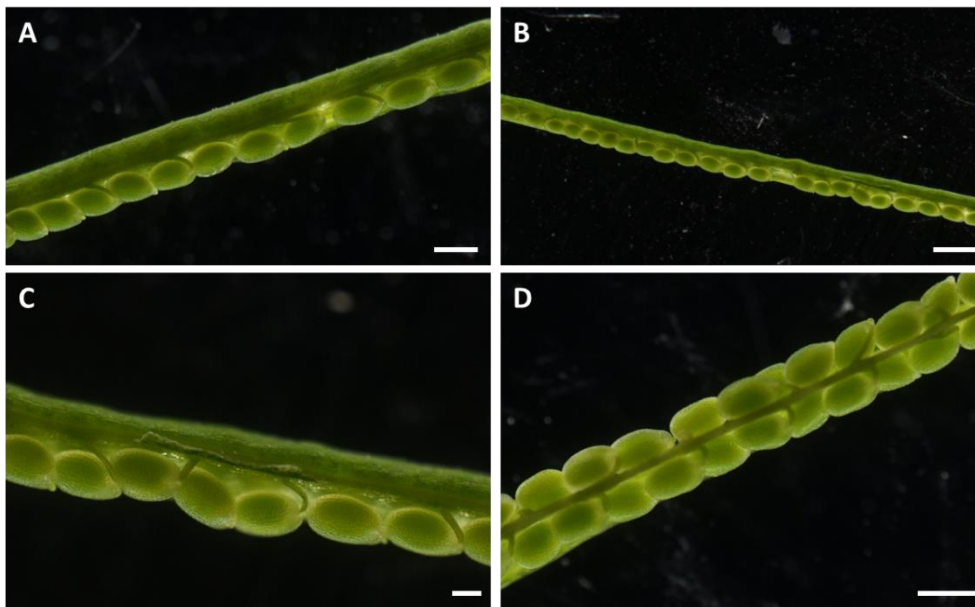


Abbildung 3-7: Fotografische Darstellung des Samenphänotyp der Komplementationslinien *sco4-2/HA#11he* und *sco4-2/HA#14he*. Durch das Einbringen des Komplementationskonstrukts in heterozygote *sco4-2* Pflanzen konnte der Samenphänotyp aufgehoben werden, so dass nur noch grüne Samen nachzuweisen waren. A: Schote einer Pflanze der Linie *sco4-2/HA#14he*, Maßstab = 500 µm. B: Schote einer Pflanze der Linie *sco4-2/HA#11he*, Maßstab = 1 mm. C: Schote einer Pflanze der Linie *sco4-2/HA#11he*, Maßstab = 200 µm. D: Schote einer Pflanze der Linie *sco4-2/HA#14he*, Maßstab = 500 µm.

Neben der morphologischen Betrachtung der Komplementationslinien wurde zur Quantifizierung der grünen und weißen Samen erneut eine Auszählung durchgeführt. Aufgrund der Segregation der heterozygoten T-DNA Insertion musste in der T1-Generation der Linien *sco4-2/HA#11he* und *sco4-2/HA#14he* zwischen WT, heterozygoten (he) und homozygoten (ho) komplementierten Pflanzen unterschieden werden. In diesen Pflanzen lag der Anteil an grünen Samen durchschnittlich über 95%. Wie schon zuvor in der morphologischen Betrachtung der Samen beobachtet werden konnte, wurden vereinzelt braune und weiße Samen in heterozygoten sowie

WT-Schoten identifiziert. Da ebenfalls in den segregierenden WT-Linien der Anteil grüner Samen nicht bei 100% lag, können auch andere Einflüsse die Entwicklung der Samen beeinflusst haben. Bei den beiden homozygoten Linien *sco4-2/HA#6ho* und *sco4-2/HA#10ho* waren nur 77-79% grüne Samen zu beobachten (Abbildung 3-8), was auf eine Segregation des vorliegenden Komplementationskonstrukts schließen lässt.

Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass durch das *pSCO4::SCO4-HA* Konstrukt der Samenphänotyp aufgehoben werden konnte. Somit konnte sichergestellt werden, dass der embryonale Phänotyp auf die T-DNA Insertion in dem Gen *SCO4* zurückzuführen ist.

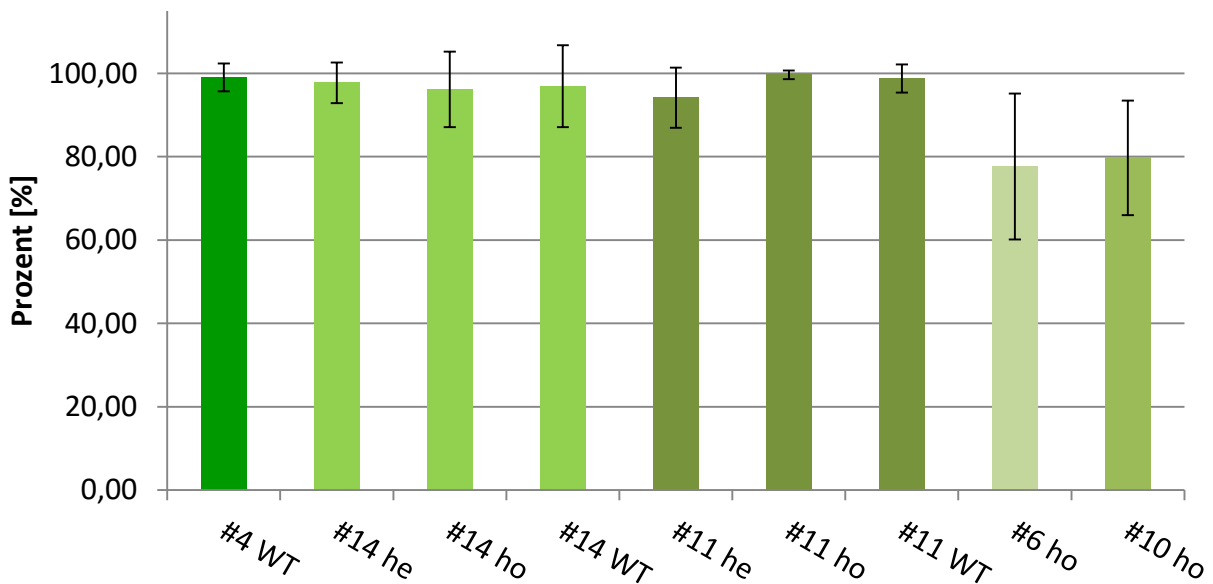


Abbildung 3-8: Graphische Darstellung der Verteilung von grünen Samen in komplementierten *sco4-2* Pflanzen. Durch das Komplementationskonstrukt *pSCO4::SCO4-HA* konnte der Samenphänotyp in den Linien *sco4-2/HA#11he* und *sco4-2/HA#14he* aufgehoben werden. So konnten in den Schoten der T1-Generation dieser Linien über 95% grüne Samen beobachtet werden. Die T1-Nachkommen der Linien *sco4-2/HA#6ho* und *sco4-2/HA#10ho* zeigten hingegen nur 77-79% grüne Samen. *sco4-2/HA#4WT*: n = 13; *sco4-2/HA#14he*: n = 25; *sco4-2/HA#14ho*: n = 24; *sco4-2/HA#14WT*: n = 21; *sco4-2/HA#11he*: n = 26; *sco4-2/HA#11ho*: n = 12; *sco4-2/HA#11WT*: n = 20; *sco4-2/HA#6ho*: n = 34; *sco4-2/HA#10ho*: n = 11; Es ist jeweils der Mittelwert ± Standardabweichung angegeben.

Werden zusammenfassend alle Ergebnisse der Charakterisierung der *sco4-2/pSCO4-SCO4-HA* Komplementationslinie betrachtet, scheint eine geringere Expression des Gens *SCO4* immer noch ausreichend für die Komplementation des Samenphänotyps zu sein, jedoch nicht für eine normale Blattmorphologie bei adulten Pflanzen.

3.1.2.2 Charakterisierung der Komplementationslinie *sco4-2/pSCO4::SCO4-GUS*

Für die Analyse der Komplementationslinie *sco4-2/pSCO4::SCO4-GUS* wurden ebenfalls der Samenphänotyp und die Morphologie der komplementierten Pflanzen untersucht. Zusätzlich dienten die segregierenden WT-Linien mit dem *SCO4-GUS* Konstrukt zur Charakterisierung der Promotoraktivität von *pSCO4* in diversen Entwicklungsstadien.

Nach der Selektion konnten sieben *sco4-2/pSCO4::SCO4-GUS* Komplementationslinien regeneriert werden. In diesem Fall konnten keine homozygoten *sco4-2* T-DNA Insertionen nachgewiesen werden. Nach dem Ausbringen heterozygoter *sco4-2* Mutanten mit dem *SCO4-GUS* Konstrukt (T1-Generation) konnten homozygote *sco4-2* Pflanzen regeneriert werden. Allerdings zeigten diese einen stark ausgeprägten kleinwüchsigen Phänotyp mit weißen Blättern (Abbildung 3-9). Diese Pflanzen waren nicht in der Lage Nachkommen zu produzieren. Die Überprüfung heterozygoter Schoten zeigte ebenfalls keine vollständige Komplementation des Samenphänotyps. Somit konnten zwar teilweise homozygote *sco4-2* Mutanten durch das *pSCO4::SCO4-GUS* Konstrukt regeneriert werden, jedoch war eine *SCO4-GUS* Fusion nur bedingt für eine Komplementation geeignet.



Abbildung 3-9: Fotografische Darstellung 5 Wochen alter homozygoter *sco4-2* Mutanten mit dem *SCO4-GUS* Komplementationskonstrukt. Die Pflanzen zeigten ein stark reduziertes Wachstum und hatten eine hellgrüne bis weiße Blattfärbung sowie eine veränderte Morphologie. Diese Pflanzen waren nicht in der Lage Nachkommen zu produzieren. Der Maßstab entspricht 1,8 cm.

In weiteren Experimenten wurden die *sco4-2/pSCO4::SCO4-GUS* Linien ausschließlich für die Charakterisierung der Promotoraktivität des *SCO4*-Gens verwendet. Für die GUS-Färbungen wurden die segregierenden WT-Pflanzen verwendet. Im Folgenden wurden die 5 Linien *sco4-2/GUS#1.1WT*, *sco4-2/GUS#6WT*, *sco4-2/GUS#1WT*, *sco4-2/GUS#4WT* und *sco4-2/GUS#4.1WT* näher analysiert.

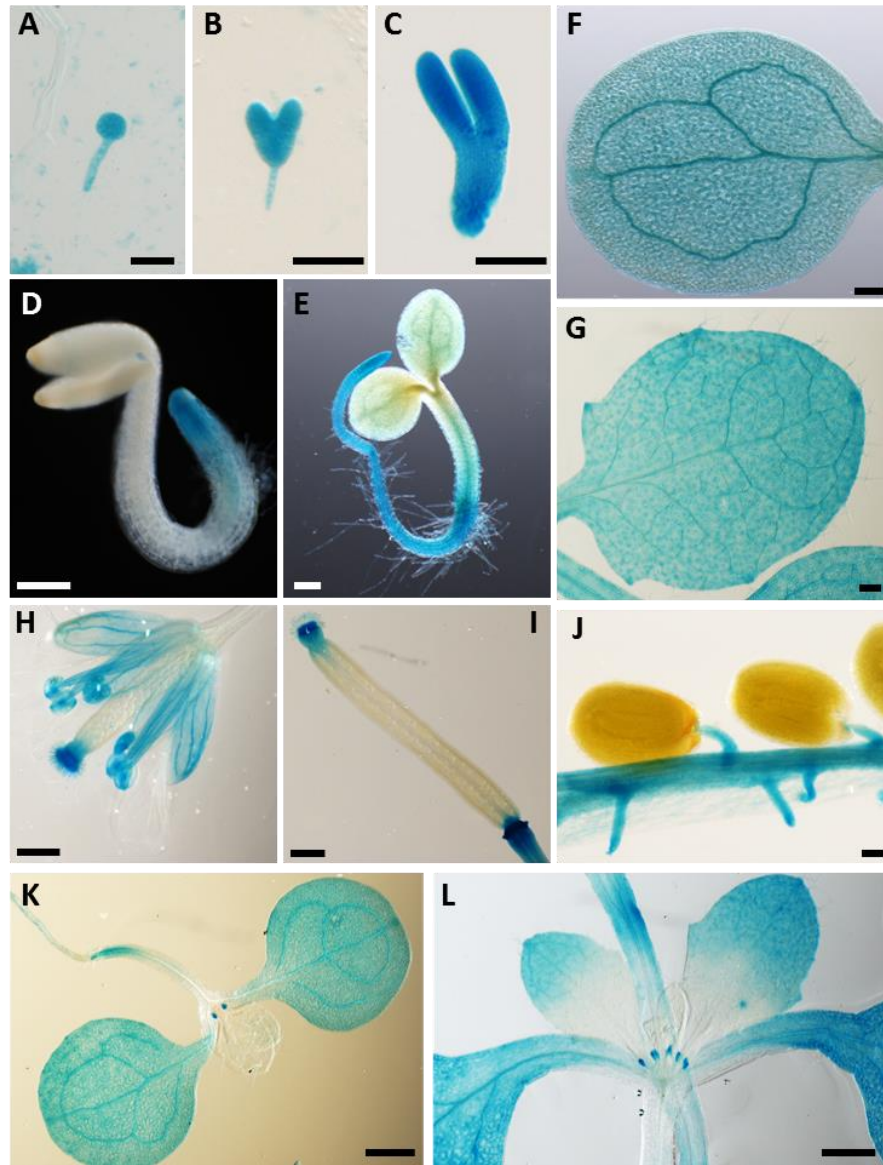


Abbildung 3-10: Makroskopische Darstellung der β -Glucuronidase-Aktivität in WT-Pflanzen mit dem $pSCO4::SCO4-GUS$ Konstrukt. A: GUS-Färbung eines globulären Embryos, Linie *sco4-2/GUS#4.1WT*, Maßstab = 50 μm . B: GUS-Färbung eines Embryo im Herzstadium, Linie *sco4-2/GUS#6WT*, Maßstab = 100 μm . C: GUS-Färbung eines Embryos im Zweikeimblattstadium, Linie *sco4-2/GUS#6WT*, Maßstab = 100 μm . D: Einen Tag alter Keimling nach der GUS-Färbung, in der Wurzelspitze war eine β -Glucuronidase Aktivität zu beobachten; Linie *sco4-2/GUS#6WT*, Maßstab = 200 μm . E: Drei Tage alter Keimling nach der GUS-Färbung; Eine deutliche Färbung war in der Wurzel und in der Vaskulatur zu sehen; Linie *sco4-2/GUS#6WT*, Maßstab = 200 μm . F: Keimblatt eines sieben Tage alten Keimlings; Die Vaskulatur zeigte eine deutliche GUS-Färbung; Linie *sco4-2/GUS#1.1WT*, Maßstab = 100 μm . G: Blatt einer 12 Tage alten Pflanze; Es war eine β -Glucuronidase Aktivität im gesamten Blatt zu erkennen; Linie *sco4-2/GUS#4.1WT*, Maßstab = 200 μm . H: GUS-Färbung einer Blüte; eine β -Glucuronidase Aktivität war in den Antheren, der Narbe und den Kelchblättern zu beobachten; Linie *sco4-2/GUS#4.1WT*, Maßstab = 500 μm . I: GUS-Färbung einer geschlossenen Schote, Eine Färbung war an beiden Enden zu erkennen; Linie *sco4-2/GUS#4.1WT*, Maßstab = 500 μm . J: Präparierte Schote nach der GUS-Färbung, eine β -Glucuronidase Aktivität war im Replum und der Scheidewand zu beobachten; Linie *sco4-2/GUS#1.1WT*, Maßstab = 100 μm . K: 6 Tage alte Pflanze mit gefärbten Keimblättern, Nebenblattansätzen, Hypokotyl und Wurzel; Linie *sco4-2/GUS#6WT*, Maßstab = 500 μm . L: 9 Tage alte Pflanze mit deutlicher GUS-Färbung der Nebenblätter, Linie *sco4-2/GUS#4WT*, Maßstab = 500 μm .

Für die Analyse der β -Glucuronidase-Aktivität wurden oberflächen-sterile Samen auf MS-Medium ausgebracht. In regelmäßigen Abständen wurden Keimlinge entnommen und diese durch die histochemischen GUS-Färbungen analysiert. Ab einem Alter von 14 Tagen wurden die Pflanzen auf Erde umgesetzt, um Blüten, Schoten und Embryonen charakterisieren zu können.

Interessanterweise war eine deutliche Promotoraktivität in den Embryonen zu erkennen. Dabei waren vom globulären, über das Herz- bis zum Zweikeimblattstadium alle Embryonen gefärbt (Abbildung 3-10, A, B und C), was den embryothalen Phänotyp der *sco4-2* Mutante unterstreicht. Die GUS-Färbung von einem Tag alten Keimlingen zeigte eine starke *pSCO4* Promotoraktivität in der Wurzel, speziell in der Wurzelspitze (Abbildung 3-10D). Keimlinge in einem Alter von drei Tagen wiesen wiederum eine zusätzliche β -Glucuronidase-Aktivität in der gesamten Wurzel, dem Hypokotyl und den Keimblättern auf. Eine Färbung der Vaskulatur war ebenfalls zu erkennen (Abbildung 3-10E). Sieben Tage nach der Keimung war die Färbung der Vaskulatur ausgeprägter (Abbildung 3-10F) und die β -Glucuronidase-Aktivität in der Wurzel blieb in weiteren Wachstumsstadien konstant. Die Blätter 1 und 2 zeigten nach 9 Tagen keine Produktion des SCO4-GUS Fusionsproteins, wiederum waren die Ansätze der Nebenblätter (Stipeln) stark gefärbt (Abbildung 3-10K). Neue Blätter fingen zunächst an, an der Spitze blaue GUS-Färbungen zu zeigen, bis sich im Laufe der Blattentwicklung das gesamte Blatt färbte (Abbildung 3-10, G und L). Über die gesamte Entwicklung der Pflanze zeigten die Nebenblätter durchgehend eine starke *pSCO4* Promotoraktivität (Abbildung 3-10, K und L). Das Expressionsmuster in den Blüten beschränkte sich auf die Antheren, die Narbe und die Kelchblätter, wobei Blütenblätter und Griffel keine Färbung zeigten (Abbildung 3-10H). In geschlossenen Schoten war an beiden Enden eine Promotoraktivität zu erkennen und nach der Präparation älterer Schoten konnte auch eine Färbung des Replums und der Scheidewand beobachtet werden (Abbildung 3-10, I und J).

Generell konnte in allen untersuchten Linien ein identisches Expressionsmuster dokumentiert werden. Aufgrund der unvollständigen Komplementation durch dieses Konstrukt, war ausschließlich eine Aussage bezüglich der Promotoraktivität möglich.

3.1.2.3 Charakterisierung der Komplementationslinie *sco4-2/pSCO4::SCO4-GFP*

Die Charakterisierung der Komplementationslinie *sco4-2/pSCO4::SCO4-GFP* beschränkte sich ebenfalls auf die Untersuchung des segregierenden WT, weil eine vollständige Komplementation durch dieses Konstrukt ebenfalls nicht erfolgen konnte. Die Expression des Konstrukts wurde mit Hilfe des konfokalen Laser-Scanning Mikroskops untersucht. Aufgrund der eingeschränkten Komplementation dieses Konstrukts konnten nur erste Hinweise über die Lokalisierung dokumentiert werden.

Da die GFP-Fluoreszenz sehr schwach war, konnten aufgrund der starken Hintergrundfluoreszenz in Blättern nur Aufnahmen in den Wurzeln erfolgen. Die Wurzeln der Keimlinge wurden zusätzlich mit Propidiumjodid (PI) gefärbt. Dadurch konnten die Zellwände deutlich dargestellt werden. Eine GFP-Fluoreszenz war in kleinen Vesikel-artigen Strukturen in der Zelle zu erkennen (Abbildung 3-11). Durch die Arbeit von Albrecht-Borth *et al.* (2013) konnte eine Lokalisierung in Chloroplasten nachgewiesen werden. Möglicherweise handelte es sich bei den beobachteten Signalen um Fluoreszenzen des SCO4-GFP Fusionsproteins in plastidären Strukturen. Um die Lokalisierung von SCO4 genauer untersuchen zu können, wurden im Folgenden Überexpressionskonstrukte transient in Protoplasten exprimiert.

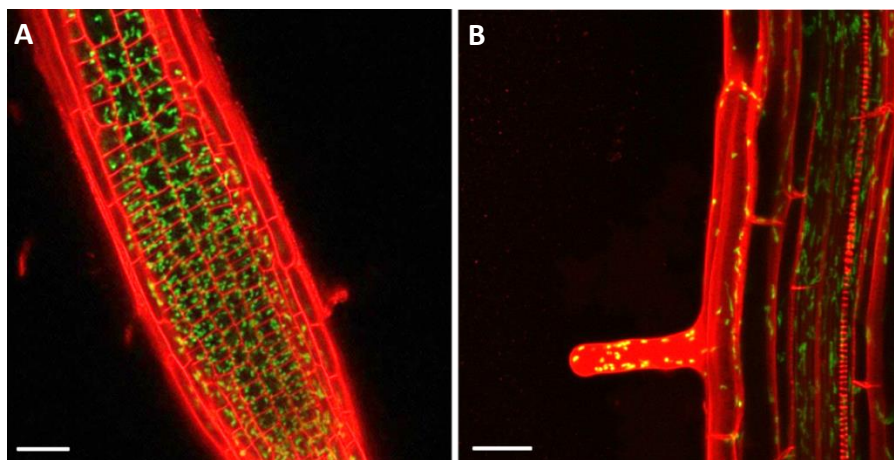


Abbildung 3-11: Konfokale Aufnahmen von Wurzeln mit dem Konstrukt *pSCO4::SCO4-GFP*. In grün ist die GFP-Fluoreszenz des Fusionsproteins SCO4-GFP dargestellt, in rot ist die PI-Färbung der Zellwände zu sehen. A: Wurzelspitze mit GFP-Fluoreszenz in Vesikel-artigen Strukturen, Maßstab entspricht 25 μm . B: Maximumprojektion einer Seitenwurzel mit GFP-Fluoreszenz in Vesikel-artigen Strukturen, Maßstab entspricht 30,5 μm .

3.1.3 Subzelluläre Lokalisierung von SCO4

Aufgrund der schwachen Expression des *pSCO4::SCO4-GFP* Konstrukts in transgenen Pflanzen wurden die Konstrukte *GFP-SCO4* und *SCO4-GFP* unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors hergestellt. Dafür wurde die codierende DNA-Sequenz (CDS) des Gens *SCO4* N- und C-terminal mit GFP fusioniert. Es folgte eine transiente Expression in Arabidopsis-Mesophyllprotoplasten, die am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop untersucht wurden. Bei der transienten Überexpression des *SCO4-GFP* Konstrukts konnten fluoreszierende Strukturen in und um die Chloroplasten beobachtet werden (Abbildung 3-12A). Damit konnten die Ergebnisse der Publikation von Albrecht-Borth *et al.* (2013) bestätigt werden. Bei der transienten Expression des *GFP-SCO4* Konstrukts in Protoplasten war wiederum eine andere Lokalisierung zu erkennen. Dabei bildete sich in der ganzen Zelle eine netzartige Struktur aus, welche einer Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum (ER) ähnelte. Diese Vermutung konnte mit Hilfe einer Co-Lokalisierung mit dem ER-Marker ER-rk CD3-959 (Nelson *et al.*, 2007) bestätigt werden. Dabei war eine deutliche Überlagerung der GFP-Fluoreszenz des GFP-SCO4 Fusionsproteins und des *mCherry* des ER-Markers zu sehen (Abbildung 3-12B).

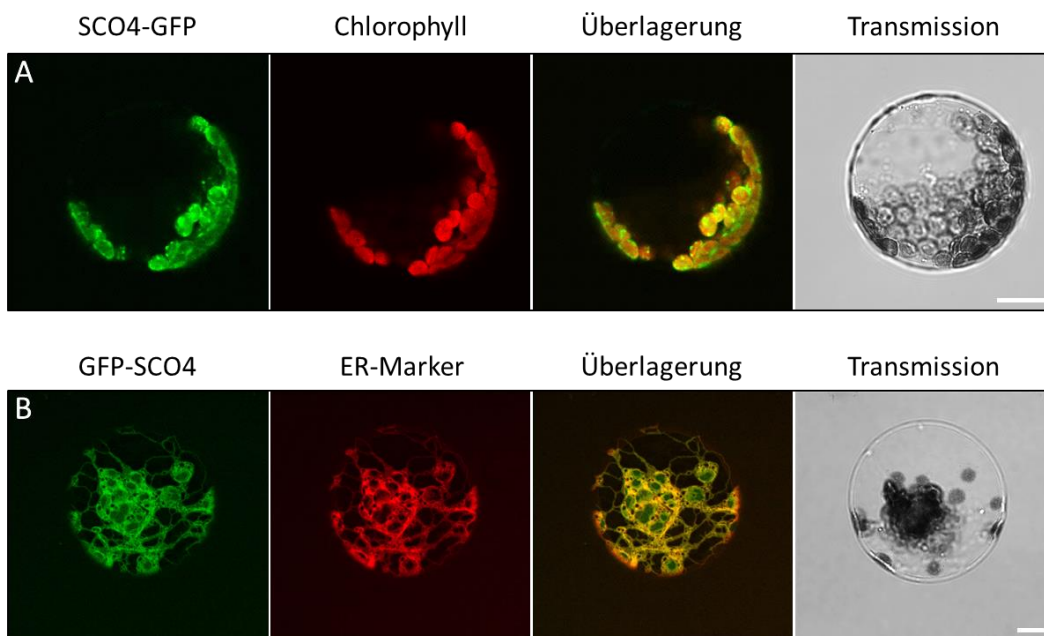


Abbildung 3-12: Konfokale Aufnahmen der subzellulären Lokalisierung von SCO4 in Mesophyllprotoplasten.
 A: Subzelluläre Lokalisierung des Fusionsproteins SCO4-GFP. Es ist eine Lokalisierung in und um die Chloroplasten zu erkennen. Grün: SCO4-GFP, Rot: Chlorophyll. Maßstab = 20 µm. B: Subzelluläre Lokalisierung des Fusionsproteins GFP-SCO4 (grün) mit Co-Lokalisierung des ER-Markers ER-rk CD3-959 (rot); Es ist eine Überlagerung des ER-Markers mit der GFP-Fluoreszenz des Fusionsproteins GFP-SCO4 zu beobachten. Maßstab = 10 µm.

Aufgrund der publizierten Lokalisation von SCO4 in Chloroplasten (Albrecht-Borth *et al.*, 2013) und der in dieser Arbeit gezeigten Übereinstimmung ist eine Funktion von SCO4 in plastidären Strukturen wahrscheinlich. Jedoch konnte zuvor die Funktion von anderen CAAX-Proteasen im ER beschrieben werden (Bracha *et al.*, 2002; Bracha-Drori *et al.*, 2008), so dass eine Funktion von SCO4 im ER nicht ausgeschlossen werden kann.

3.2 Suppressor-Screen von *saul1-1* Mutanten

Zur Untersuchung des Signalnetzwerkes von SAUL1 wurde ein Suppressor-Screen mit *saul1-1* Mutanten durchgeführt. Mit Hilfe einer EMS-Mutagenese sollten randomisierte Punktmutationen in *saul1-1* Pflanzen erzeugt werden, die eine Unterdrückung des *saul1-1* Phänotyps zur Folge haben können. Aufgrund des Temperatur-induzierbaren *saul1-1* Phänotyps, konnte ein Nachweis supprimierter Pflanzen bei einer Temperatur von 20°C leicht erfolgen. Zur Reduzierung nicht relevanter Punktmutationen wurden *saul1-1* Mutanten, die einen supprimierten Phänotyp zeigten, zweimal in *saul1-1/SAUL1-1* heterozygote Pflanzen rückgekreuzt (durchgeführt von Katja Vogelmann (Universität Hamburg, AG Prof. Dr. Hoth) und Tatjana Kleine (LMU München, AG Prof. Dr. Leister), persönliche Mitteilung). So entstanden unabhängige Suppressor-Linien, welche im Folgenden *saul1-1 susa* (*suppressor of saul1-1*) genannt werden. In Abbildung 3-13 sind exemplarisch 6 unabhängige *saul1-1 susa* Linien dargestellt, welche im Vergleich zu *saul1-1* keine gelben Blätter und kein verringertes Wachstum zeigten. Die erste Zielsetzung dieser Arbeit war die Identifizierung der für die Suppression verantwortlichen Allele.

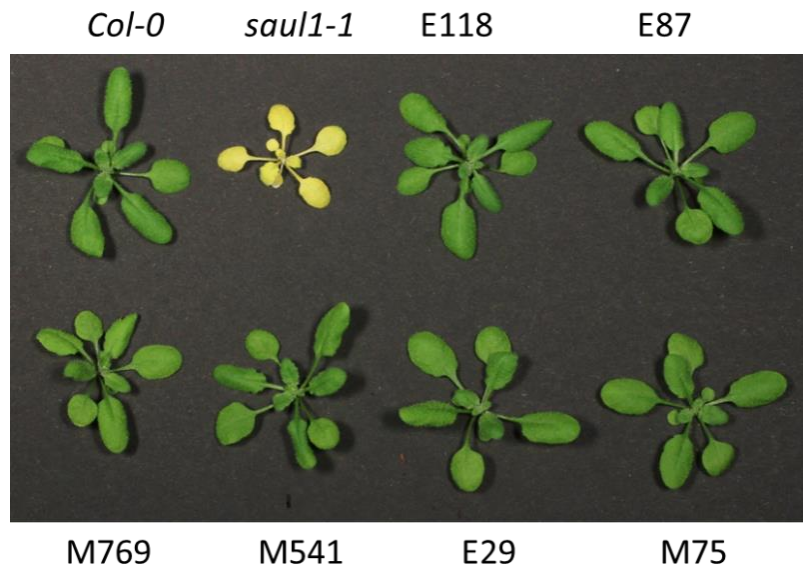


Abbildung 3-13: Fotografische Darstellung von *saul1-1 susa* Linien im Vergleich mit der *saul1-1* Mutante und dem WT (*Col-0*). Es handelt sich um 3 Wochen alte Pflanzen, welche zur Keimung zunächst 2 Wochen bei 25°C kultiviert wurden. Anschließend erfolgte die Induktion des *saul1-1* Phänotyps für eine weitere Woche bei 20°C. Die *saul1-1 susa* Linien zeigten keine veränderte Morphologie; die *saul1-1* Pflanze stellte das Wachstum ein und wurde gelb.

Für diese Arbeit wurden die F2- und F3-Generationen von 12 unabhängigen Suppressor-Linien der 2. Rückkreuzung von Katja Vogelmann (FAU Erlangen und Universität Hamburg, AG Prof. Dr. Hoth) und Tatjana Kleine (LMU München, AG Prof. Dr. Leister) zur Verfügung gestellt. Diese sind in Tabelle 3-2 aufgelistet und werden in E-Linien (aus Erlangen) und M-Linien (aus München) unterteilt. In den folgenden Beschreibungen handelt es sich ausschließlich um *saul1-1* homozygote *saul1-1 susa* Linien, deren genetischer Hintergrund durch PCR-basierten Nachweis der T-DNA in jedem Experiment erfolgreich kontrolliert wurde.

Tabelle 3-2: Auflistung der in dieser Arbeit untersuchten Suppressor-Linien

Herkunft	Name	Rückkreuzung und Generation	Zur Verfügung gestellt durch
Erlangen	E3	BC2F2/F3	Katja Vogelmann
Erlangen	E29	BC2F2/F3	Katja Vogelmann
Erlangen	E79	BC2F2/F3	Katja Vogelmann
Erlangen	E87	BC2F2/F3	Katja Vogelmann
Erlangen	E118	BC2F2	Katja Vogelmann
München	M541	BC2F2	Tatjana Kleine
München	M75	BC2F2	Tatjana Kleine
München	M391	BC2F2	Tatjana Kleine
München	M769	BC2F2	Tatjana Kleine
München	M101	BC2F2	Tatjana Kleine
München	M902	BC2F2	Tatjana Kleine
München	M903	BC2F2	Tatjana Kleine

3.2.1 Identifizierung des *saul1-1* Suppressor-Allels

3.2.1.1 Segregationsverhalten der Suppressorlinien

Das Segregationsverhalten der Suppressor-Linien (F2-Generation) lässt Rückschlüsse auf die dominante oder rezessive Vererbung des Suppressors zu. Ein rezessives Suppressor-Allel würde in

der F2-Generation 25% Pflanzen mit supprimiertem Phänotyp hervorbringen. Die restlichen 75% der Pflanzen würden den typischen *saul1-1* Phänotyp zeigen. Bei dominanten Suppressor-Allelen hingegen würden 75% der Pflanzen den Phänotyp unterdrücken. Hierfür ist die homozygote T-DNA Insertion in dem Gen *SAUL1* Voraussetzung.

Zur Untersuchung des Erbgangs der *saul1-1 susa* Linien wurden je 71 bis 152 Pflanzen, verteilt auf je zwei MS-Medium Platten, steril ausgebracht und bei 25°C angezogen. Zur Induktion des *saul1-1* Phänotyps wurden die Platten nach 8 Tagen auf 20°C umgestellt. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte nach weiteren 8 Tagen durch die Bestimmung der Anzahl an Pflanzen ohne Phänotyp. Die untersuchten fünf *saul1-1 susa* Linien (M903, M769, M902, M101 und M391) zeigten einen Anteil an grünen, supprimierten Pflanzen von durchschnittlich 23,73%, so dass bei diesen Linien von einem rezessiven Suppressor-Allel ausgegangen werden konnte (Tabelle 3-3).

Tabelle 3-3: Auflistung des Segregationsverhaltens diverser *saul1-1 susa*-Linien. Die Gesamtzahl gibt die für diesen Versuch ausgebrachten Pflanzen an. Nach der Induktion des Phänotyps wurden die Anzahl der Pflanzen mit supprimiertem Phänotyp gezählt und der Anteil an grünen Pflanzen (supprimierter Phänotyp) bestimmt.

Linie	Gesamtanzahl [total]	grüne Pflanzen [total]	Anteil grüner Pflanzen [%]
M903	152	37	24,34
M769	134	34	25,37
M902	138	42	30,43
M101	138	24	17,39
M391	71	15	21,13

Zusätzlich zu den steril angezogenen fünf *saul1-1 susa* Linien, wurde das Segregationsverhalten der restlichen Linien auf Erde betrachtet und eingeschätzt. Es konnte neben dem *saul1-1* typischen Phänotyp und den supprimierten Pflanzen, die je ¼ der Pflanzen ausmachten, ein intermediärer Phänotyp beobachtet werden (Abbildung 3-14A). Nach der Umstellung auf 20°C begannen die Pflanzen mit einem intermediären Phänotyp, im Vergleich zu *saul1-1* Mutanten, langsamer und ungleichmäßiger gelbe Blätter auszubilden. Zusätzlich war zu beobachten, dass die Gelbfärbung nicht die gesamte Pflanze betraf, sondern an den Blattspitzen anfang und sich langsam verteilte. Des Weiteren waren diese Pflanzen in der Lage Blütenstände und

anschließend Schoten zu bilden, welche sich büschelartig an dem kurzen Stil anordneten (Abbildung 3-14B). Beispielhaft ist in Abbildung 3-14 das Segregationsverhalten der *saul1-1 susa* Linie E3 (BC2F2) dargestellt. Es konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei Pflanzen mit einem intermediären Phänotyp um heterozygote Suppressor-Allele handelte und somit auch von einem semi-dominanten Allel gesprochen werden kann.

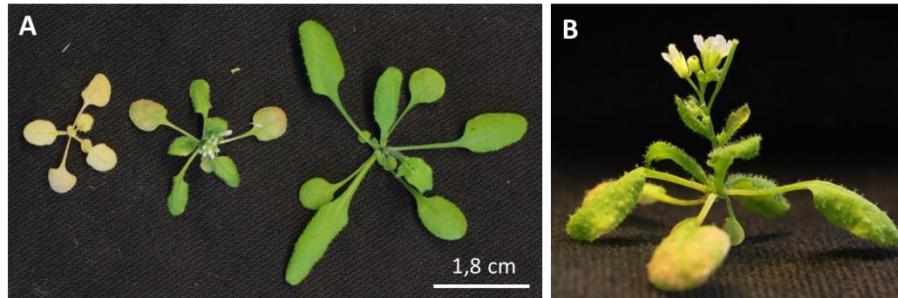


Abbildung 3-14: Fotografische Darstellung des Segregationsverhaltens der *saul1-1 susa* Linie E3 (BC2F2).
 A: Fotografische Darstellung der unterschiedlichen Phänotypen aufgrund der Segregation. Es konnte eine Segregation von 1:2:1 beobachtet werden, wobei $\frac{1}{4}$ der Pflanzen den typischen *saul1-1* Phänotyp und weitere $\frac{1}{4}$ eine WT-ähnliche Morphologie zeigten. Die restlichen Pflanzen zeigten einen intermediären Phänotyp. B: Pflanze mit intermediärem Phänotyp; die Pflanze hatte ein reduziertes Wachstum und war in der Lage Blütenstände und anschließend Schoten auszubilden, welche sich büschelartig an dem kurzen Stil anordneten.

3.2.1.2 Komplementationstudien

Aufgrund der rezessiven Vererbung des Suppressors wird ein Ausfall beider Allele zur Suppression des Phänotyps vorausgesetzt. Da in allen 12 *saul1-1 susa* Linien ein ähnlicher intermediärer Phänotyp zu beobachten war, stellte sich im nächsten Schritt die Frage, wie viele unterschiedliche Gene für die Suppression des *saul1-1* Phänotyps verantwortlich waren. Um diese Frage beantworten zu können, wurde eine Komplementationstudie mit 10 unabhängigen *saul1-1 susa* Linien (E3, E29, E79, E87, E118, M903, M902, M391, M769 und M101) durchgeführt. Für die Komplementationstudie wurden unabhängige *saul1-1 susa* Linien gekreuzt und die F1-Nachkommen phänotypisch analysiert. Die individuellen Kreuzungsexperimente der *saul1-1 susa* Linien sind im Anhang der Tabelle 7-7 zu entnehmen.

Sind in zwei unabhängigen *saul1-1 susa* Linien zwei unterschiedliche Gene betroffen, liegen diese in der F1-Generation jeweils heterozygot vor und die Pflanzen sollten den *saul1-1* typischen

oder intermediären Phänotyp zeigen. Zwei *saul1-1 susa* Linien, in denen dasselbe Gen betroffen ist, hätten hingegen in der F1-Generation eine WT-ähnliche Morphologie.

Für die Komplementationstudie wurden je 39 Nachkommen ausgebracht und hinsichtlich ihres Phänotyps untersucht. Es wurden zwei Experimente durchgeführt, in denen zunächst alle E-Linien untereinander gekreuzt wurden. Die Nachkommen zeigten keinen *saul1-1* typischen Phänotyp. Daraus lässt sich schließen, dass die Eltern allelisch waren. In dem zweiten Experiment wurden 5 M-Linien u.a. mit der *saul1-1 susa* Linie E3 gekreuzt. Auch diese direkten Nachkommen zeigten eine WT-Morphologie.

In Abbildung 3-15 sind beispielhaft einige F1-Nachkommen der Kreuzungen M391xM101, M391xM769, E3xM391 und E3xM101 dargestellt. Im Vergleich zu *saul1-1* Mutanten zeigten die Nachkommen der Kreuzung einen WT-ähnlichen Phänotyp. So konnte in diesem Beispiel gezeigt werden, dass die *saul1-1 susa* Linien E3, M101, M391 und M769 allelisch waren.

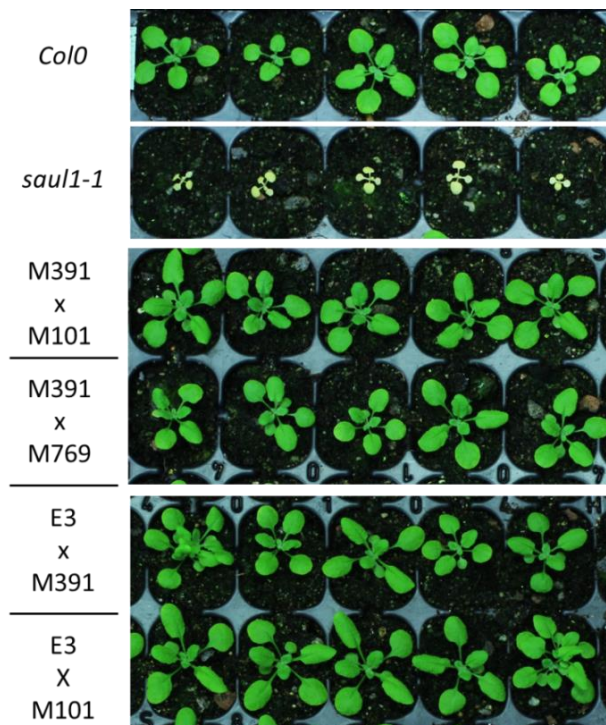


Abbildung 3-15: Fotografische Darstellung der Komplementationstudie einiger *saul1-1 susa*-Linien. Fotografische Darstellung der F1-Nachkommen aus den Kreuzungen M391xM101, M391xM769, E3xM391 und E3xM101 im Vergleich zu der *saul1-1* Mutante und dem WT (*Col-0*). Bei den Nachkommen der Kreuzungen unterschiedlicher *saul1-1 susa*-Linien war kein *saul1-1* typischer Phänotyp zu beobachten. Die Eltern dieser Nachkommen waren allelisch. Die F1-Pflanzen wurden auf Erde für 11 Tage bei 25°C herangezogen und anschließend zur Induktion des Phänotyps für weitere 7 Tage auf 20°C umgestellt.

Zusammenfassend konnte mithilfe der Komplementationstudien gezeigt werden, dass es sich bei den 10 untersuchten Linien um unabhängige, allelische *saul1-1 susa* Linien handelte, welche im selben Gen eine Mutation haben müssen. Das Gen wird im Folgenden als *SUSA1* bezeichnet.

3.2.1.3 Tiefensequenzierung und genetische Kartierung der *saul1-1 susa* Linie E3

Zur Identifizierung des Suppressor-Allels sollte mithilfe einer Tiefensequenzierung in Kombination mit einer groben genetischen Kartierung der Chromosomenlocus des Suppressors definiert werden. Da es sich um allelische *saul1-1 susa* Linien handelte, wurde sich in dieser Versuchsreihe auf die Linie E3 konzentriert und eine Tiefensequenzierung der F3-Generation der 2. Rückkreuzung (BC2F3) durchgeführt. Parallel wurde eine Kartierungspopulation durch Auskreuzung der BC2F3-Pflanzen mit einer *saul1-1* Mutante im Landsberg *erecta* (*saul1-1* Ler) Hintergrund erstellt.

3.2.1.3.1 Auswertung der Tiefensequenzierung

Für die Tiefensequenzierung wurden die Pflanzen der *saul1-1 susa* Linie E3 (BC2F3) auf Erde in einer Klimakammer kultiviert und anschließend aus einem Pool von 10 Pflanzen genomische DNA isoliert (2.4.6). Die Tiefensequenzierung und die bioinformatische Auswertung erfolgten bei der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland). Aufgrund der rezessiven Vererbung des Suppressor-Allels wurde anschließend nach homozygoten SNPs (*single nucleotide polymorphism*) gefiltert, die auf die Mutagenese mit EMS zurückzuführen waren. Zusätzlich wurde sich auf SNPs in annotierten Genen beschränkt, welche eine Änderung in der Aminosäuresequenz zur Folge hatten (mit freundlicher Unterstützung durch Felix Seifert, AG PD Dr. Scholten, Universität Hamburg). Bei dieser Analyse konnten 41 SNPs identifiziert werden, welche sich über die Chromosomen 1, 2, 3 und 4 verteilten (Anhang 7.8.1). Insgesamt wurden so 35 SNPs auf Chromosom 1, 1 SNP auf Chromosom 2, 4 SNPs auf Chromosom 3 und ein weiterer SNP auf Chromosom 4 identifiziert.

3.2.1.3.2 Genetische Kartierung

Als Grundlage für die genetische Kartierung wurden SSLP-Marker (*simple sequence length polymorphism*) verwendet. Dabei handelt es sich um nicht codierende DNA-Abschnitte im Genom, welche sich in unterschiedlichen Ökotypen bezüglich ihrer Länge unterscheiden. Die im *Col-0* Hintergrund vorliegende *saul1-1 susa* Linie E3 wurde mit einer *saul1-1* Mutante im Landsberg *erecta* Hintergrund ausgekreuzt. Im Vorfeld wurden die *saul1-1 Ler* Pflanzen durch 7-maliges Auskreuzen der *saul1-1* Mutante in den Ökotyp Landsberg *erecta* von Katja Vogelmann (FAU Erlangen und Universität Hamburg, AG Hoth) hergestellt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Für die grobe Kartierung wurden SSLP-Marker der *Arabidopsis Mapping Plattform* (Hou *et al.*, 2010) verwendet. Die verwendeten Oligonukleotide und die Amplifikatlängen der Ökotypen sind im Anhang (Tabelle 7-6) zu finden.

Auf Grundlage der Ergebnisse der Tiefensequenzierung wurde in den Chromosombereichen der identifizierten 41 SNPs eine Kartierung durchgeführt. Zur besseren Eingrenzung des oberen Abschnitts des Chromosom 1 wurden drei weitere SSLP-Marker verwendet (Abbildung 3-16).

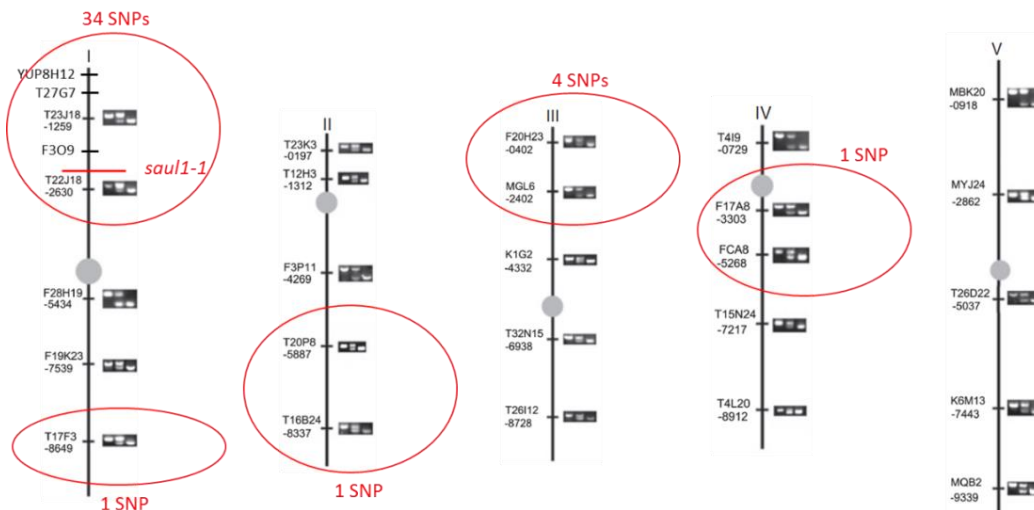


Abbildung 3-16: Schematische Darstellung der SSLP-Marker für die grobe Kartierung der fünf Arabidopsis-Chromosomen (modifiziert von Hou *et al.*, 2010). Für die grobe Kartierung der Arabidopsis-Chromosomen werden für jedes Chromosom fünf SSLP-Marker verwendet. Im oberen Bereich des Chromosoms 1 sind drei weitere SSLP-Marker definiert worden. Die roten Kreise markieren die Bereiche mit den durch die Tiefensequenzierung identifizierten SNPs, wobei die Anzahl der SNPs pro Bereich angegeben ist. Auf Chromosom 1 ist zusätzlich die Position der T-DNA Insertion im Gen *SAUL1* durch einen roten Balken schematisch dargestellt. Die grauen Kreise auf den Chromosomen symbolisieren die Zentromere.

Für die Kartierung wurden 64 WT-ähnliche Pflanzen der F2-Generation, die den *saul1-1* Phänotyp supprimierten, verwendet. Von diesen Pflanzen wurde mittels PCR-basierter Kartierung der Chromosomen die *Col-0* Allelfrequenz bestimmt. Dabei sollte der Chromosomenbereich, in dem sich das Suppressor-Allel befindet, eine hohe *Col-0* Allelfrequenz aufweisen. Beispielphaft wird im Folgenden das Vorgehen anhand des SSLP-Markers F17A8 auf Chromosom 4 dargestellt. Dabei ist das Amplifikat im *Col-0* Ökotyp um 20 nt größer als im *Ler* Hintergrund (Abbildung 3-17, Pfeile). Pflanzen mit einem *Col-0* und einem *Ler* Allel weisen in der PCR zwei Banden mit den Größen von 137 bp und 117 bp auf. In Abbildung 3-17 sind beispielhaft PCR-Produkte von 20 individuellen Pflanzen der Kartierungspopulation in einem 4%igen Agarosegel dargestellt. 5 Pflanzen haben in diesem Beispiel zwei *Col-0* Allele und weitere 5 Pflanzen ausschließlich *Ler* Allele. Die restlichen 10 Pflanzen sind für diesen Marker heterozygot und haben ein *Col-0* und ein *Ler* Allel, wodurch sich in diesem Beispiel eine *Col-0* Frequenz von 50% ergibt.

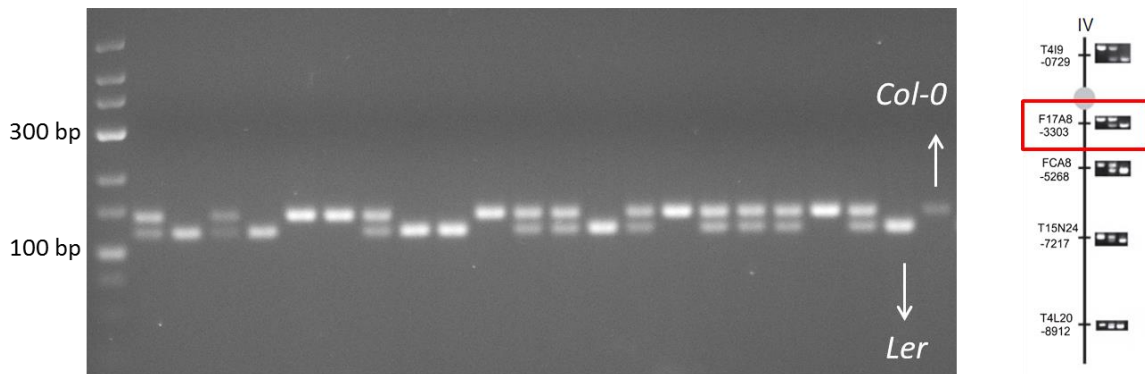


Abbildung 3-17: Darstellung der Amplifikate nach einer Kartierungs-PCR des Markers F17A8 (Chromosom 4). Darstellung eines 4%igen Agarosegels mit 20 Proben der Kartierungspopulation und zwei WT (*Ler* und *Col-0*) Kontrollen. Das Amplifikat von *Ler* Allelen hat eine Größe von 117 bp und das Amplifikat von *Col-0* Allelen besitzt eine Größe von 137 bp. Proben mit zwei Banden sind Pflanzen mit einem *Col-0* und einem *Ler* Allel zuzuordnen. Als Marker wurde der *GeneRoler Low Range DNA Ladder* der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) verwendet. Zur bildlichen Darstellung des SSLP-Markers auf Chromosom 4 sind die SSLP-Marker für die grobe Kartierung von Chromosom 4 abgebildet (modifiziert von Hou *et al.*, 2010).

Wurden alle 64 Pflanzen der Kartierungspopulation berücksichtigt, ergab sich für diesen Marker eine *Col-0* Allelfrequenz von 52,50%. Auch alle weiteren Marker auf den Chromosomen 2, 3 und 4 hatten durchschnittlich eine *Col-0* Allelfrequenz 50,76%. Somit war die Wahrscheinlichkeit sehr gering, dass das Suppressor-Allel auf diesen drei Chromosomen liegen könnte. Wurde hingegen Chromosom 1 betrachtet, war zu erkennen, dass im oberen Abschnitt vier SSLP-Marker zu

100% im *Col-0* Hintergrund lagen. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass die Auskreuzung in den *Ler* Hintergrund mit einer *saul1-1* Mutante erfolgte, die ebenfalls durch Auskreuzung in den *Ler* Ökotyp entstand. Die Bereiche um die T-DNA Insertion in dem Gen *SAUL1* bleiben trotz Auskreuzung im *Col-0* Hintergrund. Die jeweiligen Marker wurden ebenfalls in *saul1-1* *Ler* Pflanzen getestet und dabei war zu erkennen, dass die Marker F309 und T22J18 ausschließlich im *Col-0* Hintergrund lagen. Im Bereich der Marker T27G7 und T23J18 konnten beide Allele identifiziert werden. Alle anderen verwendeten Marker lagen im *Ler* Hintergrund.

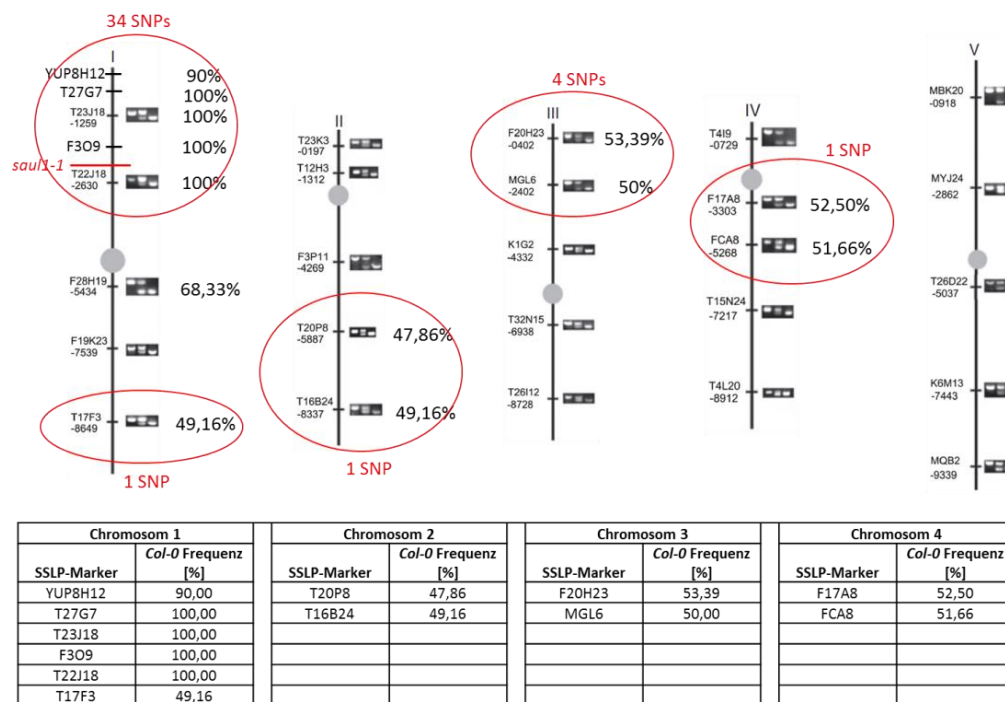


Abbildung 3-18: Schematische Darstellung der SSLP-Marker für die grobe Kartierung der fünf Arabidopsis-Chromosomen (modifiziert von Hou *et al.*, 2010) mit den jeweiligen Angaben der *Col-0* Allelfrequenz nach der groben Kartierung. Für die grobe Kartierung der Arabidopsis Chromosomen wurden für jedes Chromosom fünf SSLP-Marker verwendet. Im oberen Bereich des Chromosoms 1 sind drei weitere SSLP-Marker definiert worden. Die roten Kreise markieren die Bereiche, in denen SNPs identifiziert wurden. Dabei ist die Anzahl der SNPs für den jeweiligen Locus angegeben. Auf Chromosom 1 ist zusätzlich die Position der T-DNA Insertion im Gen *SAUL1* durch einen roten Balken schematisch dargestellt. Die grauen Kreise auf den Chromosomen symbolisieren die Zentromere. Den SSLP-Markern ist die *Col-0* Allelfrequenz von der Kartierung von 64 Pflanzen zu geordnet. Die Allelfrequenz ist zusätzlich tabellarisch mit den jeweiligen SSLP-Markern dargestellt.

Aufgrund dieser Tatsache war eine Aussage über den Suppressorlocus im Bereich der T-DNA Insertion nicht möglich. Die anderen Chromosomenbereiche erschienen nach der Kartierung durch

die geringe *Col-0* Allelfrequenz unwahrscheinlich, so dass ein eindeutiger Locus nicht definiert werden konnte.

3.2.1.4 Kopplungsanalysen

Aufgrund der hohen Anzahl an identifizierten SNPs auf Chromosom 1 wurde eine Kopplungsanalyse durchgeführt. Dabei wurde getestet, ob das Suppressor-Gen *SUSA1* mit der T-DNA Insertion in *SAUL1* gekoppelt vererbt wird. In diesem Experiment wurden die *saul1-1 susa* Linien E3, E29, E79, E87 und E118 in den WT *Col-0* gekreuzt und die F2-Generation betrachtet.

Bei nicht-gekoppelter Vererbung sollten die T-DNA Insertion in *SAUL1* und die Suppressor-Mutation unabhängig segregieren. Dabei sollte nur $\frac{1}{16}$ der Pflanzen den *saul1-1* typischen Phänotyp unterdrücken. Bei einer gekoppelten Vererbung der T-DNA Insertion und der Suppressor-Mutation steigt die Anzahl der *saul1-1* homozygoten Pflanzen mit WT-ähnlicher Morphologie an, weil die Wahrscheinlichkeit einer Rekombination gekoppelter Merkmale bei geringerem Abstand der Gene abnimmt.



Abbildung 3-19: Fotografische Darstellung von Arabidopsis-Pflanzen der F2-Generation der *saul1-1 susa* Linie E29 nach der Kreuzung in den WT *Col-0*. Für die Kopplungsanalyse wurde die F2-Generation nach der Kreuzung in *Col-0* betrachtet. Die *saul1-1* homozygoten Pflanzen sind durch einen Kreis markiert, wobei ein roter Kreis Pflanzen mit WT-ähnlichem Phänotyp markiert und ein gelber Kreis Pflanzen mit einem *saul1-1* ähnlichen Phänotyp zeigt. Aufgrund der hohen Anzahl an WT-ähnlichen Pflanzen kann von einer gekoppelten Vererbung von *SAUL1* und *SUSA1* ausgegangen werden. Die Pflanzen wurden für 2 Wochen bei 25°C angezogen und für eine weitere Woche zur Induktion des Phänotyps bei 20°C kultiviert.

In dieser Versuchsreihe wurden von jeder Kreuzung 104 Pflanzen der F2-Generation ausgesät und mittels PCR auf die T-DNA Insertion in *SAUL1* überprüft. In Abbildung 3-19 ist beispielhaft für alle weiteren vier *saul1-1 susa* Linien eine Schale mit 104 ausgesäten F2 Pflanzen der *saul1-1 susa* Linie E29 zu sehen.

Von den 104 Pflanzen waren 92 Pflanzen gekeimt und 90 Pflanzen konnten genotypisiert werden. Davon waren 24 Pflanzen WT, 45 Pflanzen heterozygot und 21 Pflanzen homozygot für die T-DNA Insertion in *SAUL1*. Die *saul1-1* homozygoten Pflanzen sind in der Abbildung 3-19 mit einem Kreis markiert. Drei Pflanzen zeigten einen *saul1-1* typischen Phänotyp (gelber Kreis). Alle weiteren Pflanzen wiesen einen WT-ähnlichen Phänotyp auf (roter Kreis). Bei den weiteren getesteten Linien E3, E118, E79 und E87 konnte ein ähnliches Verhältnis beobachtet werden. Die genauen Ergebnisse der Genotypisierung und die Anzahl an Pflanzen mit *saul1-1* Phänotyp sind in der Tabelle 3-4 dargestellt. So gab es bei den Linien E3 und E118 nur eine und bei der Linie E79 zwei Pflanzen mit *saul1-1* ähnlichem Phänotyp. Bei der Linie E87 waren alle gekeimten Pflanzen grün und zeigten einen WT-Phänotyp. Aufgrund der großen Anzahl an *saul1-1* homozygoter Pflanzen mit supprimiertem Phänotyp ist eine gekoppelte Vererbung von *SAUL1* und *SUSA1* wahrscheinlich.

Tabelle 3-4: Auflistung der Genotypisierungsergebnisse der F2-Population der Kopplungsanalyse. Für die Kopplungsanalyse wurden 71 bis 92 Pflanzen auf dessen *saul1-1* Genotyp mittels PCR untersucht. Von den *saul1-1/saul1-1* (homozygot) Pflanzen zeigten nur jeweils 1 bis 3 Pflanzen den typischen *saul1-1* Phänotyp. Somit ist von einer gekoppelten Vererbung von *SAUL1* und *SUSA1* auszugehen.

	E3	E118	E29	E79	E87
<i>SAUL1-1/SAUL1-1</i>	20	13	24	24	18
<i>saul1-1/SAUL1-1</i>	40	41	45	50	44
<i>saul1-1/saul1-1</i>	24	16	21	15	18
genotypisiert	84	70	90	89	80
gekeimt	85	71	92	89	82
<i>saul1-1</i> Phänotyp	1	1	3	2	0

3.2.1.5 Mapping-by-sequencing

Aufgrund der gekoppelten Vererbung von *SAUL1* und *SUSA1* und der Identifizierung von 10 allelischen *saul1-1 susa* Linien wurde die Tiefensequenzierung mit den drei unabhängigen Linien E118, M391 und M101 wiederholt. Dabei wurde das von James *et al.* (2013) beschriebene *mapping-by-sequencing* durchgeführt. Bei der Methode wird eine Mapping-Population aus der 2. Rückkreuzung erstellt, wovon ca. 150 - 200 Pflanzen der F2-Generation verwendet werden. Es konnte in einem Szenario gezeigt werden, dass ab einem Pool von 150 individuellen Pflanzen die Frequenz nicht relevanter SNPs sinkt. Zusätzlich können zwei oder mehrere Mapping-Populationen unabhängiger Linien miteinander verglichen werden. Dabei können identische Varianten in allen Linien ebenfalls als nicht relevant eingestuft werden (James *et al.*, 2013; Hartwig *et al.*, 2012). Aufgrund von Kopplungsanalysen, Komplementationstudien und eines Vergleichs von Tiefensequenzierungsdaten ließ sich die Anzahl relevanter SNPs stark reduzieren.

3.2.1.5.1 Tiefensequenzierung der *saul1-1 susa* Linien E118, M391 und M101

Für die Mapping-Population (F2-Generation) wurden 150 bis 200 Pflanzen mit supprimiertem Phänotyp benötigt, welche aufgrund der rezessiven Vererbung nur $\frac{1}{4}$ der Gesamtanzahl der Pflanzen ausmachte. So wurden von jeder *saul1-1 susa* Linie 1040 Pflanzen (BC2F2) ausgebracht. Von der *saul1-1 susa* Linie E118 konnte Material von 164 Pflanzen geerntet werden, bei den beiden anderen Linien wurden je 160 Pflanzen für die Mapping-Population verwendet. Es wurde von jeder Pflanze ein definiertes Stück Blatt (Durchmesser: 1,5 cm) ausgestanzt und in 10er Pools in einem Reaktionsgefäß bei -80°C eingefroren. Nach der gDNA-Isolierung wurden alle 10er Pools einer Mapping-Population auf eine Probe reduziert und hinsichtlich ihrer Qualität untersucht. Die Proben wurden zu der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) geschickt. Dort fanden die Herstellung der Bibliothek, die Tiefensequenzierung und die bioinformatische Auswertung statt.

3.2.1.5.2 Auswertung der Tiefensequenzierung

Die Variantenanalyse der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) konnte durchschnittlich 40.000 SNPs pro sequenzierter Linie identifizieren. Nach der Selektion homozygoter und aus der EMS-Mutagenese resultierender SNPs reduzierte sich die Anzahl

drastisch. Zusätzlich wurde nach Varianten in codierenden Bereichen selektiert, welche eine Aminosäureänderung zur Folge hatten. Dabei konnten für die *saul1-1 susa* Linie E118 21 resultierende SNPs definiert werden. Für die Linie M101 waren es 32 und für die Linie M391 27 resultierende SNPs. In einem weiteren Schritt wurden Varianten, die in allen drei Linien identisch waren, verworfen. Hierfür wurden die Informationen der ersten Tiefensequenzierung der *saul1-1 susa* Linie E3 hinzugezogen (3.2.1.3). Auf diese Weisen konnten 7 relevante SNPs in der Linie E118, 17 SNPs in der Linie M101 und 11 SNPs in der Linie 391 identifiziert werden. Dabei verteilten sich alle SNPs, wie schon vorher angenommen, auf Chromosom 1. Lediglich die *saul1-1 susa* Linie M391 zeigte einen relevanten SNP auf Chromosom 4. Da es sich allerdings um drei allelische *saul1-1 susa* Linien handelte, konnte diese Variante ausgeschlossen werden. Unter den relevanten SNPs der unabhängigen Linien musste aufgrund der Allelität ein gemeinsames Gen identifiziert werden. Wie in dem Mengendiagramm in Abbildung 3-20 dargestellt, konnte auch genau ein Gen gefunden werden. Es handelte sich bei diesem Gen um At1g17600, welches im Folgenden als *SUSA1* bezeichnet wird. *SUSA1* wird in der TAIR-Datenbank (<http://www.arabidopsis.org/>) als ein noch nicht charakterisiertes TIR-NBS-LRR Resistenzprotein beschrieben.

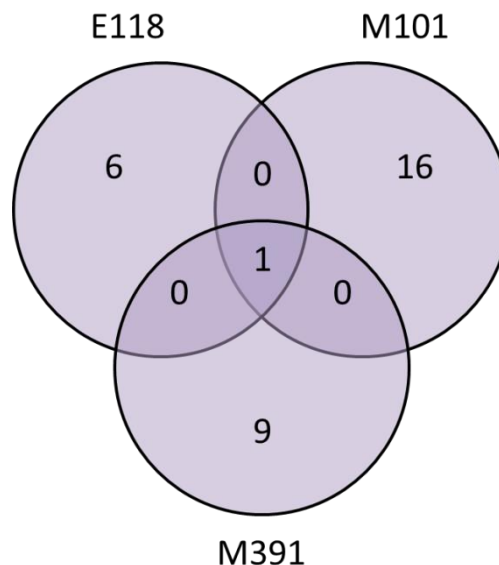


Abbildung 3-20: Mengendiagramm zur graphischen Darstellung von Übereinstimmungen in drei Listen der relevanten Suppressor-Gene der *saul1-1 susa* Linien E118, M101 und M391. Die Auswertung der Tiefensequenzierung ergab für die *saul1-1 susa* Linie E118 7 relevante SNPs, für die *saul1-1 susa* Linie M101 17 und für die *saul1-1 susa* Linie M391 10 relevante SNPs. Aufgrund der Allelität der drei *saul1-1sus*a Linien konnte durch die Übereinstimmung eines Gens At1g17600 als *SUSA1* definiert werden. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Venny (Oliveros 2007-2015).

Bei der Linie E118 (zukünftig *saul1-1 susa1-7*) konnte eine Mutation von Glycin zu Argenin an der Aminosäureposition 212 in dem P-Loop der AAA ATPase Domäne gefunden werden. Die Linien M391 und M101 wiesen beide Mutationen in den Bereichen der Leucin-reichen Wiederholungen (*leucine-rich-repeats*, LRR) auf. Die *saul1-1 susa* Linie M101 wies an der Position 712 einen Austausch von Valin zu Methionin auf und die Linie M391 zeigte wiederum eine Mutation von Serin zu Phenylalanin an der Stelle 960 (Abbildung 3-21). Die noch ausstehenden *saul1-1 susa* Linien (M541, E79, E87, M769, E29, M75, M902 und M903) wurden über eine Sanger-Sequenzierung auf Punktmutationen in dem Gen *SUSA1* untersucht. Dafür wurden von den Linien gDNA isoliert und das Gen mit flankierenden Oligonukleotiden außerhalb der kodierenden Bereiche amplifiziert. Die Amplifikate wurden gereinigt und für eine Sanger-Sequenzierung zu der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) geschickt. Dabei konnten Punktmutationen in dem Gen *SUSA1* in allen *saul1-1 susa* Linien bestätigt werden. Die resultierenden Aminosäureänderungen und die neuen Allelbezeichnungen sind in der Tabelle 3-5 aufgelistet.

Tabelle 3-5: Auflistung aller *saul1-1 susa1* Linien mit Angaben zu der Aminosäure(AS)-Änderung und der damit betroffenen Domäne von *SUSA1*

Allel ¹	Linie	AS-Änderung	betroffene Domäne	Kommentar
<i>susa1-6</i>	M541	E86K	TIR	
<i>susa1-7</i>	E118	G212R	P-Loop/NBS-ARC	
<i>susa1-8</i>	E79/E87	G214E	P-Loop/NBS-ARC	
<i>susa1-9</i>	M769	W272Stopp	NBS-ARC	
<i>susa1-10</i>	E3/E29	T649M	LRR Bereich	
<i>susa1-11</i>	M75	E822K	LRR	
<i>susa1-12</i>	M391	S960F	LRR	
<i>susa1-13</i>	M101	V712M	LRR Bereich	
	M902	n.a.	3. Intron, Spleißregion	nicht eindeutig
	M903	E822K	LRR	nicht eindeutig

¹ Die *susa1*-Allele *susa1-1* bis *susa1-5* wurden in einem weiteren Suppressor-Screen von *saul1-1* in der Arbeitsgruppe von Prof. Xin Li (University of British Columbia, Vancouver, Kanada) identifiziert (Tong *et al.*, eingereicht).

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass bei den Linien E3 und E29 sowie bei E79 und E87 identische SNPs identifiziert wurden. Diese Linienpaare werden im Folgenden in je einer *saul1-1 susa1* Linie zusammengefasst (E3/E29 = *saul1-1 susa1-10*; E79/E87 = *saul1-1 susa1-8*). Die Linien M541 (*saul1-1 susa1-6*) und M75 (*saul1-1 susa1-11*), welche zuvor noch nicht hinsichtlich ihrer Allelität zu den anderen Linien getestet wurden, zeigten ebenfalls Mutationen in *SUSA1* und werden zukünftig ebenfalls als *saul1-1 susa1* Linien beschrieben. Die *saul1-1 susa* Linien M902 und M903 zeigten in der Sanger-Sequenzierung Artefakte, so dass bei der *saul1-1 susa* Linie M902 eine Mutation in der Spleißregion des 3. Introns nur vermutet werden konnte. Selbiges traf auf die Linie M903 zu. Dabei konnte eine Mutation im LRR-Motiv angenommen werden, welche identisch mit der Mutation in Linie M75 wäre. Beide *saul1-1 susa* Linien M902 und M903 wurden aufgrund der Ungenauigkeiten in der Sequenzierung nicht näher betrachtet. In den Linien *saul1-1 susa1-8* und *saul1-1 susa1-9* konnten neben *saul1-1 susa1-7* ebenfalls Mutationen in der AAA ATPase Domäne (Abbildung 3-21B, gelbe Box) gefunden werden. Die Linie *saul1-1 susa1-8* zeigte eine Änderung im P-Loop der AAA ATPase Domäne und bei der Linie *saul1-1 susa1-9* führt die Mutation zu einem Stoppcodon. *saul1-1 susa1-6* (M541) war die einzige Linie, in der eine Änderung in der TIR-Domäne zu finden war. Alle weiteren *saul1-1 susa1* Linien zeigten Aminosäureänderungen in den Bereichen der LRR-Motive (Abbildung 3-21).

So scheinen alle Domänen und Motive in diesem Protein wichtig für dessen Funktion zu sein, so dass es durch eine Fehlfunktion oder durch einen Funktionsausfall von *SUSA1* zu einer Suppression des Phänotyps in *saul1-1* Mutanten kommt.

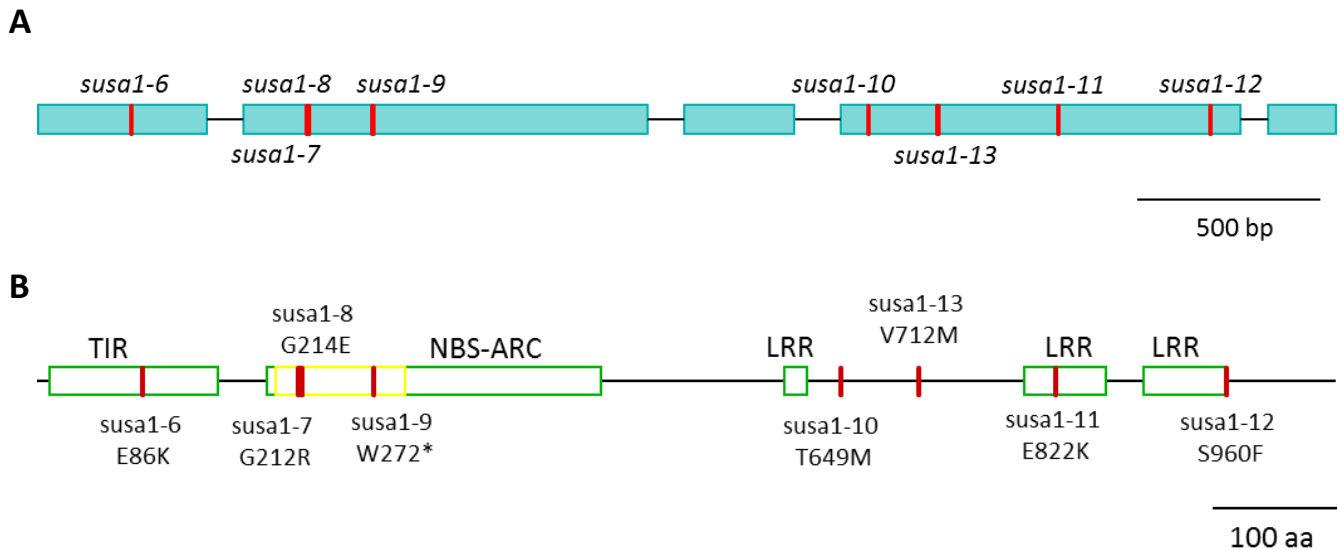


Abbildung 3-21: Schematische Darstellung des genomischen Bereichs von *SUS A1* mit Exon- und Intron-Struktur (A) und schematische Darstellung der Domänenstruktur von *SUS A1* (B). Die Darstellung erfolgte mit dem Programm Clone Manager 9 Professional Edition (Scientific and Educational Software). A: Darstellung der Exon- und Intron-Struktur des Gens *SUS A1*. Die blauen Boxen symbolisieren die fünf Exons, wobei dazwischen die Introns durch einen schwarzen Balken dargestellt sind. Die Punktmutationen in den jeweiligen *saul1-1 susa* Linien sind durch rote Bereiche dargestellt. B: Darstellung der Domänenstruktur von *SUS A1*. Die grünen Boxen sind den jeweiligen Domänen zuzuordnen. Die gelbe Box in der NBS-ARC-Domäne symbolisiert die AAA ATPase-Domäne des *SUS A1*-Proteins. Die Aminosäureänderungen der *saul1-1 susa* Linien sind ebenfalls durch rote Bereiche dargestellt. Die Anordnung der Domänen von *SUS A1* wurde durch die NCBI Datenbank *Conserved Domain Database* (CDD) (Marchler-Bauer *et al.*, 2015) vorhergesagt.

3.2.2 Charakterisierung von *SUS A1*

3.2.2.1 Komplementation von *saul1-1 susa1-7*

Zur Bestätigung des Suppressors wurde eine Komplementation der Linie *saul1-1 susa1-7* mit dem Fusionskonstrukt *GFP-SUS A1* unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors durchgeführt. Dadurch sollte der *saul1-1* Phänotyp wieder hergestellt werden. Es wurde der genomische Teil des Gens *SUS A1* mittels Gateway®-Technologie in den Zielvektor pMDC43 kloniert. Dadurch entstand eine N-terminale Fusion mit GFP. Dieses Überexpressionskonstrukt wurde über Agrobakterien-vermittelte Transformation in Pflanzen der Linie *saul1-1 susa1-7* eingebracht. Die Regeneration von Transformanten erwies sich als sehr schwierig. Daher konnte nur eine Komplementationslinie *saul1-1 susa1-7/OE GFP-SUS A1* nach der Selektion regeneriert werden, die

teilweise gelbe Blätter und ein verringertes Wachstum bereits bei 25°C zeigte. Um einen Einfluss der Hygromycinselektion auf den Phänotyp auszuschließen, wurden die Nachkommen der Pflanze (T1) betrachtet. Dabei konnten nach einem Umstellversuch von 25°C auf 20°C Pflanzen mit teilweise gelben Blättern und verringertem Wachstum festgestellt werden. Dabei unterschied sich die Pflanzenmorphologie vom typischen *saul1-1* Phänotyp (Abbildung 3-22). Eine Genotypisierung bestätigte die T-DNA Insertion im Gen *SAUL1* und auch eine spezifische PCR auf das *GFP-SUSA1* Konstrukt zeigte ein Amplifikat in der Größe von 2421 bp. Der Nachweis der GFP-SUSA1 Fluoreszenz unter dem Fluoreszenz-Makroskop konnte nicht erfolgen. Auch der Nachweis des *GFP-SUSA1* Transkriptes erwies sich als schwierig. Daher war von einer sehr geringen Expression des Komplementationskonstruktes auszugehen. Dieses würde den nur teilweise wieder hergestellten *saul1-1* Phänotyp erklären. Eine genaue Charakterisierung der Komplementationslinie *saul1-1 susa1-7/OE GFP-SUSA1* steht noch aus.

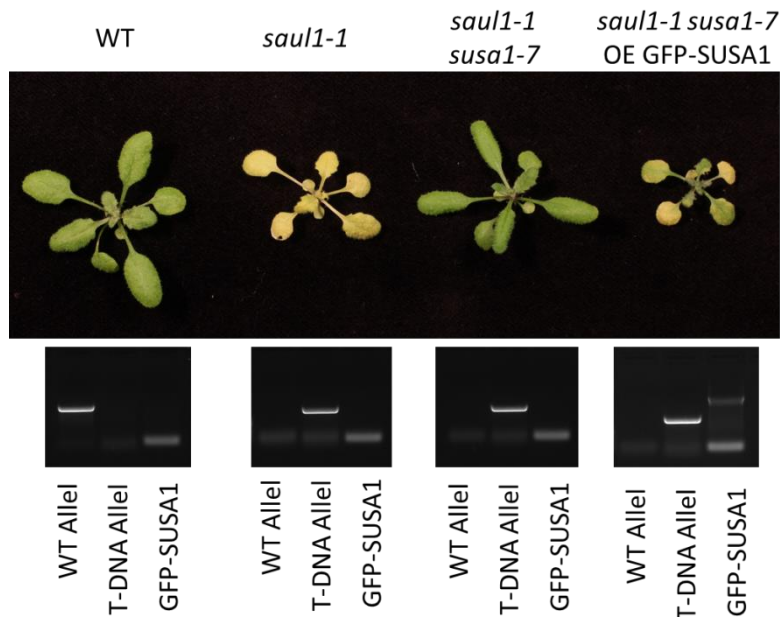


Abbildung 3-22: Fotografische Darstellung der *saul1-1 susa1-7/OE GFP-SUSA1* Komplementationslinie im Vergleich zu *saul1-1*, WT und *saul1-1 susa1-7* Arabidopsis-Pflanzen. Die Komplementationslinie *saul1-1 susa1-7/OE GFP-SUSA1* zeigte eine teilweise Wiederherstellung des *saul1-1* Phänotyps, wobei ein reduziertes Wachstum und eine teilweise gelbliche Färbung der Blätter im Vergleich zu *saul1-1 susa1-7* und dem WT auftrat. Zu jeder Pflanze ist die Genotypisierung auf die T-DNA im Gen *SAUL1* dargestellt. Das Komplementationskonstrukt *GFP-SUSA1* konnte in der Komplementationslinie ebenfalls über eine PCR nachgewiesen werden (2421 bp). Bei dem WT handelt es sich um den segregierenden WT der *saul1-1* Mutante. Die Pflanzen wurden für 14 Tage bei 25°C angezogen und für die Induktion des Phänotyps eine weitere Woche bei 20°C kultiviert.

3.2.2.2 Analyse der T-DNA Insertionslinie *susa1-14*

Neben den Suppressorlinien wurde eine unabhängige T-DNA Insertionslinie von *SUSA1* betrachtet, welche im Folgenden als *susa1-14* beschrieben wird. Zusätzlich zu der Komplementation der *saul1-1 susa1-7* Linie mit dem *GFP-SUSA1* Konstrukt sollte durch doppelt-homozygote *saul1-1 susa1-14* Mutanten in einem vom Suppressor-Screen unabhängigen System die Aufhebung des *saul1-1* Phänotyps bestätigt werden.

Die T-DNA wurde im 4. Exon der codierenden Sequenz von *SUSA1* durch eine Sequenzierung des flankierenden Bereichs der *left border* bestätigt. Demnach konnte die T-DNA Insertion an der Position +2922 nt ausgehend vom Startcodon festgestellt werden (Abbildung 3-23).

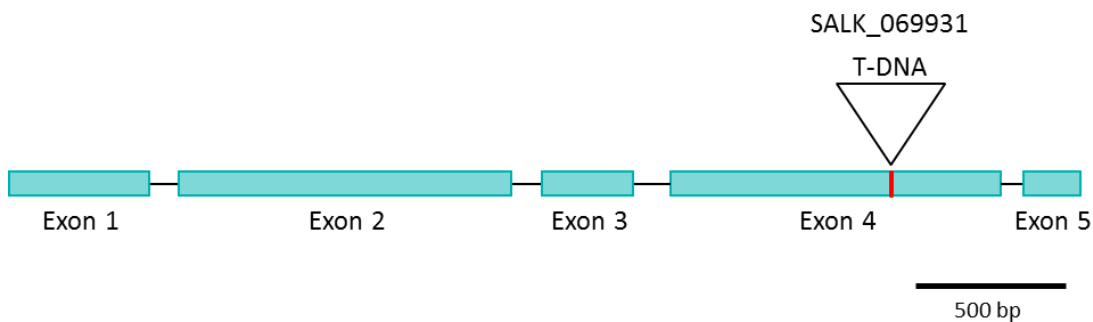


Abbildung 3-23: Schematische Darstellung der Exon- und Intron-Struktur des Gens *SUSA1* mit Darstellung der Position der T-DNA Insertion in *susa1-14*. Die T-DNA konnte durch Sanger-Sequenzierung im 4. Exon an der Position +2922 ausgehend vom Startcodon ATG bestätigt werden. Die Darstellung erfolgte mit dem Programm Clone Manager 9 Professional Edition (Scientific and Educational Software).

susa1-14 Mutanten zeigten bei 25°C wie auch bei 20°C keinen auffälligen Phänotyp und hatten eine WT-ähnliche Morphologie (Abbildung 3-24). Durch die Kreuzung von *saul1-1* und *susa1-14* Mutanten konnten in der F3-Generation trotz Kopplung beider Gene doppelt-homozygote *saul1-1 susa1-14* Mutanten erzeugt werden. Wie in Abbildung 3-24 zu sehen ist, zeigten diese Pflanzen trotz einer Temperatur von 20°C keinen *saul1-1* Phänotyp. Interessanterweise konnte ein intermediärer Phänotyp bei *saul1-1* homozygote Pflanzen mit heterozygoter T-DNA Insertion in *SUSA1* beobachtet werden, was zuvor auch bei den Suppressor-Linien gezeigt wurde (Abbildung 3-14). Zusammenfassend kann anhand der Doppelmutante *saul1-1 susa1-14 SUSA1* endgültig als Suppressor bestätigt werden.



Abbildung 3-24: Fotografische Darstellung der *susa1-14* Mutante und der Doppelmutante *saul1-1 susa1-14* im Vergleich zur *saul1-1* Mutante. *susa1-14* Pflanzen zeigten keinen vom WT abweichenden Phänotyp. Die Doppelmutante *saul1-1 susa1-14* konnte den *saul1-1* typischen Phänotyp aufheben. Bei heterozygot vorliegender T-DNA Insertion in *SUSA1* (he) wurde in *saul1-1* homozygoten Pflanzen (ho) ein intermediärer Phänotyp beobachtet. Bei dem WT handelt es sich um den segregierenden WT der *saul1-1* Mutante. Die Pflanzen wurden für 14 Tage bei 25°C angezogen und für die Induktion des Phänotyps eine weitere Woche bei 20°C kultiviert.

3.2.2.3 Analyse der Spleißvarianten von *SUSA1*

Für die Charakterisierung von *SUSA1* war eine Klonierung des Gens *SUSA1* notwendig. Dafür wurde der genomische Bereich wie auch die codierende DNA Sequenz (*coding DNA sequence*, CDS) in den Ausgangsvektor TOPOTM/pENTR[®] kloniert. Bei der Klonierung der CDS von *SUSA1* fielen mehrere Klone in der Sanger-Sequenzierung durch diverse Insertionen und Deletionen auf. Bei näherer Betrachtung wurde auffällig, dass es sich um verschiedene Spleißvarianten handeln könnte (Anhang 7.7.4). Der genomische Bereich von *SUSA1* wurde anschließend durch das internetbasierte Programm NetGene2 (Version 2.4; (Hebsgaard *et al.*, 1996)) auf Spleißregionen bioinformatisch untersucht. Dabei wurden durch einen *confidence value* > 0,95 Donor- und Akzeptorbereiche mit einer hohen statistischen Wahrscheinlichkeit definiert. Ein *confidence value* zwischen 0,50 und 0,95 beschreibt Donor- und Akzeptorbereiche mit einer geringeren statistischen Wahrscheinlichkeit. Die Daten sind im Anhang 7.10 dargestellt.

Durch die Deletionen und Insertionen in der CDS von *SUSA1* konnten 4 unterschiedliche Spleißvarianten definiert werden. Ein Nachweis dieser Varianten in einer RT-PCR konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden. In Abbildung 3-25 sind alle vier Spleißvarianten schematisch

dargestellt, welche mit dem durch die Variation entstandenen Stoppcodon enden. Bei der Spleißvariante 1 (SV1) wurde das 4. Intron nicht deletiert (*Intron Retention*, IR), was ein frühzeitiges Stoppcodon im 4. Intron zur Folge hatte. Bei SV2 wurde das 1. Intron von 99 Nukleotiden (nt) auf 443 nt verlängert und ein Teil des 2. Exon heraus geschnitten. Das Leseraster wurde dadurch nicht beeinflusst. Im Vergleich dazu wurde bei SV3 ein 540 nt großes Fragment von Intron 1 und Exon 2 deletiert, was zu einem frühzeitigen Stoppcodon im 2. Exon führte. Die Spleißvariante SV4 zeigte eine Deletion von 114 nt im 4. Exon, was anschließend auch ein vorzeitiges Stoppcodon zur Folge hatte.

Durch bioinformatische Analyse des genomischen Bereichs von *SUSA1* (ohne UTRs) mit dem Programm NetGene2 konnten Angaben über die statistische Wahrscheinlichkeit von Donor- und Akzeptorbereichen und deren *branch points* (Verzweigungspunkt) gemacht werden. Zusätzlich wurde die Sequenz auf codierende Bereiche untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 3-25 (oberer Teil) graphisch dargestellt. In den Bereichen von Intron 2 und 3 konnten keine abweichenden Ergebnisse in der Sequenzanalyse beobachtet werden. Interessanterweise konnte für Intron 1 ein eindeutiger Donorbereich definiert werden, jedoch war bioinformatisch kein Akzeptorbereich und kein *branch point* zu finden. Zusätzlich ist in der Analyse der Sequenz ein weiterer, nicht-codierender Bereich neben Intron 1 auffällig (Abbildung 3-25, Stern *), der ursächlich für die variable Größe des Introns 1 sein könnte. Eine Erklärung für die IR von Intron 4 erfolgte durch diese Analyse nicht, da ein genauer Donor- und Akzeptorbereich vorhanden waren. Im Bereich des 4. Exons konnten zusätzliche Donor- und Akzeptorbereiche definiert werden, welche in dem Bereich der Deletion von SV4 lagen (Abbildung 3-25, Stern *).

Generell spiegelten die durch das Programm NetGene2 erhaltenen Vorhersagen von Spleißbereichen im genomischen Bereich von *SUSA1* die durch die Sanger-Sequenzierung beobachteten Varianten wieder. Aufgrund dieser Vorhersagen sind vier unterschiedliche Spleißvarianten wahrscheinlich.

ERGEBNISSE

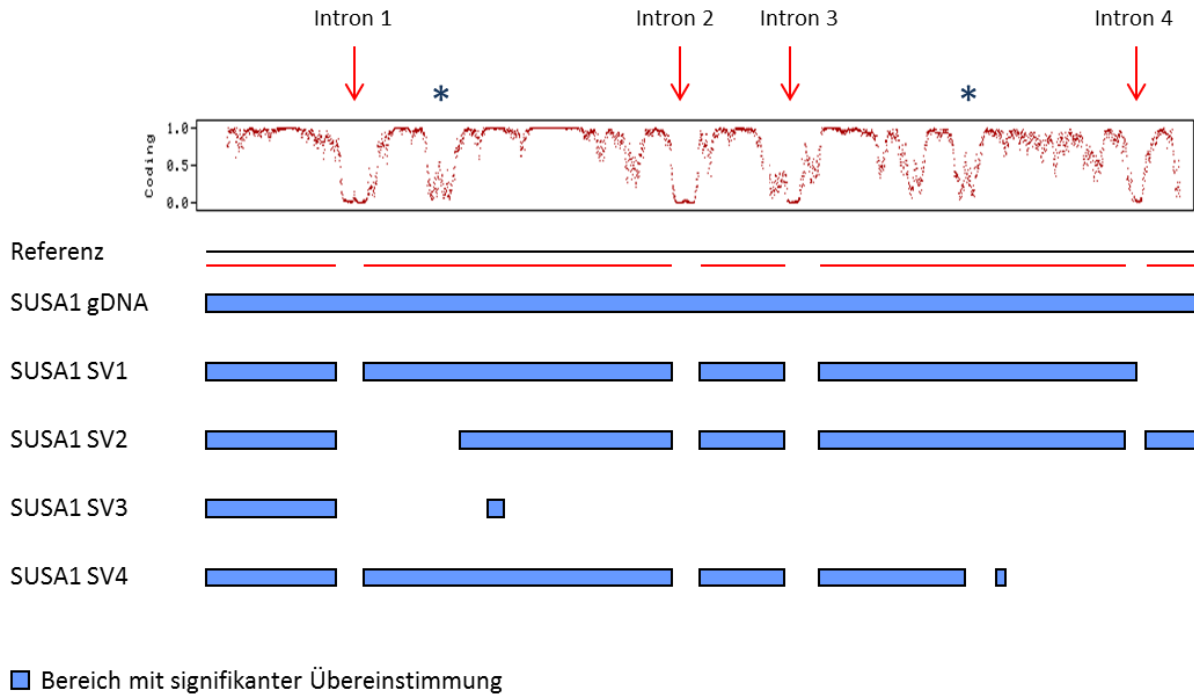


Abbildung 3-25: Schematische Darstellung der Spleißvarianten von *SUSA1*. Im oberen Bereich wurde der genomische Bereich von *SUSA1* durch die Datenbank NetGene2 in codierende und nicht-codierende Bereiche eingeteilt. Die durch TAIR10 annotierten Intron-Bereiche sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Sterne (*) symbolisieren nicht codierende Bereiche in denen eine Spleißvariante in dieser Arbeit festgestellt werden konnte. Im unteren Bereich ist die Referenz (schwarzer Balken: gesamter genomischer Bereich von *SUSA1*, rote Balken: fünf Exonbereiche von *SUSA1*) im Vergleich mit den Spleißvarianten (SV) dargestellt. Die Varianten enden mit dem durch die Variation entstandenen Stoppcodon. Die Darstellung wurde durch einen Vergleich der Sequenzen mit dem Programm Clone Manager 9 Professional Edition (Scientific and Educational Software) erstellt.

3.2.2.4 Transiente Lokalisierungsstudien von *SUSA1* in Arabidopsis-Protoplasten und Tabak

Für die Charakterisierung von *SUSA1* ist die subzelluläre Lokalisierung des Proteins von Bedeutung. Zur Aufklärung der subzellulären Lokalisierung wurde ein GFP-*SUSA* Fusionsprotein hergestellt. Dafür wurde der genomische Teil von *SUSA1* N-terminal mit GFP fusioniert, so dass alle potentiellen *SUSA1*-Proteinvarianten betrachtet werden, falls diese aus den Spleißvarianten hervorgehen würden. Das *GFP-SUSA1* Konstrukt unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors wurde transient in Arabidopsis-Mesophyllprotoplasten und in Tabakblättern exprimiert. Die Analyse der GFP-Fluoreszenz erfolgte am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop.

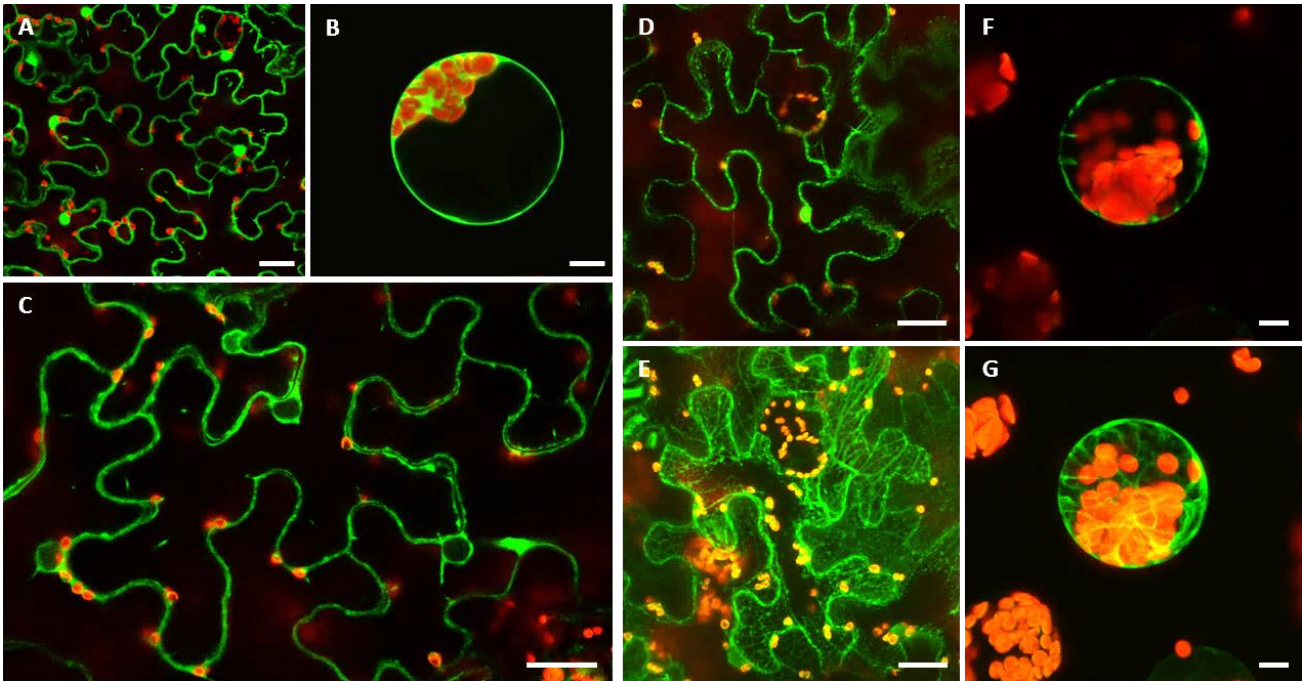


Abbildung 3-26: Konfokale Aufnahmen der subzellulären Lokalisierung von SUSAN1 in Tabak und Arabidopsis-Mesophyllprotoplasten. A: Lokalisierung von freiem GFP (grün) in Tabakzellen. Die Lokalisierung ist im Zytoplasma und im Zellkern zu sehen. In rot sind die Chloroplasten dargestellt. Maßstab = 25 μm . B: Lokalisierung von freiem GFP (grün) in einem Arabidopsis-Mesophyllprotoplasten. Die Lokalisierung ist im Zytoplasma und im Zellkern zu beobachten. In rot sind die Chloroplasten dargestellt. Maßstab = 10 μm . C: Subzelluläre Lokalisierung von GFP-SUSAN1 (grün) in Tabakzellen. Es ist eine Lokalisierung in zytosomatischen Strukturen zu vermuten. Die Chloroplasten sind in rot dargestellt. Maßstab = 25 μm . D: Subzelluläre Lokalisierung von GFP-SUSAN1 (grün) in Tabakzellen. Es ist eine Lokalisierung in zytosomatischen Strukturen und im Zellkern erkennbar. Die Chloroplasten sind in rot dargestellt. Maßstab = 25 μm . E: Maximumprojektion der Tabakzellen aus D. Eine netzartige Struktur lässt eine ER Lokalisierung vermuten. Die Chloroplasten sind in rot dargestellt. Maßstab = 25 μm . F: Subzelluläre Lokalisierung von GFP-SUSAN1 (grün) in Arabidopsis-Mesophyllprotoplasten. Es ist eine Lokalisierung in zytosomatischen Strukturen zu erkennen. Die Chloroplasten sind in rot dargestellt. Maßstab = 10 μm . G: Maximumprojektion des Protoplasten aus F. Eine netzartige Struktur lässt eine ER Lokalisierung vermuten. Die Chloroplasten sind in rot dargestellt. Maßstab = 10 μm .

Parallel zu GFP-SUSAN1 diente freies GFP in Arabidopsis-Mesophyllprotoplasten und Tabak als Kontrolle. Freies GFP konnte im Zytoplasma und im Kern detektiert werden (Abbildung 3-26, A und B). GFP-SUSAN1 wiederum war in den ersten Experimenten in Zytosol-ähnlichen Strukturen zu finden (Abbildung 3-26, C und F). In ca. 5 – 10% der Tabakzellen war auch eine Lokalisierung im Kern zu beobachten (Abbildung 3-26, D und E). Dies konnte in Protoplasten nicht gezeigt werden. In Tabakzellen wie auch in Protoplasten war eine netzartige Struktur auffällig, welche in einer Überlagerung von Bildern einer Serie sichtbar wurde (Abbildung 3-26, E und G).

Da diese Netzstruktur an das endoplasmatische Retikulum (ER) erinnerte, jedoch zytoplasmatische Strukturen nicht ausgeschlossen werden konnten, wurden Co-Lokalisierungen in Protoplasten mit dem ER-*mCherry*-Marker ER-rk CD3-959 (Nelson *et al.*, 2007) und dem *mCherry* Marker Wave1RmCherryNIGEL (Geldner *et al.*, 2009) durchgeführt. Die Co-Lokalisierung mit freiem *mCherry* zeigte eine eindeutige Überlagerung der Signale im Zytoplasma. Im Kern konnte jedoch auch hier kein GFP-SUSA1 Signal detektiert werden (Abbildung 3-27A). Interessanterweise wurde auch bei der Co-Lokalisierung mit dem ER-Marker eine Überlagerung der Strukturen sichtbar (Abbildung 3-27B).

Parallel wurde eine Co-Lokalisierung von GFP-SUSA1 und dem membranständigen Fusionsprotein SAUL1-RFP in Tabak und Arabidopsis-Mesophyllprotoplasten betrachtet. GFP-SUSA1 war zum größten Teil im Zytoplasma zu erkennen. Dabei waren leichte Überlagerungen mit SAUL1-RFP in einigen Bereichen nahe der Plasmamembran sichtbar (Abbildung 3-27, C und D, Pfeile). Zudem wurden keine GFP-SUSA1 Signale im Kern der Tabakzellen bei dieser Co-Lokalisierung beobachtet.

Mit Hilfe der Co-Lokalisierungstudie konnte SUSA1 sowohl im Zytoplasma und im ER als auch teilweise im Kern lokalisiert werden.

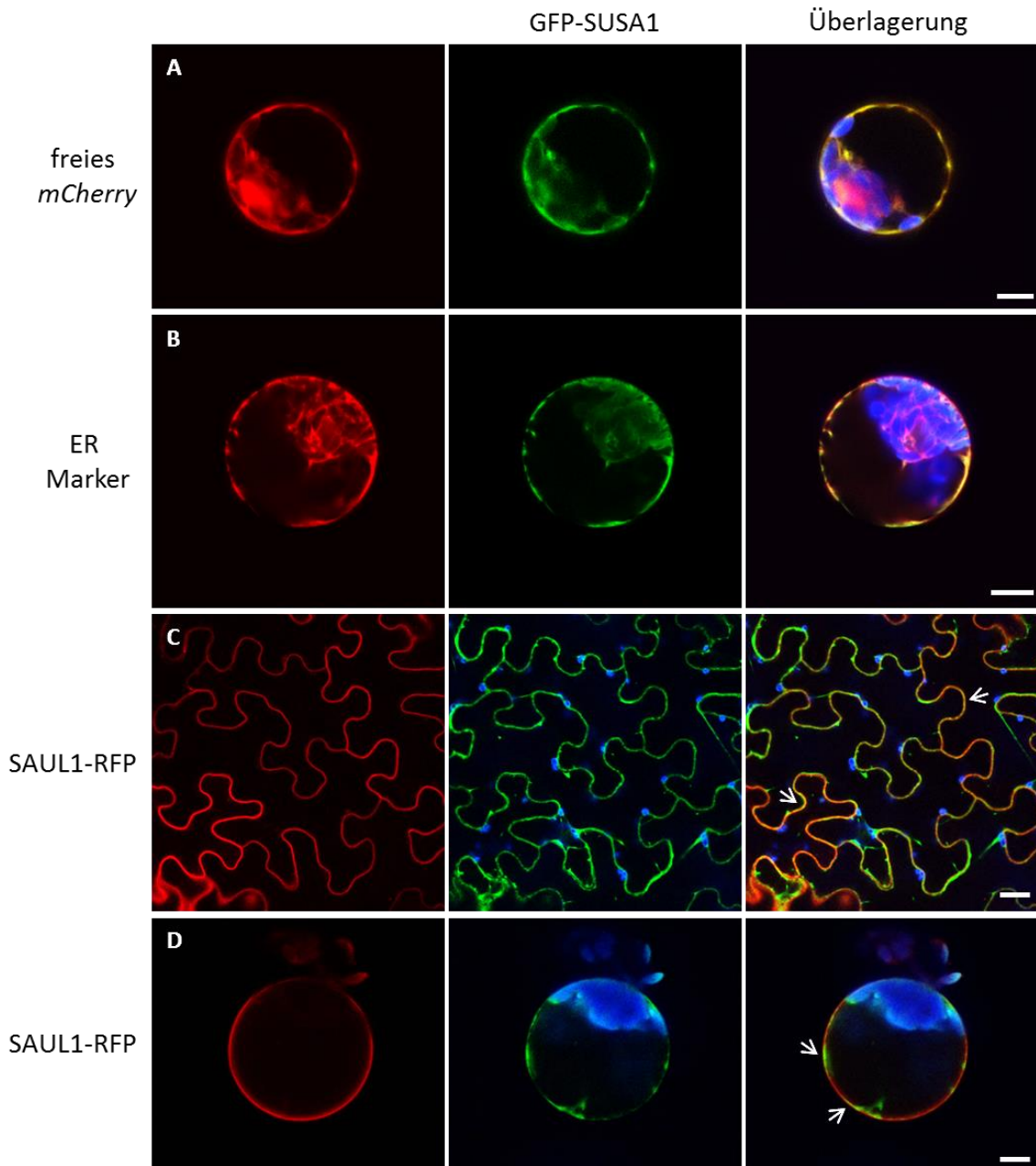


Abbildung 3-27: Konfokale Aufnahmen der subzellulären Co-Lokalisierung von GFP-SUSA1 und ER-Marker, freiem *mCherry* und SAUL1-RFP in Tabak und Arabidopsis-Mesophyllprotoplasten. Die Chloroplasten sind in blau dargestellt. A: Co-Lokalisierung von GFP-SUSA1 (grün) mit freiem *mCherry* (rot) (*mCherry* Marker Wave1RmCherryNIGEL (Geldner *et al.*, 2009)) in einem Protoplasten. In der Überlagerung ist eine deutliche Co-Lokalisierung im Zytoplasma zu erkennen. Maßstab = 7,5 µm. B: Co-Lokalisierung von GFP-SUSA1 (grün) mit dem ER Marker (rot) (ER-rk CD3-959 (Nelson *et al.*, 2007)) in einem Protoplasten. In der Überlagerung ist eine deutliche Co-Lokalisierung im ER zu beobachten. Maßstab = 10 µm. C: Co-Lokalisierung von GFP-SUSA1 (grün) und SAUL1-RFP (rot) in Tabakzellen. Es ist in einigen Bereichen eine leichte Überlagerung des membranständigen SAUL1-RFP Proteins mit GFP-SUSA1 zu erkennen (Pfeil). Maßstab = 25 µm. D: Co-Lokalisierung von GFP-SUSA1 (grün) und SAUL1-RFP (rot) in einem Protoplasten. Es ist in einigen Bereichen eine leichte Überlagerung des membranständigen SAUL1-RFP Proteins mit GFP-SUSA1 zu erkennen (Pfeil). Maßstab = 10 µm.

3.2.2.5 Immunodetektion des Fusionsproteins GFP-SUSA1

Aufgrund der während der Klonierung festgestellten Spleißvarianten, stellte sich die Frage, ob diese als Proteinvarianten nachzuweisen sind. Dafür wurde das Gesamtprotein aus den mit *35S::GFP-SUSA1* infiltrierten Tabakblättern isoliert und über ein SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Da bei der Tabakinfiltration zur Unterdrückung der zelleigenen RNA-Interferenz zusätzlich das virale Protein P19 infiltriert wurde, diente eine Tabakpflanze, die ausschließlich mit P19 infiltriert wurde, als Negativkontrolle. Infiltrierte Tabak-Pflanzen mit freiem GFP/P19 wurden als Positivkontrolle verwendet. Dabei sollte freies GFP in der Immunodetektion mit einer Größe von 26,9 kDa zu erkennen sein. Von der Negativkontrolle P19 und der Probe P19/GFP-SUSA1 wurden gleiche Mengen Gesamtprotein verwendet. Da die Expression von freiem GFP sehr stark war, wurde von dieser Probe nur $\frac{1}{40}$ der Menge an Gesamtprotein im Vergleich zu den anderen beiden Proben verwendet (Abbildung 3-28, siehe Ladekontrolle).

Es konnte eine Bande mit einer Größe von ca. 150 kDa in der Probe P19/GFP-SUSA1 detektiert werden. Dabei entsprach diese Bande der erwarteten Größe des Fusionsproteins GFP-SUSA1 von 147,47 kDa. Zusätzlich war eine weitere schwächere Bande bei ca. 50 kDa zu erkennen (Abbildung 3-28, rote Sterne*). In der Negativkontrolle wurden keine Banden detektiert und auch in der Positivkontrolle konnten in den Bereichen, in denen in der Probe P19/GFP-SUSA1 Banden zu erkennen waren, keine Signale beobachtet werden.

Durch dieses Ergebnis konnte nicht ausgeschlossen werden, dass Proteinvarianten von SUSA1 vorlagen, die u.a. für die sporadische Kernlokalisierung in Tabakzellen verantwortlich sein könnten.

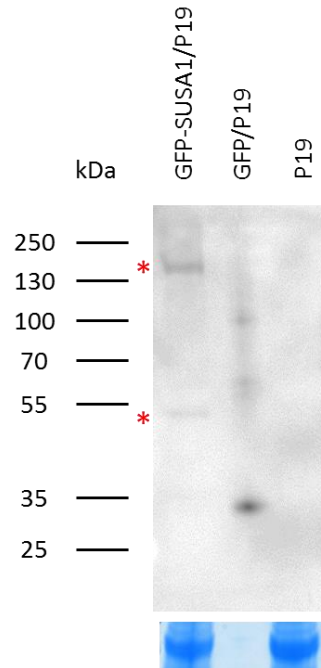


Abbildung 3-28: Darstellung des Fusionsproteins GFP-SUSA1 im Vergleich zu freiem GFP in einem Immunoblot. Aus mit GFP-SUSA1/P19, GFP/P19 und P19 infiltrierte Tabakblätter wurde Gesamtprotein isoliert und über ein SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Immunodetektion erfolgte mit den Antikörpern Anti-GFP (IgG aus Kaninchen; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) und *Goat Anti-Rabbit IgG Antibody, Peroxidase Conjugated* (Merck Millipore, Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland). Die Visualisierung der GFP-Fusionsproteine erfolgte mittels Chemielumineszenz. Als Ladekontrolle diente das Protein Rubisco, welches in der Coomassie Färbung zu sehen ist. Im Vergleich zu der Probe „freies GFP“ wurde 40x so viel Gesamtprotein von der GFP-SUSA1 Probe aufgetragen. Es konnte eine Bande mit der Größe von ca. 150 kDa detektiert werden. Das entspricht der Größe von GFP-SUSA1 mit 147,47 kDa. Eine weitere Bande konnte bei einer Größe von ca. 50 kDa detektiert werden (rote Sterne *). Freies GFP ist bei einer Größe von 26,9 kDa zu erkennen. In der Negativkontrolle sind keine Banden zu beobachten.

3.2.2.6 Interaktionsstudien von SAUL1 und SUSA1

Zur Identifizierung der Zusammenhänge von SAUL1 und SUSA1 ist eine Interaktionsstudie beider Proteine von großer Bedeutung. Für erste Erkenntnisse wurde eine Hefe-Zwei-Hybrid Studie (*Yeast Two Hybrid*, Y2H) und eine bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) durchgeführt.

3.2.2.6.1 Hefe-Zwei-Hybrid System

Für eine Hefe-Zwei-Hybrid (Y2H) Studie werden potenzielle Interaktionspartner mit der Bindedomäne bzw. der Aktivierungsdomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors fusioniert. Durch eine

Interaktion beider Proteine kommt es zu einer Aktivierung der Histidinsynthese und die Hefe ist in der Lage auf Selektionsmedium ohne Histidin zu wachsen (siehe auch 2.8.2).

Für die Interaktionsstudie von SAUL1 und SUSA1 wurde das Konstrukt *BD-SAUL1 ΔNΔC* von Johannes Bergler (Diplomarbeit; FAU Erlangen, AG Hoth) zur Verfügung gestellt. Johannes Bergler konnte zuvor in seiner Diplomarbeit die Funktionsfähigkeit des Konstrukts *BD-SAUL1 ΔNΔC* nachweisen. Dabei handelt es sich um eine C- und N-terminal verkürzte Proteinversion von SAUL1, die eine bessere Interaktionsstudie im Hefe-Zwei-Hybrid System gewährleistet (persönliche Mitteilung: Prof. Dr. Frederik Börnke, IGZ Großbeeren). Zusätzlich wurde in dieser Arbeit das Konstrukt *AD-SAUL1 ΔNΔC* kloniert. Die Konstrukte *AD-SUSA1* und *SUSA1-AD* wurden im Rahmen der Masterarbeit von Jara Oppenheimer (Universität Hamburg, AG Prof. Dr. Hoth) hergestellt. Dabei wurde die annotierte codierende Sequenz (CDS) von *SUSA1* verwendet. Durch eine Co-Transformation des Hefestamms AH109 wurden die Konstrukte *BD-SAUL1 ΔNΔC* und *AD-SUSA1* bzw. *SUSA1-AD* bzw. *AD-SAUL1 ΔNΔC* in die Hefe eingebracht. Als Kontrolle diente eine Co-Transformation von *BD-SAUL1 ΔNΔC* mit dem AD-Leervektor bzw. der BD-Leervektor und *AD-SAUL1 ΔNΔC*. Durch eine Co-Expression beider Vektoren ist ein Wachstum der transformierten Hefe auf Mangelmedium ohne Leucin und Tryptophan (SCAD –L –W) möglich (Abbildung 3-29; linkes Bild). Auf Mangelmedium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin (SCAD –L –W –H +0,5mM 3-AT) wäre hingegen nur das Wachstum von Hefen zu beobachten, in denen eine Interaktion beider Proteine stattgefunden hat (Abbildung 3-29, rechtes Bild). Die transformierte Hefe wurde in vier Verdünnungsstufen auf Selektionsmedium getropft. Anhand dieser Interaktionsstudie konnte eine Interaktion von SAUL1 und SAUL1 gezeigt werden. Dabei war ein Wachstum der Hefe auf Selektionsmedium bis zu einer Verdünnung von $OD_{600} = 0,04$ sichtbar (Abbildung 3-29). Eine Interaktion zwischen SAUL1 und SUSA1 konnte in dieser Versuchsreihe nicht nachgewiesen werden, weil das Wachstum der Hefe auf Selektionsmedium im Vergleich zu den Negativkontrollen (*BD-SAUL1 ΔNΔC* und AD-Leervektor bzw. BD-Leervektor und *AD-SAUL1 ΔNΔC*) nicht stärker war (Abbildung 3-29).

ERGEBNISSE

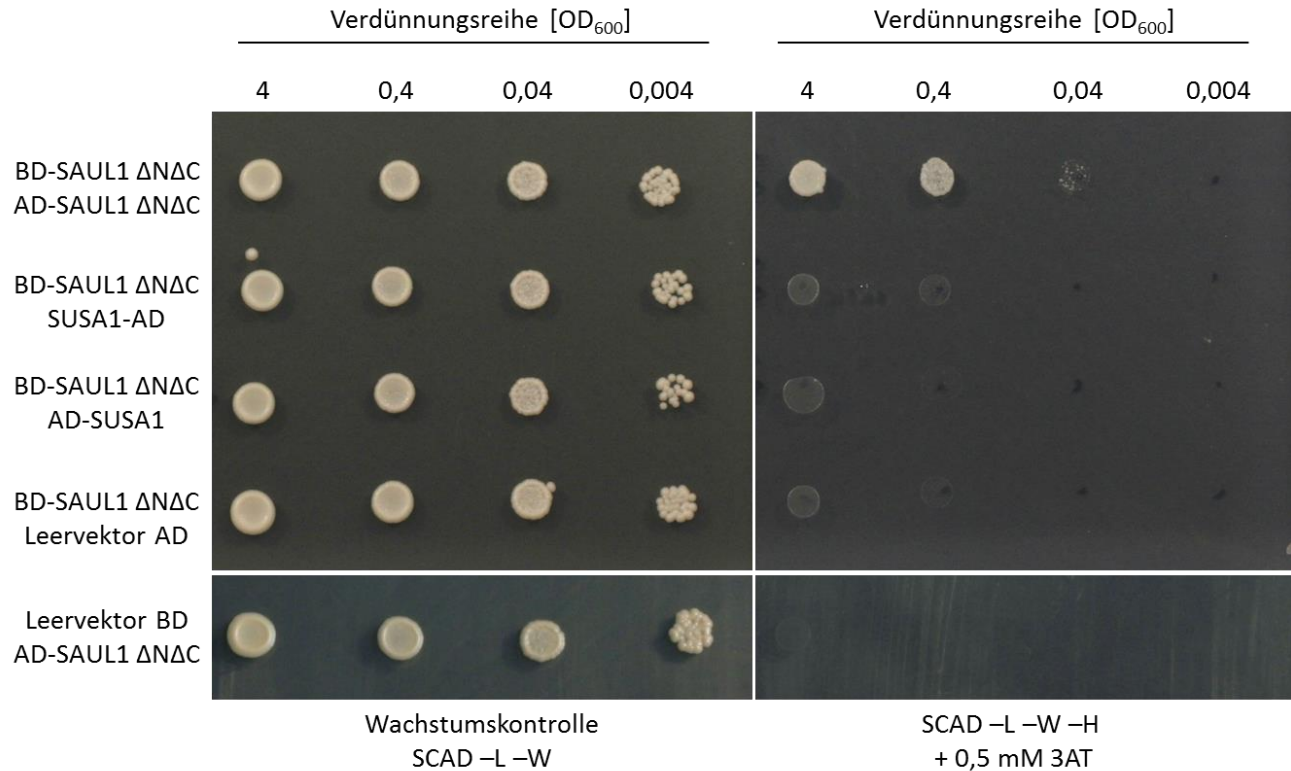


Abbildung 3-29: Darstellung der Y2H-Interaktionsstudie zwischen SAUL1 und SUSA1. Links: Darstellung der Wachstumskontrolle auf SCAD –L –W Medium. Alle Co-transformierten Hefe-Klone konnten bis zu einer Verdünnung OD₆₀₀ = 0,004 wachsen. Rechts: Darstellung des Wachstums von Hefe auf Selektionsmedium mit 3-AT (SCAD –L –W –H + 0,5 mM 3-AT). Die Positivkontrolle (BD-SAUL1 ΔNΔC AD-SAUL1 ΔNΔC) zeigte ein Wachstum bis zu einer Verdünnung von OD₆₀₀ = 0,04. Alle weiteren getesteten Interaktionen zeigten kein Wachstum auf Selektionsmedium mit 3-AT. Somit war keine Interaktion zwischen SAUL1 und SUSA1 nachzuweisen. Als Negativkontrolle dienten Co-Transformationen von BD-SAUL1 ΔNΔC mit einem AD-Leervektor und der BD-Leervektor mit AD-SAUL1 ΔNΔC. Dabei war kein Wachstum auf Selektionsmedium zu beobachten. Das Wachstum erfolgte 3-4 Tage bei 29°C.

Zusammenfassend konnte mit Hilfe der Hefe-Zwei-Hybrid Studie keine Interaktion zwischen SAUL1 und SUSA1 beobachtet werden.

3.2.2.6.2 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation

Zur Überprüfung der Ergebnisse der Y2H-Studie wurde parallel eine bimolekulare Fluoreszenzkomplementation durchgeführt. Dabei wurden SAUL1 und SUSA1 jeweils mit einem Split-YFP fusioniert, welches bei Interaktion beider Proteine ein intaktes Fluorophor bildete.

Die BiFC-Konstrukte wurden transient in Arabidopsis-Protoplasten exprimiert und anschließend mit Hilfe des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops analysiert. Als Transformationskontrolle diente freies RFP, welches unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors

in allen BiFC-Konstrukten enthalten war. Als Positivkontrolle diente ebenfalls die Interaktion zwischen SAUL1 und SAUL1 (Abbildung 3-30A). Wie in Abbildung 3-30 (B) exemplarisch an dem Konstrukt *BiFC CN SAUL1-nYFP/cYFP-SUSA1* zu sehen ist, konnte durch die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation kein YFP-Signal erzeugt werden. Es ist ausschließlich das RFP-Signal der Transformationskontrolle zu erkennen. Bei Betrachtung von vier weiteren BiFC-Konstrukten, bei denen verschiedene Split-YFP Fusionen getestet wurden, bestätigte sich das Bild (Tabelle 2-19). Parallel wurden einzelne Domänen von SUSA1 (TIR, TIR-NBS und LRR) kloniert und ebenfalls in einer Interaktionsstudie mit SAUL1 überprüft. So konnte auch in den fünf weiteren BiFC-Konstrukten keine Interaktion beobachtet werden. Dabei steht allerdings der Nachweis der Proteine über einen Immunoblot aus.

NLR-Proteine wie SUSA1 sind in der Lage Heterodimere zu bilden. Dieses wurde am Beispiel von RPS4 und RRS1 gezeigt (Narusaka *et al.*, 2009). Interessanterweise liegen diese Gene in einem Kopf-an-Kopf Cluster. Wird der Locus von SUSA1 betrachtet, ist auch hier eine Kopf-an-Kopf Anordnung von *SUSA1* (At1g17600) mit *CHS1* (*CHILLING SENSITIVE1*; At1g17610) zu erkennen. *CHS1* wurde zuvor als TIR-NBS Protein charakterisiert und die Mutante *chs1-1* zeigt einen *saul1-1* ähnlichen Phänotyp (Wang *et al.*, 2013; Zbierzak *et al.*, 2013). Zusätzlich konnte in Studien der Arbeitsgruppe von Prof. Shuhua Yang (China Agricultural University, Beijing, China) die Interaktion von *CHS1* und *SUSA1* durch Interaktionsstudien gezeigt werden (persönliche Mitteilung: Prof. Shuhua Yang). Aufgrund dieser Tatsachen konnten gemeinsame Funktionen von *CHS1* und *SUSA1* vermutet werden. Daraufhin wurde zusätzlich eine BiFC-Interaktionsstudie zwischen *CHS1* und *SUSA1* bzw. *SAUL1* durchgeführt. Dabei konnte eine schwache Interaktion zwischen *CHS1* und *SUSA1* in zytoplasmatischen Strukturen und im Kern beobachtet werden (Abbildung 3-30, C und D) und bestätigte die schon durch Prof. Shuhua Yang (China Agricultural University, Beijing, China) gezeigte Interaktion. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte die Lokalisierung von *SUSA1* im Zellkern bestätigt werden. Eine ähnlich schwache Interaktion war bei *CHS1* und *SAUL1* zu erkennen. Dabei konnte das YFP-Signal in Nähe der Plasmamembran und im Zytoplasma detektiert werden (Abbildung 3-30E). In Abbildung 3-30 (E) ist die Expression des Konstrukts *BiFC CC CHS1-nYFP/SAUL1-cYFP* in einem Protoplasten exemplarisch dargestellt, ähnliche Bilder konnten aber auch mit dem Konstrukt *BiFC NC nYFP-CHS1/SAUL1-cYFP* gemacht werden. Auch in diesem Fall steht ein Nachweis der Proteine über einen Immunoblot aus.

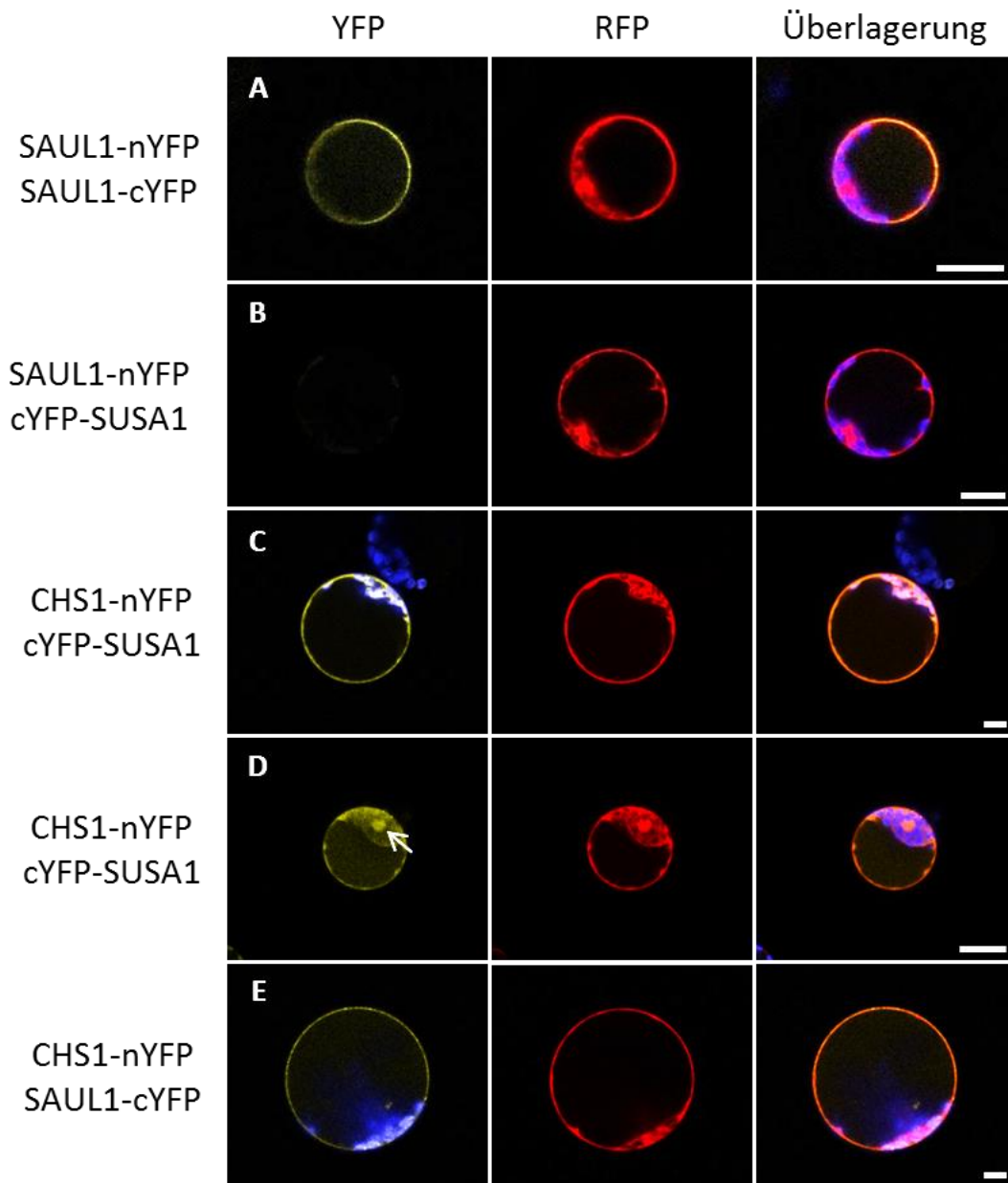


Abbildung 3-30: Konfokale Aufnahmen der bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) von SUSA1, SAUL1 und CHS1 in Arabidopsis-Mesophyllprotoplasten. A: Positivkontrolle; *BiFC CC SAUL1-nYFP/SAUL1-cYFP*; durch die Interaktion von SAUL1 und SAUL1 ist ein YFP-Signal an der Plasmamembran zu sehen. Maßstab = 20 µm. B: Interaktion von SAUL1 und SUSA1; *BiFC CN SAUL1-nYFP/cYFP-SUSA1*; Es ist keine YFP-Fluoreszenz und somit auch keine Interaktion von SAUL1 und SUSA1 zu erkennen. Maßstab = 20 µm. C und D: Interaktion von CHS1 und SUSA1; *BiFC CN CHS1-nYFP/cYFP-SUSA1*; es ist eine schwache Interaktion von SUSA1 und CHS1 im Zytoplasma und im Zellkern (Pfeil) zu erkennen. Maßstab: C = 10 µm und D = 25 µm. E: Interaktion von SAUL1 und CHS1; *BiFC CC CHS1-nYFP/SAUL1-cYFP*; Es ist eine schwache Interaktion in Plasmamembran-Nähe zu erkennen. Maßstab = 10 µm.

Zusammenfassend konnte durch die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation eine schwache Interaktion zwischen CHS1 und SAUL1 bzw. SUSA1 gezeigt werden. Somit ist hypothetisch die Bildung eines Komplexes aus diesen drei Proteinen *in planta* möglich. Dabei interagiert das Plasmamembran-assoziierte Protein SAUL1 einerseits mit sich selbst und andererseits mit CHS1, das wiederum mit SUSA1 eine Interaktion eingeht.

4 Diskussion

Die Zielsetzung dieser Arbeit waren die Charakterisierung des Phänotyps der T-DNA Insertionsmutante *sco4-2* und die Untersuchung der SAUL1-Signaltransduktion. Für die Charakterisierung des SAUL1-Signalweges wurde ein Suppressor von *saul1-1* identifiziert und anschließend charakterisiert.

4.1 Die Charakterisierung der *sco4-2* Mutante

4.1.1 Der embryolethale Phänotyp der *sco4-2* Mutante

Zur Analyse der Funktion co-exprimierter Gene von *SAUL1* wurde die T-DNA Insertionsmutante *sco4-2* etabliert. Der vorhergesagte T-DNA Insertionslocus wurde durch eine Sanger-Sequenzierung im 4. Exon bestätigt (Abbildung 3-1). Allerdings konnten keine homozygoten *sco4-2/sco4-2* Pflanzen regeneriert werden, so dass im Folgenden die Samen in heterozygoten Schoten betrachtet wurden. Durch eine Entfärbung der Samen und eine Differenzialinterferenzkontrastierung am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop konnte ein Arrest der Embryoentwicklung im globulären Stadium in $\frac{1}{4}$ der Samen dokumentiert werden (Abbildung 3-4). Diese Ergebnisse lieferten die ersten Vermutungen, dass es sich bei *sco4-2* um eine embryolethale Mutante handeln könnte. Durch Komplementation des Phänotyps mit dem Konstrukt *pSCO4::SCO4-HA* konnte dieses bestätigt werden (Kapitel 3.1.2; Abbildung 3-7).

4.1.1.1 SCO4 gehört zu einer unbekanntem Proteasefamilie in Chloroplasten

SCO4 wurde zuvor von Albrecht-Borth *et al.* (2013) als eine chloroplastidäre Protease beschrieben, die an der Anpassung an hohe Lichtbedingungen in Keimlingen beteiligt ist. Dabei wurde die Punktmutante *sco4-1* mit einem durch hohe Lichtintensitäten induzierbaren Phänotyp beschrieben. SCO4 wird als CAAX-Protease vorhergesagt und besitzt eine potentielle C-terminale Abi (*abortive infection*) Domäne, die sich zwischen den Aminosäurepositionen 250

und 340 befindet (Conserved Domain Database (Marchler-Bauer *et al.*, 2015)). Proteine mit dieser Domäne werden der CAAX-Protease Proteinfamilie zu geordnet und können auch eine Zinkionen-bindende Funktion besitzen. In Eukaryoten sind CAAX-Proteasen für die Prenylierung von Zielproteinen verantwortlich und gehören zu den membrangebundenen Metalloproteasen (Pei und Grishin 2001). Die ersten zwei CAAX-Proteasen STE24p (auch AFC1p genannt) und RCE1p wurden in Hefe identifiziert. Beide Enzyme besitzen eine redundante Funktion in dem Prenylierungsprozess von Proteinen (Boyartchuk *et al.*, 1997; Trueblood *et al.*, 2000). In Säugerzellen konnten ebenfalls beide CAAX-Proteasen gefunden werden. Eine Dysfunktion von ZMPSTE24 im Menschen führt u.a. zum Hutchinson-Gilford Syndrom, das einen frühzeitigen Alterungsprozess bei Kindern hervorruft (Übersicht: Barrowman und Michaelis 2009). Ein Ausfall von RCE1 in Mäusen ist wiederum embryolethal, da es zu einer fehlerhaften Prozessierung der Ras GTPase kommt (Kim *et al.*, 1999). In *Arabidopsis thaliana* sind ebenfalls zwei CAAX-Proteasen STE24 und RCE1 (RAS CONVERTING ENZYM1) beschrieben. Beide besitzen eine CAAX-Proteaseaktivität, was durch eine Komplementation eines *ste24Δrce1Δ*-defizienten Hefestamms demonstriert wurde (Bracha *et al.*, 2002; Cadiñanos *et al.*, 2003; Bracha-Drori *et al.*, 2008). Demnach scheint der Prenylierungsprozess durch die beiden CAAX-Proteasen STE24 und RCE1 in Eukaryoten ein stark konservierter Prozess zu sein. SCO4 war nicht in der Lage den *ste24Δrce1Δ*-defizienten Hefestamm zu komplementieren, so dass bislang keine Hinweise für eine typische CAAX-Proteasefunktion gefunden werden konnten (Albrecht-Borth *et al.*, 2013).

Die T-DNA Insertion in dem Gen *SCO4* (*sco4-2*) betrifft die Aminosäuren zwischen den Positionen 254 und 274 und liegt somit direkt in der vorhergesagten Abi-Domäne des Proteins (Abbildung 3-1). Die zuvor beschriebene Mutante *sco4-1* besitzt eine Mutation von Alanin zu Threonin an der Aminosäureposition 289, die ebenfalls in der Abi-Domäne liegt (Albrecht-Borth *et al.*, 2013). Daraus lässt sich schließen, dass die vorhergesagte Abi-Domäne für die Funktion von SCO4 von enormer Bedeutung ist und daraus die Phänotypen der beiden Mutanten resultieren. Die T-DNA Insertionsmutante *sco4-2* zeigt eine gestörte Embryoentwicklung (Abbildung 3-4), wiederum weißt die Punktmutante *sco4-1* einen durch hohe Lichtintensitäten induzierbaren Phänotyp in Keimlingen jedoch keinen Samenphänotyp auf (Albrecht-Borth *et al.*, 2013). Aufgrund der T-DNA Insertion in der Abi-Domäne wird das Protein wahrscheinlich gar

nicht oder nur in einer verkürzten und funktionslosen Variante gebildet, so dass die Funktion von SCO4 möglicherweise komplett ausfällt. Bei der Punktmutante *sco4-1* wird hingegen das Protein lediglich durch den Austausch einer Aminosäure beeinträchtigt, ist aber wohl in der Lage die Funktion für die Embryoentwicklung zu erfüllen (Albrecht-Borth *et al.*, 2013). Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass SCO4 eine essentielle Funktion in der Embryogenese besitzt, die potentiell durch andere Proteasen nicht übernommen werden kann. So scheint die von Albrecht-Borth *et al.* (2013) beschriebene Punktmutation in *sco4-1* eine geringere Relevanz im Vergleich zu der T-DNA Insertion in *sco4-2* in der Embryoentwicklung zu besitzen.

4.1.1.2 SCO4 könnte in Embryonen in der Chloroplastenbiogenese involviert sein

Ähnliche phänotypische Unterschiede zwischen Punktmutanten und T-DNA Insertionsmutanten konnten zuvor auch bei der Charakterisierung der Gene *SCO1* und *SCO3* beobachtet werden. Der Elongationsfaktor G (*SCO1*) ist in der Translation chloroplastidärer Proteine involviert. Die Punktmutante *sco1-1* führt zu weißen Keimblättern, so dass von einer gestörten Photomorphogenese ausgegangen werden kann (Albrecht *et al.*, 2006). Die T-DNA Insertionsmutanten *sco1-2* und *sco1-3* haben wiederum weiße Samen in heterozygoten Schoten und werden als embryoletal beschrieben. Eine dritte T-DNA Insertion im Promotorbereich des Gens *SCO1* führt allerdings zu einem *sco1-1*-ähnlichen Phänotyp, so dass auch die Expressionsstärke und das resultierende Proteinlevel eine Rolle in der Ausprägung des Phänotyps spielen können. Dabei wird spekuliert, dass zwei weitere in den Mitochondrien lokalisierte EF-Gs die Fehlfunktion von *SCO1* in den Keimblättern und Folgeblättern jedoch nicht in den Embryonen ausgleichen (Ruppel und Hangarter 2007). Ähnlich verhält es sich auch bei der Charakterisierung des Proteins *SCO3*. Die Punktmutante *sco3-1* zeigt eine gestörte Chloroplastenmorphologie sowie eine Beeinträchtigung in der Thylakoidformation und Photosynthese in den Keimblättern. Eine T-DNA Insertion in dem Gen *SCO3* ist wiederum embryoletal (Albrecht *et al.*, 2010).

Generell führen viele Mutationen, die die Chloroplastenbiogenese in Embryonen betreffen, zum Stillstand der Embryoentwicklung. Dabei wird oft ein Arrest des Embryos

zwischen dem globulären und dem Herzstadium beobachtet. In dieser Entwicklungsphase findet auch die Biogenese der Chloroplasten aus den Proplastiden statt (Hsu *et al.*, 2010). Durch die Charakterisierung der *EMB* (*EMBRYO DEFECTIVE*) Gene konnten ca. 30% Chloroplasten-lokalisierte Proteine identifiziert werden, bei denen ebenfalls eine gestörte Embryoentwicklung gezeigt werden konnte. Bei vielen Mutanten wurde ein Arrest der Embryoentwicklung zwischen dem globulären und dem Herzstadium bestätigt (Meinke *et al.*, 2008; Bryant *et al.*, 2011). Die T-DNA Insertionsmutante *sco4-2* wurde zuvor in einem Screen von potentiell embryoethalen Mutanten untersucht und als in der Samenentwicklung eingeschränkte Mutante definiert. Dabei wurde ebenfalls der Schwerpunkt auf Plastid-lokalisierende Proteine gelegt (Savage *et al.*, 2013).

In dieser Arbeit konnte durch mikroskopische DIC-Aufnahmen der Arrest des Embryos im globulären Stadium in der *sco4-2* Mutante gezeigt werden (Abbildung 3-4), so dass von einer Funktion des Proteins SCO4 in der Embryoentwicklung und der dazu notwendigen Chloroplastenbiogenese ausgegangen werden könnte. Um den Einfluss von SCO4 in der Chloroplastenentwicklung bestätigen zu können, müssten in weiterführenden Versuchen die Proteinfunktion von SCO4 und dessen Signalwege untersucht werden. Würde sich eine Proteaseaktivität von SCO4 bestätigen, wäre die Identifikation von Zielproteinen von weiterer Bedeutung.

4.1.2 Der dosisabhängige Blattphänotyp in komplementierten Pflanzen

Die Komplementation des Samenphänotyps erfolgte mit den Konstrukten *pSCO4::SCO4-HA*, *pSCO4::SCO4-GUS* und *pSCO4::SCO4-GFP*, welche mittels Agrobakterien-vermittelter Transformation in heterozygote *sco4-2/SCO4-2* Pflanzen eingebracht wurden (Kapitel 3.1.2). Durch das Konstrukt *pSCO4::SCO4-HA* konnte der Phänotyp erfolgreich komplementiert werden (Abbildung 3-7). Zusätzlich wurde ein dosisabhängiger Phänotyp in komplementierten homozygoten *sco4-2* Pflanzen dokumentiert (Abbildung 3-5; Abbildung 3-9).

4.1.2.1 Die Wahl des Promotorbereichs *pSCO4*

Für die Komplementation des Samenphänotyps der *sco4-2* Mutante wurde ein Konstrukt mit dem nativen *pSCO4* Promotor hergestellt. Der Promotorbereich wurde 1747 nt oberhalb des Startcodons festgelegt und beinhaltet das 5'UTR mit einer Länge von 181 nt (Anhang 7.7.1). *SCO4* liegt in einer Kopf-an-Kopf Anordnung mit dem Gen At5g60740 (ABC Transporter), wobei sich die Gene durch einen Bereich von nur 621 nt trennen. Eine Analyse dieses Bereichs durch die Softberry Software TSSP (<http://www.softberry.com/>; Softberry Inc.) konnte keinen relevanten Promotorbereich definieren. Wurde hingegen der 5'UTR Bereich bei der Analyse mit einbezogen, konnte ein Promotorbereich ohne TATA-Box identifiziert werden, so dass von einer für den Promotor relevanten Funktion des 5'UTRs auszugehen ist. Durch eine Verlängerung des Promotors auf ca. 2000 nt inklusive 5'UTR konnte ein Promotorbereich mit TATA-Box und ein weiterer *Enhancer*-Bereiche identifiziert werden, die ebenfalls in dem gewählten Bereich 1747 nt oberhalb des Startcodons vorhanden sind. Um eine ausreichende Promotoraktivität gewährleisten zu können, wurde der Promotorbereich für die Komplementationskonstrukte auf diese Größe festgelegt. Neben dem Promotor enthielt das Konstrukt das komplette Gen *SCO4*. Aufgrund der C-terminalen Fusion mit HA, GUS und GFP wurde auf das 3'UTR verzichtet. Dabei ist allerdings die Relevanz des 3'UTRs nicht zu unterschätzen, da auch von diesem Bereich regulatorische Eigenschaften ausgehen können (Mignone *et al.*, 2002).

Aufgrund der Komplementation des Samenphänotyps kann der gewählte Promotorbereich als funktionsfähig eingestuft werden.

4.1.2.2 Durch die Komplementation konnten homozygote *sco4-2* Pflanzen mit einem dosisabhängigen Phänotyp regeneriert werden

Durch die Analyse der Komplementationslinie *sco4-2/pSCO4::SCO4-HA* konnten homozygote *sco4-2* Mutanten regeneriert und der Samenphänotyp in heterozygoten Pflanzen erfolgreich aufgehoben werden (Abbildung 3-7). Nach der Selektion der Komplementationslinie *sco4-2/pSCO4::SCO4-HA* zeigte die Linie *sco4-2/HA#10ho* eine veränderte Blattfärbung, die sich auf einzelne Nachkommen vererbte (Abbildung 3-5). Die Bestimmung der relativen Expression des Komplementationskonstrukts zeigte in weißlichen komplementierten Pflanzen eine

niedrigere Expression im Vergleich zu grünen komplementierten Pflanzen (Abbildung 3-6). So scheint das Expressionsniveau und das resultierende Proteinlevel ausschlaggebend für den helleren Blattphänotyp und das reduzierte Wachstum dieser Pflanzen zu sein. Im Vergleich dazu zeigten komplementierte homozygote *sco4-2* Mutanten mit den Fusionsproteinen SCO4-GUS oder SCO4-GFP einen stärker ausgeprägten kleinwüchsigen Phänotyp, eine weiße Blattfärbung sowie eine gestörte Blattmorphologie (Abbildung 3-9). In diesem Fall konnte durch die Komplementationskonstrukte *pSCO4::SCO4-GUS* und *pSCO4::SCO4-GFP* der Phänotyp nur teilweise aufgehoben werden, so dass eine Regeneration homozygoter *sco4-2* Mutanten mit einem Blattphänotyp erfolgen konnte. Diese Pflanzen waren jedoch nicht in der Lage Nachkommen zu produzieren. Dabei könnte ein Diskussionspunkt die C-terminale Fusion mit der β -Glucuronidase bzw. GFP darstellen. Aufgrund der ebenfalls C-terminal vorhergesagten Abi-Domäne in dem Protein SCO4 kann durch eine zusätzliche Fusion mit einem größeren Protein die Funktionsfähigkeit von SCO4 eingeschränkt sein. Dabei könnten die Fusionsproteine die Abi-Domäne aus sterischen Gründen blockieren. Zusätzlich könnte der Import von SCO4 in die Plastiden durch die GFP- und GUS-Fusion beeinträchtigt sein, so dass eine vollständige Funktion von SCO4 in plastidären Strukturen nicht gegeben ist. Ein weiterer Diskussionspunkt könnte die Expressionsstärke des Komplementationskonstruktes sein. Wie an der Komplementationslinie *sco4-2/pSCO4::SCO4-HA* gezeigt werden konnte, steht eine veränderte Blattmorphologie mit der Expressionsstärke des Komplementationskonstruktes in Zusammenhang.

Der Einfluss der Expressionsstärke auf den Blattphänotyp konnte durch die Untersuchung der plastidären NAD-abhängige Malat-Dehydrogenase (pdNAD-MDH) gezeigt werden. Eine Transposon-Insertion in dem Gen *pDNAD-MHD* führt ebenfalls zu einem embryoethalen Phänotyp (Beeler *et al.*, 2014). pdNAD-MDH ist in Chloroplasten für die Redox-Kontrolle und die Regeneration des Elektronenakzeptors NAD(P) verantwortlich (Scheibe 2004). Zur Untersuchung der pdNAD-MDH wurde das Proteinlevel durch ein *microRNA-Silencing*-Konstrukt deutlich gesenkt. Die resultierenden *miR-mdh* Arabidopsis-Pflanzen zeigten ein stark reduziertes Wachstum und hellgrüne Blätter mit einer gestörten Morphologie. Dieser Phänotyp ähnelt den in dieser Arbeit regenerierten komplementierten homozygoten *sco4-2* Mutanten (Abbildung 3-9; Abbildung 4-1). Die *miR-mdh* Pflanzen besitzen eine geringere Anzahl an

Thylakoidmembranen und eine verringerte Photosyntheserate. Unter hohen Lichtintensitäten konnte auch eine leicht reduzierte NPQ-Rate festgestellt werden. Diese morphologischen Veränderungen in den Chloroplasten waren vermehrt in jungen, sich entwickelnden Geweben zu beobachten (Beeler *et al.*, 2014). Der genaue Mechanismus, der bei einem reduzierten Proteinlevel plastidärer Proteine zu einer normalen Embryoentwicklung aber zu keiner normalen Blattmorphologie führt, ist zurzeit noch unklar.

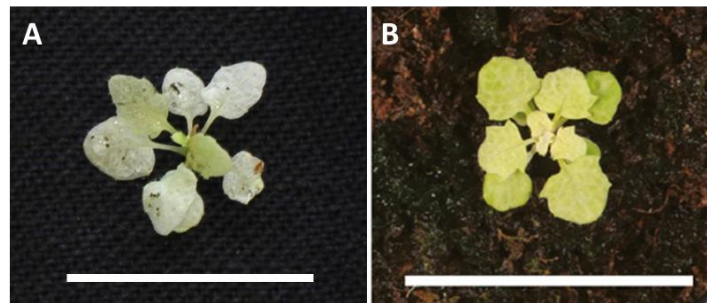


Abbildung 4-1: Fotografische Gegenüberstellung einer homozygoten *sco4-2* Mutante mit dem Komplementationskonstrukts *pSCO4::SCO4-GUS* und einer *miR-mdh* Mutante aus Beeler *et al.*, 2014
 A: Fotografische Darstellung einer fünf Wochen alten homozygoten *sco4-2* Mutante mit dem Komplementationskonstrukts *pSCO4::SCO4-GUS*. Die Mutante zeigt einen kleinwüchsigen Phänotyp mit weißlichen, morphologisch veränderten Blättern. Der Maßstab entspricht 1,8 cm
 B: Darstellung einer 40 Tage alten *miR-mdh* Mutanten (Beeler *et al.*, 2014). Die Pflanze zeigt ebenfalls einen kleinwüchsigen Phänotyp mit hellgrünen Blättern. Der Maßstab entspricht 2 cm.

Durch die Komplementation der embryothalen *sco1-2* Mutante konnten ebenfalls eine hellgrüne Blattmorphologie sowie ein reduziertes Wachstum der Pflanzen beobachtet werden. In diesem Fall wird ein Einfluss von plastidären Proteinen zwischen der Chloroplastenentwicklung, der generellen Pflanzenentwicklung und der Blattmorphologie diskutiert (Pogson *et al.*, 2015). Dabei spielt die Kommunikation zwischen Zellkern und Chloroplasten während der Blattexpansion eine entscheidende Rolle. Bei der Blattentwicklung wird die Zellteilung an der Blattspitze eingestellt und es kommt zur post-mitotischen Expansion. Dabei ist die Chloroplastendifferenzierung und die Etablierung des Photosyntheseprozesses ein entscheidender Faktor. Wird dieser Prozess blockiert, kommt es ebenfalls zur Inhibierung der Blattexpansion (Andriankaja *et al.*, 2012).

Da aufgrund des *microRNA-Silencing*-Konstrukts ein reduziertes Proteinlevel von pdNAD-MDH zu einer gestörten Blattmorphologie führt (Beeler *et al.*, 2014), kann auch bei der Komplementationslinie *sco4-2/HA#10ho* durch das niedrige Expressionsniveau ein geringeres Proteinlevel vermutet werden, was allerdings auf Proteinebene in zukünftigen Untersuchungen bestätigt werden müsste. Bei dem stärker ausgeprägten Blattphänotyp bei den *sco4*-Komplementationslinien mit *SCO4-GUS* und *SCO4-GFP* Konstrukten müsste der Zusammenhang zwischen RNA- und Proteinlevel noch gezeigt werden. Generell kann bei den komplementierten homozygoten *sco4-2* Mutanten von einem dosisabhängigen Phänotyp ausgegangen werden. Dadurch ist eine geringere Expression von *SCO4* für die Embryoentwicklung jedoch nicht für die normale Entwicklung der Blattmorphologie ausreichend. Zusätzlich lässt sich neben der Funktion von *SCO4* in der Embryoentwicklung zum Zeitpunkt der Chloroplastenbiogenese auch ein Einfluss während der Blattdifferenzierung vermuten. Dabei wäre die Klärung des noch unbekanntes Mechanismus zwischen der Embryo- und Blattentwicklung durch plastidäre Proteine ein weiteres Forschungsziel.

In weiterführenden Untersuchungen wäre die Analyse von *RNAi-sco4* Pflanzen, bei denen durch ein RNA-Interferenz (RNAi) Konstrukt das Proteinlevel von *SCO4* herabgesenkt wird, von Bedeutung. Nach dem jetzigen Kenntnisstand kann ein den komplementierten homozygoten *sco4-2* Pflanzen ähnlicher Phänotyp erwartet werden. Zusätzlich müssten Expressionsanalysen der weiteren *sco4*-Komplementationslinien zur Bestätigung des dosisabhängigen Phänotyps durchgeführt werden. Dabei wäre interessant, ob der Unterschied in der relativen Expression sich auf das Proteinlevel auswirkt. Des Weiteren sollte der Einfluss des gewählten *pSCO4*-Promotors bezüglich des Blattphänotyps untersucht werden.

4.1.3 Die Funktion von SCO4 in Entwicklungsprozessen

4.1.3.1 Die Promotoraktivität von *pSCO4* kann in sich entwickelnden Geweben dokumentiert werden

Da durch die gelungene Komplementation des Samenphänotyps die Promotoraktivität von *pSCO4* als funktionsfähig eingestuft werden konnte, wurden in folgenden Versuchen das SCO4-GUS Expressionsmuster in segregierenden WT-Pflanzen betrachtet. Diese Untersuchung spiegelt ausschließlich die Promotoraktivität in den einzelnen Geweben wieder. Eine Interpretation der Expressionsstärke durch die Intensität der GUS-Färbung ist aufgrund der nur teilweise komplementierten *sco4-2* Pflanzen durch dieses Konstrukt schwierig, da eine Beeinflussung der Proteinfunktion durch die Fusion mit der β -Glucuronidase nicht ausgeschlossen werden kann.

Die Promotoraktivität von *pSCO4* ist in allen Embryostadien, den Keimblättern, der Vaskulatur, den Nebenblättern (Stipeln) und der Wurzel zu beobachten. In den Blüten ist eine Aktivität in den Kelchblättern, den Antheren und der Narbe zu erkennen (Abbildung 3-10). Dabei wird ein Expressionsmuster in sich entwickelnden Organen und Geweben deutlich. In den Embryonen findet ein ausgeprägter Differenzierungsprozess statt und auch die Ausbildung der Vaskulatur, der Blätter, der Wurzel und der Reproduktionsorgane erfordert eine Regulation dieser Prozesse. Bei der Promotoraktivität von *pSCO4* ist zusätzlich die Expression in den Nebenblättern auffällig. Es konnte zuvor durch Aloni *et al.* (2003) nachgewiesen werden, dass in den Nebenblättern eine starke freie Auxinproduktion stattfindet, welches anschließend durch einen Transfer in die Primordien die Entwicklung der Vaskulatur und der Blattmorphologie unterstützt. Wird das Expressionsmuster des Auxin-Reporterkonstrukts *DR5::GUS* betrachtet, sind einige Übereinstimmungen mit der Promotoraktivität von *pSCO4* in den Nebenblättern, der Vaskulatur, den Reproduktionsorganen, der Wurzel, den Keimblättern und den Embryonen zu erkennen (Aloni *et al.*, 2003; Aloni *et al.*, 2006). Aufgrund der Promotoraktivität in den Blattspitzen und in späteren Entwicklungsstadien in den gesamten Blättern ist auch hier ein Einfluss von SCO4 in der Blattexpansion und der dazu notwendigen Chloroplastendifferenzierung nicht auszuschließen (Andriankaja *et al.*, 2012; Kapitel 4.1.2.2). Die

ausgeprägte Promotoraktivität in den Wurzeln deutet auf eine weitere spezielle Funktion von *SCO4* in diesem Gewebe hin. Dabei ist ein Einfluss bei Entwicklungsprozessen der Wurzel ebenfalls denkbar. Wird die in dieser Arbeit beschriebene *pSCO4*-Promotoraktivität mit dem *SCO4*-Expressionsmuster der Datenbank eFP Browser (Winter *et al.*, 2007; Anhang 7.5) verglichen, sind ebenfalls deutliche Übereinstimmungen zu finden. In der Datenbank ist eine starke *SCO4*-Genexpression in den Keimblättern und den Folgeblättern beschrieben. Ebenfalls ist eine *SCO4*-Expression in den Wurzeln, den Blütenständen und in den frühen Entwicklungsphasen der Schoten dargestellt. Interessanterweise ist in den Embryonen die *SCO4*-Genexpression im globulären Stadium am stärksten und nimmt in der weiteren Embryoentwicklung leicht ab. Die Daten des eFP Browsers unterstreichen ebenfalls die wichtige Funktion von *SCO4* in der Embryoentwicklung speziell im globulären Stadium.

Aufgrund ähnlicher Expressionsmuster von Auxin-relevanten Proteinen im Vergleich zu der Promotoraktivität von *pSCO4* lässt sich eine Funktion des Proteins *SCO4* in diversen Entwicklungsprozessen vermuten. Dabei könnte der Einfluss in der Chloroplastendifferenzierung während der Blattexpansion eine entscheidende Aufgabe sein. Generell müsste der Zusammenhang der *SCO4*-Funktion zwischen der frühen Chloroplastenbiogenese in Embryonen und der Entwicklung einzelner Gewebe durch den Einfluss von Plastiden in weiteren Untersuchungen gezeigt werden. Um eine Aussage über die Funktion von *SCO4* in Wurzeln treffen zu können, bedarf es weiterer Untersuchungen. Dabei wäre eine genaue Betrachtung der Wurzelmorphologie beispielsweise in *RNAi-sco4* Pflanzen ein weiteres Ziel.

4.1.4 Die Lokalisierung von *SCO4* in plastidären Strukturen

Die Lokalisierungsstudien wurden einerseits mit der Komplementationslinie *sco4-2/pSCO4::SCO4-GFP* und andererseits transient in Protoplasten durch die Konstrukte *35S::GFP-SCO4* und *35S::SCO4-GFP* durchgeführt.

Bei der Betrachtung des segregierenden WT mit dem *SCO4-GFP* Konstrukt konnte die Promotoraktivität in den Wurzeln bestätigt werden. Aufgrund der eingeschränkten

Komplementation durch dieses Konstrukt ist es denkbar, dass zusätzlich auch die Lokalisierung beeinträchtigt wurde. In den Wurzeln konnte SCO4-GFP in Vesikel-artigen Strukturen beobachtet werden (Abbildung 3-11). In der Arbeit von Albrecht-Borth *et al.* (2013) wurde die Punktmutante *sco4-1* mit einem *35S::SCO4-GFP* (Vektorhintergrund: pCAMBIA1302) Konstrukt komplementiert und anschließend die Lokalisierung von SCO4 betrachtet. Dabei konnten punktartige Strukturen in den Chloroplasten identifiziert werden. In diesem Fall konnte die Komplementation den *snowy cotyledon* Phänotyp vollständig aufheben, so dass hier keine Beeinträchtigung der GFP-Fusion zu beobachten ist. Im Unterschied zu dem in dieser Arbeit verwendeten Komplementationskonstrukt wurde ein konstitutiver 35S-Promotor verwendet, so dass eine höhere Expression von SCO4-GFP zu erwarten ist.

Die transiente Expression von *35S::SCO4-GFP* in Protoplasten zeigte in dieser Arbeit ähnliche Strukturen in und um die Chloroplasten. Dabei ist eine definierte Lokalisierung in den einzelnen Strukturen in den Chloroplasten nicht möglich gewesen, da keine homogene SCO4-Lokalisierung zu beobachten war (Abbildung 3-12A). Dabei ist ebenfalls nicht auszuschließen, dass durch eine GFP-Fusion der Chloroplastenimport beeinträchtigt ist und es somit zu Akkumulationen außerhalb der Chloroplasten kommt. Die transiente Expression des Konstrukts *35S::GFP-SCO4* konnte durch Co-Lokalisierungen im ER bestimmt werden (Abbildung 3-12B). Da die bekannten CAAX-Proteasen im ER lokalisiert sind und dort die post-translationelle Modifikation von Proteinen durchgeführt wird, scheint eine ER-Lokalisierung nicht ungewöhnlich (Bracha *et al.*, 2002; Bracha-Drori *et al.*, 2008). Wird jedoch die Proteinsequenz durch das Programm ChloroP untersucht, kann ein N-terminales Signalpeptid für Chloroplasten identifiziert werden (Emanuelsson *et al.*, 1999). Zusätzlich wurde SCO4 durch bioinformatische Analysen im *Chloroplast 2010 Project* (<http://plastid.msu.edu/>; (Ajjawi *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2011b)) als plastidäres Protein beschrieben. Zusätzlich erfolgte die Analyse essentieller Plastiden-lokalisierter Proteine durch die Arbeit von Savage *et al.* (2013), in der *sco4-2* als in der Samenentwicklung eingeschränkte Mutante definiert wurde. Somit ist davon auszugehen, dass durch eine N-terminale GFP Fusion das Signalpeptid von SCO4 verdeckt wird und es somit zu einer fehlerhaften Lokalisierung im ER kommt.

Da eine Promotoraktivität in Wurzeln dokumentiert werden konnte, kann die Lokalisierung von SCO4 generell in plastidären Strukturen definiert werden. Was jedoch die

punktartigen Strukturen in und um die Plastiden sind, muss in weiteren Co-Lokalisierungen herausgefunden werden. Eine Fraktionierung und ein anschließender Immunoblot konnte SCO4 in der Thylakoid- und Stromafraktion nachweisen, so dass auch dadurch keine genauen Strukturen in den Plastiden definiert werden konnten (Albrecht-Borth *et al.*, 2013). Demnach bedarf es weitere Protein-biochemische Analysen zur genauen Lokalisierung von SCO4.

4.2 Die Identifizierung und Charakterisierung des Suppressors von *saul1-1*

4.2.1 Der Suppressor von *saul1-1* kodiert für ein TIR-NBS-LRR Protein

Zur Analyse des SAUL1-Signalnetzwerkes wurde ein Suppressor-Screen durchgeführt. Durch eine EMS-Mutagenese von *saul1-1* Mutanten wurden randomisierte Punktmutationen eingefügt, die zu einer Suppression des *saul1-1* Phänotyps führen können (Abbildung 3-13). Durch die Analyse des Segregationsverhaltens konnte von einem rezessiven Suppressor-Allel ausgegangen werden. Weitere Komplementationsstudien, Kopplungsanalysen und Chromosomenkartierung identifizierten 10 allelische Suppressorlinien, die mit SAUL1 gekoppelt vererbt werden. Durch eine Tiefensequenzierung von drei allelischen Suppressorlinien und dem Vergleich relevanter SNPs konnte der Suppressor von *saul1-1* (*SUSA1*) identifiziert werden. *SUSA1* (At1g17600) kodiert für ein funktionell noch nicht charakterisiertes TIR-NBS-LRR Protein mit Homologien zu anderen Resistenz-Proteinen und ist an der Immunantwort von Pflanzen beteiligt (Tong *et al.*, eingereicht). Weitere Sanger-Sequenzierungen bestätigten in den restlichen Linien Mutationen in dem Gen *SUSA1* (Abbildung 3-21; Anhang 7.7.2).

Ein parallel durchgeführter Suppressor-Screen von *saul1-1* in der Arbeitsgruppe von Prof. Xin Li (Kooperation mit Prof. Xin Li, University of British Columbia, Vancouver, Kanada; Tong *et al.*, eingereicht) konnte ebenfalls 5 unabhängige, allelische *saul1-1 susa1* Linien identifizieren, so dass der Einfluss von *SUSA1* in der SAUL1-Signaltransduktion von großer Bedeutung sein muss. Somit bestätigt sich die Funktion von SAUL1 in der pflanzlichen Immunantwort, was zuvor schon durch Disch *et al.* (2016) anhand von Genexpressionsdaten und transmissionselektronischen Untersuchungen gezeigt werden konnte.

4.2.1.1 Die Identifizierung von SUSAN1 erfolgte durch die *mapping-by-sequencing* Methode

Die Identifizierung von SUSAN1 sollte zunächst durch eine Chromosomenkartierung (*positional cloning*) eingegrenzt werden. Dabei wurde durch eine Auskreuzung in den Ökotyp Landsberg *erecta* eine Kartierungspopulation erstellt, die über SSLP-Marker charakterisiert werden sollte. Dafür wurden die Marker der *Arabidopsis Mapping Plattform* (Hou *et al.*, 2010) verwendet. Im Vergleich zu den zuvor von Lukowitz *et al.* (2000) beschriebenen Markern zur groben Kartierung wurde das SSLP-Spektrum auf der *Arabidopsis Mapping Plattform* erhöht und neue Marker mit optimierten PCR-Bedingungen angegeben. Somit konnte in dieser Arbeit durch molekularbiologische Standardmethoden die grobe Chromosomenkartierung ohne weitere Optimierungen durchgeführt werden. Um erste Hinweise zu bekommen, wurde die Kartierung nur mit 64 Pflanzen durchgeführt und mit einer Tiefensequenzierung einer F3-Generation verglichen. Durch die Kartierung wurde die *Col-0* Allelfrequenz bestimmt, welche in den untersuchten Chromosombereichen bei durchschnittlich 50% lag (Abbildung 3-18). Zusätzlich war eine Kartierung im Bereich der T-DNA Insertion im Gen *SAUL1* nicht möglich. Eine Kopplungsanalyse konnte zudem die gekoppelte Vererbung von *SAUL1* und SUSAN1 bestätigen (Abbildung 3-19), so dass im Folgenden die *mapping-by-sequencing* Methode zur Identifizierung des Suppressors angewendet wurde.

Die Chromosomenkartierung ist eine sehr Zeit- und Material-intensive Methode. Dafür muss eine Kartierungspopulation durch Auskreuzung in einen anderen Ökotyp erstellt werden. Für die Kartierung werden spezielle SSLP-Marker verwendet, die sich in unterschiedlichen Ökotypen bezüglich ihrer Länge unterscheiden. Zunächst wird eine grobe Chromosomenkartierung von über 100 Pflanzen durchgeführt, bei der das gesamte Genom auf dessen Allelfrequenz bezüglich des Ökotyps, in dem die Mutation vorliegt, untersucht wird. In eingegrenzten Bereichen folgt anschließend eine Feinkartierung, bei der der Abstand der Marker auf dem Genom immer geringer gewählt wird. Um in sehr eingegrenzten Chromosombereichen eine Aussage über die Allelfrequenz treffen zu können, muss eine Kartierungspopulation von bis zu 4000 Pflanzen für die Feinkartierung untersucht werden (Jander *et al.*, 2002). Durch die Bereitstellung des *Arabidopsis thaliana* Genoms und die NGS (*Next Generation Sequencing*) Technologie ist eine bioinformatische Analyse einer Kartierungspopulation möglich. Durch die Software SHOREmap

kann beispielsweise die Allelfrequenz eines Pools aus 500 Pflanzen bioinformatisch aus den Daten einer Tiefensequenzierung dargestellt werden. Abweichungen in der Allelfrequenz können genaue Chromosomenbereiche identifizieren, die in der Variantanalyse auf relevante SNPs untersucht werden können (Schneeberger *et al.*, 2009). Da eine Auskreuzung in einen anderen Ökotyp oft zu phänotypischen Unterschieden führen kann, ist diese Methode auch mit einer Rückkreuzung in die Ausgangsmutante durchführbar. Dabei wird durch die F₂-Generation einer Rückkreuzung eine Mapping-Population erstellt. Es konnte in einem Szenario von James *et al.* (2013) gezeigt werden, dass ab einem Pool von 150 individuellen Pflanzen die Frequenz nicht relevanter SNPs sinkt. Allerdings ist dafür eine Tiefensequenzierung eines Pools aus über 150 Pflanzen der Mapping-Population und der zur Rückkreuzung verwendeten Mutanten notwendig, weil anschließend eine Subtraktion der nicht relevanten SNPs erfolgt. Alternativ können auch Mapping-Populationen unabhängiger Linien parallel sequenziert und verglichen werden. Durch die Selektion der EMS-induzierten Varianten können relevante SNPs identifiziert werden. Durch eine Amplicon-Sequenzierung (dCARE, *deep candidate re-sequencing*) werden kleine Unterschiede in der Allelfrequenz bestimmt und somit unter den relevanten SNPs die Mutation für den verantwortlichen Phänotyp identifiziert (Hartwig *et al.*, 2012; James *et al.*, 2013). Werden der zeitliche Aufwand und die Gesamtkosten der Chromosomenkartierung und der *mapping-by-sequencing* Methode verglichen, war die bioinformatische Analyse und die Identifizierung durch die gegebene Technologie für die Fragestellung dieser Arbeit die Methode der Wahl.

Nach der Identifizierung von SUSA1 wurden die Punktmutationen in weiteren *saul1-1 susa1* Linien durch eine Sanger-Sequenzierung identifiziert (Tabelle 3-5). Um Artefakte ausschließen zu können, wäre hier eine eindeutige Bestimmung der Mutationen durch eine Amplicon-Sequenzierung sinnvoll (Hartwig *et al.*, 2012). Da allerdings in dieser Arbeit der Suppressor bereits identifiziert war und der zeitliche Aufwand und die Kosten berücksichtigt wurden, wurde eine Sanger-Sequenzierung vorgezogen.

4.2.1.2 Alle Domänenstrukturen von SUSA1 sind für die Funktion von Bedeutung

Die in dieser Arbeit identifizierten acht Aminosäuremutationen in den jeweiligen *saul1-1 susa1* Linien sind über alle Domänen verteilt. In der TIR-Domäne ist eine Mutation (*saul1-1 susa1-6*, E86K) zu finden. In der NBS-ARC-Domäne befinden sich die Mutationen ausschließlich in der integrierten ATPase-Domäne. Alle weiteren Mutationen sind in den LRR-Motiven zu finden (Abbildung 3-21). Interessanterweise konnten für je zwei unabhängige *saul1-1 susa1* Linien identische Mutationen (G214E und T649M) identifiziert werden. So scheinen diese Bereiche für die Funktion von SUSA1 von großer Bedeutung zu sein. Die Mutation G214E liegt im P-Loop-Motiv der ATPase-Domäne. Dieser Bereich spielt bei der ATP-Bindung eine entscheidende Rolle (Williams *et al.*, 2011). Die Mutation T649M liegt im Bereich der LRR-Motive. Im parallel durchgeführten Suppressor-Screen in der Arbeitsgruppe von Prof. Xin Li (University of British Columbia, Vancouver, Kanada) verteilten sich die Mutationen auf die NBS-ARC-Domäne und die LRR-Motive. Insgesamt konnten durch die Zusammenarbeit 13 *susa1*-Allele identifiziert werden, von denen sieben in den LRR-Motiven zu finden sind (Tong *et al.*, eingereicht). So scheint aufgrund der hohen Anzahl von Mutationen in den LRR-Motiven im Vergleich zur TIR-Domäne dieser Bereich im Zusammenhang mit der SAUL1-Signaltransduktion von größerer Bedeutung zu sein.

Dass in zwei unabhängigen Linien eine identische Mutation gefunden werden konnte, wurde schon zuvor durch die Analyse der *chs1-1* Mutante gezeigt. Durch einen Screen von Temperatur-sensitiven Mutanten konnte CHS1 als Zelltodregulator bei niedrigen Temperaturen beschrieben werden. Dabei konnte in den unabhängigen Studien von Wang *et al.* (2013) und Zbierzak *et al.* (2013) in je zwei Linien eine identische Mutation in der Nukleotidposition 28 identifiziert werden. In dem Suppressor-Screen von *exo70B1* wurden ebenfalls zwei Linien identifiziert, die an gleicher Aminosäureposition einen Austausch aufweisen. Die Mutante *exo70B1* besitzt eine gesteigerte Resistenz gegenüber Pathogenen und das Protein EXO70B1 ist eine Untereinheit des Exozystkomplexes und für die Exozytose verantwortlich. In diesem Suppressor-Screen konnte u.a. das TIR-NBS Protein TN2 als Suppressor von *exo70B1* beschrieben werden. Dabei wurden neun Allele gefunden, die sich auf die TIR- und

NBS-Domänen verteilen. Dabei führen zwei verschiedene Punktmutationen zu einem Aminosäureaustausch in der TIR-Domäne an identischer Position (Zhao *et al.*, 2015).

Somit bestätigt die Identifizierung von insgesamt 13 *susa1*-Allelen in zwei unabhängigen Suppressor-Screens die enorme Bedeutung von *SUSA1* in der SAUL1-Signaltransduktion. Zusätzlich weisen identische Mutationen in zwei Linien auf konservierte Bereiche hin, die für die Signalweiterleitung im Bezug zu SAUL1 wichtig sind.

4.2.1.3 *SUSA1* kann durch Komplementation und Erzeugung von Doppelmutanten als Suppressor von *saul1-1* bestätigt werden

Um *SUSA1* als Suppressor von *saul1-1* zu bestätigen, wurde eine Komplementation der Linie *saul1-1 susa1-7* mit dem Konstrukt *35S::GFP-SUSA1* durchgeführt. Dabei sollte durch das Einbringen eines funktionalen *SUSA1*-Genes der *saul1-1* Phänotyp wieder hergestellt werden. Es konnte eine Komplementationslinie regeneriert werden, die teilweise den *saul1-1* typischen Phänotyp zeigte (Abbildung 3-22). Eine genaue Charakterisierung dieser Linie steht allerdings noch aus.

Die Komplementation mit dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellten Konstrukt *35S::GFP-SUSA1* wurde ebenfalls in der Arbeitsgruppe von Prof. Xin Li (University of British Columbia, Vancouver, Kanada) an einer weiteren *saul1-1 susa1* Linie durchgeführt. Dabei konnte der *saul1-1* Phänotyp vollständig wieder hergestellt werden (Tong *et al.*; eingereicht). Demnach kann das Komplementationskonstrukt *35S::GFP-SUSA1* als funktionsfähig eingestuft werden. In dieser Arbeit wurde die Komplementation mit der Linie *saul1-1 susa1-7* (E118) durchgeführt, die eine relevante Mutation im P-Loop-Motiv besitzt. In den regenerierten Pflanzen konnte auf genomischer Ebene das Komplementationskonstrukt nachgewiesen werden, jedoch war keine GFP-Fluoreszenz zu beobachten. Somit könnte es aufgrund der sehr niedrigen Expression des Konstrukts nur zu einem teilweise komplementierten Phänotyp gekommen sein. Eine weitere Charakterisierung der Komplementationslinie *saul1-1 susa1-7/OE GFP-SUSA1* könnte weitere Erkenntnisse bringen.

Durch die parallel erstellte Doppelmutante *saul1-1 susa1-14* wurde unabhängig vom Suppressor-Screen *SUSA1* als Suppressor von *saul1-1* bestätigt. In der F3-Generation konnten doppelt homozygote Mutanten identifiziert werden, die den *saul1-1* typischen Phänotyp aufhoben (Abbildung 3-24). Die T-DNA Insertion im Gen *SUSA1* konnte in dieser Arbeit in Exon 4 bestätigt werden (Abbildung 3-23), wodurch - wie in einigen *saul1-1 susa1* Linien - die LRR-Motive betroffen sind. Interessanterweise konnte ein intermediärer Phänotyp bei heterozygot vorliegender *susa1-14* Mutation in homozygoten *saul1-1* Pflanzen beobachtet werden (Abbildung 3-24). Ähnliches war auch bei der Segregationsstudie der *saul1-1 susa1* Linien auffällig. Demnach ist von einem semi-dominanten Effekt auszugehen. Ein ähnlicher Effekt ist bei der *chs1-1* Mutante beschrieben. Hier führt ebenfalls eine heterozygot vorliegende Mutation im Gen *CHS1* zu einem intermediären Phänotyp. Es wird ebenfalls von einer Semi-Dominanz oder Haploinsuffizienz von *CHS1* ausgegangen (Zbierzak *et al.*, 2013). Dabei wird vermutet, dass die mutierte Proteinvariante einen negativen Effekt auf das normale Protein hat. Ähnliches kann auch bei *SUSA1* angenommen werden. Außerdem besteht weiterhin die Möglichkeit, dass verkürzte Proteinvarianten trotz T-DNA Insertion entstehen, die einen negativen Einfluss auf *SUSA1* haben.

4.2.2 Die Charakterisierung von *SUSA1*

4.2.2.1 Es konnten vier Spleißvarianten von *SUSA1* nachgewiesen werden

Bei der Herstellung der *SUSA1*-Konstrukte sollte u.a. die kodierende DNA-Sequenz (CDS) amplifiziert und kloniert werden. Aufgrund der vermutlich sehr schwachen Expression von *SUSA1* (eFP Browser (Anhang: 7.5 und Winter *et al.*, 2007) und Genevestigator (© NEBION / ETH Zurich, 2008)) konnten durch die PCR nur sehr geringe Mengen an Amplifikaten produziert werden. Nach der Klonierung und Sequenzierung der Ausgangsvektoren wurden neben der annotierten CDS vier weitere Spleißvarianten (SV) identifiziert (Abbildung 3-25). Durch die sehr schwache Expression von *SUSA1* konnten in einer RT-PCR keine weiteren Banden identifiziert werden.

Der alternative Spleißvorgang ist bei Resistenz-Genen nicht ungewöhnlich. So konnten beispielsweise in Arabidopsis für die Gene *SNC1*, *RPS4* und *RPS6* alternative Transkripte nachgewiesen werden (Kim *et al.*, 2009; Zhang und Gassmann 2003; Zhang und Gassmann 2007; Xu *et al.*, 2012). Für *RPS4* sind mit dem annotierten Transkript acht unterschiedliche Varianten beschrieben. Dabei führen alle alternativen Transkripte zu einem verfrühten Stoppcodon. Interessanterweise konnte eine IR2-Variante (IR von Intron 2) von *RPS4* nach einer bakteriellen Infektion erhöht nachgewiesen werden. Es wird diskutiert, ob nicht nur die Kombination sondern auch das Level der Transkripte für die Feinabstimmung der Immunabwehr verantwortlich ist. Spekulativ können verkürzte Proteinvarianten zu einer negativen oder auch positiven Beeinflussung der Immunantwort führen (Zhang und Gassmann 2007). Die in dieser Arbeit beschriebenen SV1, SV3 und SV4 Varianten von *SUSA1* haben je ein verfrühtes Stoppcodon. Ein verfrühtes Stoppcodon ist oft ein Ziel des NMD (*Nonsense Mediated Decay*) Signalwegs, in dem fehlerhafte Transkripte erkannt und abgebaut werden. Durch die Arbeit von Gloggnitzer *et al.* (2014) konnte nachgewiesen werden, dass viele TIR-NBS-LRR Proteine in Arabidopsis durch NMD reguliert werden. Durch Mutationen des NMD-Faktors SMG7 kommt es in Arabidopsis zu einer Autoaktivierung des Immunsystems, was sich in einem kleinwüchsigen Phänotyp mit Zelltodläsionen äußert. Durch eine bakterielle Infektion kann die Effizienz des NMD-Signalwegs herunterreguliert werden (Gloggnitzer *et al.* 2014). Dadurch wird die Bedeutung der alternativen Transkripte von NLR-Proteinen in der Immunabwehr hervorgehoben. Interessanterweise sind Transkripte mit einer *Intron-Retention* nicht für den im Zytoplasma durchgeführten NMD-Signalweg sensitiv. In der Studie von Göhring *et al.* (2014) konnte gezeigt werden, dass alternative Transkripte mit integrierten Introns im Kern verbleiben. Es wird vermutet, dass äußere Einflüsse einen Spleißvorgang der Introns induzieren und somit annotierte Transkripte für die Translation schneller zur Verfügung gestellt werden. Demnach würde aus der SV1-Variante von *SUSA1*, bei dem das letzte Intron nicht entfernt wird, kein alternatives Protein entstehen.

Durch transiente Expression von GFP-*SUSA1* in Tabakblättern und einer anschließenden Proteinextraktion und Immunoblotdetektion konnten zwei potentielle Isoformen von *SUSA1* identifiziert werden (Abbildung 3-28). Eine Isoform entspricht der Größe des annotierten

Proteins und eine weitere Isoform könnte mit der SV3-Variante korrelieren. SV3 würde nur die TIR-Domäne von SUSAN1 exprimieren.

Generell scheint auch SUSAN1 durch alternative Transkripte reguliert zu werden. Um weitere Aussagen über die Funktion dieser Spleißvarianten machen zu können, müssen weitere Experimente zur Bestimmung der Transkripte und potentiellen Proteinvarianten durchgeführt werden. Dazu zählen die Optimierung der RT-PCR und die Analyse der potentiellen Proteinisoformen durch Massenspektrometrie. Interessant wäre dabei die Funktion der TIR-Domäne von SUSAN1 in der pflanzlichen Immunabwehr.

4.2.2.2 SUSAN1 ist im ER, im Zytoplasma und im Zellkern lokalisiert

Durch Lokalisierungsstudien konnte SUSAN1 im ER, Zytoplasma und teilweise auch im Zellkern identifiziert werden (Abbildung 3-26 und Abbildung 3-27). Dabei wurde das Konstrukt *35S::GFP-SUSAN1* transient in Protoplasten und Tabakblätter exprimiert. Bei diesem Konstrukt ist zu berücksichtigen, dass alle potentiellen Proteinvarianten entstehen können. Da in der Arbeitsgruppe von Prof. Xin Li (University of British Columbia, Vancouver, Kanada) eine vollständige Komplementation einer *saul1-1 susan1* Linie mit diesem Konstrukt erfolgen konnte, ist das Konstrukt *35S::GFP-SUSAN1* für eine Lokalisierung von SUSAN1 gut geeignet.

Generell war die sehr schwache GFP-Fluoreszenz trotz konstitutiven 35S-Promotors auffällig. Dieses könnte daraufhin deuten, dass die Zellen einen Mechanismus besitzen, SUSAN1 deutlich herunter zu regulieren. Generell führt eine konstitutive Aktivierung von NLRs zu einer Autoaktivierung des Immunsystems. Dieses ist deutlich an der *snc1* Mutante zu erkennen, bei der eine dauerhafte Aktivierung des NLR SNC1 zu einem autoimmunen Phänotyp führt (Li *et al.*, 2001).

Die Lokalisation von NLR-Proteinen ist nicht auf ein Zellkompartiment festgelegt. RPS5 und RPM1 sind beispielsweise an der Plasmamembran assoziiert (Qi *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2011) und RPS4 ist wiederum im Zytoplasma und im Zellkern lokalisiert. Zusätzlich konnte RPS4 auch in einer Endomembran-Fraktion nachgewiesen werden. Durch einen Pathogenbefall kann es auch zu einer Relokalisierung von NLR-Proteinen kommen. RPS4 akkumuliert nach einer

Infektion im Zellkern und kann dadurch die EDS1-abhängige Immunantwort auslösen (Wirthmueller *et al.*, 2007). Das NLR-Protein L6 aus Lein (*Linum*; auch Flachs genannt) ist u.a. im Golgi-System lokalisiert und die N-terminalen Domänen der Proteine M (Lein) und RPP1-WsA (*Arabidopsis*) sind ebenfalls im Endomembransystem zu finden (Takemoto *et al.*, 2012). Eine Relokalisierung konnte auch bei dem Resistenzprotein R3a aus der Kartoffel beobachtet werden. Bei einer Co-Expression mit dem Effektor AVR3a^{KI} wird R3a vom Zytoplasma zu den Endosomen transferiert (Engelhardt *et al.*, 2013).

Die Kernlokalisierung von SUSAN1 wurde in dieser Arbeit nur in ca. 5-10% aller GFP-positiven Tabakzellen nachgewiesen. In Protoplasten konnte dieses allerdings nicht beobachtet werden (Abbildung 3-26). Spekulativ könnten äußere Einflüsse eine Kernlokalisierung von SUSAN1 induzieren und zum Zelltod führen. In diesem Fall wäre eine Kernlokalisierung in lebenden Protoplasten nur eingeschränkt möglich. Bei einer Co-Expression mit SAUL1-RFP in Tabakblättern konnte wiederum keine Kernlokalisierung von GFP-SUSAN1 beobachtet werden (Abbildung 3-27). Demnach würde die Anwesenheit von SAUL1 die Kernlokalisierung und somit die starke Immunantwort verhindern. Anhand der sehr schwachen Expression des konstitutiv exprimierten *GFP-SUSAN1* Konstrukts ist eine starke Regulation von SUSAN1 nicht auszuschließen. Potentiell könnte die deutliche ER-Lokalisierung von SUSAN1 einen Schutzmechanismus darstellen, weil eventuell eine Signalweiterleitung im ER von SUSAN1 nicht vorgesehen ist. Zusätzlich könnten verkürzte Proteinvarianten für die jeweilige Lokalisierung verantwortlich sein. In der Immunodetektion von GFP-SUSAN1 konnte eine kleinere Proteinvariante, die der TIR-Domäne entsprechen könnte, nachgewiesen werden. Um dieses näher erörtern zu können, müssten einzelne Domänen und Proteinvarianten von SUSAN1 auf deren Lokalisierung untersucht werden. Zusätzlich wäre auch in diesem Fall eine Untersuchung der potentiellen Proteinvarianten durch Massenspektrometrie sinnvoll.

4.2.2.3 CHS1 interagiert mit SUSAN1 und SAUL1

Die in dieser Arbeit durchgeführten BiFC- und Y2H-Studien konnten keine Interaktion von SUSAN1 und SAUL1 nachweisen (Abbildung 3-29 und Abbildung 3-30). Aufgrund der durch die

Arbeitsgruppe von Prof. Shuhua Yang (China Agricultural University, Beijing, China; persönliche Mitteilung: Prof. Shuhua Yang) gezeigten Interaktion von CHS1 und SUSA1 durch Y2H- und Co-Immunoprecipitation (CoIP) Analysen, wurde CHS1 in die BiFC-Interaktionsstudien integriert. In dieser Arbeit konnte in BiFC-Studien eine Interaktion von CHS1 und SAUL1 bzw. SUSA1 gezeigt werden (Abbildung 3-30).

Bei der Untersuchung des Genombereichs von *SUSA1* konnte ein R-Gen Cluster identifiziert werden, in dem die R-Gene *SUSA1*, *CHS1* und *TN2* zu finden waren. *CHS1* und *SUSA1* liegen in einer Kopf-an-Kopf Anordnung, was bei R-Genen nicht ungewöhnlich ist. So konnte zuvor das Cluster von *RPS4* und *RRS1* beschrieben werden. Beide Proteine bilden ein Heterodimer und leiten durch die Erkennung von Effektoren die Immunantwort ein (Narusaka *et al.*, 2009; Le Roux *et al.*, 2015; Sarris *et al.*, 2015). Die R-Gene *CHS3* und *CSA1* befinden sich ebenfalls in einer Kopf-an-Kopf Anordnung und die Funktion von CHS3 beruht auf der Anwesenheit von CSA1. Eine Interaktion beider Proteine konnte noch nicht nachgewiesen werden (Xu *et al.*, 2015).

In der Arbeitsgruppe von Prof. Xin Li (University of British Columbia, Vancouver, Kanada) konnte wiederum über eine CoIP eine schwache Interaktion von SAUL1 und SUSA1 *in planta* nachgewiesen werden, jedoch war ein Split-Luciferase-Assay zur Analyse der direkten Interaktion ebenfalls negativ (Tong *et al.*, eingereicht). Demnach ist von einer indirekten Assoziation von SAUL1 und SUSA1 auszugehen. Aufgrund des reproduzierten Interaktionsnachweises von CHS1 und SUSA1 und der in dieser Arbeit gezeigten SAUL1-CHS1 Assoziation fördert CHS1 womöglich die indirekte Interaktion von SAUL1 und SUSA1. Ob in diesem Komplex weitere Proteine involviert sind, müsste in weiteren Studien über eine CoIP und anschließende 2D-PAGE sowie Massenspektrometrie untersucht werden. Zusätzlich ist bei der BiFC-Interaktionsstudie der Nachweis der Proteine durch einen Immunoblot notwendig.

4.2.3 SAUL1 als positiver Regulator in der basalen Immunantwort

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse und Überlegungen kann die *guard/decoy*-Hypothese für die Proteine SAUL1, CHS1 und SUSAN1 vermutet werden. Dabei steht SAUL1 mit dem NLR Heterodimer CHS1 und SUSAN1 in Kontakt. Durch die Abwesenheit von SAUL1, wie es in *saul1-1* Mutanten der Fall ist, wird dieses durch CHS1 und SUSAN1 erkannt und es kommt zur Einleitung des Zelltods (Abbildung 4-2). Interessant wäre dabei, ob CHS1 und SUSAN1 dadurch dissoziieren oder die Konformation ändern. Dass SAUL1 und CHS1 in einem Komplex mit SUSAN1 agieren, wird auch durch die *chs1-1* Mutante deutlich, da diese dem *saul1-1* Phänotyp sehr ähnlich ist (Wang *et al.*, 2013; Zbierzak *et al.*, 2013; Disch *et al.*, 2016). Somit führt die Abwesenheit bzw. eine Fehlfunktion von SAUL1 bzw. CHS1 zu einer Autoaktivierung von SUSAN1 und zu dem in *chs1-1* und *saul1-1* zu beobachtenden autoimmunen Phänotyp. Demnach ist auch SUSAN1 die Funktion der Signalweiterleitung zuzuordnen, was durch den unauffälligen Phänotyp der *susa1-14* Mutante unterstrichen wird. Im natürlichen System könnte SAUL1 durch Effektoren negativ beeinflusst werden, was durch das Heterodimer CHS1 und SUSAN1 erkannt wird (Abbildung 4-2). Da pathogene Effektoren meistens die basale Immunantwort angreifen und diese unterdrücken (Übersicht: Jones und Dangl 2006), könnte SAUL1 ein positiver Regulator der basalen Immunantwort sein.

Ähnliches konnte in Reis am Beispiel der Ubiquitin E3 Ligase OsPUB44 gezeigt werden. Dabei wurde eine positive Funktion von OsPUB44 in der basalen Immunantwort beschrieben. Zusätzlich interagiert der Effektor XopP_{xoo} (aus *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*) mit OsPUB44 und manipuliert dessen Funktion (Ishikawa *et al.*, 2014). Parallel konnte die *guard*-Hypothese (Dangl und Jones 2001) zuvor schon durch das Protein RIN4 (RPM1-INTERACTING PROTEIN4) beschrieben werden. RIN4 wird durch bakterielle Effektoren negativ beeinflusst, was zur Aktivierung der NLRs RPM1 und RPS2 führt (Axtell und Staskawicz 2003; Mackey *et al.*, 2003; Mackey *et al.*, 2002; Chung *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011). RIN4 beeinflusst die H⁺-ATPase in Stomata während eines Pathogenbefalls (Liu *et al.*, 2009). Durch die negative Beeinflussung von RIN4 durch Effektoren kann das Eindringen von Bakterien erleichtert werden.

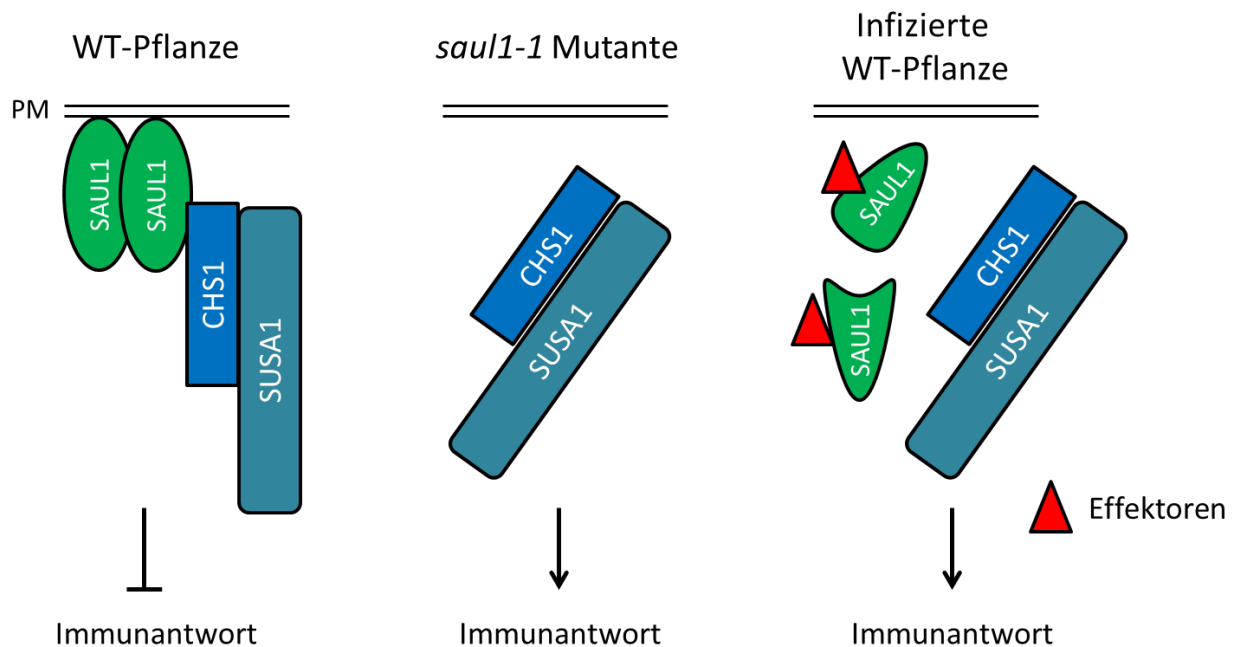


Abbildung 4-2: Schematisches Szenario der Interaktion und Reaktion von SAUL1, CHS1 und SUS1 in WT-Pflanzen, *saul1-1* Mutanten und in infizierten Pflanzen. In WT-Pflanzen kommt es zu einer Komplexbildung von SAUL1, CHS1 und SUS1. Dadurch wird die Immunantwort unterdrückt. In der *saul1-1* Mutante sind die NLR-Proteine CHS1 und SUS1 durch das Fehlen von SAUL1 in einem aktivierten Modus, was bei Temperaturen unter 24°C zu einer Immunantwort und somit zum Zelltod führt. Dieser Effekt ist für den *saul1-1* typischen Phänotyp verantwortlich. Pathogene können Effektoren in die Zelle segregieren und die PAMP-vermittelte Immunantwort (PTI) dadurch unterdrücken (ETS). Durch diese Effektoren könnte die Funktion von SAUL1 beeinträchtigt werden, was eine Aktivierung von CHS1 und SUS1 zur Folge hat. Es kommt zu der Effektor-vermittelten Immunantwort (ETI).

In der Arbeitsgruppe von Prof. Xin Li (University of British Columbia, Vancouver, Kanada) konnte durch Infektionsstudien die positive Funktion von SAUL1 in der basalen Immunantwort bestätigt werden (Tong *et al.*, eingereicht). Dafür wurde eine Infektion von einer *saul1-1 susa1* Linie mit einem im Typ III Sekretionssystem beeinträchtigten Bakteriumstamm (*P.s.t.* DC3000 *hrcC*⁻) durchgeführt. Dieses Pathogen ist nicht in der Lage Effektoren in die pflanzliche Zelle zu schleusen. Interessanterweise konnte zunächst kein Unterschied zwischen dem Wachstum des Pathogens auf WT-Pflanzen und *saul1-1 susa1* Mutanten festgestellt werden. Da die E3 Ubiquitinligase PUB43 eine Ähnlichkeit von 73% in der Aminosäuresequenz zu SAUL1 aufweist, wurde eine redundante Funktion zwischen PUB43 und SAUL1 vermutet. Die dreifache Mutante *saul1-1 susa1 pub43* zeigte in der Infektionsstudie eine signifikant gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber dem Pathogen *P.s.t.* DC3000 *hrcC*⁻ im Vergleich zu der

saul1-1 susa1 Mutante. Dadurch ist davon auszugehen, dass PUB43 und SAUL1 eine redundante Funktion besitzen und die basale Immunantwort positiv regulieren. Die Funktion von SAUL1 wird zusätzlich durch das NLR-Protein SUSA1 bewacht.

So konnte in dieser Arbeit mit der Unterstützung durch die Arbeitsgruppe von Prof. Xin Li (University of British Columbia, Vancouver, Kanada) der Signalweg von SAUL1 in der pflanzlichen Immunantwort beschrieben werden. SAUL1 beeinflusst dabei die basale Immunantwort positiv und wird durch NLR-Proteine bewacht. Somit gehört SAUL1 zu der Gruppe von E3 Ubiquitinligasen, die in der basalen Abwehr gegenüber Pathogenen beteiligt sind. Generell konnte mit der Zusammenarbeit durch Prof. Xin Li und Meixuezi Tong (University of British Columbia, Vancouver, Kanada) erstmals eine Ubiquitinligase beschrieben werden, die durch ein NLR-Protein bewacht wird und eine positive Rolle in der basalen Immunantwort spielt. Um die Aufgabe in der basalen Immunantwort genauer erörtern zu können, müsste in weiterführenden Studien das Substrat von SAUL1 identifiziert werden.

5 Zusammenfassung

Pflanzen sind sessile Organismen und darauf angewiesen, sich den Umweltbedingungen in Ihrer Umgebung anzupassen. Wechselnde Lichtbedingungen und diverse Pathogene stellen Beispiele für relevante abiotische und biotische Stressfaktoren dar. Die Reaktion auf diese Faktoren ist für das Überleben der Pflanze von großer Bedeutung. Auf molekularer Ebene spielt die post-translationelle Modifikation von Proteinen durch Ubiquitinierung eine wichtige Rolle bei der Reaktion auf abiotische und biotische Stressfaktoren.

In dieser Arbeit wurde das Signalnetzwerk der membranständigen E3 Ubiquitinligase SENESENCE ASSOCIATED E3 UBIQUITIN LIGASE1 (SAUL1) in zwei separaten Ansätzen untersucht. Durch vorangegangene Studien konnte gezeigt werden, dass SAUL1 eine Funktion in der Regulation des Zelltods u.a. bei Seneszenzprozessen besitzt und zudem in der Immunabwehr involviert ist.

Im ersten Projekt sollte die Signaltransduktion von SAUL1 durch Identifizierung und Charakterisierung des Suppressors von *saul1-1* (SUSA) analysiert werden. Durch die Analyse von 12 Suppressor-Linien mittels Kopplungsanalysen, Komplementationsstudien und Tiefensequenzierungen wurde in allen *saul1-1 susa* Linien ein noch nicht charakterisierter zytoplasmatischer TIR-NB-LRR Immunrezeptor als SUSA1 identifiziert. Durch eine Komplementation und die Herstellung von unabhängigen Doppelmutanten wurde SUSA1 als Suppressor bestätigt.

Durch die anschließende Charakterisierung von *SUSA1* konnten vier neue Spleißvarianten beschrieben werden. Co-Lokalisierungsstudien zeigten eine subzelluläre Lokalisation von SUSA1 im ER, Zytoplasma und teilweise im Kern. Der Nachweis einer direkten Interaktion von SAUL1 und SUSA1 mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen und bimolekularer Fluoreszenzkomplementation gelang jedoch nicht. Mithilfe der Integration eines weiteren im *SUSA1*-Locus liegenden Immunrezeptors (*CHS1*) in die Interaktionsstudien gelang der Nachweis einer Interaktion von CHS1 und SAUL1 bzw. SUSA1. Auf Grundlage dieser Ergebnisse konnte eine indirekte Interaktion von SAUL1 und SUSA1 über den Immunrezeptor CHS1 vermutet und eine Funktion von SAUL1 in der pflanzlichen Immunabwehr bestätigt werden.

In dem zweiten Projekt sollten co-exprimierte Gene von *SAUL1* identifiziert und analysiert werden. In diesem Ansatz wurde die Insertionsmutante *sco4-2* identifiziert. Folgende

Untersuchungen konnten jedoch keinen Zusammenhang zwischen *SAUL1* und *SCO4* feststellen. Aus diesem Grund wurde die Mutante *sco4-2* unabhängig von *SAUL1* charakterisiert. *SCO4* wurde zuvor als chloroplastidäre Protease mit einer Funktion in der Anpassung an hohe Lichtintensitäten beschrieben. Bei der Analyse von *sco4-2* konnte ein auffälliger Phänotyp bei $\frac{1}{4}$ der Samen heterozygoter Pflanzen beobachtet werden. Durch eine anschließende Differenzialinterferenzkontrastierung wurde ein Arrest der Embryonen im globulären Stadium dokumentiert. Eine Komplementation des Phänotyps bestätigte *sco4-2* als embryothale Mutante. Interessanterweise konnte in den Komplementationslinien ein dosisabhängiger Phänotyp der Blätter beschrieben werden. Histochemische Untersuchungen der Promotoraktivität zeigten eine Expression von *SCO4* in sich entwickelnden Geweben und Organen. Hingegen bestätigten konfokalmikroskopische Untersuchungen eine Lokalisierung von *SCO4* in plastidären Strukturen. Aufgrund der maßgeblichen Funktion von *SCO4* in der Embryoentwicklung und der Beeinflussung der Blattmorphologie kann neben der Aufgabe in der Lichtanpassung auch eine Funktion in generellen Entwicklungsprozessen abgeleitet werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeiten tragen zur Aufklärung der Signalwege abiotischer und biotischer Stressantworten in Pflanzen bei. Ein besseres Verständnis stressinduzierter molekularer Netzwerke kann dazu beitragen, die Hintergründe der Anpassungsfähigkeit von Pflanzen an Ihre komplexen Lebensräume besser zu verstehen.

Summary

Plants have established different strategies and mechanisms to successfully respond to environmental conditions. The acclimation to high light conditions and the response to pathogen attack are important factors regulating the balance between growth and defense. Ubiquitination is a post-translational modification of proteins controlling these mechanisms. The focus of this work was the characterization of the signaling network of the membrane-associated SENESCENCE ASSOCIATED E3 UBIQUITIN LIGASE1 (*SAUL1*). In previous studies *SAUL1* was described as an essential regulator of cell death and plant immunity.

In the first project the analysis of the signal transduction of the membrane-associated SENESCENCE ASSOCIATED E3 UBIQUITIN LIGASE1 (SAUL1) was performed via the identification and characterization of the Suppressor of *saul1-1* 1 (SUSA1). Through linkage analysis, allelism tests and deep re-sequencing SUSA1 was identified as a novel resistance protein, which belongs to the group of TIR-NB-LRR immune receptors. Complementation lines and independent double mutants confirm SUSA1 as a suppressor of *saul1-1* in 12 independent allelic *saul1-1 susa1* lines. By using confocal laser scanning microscopy SUSA1 was localized to the ER, cytoplasm and to the nucleus. Additionally, four splice variants of SUSA1 could be described. However, in Y2H and BiFC assays no direct interaction between SAUL1 and SUSA1 was observed. By including the SUSA1 resistance gene neighbour CHS1 into the interaction analysis, a CHS1-SAUL1 and CHS1-SUSA1 interaction was observed, respectively. Consequently, these results confirm the function of SAUL1 in plant defense and an indirect interaction between SAUL1 and SUSA1 via CHS1 could be proposed.

In a second project, co-expressed genes of SAUL1 were analyzed, and the *sco4-2* mutant was identified. Further analysis showed no functional link between SCO4 and SAUL1. Thus, the characterization of *sco4-2* was performed independently. In a previous study, SCO4 was described as a novel endopeptidase involved in the photosynthetic acclimation to higher light intensities. Here, phenotypic analysis of *sco4-2* showed an abnormal seed development and DIC images verified an embryo arrest at the globular stage. This embryolethal phenotype could be confirmed by analyzing complementation lines. Interestingly, a dosage-dependent phenotype in leaves was observed in complemented plants. In addition, promoter activity assays showed an expression of SCO4 in developing tissues. Furthermore, the plastid localization of SCO4 could be confirmed via confocal laser scanning microscopy. Besides the function of SCO4 in photosynthetic acclimation to higher light intensities, an additional role in embryo development and leaf morphology could be proposed.

6 Literaturverzeichnis

- Ajjawi, I., Lu, Y., Savage, L. J., Bell, S. M., Last, R. L.** (2010). Large-Scale Reverse Genetics in Arabidopsis. Case Studies from the Chloroplast 2010 Project. *Plant physiology* **152**, 529–540.
- Albrecht, V., Ingenfeld, A., Apel, K.** (2006). Characterization of the snowy cotyledon 1 mutant of Arabidopsis thaliana: the impact of chloroplast elongation factor G on chloroplast development and plant vitality. *Plant molecular biology* **60**, 507–518.
- Albrecht, V., Ingenfeld, A., Apel, K.** (2008). Snowy cotyledon 2: the identification of a zinc finger domain protein essential for chloroplast development in cotyledons but not in true leaves. *Plant molecular biology* **66**, 599–608.
- Albrecht, V., Simková, K., Carrie, C., Delannoy, E., Giraud, E., Whelan, J., Small, I. D., Apel, K., Badger, M. R., Pogson, B. J.** (2010). The cytoskeleton and the peroxisomal-targeted snowy cotyledon3 protein are required for chloroplast development in Arabidopsis. *The Plant cell* **22**, 3423–3438.
- Albrecht-Borth, V., Kauss, D., Fan, D., Hu, Y., Collinge, D., Marri, S., Liebers, M., Apel, K., Pfanschmidt, T., Chow, W. S., Pogson, B. J.** (2013). A novel proteinase, SNOWY COTYLEDON4, is required for photosynthetic acclimation to higher light intensities in Arabidopsis. *Plant physiology* **163**, 732–745.
- Aloni, R., Aloni, E., Langhans, M., Ullrich, C. I.** (2006). Role of auxin in regulating Arabidopsis flower development. *Planta* **223**, 315–328.
- Aloni, R., Schwalm, K., Langhans, M., Ullrich, C. I.** (2003). Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis. *Planta* **216**, 841–853.

- Andriankaja, M., Dhondt, S., De Bodt, S., Vanhaeren, H., Coppens, F., De Milde, L., Mühlenbock, P., Skirycz, A., Gonzalez, N., Beemster, G. T., Inzé, D.** (2012). Exit from Proliferation during Leaf Development in *Arabidopsis thaliana*. A Not-So-Gradual Process. *Developmental cell* **22**, 64–78.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, Chiu, W. L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F. M., Sheen, J.** (2002). MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* **415**, 977–983.
- Atkinson, N. J., Urwin, P. E.** (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of experimental botany* **10**, 3523–3544.
- Axtell, M. J., Chisholm, S. T., Dahlbeck, D., Staskawicz, B. J.** (2003). Genetic and molecular evidence that the *Pseudomonas syringae* type III effector protein AvrRpt2 is a cysteine protease. *Molecular Microbiology* **49**, 1537–1546.
- Axtell, M. J., Staskawicz, B. J.** (2003). Initiation of RPS2-Specified Disease Resistance in *Arabidopsis* Is Coupled to the AvrRpt2-Directed Elimination of RIN4. *Cell* **112**, 369–377.
- Azevedo, C., Santos-Rosa, M. J., Shirasu, K.** (2001). The U-box protein family in plants. *Trends in Plant Science* **6**, 354–358.
- Bailey, S., Walters, R. G., Jansson, S., Horton, P.** (2001). Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment. The existence of separate low light and high light responses. *Planta* **213**, 794–801.
- Barrowman, J., Michaelis, S.** (2009). ZMPSTE24, an integral membrane zinc metalloprotease with a connection to progeroid disorders. *Biological chemistry* **390**, 761–773.
- Beck, M., Zhou, J., Faulkner, C., MacLean, D., Robatzek, S.** (2012). Spatio-Temporal Cellular Dynamics of the *Arabidopsis* Flagellin Receptor Reveal Activation Status-Dependent Endosomal Sorting. *The Plant cell* **24**, 4205–4219.
- Beeler, S., Liu, H.-C., Stadler, M., Schreier, T., Eicke, S., Lue, W.-L., Truernit, E., Zeeman, S. C., Chen, J., Kotting, O.** (2014). Plastidial NAD-Dependent Malate Dehydrogenase Is Critical for Embryo Development and Heterotrophic Metabolism in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **164**, 1175–1190.

- Bhattacharjee, S., Halane, M. K., Kim, S. H., Gassmann, W.** (2011). Pathogen effectors target Arabidopsis EDS1 and alter its interactions with immune regulators. *Science* **334**, 1405–1408.
- Boyartchuk, V. L., Ashby, M. N., Rine, J.** (1997). Modulation of Ras and a-Factor Function by Carboxyl-Terminal Proteolysis. *Science* **275**, 1796–1800.
- Boyle, P., Le Su, E., Rochon, A., Shearer, H. L., Murmu, J., Chu, J. Y., Fobert, P. R., Despres, C.** (2009). The BTB/POZ Domain of the Arabidopsis Disease Resistance Protein NPR1 Interacts with the Repression Domain of TGA2 to Negate Its Function. *The Plant cell* **21**, 3700–3713.
- Bracha, K., Lavy, M., Yalovsky, S.** (2002). The Arabidopsis AtSTE24 is a CAAX protease with broad substrate specificity. *The Journal of biological chemistry* **277**, 29856–29864.
- Bracha-Drori, K., Shichrur, K., Lubetzky, T. C., Yalovsky, S.** (2008). Functional analysis of Arabidopsis postprenylation CaaX processing enzymes and their function in subcellular protein targeting. *Plant physiology* **148**, 119–131.
- Bryant, N., Lloyd, J., Sweeney, C., Myouga, F., Meinke, D.** (2011). Identification of Nuclear Genes Encoding Chloroplast-Localized Proteins Required for Embryo Development in Arabidopsis. *Plant physiology* **155**, 1678–1689.
- Cadiñanos, J., Varela, I., Mandel, D. A., Schmidt, W. K., Díaz-Perales, A., López-Otín, C., Freije, J. M. P.** (2003). AtFACE-2, a functional prenylated protein protease from Arabidopsis thaliana related to mammalian Ras-converting enzymes. *The Journal of biological chemistry* **278**, 42091–42097.
- Callis, J.** (2014). The ubiquitination machinery of the ubiquitin system. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists* **12**, 1–35.
- Cazzonelli, C. I., Cuttriss, A. J., Cossetto, S. B., Pye, W., Crisp, P., Whelan, J., Finnegan, E. J., Turnbull, C., Pogson, B. J.** (2009). Regulation of carotenoid composition and shoot branching in Arabidopsis by a chromatin modifying histone methyltransferase, SDG8. *The Plant cell* **21**, 39–53.
- Cesari, S., Bernoux, M., Moncuquet, P., Kroj, T., Dodds, P. N.** (2014). A novel conserved mechanism for plant NLR protein pairs: the "integrated decoy" hypothesis. *Frontiers in plant science* **5**, 1–10.

- Charuvi, D., Kiss, V., Nevo, R., Shimoni, E., Adam, Z., Reich, Z.** (2012). Gain and loss of photosynthetic membranes during plastid differentiation in the shoot apex of *Arabidopsis*. *The Plant cell* **24**, 1143–1157.
- Chen, M., Tao, Y., Lim, J., Shaw, A., Chory, J.** (2005). Regulation of phytochrome B nuclear localization through light-dependent unmasking of nuclear-localization signals. *Current Biology* **15**, 637–642.
- Cheng, Y. T., 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. *PNAS* **108**, 14694–14699.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J. D. G., Felix, G., Boller, T.** (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**, 497–500.
- Cho, S. K., Bae, H., Ryu, M. Y., Wook Yang, S., Kim, W. T.** (2015). PUB22 and PUB23 U-BOX E3 ligases directly ubiquitinate RPN6, a 26S proteasome lid subunit, for subsequent degradation in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and biophysical research communications* **464**, 994–999.
- Cho, S. K., Ryu, M. Y., Song, C., Kwak, J. M., Kim, W. T.** (2008). *Arabidopsis* PUB22 and PUB23 are homologous U-Box E3 ubiquitin ligases that play combinatorial roles in response to drought stress. *The Plant cell* **20**, 1899–1914.
- Chung, E.-H., da Cunha, L., Wu, A.-J., Gao, Z., Cherkis, K., Afzal, A. J., Mackey, D., Dangl, J. L.** (2011). Specific threonine phosphorylation of a host target by two unrelated type III effectors activates a host innate immune receptor in plants. *Cell host & microbe* **9**, 125–136.
- Clough, S. J., Bent, A. F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16**, 735–743.
- Curtis, M. D., Grossniklaus, U.** (2003). A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant physiology* **133**, 462–469.
- Dangl, J. L., Jones, J. D.** (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826–833.

- Deblaere, R., Bytebier, B., Greve, H. de, Deboeck, F., Schell, J., van Montagu, M., Leemans, J.** (1985). Efficient octopine Ti plasmid derived vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants. *Nucleic acids research* **13**, 4777–4788.
- Dietzel, L., Bräutigam, K., Steiner, S., Schöffler, K., Lepetit, B., Grimm, B., Schöttler, M. A., Pfannschmidt, T.** (2011). Photosystem II supercomplex remodeling serves as an entry mechanism for state transitions in Arabidopsis. *The Plant cell* **23**, 2964–2977.
- Disch, E.-M., Tong, M., Kotur, T., Koch, G., Wolf, C.-A., Li, X., Hoth, S.** (2016). Membrane-Associated Ubiquitin Ligase SAUL1 Suppresses Temperature- and Humidity-Dependent Autoimmunity in Arabidopsis. *Molecular plant-microbe interactions* **29**, 69–80.
- 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. *Journal of experimental botany* **62**, 775–785.
- Dubiella, U., Seybold, H., Durian, G., Komander, E., Lassig, R., Witte, C.-P., Schulze, W. X., Romeis, T.** (2013). Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. *PNAS* **110**, 8744–8749.
- Earley, K. W., Haag, J. R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K., Pikaard, C. S.** (2006). Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *The Plant Journal* **45**, 616–629.
- Ellinger, D., Naumann, M., Falter, C., Zwikowics, C., Jamrow, T., Manisseri, C., Somerville, S. C., Voigt, C. A.** (2013). Elevated Early Callose Deposition Results in Complete Penetration Resistance to Powdery Mildew in Arabidopsis. *Plant physiology* **161**, 1433–1444.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Heijne, G. V.** (1999). ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Science* **8**, 978–984.
- Engelhardt, S., Boevink, P. C., Armstrong, M. R., Ramos, M. B., Hein, I., Birch, P. R. J.** (2013). Relocalization of Late Blight Resistance Protein R3a to Endosomal Compartments Is Associated with Effector Recognition and Required for the Immune Response. *The Plant cell* **24**, 5142–5158.

- Fischer, C., Kugler, A., Hoth, S., Dietrich, P.** (2013). An IQ domain mediates the interaction with calmodulin in a plant cyclic nucleotide-gated channel. *Plant & cell physiology* **54**, 573–584.
- Ganguly, D., Crisp, P., Harter, K., Pogson, B. J., Albrecht-Borth, V.** (2015). Genetic suppression of plant development and chloroplast biogenesis via the Snowy Cotyledon 3 and Phytochrome B pathways. *Functional plant biology* **42**, 676–686.
- Gao, Z., Chung, E. H., Eitas, T. K., Dangl, J. L.** (2011). Plant intracellular innate immune receptor Resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*1 (RPM1) is activated at, and functions on, the plasma membrane. *PNAS* **108**, 7619–7624.
- Geldner, N., Déneraud-Tendon, V., Hyman, D. L., Mayer, U., Stierhof, Y.-D., Chory, J.** (2009). Rapid, combinatorial analysis of membrane compartments in intact plants with a multicolor marker set. *The Plant Journal* **59**, 169–178.
- Gietz, R. D., Triggs-Raine, B., Robbins, A., Graham, K. C., Woods, R. A.** (1997). Identification of proteins that interact with a protein of interest: Applications of the yeast two-hybrid system. *Molecular and Cellular Biochemistry* **172**, 67–79.
- Gloggnitzer, J., Akimcheva, S., Srinivasan, A., Kusenda, B., Riehs, N., Stampfl, H., Bautor, J., Dekrout, B., Jonak, C., Jiménez-Gómez, J. M., Parker, J. E., Riha, K.** (2014). Nonsense-mediated mRNA decay modulates immune receptor levels to regulate plant antibacterial defense. *Cell host & microbe* **16**, 376–390.
- Göhring, J., Jacak, J., Barta, A.** (2014). Imaging of endogenous messenger RNA splice variants in living cells reveals nuclear retention of transcripts inaccessible to nonsense-mediated decay in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **26**, 754–764.
- Gómez-Gómez, L., Boller, T.** (2000). FLS2: An LRR Receptor-like Kinase Involved in the Perception of the Bacterial Elicitor Flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* **5**, 1003–1011.
- Goritschnig, S., Zhang, Y., Li, X.** (2007). The ubiquitin pathway is required for innate immunity in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **49**, 540–551.
- Grefen, C., Blatt, M. R.** (2012). A 2in1 cloning system enables ratiometric bimolecular fluorescence complementation (rBiFC). *BioTechniques* **53**, 311–314.

- Han, Y.-J., Song, P.-S., Kim, J.-I.** (2007). Phytochrome-mediated photomorphogenesis in plants. *Journal of Plant Biology* **50**, 230–240.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *Journal of molecular biology* **166**, 557–580.
- Hartwig, B., James, G. V., Konrad, K., Schneeberger, K., Turck, F.** (2012). Fast isogenic mapping-by-sequencing of ethyl methanesulfonate-induced mutant bulks. *Plant physiology* **160**, 591–600.
- He, P., Shan, L., Lin, N.-C., Martin, G. B., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Sheen, J.** (2006). Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in *Arabidopsis* innate immunity. *Cell* **125**, 563–575.
- He, Q., McLellan, H., Boevink, P. C., Sadanandom, A., Xie, C., Birch, P. R. J., Tian, Z.** (2015). U-box E3 ubiquitin ligase PUB17 acts in the nucleus to promote specific immune pathways triggered by *Phytophthora infestans*. *Journal of experimental botany* **66**, 3189–3199.
- Hebsgaard, S., Korning, P. G., Tolstrup, N., Engelbrecht, J., Rouzé, P., Brunak, S.** (1996). Splice site prediction in *Arabidopsis thaliana* pre-mRNA by combining local and global sequence information. *Nucleic acids research* **17**, 3439–3452.
- Heidrich, K., Wirthmueller, L., Tasset, C., Pouzet, C., Deslandes, L., Parker, J. E.** (2011). *Arabidopsis* EDS1 connects pathogen effector recognition to cell compartment-specific immune responses. *Science* **334**, 1401–1404.
- Hou, X., Li, L., Peng, Z., Wei, B., Tang, S., Ding, M., Liu, J., Zhang, F., Zhao, Y., Gu, H., Qu, L.-J.** (2010). A platform of high-density INDEL/CAPS markers for map-based cloning in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **63**, 880–888.
- Hsu, S.-C., F. Belmonte, M., J. Harada, J., Inoue, K.** (2010). Indispensable Roles of Plastids in *Arabidopsis thaliana* Embryogenesis. *Current Genomics* **11**, 338–349.
- Hu, C.-D., Chinenov, Y., Kerppola, T. K.** (2002). Visualization of Interactions among bZIP and Rel Family Proteins in Living Cells Using Bimolecular Fluorescence Complementation. *Molecular Cell* **9**, 789–798.

- Huang, S., Monaghan, J., Zhong, X., Lin, L., Sun, T., Dong, O. X., Li, X. (2014a). HSP90s are required for NLR immune receptor accumulation in Arabidopsis. *The Plant Journal* **79**, 427–439.
- Huang, Y., Minaker, S., Roth, C., Huang, S., Hieter, P., Lipka, V., Wiermer, M., Li, X. (2014b). An E4 ligase facilitates polyubiquitination of plant immune receptor resistance proteins in Arabidopsis. *The Plant cell* **1**, 485–496.
- Hubert, D. A., Tornero, P., Belkhadir, Y., Krishna, P., Takahashi, A., Shirasu, K., Dangl, J. L. (2003). Cytosolic HSP90 associates with and modulates the Arabidopsis RPM1 disease resistance protein. *The EMBO Journal* **22**, 5679–5689.
- Ichimura, K., Casais, C., Peck, S. C., Shinozaki, K., Shirasu, K. (2006). MEKK1 Is Required for MPK4 Activation and Regulates Tissue-specific and Temperature-dependent Cell Death in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 36969–36976.
- Inoue, H., Li, M., Schnell, D. J. (2013). An essential role for chloroplast heat shock protein 90 (Hsp90C) in protein import into chloroplasts. *PNAS* **110**, 3173–3178.
- Ishikawa, K., Yamaguchi, K., Sakamoto, K., Yoshimura, S., Inoue, K., Tsuge, S., Kojima, C., Kawasaki, T. (2014). Bacterial effector modulation of host E3 ligase activity suppresses PAMP-triggered immunity in rice. *Nature communications* **5**, 5430.
- Jambunathan, N., Siani, J. M., McNellis, T. W. (2001). A Humidity-Sensitive Arabidopsis Copine Mutant Exhibits Precocious Cell Death and Increased Disease Resistance. *The Plant cell* **13**, 2225–2240.
- James, G. V., Patel, V., Nordström, K. J. V., Klasen, J. R., Salomé, P. A., Weigel, D., Schneeberger, K. (2013). User guide for mapping-by-sequencing in Arabidopsis. *Genome biology* **14**, R61.
- James, P., Halladay, J., Craig, E. A. (1996). Genomic Libraries and a Host Strain Designed for Highly Efficient Two-Hybrid Selection in Yeast. *Genetics* **144**, 1425–1436.
- Jander, G., Norris, S. R., Rounsley, S. D., Bush, D. F., Levin, I. M., Last, R. L. (2002). Arabidopsis map-based cloning in the post-genome era. *Plant physiology* **129**, 440–450.
- Janjusevic, R., Abramovitch, R. B., Martin, G. B., Stebbins, C. E. (2006). A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase. *Science* **311**, 222–226.

- Jarvis, P., López-Juez, E.** (2013). Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids. *Nature reviews. Molecular cell biology* **14**, 787–802.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., Bevan, M. W.** (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* **13**, 3901–3907.
- Jones, J. D. G., Dangl, J. L.** (2006). The plant immune system. *Nature* **444**, 323–329.
- Kadota, Y., Sklenar, J., Derbyshire, P., Stransfeld, L., Asai, S., Ntoukakis, V., Jones, J. D., Shirasu, K., Menke, F., Jones, A., Zipfel, C.** (2014). Direct regulation of the NADPH oxidase RBOHD by the PRR-associated kinase BIK1 during plant immunity. *Molecular Cell* **54**, 43–55.
- Kargul, J., Barber, J.** (2008). Photosynthetic acclimation: structural reorganisation of light harvesting antenna - role of redox-dependent phosphorylation of major and minor chlorophyll a/b binding proteins. *The FEBS journal* **275**, 1056–1068.
- Karimi, M., Depicker, A., Hilson, P.** (2007). Recombinational cloning with plant gateway vectors. *Plant physiology* **145**, 1144–1154.
- Kazan, K., Lyons, R.** (2014). Intervention of Phytohormone Pathways by Pathogen Effectors. *The Plant cell* **26**, 2285–2309.
- Kim, E., Ambroziak, P., Otto, J. C., Taylor, B., Ashby, M., Shannon, K., Casey, P. J., Young, S. G.** (1999). Disruption of the Mouse Rce1 Gene Results in Defective Ras Processing and Mislocalization of Ras within Cells. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 8383–8390.
- Kim, S. H., Kwon, S. I., Saha, D., Anyanwu, N. C., Gassmann, W.** (2009). Resistance to the *Pseudomonas syringae* Effector HopA1 is governed by the TIR-NBS-LRR Protein RPS6 and is enhanced by mutations in SRFR1. *Plant physiology* **150**, 1723–1732.
- Kloppstech, K.** (1997). Light regulation of photosynthetic genes. *Physiologia Plantarum* **100**, 739–747.
- Koncz, C., Schell, J.** (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular & General Genetics* **204**, 383–396.

- Korbei, B., Luschnig, C.** (2013). Plasma Membrane Protein Ubiquitylation and Degradation as Determinants of Positional Growth in Plants. *Journal of integrative plant biology* **55**, 809–823.
- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., Felix, G.** (2004). The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. *The Plant cell* **16**, 3496–3507.
- Lakatos, L., Szittyá, G., Silhavy, D., Burgyán, J.** (2004). Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *The EMBO Journal* **23**, 876–884.
- Lamesch, P., Berardini, T. Z., Li, D., Swarbreck, D., Wilks, C., Sasidharan, R., Muller, R., Dreher, K., Alexander, D. L., Garcia-Hernandez, M., Karthikeyan, A. S., Lee, C. H., Nelson, W. D., Ploetz, L., Singh, S., Wensel, A., Huala, E.** (2011). The Arabidopsis Information Resource (TAIR). Improved gene annotation and new tools. *Nucleic acids research* **40**, D1202-D1210.
- Le Roux, C., Huet, G., Jauneau, A., Camborde, L., Trémousaygue, D., Kraut, A., Zhou, B., Levaillant, M., Adachi, H., Yoshioka, H., Raffaele, S., Berthomé, R., Couté, Y., Parker, J. E., Deslandes, L.** (2015). A receptor pair with an integrated decoy converts pathogen disabling of transcription factors to immunity. *Cell* **161**, 1074–1088.
- Li, X., Clarke, J. D., Zhang, Y., Dong, X.** (2001). Activation of an EDS1-Mediated R -Gene Pathway in the *snc1* Mutant Leads to Constitutive, NPR1-Independent Pathogen Resistance. *Molecular plant-microbe interactions* **14**, 1131–1139.
- Li, X., Kapos, P., Zhang, Y.** (2015). NLRs in plants. *Current opinion in immunology* **32**, 114–121.
- Liu, J., Elmore, J. M., Fuglsang, A. T., Palmgren, M. G., Staskawicz, B. J., Coaker, G.** (2009). RIN4 functions with plasma membrane H⁺-ATPases to regulate stomatal apertures during pathogen attack. *PLoS biology* **7**, e1000139.
- Liu, J., Elmore, J. M., Lin, Z.-J. D., Coaker, G.** (2011). A receptor-like cytoplasmic kinase phosphorylates the host target RIN4, leading to the activation of a plant innate immune receptor. *Cell host & microbe* **9**, 137–146.
- Liu, X., Yu, F., Rodermel, S.** (2010). Arabidopsis chloroplast FtsH, var2 and suppressors of var2 leaf variegation: a review. *Journal of integrative plant biology* **52**, 750–761.

- Lu, D., Lin, W., Gao, X., Wu, S., Cheng, C., Avila, J., Heese, A., Devarenne, T. P., He, P., Shan, L.** (2011a). Direct ubiquitination of pattern recognition receptor FLS2 attenuates plant innate immunity. *Science* **332**, 1439–1442.
- Lu, D., Wu, S., Gao, X., Zhang, Y., Shan, L., He, P.** (2010). A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *PNAS* **107**, 496–501.
- Lu, Y., Savage, L. J., Larson, M. D., Wilkerson, C. G., Last, R. L.** (2011b). Chloroplast 2010. A Database for Large-Scale Phenotypic Screening of Arabidopsis Mutants. *Plant physiology* **155**, 1589–1600.
- Lukowitz, W., Gillmor, C. S., Scheible, W.-R.** (2000). Positional Cloning in Arabidopsis. Why It Feels Good to Have a Genome Initiative Working for You. *Plant physiology* **123**, 795–806.
- Macho, A. P., Zipfel, C.** (2014). Plant PRRs and the Activation of Innate Immune Signaling. *Molecular Cell* **54**, 263–272.
- Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Dangl, J. L.** (2003). Arabidopsis RIN4 Is a Target of the Type III Virulence Effector AvrRpt2 and Modulates RPS2-Mediated Resistance. *Cell* **112**, 379–389.
- Mackey, D., Holt, B. F., Wiig, A., Dangl, J. L.** (2002). RIN4 Interacts with *Pseudomonas syringae* Type III Effector Molecules and Is Required for RPM1-Mediated Resistance in Arabidopsis. *Cell* **108**, 743–754.
- Mang, H.-G., Qian, W., Zhu, Y., Qian, J., Kang, H.-G., Klessig, D. F., Hua, J.** (2012). Abscisic Acid Deficiency Antagonizes High-Temperature Inhibition of Disease Resistance through Enhancing Nuclear Accumulation of Resistance Proteins SNC1 and RPS4 in Arabidopsis. *The Plant cell* **24**, 1271–1284.
- Mansfield, S. G., Briarty, L. G.** (1991). Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. II. The developing embryo. *Canadian Journal of Botany* **69**, 461–476.

- Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M. K., Gonzales, N. R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L. Y., Geer, R. C., He, J., Gwadz, M., Hurwitz, D. I., Lanczycki, C. J., Lu, F., Marchler, G. H., Song, J. S., Thanki, N., Wang, Z., Yamashita, R. A., Zhang, D., Zheng, C., Bryant, S. H.** (2015). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic acids research* **43**, D222-D226.
- Martinez-Zapater, J. M.** (1993). Genetic analysis of variegated mutants in *Arabidopsis*. *Journal of Heredity* **83**, 138–140.
- Martins, S., Dohmann, E. M. N., Cayrel, A., Johnson, A., Fischer, W., Pojer, F., Satiat-Jeunemaître, B., Jaillais, Y., Chory, J., Geldner, N., Vert, G.** (2015). Internalization and vacuolar targeting of the brassinosteroid hormone receptor BRI1 are regulated by ubiquitination. *Nature communications* **6**, ncomms7151.
- Meinke, D., Muralla, R., Sweeney, C., Dickerman, A.** (2008). Identifying essential genes in *Arabidopsis thaliana*. *Trends in Plant Science* **13**, 483–491.
- Meng, X., Zhang, S.** (2013). MAPK Cascades in Plant Disease Resistance Signaling. *Annual review of phytopathology* **51**, 245–266.
- Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S. Pesole, G.** (2002). Untranslated regions of mRNAs. *Genome biology* **3**, 1–10.
- Monaghan, J., Matschi, S., Romeis, T., Zipfel, C.** (2015). The calcium-dependent protein kinase CPK28 negatively regulates the BIK1-mediated PAMP-induced calcium burst. *Plant signaling & behavior* **10**, e1018497.
- Monaghan, J., Matschi, S., Shorinola, O., Rovenich, H., Matei, A., Segonzac, C., Malinovsky, F. G., Rathjen, J. P., MacLean, D., Romeis, T., Zipfel, C.** (2014). The Calcium-Dependent Protein Kinase CPK28 Buffers Plant Immunity and Regulates BIK1 Turnover. *Cell host & microbe* **16**, 605–615.
- Mou, Z., Fan, W., Dong, X.** (2003). Inducers of Plant Systemic Acquired Resistance Regulate NPR1 Function through Redox Changes. *Cell* **113**, 935–944.
- Mucyn, T. S., Clemente, A., Andriotis, V. M. E., Balmuth, A. L., Oldroyd, G. E. D., Staskawicz, B. J., Rathjen, J. P.** (2006). The tomato NBARC-LRR protein Prf interacts with Pto kinase in vivo to regulate specific plant immunity. *The Plant cell* **18**, 2792–2806.

- Mudgett, M. B.** (2005). New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annual review of plant biology* **56**, 509–531.
- Mudgil, Y., Shiu, S.-H., Stone, S. L., Salt, J. N., Goring, D. R.** (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.
- Mullis, K. B., Faloona, F. A.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**, 335–350.
- Muranaka, A., Watanabe, S., Sakamoto, A., Shimada, H.** (2012). Arabidopsis cotyledon chloroplast biogenesis factor CYO1 uses glutathione as an electron donor and interacts with PSI (A1 and A2) and PSII (CP43 and CP47) subunits. *Journal of plant physiology* **169**, 1212–1215.
- 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.
- Nelson, B. K., Cai, X., Nebenführ, A.** (2007). A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *The Plant Journal* **51**, 1126–1136.
- Ni, X., Tian, Z., Liu, J., Song, B., Li, J., Shi, X., Xie, C.** (2010). StPUB17, a novel potato UND/PUB/ARM repeat type gene, is associated with late blight resistance and NaCl stress. *Plant Science* **178**, 158–169.
- Obayashi, T., Kinoshita, K.** (2010). Coexpression landscape in ATTED-II. Usage of gene list and gene network for various types of pathways. *Journal of plant research* **123**, 311–319.
- Obayashi, T., Kinoshita, K., Nakai, K., Shibaoka, M., Hayashi, S., Saeki, M., Shibata, D., Saito, K., Ohta, H.** (2007). ATTED-II. A database of co-expressed genes and cis elements for identifying co-regulated gene groups in Arabidopsis. *Nucleic acids research* **35**, D863–D869.
- Oliveros, J.** (2007-2015). VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn diagrams. BioinfoGP, CNB-CSIC, <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.

- Olvera-Carrillo, Y., van Bel, M., van Hautegeem, T., Fendrych, M., van Durme, M., Huysmans, M., Šimášková, M., Buscaill, P., Rivas, S., Coll, N. S., Maere, S., Coppens, F., Nowack, M. K.** (2015). A conserved core of PCD indicator genes discriminates developmentally and environmentally induced programmed cell death in plants. *Plant physiology* **169**, 2684–2699.
- Pei, J., Grishin, N. V.** (2001). Type II CAAX prenyl endopeptidases belong to a novel superfamily of putative membrane-bound metalloproteases. *Trends in Biochemical Sciences* **26**, 275–277.
- Pesaresi, P., Hertle, A., Pribil, M., Kleine, T., Wagner, R., Strissel, H., Ihnatowicz, A., Bonardi, V., Scharfenberg, M., Schneider, A., Pfannschmidt, T., Leister, D.** (2009). Arabidopsis STN7 kinase provides a link between short- and long-term photosynthetic acclimation. *The Plant cell* **21**, 2402–2423.
- Pogson, B. J., Ganguly, D., Albrecht-Borth, V.** (2015). Insights into chloroplast biogenesis and development. *Biochimica et biophysica acta* **1847**, 1017–1024.
- Pribil, M., Labs, M., Leister, D.** (2014). Structure and dynamics of thylakoids in land plants. *Journal of experimental botany* **65**, 1955–1972.
- Pribil, M., Pesaresi, P., Hertle, A., Barbato, R., Leister, D.** (2010). Role of plastid protein phosphatase TAP38 in LHCII dephosphorylation and thylakoid electron flow. *PLoS biology* **8**, 1–12.
- Qi, D., DeYoung, B. J., Innes, R. W.** (2012). Structure-Function Analysis of the Coiled-Coil and Leucine-Rich Repeat Domains of the RPS5 Disease Resistance Protein. *Plant physiology* **158**, 1819–1832.
- Qi, D., Innes, R. W.** (2013). Recent Advances in Plant NLR Structure, Function, Localization, and Signaling. *Frontiers in immunology* **4**, 1–10.
- 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. *The Plant Journal* **59**, 39–51.

- Ranf, S., Gisch, N., Schäffer, M., Illig, T., Westphal, L., Knirel, Y. A., Sánchez-Carballo, P. M., Zähringer, U., Hückelhoven, R., Lee, J., Scheel, D.** (2015). A lectin S-domain receptor kinase mediates lipopolysaccharide sensing in *Arabidopsis thaliana*. *Nature immunology* **16**, 426–433.
- Robatzek, S., Chinchilla, D., Boller, T.** (2006). Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in *Arabidopsis*. *Genes & development* **20**, 537–542.
- Rochon, A., Boyle, P., Wignes, T., Fobert, P. R., Despres, C.** (2006). The Coactivator Function of *Arabidopsis* NPR1 Requires the Core of Its BTB/POZ Domain and the Oxidation of C-Terminal Cysteines. *The Plant cell* **18**, 3670–3685.
- Ruban, A. V., Johnson, M. P., Duffy, C. D. P.** (2012). The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna. *Biochimica et biophysica acta* **1817**, 167–181.
- Ruppel, N. J., Hangarter, R. P.** (2007). Mutations in a plastid-localized elongation factor G alter early stages of plastid development in *Arabidopsis thaliana*. *BMC plant biology* **7**, 1–10.
- Ruuska, S. A., Schwender, J., Ohlrogge, B.** (2004). The Capacity of Green Oilseeds to Utilize Photosynthesis to Drive Biosynthetic Processes. *Plant physiology* **136**, 2700–2709.
- Sakamoto, W., Miura, E., Kaji, Y., Okuno, T., Nishizono, M., Ogura, T.** (2004). Allelic characterization of the leaf-variegated mutation *var2* identifies the conserved amino acid residues of FtsH that are important for ATP hydrolysis and proteolysis. *Plant molecular biology* **56**, 705–716.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press **2. Auflage**.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* **74**, 5463–5467.
- Sarris, P. F., Duxbury, Z., Huh, S. U., Ma, Y., Segonzac, C., Sklenar, J., Derbyshire, P., Cevik, V., Rallapalli, G., Saucet, S. B., Wirthmueller, L., Menke, F. L. H., Sohn, K. H., Jones, J. D. G.** (2015). A Plant Immune Receptor Detects Pathogen Effectors that Target WRKY Transcription Factors. *Cell* **161**, 1089–1100.

- Savage, L. J., Imre, K. M., Hall, D. A., Last, R. L.** (2013). Analysis of essential Arabidopsis nuclear genes encoding plastid-targeted proteins. *PLoS one* **8**, e73291.
- Scheibe, R.** (2004). Malate valves to balance cellular energy supply. *Physiologia Plantarum* **120**, 21–26.
- Schneeberger, K., Ossowski, S., Lanz, C., Juul, T., Petersen, A. H., Nielsen, K. L., Jørgensen, J.-E., Weigel, D., Andersen, S. U.** (2009). SHOREmap: simultaneous mapping and mutation identification by deep sequencing. *Nature methods* **6**, 550–551.
- Shapiguzov, A., Ingelsson, B., Samol, I., Andres, C., Kessler, F., Rochaix, J.-D., Vener, A. V., Goldschmidt-Clermont, M.** (2010). The PPH1 phosphatase is specifically involved in LHCII dephosphorylation and state transitions in Arabidopsis. *PNAS* **107**, 4782–4787.
- Sheng, P., Tan, J., Jin, M., Wu, F., Zhou, K., Ma, W., Heng, Y., Wang, J., Guo, X., Zhang, X., Cheng, Z., Liu, L., Wang, C., Liu, X., Wan, J.** (2014). Albino midrib 1, encoding a putative potassium efflux antiporter, affects chloroplast development and drought tolerance in rice. *Plant cell reports* **9**, 1581–1594.
- Spoel, S. H., Dong, X.** (2012). How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature reviews. Immunology* **12**, 89–100.
- Stangeland, B., Salehian, Z.** (2002). An improved clearing method for GUS assay in Arabidopsis endosperm and seeds. *Plant Molecular Biology Reporter* **20**, 107–114.
- Stegmann, M., Anderson, R. G., Ichimura, K., Pecenkova, T., Reuter, P., Žárský, V., McDowell, J. M., Shirasu, K., Trujillo, M.** (2012). The ubiquitin ligase PUB22 targets a subunit of the exocyst complex required for PAMP-triggered responses in Arabidopsis. *The Plant cell* **24**, 4703–4716.
- Suarez-Rodriguez, M. C., Adams-Phillips, L., Liu, Y., Wang, H., Su, S.-H., Jester, P. J., Zhang, S., Bent, A. F., Krysan, P. J.** (2007). MEKK1 Is Required for flg22-Induced MPK4 Activation in Arabidopsis Plants. *Plant physiology* **143**, 661–669.
- Sun, Y., Li, L., Macho, A. P., Han, Z., Hu, Z., Zipfel, C., Zhou, J.-M., Chai, J.** (2013). Structural basis for flg22-induced activation of the Arabidopsis FLS2-BAK1 immune complex. *Science* **342**, 624–628.

- Tada, Y., Spoel, S. H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., Zuo, J., Dong, X.** (2008). Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* **321**, 952–956.
- Takahashi, A., Casais, C., Ichimura, K., Shirasu, K.** (2003). HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in Arabidopsis. *PNAS* **100**, 11777–11782.
- Takemoto, D., Rafiqi, M., Hurley, U., Lawrence, G. J., Bernoux, M., Hardham, A. R., Ellis, J. G., Dodds, P. N., Jones, D. A.** (2012). N-Terminal Motifs in Some Plant Disease Resistance Proteins Function in Membrane Attachment and Contribute to Disease Resistance. *Molecular plant-microbe interactions* **25**, 379–392.
- Tan, X., Zhang, D., Wintgens, C., Willingmann, P., Adam, G., Heinze, C.** (2012). A Comparative Testing of Cucumber mosaic virus (CMV)-Based Constructs to Generate Virus Resistant Plants. *American Journal of Plant Sciences* **3**, 461–472.
- Tanz, S. K., Kilian, J., Johnsson, C., Apel, K., Small, I., Harter, K., Wanke, D., Pogson, B., Albrecht, V.** (2012). The SCO2 protein disulphide isomerase is required for thylakoid biogenesis and interacts with LHCB1 chlorophyll a/b binding proteins which affects chlorophyll biosynthesis in Arabidopsis seedlings. *The Plant Journal* **69**, 743–754.
- Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J. T., Mesirov, J. P.** (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in bioinformatics* **14**, 178–192.
- Tong, M., Kotur, T., Liang, W., Li, Y., Vogelmann, K., Kleine, T., Leister, D., Zhang, Y., Hoth, S., Li, X.** (2016). E3 ligase SAUL1 serves as a positive immune regulator and its homeostasis is monitored by TNL receptor SUSA1. *New Phytologist* **eingereicht**.
- Trueblood, C. E., Boyartchuk, V. L., Picologlou, E. A., Rozema, D., Poulter, C. D., Rine, J.** (2000). The CaaX Proteases, Afc1p and Rce1p, Have Overlapping but Distinct Substrate Specificities. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 4381–4392.
- Trujillo, M., Ichimura, K., Casais, C., Shirasu, K.** (2008). Negative regulation of PAMP-triggered immunity by an E3 ubiquitin ligase triplet in Arabidopsis. *Current Biology* **18**, 1396–1401.

- Ueda, H., Yamaguchi, Y., Sano, H.** (2006). Direct interaction between the tobacco mosaic virus helicase domain and the ATP-bound resistance protein, N factor during the hypersensitive response in tobacco plants. *Plant molecular biology* **61**, 31–45.
- van der Hoorn, R., Kamoun, S.** (2008). From Guard to Decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *The Plant cell* **20**, 2009–2017.
- van Doorn, W. G., Beers, E. P., Dangl, J. L., Franklin-Tong, V. E., Gallois, P., Hara-Nishimura, I., Jones, A. M., Kawai-Yamada, M., Lam, E., Mundy, J., Mur, L. A. J., Petersen, M., Smertenko, A., Taliansky, M., van Breusegem, F., Wolpert, T., Woltering, E., Zhivotovsky, B., Bozhkov, P. V.** (2011). Morphological classification of plant cell deaths. *Cell death and differentiation* **18**, 1241–1246.
- Vogelmann, K., Drechsel, G., Bergler, J., Subert, C., Philippar, K., Soll, J., Engelmann, J. C., Engelsdorf, T., Voll, L. M., Hoth, S.** (2012). Early senescence and cell death in Arabidopsis saul1 mutants involves the PAD4-dependent salicylic acid pathway. *Plant physiology* **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. *Frontiers in plant science* **5**, doi: 10.3389/fpls.2014.00037.
- Wagner, S., Stuttmann, J., Rietz, S., Guerois, R., Brunstein, E., Bautor, J., Niefind, K., Parker, J. E.** (2013). Structural basis for signaling by exclusive EDS1 heteromeric complexes with SAG101 or PAD4 in plant innate immunity. *Cell host & microbe* **14**, 619–630.
- Wang, Y., Bao, Z., Zhu, Y., Hua, J.** (2009). Analysis of temperature modulation of plant defense against biotrophic microbes. *Molecular plant-microbe interactions* **22**, 498–506.
- Wang, Y., Zhang, Y., Wang, Z., Zhang, X., Yang, S.** (2013). A missense mutation in CHS1, a TIR-NB protein, induces chilling sensitivity in Arabidopsis. *The Plant Journal* **75**, 553–565.
- Wang, Z., Meng, P., Zhang, X., Ren, D., Yang, S.** (2011). BON1 interacts with the protein kinases BIR1 and BAK1 in modulation of temperature-dependent plant growth and cell death in Arabidopsis. *The Plant Journal* **67**, 1081–1093.

- Williams, S. J., Sohn, K. H., Wan, L., Bernoux, M., Sarris, P. F., Segonzac, C., Ve, T., Ma, Y., Saucet, S. B., Ericsson, D. J., Casey, L. W., Lonhienne, T., Winzor, D. J., Zhang, X., Coerdet, A., Parker, J. E., Dodds, P. N., Kobe, B., Jones, J. D. G.** (2014). Structural basis for assembly and function of a heterodimeric plant immune receptor. *Science* **344**, 299–303.
- Williams, S. J., Sornaraj, P., deCourcy-Ireland, E., Menz, R. I., Kobe, B., Ellis, J. G., Dodds, P. N., Anderson, P. A.** (2011). An autoactive mutant of the M flax rust resistance protein has a preference for binding ATP, whereas wild-type M protein binds ADP. *Molecular plant-microbe interactions* **24**, 897–906.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V., Provart, N. J., Baxter, I.** (2007). An “Electronic Fluorescent Pictograph” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PloS one* **2**, e718.
- Wirthmueller, L., Zhang, Y., Jones, J. D., Parker, J. E.** (2007). Nuclear Accumulation of the Arabidopsis Immune Receptor RPS4 Is Necessary for Triggering EDS1-Dependent Defense. *Current Biology* **17**, 2023–2029.
- Xia, S., Cheng, Y. T., Huang, S., Win, J., Soards, A., Jinn, T.-L., Jones, J. D. G., Kamoun, S., Chen, S., Zhang, Y., Li, X.** (2013). Regulation of transcription of nucleotide-binding leucine-rich repeat-encoding genes SNC1 and RPP4 via H3K4 trimethylation. *Plant physiology* **162**, 1694–1705.
- Xiang, T., Zong, N., Zou, Y., Wu, Y., Zhang, J., Xing, W., Li, Y., Tang, X., Zhu, L., Chai, J., Zhou, J.-M.** (2008). *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Current Biology* **18**, 74–80.
- Xu, F., Xu, S., Wiermer, M., Zhang, Y., Li, X.** (2012). The cyclin L homolog MOS12 and the MOS4-associated complex are required for the proper splicing of plant resistance genes. *The Plant Journal* **70**, 916–928.
- Xu, F., Zhu, C., Cevik, V., Johnson, K., Liu, Y., Sohn, K., Jones, J. D., Holub, E. B., Li, X.** (2015). Autoimmunity conferred by chs3-2D relies on CSA1, its adjacent TNL-encoding neighbour. *Scientific reports* **5**, 1–7.
- Yang, S., Hua, J.** (2004). A Haplotype-Specific Resistance Gene Regulated by BONZA11 Mediates Temperature-Dependent Growth Control in Arabidopsis. *The Plant cell* **16**, 1060–1071.

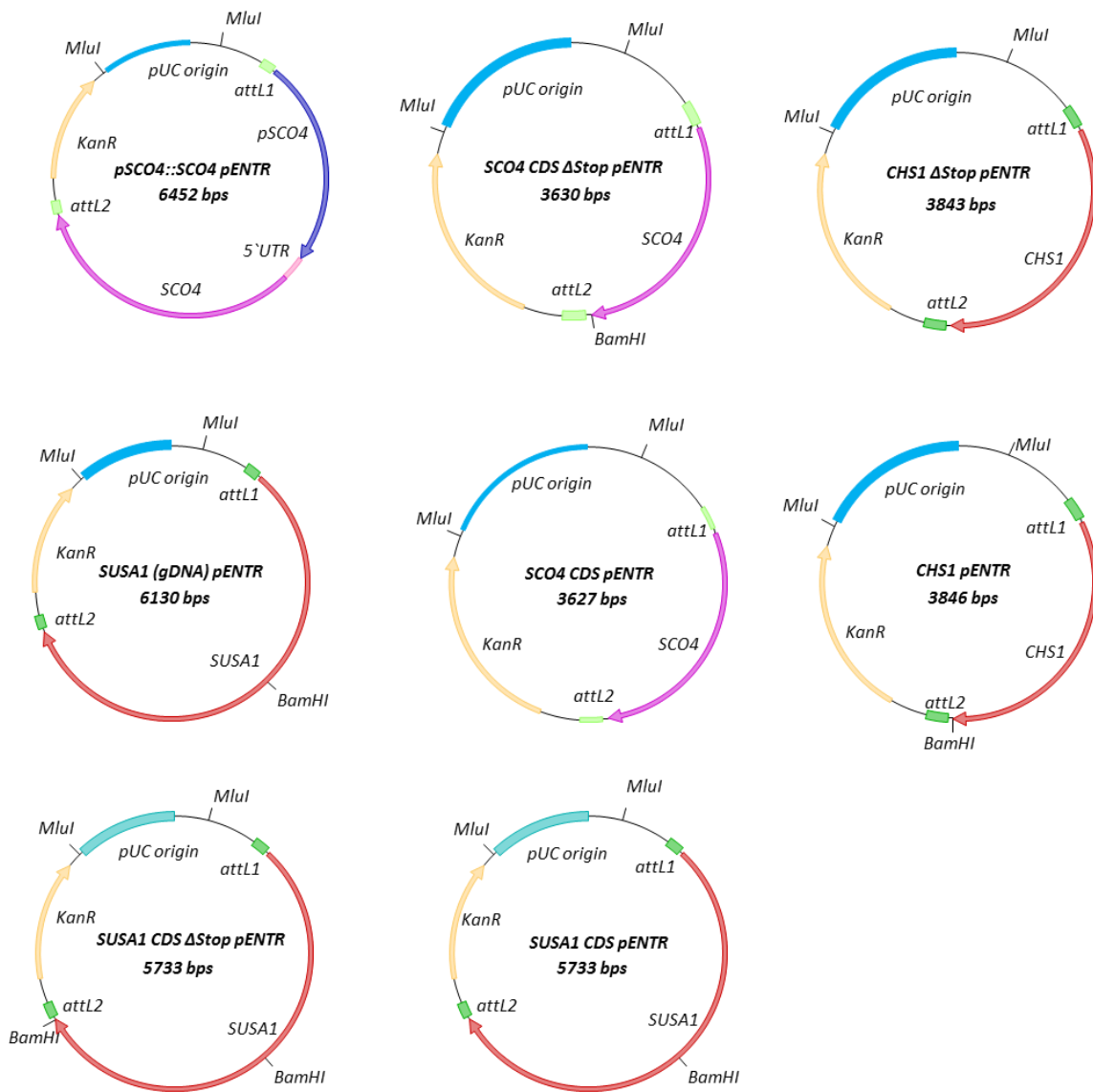
- Zbierzak, A. M., Porfirova, S., Griebel, T., Melzer, M., Parker, J. E., Dörmann, P.** (2013). A TIR-NBS protein encoded by Arabidopsis Chilling Sensitive 1 (CHS1) limits chloroplast damage and cell death at low temperature. *The Plant Journal* **75**, 539–552.
- Zhang, X.-C., Gassmann, W.** (2003). RPS4-Mediated Disease Resistance Requires the Combined Presence of RPS4 Transcripts with Full-Length and Truncated Open Reading Frames. *The Plant cell* **15**, 2333–2342.
- Zhang, X.-C., Gassmann, W.** (2007). Alternative splicing and mRNA levels of the disease resistance gene RPS4 are induced during defense responses. *Plant physiology* **145**, 1577–1587.
- Zhang, Y., Goritschnig, S., Dong, X., Li, X.** (2003). A gain-of-function mutation in a plant disease resistance gene leads to constitutive activation of downstream signal transduction pathways in suppressor of npr1-1, constitutive 1. *The Plant cell* **15**, 2636–2646.
- Zhao, C., Xu, J., Chen, Y., Mao, C., Zhang, S., Bai, Y., Jiang, D., Wu, P.** (2012). Molecular cloning and characterization of OsCHR4, a rice chromatin-remodeling factor required for early chloroplast development in adaxial mesophyll. *Planta* **4**, 1165–1176.
- Zhao, T., Rui, L., Li, J., Nishimura, M. T., Vogel, J. P., Liu, N., Liu, S., Zhao, Y., Dangl, J. L., Tang, D.** (2015). A truncated NLR protein, TIR-NBS2, is required for activated defense responses in the *exo70B1* mutant. *PLoS genetics* **11**, e1004945.
- Zhu, Y., Qian, W., Hua, J., Ding, S.-W.** (2010). Temperature Modulates Plant Defense Responses through NB-LRR Proteins. *PLoS pathogens* **6**, e1000844.
- Zipfel, C.** (2014). Plant pattern-recognition receptors. *Trend in Immunology* **35**, 345–351.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J. D. G., Boller, T., Felix, G.** (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* **125**, 749–760.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E. J., Jones, J. D. G., Felix, G., Boller, T.** (2004). Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* **428**, 764–767.

Zou, B., Yang, D.-L., Shi, Z., Dong, H., Hua, J. (2014). Monoubiquitination of histone 2B at the disease resistance gene locus regulates its expression and impacts immune responses in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **165**, 309–318.

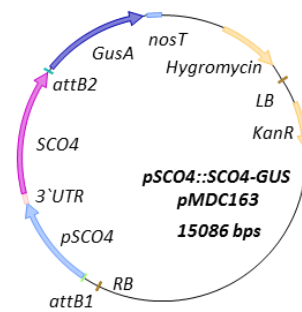
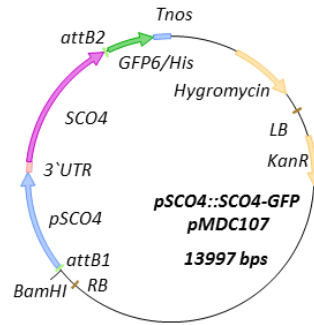
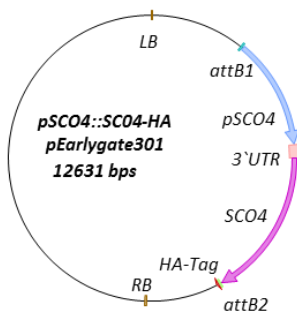
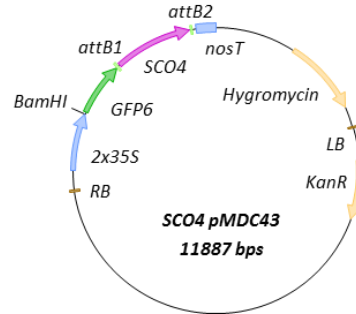
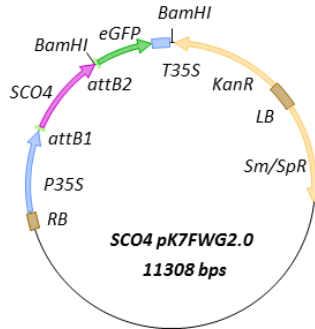
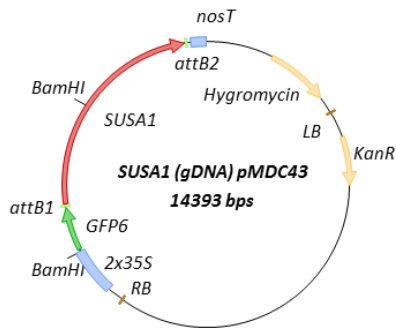
7 Anhang

7.1 Vektoren

7.1.1 Hergestellte Ausgangsvektoren pENTR™/D-TOPO®



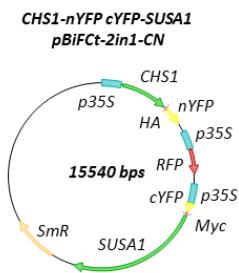
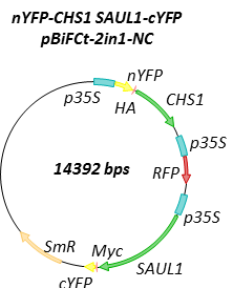
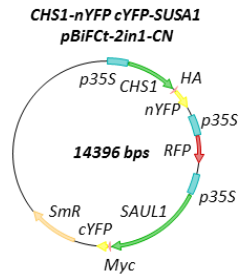
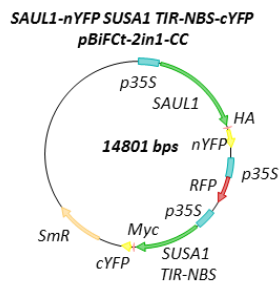
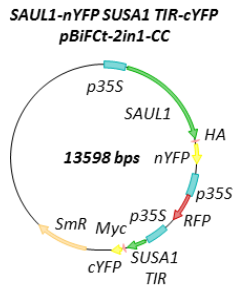
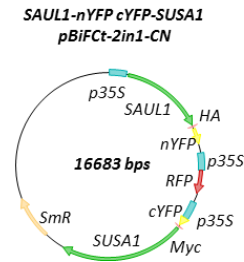
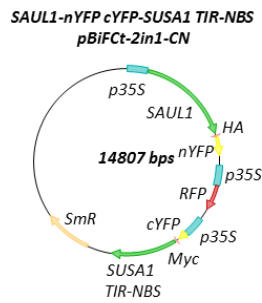
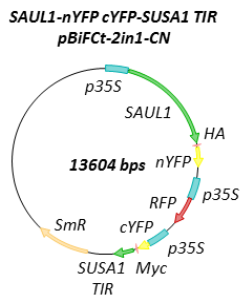
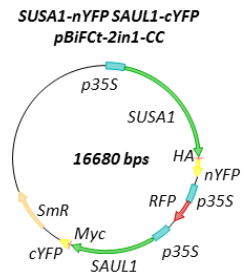
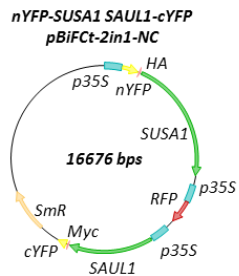
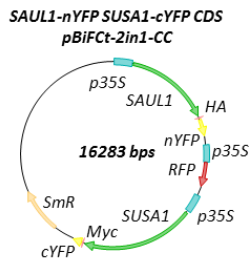
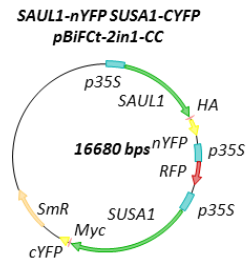
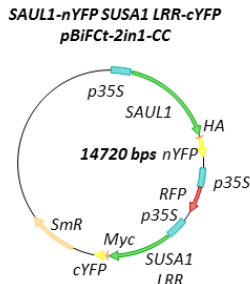
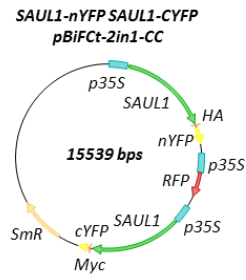
7.1.2 Hergestellte Zielvektoren



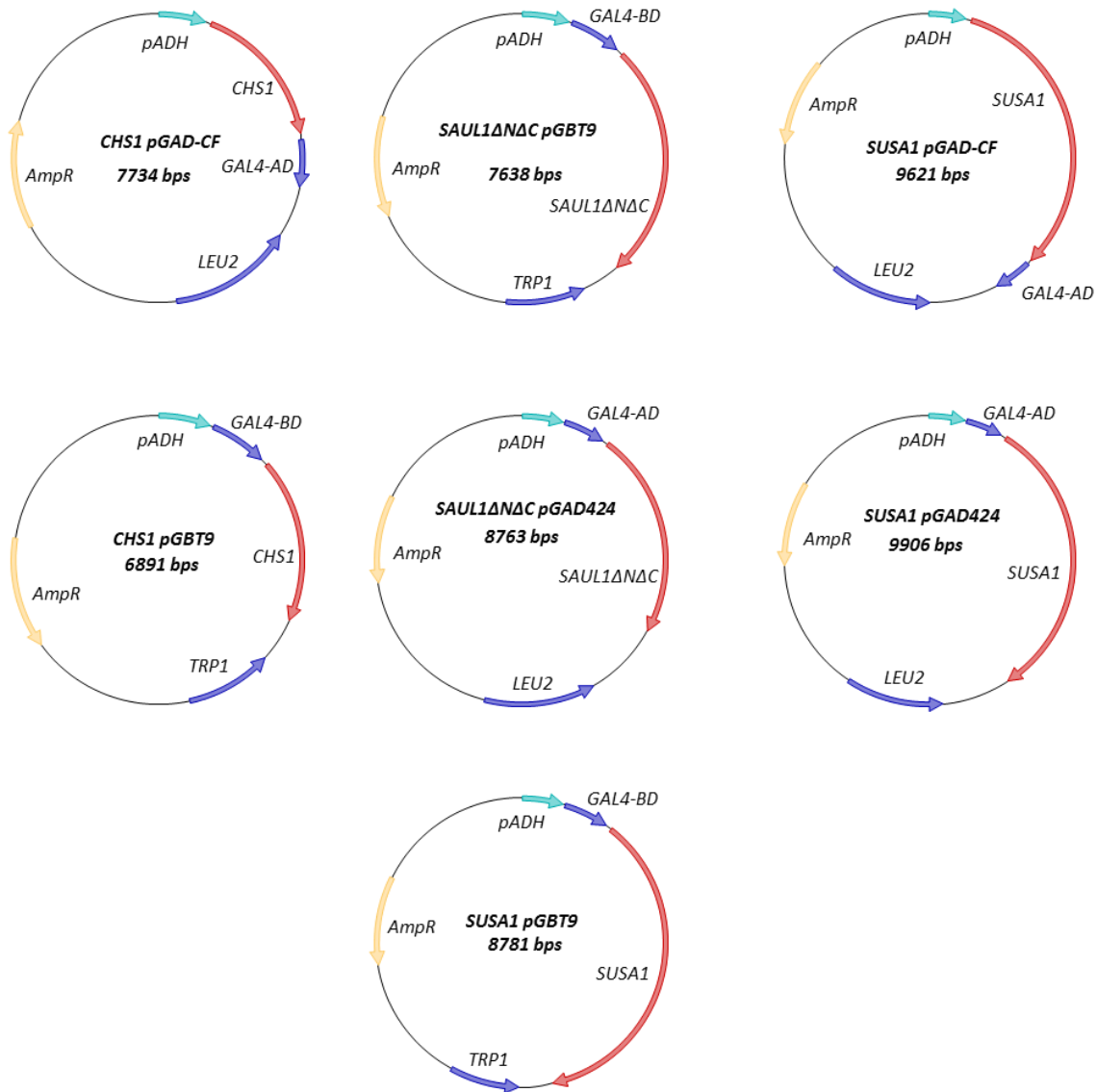
7.1.3 Hergestellte Ausgangsvektoren pDONR221™



7.1.4 Hergestellte BiFC-Konstrukte pBiFCt-2in1



7.1.5 Hergestellte Y2H-Vektoren



Der Vektor *SAUL1ΔNΔC pGBT9* wurde von Johannes Bergler (FAU Erlangen und Universität Hamburg, AG Prof. Dr. Hoth) zur Verfügung gestellt. Die Vektoren *SUSAN1 pGAD424* und *SUSAN1 pGAD-CF* wurden von Jara Oppenheimer im Rahmen ihrer Masterarbeit (Universität Hamburg, AG Prof. Dr. Hoth) hergestellt.

7.2 Aminosäure-Mix für Hefemedien

Tabelle 7-1: Auflistung der Zusammensetzung des Aminosäure-Mix für die Hefe-Selektionsmedien

Aminosäure (AS) oder Base	AS-Mix -L-W [g]	AS-Mix -L-W-H [g]
Adenin-Hemisulfat	2,0	2,0
p-Aminonezolsäure	0,2	0,2
Argenin	2,0	2,0
Histidin	2,0	-
Isoleucin	2,0	2,0
Myo-Inositol	2,0	2,0
Leucin	-	-
Lysin	2,0	2,0
Methionin	2,0	2,0
Phenylalanin	3,0	3,0
Serin	2,0	2,0
Threonin	2,0	2,0
Tryptophan	-	-
Tyrosin	2,0	2,0
Uracil	1,2	1,2
Valin	9,0	9,0

7.3 Oligonukleotide

Tabelle 7-2: Oligonukleotide für die Genotypisierung diverser T-DNA Insertionslinien

ID	Name	Sequenz [5' --> 3']	Verwendungszweck
ED30	SAUL1_LP	TTTCCCCATTTCATGAGTGAAG	Genotypisierung
ED29	SAUL1_RP	TGAGGCCAATCAAATGATTTC	Genotypisierung
TK264	susa1-14_LP (ML093LP) (At1g17600g+2448s)	ACGCAAAAAGTGAAAATGGATG	Genotypisierung

ANHANG

Tabelle 7-2: Oligonukleotide für die Genotypisierung diverser T-DNA Insertionslinien (Fortsetzung)

TK265	susa1-14_RP (ML093RP) (At1g17600g+3684as)	CAAAATGCGAGTGGAAAAGAG	Genotypisierung
TK63	sco4-2_LP (ML015LP) (At5g60750g+2542as)	TTGGCCTTAATTGAGCTCAAG	Genotypisierung
TK64	SCO4-2_RP (ML015RP) (At5g60750g+1452s)	TTCAGGTAATGCTTCTGTGGG	Genotypisierung
TK68	LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	SALK T-DNA Insertion/ Genotypisierung
TK135	SALK RB	CCAAACGTAAAACGGCTTGT	SALK T-DNA Insertion/ Genotypisierung

Tabelle 7-3: verwendete Oligonukleotide für qPCR, Kolonie-PCR und Sequenzierung

ID	Name	Sequenz [5' --> 3']	Verwendungszweck
TK148	At5g60750g+75s	TAGGGTTCCTTGTCGAACTG	qPCR
TK149	At5g60750g+545as	GATTCTCGGGAGCAGAATCTTC	qPCR
TK234	At5g60750g+2068s	ACCTTCAATGCTGTTGCATAGC	qPCR
MPP309	Ubi rev (At4g05320)	AAAGAGATAACAGGAACGGAAACATAGT	qPCR
MPP310	Ubi fw (At4g05320)	GGCCTTGATAATCCCTGATGAATAAG	qPCR
-	GUS2 (rev)	TCGTGCACCATCAGCACGTTA	GUS/Kolonie-PCR/ Genotypisierung (DNA-Cloning Service)
TK145	GFPR	GAATTGGGACAACCTCCAGTGAA	eGFP/Kolonie-PCR
TK158	HA-Tag rev	GCGTAATCTGGAACATCGTATG	HA-Tag/Kolonie-PCR/Ge notypisierung/ qPCR
JB168	GFP6+601f	CTGTCCACACAATCTGCCCTTTCG	Genotypisierung
TK268	At1g17600g+2244rRT	GCTTGAGATGCTTAGATCCC	Genotypisierung
TK247	At1g17600g-738f	GCAGCTATGTTGTCCAGTTTG	Sequenzierung von <i>AtSUSA1</i>
TK248	At1g17600g+3958r	ATTAGCAGTACCGCCACCTTC	Sequenzierung von <i>AtSUSA1</i>

ANHANG

Tabelle 7-4: Verwendete BiFC-Oligonukleotide und jeweilige Sequenzierungsprimer

ID [TK]	Name	Sequenz [5' --> 3']	Verwendungszweck
253	B1 SUS A1 fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGGTGCCTCCTCTGCAC	BiFC SUS A1 Volllänge
254	B3 SUS A1 fw	GGGGACAAC TTTGTATAATAAAGTTGTC ATGGTGCCTCCTCTGCAC	BiFC SUS A1 Volllänge
255	B4 SUS A1oS rev	GGGGACAAC TTTGTATAGAAAAGTTGGGTG CTTGAAAACACGCAGGAGTA	BiFC SUS A1 Volllänge
256	B2 SUS A1oS rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT CTTGAAAACACGCAGGAGTA	BiFC SUS A1 Volllänge
275	B4 SUS A1mS rev	GGGGACAAC TTTGTATAGAAAAGTTGGGTG TCACTTGAAAACACGCAGGAG	BiFC SUS A1 Volllänge
276	B2 SUS A1mS rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT TCACTTGAAAACACGCAGGAG	BiFC SUS A1 Volllänge
299	B4 SUS A1c+462oSr	GGGGACAAC TTTGTATAGAAAAGTTGGGTG GTGGCTTGAAACCACGCC	BiFC SUS A1 TIR
300	B4 SUS A1c+462mSr	GGGGACAAC TTTGTATAGAAAAGTTGGGTG TCAGTGGCTTGAAACCACGCC	BiFC SUS A1 TIR
301	B4 SUS A1c+1566oSr	GGGGACAAC TTTGTATAGAAAAGTTGGGTG GTCTCTGAAAGCCAGGGCA	BiFC SUS A1 TIR-NBS
302	B4 SUS A1c+1566mSr	GGGGACAAC TTTGTATAGAAAAGTTGGGTG TCAGTCTCTGAAAGCCAGGGCA	BiFC SUS A1 TIR-NBS
303	B1 SUS A1c+1567fStart	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGGGAGGAGAACA AACTGAATG	BiFC SUS A1 LRR
249	At1g17600g+46f	CTCAGCTCCGTGGAGAAGAC	Sequenzierung
250	At1g17600g+919f	GTGGAAGCTGGATGCCAAGAG	Sequenzierung
251	At1g17600g+1714f	CCTGACCTGACGAGTTTCTG	Sequenzierung
252	At1g17600g+2571f	CCCATTATATCGGCGATGAGTC	Sequenzierung
261	At1g17600c+1626f	CATGGAGGCCAGTGTGTTG	Sequenzierung
257	B1 SAUL1 fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGGTTGGAAGCTCGGATG	BiFC SAUL1 Volllänge
258	B3 SAUL1 fw	GGGGACAAC TTTGTATAATAAAGTTGTC ATGGTTGGAAGCTCGGATG	BiFC SAUL1 Volllänge
259	B4 SAUL1oS rev	GGGGACAAC TTTGTATAGAAAAGTTGGGTG TGCGATGTTTGGGAATATAC	BiFC SAUL1 Volllänge
260	B2 SAUL1oS rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT TGCGATGTTTGGGAATATAC	BiFC SAUL1 Volllänge
CB1	SAUL1_fw	GGGAGGCAGCTGTTTCCTTG	Sequenzierung

Tabelle 7-4: Verwendete BiFC-Oligonukleotide und jeweilige Sequenzierungsprimer (Fortsetzung)

ID [TK]	Name	Sequenz [5' --> 3']	Verwendungszweck
CB2	SAUL1_rev	TAATGGCCCCGAGCCTCTTTG	Sequenzierung
307	CHS1g+1f_B3	GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGTC ATGTCTACTTCTTATTCTTTTTTTGTTGG	BiFC CHS1 Volllänge
308	CHS1g+1263r_B2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT TTATCTTTGGGATGCTCCAC	BiFC CHS1 Volllänge
309	CHS1g+1260r_B2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT TCTTTGGGATGCTCCACG	BiFC CHS1 Volllänge

Tabelle 7-5: Verwendete Primerkombinationen für die Amplifikation der BiFC-Konstrukte

Oligonukleotide ID [TK] fw	Oligonukleotide ID [TK] rev	Resultierender pDONR221
257	259	SAUL1 CDS ΔStopp pDONR221 L1L4
258	260	SAUL1 CDS ΔStopp pDONR221 L3L2
253	275	SUSA1 gDNA pDONR221 L1L4
254	276	SUSA1 gDNA pDONR221 L3L2
253	255	SUSA1 gDNA ΔStopp pDONR221 L1L4
254	256	SUSA1 gDNA ΔStopp pDONR221 L3L2
253	255	SUSA1 CDS ΔStopp pDONR221 L1L4
254	256	SUSA1 CDS ΔStopp pDONR221 L3L2
253	300	SUSA1-TIR CDS pDONR221 L1L4
253	299	SUSA1-TIR CDS ΔStopp pDONR221 L1L4
253	302	SUSA1-TIR-NBS pDONR221 L1L4
253	301	SUSA1-TIR-NBS ΔStopp pDONR221 L1L4
303	255	SUSA1-LRR CDS ΔStopp pDONR221 L1L4
307	309	CHS1 ΔStopp pDONR221 L3L2
307	308	CHS1 pDONR221 L3L2

ANHANG

Tabelle 7-6: Auflistung von Oligonukleotiden für die grobe Chromosomenkartierung. Dick hinterlegte Oligonukleotide wurden für die Kartierung verwendet.

Chromosom	Position [Mb]	Name	Sequenz [5'--> 3']	Col-0 [bp]	Ler [bp]	Annealing [°C]
1	1,4	Ch1-YUP8H12-fw	CAAACCTGCAAAACCCCTTAG	183	167	55
		Ch1-YUP8H12-rev	TGCGATTCCCTTGGATGAT			
	2,6	Chr1-T27G7-fw	GGTAATCGCTAACTTTTTGT	197	177	52,5
		Chr1-T27G7-rev	GAATTTCAACTGATGTTAT			
	3,8	Chr1-T23J18-fw	GATATTTGTTTTGCTAACAC	182	150	49
		Chr1-T23J18-rev	TAATAAAGTCCAGCTTTGA			
	5,6	Chr1-F3O9-fw	AAGATTACACGACCAAGAAG	212	179	52,5
		Chr1-F3O9-rev	CTTGTCGGGCAGATAAACTA			
	8	Chr1-T22J18-fw	CACTGCAACAAAGTGGAAT	171	156	52
		Chr1-T22J18-rev	ATCCGTTTCAATATCCACAA			
	16,6	Chr1-F28H19-fw	TGCGGGAGTGTGATAGAATA	148	102	52
		Chr1-F28H19-rev	TCCTCGAAAGATTCATTGAT			
	22,8	Chr1-F19K23-fw	GAATTCTGTAACATCCCATTTC	200	kleiner 200	52
		Chr1-F19K23-rev	GGTCTAATTGCCGTTGTTGC			
26,4	Chr1-T17F3-fw	GGACCGACGGTTACGAGAGT	130	114	52	
	Chr1-T17F3rev	TAACGGGCCGTTGCAAGA				
2	0,4	Chr2-T23K3-fw	CGTGTTTACGGGTCGGA	133	118	50
		Chr2-T23K3-rev	AAAACCCCTGAAGAATACG			
	2,6	Chr2-T12H3-fw	TAGTCTGAGCTTACCAATA	99	89	52
		Chr2-T12H3-rev	TTACCCTCGACTCGTAAC			
	8,5	Chr2-F3P11-fw	ATGTATTTGTTGCAAAATAA	210	150	50
		Chr2-F3P11-rev	TGCACAGAAGAAAAAACTA			
	11,6	Chr2-T20P8-fw	TCCGATTTCGATTAACCTC	124	112	50
		Chr2-T20P8-rev	TTATTTCTATTTCAAGACT			
	16,2	Chr2-T16B24-fw	ATGAACGGAGTAGCTATC	143	129	50
		Chr2-T16B24-rev	CGCGTAGAACATAATCTGTA			
3	0,9	Chr3-F20H23-fw	CAATGGGAAGAAGGTGTGAG	186	168	49
		Chr3-F20H23rev	CGCATTTCCATAAGTTTGT			
	5,6	Chr3-MGL6-fw	ACCTGTTCACTCTATGTTAC	218	165	50
		Chr3-MGL6-rev	GGGAATTATTAACATTATCA			
	10,2	Chr3-K1G2-fw	ATGAGCTTAGGAGTGTGTA	171	157	50
		Chr3-K1G2-rev	AATTTTGTCCCAAAAGAATA			
	16,3	Chr3-T32N15-fw	CAAAAGAAATGCAACGAGAC	143	124	50
		Chr3-T32N15-rev	TTTGATCATGAATGGTAGTG			
	20,5	Chr3-T26I12-fw	GAGCAACATTAAGGATAGAA	181	165	50
		Chr3-T26I12-rev	ATCTCATACTCATAATATGTAG			

ANHANG

Tabelle 7-6: Auflistung von Oligonukleotiden für die grobe Chromosomenkartierung (Fortsetzung). Dick hinterlegte Oligonukleotide wurden für die Kartierung verwendet.

Chromosom	Position [Mb]	Name	Sequenz [5'--> 3']	Col-0 [bp]	Ler [bp]	Annealing [°C]
4	1,3	Chr4-T4I9-fw	TTATAGCAAACGTACAAGTC	145	101	49
		Chr4-T4I9-rev	CTGCATACACGTCGTCTC			
	6,1	Chr4-F17A8-fw	CTGGACCCTAGTGGATGT	137	117	49
		Chr4-F17A8-rev	GACGGTTCTCCATTAATTAT			
	9,9	Chr4-FCA8-fw	TTCGGAGAAAAGAAACGACAT	151	126	49
		Chr4-FCA8-rev	ATGGAACTATTCAGGCATTA			
	13,5	Chr4-T15N24-fw	GCAACCGCTGCTGCTTTA	99	91	49
		Chr4-T15N24-rev	AATATTTGGCTTTGCGTAGA			
	20,5	Chr4-T4L20-fw	ACCCTAAAACAATGTCTCTT	128	118	52
		Chr4-T4L20-rev	TGCTAACATGGAAATTTGTC			
5	2,5	Chr5-MBK20-fw	CTCTGTTGGGGCAAACC	220	146	52
		Chr5-MBK20-rev	GATGCTGGAGAGTAGCTTAG			
	7,8	Chr5-MYJ24-fw	TTCATGAGAGCGGCATTC	112	100	50
		Chr5-MYJ24-rev	GCAAAATGTTTGGACAATTA			
	13,8	Chr5-T26D22-fw	CACAGGCCATTGGATGTA	181	138	50
		Chr5-T26D22-rev	TGTTAGAACCCACCATTG			
	20,1	Chr5-K6M13-fw	CCTGTTCCAATGAATATG	141	108	50
		Chr5-K6M13-rev	TGTAGCTGCTGAGTTGTC			
	25,1	Chr5-MQB2-fw	AAAAGGCGACTACTAGCA	135	115	50
		Chr5-MQB2-rev	GCCATTTATTTGGTCAAC			

7.4 Zusammenstellung der co-exprimierter Gene von SAUL1

Mutantenlinien [ID]	AGI-Nummer	T-DNA Insertionslinien	Phänotyp	identifizierte Genotypen
ML001	At2g35390	SALK_090404.24.75.x	kein auffälliger Phänotyp	nur ho
ML002	At2g35390	SALK_137863.22.40.x	kein auffälliger Phänotyp	nur ho
ML003	At1g63500	SALK_010706.56.00.x	kein auffälliger Phänotyp	WT, he und ho
ML004	At1g63500	WiscDcLox413-416F2	kein auffälliger Phänotyp	WT, he und ho
ML005	At5g56230	SAIL_34_C04	kein auffälliger Phänotyp	WT, he und ho
ML006	At3g02880	SALK_019840.49.00.x	kein auffälliger Phänotyp	WT, he und ho
ML007	At3g02880	SALK_040345.53.35.x	kein auffälliger Phänotyp	nur WT
ML008	At2g27660	SALK_031699.55.50.x	kein auffälliger Phänotyp	WT, he und ho
ML009	At2g27660	SALK_114319.39.95.x	kein auffälliger Phänotyp	WT, he und ho
ML010	At2g27660	SALK_092915.54.25.x	kein auffälliger Phänotyp	WT und he
ML011	At1g51790	SALK_025281.31.00.x	kein auffälliger Phänotyp	WT, he und ho
ML012	At1g51790	SALK_025291.43.65.n	kein auffälliger Phänotyp	nur WT
ML013	At5g46450	SALK_058343.19.45.x	kein auffälliger Phänotyp	WT, he und ho
ML014	At5g60750	SALK_035439.29.99.f	kein auffälliger Phänotyp	nur WT
ML015	At5g60750	SALK_035460.54.00.x	Samenphänotyp	WT und he
ML016	At3g54100	SALK_141376.21.20.n	kein auffälliger Phänotyp	nur WT

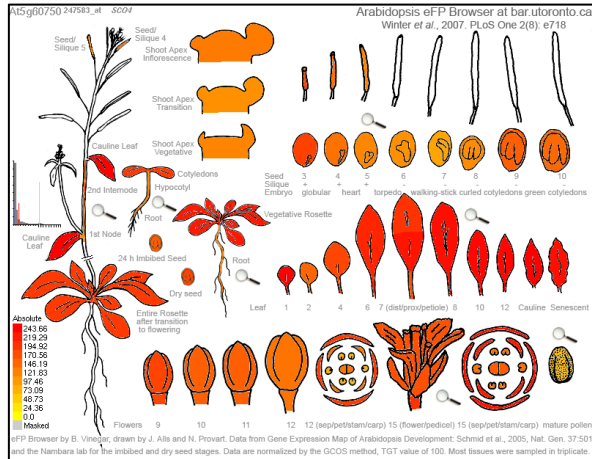
Übersicht der Lokalisierungsergebnisse

Name/Funktion nach TAIR	AGI-Nummer	N-terminale GFP-Fusion	C-terminale GFP-Fusion
PES1, Phosphoribosyltransferase	At2g35390	-	Vesikel, Aggregation in Chloroplasten
TIR-NBS-LRR, <i>disease resistance protein</i>	At5g46450	-	ER/Cytosol
CAAX-Protease (SCO4)	At5g60750	ER	Vesikel-artige Strukturen/Chloroplasten
Proteinkinase	At1g63500	-	PM
PRA1.G2, <i>prenylated RAB acceptor</i>	At5g56230	-	Vesikel
LRR-Proteinkinase	At3g02880	Cytosol	PM
DC1, Cystein/Histidin reiche C1 Domänefamilie	At2g27660	-	ER (?)
LRR-Proteinkinase	At1g51790	PM/Vesikel	PM
O-Fucosyltransferase	At3g54100	-	Vesikel, Aggregation

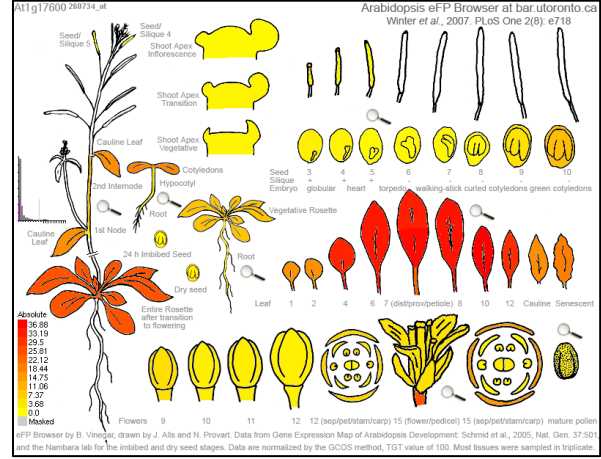
Die Klonierung der GFP-Fusionsproteine erfolgte mit der Gateway®-Technologie und wurde, wie in Kapitel 2.4.12.1 dargestellt, durchgeführt. Die Analyse der T-DNA Insertionsmutanten erfolgte nach den Angaben des Kapitels 2.6.2.

7.5 *SCO4* und *SUSA1* Genexpressionsmuster eFP Browser

At5g00750 (*SCO4*) Stand: 20.04.2016



At1g17600 (*SUSA1*) Stand: 02.05.2016



7.6 Abkürzungscode der Aminosäuren

Aminosäuren	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

7.7 Sequenzen

7.7.1 DNA Sequenz des genomischer Bereich von *SCO4* mit Promotor und 5`UTR

1 *gcagcaatct taccatatgt tcaagacaaa cttagaaaaa tgagcaaaaa caagacttac*
 61 *gggtcgcata atcctgttgt tctgttcaga ttagcttctg gacaataagc tcccaaagga*
 121 *caagcttcac atcatagtga gaaacaaca ttagaaatgg atcaacaacc gaatctttca*
 181 *tcgtttctga atgtttaaag gaggttaact tacggatcat gcaggtgata ccacgagggc*
 241 *agaagaaacc tgcgcaacaa ggcgcacatt gctgagttct aacaggaaca ttcttgtcgt*
 301 *ctttaaggtc aactttcaca tcttttagcag tacgacaagc ccatccaggc tcacatccag*
 361 *acatccatga agatagattg cagttcttgt tcggtttcaa gtaattagta gctctctttg*
 421 *cacctcctaa taatccattg aagtatattc tcacttctgc agccgtacat atcctctgca*
 481 *tcatgtcacc tattctcaaa ccaaaaacat cagcaaaaatt aaaatattat ttcggcttct*
 541 *gtcaatgaaa cagaggatgt ataaatatac cttttgtggt tttaccacat gcgtttaaga*
 601 *aatctggctt tgtagagaaa ttaaaggctt cgttataatc ttcttttctg aaacaaagac*
 661 *aataacataa acatcttcaa tgctatagga taaaggtaa tgccattttg aaactaacac*
 721 *attggtaatg cagaatccga gctctctttt gatgtcatcc tcaaaaactt cggtgagatt*
 781 *cgatattttg tcgaaaacga attggttata gagacgatta gccgcgggat tatccaagct*
 841 *tctatcttct tgacaaatca ctctttcttg ctgaagaatc aacacgataa acacgaagaa*
 901 *caatggaaca aaattccctg gaaaatatga atttctcctt cccatccctg aaaattttcc*
 961 *aagaaaacaa cgttgcaaag aattgtcttg agatcaggat ggatcaagga gacattagac*
 1021 *aattgaagga gacagaaaga gagaattagg gtttgtttgt tttttctttt tttctttttc*
 1081 *tttttgggga gagagagatt gttgtgtatc ttgagagtca agaaatggat gagaggaagg*
 1141 *catggcgata tatgaggagg aaagagacga aaacagatth taatttgacc gtttgacttt*
 1201 *ctctaactcg tgtcatgga atagattctt caccaaggaa tcatactatg taatttacag*
 1261 *ttaaggctct gtattttgat aatgtttcta ctgtgacctc tatagttttg acatttttgg*
 1321 *tgcaatatgt caaatagaaa agatttgttt ttctgaaaaa tataaaaaata aatttaccaa*
 1381 *tgtgttctga aggcaattca gctataaaact ataaaaggat aatgaacaaa ttggtttatt*
 1441 *catcaataaa ttggtttatt ttggtttaaa catcggtttt gttcgatggt ccggttaaga*

ANHANG

1501 cggattgtta attattgtcg ttgaaaattc aacaactttt ttttggtag aaaaactgaa
1561 agacacaaaa tcagtcacga aaaccccaa atccacagat taattagggt tttcgatttc
1621 tctgatgaaa ctgagaagaa tctctcatta gggttcttca ttcttcagag ggattttctca
5' UTR
1681 tatctctctc attgagcttg ctaaagctga aatctgagtt tgaaattgga attcagattc
1741 ccatccc**ATG** ttgacctctt cttgctcttc ttcgtctctc ctctgccatc gccagctct
1801 ctctagttcg cgttccaagt ttagggttcc ttgtcgaact gttttctctc ctgctcttac
1861 caagatttcc cctttaactg cttcttcacc ttctaagtcc gccaaagcatg tacgcttctt
1921 tcttcttttc tctgtttata ttcaaaagta tgaaactttg aattgaaaaa gagactttgg
1981 tgtttgaatt gtgttgaaat tgaggaatct tggattcga tagcactgtg gattcagttt
2041 atttacgaaa gagagtgcct tttgataagg atttgcttgg attactagta gttttagaaa
2101 tttgtggttt cttgaggttt tagtaatctt gtgacttctt tattgtaaga attcaatatt
2161 tgtattgatg cagtgtcaaa tggttaatgg aagaatcggg agtttgtctc caatgtatta
2221 aactttgggg ctattttctg cagaaatgga agattttgtg ttttagaaat gaagattctg
2281 ctccccgagaa tccggagcat tttgtgcctg aggaattagt taagccagat caagattctc
2341 catgtacaga taaaacagat tggaaggcaa cttttcaaaa ggtaaagatc tatggacggt
2401 actggatact tgtacagttg aagaagaact accttctgtc tctgttttag tctgacaaac
2461 cggttttgat attaggtct agactctaga ggtaggact gcagcagaat cttatatttg
2521 tcaataaact gttatgtata tatccattat ccaactcttg ttttttttg tttactagtg
2581 aaaaataaga atttgaggtt tcttttgatc tggaaatgtg ccatacaaat tgatgaggct
2641 ttctatttac taaatgtgat ggcaaaaatg caaataagga aactctcaca aaggcttatc
2701 gatcttgtgt tcaacctatt attattgggt ctaaaaagca ctttgtttcg ttggttttca
2761 ggctgcagat gcagttttga aggccattgg gactcgttgg aaggtaccat ggactgtcga
2821 gaccattgtg caggtaccta catcttaatg ttacttaacc tcttttgat taccgtatca
2881 tattcataac ttttacacaa gaacattatt gaaacctata tagaaatfff acgggattat
2941 ctgataagag tgtattatgg atattgagtc tgtgtaagac gtagtttttg aatgtataga
3001 catttaaacy tgggctaata tccttgactt agtaactagg gactacaaga taacatcaag
3061 ctaatagtat tatagatgct ttggttcata caaaagatgc aaaacaaaca gtaatgagaa

3121 atgagttata taccaaagct ttcagttatt tccttggtta atcctgcgat aatctgccat
 3181 gcccctaaca tacacttttt caggtaatgc ttctgtgggt agccgctttc tggttcattg
 3241 gttcatggat gatcccattc atggctcata tatcaggttt ccacaaagaa tccctaacat
 3301 ttagaggcca agctttgttc agtctgataa ccgatgtaac agaaggccta gccgggattg
 3361 ctatcctcca cgttgctc tccatgttcc gtccacttgc aagtgattgg ttccgcttta
 3421 cccttaaagg aaactggcaa ctagatgtta tcataggctg tttcatgttc cctttcgta
 3481 accggctctc ccaattaaac ctaaacctct tgccactccc accaacctca agtccagtct
 3541 cactctcaag tgtcgagcag tctataatgg ctagagacc ctagagacc tgtggcaatg g**actgtatg**

 3601 **cagttgtagt atcaatttgt gcaccggtt ggaagagat agtggtcaga ggg**ttcttgt
 Deletion durch T-DNA
 3661 taccgtctct aactaggtac atgccagttt ggtgtgcgat tcttgtgagt tcgattgcat
 3721 ttgctttggc acatttcaat gtgcagagga tgttaccatt ggtgttcctt ggagtggat
 3781 tgggtttgat attcgcaagg tcaaggaact tgttaccttc aatgctgttg catagcttgt
 3841 ggaacggctt tgtattcatg gaattgatgc ga**TGA**

Kursiv → pSCO4 Promotorbereich

Rot, kursiv → 5'UTR

Fett, Groß → Start- und Stoppcodon

Rot → Bereich der T-DNA Insertion

7.7.2 DNA Sequenz des genomischen Bereichs von *SUSA1* mit sämtlichen SNPs

1 atggtgtcct cctctgcacc tcgtgtatcg aagtacgacg tcttctcag ctcccggtga
 >>.....Exon 1.....>
 61 gaagacaccc gcaaaacat cgtcagtcac ttatatgcag cacttgatag cagaggcatt
 >.....Exon 1.....>
 121 gttactttca aagatgacca aaggcttgag ataggcgatc acatttccga tgaactccac
 >.....Exon 1.....>
 181 agagcactag ggagttcgag tttcgtggtt gttgttctct ccgagaacta cgctacttcg
 >.....Exon 1.....>

ANHANG

241 agatggtgct tattg^gaact tcaactgata atggagctta tgaaggaggg aagacttgaa
sus1-6 (G → A)
>.....Exon 1.....>

301 gtctttccca tcttctatgg agtagatcct tccgtggtga ggcatcagct aggaagtttc
>.....Exon 1.....>

361 tcttttagtaa agtaccaagg tcttgaaatg gtggataagg ttctcaggtg gagagaagct
>.....Exon 1.....>

421 cttaacctaa tcgccaatct ttcaggcgtg gtttcaagcc actggtaagc ctcgttttct
>.....Exon 1.....>>

481 tgtttacaca catttatcac tttgttttagc agcacactgg aaagttgaat tataattttc

541 ctgctcaatt tcaatattat tagtgttgat gaggctataa tggttggaga aattgctaga
>>.....Exon 2.....>

601 gatatttcaa gacgtgtgac attgatgcat aaaatagact ctggaaatat tgttgggatg
>.....Exon 2.....>

661 aaagtcaca tggaaggtct taatcatctc ttggatcagg aatccaatga ggttctcctg
>.....Exon 2.....>

721 gtaggaatct gg^ggaatgg^g aggaattggg aaaacctcca ttgttaagtg tctctatgac
sus1-7sus1-8
je (G → A)
>.....Exon 2.....>

781 cagctctcac ctaaatttcc agctcattgt ttcatagaaa acattaagag tgttagtaaa
>.....Exon 2.....>

841 gacaatggcc atgatctaaa gcatttgcaa aaagaattgc tctccagtat cctctgtgat
>.....Exon 2.....>

901 gatattaggt tatg^gagcgt ggaagctgga tgccaagaga taaaaaagag acttgggaat
sus1-9 (G → A)
>.....Exon 2.....>

961 caaaaggttt ttcttgtgct tgatggtgtg gataaagtgg cgcaggtgca tgctttggca
>.....Exon 2.....>

1021 aaagagaaaa actggtttgg tcttgggagc cgaattatca taaccactcg agatatgggc
>.....Exon 2.....>

1081 ttgctcaata cctgtggagt agaagtcggt tatgaggta agtgcttggga tgataaggat
>.....Exon 2.....>

1141 gccctcaga tgtttaaaca gattgctttt gaaggaggac ttcctccttg tgagggtttt
>.....Exon 2.....>

1201 gaccaactct caatccgagc ttctaagctt gctcacgggc ttccttctgc cattcaagcc
>.....Exon 2.....>

1261 tatgcattat ttctcogtgg aaggacagcg agtctgagg agtgggaaga agcactgggt
>.....Exon 2.....>

ANHANG

1321 gcacttgaaa gcagtcttga cgagaatata atggaaatct tgaaaattag ctacgagggc
>.....Exon 2.....>

1381 ttacaaaaac cacatcagaa tgtattcctt catgttgtct gtctcttcaa tggagacact
>.....Exon 2.....>

1441 ctccagcgaa tcacttccct tcttcatggc cccatacctc agagcagcct gtggataaga
>.....Exon 2.....>

1501 gttttagcag agaaatctct catcaaaata tcaactaatg gatctgttat catgcacaag
>.....Exon 2.....>

1561 ttggtcgaac aaatgggaag agaaattatc cgcgacgaca tgtctttggc tcgaaagtcc
>.....Exon 2.....>

1621 ctcagggatc ctatggaaat tcgcgttgcc ctggctttca gagacgtaag catctatatc
>.....Exon 2.....>>

1681 atctttgatc tattctttta aattttcatg catcctgacc tgacgagttt ctggctttgt

1741 gtttcttttg tcttcttata atcagggagg agaacaaact gaatgcatgt gcctacacac
>>.....Exon 3.....>

1801 gtgtgatatg acctgtgtgt tatccatgga ggcagtggt gttggccgta tgcataatct
>.....Exon 3.....>

1861 caagtttctc aaggtttaca agcatgtaga ttacagagag tcgaatctgc aactcattcc
>.....Exon 3.....>

1921 agaccaaccg ttctgcctc gtagcctacg gctattccat tgggatgcat ttccattgag
>.....Exon 3.....>

1981 agccctgect tccggttctg atccatgttt tcttgttgaa ctcaatctgc gtcacagtga
>.....Exon 3.....>

2041 tttagaaact ctctggagtg gaacaccggt aatcttttct atgattctgc atcttgtggt
>.....Exon 3.....>>

2101 tgtgtttttg atagagcaat ggtgtgaaaa cagagaatcc ttgagagaaa cataattcca

2161 actatttcca tgtgttggtg tatcttgctc agatgttgaa gagtttgaag agactagatg
>>.....Exon 4.....>

2221 tgacgggatc taagcatctc aagcaacttc cagatctttc aagtatcag agtcttgagg
sus1-10 (C → T)
>.....Exon 4.....>

2281 aattgcttct ggaacaatgc acgagactgg agggcattcc agagtgtatt ggaaaaagg
>.....Exon 4.....>

2341 ctaccttaaa gaagcttaag ctatcctacc gtggagggcg tagaagtgcc ctgcggtttt
>.....Exon 4.....>

2401 ttctacgaaa atctacaagg cagcaacata ttggattgga gttcccagac gcaaaaatga
sus1-13 (G → A)
>.....Exon 4.....>

ANHANG

```
2461 aaatggatgc acttataaac atatcgattg ggggagacat tacttttgag tttcgttcaa
>.....Exon 4.....>

2521 aatttagagg atatgctgaa tacgtctctt ttaattctga gcaacagata cccattatat
>.....Exon 4.....>

2581 cggcgatgag tctgcaacaa gcacctggg tcatctcaga gtgcaacaga ttcaattccc
>.....Exon 4.....>

2641 tccgcatcat gaggttcagc cacaaagaaa acgggtgaatc tttctcctt gacgtcttcc
>.....Exon 4.....>

2701 cagatthttcc cgacctgaaa gagctaaaac tagtgaactt aaacatcagg aaaatcccat
>.....Exon 4.....>

2761 ctgggatttg tcacctggat ttactagaga agctggacct cagcggaaat gattttgaga
>.....Exon 4.....>
                     susa1-11 (G → A)

2821 acttaccaga agctatgagt agccttccc ggttaaaaac tctctggcct caaaactgct
>.....Exon 4.....>

2881 ttaagctcca ggagttgcc aagctaactc aggtgcagac acttacactt accaactgta
>.....Exon 4.....>
                     LB der T-DNA Insertion (susa1-14)

2941 ggaaccttag atcattggcg aaactatcta acacaagtca agatgagggga agatactggt
>.....Exon 4.....>

3001 tgcttgagct ttgccttgaa aattgcaaga gtgttgaatc attgtcagat cagcttagtc
>.....Exon 4.....>

3061 atttcaccaa gttgacatgt ttagatctca gcaacatga ttttgagaca ttgccatcaa
>.....Exon 4.....>

3121 gcatcagaga tcttacctca ttggtaacac tttgcctcaa taactgcaag aaactcaaat
>.....Exon 4.....>

3181 cgggtgaaaa acttcccttg tcctccaat ttctgatgc acacggctgt gattctctcg
>.....Exon 4.....>
                     susa1-12 (C → T)

3241 aagctggttc tgcagaacat tttgaggaca taccaaacaa ggaggtgaat acttggctct
>.....Exon 4.....>>

3301 tgatccgtct ctactatgat tgatgtagtt accctttatc atctcccttc ttttataggc
>.....Exon 5 >>

3361 acatacacga aatgactact tccaagaaac tgagatgtcg agttatgtac tgaaaactca
>.....Exon 5.....>

3421 agccacaaga aatcgccaaa ccatccgct tccaagatc acacatgcgg ttaatgtatgt
>.....Exon 5.....>
```

```

3481 aggcacccct atctgcatca cgctagtggc tgctcttggtg attttactcc tgcgtgtttt
>.....Exon 5.....>

3541 caagtga
>....>> Exon 5

```

7.7.3 Aminosäuresequenz von SUSa1 mit den Mutationen

```

1  mvsssaprvs kydvflsfrg edtrktivsh lyaaldsrgi vtfkddqrle igdhisdelh
   >>.....TIR.....>

61  ralgsssfav vvlsenyats rwcllqlqli melmkegrle vfpifygvdp svvrhqlgsf
   >.....TIR.....>
   susa1-6 E86K >

121 slvkyqglem vdkvlrwrea lnlianlsgv vsshcvdeai mvgeiardis rrvtlmhkid
   >.....TIR.....>>

181 sgnivgmkah meglnhlldq esnevlvigi wmggigt s ivkclydqls pkfpahcfie
   >>.....NBS-ARC.....>
   >>.....AAA ATPase.....>
   P-Loop
   susa1-7 G212R >
   susa1-8 G214E >

241 niksvskdng hdlkhlqkel lssilcddir lwsveagcqe ikkrlgnqkv flvldgvdkv
   >.....NBS-ARC.....>
   >.....AAA ATPase.....>>
   susa1-9 W272Stopp >

301 aqvalakek nwfpggsrii ittrdmglln tcgvevvyev kclddkdalq mfkqiafegg
   >.....NBS-ARC.....>

361 lppcegfdql sirasklahg lpsaiqayal flrgrtaspe eweealgale sslidenimei
   >.....NBS-ARC.....>

421 lkisyeglpk phqnvflhvv clfngdtlqr itsllhgpip qsslwirvla ekslikistn
   >.....NBS-ARC.....>>

481 gsvimhklve qmgreiirdd mslarkflrd pmeirvalaf rdggeqtecm clhtcdmtcv

541 lsmeasvvgr mhnkflkvy khvdyresnl qlipdqpfpl rslrlfhwda fplralpsgs

601 dpcflvelnl rhdletlws gtpmlkslkr ldvtgskhkl qlpdlssi s leellleqct
   >>.....LRR.....>>
   susa1-10 T649M >

661 rlegipecig krstlkkklk syrggrrsal rfflrkstrq qhiglefpda kvkmdalini
   susa1-13 V712M >

721 siggditfef rskfrgyaey vsfnseqqip iisamslqqa pwvisecnrf nslrimrfsh

```

```

781 kengesfsfd vfpdfpdlke lklvlnlirk ipsgichldl lskldlsgnd fenlpeamss
    >>.....LRR.....>
    susal-11 E822K >

841 lsrlktlwlq ncfklqelpk ltqvqtltlt ncrnlrslak lsntsqdegr ycllelclen
    >.....LRR.....>>
    >>LRR.>

901 cksveslsdq lshftklctcl dlsnhdfetl pssirdltsl vtlclnncck lksveklpls
    >.....LRR.....>
    susal-12 S960F >

961 lqfldahgcd sleagsaehf edipnkeahf rndyfqetem ssyvlktqat rnrqirtlpk
    > LRR

1021 ithavmyvgi picitlvaal villllrvfk
    
```

7.7.4 CDS Sequenzen der Spleißvarianten von *SUSA1*

7.7.4.1 Spleißvariante 1

```

1 atgggtgtcct cctctgcacc tcgtgtatcg aagtacgacg tcttcctcag cttccgtgga
61 gaagacaccc gcaaaaacccat cgtcagtcac ttatatgcag cacttgatag cagaggcatt
121 gttactttca aagatgacca aaggcttgag ataggcgatc acatttccga tgaactccac
181 agagcactag ggagttcgag tttcgcctggt gttgttctct ccgagaacta cgctacttgc
241 agatgggtgct tattggaact tcaactgata atggagctta tgaaggaggg aagacttgaa
301 gtctttccca tcttctatgg agtagatcct tccgtggtga ggcacagct aggaagtctc
361 tctttagtaa agtaccacag tcttgaaatg gtggataaag ttctcaggtg gagagaagct
421 cttaacctaa tcgccaatct ttcaggcgtg gtttcaagcc actgtgttga tgaggctata
481 atggttggag aaattgctag agatatttca agacgtgtga cattgatgca taaaatagac
541 tctggaaata ttggtgggat gaaagctcac atggaaggtc ttaatcatct cttggatcag
601 gaatccaatg aggttctcct ggtaggaatc tggggaaatgg gaggaattgg gaaaacctcc
661 attgttaagt gtctctatga ccagctctca cctaaatttc cagctcattg tttcatagaa
721 aacattaaga gtgtagtaa agacaatggc catgatctaa agcatttga aaaagaattg
781 ctctccagta tcctctgtga tgatattagg ttatggagcg tggagctgg atgccaagag
841 ataaaaaaga gacttgggaa tcaaaaaggtt tttcttgtgc ttgatggtg ggataaagtg
901 gcgcaggtgc atgctttggc aaaagagaaa aactggtttg gtcctgggag ccgaattatc
961 ataaccactc gagatatggg cttgctcaat acctgtggag tagaagtcgt ttatgaggtt
1021 aagtgccttg atgataagga tgccctccag atgtttaaac agattgcttt tgaaggagga
1081 cttcctcctt gtgagggttt tgaccaactc tcaatccgag cttctaagct tgctcacggg
1141 cttccttctg ccattcaagc ctatgcatta tttctccgtg gaaggacagc gagtctgag
1201 gagtgggaag aagcactggg tgcacttgaa agcagtcttg acgagaatat aatggaaatc
1261 ttgaaaatta gctacgaggg cttaccaaaa ccacatcaga atgtattcct tcatgttgc
1321 tgtctcttca atggagacac tctccagcga atcacttccc ttcttcatgg ccccatacct
1381 cagagcagcc tgtggataag agttttagca gagaaatctc tcatcaaaat atcaactaat
1441 ggatctgtta tcatgcacaa gttggtcgaa caaatgggaa gagaaattat ccgcgacgac
1501 atgtctttgg ctcgaaagtt cctcagggat cctatggaaa ttcgcgttgc cctggcttct
1561 agagacggag gagaacaaac tgaatgcatg tgcctacaca cgtgtgatat gacctgtgtg
1621 ttatccatgg aggccagtgt tgttggccgt atgcataatc tcaagtttct caaggtttac
1681 aagcatgtag attacagaga gtcgaatctg caactcattc cagaccaacc gttcctgcct
1741 cgtagcctac ggctattcca ttgggatgca tttccattga gagccctgcc ttccggttct
1801 gatccatggt ttcttgttga actcaatctg cgtcacagtg atttagaaac tctctggagt
    
```

1861 ggaacaccga tgttgaagag tttgaagaga ctagatgtga cgggatctaa gcatctcaag
 1921 caacttccag atctttcaag tatcacgagt cttgaggaat tgcttctgga acaatgcacg
 1981 agactggagg gcattccaga gtgtattgga aaaaggctca ccttaaagaa gcttaagcta
 2041 tcctaccgtg gagggcgtag aagtgccctg cggttttttc tacgaaaatc tacaaggcag
 2101 caacatattg gattggagtt cccagacgca aaagtgaaaa tggatgcact tataaacata
 2161 tcgattgggg gagacattac ttttgagttt cgttcaaaaat ttagaggata tgctgaatac
 2221 gtctctttta attctgagca acagataccc attatatcgg cgatgagtct gcaacaagca
 2281 ccttgggtca tctcagagtg caacagattc aattccctcc gcatcatgag gttcagccac
 2341 aaagaaaacg gtgaatcttt ctcttttgac gtctttccag attttcccga cctgaaagag
 2401 ctaaaaactag tgaacttaaa catcaggaaa atcccatctg ggatttgtca cctggattta
 2461 ctagagaagc tggacctcag cggaaatgat tttgagaact taccagaagc tatgagtagc
 2521 ctttcccggg taaaaactct ctggcttcaa aactgcttta agctccagga gttgccaag
 2581 ctaactcagg tgcagacact tacacttacc aactgtagga accttagatc attggcgaaa
 2641 ctatctaaca caagtcaaga tgagggaaga tactgtttgc ttgagctttg ccttgaaaat
 2701 tgcaagagtg ttgaatcatt gtcagatcag cttagtattc tcaccaagtt gacatgttta
 2761 gatctcagca accatgattt tgagacattg ccatcaagca tcagagatct tacctcattg
 2821 gtaacacttt gcctcaataa ctgcaagaaa ctcaaatcgg tggaaaaact tcccttgtct
 2881 ctccaatttc tcgatgcaca cggctgtgat tctctcgaag ctggttctgc agaacatttt
 2941 gaggacatac caaacaagga ggtgaatact tggctcttga tccgtctcta ctatgattga

7.7.4.2 Spleißvariante 2

1 atggtgtcct cctctgcacc tcgtgtatcg aagtacgacg tcttctcag cttccgtgga
 61 gaagacacc gcaaaacccat cgtcagtcac ttatatgcag cacttgatag cagaggcatt
 121 gttactttca aagatgacca aaggcttgag ataggcgatc acatttccga tgaactccac
 181 agagcactag ggagttcgag tttcgctggt gttgttctct ccgagaacta cgctacttccg
 241 agatgggtgct tattggaact tcaactgata atggagctta tgaaggaggg aagacttgaa
 301 gtctttccca tcttctatgg agtagatcct tccgtgggta ggcacagctc aggaagtttc
 361 tctttagtaa agtaccaagg tcttgaaatg gtggataaagg ttctcaggtg gagagaagct
 421 cttaacctaa tcgccaatct ttcaggcgtg gtttcaagcc actggttatg gagcgtggaa
 481 gctggatgcc aagagataaa aaagagactt gggaaatcaa aggtttttct tgtgcttgat
 541 ggtgtggata aagtggcgca ggtgcatgct ttggcaaaag agaaaaactg gtttggctct
 601 gggagccgaa ttatcataac cactcgagat atgggcttgc tcaataacctg tggagtagaa
 661 gtcgtttatg aggttaagtg cttggatgat aaggatgcc tccagatgtt taaacagatt
 721 gcttttgaag gaggacttcc tcttgtgag ggttttgacc aactctcaat ccgagcttct
 781 aagcttgctc acgggcttcc ttctgccatt caagcctatg cattatttct cctggaagg
 841 acagcgagtc ctgaggagtg ggaagaagca ctgggtgcac ttgaaagcag tcttgacgag
 901 aatataatgg aaatcttgaa aattagctac gagggcttac caaaaccaca tcagaatgta
 961 ttcttcatg ttgtctgtct cttcaatgga gacactctcc agcgaatcac ttcccttctt
 1021 catggcccca tacctcagag cagcctgtgg ataagagttt tagcagagaa atctctcatc
 1081 aaaatatcaa ctaatggatc tgttatcatg cacaagtgg tcaacaat ggaagagaa
 1141 attatccgag acgacatgct tttggctcga aagtctctca gggatcctat ggaattcgc
 1201 gttgccctgg ctttcagaga cggaggagaa caaactgaat gcatgtgcct acacacgtgt
 1261 gatatgacct gtgtgttatc catggaggcc agtgtgttg gccgtatgca taatctcaag
 1321 tttctcaagg tttacaagca tgtagattac agagagtcga atctgcaact cattccagac
 1381 caaccgttcc tgcctcgtag cctacggcta ttccattggg atgcatttcc attgagagcc
 1441 ctgccttccg gttctgatcc atgttttctt gttgaactca atctgcgtca cagtgattta
 1501 gaaactctct ggagtggaac accgatgttg aagagtttga agagactaga tgtgacggga
 1561 tctaagcatc tcaagcaact tccagatctt tcaagtatca cgagtcttga ggaattgctt
 1621 ctggaacaat gcacgagact ggagggcatt ccagagtgt tggaaaaaag gtctacctta
 1681 aagaagctta agctatccta ccgtggaggg cgtagaagt cctcgcggt ttttctacga
 1741 aaatctacaa ggcagcaaca tattggattg gagtcccag acgcaaaagt gaaaatggat
 1801 gcacttataa acatatcgat tgggggagac attacttttg agtttctgtc aaaatttaga
 1861 ggatatgctg aatacgtctc ttttaattct gagcaacaga taccattat atcggcgatg
 1921 agtctgcaac aagcaccttg ggtcatctca gagtgcaaca gattcaattc cctccgcatc
 1981 atgaggttca gccacaaaaga aaacgggtgaa tctttctcct ttgacgtctt tccagatttt

2041 cccgacctga aagagctaaa actagtgaac ttaaacaatca ggaaaatccc atctgggatt
 2101 tgtcacctgg atttactaga gaagctggac ctcagcggaa atgattttga gaacttacca
 2161 gaagctatga gtagcctttc ccggttaaaa actctctggc ttcaaaactg ctttaagctc
 2221 caggagtggc caaagctaac tcagggtgcag acaacttacac ttaccaactg taggaacctt
 2281 agatcattgg cgaaaactatc taacacaagt caagatgagg gaagatactg tttgcttgag
 2341 ctttgccctg aaaattgcaa gagtggtgaa tcattgtcag atcagcttag tcatttcacc
 2401 aagttgacat gtttagatct cagcaacctat gattttgaga cattgccatc aagcatcaga
 2461 gatcttacct cattggtaac actttgcctc aataactgca agaaactcaa atcgggtggaa
 2521 aaacttcctt tgtctctcca atttctcgat gcacacggct gtgatttctc cgaagctggg
 2581 tctgcagaac attttgagga cataccaaac aaggaggcac atacacgaaa tgactacttc
 2641 caagaaactg agatgtcgag ttatgtactg aaaactcaag ccacaagaaa tcgccaacc
 2701 atccgccttc ccaagatcac acatgcggtt atgtatgtag gcatccctat ctgcatcacg
 2761 ctagtggctg ctcttgtgat tttactcctg cgtgttttca agtga

7.7.4.3 Spleißvariante 3

1 atggtgtcct cctctgcacc tcgtgtatcg aagtacgacg tcttcctcag cttccgtgga
 61 gaagacacc gcaaaacctat cgtcagtcac ttatatgcag cacttgatag cagaggcatt
 121 gttactttca aagatgacca aaggcttgag ataggcgatc acatttccga tgaactccac
 181 agagcactag ggagttcgag tttcgctggt gttgttctct ccgagaacta cgctacttcg
 241 agatggtgct tattggaact tcaactgata atggagctta tgaaggaggg aagacttgaa
 301 gtctttccca tcttctatgg agtagatcct tccgtggtga ggcatcagct aggaagtttc
 361 tctttagtaa agtaccaagg tcttgaaatg gtggataagg ttctcagggtg gagagaagct
 421 cttaacctaa tcgccaatct ttcaggcgtg gtttcaagcc actggtgcat gctttggcaa
 481 aagagaaaaa ctggtttggt cctgggagcc gaattatcat aa

7.7.4.4 Spleißvariante 4

1 atggtgtcct cctctgcacc tcgtgtatcg aagtacgacg tcttcctcag cttccgtgga
 61 gaagacacc gcaaaacctat cgtcagtcac ttatatgcag cacttgatag cagaggcatt
 121 gttactttca aagatgacca aaggcttgag ataggcgatc acatttccga tgaactccac
 181 agagcactag ggagttcgag tttcgctggt gttgttctct ccgagaacta cgctacttcg
 241 agatggtgct tattggaact tcaactgata atggagctta tgaaggaggg aagacttgaa
 301 gtctttccca tcttctatgg agtagatcct tccgtggtga ggcatcagct aggaagtttc
 361 tctttagtaa agtaccaagg tcttgaaatg gtggataagg ttctcagggtg gagagaagct
 421 cttaacctaa tcgccaatct ttcaggcgtg gtttcaagcc actgtgttga tgaggctata
 481 atggttggag aaattgctag agatatttca agacgtgtga cattgatgca taaaatagac
 541 tctggaaata ttggtgggat gaaagctcac atggaaggctc ttaatcatct cttggatcag
 601 gaatccaatg aggttctcct ggtaggaatc tggggaatgg gaggaattgg gaaaacctcc
 661 attgttaagt gtctctatga ccagctctca cctaaatttc cagctcattg tttcatagaa
 721 aacattaaga gtgttagtaa agacaatggc catgatctaa agcatttgca aaaagaattg
 781 ctctccagta tcctctgtga tgatattagg ttatggagcg tggaaagctgg atgccaagag
 841 ataaaaaaga gacttgggaa tcaaaagggtt tttcttgtgc ttgatggtgt ggataaagtg
 901 gcgcaggtgc atgctttggc aaaagagaaa aactgggttg gtcctgggag ccgaattatc
 961 ataaccactc gagatatggg cttgctcaat acctgtggag tagaagtcgt ttatgaggtt
 1021 aagtgccttg atgataagga tgccctccag atgtttaaac agattgcttt tgaaggagga
 1081 cttcctcctt gtgagggttt tgaccaactc tcaatccgag cttctaagct tgctcacggg
 1141 cttccttctg ccattcaagc ctatgcatta tttctccgtg gaaggacagc gagtctgag
 1201 gagtgggaag aagcactggg tgcacttgaa agcagtcctg acgagaatat aatggaaatc
 1261 ttgaaaatta gctacgaggg cttaccaaaa ccacatcaga atgtattcct tcatggtgtc
 1321 tgtctcttca atggagacac tctccagcga atcacttccc ttcttcatgg ccccatacct
 1381 cagagcagcc tgtggataag agtttttagca gagaaaatct tcatcaaaaat atcaactaat
 1441 ggatctgtta tcatgcacaa gttggtcgaa caaatgggaa gagaaattat ccgagcagac
 1501 atgtcttttg ctcgaaagtt cctcagggat cctatggaaa ttcgcggttg cctggctttc

ANHANG

1561 agagacggag gagaacaaac tgaatgcatg tgcctacaca cgtgtgatat gacctgtgtg
1621 ttatccatgg aggccagtgt tgttggccgt atgcataatc tcaagtttct caaggtttac
1681 aagcatgtag attacagaga gtcgaatctg caactcattc cagaccaacc gttcctgcct
1741 cgtagcctac ggctattcca ttgggatgca tttccattga gagccctgcc ttccggttct
1801 gatccatggt ttcttggtga actcaatctg cgtcacagtg atttagaaac tctctggagt
1861 ggaacaccga tgttgaagag tttgaagaga ctagatgtga cgggatctaa gcatctcaag
1921 caacttccag atctttcaag tatcacgagt cttgaggaat tgcttctgga acaatgcacg
1981 agactggagg gcattccaga gtgtattgga aaaaggctc ccttaaagaa gcttaagcta
2041 tcctaccgtg gagggcgtag aagtgccctg cggttttttc tacgaaaatc tacaaggcag
2101 caacatattg gattggagtt cccagacgca aaagtgaaaa tggatgcaact tataaacata
2161 tcgattgggg gagacattac ttttgagttt cgttcaaaaat ttagaggata tgctgaatac
2221 gtctctttta attctgagca acagataccc attatatcgg cgatgagtct gcaacaagca
2281 ccttgggtca tctcagagtg caacagattc aattccctcc gcatcatgag gttcagccac
2341 aaagaaaacg gtgaatcttt ctcttttgac gtctttccag attttcccga ccagaagcta
2401 tgagtagcct ttcccggtta a

7.8 Relevante SNPs der Tiefensequenzierungen

7.8.1 Tiefensequenzierung der *saul1-1 susa1* Line E3 (BC2F3)

Chromosom	Position	Gen	Aminosäureänderung
Chr1	1256593	AT1G04580.1	Ala --> Val
Chr1	1707966	AT1G05690.1	Gly --> Glu
Chr1	1749812	AT1G05820.1	Ala --> Thr
Chr1	2550203	AT1G08135.1	Ser --> Leu
Chr1	3163833	AT1G09770.1	Glu --> Lys
Chr1	3252792	AT1G09970.1	Gly --> Ser
Chr1	3357355	AT1G10240.1	Ser --> Phe
Chr1	3597740	AT1G10790.1	Gly --> Ser
Chr1	4643867	AT1G13570.1	Arg --> Trp
Chr1	4752806	AT1G13890.1	Gly --> Arg
Chr1	4790903	AT1G13980.1	Asp --> Asn
Chr1	5312323	AT1G15460.1	Ala --> Val
Chr1	5891552	AT1G17230.1	Gly --> Arg
Chr1	6054304	AT1G17600.1	Thr --> Met
Chr1	6410809	AT1G18620.1	Asp --> Asn
Chr1	6550933	AT1G18950.1	Gly --> Glu
Chr1	7039240	AT1G20330.1	Gly --> Arg
Chr1	7096320	AT1G20480.1	Glu --> Lys
Chr1	7879779	AT1G22300.1	Cys --> Tyr
Chr1	8327394	AT1G23460.1	Leu --> Phe
Chr1	8637587	AT1G24340.1	Pro --> Leu
Chr1	8667579	AT1G24460.1	Gln --> Stopp
Chr1	8683002	AT1G24490.1	Gln --> Stopp
Chr1	9123840	AT1G26370.1	Val --> Phe
Chr1	9396146	AT1G27060.1	Thr --> Ile
Chr1	9769339	AT1G28020.1	Ala --> Thr
Chr1	9986750	AT1G28420.1	Glu --> Lys
Chr1	9993127	AT1G28430.1	Trp --> Stopp
Chr1	9998900	AT1G28440.1	His --> Tyr
Chr1	10510833	AT1G30000.1	Glu --> Lys
Chr1	10920266	AT1G30760.1	Ala --> Val
Chr1	11144409	AT1G31180.1	Gly --> Glu
Chr1	11509666	AT1G32010.1	Gly --> Asp
Chr1	11509973	AT1G32010.1	Glu --> Lys
Chr1	28022871	AT1G74580.1	Val --> Ile
Chr2	12998781	AT2G30500.1	Ala --> Thr

Fortsetzung: Ergebnisse der Tiefensequenzierung der *saul1-1 susa1* Linie E3 (BC2F3)

Chromosom	Position	Gen	Aminosäureänderung
Chr3	2307969	AT3G07250.1	Gly --> Ser
Chr3	3233170	AT3G10400.1	Pro --> Ser
Chr3	3892401	AT3G12203.1	Glu --> Lys
Chr3	4514550	AT3G13750.1	His --> Tyr
Chr4	9288698	AT4G16470.1	Arg --> Ser

7.8.2 Tiefensequenzierung der *saul1-1 susa1* Linien E118, M101 und M391 (BC2F2)

E118

Chromosom	Gen	Position	Aminosäureänderung
1	At1g10190	3344755	Pro183Leu
1	At1g14685	5043507	Ala141Val
1	At1g15740	5411651	Ser48Phe
1	At1g18910	6055840	Gly212Arg
1	At1g22720	6536587	Val267Met
1	At1g24200	8044555	Gly113Arg
1	At1g17600	8572106	Glu59Lys

M101

Chromosom	Gen	Position	Aminosäureänderung
1	At1g05060	1452707	Pro51Leu
1	At1g07130	2188288	Gly121Arg
1	At1g08090	2525664	Gly446Glu
1	At1g10520	3466242	Asp53Asn
1	At1g10910	3641344	Gly241Glu
1	At1g12230	4149446	Gly174Asp
1	At1g16940	5792094	Leu38Phe
1	At1g17600	6054116	Val712Met
1	At1g18600	6400716	Pro24Ser
1	At1g24040	8506204	Ala184Thr
1	At1g24150	8549732	Ser72Leu
1	At1g24300	8616190	Glu1040Lys
1	At1g24440	8663397	Pro126Ser
1	At1g25350	8890354	Ala583Thr
1	At1g27900	9717708	Asp390Asn
1	At1g30520	10811178	Ala47Val
1	At1g30960	11039602	Ala126Thr

ANHANG

M391

Chromosom	Gen	Position	Aminosäureänderung
1	At1g09794	3173224	Arg32Lys
1	At1g11000	3675193	Ser87Phe
1	At1g17600	6053371	Ser960Phe
1	At1g21840	7667378	Asp174Asn
1	At1g22540	7964528	Ala71Thr
1	At1g26220	9071517	Val121Ile
1	At1g28420	9983362	Glu628Lys
1	At1g30550	10821006	Pro429Leu
1	At1g31230	11162997	Ala20Val
1	At1g31230	11315106	Pro32Ser
1	At1g31600	12579176	Gly247Glu

7.9 Kreuzungsexperimente diverser *saul1-1 susa* Linien

Tabelle 7-7: Tabellarische Auflistung der Kreuzungsexperimente diverser *saul1-1 susa* Linien. In einem ersten Experiment wurden alle E-Linien untereinander gekreuzt und eine Allelität festgestellt. Daraufhin folgte ein zweites Experiment mit den M-Linien; auch in diesem Experiment waren alle Linien allelisch.

Kreuzung 1. Experiment	Kreuzung 2. Experiment	
E118 x E3	M903 x M391	M391 x E3
E87 x E79	M903 x M902	M101 x M769
E29 x E87	E3 x M903	M101 x M903
E3 x E87	M902 x M391	E3 x M902
E118 x E79	M391 x M101	M902 x M101
	M769 x E3	E3 x M101

7.10 Ergebnisse der bioinformatischen Analyse der Spleißvarianten

Length: 3547 nucleotides.

27.7% A, 20.7% C, 22.0% G, 29.5% T, 0.0% X, 42.8% G+C

Donor Spleiß sites

	pos	5'→3'	phase	strand	confidence	5'	exon	intron	3'
Intron 1	465		1	+	1.00	CAAGCCACTG	^	GTAAGCCTCG	H
Intron 2	1666		0	+	1.00	TTTCAGAGAC	^	GTAAGCATCT	H
	1995		1	+	0.74	CTGCCTTCCG	^	GTTCTGATCC	
Intron 3	2069		0	+	0.96	TGGAACACCG	^	GTAATCTTTT	H
	2339		0	+	0.94	TTGGAAAAAG	^	GTCTACCTTA	H
	2674		1	+	0.99	AAAGAAAACG	^	GTGAATCTTT	
	3144		0	+	0.89	TACCTCATTG	^	GTAACACTTT	
Intron 4	3285		0	+	0.90	AAACAAGGAG	^	GTGAATACTT	

Acceptor Spleiß sites

	pos	5'→3'	phase	strand	confidence	5'	intron	exon	3'
Intron 2	1765		2	+	0.97	TTATCATCAG	^	GGAGGAGAAC	
	2114		0	+	0.93	TTTTTGATAG	^	AGCAATGGTG	
Intron 3	2192		0	+	0.95	TCTTGCTCAG	^	ATGTTGAAGA	H
	2567		0	+	0.96	TGAGCAACAG	^	ATACCCATTA	
Intron 4	3358		0	+	0.95	TCTTTTATAG	^	GCACATACAC	

Branch points

acceptor	branch				5'	A	3'
pos 5'→3'	pos 5'→3'	strand	score				
1765	1722	+	-3.25		TCCTGACCTGACGAGTTTCT		
2114	2083	+	-2.53		CTTTTCTATGATTCTGCATC		
2192	2149	+	-0.32		CTTGCGAGAAACATAATTCC		
2567	2538	+	-3.37		GGATATGCTGAATACGCTTC		
3358	3322	+	-2.53		ACTATGATTGATGTAGTTAC		

CUTOFF values used for confidence:

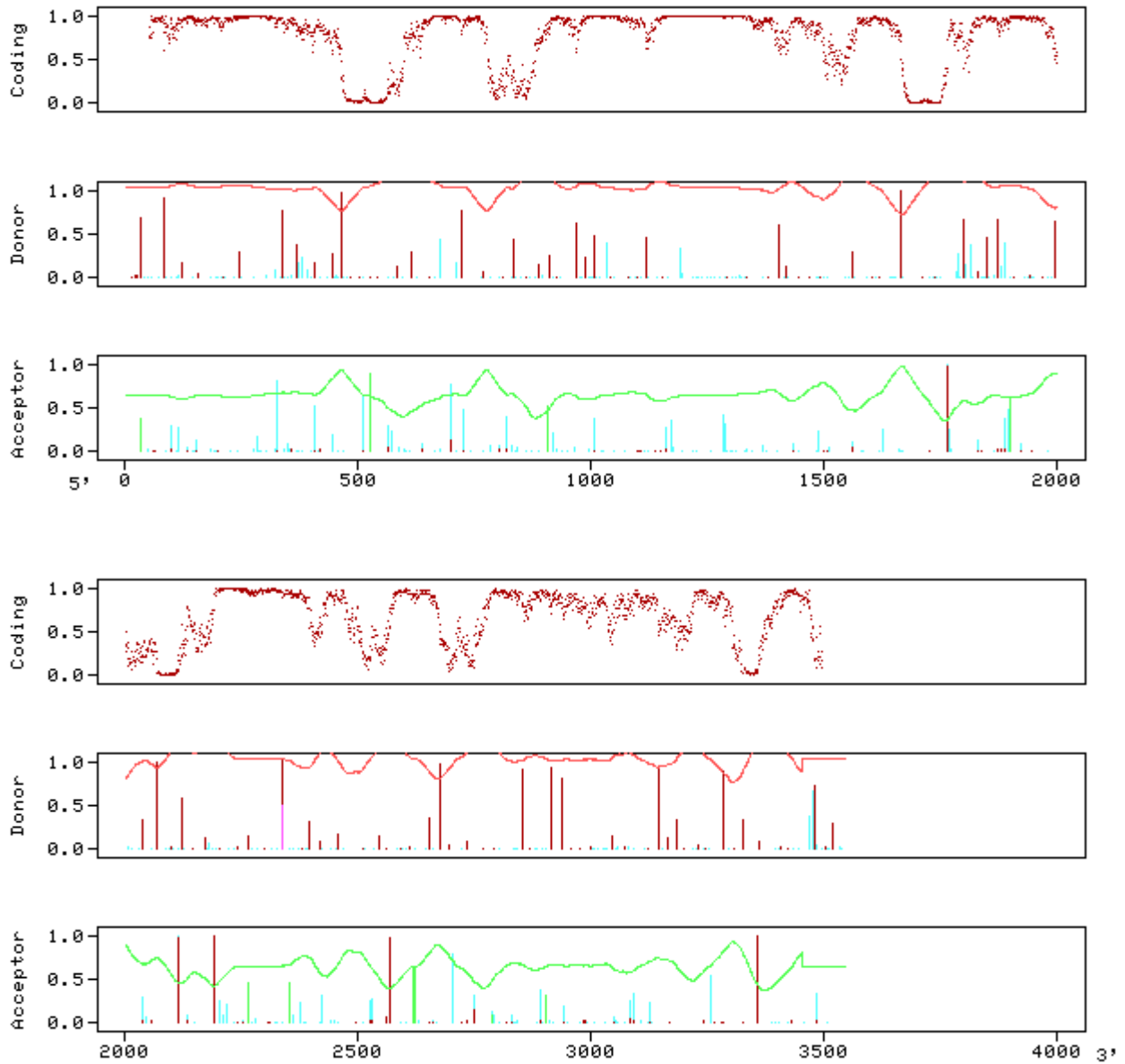
Highly confident donor sites (H): 95.0 %

Nearly all true donor sites: 50.0 %

Highly confident acceptor sites (H): 95.0 %

Nearly all true acceptor sites: 20.0 %

Graphische Darstellung



Danksagung

Bedanken möchte ich mich besonders bei Prof. Dr. Stefan Hoth für die Bereitstellung des Promotionsthemas, die sehr gute Betreuung in der gesamten Zeit und die Begutachtung dieser Arbeit. Danke für die Möglichkeit, an diesem spannenden Projekt zu arbeiten und dafür, dass ich meine Promotion in dieser Arbeitsgruppe durchführen durfte.

Zusätzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. Arp Schnittger für die zweite Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Dr. Magdalena Weingartner danke ich neben den zahlreichen fachlichen Diskussionen für die Korrektur dieser Arbeit. Ich danke dir für die beratenden Gespräche und die Unterstützung in der gesamten Zeit. Ich habe sehr viel von dir gelernt!

Einen besonderen Dank geht an François Clement Perrineau! Du hast dazu beigetragen, dass ich in dieser Arbeitsgruppe aufgenommen wurde und wir lange Zeit ein Büro teilen durften. Danke auch für die zahlreichen „Supervisionen“ und die schöne Zeit im Labor und beim Yoga.

Benjamin Möller danke ich für die sehr geduldige Einarbeitung in die konfokale Laser-Scanning Mikroskopie. Ich konnte viel von dir über die ganzen „bunten Bilder“ lernen. Zudem danke ich dir für die wöchentliche Motivationshilfe zum sportlichen Ausgleich.

Ein besonderer Dank geht natürlich auch an Eva-Maria Disch, Kerstin Wöltje, Catharina Brieske und Jan Knop. Die Zeit mit euch war hervorragend! Danke für die zahlreichen Diskussionen, die tollen Mittagspausen und die Lasagne-Abende. Eva danke ich speziell für die Zusammenarbeit mit Justus, Peter und Bob. Kerstin verdanke ich den regelmäßigen Nachschub an Kaffee auf meinem Schreibtisch. Cathi danke ich für die immer sehr unterhaltsamen Anekdoten im Labor und beim Mittag.

DANKSAGUNG

Als nächstes möchte ich Judith Mehrmann, Wiebke Hellmeyer und Teresa Bisdorf für die vielen unterstützenden Stunden im Labor, die hilfreichen Diskussionen und die großartige Organisation im Labor danken. Darüberhinaus verbinde ich mit Wiebke und Judith eine sehr schöne Bürozeit mit wertvollen Gesprächen. Teresa danke ich besonders für die praktische Unterstützung im letzten Jahr. Dem anschließen möchte ich meinen Dank an Christiane Debus. Ich danke dir für die vielen hilfreichen Tipps und die Unterstützung bei bürokratischen Problemen.

Ebenso danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern sowie Studierenden der Abteilung MPP für die sehr angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre und die anregenden Gespräche. Besonderer Dank geht dabei an Julia Sandberg-Meinhardt, die neben den Kaffeepausen auch privat bei Pizza und Pasta regelmäßig ein offenes Ohr für mich hatte. Zudem danke ich dir für die Rechtschreibkorrektur dieser Arbeit.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die immer an mich geglaubt haben. Besonderer Dank geht an meine Eltern, die mir dieses Studium ermöglichten. Volker danke ich für die private Unterstützung und das geduldige Zuhören während der gesamten Zeit. Zudem danke ich dir für die konstruktive Korrektur dieser Arbeit.

Publikationsliste

Teile dieser Arbeit werden in folgender Publikation veröffentlicht:

E3 ligase SAUL1 serves as a positive immune regulator and its homeostasis is monitored by TNL receptor SUSA1.

Meixuezi Tong^{*}, **Tanja Kotur**^{*}, Wanwan Liang, Yan Li, Katja Vogelmann, Tatjana Kleine, Dario Leister, Yuelin Zhang, Stefan Hoth[#] and Xin Li[#] (2016)

Diese Publikation wurde bei *New Phytologist* eingereicht.

^{*} Diese Autoren trugen gleichermaßen zu dieser Studie bei

[#] Für die Korrespondenz verantwortliche Personen

Weitere Publikationen:

Disch, E.-M., Tong, M., **Kotur, T.**, Koch, G., Wolf, C.-A., Li, X., Hoth, S. (2016). Membrane-Associated Ubiquitin Ligase SAUL1 Suppresses Temperature- and Humidity-Dependent Autoimmunity in Arabidopsis. *MPMI* **29**, 69–80.

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. *Frontiers in plant science* **5**, doi: 10.3389/fpls.2014.00037.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den 12.05.2016

Unterschrift

Tanja Kotur