

Proteinbiochemische und molekularbiologische Analysen pflanzlicher PUB-ARM E3 Ubiquitinligasen

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

vorgelegt von

Catharina Brieske

Hamburg, 28.09.2017

1. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Hoth

2. Gutachter: Prof. Dr. Julia Kehr

Datum der Disputation: 09.02.2018

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Einleitung.....	1
1.1. Das Ubiquitin-26S Proteasomsystem.....	2
1.1.1. Der Ablauf des Ubiquitin-abhängigen Proteinabbaus.....	2
1.1.2. Differentielle Ubiquitinierung von Proteinen	3
1.1.3. E3 Ubiquitinligasen in <i>Arabidopsis thaliana</i>	5
1.2. Immunabwehr in Pflanzen	9
1.2.1. <i>Pamp-Triggered Immunity</i> (PTI)	9
1.2.2. <i>Effector-Triggered Immunity</i> (ETI).....	11
1.2.3. R-Protein vermittelte Autoimmunität in <i>Arabidopsis thaliana</i>	12
1.2.4. PUB E3 Ubiquitinligasen bei der pflanzlichen Immunantwort.....	13
1.2.5. Die PUB-ARM Proteine PUB42, PUB43 und PUB44	15
1.3. Zielsetzung dieser Arbeit.....	20
2. Material und Methoden	21
2.1. Pflanzen.....	21
2.2. Organismen	21
2.3. Antikörper	22
2.4. Vektoren.....	22
2.4.1. Konstrukte für Interaktionsstudien.....	23
2.4.2. Konstrukte für die rekombinante Proteinexpression	26
2.4.3. Konstrukte zur Proteinlokalisierung.....	27
2.5. Oligonukleotide	27
2.6. Anzuchtmedien	30
2.7. Antibiotika	31
2.8. Geräte.....	31
2.9. Software	33
2.10. Methoden zur Arbeit mit Pflanzen.....	34
2.10.1. Anzucht von Pflanzen	34
2.10.2. Transformation von Protoplasten aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	34
2.10.3. Infiltration von <i>Nicotiana benthamiana</i> mit <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	36
2.10.4. Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> zur Analyse der Genexpression mittels RT-qPCR	37
2.11. Molekularbiologische Methoden	37
2.11.1. Isolierung genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	37

2.11.2.	Isolierung von RNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	38
2.11.3.	Synthese von cDNA	38
2.11.4.	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	38
2.11.5.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	39
2.11.6.	Spezielle Klonierungsstrategien	41
2.11.7.	Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR).....	43
2.11.8.	Agarosegelelektrophorese von DNA und RNA.....	45
2.11.9.	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	45
2.11.10.	Plasmidminipräparation mittels alkalischer Lyse.....	45
2.11.11.	Plasmidmidipräparation.....	46
2.11.12.	Herstellung chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i>	47
2.11.13.	Hitzeschocktransformation von <i>Escherichia coli</i>	47
2.11.14.	Herstellung elektrokompenter <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	47
2.11.15.	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> mittels Elektroporation	48
2.11.16.	Herstellung von Glycerindauerkulturen.....	48
2.11.17.	Sequenzierung.....	48
2.11.18.	Computergestützte Sequenzanalyse und Primerdesign	49
2.12.	Proteinbiochemische Methoden.....	49
2.12.1.	Expression von Fusionsproteinen in <i>Escherichia coli</i>	49
2.12.2.	Affinitätschromatographische Proteinaufreinigung aus <i>Escherichia coli</i>	49
2.12.3.	Tandemaffinitätsaufreinigung aus pflanzlichen Geweben	52
2.12.4.	Assay zur Analyse der Assoziation von SAUL1 an die pflanzliche Plasmamembran	52
2.12.5.	Proteinextraktion und Co-Immunpräzipitation (Co-IP) aus pflanzlichen Geweben.....	54
2.12.6.	GST-Pull-down	55
2.12.7.	Löslichkeitsassay	56
2.12.8.	Bestimmung der Proteinkonzentration	57
2.12.9.	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	57
2.12.10.	Coomassie Colloidal Gelfärbung	59
2.12.11.	Semi-dry Western Blot	59
2.12.12.	Ponceau S Färbung.....	61
2.13.	Bildgebende Methoden.....	61
2.13.1.	Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie	61
2.13.2.	Direkte stochastische optische Rekonstruktionsmikroskopie	62
3.	Ergebnisse.....	63
3.1.	Analyse der Funktion von PUB-ARM Proteinen bei der pflanzlichen Autoimmunität...	63

3.1.1.	Phänotypische Analyse von SAUL1- und PUB43-Überexpressionspflanzen	63
3.1.2.	Analyse der Expression von GFP-PUB43 und YFP-SAUL1 in <i>Arabidopsis thaliana</i>	64
3.1.3.	Analyse der Expression von <i>PATHOGENESIS-RELATED</i> -Genen in PUB43- und SAUL1-Überexpressionspflanzen	67
3.1.4.	Temperatur-abhängige Analyse des Phänotyps von <i>pub42</i> -Mutanten	70
3.1.5.	Analyse der Expression von <i>PATHOGENESIS-RELATED</i> -Genen in <i>pub42-2</i> Mutanten ...	73
3.2.	Identifikation und Analyse von Interaktionspartnern des PUB-ARM Proteins SAUL1...	77
3.2.1.	Identifikation von Interaktionspartnern mithilfe der Tandemaffinitätsaufreinigung....	77
3.2.2.	Analyse der Interaktion von SAUL1 mit BON1 und BAP1	82
3.2.3.	Analyse der Interaktion von PUB43 mit BON1 und BAP1	92
3.2.4.	Analyse der Interaktion von SAUL1 mit LORE	94
3.3.	<i>In vitro</i> Analyse von SAUL1 Interaktionspartnern	97
3.3.1.	Überexpression und Solubilisierung von SAUL1-Interaktionspartnern	97
3.3.2.	Affinitätschromatographische Aufreinigung von Fusionsproteinen aus <i>Escherichia coli</i>	100
3.3.3.	Analyse der Interaktion von SAUL1 und BON1 mittels <i>Pull-down</i>	102
3.4.	Analyse der Topologie von SAUL1 in <i>Arabidopsis thaliana</i>	104
3.4.1.	Direkte stochastische optische Rekonstruktionsmikroskopie	104
3.4.2.	Analyse der Assoziation von SAUL1 an die Plasmamembran	107
4.	Diskussion.....	110
4.1.	Funktion von pflanzlichen PUB-ARM Proteinen bei der pflanzlichen Autoimmunität	110
4.1.1.	Überexpression von SAUL1 und PUB43 führt zu autoimmunitätsähnlichem Phänotyp	110
4.1.2.	SAUL1 und PUB43 haben einen Einfluss auf die Expression der Gene <i>PR1</i> und <i>PR2</i> ...	112
4.1.3.	Der <i>knock-out</i> von <i>PUB42</i> hat keinen Einfluss auf den <i>saul1-1</i> -Phänotyp	114
4.1.4.	<i>PUB42</i> hat keinen Einfluss auf die Genexpression von <i>PR1</i> und <i>PR2</i>	116
4.2.	Interaktionspartner von SAUL1	117
4.2.1.	Identifikation von Interaktionspartnern mithilfe der Tandemaffinitätsaufreinigung..	118
4.2.1.1.	Das Motor-Protein AtKRP125b als putativer Interaktionspartner	119
4.2.1.2.	AtKRP125b interagiert mit SAUL1 <i>in planta</i>	121
4.2.1.3.	Weitere putative Interaktionspartner.....	124
4.2.2.	Das Copine-Protein BON1 als putativer Interaktionspartner.....	129
4.2.2.1.	BON1 interagiert mit SAUL1 <i>in planta</i>	129
4.2.2.1.1.	BON1 als putatives Substrat von SAUL1	133
4.2.2.2.	BON1 und BAP1 interagieren mit dem SAUL1-Paralog PUB43 <i>in planta</i>	136

4.2.3.	Die Rezeptorkinase LORE als putativer Interaktionspartner.....	138
4.2.3.1.	LORE interagiert nicht mit SAUL1 <i>in planta</i>	138
4.3.	Topologie von SAUL1 in <i>A. thaliana</i>	140
4.3.1.	SAUL1 tendiert zu oligomeren Strukturen <i>in planta</i>	140
4.3.2.	SAUL1 assoziiert mit der Plasmamembran über hydrophobe Wechselwirkungen	142
5.	Zusammenfassung.....	145
	Summary	146
6.	Literaturverzeichnis.....	148
7.	Anhang	162
7.1.	Vektorkarten	162
7.1.1.	Hergestellte pDONR221™ Ausgangsvektoren für die Tandemaffinitätsaufreinigung .	162
7.1.2.	Hergestellte pDONR221™ Ausgangsvektoren für die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)	163
7.1.3.	Hergestellte Zielvektoren für die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)	168
7.1.4.	Hergestellte Konstrukte zur Co-Immunopräzipitation (Co-IP).....	175
7.1.5.	Hergestellte Konstrukte zur rekombinanten Proteinexpression	176
7.1.6.	Hergestellte Konstrukte zur Proteinlokalisierung	177
7.2.	Expressionsmuster von <i>PUB42</i> in <i>A. thaliana</i>	177
7.3.	Aminosäuresequenzalignment von <i>PUB44</i> , <i>PUB43</i> und <i>PUB42</i>	178
7.4.	Konfokale Aufnahmen der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC)	180
	Danksagung	184
	Publikationsliste.....	186
	Eidesstattliche Versicherung	187

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
β	beta
Δ	delta (Deletion)
\emptyset	Durchmesser
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
<	kleiner als
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	mikromolar
μmol	Mikromol
%	Prozent
∞	unendlich
ABA	Abscisinsäure (<i>Abscisic acid</i>)
Abb.	Abbildung
AGI	<i>Arabidopsis Genome Initiative</i>
ARM	<i>Armadillo</i>
ATP	Adenosintriphosphat
<i>att</i>	<i>attachment</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BAP1	BON1 ASSOCIATION PROTEIN1
BiFC	<i>Bimolecular fluorescence complementation</i> (Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation)
BON1	BONZAI1
bp	Basenpaar
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CaCl_2	Calciumchlorid
CBB G-250	<i>Coomassie brilliant blue G-250</i>
CC	<i>Coiled-Coil</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cm	Zentimeter
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
ddH_2O	doppelt deionisiertes Wasser
DLS	<i>Dynamic light scattering</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dSTORM	direkte stochastische optische Rekonstruktionsmikroskopie
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

Abkürzungsverzeichnis

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alii, et alae</i> (und andere)
ETI	<i>Effector-Triggered Immunity</i>
ETS	<i>Effector-Triggered Susceptibility</i>
flg22	Flagellin 22
g	Gramm
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HCl	Salzsäure
HR	<i>Hypersensitive Response</i>
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaar(e)
KCl	Kaliumchlorid
KD	<i>Kinase dead</i>
kDa	Kilodalton
L	Liter
LB	Luria Broth
LORE	LIPOOLIGOSACCHARIDE-SPECIFIC REDUCED ELICITATION
m	Meter
M	molar
mA	Milliampere
MAMP	<i>Microbe-associated molecular pattern</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
Min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
MnCl ₂	Mangan(II)-chlorid
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
mSek	Millisekunde

Abkürzungsverzeichnis

<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
NaBr	Natriumbromid
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NaSCN	Natriumthiocyanat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
p	<i>probability value</i> (Signifikanzwert)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
PM	Plasmamembran
pmol	Pikomol
<i>PR</i>	<i>PATHOGENESIS-RELATED</i>
PRR	<i>Pathogen Recognition Receptor</i>
PTI	<i>PAMP-Triggered Immunity</i>
PUB	<i>Plant U-Box</i>
PVPP	Polyvinylpyrrolidon
R	Resistenz
RFP	<i>Red Fluorescent Protein</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT-qPCR	quantitative Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SA	Salicylsäure
SAUL1	SENESCENCE ASSOCIATED UBIQUITIN LIGASE1
SAXS	<i>Small-angle X-ray scattering</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
Sek	Sekunde
SNC1	SUPPRESSOR OF NPR1-1, CONSTITUTIVE1
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
SOC	<i>Super Optimal Broth with Catabolite repression</i>
SOC3	SUPPRESSOR of <i>chs1-2, 3</i>
Tab.	Tabelle
<i>Tap</i>	<i>Tandem affinity purification</i>
T-DNA	Transfer DNA

Abkürzungsverzeichnis

u. a.	unter anderem
UPS	Ubiquitin-26S Proteasomsystem
UV	Ultraviolett
V	Volt
veH ₂ O	vollentsalztes Wasser
VWA	von Willebrand A
WT	Wildtyp
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Als sessile Organismen sind Pflanzen sich stetig verändernden Umweltbedingungen und somit verschiedenen abiotischen (z. B. Trocken- oder Salzstress) bzw. biotischen (z. B. Viren, Nematoden) Stressfaktoren ausgesetzt. Die Wahrnehmung von damit verbundenen Stresssignalen erfolgt oftmals an der Plasmamembran der pflanzlichen Zellen. Infolgedessen werden Signaltransduktionskaskaden aktiviert, über die das jeweilige Stresssignal in die einzelnen Zellen weitergeleitet wird. Die daraus resultierenden Abwehrmechanismen ermöglichen eine Anpassung der Pflanzen an die herrschenden Umgebungsbedingungen. Die Untersuchung der dabei stattfindenden molekularen Abläufe ist von hoher Bedeutung, da sie dazu beiträgt, die pflanzliche Resistenz gegenüber verschiedenen Stressszenarien zu verbessern und infolgedessen die Produktivität der Pflanzen zu steigern. In vielen Fällen erfolgt die Regulation der zellulären Signalwege über eine durch das Ubiquitin-26S Proteasomsystem vermittelte Proteolyse beteiligter regulatorischer Proteinkomponenten. Das Verändern des pflanzlichen Proteoms spielt somit eine wichtige Rolle bei der pflanzlichen Abwehr abiotischer und biotischer Stressfaktoren. E3 Ubiquitinligasen gewährleisten dabei die Spezifität des Systems, da sie für die Bindung der zu degradierenden Proteine verantwortlich sind.

In den nachfolgenden Kapiteln erfolgt eine Beschreibung des Ubiquitin-26S Proteasomsystems, der damit einhergehenden Ubiquitinierung von Zielproteinen und der daran beteiligten Komponenten. Des Weiteren wird ein Einblick in die Prozesse der Immunabwehr und der Autoimmunität in Pflanzen gegeben.

1.1. Das Ubiquitin-26S Proteasomsystem

Mithilfe des Ubiquitin-26S Proteasomsystems (UPS) werden regulatorische Proteine, die nicht mehr benötigt werden und missgefaltete Proteine abgebaut. Zu diesem Zweck werden sie postranslationell durch eine Konjugation mit dem Molekül Ubiquitin modifiziert. In *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) spielt die Ubiquitinierung von Proteinen eine zentrale Rolle. Über 6 % des gesamten pflanzlichen Proteoms sind an diesem Mechanismus beteiligt (Downes und Vierstra, 2005). Das Spektrum, der durch das UPS beeinflussten Prozesse reicht dabei von der pflanzlichen Entwicklung und den verschiedenen Hormonsignalwegen, über den Zellzyklus bis hin zur Immunabwehr von Pathogenen (Übersicht: Dreher und Callis, 2007).

1.1.1. Der Ablauf des Ubiquitin-abhängigen Proteinabbaus

Das Ubiquitin-26S Proteasomsystem (UPS) beginnt mit einer dreistufigen Reaktionskaskade, bei der ein oder mehrere Ubiquitinmoleküle auf ein spezifisches Zielprotein, das Substrat, übertragen werden (Abb. 1.1). In einem ersten Schritt katalysiert das Enzym E1 (Ubiquitin-aktivierendes Enzym) unter Verbrauch von ATP (Adenosintriphosphat) eine Aktivierung des Ubiquitins, indem eine Thioesterbindung zwischen dem Carboxy-terminalen Glycin des Ubiquitins und einem Cysteinrest des E1 erzeugt wird. Anschließend wird das Ubiquitin durch eine trans-Veresterung auf den Cysteinrest des Enzyms E2 (Ubiquitin-konjugierendes Enzym) übertragen. In einem nächsten Schritt erfolgt der Transfer des Ubiquitins auf das zu markierende Protein. Dieser Prozess wird mithilfe eines sogenannten E3 Enzyms (Ubiquitinligase) katalysiert, das das Substrat spezifisch erkennt. Die Übertragung des Ubiquitins erfolgt hierbei entweder direkt vom E2 auf das Protein oder indirekt durch einen Zwischenschritt, bei dem das Ubiquitin zunächst über eine Thioesterbindung an die E3 Ligase gebunden wird (Vierstra, 2009; Callis, 2014). Bei der Ubiquitinierung wird über den Carboxy-Terminus des Ubiquitins eine Isopeptidbindung mit der Aminogruppe eines Lysinrests des Zielproteins erzeugt (Chen und Sun, 2009). Dieser Vorgang kann mehrmals hintereinander durchlaufen werden, sodass eine Polyubiquitinkette entsteht. Das Protein-Ubiquitin-Konjugat wird mithilfe von Ubiquitin-Rezeptoren von dem 26S Proteasom erkannt und degradiert. Parallel dazu werden die gebundenen Ubiquitinmoleküle mithilfe von Deubiquitinierungsenzymen (DUBs) zurückgewonnen, sodass diese in weiteren Ubiquitinierungszyklen wiederverwendet werden können (Finley, 2009; Vierstra, 2009).

Einleitung

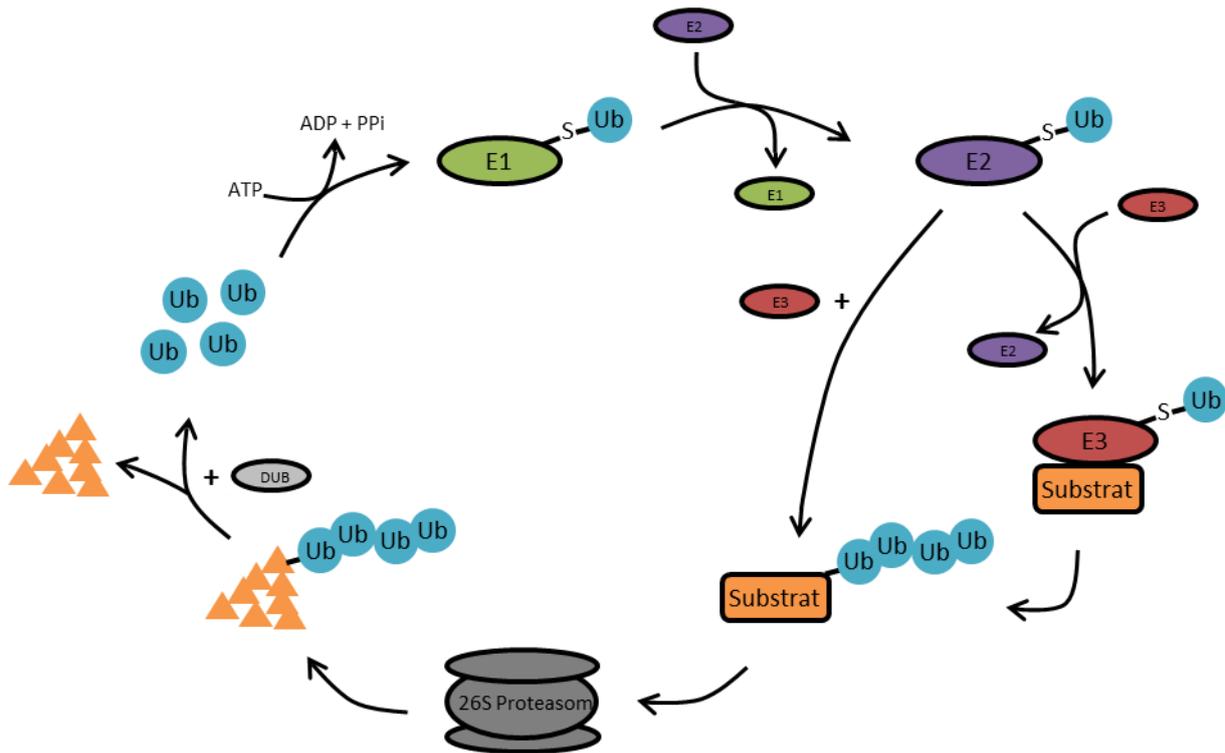


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Ubiquitin-26S Proteasomsystems. Das Enzym E1 (grün) katalysiert unter ATP-Verbrauch die Aktivierung des Ubiquitins (blau). Durch eine Thioesterbindung wird das Molekül zuerst auf E1, dann auf das Enzym E2 (violett) übertragen. Die Ubiquitinierung des Zielproteins (Substrat, orange) wird mithilfe des Enzyms E3 (rot) katalysiert. Der Transfer erfolgt entweder direkt vom E2 auf das Substrat oder indirekt, wobei in einem Zwischenschritt das Ubiquitin zunächst auf das E3 übertragen wird. Das ubiquitinierte Substrat wird von dem 26S Proteasom (dunkelgrau) erkannt und proteolytisch degradiert. Deubiquitinierungsenzyme (DUBs, hellgrau) katalysieren das Ablösen der Ubiquitinmoleküle, sodass diese wiederverwendet werden können (nach Vierstra, 2009).

Die Ubiquitinierung führt jedoch nicht in allen Fällen zu einem Proteinabbau. Zum einen handelt es sich bei der beschriebenen posttranslationalen Modifikation von Proteinen um einen reversiblen Mechanismus, der mithilfe von DUBs wieder rückgängig gemacht werden (Vierstra, 2009). Zum anderen kann die Ubiquitinierung von Proteinen zu einer Induktion von Signaltransduktionkaskaden führen oder die Lokalisierung bzw. die Aktivität der markierten Proteine beeinflussen (Callis, 2014).

1.1.2. Differentielle Ubiquitinierung von Proteinen

Das globuläre Protein Ubiquitin besteht aus 76 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 8,5 kDa. Hinsichtlich seiner Aminosäuresequenz handelt es sich um ein hochkonserviertes Protein, da sich die Sequenz zwischen tierischen, pflanzlichen und pilzlichen Ubiquitinen lediglich um zwei bis drei Aminosäuren unterscheidet (Callis, 2014).

Der Transfer eines Ubiquitins auf ein Zielprotein wird als Monoubiquitinierung bezeichnet. Werden mehrere Ubiquitinmoleküle mit verschiedenen Lysinresten des Zielproteins verknüpft, so wird dieser Vorgang als Multi-Monoubiquitinierung bezeichnet. Monoubiquitinierung spielt u. a. bei der Endozytose von Plasmamembranproteinen sowie der Regulation der Aktivität von Histonen eine Rolle (Übersicht: Hicke, 2001). Innerhalb der Ubiquitin-Aminosäuresequenz befinden sich sieben Lysinreste (Lys) (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48 und Lys63), die durch ein weiteres Ubiquitin zu einer Polyubiquitinkette konjugiert werden können (Chen und Sun, 2009). Bei der Polyubiquitinierung dient das erste Ubiquitinmolekül somit als „Akzeptor“, an den sukzessiv weitere Ubiquitine übertragen werden. Eine Molekülkette, die über den Lysinrest 48 (Lys48) verknüpft ist, führt zu einem proteolytischen Abbau des Proteins mithilfe des 26S Proteasoms (Ikeda und Dikic, 2008; Chen und Sun, 2009). Lys63-Polyubiquitinketten sind an einer Vielzahl von zellulären Prozessen, z. B. DNA-Reparaturmechanismen, Aktivität von Kinasen, Signaltransduktion sowie Endozytose beteiligt (Sadowski *et al.*, 2012). Lys11-verknüpfte Ubiquitinierungen dienen, ähnlich wie Lys48-Konjugationen, als Signal für den proteolytischen Abbau. Ubiquitinierungen über Lys33 spielen eine Rolle bei dem post-Golgi Membranproteintransport. Die Wirkungsweise der Verknüpfungen Lys6, Lys27 und Lys29 konnte bislang nicht vollständig entschlüsselt werden (Übersicht: Swatek und Komander, 2016).

In Saracco *et al.* (2009) und Kim *et al.* (2013) wurde das *Arabidopsis*-Proteom hinsichtlich von Ubiquitinierungen analysiert. Insgesamt wurden mehr als 1000 Proteine mit dieser postranslationellen Modifikation identifiziert. Ubiquitinketten mit einer Verknüpfung über Lys48, Lys63 sowie Lys11 konnten am häufigsten detektiert werden. Die Beteiligung der Lys48- und Lys11-Polyubiquitinierung an dem UPS wurde ebenfalls gezeigt, da die Menge dieser Ubiquitinverknüpfungen durch eine Behandlung der verwendeten Pflanzen mit dem Proteasominhibitor MG132 stark beeinflusst werden konnte (Kim *et al.*, 2013). Ein Beispiel für eine Ubiquitinierung über eine Lys48-Verknüpfung in *A. thaliana* ist der Blaulichtrezeptor CRY2 (CRYPTOCHROME2). CRY2 ist ein Kern-lokalisierter Photorezeptor, der die Lichtregulation bei der pflanzlichen Entwicklung und dem Pflanzenwachstum vermittelt. In Anwesenheit von blauem Licht erfolgt die Ubiquitinierung von CRY2. Das Protein wird anschließend abgebaut (Liu *et al.*, 2016). In Leitner *et al.* (2012) konnte gezeigt werden, dass der Auxin-Efflux-Carrier PIN2 (PIN-FORMED2) mit Lys63-Polyubiquitinketten modifiziert wird.

Die Polyubiquitinierung dient hierbei vermutlich als Signal zur endozytischen Internalisierung des Plasmamembran-ständigen Carrierproteins und zum Transport in die Vakuole. In Wang *et al.* (2009) konnte gezeigt werden, dass Lys29-Ubiquitinketten in einem zellfreien System zu einem Abbau des DELLA-Proteins RGA (REPRESSOR OF *ga1-3*) führen. Die Funktion der anderen Lys-Ubiquitinverknüpfungen in *A. thaliana* ist bislang ungeklärt.

1.1.3. E3 Ubiquitinligasen in *Arabidopsis thaliana*

Die E3 Ubiquitinligasen gewährleisten die Spezifität des UPS und der damit einhergehenden Ubiquitinierung, da sie für die Bindung der zu degradierenden Proteine verantwortlich sind. Mit über 1300 Genen, die für putative Ubiquitinligasen kodieren, ist die Gruppe der E3 Enzyme weitaus stärker vertreten als die der E1 und E2 Enzyme der Ubiquitinierungskaskade (Smalle und Vierstra, 2004). Mit UBA1 und UBA2 (UBIQUITIN ACTIVATING1 und 2) gibt es lediglich zwei Isoformen des E1 Enzyms in *Arabidopsis*. Des Weiteren werden 37 verschiedene E2-Isoformen exprimiert (Callis, 2014). Basierend auf ihrer Funktionsweise und ihrer Struktur wird zwischen vier Gruppen von E3 Enzymen unterschieden, den HECT- (HOMOLOGY TO E6-AP CARBOXY TERMINUS), RING- (REALLY INTERESTING NEW GENE), cullin-RING (CLR) -- und U-Box-Ubiquitinligasen (Vierstra, 2009). Der Aufbau dieser Proteine ist in Abbildung 1.2 schematisch dargestellt.

Proteine der Gruppe der HECT E3 Enzyme verfügen über einen konservierten Sequenzbereich, bestehend aus ca. 350 Aminosäuren, der homolog ist zum C-Terminus des humanen E6-assoziierten Proteins (E6-AP) (Downes *et al.*, 2003). E6-AP ist eine Ligase, die am Abbau des Tumorsuppressors p53 beteiligt ist (Huibregtse *et al.*, 1995). Im Gegensatz zu den anderen Gruppen der E3 Ubiquitinligasen katalysieren HECT Proteine keinen direkten, sondern einen indirekten Transfer des Ubiquitins vom E2 Enzym zum Substrat. Zunächst interagiert das E2 Enzym mit der HECT-Domäne des E3 (Abb. 1.2.A) und das Ubiquitinmolekül wird über eine Thioesterbindung an einen Cysteinrest innerhalb der HECT-Domäne des E3 Enzyms übertragen. Nach diesem Zwischenschritt wird das Ubiquitin an das zu markierende Substrat weitergegeben. In *A. thaliana* gibt es insgesamt sieben HECT-Proteine, die UPL1 bis UPL7 (UBIQUITIN PROTEIN LIGASE1 bis 7) genannt werden (Chen und Hellmann, 2013). In Bates und Vierstra (1999) wurde in *in vitro* Analysen eine Ubiquitinierungsaktivität des Proteins UPL1 nachgewiesen. Ein Substrat der E3 Ligase konnte bislang jedoch nicht identifiziert werden. Für UPL3 wird eine Funktion bei der Trichom-

entwicklung vermutet (Downes *et al.*, 2003). Das Protein UPL5 ist an der Regulation der Blattseneszenz beteiligt, da es die Ubiquitinierung und den darauffolgenden Abbau des Transkriptionsfaktors WRKY53 katalysiert (Miao und Zentgraf, 2010). Die Funktion der UPL-Proteine 2 und 4 ist bislang noch ungeklärt.

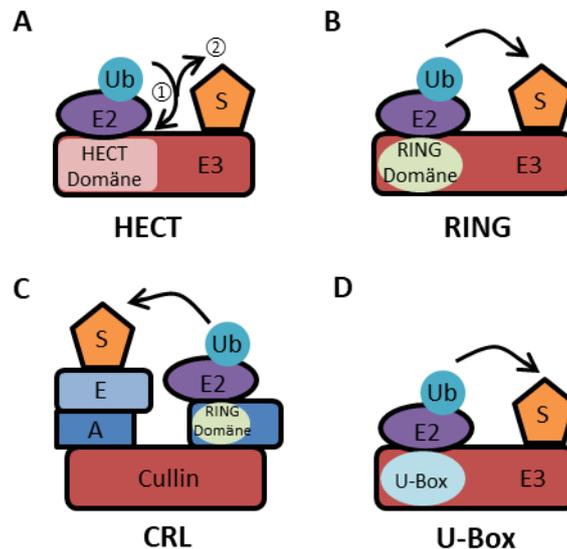


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Funktionsweise der pflanzlichen HECT-, RING-, U-Box- und CRL-E3 Ubiquitinligasen. **A:** HECT-E3 Ubiquitinligasen: E3 Enzyme dieser-Familie verfügen über eine HECT-Domäne (hellrot), über die die Interaktion mit dem E2 Enzym(violett) erfolgt. Das Ubiquitin (blau) wird zunächst auf die E3 Ligase übertragen, ehe es an das Substrat (S, orange) konjugiert wird. **B:** RING-E3 Ubiquitinligasen: Die Bindung des E2 Enzyms erfolgt über eine RING-Domäne (hellgrün), ehe das Ubiquitin auf das Substrat übertragen wird. **C:** CRL-E3 Ubiquitinligasen: Diese E3 Enzyme bestehen aus mehreren Proteinuntereinheiten. Das Cullin-Protein ist mit einer RING-Domäne-tragenden Untereinheit verbunden, über die die Erkennung des E2 Enzyms erfolgt. Das Substrat wird über eine Erkennungsproteineinheit (E, hellblau) gebunden, die wiederum über ein Adapterprotein (A, blau) mit der Cullin-Untereinheit verbunden ist. Infolgedessen erfolgt die Übertragung des Ubiquitins an das Substrat. **D:** U-Box-E3 Ubiquitinligasen: Das E2 Enzym interagiert über eine U-Box Domäne (hellblau) mit dem E3 Enzym, sodass das gebundene Substrat mit dem Ubiquitin markiert werden kann. (verändert nach Stone, 2014).

RING-E3 Ubiquitinligasen besitzen eine charakteristische RING-Domäne, die dem Motiv des Zinkfingers sehr ähnelt. Die Domäne besteht aus acht Cystein- und Histidinresten, die zwei Zinkionen binden können, sodass eine Querstrebenvernetzungsstruktur entsteht (Vierstra, 2009). Die RING-Domäne vermittelt die Bindung des E2 Enzyms, sodass eine direkte Übertragung des Ubiquitins auf das Substrat erfolgen kann (Abb. 1.2.B). In *A. thaliana* wurden 469 putative RING-E3 Ligasen identifiziert (Stone *et al.*, 2005). Aufgrund dieser hohen Anzahl sind die RING Proteine an vielen zellulären Abläufen beteiligt. Beispielsweise

ubiquitinieren die RING-E3 Ligasen DRIP1 und DRIP2 (DREB2A-INTERACTING PROTEIN1 und 2) den Transkriptionsfaktor DREB2A (DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN2A), sodass dieser proteolytisch degradiert wird. Infolgedessen wird eine regulatorische Funktion von DRIP1 und DRIP2 bei der Trockenstress-responsiven Genexpression in *Arabidopsis* vermutet (Qin *et al.*, 2008). Die E3 Ligase COP1 fungiert als negativer Regulator der Photomorphogenese, indem sie Aktivatoren von Licht-responsiven Genen ubiquitiniert und somit für den Abbau markiert (Qin *et al.*, 2008). Das Protein MIEL1 (MYB830-INTERACTING E3 LIGASE 1) ist an der Steuerung der Abscisinsäure-Signaltransduktion beteiligt, da es den Abbau der beiden Transkriptionsfaktoren MYB96 und MYB30 durch eine Konjugation mit Ubiquitin auslöst (Lee und Seo, 2016).

Die dritte und auch größte Gruppe der Ubiquitinligasen umfasst die sogenannten cullin-RING (CRL) Proteine. Diese E3 Enzyme bestehen, im Gegensatz zu den RING Proteinen, aus mehreren Untereinheiten, die als Komplex die Ubiquitin-Konjugation des Substrats vermitteln. Die zentrale Untereinheit dieses Komplexes besteht aus dem für CRL-Proteine charakteristischen Cullin (CUL)-Protein. Mit den Proteinen CUL1, CUL2, CUL3a, CUL3b, CUL4 und APC2 (ANAPHASE PROMOTING COMPLEX2) gibt es insgesamt sechs verschiedene CUL-Proteine in *A. thaliana* (Choi *et al.*, 2014). Am C-Terminus des CUL-Proteins erfolgt eine Interaktion mit dem Protein RBX1 (RING-BOX1), an dem wiederum die Bindung des Ubiquitin-konjugierten E2 Enzyms stattfindet. Am N-Terminus werden Adaptorproteine, die eine spezifische Substraterkennung gewährleisten, rekrutiert (Abb. 1.2.C). Als Adaptoren dienen hierbei u. a. Proteine der Familien F-Box, BTB (Broad complex Tramtrack Bric-a-Brac) und der DWD (DDB1 binding WD40). Der Transfer des Ubiquitins erfolgt bei den CRL direkt vom E2 Enzym auf das Substrat (Stone, 2014; Hua und Vierstra, 2011). Aufgrund ihrer strukturellen Diversität sind CRL-Proteine an einer Vielzahl biologischer Prozesse, z. B. Immunabwehr, DNA-Reparatur, Phytohormonsignalwege, Zellzyklus und Fettsäurebiosynthese in *A. thaliana* beteiligt (Übersicht: Chio *et al.*, 2014). Das bekannteste CRL-Protein ist der sogenannte SCF^{TIR1/AFB}-E3 Ubiquitinligase-Komplex, der als Auxin-Rezeptor fungiert. Das Auxin wird von dem F-Box Protein TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1) und den homologen Proteinen AFB1 bis 3 (AUXIN RECEPTOR F-BOX1 bis 3) gebunden und erhöht die Substrataffinität des CRL-Proteins für Aux/IAA (Auxin/*Indole-3-acetic-acid*) Proteine. Diese werden anschließend ubiquitiniert und proteolytisch degradiert. Infolgedessen erfolgt die Freisetzung von Transkriptionsfaktoren, den sogenannten Auxin-

responsiven Faktoren (ARFs), die die Auxin-responsive Genexpression regulieren (Stuttman *et al.*, 2009; Teale *et al.*, 2006).

U-Box-Ubiquitinligasen stellen die vierte Gruppe der E3 Enzyme dar. Diese Proteine besitzen ein ca. 70 Aminosäuren großes U-Box Motiv, das der Struktur des RING Fingers sehr ähnelt, jedoch keine Zink-komplexierenden Cystein- und Histidinreste enthält (Chen und Hellmann, 2013). Es wird angenommen, dass Salzbrücken und Wasserstoffbrückenbindungen die Stabilität des U-Box Motivs gewährleisten. Die U-Box vermittelt die Bindung des mit Ubiquitin-beladenen E2 Enzyms an die Ubiquitinligase. Parallel dazu erfolgt die spezifische Erkennung des zu markierenden Substrats, sodass das Ubiquitin direkt vom E2 auf das Substrat übertragen werden kann (Abb. 1.2.D). Pflanzliche U-Box E3 Enzyme werden als sogenannte PUBs (*Plant U-Box*) bezeichnet (Yee und Goring, 2009). In *A. thaliana* wurden insgesamt 64 PUB-Proteine (AtPUB) identifiziert (Callis, 2014). Basierend auf den neben der U-Box vorliegenden Proteindomänen (UFD2 (Ubiquitin Fusion Degradation2), *Armadillo* (ARM) *Repeats*, UND (U-box N-terminal domain), Serin/Threonin Kinase, WD40 *Repeats*) können die PUBs in fünf Gruppen unterteilt werden (Samuel *et al.*, 2008). Ferner gibt es die PUB-Proteine AtPUB49 und AtCHIP, die über eine C-terminale Cyclophilin-ähnliche Domäne bzw. Tetratricopeptid (TPR)-*Repeats* verfügen (Yee und Goring, 2009). Die PUB-ARM Proteine bilden mit 41 Mitgliedern die größte Gruppe der U-Box Proteine (Mudgil *et al.*, 2004). Diese Ubiquitinligasen enthalten neben der U-Box Domäne, sogenannte ARM-*Repeats*, die der direkten oder indirekten Substraterkennung dienen (Dreher und Callis, 2007). Ein ARM-*Repeat* besteht aus etwa 42 Aminosäuren, die drei α -Helices ausbilden. Bei mehreren hintereinandergeschalteten ARM-*Repeats* interagieren die α -Helices miteinander und formen so eine Superhelix, von der angenommen wird, dass sie der Protein-Protein Interaktion dient (Huber *et al.*, 1997; Coates, 2003). In *A. thaliana* fungieren PUBs als Signalproteine von Rezeptorkinasen und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Hormonsignaltransduktionskaskaden bei abiotischem und biotischem Stress (Übersicht: Sharma *et al.*, 2013). PUBs, die eine große Homologie in ihrer Primärstruktur zeigen, sind oftmals an identischen zellulären Prozessen beteiligt. Ein Beispiel hierfür sind die zu einem Cluster zusammengefassten homologen Proteine PUB22, 23 und 24, die als negative Regulatoren bei der pflanzlichen Immunantwort eine Rolle spielen (Trujillo *et al.*, 2008). Darüberhinaus sind PUB22 und PUB23 regulatorisch an der Trockenstressantwort beteiligt (Cho *et al.*, 2008). Im Gegensatz dazu sind die PUB-ARM Proteine PUB46 und 48 an der

pflanzlichen Toleranz gegenüber Wasserstress beteiligt, nicht jedoch ihr Homolog PUB47 (Adler *et al.*, 2017).

1.2. Immunabwehr in Pflanzen

Um sich gegen Pflanzenpathogene zur Wehr setzen zu können, haben Pflanzen im Laufe der Evolution ein komplexes Netzwerk aus Abwehrmechanismen entwickelt. Die erste Barriere, die dabei von Pathogenen überwunden werden muss, stellt die pflanzliche Zellwand dar, die mithilfe von Calloseeinlagerungen bei einer Infektion verstärkt werden kann (Spoel und Dong, 2012). In einem nächsten Schritt wird die basale Immunantwort (auch *PAMP-Triggered Immunity* (PTI) genannt) ausgelöst, indem Pathogen-assoziierte Moleküle von Rezeptoren, die in der pflanzlichen Zellmembran vorliegen, detektiert werden. Diese Immunantwort kann jedoch von einigen Bakterien durch die Sekretion sogenannter Effektormoleküle in die Pflanzenzelle unterdrückt werden, sodass sich die Pathogene im Apoplasten der Zelle vermehren können (*Effector-Triggered Susceptibility* (ETS)). Pflanzen verfügen jedoch über Resistenzproteine, die die sekretierten Effektorproteine oder deren Wirkung auf pflanzliche Zielproteine erkennen und so eine starke Immunantwort (*Effector-Triggered Immunity* (ETI)) induzieren (Bent und Mackey, 2007). Die ETI resultiert in einer sogenannten *Hypersensitive Response* (HR), die den programmierten Zelltod in den infizierten Zellen sowie die Produktion von antimikrobiellen Stoffen zur Abwehr der Pathogene auslöst (Spoel und Dong, 2012).

1.2.1. *Pamp-Triggered Immunity* (PTI)

Die Wahrnehmung von Pathogenen bei einer Infektion der Pflanzenzelle erfolgt mithilfe von membrangebundenen Rezeptor-ähnlichen Kinasen (*Receptor-like kinases* (RLK)) oder Rezeptor-ähnlichen Proteinen (*Receptor-like Proteins* (RLP)), den sogenannten *Pathogen Recognition Receptors* (PRR), (Spoel und Dong, 2012). Die PRRs erkennen dabei Pathogen-assoziierte Moleküle, die sogenannten MAMPs (*microbe-associated molecular patterns*) bzw. PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*). Bekannte PAMPs sind bakterielles Flagellin, Lipopolysaccharide, der Elongationsfaktor Tu (EF Tu), pilzliches Chitin sowie oomyzetisches Pep13 und Heptaglukoside (Bent und Mackey, 2007). Die RLKs bestehen aus einer extrazellulären Domäne, die der Bindung des jeweiligen MAMP-Liganden dient, einer Transmembran- sowie einer Kinase-Domäne. RLPs sind ähnlich aufgebaut, besitzen jedoch

keine Kinase-Domäne. Pflanzliche PRRs rekrutieren nach der Bindung des Liganden mithilfe der extrazellulären Domäne weitere regulatorische RLKs. Um die Aktivierung der membranständigen PRRs infolge der MAMP-Erkennung weitergeben zu können und die daraus resultierenden intrazellulären Signalwege der PTI zu initiieren, interagiert der PRR-Komplex mit cytoplasmatischen RLKs (*Receptor-like cytoplasmic kinases* (RLCK)) (Macho und Zipfel, 2014; Couto und Zipfel, 2016). Ein sehr gut untersuchtes PRR-Protein ist die *Leucin rich-repeat* (LRR) - Rezeptorkinase FLS2 (FLAGELLIN SENSITIVE2) in *A. thaliana*. FLS2 besteht aus einer extrazellulären LRR-Domäne, einer Transmembrandomäne sowie einer intrazellulären Serin/Threonin-Kinase-Domäne. Mittels der LRR-Domäne erfolgt die Erkennung des bakteriellen Flagellins 22 (flg22) (Spoel und Dong, 2012). Der aktivierte FLS2-Rezeptor interagiert mit dem Ko-Rezeptor BAK1 (BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE1). Der FLS2-BAK1-Komplex wiederum interagiert mit der RLCK BIK1 (BOTRYTIS-INDUCED KINASE 1). Infolgedessen phosphoryliert BAK1 das RLCK Protein BIK1, das wiederum die beiden Kinasen FLS2 und BAK1 phosphoryliert, ehe es aus dem Komplex dissoziiert, um nachgeschaltete Signalkomponenten der PTI zu aktivieren (Lu *et al.*, 2010, Zhang *et al.*, 2010). So phosphoryliert und aktiviert die BIK1 die Plasmamembran-lokalisierte NADPH-Oxidase RBOHD (RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG D), um die Produktion der *Reactive Oxygen Species* (ROS) zu induzieren. ROS spielen bei der Schließung der Stomata zur Abwehr von Pathogenen eine wichtige Rolle (Li *et al.*, 2014). Darüberhinaus wird die Aktivität der RBOHD durch eine Phosphorylierung, die durch die Calcium-abhängige Proteinkinase CPK5 katalysiert wird, gefördert, sodass eine ROS-basierte Signalweiterleitung in die benachbarten Zellen erfolgen kann (Dubiella *et al.*, 2013). Neben der ROS-Produktion führt die PRR-vermittelte Bindung von MAMPs zu einer Induktion von sogenannten *Mitogen-activated Protein Kinase* (MAPK) Kaskaden. Hierbei erfolgt in einem ersten Schritt die Stimulus-getriggerte Aktivierung einer MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAP3K, MEKK). Die aktivierte MAP3K phosphoryliert MAP-Kinase-Kinasen (MAP2K, MKK) und führt so wiederum zu deren Aktivierung. Anschließend katalysieren die MAP2Ks die Phosphorylierung von nachgeschalteten MAP-Kinasen, die ihrerseits Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und so zu einer transkriptionellen Reprogrammierung bzw. Aktivierung der Expression von Abwehr-assoziierten Genen führen (Rasmussen *et al.*, 2012). Beispielsweise wird in *A. thaliana* nach der Erkennung von flg22 eine MAPK-Kaskade bestehend aus der MAP3K

MEKK1, den beiden MAP2K MKK4 und 5 sowie den MAP-Kinasen 3 und 6 ausgelöst, die wiederum WRKY-Transkriptionsfaktoren aktivieren (Asai *et al.*, 2002).

Darüberhinaus kontrollieren MAP-Kinasen mithilfe der Phosphorylierung von Enzymen und anderen Zielproteinen ein komplexes Netzwerk an Immunreaktionen, mit denen sich Pflanzen gegen Pathogene zur Wehr setzen können. So kontrollieren MAPK die Synthese antimikrobieller Abwehrstoffe (z. B. Phytoalexin), die Schließung der Stomata, die Verdickung der Zellwand durch Einlagerungen von Callose und die Synthese pflanzlicher Hormone (z. B. Salicylsäure, Ethylen), die als sekundäre Signalmoleküle bei der Immunabwehr fungieren (Couto und Zipfel, 2016; Übersicht: Meng und Zhang, 2013).

1.2.2. Effector-Triggered Immunity (ETI)

Über das Typ-III-Sekretionssystem ist es einigen pathogenen Bakterien möglich, sogenannte Effektoren (auch Virulenzfaktoren (Avr) genannt) in die pflanzliche Zelle hineinzuschleusen und infolgedessen die *PAMP-Triggered Immunity* zu unterdrücken. Dieser Prozess wird als *Effector-Triggered Susceptibility* (ETS) bezeichnet und ermöglicht die Vermehrung des Pathogens im pflanzlichen Apoplasten (Bent und Mackey, 2007; Übersicht: Mudgett, 2005). Beispielsweise interagieren in *A. thaliana* die beiden Effektoren AvrPto und AvrPtoB aus *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 mit der jeweiligen Kinase-Domäne der RLKs FLS2, ERF (EF Tu RECEPTOR) sowie BAK1 und inhibieren so deren Kinaseaktivität bzw. verhindern die Bildung des FLS2-BAK1-Komplexes. Darüberhinaus verfügt AvrPtoB über eine C-terminale E3 Ubiquitinligase-ähnliche Domäne, die den Abbau von PRRs initiiert und so die basale Immunabwehr beeinträchtigt (Boller und He, 2009).

Um sich gegen die Effektoren zur Wehr setzen zu können, verfügen Pflanzen über intrazelluläre Immunrezeptoren, die sogenannten Resistenz (R)-Proteine, die die Effektor-moleküle spezifisch erkennen und so die *Effector-Triggered Immunity* (ETI) auslösen. Die ETI resultiert in einer *Hypersensitive Response* (HR), die den programmierten Zelltod in den infizierten und benachbarten Zellen sowie die Synthese antimikrobieller Moleküle, z. B. hydrolytische Enzyme (Chitinase, β -1,3-Glucanase) zur Pathogenabwehr induzieren (Spoel und Dong, 2012). Infolgedessen wird eine weitere Vermehrung der Pathogene eingegrenzt. Pflanzliche R-Proteine bestehen typischerweise aus einem variablen N-Terminus, einer *Nucleotide-binding site* (NBS)-Domäne und einer Carboxy-terminalen LRR-Domäne. Der N-Terminus der sogenannten NB-LRR Proteine umfasst entweder eine *Toll/Interleukin-1* (TIR)-

Rezeptordomäne oder eine *Coiled-Coil* (CC)-Domäne, sodass zwischen TIR-NB-LRR und CC-NB-LRR-Proteinen unterschieden wird (Elmore *et al.*, 2011). Die Erkennung der Effektoren kann zum einen durch eine direkte Bindung an den NB-LRR Immunrezeptor erfolgen. Zum anderen kann die Detektion der Effektoren über einen indirekten Prozess ablaufen, indem der Immunrezeptor mit anderen pflanzlichen Proteinen assoziiert, die durch Effektoren modifiziert werden (Jones und Dangl, 2006; Elmore *et al.*, 2011). In *A. thaliana* interagiert das Plasmamembran-assoziierte Protein RIN4 (RPM1-INTERACTING PROTEIN 4) mit den beiden R-Proteinen RPM1 (RESISTANCE TO PSEUDOMONAS SYRINGAE PV. MACULICOLA 1) und RPS2 (RESISTANCE TO PSEUDOMONAS SYRINGAE 2), sodass diese in einem inaktiven Zustand vorliegen. Bei einer *P. syringae* Infektion werden die beiden Effektoren AvrB und AvrRpm1 in die pflanzliche Zelle sekretiert und führen zu einer Phosphorylierung von RIN4. Diese Modifikation wird wiederum von RPM1 detektiert, sodass die pflanzlichen Abwehrreaktionen ausgelöst werden (Mackey, 2002; Chisholm *et al.*, 2006). Die Sekretion des Effektors AvrRpt2 führt zu einer Spaltung von RIN4, sodass RPS2 aktiviert und die ETI initiiert wird (Mackey *et al.*, 2003; Axtell und Staskawicz, 2003).

1.2.3. R-Protein vermittelte Autoimmunität in *Arabidopsis thaliana*

Aufgrund der drastischen Auswirkungen, die die Intitiation der ETI zur Folge hat, ist eine enge Steuerung der R-Protein vermittelten Immunantwort für das Überleben der Pflanze von entscheidender Bedeutung. Da eine Akkumulation von R-Proteinen oftmals zu auto-aktivierten Immunreaktionen führt, werden R-Proteine in geringen Mengen exprimiert und verbleiben in Abwesenheit von Pathogenen in einem inaktiven Zustand (Gou und Hua, 2012; Cheng *et al.*, 2011). *A. thaliana* Autoimmunitätsmutanten, bei denen aufgrund von Mutationen eine Dysregulation der R-Proteine vorliegt, verdeutlichen die drastischen Auswirkungen der Autoimmunität in Pflanzen. Anzeichen für eine auto-aktivierte Immunantwort spiegeln sich zunächst in einem deutlich verzögerten Wachstum (Zwergwuchs) der Pflanzen im Vergleich zu Wildtyppflanzen wieder. Darüberhinaus zeigen Autoimmunitätsmutanten eine konstitutive Expression Abwehr-relevanter *PR*-Gene, einen Anstieg des Salicylsäurelevels, eine erhöhte Resistenz gegenüber Pathogenen und in manchen Fällen die Bildung systemischer Läsionen (Cheng *et al.*, 2011; van Wersch *et al.*, 2016). Diese charakteristischen Merkmale treten oftmals in Abhängigkeit der umgebenden Temperatur auf.

Beispielsweise führt eine Punktmutation innerhalb der Sequenz des R-Gens *SNC1* (*SUPPRESSOR OF NPR1-1, CONSTITUTIVE1*) zu einer konstitutiven Expression des Proteins. Infolgedessen zeigen *snc1*-Mutanten bei einer Temperatur von 22°C einen kleinwüchsigen Autoimmunitätsphänotyp (Zhang *et al.*, 2003). Die Mutation des R-Gens *CHS1* (*CHILLING SENSITIVE1*) führt bei einer Temperatur von höchstens 16°C zu einem Zelltodphänotyp in *chs1*-Pflanzen (Wang *et al.*, 2013; Zbierzak *et al.*, 2013). Darüberhinaus kann eine Mutation von Proteinen, die als negative oder positive Regulatoren der Immunantwort fungieren, ebenfalls zu einer auto-aktivierten Immunabwehr führen, da diese oftmals eine Aktivierung von R-Proteinen zur Folge haben (van Wersch *et al.*, 2016). Das Copine Protein BON1 (*BONZAI1*) ist als negativer Regulator von *SNC1* an der Immunabwehr beteiligt. Darüberhinaus interagiert das Protein mit den beiden RLKs BAK1 und BIR1 (*BAK1-INTERACTION RECEPTOR KINASE1*). Bei einer Temperatur von 22°C zeigen *bon1-1* Mutanten ein stark verzögertes Wachstum, eine erhöhte *PR1*-Genexpression sowie eine erhöhte Resistenz gegenüber virulenten Pathogenen (Hua *et al.*, 2001; Yang und Hua, 2004).

1.2.4. PUB E3 Ubiquitinligasen bei der pflanzlichen Immunantwort

Die PUB E3 Ubiquitinligasen spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der pflanzlichen Immunabwehr. Die beiden Proteine PUB12 und PUB13 katalysieren die Ubiquitinierung der LRR-Rezeptorkinase FLS2 in *A. thaliana*. Die E3 Ubiquitinligasen assoziieren mit dem Immunrezeptor BAK1. In Anwesenheit des PAMPs flg22 werden PUB12 und PUB13 von BAK1 phosphoryliert und bilden einen Komplex mit FLS2. Die Rezeptorkinase wird von den E3 Ubiquitinligasen polyubiquitiniert (Lu *et al.*, 2011). In Wildtyppflanzen konnte eine Reduktion an FLS2 nach einer Behandlung der Pflanzen mit flg22 beobachtet werden. Im Vergleich dazu blieb die FLS2-Menge in der *pub12-2 pub13* Mutante, bei der keine Expression der beiden E3 Ubiquitinligasen vorlag, unverändert. Somit wird angenommen, dass die Rezeptorkinase infolge der Polyubiquitinierung durch PUB12 und PUB13 proteolytisch degradiert wird (Lu *et al.*, 2011). Alternativ dazu wurde in Robatzek *et al.* (2006) gezeigt, dass in Anwesenheit von flg22 eine endozytotische Internalisierung von FLS2 erfolgt. Anschließend erfolgt die Degradation der Rezeptorkinase in der Vakuole. Ein möglicher Zusammenhang zwischen der FLS2-Endozytose und der Ubiquitinierung des Proteins wird nicht ausgeschlossen (Robatzek *et al.*, 2006; Geldner und Robatzek, 2008). In Liao *et al.* (2017) konnte gezeigt werden, dass PUB13 mit der Rezeptorkinase LYK5 (*LYSIN MOTIF RECEPTOR KINASE5*) einen Komplex bildet

und so dessen Aktivität bei einem Pathogenbefall reguliert. LYK5 ist für die Erkennung von pilzlichen Chitooligosacchariden (COs) verantwortlich und interagiert daraufhin mit der Rezeptorkinase CERK1 (CHITIN ELICITOR RECEPTOR KINASE1), um so die pflanzliche Immunabwehr zu induzieren (Cao *et al.*, 2014). In Abwesenheit von COs interagiert PUB13 mit LYK5, ubiquitiniert die Rezeptorkinase und sorgt so für deren Abbau. Sind COs infolge eines Pathogenbefalls vorhanden, wird PUB13 von LYK5 losgelöst, sodass LYK5 nicht mehr abgebaut und die Immunantwort induziert werden kann (Liao *et al.*, 2017). Für die E3 Ubiquitinligase PUB17 wird eine Funktion als positiver Regulator bei der Immunantwort in *A. thaliana* angenommen. So konnte bei der Mutante *pub17-3* eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber virulenten und avirulenten *P. syringae* pv. *tomato* Stämmen festgestellt werden (Yang *et al.*, 2006). PUB17 ist ein Homolog zu dem U-Box Protein ACRE276 aus *Nicotiana tabacum* (*N. tabacum*). Transgene Cf9-Tabakpflanzen, die das RLK-Protein Cf9 aus der Tomate (*Lycopersicon esculentum*) exprimieren, zeigen bei einer Behandlung mit dem Effektor Avr9 aus *Cladosporium fulvum* eine HR. In Pflanzen, die das Protein ACRE276 nicht synthetisieren, wird die HR unterdrückt. Infolge einer transienten Expression von PUB17 konnte eine Wiederherstellung der HR bei einer Avr9-Behandlung nachgewiesen werden (Yang *et al.*, 2006). In *A. thaliana* fungieren die drei E3 Ubiquitinligasen PUB22, PUB23 und PUB24 als negative Regulatoren der Immunantwort. Bei der Dreifachmutante *pub22 pub23 pub24* wurde in Anwesenheit verschiedener PAMPs eine verstärkte Immunreaktion festgestellt. Die Pflanzen zeigten einen Anstieg der ROS-Produktion, eine erhöhte transkriptionelle Aktivierung immunspezifischer Gene und eine verstärkte Resistenz gegenüber Pathogenen (Trujillo *et al.*, 2008). In Stegmann *et al.* (2012) konnte gezeigt werden, dass die E3 Ubiquitinligase PUB22 in Anwesenheit des PAMPs flg22 die Ubiquitinierung und den daraus resultierenden Abbau des Proteins Exo70B2 in *Arabidopsis* katalysiert. Exo70B2 ist eine Untereinheit des Exocystkomplexes, der bei der Verschmelzung der Vesikel mit der Plasmamembran eine wichtige Rolle spielt. Die Untereinheit ist an der Aktivierung der Immunantwort bei einem Pathogenbefall der Pflanzen beteiligt. Mutanten, die kein Exo70B2 exprimieren, zeigen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. Es wird vermutet, dass die in Anwesenheit von Pathogenen induzierte Immunantwort durch den PUB22 vermittelten Abbau von Exo70B2 wieder abgeschwächt werden soll (Stegmann *et al.*, 2012). In einer weiteren Studie konnte festgestellt werden, dass eine von der MAP Kinase MPK3 katalysierte Phosphorylierung die Aktivität von PUB22

reguliert. In Anwesenheit des PAMPs flg22 erfolgt die Phosphorylierung der E3 Ubiquitinligase, die eine Oligomerisierung des Proteins verhindert. Infolgedessen wird die autokatalytische Ubiquitinierung von PUB22 inhibiert, das Protein akkumuliert und kann die Immunantwort negativ beeinflussen (Furlan *et al.*, 2017).

1.2.5. Die PUB-ARM Proteine PUB42, PUB43 und PUB44

Hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisierung sind die PUB Proteine in *A. thaliana* vorwiegend im Cytosol oder im Zellkern zu finden (Samuel *et al.*, 2008; Drechsel *et al.*, 2011). Eine Ausnahme bilden hierbei das Protein PUB44 (nachfolgend als SAUL1 (SENESCENCE ASSOCIATED UBIQUITIN LIGASE1) bezeichnet) sowie seine beiden paralogen Proteine PUB43 und PUB42. Die Analyse von SAUL1-GFP-, GFP-PUB43- und GFP-PUB42-Fusionsproteinen in transformierten *Arabidopsis* Protoplasten ergab eine Lokalisierung der Proteine an der Plasmamembran (Abb. 1.3.A) (Drechsel *et al.*, 2011). Aufgrund ihrer Struktur, die aus einer N-terminalen U-Box Domäne sowie mehreren hintereinander liegenden ARM-*Repeats* besteht (Abb. 1.3.B), werden diese Proteine der Gruppe der PUB-ARM Ubiquitinligasen zugeordnet. Anhand einer phylogenetischen Analyse durch einen Vergleich der U-Box Sequenz konnte festgestellt werden, dass die Proteine SAUL1, PUB42 und PUB43 innerhalb der PUB-ARM Proteinfamilie einen eigenen Seitenzweig bilden (Mudgil *et al.*, 2004). Hierbei zeigen die drei Ubiquitinligasen eine hohe Sequenzhomologie, wobei PUB43 das nächstparaloge Protein zu SAUL1 darstellt (Abb. 1.3.B). Darüberhinaus unterscheiden sich die drei Proteine aufgrund eines verlängerten C-Terminus und der hohen Anzahl an ARM-Repeat-Domänen deutlich von den anderen Mitgliedern der PUB-ARM Proteine (Mudgil *et al.*, 2004). In Drechsel *et al.* (2011) konnte gezeigt werden, dass die C-terminalen ARM-*Repeats* 7 bis 11 für die Assoziation von SAUL1 mit der Plasmamembran essentiell sind. Eine Deletion dieses Sequenzbereiches führte zu einer Translokation des Fusionsproteins SAUL1 Δ ARM₇₋₁₁-GFP in das Cytosol. Die plasmamembrane Lokalisierung des nächsthomologen Proteins PUB43 wird ebenfalls durch die C-terminalen ARM-*Repeats* 7 bis 12 vermittelt (Vogelmann *et al.*, 2014). Ob die ARM-Motive ebenfalls an der Assoziation von PUB42 mit der Plasmamembran involviert sind, konnte bislang noch nicht geklärt werden.

Einleitung

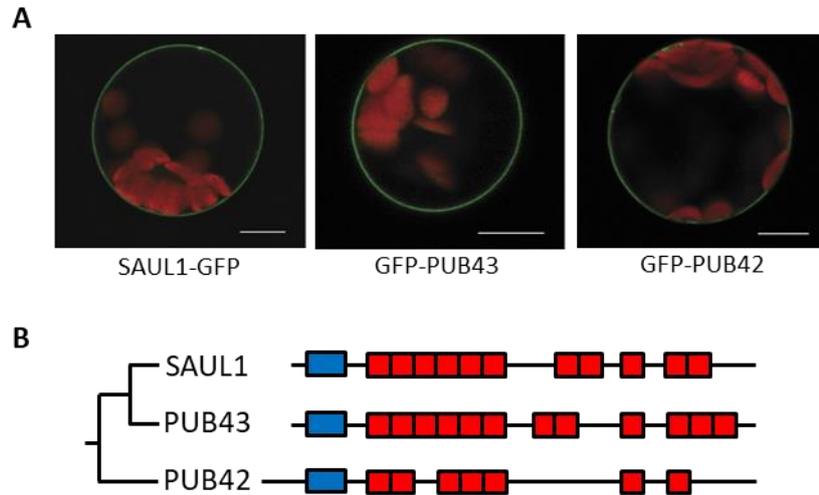


Abb. 1.3: Subzelluläre Lokalisierung und schematische Darstellung des Aufbaus der PUB-ARM Proteine SAUL1, PUB43 und PUB42. **A:** Subzelluläre Lokalisierung der Fusionsproteine SAUL1-GFP, GFP-PUB43 und GFP-PUB42 in Mesophyllprotoplasten aus *A. thaliana*. Die jeweiligen GFP-Signale sind an der Plasmamembran zu erkennen. Die Chloroplasten erscheinen infolge der Autofluoreszenz in rot. Maßstab = 10 μm (Drechsel *et al.*, 2011). **B:** Phylogenetische Analyse und Aufbau von SAUL1, Pub43 und PUB42. Anhand der Sequenzanalyse der U-Box-Domänen wurden die Proteine in einer Gruppe zusammengefasst, wobei PUB43 eine höhere Sequenzhomologie zu SAUL1 besitzt als PUB42. Die Proteine bestehen jeweils aus einer am N-Terminus liegenden U-Box (blau) sowie mehreren ARM-Repeats (rot) (verändert nach Mudgil *et al.*, 2004).

Von den drei Plasmamembran-assoziierten PUB-ARM Proteinen in *A. thaliana* ist SAUL1 das bislang am intensivsten analysierte Protein. Die Funktionsweise als E3 Ubiquitinligase konnte für SAUL1 mithilfe eines *in vitro* Ubiquitinierungsassays nachgewiesen werden (Raab *et al.*, 2009). Die Analyse der T-DNA-Insertionsmutanten *saul1-1* und *saul1-2*, bei der keine SAUL1-Expression erfolgt, ergab, dass die Pflanzen unter Niedriglichtbedingungen, d.h. bei einer PFD (*Photon Flux Density*) von unter $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ im Gegensatz zu Wildtyppflanzen eine deutliche Gelbfärbung der Blätter sowie ein verzögertes Wachstum zeigten. Eine Verringerung des Chlorophyllgehalts und der Photosyntheseaktivität konnte ebenfalls festgestellt werden. Zusätzlich wurde ein Anstieg der Expression von Genen, die im Zusammenhang mit pflanzlicher Seneszenz und Zelltod stehen, z. B. *SAG13* (*SENESCENCE-ASSOCIATED GENE13*) und *ORE1* (*ORESARA1*) sowie ein Anstieg des Abscisinsäuregehalts in den *saul1-1* Pflanzen beobachtet. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für SAUL1 eine Funktion als Suppressor der vorzeitigen Seneszenz und des verfrühten Zelltods in *A. thaliana* angenommen (Raab *et al.*, 2009, Vogelmann *et al.*, 2012). In Disch *et al.* (2016) konnte gezeigt werden, dass der charakteristische *saul1-1* Phänotyp sowohl durch eine niedrige Luftfeuchtigkeit von 39 % als auch durch eine niedrige Temperatur von unter 25°C induziert

werden kann. Durch das gleichzeitige Ausschalten der Gene *EDS1* (*ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1*) und *PAD4* (*PHYTOALEXIN DEFICIENT4*) in den Doppelmutanten *saul1-1 pad4-1* und *saul1-1 eds1-2* konnte eine Aufhebung des *saul1-1* Phänotyps beobachtet werden (Vogelmann *et al.*, 2012, Disch *et al.*, 2016). Infolge einer Veränderung der Umgebungstemperatur von 25°C auf 20°C wurde ein Anstieg der Expression der Gene *PR1* und *PR2* (*PATHOGENESIS-RELATED1* und *2*) sowie *PAD4*, die an der pflanzlichen Immunabwehr beteiligt sind, in den *saul1-1* Mutanten nachgewiesen (Disch *et al.*, 2016). Auf zellulärer Ebene wurde eine Verdickung der Zellwand beobachtet. Ferner wurden Veränderungen in der Chloroplastenstruktur festgestellt. Zum einen verloren Thylakoidmembranen ihre Integrität und zum anderen stieg die Anzahl und Größe der Plastoglobuli an. Darüberhinaus wurde bei den *saul1-1* Pflanzen eine erhöhte Resistenz gegenüber verschiedenen *Pseudomonas syringae* Stämmen und dem Oomyzeten *Hyaloperonospora arabidopsidis* Noco2 ermittelt (Disch *et al.*, 2016). Die *saul1-1* Mutante zeigt somit phänotypische und molekulare Merkmale, die bei sogenannten Autoimmunitätsmutanten, z. B. *bon1-1* und *snc1* aufgrund einer auto-aktivierten Immunreaktion auftreten. Infolgedessen wurde vermutet, dass SAUL1 eine Rolle bei der pflanzlichen Immunabwehr spielen könnte. Es wurde angenommen, dass die E3 Ligase eine regulatorische Funktion besitzt, indem sie einen positiven Regulator der Immunantwort oberhalb des EDS1/PAD4 Signalweges inaktiviert und so in Wildtyppflanzen das vorzeitige Auslösen von Abwehrreaktionen verhindert (Disch *et al.*, 2016). In Tong *et al.* (2017) konnte der Autoimmunitätsphänotyp der *saul1-1* Mutante mithilfe eines *Suppressor Screenings* auf eine Aktivierung des TIR-NB-LRR-Immurrezeptors SUSA1 (*SUPPRESSOR of saul1-1*), auch SOC3 (*SUPPRESSOR of chs1-2, 3*) (Zhang *et al.*, 2017) genannt, zurückgeführt werden. Die Funktionsweise von SOC3 als SAUL1-Suppressor konnte sowohl in *saul1-1 soc3* Doppelmutanten als auch in SAUL1-überexprimierenden Pflanzen mit einer *SOC3*-Mutation (*35S::SAUL1 soc3* genannt) anhand der Aufhebung des charakteristischen Autoimmunitätsphänotyps beobachtet werden. Darüberhinaus wurde die erhöhte Resistenz von SAUL1-überexprimierenden Pflanzen gegenüber dem Oomyzeten *H. arabidopsidis* Noco2 sowie avirulenten *P. syringae* Stämmen in *35S::SAUL1 soc3* Pflanzen wieder rückgängig gemacht (Tong *et al.*, 2017). Eine direkte Interaktion von SAUL1 und SOC3 *in planta* konnte nicht nachgewiesen werden. Da beide Proteine jedoch mit dem R-Protein CHS1 (*CHILLING SENSITIVE1*) interagieren, wird eine Komplexbildung der Proteine miteinander vermutet

(Kotur, 2016; Tong *et al.*, 2017). Es wird angenommen, dass SAUL1 als positiver Regulator der Immunantwort fungiert und dass die SAUL1-Homöostase infolge der Komplexbildung durch den Immunrezeptor SOC3 bewacht wird. Infolgedessen wird eine vorzeitige Induktion der ETI verhindert. Aufgrund der fehlenden SAUL1-Moleküle in *saul1-1* Mutanten wird SOC3 bei niedrigen Temperaturen aktiviert und die ETI ausgelöst. Der charakteristische Autoimmunitätsphänotyp entsteht. Ferner wird angenommen, dass SAUL1 bei einem Pathogenbefall für die Ubiquitinierung eines spezifischen Substrats und den damit verbundenen proteosomalen Abbau verantwortlich ist, sodass die durch das Substrat unterdrückte PTI stattfinden kann (Tong *et al.*, 2017).

PUB43 ist das nächstparaloge Protein zu SAUL1. Bei der phänotypischen Analyse der T-DNA Insertionslinie *pub43-1* konnten im Gegensatz zu den *saul1-1* Pflanzen keine morphologischen Veränderungen beobachtet werden (Salt *et al.*, 2011; persönliche Mitteilung, Johannes Bergler und Stefan Hoth, Abteilung für Molekulare Pflanzenphysiologie, Universität Hamburg). Mit Hinblick auf die intrazelluläre Funktion wird eine Beteiligung an der pflanzlichen Immunantwort, im Speziellen der PTI vermutet. Da in der *saul1-1 soc3 pub43-1* Dreifachmutante ein signifikanter Anstieg der Resistenz gegenüber *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 hrcC im Vergleich zu den Doppelmutanten *saul1-1 soc3* und *pub43 soc3* nachgewiesen werden konnte, wird eine funktionale Redundanz von SAUL1 und PUB43 angenommen (Tong *et al.*, 2017). Anhand von Microarray-Analysen konnte festgestellt werden, dass PUB43 im Vergleich zu SAUL1 weitaus stärker in den verschiedenen pflanzlichen Geweben exprimiert wird (Salt *et al.*, 2011).

Neben der in Drechsel *et al.* (2011) erfolgten Analyse der subzellulären Lokalisierung von PUB42 in *A. thaliana* sind nur wenige experimentelle Daten hinsichtlich der Funktionsweise des PUB ARM-Proteins in der Literatur zu finden. Im Rahmen der Masterarbeit von Nina Danzberger (2010) wurden Untersuchungen zur Charakterisierung des PUB42 Proteins durchgeführt. Das höchste Expressionslevel von PUB42 wurde in den Wurzeln von *A. thaliana* Pflanzen nachgewiesen. Des Weiteren erfolgte eine phänotypische Analyse der T-DNA Insertionsmutanten *pub42-1* und *pub42-2* bei einer Anzucht unter verschiedenen Stressbedingungen (Trocken-, Wasser-, Kälte-, Salzstress, Behandlung mit Abscisinsäure). Im Vergleich zu Wildtyppflanzen konnten jedoch keine morphologischen Veränderungen infolge

Einleitung

der verschiedenen abiotischen Stressfaktoren festgestellt werden. Die Funktion von PUB42 in *A. thaliana* bleibt demnach bislang ungeklärt.

1.3. Zielsetzung dieser Arbeit

Pflanzen verfügen über ein komplexes System aus Abwehrmechanismen, um auf die verschiedenen biotischen und abiotischen Stressfaktoren zu reagieren und sich der stetig verändernden Umgebung anzupassen. Die Steuerung der dabei stattfindenden zellulären Abwehrprozesse erfolgt u. a. mithilfe des Ubiquitin-26S Proteasomsystems. Die Spezifität dieses Systems wird durch sogenannte E3 Ubiquitinligasen gewährleistet. Die E3 Ubiquitinligase SAUL1 (auch PUB44 genannt) ist ein Plasmamembran-assoziiertes Protein, welches ein positiver Regulator von PTI ist. Im Gegensatz dazu war die Funktion der SAUL1-paralogen Proteine PUB43 und PUB42 zu Beginn dieser Doktorarbeit unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss von SAUL1 und seinen paralogen Proteinen auf die immunspezifische Genexpression in *A. thaliana* mithilfe phänotypischer und molekularer Analysen von Überexpressions- und T-DNA Insertionslinien untersucht werden. Des Weiteren sollte die Funktion von SAUL1 anhand der Identifikation von Interaktionspartnern charakterisiert werden. Hierfür sollten zwei verschiedene Strategien verfolgt werden. Zum einen sollten putative Interaktoren mithilfe einer Tandemaffinitätsaufreinigung aus pflanzlichen Zellkulturen isoliert werden. Zum anderen sollten Proteine, bei denen eine Wechselwirkung mit SAUL1 aufgrund ähnlicher Eigenschaften in *A. thaliana* vermutet wurde, auf eine Interaktion mit der E3 Ubiquitinligase hin überprüft werden. In einem weiteren Projekt sollte die Topologie von SAUL1 an der Plasmamembran mithilfe mikroskopischer und biochemischer Verfahren analysiert werden, um herauszufinden inwiefern SAUL1 mit der Membran *in planta* assoziiert.

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzen

Die in dieser Arbeit verwendeten Pflanzenlinien sind in den Tabellen 2.1, 2.2 und 2.3 aufgeführt.

Tabelle 2.1: Verwendete Wildtypen (WT)-Pflanzenlinien

Linie	Kurzform	Referenz
Columbia-0	Col-0	<i>Arabidopsis</i> Sequenzierungsprojekt, LEHLE SEEDS, Round Rock, USA
<i>saul1-1</i> WT	-	Segregierender WT der Linie SALK_063974
<i>pub42-2</i> WT	-	Segregierender WT der Linie SALK_133987

Tabelle 2.2: Verwendete T-DNA Insertionslinien

Mutiertes Allel	Hintergrund	verändertes Gen	Referenz
<i>bon1</i>	Col-0	At5g61900	SALK_070435
<i>saul1-1</i>	Col-0	At1g20780	SALK_063974
<i>pub42-2</i>	Col-0	At1g68940	SALK_133987
<i>pub42-2 saul1-1</i>	Col-0	At1g68940 At1g20780	in dieser Arbeit erstellt

Tabelle 2.3: Verwendete Proteinüberexpressionslinien

Linie	Hintergrund	Konstrukt	Referenz
GFP	Col-0	pUQC477_35S::GFP	Brosnan <i>et al.</i> , 2007
GFP-PUB43 (KV29)	Col-0	pMDC43_35S::GFP-PUB43	Katja Vogelmann, Stefan Hoth, Universität Hamburg
YFP-SAUL1 (GD41)	Col-0	pEarleyGate104_35S::YFP_SAUL1	Drechsel <i>et al.</i> , 2011
SAUL1-GFP	<i>saul1-1</i>	pK7FWG2.0_35S::SAUL1-GFP	Raab <i>et al.</i> , 2009

2.2. Organismen

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind der Tabelle 2.4 zu entnehmen.

Tabelle 2.4: Verwendete Bakterienstämme

Bezeichnung	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F- endA1, hsdR17 (rk-, mk-) supE44, thi-1 recA1 gyrA96 relA1 Φ 80d lacZ[Δ]M15	Hanahan, 1983
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] Δ hsdS λ DE3 = λ sBamHIo Δ EcoRI-B int::[lacI::PlacUV5::T7 gene1] i21 Δ nin5	New England Biolabs Inc., Frankfurt am Main, Deutschland
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58C1	pGV2260 in C58C1	Deblaere <i>et al.</i> 1985

2.3. Antikörper

Die Antikörper, die zur Immundetektion von Proteinen nach einem Western Blot (Abschnitt 2.12.11) verwendet wurden, sind in der Tabelle 2.5 aufgelistet.

Tabelle 2.5: Verwendete Antikörper zur Immundetektion

Bezeichnung	Verdünnung	Referenz
Ziege anti-Kaninchen Meerrettichperoxidase IgG Antikörper,	1:5000	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
anti-GFP Antikörper aus Kaninchen	1:2500	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
anti-HA Antikörper aus Kaninchen	1:1000	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ziege anti-Maus Meerrettichperoxidase IgG Antikörper,	1:5000	Abcam, Cambridge, England
Anti-Glutathion-S-Transferase Antikörper aus Kaninchen	1:5000	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Penta-His Antikörper aus Maus	1:2000	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.4. Vektoren

Die Vektoren, die innerhalb dieser Arbeit verwendet wurden, sind in der folgenden Tabelle 2.6 aufgeführt.

Tabelle 2.6: Verwendete Ausgangsvektoren

Bezeichnung	Resistenz	Referenz
pJET1.2/blunt	Ampicillin	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
pGEX_6P_1	Ampicillin	GE Healthcare Life Sciences, Amersham, Großbritannien
pQE80L	Ampicillin	Qiagen, Hilden, Deutschland
pENTR-D/TOPO	Kanamycin	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
pDONR™221	Kanamycin	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
pDONR™221-P1P4	Kanamycin	Life Technologies, Paisley, Großbritannien
pDONR™221-P3P2	Kanamycin	Life Technologies, Paisley, Großbritannien
pBiFC2in1 NN	Spectinomycin / X-Gal*	Grefen und Blatt, 2012
pBiFC2in1 NC	Spectinomycin / X-Gal*	Grefen und Blatt, 2012
pBiFC2in1 CN	Spectinomycin / X-Gal*	Grefen und Blatt, 2012
pBiFC2in1 CC	Spectinomycin / X-Gal*	Grefen und Blatt, 2012

Tabelle 2.6: Verwendete Ausgangsvektoren

pGWB614	Spectinomycin	Nakamura <i>et al.</i> 2010
pK7FWG2.0	Spectinomycin	Karimi <i>et al.</i> 2002
pEarleygate104	Kanamycin	Earley <i>et al.</i> , 2006

* = 5-Brom-4-chlor-3-Indoxyl- β -D-galactopyranosid

2.4.1. Konstrukte für Interaktionsstudien

Die Konstrukte, die im Rahmen dieser Arbeit zur Durchführung der Interaktionsstudien hergestellt wurden, sind in den nachfolgenden Tabellen aufgeführt.

Tabelle 2.7: Auflistung der erstellten pDONR221-Konstrukte und der dazugehörigen Glycerindauerkulturen

Ausgangsvektor	Insert	ID
pDONR221 TM	SAUL1 ohne Stopp	bCB150
pDONR221 TM	SAUL1_ΔU-Box ohne Stopp	bCB180
pDONR221 TM -P1P4	AtKRP125	bJM98
pDONR221 TM -P1P4	AtKRP125 ohne Stopp	bJM99
pDONR221 TM -P3P2	AtKRP125	bJM100
pDONR221 TM -P1P4	SAUL1 ohne Stopp	bJM97a
pDONR221 TM -P3P2	SAUL1 ohne Stopp	bJM97b
pDONR221 TM -P3P2	SAUL1	bCB360
pDONR221 TM -P1P4	SAUL1	bCB362
pDONR221 TM -P1P4	BON1	bJM64
pDONR221 TM -P1P4	BON1 ohne Stopp	bJM66
pDONR221 TM -P3P2	BON1	bJM67
pDONR221 TM -P1P4	BAP1	bJM68
pDONR221 TM -P1P4	BAP1 ohne Stopp	bJM69
pDONR221 TM -P3P2	BAP1	bJM70
pDONR221 TM -P1P4	LORE	bJM89
pDONR221 TM -P1P4	LORE ohne Stopp	bJM90
pDONR221 TM -P3P2	LORE	bJM91
pDONR221 TM -P3P2	LORE ohne Stopp	bJM92
pDONR221 TM -P1P4	LORE-KD	bJM93
pDONR221 TM -P1P4	LORE-KD ohne Stopp	bJM94
pDONR221 TM -P3P2	LORE-KD	bJM95
pDONR221 TM -P3P2	LORE-KD ohne Stopp	bJM96
pDONR221 TM -P3P2	SAUL1_ΔARM ₇₋₁₁ ohne Stopp	bCB240
pDONR221 TM -P3P2	SAUL1_ΔARM ₇₋₁₁	bCB363
pDONR221 TM -P1P4	SAUL1_ΔARM ₇₋₁₁	bCB365
pDONR221 TM -P1P4	PUB43 ohne Stopp	bCB244
pDONR221 TM -P3P2	PUB43 ohne Stopp	bCB248
pDONR221 TM -P3P2	PUB43	bCB367
pDONR221 TM -P1P4	PUB43	bCB369
pDONR221 TM -P3P2	BON1_ΔVWA	bJM166
pDONR221 TM -P3P2	BON1-VWA	bJM167

Tabelle 2.8: Auflistung der erstellten pBiFC2in1-Konstrukte und der dazugehörigen Glycerindauerkulturen

Ausgangsvektor	Insert mit YFP^N fusioniert	Insert mit YFP^C fusioniert	ID
pBiFC2in1 NC	AtKRP125	SAUL1	bJM115
pBiFC2in1 CN	SAUL1	AtKRP125	bJM116
pBiFC2in1 CC	SAUL1	AtKRP125	bJM114
pBiFC2in1 NN	BON1	BAP1	bJM87
pBiFC2in1 NN	BAP1	BON1	bJM88
pBiFC2in1 CN	SAUL1	BON1	bJM82
pBiFC2in1 CN	SAUL1	BAP1	bJM82
pBiFC2in1 CC	SAUL1	BON1	bJM83
pBiFC2in1 CC	SAUL1	BAP1	bJM84
pBiFC2in1 NC	BON1	SAUL1	bJM85
pBiFC2in1 NC	BAP1	SAUL1	bJM86
pBiFC2in1 NN	SAUL1	BON1	bCB378
pBiFC2in1 NN	SAUL1	BAP1	bCB379
pBiFC2in1 NC	SAUL1	BON1	bCB380
pBiFC2in1 CN	SAUL1	LORE	bJM105
pBiFC2in1 CN	SAUL1	LORE-KD	bJM106
pBiFC2in1 CC	SAUL1	LORE	bJM107
pBiFC2in1 CC	SAUL1	LORE-KD	bJM108
pBiFC2in1 CC	LORE	SAUL1	bJM109
pBiFC2in1 CC	LORE-KD	SAUL1	bJM110
pBiFC2in1 NC	LORE	SAUL1	bJM111
pBiFC2in1 NC	LORE-KD	SAUL1	bJM112
pBiFC2in1 CN	SAUL1_ΔARM ₇₋₁₁	BON1	bCB307
pBiFC2in1 CN	SAUL1_ΔARM ₇₋₁₁	BAP1	bCB311
pBiFC2in1 CC	SAUL1_ΔARM ₇₋₁₁	BON1	bCB315
pBiFC2in1 CC	SAUL1_ΔARM ₇₋₁₁	BAP1	bCB319
pBiFC2in1 NN	SAUL1_ΔARM ₇₋₁₁	BON1	bJM138
pBiFC2in1 NN	SAUL1_ΔARM ₇₋₁₁	BAP1	bJM139
pBiFC2in1 NC	SAUL1ΔARM ₇₋₁₁	BON1	bCB386
pBiFC2in1 NC	SAUL1ΔARM ₇₋₁₁	BAP1	bCB388
pBiFC2in1 NN	BON1	SAUL1_ΔARM ₇₋₁₁	bCB390
pBiFC2in1 NN	BAP1	SAUL1_ΔARM ₇₋₁₁	bCB392
pBiFC2in1 NC	BON1	PUB43	bCB256
pBiFC2in1 NC	BAP1	PUB43	bCB260
pBiFC2in1 CC	PUB43	BON1	bCB264
pBiFC2in1 CC	PUB43	BAP1	bCB268
pBiFC2in1 NN	PUB43	BON1	bCB394
pBiFC2in1 NN	PUB43	BAP1	bCB396
pBiFC2in1 NC	PUB43	BON1	bCB402
pBiFC2in1 NC	PUB43	BAP1	bCB404
pBiFC2in1 NN	BON1	PUB43	bCB398
pBiFC2in1 NN	BAP1	PUB43	bCB400
pBiFC2in1 NN	BON1ΔVWA	BAP1	bJM192

Tabelle 2.8: Auflistung der erstellten pBiFC2in1-Konstrukte und der dazugehörigen Glycerindauerkulturen

Ausgangsvektor	Insert mit YFP ^N fusioniert	Insert mit YFP ^C fusioniert	ID
pBiFC2in1 NN	BON1ΔVWA	SAUL1	bJM193
pBiFC2in1 NN	BON1-VWA	BAP1	bJM194
pBiFC2in1 NN	BON1-VWA	SAUL1	bJM195

Tabelle 2.9: Auflistung der erstellten Konstrukte für den Co-Immunopräzipitationsassay und der dazugehörigen Glycerindauerkulturen

Name	Ausgangsvektor	Insert	Resistenz	ID
pENTR-D/TOPO_BON1+Stop	pENTR-D/TOPO	BON1	Kanamycin	bJO43
pGWB614_BON1	pGWB614	BON1	Spectinomycin	bCB350

Klonierung von Konstrukten für Interaktionsstudien *in planta*

pDONR221_SAUL1* und *pDONR221_SAUL1_ΔU-Box

Die Amplifikation der kodierenden Sequenz für *SAUL1* mittels PCR erfolgte unter Verwendung der Primer At1g20780c+1f und At1g20780c+2403r. Zum Erstellen des Deletionskonstrukts wurden die Primer At1g20780c+280f und At1g20780c+2403r verwendet. Die für die Gateway® Klonierung benötigten *attachment sites* wurden durch eine weitere PCR mit dem Primerpaar attB1_fwd und attB2_rev an die PCR Amplifikate gefügt, sodass diese mittels BP-Clonase Reaktion jeweils in den Vektor pDONR221 kloniert werden konnte. Durch eine Sequenzierung wurde die Korrektheit der klonierten Sequenzen bestätigt.

***pDONR221TMP3P2*, *pDONR221TMP1P4* und *pBiFC2in1* Konstrukte**

Mit den in Tabelle 2.14 angegebenen Primern wurden die kodierenden Sequenzen des jeweiligen Gens in einer PCR amplifiziert und mittels einer BP-Clonase Reaktion in den entsprechenden pDONR Vektor eingebracht. Anschließend wurden die Sequenzen mithilfe einer Sequenzierung überprüft. Die pDONR-Vektoren der beiden Proteine, die mittels BiFC auf eine Interaktion hin untersucht werden sollten, wurden in einer LR-Clonase-Reaktion eingesetzt, sodass die Insert-Sequenzen in den jeweiligen pBiFC2in1 Vektor rekombiniert werden konnten.

pENTR-D/TOPO_BON1* und *pGWB614_BON1

Unter Verwendung der Primer At5g61900c+1fCACC und At5g61900c+1737r wurde die kodierende Sequenz von *BON1* amplifiziert und in den Vektor pENTR-D/TOPO eingebracht. Die Sequenzen wurden mittels Sequenzierung überprüft und in einer LR-Clonase-Reaktion in den Vektor pGWB614 rekombiniert.

2.4.2. Konstrukte für die rekombinante Proteinexpression

Die Konstrukte, die im Rahmen dieser Arbeit zur Durchführung der rekombinanten Proteinexpression hergestellt wurden, sind in der Tabelle 2.10 aufgeführt.

Tabelle 2.10: Auflistung der erstellten Konstrukte zur rekombinanten Proteinexpression und der dazugehörigen Glycerinkultur

Name	Ausgangsvektor	Insert	Resistenz	ID
pJET1.2_BON1	pJET1.2	BON1	Ampicillin	BCB406
pJET1.2_BAP1	pJET1.2	BAP1	Ampicillin	BCB358
pJET1.2_AtKRP125b	pJET1.2	AtKRP125b	Ampicillin	BCB338
pGEX_6P_1_BON1	pGEX_6P_1	GST-BON1	Ampicillin	BCB356
pGEX_6P_1_BAP1	pGEX_6P_1	GST-BAP1	Ampicillin	BCB373
pGEX_6P_1_AtKRP125b	pGEX_6P_1	GST-AtKRP125b	Ampicillin	BCB346

Klonierung von Konstrukten für die rekombinante Proteinexpression in *E. coli*

pJET1.2_BON1* und *pGEX_6P_1_BON1

Zur Amplifikation der kodierenden Sequenz von *BON1* mittels PCR wurden die Primer At5g61900c+1fEcoRI und At5g61900c+rSall verwendet, sodass die Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *EcoRI* und *Sall* angefügt werden konnten. Das Amplifikat wurde zunächst in den Vektor pJET1.2/blunt kloniert und mithilfe einer Sequenzierung überprüft. Anschließend wurde die zu klonierende Sequenz durch eine Restriktionsspaltung mit den oben genannten Enzymen aus dem Vektor isoliert und unter durch Ligation in den ebenfalls verdauten Expressionsvektor pGEX_6P_1 ligiert.

pJET1.2_BAP1* und *pGEX_6P_1_BAP1

Die Klonierung der beiden Konstrukte erfolgte analog zur Klonierung von pJET1.2_BON1 und pGEX_6P_1_BON1, wobei jedoch das Primerpaar At3g61190+1fEcoRI und At3g61190+rSall zur Amplifikation der kodierenden Sequenz von *BAP1* verwendet wurde.

pJET1.2_AtKRP125b* und *pJET1.2_AtKRP125b

Die Klonierung der beiden Konstrukte erfolgte analog zur Klonierung von pJET1.2_BON1 und pGEX_6P_1_BON1, wobei jedoch das Primerpaar At2g36200c+1fEcoRI und At2g36200+rSall zur Amplifikation der kodierenden Sequenz von *AtKRP125b* verwendet wurde. Für die Klonierung wurde die *Splicing*-Variante At2g36200.1 verwendet.

2.4.3. Konstrukte zur Proteinlokalisierung

Die Konstrukte, die im Rahmen dieser Arbeit zur Durchführung der Proteinlokalisierung in *A. thaliana* hergestellt wurden, sind in der Tabelle 2.11 aufgeführt.

Tabelle 2.11: Auflistung der erstellten Konstrukte zur Proteinlokalisierung und der dazugehörigen Glycerindauerkulturen

Name	Ausgangsvektor	Insert	Resistenz	ID
pENTR_BON1-Stop	pENTR-D/TOPO	BON1	Kanamycin	bJO44
pK7FWG2.0_BON1-GFP	pK7FWG2.0	BON1	Spectinomycin	bCB375

pENTR-D/TOPO_BON1-Stop* und *pK7FWG2.0_BON1-GFP

Unter Verwendung der Primer At5g61900c+1fCACC und At5g61900c+1734r wurde die kodierende Sequenz von *BON1* amplifiziert und in den Vektor pENTR-D/TOPO eingebracht. Die Sequenzen wurden mittels Sequenzierung überprüft und in einer LR-Clonase-Reaktion in den Vektor pK7FWG2.0 rekombiniert.

2.5. Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Die lyophilisierten Primer wurden in d_2H_2O resuspendiert, sodass die Stocklösungen eine Konzentration von 100 pmol/ μ L enthielten. Zur Anwendung der Oligonukleotide wurden 1:10 Verdünnungen erstellt. Die verwendeten Primer sind den Tabellen 2.12 bis 2.15 zu entnehmen.

Tabelle 2.12: Verwendete Oligonukleotide zur RT-qPCR

Gen	Name	Sequenz (in 5'-3'-Orientierung)	ID
<i>PR-1</i>	At2G14610c+316f	TACAACCTACGCTGCGAACAC	ED80
	At2G14610c+414r	ACACCTCACTTTGGCACATC	ED81
<i>PR-2</i>	AT3G57260c+420f	CATCGAGAACGCGGTTTCTG	ED82
	AT3G57260c+512r	TGAGACGGAGGAGACGTATC	ED83
<i>RPL10</i>	AT1G14320c+488f	TGGTCACCATGCTCAAGAGG	JK49
	AT1G14320c-581r	CTTCGTGAAGCCCCATTTCC	JK50
<i>EER1</i>	AT1G25490c+770f	AAGATGACCAAGATTCTGTGAGA	JK55
	AT1G25490c-868r	CAGGTAATAATGCGTGCAACAC	JK56
<i>ATVDAC1</i>	AT3G01280c+664f	GCCTCCCTTACTGTGAACGA	JK57
	AT3G01280c-762r	GCTCACTTCGGCTCCAAC	JK58

Material und Methoden

Tabelle 2.13: Verwendete Oligonukleotide zur Genotypisierung

Mutante	Name	Sequenz (in 5'-3'-Orientierung)	ID
<i>saul1-1</i>	AT1G20780g+2975r	TGAGGCCAATCAAATGATTTTC	ED29
	AT1G20780g+1810f	TTTCCCCATTCATGAGTGAAG	ED30
<i>bon1</i>	LP_bon1a	AAGCATCACAGATCCAGTTGG	ED114
	RP_bon1a	CTTCACTGCGGAAAACCTTCTG	ED115
	LBa1*	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	TK68

* = Primer zum Nachweis der T-DNA Insertion in beiden Mutanten

Tabelle 2.14: Verwendete Oligonukleotide zur Klonierung der BiFC-Konstrukte

Gen	Name	Sequenz (in 5'-3'-Orientierung)	ID
<i>AtKRP125b</i>	At2g36200 B1 f	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGTCTAGCCGCCATGACAAAGAG	426
	At2g36200 B4+S r	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGGGTG TTAGTTGACTTGTGAGAGAGGCGACCGT	427
	At2g36200 B4-S r	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGGGTG GTTGACTTGTGAGAGAGGCGACCGT	428
	At2g36200 B3 f	GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGTC ATGTCTAGCCGCCATGACAAAGAG	429
	At2g36200 B2+S r	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT TTAGTTGACTTGTGAGAGAGGCGACCGT	430
<i>BAP1</i>	BAP1B1 f neu	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGATATATTTTGGTAGATCAATCGACAA	400
	BAP1B4+S r neu	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGGGTG TTAAAATTGGCGTTGATACAGACCCCA	401
	BAP1B4-S r neu	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGGGTG AAATTGGCGTTGATACAGACCCCA	402
	BAP1B3 f neu	GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGTC ATGATATATTTTGGTAGATCAATCGACAA	403
	BAP1B2+S r neu	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT TTAAAATTGGCGTTGATACAGACCCCA	404
<i>BON1</i>	BON1B1f	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGGGGAATTGTTGCTCCGATG	388
	BON1B4+Sr	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGGGTG TCATGGAGGAATCGGTTTCATATTA	389
<i>BON1</i>	BON1B4-Sr	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGGGTG TGGAGGAATCGGTTTCATATTA	390
	BON1B3f	GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGTC ATGGGGAATTGTTGCTCCGATG	395
	BON1B2+Sr	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT TCATGGAGGAATCGGTTTCATATTA	396
	At5g61900- B2+1014r	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTT CAAAATCCAGATGCCAAGT	CB131
	B3-At5g61900+ 1015f	GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGTC ATGGAGTTAACTTTATGGTAG	CB132

Material und Methoden

Tabelle 2.14: Verwendete Oligonukleotide zur Klonierung der BiFC-Konstrukte

Gen	Name	Sequenz (in 5'-3'-Orientierung)	ID
<i>LORE</i>	LORE B1 f	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGGGTATGGTTTTATTTGCTTG	420
	LORE B4+S r	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGGGTG TTACCTTCCTTGGATCATAGATTCT	421
	LORE B4-S r	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGGGTG CCTTCCTTGGATCATAGATTCT	422
	LORE B3 f	GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGTC ATGGGTATGGTTTTATTTGCTTG	423
	LORE B2+S r	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT TTACCTTCCTTGGATCATAGATTCT	424
	LORE B2-S r	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT CCTTCCTTGGATCATAGATTCT	425
<i>PUB43</i>	B3-At1g76390c+1f	GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGTC ATGGCTGGAAGTGGAAAGTTGG	CB99
	At1g76390c- B2+2433r	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT ACCAATGTTGGTGAATATAACC	CB100
	B1-At1g76390c+1f	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGGCTGGAAGTGGAAAGTTGG	CB101
	At1g76390c- B4+2433r	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGGGTG ACCAATGTTGGTGAATATAACC	CB102
	At1g76390c- B2+2436r	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT CTAACCAATGTTGGTGAATA	CB123
	At1g76390c- B4+2436r	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGGGTG CTAACCAATGTTGGTGAATA	CB124
<i>SAUL1</i>	At1g20780- B2+2406r	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT CTATGCGATGTTTGGGAATA	CB127
	At1g20780- B4+2406r	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGGGTG CTATGCGATGTTTGGGAATA	CB128
	B1 SAUL1 fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGGTTGGAAGCTCGGATG	TK257
	B3 SAUL1 fw	GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGTC ATGGTTGGAAGCTCGGATG	TK258
	B4 SAUL1oS rev	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGGGTG TGCGATGTTTGGGAATATAC	TK259
	B2 SAUL1oS rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT TGCGATGTTTGGGAATATAC	TK260
<i>SAUL1_ΔARM₇₋₁₁</i>	B3-At1g20780c+1f	GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGTC ATGGTTGGAAGCTCGGATGGTG	CB103
	At1g20780- B2+1224r	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT TAGATGGAGCAGATTCTCCAC	CB104
	B1-At1g20780+1f	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGGTTGGAAGCTCGGATGGTG	CB105
	At1g20780- B2+1224r+STOPP	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT CTATAGATGGAGCAGATTCT	CB125
	At1g20780- B4+1224r+STOPP	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGGGTG CTATAGATGGAGCAGATTCT	CB126

Tabelle 2.15: Verwendete Oligonukleotide zur Klonierung der GST-, HA- und *Tap-Tag*-Fusionskonstrukte

Gen	Name	Sequenz (in 5'-3'-Orientierung)	ID
<i>BON1</i>	At5g61900c+1fEcoRI	GCGAATTCATGGGGAATTGTTGCTCCG	CB110
	At5g61900c+rSall	GCGTCGACTCATGGAGGAATCGGTTTC ATATTAC	CB111
	At5g61900c+1fCACC	CACCATGGGGAATTGTTGCTCCG	CB107
	At5g61900c+1734r	TGGAGGAATCGGTTTCATATTAC	CB109
	At5g61900c+1737r	TCATGGAGGAATCGGTTTCATATTAC	CB108
<i>BAP1</i>	At3g61190+1fEcoRI	GCGAATTCATGATATATATTTGGTAGATC	CB116
	At3g61190+rSall	GCGTCGACTTAAAATTGGCGTTGATAC	CB117
<i>AtKRP125b</i>	At2g36200c+1fEcoRI	GCGAATTCATGTCTAGCCGCCATGACAA	CB121
	At2g36200c+rSall	GCGTCGACTTAGTTGACTTGTGAGAGAG	CB122
	At5g61900c+1734r	TGGAGGAATCGGTTTCATATTAC	CB109
<i>SAUL1</i>	At1g20780c+1f	AAAAAGCAGGCTCCACCATGGTTGGAAGCT CGGATGG	CB81
	At1g20780c+2403r	AGAAAGCTGGGTCTGCGATGTTTGGGAATA TACTTG	CB80
<i>ARM₇₋₁₁</i>	At1g20780c+1294f- ATG	GCGGATCCGCTAACATAGTGAACAT	CB28
	At1g20780c+2532r	TGGTCGACCTATGAGAAGTTTGGGATCT	CB15
<i>SAUL1ΔU- Box</i>	At1g20780c+280f	AAAAAGCAGGCTCCACCATGTGGAGATCCA GGAATGATGC	CB91
	At1g20780c+2403r	AGAAAGCTGGGTCTGCGATGTTTGGGAATA TACTTG	CB80
	attB1_fwd*	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT	CB82
	attB2_rev*	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT	CB83

* = Primer zum Anfügen von *attachment-sites* an PCR-Produkt zur *Tap-Tag* Klonierung

2.6. Anzuchtmedien

SOB-Medium

10 g Trypton
 2,5 g Hefeextrakt
 10 mM NaCl
 2,5 mM KCl
 10 mM MgSO₄
 10 mM MgCl₂
 ad 500 mL _{dd}H₂O
 autoklavieren, Lagerung bei 4°C

SOC-Medium

SOB-Medium
 20 mM Glukose
 sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C

LB-Medium	
5 g	Trypton
2,5 g	Hefeextrakt
5 g	NaCl
ad 500 mL _{dd} H ₂ O	
autoklavieren, Lagerung bei 4°C	

LB-Agar	
500 mL	LB-Medium
7,5 g	Agar
autoklavieren, Lagerung bei 4°C	

2.7. Antibiotika

Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika zur Selektion transgener Bakterien sind der Tabelle 2.16 zu entnehmen.

Tabelle 2.16: Auflistung der verwendeten Antibiotika zur Selektion der transgenen Bakterien

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

2.8. Geräte

- BioPhotometer (Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
- Concentrator plus (Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
- E-Box VX2 (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- Electron Multiplying Charge-Coupled Device (EMCCD)-Kamera iXon + DU-897 (Andor Technology Plc, Belfast, England)
- Eporator (Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
- Epson Perfection V700 Photo Scanner (Epson Deutschland GmbH, Meerbusch, Deutschland)
- Extend Präzisionswaage (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)
- High Performance Zentrifuge Avanti J-E (Beckman Coulter, Brea, USA)
- Fastblot Semi-Dry Blotter (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland)

Material und Methoden

- FH10 Microflex Pump System (Thermo Fisher Scientific GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- Heraeus Fresco21 Microzentrifuge (Thermo Fisher Scientific GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- Heraeus HERAsafe® Sicherheitswerkbank (Thermo Fisher Scientific GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- Inkubator 1000 (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland)
- Klimaschrank Modell Select 41L (CLF Plant Climatics, Wertingen, Deutschland)
- Klimakammer (Weiss Klimatechnik GmbH, Reiskirchen-Lindenstruth, Deutschland)
- LA 120S Präzisionswaage (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)
- LAS-3000 Imaging System (Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland)
- Leica TCS SP8 konfokale Plattform (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland)
- Magnetrührer IKA REO (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland)
- Makro-Zoom Forschungsmikroskop MVX10 (Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg, Deutschland)
- Mikrozentrifuge 22R (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland)
- Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
- MSC-Advantage™ Mikrobiologische Sicherheitswerkbank (Thermo Fisher Scientific GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- Multitron Schüttler (Infors AG, Bottmingen, Schweiz)
- NanoDrop2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- Netzgerät Power Source 300 V (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- Netzgerät peqPower 300 V (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- Optima™ MAX-XP Ultrazentrifuge (Beckman Coulter, Brea, USA)
- optisches Rekonstruktionsmikroskop N-STORM (Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland)
- peqSTAR Thermocycler (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- PerfectBlue™ Gel System Mini M,L (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland)

- ph530 digitales Labor pH-Meter (Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, WTW, Weilheim, Deutschland)
- Power Pac 200 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
- Professional Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland)
- *Quad line Beamsplitter* zt405/488/561/640rpc TIRF (Chroma Technology Corporation, Bellows Falls, Vermont, USA)
- *Quad line* Emissionsfilter Brightline HC 446, 523, 600, 677 (Semrock, Inc., Rochester, New York, USA)
- Rotilabo®-Mini-Zentrifuge (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Rotor-Gene Q PCR-Cycler (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- Schüttler Unimax 1010 (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland)
- Schüttler KS10 (Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland)
- Schüttler 3005 (Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland)
- Schüttler 3015 (Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland)
- Thermomixer Compact (Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
- Tissue Lyser (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, New York, USA)
- Zentrifuge 5810R (Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
- Zentrifuge 5424 (Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)

2.9. Software

- CloneManager Professional 9 (Scientific and Educational Software, Morrisville, USA)
- Genevestigator (Nebion AG, Zürich, Schweiz)
- LAS X (für TCS SP8) (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland)
- Microsoft Office (Excel, Power Point, Word) (Microsoft Corporation, Redmond, USA)
- MUSCLE (Edgar, 2004)
- Past 3.14 (Hammer *et al.*, 2001)

- Rotor-Gene Q Series Software ((Qiagen, Hilden, Deutschland))
- Sigmaplot 10 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland)
- Vector NTI Advance® 10 (Thermo Fisher Scientific GmbH, Darmstadt, Deutschland)

2.10. Methoden zur Arbeit mit Pflanzen

2.10.1. Anzucht von Pflanzen

Arabidopsis thaliana

Die Anzucht der benötigten Pflanzen erfolgte auf einem Medium aus den folgenden Komponenten:

Anzuchtmedium *Arabidopsis thaliana*

- 65 % Fruhstorfer Erde Typ P
- 25 % Sand
- 10 % Blähton

Das Erdgemisch wurde in Anzuchtgefäße gefüllt und gewässert. Anschließend wurde die Erde mit einer BioMück-Lösung (0,5 g/L) gegossen und für eine Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach erfolgte eine Behandlung mit einer 0,25 %-igen Previcur-Lösung, gefolgt von einer weiteren Inkubationszeit von mindestens einer Stunde bei Raumtemperatur. Nach dieser Behandlung wurden die benötigten Samen auf der Erde ausgebracht und für 72 Stunden bei 4°C im Dunkeln zur Stratifikation der Samen inkubiert. Die weitere Anzucht erfolgte bei 25°C unter Langtagbedingungen. Individuelle Inkubationsbedingungen sind dem entsprechenden Ergebnisteil zu entnehmen.

Nicotiana benthamiana

Die Aussaat der Pflanzen erfolgte auf Fruhstorfer Erde Typ P. Hierbei war darauf zu achten, dass die Samen nach der Aussaat leicht von der Erde bedeckt waren. Es fand keine Stratifikation statt. Die Anzucht erfolgte bei 20°C unter Langtagbedingungen.

2.10.2. Transformation von Protoplasten aus *Arabidopsis thaliana*

Für die Isolierung von Mesophyllprotoplasten wurden 6 bis 8 Wochen alte *Arabidopsis thaliana* Pflanzen verwendet. Circa 40 Blätter wurden in 1 bis 2 mm dünne Streifen geschnitten und in eine Petrischale ($\varnothing = 12,5$ cm) mit 30 mL MCP-Lösung, die in einem Verhältnis von 1:1 mit d_4 H₂O verdünnt wurde, überführt. Die MCP-Lösung wurde vorsichtig abpipettiert und die Schale mit 30 mL Enzymlösung befüllt. Die Enzymlösung wurde zuvor

frisch angesetzt und für 10 Minuten bei 55°C inkubiert und anschließend in Dunkelheit abgekühlt. Die Blattstücke wurden in der in Alufolie eingepackten Petrischale für 2 Stunden bei 26°C und 60 rpm leicht schüttelnd in der Enzymlösung inkubiert. Zum Herauslösen der Protoplasten aus dem Blattskelett wurde die Rotation für 1 Minute auf 80 rpm erhöht. Die Protoplasten wurden durch das Filtrieren durch ein mit MaMg-Lösung angefeuchtetes 50 µm Nylonnetz in ein 50 mL Falkongefäß von den Blattresten abgetrennt und anschließend bei 100xg für 3 Minuten und 23°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Protoplastenpellet in 20 mL MaMg-Puffer durch vorsichtiges Drehen des 50 mL Falkongefäßes resuspendiert. Die Protoplasten wurden erneut pelletiert und je nach Menge der Protoplasten in 150 bis 1000 µL MaMg Puffer durch leichtes Drehen gelöst. Pro Transformation wurden 150 µL Protoplasten zunächst mit 20 µg zu transformierender DNA versetzt. Danach erfolgte eine rasche, jedoch vorsichtige Zugabe von 165 µL PEG-CaCl₂-Lösung. Der Reaktionsansatz wurde durch vorsichtiges Drehen durchmischt und anschließend bei Raumtemperatur für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Danach wurden zunächst 500 µL, dann 1000 µL und 1500 µL W5-Puffer zu den einzelnen Transformationen hinzugegeben, durch Drehen gemischt und danach bei 60xg und 23°C für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Protoplasten in 3 mL W5-Puffer aufgenommen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das Protoplastenpellet in 3 mL W5-Puffer gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Die Transformation der Protoplasten wurde anschließend am konfokalen Lichtmikroskop analysiert.

MCP-Puffer

500 mM Sorbit
1 mM CaCl₂
10 mM MES (pH 5,7)
pH 5,6 (KOH), Lagerung bei 4°C

Enzymlösung

0,25 % Macerozym
1 % Cellulase
in MCP-Puffer ansetzen

MaMg-Puffer

450 mM Sorbit
15 mM MgCl₂
5 mM MES (pH 5,7)
pH 5,6 (KOH), Lagerung bei 4°C

PEG-Ca-Puffer

4 % PEG 4000
0,2 M Mannitol
0,1 M CaCl₂

W5-Puffer

154 mM NaCl
125 mM CaCl₂
5 mM KCl
5 mM Glukose
2 mM MES (pH 5,7)
autoklavieren, Lagerung bei 4°C

2.10.3. Infiltration von *Nicotiana benthamiana* mit *Agrobacterium tumefaciens*

Zur Anzucht der Agrobakterien wurden 5 mL LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und mittels einer Impföse mit dem benötigten Bakterienstamm, der zuvor auf einer Agarplatte vermehrt wurde, inokuliert und über Nacht bei 28°C bei 180 rpm schüttelnd inkubiert. Zusätzlich zu den Bakterien, die anhand der Tabakinfiltration analysiert werden sollten, wurde ebenfalls eine Kultur eines Agrobakterienstammes angesetzt, der das Plasmid pBin61_35S::p19 trägt, das für das sogenannte P19 Protein kodiert. Wird dieses Protein zusammen mit dem gewünschten Fusionsprotein in Tabakblätter infiltriert, so erhöht es mitunter die Expression des Zielproteins, da es post-transkriptionelles *Gene-Silencing* unterdrückt (Voinnet *et al.*, 2003). Die Kulturen wurden bei 4000 rpm für 15 Minuten bei Raumtemperatur pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in jeweils 5 mL Infiltrationslösung durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Im Anschluss daran wurde die optische Dichte (OD_{600nm}) sämtlicher Kulturen bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Mit einem Gesamtvolumen von 10 mL wurde für jede Kultur eine Verdünnung mit einer OD_{600nm} von 1,0 mithilfe der Infiltrationslösung erstellt. Diese Verdünnungen wurden für weitere 1-3 Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Zur Infiltration wurden 6 Wochen alte *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*) Pflanzen verwendet, wobei jedoch nur die oberen 4 Blätter infiltriert wurden. Hierfür wurden die zu

infiltrierenden Stämme im Verhältnis 1:1 mit dem P19-Stamm gemischt und mittels einer 2 mL Spritze in die Blattunterseite der Blätter gespritzt. Anschließend wurden die Pflanzen für weitere 2-3 Tage im Gewächshaus inkubiert und dann mithilfe des Makroskops auf Fluoreszenzsignale hin untersucht, ehe die Blätter in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur Weiterverwendung gelagert wurden.

Infiltrationslösung

100 µL Natriumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,1)
15 µL Acetosyringon (0,1 M)
50 µL MgCl₂ (2 M)
ad 10 mL ddH₂O

2.10.4. Anzucht von *Arabidopsis thaliana* zur Analyse der Genexpression mittels RT-qPCR

Um den Einfluss der Temperatur auf die Genexpression ausgewählter Pflanzenlinien zu analysieren, wurden Samen der dafür benötigten Linien zusammen mit Saatgut von *A. thaliana* Col-0 Pflanzen auf Erde ausgebracht, stratifiziert und für 2 Wochen bei 25°C unter Langtagbedingungen angezogen. Pro Linie wurden drei Proben genommen, indem 2 bis 3 Pflanzen zusammen mit 2 Stahlkugeln in ein 2 mL Reaktionsgefäß gegeben und in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Ein Teil der restlichen Pflanzen wurde für drei weitere Tage bei 20°C inkubiert, der andere Teil wurde erneut bei 25°C inkubiert. Erneut wurden pro Linie und Temperatur drei Proben genommen, eingefroren und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.11. Molekularbiologische Methoden

2.11.1. Isolierung genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Zur Isolierung der genomischen DNA wurde das benötigte Blattmaterial zunächst mit 200 µL Lyse-Puffer in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß homogenisiert. Nach einer Zentrifugation von 5 Minuten bei 14.000 rpm und Raumtemperatur wurde der Überstand abgenommen und in einem neuen 1,5 mL Reaktionsgefäß mit 150 µL Isopropanol vermischt. Der Ansatz wurde für 5 Minuten bei -20°C inkubiert, um die DNA zu fällen und anschließend für 8 Minuten bei 14.000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 mL eiskaltem 70 %-igem Ethanol versetzt, gevortext und auf Eis für 5 Minuten inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation von 3 Minuten bei 14.000 rpm und 4°C wurde der Überstand

abgenommen und das Pellet für 5 Minuten bei 50°C im Heizblock getrocknet. Das DNA-Pellet wurde zum Lösen für 10 Minuten bei 50°C in 50 μL ddH_2O inkubiert. Anschließend wurde erneut für 3 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand mit der darin enthaltenen DNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde bei 4°C gelagert.

Lyse-Puffer

200 mM	Tris-HCl (pH 7,8 – 8)
250 mM	NaCl
25 mM	EDTA (pH 8)
0,5 %	SDS

2.11.2. Isolierung von RNA aus *Arabidopsis thaliana*

Die Isolierung von RNA aus Blattmaterial von *A. thaliana* erfolgte gemäß den Herstellerangaben des „InnuPREP Plant RNA“ Kits (Analytik Jena AG, Jena, Deutschland). Das dafür benötigte Pflanzenmaterial wurde zuvor zusammen mit kleinen Stahlkugeln in einem 2 mL Eppendorfgefäß in flüssigem Stickstoff eingefroren und mithilfe des „TissueLyser“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) für 2 Minuten und einer Frequenz von 30/Sek zerkleinert. Zur Elution der RNA wurden 30 μL RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben und nach einer Inkubationszeit von 1 bis 5 Minuten die RNA mittels Zentrifugation eluiert. Die RNA-Konzentration wurde anhand des Nanodrop 2000 Spektrometers bestimmt und die Qualität der isolierten RNA mittels eines Agarosegels überprüft. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.11.3. Synthese von cDNA

Zur Synthese von cDNA wurde das Kit „QuantiTect Reverse Transcription“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. 500 ng der jeweiligen RNA wurden verwendet, um die cDNA gemäß den Herstellerangaben zu synthetisieren. Die cDNA wurde anschließend bei 4°C gelagert.

2.11.4. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Messung der Konzentration isolierter Nukleinsäuren erfolgte mithilfe des NanoDrop 2000 Spektrophotometers (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben.

2.11.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR zur Amplifikation von Genen

Zur Amplifikation der kodierenden Sequenzen der zu klonierenden Gene mithilfe der Phusion®DNA Polymerase wurde ein Ansatz verwendet, der aus den folgenden Komponenten bestand.

1x Mastermix	
11,8 µL	ddH ₂ O
4,0 µL	Phusion HF Puffer (5x)
0,4 µL	dNTPs (10 mM)
1,0 µL	Primer 1 (10 µM)
1,0 µL	Primer 2 (10 µM)
0,6 µL	DMSO
0,2 µL	Phusion®DNA Polymerase (2 U/µL)
1 µL	DNA (1 – 60 ng)
20 µL	

Das dazugehörige PCR-Programm setzte sich aus den folgenden Schritten zusammen.

98°C	30 Sek	}	40 Zyklen
98°C	10 Sek		
55 - 58°C*	30 Sek		
72°C	30 Sek/1 kb		
72°C	5 Min		
10°C	∞		

* = Temperatur abhängig vom Primerpaar gewählt

Kolonie-PCR & PCR zur Genotypisierung von *Arabidopsis thaliana*

Zur Analyse der nach einer Transformation gewachsenen Kolonien und des Genotyps von *Arabidopsis* Pflanzen wurde der folgende Reaktionsansatz verwendet.

1x Mastermix	
13,5 µL	ddH ₂ O
2 µL	DreamTaq Puffer (10x)
0,4 µL	dNTPs (10 mM)
1 µL	Primer 1 (10 µM)
1 µL	Primer 2 (10 µM)
0,1 µL	DreamTaq Polymerase (5 U/µL)
2 µL	DNA
20 µL	

Das PCR-Programm wurde nach den folgenden Angaben durchgeführt.

94°C	3 Min	} 40 Zyklen
94°C	30 Sek	
55 - 58°C*	30 Sek	
72°C	1 Min/1 kb	
72°C	5 Min	
10°C	∞	

PCR zur Amplifikation der Inserts zur Klonierung der Tap Tag Konstrukte

Um die kodierenden Sequenzen von *SAUL1* für das pDONR™221.Konstrukt zur Tandemaffinitätsaufreinigung zu amplifizieren und mit den benötigten *attachment (att) sites* zu fusionieren, wurden zwei aufeinanderfolgende PCRs durchgeführt. Der Mastermix des ersten Reaktionsschritts bestand aus den folgenden Reagenzien.

1x Mastermix

30 µL	ddH ₂ O
10 µL	HF Puffer (5x)
1 µL	dNTPs (10 mM)
1 µL	Primer 1 (10 µM)
1 µL	Primer 2 (10 µM)
1,5 µL	DMSO
0,5 µL	Phusion®DNA Polymerase (2 U/µL)
5 µL	DNA
<hr/>	
50 µL	

Das dazugehörige PCR-Programm wurde nach den folgenden Angaben durchgeführt.

98°C	30 Sek	} 12 Zyklen
98°C	10 Sek	
55 - 58°C*	30 Sek	
72°C	1 Min/1 kb	
72°C	5 Min	
10°C	∞	

* = Temperatur abhängig vom Primerpaar gewählt

Zum Anfügen der *att sites* an das PCR-Produkt wurde eine zweite PCR nach folgender Methode durchgeführt.

1x Mastermix

19 μL	ddH_2O
10 μL	HF Puffer (5x)
1 μL	dNTPs (10 mM)
4 μL	attB1 (10 μM)
4 μL	attB2 (10 μM)
1,5 μL	DMSO
0,5 μL	Phusion [®] DNA Polymerase (2 U/ μL)
10 μL	Template (aus 1. PCR)
<hr/>	
50 μL	

Das PCR-Programm, das verwendet wurde, bestand aus den folgenden Schritten.

98°C	30 Sek	} 5 Zyklen
98°C	10 Sek	
45°C	30 Sek	
72°C	1 Min/1 kb	
98°C	10 Sek	
55°C	30 Sek	} 20 Zyklen
72°C	1 Min/1 kb	
72°C	5 Min	
10°C	∞	

2.11.6. Spezielle Klonierungsstrategien

Gateway[®] Klonierung

Das Prinzip der Gateway Klonierung basiert auf dem spezifischen Rekombinationssystem des Bakteriophagen λ in *E. coli*, bei dem durch Rekombination der *att sites* eine Übertragung des genetischen Materials erfolgt. In einem ersten Schritt wird ein sogenannter *entry vector* erstellt, indem ein mittels PCR amplifiziertes Insert in den Vektor pENTR[™]/D-TOPO einbracht wird. Das Insert enthält am 5'-Ende die benötigte Topoisomerase I-Erkennungssequenz CACC, sodass eine gerichtete Klonierung des Inserts in den Vektor ermöglicht wird. Ein Reaktionsansatz setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen.

TOPO-Klonierung

2 μL	Insert + CACC
0,5 μL	Salt Solution
0,5 μL	pENTR [™] /D-TOPO
<hr/>	
3 μL	

Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend vollständig mittels Hitzeschock (Abschnitt 2.11.13) in *E. coli* DH5 α Zellen transformiert. Im *entry vector* wird das Insert von den *attL1* und *attL2 sites* flankiert. Der Zielvektor

(*destination vector*) verfügt ebenfalls über zwei *att sites*, *attR1* und *attR2*, die ein *ccdB*-Gen umgeben, dessen Genprodukt zum Zelltod führt. In einer LR Clonase®-Reaktion findet eine spezifische Rekombination der *att sites* statt, sodass das *ccdB*-Gen durch das Insert aus dem *entry vector* ausgetauscht wird.

LR Clonase®-Reaktion

1-7 µL	<i>entry vector</i> (150 ng)
1 µL	<i>destination vector</i> (150 ng)
1 µL	LR Clonase®II Enzymmix
ad 9 µL	TE-Puffer, pH 8,0
<hr/>	
10 µL	

Der Reaktionsansatz wurde bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. 3 µL der Reaktion wurden in *E. coli* DH5α transformiert.

Eine weitere Möglichkeit um einen *entry vector* zu erstellen, ist die Amplifikation des Inserts mit Primern, durch die *attB sites* an das Insert angefügt werden. Diese Strategie wurde zur Klonierung der pBiFC2in1-Konstrukte bzw. für die pDONR™221-Konstrukte zur Tandemaffinitätsaufreinigung verfolgt. Der Vektor, pDONR™221, in den das Insert eingebracht werden soll, besitzt *attP sites*, die in einer sogenannten BP Clonase®-Reaktion spezifisch mit den *att sites* des PCR-Produkts rekombiniert werden. Das Insert gelangt so in den Vektor.

BP-Clonase®-Reaktion

1-8,5 µL	PCR Produkt (75 ng)
1 µL	pDONR™221 (75 ng)
0,5 µL	BP Clonase®II-Enzymmix
ad 9,5 µL	TE-Puffer, pH 8,0
<hr/>	
10 µL	

Der BP-Reaktionsansatz wurde in Abhängigkeit des zu klonierenden Inserts entweder bei 25°C für eine Stunde oder über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Transformation von *E. coli* DH5α Zellen wurden 4 µL verwendet. Da bei dieser Reaktion *attL sites* entstehen, kann das Insert durch eine darauffolgende LR-Clonase®-Reaktion in den benötigten *destination vector* eingebracht werden. Bei der Klonierung der pBiFC2in1 Konstrukte wurden zwei pDONR™221-Vektoren mit einem *destination vector* rekombiniert. Der Reaktionsansatz bestand aus den folgenden Bestandteilen.

LR-Clonase®-Reaktion

1 µL	pDONR™221 A (60 ng/µL)
1 µL	pDONR™221 B (60 ng/µL)
1 µL	pBiFC2in1 (30 ng/µL)
0,8 µL	LR Clonase®II-Enzymmix
2 µL	TE-Puffer, pH 8,0
<hr/>	
5,8 µL	

Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und vollständig per Hitzeschock in *E. coli* DH5α Zellen transformiert.

CloneJET PCR Klonierung

Die CloneJET PCR Klonierung wurde im Rahmen der Synthese der GST-Fusionskonstrukte verwendet. In einer PCR wurde das benötigte Insert so amplifiziert, dass es von jeweils ausgewählten Restriktionsschnittstellen flankiert wurde. Mithilfe der T4-Ligase wurde es in den Vektor pJET1.2/blunt eingebracht und sequenziert. Die Durchführung erfolgte dabei gemäß den Herstellerangaben (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland), wobei wurde der Ligationsansatz 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Zur weiteren Klonierung wurde das Insert mittels Restriktionsspaltung aus dem Vektor isoliert und in den Expressionsvektor pGEX_6P_1 ligiert. Der Zwischenschritt über den pJET1.2/blunt Vektor wurde gewählt, um den Restriktionsenzymen eine größere Oberfläche zur Erkennung der Schnittstelle zu ermöglichen und so die Klonierungseffizienz zu erhöhen.

2.11.7. Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR)

Die wie in Abschnitt 2.11.3 beschriebenen synthetisierten cDNA wurde direkt nach der Synthesereaktion 1:4 mit 30 µL ddH₂O verdünnt. Für die PCR wurden 20 µL aus der ersten Verdünnung erneut 1:4 mit 60 µL ddH₂O verdünnt, um so eine 1:16 Verdünnung zu erhalten. Für die RT-qPCR wurden jeweils 4 µL der verdünnten cDNA verwendet. Zusätzlich zu den cDNA-Proben wurde ein sogenannter *Inter Run Calibrator* (IRC) erstellt, d.h. eine Mischung aus gleich großen Aliquots der zu untersuchenden cDNA-Proben. Jeder PCR-Reaktionsansatz setzte sich aus dem folgenden Mastermix zusammen.

1x Mastermix	
5 µL	SYBR® Green PCR Puffer
0,5 µL	Primer 1 (10 µM)
0,5 µL	Primer 2 (10 µM)
4 µL	cDNA (1:16)
<hr/>	
10 µL	

Pro Probe wurden drei biologische Replikate und von diesen jeweils zwei technische Replikate mittels RT-qPCR analysiert. Neben den zu analysierenden Genen *PR1* und *PR2* wurden drei sogenannte Referenzgene, d. h. Gene, die in *A. thaliana* bei den vorliegenden Versuchsbedingungen (hier: Temperaturstress) konstitutiv exprimiert werden, ebenfalls gemessen. Mithilfe der Genexpressionsdatenbank *Genevestigator* (Nebion AG, Zürich, Schweiz) wurden hierfür die Gene *ATVDAC1*, *RPL10*, *EER1* identifiziert. Um die Proben von verschiedenen Messdurchläufen miteinander vergleichen zu können, wurde zusätzlich die Expression der Referenzgene bei jedem Durchlauf im IRC gemessen. Des Weiteren wurde eine *No-Template-Control*-Probe mitgeführt, bei der an Stelle von cDNA dH_2O hinzugefügt wurde. Die Messung der Genexpression erfolgte mithilfe des Rotor-Gene Q PCR-Cyclers (Qiagen, Hilden, Deutschland). Dabei wurde das folgende PCR-Programm verwendet. Es wurden 40 Zyklen durchgeführt.

Hold	95°C	5 Min
Cycling	95°C	10 Sek
Cycling	60°C	30 Sek
Melt	65 – 95°C	5 Sek pro Temperaturgrad

Mithilfe der qPCR wurde der sogenannte *cycle threshold* (Ct) bestimmt, d.h. der Zyklus, in dem die SYBR® Green Fluoreszenz anfängt, exponentiell zu steigen. Die Ausgabe der Ct-Messwerte erfolgte mithilfe der Rotor-Gene Q Series Software (Qiagen), wobei stets ein Schwellenwert der Fluoreszenz von 0,1 eingestellt wurde. Die Auswertung der Ct-Werte erfolgte nach Hellemans *et al.* (2007). Hierbei wurde zunächst der ΔCt -Wert durch Bildung des Mittelwertes der jeweiligen technischen Replikate der Proben ermittelt. Durch Anwendung einer exponentiellen Funktion erfolgte anschließend die Berechnung der relativen Quantität (RQ) der Transkriptmenge der jeweiligen Probe. Unter Berücksichtigung der Messwerte des ICRs und der Referenzgene wurde sowohl ein *Calibration Factor* (CF) als auch ein Normalisierungsfaktor (NF) ermittelt. Infolge einer Normalisierung der RQ auf diese beiden Faktoren konnte die kalibrierte normalisierte relative Quantität (NCRQ (*normalized calibrated relative quantities*)) der Genexpression des jeweiligen Gens bestimmt werden. In einem letzten Schritt wurden der Mittelwert der NCRQ aus den drei biologischen Replikaten der Probe sowie die jeweilige Standardabweichung gebildet.

2.11.8. Agarosegelelektrophorese von DNA und RNA

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von Spaltungsansätzen und PCR-Amplifikaten wurden 1 %-ige Agarosegele verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1x TAE-Puffer in einer Mikrowelle aufgeköcht, bis die Agarose vollständig aufgelöst war. Im Anschluss wurde die Agaroselösung in einen Gelträger gegossen und je nach Größe (9 x 11 cm, 12 x 14 cm) mit 4 bzw. 6 µL einer Ethidiumbromidlösung (1 mg/mL) versetzt und mit einem Kamm versehen. Das ausgehärtete Gel wurde zusammen mit dem Gelträger in die Elektrophoresekammer überführt und mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Falls sich kein DNA-Ladepuffer in den Reaktionsansätzen befand, wurden die Proben mit 1/6 Volumen eines 6x DNA-Ladepuffers gemischt und vollständig in die Taschen des Gels pipettiert. Zur Abschätzung der Bandengröße wurden zusätzlich 6 µL einer 1 kb Plus DNA-Leiter in eine leere Tasche pipettiert. Die Auftrennung der aufgetragenen Proben erfolgte für 60 bis 90 Minuten bei einer Spannung von 120 Volt. Abschließend erfolgte die fotografische Dokumentation der Agarosegele unter UV-Licht mithilfe des Geldokumentationssystems E-BOX VX2.

Zur Analyse der extrahierten RNA wurden 500 ng RNA mit ½ Volumen eines 2x RNA-Ladepuffers versetzt und in die Taschen eines 1%-igen Agarosegels pipettiert.

1x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer

40 mM Tris-HCl (pH 7,6)

20 mM Essigsäure

1 mM EDTA

2.11.9. Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel erfolgte mithilfe des Kits „NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up“ (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Hierfür wurde das auf einem Agarosegel aufgetrennte DNA-Fragment unter UV-Licht detektiert und ausgeschnitten. Die Aufreinigung fand gemäß den Herstellerangaben statt. Die Elution der DNA erfolgte in 30 µL NE-Puffer nach einer Inkubation von 5 Minuten bei 37°C.

2.11.10. Plasmidminipräparation mittels alkalischer Lyse

Zur Präparation von Plasmiden wurde eine 5 mL Kultur des entsprechenden Klons in LB-Medium mit dem passenden Antibiotikum angeimpft und bei 37°C über Nacht bei 180 rpm schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde Kultur in einem 2 mL Reaktionsgefäß für 1 Minute

bei 10.000 rpm und Raumtemperatur pelletiert. Das Pellet wurde in 300 μ L eiskaltem S1-Puffer resuspendiert und nach einer Zugabe von 300 μ L S2-Puffer und 10-maligem Invertieren für 10 Minuten inkubiert. 300 μ L des S3-Puffers werden hinzugefügt, der Ansatz 10 Mal invertiert und für 10 Minuten inkubiert. Nach einer anschließenden Zentrifugation für 5 Minuten bei 14.000 rpm, wurde der Überstand in eine neues 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt und mit 500 μ L Isopropanol versetzt. Zur Fällung der DNA wurde der Ansatz für 30 Minuten bei -20°C inkubiert. Die DNA wurde durch eine Zentrifugation bei 14.000 rpm für 10 Minuten pelletiert und anschließend mit 500 μ L Ethanol (70 %) gewaschen, indem der Ansatz für 5 Minuten auf Eis inkubiert und für 5 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert wurde. Das Pellet wurde für 15 Minuten bei 50°C getrocknet und in 50 μ L ddH_2O aufgenommen und durch eine weitere Inkubation bei 50°C für 15 Minuten resuspendiert.

S1-Puffer

50 mM Tris-HCl (pH 8)
10 mM EDTA
100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase
Lagerung bei 4°C

S2-Puffer

200 mM NaOH
1 % SDS

S3-Puffer

2,8 M Kaliumacetat
pH auf 5,1 mit Eisessig einstellen

2.11.11. Plasmidmidipräparation

Da für die in Abschnitt 2.10.2 beschriebene Transformation von Protoplasten größere Mengen an DNA benötigt wurden, wurden Präparationen der entsprechenden Plasmide unter Verwendung des „NucleoBond Xtra Midi“ Kits (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Das getrocknete DNA-Pellet wurde in insgesamt 100 μ L ddH_2O resuspendiert.

2.11.12. Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia coli*

Zunächst wurde eine Übernachtskultur von 2 mL LB-Medium mit dem benötigten *E. coli* Stamm erstellt. Anschließend wurden 100 mL SOB-Medium mit der Übernachtskultur inokuliert und bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 bei 37°C und 180 rpm schüttelnd inkubiert. Die Kultur wurde auf zwei 50 mL Falkongefäßen aufgeteilt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde die Kultur bei 4.000 rpm und 4°C für 10 Minuten pelletiert. Die beiden Pellets wurden in jeweils 40 mL eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und erneut für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt von 10 Minuten bei 4.000 rpm und 4°C wurden die beiden Pellets in je 3,75 mL TB-Puffer und 300 µL DMSO aufgenommen, in einem Reaktionsgefäß vereint und in 100 µL Aliquots in 1,5 mL Eppendorfgefäßen überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

TB-Puffer

10 mM PIPES (pH 7)
55 mM MnCl₂
15 mM CaCl₂
250 mM KCl
autoklavieren, Lagerung bei 4°C

2.11.13. Hitzeschocktransformation von *Escherichia coli*

Zur Transformation von *E. coli* Zellen mit dem gewünschten Plasmid wurden 100 µL Aliquots der kompetenten Zellen verwendet. Die zu transformierende DNA wurde zu den auf Eis aufgetauten Zellen hinzugefügt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 30 Sekunden bei 42°C wurden die Zellen kurz auf Eis gelagert, mit 400 µL SOC-Medium versetzt und anschließend bei 37°C und 450 rpm schüttelnd für eine Stunde inkubiert. Zur Überprüfung der Transformation wurden 50 und 100 µL der Transformation auf LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden im Anschluss mittels einer Kolonie-PCR (siehe Abschnitt 2.11.5) auf die Korrektheit des enthaltenen Plasmids hin überprüft.

2.11.14. Herstellung elektrokompetenter *Agrobacterium tumefaciens*

Ein Volumen von 5 mL LB-Medium wurde mit dem gewünschten Bakterienstamm inokuliert und bei 28°C und 200 rpm über Nacht inkubiert. Ein Milliliter der Übernachtskultur wurde in

100 mL LB-Medium überführt und bei 28°C und 200 rpm bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 bis 1,0 wachsen gelassen. Die Kultur wurde anschließend auf zwei 50 mL Falkongefäße aufgeteilt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem 10-minütigem Zentrifugationsschritt bei 4.000 rpm und 4°C wurden die beiden Pellets jeweils in 10 mL 10 %-iger Glycerinlösung aufgenommen, die Pellets in einem Reaktionsgefäß vereint und wieder zentrifugiert. Das Pellet wurde in 15 mL Glycerin (10 %) resuspendiert, erneut zentrifugiert und in 10 mL der Glycerinlösung aufgenommen. Nach einer letzten Zentrifugation wurde das Pellet in 1 bis 2 mL Glycerin (10 %) resuspendiert, in jeweils 80 µL Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.11.15. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* mittels Elektroporation

Für jede Reaktion wurde ein Aliquot der Agrobakterien von 80 µL verwendet. Von der zu transformierenden DNA wurden 10 ng auf die auf Eis aufgetauten Zellen gegeben und leicht vermischt. Anschließend wurden die Zellen in eine vorgekühlte Küvette überführt und in den Küvetteneinschub des Eppendorf Eporators gestellt. Der Einschub wurde in den Küvettenschacht eingeführt und die Transformation bei einer Spannung von 1440 Volt durchgeführt, wobei der ausgelöste Impuls eine Dauer von ca. 5 mSek haben sollte. Anschließend wurden 400 µL SOC-Medium zu dem Reaktionsansatz gegeben, dieser mit einer sterilen Pasteurpipette in ein neues 2 mL Eppendorfgefäß überführt und für 2 Stunden bei 28°C und 450 rpm inkubiert. 50 bzw. 100 µL der Transformation wurden auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und für 48 Stunden bei 28°C inkubiert. Mittels einer Kolonie-PCR wurden die gewachsenen Kolonien auf das gewünschte Plasmid hin analysiert.

2.11.16. Herstellung von Glycerindauerkulturen

Zur dauerhaften Lagerung von transformierten Zellen (*E. coli*, *A. tumefaciens*) wurden 300 µL einer Übernachtskultur mit 700 µL Glycerin versetzt, gründlich durchmischt und bei -80°C gelagert.

2.11.17. Sequenzierung

Um die Sequenzen der hergestellten DNA-Konstrukte zu überprüfen, wurden bei der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) Sequenzierungen der Plasmide in Auftrag

gegeben. Ein Volumen von 15 μL und eine Konzentration von ca. 80 $\text{ng}/\mu\text{L}$ des jeweiligen Plasmids wurden mit 1 μL des benötigten Primers (10 μM) versetzt, sofern dieser nicht bei Eurofins Genomics vorlag und anschließend gemäß den Anforderungen des Anbieters verschickt. Die Sequenzierreaktionen erfolgten mittels der *Cycle Sequencing* Technologie.

2.11.18. Computergestützte Sequenzanalyse und Primerdesign

Zur Simulation von Klonierungen, zum Erstellen von Vektorkarten und Primersequenzen sowie zur Auswertung von Sequenzanalysen wurden die beiden Programme Vector NTI Advance® 10 und CloneManager Professional 9 verwendet.

2.12. Proteinbiochemische Methoden

2.12.1. Expression von Fusionsproteinen in *Escherichia coli*

Das in dieser Arbeit verwendete Protokoll zur Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* wurde in Anlehnung an ein Protokoll aus der Dissertation von Haifa el Kilani (2016) durchgeführt. Ein Volumen von 30 mL LB-Medium mit Ampicillin wurde mit einem *E. coli* BL21 (DE3) Stamm inokuliert, der das Plasmid des zu exprimierenden Fusionsproteins trägt und über Nacht bei 37°C und 180 rpm schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde eine Hauptkultur erstellt, indem 5 mL der Vorkultur in 200 mL LB-Medium mit Antibiotikum überführt und bei 37°C und 180 rpm schüttelnd bis zu einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ bis 0,3 wachsen gelassen. Danach wurde die Hauptkultur bei 30°C weiter inkubiert, bis eine $\text{OD}_{600\text{nm}}$ zwischen 0,4 und 0,5 erreicht wurde. Nun erfolgte die Zugabe von 1 mL einer 0,2 M IPTG-Lösung, um die Expression des Fusionsproteins zu induzieren. Die Kultur wurde über Nacht bei 17°C schüttelnd inkubiert und bei 7.000 rpm bei 4°C für 20 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde in einem kleinen Volumen an LB-Medium resuspendiert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.12.2. Affinitätschromatographische Proteinaufreinigung aus *Escherichia coli*

Zellaufschluss

Das für die Aufreinigung benötigte Bakterienpellet wurde zunächst auf Eis aufgetaut und in dem jeweiligen Lyse-Puffer (30 bis 50 mL) aufgenommen. Nach der Zugabe von Lysozym (1 mg/mL) erfolgte eine Inkubation für 30 Minuten unter stetigem Rühren der Bakterien-suspension bei 4°C. Zusätzlich wurde ein Sonifikationsschritt durchgeführt, bei dem 8 Zyklen

mit einer Dauer von jeweils 30 Sekunden Sonifikation und 20 Sekunden Pause durchlaufen wurden. Die Suspension wurde für 30 Minuten bei 4°C und 4.000 rpm zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand (Lysat) wurde abgenommen und durch einen 0,45 µm Filter filtriert.

Aufreinigung mittels His-Tag

Zur affinitätschromatographischen Aufreinigung von His-markierten Proteinen wurden 1 mL Ni-NTA Superflow Cartridge Säulen (Qiagen) sowie das FH10 Microflex Pump System (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Aufreinigung erfolgte gemäß den Herstellerangaben von Qiagen. In einem ersten Schritt erfolgte die Äquilibration der zu benutzenden Säule mit einem Volumen von ca. 10 mL des Puffers NPI-10 (ohne Tween-20 und Protease Inhibitor (EDTA-frei, Thermo Fisher Scientific)). Anschließend wurde das filtrierte Lysat auf die Säule geladen. Durch Spülen der Säule mit 10 mL des Puffers NPI-20 wurden nicht-gebundene Proteine aus der Säule gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden im Anschluss mithilfe von 5 mL des Puffers NPI-100 in einem ersten Elutionsschritt von der Säule gelöst. Zusätzlich erfolgte eine weitere Elution mit 5 mL des Puffers NPI-250. Von sämtlichen Fraktionen (Lysat, Durchfluss, Waschen, Elution1 & 2) wurden Proben genommen, mit einem 1/5 ihres Volumens an 5x Lämmli-Puffer versetzt und für 10 Minuten bei 95°C aufgekocht. Die Proben wurden auf ein SDS-Gel (Abschnitt 2.12.9) aufgetragen und durch Anfärben des Gels mit Coomassie Colloidal (Abschnitt 2.12.10) die Aufreinigung der Proteine überprüft. Die Säule wurde nach jeder Aufreinigung mit 0,5 molarer NaOH-Lösung gewaschen und in einer 20%-igen Ethanollösung bei 4°C gelagert.

NPI-10 (Lyse-Puffer)

50 mM	NaH ₂ PO ₄
300 mM	NaCl
10 mM	Imidazol
	pH 8,0 einstellen durch Zugabe von NaOH
1 Tablette	Protease Inhibitor
0,01 %	Tween-20

NPI-20 (Waschpuffer)

50 mM	NaH ₂ PO ₄
300 mM	NaCl
20 mM	Imidazol
	pH 8,0 einstellen durch Zugabe von NaOH

NPI-100 (Elutionspuffer)

50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl
100 mM Imidazol
pH 8,0 einstellen durch Zugabe von NaOH

NPI-250 (Elutionspuffer)

50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl
250 mM Imidazol
pH 8,0 einstellen durch Zugabe von NaOH
nach Sterilfiltration Lagerung bei 4°C

Aufreinigung mittels GST-Tag

Die Aufreinigung der mit GST fusionierten Proteine erfolgte mithilfe der Glutathion HiCap Cartridge Säulen (Qiagen). Zu Beginn der Aufreinigung wurde die Säule mit dem jeweils verwendeten Lyse-Puffer (ohne Detergenz und Protease Inhibitor) äquilibriert und anschließend mit dem Lysat beladen. Nach dem Waschen der Säule mit 10 mL Lyse-Puffer, erfolgte die Elution der gebundenen Proteine mit jeweils 5 mL der unten aufgeführten Elutionspuffer, beginnend mit der niedrigsten Konzentration an Glutathion. Sämtliche Fraktionen der Aufreinigung wurden gesammelt und mittels SDS-PAGE und einer Coomassie-Färbung analysiert.

Lyse-Puffer GST-BON1, GST

10 mM NaH₂PO₄
140 mM NaCl
1,8 mM KH₂PO₄
2,7 mM KCl
1 Tablette Protease Inhibitor
0,1 % Triton X-100
pH 7,4 einstellen durch
Zugabe von NaOH

Lysepuffer GST-BAP1

50 mM Tris-HCl, pH 7,0
200 mM NaCl
1 mM EDTA
1 Tablette Protease Inhibitor
0,1 % Nonidet P-40

Elutionspuffer 1

50 mM Tris-HCl, pH 9,3
300 mM NaCl
1 mM DTT
15 mM Glutathion

Elutionspuffer 2

50 mM Tris-HCl, pH 9,3
300 mM NaCl
1 mM DTT
30 mM Glutathion

2.12.3. Tandemaffinitätsaufreinigung aus pflanzlichen Geweben

Die Aufreinigung von SAUL1-Proteinkomplexen zur Isolierung von potentiellen Interaktionspartnern erfolgte in der Abteilung für pflanzliche Systembiologie des „Vlaams Instituut voor Biotechnologie“ (VIB) in Gent (Belgien) gemäß den Angaben in van Leene *et al.* (2014). Für die beiden verschiedenen Fusionskonstrukte wurden jeweils zwei Experimente durchgeführt. Die Expression der Konstrukte erfolgte in pflanzlicher Zellkultur von *A. thaliana* (Ökotyp *Landsberg erecta*).

2.12.4. Assay zur Analyse der Assoziation von SAUL1 an die pflanzliche Plasmamembran

Im Rahmen dieser Analyse wurden *saul1-1* Pflanzen verwendet, die mit einem *35S::SAUL1-GFP* Konstrukt transformiert worden waren (Drechsel *et al.*, 2011). In einem ersten Schritt wurden 8 g Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff zermörsert und in 16 mL Extraktionspuffer I aufgenommen. Unter stetigem Mörsern wurde das Probenmaterial aufgetaut und mit dem Puffer vermischt. Anschließend wurde das Probengemisch auf mehrere 2 mL Reaktionsgefäße aufgeteilt und bei 4°C für 15 Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und eventuelle Pflanzenreste mittels Filtration durch ein Miracloth Filterpapier entfernt. In einem nächsten Schritt wurde der Pflanzenrohextrakt in 1,2 mL Volumina auf „Beckman Ultracentrifuge“ Reaktionsgefäße aufgeteilt und bei 4°C für eine Stunde bei 100.000xg zentrifugiert. Die Überstände wurden entfernt und die Pellets in jeweils 100 µL Extraktionspuffer II durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Die gelösten Pellets wurden in einem neuen Reaktionsgefäß vereint und die Proteinkonzentration bestimmt (Abschnitt 2.12.8). Anschließend wurden 5 Reaktionsansätze erstellt, indem die

Proteinlösung in einem Volumen von 1 mL auf eine Konzentration von 100 ng/μL mit dem Extraktionspuffer II verdünnt wurde. Der Extraktionspuffer II enthielt neben den generellen Bestandteilen eine der folgenden Chemikalien, mit der die Assoziation von SAUL1 an die pflanzliche Plasmamembran analysiert werden sollte: NaCl (2 M), NaSCN (2 M), NaBr (2 M), Na₂CO₃ (0,1 M) oder NaOH (0,1 M). Die Proben wurden auf Eis für eine Stunde inkubiert und in regelmäßigen Abständen invertiert. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation bei 100.000xg für eine Stunde bei 4°C. Die Überstände wurden abgenommen und mit 200 μL 5x Lämmli-Puffer versetzt. Zur Analyse der Pellets wurden diese in 1 mL Extraktionspuffer II resuspendiert und ebenfalls mit 200 μL 5x Lämmli-Puffer versetzt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht (Abschnitt 2.12.9 und 2.12.11).

Extraktionspuffer I

50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
0,5 M	Saccharose
1 mM	MgCl ₂
10 mM	EDTA
5 mM	DTT
1:100	Protease Inhibitor

Extraktionspuffer II

50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
10 mM	EDTA
5 mM	DTT
1:100	Protease Inhibitor
2 M	NaCl/
2 M	NaSCN
2 M	NaBr
0,1 M	Na ₂ CO ₃
0,1 M	NaOH

5x Lämmli-Puffer

300 mM	Tris-HCl, pH 6,8
50 %	Glycerol
10 %	SDS
0,005 %	Bromphenolblau
0,06 μg/μL	DTT (frisch dazugeben)

2.12.5. Proteinextraktion und Co-Immunpräzipitation (Co-IP) aus pflanzlichen Geweben

Die Proteinextraktion wurde in Anlehnung an Piquerez *et al.* (2014) durchgeführt. Der Co-IP wurde zum einen dazu verwendet, Protein-Protein-Interaktionen mit Blattmaterial von infiltrierten *N. benthamiana* Pflanzen (Abschnitt 2.10.3) zu analysieren. Zum anderen konnte mithilfe des folgenden Protokolls eine Anreicherung eines Proteins aus stabil transformierten *A. thaliana* Überexpressionsmutanten durchgeführt werden. Es wurde jeweils 1 bis 2 g Pflanzenmaterial benötigt.

Das Pflanzenmaterial wurde zunächst in flüssigem Stickstoff gemörsert und mit dem Extraktionspuffer versetzt. Hierbei wurde die vierfache Menge des eingesetzten Pflanzenmaterials verwendet. Das zerkleinerte Material wurde in dem Puffer aufgetaut und durch regelmäßiges Mörsern mit dem Puffer vermischt. Dieser Rohextrakt wurde bei 14.000 rpm für 15 Minuten bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde durch ein Miracloth Filterpapier filtriert, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Anschließend wurde die magnetische Matrix (GFP-Trap®_M, ChromoTek-GmbH, Planegg-Martinsried) mit dem Extraktionspuffer, jedoch ohne Tween-20, äquilibriert. Zu diesem Zweck wurden 25 bis 50 µL der Matrix jeweils dreimal mit 100 µL des Puffers versetzt und nach Absetzen der Matrix in einem Magnetständer wurde der Überstand entfernt. Danach wurde die Matrix in den filtrierten Rohextrakt überführt und für 2 Stunden bei 4°C über Kopf rotierend inkubiert. Bei Ansätzen, die in einem Falkongefäß angesetzt wurden, erfolgte das Pelletieren der Matrix zunächst durch einen Zentrifugationsschritt von 5 Minuten bei 1000xg bei 4°C. Der Großteil des Überstands wurde entfernt und der Rest zusammen mit der Matrix in ein Eppendorfgefäß überführt. Mithilfe des Magneten wurde die Matrix zurückgehalten und der restliche Puffer entfernt. Bei 4°C wurde die Matrix dreimal mit 500 µL Waschpuffer (Extraktionspuffer ohne PVPP, mit 0,1 % Tween-20) gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch eine Inkubation der Matrix in 25 bis 50 µL 2x Lämmli Puffer (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) für 10 Minuten bei 95°C. Abschließend erfolgte die Analyse der Elutionsfraktion mittels SDS-PAGE und Western Blot.

Extraktionspuffer

150 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
150 mM	NaCl
5 %	Glycerol
5 mM	EDTA
10 mM	Na ₂ MoO ₄
1 mM	Na ₃ VO ₄
10 mM	DTT
1:100	Protease Inhibitor
1 %	PVPP
0,5 %	Tween-20

2.12.6. GST-Pull-down

Die Durchführung des GST-Pull-Down Assays erfolgte gemäß den Angaben des *Glutathione Affinity Handbook* (2014) von Qiagen unter Verwendung der Glutathion HiCap Matrix. Pro Reaktionsansatz wurden 25 µL der Matrix und 10 µg des jeweiligen Proteins benötigt. Zunächst wurde die Matrix mit dem Puffer TN1 äquilibriert, d.h. die Matrix wurde in einem 1 mL des Puffers aufgenommen und für 2 Minuten bei 1.000xg zentrifugiert. Das Pellet wurde in 25 µL des TN1-Puffers resuspendiert und bei 4°C gelagert. Die Proteine des jeweiligen Reaktionsansatzes wurden gemäß Tabelle 2.17 in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß pipettiert und mit TN1-Puffer auf ein Volumen von einem Milliliter aufgefüllt. Die äquilibrierte Matrix wurde hinzugefügt und die Reaktionen für zwei Stunden rotierend bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionen für 2 Minuten bei 1.000xg bei 4°C zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet in neuem TN1-Puffer aufgenommen. Dieser Waschschrift wurde insgesamt dreimal durchgeführt. In einem letzten Schritt wurde das Pellet in 2x Lämmli-Puffer resuspendiert und für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und mittels SDS-PAGE und Western Blot auf Proteininteraktionen hin analysiert.

Tabelle 2.17: Übersicht der Reaktionsansätze des GST-Pull-down Assays („+“ = Protein vorhanden, „-“ = Protein nicht vorhanden)

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4
His-SAUL1	+	+	+	+
GST-BON1	-	+	-	-
GST-BAP1	-	-	+	-
GST	-	-	-	+

TN1-Puffer

50 mM Tris-HCl, pH 9,3
 200 mM NaCl
 1 mM DTT

2.12.7. Löslichkeitsassay

Um einen möglichst effizienten Puffer zur Lyse von Fusionsproteinen aus *E. coli* zu finden, wurde ein Löslichkeitsassay nach Lindwall *et al.* (2000) durchgeführt, bei dem Puffer mit unterschiedlicher Zusammensetzung getestet wurden. Folgende Puffer wurden hierfür verwendet.

Tabelle 2.18: Zusammensetzung der verwendeten Puffer für den Löslichkeitsassay

Puffer	Zusammensetzung
I	PBS*, pH 7,4, 0,1 % Triton X-100
II	PBS*, pH 7,4, 0,1 % Triton X-100, 100 mM Urea
III	100 mM Tris-HCl, pH 7,0, 50 mM NaCl, 100 mM Urea
IV	100 mM Tris-HCl, pH 7,0, 200 mM NaCl, 100 mM Urea
V	100 mM Tris-HCl, pH 7,0, 200 mM NaCl, 100 mM Urea, ,1 % Triton X-100
VI	50 mM Tris-HCl, pH 7,0, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40
VII	50 mM Tris-HCl, pH 7,0, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% NP-40
VIII	100 mM Tris-HCl, pH 8,5, 100 mM KCl, 2 mM EDTA, 1 % Triton X-100
IX	100 mM Tris-HCl, pH 8,5, 1 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 10 mM DTT
X	100 mM Tris-HCl, pH 7,0, 2 M NaCl, 0,1 % CHAPS
XI**	50 mM Tris-HCl, pH 7,9, 10 % Glycerin, 6 mM MgCl ₂ , 0,1 % Triton X-100
Waschpuffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA

* = 10 mM Na₂HPO₄, 140 mM NaCl, 1,8 mM KH₂PO₄, 2,7 mM KCl

** = zusätzlich beim Löslichkeitsassay von AtKRP125b verwendet

Das Pellet einer 200 mL Expressionskultur des benötigten Fusionsproteins wurde auf Eis aufgetaut und mit dem Waschpuffer, je nach Menge des Pellets, auf ein Volumen von 15 bis 30 mL in einem 50 mL Falkongefäß aufgefüllt. Die Pelletlösung wurde in 1 mL Aliquots auf 10 1,5 mL Eppendorfgläser verteilt und bei 10.000 rpm für 1 Minute pelletiert. Anschließend wurden die Pellets in 1 mL des jeweiligen Lysepuffers durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Durch Zugabe einer LysozymbLösung (c = 1 mg/mL) und einer Inkubation von 15 Minuten auf Eis, erfolgte der Verdau der Zellpellets. Danach wurden die Lösungen bei 4°C am Sonifizierer (Hielscher, UP5H) jeweils 8 mal für 30 Sekunden mit 20 Sekunden Unterbrechung sonifiziert. Die Proben wurden für 5 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen, mit einem 5x Lämmli Puffer versetzt und für 10 Minuten bei 95°C aufgekocht. Die Proben wurden entweder bei -20°C gelagert oder sofort auf ein

Polyacrylamidgel aufgetragen (Abschnitt 2.12.9) und sowohl mit einer Coomassie-Färbung (Abschnitt 2.12.10) als auch mithilfe eines Western Blots (Abschnitt 2.12.11) analysiert.

Beim Löslichkeitsassay des Kinesin-Proteins AtKRP125b wurden neben den Puffer I bis X, der Puffer XI verwendet. Sämtliche Puffer enthielten zusätzlich zu den in Tabelle 2.18 aufgeführten Substanzen 1 mM DTT (Ausnahme Puffer IX) und 1 mM ATP.

2.12.8. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mithilfe des Pierce™ 660nm Protein Assays (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Für die verschiedenen Pufferlösungen, die zur Extraktion bzw. Aufreinigung der Proteine verwendet wurden, wurde jeweils eine Standardkurve mit verschiedenen BSA-Verdünnungen mithilfe des NanoDrop 2000 Spektrophotometers (Thermo Fisher Scientific) erstellt. Um die Proteinkonzentration von einzelnen Proben zu messen, wurden zunächst 150 µL der Pierce™-Reagenz in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß vorgelegt. Anschließend wurden 10 µL der zu messenden Probe hinzugefügt und der Ansatz durch Vortexen gemischt. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Proteinkonzentration am NanoDrop 2000 Spektrophotometer gemessen, indem 2 µL des Ansatzes auf die Messzelle des Geräts aufgetragen und mithilfe der dazugehörigen Standardkurve die Konzentration an enthaltenen Proteinen ermittelt wurde.

2.12.9. Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Molekülmasse wurden diese auf Polyacrylamidgele aufgetragen und einem elektrischen Feld ausgesetzt. Hierfür wurde zunächst ein 11 %-iges Trenngel gegossen, das sich aus den folgenden Substanzen zusammensetzt.

ddH ₂ O	1,86 mL
1,5 M Tris-HCl, 0,4 % SDS, pH 8,8	1,25 mL
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	1,835 mL
Ammoniumperoxodisulfat (APS) (10 %)	0,05 mL
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	0,005 mL
	<hr/>
	5 mL

Material und Methoden

Nachdem die beiden Substanzen APS und TEMED hinzugegeben wurden, wurde die Lösung nach leichtem Schwenken zügig zwischen zwei Glasplatten für Minigele mit 0,75 mm Spacer (Mini PROTEAN System, Biorad, München, Deutschland) pipettiert und mit 1 mL ddH_2O beschichtet. Nach dem Aushärten des Trenngels wurde ein 4 %-iges Sammelgel nach dem folgenden Schema hergestellt.

ddH_2O	1,525 mL
1,5 M Tris-HCl, 0,4 % SDS, pH 6,8	0,625 mL
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	0,325 mL
Ammoniumperoxodisulfat (APS) (10 %)	0,025 mL
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	0,0025 mL
	<hr/>
	2,5025 mL

Das überschüssige Wasser zwischen den Glasplatten wurde abgegossen und die Lösung für das Sammelgel auf das ausgehärtete Gel gegeben. Ein Kamm mit 10 Taschen wurde eingesteckt und das Gel bis zur vollständigen Polymerisation stehen gelassen.

Für die Analyse von Proteinen wurden diese mit 1/5 Volumen eines 5x Lämmli Puffers (Abschnitt 2.12.4) versetzt und für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht. Um die Molekülmasse der aufzutrennenden Proteine nach dem Lauf des Gels abschätzen zu können, wurden neben den auf Raumtemperatur abgekühlten Proben 5 μL eines Größenstandards (PageRuler™ Plus Prestained Protein ladder, Thermo Fisher Scientific) aufgetragen. Zum Konzentrieren der aufgetragenen Proteine innerhalb des Sammelgels wurde zu Beginn der Elektrophorese eine Spannung von 130 Volt (V) angelegt. Sobald die Lauffront der Proben in das Trenngel übergetreten war, wurde die Spannung auf 150 bis 180 V erhöht. Die Dauer der Elektrophorese war hierbei abhängig von der benötigten Auftrennung der Proteine. Anschließend wurde das Gel entweder zweimal für 10 Minuten in ddH_2O unter Schwenken gewaschen und mithilfe einer Coomassie Colloidal Färbelösung (Abschnitt 2.12.10) über Nacht angefärbt oder für einen Western Blot (Abschnitt 2.12.11) weiterverwendet.

10x SDS-Laufpuffer

0,25 M	Tris-HCl (pH 8,3)
1,92 M	Glycin
1 %	SDS

2.12.10. Coomassie Colloidal Gelfärbung

Die Anfärbung der Polyacrylamidgele wurde nach Kang *et al.*, (2002) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde ein Gel über Nacht in der Färbelösung schüttelnd inkubiert und anschließend bis zum benötigten Grad der Entfärbung mit Entfärbelösung gewaschen. Nach mehrmaligem Waschen des Gels in Wasser wurde das Gel mithilfe eines Scanners fotografisch dokumentiert.

Färbelösung

0,02 %	CBB G-250
5 %	Aluminiumsulfat Hydrat
10%	Ethanol
2 %	ortho-Phosphorsäure (85 %)

Entfärbelösung

10 %	Ethanol
2 %	ortho-Phosphorsäure (85 %)

2.12.11. Semi-dry Western Blot

Zur Immundetektion von Proteinen, die zuvor mithilfe eines Polyacrylamidgels (Abschnitt 2.12.9) anhand ihrer Molekülmasse aufgetrennt wurden, erfolgte ein Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran. Zu diesem Zweck wurden pro Gel vier 3MM-Papiere und eine Membran zurechtgeschnitten. Zwei der 3MM-Papiere wurden im 1x Transferpuffer angefeuchtet und auf den Korpus des Fastblot-Geräts (Biometra), der Anode, gelegt. Die beiden Papiere wurden mit der in Transferpuffer getränkten Nitrocellulosemembran überdeckt. Das Polyacrylamidgel wurde von den beiden Glasplatten gelöst, das Sammelgel abgetrennt und nach leichtem Anfeuchten im Transferpuffer auf die Membran platziert. Nach einer Zugabe von ein paar Tropfen des Puffers auf das Gel wurden aufgetretene Luftblasen durch Ausrollen mit einer Glaspipette entfernt. Abschließend wurden zwei angefeuchtete 3MM-Papiere auf das Gel gelegt. Erneut wurden Luftblasen durch Rollen über die letzte Schicht entfernt und der Deckel des Fastblots, die Kathode, auf die Anode gesetzt. Bei einer Stromstärke von 60 mA pro Gel erfolgte das Elektroblothing für 65 Minuten bei Raumtemperatur.

Nach Beendigung des Transfers wurde die Apparatur auseinandgebaut und die Membran in der Blockierungslösung mit 4 % Magermilchpulver über Nacht bei 4°C und unter leichtem

Schwenken blockiert. Nach dem Entfernen der Blockierungslösung erfolgte die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper, wobei dieser in einer in Tabelle 2.5 angegebenen Verdünnung in 10 mL der Blockierungslösung mit 1 % Magermilchpulver vorlag. Die Inkubation erfolgte schüttelnd bei Raumtemperatur für zwei Stunden oder über Nacht bei 4°C. Anschließend erfolgte das Waschen der Membran, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Hierfür wurde die Membran dreimal für 10 bis 20 Minuten, je nach Antikörper, in 1x-TBS-T Puffer geschwenkt. Nun erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, ebenfalls verdünnt in 10 mL einer 1 % -igen Magermilchpulver-Blockierungslösung für zwei weitere Stunden. Nach drei weiteren Waschschrritten erfolgte die Detektion der Proteine mithilfe einer Chemilumineszenz-Reaktion. Hierfür wurden die Entwicklerlösungen 1 und 2, die, die für die Reaktion essentiellen Substanzen Luminol, Cumarinsäure und Wasserstoffperoxid enthalten, auf die Membran gegeben und der Ansatz für 1 Minute stark geschwenkt (Bartetzko, 2012). Die Detektion der Antikörper-spezifischen Signale erfolgte mithilfe des Imaging Systems LAS-3000 (Fujifilm, Kleve, Deutschland).

10x TBS

0,5 M Tris-HCl (pH 7,6)
1,5 M NaCl

1x TBS-T

50 mL 10x TBS
25 µL Tween-20
ad 500 mL _{ve}H₂O

10x Transferpuffer

250 mM Tris-HCl (pH 8,3)
1,92 M Glycin

1x Transferpuffer

10 mL 10x Transferpuffer
20 mL Methanol
ad 1000 mL _{ve}H₂O

Blockierungslösung

50 mL 10x TBS
2 g/0,5 g Magermilchpulver
(4 %/1 %)
25 µL Tween-20
ad 500 mL veH_2O

Entwicklerlösung 1

5 mL Tris-HCl, 100 mM, pH 8,5
3 µL Wasserstoffperoxid (50 %)

Entwicklerlösung 2

5 mL Tris-HCl, 100 mM, pH 8,5
72 µL CouLu-Reagenz

CouLu-Reagenz

22 µL Cumarinsäure (90 mM)
50 µL Luminol (250 mM)

2.12.12. Ponceau S Färbung

Um die übertragenen Proteine auf der Nitrocellulosemembran anfärben zu können, wurde die Membran nach dem Blotten kurz in veH_2O gewaschen und anschließend für 5 Minuten in der Ponceau S Färbelösung unter leichtem Schütteln inkubiert, bis die zu erwartenden Proteinbanden sichtbar waren. Durch eine Inkubation der Membran in der Entfärbelösung wurde die Ponceau S Färbung wieder entfernt.

Ponceau S Färbelösung

0,1 % Ponceau S
1 % Essigsäure

Ponceau S Entfärbelösung

1 % Essigsäure

2.13. Bildgebende Methoden

2.13.1. Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

Die Analyse der subzellulären Lokalisierung von GFP- bzw. YFP-fusionierten Proteinen und der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC) in transgenen *A. thaliana* Pflanzen sowie Mesophyllprotoplasten erfolgte mithilfe der Leica TCS SP8 konfokalen Plattform (Leica

Microsystems, Wetzlar, Deutschland). Die Anregung der GFP-Fusionsproteine erfolgte bei einer Wellenlänge von 488 nm. Die Detektion der Fluoreszenz wurde in einem Detektionsfenster von 496 nm bis 509 nm (bzw. 500 nm bis 513 nm) durchgeführt. Die YFP-Fusionsproteine wurde bei einer Wellenlänge von 514 nm angeregt und die Fluoreszenz in einem Detektionsfenster von 520 nm bis 535 nm aufgenommen. Die Autofluoreszenz der Chloroplasten wurde in einem Bereich von 649 nm bis 692 nm detektiert.

Zur Analyse der BiFC-Konstrukte erfolgte ein sequenzieller Scan, um sowohl die YFP- als auch die RFP-Fluoreszenz aufnehmen zu können. In der ersten Sequenz erfolgte eine Anregung bei 514 nm und die YFP-Signale wurden in einem Detektionsfenster von 531 nm bis 544 nm ermittelt. In der zweiten Sequenz erfolgte die Anregung des RFP bei einer Wellenlänge von 561 nm. Die Fluoreszenz wurde in einem Bereich von 580 nm bis 95 nm detektiert.

2.13.2. Direkte stochastische optische Rekonstruktionsmikroskopie

Die Durchführung der direkten stochastischen optischen Rekonstruktionsmikroskopie erfolgte mithilfe von Dr. Dennis Eggert (Heinrich-Pette-Institut - Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie, Hamburg) in Anlehnung an Eggert *et al.* (2014) mithilfe eines modifizierten stochastischen optischen Rekonstruktionsmikroskops (N-STORM, Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland). Das Mikroskop enthielt ein Apo TIRF 100x Öl-Immersionsobjektiv mit einer numerischen Apertur von 1,49 (Nikon GmbH), einer *Electron Multiplying Charge-Coupled Device (EMCCD)*-Kamera (iXon + DU-897, Andor Technology Plc, Belfast, England) und einem Quadband Filter, bestehend aus einem *Quad line Beamsplitter* (zt405/488/561/640rpc TIRF, Chroma Technology Corporation, Bellows Falls, Vermont, USA) und einem *Quad line* Emissionsfilter (Brightline HC 446, 523, 600, 677, Semrock, Inc., Rochester, New York, USA). Die Anregung der GFP-Fusionsproteine erfolgte mithilfe eines 40 mW 488 nm Argon Gaslasers (Melles Griot GmbH, Bensheim, Deutschland). Die Belichtungszeit der *EMCCD*-Kamera betrug 16 mSek pro Einzelbild mit einer *EM-Gain* Einstellung von 300. Des Weiteren wurde das Nikon *perfect focus* System verwendet, um den Fokus während der Aufnahmen stabil halten zu können. Die super-auflösenden Bilder wurden aus einer Reihe von 15.000 bis 30.000 Weitwinkelaufnahmen pro Kanal unter der Verwendung des N-STORM Analyse-Moduls v. 2.0.0.76 of NIS Elements AR v. 4.00.07 (Laboratory imaging s.r.o., Prag, Tschechische Republik) erstellt.

3. Ergebnisse

3.1. Analyse der Funktion von PUB-ARM Proteinen bei der pflanzlichen Autoimmunität

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Protein SAUL1 (PUB44) sowie deren Paraloge PUB42 und PUB43 untersucht werden, um herauszufinden, ob sie einen Einfluss auf die Genexpression bei der pflanzlichen Autoimmunität haben. Zur Analyse von SAUL1 und PUB43 wurden Pflanzenlinien verwendet, bei denen eine Überexpression des jeweiligen Gens vorlag. Durch einen Vergleich von T-DNA Insertionslinien, bei denen entweder *SAUL1*, *PUB42* oder beide Gene nicht exprimiert werden, sollte die Charakterisierung von *PUB42* erfolgen. Die verschiedenen Linien wurden hinsichtlich ihres Phänotyps und der Expression von *PATHOGENESIS-RELATED (PR)*-Genen bei unterschiedlichen Temperaturen analysiert.

3.1.1. Phänotypische Analyse von SAUL1- und PUB43-Überexpressionspflanzen

Um die Funktion des Proteins PUB43 zu charakterisieren, wurden zwei unabhängige Überexpressionslinien (KV29 #6.4 und #9.3, nachfolgend als *GFP-PUB43-1* und -2 bezeichnet) verwendet. Die Linien wurden durch eine stabile Transformation des Fusionskonstrukts *2x35S::GFP-PUB43* in *A. thaliana* (Ökotyp Col-0) erstellt (Katja Vogelmann und Stefan Hoth, unveröffentlichte Daten, Abteilung für Molekulare Pflanzenphysiologie, Universität Hamburg). Nach einer Anzucht der Pflanzen bei 25°C unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht, 8 Stunden Dunkelheit) konnten bei beiden Linien im Vergleich zu Wildtyppflanzen, sowohl Pflanzen mit verändertem als auch mit unverändertem Phänotyp beobachtet werden. In Abbildung 3.1 ist exemplarisch der veränderte Phänotyp der Linie *GFP-PUB43-1* dargestellt. Die Pflanzen wiesen ein stark reduziertes Wachstum sowie eine Deformation der Blätter auf, d. h. die Blätter waren stark eingerollt (Abb. 3.1.B). Die Genotypisierung der beiden Linien ergab, dass das Fusionskonstrukt sowohl bei Pflanzen mit verändertem als auch mit unverändertem Phänotyp nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Es stellte sich die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen den phänotypischen Veränderungen und der Expressionsstärke des Fusionskonstrukts bestand. Um diese Frage beantworten zu können, wurde sich in den nachfolgenden Experimenten (siehe Abschnitt 3.1.2) auf die Linie *GFP-PUB43-1* konzentriert.

Zur Analyse der Überexpression von *SAUL1 in planta* wurden im Rahmen der Dissertation von Gabriele Drechsel (2011) *A. thaliana* Pflanzen stabil mit dem Konstrukt *35S::YFP-SAUL1* transformiert und transgene Pflanzen mithilfe einer Basta-Selektion identifiziert. Diese Pflanzen zeigten unter Standardwachstumsbedingungen ein reduziertes Wachstum (Vogelmann *et al.*, 2014). Aus den bereits etablierten Linien wurde die Linie GD41 #14 ausgewählt, welche im Folgenden als *YFP-SAUL1* bezeichnet wird. Bei der Anzucht der Pflanzen bei 25°C unter Langtagbedingungen konnten zwei unterschiedliche Phänotypen beobachtet werden. Ein Teil der Pflanzen zeigte den in Abbildung 3.1.C dargestellten veränderten Phänotyp. Die Pflanzen waren sehr viel kleiner im Vergleich zu Wildtyppflanzen. Zusätzlich waren ihre Blätter, ähnlich wie bei den *GFP-PUB43*-Überexprimierern, stark eingerollt. Die Deformation sowie das reduzierte Wachstum der Pflanzen erschienen bei den *YFP-SAUL1*-Pflanzen deutlicher ausgeprägt als bei den *GFP-PUB43-1*-Pflanzen (Abb. 3.1.B). Bei dem anderen Teil der Pflanzen konnten phänotypisch keine Unterschiede zu den Wildtyppflanzen beobachtet werden. Vermutlich ist dieses Ergebnis darauf zurückzuführen, dass es sich bei der verwendeten Linie um die segregierende T2-Generation handelt.

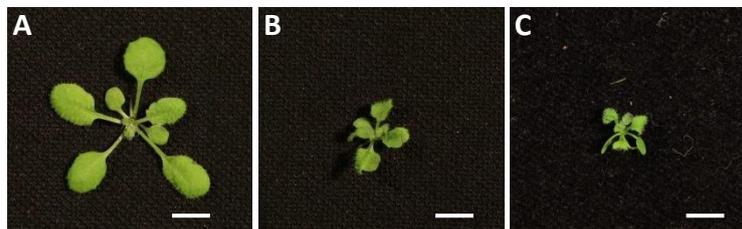


Abbildung 3.1: Darstellung der Phänotypen der Überexpressionslinien im Vergleich zum Wildtyp . **A:** Wildtyp Col-0, **B:** *GFP-PUB43-1*-Pflanze, **C:** *YFP-SAUL1*-Pflanze. *GFP-PUB43-1*- und *YFP-SAUL1*-Pflanzen wiesen im Vergleich zum Wildtyp ein stark verlangsamtes Wachstum sowie eingerollte Blätter auf. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte auf Erde bei 25°C unter Langtagbedingungen für 15 (**A, B**) bzw. 17 (**C**) Tage. Maßstab = 0,5 cm.

Sämtliche Pflanzenlinien waren in der Lage Samen zu bilden, jedoch konnte bei den phänotypisch veränderten *YFP-SAUL1*-Pflanzen eine verringerte Produktion von Samen beobachtet werden.

3.1.2. Analyse der Expression von *GFP-PUB43* und *YFP-SAUL1* in *Arabidopsis thaliana*

Um zu überprüfen, ob der beobachtete Phänotyp der verwendeten Pflanzenlinien auf eine Überexpression von *PUB43* und *SAUL1* zurückzuführen ist, wurde zunächst die Expression der Fusionskonstrukte am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop analysiert. Aus den beiden

Überexpressionslinien wurden jeweils Pflanzen mit verändertem und mit unverändertem Phänotyp analysiert. Bei *GFP-PUB43-1*-Pflanzen, die in ihrer Morphologie verändert waren, konnte stets ein GFP-Fluoreszenzsignal an der Plasmamembran detektiert werden (Abb. 3.2.A). Deformierte *YFP-SAUL1*-Pflanzen wiesen ebenfalls ein Fluoreszenzsignal an der Plasmamembran auf (Abb. 3.2.B), wobei dieses nicht bei allen kleinwüchsigen Pflanzen beobachtet werden konnte. Bei den Pflanzen der beiden Überexpressionslinien, die sich äußerlich nicht von Wildtyppflanzen unterschieden, konnte keine Fluoreszenz beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Ein weiterer Nachweis der Expression der beiden Fusionsproteine sollte mithilfe einer Immundetektion erfolgen. Hierfür wurden von beiden Überexpressionslinien Proteinextrakte von phänotypisch veränderten und unveränderten Pflanzen hergestellt (Abschnitt 2.13.5) und die jeweils 2 µg der Proteine mithilfe eines Western Blots auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Immundetektion der mit GFP und YFP fusionierten Proteine erfolgte mithilfe eines anti-GFP-Antikörpers und ist in Abbildung 3.2 dargestellt. Die erwartete Bandengröße beträgt für beide Fusionsproteine 116 kDa.

Die Analyse der *GFP-PUB43-1* Linie ergab, dass bei den Pflanzen, die sowohl eine veränderte Morphologie als auch eine GFP-Fluoreszenz aufwiesen, die erwartete Proteinbande detektiert werden konnte (Abb. 3.2.C). Im Gegensatz dazu wurde in den Proteinextrakten der Wildtyppflanzen und der *GFP-PUB43-1*-Pflanzen, deren Phänotyp unverändert war, keine Bande festgestellt. Bei den *YFP-SAUL1*-Pflanzen war bei den phänotypisch veränderten Pflanzen, unabhängig vom YFP-Fluoreszenzsignal, eine Proteinbande von 116 kDa zu erkennen (Abb. 3.2.D). Die Pflanzen, die sich nicht vom Wildtyp unterschieden sowie die Wildtyppflanzen zeigten keine Proteinbande.

Um zu bestätigen, dass es sich bei den detektierten Proteinbanden um die beiden Fusionsproteine GFP-PUB43 und YFP-SAUL1 handelt, wurden diese aus den Proteinextrakten durch eine Immunpräzipitation angereichert, auf einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die erwarteten Proteinbanden mittels Massenspektrometrie (MS) analysiert. Die Analysen wurden in der Abteilung für Molekulare Pflanzengenetik (Prof. Dr. Julia Kehr) der Universität Hamburg durchgeführt. Die Proteine PUB43 und SAUL1 konnten in den jeweiligen Proben identifiziert werden.

Ergebnisse

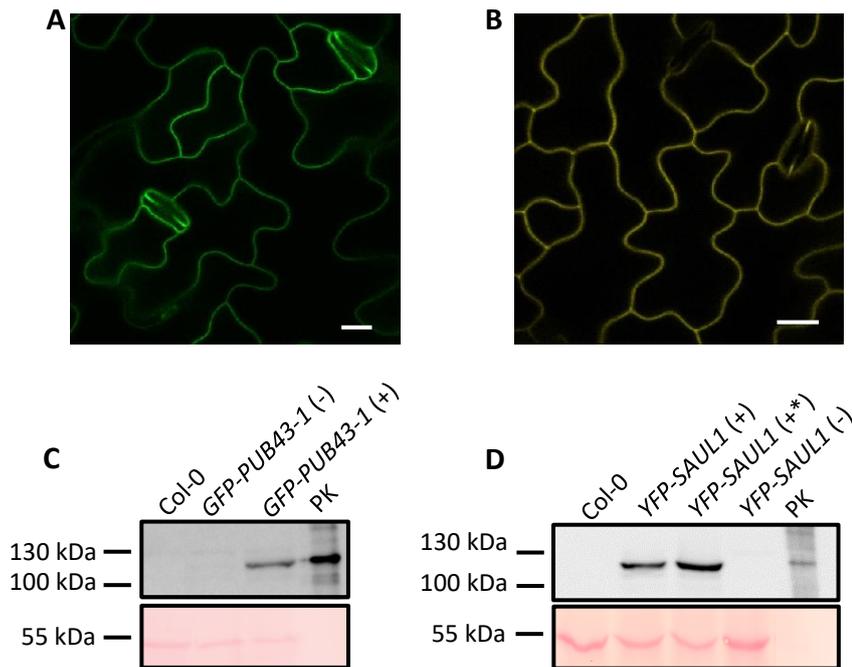


Abbildung 3.2: Analyse der Expression der Fusionsproteine GFP-PUB43 und YFP-SAUL1. **A:** Subzelluläre Lokalisierung von GFP-PUB43. *GFP-PUB43-1*-Pflanzen mit verändertem Phänotyp wiesen ein GFP-Signal an der Plasmamembran auf. Die Pflanzen wurden für 22 Tage bei 25°C unter Langtagbedingungen auf Erde angezogen. Maßstab = 10 µm. **B:** Subzelluläre Lokalisierung von YFP-SAUL1. *YFP-SAUL1*-Pflanzen, die einen veränderten Phänotyp zeigten, zeigten ebenfalls eine YFP-Fluoreszenz an der Plasmamembran. Die Pflanzen wurden für 25 Tage bei 25°C unter Langtagbedingungen auf Erde angezogen. Maßstab = 10 µm **C:** Immundetektion von GFP-PUB43 aus Proteinextrakt. Im Vergleich zum Wildtyp und *GFP-PUB43-1*-Pflanzen, die keinen veränderten Phänotyp zeigten (-), konnte in kleinwüchsigen *GFP-PUB43-1*-Pflanzen (+) das Fusionsprotein mit einer Bandengröße von 116 kDa detektiert werden. **D:** Immundetektion von YFP-SAUL1 aus Proteinextrakt. Bei kleinwüchsigen *YFP-SAUL1*-Pflanzen mit (+) und ohne YFP-Signal (+*) konnte die erwartete Proteinbande von 116 kDa detektiert werden. Bei Wildtyppflanzen und *YFP-SAUL1*-Pflanzen ohne veränderte Morphologie konnte kein Fusionsprotein nachgewiesen werden. Die in **B** und **D** dargestellten Banden (Ponceau S Färbung) zeigen die große Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase. Die Detektion dieser Banden sollte veranschaulichen, dass gleiche Mengen der verschiedenen Proteinextrakte analysiert wurden. PK = Positivkontrolle (GFP-fusioniertes Protein zum Nachweis der Spezifität des Antikörpers)

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass es sich bei den verwendeten Linien um Überexpressionslinien der beiden Fusionsproteine GFP-PUB43 und YFP-SAUL1 handelt. Die subzelluläre Lokalisierung sowie die Immundetektion in den Proteinextrakten deuten auf einen Zusammenhang zwischen den phänotypischen Veränderungen und der Expressionsstärke des jeweiligen Fusionskonstrukts.

3.1.3. Analyse der Expression von *PATHOGENESIS-RELATED*-Genen in *PUB43*- und *SAUL1*-Überexpressionspflanzen

Das Ausschalten von Genen kann in *A. thaliana* in einigen Fällen zu einer Aktivierung der pflanzlichen Immunabwehr führen (Rodriguez *et al.*, 2016). Diese Pflanzen weisen typische Merkmale einer auto-aktivierten Immunität auf, wie Zwergwuchs, systemische Läsionen, erhöhte Resistenz gegenüber Pathogenen und konstitutive Expression von Genen, die im Zusammenhang mit der Immunabwehr stehen (van Wersch *et al.*, 2016). Die *saul1-1* Mutanten zeigten nach Herabsenken der Umgebungstemperatur sowohl ein verzögertes Wachstum als auch systemische Läsionen. Parallel dazu wurde nach der Umstellung der Temperatur von 25°C auf 20°C ein Anstieg der Expression von Genen, z. B. *PATHOGENESIS-RELATED (PR)*-1 und -2 beobachtet (Disch *et al.*, 2016; Tong *et al.*, 2017).

Um die Frage zu beantworten, ob die beiden Proteine SAUL1 und PUB43 bei der Genexpression der Autoimmunität eine Rolle spielen und infolge der Überexpression zu einem Autoimmunphänotyp führen, wurden die beiden Überexpressionslinien *GFP-PUB43-1* und *YFP-SAUL1* der oben genannten Temperaturumstellung unterzogen. Jede Überexpressionslinie wurde zusammen mit Saatgut von Wildtyppflanzen auf Erde ausgebracht und für 2 Wochen bei 25°C unter Langtagbedingungen herangezogen. Für jede Linie wurden 3 Proben genommen, wobei für jede Probennahme die Expression des jeweiligen Fusionsproteins mittels Fluoreszenzmikroskopie positiv bestätigt wurde. Der Zeitpunkt dieser Probennahme wird im Folgenden als $t = 0$ Stunden (h) bezeichnet. Die restlichen Pflanzen wurden aufgeteilt, wobei eine Hälfte für 72 h bei 20°C inkubiert und die andere Hälfte bei 25°C belassen wurde. Anschließend erfolgte eine erneute Probennahme für jede Linie bei beiden Temperaturen. Die Proben wurden zur RNA-Isolierung und cDNA-Synthese verwendet. Die cDNA wiederum wurde mittels quantitativer Reverse Transkriptase-PCR (RT-qPCR) auf Veränderungen der Expression der Gene *PR1* und *PR2* untersucht. Hierbei wurde die kalibrierte normalisierte relative Quantität (NCRQ (*normalized calibrated relative quantities*)) der jeweiligen Genexpression, nachfolgend als relative Expression bezeichnet, ermittelt. Die Ergebnisse der Expressionsanalyse der *GFP-PUB43-1*-Linie sind in der Abbildung 3.3 dargestellt.

Im Gegensatz zu den Wildtyppflanzen, bei denen nur eine sehr schwache Expression des Gens *PR1* festgestellt werden konnte, wiesen die *GFP-PUB43-1*-Überexpressionspflanzen zum Zeitpunkt $t = 0$ h ein deutliches und signifikant höheres Transkriptlevel von *PR1* auf

Ergebnisse

(Abb. 3.3.A). Ein ähnliches Ergebnis konnte nach weiteren 72 Stunden sowohl bei einer Temperatur von 25°C als auch 20°C nachgewiesen werden. In den Col-0 Pflanzen wurde lediglich ein geringer Anstieg der *PR1*-Transkriptmenge beobachtet. Im Vergleich dazu war die Expression in den Überexpressionspflanzen stets signifikant erhöht. Des Weiteren konnte ein deutlicher Anstieg der *PR1*-Expression durch das Herabsenken der Temperatur von 25°C auf 20°C ermittelt werden (Abb. 3.3.A).

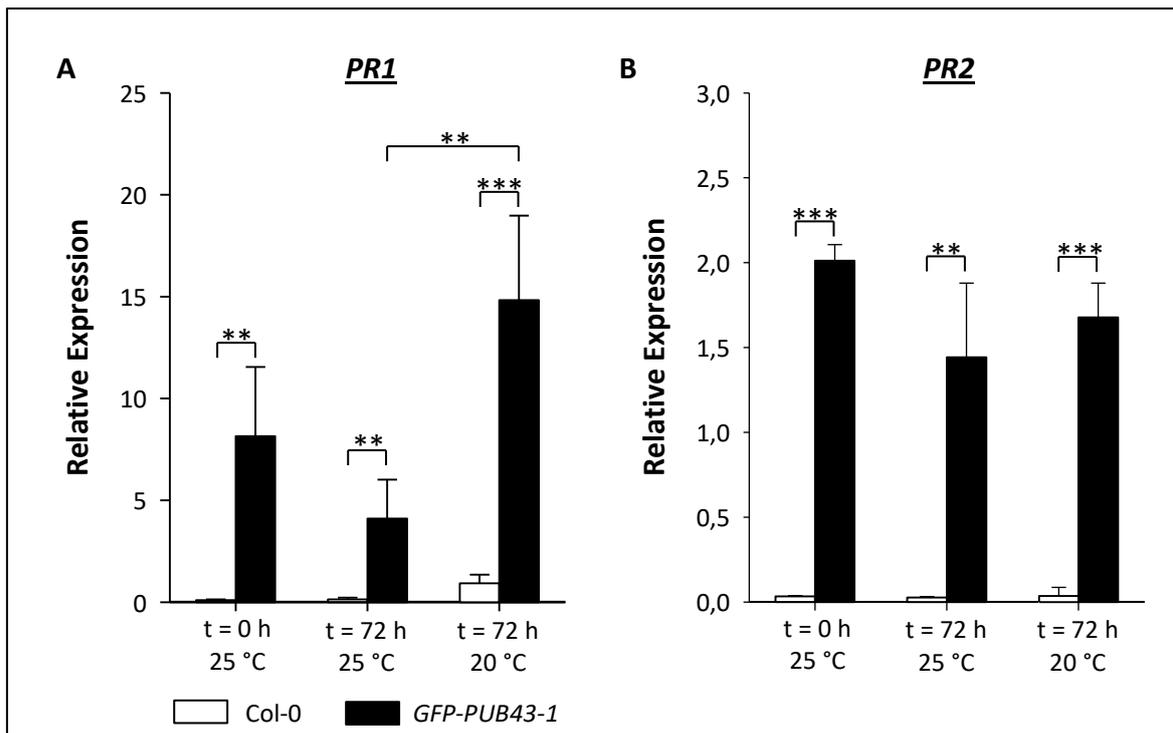


Abbildung 3.3: Quantitative Genexpressionsanalyse von *PR1* und *PR2* in *GFP-PUB43-1*-Pflanzen. **A:** *PR1*-Genexpression. Die Expression in *GFP-PUB43-1*-Pflanzen ist im Vergleich zum Wildtyp zu allen gewählten Zeitpunkten signifikant erhöht. Bei t = 72 h, 20°C ist ein signifikanter Anstieg der *PR1*-Transkriptmenge in den Überexpressionspflanzen gegenüber den Pflanzen, die bei 25°C angezogen wurden, zu erkennen. **B:** *PR2*-Genexpression. Die Expression von *PR2* war, unabhängig von Temperatur und Zeitpunkt der Probennahme stets signifikant erhöht im Vergleich zum Wildtyp, bei dem nur eine schwache Expression des Gens ermittelt werden konnte. Zwischen den Proben der *GFP-PUB43-1*-Pflanzen wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Die verwendeten Pflanzen wurden für 15 Tage bei 25°C unter Langtagbedingungen angezogen (t = 0 h), ehe die Temperatur verändert wurde. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des *Student's t-Tests*, n = 3, p < 0,05 = *, p < 0,04 = **, p < 0,01 = ***

Die Analyse der *PR2*-Expression ergab, dass dieses Gen in den *GFP-PUB43-1*-Pflanzen stets um ein Vielfaches stärker exprimiert wurde als in den Wildtyppflanzen (Abb. 3.3.B). Der signifikante Unterschied in der *PR2*-Transkriptmenge war dabei unabhängig vom Zeitpunkt der Probennahme und der vorliegenden Temperatur. Zwischen den Proben der

Überexpressionslinien konnten keine signifikanten Veränderungen bezüglich der *PR2*-Expression festgestellt werden (Abb. 3.3.B). Das Verändern der Temperatur hatte keinen Einfluss auf den in Abschnitt 3.1.1 beschriebenen Phänotyp der *GFP-PUB43-1*-Pflanzen.

Wie in Abbildung 3.4. dargestellt, wurden bei den *YFP-SAUL1*-Überexpressionspflanzen im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls deutliche Unterschiede in der Expressionsmenge der Gene *PR1* und *PR2* ermittelt. Die Analyse der *PR1*-Expressionsmenge ergab, dass diese in den Überexpressionspflanzen im Gegensatz zu den Wildtyppflanzen stets deutlich erhöht vorlag (Abb. 3.4.A). Da zu den Zeitpunkten $t = 0$ h und $t = 72$ h bei einer Temperatur von 25°C bei den Wildtyppflanzen lediglich ein $n = 2$ analysiert werden konnte, konnte hierbei jedoch keine statistische Auswertung erfolgen. Die gemessenen Daten zeigen jedoch einen deutlichen Unterschied in der *PR1*-Transkriptmenge und deuten auf einen Anstieg der Expression in den *YFP-SAUL1*-Pflanzen im zeitlichen Verlauf hin. Zum Zeitpunkt $t = 72$ h und einer Temperatur von 20°C wurde eine stark erhöhte *PR1*-Expression in den *YFP-SAUL1*-Pflanzen festgestellt. Bei der Analyse der Expression des Gens *PR2* wurde ebenfalls festgestellt, dass in den Überexpressionspflanzen stets eine weitaus höhere Transkriptmenge vorlag als in den Wildtyppflanzen (Abb. 3.4.B). Aufgrund des $n = 2$ bei 25°C zu den Zeitpunkten $t = 0$ h und 72 h bei den Wildtyppflanzen konnte lediglich bei der Temperatur von 20°C ein signifikanter Anstieg der Expressionsmenge bei den *YFP-SAUL1*-Pflanzen ermittelt werden. Während die *PR2*-Expression in den Col-0-Pflanzen zu allen Probenzeitpunkten weitgehend konstant blieb, stieg sie bei den Überexpressionspflanzen nach der Temperaturveränderung auf 20°C signifikant an, sodass ein Einfluss der Temperatur auf die Expression dieses Gens anzunehmen ist (Abb. 3.4.B).

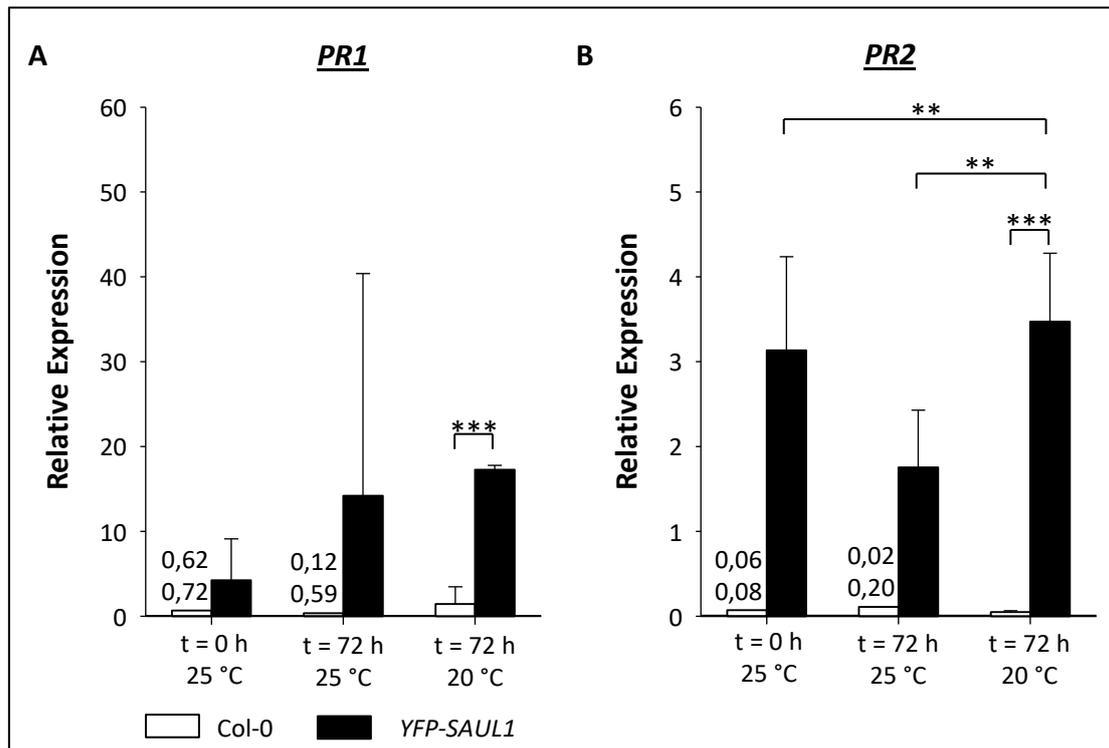


Abbildung 3.4: Quantitative Genexpressionsanalyse von *PR1* und *PR2* in *YFP-SAUL1*-Pflanzen. **A:** *PR1*-Expression. In den *YFP-SAUL1*-Pflanzen lag eine erhöhte Expression des *PR1*-Gens vor, jedoch konnte nur zum Zeitpunkt t = 72 h und 20°C ein signifikanter Unterschied ermittelt werden, da bei den vorherigen Zeitpunkten für die Wildtypproben jeweils nur ein n = 2, und damit keine Signifikanz bestimmt werden konnte. **B:** *PR2*-Expression. Die *PR2*-Transkriptmenge war in den Überexpressionsmutanten gegenüber dem Wildtyp zu allen Zeitpunkten (t = 0 h, t = 72 h) erhöht, wobei aufgrund des n = 2 bei den Wildtyppflanzen, nur bei 20°C nach 72 h ein signifikanter Unterschied festgestellt wurde. Im Vergleich zu den Mutanten, die bei 25°C angezogen worden waren, war die Expression in den *YFP-SAUL1*-Pflanzen bei 20°C signifikant erhöht. Die Pflanzen wurden für 14 Tage bei 25°C unter Langtagbedingungen auf Erde angezogen (t = 0 h), ehe die Temperatur verändert wurde. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des *Student's t-Tests*, n = 3, p < 0,05 = *, p < 0,04 = **, p < 0,01 = ***. Bei einem n = 2 wurde die relative Expression als Zahlenwert angegeben.

Zusammenfassend betrachtet, führte die Überexpression von PUB43 und SAUL1 in *A. thaliana* zu einer Aktivierung der *PR1*- und *PR2*-Genexpression. Hierbei stand die *PR1*-Transkriptmenge in den *GFP-PUB43-1*-Pflanzen und die *PR2*-Transkriptmenge in den *YFP-SAUL1*-Pflanzen zusätzlich unter dem Einfluss der Temperatur.

3.1.4. Temperatur-abhängige Analyse des Phänotyps von *pub42-2* Mutanten

Zur Untersuchung der Funktion des PUB-ARM Proteins PUB42 bei der Genexpression bei der pflanzlichen Autoimmunität wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene T-DNA-Insertionsmutanten nach einer Temperaturumstellung von 25°C auf 20°C sowohl phänotypisch als auch hinsichtlich der Genexpression bei verschiedenen Temperaturen

untersucht. Bei der Linie *pub42-2* handelt es sich um eine T-DNA-Insertionslinie, deren Insertion im dritten Exon vorliegt und dazu führt, dass das Gen nicht mehr exprimiert wird (Abb. 3.5). Der Nachweis der T-DNA Insertion sowie das Fehlen der Genexpression konnte bereits gezeigt werden (Danzberger, 2010).

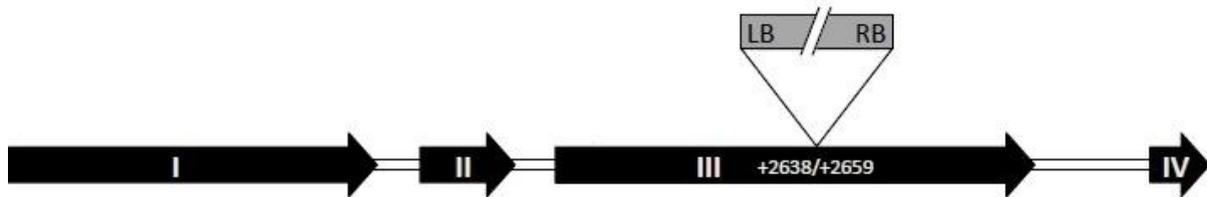


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der Genomsequenz von *PUB42* sowie der T-DNA-Insertion der *pub42-2* Mutante. Die vier Exons sind als schwarze Pfeile mit römischen Ziffern dargestellt. Die T-DNA Insertion (grau, LB = *Left Border*, RB = *Right Border*) befindet sich im dritten Exon, 2638 bp hinter dem Startcodon ATG (Danzberger, 2010).

Zum Vergleich wurden in den folgenden Experimenten stets *saul1-1* Mutanten herangezogen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch eine Kreuzung der beiden Linien *pub42-2* und *saul1-1* die Doppelmutante *pub42-2 saul1-1* erzeugt (Daten nicht gezeigt). Bei dieser Mutantenlinie war sowohl die Expression von *SAUL1* als auch von *PUB42* unterbunden. Diese Pflanzen wurden ebenfalls im Rahmen der Temperaturumstellung von 25°C auf 20°C analysiert, um sie mit den Einzelmutanten vergleichen zu können. Mithilfe dieses Experiments sollte die Frage beantwortet werden, ob das zusätzliche Ausschalten von *PUB42* Auswirkungen auf den Autoimmunphänotyp von *saul1-1* Mutanten bzw. auf dessen Genexpression hat.

Die Einzelmutanten, die jeweiligen segregierenden Wildtypen sowie die Doppelmutante wurden zunächst für 14 Tage bei 25°C unter Langtagbedingungen angezogen (Abb. 3.6 links). Nach der Probennahme wurde ein Teil der Pflanzen für weitere 72 Stunden bei 25°C (Abb. 3.6. Mitte) und der andere Teil bei 20°C (Abb. 3.6 rechts) angezogen und erneut Proben genommen. Aus diesen Proben wurde RNA isoliert, in cDNA umgewandelt und anschließend die Expression der Gene *PR1* und *PR2* mittels RT-qPCR ermittelt.

Ergebnisse

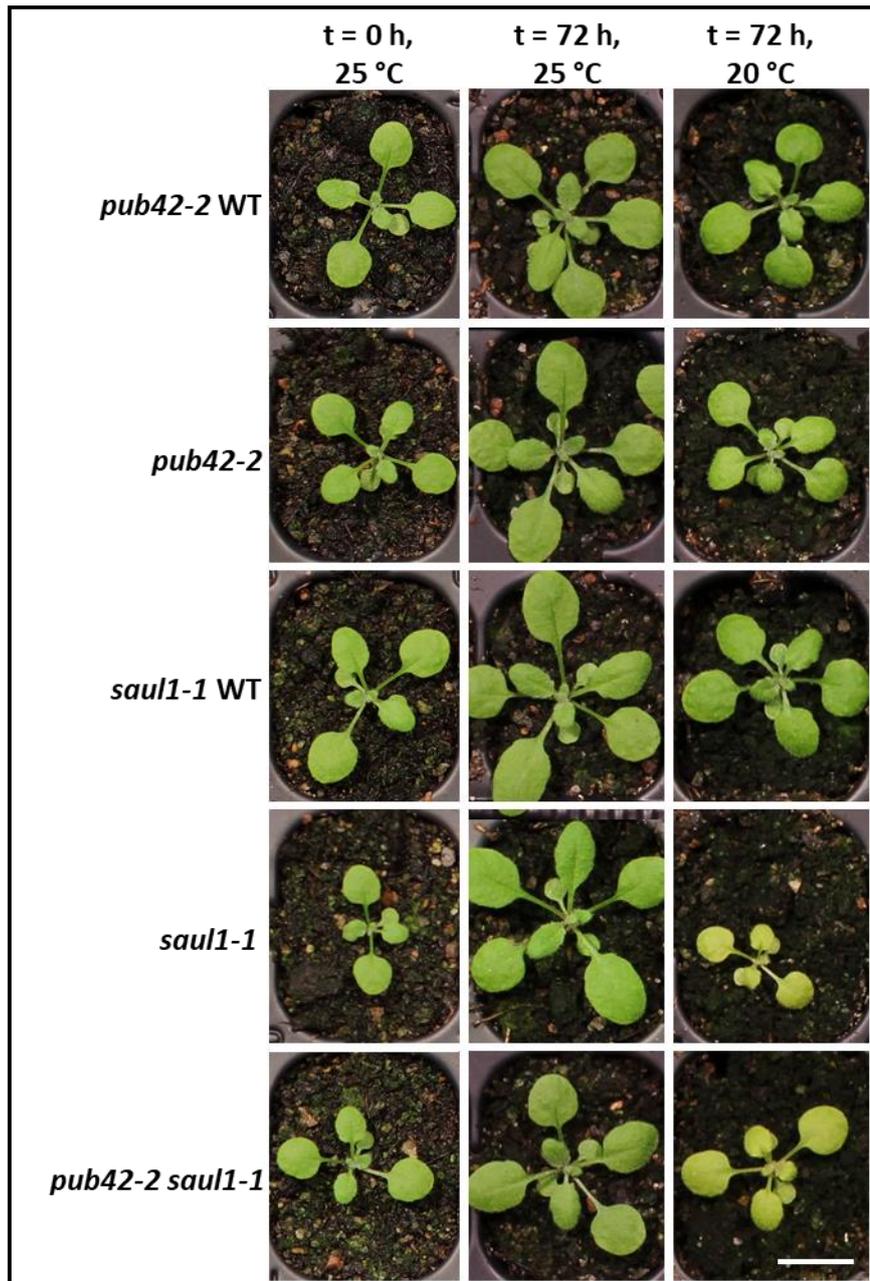


Abbildung 3.6: Kinetische Analyse der Pflanzenmorphologie der *saul1-1*-, *pub42-2*-Einzelmutanten sowie der *pub42-2 saul1-1* Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp. Die Pflanzen wurden für 14 Tage auf Erde bei 25°C unter Langtagbedingungen angezogen (t = 0 h), ehe ein Teil der Pflanzen für 72 h bei 25°C und ein Teil bei 20°C inkubiert wurde. Im Vergleich zum *saul1-1* Wildtyp (WT) und *pub42-2* WT wiesen die *saul1-1*- und *pub42-2 saul1-1* Mutanten ein reduziertes Wachstum sowie eine Gelbfärbung der Blätter nach Umstellung der Temperatur auf 20°C auf. Maßstab = 1 cm. (Lienemann, 2015)

Die phänotypische Untersuchung der bei 25°C unter Langtagbedingungen angezogenen Pflanzen ergab zunächst, dass bei allen drei T-DNA Insertionslinien keine morphologischen Unterschiede im Vergleich zu den Wildtyppflanzen beobachtet werden konnten (Abb. 3.6). Die Pflanzen wiesen eine grüne Blattrosette sowie ein ähnliches Wachstumsverhalten auf. Nach der Temperaturumstellung auf 20°C konnten bei der *saul1-1* Einzelmutante und bei der

pub42-2 saul1-1 Doppelmutante phänotypische Veränderungen beobachtet werden. Die Pflanzen zeigten im Gegensatz zum Wildtyp ein verlangsamtes Wachstum sowie eine Gelbfärbung der bereits gewachsenen Blätter (Abb. 3.6). Im Vergleich dazu wurden bei der *pub42-2*-Einzelmutante keine Veränderungen des Phänotyps festgestellt. Bezüglich des Phänotyps konnten somit keine Veränderungen in *saul1-1* Mutanten bei gleichzeitigem Ausschalten von *PUB42* ermittelt werden.

3.1.5. Analyse der Expression von *PATHOGENESIS-RELATED*-Genen in *pub42-2* Mutanten

Wie bereits in Abschnitt 3.1.4 beschrieben, wurden die verschiedenen T-DNA-Insertionslinien sowie deren Wildtypen einer Temperaturumstellung unterzogen, um anschließend die Genexpression der beiden Gene *PR1* und *PR2* mithilfe der RT-qPCR analysieren zu können. Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse sind in Abbildung 3.7 und 3.8 dargestellt.

Die Analyse der Genexpression von *PR1* in den Mutanten und Wildtypenlinien ergab, dass nach 14-tägiger Anzucht bei 25°C in allen verwendeten Linien ein ähnlich niedriges *PR1*-Transkriptlevel vorlag (Abb. 3.7). Nach weiteren 72 Stunden wurde sowohl in den *saul1-1* Pflanzen, als auch in den *pub42-2 saul1-1* Doppelmutanten im Vergleich zu den jeweiligen Wildtyppflanzen ein leichter, jedoch nicht-signifikanter Anstieg der *PR1*-Transkriptmenge festgestellt. Die *pub42-2* Mutanten hingegen wiesen eine fast unveränderte *PR1*-Expression auf. Wurden die Pflanzen jedoch für 72 Stunden bei 20°C inkubiert, zeigten sich weitaus deutlichere Veränderungen in der *PR1*-Transkriptmenge. So wiesen die *saul1-1* Pflanzen und die Doppelmutanten einen hochsignifikanten Anstieg der Expression sowohl gegenüber den entsprechenden Wildtypen als auch den Linien, die bei 25°C angezogen worden waren, auf. Im Gegensatz dazu unterschied sich die *PR1*-Expressionsmenge in den *pub42-2* Einzelmutanten kaum von der Menge in den *pub42*-WT-Pflanzen. Die Pflanzen, die bei 20°C inkubiert worden waren, zeigten ein vergleichsweise höheres, wenn auch nicht-signifikantes *PR1*-Transkriptlevel im Gegensatz zu den Pflanzen, die bei 25°C angezogen worden waren (Abb. 3.7).

Ergebnisse

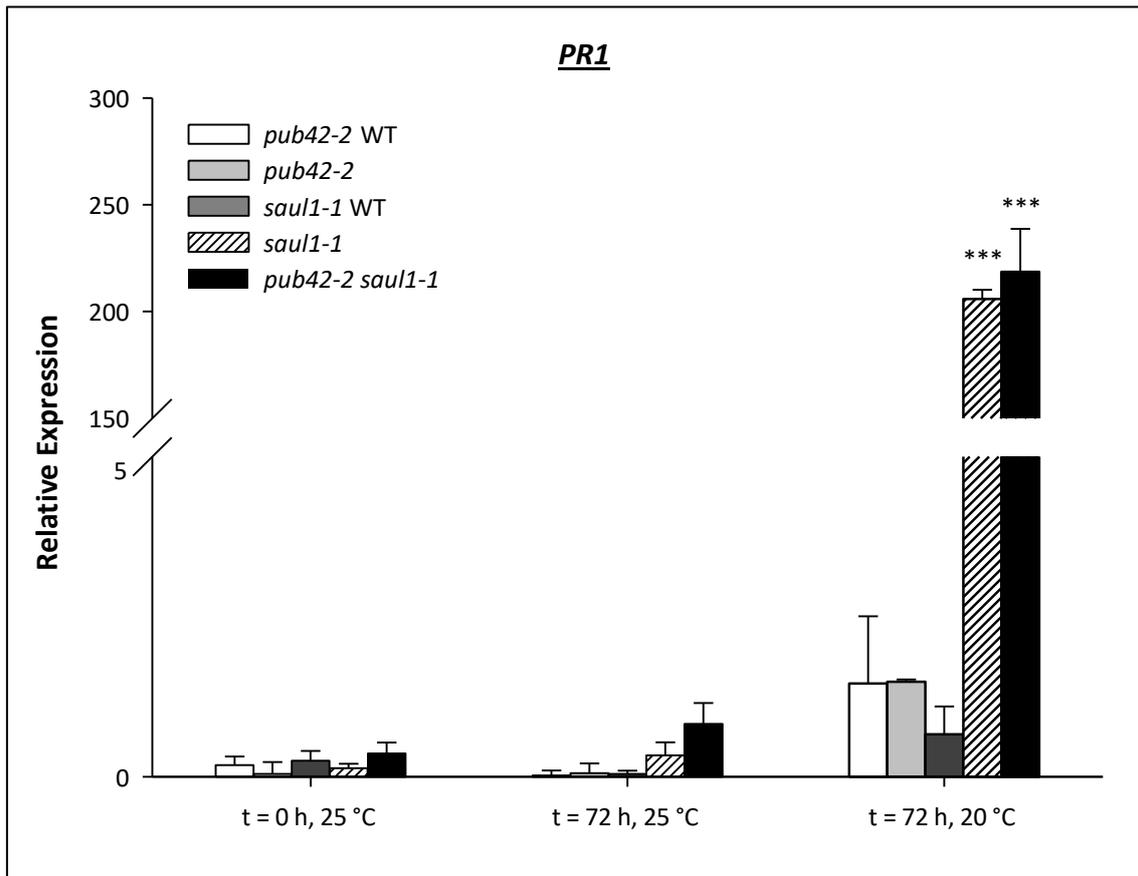


Abbildung 3.7: Quantitative Genexpressionsanalyse von *PR1* in *pub42-2*-, *saul1-1*- und *pub42-2 saul1-1* Mutanten. Zum Zeitpunkt $t = 0$ h ist die Expression in allen Linien ähnlich gering. Nach 72 h bei 25°C zeigte sich ein leichter Anstieg in der *PR1*-Transkriptmenge. Im Vergleich dazu wurde ein hochsignifikanter Anstieg der Expressionsmenge in *saul1-1* Mutanten und *pub42-2 saul1-1* Mutanten im Vergleich zu den jeweiligen Wildtyppflanzen und den Pflanzen, die bei 25°C angezogen worden waren, ermittelt. Die Pflanzen wurden für 14 Tage bei 25°C unter Langtagbedingungen auf Erde angezogen ($t = 0$ h), ehe sie für 72 Stunden bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert wurden. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des *Student's t-Tests*, $n = 3$, $p < 0,05 = *$, $p < 0,04 = **$, $p < 0,01 = ***$

Bei der Analyse der *PR2*-Genexpression wurde zum Zeitpunkt $t = 0$ h bei der Linie *saul1-1* im Vergleich zum *saul1-1* WT eine signifikant höhere Expressionsmenge festgestellt (Abb. 3.8). Im Gegensatz dazu konnte zwischen den anderen Linien kein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Nach weiteren 72 Stunden wurde jedoch ein starker Anstieg der *PR2*-Transkriptmenge bei den Doppelmutanten im Vergleich zur *pub42-2* Mutante festgestellt. Zwischen den *saul1-1* Mutanten und dem *saul1-1* WT konnte kein signifikanter Unterschied mehr beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigten sich bei den Pflanzen, die bei 20°C inkubiert worden waren, große Unterschiede in der Expressionsmenge. So wiesen sowohl die *saul1-1* Pflanzen als auch die Doppelmutanten signifikant hohe *PR2*-Transkriptlevel im Vergleich zu den Wildtyppflanzen und den Pflanzen, die bei 25°C angezogen worden waren,

Ergebnisse

auf (Abb. 3.8). Je nachdem mit welcher Linie die Mutanten verglichen wurden, konnte ein signifikanter ($p < 0,05$) bis hochsignifikanter ($p < 0,01$) Unterschied ausgemacht werden. Des Weiteren zeigte sich bei den *pub42-2*-Mutanten im Gegensatz zu den Pflanzen, die bei 25°C inkubiert worden waren, ein hochsignifikanter Anstieg der *PR2*-Expression. Es ist zu beachten, dass die Streuung der gemessenen relativen Expression zwischen den einzelnen biologischen Replikaten ($n = 3$) bei der Analyse der *PR2*-Expression (Abb. 3.8) größer war und die Messwerte somit größeren Schwankungen unterlagen als bei der Untersuchung der *PR1*-Expression (Abb. 3.7).

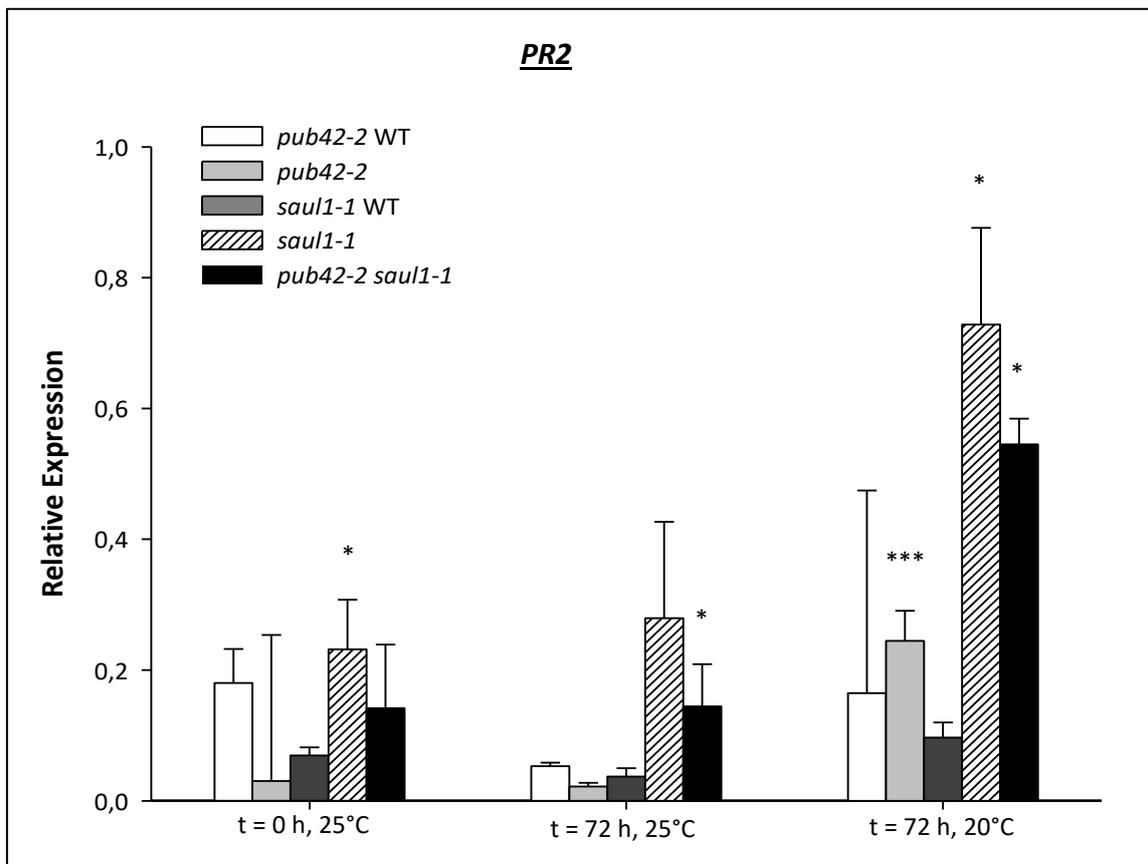


Abbildung 3.8: Quantitative Genexpressionsanalyse von *PR2* in *pub42-2*-, *saul1-1*- und *pub42-2 saul1-1* Mutanten. Zum Zeitpunkt $t = 0$ h konnte eine signifikant höhere Expressionsmenge in den *saul1-1* Pflanzen im Vergleich zum *saul1-1* WT festgestellt werden. Nach weiteren 72 Stunden wiesen die *pub42-2 saul1-1* Doppelmutanten ein signifikant höheres *PR2*-Transkriptlevel im Gegensatz zum Wildtyp auf. Wurden die Pflanzen bei 20°C inkubiert, so konnte ein starker Anstieg der Expression bei *pub42-2*-, *saul1-1*- und *pub42-2 saul1-1*-Pflanzen ausgemacht werden. Die Pflanzen wurden für 14 Tage bei 25°C unter Langtagbedingungen auf Erde angezogen ($t = 0$ h), ehe die Temperatur verändert wurde. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des *Student's t-Tests*, $n = 3$, $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$

Zusammenfassend betrachtet, fällt auf, dass die Mutation von *PUB42* im Vergleich zu den Wildtyppflanzen zu keiner Veränderung der Expression führte. Des Weiteren scheint das

Ergebnisse

Ausschalten von *PUB42* im *saul1-1* Hintergrund keinen additiven Einfluss auf die *PR1*- und *PR2*-Genexpression in den *saul1-1* Mutanten zu haben, da hinsichtlich der Transkriptmenge, unabhängig von der Umgebungstemperatur, keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden konnten. Ein Zusammenhang zwischen *PUB42* und der bei *SAUL1* beobachteten Temperatur-spezifischen Regulation der Genexpression bei der pflanzlichen Autoimmunität schien somit nicht zu bestehen.

3.2. Identifikation und Analyse von Interaktionspartnern des PUB-ARM Proteins SAUL1

Im Fokus dieser Arbeit stand die Identifikation von Interaktionspartnern der E3 Ubiquitinligase SAUL1, um deren Funktion in *A. thaliana* aufzuklären. Mithilfe der sogenannten Tandemaffinitätsaufreinigung sollten potentielle Interaktoren von SAUL1 aus einer pflanzlichen Zellkultur isoliert und identifiziert werden. Des Weiteren sollten Interaktionsstudien mit Proteinen durchgeführt werden, bei denen aufgrund ähnlicher Eigenschaften und Lokalisation in *A. thaliana* eine Wechselwirkung mit SAUL1 vermutet werden konnte.

3.2.1. Identifikation von Interaktionspartnern mithilfe der Tandemaffinitätsaufreinigung

Mithilfe der Tandemaffinitätsaufreinigung ist es möglich, Komplexe von Proteinen, die miteinander interagieren, aus einer pflanzlichen Zellkultur zu isolieren und die verschiedenen Proteine durch eine anschließende massenspektrometrische Analyse zu identifizieren. Die Methode zeichnet sich hierbei durch eine hohe Spezifität aus, da die Aufreinigung der Proteinkomplexe in zwei aufeinanderfolgenden Schritten erfolgt und Verunreinigungen durch Proteine, die fälschlicherweise gebunden wurden, somit reduziert werden (van Leene *et al.*, 2015).

Für die Tandemaffinitätsaufreinigung wurden wie in Abschnitt 2.4.1 beschrieben, zwei verschiedene pDONR221-Konstrukte erstellt. Das Konstrukt *pDONR221_SAUL1* enthielt die vollständige kodierende Sequenz von *SAUL1*, das Konstrukt *pDONR221_SAUL1_ΔU-Box* eine verkürzte Version der *SAUL1*-Sequenz, bei der der kodierende Teil der U-Box fehlte. Das Deletionskonstrukt wurde verwendet, um Interaktionspartner isolieren zu können, die infolge einer Ubiquitinierung durch SAUL1 im 26S Proteasom abgebaut werden. Die Fusion der beiden *SAUL1*-Sequenzen mit dem *Tap tag* sowie die Tandemaffinitätsaufreinigung wurden in der Abteilung „Pflanzliche Systembiologie“ des *Vlaams Instituut voor Biotechnologie* (Gent, Belgien) durchgeführt. Der schematische Aufbau der beiden Fusionskonstrukte ist in der Abbildung 3.9 dargestellt, wobei die jeweilige *SAUL1*-Sequenz am C-Terminus mit der Sequenz des sogenannten *Tap tags* fusioniert wurde. Der *Tap tag* besteht aus einer Protein G-Domäne (ProtG), einer *Tobacco etch virus (TEV)* Schnittstelle sowie einer Streptavidinbindungsstelle (SBP), sodass nach der Expression des jeweiligen

Ergebnisse

Fusionskonstrukts in *A. thaliana* die SAUL1-Protein-Komplexe in zwei aufeinanderfolgenden Schritten aufgereinigt werden konnten. In einem ersten Schritt wurden die Komplexe durch Bindung der ProtG-Domäne an eine IgG-Matrix aus dem Proteinextrakt isoliert (van Leene *et al.* 2015). Nach dem Ablösen von der Matrix durch die Spaltung der TEV-Schnittstelle mit einer TEV-Protease, erfolgte die Bindung der Komplexe an eine Streptavidinmatrix. Nach der Elution der SAUL1-Protein-Komplexe, wurden diese gelelektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss wurden die potentiellen Interaktionspartner mithilfe einer ultrasensitiven Massenspektrometrie (MS) identifiziert (van Leene *et al.* 2015).

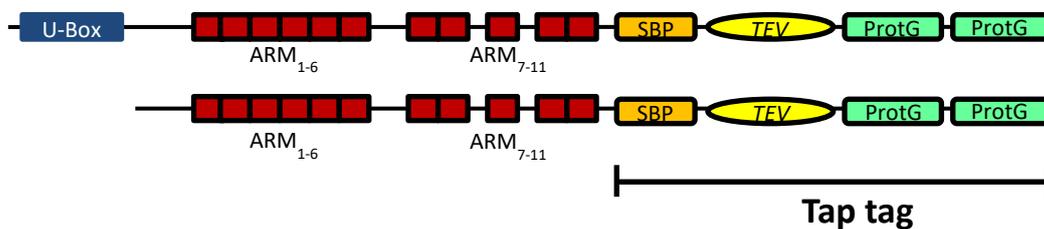


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung der SAUL1- und SAUL1_ΔU-Box-Tap Tag Fusionskonstrukte. Durch Fusion der SAUL1-Sequenzen mit der Tap tag Sequenz konnten die SAUL1-Protein Komplexe in zwei aufeinanderfolgenden Aufreinigungsschritten isoliert werden. U-Box (blau), Armadillo Repeats (ARM₁₋₆, ARM₇₋₁₁, rot), Streptavidin-Bindungspeptid (SBP, orange), Tobacco etch virus-Schnittstelle (TEV, gelb), Protein G-Domäne (ProtG, grün) (verändert nach van Leene *et al.*, 2015).

Für jedes Fusionskonstrukt wurden zwei Tandemaffinitätsaufreinigungen durchgeführt. Die Ergebnisse der MS-Analyse und die somit identifizierten Interaktionspartner von SAUL1 sind in den Tabellen 3.1 und 3.2 aufgeführt.

Tabelle 3.1: Ergebnis der Tandemaffinitätsaufreinigung mit dem SAUL1-Tap tag-Fusionskonstrukt („+“ = Protein wurde in MS identifiziert, „-“ = Protein wurde nicht in MS identifiziert)

AGI	Protein	1. Experiment	2. Experiment
At2g36200	AtKRP125b	+	+
At1g04080	AtPRP39a	+	-
At1g67230	LINC1	+	-
At2g03150	RSA1/EMB1579	+	-
At5g40490	HLP1	-	+

Bei der Tandemaffinitätsaufreinigung mithilfe des Fusionsproteins SAUL1-Tap tag wurden insgesamt fünf verschiedene Interaktionspartner ermittelt, von denen das Protein AtKRP125b in beiden Experimenten isoliert werden konnte (Tab. 3.1). Es handelt sich hierbei um ein Motor-Protein, ein sogenanntes Kinesin, das zur Familie der Kinesin-5 Proteine gehört (Lee und Liu, 2004). Diese Proteine sind an der Quervernetzung der Mikrotubuli und

Ergebnisse

der Bewegung des Spindelapparats während der Zellteilung beteiligt (Bannigan *et al.*, 2007). Das Protein AtPRP39a (PRE-mRNA PROCESSING39a) wurde in einem der beiden Experimente identifiziert. Als Zellkern-lokalisiertes Protein ist AtPRP39a an der Regulation der Blütezeit in *A. thaliana* beteiligt (Knop *et al.*, 2016, Wang *et al.*, 2007). Bei LINC1 (LITTLE NUCLEI1) handelt es sich um ein nukleares Protein, das bei der Entwicklung des pflanzlichen Zellkerns involviert ist (Dittmer und Richards, 2008). Ein weiteres Protein, das zusammen mit SAUL1 isoliert wurde, ist RSA1 (SHORT ROOT IN SALT MEDIUM 1), auch EMB1579 (EMBRYO DEFECTIVE 1579) genannt. Dieses Protein ist ebenfalls im Zellkern lokalisiert und spielt als Calcium-Sensor während der Genregulation bei Salzstress und bei der Salztoleranz in *A. thaliana* eine wichtige Rolle (Guan *et al.*, 2013). Das Protein HLP1 (HRP1-LIKE PROTEIN1) wurde ebenfalls in einem der beiden Experimente identifiziert. Hierbei handelt es sich um ein nukleares Ribonukleoprotein, das als Regulator der 3'-Ende-mRNA-Prozessierung bei der Regulation der pflanzlichen Blütezeit beteiligt ist (Zhang *et al.*, 2015).

Tabelle 3.2: Ergebnis der Tandemaffinitätsaufreinigung mit dem *SAUL1_ΔU-Box-Tap tag* Fusionskonstrukt („+“ = Protein wurde in MS identifiziert, „-“ = Protein wurde nicht in MS identifiziert)

AGI	Protein	1. Experiment	2. Experiment
At2g36200	AtKRP125b	+	+
At5g40770	Prohibitin3	+	+
At4g28510	Prohibitin1	+	+
At1g03860	Prohibitin2	+	+
At2g20530	Prohibitin6	+	+
At4g27280	Prohibitin4	+	-
At5g41790	CIP1	+	-

Wie in Tabelle 3.2 aufgeführt, wurde mithilfe des *SAUL1_ΔU-Box-Tap tag* Fusionsproteins erneut das Kinesin-Protein AtKRP125b in beiden Experimenten isoliert. Des Weiteren konnten mehrere Prohibitine als putative Interaktionspartner identifiziert werden, wobei bis auf Prohibitin4, alle Proteine in beiden Experimenten gefunden wurden. Diese Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der mitochondrialen Biogenese in Pflanzen (Ahn *et al.*, 2006). Prohibitin3 ist *in planta* sowohl im Kern, als auch im Cytoplasma lokalisiert (Christians und Larsen, 2007). In einem Experiment wurde das Protein CIP1 (COP1-INTERACTIVE PROTEIN1) isoliert, ein Plasmamembran-lokalisiertes Protein, das bei der Abscisinsäureantwort in *A. thaliana* involviert ist (Ren *et al.*, 2016).

Zusammengefasst konnte mithilfe der Tandemaffinitätsaufreinigung unter Verwendung des *SAUL1*- und *SAUL1_ΔU-Box-Tap tag* Fusionskonstrukts eine Vielzahl von potentiellen Interaktionspartnern von SAUL1 identifiziert werden. Auffallend ist hierbei, dass es sich bei

den isolierten Interaktoren oftmals um Proteine handelt, die nicht wie SAUL1 an der Plasmamembran, sondern im Zellkern von *A. thaliana* lokalisiert sind.

3.2.1.1. Analyse der Interaktion von SAUL1 und AtKRP125b *in planta*

Da das Protein AtKRP125b in sämtlichen Experimenten der Tandemaffinitätsaufreinigung als möglicher Interaktionspartner identifiziert werden konnte, sollte die Interaktion mit SAUL1 mithilfe der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC) überprüft werden. Hierfür wurden beide Proteine mit je einer Hälfte des *Yellow Fluorescent Proteins* (YFP) fusioniert, sodass bei einer Interaktion der beiden Proteine SAUL1 und AtKRP125b ein intaktes Fluorophor YFP entsteht.

Die BiFC-Konstrukte wurden wie in Abschnitt 2.4.1 beschrieben, hergestellt, in Mesophyllprotoplasten aus *A. thaliana* (Col-0) transformiert und hinsichtlich eines YFP-Signals mithilfe des konfokalen Laser-Scanning Mikroskops analysiert. Anhand der konstitutiven Expression des in den BiFC-Konstrukten enthaltenen *Red Fluorescent Proteins* (RFP) konnte die erfolgreiche Transformation der Protoplasten anhand des freien RFPs erkannt werden. Die Ergebnisse der BiFC-Analysen von SAUL1 und AtKRP125b sind in der Abbildung 3.10 dargestellt.

Nach der Transformation des Konstrukts *pBiFC2in1 NC YFP^N-AtKRP125b/SAUL1-YFP^C* konnte ein YFP-Signal im Cytosol und im Zellkern der Protoplasten detektiert werden (Abb. 3.10.A). Die Transformation des Konstrukts *pBiFC2in1 CN SAUL1-YFP^N/ YFP^C-AtKRP125b* führte ebenfalls zu einer Interaktion der beiden Proteine, wobei ein schwächeres Signal im Cytosol beobachtet werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde kein YFP-Signal festgestellt, wenn AtKRP125b C-terminal mit einer Hälfte des Fluorophors fusioniert worden war (Konstrukt *pBiFC2in1 CC SAUL1-YFP^N/AtKRP125b-YFP^C*, Abb. 3.10.C).

Die Interaktion von SAUL1 und AtKRP125b konnte aufgrund einer Interaktion im Cytosol und im Zellkern *in planta* bestätigt werden.

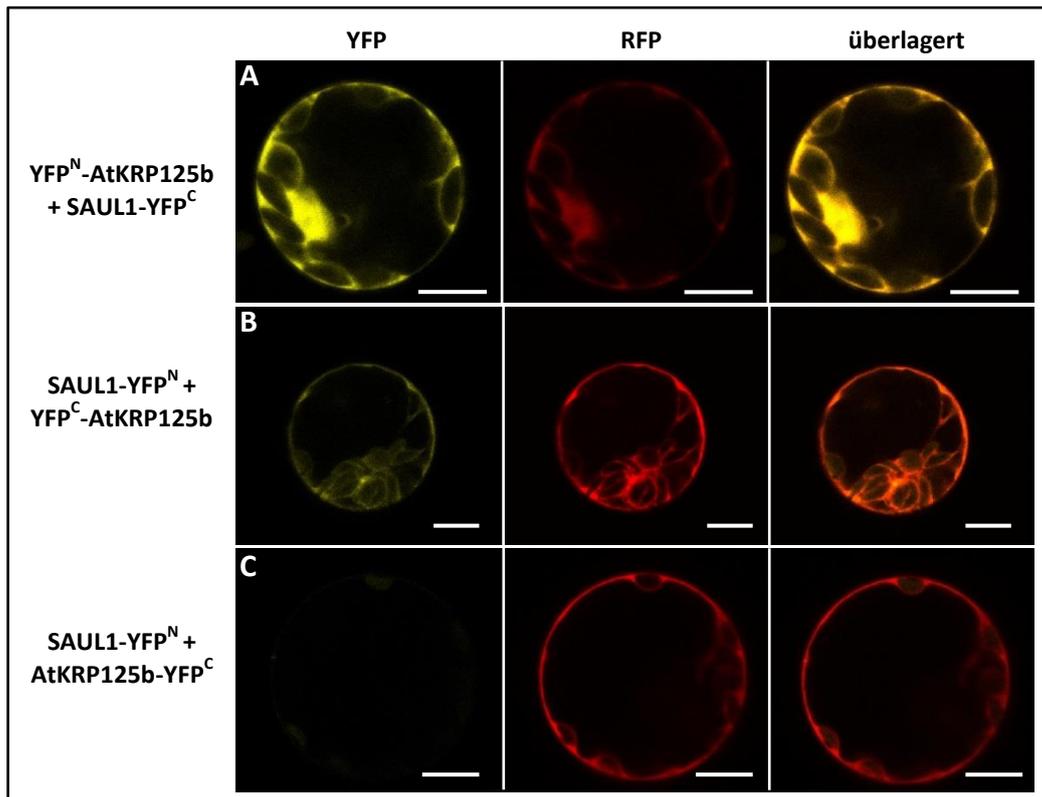


Abbildung 3.10: Konfokale Aufnahmen der BiFC-Analyse von SAUL1 und AtKRP125b in Mesophyllprotoplasten aus *A. thaliana*. **A:** Interaktion von YFP^N-AtKRP125b und SAUL1-YFP^C (*pBiFC2in1 NC YFP^N-AtKRP125b/SAUL1-YFP^C*). Aufgrund der Interaktion zwischen den beiden Proteinen konnte ein YFP-Signal im Cytosol und im Zellkern detektiert werden. **B:** Interaktion von SAUL1-YFP^N und YFP^C-AtKRP125b (*pBiFC2in1 CN SAUL1-YFP^N/YFP^C-AtKRP125b*). Die Interaktion zeigte sich in der YFP-Fluoreszenz im Cytosol. **C:** Interaktion von SAUL1-YFP^N und AtKRP125b-YFP^C (*pBiFC2in1 CC SAUL1-YFP^N/AtKRP125b-YFP^C*). Es konnte kein YFP-Signal und somit keine Interaktion der Proteine festgestellt werden. Das RFP-Signal diente zur Überprüfung der Transformation der Konstrukte in die Protoplasten. Maßstab = 10 µm.

3.2.1.2. Subzelluläre Lokalisierung von AtKRP125b

Die Ergebnisse der BiFC-Analysen von SAUL1 und AtKRP125b zeigten, dass die Interaktion der beiden Proteine im Cytosol und im Zellkern stattgefunden hat. Um die subzelluläre Lokalisierung von AtKRP125b genauer zu analysieren, wurde im Rahmen der Masterarbeit von Tobias Strauß (2016) ein *35S::GFP-AtKRP125b*-Fusionskonstrukt erstellt. Das Konstrukt wurde in *A. thaliana* Mesophyllprotoplasten transformiert und die GFP-Fluoreszenz am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop untersucht.

Das GFP-Signal des Fusionsproteins konnte, wie in Abbildung 3.11 aufgeführt, im Zellkern, teilweise sogar in den Kernkörperchen der Protoplasten detektiert werden, sodass von einer nuklearen Lokalisierung des Proteins auszugehen ist. Darüber hinaus konnte in manchen Protoplasten ein schwaches Fluoreszenzsignal im Cytosol detektiert werden.

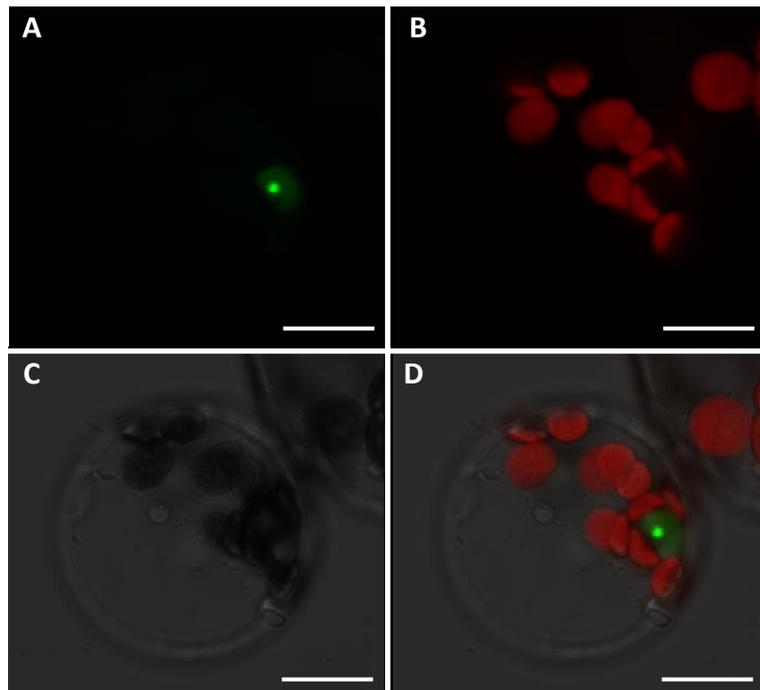


Abbildung 3.11: Subzelluläre Lokalisierung von GFP-AtKRP125b in Mesophyllprotoplasten aus *A. thaliana*. **A:** Die GFP-Fluoreszenz des Fusionsproteins konnte im Zellkern und im Kernkörperchen der Protoplasten detektiert werden. **B:** Die Autofluoreszenz der Chloroplasten führte zu einem roten Fluoreszenzsignal. **C:** Durchlichtaufnahme des transformierten Protoplasten. **D:** Überlagerung von A, B und C. Maßstab = 10 μm (Strauß, 2016).

3.2.2. Analyse der Interaktion von SAUL1 mit BON1 und BAP1

BON1 (BONZAI1), auch CPN1 (COPINE1) genannt, gehört zu der Familie der Copine-Proteine und ist wie SAUL1 an der pflanzlichen Plasmamembran lokalisiert. Die Lokalisierung wird über eine Myristoylierung am N-Terminus des Proteins vermittelt (Li *et al.*, 2010). Es besteht, wie in Abbildung 3.12 dargestellt, aus zwei Calcium-abhängigen Phospholipid-bindenden C2-Domänen (C2A, C2B) und einer von Willebrand A (VWA)-Domäne (Yang *et al.*, 2006a; Lee und McNellis, 2009). Als negativer Regulator des R-Gens *SNC1* ist BON1 an der Immunabwehr in *A. thaliana* beteiligt (Yang und Hua, 2004). Des Weiteren konnte bei *bon1-1 knock-out*-Mutanten anhand des verlangsamten Wachstums im Vergleich zu Wildtyppflanzen ein temperatursensitiver Phänotyp, ähnlich zu dem Phänotyp von *saul1-1*-Pflanzen, beobachtet werden (Hua *et al.*, 2001).

Ergebnisse



Abbildung 3.12: Schematische Darstellung der Domänen des BON1-Proteins. Das Protein besteht aus zwei N-terminalen C2-Domänen (orange) und einer C-terminalen von Willebrand A (VWA) –Domäne (blau). (verändert nach Hua *et al.*, 2001)

Aufgrund dieser ähnlichen Eigenschaften in *A. thaliana* wurde BON1 als potentieller Interaktionspartner von SAUL1 ausgewählt. Zusätzlich wurde das mit BON1 interagierende Protein BAP1 (BON1 ASSOCIATION PROTEIN1) auf eine Interaktion mit SAUL1 hin untersucht. Bei BAP1 handelt es sich um ein Plasmamembran-lokalisiertes Protein, das als negativer Regulator des programmierten Zelltods in *A. thaliana* wirkt (Yang *et al.*, 2007). Erneut wurden die Interaktionsanalysen mithilfe der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation durchgeführt.

Die Untersuchung der Interaktion von BON1 mit BAP1 erfolgte bislang *in vivo* mithilfe eines Hefe-2-Hybrid-Systems (Hua *et al.*, 2001) und *in vitro* in einem *Pull-Down* Experiment (Yang *et al.*, 2007), nicht jedoch in *A. thaliana* selbst. Im Zuge der Etablierung der BiFC-Experimente sollte eine Positivkontrolle, d.h. ein BiFC-Konstrukt mit Proteinen, bei denen eine Interaktion in *Arabidopsis* Protoplasten besteht, etabliert werden. Somit sollte zunächst die Interaktion zwischen BON1 und BAP1 *in planta* bestätigt werden. Wie in Abbildung 3.13.A dargestellt, wurde nach der Transformation des Konstrukts *pBiFC2in1 NN YFP^N-BON1/YFP^C-BAP1* ein deutliches YFP-Signal in den Protoplasten detektiert. Durch eine Überlagerung der Fluoreszenz mit dem Signal des freien RFPs zeigte sich, dass die Interaktion der beiden Proteine im Cytosol stattfindet. Die Interaktion der beiden Proteine scheint somit bestätigt und könnte nun in zukünftigen Experimenten als Positivkontrolle genutzt werden. Abbildung 3.13.B zeigt exemplarisch das Ergebnis der BiFC-Analyse von SAUL1 und BON1. Das Fluoreszenzsignal wurde an der Plasmamembran beobachtet. Dieses Ergebnis wurde mit einer Analyse von vier weiteren Konstrukten (Tab. 3.3) bestätigt, wobei die Interaktion unabhängig davon, ob das Split-YFP am N- oder am C-Terminus des jeweiligen Proteins fusioniert war, nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde nach Transformation des Konstrukts *pBiFC2in1 CC SAUL1-YFP^N/BAP1-YFP^C* kein YFP-Signal und somit auch keine Interaktion ermittelt (Abb. 3.13.C). Drei weitere BiFC-Konstrukte ergaben ebenfalls keine YFP-Fluoreszenz (Tab. 3.3). Ein Nachweis der Expression der Proteine, bei

denen kein YFP-Signal und somit keine Interaktion gezeigt werden konnte, mithilfe eines Immunoblots, steht allerdings noch aus.

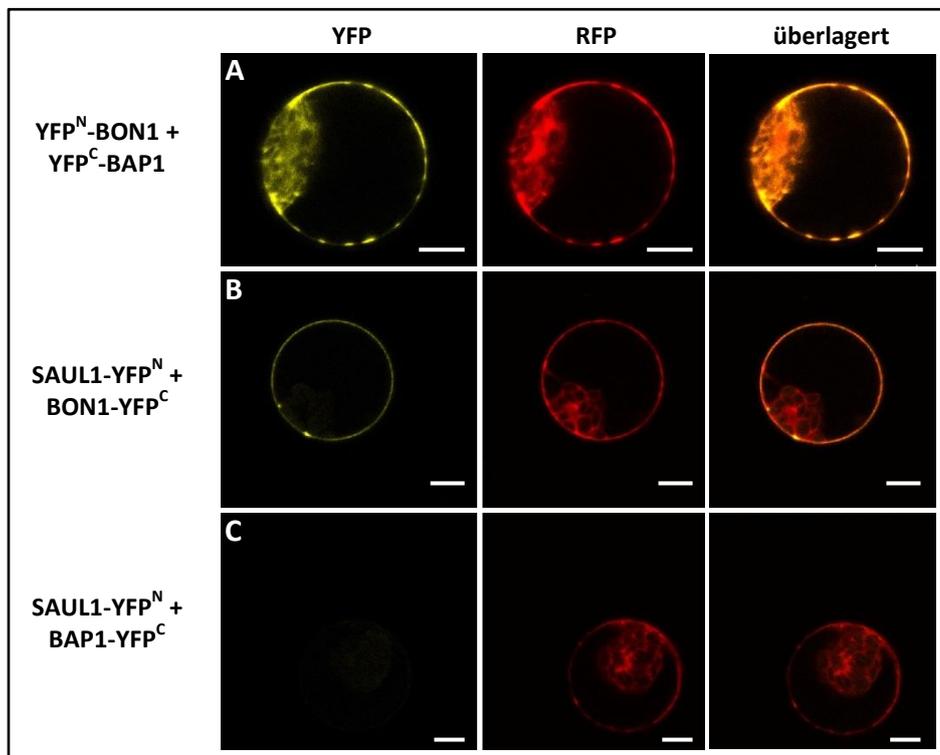


Abbildung 3.13: Konfokale Aufnahmen der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation von SAUL1, BON1 und BAP1 in Mesophyllprotoplasten aus *A. thaliana*. **A:** Interaktion von YFP^N-BON1 und YFP^C-BAP1 (*pBiFC2in1 NN YFP^N-BON1/ YFP^C-BAP1*). Die Interaktion der beiden Proteine ist anhand des YFP-Signals im Cytosol erkennbar. **B:** Interaktion von SAUL1-YFP^N und BON1-YFP^C (*pBiFC2in1 CC SAUL1-YFP^N/BON1-YFP^C*). Durch die Interaktion konnte ein YFP-Signal an der Plasmamembran detektiert werden. **C:** Interaktion von SAUL1-YFP^N und BAP1-YFP^C (*pBiFC2in1 CC SAUL1-YFP^N/BAP1-YFP^C*). Es konnte keine YFP-Fluoreszenz und somit keine Interaktion nachgewiesen werden. Das RFP-Signal diente zur Überprüfung der Transformation der Konstrukte in die Protoplasten. Maßstab = 10 µm.

Tabelle 3.3: Übersicht der verwendeten BiFC-Konstrukte und der Ergebnisse der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation von SAUL1, BON1 und BAP1 („+“ = Interaktion, „-“ = keine Interaktion)

Vektor	Protein 1	Protein 2	Interaktion
pBiFC2in1 CN	SAUL1-YFP ^N	YFP ^C -BON1	+
pBiFC2in1 CN	SAUL1-YFP ^N	YFP ^C -BAP1	-
pBiFC2in1 CC	SAUL1-YFP ^N	BON1-YFP ^C	+
pBiFC2in1 CC	SAUL1-YFP ^N	BAP1-YFP ^C	-
pBiFC2in1 NC	YFP ^N -BON1	SAUL1-YFP ^C	+
pBiFC2in1 NC	YFP ^N -BAP1	SAUL1-YFP ^C	-
pBiFC2in1 NN	YFP ^N -SAUL1	YFP ^C -BON1	+
pBiFC2in1 NN	YFP ^N -SAUL1	YFP ^C -BAP1	-
pBiFC2in1 NC	YFP ^N -SAUL1	BON1-YFP ^C	+

Ergebnisse

Aufgrund der Lokalisierung von SAUL1 und BON1 an der Plasmamembran, stellte sich die Frage, ob die Interaktion zwischen den beiden Proteinen nicht mehr stattfinden würde, sollte SAUL1 nicht mehr an der Plasmamembran vorliegen. Um diese Frage beantworten zu können, wurden BiFC-Experimente mit BON1 und einer verkürzten Variante von SAUL1 durchgeführt, bei der die C-terminalen ARM-Repeats (ARM₇₋₁₁), die eine Assoziation mit der Plasmamembran vermitteln, deletiert waren (vgl. Drechsel *et al.*, 2011). Als Negativkontrolle wurde BAP1 ebenfalls in die Untersuchungen miteinbezogen.

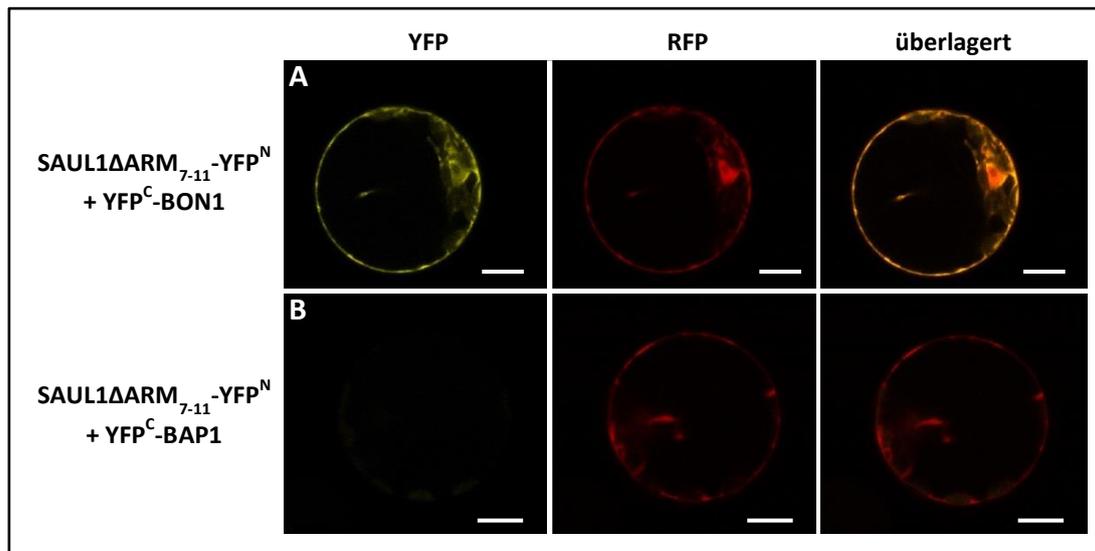


Abbildung 3.14: Konfokale Aufnahmen der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation von SAUL1ΔARM₇₋₁₁, BON1 und BAP1 in Mesophyllprotoplasten aus *A. thaliana*. **A:** Interaktion von SAUL1ΔARM₇₋₁₁-YFP^N und YFP^C-BON1 (*pBiFC2in1 CN SAUL1ΔARM₇₋₁₁-YFP^N/YFP^C-BON1*). Die Interaktion der beiden Proteine ist anhand des YFP-Signals im Cytosol erkennbar. **B:** Interaktion von SAUL1ΔARM₇₋₁₁-YFP^N und YFP^C-BAP1 (*pBiFC2in1 CN SAUL1ΔARM₇₋₁₁-YFP^N/YFP^C-BAP1*). Es konnte keine YFP-Fluoreszenz und somit keine Interaktion nachgewiesen werden. Das RFP-Signal diente zur Überprüfung der Transformation der Konstrukte in die Protoplasten. Maßstab = 10 μm.

Wie in Abbildung 3.14.A exemplarisch an dem Konstrukt *pBiFC2in1 CN SAUL1ΔARM₇₋₁₁-YFP^N/YFP^C-BON1* dargestellt, konnte ein deutliches YFP-Signal im Cytosol der Protoplasten detektiert werden. Dieses Ergebnis wurde bei vier weiteren BiFC-Konstrukten (Tab. 3.4) ebenfalls festgestellt. Nach der Transformation des Konstrukts *pBiFC2in1 CN SAUL1ΔARM₇₋₁₁-YFP^N/YFP^C-BAP1* konnte bis auf ein schwaches Hintergrundsignal keine YFP-Fluoreszenz und somit keine Interaktion ermittelt werden (Abb. 3.14.B). Die Analyse von vier weiteren Konstrukten bestätigte das Ergebnis, dass zwischen SAUL1ΔARM₇₋₁₁ und BAP1 keine

Ergebnisse

Interaktion vorliegt (Tab. 3.4). Ein Nachweis der Expression der Proteine, bei denen kein YFP-Signal detektiert werden konnte, mithilfe eines Immunoblots, steht allerdings noch aus.

Tabelle 3.4: Übersicht der verwendeten BiFC-Konstrukte und der Ergebnisse der bimolekularen Fluoreszenz-komplementation von SAUL1 Δ ARM₇₋₁₁, BON1 und BAP1 („+“ = Interaktion, „-“ = keine Interaktion)

Vektor	Protein 1	Protein 2	Interaktion
pBiFC2in1 CN	SAUL1 Δ ARM ₇₋₁₁ -YFP ^N	YFP ^C -BON1	+
pBiFC2in1 CN	SAUL1 Δ ARM ₇₋₁₁ -YFP ^N	YFP ^C -BAP1	-
pBiFC2in1 CC	SAUL1 Δ ARM ₇₋₁₁ -YFP ^N	BON1-YFP ^C	+
pBiFC2in1 CC	SAUL1 Δ ARM ₇₋₁₁ -YFP ^N	BAP1-YFP ^C	-
pBiFC2in1 NN	YFP ^N -SAUL1 Δ ARM ₇₋₁₁	YFP ^C -BON1	+
pBiFC2in1 NN	YFP ^N -SAUL1 Δ ARM ₇₋₁₁	YFP ^C -BAP1	-
pBiFC2in1 NC	YFP ^N -SAUL1 Δ ARM ₇₋₁₁	BON1-YFP ^C	+
pBiFC2in1 NC	YFP ^N -SAUL1 Δ ARM ₇₋₁₁	BAP1-YFP ^C	-
pBiFC2in1 NN	YFP ^C -BON1	YFP ^C -SAUL1 Δ ARM ₇₋₁₁	+
pBiFC2in1 NN	YFP ^C -BAP1	YFP ^C -SAUL1 Δ ARM ₇₋₁₁	-

In Li *et al.* (2010) konnte in einem Hefe-2-Hybrid-Experiment gezeigt werden, dass die Mutation von 6 Aminosäuren in der C-terminalen VWA-Domäne in BON1 dazu führte, dass keine Interaktion mit BAP1 mehr stattfindet. Um *in planta* zu überprüfen, ob die Interaktion der beiden Proteine über die VWA-Domäne vermittelt wird, wurden BiFC-Experimente mit einem BON1-Deletionskonstrukt, bei dem die Sequenz der VWA-Domäne deletiert worden war oder mit der VWA-Domäne durchgeführt. Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob die Interaktion von BON1 und SAUL1 ebenfalls nicht mehr stattfindet, sobald die VWA-Domäne fehlt.

Die Transformation des Konstrukts *pBiFC2in1 NN YFP^N-BON1 Δ VWA/YFP^C-BAP1* in die Protoplasten ergab, dass kein YFP-Signal und so auch keine Interaktion der beiden Proteine nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.15.A). Im Gegensatz dazu ist eine deutliche Interaktion zwischen der VWA-Domäne und BAP1 zu sehen (Abb. 3.15.B). Die YFP-Fluoreszenz konnte im Cytosol der Protoplasten beobachtet werden. Die Akkumulation des YFPs in fleckenartigen Strukturen ist vermutlich auf die starke Expression der Proteine durch den 35S-Promotor zurückzuführen. Bei der Untersuchung des BiFC-Konstrukts *pBiFC2in1 NN YFP^N-BON1 Δ VWA/YFP^C-SAUL1* wurde ein YFP-Signal im Cytosol der Protoplasten detektiert (Abb. 3.15.C). Eine Interaktion zwischen der VWA-Domäne und SAUL1 konnte jedoch nicht festgestellt werden, da hierbei das YFP-Signal fehlte (Abb. 3.15.D). Dabei steht der Nachweis der Expression der Proteine mittels Immunoblot allerdings aus.

Ergebnisse

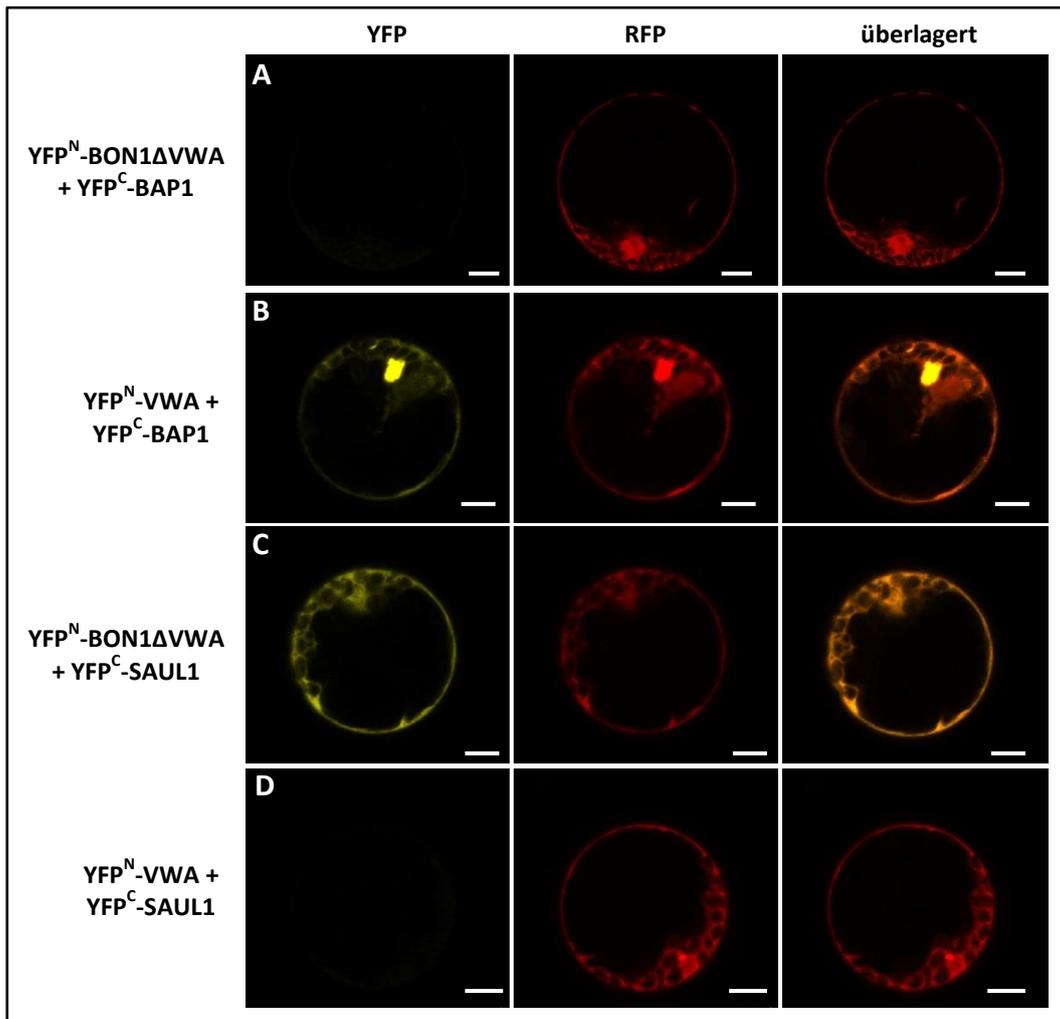


Abbildung 3.15: Konfokale Aufnahmen der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation von BON1-Deletionen, BAP1 und SAUL1 in Mesophyllprotoplasten aus *A. thaliana*. **A:** Interaktion von YFP^N-BON1ΔVWA und YFP^C-BON1 (*pBiFC2in1 NN YFP^N-BON1ΔVWA/YFP^C-BON1*). Es konnte keine YFP-Fluoreszenz und somit keine Interaktion nachgewiesen werden. **B:** Interaktion von YFP^N-VWA und YFP^C-BAP1 (*pBiFC2in1 NN YFP^N-VWA/YFP^C-BAP1*). Im Cytosol konnte ein YFP-Signal und somit eine Interaktion der VWA-Domäne und BAP1 ermittelt werden. **C:** Interaktion von YFP^N-BON1ΔVWA und YFP^C-SAUL1 (*pBiFC2in1 NN YFP^N-BON1ΔVWA/YFP^C-SAUL1*). Eine Interaktion der beiden Proteine ist anhand der Fluoreszenz zu erkennen. **D:** Interaktion von YFP^N-VWA und YFP^C-SAUL1 (*pBiFC2in1 NN YFP^N-VWA/YFP^C-SAUL1*). Zwischen der VWA-Domäne und SAUL1 besteht keine Interaktion. Das RFP-Signal diente zur Überprüfung der Transformation der Konstrukte in die Protoplasten. Maßstab = 10 µm.

Zusammengefasst konnte mithilfe der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation zum einen die Interaktion von BON1 und BAP1 *in planta* bestätigt werden, wobei diese durch die VWA-Domäne in BON1 vermittelt wird. Somit konnte eine Positiv- und Negativkontrolle für zukünftige BiFC-Experimente etabliert werden. Eine Interaktion von BON1 mit SAUL1 konnte ebenfalls nachgewiesen werden, jedoch scheint diese unabhängig von der Lokalisierung von SAUL1 an die Plasmamembran zu sein. Die Ergebnisse deuten an, dass die Interaktion

zwischen den beiden C2-Domänen von BON1 und der U-Box sowie ARM₁₋₆ von SAUL1 erfolgt. Zwischen BAP1 und SAUL1 hingegen konnte keine Interaktion nachgewiesen werden.

3.2.2.1. Analyse der Interaktion von SAUL1 und BON1 mittels Co-Immunopräzipitation

Parallel zur bimolekularen Fluoreszenzkomplementation sollte im Rahmen dieser Arbeit mit der Co-Immunpräzipitation (Co-IP) ein zweiter experimenteller Ansatz durchgeführt werden, um die Interaktion von SAUL1 und BON *in planta* untersuchen zu können. Die Analyse basiert dabei auf dem Prinzip, dass ein mit einem *Tag* fusioniertes Protein durch die spezifische Bindung an eine Matrix aus einem Proteinextrakt isoliert wird. Moleküle, die mit diesem Protein interagieren, werden dabei co-präzipitiert.

Zunächst wurde, wie in Abschnitt 2.4.1 beschrieben, ein T-DNA Konstrukt (*pGWB614_BON1*) erstellt, bei dem die kodierende Sequenz von *BON1* mit der Sequenz eines dreifachen (3x) Hämagglutinin (HA) *Tags* N-terminal fusioniert wurde. Zusammen mit dem Vektor *pEarleyGate104_35S::YFP_SAUL1* (Drechsel *et al.*, 2011) sowie *pBin61_35S::p19* (Voinnet *et al.*, 2003) wurde das *3xHA-BON1*-Fusionskonstrukt mithilfe von Agrobakterien in Blätter von *N. benthamiana* Pflanzen infiltriert und dort transient exprimiert. Dabei führt das Protein P19 zur Unterdrückung der zelleigenen RNA-Interferenz (Voinnet *et al.*, 2003). Das aus den Blättern hergestellte Gesamtproteinextrakt wurde auf eine mit anti-GFP-Antikörpern beschichtete Matrix (GFP-Trap[®]_M, ChromoTek-GmbH) gegeben, um die YFP-SAUL1/3xHA-BON1-Komplexe co-präzipitieren zu können. Nach der Elution sollten die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt und in einem Western Blot mit spezifischen Antikörpern (anti-HA-, anti-GFP-Antikörper) nachgewiesen werden. Dabei wurde bei YFP-SAUL1 eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 116 kDa, bei 3xHA-BON1 eine Proteinbande von 66,5 kDa erwartet. Als Negativkontrolle diente Blattmaterial einer Tabakpflanze, die nur mit dem P19-Konstrukt infiltriert worden war. Als Positivkontrolle für die anti-GFP-Matrix wurde freies GFP zusammen mit P19 in den Tabakblättern exprimiert. Um die Funktionalität des zur Immundetektion verwendeten anti-GFP- und anti-HA-Antikörpers zu überprüfen, diente zuvor isoliertes GFP-Protein und *Posi-Tag Epitope Tag Control* Protein (Covance Inc.). Wie in Abbildung 3.16 dargestellt, wurde mit beiden Antikörpern in der Elutionsfraktion der Negativkontrolle (P19) kein Protein detektiert. Bei der Positivkontrolle wiederum war eine intensive GFP-Proteinbande von 26,9 kDa und eine etwas schwächere Bande bei ca. 55 kDa

Ergebnisse

zu erkennen. Hierbei wird eine Aggregation des GFP-Proteins vermutet. Das in Tabak exprimierte 3xHA-BON1 Fusionsprotein konnte nicht allein aus dem Proteinextrakt isoliert werden, sodass keine Bande erkennbar war (Abb. 3.16). Die Immunopräzipitation des YFP-SAUL1 ergab, dass mithilfe des anti-GFP-Antikörpers eine Bande von 116 kDa zu sehen war. Zusätzlich wurden, neben mehreren schwach erkennbaren Banden, drei weitere Banden mit stärkerer Intensität bei ca. 100 kDa, 30 kDa und 25 kDa nachgewiesen. Bei letzterer handelt es sich vermutlich um abgespaltenes YFP. Durch den anti-HA-Antikörper wurden keine Banden detektiert. Ein vergleichbares Ergebnis wurde bei der Immunopräzipitation von YFP-SAUL1 mit 3xHA-BON1 ermittelt, jedoch konnte keine Proteinbande mithilfe des anti-HA-Antikörpers detektiert werden (Abb. 3.16). Somit konnte keine Interaktion der beiden Proteine nachgewiesen werden. Um eine eventuelle Interaktion von 3xHA-BON1 mit dem Protein-*Tag* von SAUL1 auszuschließen, wurde das Fusionsprotein zusammen mit freiem GFP in Tabak exprimiert. Außer den GFP-Proteinbanden bei 26,9 kDa und ca. 55 kDa konnten keine zusätzlichen Banden festgestellt werden, sodass keine Interaktion vorlag. Die für den jeweiligen Antikörper verwendeten Positivkontrollen ergaben entweder eine Bande von 26,9 kDa und ca. 55 kDa (anti-GFP) oder 45 kDa (anti-HA) (Abb. 3.16).

Ergebnisse

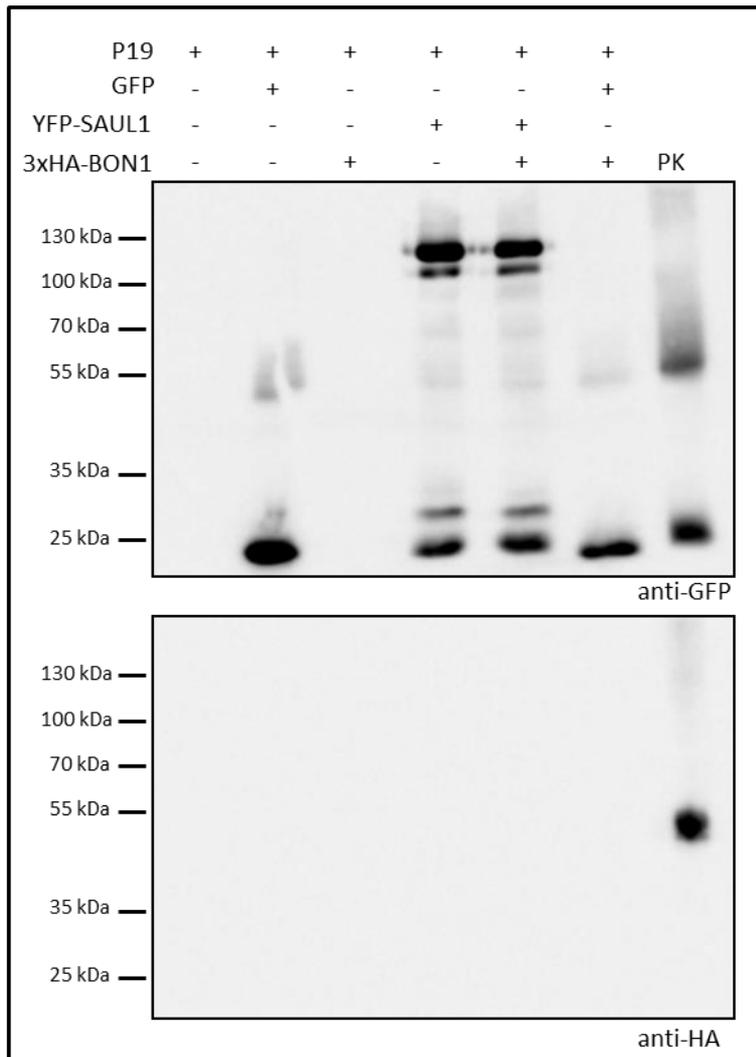


Abb 3.16: Western Blot der Co-Immunpräzipitation von YFP-SAUL1 mit 3xHA-BON1. In der Negativkontrolle (P19) konnte keine Proteinbande detektiert werden. Die Immunpräzipitation des freien GFPs ergab eine intensive Proteinbande von 26,9 kDa und eine deutlich schwächere Bande bei ca 55 kDa, vermutlich aggregiertes GFP. Bei alleiniger Expression von 3xHA-BON1 in Tabak konnte keine Bande des Proteins ausgemacht werden. YFP-SAUL1 wurde, erkennbar an der erwarteten Bande von 116 kDa, präzipitiert. Zusätzlich wurden weitere Banden mithilfe des anti-GFP-Antikörpers detektiert. Die Interaktion von YFP-SAUL1 und 3xHA-BON1 konnte nicht nachgewiesen werden, da keine Banden mithilfe des anti-HA-Antikörpers ermittelt werden konnten. YFP-SAUL1 konnte erneut angereichert werden. Eine Interaktion von 3xHA-BON1 mit freiem GFP konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden, da die Immunpräzipitation nur eine Anreicherung des GFPs, erkennbar an zwei Proteinbanden (26,9 kDa, ca. 55 kDa), ergab. PK = Positivkontrolle (für anti-GFP-Antikörper: freies GFP, für anti-HA-Antikörper: *Posi-Tag Epitope Tag Control Protein*)

Mithilfe der Co-Immunpräzipitation konnte keine Interaktion von SAUL1 und BON1 *in planta* nachgewiesen werden.

3.2.2.2. Analyse der gegenseitigen Beeinflussung von SAUL1 und BON1 bezüglich ihrer subzellulären Lokalisierung in T-DNA Insertionsmutanten

Wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben wurde die Interaktion von SAUL1 und BON1 infolge der Deletion der C-terminalen ARM-Repeat-Domänen (ARM₇₋₁₁) nicht mehr an der Plasmamembran, sondern im Cytosol der Protoplasten lokalisiert. Es stellte sich die Frage, ob SAUL1 an der Assoziation von BON1 an die Plasmamembran beteiligt ist oder umgekehrt. Um diese Frage zu beantworten, sollte die subzelluläre Lokalisierung von SAUL1 und BON1 in Abwesenheit des jeweiligen Interaktionspartners analysiert werden. Hierfür wurde das Fusionskonstrukt *35S::BON1-GFP* erstellt und in Protoplasten aus *saul1-1* Mutanten transformiert. Des Weiteren wurde ein *35S::SAUL1-GFP* Konstrukt (Drechsel *et al.*, 2011) verwendet und in Protoplasten Pflanzen der Linie *bon1*, bei der die *BON1*-Expression ausgeschaltet ist, transformiert. Die Fluoreszenz wurde mithilfe des konfokalen Laser-Scanning Mikroskops untersucht.

Anhand des GFP-Signals war das Fusionsprotein SAUL1-GFP an der Plasmamembran der *bon1*-Protoplasten zu erkennen (Abb. 3.17.A). Ein vergleichbares Lokalisierungssignal ergab die Transformation des Konstrukts *35S::BON1-GFP* in *saul1-1*-Protoplasten (Abb. 3.17.B). Somit blieb die Lokalisierung der beiden Proteine unverändert, auch wenn der Interaktionspartner fehlte, da sie ebenfalls im Wildtyp an der Plasmamembran detektiert worden waren (Abb. 3.17.C und D).

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die Lokalisation von SAUL1 und BON1 in Abwesenheit des jeweiligen Interaktionspartners nicht verändert. Somit scheint SAUL1 nicht an der Assoziation von BON1 an die Plasmamembran beteiligt zu sein und BON1 nicht an der Membranassoziation von SAUL1.

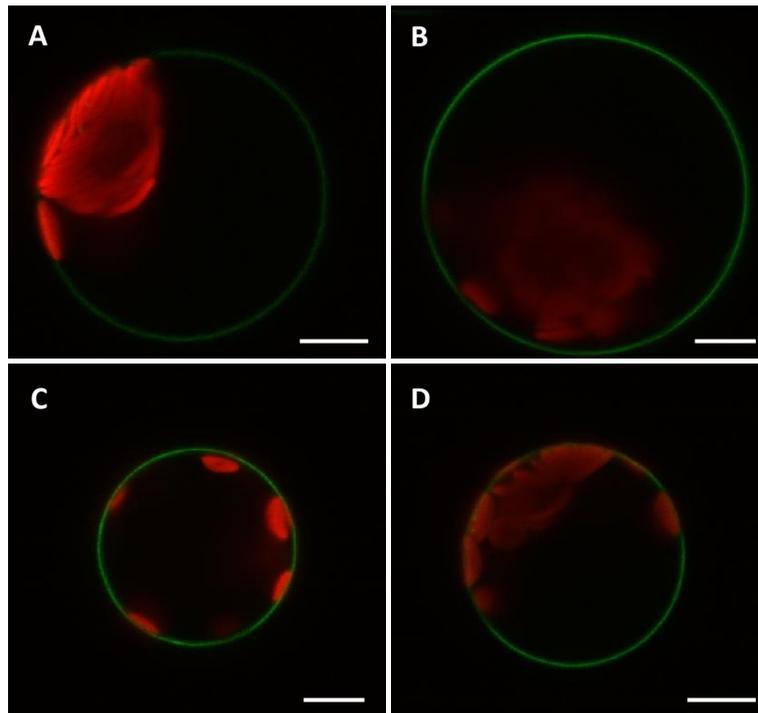


Abb. 3.17: Subzelluläre Lokalisierung von SAUL1-GFP und BON1-GFP in Mesophyllprotoplasten aus *A. thaliana*. **A:** SAUL1-GFP in *bon1*. Das GFP-Signal wurde an der Plasmamembran detektiert. **B:** BON1-GFP in *saul1-1*. Die Fluoreszenz des Fusionsproteins ist an der Plasmamembran zu sehen. **C:** SAUL1-GFP in Col-0. Das Protein wurde anhand des GFP-Signals an der Plasmamembran ermittelt. **D:** BON1-GFP in Col-0. Das GFP-Signal ist an der Plasmamembran zu erkennen. Aufgrund ihrer Autofluoreszenz erscheinen die Chloroplasten in rot. Maßstab = 10 μm

3.2.3. Analyse der Interaktion von PUB43 mit BON1 und BAP1

Laut Tong *et al* (2017) ist von einer funktionalen Redundanz bei der PTI zwischen SAUL1 und dem nächstparalogen Protein PUB43 auszugehen. Aufgrund der Interaktion von SAUL1 mit BON1 ergab sich die Frage, ob BON1 auch mit PUB43 *in planta* assoziiert. Um die Frage beantworten zu können, wurden Interaktionsanalysen mit PUB43, BON1 und BAP1 mithilfe der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation durchgeführt.

Wie exemplarisch anhand des Konstrukts *pBiFC2in1 NC YFP^N-PUB43/BON1-YFP^C* dargestellt, konnte ein YFP-Signal an der Plasmamembran und somit eine Interaktion von PUB43 und BON1 beobachtet werden (Abb. 3.18.A). Dieses Ergebnis konnte durch die Analyse von zwei weiteren BiFC-Konstrukten (Tab. 3.5) bestätigt werden. Im Gegensatz dazu ergab die Untersuchung des Konstrukts *pBiFC2in1 CC PUB43-YFP^N/BON1-YFP^C* keine Interaktion zwischen den beiden Proteinen (Abb. 3.18.B). Nach der Transformation des Konstrukts *pBiFC2in1 NC YFP^N-BON1/PUB43-YFP^C* wiederum wurde ein YFP-Signal an der Plasmamembran beobachtet (Tab. 3.5). Zwischen PUB43 und BAP1 konnte ebenfalls eine

Ergebnisse

Interaktion beobachtet werden. Wie in Abbildung 3.18.C gezeigt, wurde ein im Vergleich zu Abbildung 3.18.B schwaches YFP-Signal an der Plasmamembran detektiert, sofern beide Proteine N-terminal mit einem Split-YFP fusioniert worden waren. Die Untersuchung des Konstrukts *pBiFC2in1 NN YFP^N-BAP1/YFP^C-PUB43* (Tab. 3.5) ergab ebenfalls ein YFP-Signal, jedoch konnte dies nur bei wenigen Protoplasten beobachtet werden. Wurde eines der beiden Proteine C-terminal fusioniert, so konnte keine Interaktion mehr festgestellt werden (Abb. 3.18.D).

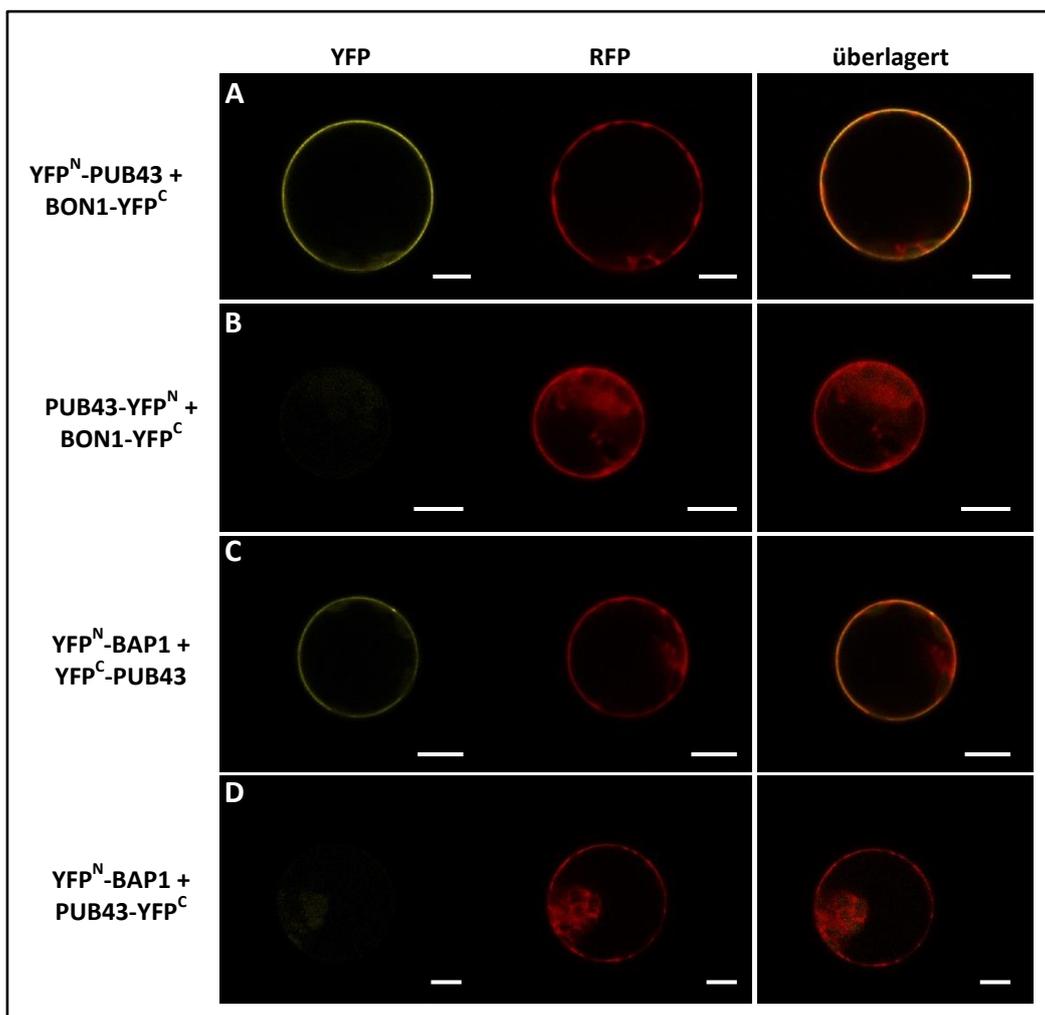


Abb. 3.18: Konfokale Aufnahmen der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation von PUB43, BON1 und BAP1 in Mesophyllprotoplasten aus *A. thaliana*. **A:** Interaktion von YFP^N-PUB43 und BON1-YFP^C (*pBiFC2in1 NC YFP^N-PUB43/BON1-YFP^C*). Die Interaktion konnte anhand des YFP-Signals an der Plasmamembran nachgewiesen werden. **B:** Interaktion von PUB43-YFP^N und BON1-YFP^C (*pBiFC2in1 CC PUB43-YFP^N/ BON1-YFP^C*). Es wurde kein YFP-Signal und somit keine Interaktion ermittelt werden. **C:** Interaktion von YFP^N-BAP1 und YFP^C-PUB43 (*pBiFC2in1 NN YFP^N-BAP1/YFP^C-PUB43*). Die Interaktion wurde an der Plasmamembran detektiert. **D:** Interaktion von YFP^N-BAP1 und PUB43-YFP^C (*pBiFC2in1 NC YFP^N-BAP1/PUB43-YFP^C*). Da kein YFP-Signal beobachtet werden konnte, liegt keine Interaktion der beiden Proteine vor. Das RFP-Signal diente zur Überprüfung der Transformation der Konstrukte in die Protoplasten. Maßstab = 10 µm.

Drei weitere Konstrukte ergaben ebenfalls kein YFP-Signal (Tab. 3.5). Hierbei steht der Nachweis der Expression der Proteine, die kein YFP-Signal erzeugten, mittels Immunoblot noch aus. Zusammengefasst betrachtet, konnte sowohl eine Interaktion von PUB43 mit BON1 als auch mit BAP1 *in planta* nachgewiesen werden.

Tabelle 3.5: Übersicht der verwendeten BiFC-Konstrukte und der Ergebnisse der bimolekularen Fluoreszenz-komplementation von PUB43, BON1 und BAP1 („+“ = Interaktion, „-“ = keine Interaktion)

Vektor	Protein 1	Protein 2	Interaktion
pBiFC2in1 NC	YFP ^N -BON1	PUB43-YFP ^C	+
pBiFC2in1 NC	YFP ^N -BAP1	PUB43-YFP ^C	-
pBiFC2in1 CC	PUB43-YFP ^N	BON1-YFP ^C	-
pBiFC2in1 CC	PUB43-YFP ^N	BAP1-YFP ^C	-
pBiFC2in1 NN	YFP ^N -PUB43	YFP ^C -BON1	+
pBiFC2in1 NN	YFP ^N -PUB43	YFP ^C -BAP1	+
pBiFC2in1 NC	YFP ^N -PUB43	BON1-YFP ^C	+
pBiFC2in1 NC	YFP ^N -PUB43	BAP1-YFP ^C	-
pBiFC2in1 NN	YFP ^N -BON1	YFP ^C -PUB43	+
pBiFC2in1 NN	YFP ^N -BAP1	YFP ^C -PUB43	+

3.2.4. Analyse der Interaktion von SAUL1 mit LORE

Das Protein LORE (LIPOOLIGOSACCHARIDE-SPECIFIC REDUCED ELICITATION), auch SD1-29 (S-DOMAIN 1-29) genannt, ist eine Plasmamembran-lokalisierte Rezeptorkinase, die an der Erkennung von PAMPs, im Speziellen von Lipopolysacchariden, bei der pflanzlichen Immunantwort beteiligt ist (Ranf *et al.*, 2015).

Laut Samuel *et al.* (2008) konnte anhand einer Hefe-2-Hybrid Interaktionsstudie eine Interaktion zwischen der ARM-Repeat Region von SAUL1 und der intrazellulären Kinase-Domäne des LORE-Proteins nachgewiesen werden.

Um die Interaktion der beiden Proteine *in planta* untersuchen zu können, wurden BiFC-Experimente durchgeführt. Da die Überexpression von LORE in Pflanzen zum Zelltod führen kann, wurde zusätzlich eine mutierte Variante der Rezeptorkinase verwendet, bei der eine Punktmutation (K516A) in der Kinase-Domäne vorlag, nachfolgend als LORE-Kinase Dead (KD) bezeichnet. Durch die Punktmutation wird der durch die Überexpression des Proteins verursachte Zelltod vermieden (persönliche Mitteilung, Milena Schäffer, Lehrstuhl für Phytopathologie, Technische Universität München). Als Positivkontrolle diente die bereits gezeigte Interaktion der beiden Proteine BON1 und BAP1 (Abb. 3.19.A). Wie in Abbildung 3.19.B und D exemplarisch an den beiden Konstrukten *pBiFC2in1 CC SAUL1-YFP^N/LORE-YFP^C*

und *pBiFC2in1 CC SAUL1-YFP^N/LORE-KD-YFP^C* zu erkennen ist, konnte kein YFP-Signal infolge der Fluoreszenzkomplementation detektiert werden.

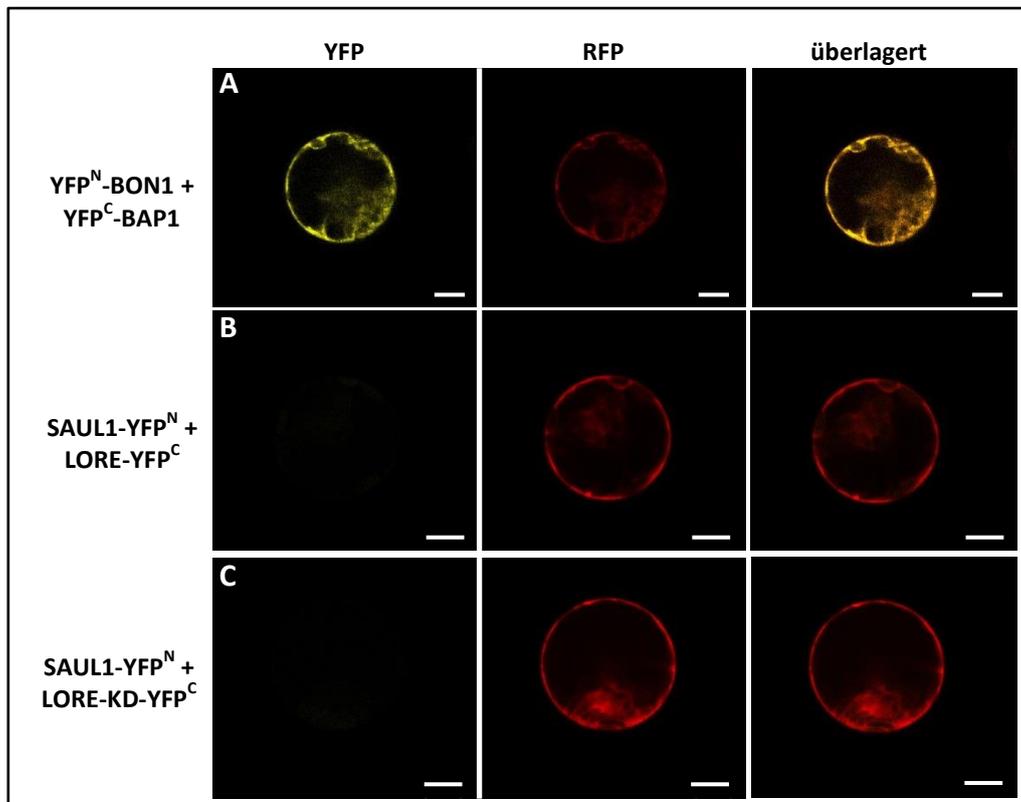


Abbildung 3.19: Konfokale Aufnahmen der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation von SAUL1 und LORE in Mesophyllprotoplasten aus *A. thaliana*. **A:** Positivkontrolle (*pBiFC2in1 NN YFP^N-BON1/YFP^C-BAP1*). Die Interaktion von BON1 und BAP1 führt zu einem YFP-Signal im Cytosol. **B:** Interaktion von SAUL1-YFP^N und LORE-YFP^C (*pBiFC2in1 CC SAUL1-YFP^N/LORE-YFP^C*). Es konnte keine Interaktion der beiden Proteine festgestellt werden, da kein YFP-Signal detektiert wurde. **C:** Interaktion von SAUL1-YFP^N und LORE-KD-YFP^C (*pBiFC2in1 CC SAUL1-YFP^N/LORE-KD-YFP^C*). Zwischen SAUL1 und der mutierten Version des LORE-Proteins konnte keine Interaktion festgestellt werden. Das RFP-Signal diente zur Überprüfung der Transformation der Konstrukte in die Protoplasten. Maßstab = 10 µm.

Allerdings steht ein Nachweis der Expression der Proteine mittels Immunoblot aus. Dieses Ergebnis wurde in den Analysen von sechs weiteren BiFC-Konstrukten (Tab. 3.6) bestätigt, sodass angenommen werden kann, dass zwischen SAUL1 und LORE *in planta* keine Interaktion besteht.

Ergebnisse

Tabelle 3.6: Übersicht der verwendeten BiFC-Konstrukte und der Ergebnisse der bimolekularen Fluoreszenz-komplementation von SAUL1 und LORE („+“ = Interaktion, „-“ = keine Interaktion)

Vektor	Protein 1	Protein 2	Interaktion
pBiFC2in1 CN	SAUL1-YFP ^N	YFP ^C -LORE	-
pBiFC2in1 CN	SAUL1-YFP ^N	YFP ^C -LORE-KD	-
pBiFC2in1 CC	SAUL1-YFP ^N	LORE-YFP ^C	-
pBiFC2in1 CC	SAUL1-YFP ^N	LORE-KD-YFP ^C	-
pBiFC2in1 CC	LORE-YFP ^N	SAUL1-YFP ^C	-
pBiFC2in1 CC	LORE-KD-YFP ^N	SAUL1-YFP ^C	-
pBiFC2in1 NC	YFP ^N -LORE	SAUL1-YFP ^C	-
pBiFC2in1 NC	YFP ^N -LORE-KD	SAUL1-YFP ^C	-

3.3. *In vitro* Analyse von SAUL1 Interaktionspartnern

Zur weiteren Charakterisierung der Interaktion von SAUL1 mit BON1 sollte im Rahmen dieser Arbeit eine *in vitro* Untersuchung mithilfe eines *Pull-down* Experiments durchgeführt werden. Die dafür benötigten Proteine sollten in *Escherichia coli* (*E. coli*) überexprimiert und anschließend affinitätschromatographisch aufgereinigt werden. Zur Vorbereitung der Proteinextraktion sollten anhand eines Löslichkeitsassays optimale Pufferbedingungen zur Solubilisierung des jeweiligen Interaktionspartners identifiziert werden.

3.3.1. Überexpression und Solubilisierung von SAUL1-Interaktionspartnern

Zur Überexpression der in Abschnitt 3.2 nachgewiesenen Interaktionspartner von SAUL1 wurden mehrere Expressionskonstrukte erstellt, indem die kodierende Sequenz des jeweiligen Proteins mit einem N-terminalen Glutathion-S-Transferase (GST) -*Tag* fusioniert wurde. Neben BON1, wurde für BAP1, das als Negativkontrolle im *Pull-down* dienen sollte sowie für AtKRP125b jeweils ein GST-Fusionskonstrukt erstellt. Die Konstrukte wurden in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) transformiert und exprimiert. Anschließend sollten die verschiedenen Proteine mithilfe einer Glutathion-Matrix aufgereinigt werden. Um bei der Aufreinigung, Pufferbedingungen zu verwenden, die eine Isolierung des jeweiligen Proteins in gelöster Form ermöglichen, wurde in Anlehnung an Lindwall *et al.* (2000) ein Löslichkeitsassay durchgeführt. Wie in Abschnitt 2.12.7 beschrieben, wurden die Bakterienpellets der jeweiligen Expressionskultur in Puffern (Tab. 2.18) mit unterschiedlicher Zusammensetzung aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte mithilfe eines Lysozym-Verdau und, mit Ausnahme der GST-AtKRP125b Expressionskultur, mehreren Sonifikationszyklen. Die Proteinüberstände wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen. Mithilfe von anti-GST-spezifischen Antikörpern sollte der Nachweis der Proteine erfolgen, um die Effizienz des jeweiligen Puffers zur Proteinextraktion beurteilen zu können. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.20 dargestellt.

Die Analyse der Löslichkeit von GST-BON1 ergab, dass die erwartete Proteinbande von 89 kDa in den Puffern I bis VIII, nicht jedoch in den Puffern IX und X nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.20.A). Zusätzlich wurden oberhalb (Puffer I bis VII) und unterhalb (Puffer I bis IV) der GST-BON1-Proteinbande weitere Banden detektiert. Vermutlich handelt es sich hierbei um Proteinaggregate und Abbauprodukte. Anhand der Bandenintensität konnten

Ergebnisse

deutliche Unterschiede bezüglich der isolierten Proteinmenge festgestellt werden. So konnte durch Anwendung der Puffer I und II die größte Proteinmenge aus den Zellen gelöst werden, hier konnten intensivsten Proteinbanden detektiert werden. Bei diesen Puffern handelt es sich jeweils um einen PBS-Puffer mit 0,1 % Triton X-100, jedoch enthält Puffer II zusätzlich 0,1 M Urea (Tab. 2.18). Da dieser Zusatz jedoch zu keiner deutlichen Verstärkung der Proteinlöslichkeit, erkennbar an der vergleichbaren Intensität der Proteinbanden (Abb. 3.20.A), geführt hat, sollte zur Aufreinigung des Proteins GST-BON1 der Puffer I verwendet werden. Wie in Abbildung 3.20.B aufgezeigt, wurde das Protein GST-BAP1 mit einem Molekulargewicht von 48 kDa in den Puffern I bis VIII, jedoch nicht in den Puffer IX und X nachgewiesen. Mit Ausnahme der Puffer IV, V und VI wurde mit den verwendeten Puffern stets eine vergleichbare Menge an Protein isoliert. Die bei einer Größe von ca. 25 kDa detektierten Banden sind möglicherweise abgespaltene GST-Moleküle. Bei den Banden oberhalb der GST-BAP1-Bande handelt es sich vermutlich um Proteinaggregate (Abb. 3.20.B). Die vergleichbaren GST-BAP1-Proteinbanden, die in den Puffer I, II, III, VII und VIII nachgewiesen wurden, zeigen, dass die verschiedenen Puffersysteme (PBS, Tris-HCl) sowie die unterschiedlichen Detergenzien (Triton X-100, NP-40) zu keinen deutlich sichtbaren Unterschieden in der Proteinisolierung geführt haben. Des Weiteren wurde keine Verbesserung der Proteinlöslichkeit durch den Zusatz von Urea (Puffer II, III) beobachtet (Abb. 3.20.B). Da nach einem möglichst einfach zusammengesetzten Puffer mit einer geringen Detergenzienkonzentration gesucht wurde, sollte der Puffer VII (100 mM Tris-HCl, pH 7,0, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% NP-40) zur Aufreinigung von GST-BAP1 verwendet werden. Bei der Analyse der Löslichkeit des Fusionsproteins GST-AtKRP125b wurde festgestellt, dass das Protein im Vergleich zu den Proteinen GST-BON1 und GST-BAP1 in weitaus weniger Puffern gelöst werden konnte. Es ist zu beachten, dass die Puffer I bis XI zur Stabilisierung des Kinesins zusätzlich ATP und DTT enthielten. So wurde die erwartete Proteinbande von 140 kDa in den Puffern V, VI, VIII und XI detektiert (Abb. 3.20.C). In den anderen Puffern konnten entweder Banden unterhalb der GST-AtKRP125b-Bande oder gar keine Banden festgestellt werden. In dem Puffer V konnte im Vergleich zu den Puffern VI, VIII und XI die intensivste Proteinbande und somit die größte Proteinmenge von GST-AtKRP125b isoliert werden. Somit sollte dieser Puffer zur Aufreinigung des Fusionsproteins verwendet werden. Die zusätzlichen Banden in den Puffern sind vermutlich auf Abbauprodukte des Proteins zurückzuführen (Abb. 3.20.C).

Ergebnisse

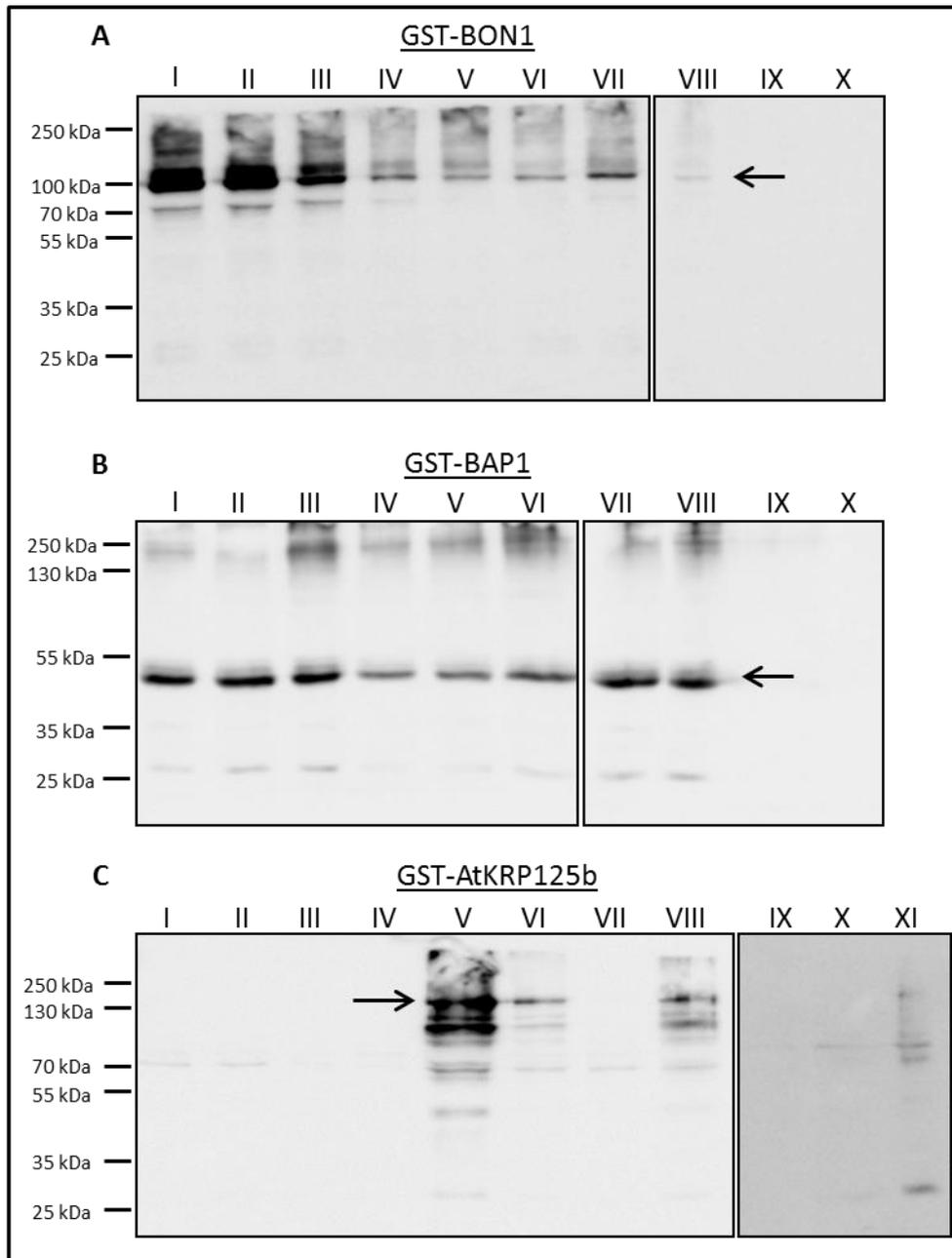


Abbildung 3.20: Western Blot des Löslichkeitsassays von GST-BON1, GST-BAP1 und GST-AtKRP125b. **A:** Solubilisierung von GST-BON1 (89 kDa). Die erwartete Bande konnte in den verwendeten Puffern I bis VIII nachgewiesen werden, wobei in Puffer I und II die deutlichsten Banden festgestellt werden konnten. Zusätzlich wurden weitere Banden ober- und unterhalb der GST-BON1-Bande ermittelt. **B:** Solubilisierung von GST-BAP1 (48 kDa). Bis auf Puffer IX und X konnte die Proteinbande in allen Puffern detektiert werden. Die geringste Intensität der Proteinbande wurde in den Puffern IV und V ermittelt. Obere Proteinbanden sind vermutlich auf Proteinaggregate zurückzuführen. Bei den Banden, die bei ca. 25 kDa detektiert wurden, handelt es sich vermutlich um den GST-Tag. **C:** Solubilisierung von GST-AtKRP125b (140 kDa). Die erwartete Proteinbande wurde in den Puffern V, VI und VIII nachgewiesen. Die kleineren detektieren Banden sind vermutlich Abbauprodukte des Fusionsproteins. Die erwarteten Bandengrößen sind mit Pfeilen markiert. Die verschiedenen Puffer sind mit römischen Zahlen (I bis XI) gekennzeichnet.

Die Analyse der Löslichkeitsassays hat ergeben, dass alle Proteine in gelöster Form aus den Expressionskulturen isoliert und somit geeignete Pufferbedingungen zur Aufreinigung der Proteine gefunden werden konnten.

3.3.2. Affinitätschromatographische Aufreinigung von Fusionsproteinen aus *Escherichia coli*

Zur *in vitro* Analyse der Interaktion von SAUL1 mit BON1 und BAP1 wurden die in Abschnitt 3.3.1 beschriebenen GST-Fusionskonstrukte sowie ein 6xHis-SAUL1 Fusionskonstrukt (Raab *et al.*, 2009) benötigt. Des Weiteren sollte freies GST isoliert werden, um eine Interaktion von SAUL1 mit dem *Tag* der Fusionsproteine ausschließen zu können. Die Expression und Aufreinigung der Proteine wurde wie in den Abschnitten 2.12.1 und 2.12.2 beschrieben, durchgeführt. Die anhand des Löslichkeitsassays (Abschnitt 3.3.1) ausgewählten Puffer I und VII wurden zur Aufreinigung von GST-BON1 und GST-BAP1 verwendet. Die verschiedenen Fraktionen der Affinitätsaufreinigung wurden elektrophoretisch auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine mithilfe einer Coomassie-Färbung sichtbar gemacht, um den Erfolg der Aufreinigung zu überprüfen. Des Weiteren wurde die Konzentration der in der jeweiligen Elutionsfraktion enthaltenen Fusionsproteine ermittelt. In Abbildung 3.21 ist das Ergebnis der Aufreinigung der vier verschiedenen Proteine aufgeführt. Auf dem jeweiligen Polyacrylamidgel wurden die Lysatfraktion, d.h. der Proteinüberstand nach Zellaufschluss, die Durchflussfraktion, die Waschfraktion sowie die beiden Elutionsfraktionen aufgetragen. Wie in Abbildung 3.21.A aufgeführt, wurde die erwartete 6xHis-SAUL1 Proteinbande (89 kDa) in der ersten Elutionsfraktion nachgewiesen. Mit einem Molekulargewicht von ebenfalls 89 kDa, wurde das Fusionsprotein GST-BON1 in der Elutionsfraktion 1 ermittelt (Abb. 3.21.B). Schwache Banden unterhalb von BON1 sind vermutlich auf Abbauprodukte des Proteins zurückzuführen. Das Protein GST-BAP1 (48 kDa) konnte, wie in Abbildung 3.21.C gezeigt, in der ersten Elutionsfraktion nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich diese Bande ebenfalls in der Durchlaufraction, sodass es scheint, als ob nicht alle Proteinmoleküle an der Chromatographiesäule gebunden haben. Zusätzlich wurden weitere Banden ober- und unterhalb von GST-BAP1 detektiert, bei denen es sich vermutlich um Aggregate bzw. Abbauprodukte handelt. Die Aufreinigung des GST-Tags (26 kDa) ergab, dass dieser hauptsächlich in der ersten, jedoch auch in der zweiten Elutionsfraktion angereichert werden konnte (Abb. 3.21.D). In den vorherigen Fraktionen wurden ebenfalls deutliche

Ergebnisse

Banden des *Tags* nachgewiesen. Schwache Banden oberhalb des *Tags* in der ersten Elutionsfraktion sind möglicherweise Aggregate des Moleküls. Die Konzentrationsbestimmung mithilfe des Pierce™ 660nm Protein Assays (Thermo Fisher Scientific) ergab, für alle aufgereinigten Proteine eine Konzentration von 0,1 mg/mL bis 0,6 mg/mL.

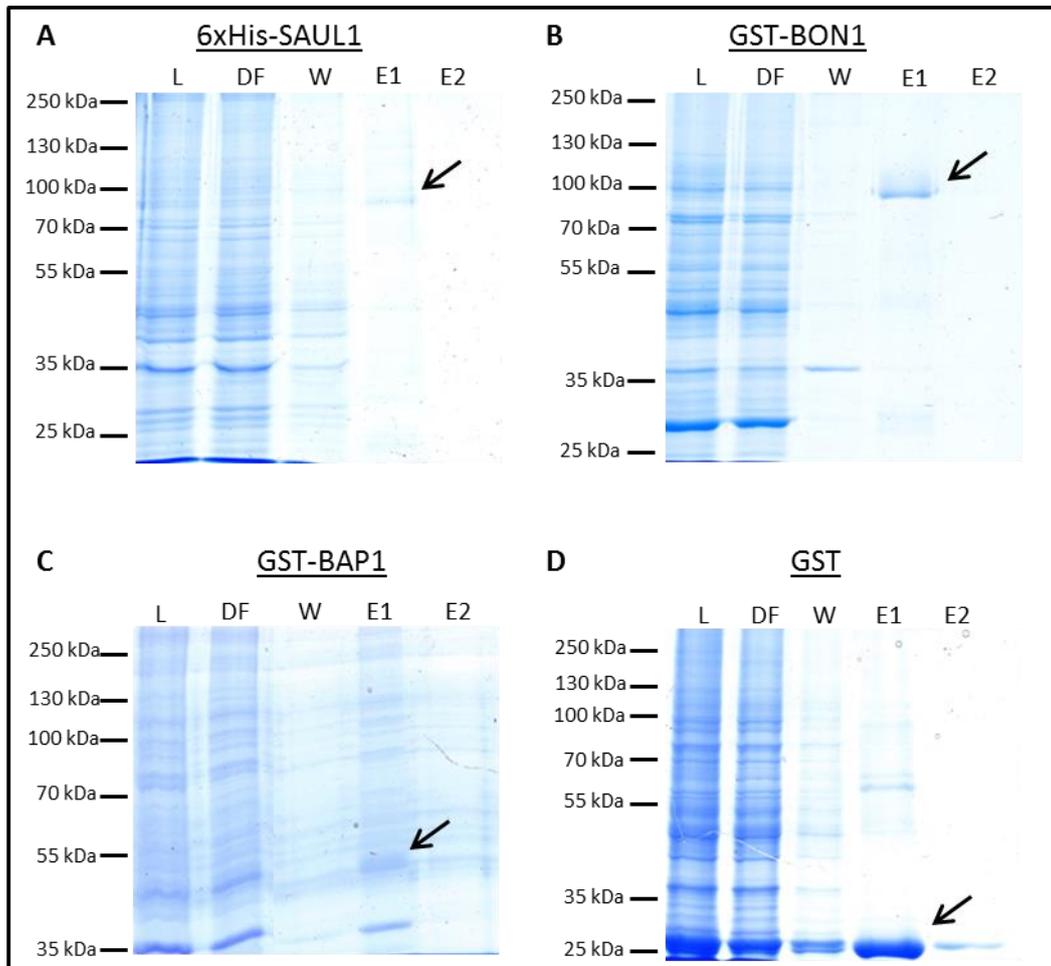


Abbildung 3.21: Coomassie-gefärbtes Polyacrylamidgel zur Analyse der Aufreinigung der Fusionsproteine 6xHis-SAUL1, GST-BON1, GST-BAP1 und GST. **A:** Aufreinigung von 6xHis-SAUL1: Die erwartete Proteinbande mit einer Größe von 89 kDa wurde in der Elutionsfraktion 1 (Pfeil) nachgewiesen. **B:** Aufreinigung von GST-BON1. Das Fusionsprotein (89 kDa) wurde in der Elutionsfraktion 1 (Pfeil) ermittelt. Bei der zweiten Bande (ca. 25 kDa) handelt es sich womöglich um den GST-Tag. **C:** Aufreinigung von GST-BAP1. In der ersten Elutionsfraktion ist eine deutliche Bande mit der erwarteten Proteingröße von 48 kDa (Pfeil) zu erkennen. **D:** Aufreinigung von GST: Der GST-Tag konnte, erkennbar an der deutlichen Proteinbande von 26 kDa, in der ersten und zweiten Elutionsfraktion (Pfeil) nachgewiesen werden. Die Proteinaufreinigung erfolgte entweder mithilfe einer Nickel-NTA Matrix (A) oder mit einer Glutathion *HiCap* Matrix (B – D) (Qiagen). (L = Lysat, DF = Durchflussfraktion, W = Waschfraktion, E1 bzw. E2 = Elutionsfraktion 1 und 2)

Die zur *in vitro* Analyse mittels *Pull-down* benötigten Proteine 6xHis-SAUL1 sowie GST-BON1, GST-BAP1 und GST konnten aus dem jeweiligen *E. coli* Überexpressionsstamm aufgereinigt werden.

3.3.3. Analyse der Interaktion von SAUL1 und BON1 mittels *Pull-down*

Die *in vitro* Analyse der Interaktion von SAUL1 mit BON1 und BAP1 sollte mithilfe eines sogenannten *Pull-down* Experiments erfolgen. Hierbei wurde das Fusionsprotein 6xHis-SAUL1 zusammen mit einem GST-getaggten Protein auf eine Glutathion Matrix gegeben. Bei einer bestehenden Interaktion sollte der Proteinkomplex mithilfe der Matrix präzipitiert werden. Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben (Abschnitt 2.12.6). Nach der Elution der Proteine wurde die entsprechende Elutionsfraktion gelelektrophoretisch aufgetrennt und in einem Western Blot mithilfe von spezifischen anti-His und anti-GST-Antikörpern nachgewiesen. Für 6xHisSAUL1 sowie GST-BON1 wurde jeweils eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 89 kDa erwartet, für GST-BAP1 48 kDa und für GST 26 kDa. Das Protein GST-BAP1 wurde als Negativkontrolle hinzugezogen, da es nicht mit SAUL1 interagiert.

In Abbildung 3.22 ist das Ergebnis eines *Pull-down* Experiments exemplarisch dargestellt. Es fällt auf, dass in den Reaktionsansätzen mit 6xHis-SAUL1 und GST-BON1 bzw. GST-BAP1 keine entsprechenden Proteinbanden für die GST-fusionierten Proteine nachgewiesen werden konnten. Eine Anreicherung durch die Glutathion-Matrix scheint nicht erfolgt zu sein. Im Gegensatz dazu, konnte eine Bande von 89 kDa für 6xHis-SAUL1 beobachtet werden. Somit konnte keine Interaktion zwischen SAUL1 und BON1 *in vitro* gezeigt werden. Um eine Interaktion der Matrix mit 6xHis-SAUL1 ausschließen zu können, wurde das Protein ohne weiteren Interaktionspartner auf die Glutathion-Matrix gegeben. Die SAUL1-Proteinbande konnte jedoch nachgewiesen werden, was auf eine Bindung des Proteins an die Matrix deutet (Abb. 3.22). Möglicherweise verhindert diese Interaktion die Bindung der GST-fusionierten Proteine an die Matrix. Bei einer Inkubation von 6xHis-SAUL1 mit GST konnten sowohl die erwartete GST-Bande von 26 kDa, als auch die 6xHis-SAUL1 Bande detektiert werden, wobei die GST-Bande weitaus schwächer erschien (Abb. 3.22). Die für den jeweiligen Antikörper verwendeten Positivkontrollen ergaben entweder eine Bande von 45 kDa (anti-His) oder 26 kDa (anti-GST). Basierend auf den Ergebnissen der anderen Reaktionsansätze kann jedoch keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, ob

Ergebnisse

SAUL1 mit dem GST-Tag interagiert und es so zur Anreicherung der beiden Proteine kommt. Der *Pull-down* wurde unter modifizierten Bedingungen wiederholt. Die Proteine wurden zunächst ohne Matrix für eine Stunde rotierend bei 4°C inkubiert, ehe die Matrix hinzugefügt und die Reaktion für eine weitere Stunde inkubiert wurde. Eine Interaktion von 6xHis-SAUL1 mit der Glutathion-Matrix sollte somit vermieden und die Bindung der GST-getaggten Proteine ermöglicht werden. Erneut wurde eine Interaktion der Matrix mit 6xHis-SAUL1 beobachtet. Eine Anreicherung der GST-fusionierten Proteine konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

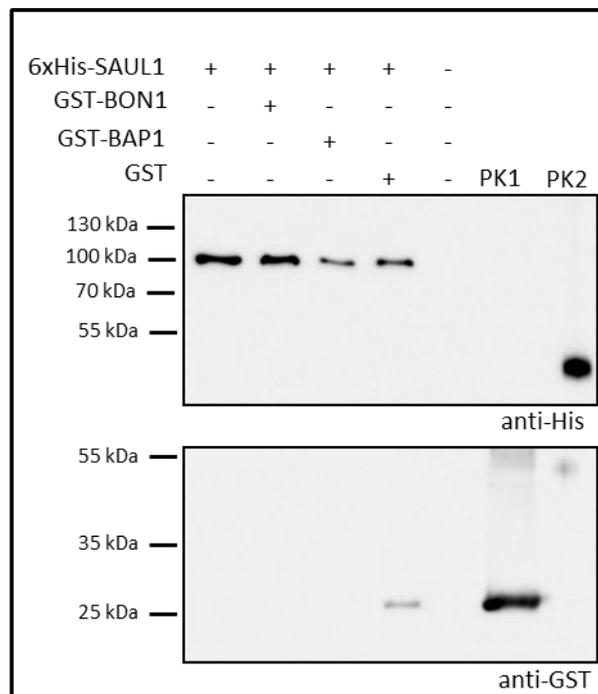


Abbildung 3.22: Western Blot des *Pull-down* Experiments zur Analyse der Interaktion von 6xHis-SAUL1 mit GST-BON1 und GST-BAP1. Der *Pull-down* wurde mithilfe einer Glutathion *HiCap* Matrix (Qiagen) durchgeführt. Mit Ausnahme des GST-Tags (26 kDa), konnten die beiden Proteine GST-BON1 und GST-BAP1 nicht mithilfe der Matrix angereichert werden. Im Gegensatz dazu wurde 6xHis-SAUL1 (89 kDa) in sämtlichen Reaktionsansätzen nachgewiesen. Die Interaktion der GST-fusionierten Proteine mit SAUL1 konnte nicht festgestellt werden. PK = Positivkontrolle (PK1 = freies GST, PK2 = *Posi-Tag Epitope Tag Control Protein*)

Die *in planta* nachgewiesene Interaktion von SAUL1 mit BON1 konnte mithilfe eines *Pull-down* Experiments nicht nachgewiesen werden.

3.4. Analyse der Topologie von SAUL1 in *Arabidopsis thaliana*

Im Rahmen dieser Arbeit sollte unter Anwendung der direkten stochastischen optischen Rekonstruktionsmikroskopie die Anordnung der SAUL1-Moleküle an der pflanzlichen Plasmamembran analysiert werden. Des Weiteren sollte herausgefunden werden, auf welche Art und Weise SAUL1 als Plasmamembran-lokalisiertes Protein mit der Membran assoziiert ist.

3.4.1. Direkte stochastische optische Rekonstruktionsmikroskopie

Im Rahmen der Dissertation von Tanja Kotur (2016) konnte mithilfe der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC) gezeigt werden, dass zwischen SAUL1-Molekülen eine Interaktion besteht. Diese Interaktion wurde ebenfalls bei *Dynamic Light Scattering* (DLS) Messungen beobachtet, bei denen eine konzentrationsabhängige Oligomerisierung von rekombinanten SAUL1-Proteinen detektiert werden konnte (El Kilani, 2016). Mit steigender Proteinkonzentration konnte ein Anstieg des Molekulargewichts der gemessenen SAUL1-Moleküle festgestellt werden. Die verschiedenen Multimere (Di-, Tri-, Tetramer) wurden anhand einer nativen Polyacrylamidgelelektrophorese bestätigt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass SAUL1 in Abhängigkeit der Proteinkonzentration zu einer Bildung von Oligomeren tendiert (El Kilani, 2016). Dieser Effekt konnte ebenfalls anhand von *Small-angle X-ray scattering* (SAXS)-Messungen gezeigt werden. Sowohl Dimere als auch Trimere wurden in Abhängigkeit der vorliegenden Proteinmenge nachgewiesen (El Kilani, 2016). Der Nachweis der SAUL1-Oligomere könnte andeuten, dass die E3 Ligase *in vivo* in keinem stabilen Zustand, z. B. als Monomer bzw. als definierter Komplex mit einer festen Anzahl an Molekülen vorliegt, sondern höher geordnete flexible Strukturen in Abhängigkeit der Proteinkonzentration bildet.

Da die Tendenz von SAUL1 zur Bildung von Multimeren bislang in *in vitro* Systemen, nicht jedoch *in planta* untersucht wurde, sollte im Rahmen dieser Arbeit mithilfe der direkten stochastischen optischen Rekonstruktionsmikroskopie (dSTORM) die Topologie der E3-Ligase an der Plasmamembran im pflanzlichen System analysiert werden. Zur Anwendung der dSTORM-Methode wird das zu untersuchende Protein mit einem Fluorophor (z. B. GFP) fusioniert. In einem ersten Schritt werden alle Fluorophore durch Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge in den nichtfluoreszierenden „Off“-Zustand gebracht. In einem zweiten Schritt, der entweder spontan oder durch Anregung mit einem zweiten Laser

erfolgt, wird ein geringer Anteil der Fluorophore reaktiviert und so in den „On“-Zustand überführt (van de Linde *et al.*, 2011). Durch das Wiederholen dieser „Photoaktivierung“ können viele Bilderserien hintereinander von den räumlich isolierten Fluorophoren aufgenommen werden, die anschließend zu einem super-auflösenden Bild zusammengesetzt werden. Eine exaktere Bestimmung der Position der markierten Proteine wird somit ermöglicht (van de Linde *et al.*, 2011).

Für das dSTORM-Experiment wurden *saul1-1* Mutanten verwendet, die stabil mit einem *35S::SAUL1-GFP* Konstrukt transformiert worden waren (Drechsel *et al.*, 2011, im Folgenden *sau1-1/35S::SAUL1-GFP* genannt). Die Durchführung der mikroskopischen Arbeiten erfolgte unter der Anleitung von Dr. Dennis Eggert (Heinrich-Pette-Institut - Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie, Hamburg). Das Ergebnis der Mikroskopie ist in Abbildung 3.23 dargestellt.

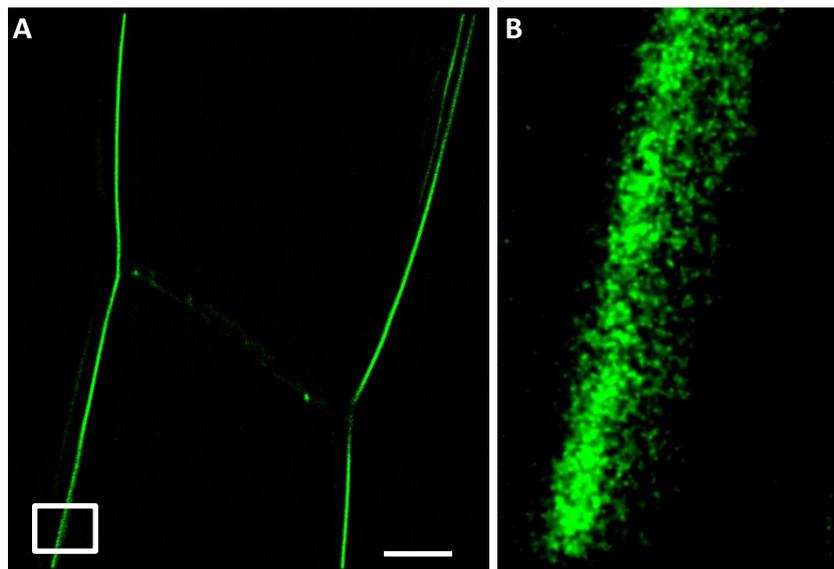


Abb. 3.23: dSTORM-Aufnahmen von SAUL1-GFP in *saul1-1* Mutanten. **A:** Übersichtsbild der GFP-Fluoreszenz von SAUL1-GFP. Die GFP-Signale wurden entlang der Plasmamembran detektiert. **B:** Aufnahme des vergrößerten Bereiches (Kasten in A). Eine deutliche Akkumulation der Fusionsproteine entlang der Plasmamembran ist anhand der Fluoreszenz erkennbar. Einzelne Fusionsproteine können nicht eindeutig festgestellt werden. Maßstab = 5 µm

Die SAUL1-GFP Fusionsproteine wurden anhand ihres Fluoreszenzsignals entlang der Plasmamembran nachgewiesen (Abb. 3.23.A). Eine Vergrößerung der super-auflösenden Aufnahmen zeigte eine deutliche und durchgängige Anhäufung der Fusionsproteine an der Membran. Einzelne Fluoreszenzsignale konnten aufgrund der starken Akkumulation der Fluoreszenzmoleküle nicht eindeutig festgestellt werden (Abb. 3.23.B).

Die Datensätze der dSTORM-Analysen wurden in einem nächsten Schritt verwendet, um die Topologie der SAUL1-GFP-Moleküle zu untersuchen. Die dafür benötigte Auswertung wurde von Dr. Christian Voigt (Abteilung für Molekulare Phytopathologie, Universität Hamburg) durchgeführt. Untereinheiten, die aus der hochauflösenden Aufnahme herausgeschnitten wurden, wurden mithilfe einer *Convolution* Matrix bearbeitet, um eventuelle Muster zu erkennen. Anschließend wurden die einzelnen Bilder einer Rotationsanalyse um 60, 90, 120 bzw. 180 Grad unterzogen. Die jeweils entstandenen Einzelbilder wurden anschließend mithilfe einer Z-Projektion zu einem Bild kombiniert (persönliche Mitteilung, Dr. Christian Voigt, Abteilung für Molekulare Phytopathologie, Universität Hamburg). Anhand der beschriebenen Rotationsanalyse können eventuell vorhandene distinkte Muster, die auf einer bestimmten Proteinanordnung bzw. Komplexbildung basieren, sichtbar gemacht werden. In Abbildung 3.24 ist das Ergebnis der Rotationsanalyse dargestellt. Betrachtet wurden hierbei die sich innerhalb der schwarzen kreisförmigen Struktur befindenden Muster, um eventuelle Hinweise auf die Anordnung von SAUL1-GFP zu erhalten.

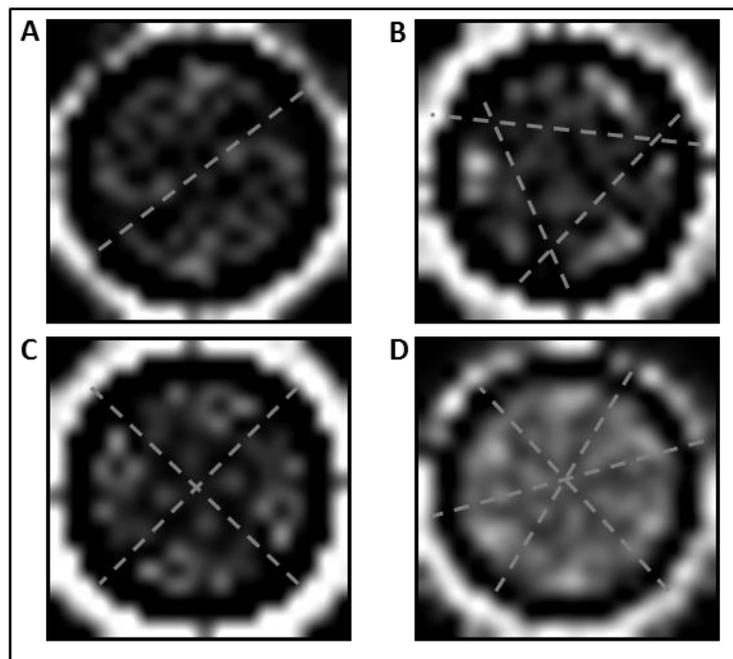


Abb. 3.24: Ergebnis der Rotationsanalyse unter Verwendung der dSTORM-Aufnahmen von SAUL1-GFP in *saul1-1* Mutanten. **A:** Analyse mit einem Rotationswinkel von 180 Grad. Das erkennbare Muster ähnelt einer dimeren Struktur. **B:** Analyse mit einem Rotationswinkel von 120 Grad. Die Rotation ergab eine Struktur, die auf eine trimere Anordnung von SAUL1-GFP deutet. **C:** Analyse mit einem Rotationswinkel von 90 Grad. Das entstandene Rotationsmuster ist vergleichbar mit einem Tetramer. **D:** Analyse mit einem Rotationswinkel von 60 Grad. Bei dieser Rotation wurde ein Muster ermittelt, das einer hexameren Anordnung der SAUL1-GFP Proteine ähnelt. Die in grau dargestellten gestrichelten Linien dienen der Verdeutlichung der erkennbaren multimeren Strukturen.

Wie in Abbildung 3.24 dargestellt, wurden in Abhängigkeit des Rotationswinkels verschiedene Muster für die Anordnung der SAUL1-GFP Fusionsproteine ermittelt. Bei einem Winkel von 180 Grad konnte ein Muster detektiert werden, das den Anschein einer dimeren Struktur hat (Abb. 3.24.A). Ein Rotationswinkel von 120 Grad ergab eine Trimer-ähnliche Topologie der Moleküle (Abb. 3.24.B). Bei einem Winkel von 90 Grad erschien ein Muster, das auf einen trimeren Zustand der Moleküle deutet (Abb. 3.24.C). Im Gegensatz dazu wurde bei einem Winkel von 60 Grad eine Hexamer-ähnliche Struktur festgestellt (Abb. 3.24.D). Insgesamt wurde bei der Rotationsanalyse für SAUL1-GFP kein distinktes Muster nachgewiesen. Mit abnehmendem Winkel wurden Strukturen ermittelt, die auf eine Oligomerisierung der Moleküle deuten. Anhand dieser Ergebnisse kann keine eindeutige Aussage über die Topologie von SAUL1 an der Plasmamembran gemacht werden, jedoch scheint das Protein in keinem stabilen Zustand bzw. distinkter Struktur *in planta* vorzuliegen.

3.4.2. Analyse der Assoziation von SAUL1 an die Plasmamembran

Lokalisierungsstudien haben gezeigt, dass SAUL1 an der Plasmamembran in *A. thaliana* lokalisiert ist (Drechsel *et al.*, 2011). Entscheidend sind dabei die C-terminalen *Armadillo* (ARM)-*Repeats* der E3 Ligase, die offensichtlich an der Assoziation des Proteins an die Plasmamembran beteiligt sind. Inwiefern die *ARM-Repeats* jedoch mit der Membran interagieren, konnte bislang noch nicht entschlüsselt werden. Bei Proteinen, die an einer Membran lokalisiert sind, wird zwischen sogenannten integralen und peripheren Proteinen unterschieden (Kim *et al.*, 2015). Integrale Proteine sind aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen fest in der Membranlipiddoppelschicht eingeschlossen und verfügen über sogenannte Transmembrandomänen, die aus α -Helix-Ketten oder β -Faltblattstrukturen aufgebaut sind (Lodish *et al.*, 2000). Periphere Proteine können auf unterschiedliche Art und Weise mit der Membran verbunden sein. Zum einen können Lipidmodifikationen, z. B. Myristoylierungen oder Prenylierungen am C- oder N-Terminus des Proteins zu einer Membranassoziation führen. Zum anderen können periphere Proteine über amphipathische α -Helix-Ketten mit Membranlipiden verbunden sein. Viele periphere Proteine sind über elektrostatische bzw. hydrophobe Wechselwirkungen oder über Wasserstoffbrückenbindungen mit integralen Membranproteinen verknüpft (Alberts *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2015).

In silico Analysen haben ergeben, dass in der Aminosäuresequenz von SAUL1 weder Lipidmodifikationsmotive noch Transmembran-Helices vorliegen (Drechsel, 2011; Drechsel *et al.*, 2011). Infolgedessen sollte im Rahmen dieser Arbeit *in planta* analysiert werden, ob es sich bei SAUL1 um ein peripheres oder integrales Membranprotein handelt. Hierfür wurden die in Abschnitt 3.4.1 beschriebenen *saul1-1/35S::SAUL1-GFP*-Pflanzen verwendet (Drechsel *et al.*, 2011). Unter nativen Bedingungen wurde zunächst die Gesamtmembranfraktion aus den Pflanzen isoliert. Diese Fraktion wurde anschließend entweder mit Natriumhydroxid (NaOH), Natriumcarbonat (Na₂CO₃) Natriumchlorid (NaCl), (Natriumbromid (NaBr) oder Natriumthiocyanat (NaSCN)) behandelt. Nach einer weiteren Fraktionierung der Proben mittels Ultrazentrifugation wurden sowohl die Überstände als auch die Pellets gelelektrophoretisch aufgetrennt. In einem Western Blot mit spezifischen anti-GFP Antikörpern sollte der Nachweis des Fusionsproteins SAUL1-GFP mit einem Molekulargewicht von 115 kDa in den verschiedenen Fraktionen erfolgen. Die Zugabe der verschiedenen Chemikalien kann, wie in Karnauchov *et al.* (1997) anhand von Thylakoidmembranständigen Proteinen gezeigt, je nach Art der Membranassoziation, zu einer Ablösung der Proteine von der Membran führen. Schwach-assoziierte periphere Proteine, die über elektrostatische Wechselwirkungen mit integralen Membranproteinen oder Membranlipiden an die Membran gebunden sind, können durch eine hohe Salzkonzentration (z. B. NaCl) abgelöst werden (Okamoto *et al.*, 2001; Rolland *et al.*, 2006). Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen peripheren Proteinen mit integralen Proteinen oder mit Lipiden der Membranlipiddoppelschicht können durch einen hohen pH-Wert durch Zugabe von NaOH oder Na₂CO₃ unterbrochen werden. Integrale Membranproteine bzw. Proteine, die über einen Lipid-Anker verfügen, bleiben hierbei jedoch membranständig (Kim *et al.*, 2015; Rolland *et al.*, 2006). Chaotrope Salze (z. B. NaBr, NaSCN) können ebenfalls die hydrophoben Wechselwirkungen bei Protein-Protein bzw. Protein-Lipid-Interaktionen unterbrechen und so das Ablösen peripher-membrangebundener Proteine herbeiführen (Ahmed, 2005; McCue, 2009).

Das Ergebnis der Behandlung der Gesamtmembranfraktion mit den verschiedenen Chemikalien ist in Abbildung 3.25 dargestellt. Durch eine Zugabe von NaCl konnte SAUL1-GFP, erkennbar an der in der Pelletfraktion detektierten Proteinbande von 115 kDa, nicht von der Membran gelöst werden. Die Behandlung mit 2 molarem NaSCN führte zu einem ähnlichen Ergebnis, jedoch konnte im Überstand ebenfalls eine schwache Bande detektiert

Ergebnisse

werden (Abb. 3.25). Nach der Zugabe von NaBr zu der Gesamtmembranfraktion konnte sowohl in der Überstandsfraction als auch im Pellet eine Bande, die unterhalb des erwarteten Molekulargewichts lag, festgestellt werden. Möglicherweise handelt es sich um ein Abbauprodukt von SAUL1-GFP. Des Weiteren wurde eine schwache Bande von SAUL1-GFP in der Pelletfraktion nachgewiesen. Durch die Behandlung mit Na₂CO₃ sowie NaOH wurde das Fusionsprotein von der Membran gelöst. In dem jeweiligen Überstand konnte eine deutliche Bande detektiert werden. Ein vollständiges Ablösen konnte jedoch nicht beobachtet werden, da in den Pelletfraktionen ebenfalls eine, wenn auch weitaus schwächere Proteinbande ermittelt werden konnte. Zusätzliche Banden unterhalb von SAUL1-GFP sind vermutlich auf Abbauprodukte zurückzuführen. Ohne Zusatz der verschiedenen Salze konnte SAUL1 nicht von der Membran abgelöst werden und verblieb in der Pelletfraktion (Daten nicht gezeigt).

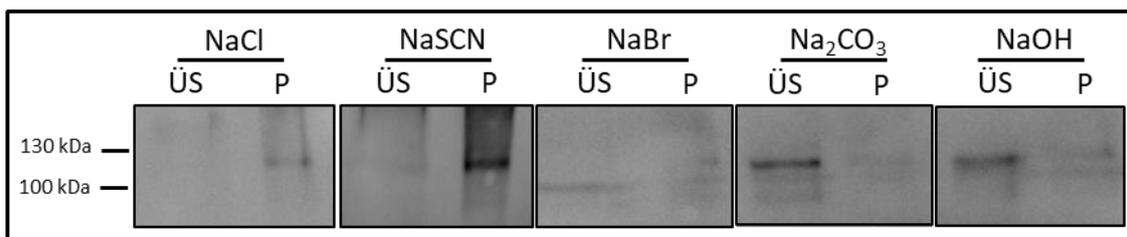


Abb. 3.25: Western Blot der Analyse der Assoziation von SAUL1-GFP an die Plasmamembran. Die Gesamtmembranfraktion von *saul1-1/35S::SAUL1-GFP*-Pflanzen wurde mit NaCl, NaSCN, NaBr, Na₂CO₃ oder NaOH behandelt. SAUL1-GFP konnte in der Pelletfraktion nach der Zugabe von NaCl, NaSCN und NaBr detektiert werden. Nach der Behandlung mit Na₂CO₃ sowie NaOH wurde das Fusionsprotein vorwiegend im Überstand nachgewiesen. Zusätzliche Banden unterhalb der erwarteten Proteinbande von 115 kDa sind möglicherweise auf Abbauprodukte zurückzuführen. (P = Pelletfraktion, ÜS = Überstandsfraction)

Zusammengefasst konnte ein Ablösen des Fusionsproteins SAUL1-GFP von der Plasmamembran durch eine alkalische Behandlung mit Na₂CO₃ und NaOH festgestellt werden. Es scheint, als ob SAUL1 durch nicht-kovalente bzw. hydrophobe Wechselwirkungen als peripheres Membranprotein entweder mit einem integralen Protein oder mit Lipiden der Plasmamembran verbunden ist. Es konnte jedoch nur ein sehr schwacher Einfluss von hohen Salzkonzentrationen auf die Verknüpfung von SAUL1 mit der Plasmamembran festgestellt werden.

4. Diskussion

4.1. Funktion von pflanzlichen PUB-ARM Proteinen bei der pflanzlichen Autoimmunität

Um sich gegenüber Pathogenen zur Wehr setzen zu können, verfügen Pflanzen über ein mehrstufiges, eng kontrolliertes Immunsystem. Die Aktivierung des pflanzlichen Immunsystems in Abwesenheit von Krankheitserregern wird als Autoimmunität bezeichnet. Charakteristische Eigenschaften dieses Prozesses *in planta* sind ein reduziertes Pflanzenwachstum (Zwergwuchs), eine konstitutive Expression von *PATHOGENESIS-RELATED (PR)*-Genen, ein erhöhter Salicylsäuregehalt sowie eine erhöhte Resistenz gegenüber Pathogenen (Cheng *et al.*, 2011; van Wersch *et al.*, 2016). Diese Merkmale wurden bei niedrigen Temperaturen in *saul1-1* Mutanten festgestellt (Vogelmann *et al.*, 2012, Disch *et al.*, 2016). Der *saul1-1* Autoimmunitätsphänotyp resultiert dabei aus der Aktivierung der *ETI (Effector-Triggered Immunity)* durch den Immunrezeptor SOC3 (SUPPRESSOR of *chs1-2, 3*) (Tong *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion von SAUL1 sowie seiner paralogen Proteine PUB43 und PUB42 im Zusammenhang mit der Genexpression bei der Autoimmunität in *A. thaliana* untersucht. Hierbei wurden Überexpressionslinien von *SAUL1* und *PUB43* sowie T-DNA Insertionslinien von *PUB42* sowohl phänotypisch als auch hinsichtlich der Expression von Genen, die im Zusammenhang mit der pflanzlichen Immunabwehr stehen, analysiert.

4.1.1. Überexpression von *SAUL1* und *PUB43* führt zu autoimmunitätsähnlichem Phänotyp

Zur Analyse von *SAUL1* und *PUB43* wurden die beiden Überexpressionslinien *YFP-SAUL1* und *GFP-PUB43-1* verwendet. Bei der Anzucht der Pflanzen konnte festgestellt werden, dass die Überexpression der Fusionsproteine zu deutlichen morphologischen Veränderungen führte, beobachtet wurden Zwergwuchs und das Ausbilden von deformierten Blättern (Abb. 3.1). Es wurde vermutet, dass es sich hierbei, ähnlich wie bei den *saul1-1* Mutanten, um einen Autoimmunitätsphänotyp handelt. Im Gegensatz zu den *saul1-1* Mutanten, zeigten die Überexpressionslinien die phänotypischen Veränderungen jedoch nicht nur bei niedrigen Temperaturen. Bei den Pflanzen, die diese Veränderungen zeigten, wurde die Expression des jeweiligen Fusionsproteins zunächst mithilfe einer subzellulären Lokalisation (Abb. 3.2.A und 3.2.B) nachgewiesen. Teilweise konnte bei den *YFP-SAUL1*-Überexpressionsmutanten keine

Fluoreszenz beobachtet werden. Möglicherweise kam es in diesen Pflanzen infolge der Überexpression zu einer Missfaltung des Fusionsproteins, sodass kein funktionales YFP-Fluorophor nachgewiesen werden konnte. Durch einen Nachweis der Proteine GFP-PUB43 und YFP-SAUL1 mittels Western Blot (Abb. 3.2.B und 3.2.D) konnte jedoch gezeigt werden, dass die morphologischen Veränderungen ausschließlich bei Pflanzen mit einer nachweisbaren Expression des jeweiligen Fusionsproteins auftraten. Neben den morphologisch deformierten Pflanzen wurden bei beiden Überexpressionslinien auch Pflanzen beobachtet, die sich äußerlich nicht vom Wildtyp unterschieden. Dass es sich hierbei um Wildtyppflanzen handelt, die infolge der Segregation der jeweiligen Linie auftraten, konnte bei einigen Pflanzen durch einen Nachweis des *GFP-PUB43* Konstrukts mithilfe einer Genotypisierung widerlegt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wird ein Zusammenhang zwischen der Expressionsstärke des jeweiligen Fusionsproteins und den phänotypischen Veränderungen angenommen. Ein vergleichbarer Effekt wird bei den *YFP-SAUL1*-Pflanzen vermutet, jedoch steht eine Genotypisierung der phänotypisch unveränderten Pflanzen noch aus. Das Expressionslevel eines Transgens kann durch mehrere Faktoren beeinflusst werden. Der Ort der T-DNA Insertion in das pflanzliche Genom spielt eine wichtige Rolle. Der sogenannte „Positionseffekt“ bewirkt, dass ein T-DNA Konstrukt, das in eine transkriptionsschwache Region integriert wurde, nur schwach exprimiert wird (Hobbs *et al.*, 1990). Des Weiteren kann die Anzahl der Kopien des integrierten T-DNA Konstrukts die Genexpression beeinflussen. In Schubert *et al.* (2004) wurde gezeigt, dass beim Vorhandensein von mehr als vier Kopien des GFP-Gens *Gene Silencing* erfolgen und die Genexpression deutlich reduziert werden kann. Eine Analyse der Anzahl der integrierten T-DNA Kopien und der Integrationsorte in den Überexpressionslinien sowie eine Quantifizierung der Genexpression könnte die Annahme, dass die phänotypischen Veränderungen der Pflanzen mit der Expressionsstärke des T-DNA Konstrukts korrelieren, untermauern. Um herauszufinden, ob die morphologischen Veränderungen der Überexpressionslinien infolge einer aktivierten Immunantwort der Pflanzen entstehen, wurde die Expression von Immunabwehr-spezifischen Genen mittels quantitativer Reverser Transkriptase-PCR (RT-qPCR) analysiert.

4.1.2. SAUL1 und PUB43 haben einen Einfluss auf die Expression der Gene *PR1* und *PR2*

Die Analyse der Genexpression der beiden Überexpressionsmutanten *YFP-SAUL1* und *GFP-PUB43-1* ergab, dass die Transkriptmenge der beiden *PR*-Gene 1 und 2 im Vergleich zu Wildtyppflanzen signifikant erhöht war (Abb. 3.3 und 3.4). Interessanterweise war die Höhe des Expressionslevels nicht generell abhängig von der Umgebungstemperatur. Ein Einfluss dieses Parameters kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden, da die *GFP-PUB43-1*-Pflanzen einen zusätzlichen signifikanten Anstieg des *PR1*-Transkriptlevels zeigten, sobald die Umgebungstemperatur von 25°C auf 20°C herabgesetzt wurde (Abb. 3.3). Ein ähnlicher Effekt wurde bei den *YFP-SAUL1*-Pflanzen bezüglich der *PR2*-Expression beobachtet (Abb. 3.4). Eine Ursache für den Anstieg der Expression des jeweils anderen *PR*-Gens in den Mutanten konnte bislang nicht gefunden werden. Die *PR*-Genexpressionsanalyse wird nicht nur zur Untersuchung der pflanzlichen Immunabwehr verwendet. Sie findet ebenfalls Anwendung in der Analyse des Einflusses von abiotischen Stressfaktoren, z. B. Trocken- und Salzstress (Seo *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2013). Die *PR*-Gene sind demzufolge sehr anfällig für Veränderungen von bestimmten Parametern und könnten somit sehr variabel bezüglich des Expressionslevels sein. Der Anstieg der *PR*-Genexpression könnte trotz allem jedoch auf eine Autoimmunitätsreaktion, ausgelöst durch die Überexpression der beiden Fusionsproteine in den *YFP-SAUL1* und *GFP-PUB43-1* Linien hindeuten. Dies würde bedeuten, dass sowohl SAUL1 als auch PUB43 einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Genexpression bei der pflanzlichen Autoimmunantwort haben. Eine Analyse der Expression weiterer Markergene, die im Zusammenhang mit der Immunabwehr stehen, (z.B. *ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 (EDS1)*, *PHYTOALEXIN DEFICIENT4 (PAD4)*), könnte diese Annahme zusätzlich untermauern.

Laut Tong *et al.* (2017) soll SAUL1 als positiver Regulator der PTI, der bei einem Pathogenbefall die spezifische Ubiquitinierung und den daraus resultierenden proteolytischen Abbau eines PTI-Inhibitors katalysiert, fungieren. Infolgedessen wird die PTI ausgelöst. *SAUL1*-überexprimierende Pflanzen zeigten eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Oomyzeten *H. arabidopsidis* Noco2 sowie avirulenten *P. syringae* Stämmen. Der in dieser Arbeit nachgewiesene Anstieg der Expression der Gene *PR1* und *PR2* sowie die damit einhergehenden phänotypischen Veränderungen der Überexpressionsmutanten untermauern die Funktion von SAUL1 als positiver Regulator der Immunantwort. Der

Autoimmunitätsphänotyp der *saul1-1* Mutanten basiert auf einer Aktivierung des TIR-NB-LRR-Immunrezeptors SUSA1 (Suppressor of *saul1-1*), auch SOC3 (Suppressor of *chs1-2, 3*) genannt (Zhang *et al.*, 2017; Tong *et al.*, 2017). Die Mutation des SOC3-Gens führte in *saul1-1 soc3* Doppelmutanten, jedoch auch in SAUL1-überexprimierenden Pflanzen zu einer Aufhebung des Autoimmunitätsphänotyps. Eine direkte Interaktion von SAUL1 und SOC3 *in planta* konnte nicht nachgewiesen werden. Sowohl SAUL1 als auch SOC3 interagieren jedoch mit dem R-Protein CHS1 (CHILLING SENSITIVE 1), sodass eine Komplexbildung der Proteine vermutet wird (Kotur, 2016; Tong *et al.*, 2017). Es gibt Hinweise, die auf einen funktionalen Zusammenhang von SAUL1 und CHS1 bei der pflanzlichen Immunantwort deuten könnten. So zeigen *chs1*-Mutanten bei niedrigen Temperaturen ähnliche phänotypische Veränderungen wie die *saul1-1* Mutante (Wang *et al.*, 2013; Zbierzak *et al.*, 2013). Darüberhinaus konnte infolge einer CHS1-Überexpressionsmutanten bei einer Infektion mit *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 eine Reduktion der systemischen Läsionen der infizierten Pflanzen festgestellt werden (Zbierzak *et al.*, 2013). In dem in Tong *et al.* (2017) beschriebenen Modell wird die SAUL1-Homöostase durch den Immunrezeptor SOC3 bewacht, um eine vorzeitige Induktion der ETI zu verhindern. Werden bei einem Pathogenbefall Effektoren in die pflanzlichen Zellen sekretiert, erfolgt eine Inaktivierung von SAUL1. Der PTI-Inhibitor wird nicht mehr abgebaut und unterdrückt so die PTI. Die Inaktivierung der E3 Ubiquitinligase führt jedoch zu einer konstitutiven Aktivierung des Immunrezeptors SOC3, sodass die ETI ausgelöst werden kann. In *saul1-1* Mutanten liegt SOC3 aufgrund der fehlenden SAUL1-Moleküle ebenfalls konstitutiv aktiviert vor, sodass ETI induziert wird. Der charakteristische Autoimmunitätsphänotyp entsteht (Tong *et al.*, 2017).

Da die *GFP-PUB43-1*-Überexpressionspflanzen ähnliche phänotypische Veränderungen wie die *YFP-SAUL1*-Pflanzen zeigten und auch die Analyse der Genexpression ein vergleichbares Ergebnis lieferte, wird für PUB43 ebenfalls eine regulatorische Funktion bei der pflanzlichen Immunabwehr vermutet. Darüberhinaus korrelieren diese Ergebnisse mit der in Tong *et al.* (2017) beschriebenen funktionalen Redundanz von SAUL1 und PUB43, die infolge der erhöhten Resistenz der *saul1-1 soc3 pub43-1* Dreifachmutante im Vergleich zu den Doppelmutanten *saul1-1 soc3* und *pub43 soc3* gegenüber *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 hrcC vermutet wurde. Möglicherweise führt die Überexpression von *PUB43* ebenfalls zu einem verstärkten Substratabbau eines PTI-Inhibitors und somit zur Induktion der PTI. Da jedoch bei *pub43-knock-out* Mutanten, die bei niedriger Temperatur angezogen wurden,

keine phänotypischen Veränderungen beobachtet wurden (Salt *et al.*, 2011), wird angenommen, dass die Funktion von PUB43 durch SAUL1 kompensiert und so die Entwicklung der Pflanze aufrechterhalten wird. Ein direkter Zusammenhang zwischen PUB43 und dem pflanzlichen Wachstum konnte nicht festgestellt werden.

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen von SAUL1 und PUB43 ergibt eine hohe Sequenzidentität von 77 % (siehe Anhang 7) und deutet somit auf eine Funktionsredundanz hin. Es scheint jedoch, dass PUB43 trotz der hohen Sequenzübereinstimmung nicht in der Lage ist, die Funktion von SAUL1 zu übernehmen, da die stabile Transformation von *saul1-1*-Mutanten mit einem *2x35S::PUB43* Konstrukt nicht zu einer Aufhebung des Phänotyps führte (Tong *et al.*, 2017). Möglicherweise besteht aufgrund von strukturellen Unterschieden zu SAUL1 keine Komplexbildung von PUB43 mit SOC3 und CHS1 *in planta*, sodass die PUB43-Homöostase nicht von SOC3 bewacht werden kann, um das Auslösen einer vorzeitigen ETI zu verhindern.

Um die Funktion von PUB43 bei der pflanzlichen Immunabwehr genauer charakterisieren zu können, sollten Infektionsstudien mit den *GFP-PUB43-1*-Pflanzen durchgeführt werden, da eine erhöhte Resistenz dieser Mutanten die Beteiligung von PUB43 an der pflanzlichen Immunantwort zusätzlich belegen würde. Des Weiteren sollten Interaktionsstudien mit SOC3 und CHS1 erfolgen, um eine Wechselwirkung von PUB43 mit den beiden Proteinen zu untersuchen und ggf. auszuschließen. Die Identifikation von Interaktionspartnern bzw. Substraten von PUB43 könnte zusätzliche Hinweise auf die Funktion des Proteins und möglicherweise auf dessen Wirkungsweise als positiver Regulator bei der Immunantwort liefern.

4.1.3. Der *knock-out* von *PUB42* hat keinen Einfluss auf den *saul1-1*-Phänotyp

Das PUB-ARM Protein PUB42 ist analog zu SAUL1 und PUB43 ebenfalls an der Plasmamembran lokalisiert (Drechsel *et al.*, 2011). Anhand der Analyse von T-DNA Insertionsmutanten, bei denen entweder *PUB42* oder *PUB42* und *SAUL1* nicht mehr exprimiert werden, sollte eine Charakterisierung der möglichen Funktion von *PUB42* bei der pflanzlichen Autoimmunität stattfinden. Die *pub42-2* bzw. *pub42-2 saul1-1* Mutanten wurden im Rahmen eines einer Temperaturumstellung von 25°C auf 20°C untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass die *pub42-2* Pflanzen bei einer Anzucht bei 25 °C, ähnlich wie *saul1-1* Pflanzen, keine phänotypischen Unterschiede im Vergleich zu den

Wildtyppflanzen zeigten (Abb. 3.6). Wie in Disch *et al.* (2016) dargestellt, wird der für *saul1-1* Mutanten typische Autoimmunitätsphänotyp durch ein Herabsenken der Temperatur auf 20°C induziert. Dieser Effekt konnte bei den *pub42-2* Mutanten nicht beobachtet werden. Da sich diese Pflanzen phänotypisch nicht vom Wildtyp unterscheiden, wird davon ausgegangen, dass der Parameter Temperatur in dem Bereich, der für die durchgeführten Experimente gewählt wurde, keinen Einfluss auf das Wachstum bzw. die Entwicklung der Einzelmutanten hat. Im Gegensatz dazu konnte eine Gelbfärbung der Blattrosette sowie ein reduziertes Wachstum bei den *saul1-1*- und den *pub42-2 saul1-1*-Mutanten festgestellt werden (Abb. 3.6). Aufgrund der unveränderten Morphologie der *pub42-2* Pflanzen wird angenommen, dass die phänotypischen Veränderungen der Doppelmutanten durch das Ausschalten von *SAUL1* zustande kommen und somit unabhängig von der fehlenden *PUB42*-Expression entstehen. Des Weiteren konnte der typische *saul1-1* Phänotyp durch das Ausschalten des *PUB42*-Gens weder aufgehoben noch verändert werden.

Gemäß der Datenbank „eFP Browser“ (Winter *et al.*, 2007) findet in *A. thaliana* eine schwache Expression des Gens *PUB42* statt. Das höchste Expressionslevel liegt dabei in den Wurzeln vor (siehe Anhang 7.2). Möglicherweise basiert das Ergebnis der phänotypischen Analyse der *pub42-2* Mutanten darauf, dass das Ausschalten des ohnehin schwach exprimierten Gens nur sehr geringe Auswirkungen auf die pflanzliche Entwicklung hat, sodass diese Pflanzen keine sichtbaren phänotypischen Veränderungen zeigen.

In Disch *et al.* (2016) konnte gezeigt werden, dass ein Herabsenken der Luftfeuchtigkeit ebenfalls zu einer Induktion des *saul1-1* Autoimmunitätsphänotyps führt. Um herauszufinden, ob andere Parameter eine phänotypische Veränderung in den *pub42-2*- und *pub42-2 saul1-1*-Mutanten auslösen können, sollten diese Pflanzen in einem Luftfeuchte-Experiment erneut untersucht werden. Ferner könnte eine Analyse der Mutanten in einem größeren Temperaturspektrum die Annahme bestätigen, dass dieser Parameter im Vergleich zu Wildtyppflanzen in der Entwicklung der *pub42-2* Mutanten keinen entscheidenden Einfluss hat. Bei diesen aufgeführten Experimenten wird eine phänotypische Analyse der gesamten Pflanzen, im Speziellen der Wurzeln empfohlen, um eventuelle Veränderungen feststellen zu können. Möglicherweise könnten so Hinweise auf die intrazelluläre Funktion von *PUB42* gewonnen werden.

Das Ausschalten des *PUB42*-Gens in *pub42-2* Mutanten lieferte keinen Hinweis für eine Beteiligung des PUB-ARM Proteins an der pflanzlichen Immunantwort. Ein Zusammenwirken der beiden PUB-ARM Proteine SAUL1 und PUB42 konnte nicht festgestellt werden.

4.1.4. PUB42 hat keinen Einfluss auf die Genexpression von *PR1* und *PR2*

Um die Beteiligung von *PUB42* an der Regulation der Genexpression bei der Autoimmunität in *A. thaliana* auf molekularer Ebene zu charakterisieren, wurde die Expression der Markergene *PR1* und *PR2* anhand einer Temperaturumstellung von 25°C auf 20°C bei der Anzucht von *pub42-2*-, *saul1-1*- und *pub42-2 saul1-1*-Pflanzen analysiert. Bei der quantitativen Genexpressionsanalyse wurde in den *pub42-2*-Mutanten sowohl bei der *PR1*- als auch bei der *PR2*-Expressionsmenge kein signifikanter Anstieg im Vergleich zu den Wildtyppflanzen nachgewiesen (Abb. 3.7 und 3.8). Die Temperaturveränderung von 25°C auf 20°C führte zwar zu einer Verstärkung der Genexpression, jedoch wurde dieser Effekt auch bei Wildtyppflanzen festgestellt. Im Vergleich dazu wurde sowohl bei in den *saul1-1* Einzelmutanten, als auch in den *pub42-2 saul1-1* Doppelmutanten ein signifikanter bzw. hochsignifikanter Anstieg der Transkriptmenge beider Gene nach der Temperaturveränderung festgestellt (Abb. 3.7 und 3.8). Da das zusätzliche Ausschalten von *PUB42* in den Doppelmutanten jedoch nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Genexpression im Vergleich zu den *saul1-1* Pflanzen führte, wird angenommen, dass die Veränderung der Expressionsmenge unabhängig von *PUB42* erfolgt. *PUB42* scheint demzufolge keinen direkten Einfluss auf die Genexpression von *PR1* und *PR2* zu haben. Der Nachweis der geringen *PR*-Transkriptmengen in den *pub42-2* Mutanten bestätigt diese Annahme. Wie bereits in Abschnitt 4.1.3 erwähnt, wird *PUB42* in *A. thaliana* nur schwach exprimiert. Vermutlich führt so das Ausschalten des *PUB42*-Gens zu keinen deutlichen Veränderungen in der Genexpression. Die RT-qPCR-Experimente wurden mit ganzen Pflanzen, jedoch ohne Wurzel, durchgeführt. Da jedoch das höchste *PUB42*-Expressionslevel in den Wurzeln nachgewiesen wurde (Danzberger, 2010), wird empfohlen die Genexpressionsanalyse mit Wurzelmaterial der jeweiligen Mutante zu wiederholen, um eventuelle Auswirkungen auf molekularer Ebene feststellen zu können.

Gemäß der phänotypischen Analyse und der Genexpressionsanalyse konnte im Rahmen dieser Arbeit, im Gegensatz zu SAUL1 und PUB43, für PUB42 kein Hinweis für einen direkten Zusammenhang mit der pflanzlichen Immunantwort gefunden werden. Proteine einer

Proteinfamilie, die homolog zueinander sind, sind häufig an identischen zellulären Prozessen beteiligt. Ein Beispiel hierfür sind die zu einem Cluster zusammengefassten homologen Proteine PUB22, 23 und 24, die als negative Regulatoren bei der pflanzlichen Immunantwort eine Rolle spielen (Trujillo *et al.*, 2008). Die PUB-ARM Proteine PUB46 und 48 sind an der pflanzlichen Toleranz gegenüber Wasserstress beteiligt, nicht jedoch ihr Homolog PUB47 (Adler *et al.*, 2017). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der drei Proteine zeigt, dass zwischen PUB42 und SAUL1 bzw. PUB42 und PUB43 eine Sequenzidentität von 34 % bzw. 32 % besteht (siehe Anhang 7.3). Im Gegensatz dazu besteht zwischen SAUL1 und PUB43 eine hohe Sequenzidentität von 77 %. Möglicherweise stellt die geringe Sequenzhomologie ebenfalls einen Hinweis für die Nichtredundanz der Funktion der Proteine dar. Funktionelle Sequenzbereiche, die bei PUB43 und SAUL1 zu einer Beteiligung an der pflanzlichen Immunabwehr führen, scheinen bei PUB42 nicht vorhanden zu sein. Eine Analyse des *PR1*- und *PR2*-Transkriptlevels in *PUB42*-Überexpressionsmutanten könnte weitere Hinweise für eine Nichtbeteiligung des PUB-ARM-Proteins an der pflanzlichen Immunabwehr liefern. Des Weiteren wird eine Genexpressionsanalyse weiterer Gene (z. B. *EDS1*, *PAD4*), die mit der pflanzlichen Immunabwehr in Verbindung stehen, vorgeschlagen. Um Hinweise auf die Funktion von PUB42 gewinnen zu können, wird eine Gesamt-Transkriptom-*Shotgun*-Sequenzierung (*auch RNA-Seq* genannt) der *pub42-2* Mutanten vorgeschlagen. Veränderungen in der Expressionsmenge von Genen, die mithilfe dieser Methode festgestellt werden können, könnten auf zelluläre Prozesse weisen, an denen PUB42 beteiligt ist.

4.2. Interaktionspartner von SAUL1

Zur weiteren Charakterisierung der Funktion von SAUL1 *in planta* wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei unterschiedliche Strategien verfolgt, um mögliche Interaktionspartner zu finden. Zum einen wurden mithilfe der Tandemaffinitätsaufreinigung SAUL1-assoziierte Proteine aus einer pflanzlichen Zellkultur isoliert und anschließend durch eine massenspektrometrische (MS) Analyse identifiziert. Parallel dazu wurden Interaktionsstudien mit den Proteinen BON1, BAP1 und LORE, bei denen eine Interaktion mit SAUL1 aufgrund ihrer Funktion bei der pflanzlichen Immunabwehr und der Lokalisierung an der Plasmamembran vermutet wurde, durchgeführt.

4.2.1. Identifikation von Interaktionspartnern mithilfe der Tandemaffinitätsaufreinigung

Zur Isolierung von Proteinen, die mit SAUL1 interagieren, wurden zwei verschiedene Fusionskonstrukte erstellt. Neben einem *SAUL1-Tap-Tag* Fusionskonstrukt, wurde für die Tandemaffinitätsaufreinigung ein Deletionskonstrukt (*SAUL1_ΔU-Box-Tap Tag*) mit einer verkürzten *SAUL1*-Sequenz verwendet, bei der der kodierende Sequenzabschnitt für die U-Box fehlte (Abb. 3.9). Die U-Box ist für die Ligaseaktivität der E3 Enzyme essentiell, da sie als Bindungsstelle für das Ubiquitin-konjugierende Enzym E2 im Ubiquitinierungprozess dient (Callis, 2014). Die Deletion der U-Box oder die Mutation der konservierten Aminosäuren innerhalb der Domäne führt zum Verlust der Ubiquitinligaseaktivität (Hatakeyama *et al.*, 2001). Beispielsweise wird die Ligaseaktivität der E3 Ubiquitinligase SLP11 (SPOTTED LEAF11) aus *Oryza sativa* durch eine Mutation von Valin zu Arginin (Val²⁹⁰ zu Arg²⁹⁰) innerhalb der Aminosäuresequenz der U-Box aufgehoben (Zeng *et al.*, 2004). Infolge der fehlenden Ubiquitinligaseaktivität werden der Ubiquitin-Transfer und der daraus resultierende proteolytische Substratabbau verhindert. Alle mithilfe der Tandemaffinitätsaufreinigung identifizierten putativen Interaktionspartner von SAUL1 sind in der Tabelle 4.1 aufgeführt

Tabelle 4.1: Identifizierte SAUL1-Interaktionspartner mit dem *SAUL1-Tap-Tag* und dem *SAUL1_ΔU-Box-Tap Tag*-Fusionsprotein („+“ = Protein wurde in MS identifiziert, „-“ = Protein wurde nicht in MS identifiziert)

Interaktionspartner	<i>SAUL1-Tap-Tag</i>	<i>SAUL1_ΔU-Box-Tap Tag</i>
AtKRP125b	+	+
AtPRP39a	+	-
LINC1	+	-
RSA1/EMB1579	+	-
HLP1	+	-
Prohibitin3	-	+
Prohibitin1	-	+
Prohibitin2	-	+
Prohibitin6	-	+
Prohibitin4	-	+
CIP1	-	+

Interessanterweise konnte das Protein AtKRP125b sowohl mit dem *SAUL1-Tap-Tag* als auch mit *SAUL1_ΔU-Box-Tap-tag* Fusionsprotein isoliert werden. Dieses Ergebnis deutet an, dass AtKRP125b kein Substrat von SAUL1 ist, das infolge der Ubiquitinierung abgebaut wird. Die Konjugation eines Proteins mit Ubiquitin führt jedoch nicht zwangsläufig zum Abbau, sondern kann auch eine Aktivierung des Substrats oder eine Änderung der Lokalisierung des Substrats induzieren (Callis, 2014). Das globuläre Molekül Ubiquitin verfügt über sieben

verschiedene Lysinreste (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48 und Lys63), die bei einer Polyubiquitinierung mit einem weiteren Ubiquitinmolekül verbunden werden können (Chen und Sun, 2009). Das erste Ubiquitinmolekül dient hierbei als „Akzeptor“ und wird mit weiteren Molekülen zu einer Polyubiquitinkette konjugiert. Erfolgt die Konjugation über den Lys48, dient die Molekülkette als Signal zum proteasomalen Abbau des Substrats. Erfolgt die Bindung des Ubiquitins über einen anderen Lysinrest, so kann dies z. B. zu einer Translokation des Substrats oder zu dessen Aktivierung führen (Chen und Sun, 2009).

Die Proteine AtPRP39a, LINC1, RSA1 und HLP1 wurden mithilfe des SAUL1-*Tap-Tag* Proteins, nicht jedoch mit der verkürzten Proteinvariante aufgereinigt. Dieses Ergebnis lässt die Vermutung zu, dass die Interaktion der Proteine über die U-Box von SAUL1 vermittelt wird. Möglicherweise resultiert diese Wechselwirkung in einer Ubiquitinierung des jeweiligen Interaktionspartners. Ferner könnte ebenfalls vermutet werden, dass die Modifikation der Interaktionspartner nicht zu deren Abbau, sondern zu einer Aktivierung oder Translokation führt.

Die Proteine Prohibitin1, 2, 3, 4, 6 sowie CIP1 wurden mithilfe des verkürzten Fusionsproteins SAUL1_ΔU-Box-*Tap-tag* aus der pflanzlichen Zellkultur isoliert. Da diese putativen Interaktionspartner bei der SAUL1-*Tap-Tag*-Proteinaufreinigung nicht identifiziert werden konnten, wird vermutet, dass es sich hierbei um Substrate der E3 Ligase handelt, die infolge der Ubiquitinierung im 26S Proteasom in *A. thaliana* degradiert werden.

In Raab *et al.* (2009) konnte anhand eines Ubiquitinierungsassays gezeigt werden, dass SAUL1 als Ubiquitinligase fungiert. Der Reaktionsansatz enthielt neben rekombinantem SAUL1-Protein, humanes E1, das E2 Enzym UbcH5b sowie biotinyliertes Ubiquitin. Als Substrat dienten hierbei bakterielle Proteine, die im Zelllysate des rekombinanten SAUL1-Proteins vorlagen. Die Ubiquitinierung der Proteine wurde mithilfe von Biotin-spezifischen Antikörpern in einem Western Blot nachgewiesen. Durch eine Anwendung dieses Analyseverfahrens auf die in Tabelle 4.1 aufgeführten putativen Interaktionspartner von SAUL1 könnte festgestellt werden, ob diese Proteine durch die Interaktion mit der E3 Ligase ubiquitiniert werden.

4.2.1.1. Das Motor-Protein AtKRP125b als putativer Interaktionspartner

AtKRP125b wird der Gruppe der Mikrotubuli-Motor-Proteine zugeordnet, den sogenannten Kinesinen. Kinesine besitzen eine hoch-konservierte Motordomäne, mit der sie sich unter

der Hydrolyse von Adenosin-triphosphat (ATP) z. B. entlang intrazellulärer Mikrotubuli bewegen können, um u. a. ein Cargo zu transportieren (Reddy und Day, 2001; Wang *et al.*, 2015). Sie kommen in allen eukaryotischen Organismen vor und sind für den Transport von Vesikeln, Zellorganellen, Chromosomen und Proteinkomplexen innerhalb der Zelle zuständig (Reddy und Day, 2001; Lawrence *et al.*, 2004). Des Weiteren sind sie am Aufbau des Spindelapparats während der Zellteilung und an der Stabilisierung bzw. Destabilisierung der Mikrotubuli beteiligt (Saito und Kaneko, 2017, Walczak *et al.*, 1996; Jaulin und Kreitzer 2010). Basierend auf phylogenetischen Analysen werden Kinesine in 14 verschiedene Familien eingeteilt (Lawrence *et al.*, 2004). AtKRP125b wird hierbei der Familie der Kinesin-5 Proteine zugeordnet (Reddy und Day, 2001). Diese Proteine spielen bei der Mitose eine wichtige Rolle, da sie an der Trennung der Pole des Spindelapparates sowie der Bipolarität der Spindeln beteiligt sind. Über eine N-terminale Motordomäne erfolgt hierbei die Interaktion der Kinesine mit den Mikrotubuli der Spindelfasern. Aufgrund von *Coiled-Coil*-Strukturen liegen die Kinesin-5 Proteine oligomerisiert in Form von Homotetrameren vor (Abb. 4.1) (Verhey und Hammond, 2009). Die Proteine können so anti-parallele Mikrotubuli miteinander vernetzen und diese durch eine Bewegung in Richtung der Plus-Enden der Mikrotubuli auseinanderziehen (Bannigan *et al.*, 2007).

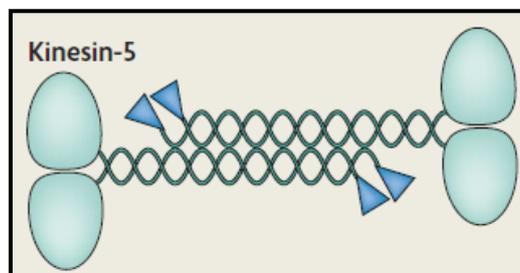


Abb. 4.1: Schematischer Aufbau eines Kinesin-5 Proteins. Kinesin-5 bildet Homotetramere durch Interaktion der *Coiled-Coil* Regionen und verfügt über N-terminale Motordomänen (grün) (Verhey und Hammond, 2009)

Die Gruppe der Kinesin-5 Proteine in *A. thaliana* besteht neben AtKRP125b aus den Motorproteinen AtKRP125a, AtKRP125c und AtF16L2.60, wobei in der Literatur lediglich für AtKRP125c experimentelle Daten zu finden sind. In Bannigan *et al.* (2007) konnte gezeigt werden, dass AtKRP125c eine entscheidende Rolle bei der Stabilisierung der Kernteilungsspindel während der pflanzlichen Zellteilung einnimmt. Bei einer Temperatur von 30°C wurde bei der AtKRP125c-Mutante *rsw7* (*radially swollen7*) neben einem Anschwellen der Wurzelspitzen, eine ausgeprägte Desorganisation der Mikrotubuli-Strukturen und infolgedessen ein Zusammenfall der mitotischen Spindel nachgewiesen.

Diese Veränderungen basieren auf einem Einzelnukleotid-Polymorphismus in dem vierten Exon der DNA-Sequenz (Wiedemeier *et al.*, 2002; Bannigan *et al.*, 2007). Die Komplementation der Mutante mit einem *AtKRP125c-GFP*-Konstrukt ergab eine Lokalisation des Proteins an den Mikrotubuli der Wurzelspitze und des Hypocotyls während der Zellteilung (Bannigan *et al.*, 2007).

In der Literatur sind bislang keine experimentellen Daten zur subzellulären Lokalisation von *AtKRP125b* erhältlich. *In silico* Untersuchungen deuten auf eine Lokalisierung des Proteins im Cytoplasma und im Zellkern hin (Strauß, 2016). Diese Vorhersagen konnten anhand der Lokalisierung von GFP-*AtKRP125b* in Mesophyllprotoplasten aus *A. thaliana* bestätigt werden. Das Fluoreszenzsignal des Fusionsproteins wurde sowohl im Zellkern, als auch in den Kernkörperchen nachgewiesen (Abb. 3.11). Zusätzlich wurden schwache GFP-Signale im Cytoplasma der Protoplasten detektiert. Es ist jedoch zu beachten, dass das zur Lokalisierung des Kinesin-5-Proteins verwendete T-DNA-Konstrukt einen *35S*-Promotor enthielt. Um eventuelle Artefakte bei der Lokalisierung infolge der Überexpression des Proteins durch den *35S*-Promotor zu vermeiden, wird eine Wiederholung der Analyse mit einem Fusionskonstrukt, das den nativen *AtKRP125b*-Promotor enthält, empfohlen. Des Weiteren sollte eine Untersuchung der Lokalisierung von *AtKRP125b* während der pflanzlichen Zellteilung erfolgen, da Kinesin-5 Proteine während dieses Vorgangs typischerweise nicht im Zellkern, sondern an den Mikrotubuli der mitotischen Spindel vorliegen (Ferez *et al.*, 2010). Basierend auf den vorliegenden Lokalisierungsergebnissen des *AtKRP125b* Proteins erschien eine *in planta* Interaktion mit dem Plasmamembran-assoziierten SAUL1 zunächst unwahrscheinlich. Mithilfe von BiFC-Experimenten sollte herausgefunden werden, ob diese Proteine trotz ihrer unterschiedlichen zellulären Lokalisierung *in planta* miteinander interagieren.

4.2.1.2. *AtKRP125b* interagiert mit SAUL1 *in planta*

Anhand der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten BiFC-Experimente konnte bestätigt werden, dass die beiden Proteine *AtKRP125b* und SAUL1 miteinander *in planta* interagieren (Abb. 3.10). Die U-Box Domäne von SAUL1 scheint für eine Wechselwirkung mit *AtKRP125b* nicht essentiell zu sein, da *AtKRP125b* auch ohne das Vorhandensein der U-Box im *Tap-Tag*-Fusionsprotein aus der Zellkultur isoliert werden konnte. Möglicherweise könnte die Interaktion zwischen den ARM-*Repeats* von SAUL1 und den *Coiled-Coil* Strukturen des

Kinesins erfolgen. Beide Strukturen bestehen aus mehreren α -Helix Ketten, von denen bekannt ist, dass sie Protein-Protein Interaktionen vermitteln (Coates, 2003; Truebestein und Leonard, 2016). Um jedoch genauere Erkenntnisse hinsichtlich der für die Interaktion der beiden Proteine essentiellen Domänen zu gewinnen, sollten zukünftig BiFC-Experimente mit Deletionskonstrukten, bei denen einzelne Sequenzabschnitte des jeweiligen Proteins fehlen, durchgeführt werden.

Obwohl es sich bei SAUL1 um ein Plasmamembran-assoziiertes Protein handelt (Drechsel *et al.*, 2011), wurde die Interaktion mit AtKRP125b sowohl im Cytoplasma, als auch im Zellkern der Mesophyllprotoplasten nachgewiesen (Abb. 3.10). Möglicherweise führt die Wechselwirkung der C-terminalen SAUL1-ARM-*Repeats* mit dem Kinesin-5-Protein zu einem Ablösen von der Plasmamembran. Dies würde bedeuten, dass die E3-Ligase nicht konstant mit der Plasmamembran verbunden ist, sondern seine intrazelluläre Position verändern kann. Es sollte jedoch beachtet werden, dass die Lokalisierung der Interaktion möglicherweise auch auf die starke Expression der beiden Proteine durch den 35S-Promotor der verwendeten *pBiFC2in1* Vektoren zurückzuführen sein könnte. Infolge der Überexpression könnte es zu einer Akkumulation der beiden Proteine im Cytoplasma und Zellkern kommen. Lokalisierungsstudien mit einem 35S::*GFP-SAUL1*-Konstrukt in *Nicotiana tabacum cv. BY-2* Zellen haben gezeigt, dass die intrazelluläre Position des Fusionsproteins sowohl durch eine Behandlung mit ausgewählten Phytohormonen (z. B. Methyljasmonat) als auch durch eine parallele Expression der cytosolischen ARK2-Kinase-Domäne beeinflusst werden konnte. GFP-SAUL1 wurde an der Plasmamembran und im perinukleären Raum detektiert, sodass eine Art Pendelbewegung von SAUL1 *in planta* vermutet wurde (Salt *et al.*, 2011). Diese Daten könnten daraufhin deuten, dass SAUL1 über eine eher instabile Wechselwirkung mit der Plasmamembran verbunden ist, die z. B. durch eine Interaktion mit einem nicht-membranständigen Protein unterbrochen werden könnte. In Drechsel *et al.* (2011) konnte ein SAUL1 Δ ARM₇₋₁₁-GFP Fusionsprotein, bei dem die C-terminalen ARM-*Repeats* fehlten, ebenfalls im Zellkern von infiltrierten Tabakblättern nachgewiesen werden. In Mesophyllprotoplasten der Pflanzenlinie *saul1-1* wurden Fluoreszenzsignale eines *pSAUL1::SAUL1-GFP*-Konstrukts überwiegend an der Plasmamembran, mitunter jedoch auch im Zellkern beobachtet (Jan Knop und Stefan Hoth, unveröffentlichte Daten, Abteilung für Molekulare Pflanzenphysiologie, Universität Hamburg). Diese Ergebnisse liefern zusätzliche Hinweise darauf, dass SAUL1 nicht konstant mit der Plasmamembran verbunden ist und sich

möglicherweise flexibel zwischen dem Zellkern und der Membran hin und her bewegt. Diese intrazelluläre Bewegung von SAUL1 könnte auch durch eine Bindung des Proteins an Vesikel erfolgen. Möglicherweise ist das Kinesin-5-Protein selbst am Transport der E3-Ligase beteiligt, sodass auf diesem Wege eine Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen entsteht. In Wakana *et al.* (2013) konnte gezeigt werden, dass sich die Funktion des in Säugetieren vorkommenden Kinesin-5-Proteins Eg5 nicht nur auf den Aufbau des bipolaren Spindelapparats während der Zellteilung beschränkt, sondern auch beim Transport von sogenannten *Carrier*-Proteinen in nicht-mitotischen Zellen eine wichtige Rolle spielt. Hierbei wird vermutet, dass die *Carrier*-Proteine auf anti-parallele Mikrotubuli des trans-Golgi-Netzwerks geladen werden, die mithilfe des Eg5 Proteins auseinandergezogen und so in die Zellperipherie transportiert werden. Es könnte vermutet werden, dass AtKRP125b, ähnlich wie Eg5, in nicht-mitotischen Zellen am intrazellulären Transport von Proteinen wie z. B. SAUL1 beteiligt ist und infolgedessen eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen entsteht. Eine Analyse der Lokalisierung von SAUL1 in sich teilenden Zellen sowie in einer *atkrp125b-knock-out*-Mutante könnte Hinweise für dieses mögliche funktionelle Zusammenspiel der beiden Proteine liefern.

Infolge der Interaktion mit SAUL1 könnte es zu einer Ubiquitinierung und somit einer Aktivierung von AtKRP125b kommen, sodass AtKRP125b in mitotischen Zellen bei dem Aufbau der Kernteilungsspindel beteiligt sein könnte. Andererseits könnte eine Ubiquitinierung des Kinesin-5-Proteins zu dessen Abbau im 26S Proteasom führen, nachdem die Zellteilung abgeschlossen ist. Der Zellzyklus wird durch viele regulatorische Prozesse, u. a. dem proteolytischen Abbau von Cyclinen und strukturellen Proteinen beeinflusst. Proteine, die über ein bestimmtes Sequenzmotiv, die sogenannte *Destruction Box* verfügen, werden ubiquitiniert und im 26S Proteasom degradiert (Vanstraelen *et al.*, 2006, Glotzer *et al.*, 1991). In der Sequenz von AtKRP125b konnten mehrere *Destruction Boxes* nachgewiesen werden, sodass ein eventueller Abbau des Proteins entweder an einem bestimmten Zeitpunkt oder nach Abschluss der Zellteilung vermutet werden kann. Mithilfe eines Ubiquitinierungsassays könnte überprüft werden, ob die Interaktion von SAUL1 und AtKRP125b infolge einer Übertragung des Ubiquitins erfolgt.

In Vanstraelen *et al.* (2006) konnte gezeigt werden, dass während der Mitose eine erhöhte Genexpression von *AtKRP125b* vorliegt. Dies könnte ein Hinweis auf die Funktion des

Kinesin-5-Proteins sein und so eine Beteiligung des Proteins an der Zellteilung andeuten. Des Weiteren wurde innerhalb der *AtKRP125b*-Sequenz eine konservierte Phosphorylierungsstelle, die sogenannte *BimC Box* gefunden. Dieser für Kinesin-5-Proteine charakteristische Sequenzbereich wird in tierischen Zellen durch Cyclin-abhängige Kinasen reversibel phosphoryliert. Auf diesem Wege erfolgt eine Regulation des Zellzyklus (Lee und Liu, 2004; Vanstraelen *et al.*, 2006). Möglicherweise fungiert *AtKRP125b* als regulatorischer Faktor bei der pflanzlichen Zellteilung, indem es, ähnlich wie *AtKRP125c* an der Stabilisierung der Mikrotubuli beteiligt ist oder es spielt eine Rolle bei der Formation der Kernteilungsspindel. Dass es sich bei *AtKRP125b* um ein Motor-Protein handelt, das sich entlang von Mikrotubuli-Strukturen bewegen kann, konnte in der Masterarbeit von Tobias Strauß (2016) bereits gezeigt werden. Um genauere Hinweise auf die Funktion von *AtKRP125b* in *A. thaliana* zu erlangen, sollte eine Charakterisierung von *knock-out* Mutanten erfolgen. Eine *knock-out* Mutantenlinie wurde bereits im Rahmen der Masterarbeit von Tobias Strauß (2016) erzeugt, wobei eine Analyse der T2-Generation der Pflanzen noch aussteht. Um eine eventuelle Komplementation der *AtKRP125b*-Funktion durch eines der anderen Kinesin-5-Proteine in *A. thaliana* zu umgehen, sollten Doppelmutanten erstellt und analysiert werden, bei denen neben *AtKRP125b* entweder *AtKRP125a*, *AtKRP125c* oder *AtF16L2.60* nicht mehr exprimiert werden. Des Weiteren wäre eine Untersuchung einer *saul1-1 atkrp125b* Doppelmutante interessant, um den funktionellen Zusammenhang zwischen den beiden Proteinen näher zu charakterisieren.

4.2.1.3. Weitere putative Interaktionspartner

Neben dem in Abschnitt 4.2.1 beschriebenen Kinesin-5-Protein *AtKRP125b* konnten weitere putative Interaktionspartner von SAUL1 mithilfe des *Tap-Tag*-Experiments identifiziert werden. Auffallend hierbei ist, dass mithilfe des SAUL1-*Tap-Tag* Fusionsproteins ausschließlich Proteine isoliert wurden, die im Zellkern von *A. thaliana* vorliegen (*AtPRP39a*, *LINC1*, *RSA1*) bzw. bei denen eine nukleare Lokalisierung vermutet wird (*HLP1*) (Tab. 3.1). Dieses Ergebnis könnte die in Abschnitt 4.2.1. beschriebene Hypothese untermauern, dass SAUL1 nicht konstant an der Plasmamembran assoziiert ist, sondern seine Position innerhalb der Zelle verändern kann, um so mit nuklearen Proteinen interagieren zu können. Möglicherweise interagieren die putativen Interaktionspartner im Anschluss an die im Cytoplasma stattfindende Proteinsynthese zunächst mit SAUL1, ehe sie in die

Zellkernperipherie transportiert werden. Da die Konjugation mit Ubiquitin als Translokationssignal eines Proteins dienen kann, könnte die nukleare Lokalisierung aus der Interaktion mit SAUL1 heraus resultieren.

Mit den Proteinen AtPRP39a (*A. thaliana* TETRATRICOPEPTIDE REPEAT 39a) und HLP1 (HRP1-LIKE PROTEIN1) konnten zwei putative Interaktionspartner isoliert werden, die an der Regulation des Blühzeitpunkts in *A. thaliana* beteiligt sind. Die beiden T-DNA-Insertionsmutanten *at prp39-1* und *at prp39-2* zeigten sowohl unter Lang- als auch Kurztagbedingungen im Vergleich zu Wildtyppflanzen ein deutlich verzögertes Blühverhalten (Wang *et al.*, 2007). AtPRP39a liegt im Zellkern lokalisiert vor und enthält mehrere *Tetratricopeptide-Repeats* (TPR), die der Protein-Protein-Interaktion dienen (Knop *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2007). Aufgrund seiner Homologie zum PRP39p-Protein aus *Saccharomyces cerevisiae* wird vermutet, dass AtPRP39a als Adapter-Protein bei der mRNA-Prozessierung, die den Blühzeitpunkt beeinflusst, fungiert (Wang *et al.*, 2007). Das Protein HLP1 wird aufgrund seiner Struktur der Familie der *hnRNP* (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*) A/B Proteine zugeordnet (Zhang *et al.*, 2015). Demzufolge wird angenommen, dass HLP1 im Zellkern lokalisiert ist. Das Protein wirkt als Regulator der mRNA-Prozessierung bei der Regulation der Blütezeit in *A. thaliana*. Die T-DNA Insertionsmutante *hlp1-1* zeigte im Gegensatz zum Wildtyp ein deutlich verzögertes Blühverhalten. Zusätzlich wurde eine erhöhte Expression des *Flowering Locus C* (*FLC*) Gens festgestellt. *FLC* wirkt als floraler Repressor und beeinflusst so den Zeitpunkt des Blühens (Zhang *et al.*, 2015). Die Analyse von *saul1-1* Mutanten lieferte jedoch keine Hinweise für eine mögliche Funktion von SAUL1 bei der Regulation des Blühzeitpunkts (Raab, 2008), sodass unklar ist, ob eine noch zu bestätigende SAUL1-AtPRP39a bzw. SAUL1-HLP1 Interaktion eine Funktion in *A. thaliana* hat.

Bei dem putativen Interaktionspartner LINC1 handelt es sich um eines von vier LITTLE NUCLEI (LINC) Proteinen in *A. thaliana* (Dittmer und Richards, 2008). Eine Analyse der beiden *loss-of-function* Mutanten *linc1-1* und *linc2-1* ergab, dass die Pflanzen äußerlich unverändert erschienen, jedoch deutlich verkleinerte Zellkerne im Gegensatz zu Wildtyppflanzen besaßen. Eine Intensivierung dieses Effekts konnte in der *linc1-1 linc2-1* Doppelmutante beobachtet werden. Zusätzlich zeigte die Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp ein deutlich verzögertes Wachstum sowie eingerollte Blätter (Dittmer *et al.*, 2007). Es wird vermutet, dass die beiden Proteine überlappende Funktionen haben und so an der

Entwicklung des Zellkerns und dessen Morphologie in *A. thaliana* beteiligt sind. LINC1 ist im Zellkern sowie in der Zellkernperipherie lokalisiert (Dittmer *et al.*, 2007). Interessanterweise konnte das Protein LINC2 in einem Hefe-2-Hybrid Screen im Rahmen der Diplomarbeit von Johannes Bergler (2008) mit einer N- und C-terminal verkürzten Variante von SAUL1 als Köderprotein als potentieller Interaktionspartner identifiziert werden.

Das Protein RSA1 (SHORT ROOT IN SALT MEDIUM 1), auch EMB1579 (EMBRYO DEFECTIVE 1579) genannt, wurde ebenfalls zusammen mit SAUL1 isoliert. RSA1 ist ein Zellkern-lokalisiertes, Calcium-bindendes Protein, das eine entscheidende Rolle bei der Genregulation bei Salzstress und bei der Salztoleranz hat. Bei *rsa1-1* Mutanten wurde eine Hypersensitivität gegenüber hohen Salzkonzentrationen festgestellt. Die Keimlinge zeigten stark verkürzte Wurzeln sowie ein verzögertes Wachstum im Vergleich zu Wildtyppflanzen (Guan *et al.*, 2013). Interessanterweise wurde bei *saul1-1* Mutanten, die unter Standardbedingungen angezogen und einer Salzbehandlung unterzogen wurden, ebenfalls eine Salzempfindlichkeit festgestellt. Die *saul1-1* Pflanzen zeigten im Gegensatz zu Wildtyppflanzen eine Gelbfärbung der Blätter (Vogelmann *et al.*, 2012).

Da die identifizierten Interaktionspartner im Zusammenhang mit der pflanzlichen Entwicklung, der Zellkernmorphologie sowie der Salztoleranz stehen, wird vermutet, dass SAUL1 neben seiner Funktion als Suppressor der vorzeitigen Seneszenz (Raab *et al.*, 2009) und als positiver Regulator der Immunantwort (Tong *et al.*, 2017) an weiteren intrazellulären Prozessen in *A. thaliana* beteiligt ist. Im Zusammenhang mit abiotischen Stressszenarien wurde in Stone (2014) ein Modell erstellt, bei dem E3 Ligasen eine sowohl negativ als auch positiv regulierende Funktion bei abiotischem Stress in Pflanzen haben können. Durch die Ubiquitinierung von bestimmten Proteinen und deren Abbau kann demnach die pflanzliche Reaktion auf einen abiotischen Stimulus unterdrückt werden, solange dieser nicht vorliegt. Wird ein bestimmtes Stressszenario von der Pflanze detektiert, können E3 Ligasen das Auslösen der Stressantwort durch die Ubiquitinierung von Proteinen, die diese reprimieren, fördern. Des Weiteren kann die Markierung von Proteinen für die Degradation im 26S Proteasom zu einer Verlangsamung der pflanzlichen Stressantwort führen (Stone, 2014). In Anlehnung an das genannte Modell kann angenommen werden, dass SAUL1 das Protein RSA1 ubiquitiniert und somit vermutlich eine vorzeitig ausgelöste Stressantwort unterdrückt. In *rsa1-1*-Mutanten fehlt das zu ubiquitinierende Substrat, sodass eine starke Reaktion der

Pflanzen bei hohem Salzstress ausgelöst wird, erkennbar an den phänotypischen Veränderungen der Mutanten.

Bei den potentiellen Interaktionspartnern, die mithilfe des SAUL1 Δ U-Box-*Tap-tag* Fusionsproteins isoliert werden konnten, handelt es sich, neben dem Kinesin-5 Protein AtKRP125b, bei fünf von sechs Proteinen um sogenannte Prohibitine (PHB) (Tab. 3.2). In Pflanzen sind PHBs bei der Entwicklung und Funktion der Mitochondrien involviert (Ahn *et al.*, 2006). In *A. thaliana* gibt es sieben *PHB*-Gene, die in Typ-I und Typ-II Familien unterteilt werden. *Prohibitin5* und *7* unterscheiden sich strukturell sehr deutlich von den anderen *PHBs*. Es wird angenommen, dass es sich bei diesen Genen entweder um sogenannte Pseudogene handelt oder, dass diese Gene sehr schwach exprimiert werden, da bislang keine *expressed sequence Tags* (EST) identifiziert werden konnten. Die *PHB*-Gene werden hauptsächlich in sich teilenden Zellen exprimiert (Van Aken *et al.*, 2007). Es konnte *in vivo* gezeigt werden, dass die Proteine PHB1, 2, 3, 4 und 6 einen multimeren Komplex miteinander bilden. Neben ihrer Funktion bei der mitochondrialen Entwicklung, sind die *PHB*-Proteine auch an weiteren zellulären Prozessen beteiligt. PHB3 fungiert als Regulator der Stickstoffmonoxid-Akkumulation in *A. thaliana* und beeinflusst so u. a. die pflanzliche Immunabwehr und Seneszenz (Delledonne *et al.*, 1998, Ma *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010). Des Weiteren hat PHB3 eine regulatorische Funktion beim Ethylen-Signalweg. Es ist sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma lokalisiert (Christians und Larsen, 2007).

Neben den *PHB*-Proteinen wurde das Protein CIP1 (COP1-INTERACTIVE PROTEIN1) isoliert. CIP1 ist ein Plasmamembran-lokalisiertes Protein, das an der Abscisinsäure (ABA)-Antwort in *A. thaliana* beteiligt ist. Neben einem ABA-sensitiven Phänotyp wurde eine Aktivierung der Genexpression von Genen, die im Zusammenhang mit der Biosynthese und der Perzeption des Phytohormons stehen, in der T-DNA-Insertionsmutante *cip1-1* nachgewiesen (Ren *et al.*, 2016).

Da die genannten Interaktionspartner mit dem verkürzten Fusionsprotein isoliert werden konnten, könnte eine Wechselwirkung der Proteine mit den ARM-Repeats von SAUL1 vermutet werden. Vermutlich fand eine Assoziation des multimeren *PHB*-Komplexes mit SAUL1 *in planta* statt, da mehrere *PHB*-Proteine zusammen isoliert werden konnten. Da das Protein CIP1, ähnlich wie SAUL1 an der Plasmamembran lokalisiert ist, könnte eine Interaktion der beiden Proteine als wahrscheinlich erachtet werden. Des Weiteren konnte in

Raab *et al.* (2009) bereits ein Zusammenhang zwischen SAUL1 und des ABA-Signalwegs gezeigt werden. In *saul1-1* Mutanten wurde parallel zum charakteristischen Phänotyp ein Anstieg des ABA-Levels festgestellt. Zudem konnte in *in vitro* Analysen eine Interaktion von SAUL1 mit der ARABIDOPSIS ALDEHYD OXIDASE3 (AAO3) sowie dessen Ubiquitinierung durch die E3 Ligase nachgewiesen werden. AAO3 ist an der Umsetzung von Abscisinaldehyd zu ABA beteiligt (Raab *et al.*, 2009). Möglicherweise fungiert CIP, ähnlich wie AAO3 als Substrat von SAUL1. In Matsui *et al.* (1995) konnte eine *in vitro* Interaktion des CIP1-Proteins mit der RING E3 Ubiquitin Ligase COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC1), einem Regulator der Photomorphogenese, gezeigt werden. CIP1 interagiert hierbei spezifisch mit der α -Helix-Domäne von COP1. Möglicherweise findet die Interaktion von CIP1 mit SAUL1 ebenfalls an den α -Helix-Strukturen der ARM-*Repeats* der E3 Ligase statt.

Um die möglichen Interaktionen überprüfen zu können, sollten weitere unabhängige Methoden zur Bestimmung von Protein-Protein Wechselwirkungen herangezogen werden. Eine Analyse mithilfe von BiFC-Experimenten könnte neben einer Bestätigung der Assoziation der Proteine, Hinweise auf die jeweilige subzelluläre Lokalisierung geben. Alternativ dazu könnte das Verfahren des FRET (Förster Resonanz Energietransfer) verwendet werden. Hierbei werden die beiden zu analysieren Proteine mit je einem Fluorophor (z. B. CFP (*Cyan Fluorescent Protein*) und YFP) fusioniert. Das CFP des sogenannten Donor-Proteins wird mit Licht einer spezifischen Wellenlänge angeregt. Kommt es zu einer Interaktion der beiden Proteine, so erfolgt ein Energietransfer vom CFP auf das YFP des sogenannten Akzeptor-Proteins. Die Fluoreszenz des Donor-Proteins nimmt ab, wohingegen die des Akzeptor-Proteins ansteigt und detektiert werden kann (Bhat *et al.*, 2006). Sowohl BiFC als auch FRET sind Verfahren zur *in planta* Analyse von Protein-Protein Interaktionen. Mit beiden Verfahren können sowohl direkte als auch indirekte Interaktionen, die über eine Komplexbildung mit zusätzlichen Komponenten vermittelt wird, nachgewiesen werden (Kudla und Bock, 2016; Xing *et al.*, 2016). Um herauszufinden, ob es sich um eine direkte Interaktion zwischen zwei Proteinen handelt, die unabhängig von weiteren Interaktoren ist, wird eine Untersuchung der SAUL1-Protein-Wechselwirkungen mittels Hefe-2-Hybrid Experimenten empfohlen. In diesem System können direkte Assoziationen von Proteinen miteinander detektiert werden (Rao *et al.*, 2014). Eine weitere Möglichkeit für den Nachweis einer direkten Protein-Protein Interaktion stellt der *Pull-down* dar. Ob es sich

bei den genannten Proteinen um Substrate der E3 Ligase handelt, sollte mithilfe eines Ubiquitinierungsassays analysiert werden.

4.2.2. Das Copine-Protein BON1 als putativer Interaktionspartner

4.2.2.1. BON1 interagiert mit SAUL1 *in planta*

Im Fokus der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Interaktionsstudien lag die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen SAUL1 und dem Plasmamembran-lokalisierten Copine-Protein BON1 (BONZAI1). Anhand der BiFC-Experimente konnte eine *in planta* Interaktion der beiden Proteine an der Plasmamembran der transformierten Mesophyllprotoplasten nachgewiesen werden (Abb. 3.13.B). Im Gegensatz dazu konnte zwischen SAUL1 und dem BON1-Interaktionspartner BAP1 keine Interaktion festgestellt werden (Abb. 3.13.C).

Mithilfe eines *SAUL1ΔARM₇₋₁₁*-Deletionskonstrukts konnte eine Interaktion mit BON1 auch ohne eine Assoziation von SAUL1 mit der Plasmamembran nachgewiesen werden. Die Wechselwirkung der beiden Proteine wurde dabei im Cytosol der Protoplasten detektiert (Abb. 3.14.A). Ferner scheint die Interaktion an der U-Box und den ARM-Repeats 1 bis 6 von SAUL1 zu erfolgen. In Li *et al.* (2010) wurde in einem Hefe-2-Hybrid-Experiment festgestellt, dass die Interaktion mit dem Protein BAP1 durch die VWA-Domäne vermittelt wird. Dieses Resultat konnte in BiFC-Experimenten mit Deletionskonstrukten des BON1 Proteins *in planta* bestätigt werden. Es stellte sich heraus, dass die beiden C2-Domänen des Copine-Proteins nicht mit BAP1 interagieren (Abb. 3.15.A). Eine Wechselwirkung von BAP1 mit der VWA-Domäne konnte jedoch im Cytosol der Protoplasten detektiert werden (Abb. 3.15.B). Im Gegensatz dazu wurde eine Interaktion von SAUL1 mit den C2-Domänen, nicht jedoch mit dem VWA-Sequenzbereich von BON1 ermittelt (Abb. 3.15.C. und 3.15.D). Eine schematische Darstellung der Interaktion von BON1 und SAUL1 an der Plasmamembran basierend auf den BiFC-Experimenten ist in Abbildung 4.2 aufgeführt.

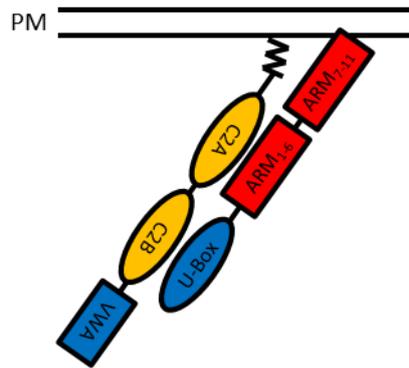


Abb. 4.2: schematische Darstellung der Interaktion von SAUL1 mit BON1 an der Plasmamembran in *A. thaliana*. BON1 ist über eine Myristoylierung am N-Terminus mit der Plasmamembran (PM) verbunden. SAUL1 ist über die C-terminalen ARM-Repeats 7 bis 11 mit der Membran assoziiert. Die Interaktion findet zwischen den beiden Calcium-abhängigen Phospholipid-bindenden C2-Domänen (C2A, C2B, orange), der U-Box (blau) sowie den ARM-Repeats 1 bis 6 (rot) statt. Die von Willebrand A (VWA, blau)-Domäne interagiert nicht mit SAUL1.

Interessanterweise fand die Interaktion von SAUL1 mit dem BON1-Deletionsprotein im Cytosol der Protoplasten statt, obwohl beide Proteine erwartungsgemäß an der Plasmamembran vorliegen sollten. Dies könnte darauf hinweisen, dass SAUL1 und BON1 an der Assoziation des jeweils anderen Proteins mit der Plasmamembran beteiligt sein könnten und diese durch deren Interaktion beeinflussen. Um diese Annahme zu untersuchen, wurde eine Analyse der subzellulären Lokalisierung von BON1-GFP in Protoplasten der *saul1-1* Mutante und von SAUL1-GFP in *bon1*-Protoplasten durchgeführt (Abb. 3.17.A und 3.17.B). Es stellte sich heraus, dass beide Fusionsproteine auch in Abwesenheit des jeweiligen Interaktionspartners an der Plasmamembran vorliegen. Eine Interaktion der Proteine scheint somit nicht essentiell für die intrazelluläre Position der Proteine zu sein. Wird die Proteinsequenz von SAUL1 oder BON1 jedoch C-terminal verkürzt, so wirkt sich dies auf die Lokalisierung der Interaktion aus.

Die Assoziation von BON1 wird über eine N-terminale Myristoylierungsstelle (Glycin 2) vermittelt (Li *et al.*, 2010, Abb. 4.2). Bei einer Myristoylierung wird eine Fettsäure, das sogenannte Myristat, kovalent an einen Glycinrest am N-Terminus in eukaryotischen und viralen Proteinen gebunden (Faraz *et al.*, 2001). Durch diesen Vorgang werden sowohl Protein-Lipid- als auch Protein-Protein-Interaktionen begünstigt. Eine Assoziation mit Membranen, z.B. der Plasmamembran kann hieraus resultieren. Es handelt sich hierbei jedoch um schwache und reversible Interaktionen, die durch verschiedene Faktoren beeinträchtigt werden und so zu einer Translokation des Proteins führen können (Peitzsch

und McLaughlin, 1993). Da die Interaktion von BON1 sowohl mit BAP1 als auch mit SAUL1 Δ ARM₇₋₁₁ im Cytosol nachgewiesen werden konnte, wird vermutet, dass die schwache Bindung des Proteins an die Membran durch die Wechselwirkungen mit den Interaktionspartnern unterbrochen wird und so eine Translokation von BON1 in das Zellinnere erfolgt. Möglicherweise ist SAUL1 durch die fehlenden *ARM-Repeats* weniger sterisch gehindert, mit BON1 zu interagieren, sodass die Bindung zwischen den beiden Proteinen intensiviert wird. Es könnte auch vermutet werden, dass durch die Interaktion mit SAUL1 eine Konformationsänderung von BON1 erfolgt und diese in einer Veränderung der intrazellulären Lokalisierung resultiert. Die Deletion der BON1-VWA-Domäne führte ebenfalls zu einer cytosolischen Interaktion mit SAUL1. Das Verändern der Aminosäuresequenz eines Proteins, z. B. durch eine Punktmutation oder durch eine Deletion von Sequenzabschnitten kann die Stabilität, die Faltung sowie die Fähigkeit zur Interaktion des Proteins beeinflussen (Studer *et al.*, 2013). Es wird vermutet, dass die Deletion der VWA-Domäne zu einer Veränderung der Faltung und somit auch der Struktur von BON1 geführt hat, sodass der N-Terminus nicht mehr mit der Membran interagieren kann. Inwiefern SAUL1 mit der Plasmamembran assoziiert ist, ist bislang ungeklärt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden jedoch Hinweise dafür gefunden, dass die Assoziation von SAUL1 mit der Plasmamembran über hydrophobe Wechselwirkungen stattfinden könnte (Abschnitt 3.4.2). Möglicherweise werden diese Wechselwirkungen bei der Interaktion mit dem verkürzten BON1-Protein überwunden, sodass es zu einer Translokation der E3 Ligase kommt. Es sollte jedoch beachtet werden, dass die verwendeten BiFC-Konstrukte 35S-Promotoren enthielten, die zu einer starken Genexpression und infolgedessen möglicherweise zu einer Akkumulation der Interaktionspartner im Cytosol geführt haben können. Eine Analyse der Interaktionen mit den nativen Promotoren könnte die cytosolische Lokalisierung bestätigen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit der sogenannten Co-Immunpräzipitation (Co-IP) ein zweiter experimenteller Ansatz verfolgt, um eine Interaktion von SAUL1 und BON1 *in planta* nachweisen zu können. Da mithilfe der anti-GFP-Matrix lediglich YFP-SAUL1, nicht jedoch der Interaktionspartner 3xHA-BON1 aus dem pflanzlichen Rohextrakt angereichert werden konnte, konnte keine Interaktion der beiden Proteine festgestellt werden (Abb. 3.16). Es wird vermutet, dass es sich hierbei um ein falsch-negatives Ergebnis handelt, das infolge der experimentellen Durchführung entstanden ist. Möglicherweise ist der verwendete Extraktionspuffer nicht dafür geeignet, BON1 aus *N. benthamiana* Pflanzen zu isolieren.

Vielleicht würden Modifikationen des Extraktionspuffers, z. B. die Veränderung des pH-Werts oder die Verwendung einer anderen Detergenz als Tween-20 zu einer Extraktion von BON1 führen. Handelt es sich um eine schwache Interaktion zwischen SAUL1 und BON1, könnte diese durch den Zentrifugationsschritt zu Beginn des Experimentes unterbrochen worden sein, sodass sich die BON1-Proteine im Pellet befanden. Womöglich könnte eine Erhöhung der Salzkonzentration von 150 mM NaCl auf 300 mM oder der Zusatz von weiteren Salzen (z. B. Magnesiumchlorid, Kaliumchlorid), von denen bekannt ist, dass sie Interaktionen positiv beeinflussen, zu einer Stabilisierung der Interaktion führen. Eine Wiederholung der Experimente unter modifizierten Bedingungen wird empfohlen. Des Weiteren sollte die Expression des 3xHA-BON1 Fusionsproteins überprüft werden.

Zusätzlich zu den *in planta* Experimenten wurde die Interaktion zwischen SAUL1 und BON1 in einer *in vitro* Analyse, dem sogenannten *Pull-down*, untersucht. Mithilfe eines Löslichkeitsassays wurden zunächst geeignete Puffer zur Solubilisierung der Fusionsproteine GST-BON1 sowie GST-BAP1 aus der jeweiligen Expressionskultur identifiziert (Abb. 3.20 A und 3.20.B). Unter Verwendung des jeweiligen Lysepuffers erfolgte eine affinitätschromatographische Aufreinigung der Proteine 6xHis-SAUL1, GST-BON1 sowie GST-BAP1 und freies GST (Abb. 3.21). Das Fusionsprotein 6xHis-SAUL1 wurde zusammen mit einem der GST-getaggten Proteine auf eine Glutathion-Matrix gegeben. Bei einer Interaktion sollte die E3 Ligase zusammen mit dem Interaktionspartner als Komplex präzipitiert werden. Eine *in vitro* Interaktion zwischen SAUL1 und BON1 bzw. BAP1 konnte mithilfe des *Pull-down* Experiments nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.22). Es stellte sich heraus, dass das His-getaggte SAUL1 Protein sowie freies GST, nicht jedoch GST-BON1 und GST-BAP1 mithilfe der Glutathion-Matrix angereichert werden konnten. Das Experiment wurde unter modifizierten Bedingungen wiederholt, um eine Bindung von SAUL1 an die Matrix zu umgehen. Zunächst wurden die Proteine in einem Reaktionsansatz vereint und erst im Anschluss an die Inkubation der Proteine, die Matrix dazugegeben. Das Ergebnis blieb jedoch unverändert. Es wird angenommen, dass SAUL1 mit der Matrix interagiert und so die eigentliche Bindung von GST-BON1 verhindert wird. Möglicherweise bildet sich ein Komplex von mehreren miteinander interagierenden SAUL1-Proteinen um die Partikel der Matrix, sodass eine Wechselwirkung mit BON1 nicht mehr erfolgen kann. Andererseits könnte es sein, dass die Assoziation der beiden Proteine nicht erfolgt, da zusätzliche Interaktionspartner fehlen. Weitere Proteine, die in dem verwendeten *in vitro* System nicht vorhanden sind, könnten an

der Komplexbildung zwischen BON1 und SAUL1 *in planta* beteiligt sein. Möglicherweise interagieren die beiden Proteine indirekt miteinander, da sie in einem Komplex mit mehreren Proteinuntereinheiten vorliegen und somit nur eine geringe Distanz zwischen SAUL1 und BON1 vorliegt.

Für weitere *in vitro* Analysen der SAUL1-BON1-Interaktion wird empfohlen, ein Verfahren zu verwenden, bei dem die Interaktion von zwei Proteinen nicht infolge einer Assoziation eines der beiden Proteine an eine Matrix analysiert wird, z. B. MST (*Microscale Thermophoresis*).

4.2.2.1.1. BON1 als putatives Substrat von SAUL1

Pflanzen der Linie *bon1-1* zeichnen sich, ähnlich wie die *saul1-1* Mutante, durch einen temperatursensitiven Autoimmunitätsphänotyp, der bei einer Temperatur von 22°C zu einem reduzierten Wachstum der Pflanzen führt, aus. Ferner zeigen *bon1-1*-Pflanzen eine erhöhte Resistenz gegenüber virulenten Pathogenen sowie einen Anstieg der *PR1*-Genexpression (Hua *et al.*, 2001; Yang und Hua, 2004). Der *bon1-1* Autoimmunitätsphänotyp ist, wie bei *saul1-1* Mutanten, abhängig von den beiden Genen *EDS1* und *PAD4*, die einen regulatorischen Knotenpunkt bei der pflanzlichen Immunantwort darstellen (Yang und Hua, 2004; Disch *et al.*, 2016). Ein zusätzliches Ausschalten eines der beiden genannten Gene führt zu einer Aufhebung der phänotypischen Veränderungen in der *bon1-1* Mutante. BON1 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der R-Protein vermittelten Immunantwort. Das Protein fungiert als negativer Regulator des R-Gens *SNC1* (SUPPRESSOR OF NPR1-1, CONSTITUTIVE1), um eine vorzeitige ETI zu unterdrücken (Yang und Hua, 2004). Darüberhinaus interagiert BON1 mit den Rezeptorkinasen BAK1 (BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE1) und BIR1 (BAK1-INTERACTING RECEPTOR KINASE1) *in planta*, wobei BAK1 das Copine-Protein phosphoryliert. Inwiefern die Phosphorylierung die Aktivität von BON1 beeinflusst, ist bislang ungeklärt. Es wird angenommen, dass die Interaktion der Kinasen mit BON1 erfolgt, um Abwehrreaktionen der ETI zu kontrollieren. Hierbei wird ein enges Zusammenspiel der PTI und ETI vermutet, da BAK1 an der Modulation von mehreren PAMP-Rezeptoren beteiligt ist (Wang *et al.*, 2011). Für SAUL1 wird ebenfalls eine regulatorische Funktion bei der pflanzlichen Immunantwort beschrieben. So soll SAUL1 bei einem Pathogenbefall zu einer verstärkten Ubiquitinierung eines bislang unbekanntes Substrats, einem PTI-Inhibitor, führen, sodass die zuvor unterdrückte PTI induziert wird (Tong *et al.*, 2017). Darüberhinaus soll die SAUL1-Homöostase von dem Immunrezeptor

SOC3 bewacht werden. Bei einer Einschleusung von Pathogenen in die pflanzliche Zelle wird eine Inaktivierung von SAUL1 vermutet, die zu einer konstitutiven Aktivierung des Immunrezeptors und somit zu einer Induktion der ETI führen soll (Tong *et al.*, 2017). Aufgrund der vergleichbaren phänotypischen sowie molekularen Eigenschaften der *saul1-1* und *bon1-1* Pflanzen und der im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen Interaktion scheint ein funktionaler Zusammenhang zwischen SAUL1 und BON1 zu bestehen. Ein Zusammenspiel der beiden Proteine bei der pflanzlichen Immunabwehr wird vermutet. Möglicherweise handelt es sich bei BON1 um ein Substrat der E3 Ligase, das infolge einer Interaktion ubiquitiniert und anschließend im 26S-Proteasom abgebaut wird. Dieser Vorgang könnte sich sowohl auf die PTI als auch auf die ETI in *A. thaliana* auswirken.

Neben der Regulation der ETI, ist BON1 ebenfalls an der basalen Immunabwehr beteiligt. Es fungiert als positiver Regulator bei der Pathogen- und Abscisinsäure (ABA)-induzierten Schließung der Stomata-Öffnungen (Gou *et al.*, 2015). Des Weiteren interagiert BON1 mit den beiden Calcium-Pumpen ACA8 und ACA10 (AUTOINHIBITED CALCIUM ATPASE8 UND 10), um das intrazelluläre Calcium-Level zur Stomataschließung zu kontrollieren und die pflanzlichen Abwehrmechanismen zu beeinflussen (Yang *et al.*, 2017). Möglicherweise ist SAUL1 durch seine Interaktion mit dem Copine-Protein ebenfalls an der Steuerung der Pathogen-induzierten Stomata-Schließung beteiligt. Ob eine regulatorische Funktion der E3 Ligase aufgrund einer Ubiquitinierung von BON1 vorliegt, muss durch experimentelle Untersuchungen überprüft werden. Des Weiteren kann durch die Interaktion von BON1 als Calcium-bindendes Copine-Protein mit Phospholipiden und die daraus resultierende Verstärkung der Vesikelaggregation eine Beteiligung von BON1 am Membrantransport vermutet werden (Hua *et al.*, 2001). Ob eine Funktion beim Aufrechterhalten des Membrangleichgewichts bei einer Infektion der Pflanze für BON1 vorliegt, konnte bislang noch nicht genauer erklärt werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, ob das Zusammenspiel von BON1 mit SAUL1 nicht auch einen Einfluss auf die Plasmamembran in infizierten *A. thaliana* Pflanzen hat.

Wie bereits erwähnt, wird in Yang und Hua (2004) auf eine Funktion für BON1 als negativer Regulator des R-Gens *SNC1* (*SUPPRESSOR OF NPR1-1, CONSTITUTIVE1*) hingewiesen. Experimentelle Daten deuten darauf hin, dass die *SNC1*-Expression in Anwesenheit von BON1 in *A. thaliana* reprimiert wird, sodass eine vorzeitige Aktivierung von Abwehrreaktionen verhindert wird. In *bon1-1* Pflanzen erfolgt eine verstärkte Expression

von *SNC1*, die wiederum in einem Anstieg der Expression der Gene *EDS1* und *PAD4* sowie zu einer Akkumulation von Salicylsäure (SA) resultiert. SA begünstigt ebenfalls die *SNC1*-Expression. Als Folge dieser Rückkopplung werden Abwehrreaktionen induziert, die zu einem verminderten Wachstum der *bon1-1* Mutante führen (Yang und Hua, 2004). Die Überexpression von BON1 kann wiederum zu einer Abschwächung der HR *in planta* führen. Die durch den Effektor *PVX coat Protein* (CP) hervorgerufene HR in *N. benthamiana* Pflanzen wurde durch eine transiente Überexpression von *BON1* reduziert (Yang *et al.*, 2007). In Disch *et al.* (2016) konnte gezeigt werden, dass SAUL1, ähnlich wie BON1, eine regulatorische Funktion oberhalb des EDS1/PAD4 Knotenpunktes hat. Hierbei wurde vermutet, dass SAUL1 ein Substrat inaktivieren kann, sodass eine SA-Akkumulation und die daraus resultierenden Abwehrreaktionen unterdrückt werden, solange keine Infektion der Pflanze vorliegt.

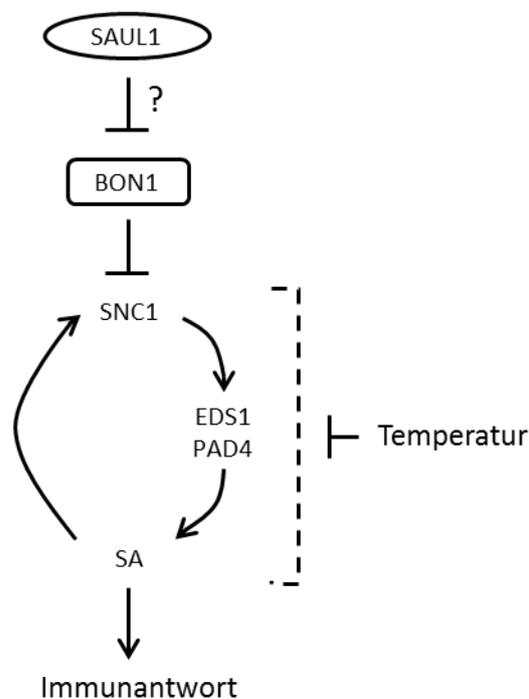


Abb. 4.3: Schematisches Modell der Funktion von SAUL1 und BON1 bei der pflanzlichen Immunantwort in *A. thaliana*. Bei einer infizierten Pflanze ubiquitiniert SAUL1 den Interaktionspartner BON1, sodass dieser proteolytisch abgebaut wird. Dadurch wird SNC1 aktiviert, das wieder die Akkumulation von Salicylsäure (SA) und Abwehrreaktionen induziert. Die Rückkopplung zwischen SNC1 und SA kann durch Temperaturen beeinflusst werden (verändert nach Disch *et al.* (2016); Yang und Hua (2004))

Eine Hypothese, nach der BON1 bei einem Pathogenbefall infolge der Interaktion mit SAUL1 ubiquitiniert und degradiert wird, sodass die SNC1-vermittelte Immunantwort aktiviert werden kann, könnte mithilfe der genannten Informationen aufgestellt werden (Abb. 4.3). Eine für die Ubiquitinierung notwendige Interaktion des Substrats mit der U-Box der E3

Ligase konnte anhand der BiFC-Interaktionsstudien in dieser Arbeit gezeigt werden. Ein weiterer Hinweis für das in Abbildung 4.3 vorgeschlagene Szenario ist die Verstärkung des *snc1*-Phänotyps durch eine SAUL1-Überexpression in *A. thaliana* (Tong *et al.*, 2017). Die *snc1*-Mutation führt zu einer konstitutiven Aktivierung des Proteins und spiegelt sich in dem kleinwüchsigen autoimmunen Phänotyp der *snc1*-Mutanten wieder (Zhang *et al.*, 2003). Vermutlich führt die erhöhte SAUL1-Expression zu einem vermehrten Abbau von BON1, sodass die ohnehin aktive *SNC1*-Expression in den Mutanten zusätzlich verstärkt wird.

Der direkte funktionale Zusammenhang zwischen SAUL1 und BON1 ist als spekulativ zu betrachten und muss durch weitere experimentelle Untersuchungen analysiert werden. Mithilfe des in Abschnitt 4.2.1 beschriebenen Ubiquitinierungsassays könnte die Ubiquitin-Konjugation von BON1 mithilfe der E3 Ligase bestätigt werden. Die Analyse von *saul1-1 bon1-1* Doppelmutanten könnte Hinweise liefern, die die oben beschriebene Hypothese zusätzlich untermauern könnten. Sollte SAUL1 den proteasomalen Abbau von BON1 auslösen, so wäre in den Doppelmutanten bei niedrigen Temperaturen eine deutliche Verstärkung der Autoimmunität, sowohl auf phänotypischer als auch auf molekularer Ebene im Vergleich zum Wildtyp und zu den Einzelmutanten zu erwarten.

4.2.2.2. BON1 und BAP1 interagieren mit dem SAUL1-Paralog PUB43 *in planta*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte mithilfe von BiFC-Experimenten festgestellt werden, dass das SAUL1-Paralog PUB43 ebenfalls mit BON1 *in planta* interagiert. Die Interaktion der Proteine wurde der intrazellulären Lokalisierung entsprechend an der Plasmamembran detektiert (Abb. 3.18.A). Eine Assoziation von PUB43 mit BON1 erfolgte dabei unabhängig davon, an welchem Terminus das Split-YFP-Molekül fusioniert worden war. Lediglich bei einer C-terminalen Fusion des Split-YFP an PUB43, bei der die kodierende Sequenz des Proteins im verwendeten BiFC-Konstrukt oberhalb der Sequenz des BON1-Fusionsproteins lag, konnte keine Interaktion ermittelt werden (Abb. 3.18.B). Interaktionsstudien mit Deletionskonstrukten der beiden Proteine sollten zukünftig durchgeführt werden, da aus den bisherigen Daten keine Rückschlüsse auf den miteinander interagierenden Sequenzbereich von BON1 und PUB43 getroffen werden können. Das Ergebnis der BiFC-Analysen liefert einen weiteren Hinweis für die funktionale Redundanz der beiden PUB-ARM Proteine. In Tong *et al.* (2017) wurde aufgrund des signifikanten Anstiegs der Resistenz gegenüber Pathogenen in der *saul1-1 soc3 pub43-1* Dreifachmutante im

Vergleich zu den Doppelmutanten *saul1-1 soc3* und *pub43 soc3* bereits eine redundante Funktion von PUB43 und SAUL1 angenommen. Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit festgestellt, dass die jeweilige Überexpression von SAUL1 und PUB43 zu einem Anstieg der Expression der Gene *PR1* und *PR2* führt, vermutlich infolge einer auto-aktivierten Immunreaktion (Abschnitt 3.1.3). Bei anderen sequenzhomologen PUB-ARM Proteinen konnte bereits eine redundante Funktion bei der Immunantwort in *A. thaliana* nachgewiesen werden. Die homologen Proteine PUB12 und PUB13 sind für die Ubiquitinierung der LRR-Rezeptorkinase FLS2 verantwortlich. In Anwesenheit des PAMPs flg22 werden PUB12 und PUB13 von dem Co-Rezeptor BAK1 phosphoryliert und bilden einen Komplex mit FLS2. Infolgedessen wird die Rezeptorkinase von den E3 Ubiquitinligasen polyubiquitiniert (Lu *et al.*, 2011). Die hochhomologen Proteine PUB22, PUB23 und PUB24 fungieren als negative Regulatoren der Immunantwort. Bei der Dreifachmutante *pub22 pub23 pub24* konnte in Anwesenheit verschiedener PAMPs eine verstärkte Immunreaktion induziert werden. So wurde bei den Pflanzen ein Anstieg der ROS-Produktion, eine erhöhte transkriptionelle Aktivierung immunspezifischer Gene und eine verstärkte Resistenz gegenüber Pathogenen festgestellt (Trujillo *et al.*, 2008).

Im Gegensatz zu SAUL1, interagiert PUB43 ebenfalls mit dem BON1-Interaktionspartner BAP1. Ein entsprechendes Fluoreszenzsignal infolge der Interaktion wurde an der Plasmamembran der transformierten Mesophyllprotoplasten detektiert. Es stellte sich jedoch heraus, dass eine Assoziation der beiden Proteine nur dann ermittelt werden konnte, wenn jeweils eine N-terminale Fusion mit dem Split-YFP Molekül vorlag (Abb. 3.18.C und 3.18.D). Vermutlich beeinträchtigt die C-terminale YFP-Fusion die Faltung des jeweiligen Proteins, sodass keine Interaktion nachgewiesen werden konnte. BiFC-Experimente mit Deletionskonstrukten könnten Hinweise auf den zur Interaktion benötigten Sequenzbereich der beiden Proteine liefern.

Basierend auf den BiFC-Experimenten scheint PUB43 sowohl mit BON1 als auch mit BAP1 in *A. thaliana* an der Plasmamembran zu interagieren. Um von einer eindeutigen Interaktion der drei Proteine sprechen zu können, sollte diese in einer weiteren unabhängigen Interaktionsstudie, z. B. mithilfe einer Co-Immunpräzipitation (Co-IP), bestätigt werden. Da zwischen BON1 und BAP1 ebenfalls eine *in planta* Assoziation besteht (Abb. 3.13.A), wird vermutet, dass es zu einer Komplexbildung mit PUB43 kommt. *Bap1-1* sowie *bon1-1*

Mutanten zeigen einen temperatursensitiven Autoimmunitätsphänotyp, der durch das R-Gen *SNC1* vermittelt wird (Hua *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2006a). Beide Proteine fungieren als negative Regulatoren bei der pflanzlichen Immunantwort. Eine Beteiligung für PUB43 an der Immunabwehr konnte im Rahmen dieser Arbeit anhand der *GFP-PUB43-1* Überexpressionsmutante ebenfalls festgestellt werden. Aufgrund dieser Daten wird ein funktionales Zusammenspiel im Rahmen der Immunabwehr vermutet. Möglicherweise werden BON1 und BAP1 bei einem Pathogenbefall von PUB43 ubiquitiniert und somit intrazelluläre Signalkaskaden in *A. thaliana* induziert, um die Pflanze vor den Pathogenen zu schützen. Darüberhinaus könnte PUB43 infolge der Interaktion mit BON1 und BAP1 am Membrantransport beteiligt sein. Eine Funktion für BON1 und BAP1 im Zusammenhang mit der Aufrechterhaltung der Membran wird vermutet, da beide Proteine infolge der C2-Domänen in der Lage sind, in Abhängigkeit von Calcium Phospholipide zu binden und an der Regulation der Zellexpansion sowie der Zellteilung bei niedrigen Temperaturen beteiligt sind (Hua *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2006a). Diese Annahmen sind jedoch spekulativ und sollten experimentell genauer untersucht werden, um weitere Informationen hinsichtlich des funktionalen Zusammenhangs zu erhalten.

4.2.3. Die Rezeptorkinase LORE als putativer Interaktionspartner

4.2.3.1. LORE interagiert nicht mit SAUL1 *in planta*

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Interaktionsstudie von SAUL1 und dem Protein LORE (LIPOOLIGOSACCHARIDE-SPECIFIC REDUCED ELICITATION, auch SD1-29 genannt) durchgeführt. In *A. thaliana* gehört LORE zu den sogenannten *Receptor-like*-Kinasen (RLK). Diese Proteine verfügen über Transmembrandomänen, die die Verankerung in der Plasmamembran vermitteln, eine Kinasedomäne, die cytoplasmatisch lokalisiert ist sowie extrazelluläre Domänen die zur Erkennung von PAMPs dienen (Ranf *et al.*, 2015). Die Detektion der Pathogen-assoziierten Moleküle führt wiederum zu einer Induktion der PTI. In *A. thaliana* fungiert LORE als Rezeptorkinase, die Lipopolysaccharide von verschiedenen Pathogenen (*Pseudomonas*, *Xanthomonas campestris*) detektiert und somit eine wichtige Rolle bei der pflanzlichen Immunabwehr spielt (Ranf *et al.*, 2015). In Tong *et al.* (2017) wird vermutet, dass durch eine Pathogeninfektion die SAUL1-vermittelte Ubiquitinierung und der damit verbundene Abbau eines Substrats, das das vorzeitige Auslösen einer PTI unterdrückt, induziert werden. Eine Verstärkung der *SAUL1*-Expression infolge der Infektion wird

angenommen. Inwiefern hierbei die Detektion des Pathogens und die daraus resultierende Steigerung der SAUL1-Aktivität erfolgt, ist bislang ungeklärt. In Hefe-2-Hybrid-Interaktionsstudien wurde eine Interaktion zwischen SAUL1 und LORE festgestellt (Samuel *et al.*, 2008). Möglicherweise führt diese Wechselwirkung der beiden Proteine bei einer Pathogeninfektion zu einer Induktion der PTI in *A. thaliana*.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Interaktion anhand von BiFC-Experimenten *in planta* analysiert werden. Eine Wechselwirkung von SAUL1 und LORE in *A. thaliana* konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.19). Vereinzelt wurden in den transformierten Mesophyllprotoplasten sehr schwache YFP-Fluoreszenzsignale in den Chloroplasten detektiert, jedoch sind diese auf die Autofluoreszenz der Zellorganellen zurückzuführen (siehe Anhang 7.4).

Aufgrund der Ergebnisse der BiFC-Experimente, wird vermutet, dass es sich bei der in den Hefe-2-Hybrid-Analysen detektierten Interaktion von SAUL1 und LORE, um ein falsch-positives Ergebnis, d. h. eine physikalische Interaktion, die in einem unabhängigen System nicht reproduziert werden kann (Brückner *et al.*, 2009), handelt. Das Hefe-2-Hybrid-System basiert auf einer transkriptionellen Aktivierung von Reporter genen infolge einer Interaktion von Proteinen im Zellkern (Lentze und Auerbach, 2008). Die Proteinexpression der putativen Interaktionspartner in dem heterologen System Hefe kann sich dabei auf die intrazelluläre Lokalisierung der zu untersuchenden Proteine auswirken. Infolgedessen kann es zu unspezifischen Interaktionen kommen (Brückner *et al.*, 2009). Eine weitere Ursache für ein falsch-positives Ergebnis stellt der Einfluss des umgebenden Zellkompartiments auf die Faltung und somit auf die Struktur des jeweiligen Proteins dar. Kommt es zu einer Proteinmissfaltung könnten ebenfalls unspezifische Interaktionspartner gebunden werden. Da das Hefe-2-Hybrid-System auf einer Interaktion im Zellkern basiert, wurde in der Diplomarbeit von Johannes Bergler (2008) ein N- und C-terminal verkürztes SAUL1-Köderprotein verwendet, um die Assoziation der E3 Ligase an die Plasmamembran zu umgehen. Die in Samuel *et al.* (2008) gezeigte Interaktionsstudie wurde mit einem LORE-Deletionskonstrukt, das nur die Kinase-Domäne enthielt und mit einem SAUL1-Deletionskonstrukt, das die Sequenzbereiche der *ARM-Repeats* umfasste, durchgeführt. Vermutlich sollte somit ebenfalls eine Lokalisierung der Proteine an die Membran verhindert werden. Die Deletion der jeweiligen Sequenzabschnitte könnte sowohl die intrazelluläre Position als auch die native Faltung der Proteine beeinflussen und so zu einer physikalischen

Interaktion geführt haben. Laut Brückner *et al.* (2009) kann eine hohe Expressionsmenge der Köder- und Beuteproteine ebenfalls zu einer falsch-positiven Interaktion von Proteinen führen.

Um eine *in planta* Interaktion von SAUL1 und LORE vollständig ausschließen zu können und so das Ergebnis der BiFC-Experimente zusätzlich zu bestätigen, sollte zum einen ein Nachweis der Proteinexpression mithilfe eines Immunoblots durchgeführt werden. Zum anderen wird eine weitere Analyse der Interaktion z. B. mithilfe einer Co-Immunopräzipitation empfohlen.

4.3. Topologie von SAUL1 in *A. thaliana*

In *in vitro* Analysen wurde eine Tendenz für SAUL1 zur Bildung von oligomeren Strukturen festgestellt (El Kilani, 2016). Um die Topologie des PUB-ARM-Proteins an der Plasmamembran in *A. thaliana* zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Anordnung von SAUL1-GFP Fusionsproteinen mithilfe der direkten stochastischen optischen Rekonstruktionsmikroskopie (dSTORM) in *saul1-1* Pflanzen analysiert. Darüberhinaus wurde die Assoziation von SAUL1 mit der Plasmamembran mittels einer Analyse der Gesamtmembranfraktion nach der Zugabe von verschiedenen Chemikalien (NaOH, NaCl, NaBr, NaSCN, Na₂CO₃) untersucht, um herauszufinden, inwiefern die E3 Ligase mit der Membran *in planta* interagiert.

4.3.1. SAUL1 tendiert zu oligomeren Strukturen *in planta*

Bei der dSTORM-Analyse der *saul1-1* Pflanzen, die mit einem SAUL1-GFP Fusionskonstrukt stabil transformiert worden waren (Drechsel *et al.*, 2011) konnte eine intensive Anhäufung der SAUL1-GFP-Moleküle entlang der Plasmamembran festgestellt werden (Abb. 3.23.A). Aufgrund der Akkumulation der Fusionsproteine konnten, auch bei einer genaueren Betrachtung der super-hochauflösenden Aufnahmen keine vereinzelt Moleküle ermittelt werden (Abb. 3.23.B). Die dSTORM-Aufnahmen wurden anschließend einer Rotationsanalyse von Dr. Christian Voigt (Abteilung für Molekulare Phytopathologie, Universität Hamburg) unterzogen, mit der eventuell vorhandene distinkte Muster, die aufgrund einer bestimmten Anordnung des Proteins entstehen, sichtbar gemacht werden können. Die daraus resultierenden Aufnahmen könnten auf eine mögliche Oligomerisierung von SAUL1 hinweisen. Mit abnehmendem Rotationswinkel wurden Strukturen erkennbar, die auf di-,

tri-, tetra- und hexamer-ähnliche Strukturen der SAUL1-GFP-Proteine hinweisen könnten (Abb. 3.24). Möglicherweise könnte anhand dieser Ergebnisse vermutet werden, dass SAUL1 in der lebenden Zelle in keinem stabilen Zustand, sondern in höher-geordneten Strukturen vorliegt. Diese Annahme würde einhergehen mit dem in der SAXS-Analyse beobachteten Effekt, dass SAUL1 mit einer steigenden Proteinkonzentration zu einer Oligomerisierung tendiert (El Kilani, 2016). Bei einer distinkten Anordnung von SAUL1 *in planta* wäre ein stabiles Muster, das unabhängig vom Rotationswinkel vorliegt, zu erwarten gewesen. Darüberhinaus könnte angenommen werden, dass die Selbstassoziation der E3 Ligase, beispielweise von einem dimeren zu einem trimeren Komplex mit einer hohen Geschwindigkeit erfolgt, sodass keine distinkte Topologie der SAUL1-Moleküle *in planta* mithilfe des dSTORM-Verfahrens sowie der Rotationsanalyse detektiert werden kann. Es wird jedoch darauf hingewiesen, dass für die im Rahmen dieser Arbeit erstellten dSTORM-Aufnahmen Pflanzen verwendet wurden, bei denen eine Überexpression des SAUL1-GFP Fusionsproteins infolge eines 35S-Promotors vorlag. Eine Wiederholung des Experiments mit einem SAUL1-GFP-Fusionskonstrukt, bei dem der native Promotor des Proteins vorliegt, sollte zukünftig durchgeführt werden, um die native Anordnung von SAUL1 optimaler analysieren zu können. Möglicherweise könnten als Folge der schwächeren SAUL1-Expression deutlichere Strukturen von Proteinkomplexen beobachtet werden. Da die Modifikation der Proteinsequenz durch eine Fusion mit einem Fluoreszenzproteins stets die Eigenschaften des Proteins, z. B. die Struktur oder die Fähigkeit zur Interaktion verändern kann, könnte eine alternative Strategie zur Detektion von SAUL1 *in planta* verfolgt werden. In Dong *et al.* (2015) erfolgte eine STORM-Analyse der Mikrotubuli-Strukturen in den Wurzeln in *A. thaliana* durch eine Behandlung der Pflanzen mit einer sogenannten Immunfluoreszenzfärbung. Hierbei wurden die *Arabidopsis* Keimlinge zunächst mit einem primären anti-Tubulin-Antikörper inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem Fluoresceinisothiocyanat-gekoppelten sekundären Antikörper. Anhand der Detektion der Fluoreszenzfarbstoffsignale konnte die Dichte der Mikrotubuli *in planta* analysiert werden (Dong *et al.*, 2015). In Löschberger *et al.* (2012) wurde das dSTORM-Verfahren verwendet, um die Topologie des Proteins gp210 in nuklearen Porenkomplexen in Eizellen des Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) zu untersuchen. Eine Anordnung der gp210-Proteine in einem aus acht Molekülen bestehenden symmetrischen Ring konnte gezeigt werden. Hierbei erfolgte die Detektion der Proteine ebenfalls durch eine spezifische Antikörper-vermittelte

Immunofluoreszenz. Des Weiteren wurde der Durchmesser der Ringstrukturen mithilfe eines Querschnittsprofils der Signalintensitäten ermittelt (Löschberger *et al.*, 2012). Ferner wird eine Analyse von aus *A. thaliana* isolierten SAUL1-Molekülen mithilfe einer nativen Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) empfohlen, um eventuelle Oligomere der E3 Ligase nachweisen zu können.

4.3.2. SAUL1 assoziiert mit der Plasmamembran über hydrophobe Wechselwirkungen

Als Folge der alkalischen Behandlung der Gesamtmembranfraktion von *saul1-1/35S::SAUL1-GFP* Pflanzen mit NaOH sowie Na₂CO₃ konnte ein nahezu vollständiges Ablösen des Fusionsproteins von der Plasmamembran festgestellt werden (Abb. 3.25). Im Gegensatz dazu schien die hohe NaCl-Salzkonzentration keinen Einfluss auf die Membranassoziation von SAUL1 zu haben. Die chaotropen Salze NaBr und NaSCN bewirkten lediglich einen sehr schwachen Übergang von der Pellet- in die Überstandsfraktion.

Diese Ergebnisse liefern Hinweise bezüglich der Assoziation von SAUL1 mit der Plasmamembran in *A. thaliana*. Zum einen wird die Annahme untermauert, dass die E3 Ligase kein integrales, sondern ein peripheres Membranprotein ist. Zum anderen lässt die Wirkungsweise eines erhöhten pH-Werts durch die Zugabe von NaOH oder Na₂CO₃ die Vermutung zu, dass SAUL1 über hydrophobe und somit nicht-kovalente Wechselwirkungen mit der Plasmamembran assoziiert ist. Möglicherweise erfolgt die Assoziation über hydrophobe Wechselwirkungen mit einem integralen oder peripheren Membranprotein. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten BiFC-Experimente mit Deletionskonstrukten von SAUL1 und dem Interaktionspartner BON1 haben gezeigt, dass SAUL1 nicht an der Assoziation von BON1 an die Plasmamembran beteiligt zu sein scheint und BON1 nicht an der Membranassoziation von SAUL1 (Abschnitt. 3.2.2.2). Alternativ könnte SAUL1 mit dem Plasmamembran-lokalisierten Protein CIP1, das als potentieller Interaktionspartner von SAUL1 mithilfe der Tandemaffinitätsaufreinigung identifiziert wurde (Abschnitt 3.2.1), assoziieren, um an der Plasmamembran lokalisiert zu sein. Möglicherweise könnte die Assoziation der E3 Ubiquitinligase auch über hydrophobe Wechselwirkungen mit einem Membranlipid erfolgen. Lipid-verankerte Proteine können ebenfalls durch einen hohen pH-Wert von der Membran gelöst werden (Rolland *et al.*, 2006). Diese Möglichkeit der Membranassoziation für SAUL1 wird jedoch als unwahrscheinlich erachtet, da *in silico*

Analysen keine Lipidmodifikationsmotive identifizieren konnten (Drechsel, 2011; Drechsel *et al.*, 2011). Ferner kann eine elektrostatische Interaktion von SAUL1 mit der Plasmamembran ausgeschlossen werden, da eine hohe Ionenstärke in diesem Experiment keinen eindeutigen Einfluss auf die Membranassoziation zu haben schien. Interessanterweise erschien die Wechselwirkung von SAUL1 mit der Plasmamembran selektiv zu sein für den Anstieg des pH-Werts. Die Zugabe der chaotropen Salze NaBr und NaSCN kann ebenfalls zu einer Unterbrechung von hydrophoben Interaktionen führen, jedoch ist die alkalische Behandlung stringenter als die Salzbehandlung hinsichtlich der Solubilisierung von hydrophoben Proteinen (Rolland *et al.*, 2006).

In Drechsel *et al.* (2011) konnte anhand von mehreren SAUL1-Deletionskonstrukten gezeigt werden, dass die C-terminalen ARM-Repeats 7 bis 11 essentiell für die Lokalisierung der E3 Ligase an der Plasmamembran *in planta* sind. Die ARM-Repeats bestehen aus jeweils drei α -Helices, die miteinander interagieren und infolgedessen eine sogenannte rechtshändig gedrehte Superhelix formen, die wiederum als Oberfläche für Protein-Protein-Interaktionen dienen kann (Huber *et al.*, 1997). Möglicherweise wird die Plasmamembranassoziation durch hydrophobe Wechselwirkungen der C-terminalen ARM-Repeats mit einem oder mehreren Membranproteinen vermittelt. Da es sich hierbei jedoch um spekulative Annahmen handelt, sollten zusätzliche Analysen durchgeführt werden, um die Assoziation von SAUL1 mit der Membran genauer charakterisieren zu können. Mithilfe einer massenspektrometrischen Analyse von SAUL1 könnten Informationen hinsichtlich posttranslationaler Modifikationen gewonnen werden, um die Assoziation des Proteins durch Lipidmodifikationen, z. B. durch Prenylierung oder einen Lipidanker ausschließen zu können. Um die Möglichkeit der Interaktion von SAUL1 mit Membranlipiden zu untersuchen, könnte ein sogenannter Lipid-Bindungsassay (Yang *et al.*, 2006a) durchgeführt. Hierbei erfolgt die Inkubation des zu untersuchenden Proteins mit Phosphatidylserin, einem Phospholipid. Nach einem Zentrifugationsschritt werden die Pellet- und Überstandsfraktion gelelektrophoretisch analysiert. Bei einer Bindung des Proteins an die Phospholipide, sollte das Protein in der Pelletfraktion nachweisbar sein. Sollte SAUL1 nicht in der Lage sein, Lipide zu binden, sollte die Möglichkeit der hydrophoben Wechselwirkung mit einem Membranprotein in Betracht gezogen werden. Da das PUB-ARM-Protein eine regulatorische Funktion bei der pflanzlichen Immunantwort besitzt, könnte es eventuell über eine Interaktion mit einem membranständigen Immunrezeptor, z. B. FLS2 (FLAGELLIN SENSITIVE2) an die

Diskussion

Plasmamembran assoziiert sein. Durch eine BiFC-Interaktionsstudie könnte diese Vermutung genauer untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Um sich den stetig verändernden Umweltbedingungen anpassen zu können, verfügen Pflanzen, als sessile Organismen, über ein komplexes System aus Abwehrmechanismen. Die Regulation der dabei stattfindenden zellulären Signalwege erfolgt oftmals mithilfe der durch das Ubiquitin-26S Proteasomsystem vermittelten Proteolyse beteiligter regulatorischer Proteinkomponenten. E3 Ubiquitinligasen, u. a. sogenannte *Plant U-Box Armadillo Repeat* (PUB-ARM)-Proteine, gewährleisten hierbei die Spezifität der Ubiquitinierung durch die Bindung des Substrats.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Plasmamembran-assoziierte PUB-ARM E3 Ubiquitinligase SAUL1 charakterisiert werden. Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass SAUL1 als Suppressor bei temperaturbedingtem Zelltod und Seneszenz fungiert. Ferner scheint SAUL1 als positiver Regulator an der Immunantwort in *A. thaliana* beteiligt zu sein. In einem ersten Projekt wurde mithilfe von Genexpressionstudien der Einfluss von SAUL1 und den nächstparalogen PUB-ARM Proteinen PUB43 und PUB42 auf die Expression Immunabwehrspezifischer Gene analysiert. Infolge der Überexpression von SAUL1 und PUB43 konnte ein deutlicher Anstieg der *PR1*- und *PR2*-Genexpression sowie ein Autoimmunitätsphänotyp festgestellt werden. Ein Zusammenhang der beiden Proteine bei der pflanzlichen Immunantwort kann daher vermutet werden. Im Gegensatz dazu ergab ein Vergleich der *PR*-Genexpression von *pub42-2 saul1-1* Doppelmutanten mit *saul1-1* Mutanten keinen additiven Effekt des Ausschaltens von *PUB42* auf die Genexpression. Zusätzlich konnte kein temperatursensitiver Phänotyp in den *pub42-2* Mutantenlinien ermittelt werden, sodass *PUB42* keinen Einfluss auf die Genexpression bei der Immunantwort in *A. thaliana* zu haben scheint.

Im Fokus dieser Arbeit lag die Identifizierung von SAUL1-Interaktionspartnern, um mögliche Substrate der E3 Ubiquitinligase zu finden. Hierbei wurden zwei verschiedene Strategien verfolgt. Zum einen konnten mithilfe einer Tandemaffinitätsaufreinigung mehrere putative Interaktoren von SAUL1 aus pflanzlichen Zellkulturen isoliert werden. Hierbei wurden überwiegend Proteine identifiziert, die im Zellkern lokalisiert sind. Die Assoziation von SAUL1 mit dem Kinesin-5-Protein AtKRP125b konnte mithilfe der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC) *in planta* bestätigt werden. Darüberhinaus wurde die subzelluläre Lokalisierung von AtKRP125b im Zellkern von *A. thaliana* nachgewiesen. In einem zweiten Ansatz wurden BiFC-Interaktionsstudien mit Proteinen, die ähnlich wie

SAUL1, bei der pflanzlichen Immunantwort beteiligt und an der Plasmamembran lokalisiert sind, durchgeführt. Hierbei konnte eine Interaktion von SAUL1 mit dem Copine Protein BON1, nicht jedoch mit dem BON1-Interaktionspartner BAP1 und der Immunrezeptorkinase LORE ermittelt werden. In Lokalisierungsstudien konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre Lokalisierung von SAUL1 und BON1 an der Plasmamembran unabhängig vom Interaktionspartner erfolgt. Darüberhinaus wurde eine Wechselwirkung zwischen PUB43 und den beiden Proteinen BON1 und BAP1 beobachtet, sodass eine Komplexbildung vermutet werden kann.

In einem weiteren Projekt wurde die Topologie und Assoziation von SAUL1 an der Plasmamembran untersucht. Anhand der direkten stochastischen optischen Rekonstruktionsmikroskopie konnten Hinweise auf oligomere Strukturen der E3 Ubiquitinligase erhalten werden, die die durch vorangegangene Studien vermutete Tendenz von SAUL1 zur Bildung von höher geordneten Strukturen, untermauern. Des Weiteren konnte durch eine selektive Behandlung und Analyse der Gesamtmembranfraktion festgestellt werden, dass SAUL1 als peripheres Membranprotein vermutlich über hydrophobe Wechselwirkungen mit der Plasmamembran in *A. thaliana* assoziiert ist.

Summary

As sessile organisms plants possess a complex system of defence mechanisms in order to adapt to changing environmental conditions. The regulation of the associated cellular signaling pathways is achieved by the ubiquitin-26S proteasome system resulting in proteolysis of participating regulatory protein components. E3 ubiquitin ligases, e.g. *Plant U-Box Armadillo Repeat* (PUB-ARM)-proteins ensure the specificity of the ubiquitination process.

The aim of this work was the characterization of the plasma membrane-associated PUB-ARM E3 ubiquitin ligase SAUL1. Previous studies showed that SAUL1 functions as suppressor of temperature-affected cell death and senescence. Furthermore SAUL1 seems to be involved in the immune response in *A. thaliana* as a positive regulator of PTI. In the first project, gene expression studies of immune response-associated genes were performed in order to analyze the role of SAUL1 and its closest paralogous proteins PUB43 and PUB42. As a result of SAUL1 and PUB43 overexpression the expression level of PR1 and PR2 increased and plants exhibited phenotypic symptoms of autoimmunity, indicating a function of the

Summary

proteins in plant immune responses. In contrast, the comparison of *PR*-gene expression in *pub42-2 saul1-1* double mutant and *saul1-1* mutant plants exhibited no additive effect of the *PUB42-knock-out* on gene expression. In addition, *pub42-2* mutants did not show the typical *saul1-1* temperature-sensitive phenotype. Therefore *PUB42* does not seem to affect gene expression during immune response in *A. thaliana*.

The main topic of this work was the identification of SAUL1 interaction partners in order to find potential substrates of the E3 ubiquitin ligase. Therefore two different strategies were followed. On the one hand, various putative SAUL1 interactors were identified using tandem affinity purification. The majority of identified proteins are localized in the nucleus. By means of bimolecular fluorescence complementation (BiFC), the *in planta* association of SAUL1 with the kinesin-5 protein AtKRP125b was confirmed. Furthermore, the subcellular localization of AtKRP125b to the nucleus was proven. On the other hand, presumed interactions of SAUL1 with proteins, which are involved in the immune response and localized to the plasma membrane, were analyzed via BiFC. SAUL1 interacts with the copine protein BON1, but neither with its interaction partner BAP1 nor with the immune receptor kinase LORE. Localization studies revealed that SAUL1 and BON1 associate to the plasma membrane in an interaction partner-independent manner. Moreover *PUB43* was shown to interact with BON1 and BAP1. Based on this result a complex formation between these three proteins is presumed.

In another project, the topology and association of SAUL at the plasma membrane was analyzed. The direct stochastic optical reconstruction microscopy revealed indications of oligomer structures of the E3 ubiquitin ligase, substantiating previous observations presuming the tendency of SAUL1 to build higher organized structures. Furthermore the selective treatment and analysis of the total membrane fraction exhibited that SAUL1 as a peripheral membrane protein is probably associated with the plasma membrane via hydrophobic interactions.

6. Literaturverzeichnis

- Adler G., Konrad Z., Zamir L., Mishra A. K., Raveh D., Bar-Zvi D.** (2017) The *Arabidopsis* paralogs, *PUB46* and *PUB48*, encoding U-box E3 ubiquitin ligases, are essential for plant response to drought stress. *BMC Plant Biol.* **17**: DOI 10.1186/s12870-016-0963-5
- Ahmed H.** (2005) Principles and Reactions of Protein Extraction, Purification and Characterization. *Florida: CRC Press*
- Ahn C. S., Lee J. H., Hwang A. R., Kim W. T., Pai H.-S.** (2006) Prohibitin is involved in mitochondrial biogenesis in plants. *Plant J.* **46**: 658 - 667
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.** (2002) Molecular Biology of the Cell, 4th edition. *New York: Garland Science*
- Asai T., Tena G., Plotnikova J., Willmann M. R., 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
- 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
- Bannigan A., Scheible W.-R., Lukowitz W., Fagerstrom C., Wadsworth P., Somerville C., Baskin T. I.** (2007) A conserved role for kinesin-5 in plant mitosis. *Journal of Cell Science* **120**: 2819 - 2827
- Bartetzko V.** (2012) Funktionelle Charakterisierung des Typ III-Effektors XopJ aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Dissertation, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
- Bent A. F., Mackey D.** (2007) Elicitors, Effectors, and *R* Genes: The New Paradigm and a Lifetime Supply of Questions. *Annu. Rev. Phytopathol.* **45**: 299 - 436
- Bates P. W., Vierstra R. D.** (1999) UPL1 and 2, two 405 kDa ubiquitin-protein ligases from *Arabidopsis thaliana* related to the HECT-domain protein family. *Plant J.* **20** (2): 183 - 195
- Bergler J.** (2008) Steuerung der Pflanzenentwicklung durch U-Box-Proteine. Diplomarbeit, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
- Bhat R. A., Lahaye T., Panstruga R.** (2006) The visible touch: *in planta* visualization of protein-protein interactions by fluorophore-based methods. *Plant methods* **2**: DOI: 10.1186/1746-4811-2-12
- Boller T., He S. Y.** (2009) Innate Immunity in Plants: An Arms Race Between Pattern Recognition Receptors in Plants and Effectors in Microbial Pathogens. *Science* **324**: 742 - 744

- Brosnan C. A., Mitter N., Christie M., Smith N. A., Waterhouse P. M., Carroll B. J.** (2007) Nuclear gene silencing directs reception of long-distance mRNA silencing in *Arabidopsis*. *PNAS* **104** (37): 14741 - 14746
- Brückner A., Polge C., Lentze N., Auerbach D., Schlattner U.** (2009) Yeast Two-Hybrid, a Powerful Tool for Systems Biology. *Int. J. Mol. Sci.* **10**: 2763 - 2788
- Callis J.** (2014) The Ubiquitination Machinery of the Ubiquitin System. *Arabidopsis Book* **12**: e0174
- Cao Y., Liang Y., Tanaka K., Nguyen C. T., Jedrzejczak R. P., Joachimiak A., Stacey G.** (2014) The kinase LYK5 is a major chitin receptor in *Arabidopsis* and forms a chitin-induced complex with related kinase CERK1. *Elife* **3**: DOI: 10.7554/eLife.03766
- Coates J. C.** (2003) Armadillo repeat proteins: beyond the animal kingdom. *TRENDS in Cell Biology* **13** (9): 463 - 471
- Chen Z. J., Sun L. J.** (2009) Nonproteolytic Functions of Ubiquitin in Cell Signaling. *Mol Cell* **33** (3): 275 - 286
- Chen L., Hellmann H.** (2013) Plant E3 Ligases: Flexible Enzymes in a Sessile World. *Molecular Plant* **6** (5): 1388 - 1404
- 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** (35): 14694 - 14699
- Chisholm S. T., Coaker G., Day B., Staskawicz B. J.** (2006) Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell* **124**: 803 - 814
- 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 Combinatory Roles in Response to Drought Stress. *Plant Cell* **20**: 1899 - 1914
- Choi C. M., Gray W. M., Mooney S., Hellmann H.** (2014) Composition, Roles and Regulation of Cullin-based Ubiquitin E3 Ligases. *Arabidopsis Book* **12**: e0175
- Christians M. J., Larsen P. B.** (2007) Mutational loss of the prohibitin *AtPHB3* results in an extreme constitutive ethylene response phenotype coupled with partial loss of ethylene-inducible gene expression in *Arabidopsis* seedlings. *Journal of Experimental Botany* **58** (8): 2237 - 2248
- Couto D., Zipfel C.** (2016) Regulation of pattern recognition receptor signaling in plants. *Nat Rev Immunol.* **16** (9): 537 - 552
- Danzberger N.** (2010) Analyse der Funktion von Ubiquitinligasen an der Plasmamembran. Masterarbeit, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

- Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deoock, F., Schell, J., Van Montagu, M., Leemans, J.** (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res.* **13** (13): 4777 - 4788
- Delledonne M., Xia Y., Dixon R. A., Lamb C.** (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**: 585 - 588
- 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*. *Mol Plant Microbe Interact.* **29** (1): 69 - 80
- Dittmer T. A., Richards E. J.** (2008) Role of LINC proteins in nuclear morphology. *Plant Signaling & Behavior* **3** (7): 485 - 487
- Dittmer T. A., Stacey N. J., Sugimoto-Shirasu K., Richards E. J.** (2007) *LITTLE NUCLEI* Genes Affecting Nuclear Morphology in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **19**: 2793 - 2803
- Dong B., Yang X., Zhu S., Bassham D. C., Fang N.** (2015) Stochastic Optical Reconstruction Microscopy Imaging of Microtubule Arrays in Intact *Arabidopsis thaliana* Seedling Roots. *Sci Rep.* **5**: DOI: 10.1038/srep15694
- Downes B. P., Stupar R. M., Gingerich D. J., Vierstra R. D.** (2003) The HECT ubiquitin-protein ligase (UPL) family in *Arabidopsis*: UPL3 has a specific role in trichome development. *Plant J.* **35**: 729 - 742
- Downes B., Vierstra R. D.** (2005) Post-translational regulation in plants employing a diverse set of polypeptide tags. *Biochem Soc. Trans.* **33**: 393 - 399
- Drechsel G.** (2011) Charakterisierung der Seneszenz-assoziierten E3-Ubiquitinligase SAUL1 aus *Arabidopsis thaliana*. Dissertation, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
- 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** (2): 775 - 785
- Dreher K., Callis J.** (2007) Ubiquitin, Hormones and Biotic Stress in Plants. *Annals of Botany* **99**: 787 - 822
- Dubiella U., Seybold H., Durian G., Komander E., Lassig R., Witter C.-P., Schulze W. X., Romeis T.** (2013) Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense propagation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110** (21): 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. *Plant J.* **45**(4):616 - 629

- Edgar R. C.** (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32** (5): 1792 - 1797
- Eggert D., Naumann M., Reimer R., Voigt C. A.** (2014) Nanoscale glucan polymer network causes pathogen resistance. *Scientific Reports* **4**: DOI: 10.1038/srep04159
- El Kilani H.** (2016) Structural Characterization of Cell Wall and Plasma Membrane Proteins of *Arabidopsis thaliana*. Dissertation, Universität Hamburg
- Elmore J. M., Lin Z.-J. D., Coaker G.** (2011) Plant NB-LRR signaling: Upstreams and Downstreams. *Curr Opin Plant Biol.* **14** (4): 365 - 371
- Faraz T. A., Waksman G., Gordon J. I.** (2001) The Biology and Enzymology of Protein N-Myristoylation. *The Journal of Biological Chemistry* **276** (43): 39501 - 39504
- Ferenz N. P., Gabel A., Wadsworth P.** (2010) Mitotic Functions of Kinesin-5. *Semin Cell Dev Biol.* **21** (3): 255 - 259
- Finley D.** (2009) Recognition and Processing of Ubiquitin-Protein Conjugates by the Proteasome. *Annu Rev Biochem.* **78**: 477 - 513
- Furlan G., Nakagami H., Eschen-Lippold L., Jiang X., Majovsky P., Kowarschik K., Hoehenwarter W., Lee J., Trujillo M.** (2017) Changes in PUB22 Ubiquitination Modes Triggered by MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE3 Dampen the Immune Response. *Plant Cell* **29** (4): 726 - 745
- Geldner N., Robatzek S.** (2008) Plant Receptors Go Endosomal: A Moving View on Signal Transduction. *Plant Physiology* **147**: 1565 - 1574
- Glotzer M., Murray A. W., Kirschner M. W.** (1991) Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**: 132 - 138
- Glutathione Affinity Handbook** (2014) For purifying and detecting proteins carrying a GST tag. *Qiagen*: Third Edition
- Gou M., Hua J.** (2012) Complex regulation of an *R* gene *SNC1* revealed by autoimmune mutants. *Plant Signal Behav.* **7** (2): 213 - 216
- Gou M., Zhang Z., Zhang N., Huang Q., Monaghan J., Yang H., Shi Z., Zipfel C, Hua J.** (2015) Opposing Effects on Two Phases of Defense Responses from Concerted Actions of HEAT SHOCK COGNATE70 and BONZAI1 in Arabidopsis. *Plant Physiology* **169**: 2304 - 2323
- Guan Q., Wu J., Yue X., Zhang Y., Zhu J.** (2013) A Nuclear Calcium-Sensing Pathway Is Critical for Gene Regulation and Salt Stress Tolerance in *Arabidopsis*. *PLOS Genetics* **9** (8): e1003755

- Grefen C. und Blatt M. R.** (2012) A 2in1 cloning system enables ratiometric bimolecular fluorescence complementation (rBiFC). *Biotechniques* **53** (5): 311 - 314
- Hammer Ø., Harper D. A. T., Ryan P. D.** (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* **4**(1):1 - 9
- Hanahan D.** (1983) Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J. Mol. Biol.* **166** (4): 557 - 580
- Hatakeyama S., Yada M., Matsumoto M., Ishida N., Nakayama K.-I.** (2001) U Box Proteins as a New Family of Ubiquitin-Protein Ligases. *J Biol Chem.* **276** (35): 33111 - 33120
- Hellemans J., Mortier G., De Paepe A., Speleman F., Vandesompele J.** (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology* **8** (2): R19
- Hicke L.** (2001) Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2** (3): 195 - 201
- Hobbs S. L. A., Kpodar P., DeLong C. M. O.** (1990) The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. *Plant Molecular Biology* **15**: 851 - 864
- Hua J., Grisafi P., Cheng S.-H., Fink G. R.** (2001) Plant growth homeostasis is controlled by the *Arabidopsis* *BON1* and *BAP1* genes. *Genes & Development* **15**: 2263 - 2272
- Hua Z., Vierstra R. D.** (2011) The Cullin-RING Ubiquitin-Protein Ligases. *Annu. Rev. Plant Biol.* **62**: 299 - 334
- Huber A. W., Nelson W. J., Weis W. I.** (1997) Three-Dimensional Structure of the Armadillo Repeat Region of β -Catenin. *Cell* **90**: 871 - 882
- Huibregtse J. M., Scheffner M., Beaudenon S., Howley P. M.** (1995) A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 2563 - 2567
- Ikeda F., Dikic I.** (2008) Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. *EMBO Rep.* **9** (6): 536 - 542
- Jaulin F., Kreitzer G.** (2010) KIF17 stabilizes microtubules and contributes to epithelial morphogenesis by acting at MT plus ends with EB1 and APC. *J Cell Biol.* **190** (3): 443 - 460
- Jones J. D. G., Dangl J. L.** (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323 - 329
- Kang D., Gho Y. S., Suh M., Kang C.** (2002) Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Bull. Korean Chem. Soc.* **23** (11): 1511 - 1512

- Karimi M., Inzé D., Depicker A.** (2002) GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* **7** (5): 193 - 195
- Karnauchov I., Herrmann R. G., Klösigen R. B.** (1997) Transmembrane topology of the Rieske Fe/S protein of the cytochrome *b₆/f* complex from spinach chloroplasts. *FEBS Letters* **408**: 206 - 210
- Kim D.-Y., Scalf M., Smith L. M., Vierstra R. D.** (2013) Advanced Proteomic Analyses Yield a Deep Catalog of Ubiquitylation Targets in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**: 1523 - 1540
- Kim H., Botelho S. C., Park K., Kim H.** (2015) Use of carbonate extraction in analyzing moderately hydrophobic transmembrane proteins in the mitochondrial inner membrane. *Protein Science* **24**: 2063 - 2069
- Knop K., Stepien A., Barciszewska-Pacak M., Taube M., Bielewicz D., Michalak M., Borst J.-W., Jarmolowski A., Szweykowska-Kulinska Z.** (2016) Active 5' splice sites regulate the biogenesis efficiency of Arabidopsis microRNAs derived from intron-containing genes. *Nucleic Acids Research Advance Access* **45** (1): 581 - 591
- Kotur T.** (2016) Die Funktion der Gene *Suppressor of saul1-1 1* und *SNOWY COTYLEDON4* in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation, Universität Hamburg
- Kudla J., Bock R.** (2016) Lighting the Way to Protein-Protein Interactions: Recommendations on Best Practices for Bimolecular Fluorescence Complementation Analyses. *Plant Cell* **28** (5): 1002 - 1008
- Lawrence C.J., Dawe R.K., Christie K.R., Cleveland D.W., Dawson S.C., Endow S.A., Goldstein L.S., Goodson H.V., Hirokawa N., Howard J., Malmberg R.L., McIntosh J.R., Miki H., Mitchison T.J., Okada Y., Reddy A.S., Saxton W.M., Schliwa M., Scholey J.M., Vale R.D., Walczak C.E., Wordeman L.** (2004) A standardized kinesin nomenclature. *Journal of Cell Biology* **167** (1): 19 - 22
- Lee Y.-R. J., Liu B.** (2004) Cytoskeletal Motors in Arabidopsis. Sixty-One Kinesins and Seventeen Myosins. *Plant Physiology* **136**: 3877 - 3883
- Lee T.-F., McNellis T. W.** (2009) Evidence that the BONZAI1/COPINE1 protein is a calcium- and pathogen-responsive defense suppressor. *Plant Mol Biol* **69**: 155 - 166
- Lee H. G., Seo P. J.** (2016) The *Arabidopsis* MIEL1 E3 ligase negatively regulates ABA signalling by promoting protein turnover of MYB96. *Nat Commun.* **7**: DOI 10.1038/ncomms12525
- Leitner J., Petrášek W., Tomanov K., Retzer K., Pařezová M., Korbei B., Bachmair A., Zařímalová E., Luschnig C.** (2012) Lysine⁶³-linked ubiquitylation of PIN2 auxin carrier protein governs hormonally controlled adaptation of *Arabidopsis* root growth. *PNAS* **109** (21): 8322 - 8327

- Lentze N., Auerbach D.** (2008) Membrane-Based Yeast Two-Hybrid System to Detect Protein Interactions. *Current Protocols in Protein Science*: DOI: 10.1002/0471140864.ps1917s52
- Li Y., Gou M., Sun Q., Hua J.** (2010) Requirement of Calcium Binding, Myristoylation, and Protein-Protein Interaction for the Copine BON1 Function in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* **285** (39): 29884 - 29891
- Li L., Li M., Yu L., Zhou Z., Liang X., Liu X., Cai G., Gao L., Zhang X., Wang Y., Chen S., Zhou J.-M.** (2014) The FLS2-Associated Kinase BIK1 Directly Phosphorylates the NADPH Oxidase RbohD to Control Plant Immunity. *Cell Host Microbe* **15** (3): 329 - 338
- Liao D., Cao Y., Sun X., Espinoza C., Nguyen C. T., Liang Y., Stacey G.** (2017) Arabidopsis E3 ubiquitin ligase PLANT U-BOX13 (PUB13) regulates chitin receptor LYSIN MOTIF RECEPTOR KINASE5 (LYK5) protein abundance. *New Phytologist* **214**: 1646 - 1656
- Lienemann T.** (2015) Funktion von SAUL1-like Proteinen in der Autoimmunantwort von *Arabidopsis thaliana*. Bachelorarbeit, Universität Hamburg
- Lindwall G., Chau M.-F., Gardner S. R., Kohlstaedt L. A.** (2000) A sparse matrix approach to the solubilization of overexpressed proteins. *Protein Engineering* **13** (1): 67 - 71
- Liu W.-X., Zhang F.-C., Zhang W.-Z., Song L.-F., Hu W.-H., Chen Y.-F.** (2013) Arabidopsis Di19 Functions as a Transcription Factor and Modulates PR1, PR2, and PR5 Expression in Response to Drought Stress. *Molecular Plant* **6** (5): 1487 - 1502
- Liu Q., Wang Q., Liu B., Wang W., Wang X., Park J., Yang Z., Du X., Bian M., Li C.** (2016) The Blue Light-Dependent Polyubiquitination and Degradation of Arabidopsis Cryptochrome2 Requires Multiple E3 Ubiquitin Ligases. *Plant Cell Physiol.* **57** (10): 2175 - 2186
- Lodish H., Berk A., Zipursky L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J.** (2000) Molecular Cell Biology, 4th edition. New York: W. H. Freeman
- Löschberger A., van de Linde S., Dabauvalle M.-C., Rieger B., Heilemann M., Krohne G., Sauer M.** (2012) Super-resolution imaging visualizes the eightfold symmetry of gp210 proteins around the nuclear pore complex and resolves the central channel with nanometer resolution. *Journal of Cell Science* **125**: 570 - 575
- 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** (1): 496 - 501
- Lu D., Lin W., Gao X., Wu S., Cheng C., Avila J., Heese A., Devarenne T. P., He P., Shan L.** (2011) Direct Ubiquitination of Pattern Recognition Receptor FLS2 Attenuates Plant Innate Immunity. *Science* **332**: 1439 - 1442

- Ma W., Smigel A., Walker R. K., Moeder W., Yoshioka K., Berkowitz G. A.** (2010) Leaf Senescence Signaling: The Ca²⁺-Conducting Arabidopsis Cyclic Nucleotide Gated Channel2 Acts through Nitric Oxide to Repress Senescence Programming. *Plant Physiology* **154**: 733 - 743
- Macho A. P., Zipfel C.** (2014) Plant PRRs and the Activation of Innate Immune Signaling. *Molecular Cell* **54**: 263 - 272
- Mackey D., Holt B. F. III, 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
- 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
- Matsui M., Stoop C. D., von Arnim A. G., Wei N., Deng X.-W.** (1995) *Arabidopsis* COP1 protein specifically interacts *in vitro* with a cytoskeleton-associated protein, CIP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 4239 - 4243
- McCue J.** (2009) Theory and use of hydrophobic interaction chromatography in protein purification applications. *Methods Enzymol.* **463**: 405 - 414
- Meng X., Zhang S.** (2013) MAPK Cascades in Plant Disease Resistance Signaling. *Annu. Rev. Phytopathol.* **51**: 245 - 266
- Miao Y., Zentgraf U.** (2010) A HECT E3 ubiquitin ligase negatively regulates Arabidopsis leaf senescence through degradation of the transcription factor WRKY53. *Plant J.* **63**: 179 - 188
- Mudgett M. B.** (2005) New Insights to the Function of Phytopathogenic Bacterial Type III Effectors in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **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
- Nakamura S., Mano S., Tanaka Y., Ohnishi M., Nakamori C., Araki M., Niwa T., Nishimura M., Kaminaka H., Nakagawa T., Sato Y., Ishiguro S.** (2010) Gateway binary vectors with the bialaphos resistance gene, bar, as a selection marker for plant transformation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74** (6): 1315 - 1319
- Okamoto T., Schwab R. B., Scherer P. E., Lisanti M. P.** (2001) Analysis of the association of proteins with membranes. *Curr Protoc Cell Biol.* Chapter 5:Unit 5.4.

- Peitzsch R. M., McLaughlin S.** (1993) Binding of Acylated Peptides and Fatty Acids to Phospholipid Vesicles: Pertinence to Myristoylated Proteins. *Biochemistry* **32**: 10436 - 10443
- Piquerez S. J. M., Balmuth A. L., Sklenár J., Jones A. M. E., Rathjen J. P., Ntoukakis V.** (2014) Identification of Post-translational Modifications of Plant Protein Complexes. *Journal of Visualized Experiments* **84**: e51095
- Qin F., Sakuma Y., Phan Tran L.-S., Maruyama K., Kidokoro S., Fujita Y., Fujita M., Umezawa T., Sawano Y., Miyazono K.-I., Tanokura M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.** (2008) *Arabidopsis* DREB2A-Interacting Proteins Function as RING E3 Ligases and Negatively Regulate Plant Drought Stress-Responsive Gene Expression. *Plant Cell* **20**: 1693 - 1707
- Raab S.** (2008) Charakterisierung von Komponenten des ABA- und stressabhängigen Regulationsnetzwerks aus *Arabidopsis thaliana*. Dissertation, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
- Raab S., Drechsel G., Zarepour M., Hartung W., Koshiba T., Bittner F., Hoth S.** (2009) Identification of a novel E3 ubiquitin ligase that is required for suppression of premature senescence in *Arabidopsis*. *Plant J.* **59**: 39 - 51
- 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** (4): 426 - 433
- Rao V. S., Srinivas K., Sujini G. N., Sunand Kumar G. N.** (2014) Protein-Protein Interaction Detection: Methods and Analysis. *Int J Proteomics* **2014**: DOI: 10.1155/2014/147648
- Rasmussen M. W., Roux M., Petersen M., Mundy J.** (2012) MAP kinase cascades in *Arabidopsis* innate immunity. *Front Plant Sci.* **3**: DOI: 10.3389/fpls.2012.00169
- Reddy A. S. N., Day I. S.** (2001) Kinesins in the *Arabidopsis* genome: A comparative analysis among eukaryotes. *BMC Genomics* **2**: 2
- Ren C., Zhu Y., Zhang P., Gong Q.** (2016) *Arabidopsis* COP1-interacting protein 1 is a positive regulator of ABA response. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **477**: 847 - 853
- Rodriguez E., El Ghouli H., Mundy J., Petersen M.** (2016) Making sense of plant autoimmunity and 'negative regulators'. *FEBS J.* **283** (8): 1385 - 1391
- Robatzek S., Chinchilla D., Boller T.** (2006) Ligand-induced endocytosis of pattern recognition receptor FLS2 in *Arabidopsis*. *Genes & Development* **20**: 537 - 542

- Rolland N., Ferro M., Ephritikhine G., Marmagne A., Ramus C., Brugière S., Salvi D., Seigneurin-Berny D., Bourguignon J., Barbier-Brygoo H., Joyard J., Garin J.** (2006) A versatile method for deciphering plant membrane proteasomes. *Journal of Experimental Botany* **57** (7): 1579 - 1589
- Sadowski M., Suryadinata R., Tan A. R., Roesley S. N. A., Sarcevic B.** (2012) Protein Monoubiquitination and Polyubiquitination Generate Structural Diversity to Control Distinct Biological Processes. *IUBMB Life* **64** (2): DOI: 10.1002/iub.589
- Saito N., Kaneko K.** (2017) Embedding dual function into molecular motors through collective motion. *Sci Rep* **10** (7): 44288
- Salt J. N., Yoshioka K., Moeder W., Goring D. R.** (2011) Altered Germination and Subcellular Localization Patterns for PUB44/SAUL1 in Response to Stress and Phytohormone Treatments. *PLoS ONE* **6** (6): e21321
- Samuel M. A., Mudgil Y., Salt J. N., Delmas F., Ramachandran S., Chilelli A., Goring D. R.** (2008) Interactions between the S-Domain Receptor Kinases and AtPUB-ARM E3 Ubiquitin Ligases Suggest a Conserved Signaling Pathway in Arabidopsis. *Plant Physiology* **147**: 2084 - 2095
- Saracco S. A., Hansson M., Scalf M., Walker J. M., Smith L. M., Vierstra R. D.** (2009) Tandem affinity purification and mass spectromic analysis of ubiquitylated proteins in Arabidopsis. *Plant J.* **59**: 344 - 358
- Schubert D., Lechtenberg B., Forsbach A., Gils M., Bahadur S., Schmidt R.** (2004) Silencing in Arabidopsis T-DNA Transformants: The Predominant Role of a Gene-Specific RNA Sensing Mechanism versus Position Effects. *Plant Cell* **16**: 2561 - 2572
- Seo P. J., Lee A.-K., Xiang F., Park C.-M.** (2008) Molecular and Functional Profiling of *Arabidopsis Pathogenesis-Related* Genes: Insights into Their Roles in Salt Response of Seed Germination. *Plant Cell Physiol.* **49** (3): 334 - 344
- Sharma M., Pandey A., Pandey G. K.** (2013) Role of Plant U-BOX (PUB) Protein in Stress and Development. *Plant Stress* **7**: 1-9
- Smalle J., Vierstra R. D.** (2004) The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol.* **55**: 555 - 590
- Spoel S. H., Dong X.** (2012) How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nat Rev Immunol.* **12** (2): 89 - 100
- 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*. *Plant Cell* **24**: 4703 - 4716

- Stone S. L., Hauksdóttir H., Troy A., Herschleb J., Kraft E., Callis J.** (2005) Functional Analysis of the RING-Type Ubiquitin Ligase Family of Arabidopsis. *Plant Physiology* **137**: 13 - 30
- Stone S. L.** (2014) The role of ubiquitin and the 26S proteasome in plant abiotic stress signaling. *Front Plant Sci* **5**: DOI: 10.3389/fpls.2014.00135
- Strauß T.** (2016) Characterization of a SAUL1-interacting kinesin-5. Masterarbeit, Universität Hamburg
- Studer R. A., Dessailly B. H., Orengo C. A.** (2013) Residue mutations and their impact on protein structure and function: detecting beneficial and pathogenic changes. *Biochem. J.* **449**: 581 - 594
- Stuttman J., Lechner E., Guérois E., Parker J. E., Nussaume L., Genschik P., Noël L. D.** (2009). COP9 Signalosome- and 26S Proteasome-dependent Regulation of SCF^{TIR1} Accumulation in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **284** (12): 7920 - 7930
- Swatek K. N., Komander D.** (2016) Ubiquitin modifications. *Cell Research* **26**: 399 - 422
- Teale W. D., Paponov I. A., Palme K.** (2006) Auxin in action: signaling, transport and the control of plant growth and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7** (11): 847 - 859
- Tong M., Kotur T., Liang W., Vogelmann K., Kleine T., Leister D., Brieske C., Yang S., Luedke D., Wiermer M., Zhang Y., Li X., Hoth S.** (2017) E3 ligase SAUL1 serves as a positive regulator of PAMP-triggered immunity and its homeostasis is monitored by TNL SOC3. *New Phytologist*: DOI: 10.1111/nph.14678
- Truebestein L., Leonard T. A.** (2016) Coiled-coils: The long and short of it. *Bioassays* **38**: 903 - 916
- 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
- Van Aken O., Pečenková T., van de Cotte B., De Rycke R., Eeckhout D., Fromm H., De Jaeger G., Witters E., Beemster G. T. S., Inzé D., Van Breusegem F.** (2007) Mitochondrial type-I prohibitins of *Arabidopsis thaliana* are required for supporting proficient meristem development. *Plant J.* **52**: 850 - 864
- Van de Linde S., Löschberger A., Klein T., Heidbreder M., Wolter S., Heilemann M., Sauer M.** (2011) Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. *Nature Protocols* **6** (7): 991 - 1009
- Van Leene J., Eeckhout D., Cannoot B., De Winne N., Persiau G., Van De Slijke E., Vercruyse L., Dedecker M., Verkest A., Vandepoele K., Martens L., Witters E., Gevaert K., De Jaeger G.** (2015) An improved toolbox to unravel the plant cellular machinery by tandem affinity purification of Arabidopsis protein complexes. *Nature Protocols* **10** (1): 169 - 187

- Van Wersch R., Li X., Zhang Y.** (2016) Mighty Dwarfs: *Arabidopsis* Autoimmune Mutants and Their Usages in Genetic Dissection of Plant Immunity. *Front Plant Sci.* **7**: DOI: 10.3389/fpls.2016.01717
- Vanstraelen M., Inzé D., Geelen D.** (2006) Mitosis-specific kinesins in *Arabidopsis*. *TRENDS in Plant Science* **11** (4): 167 - 175
- Verhey K. J., Hammond J. W.** (2009) Traffic control: regulation of kinesin motors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **10** (11): 765 - 777
- Vierstra R. D.** (2009) The ubiquitin–26s proteasome system at the nexus of plant biology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **10** (6): 385 - 397
- 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** (37): DOI: 10.3389/fpls.2014.00037
- Voinnet O., Rivas S., Mestre P., Baulcombe D.** (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* **33**: 949 - 956
- Wakana Y., Villeneuve J., van Galen J., Cuz-Garcia D., Tagaya M., Malhotra V.** (2013) Kinesin-5/Eg5 is important for transport of CARTS from the trans-Golgi network to the cell surface. *J. Cell Biol.* **202** (2): 241 - 250
- Walczak C. E., Mitchison T. J., Desai A.** (1996) XKCM1: A *Xenopus* Kinesin-Related Protein That Regulates Microtubule Dynamics during Mitotic Spindle Assembly. *Cell* **84**: 37 - 47
- Wang C., Tian Q., Hou Z., Mucha M., Aukerman M., Olsen O.-A.** (2007) The *Arabidopsis thaliana* *AT PRP39-1* gene, encoding a tetratricopeptide repeat protein with similarity to the yeast pre-mRNA processing protein PRP39, affects flowering time. *Plant Cell Rep* **26**: 1357 - 1366
- Wang F., Zhu D., Huang X., Li S., Gong Y., Yao Q., Fu X., Fan L.-M., Deng X. W.** (2009) Biochemical Insights on Degradation of *Arabidopsis* DELLA Proteins Gained From a Cell-Free Assay System. *Plant Cell* **21**: 2378 - 2390
- Wang Y., Ries A., Wu K., Yang A., Crawford N. M.** (2010) The *Arabidopsis* Prohibitin Gene *PHB3* Functions in Nitric Oxide-Mediated Responses and in Hydrogen Peroxide-Induced Nitric Oxide Accumulation. *Plant Cell* **22**: 249 - 259

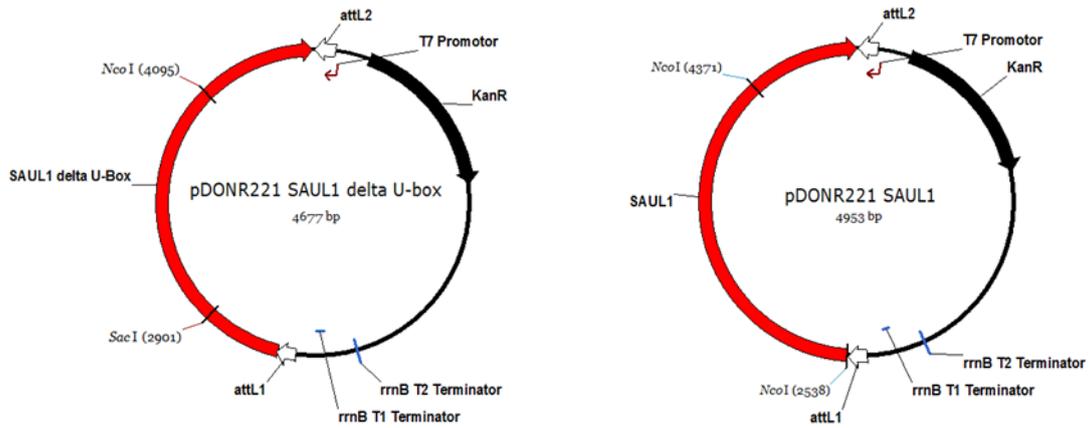
- Wang Z., Meng P., Zhang X., Ren D., Yang S.** (2011) BON1 interacts with the protein kinases BIR1 and BAK1 in modulation of temperature-dependent plant growth and cell death in Arabidopsis. *Plant J.* **67**: 1081 - 1093
- Wang Y., Zhang Y., Wang Z., Zhang X., Yang S.** (2013) A missense mutation in CHS1, a TIR-NB Protein, induces chilling sensitivity in Arabidopsis. *Plant J.* **75**: 553 - 565
- Wang W., Cao L., Wang C., Gigant B., Knossow M.** (2015) Kinesin, 30 years later: Recent insights from structural studies. *Protein Sci.* **24** (7): 1047 - 1056
- Wiedemeier A. M. D., Judy-March J. E., Hocart C. H., Wasteneys G. O., Williamson R. E., Baskin T. I.** (2002) Mutant alleles of *Arabidopsis* *RADIALLY SWOLLEN 4* and *7* reduce growth anisotropy without altering the transverse orientation of cortical microtubules or cellulose microfibrils. *Development* **129** (20): 4821 - 4830
- 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
- Xing S., Wallmeroth N., Berendzen K. W., Grefen C.** (2016) Techniques for Analysis of Protein-Protein Interactions in Vivo. *Plant Physiology* **171** (2): 727 - 758
- Yang S., Hua J.** (2004) A Haplotype-Specific *Resistance* Gene Regulated by *BONZAI1* Mediates Temperature-Dependent Growth Control in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 1060 - 1071
- Yang H., Lo Y., Hua J.** (2006a) The C2 domain protein BAP1 negatively regulates defense responses in Arabidopsis. *Plant J.* **48**: 238 - 248
- Yang C.-W., González-Lamothe R., Ewan R. A., Rowland O., Yoshioka H., Shenton M., Ye H., O'Donnell E., Jones J. D. G., Sadanandom A.** (2006) The E3 Ubiquitin Ligase Activity of *Arabidopsis* PLANT U-BOX17 and Its Functional Tobacco Homolog ACRE276 Are Required for Cell Death and Defense. *Plant Cell* **18**: 1084 - 1098
- Yang H., Yang S., Li Y., Hua J.** (2007) The Arabidopsis *BAP1* and *BAP2* Genes Are General Inhibitors of Programmed Cell Death. *Plant Physiology* **145**: 135 - 146
- Yang D.-L., Shi Z., Bao Y., Yan J., Yang Z., Yu H., Li Y., Gou M., Wang S., Zou B., Xu D., Ma Z., Kim J., Hua J.** (2017) Calcium pumps and interacting BON1 protein modulate calcium signature, stomatal closure, and plant immunity. *Plant Physiology*: DOI: 10.1104/pp.17.00495
- Yee D., Goring D. R.** (2009) The diversity of plant U-box E3 ubiquitin ligases: from upstream activators to downstream target substrates. *Journal of Experimental Botany* **60** (4): 1109 - 1121

- 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. *Plant J.* **75**: 539 - 552
- Zeng L.-R., Qu S., Bordeos A., Yang C., Baraoidan M., Yan H., Xie Q., Nahm B. H., Wang G.-L. (2004)** *Spottead leaf11*, a Negative Regulator of Plant Cell Death and Defense, Encodes a U-Box/Armadillo Repeat Protein Endowed with E3 Ubiquitin Ligase Activity. *Plant Cell* **16**: 2795 - 2808
- 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*. *Plant Cell* **15**: 2636 - 2646
- Zhang J., Li W., Xiang T., Liu Z., Laluk K., Ding X., Zou Y., Gao M., Zhang X., Chen S., Mengiste T., Zhang Y., Zhou J.-M. (2010)** Receptor-like Cytoplasmic Kinases Integrate Signaling from Multiple Plant Immune Receptors and Are Targeted by a *Pseudomonas syringae* Effector. *Cell Host Microbe* **7** (4): 290 - 301
- Zhang Y., Gu L., Hou Y., Wang L., Deng X., Hang R., Chen D., Zhang X., Zhang Y., Liu C., Cao X. (2015)** Integrative genome-wide analysis reveals HLP1, a novel RNA-binding protein, regulates plant flowering by targeting alternative polyadenylation. *Cell Research* **25**: 864 - 876
- Zhang Y., Wang Y., Liu J., Ding Y., Wang S., Zhang X., Liu Y., Yang S. (2017)** Temperature-dependent autoimmunity mediated by *chs1* requires its neighboring *TNL* gene *SOC3*. *New Phytologist* **213**: 1330 - 1345

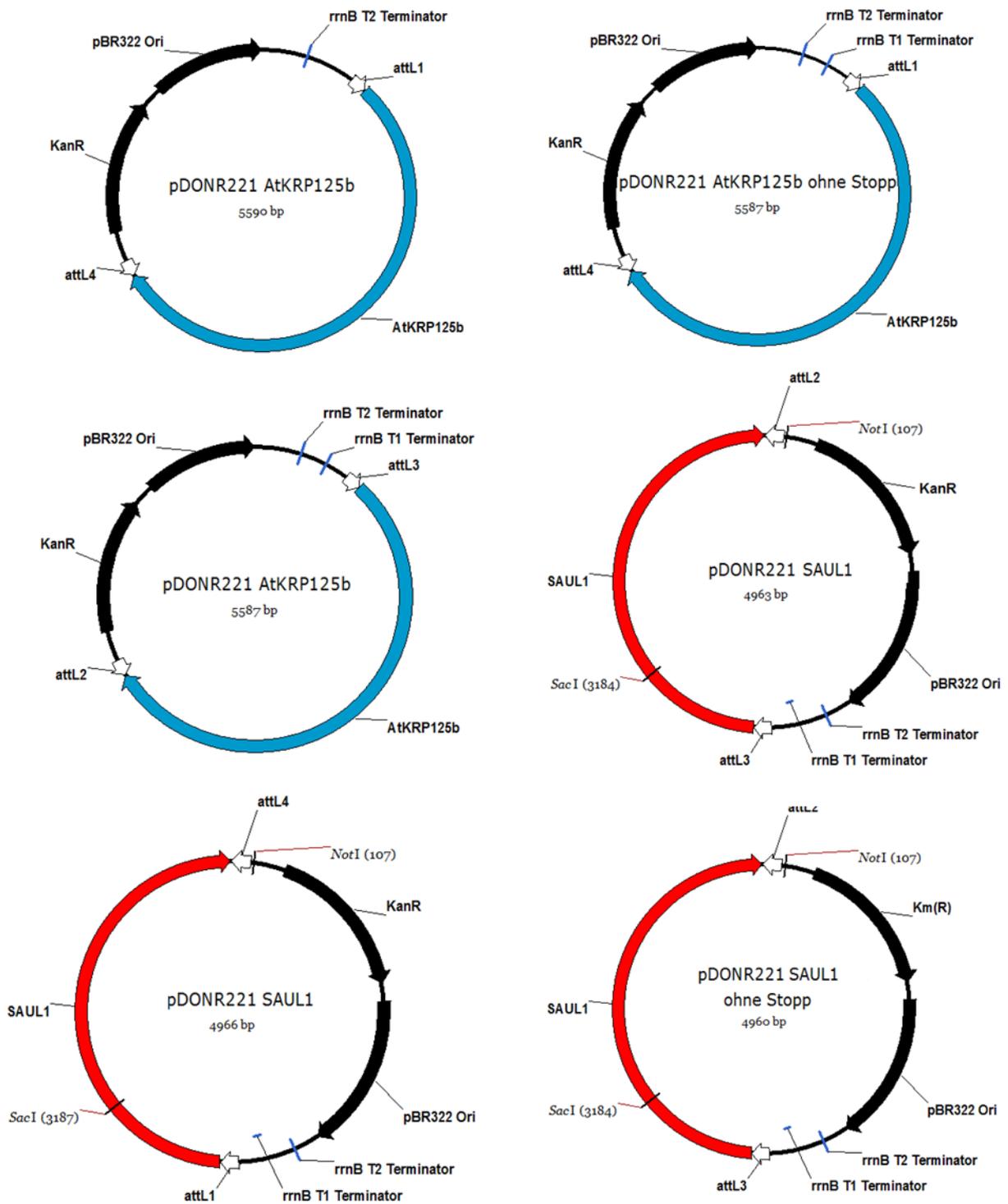
7. Anhang

7.1. Vektorkarten

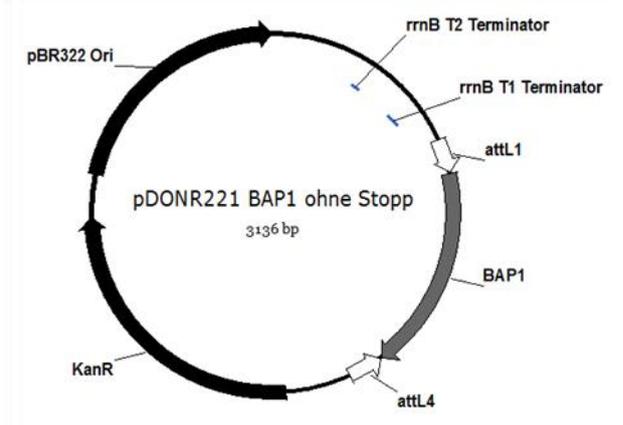
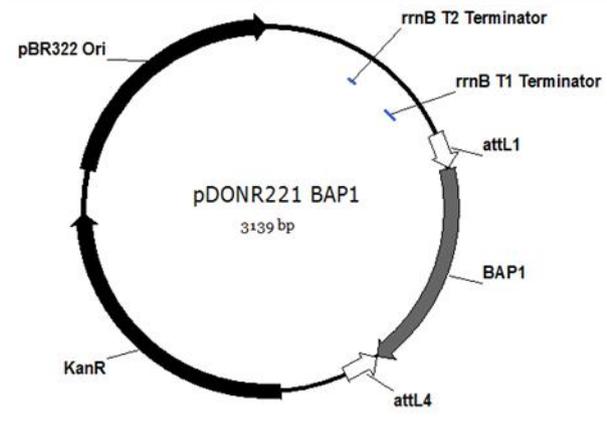
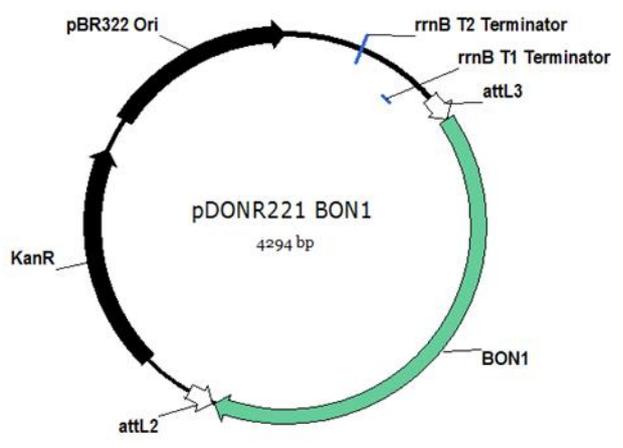
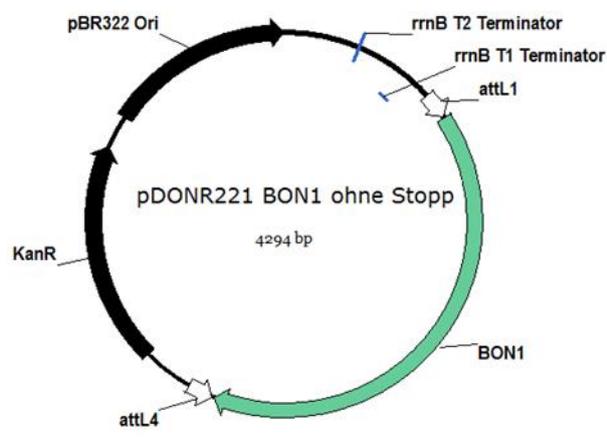
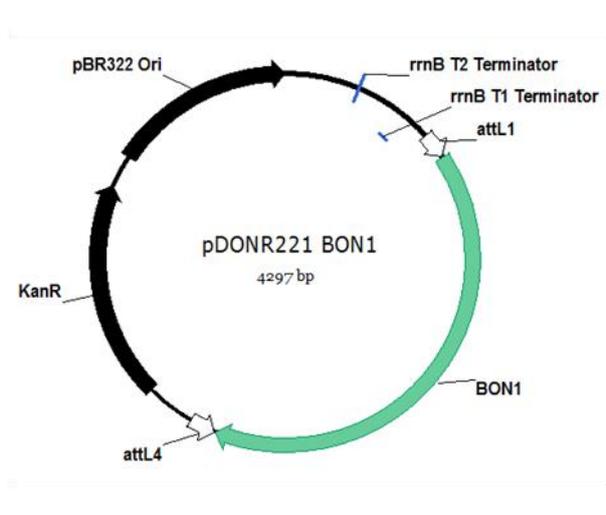
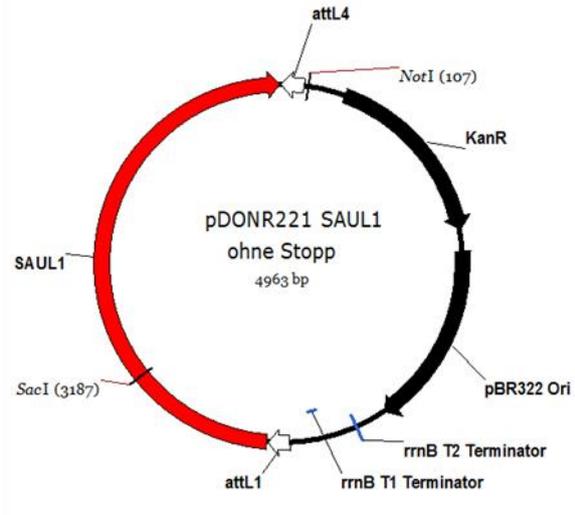
7.1.1. Hergestellte pDONR221™ Ausgangsvektoren für die Tandemaffinitätsaufreinigung



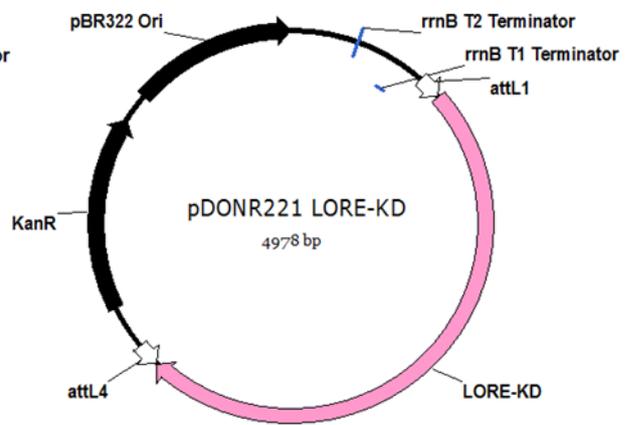
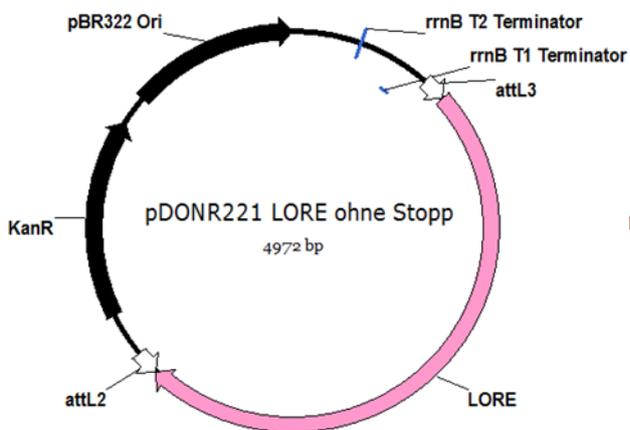
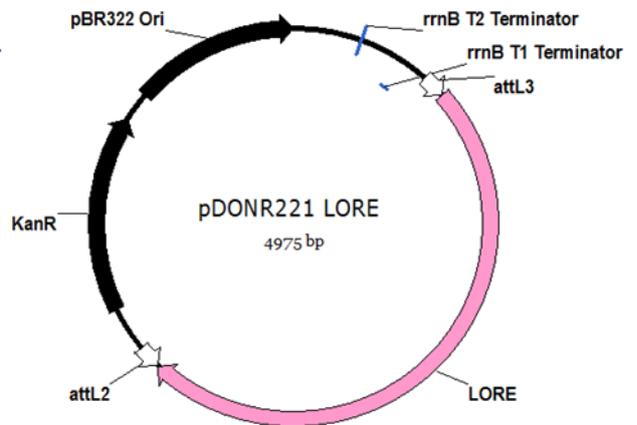
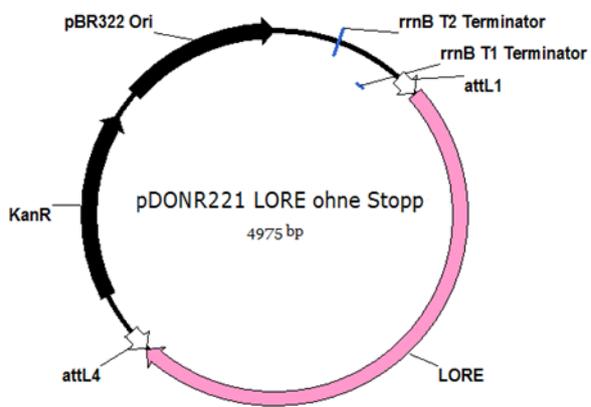
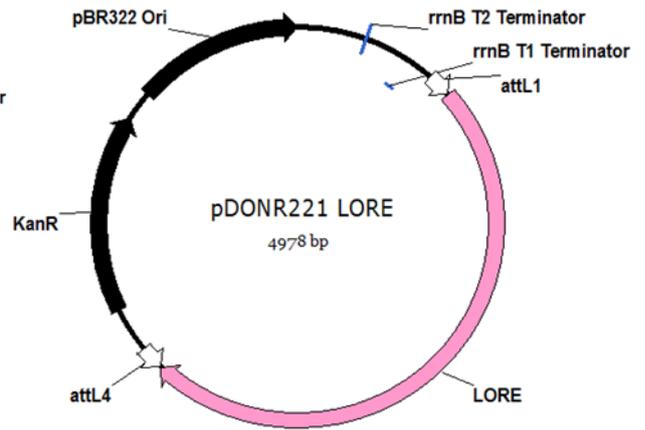
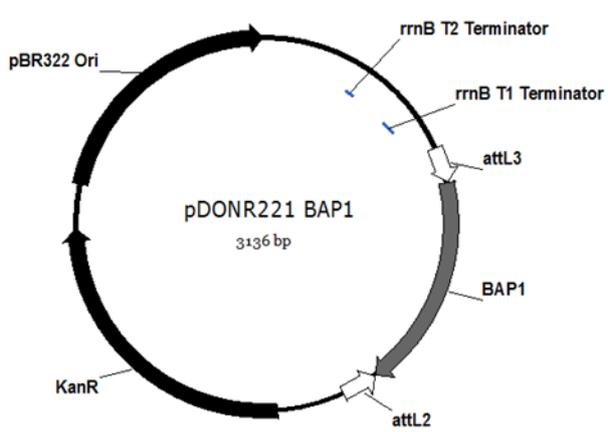
7.1.2. Hergestellte pDONR221™ Ausgangsvektoren für die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)



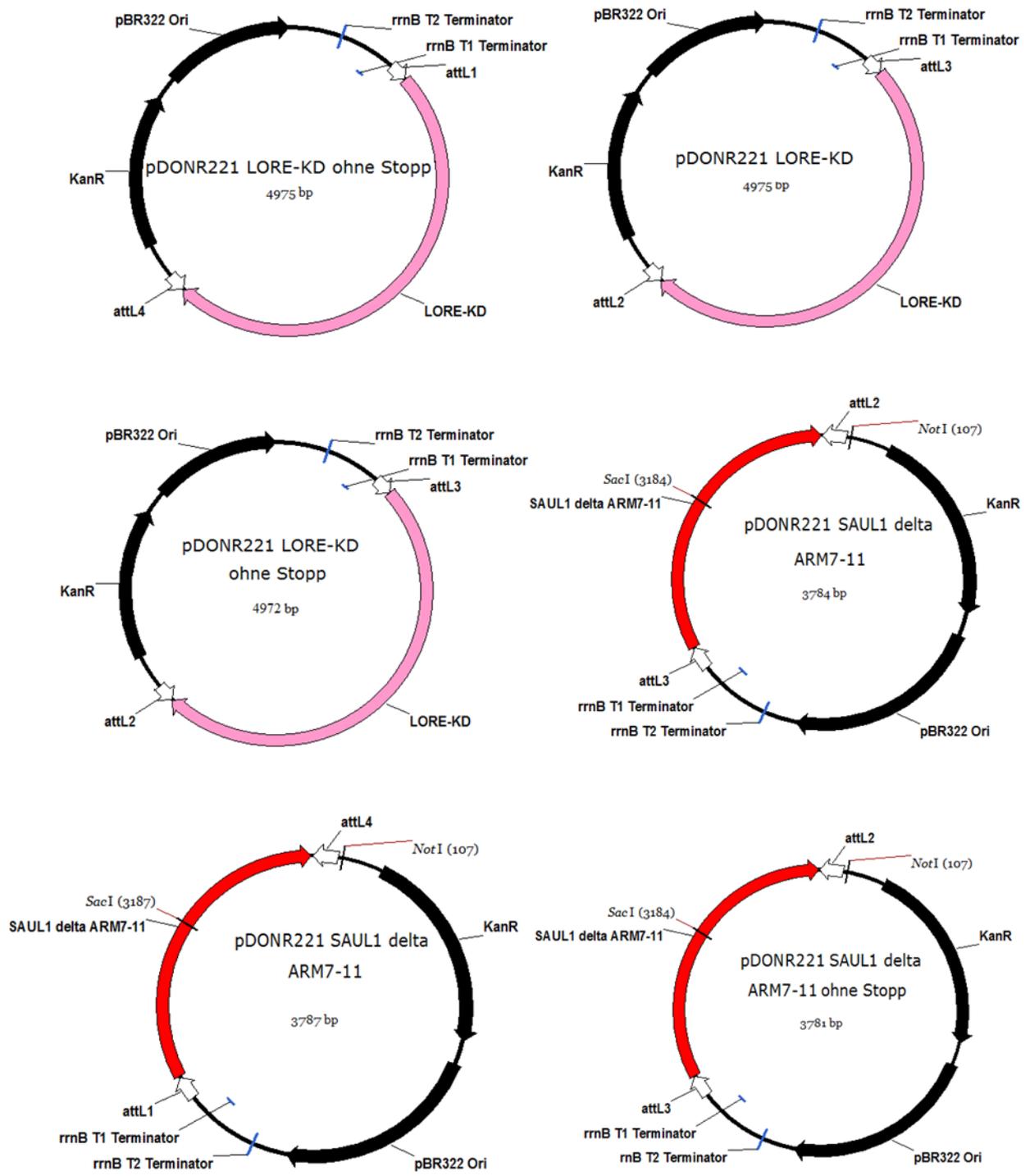
Anhang



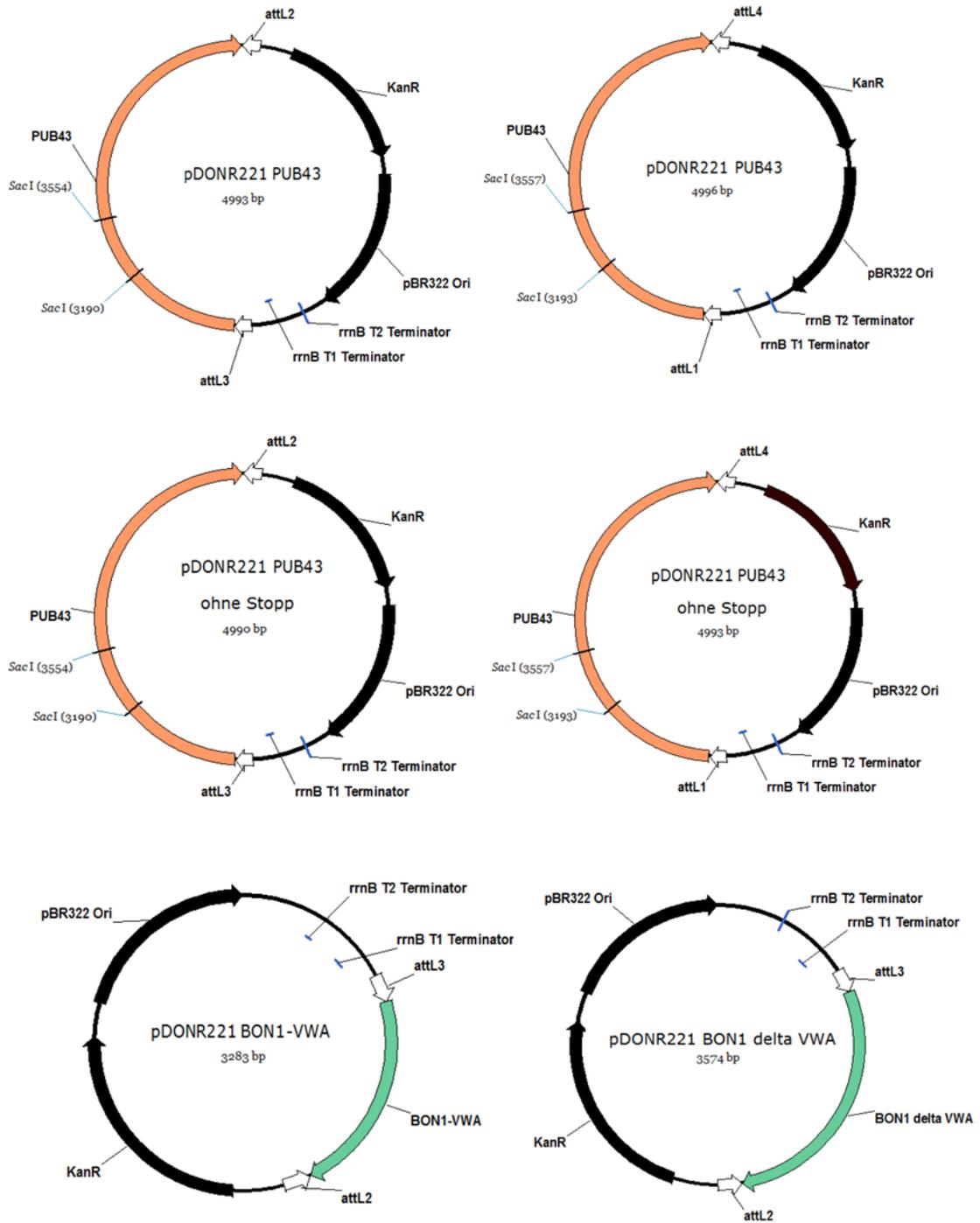
Anhang



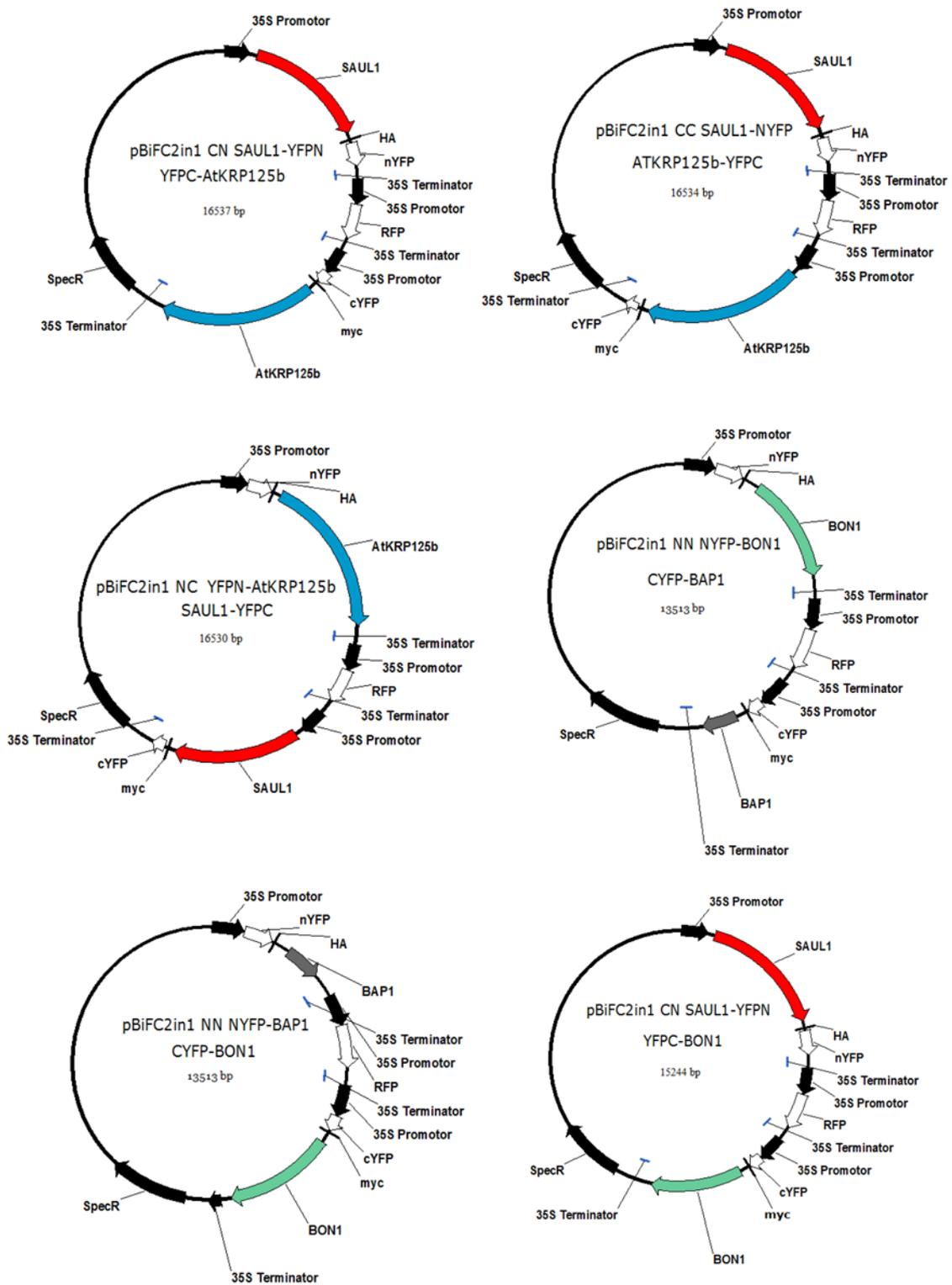
Anhang



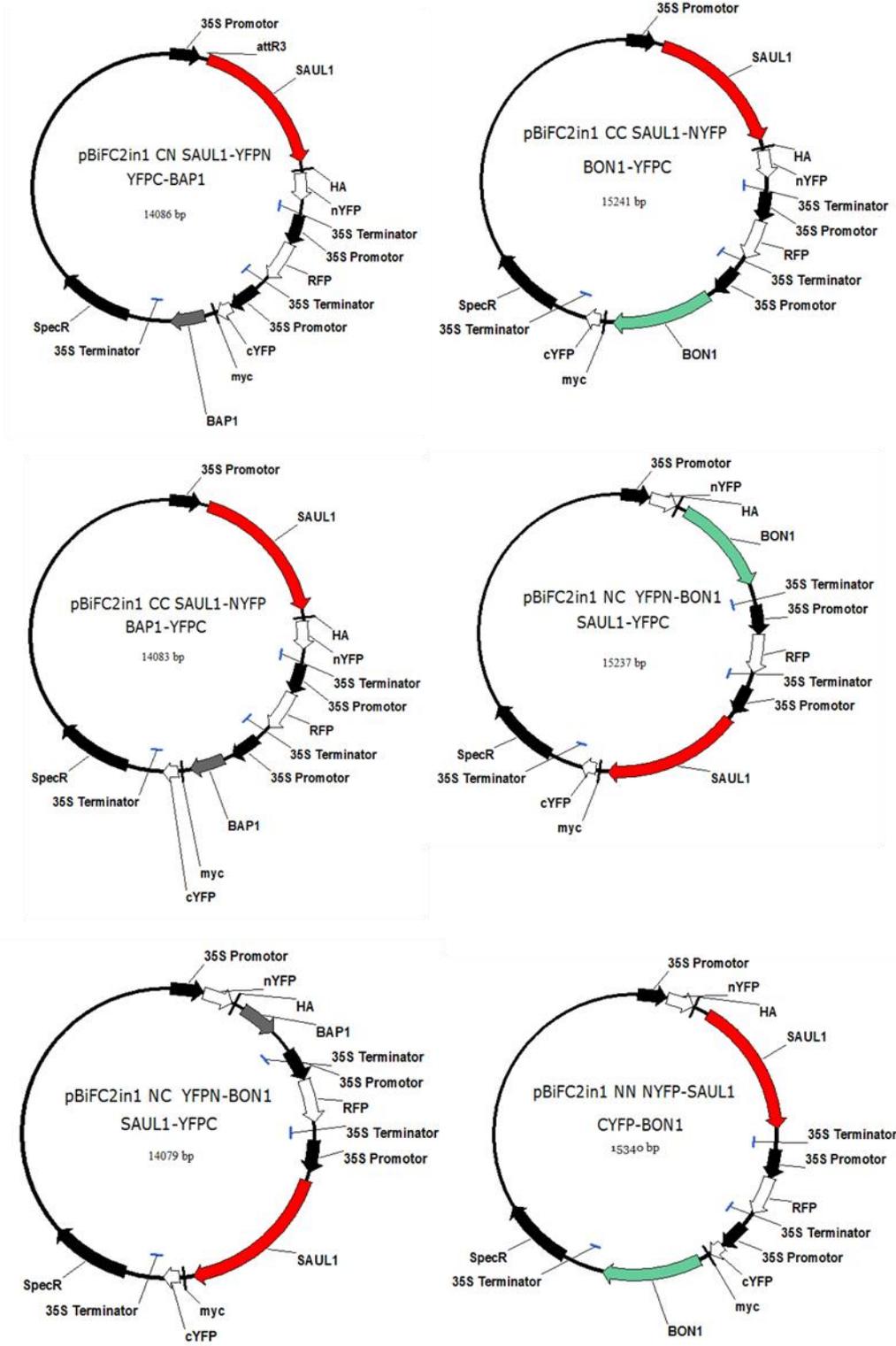
Anhang



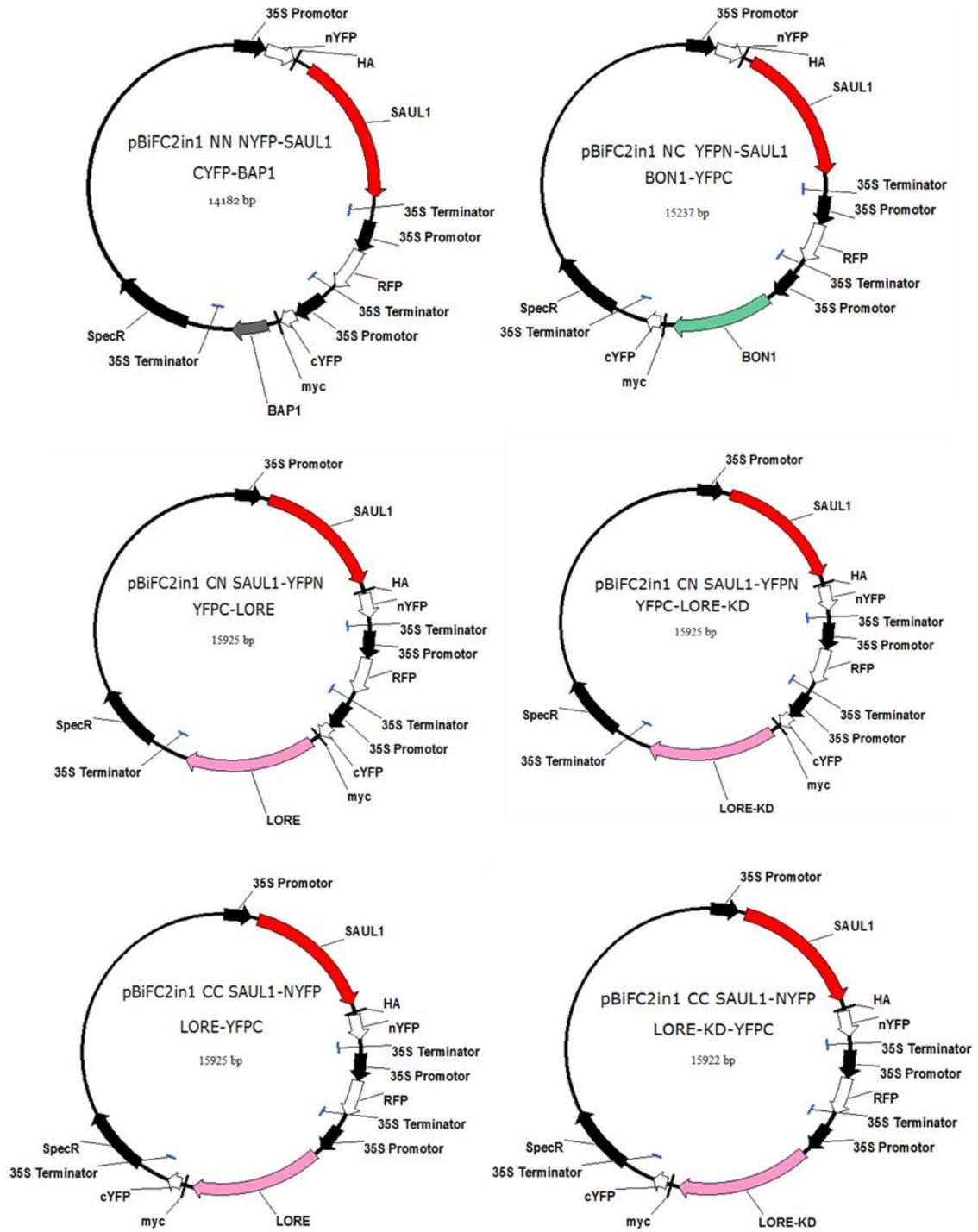
7.1.3. Hergestellte Zielvektoren für die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)



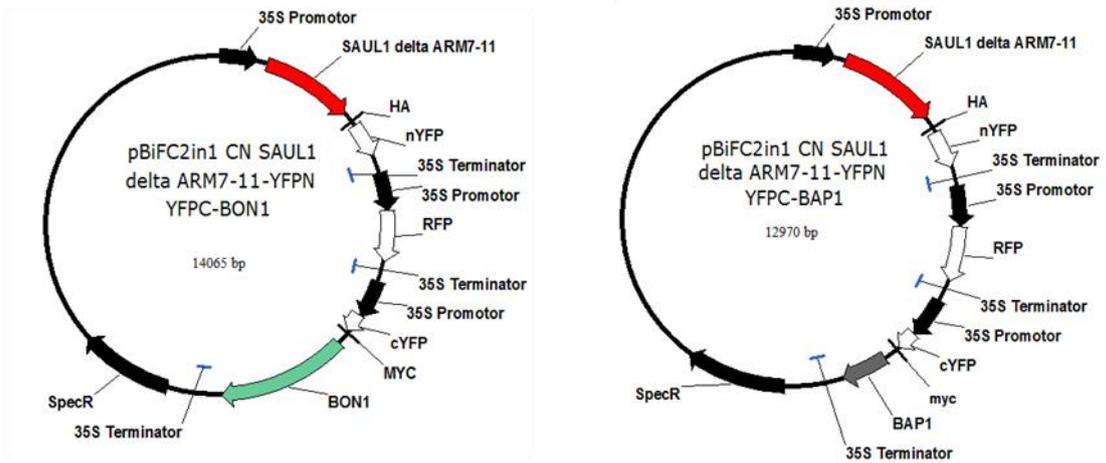
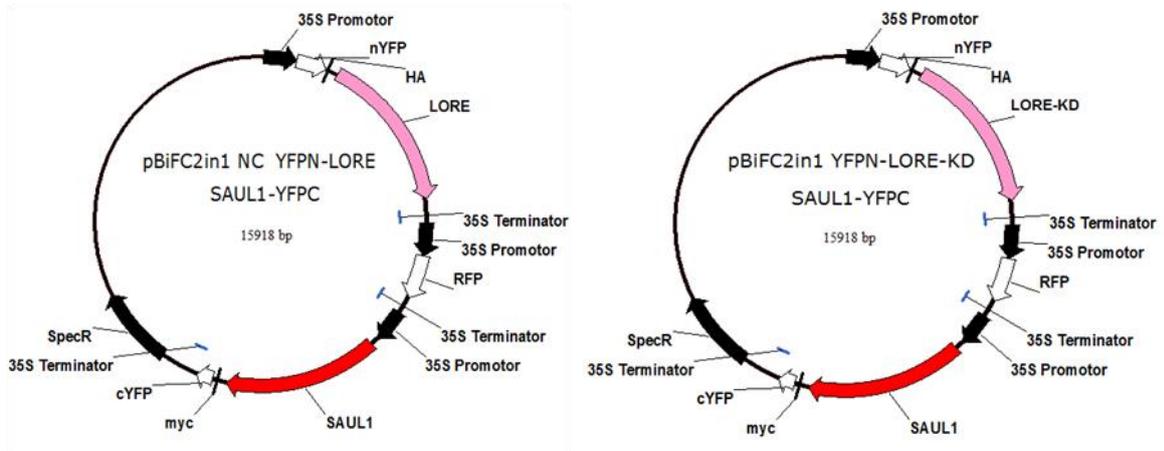
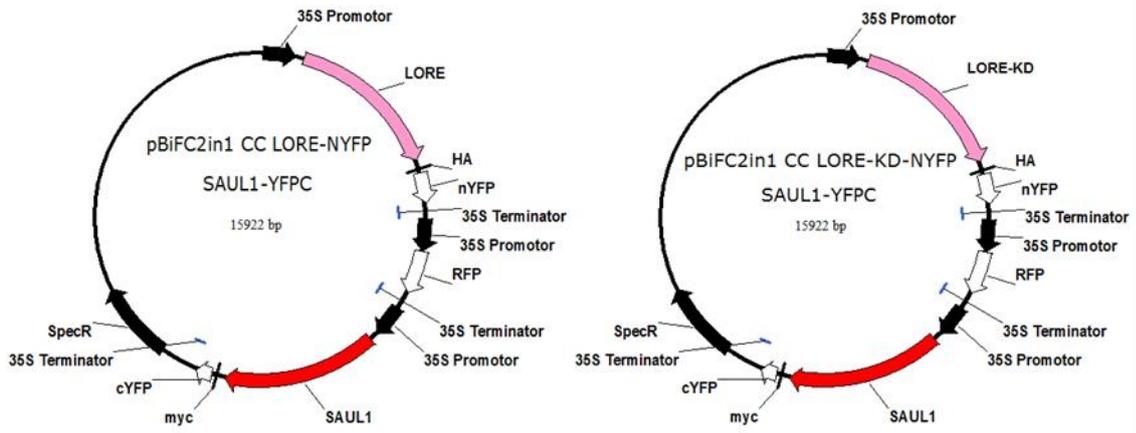
Anhang



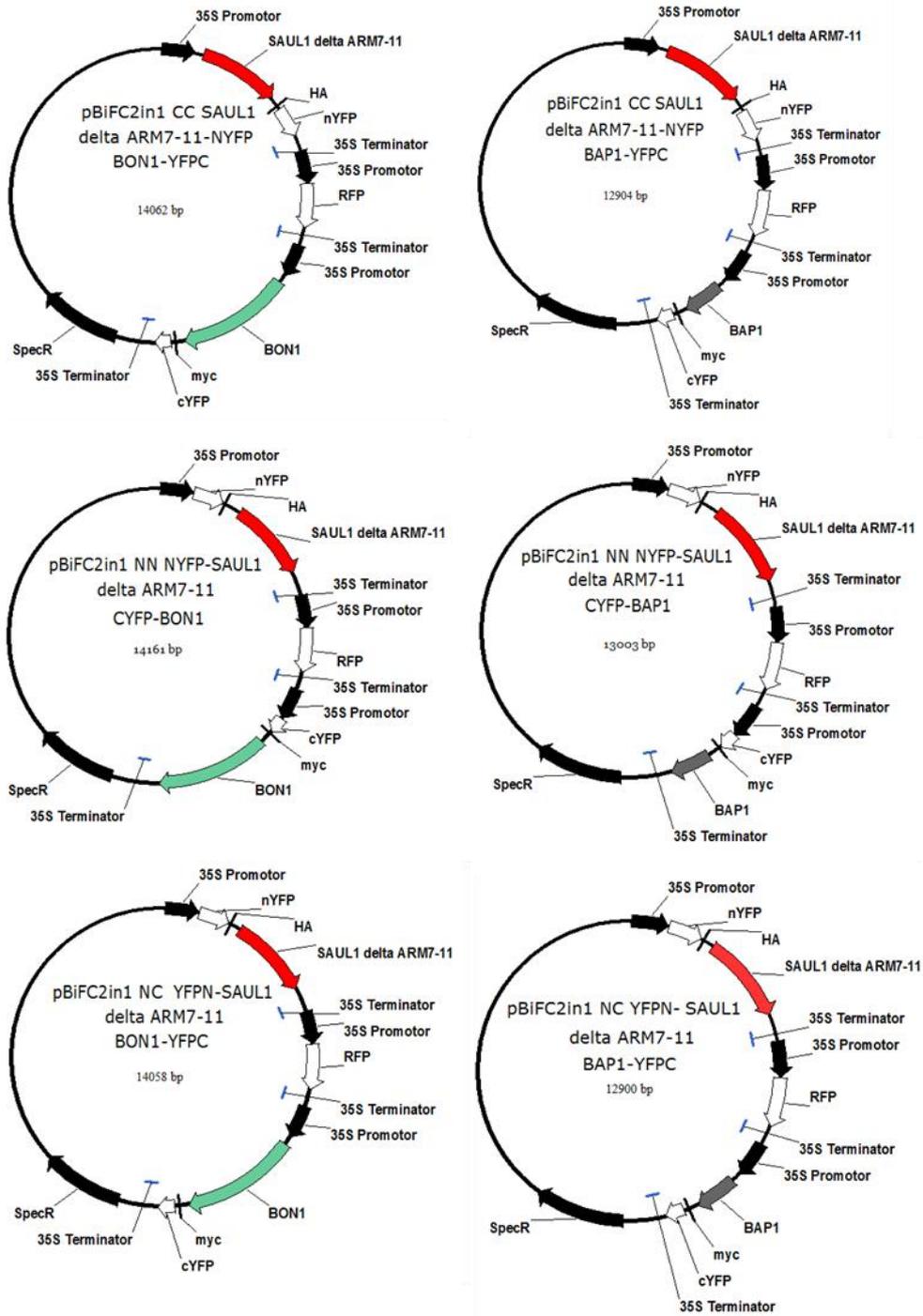
Anhang



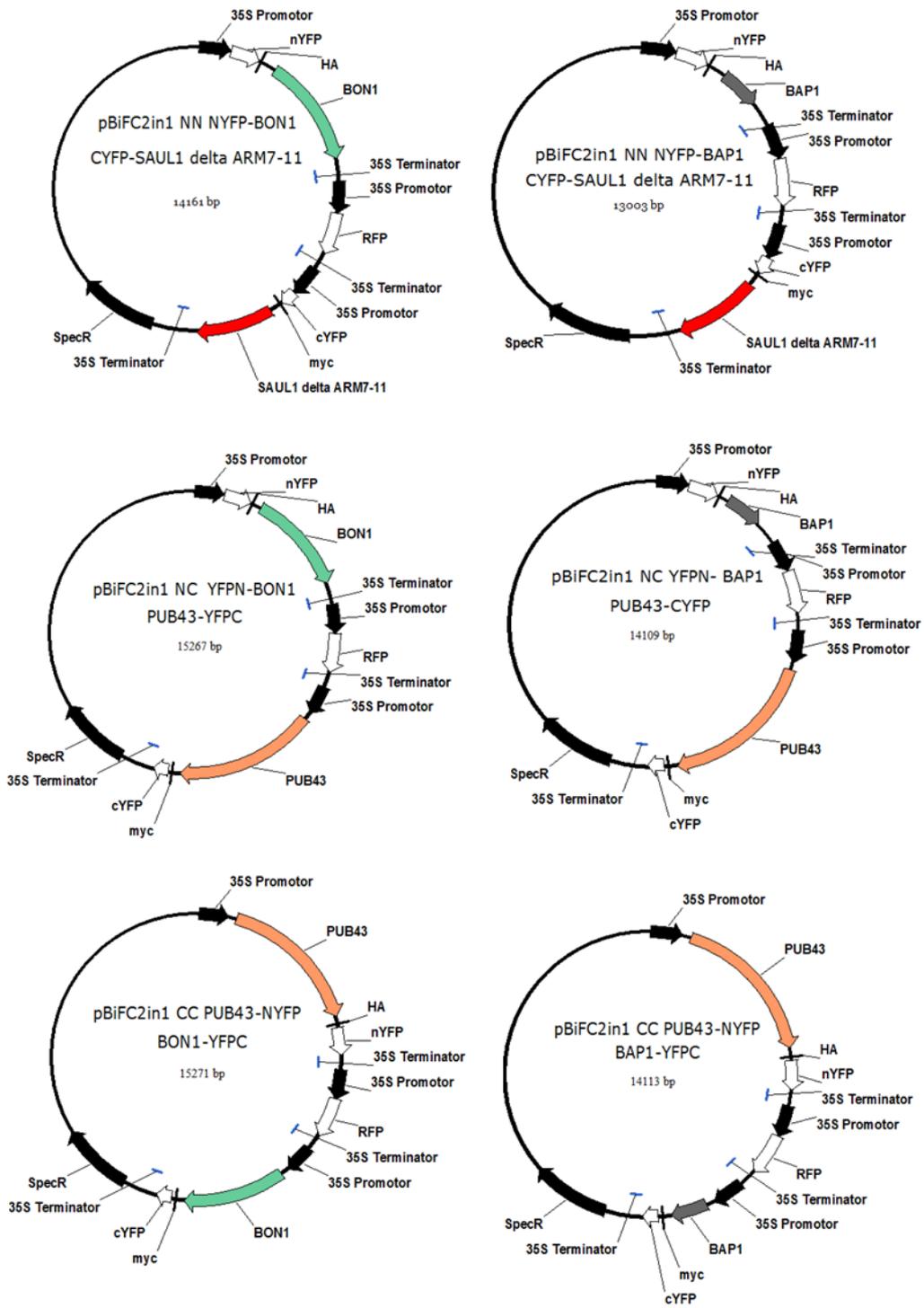
Anhang



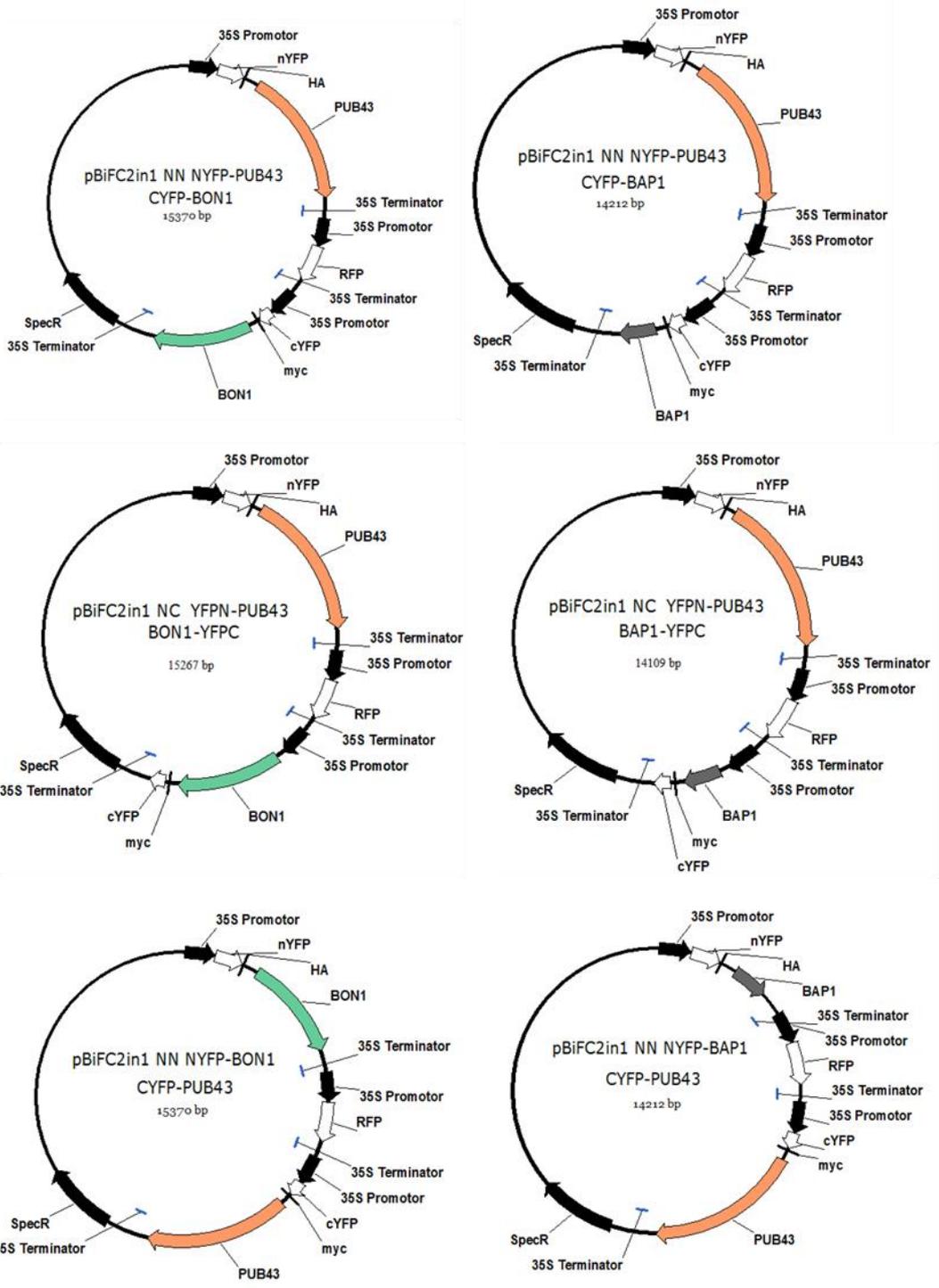
Anhang



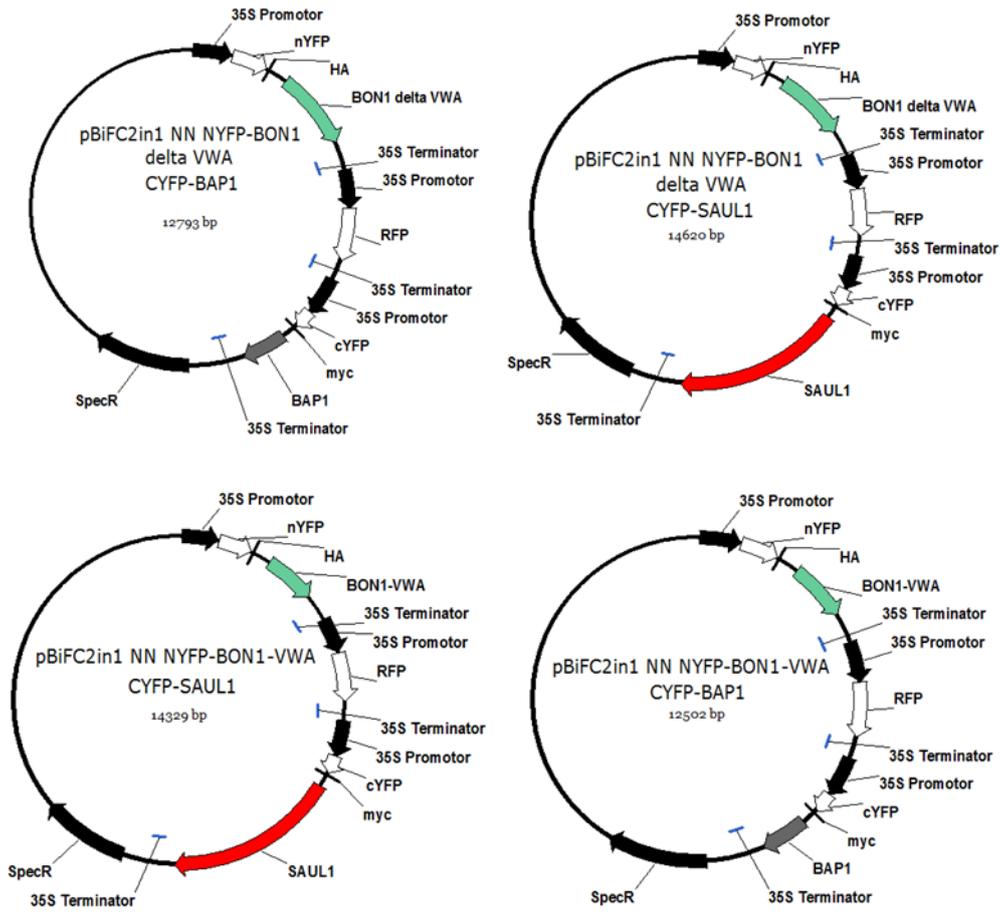
Anhang



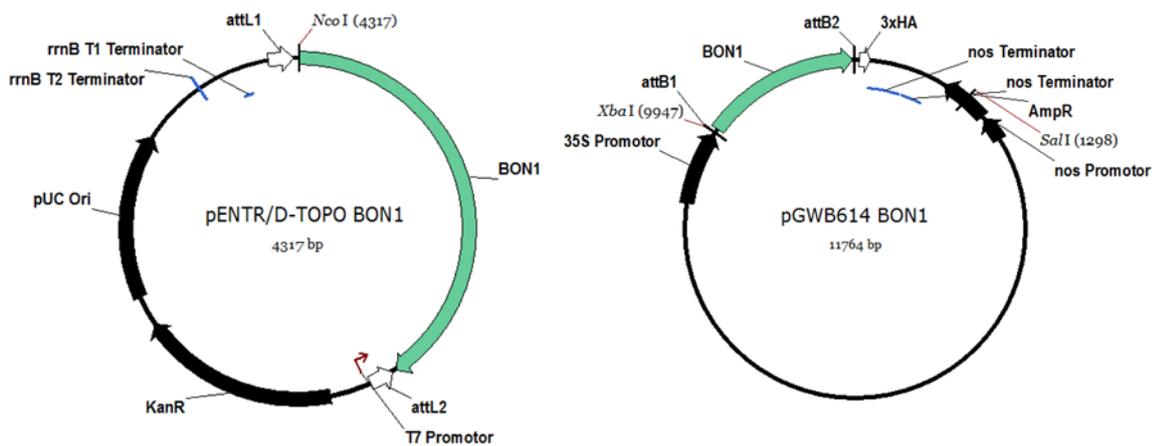
Anhang



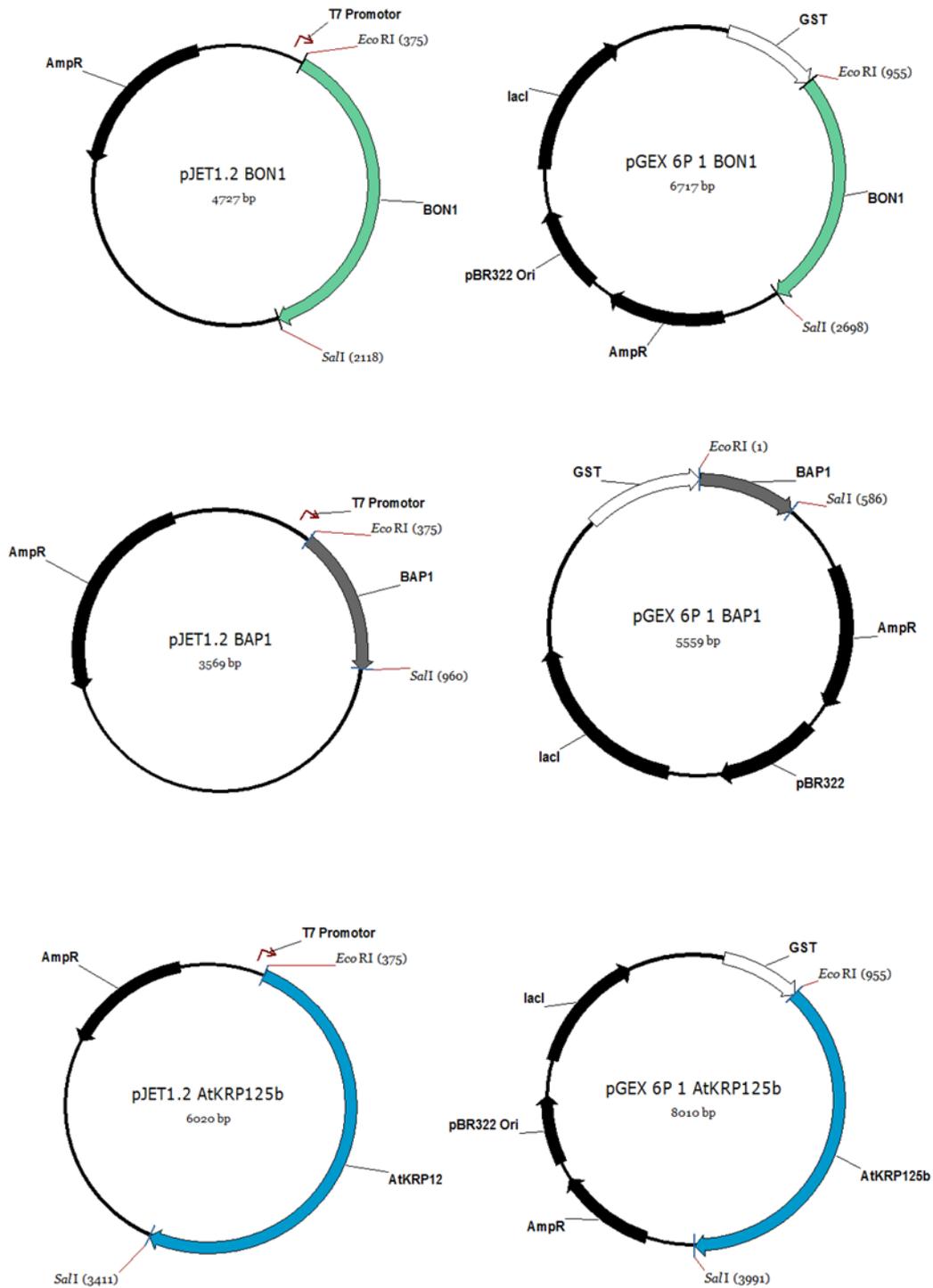
Anhang



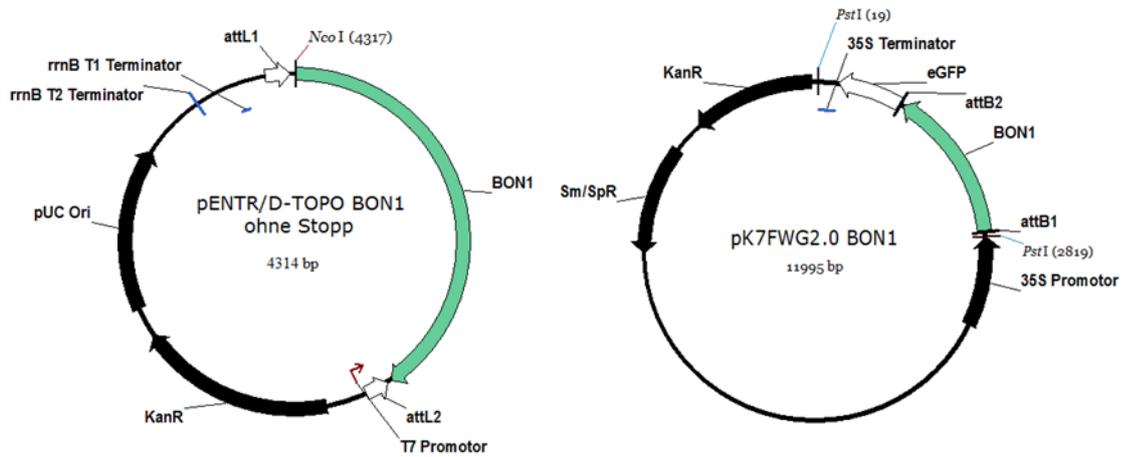
7.1.4. Hergestellte Konstrukte zur Co-Immunopräzipitation (Co-IP)



7.1.5. Hergestellte Konstrukte zur rekombinanten Proteinexpression



7.1.6. Hergestellte Konstrukte zur Proteinlokalisierung



7.2. Expressionsmuster von PUB42 in *A. thaliana*

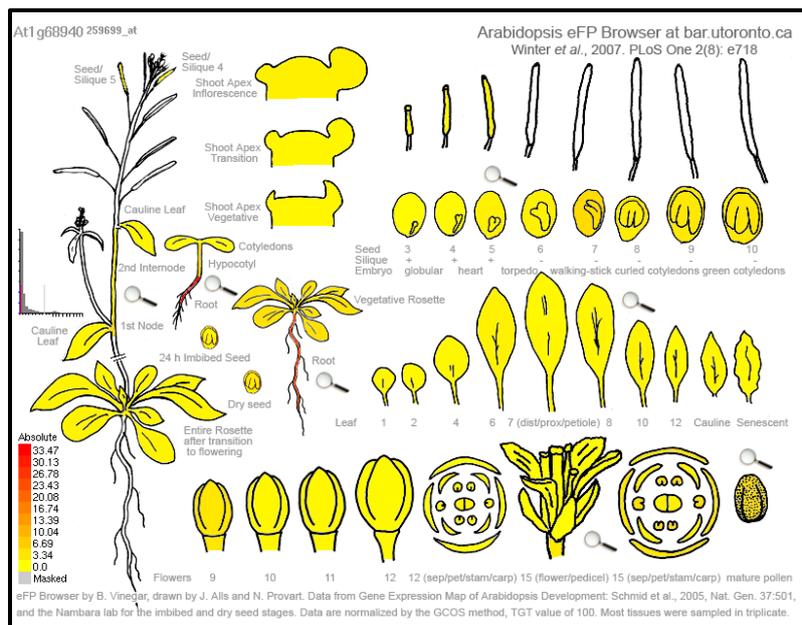


Abbildung 7.1: eFP Browser Expressionsmuster von *PUB42* in *A. thaliana* (Stand 07.03.2017)

7.3. Aminosäuresequenzalignment von PUB44, PUB43 und PUB42

```

PUB42      MEIQTAESNVICSIDIFESLSDSDVDVAKKLVEKSQESNEAESTTDLRSIEAGFEGVVKQM
PUB43      -----MAGSGSWDGSQSDNSSQFEPGIDNI-----
PUB44      -----MVGSSDGDQSDSSSHFERGVDHI-----
              * :...: : : * *.: :

PUB42      GETLQSIPESTFDEEEYIGVVIQSLSNEMQNATIGDGSKSEMINNGQQKISAKHTPDIVS
PUB43      -----
PUB44      -----

PUB42      EQMEEDLYPTDPEFSYESYMMYSESQSQMTDIPDIPSKSTDVSRQRKHGNHSESQSLVTE
PUB43      -----
PUB44      -----

PUB42      IPDIPSQSTNVSSQRKHGNLSKSSQSQSTEIPDIPSQSSNASSQRKYGNLSESLMLPQVT
PUB43      -----
PUB44      -----

PUB42      QFMPEPPYQAFICPLTKEIMEDPVTTETGVTCERQAVIEWF-DSFGNSDEINCPVTGQKLT
PUB43      -----YEAFICPLTKQVMHNPVTLENGQTFEREAIKWFQECRENGQPLSCPITSKELS
PUB44      -----YEAFICPLTKEVMHDPVTLENGRTFEREAIEKWFKECRDSGRPPSCPILTSQELT
              *:*****: * :*** * * * ***: :** :. . . . ***:**.:**

PUB42      -TELSANVVLKTIIEQEWKVRNEAARIKVAHAALSLGGSESMVIDALRDLQMTCEGKEYNK
PUB43      ITDLSPSIALRNTIEEWRARNDAKLDIARQSLYLGNNAETNILLALKNVREICRNIRKIR
PUB44      STDVSASIALRNTIEEWRARNDAKLDIARQSLFLGNAETDILQALMHVRQICRTIRSNR
              *:***:..*.. ***: **:* :...: * : * **.: : : ** :. * .

PUB42      VQVREAGIIQLLDRLTYRSKDVRFELKFLRTLDEETDDGKEMIVKTIITMSCVIKLLG
PUB43      QRVCNPQLVRLITDMLKSSSHEVRCKALQTLQVVVEGD-EESKAIVAEGDVRTIVKFLS
PUB44      HGVRNSQLIHMIIDMLKSTSHRVRYKALQTLQVVVEGD-DESKAIVAEGDVRTLVKFLS
              * :. :...: * . * : ** : * : *...: : : : * :...: * : :**:.

PUB42      SSHQPVRHAAQALLLELSKSHACEKIGTARGAILMLVTAKYNRELDSEFASSETSDQILRN
PUB43      QEPSKGREAAVSVLFLSKSEALCEKIGSIHGAILLVGLTSSKSENVSTVEKADKTLTN
PUB44      HEPKSGREAAVSLFLSKSEALCEKIGSIHGAILLVGLTSSNSENVSIVEKADRTLEN
              . . * ** :**:* ***: ***: :**.:** . . . : * :* . * *

PUB42      LEKCPENIKQMAESGLLEPLLGHLAEGSEETQVAMAAYLVEIDIGHEKKTIVAEKACPAL
PUB43      LERSEENVQMAINGRLQPLLAKLLEGSFETKVSMAFYLGVLALNNDVKVIVAQTVGSSL
PUB44      MERSEEIVRQMASYGRLQPLLKLGKLEGSFETKLSMASFLGELPLNNDVKVIVAQTVGSSL
              :*.. * : ** * * : ** : * ** * **.:** * : : : : * . ***:.. :**

PUB42      IGLVQSENIDARRAAFKALAHISLYHPNKKILVEVGIKIMVEEMFTKRVFSDLMNSRNE
PUB43      IDLMRTRDMSQREAAALGALNNISSFEGSAKLLINTGILPPLIKDLFYVGNQLPIRLKEV
PUB44      VDLMRSGDMPQREAAALKALNKISSFEGSAKVLISKGILPPLIKDLFYVGNLPIRLKEV
              :*.: : : * ** : ** :** : . * :*. ** : : : : * . . . :

PUB42      AATILANILESGLEHETFEVNTHGHTLGSDFVYNIHMLKNSSPDDLNLIRILLSLS
PUB43      SATILANIVNIGYDFDKVPGPHQTLVSEEIVENLLQLTSNTGP-EIQGKLLAVLVGLT
PUB44      SATILANIVNIGYDFDK-----ATLVSENRVENLLHLISNTGP-AIQCKLLEVLVGLT
              :*****: * :.. . ** * : * * : : : . * :* : : : * :* :*.:

PUB42      KSPRAMATIVSVIKETDASFAMIELIN-NPHDELGVGALKLLIALTPYIGHTLSERLCKT
PUB43      SCPNSVINVVS AIRNSAAI ISLVQFVEIHENDDLRLASIKLLHNI SPHMSEELANALRST
PUB44      SCPKTVPKVVYAIKTS GAI ISLVQFIEVRENDDLRLASIKLLHNLSPFMSEELAKALCGT
              ..*.: : * . * . : * : : : : : . * :* : : : ** * :*.. * : * *
    
```

Abbildung 7.2: Clustal Aminosäuresequenzalignment der PUB-ARM Proteine PUB42, PUB43 und PUB44 (SAUL1). Erstellt mit MUSCLE (Edgar, 2004) („*“ = vollständig konservierte Aminosäure, „:“ = konservierte Aminosäuren mit sehr ähnlichen Eigenschaften (Scoring > 0,5 in Gonnet PAM 250 Matrix), „.“ = konservierte Aminosäuren mit geringfügig ähnlichen Eigenschaften (Scoring < 0,5 in Gonnet PAM 250 Matrix))

Anhang

```

PUB42      RGQPENLIQCPVEANQ-ITEKHAVSAKLLAKLPHQNLTNLALVNESIVSEILHAIHLIQ
PUB43      VGQLGSLVSIISENTPTITEEQAAAAGLLAELPERDLVLTMRLLREGAFEKIISKIVGIR
PUB44      AGQLGSLVAIISEKTP-ITEEQAAAAGLLAELPDRDLGLTQEMLEVGAFEKIISKVFGIR
          ** .*:   * .  ***:.*:* ***:* .:* * .  :: . .:.*:  : * .

PUB42      RSGARTSRYATDFLEGLVGLVRETTTLY-EPQMMYLARNHDLTSVFDLLMKTSSDEVQ
PUB43      QGEIRGIRFERTFLEGLVILARITFALTKETDATLFCCEKNLPSLFLDLLQSNQDNIQ
PUB44      QGDIKGMRFVNPFLLEGLVRILARITFVFNKEARAINFCREHDVASLFLHLLQSNQDNIQ
          .. .  *:   ***** **.*:* .:  * .  .: .:::.*:*: ** ....*:*:

PUB42      RLSATGLENLSSTTMTLSRPPQPRSTKFMGSLSMPRSFSLSRSSKKKQIEICAIHRGVCSA
PUB43      RASATALENLSLESKNLTKIPELPPPTYCVSI-----FSCLSKPPVVLGICKIHQGICSV
PUB44      MVSAMALENLSLESIKLTRMPDPPPVNYCGSI-----FSCVRKPHVVNGLCKIHQGICSL
          ** .***** : .*:. * : . .: * :   ** .   : * **.*:*

PUB42      KNTFCLVEANAITKLLACLQSDKVEVVESALAAICTLLDDKVEVEKSLSMLSEMNAVQLI
PUB43      RESFCLVEGQAVDKLVDLLDHENDKVVGPALAAALSTLLEDGLDVVQGVRLIDEADGITPI
PUB44      RETFCLVEGGAVEKLVALLDHENVKVVEAALAAALSSLEEDGLDVEKGVKILDEADGIRHI
          .::*****. * : ** : * : : : ** .*****:***:* :* :. : :.* :. : *

PUB42      LNAVKEHKKESLLQKAFWMIDKFIIRGGDKYASEISQDRMLSGLESEKILKVKRDKSHDW
PUB43      LNVLLNRTENLRIRAVWMVERILRI--EEIAREVGEEQNVTA-----
PUB44      LNVLRENRTERLRRAVWMVERILRI--EDIAREVAEEQSLSA-----
          **.: *:. * * .*.**::: .: * *::: . :.

PUB42      CAEISVERGDGGEIWKIVWGSVAVYKLDPLSHSFSVKVLHSASVHV
PUB43      ---ALVDAFQNADFRTRQIAEKALRHIDKIP-NFSGIFTNIG----
PUB44      ---ALVDAFQNADFRTRQIAENALKHIDKIP-NFSSIFPNIA----
          * :  :.:. . . . * : :.* :. .** . : .

```

Abbildung 7.2: Fortsetzung des Clustal Aminosäuresequenzalignments der PUB-ARM Proteine PUB42, PUB43 und PUB44 (SAUL1). Erstellt mit MUSCLE (Edgar, 2004) („*“ = vollständig konservierte Aminosäure, „.“ = konservierte Aminosäuren mit sehr ähnlichen Eigenschaften (Scoring > 0,5 in Gonnet PAM 250 Matrix), „.“ = konservierte Aminosäuren mit geringfügig ähnlichen Eigenschaften (Scoring < 0,5 in Gonnet PAM 250 Matrix))

7.4. Konfokale Aufnahmen der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC)

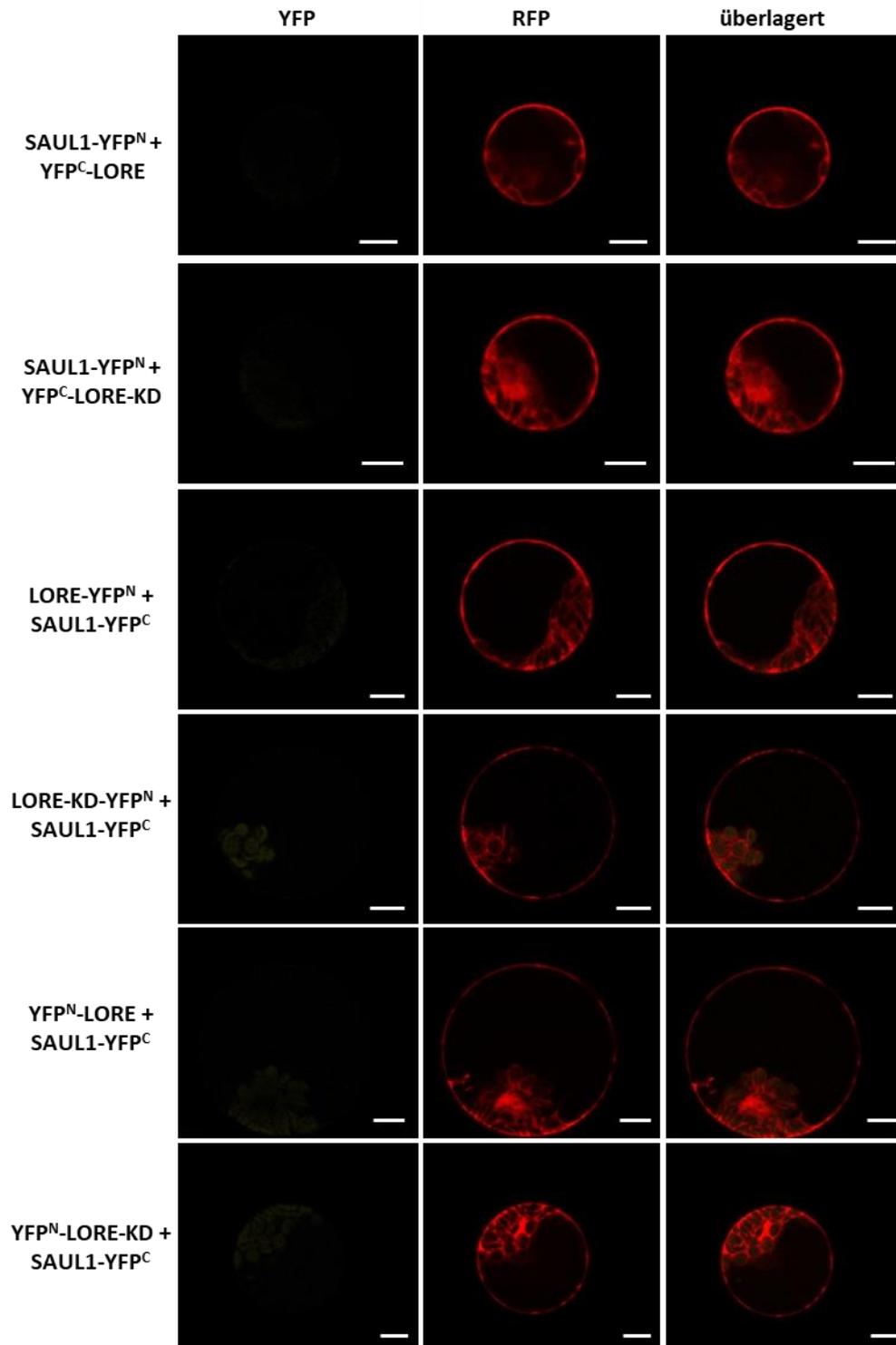


Abb. 7.3: Konfokale Aufnahmen der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation von LORE und SAUL1 in Mesophyllprotoplasten aus *A. thaliana*. Maßstab = 10 μm .

Anhang

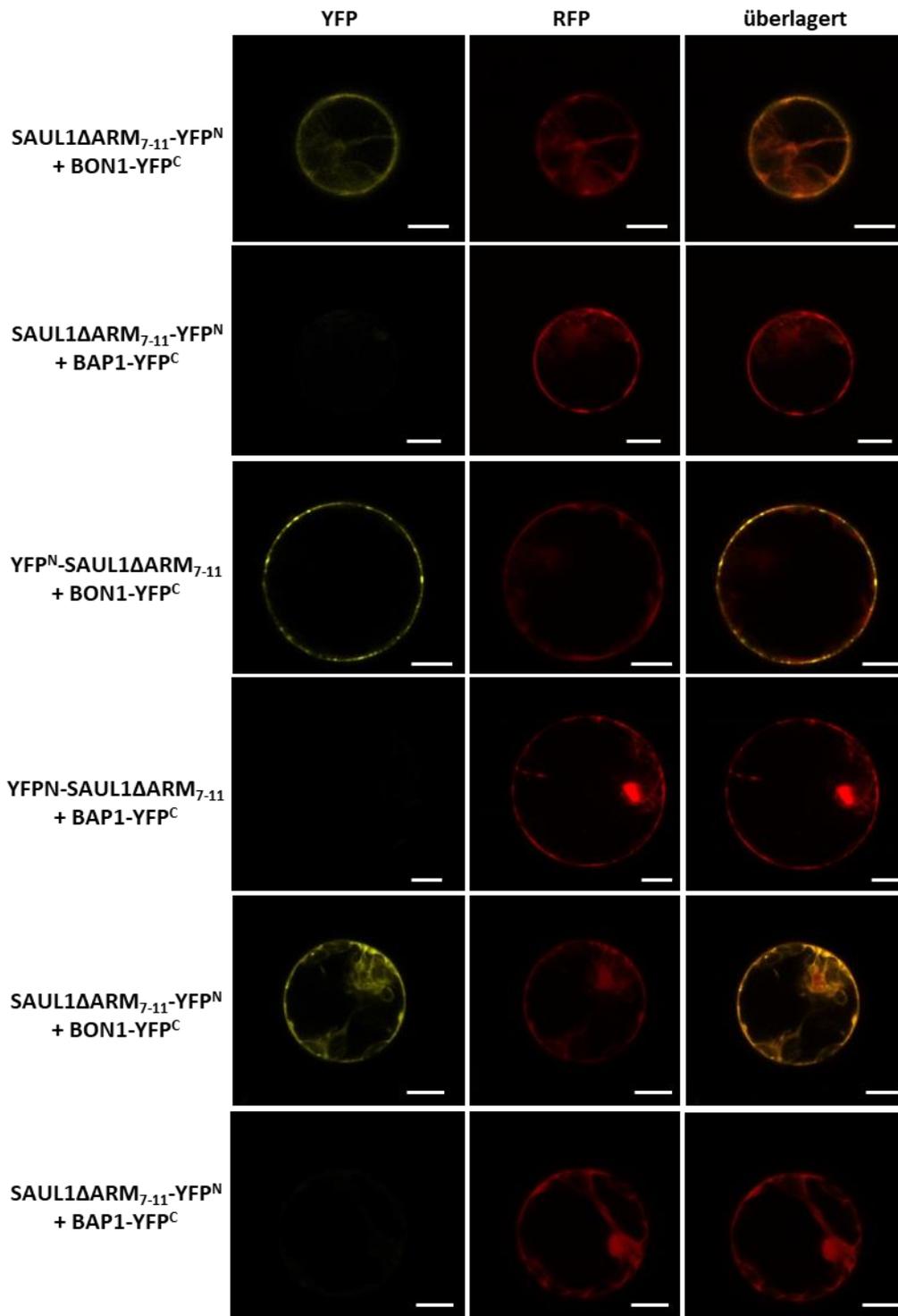


Abb. 7.4: Konfokale Aufnahmen der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation von SAUL1 Δ ARM₇₋₁₁, BON1 und BAP1 in Mesophyllprotoplasten aus *A. thaliana*. Maßstab = 10 μ m.

Anhang

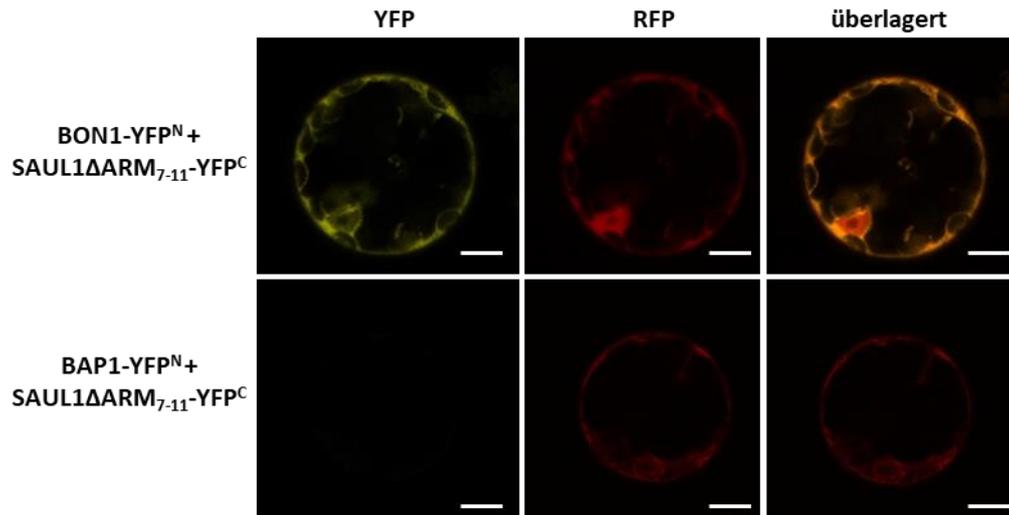


Abb. 7.4: Fortsetzung der konfokalen Aufnahmen der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation von SAUL1ΔARM₇₋₁₁, BON1 und BAP1 in Mesophyllprotoplasten aus *A. thaliana*. Maßstab = 10 µm.

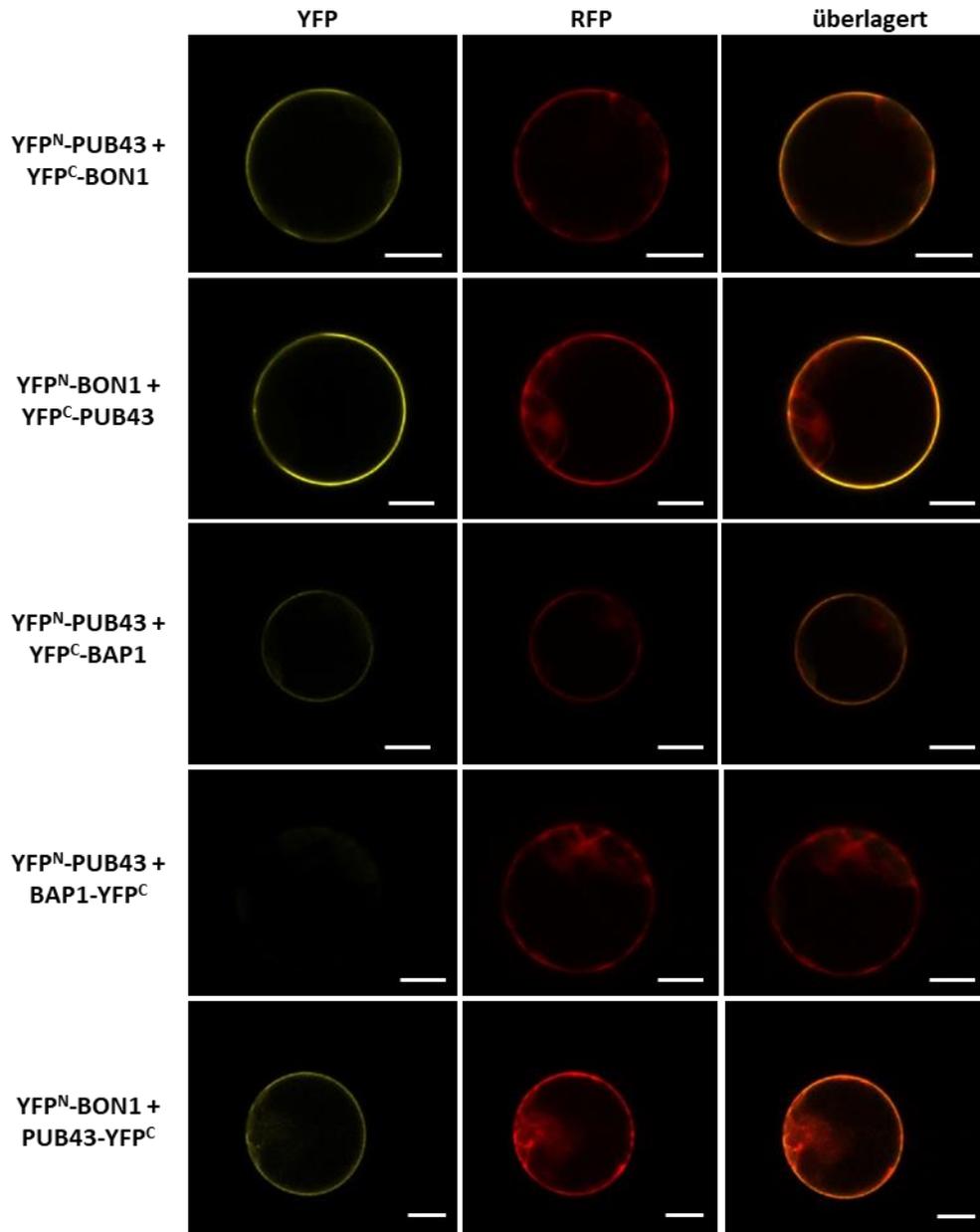


Abb. 7.5: Konfokale Aufnahmen der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation von PUB43, BON1 und BAP1 in Mesophyllprotoplasten aus *A. thaliana*. Maßstab = 10 µm.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei meinem Doktorvater und dem Leiter der Abteilung für Molekulare Pflanzenphysiologie Prof. Dr. Stefan Hoth für die Möglichkeit zur Bearbeitung eines sehr interessanten und facettenreichen Projekts bedanken. Ich danke ihm für die sehr gute Betreuung und Unterstützung sowie das entgegengebrachte Vertrauen. Ein stets offenes Ohr für Fragen und sein Interesse an den Arbeitsfortschritten haben mir bei der Anfertigung dieser Arbeit sehr geholfen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Julia Kehr für die freundliche Bereitschaft danken, im Rahmen des Promotionsverfahrens das Zweitgutachten zu verfassen.

Ferner danke ich Prof. Dr. Stefan Hoth, Prof. Dr. Wilhelm Schäfer und Prof. Dr. Christian Betzel für die Aufnahme in die Graduiertengruppe „SiMOS – Strukturbiologie von Interaktions-Modulen bei Stress“ und die Möglichkeit, neue Methoden und Verfahren zu erlernen, zu denen ich bislang noch keinen Zugang hatte. Ich danke Annemarie Glöckner und Haifa El Kilani für die Zusammenarbeit und den Austausch innerhalb der Graduiertengruppe.

Mein Dank gilt Dr. Magdalena Weingartner für die zahlreichen beratenden Gespräche und die Unterstützung bei der Korrektur dieser Arbeit.

Ich danke Dr. Dennis Eggert und Dr. Christian Voigt für die große Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der dSTORM-Analysen. Ferner danke ich Dr. Geert De Jaeger, Dr. Jelle Van Leene und Dominique Eeckhout für die Durchführung und Auswertung der Tandemaffinitätsaufreinigungen. Dr. Melanie Thieß, Anna Ostendorp und Steffen Pahlow danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen. Dr. Suayib Üstün danke ich für die Einführung in die Co-IP Analysen.

Ich möchte mich bei allen Mitgliedern der Abteilung für Molekulare Pflanzenphysiologie für die äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre und den freundlichen und stets hilfsbereiten Umgang miteinander bedanken. Es war mir eine große Freude mit euch zusammenarbeiten zu dürfen. Im Besonderen möchte ich mich bei meinen „Mitstreitern“ Tanja Kotur, Eva-Maria Disch, Kerstin Wöltje und Jan Knop bedanken. Ich danke Tanja und Eva für die vielen beratenden Diskussionen, Gespräche und Treffen, auch abseits des Laboralltags. Hoffentlich schaffen wir es nochmal auf den Weihnachtsmarkt in Altona zu gehen. Kerstin danke ich für unsere großartige gemeinsame Bürozeit. Ich kann mir keine bessere Büromitsitzerin

Danksagung

vorstellen. Immer wenn ich Barry White oder Joe Cocker höre, denke ich an dich! Jan danke ich für die vielen wunderbaren, hilfreichen und lustigen Gespräche. Du warst ein toller Labornachbar und ich vermisse unsere „frivolen Freitage“ schon jetzt!

Darüberhinaus möchte ich mich bei Tobias Strauß und Tim Lienemann bedanken, deren studentische Arbeiten einen wertvollen Beitrag zur Entstehung dieser Arbeit geliefert haben.

Ein besonderer Dank gilt Christiane Debus. Ich danke dir für deine großartige Unterstützung, die vielen hilfreichen Gespräche und dein stets offenes Ohr. Ich habe so viel von dir gelernt!

Des Weiteren möchte ich mich bei Judith Mehrmann für die zahlreichen unterstützenden Arbeiten im Laboralltag, im Speziellen die BiFC-Experimente und die damit einhergehenden unzählbaren Stunden am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop bedanken.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meiner Familie, im Besonderen meiner Mutter und Matthias sowie meinen Freunden (Saugnäpfe, FST-Mädels, Lena, Annika, Nadine und alle die ich vergessen habe), die immer an mich geglaubt und mich unermüdlich in allem unterstützt haben. Ohne eure Liebe, Freundschaft und euren Rückhalt wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen!

Publikationsliste

Teile dieser Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Tong M., Kotur T., Liang W., Vogelmann K., Kleine T., Leister D., Brieske C., Yang S., Lüdke D., Wiermer M., Zhang Y., Li X., Hoth S. (2017) E3 ligase SAUL1 serves as a positive regulator of PAMP-triggered immunity and its homeostasis is monitored by TNL SOC3. *New Phytologist*: DOI: 10.1111/nph.14678

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, 28.09.2017

Catharina Brieske