Charakterisierung zweier MAP Kinase Substrate mit PHD-Domänen aus Arabidopsis thaliana

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Msc. Annekatrin Sawusch geb. Missal

geb. am 12. April 1990 in Halle/Saale Gutachter:

Prof. Dr. Dierk Scheel | Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle Prof. Dr. Ingo Heilmann | Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Prof. Dr. Frederik Börnke | Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau e.V. Verteidigung: 16.03.2021

Inhaltsverzeichnis

Inł	altsve	rzeichnis 1 -
Ab	kürzui	ngsverzeichnis 3 -
Ab	bildun	ngs- und Tabellenverzeichnis 6 -
1	Einle	eitung1
-	1.1	Die Erkennung von Signalen in der Pathogen-Abwehr von Arabidopsis thaliana 1
-	1.2	Die Erkennung von Signalen in der Entwicklung von Arabidopsis thaliana
-	1.3	MAP Kinase Kaskaden in der Signalweiterleitung5
	1.3.1	Substrate der MAP Kinase Kaskaden in der Pathogen-Abwehr
	1.3.2	2 Substrate der MAP Kinasen in der Entwicklung9
	1.4	PHD- und RING-Domänen Proteine10
	1.4.1	PHD-Domänen Proteine in der Blütenentwicklung 12
	1.5	Zielstellung14
2	Mate	erial und Methoden15
4	2.1	Material15
	2.1.1	Chemikalien15
	2.1.2	2 Media15
	2.1.3	Bakterien
	2.1.4	Enzyme und Primer15
	2.1.5	5 Antikörper16
	2.1.6	5 Vektoren
	2.1.7	Verwendete Kits
4	2.2	Methoden17
	2.2.1	Molekularbiologische Methoden17
	2.2.2	2 Proteinbiochemische Methoden
	2.2.3	Analytische Methoden
	2.2.4	Pflanzen

3		Erge	ebnis	se	0
	3.	1	Kon	servierte Merkmale der PPL-Proteine	0
	3.	2	PPL	1 und PPL2 können MAP Kinase Substrate sein	3
		3.2.	1	Die Lokalisation von PPL2 im Zellkern	4
		3.2.	2	Die Interaktion mit MAP Kinasen in A. thaliana Protoplasten	6
		3.2.	3	Die Phosphorylierung von PPL1 und PPL2 durch MAP Kinasen	7
		3.2.	4	Eine mögliche Veränderung der Proteinstabilität durch Phosphorylierung 4	1
	3.	3	Fun	ktionelle Analyse von PPL1 und PPL24	4
		3.3.	1	Transkriptionelle Analysen der Genexpression in PPL1 ÜE und ppl2 Linien 4	5
		3.3.	2	Interaktionsanalysen zwischen PPL1/PPL2 und Histonen	8
		3.3.	3	Mögliche Ko-Lokalisation von PPL1/PPL2 mit Histonen	9
		3.3.	4	Interaktion mit Histonen über PHD-ähnliche Domäne	0
	3.	4	Proz	<i>ximity labeling</i> mit Biotin (BioID)5	2
		3.4.	1	Optimierung der Biotin-Behandlung5	2
		3.4.	2	Antikörper-Detektion	4
		3.4.	3	Die Kernlokalisation der TurboID-Konstrukte	7
		3.4.	4	Die Proteinextraktion und das Entfernen von überschüssigem freiem Biotin 5	8
		3.4.	5	Die Optimierung der Massenspektrometrie Messung	0
		3.4.	6	Ergebnisse MS	3
	3.	5	Phä	notypische Untersuchung von <i>ppl1</i> , <i>ppl2</i> und <i>ppl1ppl2</i> 6	6
4		Disl	kussi	on7	0
	4.	1	Wel	che Funktion besitzen PPL1 und PPL2 in der Blütenentwicklung?	0
	4.	2	PPL	1 und PPL2 sind MAP Kinase Substrate7	2
	4.	3	Eine	e Bewertung der proximity-labeling Methode in A. thaliana Protoplasten7	6
5		Zus	amm	enfassung	1
6		Lite	eratur	verzeichnis	2
7		Anh	nang.		0

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung		Abkürzung	
A. thaliana	Arabidopsis thaliana	MAPK	MITOGEN-ACTIVATED
			PROTEIN KINASE
AGL15	AGAMOUS-like15	MAPKK	MAPK Kinase
AP1	APETALA1	MAPKKK	MAPK Kinase Kinasen
APS	Ammoniumpersulfat	MAPKKK5	MITOGEN-ACTIVATED
			PROTEIN KINASE KINASE
			KINASE5
ASR3	ARABIDOPSIS SH4-	MBP	MYELIN BASIC PROTEIN
	RELATED3		
ATP	Adenosintriphosphat	MEKK1	MAPK/ERK KINASE KINASE1
ВАН	BROMO ADJACENT	MKK1	MITOGEN-ACTIVATED
	HOMOLOGY		PROTEIN KINASE KINASE1
BAK1	BRI1-ASSOCIATED	MKK2	MITOGEN-ACTIVATED
	RECEPTOR KINASE		PROTEIN KINASE KINASE2
BASL	BREAKING OF	MKK4/5	MITOGEN-ACTIVATED
	ASYMMETRY IN THE		PROTEIN KINASE4/5
	STOMATAL LINEAGE		
BIFC	bimolecular fluorescence	MPK3	MITOGEN-ACTIVATED
	complementation		PROTEIN KINASE3
BPTF	BROMODOMAIN AND	MPK4	MITOGEN-ACTIVATED
	PHD DOMAIN		PROTEIN KINASE4
	TRANSCRIPTION FACTOR		
BSA	Bovine serum albumin	MPK6	MITOGEN-ACTIVATED
			PROTEIN KINASE6
BSK1	BRASSINOSTEROID-	NEB	nuclear extraction buffer
	SIGNALING KINASE1		
CERK1	CHITIN ELICITOR	NURF	NUCLEOSOME REMODELLING
	RECEPTOR KINASE 1		FACTOR
СНХ	Cycloheximid	PAMP/DAM	pathogen/microbe associated
		Р	molecular pattern
CLE	CLAVATA3/ENDOSPERM	Pc	Petroselinum crispum

	SURROUNDING REGION		
CLV3	CLAVATA3	PHD	PLANT HOMEODOMAIN
СРК	CALCIUM-DEPENDENT	PPL1/2	PLANT-SPECIFIC PHD-LIKE1/2
	PROTEIN KINASE		
DMSO	Dimethylsulfoxid	PRE1	PACLOBUTRAZOL
			RESISTANCE1
EBS	EARLY BOLTING IN	PRR	PAMP-recognition receptors
	SHORT DAYS		
EFR	EF-TU RECEPTOR	PTI/DTI	PAMP/DAMP-triggered immunity
EF-Tu	Elongationsfaktor-Tu	ÜE	Überexpression
EPF	EPIDERMAL	RBOHD/F	RESPIRATORY BURST
	PATTERNING FACTORS		OXIDASE HOMOLOGUE D/F
EPFL4/6	EPF-like4/6	RING	REALLY INTERESTING NEW
			GENE
ER	ERECTA	RLCK VII-4	RECEPTOR-LIKE
			CYTOPLASMIC KINASES VII-4
ERF104	ETHYLENE RESPONSE	RLK	receptor-like kinases
	FACTOR104		
ERL1	ER-like1	RLP	receptor-like proteins
FLS2	FLAGELLIN-SENSITIVE2	ROS	reactive oxygen species
FRET	Försterresonanz	SAM	shoot apical meristem
	Energietransfer		
FRK1	FLG22-INDUCED	SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulaft-
	RECEPTOR-LIKE KINASE1		Polyacrylamidgelelektrophorese
FT	FLOWERING LOCUS T	SERK	SOMATIC EMBRYGENESIS
			RECEPTOR KINASE
H3.1	Histone3.1	SHL	SHORT LIFE
HAE	HAESA	SMART	simple modular architecture
			research tool
НЕСТ	HOMOLOGOUS TO THE	SOC1	SUPPRESSOR OF
	E6-AP CARBOXYL		OVEREXPRESSION OF CO1
	TERMINUS		
HSL2	HAESA-like2	SPCH	SPEECHLESS
IDA	INFLORESCENCE	TEMED	Tetramethylethylendiamin

	DEFICIENT IN		
	ABSCISSION		
ING2	INHIBITORY OF	TF	Transkriptionsfaktor
	GROWTH2		
JA	Jasmonat	TMM	TOO MANY MOUTHS
KNAT1	KNOTTED-LIKE FROM	UTR	Untranslatierte Region
	ARABIDOPSIS		
	THALIANA1		
LFY	LEAFY	VRE	VIP1-responsive elements
LRR	leucine-rich repeat	YDA	YODA
LYK5	LYSM-CONTAINING	YFP	yellow fluorescent protein
	RECEPTOR-LIKE		
	KINASE5		

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1 Darstellung der Signalweiterleitung in der Pathogen-Abwehr von Pflanzen 2
Abbildung 2 Darstellung der Signalweiterleitung in der Blütenentwicklung
Abbildung 3 Alignment von PPL1 und PPL2
Abbildung 4 Phylogenetischer Baum orthologer Gene zu <i>PPL1</i>
Abbildung 5 Lokalisation von PPL1 und PPL2 in Zellkern und Zytoplasma von A. thaliana
Protoplasten
Abbildung 6 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation von PPL2 mit vier MAP-Kinasen
(MPK3, MPK4, MPK6 und MPK11) in A. thaliana Protoplasten
Abbildung 7 In vitro Phosphorylierung von PPL1 und PPL2
Abbildung 8 In vivo Phosphorylierung von PPL1 in A. thaliana Col-0 Protoplasten
Abbildung 9 In vivo Phosphorylierung von PPL2 in A. thaliana Col-0 Protoplasten
Abbildung 10 Zell-freier Abbau-Assay mit PPL1 und PPL2
Abbildung 11 Proteinstabilität von PPL1 und PPL2 nach flg22 Behandlung in A. thaliana
Protoplasten
Abbildung 12 Darstellung der Transkriptom Analyse von <i>ppl2</i> 45
Abbildung 13 Darstellung der Transkriptom Analyse von 7-5 (PPL1 OE)
Abbildung 14 Ko-Lokalisation von PPL1 und PPL2 mit H3.1 im Zellkern von A. thaliana
Protoplasten
Abbildung 15 In vivo Interaktion von PPL1 und PPL2 mit H3.1 in A. thaliana Protoplasten. 51
Abbildung 16 Zeit-abhängige Biotinylierung von PPL1, PPL2 und CFP
Abbildung 17 Antikörper Vergleich der Proteindetektion nach Biotinylierung
Abbildung 18 Separate Detektion mittels strep-POD oder HA-Antikörper
Abbildung 19 Physiologische Lokalisation von PPL1-TurboID und PPL2-TurboID
Abbildung 20 Proteindetektion und Biotinylierungskontrolle nach dem Khan et al.
Extraktions-Protokoll
Abbildung 21 Optimierung des Extraktionsprotokolls und PD10-Säule
Abbildung 22 Identifizierung der Verunreinigungen in den MS1-Spektren von 3
unterschiedlichen Aufarbeitungen
Abbildung 23 Darstellung der Ergebnisse der massenspektrometrischen Messungen 64
Abbildung 24 Darstellung der intakten Blüten sowie Fläche, Breite und Länge von Petalen der
Blüten von Col-0, <i>ppl1</i> , <i>ppl2</i> und <i>ppl1ppl2</i>

Abbildung 25 Darstellung der Zellzahl pro 0,1 mm ² Petalenfläche für Col-0, ppl1, ppl	2 und
ppl1ppl2	69
Abbildung 26 Hypothese zum Abbau über das 26S Proteasom von PPL2	75

Tabelle 1 I	Für PPL1 u	nd PPL 2 in den	Messungen	2 und 3	identifizierte	Proteine	65
			wiessungen	2 und 3	Identifiziente	11000110	

1 Einleitung

1.1 Die Erkennung von Signalen in der Pathogen-Abwehr von Arabidopsis thaliana

Für Pflanzen als sessile Organismen ist es notwendig abiotische und biotische Umwelteinflüsse zu erkennen und mit entsprechenden Mechanismen zu reagieren. Dabei stellt die Interaktion mit Pathogenen wie Bakterien oder Fressfeinden ein Stressauslöser dar. Diese Auslöser werden über Signalrezeptoren an der Zelloberfläche erkannt und daraufhin werden über die Aktivierung unterschiedlicher Signalwege entsprechende Reaktionen initiiert. Dabei spielt die Erkennung von sogenannten Pathogen-assoziierten molekularen Strukturen (PAMPs) und pflanzeneigenen Schaden-assoziierten molekularen Strukturen (damageassociated molecular patterns, DAMPs) durch Muster-Erkennungs-Rezeptoren (patternrecognition receptors, PRR) einen für das jeweilige Pathogen spezifischen Schritt dar. Die dadurch ausgelösten Reaktionen werden als Muster-induzierte Immunität (pattern-triggered immunity, PTI) bezeichnet. Bei den PAMPs/DAMPs handelt es sich um konservierte Bereiche von zum Beispiel dem Flagellin Protein von Bakterien, dem Elongationsfaktor-Tu (EF-Tu) oder Chitin als ein Polysaccharid aus Zellwänden von Pilzen. Untersuchungen haben gezeigt, dass für die Induktion der PTI ein 22 Aminosäuren langes Peptid des Flagellin Proteins (flg22) oder ein 18 Aminosäuren langes Peptid des EF-Tu (elf18) für die Aktivierung ausreichend sind (Felix et al., 1999; Zipfel et al., 2006). Unter Laborbedingungen werden diese Peptide zum Imitieren einer Pathogen-Attacke verwendet. Die durch Verwundung oder Infektion prozessierten Zellwandbestandteile oder abgegebenen Peptide werden als DAMPs bezeichnet. Die für die Erkennung von PAMPs/DAMPs notwendigen PRRs können Rezeptorähnliche Kinasen (receptor-like kinases, RLKs) oder Rezeptor-ähnliche Proteine (receptorlike proteins, RLP) sein. Einige der RLKs besitzen Leucin-reiche Wiederholungen (leucinerich repeats, LRR) in ihrer extrazellulären Ectodomäne zur Bindung von PAMPs/DAMPs. Bei der Erkennung ihrer passenden Liganden bilden die PRRs FLS2 (FLAGELLIN-SENSITIVE2) und EFR (EF-TU-RECEPTOR) jeweils einen Rezeptor-Komplex mit BAK1 (BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE), einem Rezeptor-Protein (Chinchilla et al., 2007; Heese et al., 2007). Ein Komplex aus LYK5 (LYSIN MOTIF RECEPTOR KINASE5) und CERK1 (CHITIN ELICITOR RECEPTOR KINASE1) bildet den Rezeptor für Chitin (Cao et al., 2014). Alle diese RLKs sind über ihre Transmembran-Domäne in der Membran verankert (Abbildung 1).



Abbildung 1 Darstellung der Signalweiterleitung in der Pathogen-Abwehr von Pflanzen. Die Erkennung von pathogen/damage-associated molecular patterns (PAMPs) durch *RLK pattern-recognition receptors* (PRRs) Komplexen führt zur Aktivierung der *pattern-triggered immunity* (PTI) in Pflanzen. Über die Aktivierung von MAP Kinase Kaskaden werden unter anderem Transkriptionsfaktoren (TF) phosphoryliert und die Expression von abwehrrelevanten Genen beeinflusst. Abbildung nach Zhang et al., 2018

In Folge einer PAMP/DAMP-Erkennung werden Signale über die intrazelluläre Kinase-Domäne der PRRs in das Zellinnere übermittelt und dort, je nachdem um welche PAMP/DAMP-PRR Kombination es sich handelt, spezifische Signalwege aktiviert. Zu den schnell messbaren Reaktionen gehört der Anstieg der reaktiven Sauerstoff-Spezies (*reactive oxigen species*, ROS) und der Calcium-Ion (Ca²⁺) Einstrom (Ranf et al., 2011; Waszczak et al., 2018). Der Stimulus-abhängige Einstrom von Ca²⁺ wird von Calcium Sensor Proteinen (CSP) registriert und über Interaktionen oder Phosphorylierungen auf weitere Proteine übertragen. Diese CSP sind Calmodulin, CALCINEURIN B-LIKE PROTEINS und Calciumabhängige Protein Kinasen (CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASES, CDPKs) welche durch die Bindung von Ca²⁺ eine eigen-vermittelte Phosphorylierung, und damit Aktivierung, unterlaufen und über Phosphorylierung von Zielproteinen diese Signale weitergeben. Als Beispiel dafür konnte gezeigt werden, dass durch die CPK4, CPK5 und CPK11 bei *in vitro* Experimenten eine Ca²⁺-abhängige Phosphorylierung der WRKY Transkriptionsfaktoren (TF) WRKY8, WRKY28 und WRKY48 möglich ist. Gleichzeitig wird die Ca²⁺-abhängige Phosphorylierung von RBOHD (RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG PROTEIN D) und RBOHF (RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG PROTEIN F) *in vitro* durch CPK1, CPK2, CPK4 und CPK11 vermittelt (Gao et al., 2013). RBOHD ist ein gut untersuchter enzymatischer Komplex zur Generierung von reaktiven Sauerstoff-Spezies und zeigt einen hohen Grad an Stress-induzierter Aktivität (Liu and He, 2016). In der PTI werden neben dem Calcium-Einstrom und dem ROS Anstieg weitere Reaktionen zur Pathogen-Abwehr aktiviert. Darunter fallen unter anderem die Aktivierung der MAP (MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN) Kinase Kaskaden zur Weiterleitung von Signalen zu den spezifischen Substraten, wie Transkriptionsfaktoren oder Biosynthese Enzymen, zum Beispiel zur Aktivierung der Camalexin- oder Ethylen-Biosynthese (Joo et al., 2008, 6; Qiu et al., 2008a). Die Analyse dieser Substrate kann weitere wichtige Informationen für die Entschlüsselung dieses komplexen Signalnetzwerks hervorbringen.

Auf der Zelloberfläche von pflanzlichen Zellen sind unzählige weitere Rezeptoren zur Erkennung von Liganden angeordnet. Diese können zum Beispiel in der präzisen Regulation der pflanzlichen Entwicklung eine Rolle spielen. Dabei wird vor allem die Kommunikation von Zellen und Organen untereinander sicher gestellt.

1.2 Die Erkennung von Signalen in der Blüten-Entwicklung von Arabidopsis thaliana

Während des Wachstums werden Zellbegrenzung, Zellteilung und auch Differenzierung von Pflanzenzellen mit Hilfe von Botenstoffen wie Hormonen oder Peptid-Liganden vermittelt. Auch in diesem Fall werden die jeweiligen Signale durch Rezeptoren erkannt und durch entsprechende Signalwege die passenden Reaktionen aktiviert. Im Gegensatz zu den zu erkennenden Strukturen in der Pathogen-Abwehr sind es in der pflanzlichen Entwicklung vor allem endogene Peptide, deren Transport durch N-terminale Signalsequenzen in den extrazellulären Raum stattfindet. Darunter fallen zum Beispiel IDA (INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION), CLV3 (CLAVATA3) oder EPFs (EPIDERMAL PATTERNING FACTORS) (Stenvik et al., 2008; Katsir et al., 2011). Analog zu den flg22 oder elf18 Peptiden in der Pathogen-Abwehr konnten in Experimenten entsprechende Signalwege durch verkürzte beziehungsweise synthetische Peptide aktiviert werden. Eine frühere Abtrennung von Blütenorganen bei der Behandlung von Col-0 Pflanzen mit dem synthetischen IDA EPIP Peptid im Vergleich zu unbehandelten Pflanzen zeigte, dass dieses Peptid, bestehend aus 20 Aminosäuren des prolin-reichen C-terminalen EPIP Motives, durch die entsprechenden Rezeptoren erkannt werden konnte. Da jedoch hohe Konzentrationen für

diesen Effekt notwendig waren, besteht die Möglichkeit das post-translationale Modifikationen für eine effizientere Erkennung erforderlich sind (Stenvik et al., 2008). Die Peptide der CLE (CLAVATA3/ENDOSPERM SURROUNDING REGION) Familie werden ausgehend von dem 14 Aminosäuren langen CLE Motiv im C-Terminus zu aktiven CLEp Peptiden prozessiert. Im Gegensatz dazu, bilden die Mitglieder der EPF Familie aus dem 45 Aminosäuren langen Pro-Peptid des C-Terminus eine durch Disulfid-Brücken stabilisierte Struktur mit variablen Schleifen-Strukturen zwischen den Mitgliedern aus (Katsir et al., 2011). Die Erkennung dieser Peptide erfolgt über Rezeptor Komplexe aus zum Beispiel den redundanten RLKs HAE (HAESA) und HSL2 (HAESA-like2) mit SERKs (SOMATIC EMBRYGENESIS RECEPTOR KINASE) für IDA oder der Rezeptor-ähnlichen Protein Kinase ER (ERECTA) mit TMM (TOO MANY MOUTHS) für EPFs (Abbildung 2).



Abbildung 2 Darstellung der Signalweiterleitung in der Blütenentwicklung. Die von Pflanzen in den extrazellulären Raum abgegebenen endogenen Peptide wie IDA und EPF werden durch RLK Komplexe erkannt. Die spatiotemporale Aktivierung von MAP Kinase Kaskaden führt zur Regulation von Mechanismen in Wachstum und Entwicklung wie die Anordnung der Spaltöffnungen und die Abtrennung von Zellen. Abbildung nach Zhang et al., 2018

Die Erkennung der EPFs durch die ER Rezeptor-ähnliche Protein Kinase führt zur Regulation der Architektur des Blütenstandes, der Bildung und Anordnung von Spaltöffnungen und der Entwicklung der Samenanlage (Meng et al., 2012). Die homologen Rezeptoren ERL1 (ER-like1) und ERL2 zeigen dabei eine teilweise redundante Funktionsweise zu ER. Die unterschiedliche Wirkungsweise verschiedener EPFs wird dabei zum Beispiel durch die ausschließliche Expression von EPF1 und EPF2 auf die frühen und späten Phasen der Spezialisierung von Zellen zu Spaltöffnungen begrenzt. Die daraufhin in den extrazellulären Raum abgegebenen Peptide werden von Nachbarzellen über ER und ERL1 erkannt und verhindern deren Ausbildung zu weiteren Spaltöffnungen (Lee et al., 2012). Im Gegensatz dazu führt die Erkennung von EPFL4 (EPF-like4) und EPFL6 (EPF-like6) zur Regulation der Architektur des Blütenstandes über die Regulation der Zellteilung und somit des Wachstums des Blütenstandes (Cai et al., 2017).

Das Expressionsmuster von IDA ist ebenfalls begrenzt auf spezielle Zelltypen und Entwicklungsstadien wie der Blütenentwicklung (Vie et al., 2015). Hierbei führt die Erkennung von IDA durch HAE/HSL2 zur Regulation der Zelltrennung während der Abtrennung von Blütenorganen (Shi et al., 2011).

Die Erkennung von Signalpeptiden durch Rezeptoren allein ist nicht ausreichend um zum Beispiel die Genexpression zu beeinflussen. Hierfür ist eine gezielte und streng regulierte Weiterleitung der Signale innerhalb der Zellen notwendig. Alle bereits erwähnten Rezeptoren geben mit Hilfe ihrer Kinase-Domänen die Signale über Signalüberträger unter anderem an MAP Kinase Kaskaden weiter. Das erstaunliche dabei ist, dass sowohl Rezeptoren, deren Funktion in der Pathogen-Abwehr liegen, als auch Rezeptoren für endogene Peptide über die identische Zusammenstellung von MAP Kinasen in einer Kaskade ihre Signale weitergeben. Diese phosphorylieren dann wiederrum die jeweiligen spezifischen Substrate des Signalweges. Zur Aufklärung von diesen Signalprozessen ist daher, neben der Identifizierung der zuständigen MAP Kinase Kaskade, vor allem die Charakterisierung der zuständigen Substrate notwendig. Im Folgenden soll nun auf bekannte MAP Kinase Kaskaden und deren Substrate eingegangen werden.

1.3 MAP Kinase Kaskaden in der Signalweiterleitung

Nach der Erkennung von PAMPs/DAMPs in der Pathogen-Abwehr werden die Signale mittels Phosphorylierungen auf Kinasen, die im Folgenden als Signalüberträger bezeichnet werden, übertragen. Deren Funktion liegt nun in der Phosphorylierung und damit Aktivierung von MAPK Kinase Kinasen (MAPKKK). Daraufhin erfolgt die Aktivierung über

Phosphorylierung der MAPK Kinase (MAPKK), welche wiederum die untergeordnete MAPK phosphoryliert. Von diesen MAPK ausgehend werden unterschiedliche Substrate phosphoryliert und somit zum Beispiel in ihrer Stabilität (Joo et al., 2008, 6), in ihrer Lokalisation (Djamei et al., 2007) oder ihrer Interaktion mit weiteren Proteinen (Qiu et al., 2008a) beeinflusst. In Arabidopsis thaliana (A. thaliana) wurden 20 MAPKs, 10 MAPKKs und 60 MAPKKKs identifiziert und einige davon wurden bereits in ihrer Funktion bestätigt (MAPK Group, 2002). Die MAP Kinasen können entweder ein Thr-Glu-Tyr (TEY) oder Thr-Asp-Tyr (TDY) Aktivierungsmotiv tragen (Oostdyk et al., 2019). Darauf aufbauend ist es über Sequenzvergleiche möglich, eine weitere Einteilung der TEY MAP Kinasen in drei Untergruppen (Gruppe A, B oder C) und der TDY MAP Kinasen in die vierte Untergruppe D vorzunehmen (MAPK Group, 2002). Die abwehrrelevanten MAP Kinasen MAP Kinase1 (MPK1), MPK3, MPK4, MPK6, MPK11 und MPK13 können durch PAMP-Behandlung aktiviert werden (Bethke et al., 2012; Nitta et al., 2014). Dabei sind MPK3 (MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE3), MPK6 (MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE6) und MPK4 (MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE4) die am besten untersuchten PAMP-induzierten MAP Kinasen in A. thaliana. MPK3 und MPK6 können der Gruppe A und MPK4 und deren paraloge Kinase MPK11 der Gruppe B zugeordnet werden (MAPK Group, 2002).

Um die Funktion und Wirkungsweise der MAP Kinase Kaskaden vollends entschlüsseln zu können, ist es notwendig die Signalwege von den zuständigen Rezeptoren, über die Kinasen der Kaskaden bis hin zu den spezifischen Substraten nachzuverfolgen. Als Beispiel ist hier der Signalweg von der Erkennung von Chitin über den CERK1/LYK Rezeptor-Komplex, die Rezeptor-ähnliche cytoplasmatische Kinase PBL27 als Signalüberträger bis hin zur MAPKKK5 (MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE S) zu nennen. Die Phoshporylierung im C-terminalen Teil von MAPKKK5 erfolgt dabei unter Abhängigkeit von CERK1 (Yamada et al., 2016). Diese MAPKKK bildet in diesem Fall die übergeordnete Kinase für MKK4 (MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE4)/MKK5 (MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE5) und MPK3 /MPK6. Neben der PBL27 als Mitglied der RLCK VII-4 (RECEPTOR-LIKE CYTOPLASMIC KINASES VII-4) Familie konnte gezeigt werden, dass auch weitere Mitglieder dieser Familie für die Phosphorylierung der MAPKK Kinasen MAPKKK5 und MEKK1 (MAPK/ERK KINASE KINASE1) verantwortlich sind. Je nachdem um welches Mitglied es sich handelt, können diese vermutlich sowohl nach Chitin als auch nach flg22 Erkennung agieren (Bi et al., 2018). Die MEKK1 bildet mit den untergeordneten Kinasen MKK1 (MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE1)/MKK2 (MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE2) und MPK4 die als MPK4 Kaskade bezeichnete Kaskade (Qiu et al., 2008b). Als weiterer Signalüberträger nach der flg22 Erkennung konnte BSK1 (BRASSINOSTEROID-SIGNALING KINASE1) als Verbindung zwischen FLS2 und MAPKKK5 identifiziert werden (Yan et al., 2018). Ob die MAPKKK5 tatsächlich als MAPKK Kinase der MPK3/MPK6 Kaskade nach der Erkennung von flg22 fungiert, ist aufgrund abweichender Datensätze nicht eindeutig. Für *mapkkk5* Mutanten wurden nach flg22 Behandlung sowohl Daten über eine verstärkte MPK3/MPK6 Aktivierung (Yamada et al., 2016), über eine stark reduzierte MPK3/MPK6 Aktivierung (Sun et al., 2018) und über eine sehr schwache Reduktion der MPK3/MPK6 Aktivierung (Yan et al., 2018) veröffentlicht. Es scheint bei diesen Untersuchungen durch die Funktion von weiteren redundanten Kinasen zu nicht eindeutigen Ergebnissen zu kommen. Es ist jedoch durchaus wahrscheinlich, dass die MAPKKK5 ebenfalls in die Erkennung von flg22 involviert ist, da die Interaktion mit MKK1/2/4/5/6 (Yan et al., 2018) beziehungsweise MKK2/4/5 (Yamada et al., 2016) gezeigt werden konnte (Abbildung 1).

Wenn man sich nun auf die pflanzliche Entwicklung fokussiert und dort die Funktionsweise von MAP Kinase Kaskaden untersucht, ist festzustellen, dass im Vergleich zur Pathogen-Abwehr identische Kinasen involviert sind. Die Regulation der Architektur des Blütenstandes und die Bildung und Anordnung von Spaltöffnungen erfolgt nach der Erkennung von EPFs über die MAPKK Kinase YDA (YODA) mit den untergeordneten Kinasen MKK4/MKK5-MPK3/MPK6 (Wang et al., 2007; Meng et al., 2012). Zusätzlich läuft der Signalweg zur Abtrennung von Blütenorganen nach der Erkennung von IDA durch HAE/HSL2 ebenfalls über die MKK4/MKK5-MPK3/MPK6 MAP Kinase Kaskade. Im Gegensatz zur Regulation der Anordnung von Spaltöffnungen konnte die MAPKK Kinase für diesen Signalweg noch nicht identifiziert werden (Cho et al., 2008) (Abbildung 1).

Dieses Auftreten von teilweise identischen MAP Kinase Kaskaden in Signalwegen der Pathogen-Abwehr und Entwicklung zeigt deutlich, dass eine Kombination von verschiedenen MAP Kinasen nicht ausschließlich die notwendige Spezifität hervorbringen kann. Vielmehr spielen in diesem Bereich der Signalweiterleitung die von den MAP Kinasen phosphorylierten Substrate unter variablen Bedingungen eine entscheidende Rolle und generieren dadurch die eigentliche Identität der MAP Kinase Kaskaden. Es sollen daher ausgesuchte Substrate der MAP Kinasen vorgestellt und eingeordnet werden.

Einleitung

1.3.1 Substrate der MAP Kinase Kaskaden in der Pathogen-Abwehr

Neben der direkten Veränderung zum Beispiel der Stabilität von Biosynthese-Enzymen spielt vor allem die Genexpression und deren gezielte Beeinflussung in der Pathogen-Abwehr eine große Rolle. Es ist daher nicht verwunderlich, dass ein Großteil der MAP Kinase Substrate Transkriptionsfaktoren oder deren Regulatoren sind. Die Effekte auf die jeweiligen Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung können sehr unterschiedlich sein, es liegt meist eine zielgerichtete Regulation zu Grunde die jedoch dann wiederum Antwortmechanismen anstoßen kann. Dabei zeigen die MAP Kinasen MPK3/MPK6 eine positive und MPK4 sowohl positive als auch negative Effekte in der Pathogen-Abwehr (Peng et al., 2018).

Unter den MAP Kinase Substraten gibt es einerseits Proteine die von mehreren MAP Kinasen phosphoryliert werden können und andererseits Proteine die eine hohe Spezifität für eine ausgewählte MAP Kinase zeigen. Als spezifisches MPK6 Substrat scheint ERF104 (ETHYLENE RESPONSE FACTOR104), im unbehandelten Zustand, im Komplex mit MPK6 im Kern lokalisiert zu sein. Nach der Behandlung mit flg22 erfolgt die Entlassung des positiven Regulators ERF104 aus diesem Komplex. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen MPK6 und ERF104 abhängig von Ethylen Biosynthese und entsprechenden Signalwegen ist (Bethke et al., 2009). Das zeigt neben einer klaren Substrat-Spezifität die Verknüpfung von mehreren Signalwegen miteinander innerhalb der Pathogen-Abwehr.

Als ein weiteres Beispiel für diese Spezifität ist der VIP1 (VIRE2-INTERACTING PROTEIN 1) Transkriptionsfaktor als Substrat für MPK3 zu nennen. Er ist in der Lage VIP1-responsive Elemente (VIP1-responsive elements, VRE) innerhalb von DNA-Motiven zu binden. Analysen haben gezeigt, dass die Anzahl von mindestens zwei VRE in Promoter Regionen von abwehrrelevanten Genen signifikant höher ist als in Kontroll Promoter Regionen (Pitzschke et al., 2009). Dabei führt die durch MPK3 eingeführte Phosphorylierung zu einer veränderten Lokalisation aus dem Zytoplasma in den Zellkern, wodurch die Bindung an die DNA ermöglicht wird (Djamei et al., 2007).

Substrate der MPK4 können sowohl einen positiven als auch negativen Einfluss auf die PTI zeigen. Als Beispiel für einen negativen Effekt kann das MPK4 Substrat ASR3 (ARABIDOPSIS SH4-RELATED3) genannt werden. MPK4 phosphoryliert ASR3 an der T189 Position und dies führt zur Erhöhung der DNA-Bindungsaktivität. Dadurch ist ASR3 in der Lage durch die Bindung an EAR-Motive, die als Repressor Motive bekannt sind, in den

Promoter-Regionen von *ASR3* selbst und *FRK1* (*FLG22-INDUCED RECEPTOR-LIKE KINASE1*) die abwehrrelevante Genexpression zu unterdrücken (Li et al., 2015).

Diese Beispiele zeigen die am besten untersuchten MAP Kinasen der Pathogen-Abwehr und Beispiele deren spezifischen Substrate. Zusätzlich dazu gibt es weitere Substrate bei denen zum Beispiel MPK3 und MPK6 redundante Funktionen ausführen (Meng et al., 2013a). Daraus lässt sich erkennen, dass sowohl die Rezeptoren als auch die MAP Kinase Substrate in der Signalkette klare Spezifitäten vermitteln, die Signalwege jedoch über scheinbar identische MAP Kinase Kaskaden verlaufen. Diese Verknüpfung der einzelnen Signalwege über MAP Kinase Kaskaden wird noch komplexer, da auch Signale zum Beispiel innerhalb der Pflanzenentwicklung über eben diese MAP Kinase Kaskaden weitergeleitet werden können. Im Folgenden sollen einige Beispiele zur Verdeutlichung dargestellt werden.

1.3.2 Substrate der MAP Kinasen in der Entwicklung

In der Entwicklung sind das Vorhandensein und die Erkennung der Liganden zu den passenden Zeitpunkten sehr entscheidend um feine regulatorische Abstimmungen zu gewährleisten. Die Substrate der YDA-MKK4/MKK5-MPK3/MPK6 Kaskade in der Entwicklung unterscheiden sich, je nachdem welche EPFs von ER erkannt wurden. Dabei sorgen unterschiedliche Expressionsmuster für temporale unterschiedliche Funktionen. Ein Substrat der MAP Kinase Kaskade stellt der Transkriptionsfaktor SPCH (SPEECHLESS) dar. SPCH ist für die Initiierung der asymmetrischen Zellteilung bei der Ausbildung von Spaltöffnungen verantwortlich. Veröffentlichte Daten legen nahe, dass die Phosphorylierung ausgehend von MPK3/MPK6 nach der Erkennung von EPF1/EPF2, deren Expression auf Zellen während der Differenzierung zu Spaltöffnungen begrenzt ist, zu einer verringerten Stabilität von SPCH führt und die Ausbildung von weiteren Spaltöffnungen in den umliegenden Zellen unterbunden wird (Lampard et al., 2008). Zusätzlich dazu wird die Regulation der Zellteilung durch BASL (BREAKING OF ASYMMETRY IN THE STOMATAL LINEAGE) als weiteres MPK3/MPK6 Substrat beeinflusst. Das phosphorylierte BASL fungiert als Gerüst-Protein für YDA und MPK3/MPK6 am Kortex der Zellen und deren Phosphorylierung von SPCH führt zur gezielten Verhinderung der Ausbildung von Spaltöffnungen (Zhang et al., 2015).

Im Gegensatz zu EPF1/EPF2 konnte die höchste Expression von EPFL4 und EPFL6 in den Stammzellen des Blütenstandes gezeigt werden (Uchida et al., 2012). Über die Erkennung durch ER zeigen sie einen Einfluss auf die Regulation des in der Zellteilung im Blütenstiel involvierten PRE1 (PACLOBUTRAZOL RESISTANCE1) Transkriptionsfaktors (Cai et al., 2017). Dabei werden die Signale wie auch bei EPF1/EPF2 über die MAP Kinase Kaskade YDA-MKK4/MKK5-MPK3/MPK6 weitergeleitet (Meng et al., 2012) (Abbildung 2).

Neben der Ausbildung von neuen Organen ist die Abtrennung von Organen, zum Beispiel den Petalen der Blüten, ebenso notwendig. Die Erkennung des IDA Peptids durch HAE/HSL2 führt zur Regulation von einem Homeoprotein namens KNAT1 (KNOTTED-LIKE FROM ARABIDOPSIS THALIANA1), wodurch die Zelltrennung während der Abtrennung von Blütenorganen positiv beeinflusst wird (Shi et al., 2011). Zusätzlich dazu können Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel AGL15 (AGAMOUS-like15) als Substrate der MPK3/MPK6 MAP Kinase Kaskade eine positive Rückkopplungsschleife generieren. Die Phosphorylierung von AGL15 ermöglicht einen positiven Einfluss auf die Expression von HAE als übergeordneten Rezeptor (Patharkar and Walker, 2015).

Bei der Betrachtung von Signalwegen über scheinbar identische MAP Kinase Kaskaden ist eine Einordnung der möglichen Vorkommnisse sowohl zeitlich als auch zell-spezifisch notwendig. Für die Einordnung der Funktion von MAP Kinase Kaskaden während des Wachstums und der Entwicklung wird die Spezifität sowohl von Erkennungssignalen, die zum Beispiel nur bei bestimmten Entwicklungsstadien oder Zelltypen vorhanden sind, generiert als auch durch das Vorhandensein der passenden Substrate. Wenn man dies mit der Funktion von MAP Kinase Kaskaden in der Pathogen-Abwehr kombiniert, ergibt sich ein scheinbar komplexes Netzwerk an Signalen von denen jedoch unter natürlichen Bedingungen nur wenige tatsächlich gleichzeitig auftreten.

1.4 PHD- und RING-Domänen Proteine

Neben den klassischen Transkriptionsfaktoren gibt es weitere Möglichkeiten zur Genregulation in der pflanzlichen Pathogen-Abwehr und der Entwicklung. Eine wichtige Rolle dabei spielen post-translationale Modifikationen wie zum Beispiel Methylierungen, Phosphorylierungen, Ubiquitinylierungen oder Acetylierungen an Histon Proteinen. Neben einer unterschiedlichen Packungsdichte, dem eng gepackten, transkriptionell inaktiven Heterochromatin und dem locker gepackten, transkriptionell aktiven Euchromatin, tragen die post-translationalen Modifikationen an den zugänglichen N-Termini der Histon-Proteine zur Regulation der Genexpression bei. Jede der Modifikationen besitzt unterschiedliche Einflüsse auf die Chromatin-Struktur und abhängig von der Modifikation können auch mehrere spezifische Modifikations-Stellen an den Histon Proteinen vorhanden sein. Durch die Änderung der Netto-Ladung aufgrund von Phosphorylierungen und Acetylierungen kommt es

zu einer Schwächung der Interaktion zwischen DNA und Histonen. Die damit verbundene leichtere Zugänglichkeit der DNA führt zur Aktivierung der Genexpression. Bei den Methylierungen von Lysinen und Argininen sind weitere Proteine notwendig, um diese posttranslationalen Modifikationen zu erkennen und in Regulationsmechanismen umzuwandeln. Die für diese Modifikationen zuständigen Histon *code reader* gehören der PHD- (PLANT HOMEODOMAIN) Finger Domänen Familie oder der Tudor ´royal´ Familie, bestehend aus Chromo-, Tudor, PWWP und MBT Domänen, an (Bannister and Kouzarides 2011). Ihre Funktion besteht unter anderem in der Rekrutierung von Proteinkomplexen zur weiteren Regulation der Chromatin Struktur. Sowohl in Pflanzen als auch Tieren kodieren die Histon Marker H3K4me3 (dreifache Methylierung der vierten Aminosäure [Lysin] von H3) für aktive und H3K27me3 für reprimierte Genexpression und können zur Fein-Justierung auch gleichzeitig auftreten (Zhao et al., 2019).

Die PHD-Finger Domäne wurde bereits 1993 für HAT3.1 beschrieben (Schindler et al., 1993). Die Histon *code reader* Funktion konnte jedoch erst 2006 anhand der PHD-Finger Domäne von ING2 (INHIBITORY OF GROWTH2) und der BPTF (BROMODOMAIN AND PHD DOMAIN TRANSCRIPTION FACTOR) PHD-Finger Domäne von NURF (NUCLEOSOME REMODELLING FACTOR) gezeigt werden (Li et al., 2006; Peña et al., 2006; Shi et al., 2006). Die PHD Domänen gehören zu den Zink-Finger Domänen da sie über regelmäßig angeordnete Cysteine und ein Histidin zwei Zink-Ionen koordinieren. Der Struktur einer PHD-Domäne liegt folgende Aminosäuresequenz zu Grunde: $C-X_2-C-X_{(9-21)}$ - $C-X_{(2-4)}$ - $C-X_{(4-6)}$ - $H-X_2$ - $C-X_{(12-46)}$ - $C-X_2$ -C (X ist eine beliebige Aminosäure) oder auch kurz C4HC3 (Capili et al., 2001). Die Koordination der Zink-Ionen erfolgt über eine sogenannte Querstreben (*cross-brace*) Ligations-Struktur bei der das erste und dritte Cystein-Paar beziehungsweise Cystein/Histidin-Paar die erste Zink-Bindungsstelle bilden und das zweite und vierte Cystein-Paar die zweite Zink-Bindungsstelle.

Einen ähnlichen strukturellen Aufbau wie PHD Domänen besitzen zum Beispiel RING (REALLY INTERESTING NEW GENE)-Domänen. Auch diese Domäne faltet der Querstreben-Struktur folgend zur Koordination von zwei Zink Ionen. Bei den RING-Domänen gibt es mehrere unterschiedliche Varianten wie zum Beispiel RING-HC und RING-H2 Domänen, welche sich nur durch den Austausch eines Cysteins durch ein Histidin an der Position 5 unterscheiden. Obwohl das grundlegende Muster zur Zink-Koordination gleich ist, bilden die PHD- und RING-Domänen unterschiedliche Protein-Oberflächen aus. In der enzymatischen Kaskade der Ubiquitinierung aus dem Ubiquitin-aktivierenden (E1) Enzym, dem Ubiquitin-konjugierenden (E2) Enzym und der E3 Ubiquitin-Ligase wird die Substrat-

Spezifität über die E3 Ligase vermittelt. E3-Ligasen besitzen entweder HECT (HOMOLOGOUS TO THE E6-AP CARBOXYL TERMINUS) oder RING-Domänen und vermitteln über Protein-Interaktionen die direkte oder indirekte Übertragung des Ubiquitins von E2 auf das Substrat. Bei der Übertragung einer Kette aus mindestens vier Ubiquitin-Segmenten wird das Substrat dem 26S-Proteasom zum Abbau zugeführt (Thrower et al., 2000).

RING-Domänen Proteine besitzen damit eine spezifische, wenn auch stark regulierte, Funktion. Im Gegensatz dazu zeigen PHD-Domänen Proteine eine Variabilität in den Kombinationen mit weiteren Domänen innerhalb der Proteine wodurch Funktionen in einem weiten Feld von Regulationsmechanismen möglich sind. Unter anderem spielen Sie auch in der Entwicklung von Blüten eine Rolle. Im Folgenden sollen einige dieser PHD-Proteine in der Blütenentwicklung vorgestellt werden, um einen kurzen Überblick über die Regulationsmöglichkeiten dieser Proteine zu geben.

1.4.1 PHD-Domänen Proteine in der Blütenentwicklung

Die Blütenentwicklung stellt den Prozess dar, welcher unmittelbar mit der erfolgreichen Vermehrung in blühenden Pflanzen verknüpft ist. Daher unterliegt er einer sehr strengen Regulation und Kontrolle. Beginnend in der vegetativen Phase der *A. thaliana* Entwicklung werden Blätter ausgehend von dem Haupttrieb-Meristem (SAM, *shoot apical meristem*) gebildet und nach der Initiierung der Blüte geht dies in ein Infloreszenz-Meristem über von dem die Blütenproduktion in Gang gesetzt wird. Der Lebenszyklus einer Blüte kann in 20 Phasen aufgeteilt werden, die von der Ausbildung der Organanlage über die Ausbildung der Blütenorgane bis zur Freisetzung der Samen verlaufen. Innerhalb dieser Zeit werden viele Prozesse der Differenzierung von Zellen und dem gerichteten Zellwachstum durchlaufen, deren Regulation komplex und eng kontrolliert ist (Alvarez-Buylla et al., 2010).

Die Regulation des Zeitpunktes der Blütenbildung wird über eine Kombination von indirekten (über Chromatin Marker) und direkten (Transkriptionsfaktoren) Einflüssen auf die Genexpression von unterschiedlichen Genen realisiert. Dadurch wird sichergestellt, dass alle notwendigen Signale zusammen passen um den nächsten notwendigen Schritt der Entwicklung zu aktivieren.

Bei der Initiierung der Blütenbildung übernehmen zwei PHD-Finger Domänen Proteine als Histon *code reader* wichtige regulatorische Funktionen. Das EBS (EARLY BOLTING IN SHORT DAYS) Protein und sein paraloges Protein SHL (SHORT LIFE) besitzen beide jeweils eine BAH (BROMO ADJACENT HOMOLOGY) und eine PHD-Domäne. Beide Proteine sind Regulatoren des Start-Zeitpunktes der Blütenbildung und in der Lage die Blütenbildung bis zum Vorhandensein von notwendigen Umweltfaktoren und internen Signalen in *A. thaliana* zu unterdrücken. Die *knock-out* Linien von SHL und EBS zeigen beide einen Phänotyp der frühzeitigen Blütenbildung und damit einer verkürzten vegetativen Phase (López-González et al., 2014).

EBS besitzt eine zweifache Bindungsfähigkeit von Histon-Modifikationen bei der die BAH Domäne H3K27me3 und die PHD-finger Domäne H3K4me3 Modifikationen erkennt. Die Bindung an diese Histon Marker erfolgt dabei in der Region des *FT (FLOWERING LOCUS T)* Gens und führt zur Verminderung der Expression desselben (Yang et al., 2018). Die Initiierung der Blütenbildung erfolgt durch die Wanderung des FT Proteins aus den Blättern zum SAM, wo die Aktivierung der Genexpression von den Identitäts-Genen des Blütenmeristems *LFY (LEAFY)* und *AP1 (APETALA1)* erfolgt (Becker and Ehlers, 2016). Ebenso wie EBS ist SHL in der Lage Histon Marker zu erkennen, was in der Region des *SOC1 (SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1)* Gens stattfindet. Durch die Repression des *SOC1* Gens werden die Ko-Faktor Eigenschaften mit Proteinen des ABCE-Models bis zur Initiierung der Blütenbildung unterdrückt (Ó'Maoiléidigh et al., 2014). Obwohl der Aufbau der beiden Histon *code reader* Proteine sehr ähnlich ist, erfolgt die Erkennung der post-translationalen Modifikationen mit einer hohen Spezifität da weder EBS an der *SOC1* Region noch SHL an der *FT* Region bindet.

Einleitung

1.5 Zielstellung

Zwei homologe PHD-Domänen Proteine aus *A. thaliana* zeigen eine hohe Konservierung in blühenden Pflanzen. Da diese Proteine, in einem Hochdurchsatz Proteinarray, als potenzielle MAP Kinase Substrate identifiziert worden sind, stellen sie vielversprechende Kandidaten zur Charakterisierung eines weiteren wichtigen Signalweges, im Bereich der Pathogen-Abwehr oder Blütenentwicklung, dar. Zur Charakterisierung dieser MAP Kinase Substrate sollten neben Fluoreszenz-Interaktionsstudien auch Phosphorylierungs-Analysen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durchgeführt werden. Eine weitere Ebene der funktionellen Aufklärung stellt in dieser Arbeit die Analyse von Genexpressions-Mustern und phänotypischen Veränderungen in unterschiedlichen Genotypen dar.

Neben der Validierung bekannter Interaktionspartner ermöglicht die Identifizierung neuer interagierender Proteine einen tieferen Einblick in funktionelle Abläufe. Dafür wurde die Etablierung einer im pflanzlichen System noch wenig verwendeten Methode der *in vivo* Markierung von Proteinen in dem *A. thaliana* Protoplasten-System anvisiert. Damit sollte die Detektion neuer Interaktionspartner ermöglicht werden, dabei vorallem solche die mit anderen Methoden schwer zugänglich sind.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien sind, wenn nicht anders aufgeführt, von Carl Roth, Sigma-Aldrich, MERCK oder Applichem GmbH.

2.1.2 <u>Media</u>

LB-Medium

10 g/l Bacto Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 5 g/l NaCl; Zugabe von 15 g/l Agar-Agar für festes LB-Medium

1/2 MS-Medium

2,2 g/l MS Medium inklusive Vitaminen (Duchefa), 2,5 g/l Saccharose, 0,195 g/l MES

2.1.3 Bakterien

Für die Klonierungsarbeiten wurden standardmäßig *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α (ThermoFisher Scientific) Zellen und in Ausnahmefällen One Shot Top10 *E.coli* Zellen (ThermoFisher Scientific) verwendet. Zur Proteinexpression wurden BL21 StarTM (DE3)pLysS One ShotTM *E.coli* (ThermoFisher Scientific) benutzt. Die Anzucht erfolgte, wenn nicht anders benannt, auf LB-Medium bei 37 °C.

Zur Agrobakterium-vermittelten Transformation von *A. thaliana* wurde der *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 Stamm verwendet und auf LB-Medium bei 28 °C angezogen.

2.1.4 Enzyme und Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme stammen von ThermoFisher Scientific und die Primer (Eurofins Genomics, <u>https://www.eurofinsgenomics.eu</u>) sind im Anhang, nach ihrem Verwendungszweck sortiert, aufgeführt.

2.1.5 <u>Antikörper</u>

Bezeichnung	Verdünnung	Herkunft	Firma/Nummer
Primäre Antikörper			
anti-HA 11, monoclonal	1:1000	Maus	Biolegend/ MMS-101P
anti-GST, polyclonal	1:1000	Ziege	GE Healthcare/27457701
anti-H3, polyclonal	1:5000	Kaninchen	Agrisera/ AS10 710
anti-c-myc, monoclonal	1:1000	Maus	Sigma-Aldrich/M4439-100
GFP, monoclonal	1:5000	Maus	Takara Clontech/632381
Sekundäre Antikörper			
anti-mouse HRP, polyclonal	1:10 000	Kaninchen	Sigma-Aldrich/A9044
anti-rabbit HRP	1:5000	Ziege	BioRad/170-6515
anti-goat HRP, polyclonal	1:20 000	Kaninchen	Sigma-Aldrich/A8919
weitere			
Strep-POD	1: 2500		Boehringer Mannheim

2.1.6 <u>Vektoren</u>

Vektor	Selektion	Struktur	Herkunft
pEXSG-CFP	amp	35S-GW-CFP	(Feys et al., 2005)
pENSG-YFP	amp	35S-YFP-GW	(Feys et al., 2005)
pENSG-CFP	amp	35S-CFP-GW	(Feys et al., 2005)
pE-SPYCE-GW	amp	35S-HA cYFP-GW-pA35S	(Walter et al., 2004)
pE-SPYNE-GW	amp	35S-myc nYFP-GW-pA35S	(Walter et al., 2004)
pDEST15	amp	pT7-SD-GST-GW	Invitrogen
pEarley104	kana	35S-YFP-GW-OCS	(Earley et al., 2006)
pEarley201	kana	35S-HA-GW-OCS	(Earley et al., 2006)
pUGW15	amp	35Sp,N-3xHA	(Nakagawa et al., 2007)
pUGW14-CT-	amp	35S-GW-CT-TurboID-3xHA nosT	Julia Lohmann
TurboID			
pUGW14-	amp	35S-GW-CT-miniTurbo-3xHA nosT	Julia Lohmann
miniTurboID			
pUGW14-BioID2	amp	35S-GW-CT-BioID2-3xHA nosT	Julia Lohmann
pUGW14-BioID	amp	35S-GW-CT-BioID-3xHA nosT	Julia Lohmann

pDGE4	SpecR,	Pnos:PAT-tnos; pPcUbi:Cas9-tocs;	(Ordon et al., 2017)
	BASTA	TTGC-BsaI_ccdB-Cm ^R _BsaI-GCTT	
pCR8/GW/TOPO	Spec	T7-GW	Invitrogen
pENTR	Kan	T7-GW	Invitrogen

2.1.7 Verwendete Kits

Bezeichnung	Firma
PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit	ThermoFisher Scientific
NucleoBond® Xtra Maxi	Macherey-Nagel
Invisorb® spin plasmid mini two Kit	Invitek
Invisorb® fragment cleanup	Invitek
GeneChip® WT PLUS reagent Kit	Affymetrix

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Sequenzierung

Die Sequenzierungs-Reaktionen wurden von dem Eurofins Genomics Labor durchgeführt.

2.2.1.2 Mutagenese Polymerasekettenreaktion (Mutagenese PCR)

Für die gezielte Einführung von Punktmutationen in Gene wurde eine Mutagenese PCR, mit jeweils speziell konstruierten Primern (siehe Anhang 12) laut Protokoll durchgeführt (Palm-Forster, Eschen-Lippold et al. 2012).

2.2.1.3 Quantitative Echt-Zeit PCR

Zur RNA-Isolation aus Pflanzenmaterial wurde die TRIzol-Methode verwendet (Rio et al., 2010). Die cDNA Synthese wurde mittels RevertAidTM (ThermoFisher Scientific) Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Mit der verdünnten (1:10) RNA wurde die Reaktion laut Herstellerangaben mit dem *Maxima Probe qPCR Master Mix* (ThermoFisher Scientific) oder dem *EvaGreen[®] qPCR Mix* (Bio&Sell) angesetzt. Die verwendeten Primer (EvaGreen) und Primer-Sonden-Paare (Taqman) sind in Anhang 14 aufgeführt. An dem MX3005 P (Agilent) wurde ein Taqman-Programm (15 min. 95°C, 40 x [15 min. 95°C, 1 min 60°C, dann

Messung]) und EvaGreen (10 min. 95°C, 40 x [95°C für 15 s, 64°C für 40 s, dann Messung], danach 2 min 95°C, Schmelzkurve [30s 55°C, 30s 95°C]).

2.2.1.4 DNA Isolation

2.2.1.4.1 Pflanzliche, genomische DNA für PCR

Die schnelle Präparation genomischer DNA nach (Edwards et al., 1991) erfolgte aus *A. thaliana* Blattmaterial zur Verwendung für Genotypisierungen. Folgende Ergänzung wurden vorgenommen: Der Extraktions-Überstand wurde mit gleichem Volumen Chloroform versetzt, gemischt und für 5 Minuten bei 13 000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde entnommen und mit dem gleichen Volumen Isopropanol gefällt. Die Pellets wurden in 10 mM Tris pH 8.0 aufgenommen und bei 4°C gelagert.

2.2.1.4.2 Plasmid-DNA aus E.coli

Die Isolation von Plasmid-DNA für Restriktionsverdaue erfolgte wie folgt. Die von LB-Platten angeimpften Übernachtkulturen wurden zentrifugiert und die Bakterienpellets in 100 μ l Lysis-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM EDTA; 15 % (w/v) Saccharose) resuspendiert. Anschließend wurden 200 μ l alkalische SDS-Lösung (0,2 M NaOH; 1 % (w/v) SDS) hinzu gegeben, vorsichtig gemischt und 5 min bei 4 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 150 μ L Kaliumacetat-Lösung (3 M Kaliumacetat, pH 4.8) und weiteren 5 min Inkubation bei 4°C erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 12716 g und 4°C. Der Überstand wurde mit 270 μ L Isopropanol gefällt. Nach 10 minütiger Inkubation bei RT erfolgte eine weitere Zentrifugation. Das mit 70 % Ethanol gewaschene Pellet wurde bei 37°C getrocknet und in 20 μ l doppelt destilliertem Wasser (dH₂O) aufgenommen.

Die Plasmid-Präparation für Sequenzierungen erfolgte mit dem Invisorb® spin plasmid mini two Kit.

Zur Generierung ausreichender Mengen an Plasmid-DNA für die Protoplasten-Transformation wurden 250 mL Bakterienkulturen mit dem *ThermoFisher Scientific PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit* oder *NucleoBond*® *Xtra Maxi* (Macherey-Nagel, <u>https://www.mn-net.com/de</u>) aufgearbeitet.

2.2.1.5 Glycerin Stammkultur

Zum Anlegen einer Glycerin Stammkultur wurde eine Übernachtkultur 3:4 mit sterilem 80 %igen Glycerin verdünnt und bei -80 °C gelagert.

2.2.1.6 Mikroarray

Blattmaterial von 6 Wochen alten Pflanzen (Col-0, PPL1 ÜE 7-5, *ppl2*) wurden mit 1 μ M flg22 oder Wasser infiltriert und nach 1 Stunde in drei biologischen Replikaten geerntet. Die RNA Isolation erfolgte mit den *RNeasy Kit* (Qiagen, <u>https://www.qiagen.com/de/</u>) und wurde mit *DNaseI* (Qiagen) behandelt. Die Kontrolle der Qualität erfolgte mit dem Qiaxcel ScreenGel (Qiagen). RNA-Proben (100 ng) mit einer *RNA integrity number* (RIN) \geq 8 (Schroeder et al., 2006) wurden für die cDNA Synthese mit dem *WT PLUS Reagent Kit* (Affymetrix, <u>http://www.affymetrix.com/products/index.affx</u>) und Hybridisierung mit den *GeneChipTM Arabidopsis Gene 1.1 ST Array Strips* (Applied Biosystems) nach Hersteller Angaben ausgewählt. Die Array Strips wurden mit dem GeneAtlas System (Affymetrix) ausgelesen und mit den Affymetrix Power Tools (v 1.15.1) vorbearbeitet.

Die Bearbeitung und statistische Auswertung der Daten wurde von Dr. Benedikt Athmer (IPB Halle) unter Verwendung von R/Bioconductor Paketen (XPS, C. Stratowa) und einer adaptierten Pipeline nach (Tabassum et al., 2019) durchgeführt. Die Normalisierung der Rohdaten erfolgte mittels Robust Multiarray Averaging (RMA) durch Quantil-Normalisierung. Die Daten wurden auf nicht detektierte Sonden Sets untersucht um den Hintergrund, unter Verwendung von *detection above background* Tests auf dem Exon-Level, zu extrahieren. Die nicht detektierten Probes wurden vor der Detektion von differentiell exprimierten Genen aus dem Datensatz entfernt.

Die statistische Analyse der differentiellen Genexpression wurde mittels dem R/ Bioconductors LIMMA *package* (Ritchie et al., 2015) durchgeführt. Die P-Werte wurden unter Verwendung des Benjamini und Hochberg False Discovery Rate (FDR) Verfahrens korrigiert (Benjamini and Hochberg, 1995). Differentiell exprimierte Gene wurden mit einem Signifikanz Grenzwert von FDR < 0,05 und einem minimalen ("Repression/Induktion Wert") *log2-fold change* von \pm 1 identifiziert. Diese differentiell exprimierten Gene wurden über die Kalkulation des z-scores in R skaliert. Die entsprechenden Daten sind als Tabelle auf der CD als Anhang hinterlegt (Dateien/Report_microarray Analyse). Anschließend erfolgte die Analyse der Daten wie in 2.2.3.2 beschrieben.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Co-IP mit Histon Proteinen

Die relative Konzentration der mittels GSH-Sepharose gereinigten Proteine (2.2.2.3) wurde mittels Coomassie Blau gefärbtem SDS-Gel überprüft. Die GSH-Sepharose wurde mit

Bindungs-Puffer (20 mM Hepes-KOH ph 7.6, 200 mM KCl, 2,5 mM MgCl2, 10 % Glycerol, 0,05 % NP40, 0,1 mM PMSF, 1mM DTT) ohne Salz gewaschen und anschließend für 20 min bei 4°C mit 1 % BSA in Bindungs-Puffer geblockt. Nach dem Zentrifugations-Schritt für 20 Minuten bei 4°C und 2000 rpm wurde der Überstand entsorgt und 3,6 µg Histon-Mix aus Kalbsthymus (MERCK, <u>https://www.merckmillipore.com/DE/de</u>) verdünnt in Bindungs-Puffer dazugegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Im Anschluss wurden folgende Wasch-Schritte durchgeführt: zweimal mal mit Bindungs-Puffer, einmal mal mit RIPA-Puffer (10 mM Tris pH 7.5, 1mM EDTA, 0,2 % NP40 mit 200 mM NaCl), einmal mal mit RIPA-Puffer (400 mM NaCl) und einmal mit RIPA-Puffer (600 mM NaCl). Im Anschluss wurden die Pellets mittels Western Blot analysiert.

Bei der Verwendung von isolierten *A. thaliana* Zellkernen (2.2.2.6) wurden diese in IP-B Puffer (1 mM EDTA, 10 % Glycerin, 75 mM NaCl, 0,05 % SDS, 100 mM Tris-Cl pH 7,4, 0,1 % Triton, 1x P-Mix) aufgenommen, mit Ultraschall (3x 10 s bei 20 % Amplitude) aufgeschlossen und der Überstand als Extrakt mit den rekombinanten Proteinen vereinigt. Die Bindung erfolgte für 1,5 Stunden unter Rotation im Kühlraum. Anschließend wurde die GSH-Sepharose mit RIPA-Reinigungspuffer (20 mM Tris pH 7.5, 1 % NP40, 0,5 % Nadesoxycholat, 500 mM NaCl) gewaschen und die gebundenen Proteine mittels Western Blot analysiert.

2.2.2.2 Zell-freier Abbau Assay

Der Zell-freie Abbau Assay erfolgte nach dem Protokoll von (Lyzenga et al., 2012). Für diesen Assay fand die Anzucht von *A. thaliana* Col-0 Keimlingen unter Langtag Bedingungen in ¹/₂ MS-Medium in 24-Well Mikrotiterplatten statt. Die Konzentrations-Bestimmung der Proteinextrakte erfolgte mittels Bradford Reagenz (BioRad, <u>https://www.bio-rad.com/</u>) laut Protokoll an dem Tecan Infinite F-50 mittels Magellan V 7.0 Software, anhand einer BSA Standard-Kurve. Abweichend zu (Lyzenga et al., 2012) wurde die Vorbehandlung mit Proteasom Inhibitor mit MG115 durchgeführt. Die Proteinproduktion und –aufreinigung sowie Proteinelution erfolgte wie beschrieben (2.2.2.3 und 2.2.2.4). Die Detektion der rekombinanten Proteine erfolgte mittels Western Blot und anti-GST Antikörper.

2.2.2.3 Proteinproduktion und –aufreinigung

Die Proteinproduktion erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3) Star Zellen in 50 ml bis 100 ml Kulturen. Das Wachstum wurde mit 750 µl Übernachtkulturen von Zellen mit *pDEST15 GST-PPL1*, *pDEST15 GST-PPL1mutPHD*, *GST-PPL2* und *GST* gestartet. Nach 2 Stunden bei 37°C und 120 rpm Wachstum erfolgte die Induktion der Proteinproduktion durch die sterile

Zugabe von 150 μ M IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid). Für GST-PPL1, GST-PPL2 und GST erfolgte die Ernte nach 2 Stunden bei 37°C und für GST-PPL1mutPHD bereits nach einer Stunde. Die Kulturen wurden zentrifugiert und die Pellets direkt für die Proteinaufreinigung eingesetzt.

Zur Proteinaufreinigung wurden die Pellets mit 10 ml Tris gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Resuspension in 5 ml RIPA-Reinigungspuffer (siehe 2.2.2.1 mit 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin und 150 µM PMSF) und die anschließende Lyse mit 200 µg/ml Lysozym. Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Lysate in Stickstoff gefroren und entweder bei – 80°C gelagert oder direkt weiter aufgearbeitet. Die Lysate wurden anschließend auf Eis aufgetaut und mittels Ultraschall (3x10s, 40 % Amplitude) aufgeschlossen. Nach Zugabe von 2 µg/ml DNaseI erfolgte eine Inkubation von 10 Minuten auf Eis und eine Zentrifugation von 30 Minuten bei 11 000 rpm. Währenddessen wurde die GSH-Sepharose (GE Healthcare, <u>www.gelifesciences.com</u>) laut Herstellerprotokoll gewaschen und davon 25 µl 50 % verdünnter GSH-Sepharose zu der Proteinlösung gegeben. Die Inkubation erfolgte rotierend über Nacht bei 4°C. Nachdem zweimaligen Waschen mit RIPA-Reinigungspuffer wurden die gebundenen Proteine eluiert oder direkt eingesetzt.

2.2.2.4 Proteinelution von GSH-Sepharose

Für die Proteinelution wurde der Überstand der GSH-Sepharose gebundenen Proteine abgenommen und diese mit Elutionspuffer (150 mM Tris-Cl pH 8, 400 mM NaCl, 20 % Glycerin, 5 mM DTT, 40 mM Glutathion), welcher mit NaOH auf pH 8 eingestellt wurde, vermengt. Danach erfolgte eine Inkubation unter schütteln für 15 Minuten bei 4°C. Dieser Elutionsschritt wurde zweimal wiederholt.

2.2.2.5 In vitro Kinase Assay

Für die *in vitro* Phosphorylierung wurden drei rekombinante und denaturierend gereinigte Kinasen, His10-MPK3, His10-MPK4 und His10-MPK6, verwendet. Diese wurden durch die konstitutiv aktivierte MKK5 aus *Petroselinum crispum* aktiviert und waren vorhanden (Pecher et al., 2014; Lee et al., 2004). Zur Überprüfung der Aktivität der Kinasen wurde das artifizielle Substrat MBP (myelin basic protein) verwendet. Für die Reaktion wurden die Kinasen jeweils mit den an GSH-Sepharose gebundenen Proteinen (GST-PPL1, GST-PPL1^{AA}, GST-PPL2, GST-PPL2^{AA}) in 1x Kinase-Puffer (100 mM HEPES pH 7.5, 75 mM MgCl₂, 25 mM EGTA, 5 mM DTT, 1x Protease-Inhibitor HP-Mix) vermengt. Nach der Zugabe von 0,1 μ l [γ ³³]-ATP (HARTMANN Analytic GmbH) pro Reaktion erfolgte die

Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 5x Laemmli-Probenpuffer gestoppt und bei 95°C aufgekocht. Die Reaktionsansätze wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Trocknen mit Phosphor Imager Filmen (GE Healthcare) inkubiert. Das Auslesen der autoradiographischen Signale erfolgte in dem Phosphor Image Modus des *Typhoon 9410* (GE Healthcare).

2.2.2.6 Isolation intakter Zellkerne aus Pflanzenmaterial

Die Präparation der Zellkerne aus pflanzlichem Blattmaterial erfolgte nach (Elrouby et al., 2013). Hierfür wurde das gemörserte Material in dem 4 fach Volumen an NEB (*nuclear extraction buffer*)-Puffer unter schütteln aufgetaut. Sofort erfolgte die Zugabe des Protease Inhibitor Mix (P Mix, Serva, <u>https://serva.de/deDE</u>) laut Protokoll. Nach einem Zentrifugationsschritt für 15 Minuten, bei 4°C und 1700g wurde der Überstand als zytosolische Fraktion abgenommen und das Pellet in Wasch-Puffer in Lösung gebracht. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurde der Wasch-Vorgang noch 2-mal wiederholt und das Pellet sowie die zytosolische Fraktion mittels Western-Blot Analyse untersucht.

2.2.2.7 Isolation intakter Zellkerne aus Protoplasten

Die Präparation der Zellkerne aus *A. thaliana* Protoplasten erfolgte nach dem CelLyticTM PN Isolation/Extraktion Kit (Sigma-Aldrich, <u>https://www.sigmaaldrich.com/germany.html</u>). Das Pellet von 500 µl transformierten Protoplasten wurde in gleichen Volumen NIB2 (10 mM MES ph 5.7, 0,2 M Saccharose, 2,5 mM EDTA, 2,5 mM DTT, 0,1 mM Spermidin, 10 mM NaCl und 10 mM KCl) mit 0,2% Triton X-100 durch pipettieren in Lösung gebracht und mit einem Pistell für 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeschlossen. Anschließend wurden 700 µl 1,5 M Saccharose mit der Suspension überschichtet und in einem Ausschwingrotor für 20 Minuten bei 3220 g zentrifugiert. Der Überstand wurde als zytosolische Fraktion abgenommen, mit 4 Volumen Aceton versetzt und für 2 Stunden bei -20 °C gefällt. Das nach einer Zentrifugation bei 15 000 g und 4°C für 15 Minuten entstandene Pellet wurde getrocknet und in 1x SDS-Laemmli-Puffer aufgenommen. Die übrige Saccharose Schicht wurde entsorgt und das Kern-Pellet mit 500 µl NIB2 gewaschen. Anschließend wurde das Kern-Pellet in 1x SDS-Laemmli-Puffer aufgenommen. Die Analyse erfolgte mittels Western Blot.

2.2.2.8 SDS-PAGE und Immunoblot Detektion

Proteinproben wurden mit 4 x SDS-Ladepuffer (25 % 0,5 M Tris pH 6.8, 4 % SDS, 20 % Glycerin, 2 % β -Mercaptoethanol, 0,005 % Bromphenolblau) und 300 μ l abzentrifugierte Protoplastenproben entsprechend mit 1 x SDS-Ladepuffer versetzt und je für 5 min. bei 95°C

erhitzt. Die diskontinuierliche Sodiumdodecylsulaft-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) Auftrennung nach (Laemmli, 1970) erfolgte in einer Se250 Mighty Small II Mini Vertical Electrophoresis Unit (Hoefer, www.hoeferinc.com) für 90 min. bei 120 V in 1 x SDS-Laufpuffer (25 mM Tris; 192 mM glycine; 0,1% SDS). Es wurden 15% Gele aus Trenngel (15 % Rotiphorese Gel 30, 0,375 M Tris (pH 8,8), 0,1 % SDS, 0,1 % Ammoniumpersulfat (APS), 0,04 % Tetramethylethylendiamin (TEMED)) und Sammelgel (4,875 % Rotiphorese Gel 30, 0,125 M Tris (pH 6,8), 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 0,1 % TEMED) verwendet. Die Proteine wurden anschließend mittels semi-dry blotting im Trans-Blot SD (BioRad) bei 1 mA pro cm² für 60 min. in Blotpuffer (24mM Tris, 192mM Glycin, 0,037 % SDS und 20 % Methanol) auf eine Nitrocellulose Membran (Parablot NCL, Macherey-Nagel) übertragen. Anschließend wurden die Membranen mit 5 % Blocking Milch (5 % Milchpulver, 50 mM Tris-Hcl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 % Tween 20) oder 3 % BSA geblockt und entweder 1 Std. bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit den entsprechenden Antikörpern (vgl. 2.1.5) inkubiert. Die Waschschritte wurden mit TBST (50 mM Tris-Hcl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 % Tween 20) durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit dem ECLTM Prime Western Detektion Kit (Amersham, https://www.selectscience.net/suppliers/amershambiosciences-corp/?compID=2504) laut Herstellerangaben.

2.2.2.9 Strip-Protokoll

Das Standard Strip-Protokoll erfordert eine Inkubation der Membran mit Strip-Puffer (0,2 M Glycin, 0,1 % SDS, ph 2, 0,07 % β -Mercaptoethanol) für 30 min. bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Blot 4 x für 10 min. mit Wasser und 1 x mit TBST gewaschen und anschließend erneut geblockt (vgl. 2.2.2.8).

Für die beprobten Membranen mit strep-POD wurde anfangs eine Inaktivierung der POD mit 15 % H_2O_2 für 30 min. bei 37 °C und einem Waschschritt mit TBST für 5 min. durchgeführt.

2.2.2.10 Protoplasten-Isolation und -Transformation

Die Protoplasten-Isolation und -Transformation wurden mit folgenden Änderungen nach dem Protokoll von (Yoo et al., 2007) durchgeführt. Es wurden 5 bis 6 Wochen alte Pflanzen verwendet (vgl. 2.2.4.1). Nach der Infiltration wurde die Blattstreifen für 3 Stunden bei 18°C im Dunkeln inbukiert und bei den nachfolgenden Wasch-Schritten auf Eis gelagert. Alternativ wurde die Tape-Sandwich Methode für die Protoplasten-Isolation verwendet (Wu et al., 2009) und die Wasch-Schritte sowie die Transformation wie bei (Yoo et al., 2007) beschrieben durchgeführt. Die 10 µg Plasmid-DNA pro 100 µl Protoplasten-Lösung wurde mittels *PureLinkHiPure Plasmid Maxiprep Kit* oder *NucleoBond Xtra Maxi Kit aufgereinigt* (vgl.

2.1.7). Die transformierten Protoplasten wurden über Nacht bei 18°C inkubiert und anschließend für mikroskopische Untersuchungen (2.2.3.3), Immunoblot Analysen (2.2.2.8) oder *proximity-labeling* Versuche (2.2.2.11) verwendet.

2.2.2.11 Proximity-labeling in A. thaliana Protoplasten

Etablierung einer neuen Methode zur in vivo Markierung von Interaktions-Proteinen unter Verwendung einer neuen Biotin-Ligase namens TurboID (Branon et al., 2018). Als Ausgangsmaterial dienten 10 ml laut Protokoll transformierte Protoplasten (2.2.2.10) mit folgenden Änderung: Isolation der Protoplasten mittels Skalpell-Methode auf Glasplatten. Die verwendeten Plasmide sind pUGW14-CT-TurboID mit den Genen PPL1, PPL2, CFP und H3. Die Markierungs-Reaktion erfolgte für eine Stunde mit 50 µM Biotin (gelöst in WI-Puffer) bei 18 °C. Im Zuge der Etablierung wurden zwei Aufschluss-Protokolle, ein Protokoll aus dem Säugerzellen-System nach Roux (Roux et al., 2012) und ein Protokoll aus dem Pflanzen-System nach Khan (Khan et al., 2018), getestet. Bei dem Aufschluss-Protokoll nach Roux erfolgte nach einer Waschung der Protoplasten mit 0.6 M Mannitol eine Extraktion im Roux-Puffer (50 mM Tris pH 7.4, 500 mM NaCl, 0,4% SDS, 5 mM EDTA und 1 mM DTT) durch starkes Durchmischen und eine Ultraschall-Behandlung. Diese Prozedur wurde nach der Zugabe von 2 % Triton wiederholt. Bei einem Zentrifugations-Schritt erfolgte die Trennung in die löslichen Proteine im Überstand und das Pellet der unlöslichen Proteine. Im Gegensatz dazu erfolgte bei dem Protokoll nach Khan nach der Zugabe des Khan-Puffers (20 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl, 1mM DTT) eine Inkubation auf Eis, eine Durchmischung und wurde gefolgt von einem Zentrifugations-Schritt (30 Minuten, 20 000 g, 4°C). Daran anschließend wurden diese Schritte mit dem Pellet und der Zugabe von 0,4% SDS und 1% Triton wiederholt. Von allen Schritten beider Protokolle wurden Proben gesammelt und mittels Western-Blot analysiert.

Anschließend wurde von den löslichen Proteinen, über eine laut Herstellerangaben verwendete Sephadex PD10-Säule (GE Healthcare) die Konzentration des freien Biotins vermindert. Daraufhin erfolgte die Bindung biotinylierter Proteine an *Dynabeads MyONE Streptavidin C13* (ThermoFisher Scientific) unter Rotation über Nacht bei 4°C. Die *beads* wurden daraufhin laut Khan gewaschen und in 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat pH 8.0 (ABC-Puffer) aufgenommen (Khan et al., 2018).

2.2.3 Analytische Methoden

2.2.3.1 Aufarbeitung, Messung und Analyse massenspektrometrischer Proben

Die beprobten beads wurden on-bead mit Trypsin verdaut und die Peptid-Lösung entsalzt wie in (Majovsky et al., 2014) beschrieben, mit folgenden Änderungen: Nach dem Trypsin-Verdau über Nacht wurden die *beads* mit einem Magneten abgetrennt und der Überstand bis zur Trocknung eingeengt. Die Peptide wurde nach dem Entsalzen und erneuten Einengen in 5 % Acetonitril, 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) gelöst und 2 µg in ein EASY-nLC 1000 Flüssigchromatographie System (ThermoFisher Scientific) injiziert. Die Auftrennung der Peptide mittels C18 reverse phased Flüssigchromatographie erfolgte mit Hilfe eines 120 min Gradienten mit steigender Acetonitril Konzentration von 5 % bis 40 % in 0,1 % Ameisensäure (FA) bei einer Flussrate von 250 nl/min. Die eluierten Peptide wurden on-line mittels Elektrospray in das QExactive Plus Massenspektrometer (MS) (ThermoFisher Scientific) überführt. Die Spray Spannung war 1,9 kV, die Kapillar-Temperatur 275°C und die Z-Linsen Spannung 240 V. Ein voller MS Scan mit chromatograpischen Peak Weiten von 15 s, einer Auflösung von 70 000, einer automatic gain control (AGC) von 3E+06 und einer maximalen Injektionszeit (injection time, IT) von 100 ms wurde durchgeführt. Die Sequenzierung der MS/MS Peptide erfolgte mit einer Top10 DDA Scan Strategie mit HCD Fragmentierung. Es konnten MS Scans mit einer mass to charge ratio (m/z) zwischen 400 und 1850 erhalten werden. Die MS/MS Scans wurden mit den Einstellungen der Auflösung bei 17 500, AGC von 5E+04, einer IT von 50 ms, einer Isolationsweite von 1,6 m/z, einer normalisierten Kollionsenergie von 28, einer Unter-Füllrate von 3%, eines dynamischen Ausschluss-Zeitraums von 20 s und einem Intensitäts-Grenzwert von 3E+04 durchgeführt.

Die Identifizierung der Peptide und Proteine erfolgte mit Mascot v2.5.0 (Matrix Science) mit der Verbindung zu Proteome Discoverer v2.1 (ThermoFisher Scientific). Bei der TAIR Datenbank-Suche, mit zusätzlichen üblichen Kontaminationen, wurden Fehler der Ionen-Massen von 5 ppm und Fehler der Fragment-Ionen-Massen von 0,02 Da (Dalton) toleriert. Die Carbamidomethylierung von Cysteinen (C) wurde als feste Modifikation eingestellt, wohingegen die Biotinylierung von Lysinen (K), die Biotinylierung von freien N-termini (Nterm) und die Oxidation von Methioninen (M) als mögliche Modifikationen angegeben wurden. Für jedes Spektrum wurde die *false discovery rate* (FDR) der *peptide spectrum matches* (PSM) auf dem Peptid-/Proteinlevel und die Peptidgruppen und Proteine anhand des *target-decoy database* Modells und des Perkolations Modells berechnet. PSMs, Peptid-Gruppen und Proteine mit einem q-Wert oberhalb des Signifikanz-Grenzwertes einerseits von α = 0,01 für PSMs und Peptidgruppen und andererseits von α = 0,05 für Proteine wurden als identifiziert eingestuft. Die entsprechenden Tabellen der Messungen sind auf der CD als Anhang hinterlegt (Dateien/BioID_Massenspektrometrische Messung 1+2+3 von PPL1-TurboID, PPL2-TurboID und CFP-TurboID).

2.2.3.2 In-silico Datenanalyse

Für das paarweise Alignment der Proteinsequenzen von PPL1 und PPL2 wurde das online verfügbare CLUSTALW Tool, mittlerweile verbessert zu CLUSTAL OMEGA, von EMBL-EBI verwendet (Madeira et al., 2019). Die Darstellung erfolgte mit dem öffentlichen BOXSHADE Tool ausgehend von dem EXPASY Bioinformatics Resource Portal (https://embnet.vital-it.ch/software/BOX_form.html).

Der phylogenetische Baum in Abbildung 4 wurde mit *plantsENSEMBL genomes* (Howe et al., 2019) erstellt und dient zur Darstellung der 71 orthologen und 1 paralogen Gene zu *PPL1* aus *A. thaliana*.

Für die Darstellung zur paarweisen Konservierung der PPL1/PPL2 Orthologen (Anhang 3) erfolgte mit Phylogeny.fr. Dieses Webtool verbindet mehrere bioinformatische Programme um ein robustes Ergebniss zu generieren. Dabei wird MUSCLE für das Alignment, GBlocks für die Datenaufstellung, PhyML zur Generierung des phylogentischen Baums und TreeDyn zur Darstellung verwendet (Dereeper et al., 2008). Die verwendeten Gen-Sequenzen zu den vereinfachten Benennungen sind im Anhang 15 aufgeführt.

Zur Analyse von Interaktions-Netzwerken wurde sowohl für unterschiedliche regulierte Gene in der Transkript-Analyse als auch für potenzielle Interaktoren bei der *proximity labeling* Methode die STRING Analyse verwendet (Szklarczyk et al., 2019).

Zur Darstellung von überlappenden Transkripten unterschiedlicher Genotypen in der Transkript-Analyse und von überlappenden potenziellen Interaktoren bei der *proximity labeling* Methode wurde Venny 2.0.2-CSIC (<u>https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index2.0.2.html</u>) von Juan Carlos Oliveros (Spanish National Biotechnology Centre) verwendet.

2.2.3.3 Mikroskopie

Die mikroskopische Untersuchung der mit *pENSG-YFP* (Lokalisation) oder *pENSG-YFP* und *pENSG-CFP/pEXSG-CFP* (Ko-Lokalisation) transformierten Protoplasten erfolgte am LSM710 später LSM780 (Zeiss, <u>https://www.zeiss.de/mikroskopie/home.html</u>) mit der ZEN Software. Dabei wurde die Lokalisation der Fusionsproteine YFP-PPL1/PPL1^{AA} und YFP-

PPL2/PPL2^{AA} über das YFP Signal (Anregung durch Argon-Laser bei 514 nm, Emissionsdetektion von 500 bis 570 nm) detektiert. Bei der Ko-Lokalisation wurde zusätzlich in einem zweiten Kanal die CFP Signale (Anregung durch Argon-Laser bei 458 nm, Emissionsdetektion von 480 bis 520 nm) aufgenommen.

Bei den BIFC Untersuchungen wurden durch *pE-SPYCE* und *pE-SPYNE* Vektoren (Walter et al., 2004) zur Generierung von c-YFP-PPL1/2 und nYFP-MPK3/4/6/11/8 bzw. cYFP-PPL1/2/1mutPHD und nYFP-H3.1/H3.1 Δ N Fusionen in *A. thaliana* Protoplasten Interaktionsstudien durchgeführt. Die Detektion der YFP-Signale erfolgte wie oben beschrieben.

Die Lokalisation von YFP-PPL1 und YFP-PPL2 durch die Infiltration von Agrobakterien mit *pEarly*-Vektoren (Earley et al., 2006) in *Nicotiana benthamiana* Blattmaterial wurde ebenfalls am LSM710 mittels YFP-Signal Detektion überprüft.

2.2.4 Pflanzen

2.2.4.1 Anzucht

Die Anzucht von *A. thaliana* Col-0 Pflanzen zur Verwendung für die Protoplasten Transformation erfolgte auf Einheitserde Cl Ton Kokos (Gebr. Patzer, <u>https://www.einheitserde.de/einheitserdewerke/einheitserdewerke/</u>) in Phytokammern bei Kurztag (8 Std. beleuchtet/ 16 Std. dunkel) bei 22°C.

Die Anzucht von *Nicotiana benthamiana* Pflanzen erfolgte auf Einheitserde CL Ton Kokos und im Gewächshaus bei einer Beleuchtung von Langtag (16 Std beleuchtet/ 8Std. dunkel).

Die sterile Anzucht von Keimlingen in 24 Well Platten in ½ MS-Medium fand im Lichtraum bei 24°C und Langtag (16 Std licht, 8 Std dunkel) statt. Die Sterilisation der Samen erfolgte nach (Trempel et al., 2016).

2.2.4.2 Agrobakterium vermittelte Transformation von Col-0 Pflanzen

Die Agrobakterium (*A. tumefaciens* GV3101) vermittelte Transformation von *A. thaliana* Col-0 Pflanzen erfolgte mittels Blüten-Eintauch-Methode welche in (Logemann et al., 2006) beschrieben ist. Die Linien welche *HA-PPL1* unter dem 35S-Promoter exprimieren wurden mit Hilfe des *pEarlyGate201* Vektors generiert (Earley et al., 2006).

2.2.4.3 Selektion Überexpressionslinien

Die Samen der Transformanten aus 2.2.4.2 mittels Basta-Selektion auf positiv transformierte Pflanzen (T1) getestet. Die T2 Generation wurde erneut mittels Basta-Selektion in der T3 auf

homozygote Linien untersucht. Diese homozygoten Linien wurden anschließend mittels Southern-Blot auf Linien mit einzelnen Vektor Kopien und mittels Western Blot auf detektierbare Proteinlevel selektiert. In dieser Arbeit wurden die Linien 5-6 und 7-5 verwendet.

2.2.4.4 Klonierung von CRISPR-Cas9 Konstrukten

Zur Generierung von *ppl1* knock out Linien wurde die Gensequenz nach CRISPR-Cas9 Zielsequenzen (Belhaj et al., 2015) mit Hilfe des CHOPCHOP (<u>https://chopchop.cbu.uib.no/</u>) Tools untersucht. Zur Klonierung der Konstrukte wurde das molekulare Klonierungssystem von (Ordon et al., 2017) verwendet. Dafür wurden die in Anhang 13 aufgeführten Oligos in die *shuttle* Vektoren pDGE5 und pDGE8 überführt und anschließend in den *multiplex genom editing* Vektor pDGE4, kodieren für die Cas9 unter Kontrolle des Ubiquitin Promoters aus Petersilie, eingefügt.

2.2.4.5 Screen von CRISPR-Cas9 Linien

Für den ersten Screen auf mutierte Linien wurde ein T7 Endonuklease Verdau durchgeführt. Zur Generierung der zu verdauenden Fragmente wurde die Primer in Anhang 13 verwendet. Für den Test auf homozygote oder heterozygote Linien wurden durch PCR generierte Fragmente, einmal mit Col-0 und einmal ohne Col-0 Sequenz, in NEBuffer2 vorgelegt und durch erwärmen auf 95°C und abkühlen gemischt. Durch Zugabe der T7 Endonuklease (New England Biolabs, <u>https://www.neb-online.de/</u>) wurden Fragmente mit *mismatches* geschnitten, detektiert und durch Sequenzierung bestätigt.

Für die bekannten Nukleotid-Insertionen konnte ein *caps marker* Screen durchgeführt werden. Mit dem geeignetem Restriktionsenzym (XceI, ThermoFisher Scientific, <u>https://www.thermofisher.com</u>) konnten die PCR-Produkte verdaut und die Linien analysiert werden.

2.2.4.6 Phänotypisierung

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte in Phytoschränken (Langtag, 20°C hell 16 Std., 18°C dunkel 8 Std.) und Phytokammern (Kurztag, 20°C hell 8 Std., 18°C dunkel 16 Std.). Die Blüten der Entwicklungsphase 14 wurden geerntet, fotografiert und anschließend die Petale separiert. Zur Bestimmung der Fläche, Länge und Breite wurden Aufnahmen der Petalen am Stemi 2000-C mit AxioCamICc3 und der Software AxioVision Rel 4.7 (Zeiss) erstellt und in ImageJ (Schneider et al., 2012) im monochromen Modus die Fläche, Länge und Breite bestimmt. Zur Zählung der Zellen (Cheng et al., 2014) wurden die bereits separierten Petalen
in 70 % Ethanol über Nacht entfärbt und am Nikon AZ100 Mikroskop (Nikon) mit Nikon DS-Fi1c Kamera Aufnahmen mit 30 facher Vergrößerung in NIS-Elements D erstellt. Mit Hilfe des Cell Counter Add-ons (Kurt De Vos, University of Sheffield) wurden in ImageJ die Zellen pro 0,1 mm x 0,1 mm manuell gezählt.

Ergebnisse

3 Ergebnisse

3.1 Konservierte Merkmale der PPL-Proteine

Die Charakterisierung von MAP Kinase Substraten spielt für die Erforschung der Spezifität von MAP Kinase Kaskaden eine entscheidende Rolle. In dieser Arbeit sollten zwei noch unbekannte homologe Proteine aus A. thaliana auf ihre Rolle als MAP Kinase Substrate untersucht werden. Das erste Gen (At1g02070) liegt auf Chromosom 1 von A. thaliana und kodiert mit 503 Nukleotiden (inklusive einem Intron) für 131 Aminosäuren. Das Genprodukt wurde im Zuge dieser Arbeit als PLANT-SPECIFIC PHD-LIKE1 (PPL1) benannt. In meiner vorrausgegangenen Masterarbeit erfolgte die Analyse noch unter dem Namen PHD (Missal, 2014). Dieses Protein wurde in einer Hochdurchsatz Protein-Array Analyse als MPK3 Substrat identifiziert und durch seine PHD-ähnliche Domäne als mögliche Verbindung der MAP Kinase Kaskaden zu epigenetischen Markern in der Pathogen-Abwehr ausgewählt (Feilner et al., 2005). Bei Untersuchungen auf homologe Proteine konnte auf Chromosom 3 ein weiteres Gen (At3g60520) identifiziert werden, welches mit 717 Nukleotiden (inklusive einem Intron) für 129 Aminosäuren kodiert. Dieses Genprodukt wurde analog zu PPL1 als PPL2 bezeichnet. Um einen ersten Eindruck davon zu bekommen, unter welchen Bedingungen und in welchen Organen die Gene exprimiert werden, wurde mit dem Arabidopsis eFP Browser (electronic fluorescent pictogram) gearbeitet (Winter et al., 2007). Als mögliche MAP Kinase Substrate könnte für diese Genprodukte eine Regulation in Bezug auf biotischen oder auch abiotischen Stress postuliert werden. Für PPL1 konnte eine verminderte Expression in Blättern bei Kälte und osmotischem Stress, sowie eine veränderte Expression bei Hypoxie herausgearbeitet werden. PPL2 zeigte hingegen eine erhöhte Expression bei Kälte. Für beide Gene liegt nach 24 Stunden nach der Infiltration mit dem virulenten Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 eine verminderte relative Expression vor (Anhang 1). Damit unterstützen diese Daten die Hypothese der Rolle von PPL1 und PPL2 in der Pathogen Abwehr beziehungsweise der Stressantwort.

In Bezug auf die unterschiedlichen Entwicklungsstadien von *A. thaliana* besteht für *PPL1* eine hohe Expression in Petalen und eine erhöhte Expression in den Internodien relativ zu dem Mittelwert aller gemessenen Werte der Entwicklungs-Proben (eFP-Browser). Im Gegensatz dazu zeigten die Daten von *PPL2* ein generell gleichmäßigeres Expressionsmuster. Bei dem Vergleich der relativen Expression von *PPL1* und *PPL2* in Blüten zeigten sich für *PPL2* in Petalen sogar negative Expressionswerte (Anhang 2). Anhand dieser Daten war es

30

möglich *PPL1* und *PPL2* als homologe Genprodukte einzuordnen, deren Genregulation jedoch unterschiedlich zu sein scheint. Ob sich dies auch auf die Funktion der Proteine übertragen lässt, soll auch ein Bestandteil dieser Arbeit sein. Weiterhin gibt die spezifische Expression von PPL1 in Blüten einen Hinweis auf eine mögliche Funktion innerhalb der Blütenentwicklung.

Um erste Hinweise auf die Funktion der Proteine PPL1 (14,7 kDa) und PPL2 (14,6 kDa) in der Pathogen-Abwehr oder auch der Entwicklung zu bekommen, wurde ein Sequenz-Alignment durchgeführt, welches für beide Proteine eine Identität von 53 % zeigt. Wie es bereits für PPL1 in meiner Masterarbeit gezeigt werden konnte, beinhaltete auch PPL2 eine über SMART (simple modular architecture research tool) vorhergesagte Plant-Homeodomain (PHD) und zwei Serine als MAP Kinase Phosphorylierungsstellen (Letunic and Bork, 2018). Eine spezifische Phosphorylierungsstelle für MAP Kinasen stellt ein Serin oder Threonin gefolgt von einem Prolin dar. Für PPL1 wurden Serin 87 und Serin 115 identifiziert wohingegen es bei PPL2 Serin 82 und Serin 113 sind. Überraschenderweise wurde in dem Alignment ein identischer C-Terminus, der keinerlei Ähnlichkeit mit bekannten Signalpeptiden zeigt, sichtbar (Abbildung 3). Mit Hilfe von Sequenz-Alignments mit bekannten PHD-Domänen Proteinen wurden die Cysteine und Histidine der vorhergesagten PHD-Domäne für PPL1 bereits bestimmt (Missal, 2014). In dem durchgeführten paarweisen Sequenz-Alignment konnten diese Elemente auch in PPL2 identifiziert werden (Abbildung 3). Diese Übereinstimmung lässt vermuten, dass neben der PHD-ähnlichen Domäne womöglich auch die Phosphorylierungsstellen und der C-Terminus zur funktionellen Arbeitsweise der Proteine beitragen.



<u>Abbildung 3 Alignment von PPL1 und PPL2.</u> Alignment der Aminosäure-Sequenz von PPL1 und PPL2. Schwarze Hinterlegung steht für identische und graue Hinterlegung für ähnliche Aminosäuren. Die Zinkkoordinierdenden Cysteine/Histidin der PHD-ähnlich Domäne sind mit Klammern gekennzeichnet. Der identische C-Terminus ist mit einem roten Rahmen markiert. Das Alignment erfolgte mit ClustalW und die Darstellung mit Boxshade. Rote Sterne = MAP Kinase Phosphorylierungsstellen

Neben einer NCBI blastp (basic local alignment tool protein)-Suche, ausgehend von der PPL1 Aminosäure-Sequenz, konnten mit einer Genom-Analyse (*plantsENSEMBL genomes*) ausgehend von PPL1 übereinstimmend orthologe Proteine beziehungsweise Gene in weiteren Pflanzen-Spezies identifiziert werden (Altschul et al., 1990; Howe et al., 2019). Dabei zeigte sich, dass diese orthologen Gene ausschließlich in blühenden Pflanzen zu finden sind (Abbildung 4). Neben der Spezifität für Pflanzen deutet dies, in Kombination mit der spezifischen Expression von PPL1 in Blüten, auf eine mögliche essentielle Funktion in der Blütenentwicklung hin. Weiterhin wurde deutlich, dass in den unterschiedlichen Spezies jeweils mindestens eine PPL1-ähnliche und eine PPL2-ähnliche Variante konserviert vorliegen. Ein Beispiel dafür konnte in einem phylogenetischen Baum der A. thaliana Gensequenzen mit orthologen Gensequenzen aus den Kreuzblütlern dargestellt werden (Anhang 3 A). In diesem multiplen Alignment wurde deutlich, dass die bereits beschriebenen Elemente von PPL1 und PPL2 hochkonserviert sind. Darunter fallen die PHD-ähnliche Domäne, die zweite der beiden MAP Kinase Phosphorylierungsstellen und der identische C-Terminus (Anhang 3 B). Zwischen diesen konservierten Elementen befinden sich Bereiche mit einer viel höheren Variabilität an Aminosäuren. Damit besteht die Hypothese, dass alle drei Elemente eine notwendige Funktion erfüllen. Überraschenderweise ist von den Phosphorylierungsstellen für MAP Kinasen nur die zweite Phosphorylierungsstelle konserviert, was für eine Regulation in dieser Position sprechen könnte.

PPL1 und *PPL2* sind hoch konservierte Gene und somit wichtig für eine pflanzen-spezifische Funktion wie zum Beispiel die Pathogen-Abwehr oder die Blütenentwicklung. Ausgehend von den bekannten Anhaltspunkten sollten PPL1 und PPL2 funktionell charakterisiert werden um die Einordnung in einen pflanzen-spezifischen Prozess zu erleichtern.

Ergebnisse



<u>Abbildung 4 Phylogenetischer Baum orthologer Gene zu PPL1.</u> Der Phylogenetische Baum zur Darstellung der 71 orthologen und 1 paralogen Gene zu *PPL1* aus *A. thaliana* wurde mit *plantsENSEMBL genomes* erstellt (Howe et al., 2019). Die orthologen Gene sind begrenzt auf blühende Pflanzen (Monokotyledone und Dikotyledone). Rot = Gen von Interesse (PPL1), blau = paraloges Gen (PPL2); Quadrate: weiß = Endpunkt/Gen, schwarz = Spezialisierungs-Knoten, weinrot = Verdopplungs-Knoten, türkis = mehrdeutiger Knoten; graue Dreiecke = zusammengefasster Baumteil

3.2 PPL1 und PPL2 sind MAP Kinase Substrate

PPL1 wurde 2005 als MPK3 Substrat, einer in der Pathogen-Abwehr gut untersuchten Kinase, mittels Protein-Mikroarray identifiziert und in einem *in vitro* Kinase-Assay bestätigt (Feilner et al., 2005; Missal, 2014). Mit Hilfe der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BIFC, *bimolecular fluorescence complementation*) konnte die *in vivo* Interaktion mit den PAMP-induzierten Kinasen MPK3, MPK4, MPK6 und MPK11 bereits in meiner Masterarbeit gezeigt werden (Missal, 2014). Die YFP-Signale wurden im Zellkern und schwächer auch im Zytoplasma beobachtet. Diese Ergebnisse konnten während meiner Promotion bestätigt werden. Ausgehend von den vorhandenen Daten sollten weiterführende Untersuchungen unter Einbeziehung des homologen PPL2 bezüglich der *in vivo* Interaktion mit MAP Kinasen, der Phosphorylierung und der Funktion der MAP Kinase Phosphorylierung erfolgen.

Ergebnisse

3.2.1 Lokalisation von PPL2 im Zellkern

Viele bereits beschriebene Substrate der MAP Kinasen MPK3 und MPK6 zeigen ihre Funktionen bei der Reaktion auf Pathogen Erkennung, zum Beispiel in der Genregulation oder der direkten Regulation von Biosynthese Wegen (Joo et al., 2008; Qiu et al., 2008a). Für die Eingrenzung der möglichen Lokalisation von PPL1 und PPL2 wurde die vorhergesagte PHD-ähnliche Domäne herangezogen. Diese Domänen zeigen überwiegend eine Funktion in der Erkennung von Histon-Modifikationen und deuten damit auf eine Lokalisation im Zellkern hin (Bienz, 2006). Eine solche Lokalisation konnte bereits für PPL1 gezeigt werden und wurde deshalb auch für PPL2 vorhergesagt (Missal, 2014). Bei der Aktivierung der MAP Kinase Kaskaden zum Beispiel nach der Pathogen-Erkennung werden die Substrate von den MAP Kinasen phosphoryliert. Eine solche Phosphorylierung kann zur veränderten Bindungsspezifität, zur Änderung der Proteinstabilität oder auch zur Re-Lokalisation führen (Djamei et al., 2007; Qiu et al., 2008a; Pecher et al., 2014; Tabassum et al., 2019). Deshalb sollte weiterführend geprüft werden, ob die Lokalisation beider Proteine von dem Phosphorylierungs-Status abhängig ist.

Hierfür wurden beide Gene unter 35S-Promotor mit N-terminaler YFP Markierung durch Transformation von *A. thaliana* Protoplasten zur heterologen Proteinproduktion eingebracht (2.2.2.10). Die bereits beschriebene Lokalisation für PPL1 konnte bestätigt werden (Abbildung 5 A). PPL2 zeigte im Gegensatz dazu eine stärkere Konzentrierung im Zellkern, jedoch trotzdem mit Signalen im Zytoplasma (Abbildung 5 B). Mittels transienter Expression von *YFP-PPL1* und *YFP-PPL2* unter 35S-Promotor in *Nicotiana benthamiana* Mesophyll-Zellen konnte die Verteilung von PPL1 (Zellkern und Zytoplasma) und PPL2 (hauptsächlich Zellkern) in drei unabhängigen Experimenten bestätigt werden (Anhang 4 A).

Zur Untersuchung des Einflusses des Phosphorylierungs-Status auf die Lokalisation wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Einerseits wurden Protoplasten einer bereits mikroskopisch untersuchten Transformation für eine Stunde mit 100 nM flg22 behandelt und anschließend erneut geprüft. Hierbei diente die Behandlung mit dem flg22 Peptid als Werkzeug zur Aktivierung der in der Pathogen-Abwehr involvierten Kinasen MPK3, MPK6 (Asai, Tena et al. 2002), MPK4 und deren paraloger Kinase MPK11 (Bethke et al., 2012; Pecher et al., 2014). Es konnte jedoch keine Veränderung der Lokalisation von PPL1 und PPL2 beobachtet werden (Abbildung 5 A und B). Andererseits wurden die Phospho-Null Mutanten PPL1^{AA} (PPL1 S87A S115A) und PPL2^{AA} (PPL2 S82A S113A) auf ihre Lokalisation untersucht. Hierbei handelt es sich um Mutanten bei denen die Serine der zwei

MAP Kinase spezifischen Phosphorylierungsstellen durch Alanine ausgetauscht worden sind und dadurch eine Phosphorylierung an diesen Stellen nicht mehr möglich ist. Sowohl bei PPL1^{AA} als auch bei PPL2^{AA} konnte die gleiche Lokalisation wie bei den WT-Proteinen beobachtet werden (Abbildung 5 A und B).



Abbildung 5 Lokalisation von PPL1 und PPL2 in Zellkern und Zytoplasma von *A. thaliana* Protoplasten. Transiente Expression unter 35S-Promoter von (**A**) *YFP-HA-PPL1*, *YFP-HA-PPL1*^{AA}, (**B**) *YFP-HA-PPL2* und *YFP-HA-PPL2*^{AA} in *A. thaliana* Col-0 Protoplasten. Die YFP-Signale wurden 16 h nach Transformation mittels konfokaler Lasermikroskopie analysiert. Nach der Behandlung mit 100 nM flg22 für 1h erfolgte die Analyse weiterer Protoplasten der gleichen Transformation. Die Ergebnisse wurden bei 3 unabhängigen Experimenten beobachtet. Maßstabsbalken entspricht 10 nm. n \geq 15 (**C**) Proben zur Kontrolle der Genexpression wurden 16h nach Transformation eingefroren und mittels Western-Blot (HA-Antikörper) analysiert. Die Amidoschwarz Färbung diente als Ladekontrolle.

Für die Kontrolle auf korrekte Expression der Konstrukte in den *A. thaliana* Protoplasten wurden Proben der einzelnen Transformationen mittels Western-Blot analysiert (Abbildung 5 C).

Mit diesen Untersuchungen war es möglich zu zeigen, dass die Lokalisation von PPL1 und PPL2 unabhängig von dem Phosphorylierungs-Status ist und auch die Aktivierung der MAP Kinasen nach flg22 Behandlung darauf keinen Einfluss nimmt. Davon ausgehend war es notwendig zu zeigen, dass es sich bei PPL1 und PPL2 um physiologische Substrate von MAP Kinasen handelt.

3.2.2 <u>Die Interaktion der PPL-Proteine mit MAP Kinasen in A. thaliana Protoplasten</u>

In meiner Masterarbeit konnte bereits für PPL1 die *in vivo* Interaktion mit MAP Kinasen gezeigt werden (Missal, 2014). Da die postulierte Phosphorylierung keinen Einfluss auf die Lokalisation von PPL1 und PPL2 gezeigt hat, war es notwendig die physiologische Interaktion mit den MAP Kinasen für PPL2 zu bestätigen. Hierfür wurden Bimolekulare Fluoreszenzkomplementations Untersuchungen mit den nach PAMP-Behandlung aktivierten Kinasen MPK3, MPK4, MPK6 und MPK11 durchgeführt. Da zu diesem Zeitpunkt weiterhin eine Funktion in der Pathogen-Abwehr angenommen wurde, fungierte die in diesem Bereich nicht involvierte MPK8 als Negativ-Kontrolle (MAPK Group, 2002). Die Ergebnisse für PPL1 mit MPK3, MPK4, MPK6 und MPK11 zeigten Komplementations-Signale sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma (Missal, 2014).

Für die durchgeführten Untersuchungen wurden *A. thaliana* Protoplasten mit *PPL1/PPL2* (C-terminale Fusion mit cYFP-HA) in Kombination mit jeweils einer Kinase (C-terminale Fusion mit nYFP-c-myc) transformiert. Es konnte beobachtet werden, dass PPL2 ebenfalls mit den PAMP-induzierten Kinasen interagiert. Abweichend von PPL1 fanden die Interaktionen zwischen PPL2 und MPK3, MPK6, MPK4 und MPK11 fast ausschließlich im Zellkern statt (Abbildung 6). Dieser Unterscheid ist nicht verwunderlich, da auch die Lokalisation von PPL2 alleine überwiegend im Zellkern zu finden war. Weiterhin muss bemerkt werden, dass die Interaktionen bereits ohne den flg22 Stimulus beobachtet werden konnten. Bei der Negativ-Kontrolle konnten, trotz erfolgreicher Expression, keine Signale beobachtet werden. Die Überprüfung der Expression der transformierten Konstrukte erfolgte für jede Transformation mittels Western-Blot Kontrolle (Abbildung 6 F).

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass PPL2 genau wie PPL1 unter physiologischen Bedingungen mit MAP Kinasen interagieren kann und dies unabhängig von Stimuli wie zum Beispiel flg22. In weiteren Experimenten sollte überprüft werden, ob durch diese Interaktion auch eine Phosphorylierung von PPL1 und PPL2 vermittelt wird.



Abbildung 6 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation von PPL2 mit vier MAP-Kinasen (MPK3, MPK4, MPK6 und MPK11) in *A. thaliana* Protoplasten. Transiente Expression unter 35S-Promoter von *cYFP-HA-PPL2* mit *nYFP-c-myc-MPK3* (A), *nYFP-c-myc-MPK6* (B), *nYFP-c-myc-MPK11* (C), *nYFP-c-myc-MPK4* (D) oder *nYFP-c-myc-MPK8* (E) in *A. thaliana* Col-0 Protoplasten. Die YFP-Signale wurden 16 h nach Transformation mittels konfokaler Lasermikroskopie analysiert. Dargestellt sind die Ergebnisse eines von 3 unabhängigen Experimenten. Maßstabsbalken entsprichen 10 nm. $n \ge 7$ (F) Proben zur Kontrolle der Genexpression wurden 16 h nach Transformation Experimenten und mittels Western-Blot (HA oder c-myc Antikörper (AK)) analysiert. Die Amidoschwarz Färbung diente als Ladekontrolle.

3.2.3 Die Phosphorylierung von PPL1 und PPL2 durch MAP Kinasen

Ob die Interaktion mit den MAP Kinasen tatsächlich zu einer Phosphorylierung an den vorhergesagten Phosphorylierungsstellen führt, sollte zunächst die *in vivo* Phosphorylierung von PPL1 und PPL2 unter Verwendung von MPK3, MPK6 und MPK4 untersucht werden (2.2.2.5). Dafür erfolgte die rekombinante Protein-Produktion und –Aufreinigung aller verwendeten Proteine laut Protokoll (2.2.2.3, Anhang 5 A). Für die Phosphorylierungs-Reaktion wurden vorhandene rekombinante und aktivierte MAP Kinasen verwendet (Pecher et al., 2014). In den durchgeführten Experimenten konnte sowohl für PPL1 als auch für PPL2 eine bevorzugte Phosphorylierung durch MPK3 im Vergleich zu MPK4 und MPK6 beobachtet werden. Diese Substrat-Spezifität wird durch die etwas schwächeren Signale bei der Positiv-Kontrolle (MBP, MYELIN BASIC PROTEIN) durch MPK3 noch verstärkt (Abbildung 7). Da es sich bei MBP um ein generisches Substrat für MAP Kinasen handelt,

wird eine einheitliche Phosphorylierung angenommen und es in *in vitro* Phosphorylierungs-Assays als Positiv-Kontrolle eingesetzt.



<u>Abbildung 7 In vitro Phosphorylierung von PPL1 und PPL2.</u> Dargestellt sind Signale der *in vitro* Inkubation von rekombinant gereinigtem PPL1-GST und PPL2-GST mit rekombinant gereinigtem und aktivierten MPK3, MPK4 und MPK6 Protein (Pecher et al., 2014) und y³²P-ATP. Die Coomassie Brilliant Blue (CBB) Färbung diente als Ladekontrolle. Exemplarische Darstellung eines der vier unabhängigen Experimente.

Damit konnten die Ergebnisse des bereits beschriebenen Kinase-Assays für PPL1 bestätigt werden (Missal, 2014). In einem Versuch konnte die fast vollständige Reduktion der *in vitro* Phosphorylierung der PPL1^{AA} und PPL2^{AA} Mutanten gezeigt werden (Anhang 6 B). Nach der Interaktion von PPL1 und PPL2 mit den PAMP-induzierten Kinasen war es möglich nun auch eine *in vitro* Phosphorylierung durch MPK3, MPK4, und MPK6 entweder an einer oder beiden der entsprechenden MAP Kinase Phosphorylierungsstellen zu zeigen.

Im Folgenden sollten diese Ergebnisse in einem physiologischen System validiert werden. Dafür wurden in *A. thaliana* Protoplasten N-terminal HA-fusionierte *PPL1/PPL2* überexprimiert und die Protein-Produktion wurde mittels Western-Blot analysiert. Die Detektion der Proteine erfolgte dabei entweder mit oder ohne Ko-Expression mit einer übergeordneten Kinase der Kinase-Kaskaden und mit oder ohne flg22 Behandlung. Dabei wurden die Proben einerseits über eine herkömmliche SDS-PAGE und andererseits über eine mit phostagTM-Reagenz (Fujifilm, www.labchem-wako.fujifilm.com) versetzte SDS-PAGE aufgetrennt. Mit dieser Methode ist es möglich, phosphorylierte Proteine durch verlangsamte Migration in der phostagTM-Acrylamid-Matrix durch die zusätzlichen negativen Ladungen von nicht-phosphorylierten Proteinen zu trennen.

Zur Aktivierung von PAMP-induzierten Kinasen und damit der postulierten Phosphorylierung von PPL1 und PPL2 wurden die *A. thaliana* Protoplasten für eine Stunde mit 100 nM flg22 behandelt. Im Vergleich dazu erfolgte eine Ko-Expression von *PPL1* oder *PPL2* mit einer konstitutiv aktivierten MKK5 aus *Petroselinum crispum* (*PcMKK5^{DD}*) oder deren Kinase-inaktiven Mutante *PcMKK5^{KR}* (Lee et al., 2004). Durch den Austausch von Serin 217 und

Threonin 211 in der Aktivitätsschleife von PcMKK5 zu Asparaginsäure (D) werden Phosphorylierungen nachgeahmt und diese führen zur konstitutiv erhöhten Aktivität der Kinase ($PcMKK5^{DD}$). Die Kinase-inaktive Mutante ($PcMKK5^{KR}$) wurde durch die Mutation des Lys 99 in der ATP-Bindungs-Tasche zu Arginine (R) generiert (Lee et al., 2004). Als ein Homolog von AtMKK4/5 wurde die PcMKK5 ausgewählt, da sie als übergeordnete Kinase in den Kinase-Kaskaden auch in *A. thaliana* zur Aktivierung von MPK3 und MPK6, aber nicht von MPK4 und MPK11 führt (Lassowskat et al., 2014).

Bei der Analyse des Laufverhaltens von PPL1 in der phostagTM-Acrylamid-Matrix zeigte sich, dass bei der mit flg22 behandelten Probe eine sehr kleine PPL1 Retardierung beobachtet werden konnte (Abbildung 8, Spur 2). Diese Verschiebung wurde jedoch deutlicher bei dem Vorhandensein der konstitutiv aktiven Kinase *Pc*MKK5^{DD} (Abbildung 8, Spur 3). Innerhalb aller durchgeführten Experimente konnten auch stärkere Änderungen im Laufverhalten beobachtet werden (Anhang 6). Es kann ausgeschlossen werden, dass das Vorhandensein der übergeordneten Kinase allein für diese Verschiebung von PPL1 in der phostagTM-Acrylamid-Matrix verantwortlich ist, da bei der Kinase-inaktiven Variante eine nahezu wie WT laufende Bande detektiert werden konnte (Abbildung 8, Spur 4).



Abbildung 8 *In vivo* Phosphorylierung von PPL1 in *A. thaliana* Col-0 Protoplasten. Transiente Expression von *HA-PPL1* oder *HA-PPL1*^{AA} mit *c-myc-PcMKK5*^{DD} bzw. *c-myc-PcMKK5*^{KR} in *A. thaliana* Protoplasten. Die Behandlung mit 100 nM flg22 für eine Stunde erfolgte 16h nach Transformation. Daraufhin wurden alle Proben eingefroren und mittels phostagTM SDS-PAGE oder herkömmlicher SDS-PAGE aufgetrennt. Die Analyse erfolgte über Western Blot Detektion (HA oder c-myc Antikörper (AK)). Zur Veranschaulichung der Unterschiede wurden rote Balken auf die mittlere Höhe jeder Bande gelegt. Dargestellt sind die Ergebnisse eines von 3 unabhängigen Experimenten. Die Amidoschwarz Färbung diente als Ladekontrolle.

Als Kontrolle, dass es sich bei den beobachteten Verschiebungen tatsächlich um

Phosphorylierungen an den MAP Kinase Phosphorylierungsstellen (Serin 87 und/oder Serin 115) handelt, wurde die Phospho-Null Mutante PPL1^{AA} mitgeführt. Diese zeigte keine Retardierung der Proteinbanden und bestätigt damit die Phosphorylierung von PPL1 durch MPK3 und/oder MPK6 an einer oder beiden Phoshporylierungsstellen (Abbildung 8, Spur 5 – 8).

Im Gegensatz zu PPL1 konnte für PPL2 eine klare Auftrennung zwischen phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem PPL2 in zwei distinkten Western-Blot Banden detektiert werden. Es ist klar zu erkennen, dass die flg22 Behandlung bereits zur Phosphorylierung eines kleinen Teils der PPL2 Proteine führt (Abbildung 9, Spur 2). Nahezu das gesamte PPL2 Protein zeigte eine Retardierung der Western-Blot Banden durch das Vorhandensein der konstitutiv aktiven *Pc*MKK5^{DD} an. Die Anwesenheit der Kinase-inaktiven MKK5^{KR} führte dagegen zu keinerlei Verschiebung und damit keiner Phosphorylierung (Abbildung 9, Spur 3 und 4). Genau wie bei PPL1^{AA} ist auch die fehlende Verschiebung bei PPL2^{AA} ein eindeutiger Beweis, dass die beobachteten Phosphorylierungen durch MAP Kinasen an einer oder beiden Phosphorylierungsstellen (Serin82 und Serin113) hervorgerufen wurden (Abbildung 9, Spur 5 - 8).



<u>Abbildung 9 In vivo Phosphorylierung von PPL2 in A. thaliana Col-0 Protoplasten.</u>Transiente Expression von *HA-PPL2* oder *HA-PPL2*^{AA} mit *c-myc-PcMKK5*^{DD} beziehungsweise *c-myc-PcMKK5*^{KR} in A. thaliana Protoplasten. Die Behandlung mit 100 nM flg22 für eine Stunde erfolgte 16h nach der Transformation. Daraufhin wurden alle Proben eingefroren und einerseits mittels phostagTM SDS-PAGE und andererseits herkömmlicher SDS-PAGE aufgetrennt. Die Analyse erfolgte über Western Blot Detektion, mittels HA oder c-myc Antikörper (AK). Dargestellt sind die Ergebnisse eines von 3 unabhängigen Experimenten. Die Amidoschwarz Färbung diente als Ladekontrolle

Zusammenfassend konnte bestätigt werden, dass die Phosphorylierung von PPL1 und PPL2 durch MAP Kinasen erfolgen kann. Da die *Pc*MKK5 spezifisch für die Aktivierung von MPK3 und MPK6 ist, kann davon ausgegangen werden, dass mindestens eine Kinase oder sogar beide für die Phosphorylierung von PPL1 und PPL2 verantwortlich sind. In Kombination mit den *in vitro* Ergebnissen kann die MPK3 als vorherrschende MAP Kinase vermutet werden. Im weiteren Verlauf sollte der Effekt dieser Phosphorylierung im Zusammenhang mit der Funktion untersucht werden.

3.2.4 Eine mögliche Veränderung der Proteinstabilität durch Phosphorylierung

Post-translationale Modifikationen wie Phosphorylierung oder Ubiquitinierung tragen zur Regulierung unterschiedlicher Prozesse bei, indem bestimmte Eigenschaften der Substrate verändert werden. Die Phosphorylierung von MAP Kinase Substraten kann zum Beispiel zu verstärkter DNA Bindungsaktivität (Li et al., 2015), zur Re-Lokalisation (Djamei et al., 2007), zur verstärkten Proteinbindung (Xu and Chua, 2012) oder zur Veränderung der Proteinstabilität (Meng et al., 2013b; Pecher et al., 2014; Wang et al., 2014) führen. Da noch keine weiteren Informationen über die Funktionalität von PPL1 und PPL2 vorlagen und die Re-Lokalisation bereits ausgeschlossen werden konnte (3.2.1), sollte geprüft werden ob die Phosphorylierung zu einer Veränderung der Proteinstabilität führen kann.

Dazu wurde zunächst die Abbau-Rate der rekombinanten Proteine in einem Roh-Extrakt im Zuge eines Zell-freien Abbau-Assays (Lyzenga et al., 2012) untersucht (2.2.2.2). Die Aufreinigung der Proteine erfolgte nach Standard-Protokoll (Anhang 5, 2.2.2.3). Für den Assay wurden die rekombinanten Proteine in A. thaliana Col-0 Keimling-Extrakten bei 30°C inkubiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb einer Stunde Proben entnommen. Mittels Western-Blot Analyse konnte der Proteinabbau über die Zeit verfolgt werden. Sowohl für PPL1 als auch für PPL2 konnte bei 30 Minuten nahezu kein Protein detektiert werden (Abbildung 10, Spur 1-5). Dies deutet auf eine schnelle Abbau-Rate der Proteine unter physiologischen Bedingungen hin. Zur Überprüfung ob dieser Abbau über das 26S-Proteasom verläuft, wurden die Extrakte mit dem kompetitiven Proteasom Inhibitor MG115 behandelt (Yang et al., 2004). Ein Abbau konnte daraufhin nicht mehr detektiert werden (Abbildung 10, Spur 6-10). Um einen Lösungsmittel-Effekt des in DMSO gelösten MG115 auszuschließen, wurden zusätzlich Proben nur mit DMSO in gleicher Konzentration behandelt. In diesem Fall fand der Abbau fast wie bei den unbehandelten Proben statt (Abbildung 10, Spur 11-15). Damit konnte gezeigt werden, dass der schnelle Abbau von PPL1 und PPL2 über das 26S-Proteasom erfolgt. In weiteren Experimenten war es möglich zu zeigen, dass sich PPL1^{AA} und PPL2^{AA} wie die WT-Proteine verhalten. Dies deutet darauf, dass eine Phosphorylierung nicht notwendig für den Abbau zu sein scheint (Anhang 6 C).



<u>Abbildung 10 Zell-freier Abbau-Assay mit PPL1 und PPL2.</u> Die rekombinant gereinigten Proteine GST-PPL1 und GST-PPL2 wurden in je einem *A. thaliana* Col-0 Extrakt aus Keimlingen ohne Proteasom-Inhibitor MG115, mit MG115 oder mit dem Lösungsmittel DMSO inkubiert. Die Probenentnahme erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten. Die Detektion erfolgte mittels Western Blot (GST Antikörper (AK)) Analyse. Dargestellt sind die Ergebnisse eines von 4 unabhängigen Experimenten. Die Amidoschwarz Färbung diente als Ladekontrolle.

Ob die Phosphorylierung einen Einfluss auf die Proteinstabilität von PPL1 und PPL2 ausübt, sollte in *A. thaliana* Protoplasten untersucht werden. Hierfür erfolgte die Überproduktion von PPL1, PPL1^{AA}, PPL2 und PPL2^{AA} in entsprechend transformierten *A. thaliana* Protoplasten. Obwohl PPL1 und PPL2, anhand der bisherigen Ergebnisse, unstabile Proteine zu sein scheinen, konnten keine Unterschiede in den Proteinleveln mit und ohne flg22 Behandlung detektiert werden (Abbildung 11 A, vgl. Spur 2,3 mit 6,7). Um sicher zu gehen, dass mögliche Änderungen nicht durch die schnelle Genexpression über den 35S-Promoter maskiert wurden,



Abbildung 11 Proteinstabilität von PPL1 und PPL2 nach flg22 Behandlung in *A. thaliana* Protoplasten. Transiente Expression unter 35S-Promoter von (**A**) *HA-PPL1* und *HA-PPL2* sowie (**B**) *HA-PPL1*^{AA} und *HA-PPL2*^{AA} in *A. thaliana* Protoplasten. Die Behandlung mit 100 *nM* flg22 und 1 μ *M* Cycloheximid, einzeln und in Kombination, erfolgte 16h nach Transformation. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten eingefroren und mittels Western Blot analysiert. (**A**) Dargestellt sind die Ergebnisse eines von 6 unabhängigen Experimenten. (**B**) Dargestellt sind die Ergebnisse eines von 2 unabhängigen Experimenten. Die Amidoschwarz Färbung diente als Ladekontrolle.

erfolgte eine zusätzliche Behandlung mit dem Translations-Hemmer Cycloheximid (CHX) (Schneider-Poetsch et al., 2010). Über die Zugabe des Cycloheximids wurde die Neusynthese von Proteinen verhindert und die Detektion des reinen Protein-Abbaus ermöglicht. Die Detektion der am N-Terminus HA-markierten Proteine erfolgte mittels Western-Blot. In mit CHX behandelten Proben von PPL1 und PPL2 konnte nach einer Stunde nahezu kein Protein mehr detektiert werden (Abbildung 11 A, Spur 4,5). Diese Ergebnisse des schnellen Protein-Abbaus stimmen mit denen des Zell-freien Abbau-Assays überein (Abbildung 10). Wenn nun die Behandlung sowohl mit Cycloheximid als auch flg22 erfolgt, ist es möglich eine Veränderung des Abbaus nach flg22 Behandlung durch den Vergleich zu den Cycloheximid Proben zu erkennen. Für PPL1 und PPL2 zeigte sich bei der kombinierten Behandlung deutlich mehr Protein, was für eine Verlangsamung des üblichen Abbaus stehen kann (Abbildung 11 A, vgl. Spur 4,5 mit 8,9). Die flg22 Behandlung und somit womöglich die Phosphorylierung scheint bei PPL1 sowie PPL2 zu einer erhöhten Protein-Stabilität zu führen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die Phospho-Null Mutanten beider Proteine ebenfalls untersucht. Genau wie bei den WT-Proteinen konnten sowohl bei PPL1^{AA} als auch bei PPL2^{AA} keine klar unterschiedlichen Proteinlevel allein nach flg22 Behandlung beobachtet werden (Abbildung 11 B, vgl. Spur 2,3 mit 6,7). Im Vergleich zu den WT-Proteinen zeigten die Phospho-Null Mutanten bereits bei der Behandlung nur mit Cycloheximid scheinbar höhere Proteinlevel (Abbildung 11 B, Spur 4,5). Da die Phosphorylierung der MAP Kinase Stellen bei diesen Mutanten nicht möglich war, muss dieser veränderten Regulation ein weiterer unbekannter Mechanismus zu Grunde liegen. Auch hier wurde die Behandlung von flg22 in Kombination mit Cycloheximid durchgeführt, um den Protein-Abbau unabhängig vom Aufbau zu untersuchen. Für PPL2^{AA} konnten dabei in zwei unabhängigen Experimenten niedrigere Proteinlevel beobachtet werden (Abbildung 11B, PPL2^{AA} vgl. Spur 4,5 und 8,9). Im Gegensatz dazu, scheint die Regulation für PPL1^{AA} variabel zu sein, da sowohl niedrigere als auch höhere Proteinlevel detektiert werden konnten. Exemplarisch ist ein Experiment mit höheren Proteinlevel nach Cycloheximid und flg22 Behandlung dargestellt (Abbildung 11B, PPL1^{AA} vgl. Spur 4,5 mit 8,9). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass PPL1 und PPL2 einer Regulation im Protein-Abbau nach flg22 Behandlung unterliegen, dies jedoch scheinbar nicht allein auf die Phosphorylierung durch die MAP Kinasen zurückgeführt werden kann.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass PPL1 und PPL2 als MAP Kinase Substrate fungieren. Dabei interagieren sie mit den MAP Kinasen MPK3, MPK6, MPK4 und MPK11 im Zellkern und Zytoplasma, werden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch MAP Kinasen phosphoryliert und scheinen nach flg22 Behandlung in ihrer Stabilität beeinflusst zu sein. In welchem Maße die Phosphorylierung von PPL1 und PPL2 tatsächlich zu den beobachteten Veränderungen der Proteinlevel beiträgt, konnte mit Hilfe der durchgeführten Experimente nicht abschließend geklärt werden.

3.3 Funktionelle Analyse von PPL1 und PPL2

Sowohl PPL1 als auch PPL2 konnten als MAP Kinase Substrate bestätigt werden. Zusätzlich wurden Untersuchungen über die Beeinflussung der Proteinstabilität über Phosphorylierungen durchgeführt, welche jedoch keine genauen Hinweise auf die Funktion der Proteine geben konnten. Für die weitere Analyse der Funktion nach der MAP-Kinase Aktivierung, war es notwendig zu eruieren ob PPL1 und PPL2 auf der Ebene der Genregulation oder auf der Ebene von Protein-Interaktionen arbeiten. Eine Untersuchung auf einen möglichen Einfluss auf die Genregulation von zum Beispiel abwehr-relevanten Genen könnte Hinweise auf eine Funktion in diesem Bereich geben. In Vorversuchen konnten Hinweise auf eine mögliche Regulation von abwehrrelevanten Genen durch PPL1 beobachtet werden, sodass diese Möglichkeit mit genomweiten transkriptionellen Analysen als ein Überblick über mögliche Regulations-Bereiche geprüft werden sollte.

Ergebnisse

3.3.1 Transkriptionelle Analysen in PPL1 ÜE und ppl2 Linien

Für die Analyse der allgemeinen Genexpression mittels Mikroarray standen in dem Jahr 2016 noch nicht alle notwendigen *knock-out* Pflanzenlinien zur Verfügung. Sowohl für PPL1 (SALK_091010) als auch PPL2 (SALK_139823 und SALK_126470) wurden die vorhandenen SALK-Linien untersucht. Für PPL2 konnten für die Linie SALK-139823 keine homozygoten Pflanzen identifiziert werden. Bei der SALK_126470 hingegen konnten mehrere homozygote Pflanzen mit der T-DNA Insertion in der 5`UTR (nicht translatierte Region) mit einem *knock-down* Effekt identifiziert und eine ausgewählte charakterisiert werden (Abbildung 12 A, B). Leider zeigte eine Sequenzierung der einzig verfügbaren Linie für *PPL1*, dass die Insertion im 3` UTR liegt und daher keinen Einfluss auf die Transkript-Menge zeigt (Anhang 7 A).



Abbildung 12 Darstellung der Transkriptom Analyse von *ppl2*. (A) Aufgetragen ist das relative *PPL2* mRNA Level in *ppl2* und Col-0 Keimlingen aus 2 unabhängigen Experimenten. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt. (B) T-DNA Insertion der Linie SALK_126470 (*ppl2*) innerhalb der Promoter Region von *PPL2* (At3g60520). Überblick über die hoch (C) oder runter (D) regulierten Gene in *ppl2* im Vergleich zu Col-0 mittels Venny 2.0.2-CSIC (<u>https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/</u>).

Für den Mirkoarray wurde daher nur die *knock down* Linie von *PPL2* verwendet. Für das Experiment wurden Mutanten und Col-0 Pflanzen mit flg22 oder als Kontrolle H₂O infiltriert,

nach einer Stunde geerntet und für die RNA-Isolation verwendet. Zu diesem Zeitpunkt, wurde von einer möglichen Funktion in der Pathogen-Abwehr ausgegangen, sodass die flg22 Behandlung mögliche Regulationsmechanismen hätte aufzeigen können. In den statistisch ausgewerteten Daten von *ppl2* konnte nahezu keine veränderte Genexpression zur Col-0 Kontrolle gefunden werden. Ebenso zeigte die Behandlung mit flg22 fast keine Änderung des Expressionsmusters (Abbildung 12).

Um auch Informationen über PPL1 erhalten zu können, wurden *HA-PPL1* Überexpressions (ÜE)-Linien generiert und die Linie 7-5 ausgewählt. Im Vergleich zu anderen ÜE Linien zeigt 7-5 eine mittlere Expression und Proteinproduktion (Abbildung 13 A, B).

Für PPL1 ÜE 7-5 wurden unterschiedliche Methoden wie die STRING-Analyse oder die Darstellung mittels VENN-Diagramm zur Daten-Analyse angewandt. Hierbei zeigte sich ein positiver Einfluss von PPL1 auf die Genexpression von Genen in der Pathogen-Abwehr, der Photosynthese und der Jasmonat-Produktion (Abbildung 13 C). Der negative Einfluss auf die Genexpression scheint sehr gering zu sein und sich auf den Zuckerhaushalt zu begrenzen (Abbildung 13 D). Da es nicht möglich war, diese Änderungen der Genexpression in 3 unabhängigen Experimenten mittels relativer Echt-Zeit PCR Analyse zu bestätigen, können lediglich globale Erkenntnisse ausgewertet werden. Dies an sich deutet jedoch daraufhin, dass weder PPL1 noch PPL2 eine robuste Rolle in der Genregulation einnehmen und nur mögliche Nebeneffekte detektiert werden konnten. Möglicherweise agieren PPL1 und PPL2 über indirekte Funktionen und zusätzlich dazu bei anderen Entwicklungsstadien wie zum Beispiel in der Blüte. Die Experimente mit der knock-out Linie für PPL1 und der Überexpressionslinie für PPL2 wurden aufgrund der geringen Auswertbarkeit nicht nachgeholt. Zur Klärung der Funktion von PPL1 und PPL2 wurden daraufhin weitere Experimente zur Protein-Interaktionsvermittlung beziehungsweise Histon-Modifikationserkennung durchgeführt, da bekannt ist, dass Proteine mit PHD-Domänen als sogenannte Histon code reader fungieren (Bannister and Kouzarides, 2011).



<u>Abbildung 13 Darstellung der Transkriptom Analyse von 7-5 (PPL1 ÜE).</u> (A) Aufgetragen ist das relative *PPL1* Transkriptlevel in den Überexpressionslinien ÜE 5-6, ÜE 7-5 und Col-0 Keimlingen aus 2 unabhängigen Experimenten. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt. (B) Dargestellt ist eine Western-Blot Analyse (HA-Antikörper) von Blattmaterial der Linien ÜE 5-6, ÜE 7-5 und Col-0. Die Amidoschwarz diente als Ladekontrolle. Darstellung der hoch (C) oder runter (D) regulierten Gene zwischen 7-5 (PPL1 ÜE) und Col-0 unter Kontroll-Bedingungen mittels STRING Analyse (Szklarczyk et al., 2019). Legende: bekannte Interaktoren (türkis = Datenbanken, pink = Experimente), vorhergesagte Interaktoren (grün = Gen Nachbarschaft, rot = Genfusion, blau = gemeinsam auftretende Gene) und andere Quellen (hellgrün = gemeinsames Auftreten in der Literatur, schwarz = Ko-Expression, lila = Protein Homologie)

3.3.2 Interaktionsanalysen für PPL1/PPL2 und Histonen

Zur Untersuchung ob PPL1 und PPL2 über die PHD-ähnliche Domäne in der Lage sind den N-Terminus von Histonen zu erkennen, wurde zuerst ein in vitro Histon-Assay in Kooperation mit Dr. Andreas Fischer (MLU, Abteilung Entwicklungsgenetik) durchgeführt. Hierfür wurden PPL1 und PPL2 rekombinant über ihren N-terminalen GST-Anhang mittels GSH-Sepharose aufgereinigt (2.2.2.3). In ersten Versuchen wurden pull down Experimente von Histonen aus Kalbsthymus (H1, H2A, H2B, H3 und H4) mit GST-PPL1, GST-PPL1mutPHD, GST-PPL1^{AA} und GST-Anhang allein durchgeführt (2.2.2.1). Dabei sollte PPL1mutPHD als Negativ-Kontrolle dienen. Hierbei handelt es sich um eine Variante bei der alle für die Zink-Koordination notwendigen Cysteine und das Histidin zu Alanin mutiert wurden (vgl. Abbildung 3). Die stabile Faltung der Domäne sollte dadurch verhindert werden und damit die Erkennung von Histon-Modifikationen unterbrochen sein. In allen drei Experimenten wurden Signale des H3-Antikörpers bei den mitgeführten Negativ-Kontrollen (z.B. GST-Anhang allein) detektiert. Im Gegensatz dazu war der Nachweis von gebundenen Histonen mit PPL1 nur in einem der drei Experimente möglich (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse deuten unter Berücksichtigung des Versuchsaufbaus auf unspezifische Bindungen zwischen den Histon-Proteinen und den rekombinanten Proteinen hin. Um ein Versuchsaufbau mit physiologischeren Bedingungen zu ermöglichen und gleichzeitig den vorher verwendeten Histon-Mix aus Kalbsthymus zu umgehen, wurde ein weiteres pull down Experiment mit einer Zellkern-Präparation aus A. thaliana Col-0 Pflanzen durchgeführt (2.2.2.6). Auch in diesem Experiment konnte keine spezifische Interaktion der rekombinanten Proteine (GST-PPL1, GST-PPL2 und GST-Anhang) mit Histon-Proteinen detektiert werden (Anhang 5 C).

Um zu vermeiden, dass der Versuchsaufbau mit rekombinanten Proteinen, aufgrund fehlender post-translationaler Modifikationen, zu unspezifischen Effekten führt sollte in transgenen Pflanzen geprüft werden ob HA-markiertes PPL1 mit endogenen Histon-Proteinen koimmunpräzipitieren können. Hierfür wurden die bereits in 3.3.1 erwähnten transgenen Überexpressions-Linien verwendet, deren Genexpression und auch Proteinlevel, unter denaturierenden Western-Blot Bedingungen, sich voneinander unterschied (Linie 5-6 und 7-5, Abbildung 13). Leider war es nicht möglich 1xHA-PPL1 in dem Extrakt löslich zu extrahieren, wodurch die Versuche zur Ko-Immunpräzipitation nicht durchgeführt werden konnten. Auch eine vorgelagerte Zellkern-Isolation aus *A. thaliana Col-0* bzw. ÜE 5-6 Blattmaterial konnte die angestrebte PPL1 Anreicherung nicht gewährleisten. Mit Hilfe von *in vitro* pull-down Experimenten war es also nicht möglich, eindeutige Ergebnisse zur Interaktion zwischen PPL1 und PPL2 mit Histon-Proteinen zu erhalten. PPL1 scheint in physiologischen Extrakten schwer löslich zu sein, was einen Hinweis auf eine enge Chromatin-Assoziation darstellen könnte. Davon ausgehend sollte die Interaktion mit Histonen mit weiteren Experimenten untersucht werden.

3.3.3 Mögliche Ko-Lokalisation von PPL1/PPL2 mit Histonen

Da keine Ko-Immunopräzipitationsstudien mit PPL1 und Histon-Proteinen durchgeführt werden konnten, sollte zuerst die Lokalisation von PPL1 und PPL2 im Zellkern, welche für eine Funktion in diesem Kompartiment spricht, nochmals untersucht werden. Hierfür wurde *H3.1* (At5g65360) aus mehreren identifizierten Histonen in *A. thaliana* aufgrund der ubiquitären Expression ausgewählt (Okada et al., 2005). Es sollte geprüft werden, ob eine Ko-Lokalisation von PPL1 mit H3.1 besteht und eine Interaktion zwischen diesen Proteinen möglich macht. H3.1 ist aufgrund seiner Funktion ausschließlich im Kern zu finden und könnte als ein mögliches Substrat für die PHD-ähnliche Domänen von PPL1 und PPL2 fungieren. Wie bereits für PPL1 und PPL2 beobachtet, lokalisieren auch CFP-PPL1 und CFP-PPL2 im Zellkern und zu unterschiedlichen Anteilen ebenfalls im Zytoplasma, eventuell hervorgerufen durch die Überproduktion (Abbildung 14 A). Für H3.1 konnte ausschließlich eine Kern-Lokalisation beobachtet werden. Damit überschneidet sich die Lokalisation von PPL1/PPL2 und H3.1, jedoch konnten kleinere Strukturen von YFP-H3.1 nicht über den CFP Kanal detektiert werden. Eine Interaktion ist möglich, kann jedoch mit diesen Daten nicht bestätigt werden.

Zur Kontrolle der Expression aller verwendeten Konstrukte wurden Western Blot Proben analysiert (Abbildung 14 B). Aufgrund der nahezu identischen Größe war es nicht möglich CFP-PPL1 und CFP-PPL2 von YFP-H3.1 auf zu trennen.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl PPL1 als auch PPL2 in *A. thaliana* Protoplasten eindeutig auch im Zellkern lokalisieren. Ähnliche Ergebnisse konnten mit einer Kern-Präparation aus transgenen über-exprimierenden HA-PPL1 Linien für PPL1 erreicht werden (Anhang 4 B). Somit liegen die Proteine überwiegend im gleichen Kompartiment wie Histone vor, sodass die Möglichkeit einer physiologischen Interaktion besteht. Im weiteren Verlauf sollten die möglichen Interaktionen ebenfalls im physiologischen System weiter untersucht werden.



Abbildung 14 Ko-Lokalisation von PPL1 und PPL2 mit H3.1 im Zellkern von A. thaliana Protoplasten. Die YFP-Signale wurden 16 h nach Transformation mittels konfokaler Lasermikroskopie analysiert. Die YFP und CFP Signale wurden in getrennten Kanälen detektiert und anschließend mit den Signalen der Autofluoreszenz (auto) übereinander gelegt (merge). (A) Transiente Ko-Expression unter 35S Promoter von *CFP-PPL1* und *CFP-PPL2* mit *YFP-H3.1* in *A. thaliana* Protoplasten. Dargestellt sind die Ergebnisse eines von 3 unabhängigen Experimenten. Protoplasten $n \ge 17$ (B) Proben zur Kontrolle der Genexpression wurden 16h nach Transformation eingefroren und mittels Western-Blot (GFP-Antikörper) analysiert. Die Amidoschwarz Färbung diente als Ladekontrolle.

3.3.4 Interagieren PPL1/PPL2 mit Histonen über die PHD-ähnliche Domäne?

Eine weitere Möglichkeit eine physiologische Interaktion von PPL1 und PPL2 mit Histon-Proteinen zu zeigen, stellt die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation in A. thaliana Protoplasten dar. Als Interaktionspartner wurde erneut H3.1 verwendet (Okada et al., 2005). Es wurden A. thaliana Protoplasten mit folgenden Fusionsproteinen verwendet: c-YFP-HA-PPL1, c-YFP-HA-PPL2 oder c-YFP-HA-PPL1mutPHD in Kombination mit jeweils nYFP-cmyc-H3.1 oder nYFP-c-myc-H3.1/N. Die PHD-ähnliche Domänen Null-Variante des PPL1 Proteins (c-YFP-PPL1mutPHD) und das N-terminal um 43 Aminosäuren verkürzte H3.1 Protein (n-YFP-H3.1ΔN) dienen als Negativ-Kontrolle. In den durchgeführten Experimenten konnten Interaktionen zwischen PPL1 und H3.1 in dem Zellkern der A. thaliana Protoplasten beobachtet werden (Abbildung 15). Um zu prüfen ob die Bindung beider Partner über die PHD-ähnliche Domäne von PPL1 vermittelt wird, wurde die PPL1mutPHD Variante als Negativ-Kontrolle mitgeführt. Es zeigte sich, dass mit dieser Variante überwiegend keine Interaktionen beobachtet wurden. Für vereinzelt auftretende Interaktionen ließ sich die Lokalisierung nicht eindeutig bestimmen (vgl. Abbildung 15, oberes Beispiel nYFP-H3 mit nYFP-PPL1mutPHD). Dies könnte darauf hindeuten, dass es eine Vermittlung der Interaktion zwischen PPL1 und H3.1 gibt, die außerhalb der PHD-ähnlichen Domäne oder über weitere Interaktionspartner erfolgt. Als weitere Negativ-Kontrolle wurde das verwendete H3.1 N-Terminal um 43 Aminosäuren (H3.1ΔN) verkürzt. Diese 43 Aminosäuren entsprechen dem N-terminalen Bereich von Histonen an dem post-translationale Modifikationen wie Methylierung, Phosphorylierung und Acetylierung auftreten können (Li and Li, 2012). Keines der untersuchten Proteine (PPL1, PPL2 oder PPL1mutPHD) zeigte Signale mit der verkürzten H3.1 Variante (Abbildung 15). Dies spricht für eine spezifische Interaktion zwischen PPL1 oder PPL2 mit H3.1.



<u>Abbildung 15 In vivo</u> Interaktion von PPL1 und PPL2 mit H3.1 in *A. thaliana* Protoplasten. Transiente Ko-Expression unter 35S-Promoter von *cYFP-PPL1*, *cYFP-PPL2* und *cYFP-PPL1mutPHD* mit *nYFP-H3.1* und *nYFP-H3.1* Δ *Ntail* in *A. thaliana* Protoplasten. Die YFP-Signale wurden 16 h nach Transformation mittels konfokaler Lasermikroskopie analysiert. (A) Dargestellt sind die Ergebnisse eines aus 6 unabhängigen Experimenten. Der Maßstabsbalken entspricht 10 nm. n \geq 33 (B) Kontroll-Proben der Genexpression wurden 16h nach Transformation eingefroren und mittels Western-Blot (HA oder c-myc Antikörper (AK)) analysiert. Die Amidoschwarz Färbung diente als Ladekontrolle.

Mit Hilfe der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation war es möglich eine *in vivo* Interaktion zwischen PPL1 und H3.1 sichtbar zu machen. Die Interaktion zwischen PPL1/PPL2 und dem H3.1 scheint vom N-Terminus des H3.1 abhängig zu sein und gibt damit einen Hinweis auf eine mögliche Erkennung von Modifikationen in diesem Bereich durch PPL1/PPL2. Sowohl die vereinzelt auftretenden Signale zwischen PPL1mutPHD und H3.1 als auch der Fakt, dass die Interaktion nur unter physiologischen Bedingungen detektiert werden konnte, könnte einen Hinweis darauf geben dass weitere Interaktionspartner beteiligt sind. Unter den Bedingungen der durchgeführten *in vitro* Experimente würden die eventuell notwendigen Interaktionspartner fehlen oder aufgrund fehlender Modifikationen nicht binden. Es ist daher für die weitere Untersuchung der Funktion notwendig, neue Bindungspartner zu identifizieren und dabei unter physiologischen Bedingungen zu arbeiten.

3.4 *Proximity labeling* mit Biotin (BioID)

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass PPL1 und PPL2 sowohl mit MAP Kinasen als auch Histonen interagieren können, wobei die Interaktion mit H3.1 allein mit BIFC detektiert werden konnte (3.2.2 und 3.3.4). Aufgrund der unzureichenden Proteinlöslichkeit von PPL1 war es notwendig ein System zur Identifizierung weiterer Interaktionspartner zu verwenden, welches unter physiologischen Bedingungen verlässliche Ergebnisse liefert. In den letzten Jahren wurde die Biotin-Markierung von Proteinen in unmittelbarer Nachbarschaft (proximity-labeling) mittels Biotin Ligase in Säugerzellen für unterschiedlichste Anwendungen etabliert. In einer der ersten Veröffentlichungen zu Pflanzensystemen wurden Interaktionspartner für OsFD2 in Oryza sativa Protoplasen identifiziert (Lin et al., 2017). Da das PPL1 Protein für Interaktionsstudien schwierig zu extrahieren ist, stellt diese Methode die Möglichkeit dar neue Interaktionspartner zu identifizieren. Weiterhin bietet die Arbeit mit Protoplasten die Möglichkeit mehrere Konstrukte gleichzeitig und mit geringem Zeitaufwand zu testen. Zusätzlich ist es möglich unterschiedlichste Behandlungen mit z.B. PAMP oder Hormonen durchzuführen und damit ein vielseitig einsetzbares Werkzeug zur Identifizierung von Proteinkomplexen zu kreieren. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit diese Methode in dem A. thaliana Protoplasten-System etabliert und neue Interaktionspartner für PPL1 und PPL2 identifiziert werden.

3.4.1 Optimierung der Biotin-Behandlung

Versuche zur Verwendung der in Säugerzellen etablierten und optimierten BirA* Biotin Ligase im Pflanzensystem waren nicht erfolgreich (Roux et al., 2012). Da die Größe der Biotin Ligase in Pflanzensystemen zu Problemen führen könnte, wurde die ebenfalls im Säuger-System angewandte kleinere Biotin Ligase BioID2 für unsere Experimente in Betracht gezogen (Kim et al., 2016). In Vorversuchen zeigte sich jedoch, dass die Aktivität bei den für Pflanzen optimalen Temperaturen von 18°C bis 20°C nur sehr gering war, da es sich bei der BioID2 um eine Biotin Ligase aus dem thermophilen Bakterium *Aquifex aeolicus* handelt. Für weitere Experimente wurden dann eine in Hefezellen optimierte Biotin Ligase aus *Escherichia coli* (TurboID) und deren verkürzte Variante (miniTurboID) verwendet (Branon et al., 2018).

Im Zuge eines Forschungsgruppen-Praktikums von Julia Lohmann (IPB Halle, Masterstudentin, 2018) erfolgten die Klonierung und die Analyse der Biotinylierungs-Aktivität bei unterschiedlichen Biotin-Konzentrationen und Zeitpunkten aller bereits erwähnten Biotin Ligasen. In Übereinstimmung mit aktuellen Untersuchungen konnte schon zu diesem Zeitpunkt gezeigt werden, dass TurboID und miniTurboID durch ihre höhere Aktivität schnellere Biotinylierung vermitteln und dies auch im optimalen Temperaturbereich von Pflanzen (Mair et al., 2019). Die verwendeten Biotin-Konzentrationen in der Literatur für Pflanzen-Experimente variieren je nach Anwendung von 50 μ M bis 2 mM (Lin et al., 2017; Khan et al., 2018; Mair et al., 2019). Für *O. sativa* Protoplasten ist die optimale Biotin Konzentration von 50 μ M beschrieben, dies konnte von Julia Lohmann auch in *A. thaliana* Protoplasten bestätigt werden (Lin et al., 2017).

An diese Arbeit anschließend wurden weitere Experimente mit Konstrukten mit PPL1, PPL2 und CFP jeweils in Fusion mit der TurboID Biotin Ligase in *A. thaliana* Protoplasten durchgeführt (2.2.2.11). Für jedes TurboID Fusionsprotein sollte die Funktionalität und Spezifität in Vorversuchen bestimmt werden. Transient transformierte Protoplasten wurden nach der über Nacht-Proteinproduktion von PPL1-TurboID, PPL2-TurboID oder CFP-TurboID mit 50 µM Biotin behandelt und nach 0, 15, 30, 60 oder 120 Minuten wurden Proben in Stickstoff eingefroren. Die Analyse erfolgte mittels Western-Blot mit strep-POD (Streptavidin gekoppelte Peroxidase) und nach einem Strip-Vorgang mit dem HA-Antikörper. In einer nicht-transformierten Protoplasten Probe und den jeweiligen 0 Minuten Proben konnten bereits zwei stark biotinylierte Protein-Bandereiche bei ~30 kDa und ~80 kDa detektiert werden (Abbildung 16, Spur 1,2,7,12). Neben diesen Hintergrund-Signalen konnte bei allen drei Fusionsproteinen bereits nach 15 Minuten die Bande der Selbst-Biotinylierung sowie weitere Banden detektiert werden. Die Beprobung der Membran erfolgte mit strep-POD zur spezifischen Detektion von Biotin und damit von den biotinylierten Proteinen der Proben. Da sich das Muster der Banden von PPL1/CFP und PPL2 unterschied, konnte eine

53

Spezifität bei PPL2-Turbo-ID vermutet werden. Bei allen drei untersuchten Fusionsproteinen waren nach 60 Minuten mehrere Banden vorhanden, sodass sich bei weiterer Inkubation die Signale nur noch verstärkten (Abbildung 16). Um in einem Bereich der spezifischen Biotinylierung zu bleiben wurden in den folgenden Experimenten die *A. thaliana* Protoplasten für eine Stunde mit 50 µm Biotin behandelt.



<u>Abbildung 16 Zeit-abhängige Biotinylierung von PPL1, PPL2 und CFP.</u> Transiente Expression von *PPL1-TurboID, PPL2-TurboID* und *CFP-TurboID* in *A. thaliana* Protoplasten. Die Behandlung mit 50µM Biotin erfolgte 16 h nach der Transformation und wurde nach den angegebenen Zeitpunkten durch einfrieren gestoppt. Die Analyse erfolgte mittels Western Blot mit strep-POD oder HA Antikörper (AK). Als Kontrolle der Hintergrund Biotinylierung wurden nicht-transformierte Protoplasten (uP) mitgeführt. Rote Sterne zeigen die erwartete Proteingröße. Die Amidoschwarz Färbung diente als Ladekontrolle.

Zur Kontrolle der korrekten Expression der transformierten Konstrukte wurde die Membran nach der Detektion mittels H₂O₂ Inaktivierung und saurem Strip-Puffer von strep-POD befreit. Anschließend erfolgte die Detektion des HA-Anhangs zwischen Zielprotein und TurboID mit Hilfe des HA-Antikörpers. Dabei konnte beobachtet werden, dass bei allen Fusionsproteinen nahezu kein Protein nach Biotin-Behandlung detektiert werden konnte (Abbildung 16). Ein Proteinabbau widerspricht dem mit strep-POD analysierten Western-Blot, da dort die Banden der selbst-biotinylierten Fusionsproteine bis zu 120 Minuten nach Biotin Behandlung zu detektieren sind (Abbildung 16, rote Sterne). Zusätzlich dazu konnte die Aktivität von PPL1-TurboID, PPL2-TurboID und CFP-TurboID in *A. thaliana* Protoplasten nach Biotin-Behandlung durch die Zunahme der Banden gezeigt werden.

3.4.2 Antikörper-Detektion

Ein Abbau der Fusionsproteine während der Biotin-Behandlung würde zu Falsch-Positiven Interaktoren durch die Markierung von Proteinen des Abbau-Apparates wie zum Beispiel Ubiquitin oder einer 26S Proteasom Untereinheit führen. Es war daher von großem Interesse, diesen Effekt des vermeintlichen Proteinabbaus zu untersuchen. Neben dem tatsächlichen Proteinabbau könnte eine mögliche Erklärung die Selbst-Biotinylierung der TurboID in unmittelbarer Nähe zum HA-Anhang sein, was zu einer Maskierung gegenüber dem Antikörper führen könnte. Im Zuge eines Praktikums wurde von Susanne Neumann diese HA-Maskierung mit Hilfe von CFP-TurboID und CFP-BioID2 untersucht. Hierbei fungierte CFP-BioID2 durch seine geringere Aktivität als Beispiel für ein niedrigeres Biotinylierungs-Level. Die Transformation der Protoplasten und die Biotin-Behandlung erfolgten wie bereits beschrieben. Anschließend wurden die Proben getrennt und separat mittels Western-Blot einmal mit dem HA-Antikörper und einmal mit dem GFP-Antikörper analysiert. Beide Western-Blots zeigten identische Bandenmuster nach der Beprobung mit strep-POD (Abbildung 17).



Abbildung 17 Antikörper Vergleich der Proteindetektion nach Biotinylierung. Transiente Expression von *CFP-TurboID* und *CFP-BioID2* in *A. thaliana* Protoplasten. Die Behandlung mit 50µM Biotin erfolgte 16 h nach der Transformation für eine Stunde. Proben der gleichen Transformation wurden aufgeteilt. Die Analyse erfolgte mittels Western Blot durch strep-POD Detektion, der Strip-Prozedure und anschließender HA-Antikörper (AK) (A) oder GFP-Antikörper (B) Detektion. Als Kontrolle der Hintergrund Biotinylierung wurden nichttransformierte Protoplasten (uP) mitgeführt. Die erwartete Proteingröße wird durch einen roten Stern markiert. Die Amidoschwarz Färbung diente als Ladekontrolle. Das Experiment wurde von Susanne Neumann durchgeführt.

Im Anschluss an das Strip-Protokoll konnte einerseits beobachtet werden, dass CFP-BioID2 bei schwacher Biotinylierung eine gleichbleibende Proteinmenge zeigt. Andererseits zeigte sich bei CFP-TurboID nach der Biotin-Behandlung sowohl mit dem anti-HA Antikörper als auch dem anti-GFP Antikörper ein verringertes Proteinlevel (Abbildung 17 A, B). Der vermeintliche Proteinabbau konnte somit in direkter Korrelation zum Biotinylierungs-Status gesetzt werden. Weiterhin kann diese Verringerung der Proteinsignale mit zwei unterschiedlichen Antikörpern detektiert werden. Dies widerspricht der Hypothese der Maskierung des HA-Epitops durch Biotinylierungen.

In weiterführenden Experimenten konnte das Problem bei dem verwendeten Strip-Protokoll gefunden werden, welches die sehr starke Bindung zwischen Biotin und der verwendeten Streptavidin-POD nicht trennen konnte. Dafür wurden die einzelnen Transformationen getrennt und über separate Western-Blots analysiert. Durch die Beprobung einer Membran mit dem anti-HA Antikörper (Kontrolle Proteinlevel) und einer weiteren Membran mit der strep-POD (Kontrolle des Biotinylierungs-Status) wurde das Strip-Protokoll umgangen. Die strep-POD Detektion zeigte deutlich die gleichen, schon beobachteten Biotinylierungsmuster (Abbildung 16, Abbildung 18 A). Weiterhin konnte eindeutig gezeigt werden, dass auch bei einem hohen Biotinylierungs-Status kein Proteinabbau der Fusionsproteine stattfindet (Abbildung 18 B).



Abbildung 18 Separate Detektion mittels strep-POD oder HA-Antikörper. Transiente Expression von *PPL1-TbID*, *PPL2-TbID* und *CFP-TurboID* in *A. thaliana* Protoplasten. Die Behandlung mit 50µM Biotin erfolgte 16h nach der Transformation für eine Stunde. Proben der gleichen Transformation wurden aufgeteilt. Die Analyse erfolgte mittels Western Blot auf separaten Membranen einerseits durch strep-POD Detektion (**A**) und andererseits durch HA-Antikörper (AK) Detektion (**B**). Als Kontrolle der Hintergrund Biotinylierung wurden nicht-transformierte Protoplasten (uP) mitgeführt. Die erwartete Proteingröße wird durch einen roten Stern markiert. Die Amidoschwarz Färbung diente als Ladekontrolle.

Vielmehr scheint die Bindung der strep-POD an Biotin zu stark zu sein um sie mit dem verwendeten Strip-Protokoll zu entfernen. Dieser Effekt konnte auch nicht über das erneute detektieren der biotinylierten Proteine nach dem *stripping* beobachtet werden, da eine Inaktivierung der Peroxidase mit H_2O_2 in Vorbereitung für das Strip-Protokoll durchgeführt worden ist (2.2.2.9). In den weiteren Experimenten wurden nun entweder separate Membranen verwendet oder die Detektion erfolgte zuerst mit dem anti-HA Antikörper und nach dem *stripping* mit der strep-POD. Der vermeintliche Proteinabbau der TurboID-

Fusionsproteine nach Biotin Behandlung konnte damit auf einen für diese Anwendung nicht ausreichend funktionierenden Strip-Vorgang zurückgeführt werden.

3.4.3 Kernlokalisation der TurboID-Konstrukte

Das Prinzip der Kopplung von Zielproteinen mit der Biotin Ligase TurboID soll zu spezifisch markierten Interaktoren der Zielproteine führen. Die Zusammensetzung der identifizierbaren Interaktoren unterscheidet sich aufgrund von unterschiedlichen Funktionen oder Lokalisationen. Falsch-Positive Interaktoren können nicht ausgeschlossen werden, da zufällig in die Nähe kommende Proteine genauso markiert werden wie Proteine die eine direkte Bindung mit dem Zielprotein eingehen. Mit Hilfe der Western-Blot Analysen ist es mit dem strep-POD möglich, biotinylierte Proteine sichtbar zu machen und so einen Rückschluss auf die Biotinylierung zu ziehen. Anhand der Biotinylierungsmuster konnte bereits ein Unterschied zwischen PPL2 und PPL1/CFP beobachtet werden (Abbildung 16, Abbildung 18). Ob es sich hierbei tatsächlich um sichtbar biotinylierte Interaktoren handelt oder nur um Abbauprodukte des PPL2 Proteins kann mit Hilfe dieser Methode nicht geklärt werden.

Um diese Beobachtung auch im Kontext von unterschiedlichen Kompartimenten bestätigen zu können, wurde neben den bereits untersuchten TurboID Konstrukten auch ein Konstrukt für die Produktion von H3.1-TurboID (Lokalisation im Zellkern) zur Transformation von *A. thaliana* Protoplasten verwendet. Da sich sowohl bei PPL1 als auch bei PPL2 durch die TurboID Fusion die Proteingröße mehr als verdoppelt hatte, wurde eine Kernpräparation aus transformierten Protoplasten (2.2.2.7) durchgeführt um die korrekte Lokalisation der Konstrukte zu überprüfen. Als Kontrolle für die saubere Präparation von Zellkernen wurde die H3-TurboID Fusion verwendet. Es konnte eine Lokalisation für PPL1-TurboID und PPL2-TurboID in Zellkern und Zytoplasma gezeigt werden (Abbildung 19). Die nicht durch eine Funktion gerichtete Lokalisation von CFP-TurboID ist ausschließlich im Zytoplasma, da die Fusion vermutlich zu groß ist um die Kernporen ungehindert zu passieren. In Kombination mit der Lokalisation von H3.1-TurboID im Zellkern und dem Fehlen der zytoplasmatischen Ribulose-1,5-biphosphat-carboxylase/-oxygenase (RuBisCO) in den Kernpräparationen konnte die saubere Präparation bestätigt werden.



<u>Abbildung 19 Physiologische Lokalisation von PPL1-TurboID und PPL2-TurboID.</u> Transiente Expression von *PPL1-TurboID, PPL2-TurboID, H3-TurboID* und *CFP-TurboID* in *A. thaliana* Protoplasten. Die Zellkern-Präparation wurde 16h nach der Transformation durchgeführt. Die Proteindetektion der vollständigen Proben (total) und der Fraktionen (Zellkern und Zytoplasma) erfolgte mit dem HA-Antikörper. Die Amidoschwarz Färbung diente sowohl als Ladekontrolle als auch zum Anfärben des zytoplasmatischen Proteins RuBisCO.

Mit Hilfe der Kernpräparation konnte für PPL1-TurboID und PPL2-TurboID eine Lokalisation wie bereits bei den mikroskopischen Untersuchungen gezeigt werden. Daraus kann man ableiten, dass der zusätzliche Anhang an den Proteinen ihren natürlichen Weg in den Zellkern nicht beeinflusst. Der Effekt von PPL Proteinen im Zytoplasma kann ein Hinweis auf eine weniger, als bisher vermutet, enge Bindung an Chromatin sein. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der mikroskopischen Untersuchungen besteht ebenso die Möglichkeit, dass die starke Überexpression zu einem aus dem Zellkern schwämmenden Effekt führt (vgl. 3.2.1).

3.4.4 Die Proteinextraktion und das Entfernen von überschüssigem freiem Biotin

Nachdem die Vorversuche erfolgreich durchgeführt werden konnten, sollten nun die Protein Proben für die massenspektrometrische Identifizierung von Interaktoren vorbereitet werden. Dabei ist es notwendig so viele Proteine wie möglich in Lösung zu bringen. Für die Auswahl der geeigneteren Pufferzusammensetzung für diese Anwendung wurden zwei Protokolle getestet, bei denen eines aus dem Säugerzellen System (Roux et al., 2012) bereits für die Extraktion aus *O. sativa* Protoplasten (Lin et al., 2017) und eines für den Aufschluss von *A. thaliana* Blattmaterial verwendet worden war (Khan et al., 2018).

Anhand des anti-HA beprobten Western-Blots wurde bei beiden Protokollen die Löslichkeit aller Fusionsproteine festgestellt. Bei dem Protokoll nach Khan war das Bandenmuster stärker ausgeprägt und es konnten mehr Proteine extrahiert werden (Abbildung 20 A). Wohingegen bei dem Roux Protokoll ein verhältnismäßig großer Teil der Proteine nicht-löslich vorlag.

Bei der Untersuchung der Proben auf Vorhandensein von PPL1-TurboID, PPL2-TurboID, H3.1-TurboID und CFP-TurboID konnten diese bei beiden Protokollen sowohl in der

löslichen als auch nicht-löslichen Fraktion detektiert werden. Obwohl zusätzliche, zu den berechneten, Banden detektiert werden konnten, was einen Hinweis auf Protein-Abbau sein könnte, wurde das Protokoll nach Khan nach einer Optimierung mit Protease-Inhibitoren verwendet (Abbildung 20 B).



Abbildung 20 Proteindetektion und Biotinylierungskontrolle nach dem Khan et al. Extraktions-Protokoll. Transiente Expression von *PPL1-TurboID*, *PPL2-TurboID*, *H3-TurboID* und *CFP-TurboID* in *A. thaliana* Protoplasten. Die Behandlung mit 50µM Biotin erfolgte 16 h nach der Transformation für eine Stunde. Anschließend wurde die Extraktion nach Khan et al., 2018 durchgeführt. Die Analyse erfolgte mittels Western Blot. Die erwartete Proteingröße wird durch einen roten Stern markiert. Die Amidoschwarz Färbung wurde als Ladekontrolle verwendet. ÜS=Überstand, P=Pellet, TbID=TurboID

Aufgrund des schlechteren Aufschluss-Vermögens des Khan-Puffers ohne Detergenzien wurde dieser durch die Zugabe von 0,4% SDS optimiert. Hierbei konnte eindeutig gezeigt werden, dass der Khan-Puffer mit SDS ausreichend ist um nahezu alle biotinylierten Proteine im ersten Schritt zu extrahieren (Abbildung 21 A). Weiterhin ist bekannt, dass durch die hohe Konzentration an freiem Biotin in den Extrakten die Bindung der biotinylierten Proteine an Streptavidin *beads* stark vermindert ist (Khan et al., 2018; Mair et al., 2019). Bei der Aufarbeitung zweier identischer Extrakte einmal mit einem Gelfiltrations-Schritt durch eine PD10 Säule und einmal ohne, sollte dieser Effekt untersucht werden. In den Experimenten konnte die verbesserte Bindungsfähigkeit der gelfiltrierten Probe an die magnetischen Streptavidin *beads* eindeutig gezeigt werden (Abbildung 21 B). Aus diesem Grund wurden in allen nachfolgenden Experimenten die Extrakte vor der Inkubation mit Streptavidin *beads* über eine PD10 Säule gelfiltriert.



Abbildung 21 Optimierung des Extraktionsprotokolls und PD10-Säule. Die Protoplasten wurden wie bereits beschrieben mit *PPL2-TbID* oder *H3-TbID* transformiert. (**A**) Im Zuge der Extraktion nach Khan et al., 2018 wurden die biotinylierten Proteinen mittels Western Blot (strep-POD) nachgewiesen. (**B**) Vergleich der Bindungsfähigkeit der biotinylierten Proteine an die magnetischen *beads* mit und ohne Verringerung der Konzentration an freiem Biotin durch eine PD10-Säule. Die Amidoschwarz Färbung wurde als Ladekontrolle verwendet. ÜS=Überstand; P=Pellet; T=total; B¹⁰=an beads gebunden, 1/10 aufgetragen; DF¹⁰⁰=Durchfluss, 1/100 aufgetragen; DF¹⁰⁰=Durchfluss, 1/10 aufgetragen; TbID=TurboID

3.4.5 Optimierung der Massenspektrometrie Messung

Mit Hilfe der massenspektrometrischen Untersuchung erfolgt die Identifizierung der mit Biotin markierten und über die Streptavidin beads separierten Proteine. Bei dem Vergleich der Daten von PPL1-TurboID, PPL2-TurboID und CFP-TurboID können neue potenzielle Interaktionspartner herausgefiltert werden. Bei der Aufarbeitung der Proben für die Massenspektrometrie ist die Fragmentierung der Proteine zu messbaren Peptiden ein entscheidender Schritt. Hierfür wurde der Verdau direkt auf den magnetischen beads verwendet (on-bead Verdau) um den Verlust von Peptiden bei zusätzlichen Extraktionsschritten zu vermeiden.

In Vor-Versuchen zeigte die Analyse der Affinitäts-Reinigung, dass die Fusionsproteine nur in einem sehr geringen Anteil an die magnetischen *beads* binden. Es ist jedoch trotzdem möglich andere biotinylierte Proteine, dabei vor allem die bereits ohne Biotin Behandlung vorhandenen Hintergrund Proteine, auf den *beads* zu detektieren. Zur Überprüfung ob eine erhöhte Detergenzien-Konzentration diese Bindung erleichtert, wurden dem Extraktionspuffer bei der ersten Messung Na-deoxycholat und Triton zugesetzt. Es war jedoch schon bei dem MS1 Spektrum sichtbar, dass diese Detergenzien nicht aus den Proben gewaschen werden konnten und somit die Identifizierung der Peptide erschwerten oder auch verhinderten. Diese Detergenzien oder auch synthetische Produkte sind durch ihr gleichmäßiges Peak-Muster in den MS1-Spektren zu erkennen (Abbildung 22 A). Bei der Vorbereitung der Proben für die massenspektrometrische Identifizierung wurden während der Extraktion und Aufarbeitung für alle drei Messungen Proben für die Analyse mittels Western Blot entnommen (Anhang 10). Da für diese erste Messung keine verbesserte Bindung an die Streptavidin *beads* über den Western Blot detektiert werden konnte, wurden diese Detergenzien für die weiteren Messungen nicht mehr verwendet. Leider zeigte auch die zweite Messung ähnliche Verunreinigungs-Muster, obwohl keine Detergenzien neben dem SDS in den verwendeten Puffern enthalten waren (Abbildung 22 B). Bei der Problemanalyse wurden weitere mögliche Quellen für synthetische Produkte erkannt und wenn möglich bei den folgenden Aufarbeitungen vermieden. Zusätzlich dazu wurde ausschließlich MS-grade HPLC Wasser verwendet. Weiterhin zeigten die Chromatogramme immer noch große Mengen synthetischer Produkte an, wie die dominanten gleichmäßigen Peaks zeigen (Abbildung 22 C).

Da diese Verunreinigungen einen sehr großen Teil der Proben darstellen und nicht durch minimale Verunreinigungen erklärt werden konnten, erfolgte eine massenspektrometrische Untersuchung der verwendeten magnetischen Streptavidin beads. Dafür wurden diese beads laut dem beschriebenen Extraktionsprotokoll gewaschen, ausgenommen der Über-Nacht Inkubation mit den biologischen Proben. Ab dem on-bead Verdau erfolgte die Aufarbeitung unter identischen Bedingungen. Aufgrund des identischen gleichmäßigen Peak Musters wurde deutlich, dass die Verunreinigungen von den verwendeten beads in die Proben eingebracht worden waren (Abbildung 22 D). Aufgrund des wenigen biologischen Materials aus Protoplasten überlagern diese Verunreinigungen die mittel und niedrig abundanten Peptide. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde für die weitere Aufarbeitung der Proben die Methode des in-gel Verdaus getestet. Die starke nicht-kovalente Bindung zwischen Biotin und Streptavidin mit einer Affinität von 10^{13} M⁻¹ stellt für die Waschung und Separation von biotinylierten Proteinen einen großen Vorteil da. In dem Moment, wo man diese Proteine isolieren will, wird daraus ein Nachteil. Vor-Versuche haben gezeigt, dass die Elution der Proteine von den magnetischen beads garnicht oder nur teilweise stattfindet, was zu Verlusten von Information führt. Trotzdem wurden Proben erneut nach Protokoll 3 aufgearbeitet und im Anschluss an die Waschung der beads einem Elutionsschritt unterzogen. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proben im SDS-Trenngel und der anschließende in-gel Verdau. Die Messungen konnten zeigen, dass die synthetischen Verunreinigungen mit dieser Methode entfernt werden konnten (Anhang 9).



Abbildung 22 Identifizierung der Verunreinigungen in den MS1-Spektren von 3 unterschiedlichen Aufarbeitungen von Proben mit PPL2-TurboID. Die Proteinextraktion aus *A. thaliana* Protoplasten erfolgte laut (A) Extraktionsprotokoll 1 (SDS, Na-deoxycholat, Triton im Extraktionspuffer), (B) Extraktionsprotokoll 2 (nur SDS im Extraktionspuffer) oder (C) Extraktionsprotokoll 3 (nur SDS im Extraktionspuffer, alle Puffer in MSgrade Wasser). Nach der weiteren Aufarbeitung und der Separation biotinylierter Proteine mittels Streptavidin *beads* erfolgte der *on-bead* Verdau. Nach der Auftrennung über eine C18 *reversed phase* Säule in einem EASYnLC 1000 Flüssigchromatografie System wurden die im 130 Minuten Gradienten eluierten Peptide mittels Elektrospray ionisiert. Die MS/MS Messungen erfolgten an einem QExactive Plus Massenspektrometer. (D) Die verwendeten Streptavidin *beads* wurden mit Extraktionspuffer gewaschen und ab dem *on-bead* Verdau dem gleichen Protokoll wie den Proben in A-C unterzogen.

Es ist jedoch zu sagen, dass bei diesem Versuch sehr wenig biologisch relevante Peptide identifiziert werden konnten. Da aufgrund einer offiziellen Rückruf-Aktion der verwendeten Trennsäulen von ThermoFisher Scientific keine weiteren Messungen durchgeführt werde

62

konnten, war es aus zeitlichen Gründen leider nicht mehr möglich weitere notwendige Optimierungen des Protokolls vorzunehmen.

3.4.6 Ergebnisse MS

Da wie bereits erwähnt weitere Messungen zeitlich nicht mehr möglich waren, wurden die Daten der drei bereits durchgeführten Test-Messungen analysiert und ohne statistische Analysen dargestellt. Da allen drei Messungen unterschiedliche Extraktions- oder Aufarbeitungsprotokolle zugrunde liegen, wird es nicht möglich sein abschließende Aussagen über mögliche Interaktionspartner und der daraus resultierenden Funktion zu geben. Die Analyse kann jedoch Anhaltspunkte geben, worauf bei weiteren Messungen geachtet werden muss und welche Interaktionspartner eventuell mit höherer Wahrscheinlichkeit erneut gemessen werden könnten.

Bei der Auswertung der Daten wurden von vier Proteinen ein oder mehrere Peptide in jeder Probe der drei Messungen identifiziert. Es ist daher anzunehmen, dass die Genprodukte von At5g16390 (biotin carboxyl-carrier protein 1, BCCP1), At5g15530 (biotin carboxyl carrier protein 2, BCCP2), At1g03090 (3-methylcrotonyl-CoA carboxylase 1, MCCA) und At1g36160 (acetyl-CoA carboxylase 1, ACC1) in Mesophyll-Zellen im biotinylierten Zustand vorliegen. Die Proteingrößen dieser Proteine sind 29,6 kDa für BCCP1, 27,3 kDa für BCCP2, 80 kDa für MCCA und 250 kDa für ACC1. Im Vergleich zu den im Vorfeld durchgeführten Western Blot Analysen stimmen die Größen um circa 30 kDa und 80 kDa mit den bereits in unbehandelten Protoplasten detektierten Signalen überein (Abbildung 16). Diese Proteine stellen einen Hintergrund dar, der aufgrund der hohen Verunreinigung und niedrigen Konzentration an biologischem Material einen großen Teil der gemessenen Peptide einnimmt. In den durchgeführten Messungen war es sowohl für PPL1 als auch PPL2 möglich Peptide in den zugehörigen Proben zu identifizieren (Tabelle 1). Allgemein konnte man schon bei dem Vergleich der MS1 Spektren und der Anzahl der identifizierten Proteine einen klaren Unterschied zwischen der ersten und den beiden darauffolgenden Messungen erkennen (Abbildung 22, Abbildung 23). Aus diesem Grund wurden auch Analysen ohne Datenbeteiligung aus Messung 1 durchgeführt. Um den schon beschriebenen Hintergrund um weitere in den CFP-Kontrollen auftauchenden Proteinen zu verringern, wurden alle Übereinstimmungen aus den PPL1 und PPL2 Datensatz entfernt. Um den Datensatz übersichtlicher zu gestalten, wurden ebenfalls splicing Varianten und homologe Proteine bei nicht-eindeutigen Peptiden entfernt. Die Ergebnisse von PPL1 und PPL2 wurden zu Beginn getrennt voneinander betrachtet, da bereits in vorrangegangenen Experimenten die unterschiedliche Genregulation und auch das unterschiedliche Interaktionsverhalten für PPL1 und PPL2 beobachtet werden konnten.



Abbildung 23 Darstellung der Ergebnisse der massenspektrometrischen Messungen. (A, B) Von den Originalen Daten (Messung 1 bis 3) von PPL1 und PPL2 wurden für die Darstellung alle Gene aus den CFP-Kontrollen, *splicing* Varianten und homologe Proteine bei nicht-eindeutigen Peptiden aussortiert. Die Darstellung und Analyse erfolgte mittels Venny 2.0.2-CSIC. (C) Die Genbezeichnungen der übereinstimmenden Proteine zwischen Messung 2 und 3 aus A und B wurden mittels Venny 2.0.2-CSIC analysiert und dargestellt. (D) Darstellung der Genbezeichnungen der übereinstimmenden Proteine von Messung 2 und 3 von PPL2 mittels STRING Analyse. Legende: bekannte Interaktoren (pink = Experimente) und andere Quellen (grün = gemeinsames Auftreten in der Literatur, schwarz = Ko-Expression)

Im Vergleich der Daten zwischen PPL1 und PPL2 war die Anzahl der in PPL2 identifizierten Peptide höher als in PPL1 (Abbildung 23 A, B). Bei der Analyse mittels VENN-Diagramm wurde deutlich, dass über alle drei durchgeführten Messungen nur Peptide für PPL1 oder PPL2 dreimal detektiert werden konnten (Abbildung 23 A, B). Daraus kann man ablesen, dass die unterschiedliche Vorbereitung und Aufarbeitung der Proben zu sich stark voneinander unterscheidenden Ergebnissen führt. Wie bereits erwähnt, wurde für die weiteren Analysen die Messung 1 außer Acht gelassen. Für PPL2 konnten zwischen den Messungen 2 und 3 insgesamt 19 überlappende Proteine identifiziert werden. Wenn man diese Zahl mit den zwei
überlappenden Proteinen der PPL1 Messung 2 und 3 vergleicht, wird deutlich, dass beide Datensätze nur das Genprodukt von At2g44160 (methylenetetrahydrofolate reductase 2, MTHFR2) identisch haben (Abbildung 23, Tabelle 1). In den PPL1 Proben wurde MTHFR2 lediglich mit ein und demselben Peptid in beiden Messungen mit jeweils einem PSM (peptide spectrum matches) gemessen. Das zweite Protein aus beiden PPL1 Messungen ist PPL1 selber (Tabelle 1). Im Vergleich dazu ist es möglich, bei PPL2 durch die allgemein höhere gemessene Peptid-Anzahl auch mehr potenzielle Interaktionspartner zu identifizieren. Die Proteine mit einem PSM höher als 4 aus beiden Messungen sind: PPL2, At-HSC70-1, VAB2, und ein GYF domain containing protein. Somit liegen die weiteren Proteine an der Nachweis-Grenze. Es ist daher bei diesen Messungen fraglich, inwieweit diese Proteine tatsächliche Interaktoren von PPL2 darstellen. Die Protein-Familien der identifizierten Proteine reichen von Hitzeschock-Proteinen, über Kinasen zu Trimm-Proteinen von mRNA. Aufgrund dieses breiten Spektrums ist es schwierig, tatsächliche Interaktoren ohne weitere Informationen zu identifizieren. Es ist jedoch zu bemerken, dass weder die MAP Kinasen noch Histone als Interaktionspartner in diesen Messungen identifiziert werden konnten. Eventuell wäre dafür die Aktivierung der MAP Kinasen durch zum Beispiel flg22 Behandlung notwendig.

<u>Tabelle 1 Für PPL1 und PPL2 in den Messungen 2 und 3 identifizierte Proteine.</u>Von den originalen Daten (übereinstimmende Proteine, Messung 2 und 3) von PPL1 und PPL2 wurden alle Gene aus den CFP-Kontrollen, *splicing* Varianten und homologe Proteine bei uneindeutigen Peptiden aussortiert. PSM = *peptide spectrum matches* * = aufsummierte Ergebnisse von Messung 2 und 3

AGI-Loci code	Bezeichnung	Anz. Peptide*	PSM*
PPL1			
AT1G02070	plant-specific PHD-like1, PPL1	7	39
AT2G44160	methylenetetrahydrofolate reductase 2, MTHFR2	1	2
PPL2			
AT3G60520	plant-specific PHD-like 2, PPL2	10	42
AT2G44160	methylenetetrahydrofolate reductase 2, MTHFR2	3	3
AT5G02500	arabidopsis thaliana heat shock cognate protein70-1,AT-HSC70-1	6	8
AT1G27430	GYF domain-containing protein	5	6
AT4G38510	v-ATPase b subunit 2, VAB2	3	5
AT3G13300	varicose, VCS	4	4
AT1G20110	FYVE-DOMAIN PROTEIN 1, FYVE1	3	3
AT3G59770	suppressor of actin 9, SAC9	1	2
AT1G04530	tetratricopeptide repeat 4, TPR4	2	2
AT1G54170	ctc-interacting domain 3, CID3	3	3
AT5G01530	light harvesting complex photosystem ii, LHCB4.1	2	2
AT4G32285	clathrin associated protein 1, CAP1	2	2
AT3G53930	autophagy-related protein 1b kinase, ATG1B	2	2
AT4G12400	tetratricopeptide repeat, HOP3	1	2

AT2G41100	calmodulin-like 12, CML12	2	2
AT3G22380	time for coffee, TIC	2	2
AT3G55770	WLIM2B	1	2
AT1G60490	vacuolar protein sorting 34, VPS34	2	2
AT3G12780	phosphoglycerate kinase protein 1, PGKP1	1	2

Abschließend ist zu sagen, dass es möglich war Proteine zu identifizieren die nicht in den CFP Kontrollen aufgetaucht sind und PPL1 und PPL2 nahezu keine überlappenden möglichen Interaktoren zeigen. Es sind jedoch noch weitere Optimierungen notwendig um aussagekräftige Daten zu erhalten.

3.5 Phänotypische Untersuchung von *ppl1*, *ppl2* und *ppl1ppl2*

In dieser Arbeit wurden neben Datenbank-Suchen zur Genregulation auch biochemische Methoden zur Aufklärung der Funktion durchgeführt. Zusammenfassend konnte zum Beispiel für PPL1 gezeigt werden, dass das Gen am stärksten in den Petalen der Blütenentwicklungsphase 15 exprimiert ist, dass das Protein ein MAP Kinase Substrat ist und mit Histon 3 interagieren kann. Um einen weiteren Punkt zur Verknüpfung der bekannten Informationen hinzuzufügen, wurde eine phänotypische Untersuchung von ppl1, ppl2 und ppl1ppl2 Mutanten durchgeführt (2.2.4.6, Anhang 8). Da die ppl1 SALK T-DNA Linie kein reduzierter Transkriptlevel zeigte, wurde mittels CRISPR Cas9 Verfahren (2.2.4.4) eine ppl1 Linie generiert. Nach Sequenzierung zeigte, dass die ppl1 Linie ein stark verkürztes Translationsprodukt von 9 Aminosäuren durch ein frühzeitiges Stop-Codon generiert. Dies wird durch eine Nukleotid-Insertion nach bp 20 durch die Verschiebung des Leserasters hervorgerufen (Anhang 8 C). Bei der phänotypischen Untersuchung konnten keine optisch sichtbaren Unterschiede bei der Keimung, Blattbildung und Infloreszenzbildung unter Langoder Kurztag Bedingungen beobachtet werden. Unter Langtag-Bedingungen zeigten sich jedoch für ppl1 Pflanzen vergrößerte Blütenstände im Vergleich zu Col-0 Pflanzen (Abbildung 24 A). Zur analytischen Auswertung dieser Beobachtung wurden Blüten (Entwicklungsstufe 14) der vier untersuchten Linien geerntet und die Petalen separiert (Alvarez-Buylla, Benítez et al. 2010). Mit Hilfe der Vermessung der Petalen-Flächen konnte gezeigt werden, dass Pflanzen der ppl1 Linie im Vergleich zu Col-0 unter Langtag Bedingungen Blüten mit vergrößerten Petalen aufweisen (Abbildung 24 B).

Im Vergleich dazu konnte sowohl für *ppl2* Blüten als auch für *ppl1ppl2* Blüten unter Langtag Bedingungen keine Unterschiede zu Col-0 detektiert werden. Neben der Fläche wurden auch die Länge und Breite der Petalen gemessen. Dies diente der Untersuchung ob den vergrößerten Flächen der *ppl1* Petalen ein verstärktes Längen- oder Breitenwachstum zur Grunde liegt.



<u>Abbildung 24 Darstellung der intakten Blüten sowie Fläche, Breite und Länge von Petalen der Blüten von Col-</u> <u>0, *ppl1*, *ppl2* und *ppl1ppl2*. Die Anzucht der Pflanzen bis zur Blüte erfolgte einerseits in 3 unabhängigen Experimenten unter Langtag Bedingungen (**A**, **B**) und in einem Experiment unter Kurztag Bedingungen (**A**, **C**). Die intakten Blüten wurden fotografiert (**A**). (**B**, **C**) Die Petale wurden von den weiteren Bestandteilen der Blüten separiert und mit Hilfe von ImageJ analysiert. (**B**) Zur statistischen Auswertung wurde eine One-way ANOVA mit Dunn's Post Test durchgeführt. n \geq 50 Petale (je 4 Pflanzen, 1-2 Blüten pro Pflanze) (**C**) n \geq 3 (je 1-2 Pflanze, 1-2 Blüten pro Pflanze).</u>

Anhand der Daten konnte jedoch gezeigt werden, dass die *ppl1* Petalen unter Langtag einheitlich länger und breiter waren (Abbildung 24 B). Zur weiteren Einordnung dieses Effektes wurden ebenfalls Blüten der ÜE 5-6 *HA-PPL1* Überexpressionslinie untersucht. In

diesem einzelnen Experiment unter Langtag Bedingungen konnten ebenfalls vergrößerte Petale gemessen werden (Anhang 11). Dies gibt möglicherweise einen Hinweis darauf, dass eine generelle Misregulation zur Ausprägung dieses Phänotyps führt.

Aus Zeitgründen konnte die Anzucht bis zur Blüte der vier Linien nur einmal unter Kurztag Bedingungen erfolgen. Die *ppl1* Blüten zeigten einen vergleichbaren Phänotyp wie unter Langtag Bedingungen. Im Gegensatz zu den Langtag Bedingungen konnten hingegen für *ppl2* und *ppl1ppl2* kleinere Blütenstände im Vergleich zu Col-0 unter Kurztag Bedingungen beobachtet werden (Abbildung 24 A). Diese Beobachtungen werden durch die Bestimmung von Fläche, Länge und Breite der Petalen unterstützt, konnten jedoch aufgrund der einmaligen Durchführung nicht statistisch abgesichert werden (Abbildung 24 C). Dieses spezifische Verhalten gibt einen Hinweis darauf, dass vermutlich beide Proteine in ähnlichen regulatorischen Netzwerken aber unter verschiedenen Bedingungen vertreten sind.

Zur weiteren Analyse der Ursache der vergrößerten ppl1 Petalen wurden einzelne Petale der vier Pflanzenlinien entfärbt und anschließend licht-mikroskopisch untersucht. Durch die unregelmäßige Form wurde in dieser Arbeit eine indirekte Bestimmung der Größe der Zellen gewählt. Hierbei wird die Anzahl der Zellen pro definierte Fläche ausgezählt und geben damit einen reziproken Wert der Zellgröße an. Dadurch kann über die Bestimmung der Zellanzahl Aussagen über die Größe der Zellen getroffen werden (Cheng et al., 2014). Dafür wurden Petale der Pflanzen aus einem Langtag und einem Kurztag Versuch verwendet. Es war deutlich zu beobachten, dass die Zellen der ppl1 Petalen sowohl unter Kurztag als auch unter Langtag Bedingungen größer als Col-0 Zellen waren (Abbildung 25). Wie auch schon bei der Größenbestimmung der Blütenblätter konnte für ppl2 und ppl1ppl2 ein Unterschied zwischen der Anzucht unter Lang- und Kurztag Bedingungen beobachtet werden. Unter Langtag Bedingungen zeigten beide Genotypen keine Unterschiede zu den Col-0 Pflanzen beziehungsweise den ausgezählten Zellzahlen (Abbildung 25 A). Unter Kurztag Bedingungen konnten deutlich mehr Zellen pro Fläche gezählt werden (Abbildung 25 B). Diese Werte stimmen mit den optischen Beobachtungen der intakten Blütenstände überein (Abbildung 24 A).



<u>Abbildung 25 Darstellung der Zellzahl pro 0,1 mm² Petalenfläche für Col-0, *ppl1, ppl2* und *ppl1ppl2*. Die Anzucht der Pflanzen bis zur Blüte erfolgte in einem unabhängigen Experiment unter Langtag und Kurztag Bedingungen. Zur Auszählung der Zellzahl wurden die separierten Petale entfärbt und lichtmikroskopisch untersucht. Die Zählung erfolgte manuell in einem standardisierten Quadrat von 0,1 mm x 0,1 mm in ImageJ. Zur statistischen Auswertung wurde eine One-way ANOVA mit Dunn's Post Test durchgeführt. Langtag n = 9, Kurztag n=6 (jeweils 2 Pflanzen, je 1 Blüte)</u>

In phänotypische Untersuchungen von Col-0, *ppl1*, *ppl2*, *ppl1ppl2* und PPL1 ÜE 5-6 Pflanzen konnten vergrößerte Petalen bei *ppl1* und ÜE 5-6 beobachtet werden, die durch ein verstärktes Zellwachstum hervorgerufen werden. Im Gegensatz dazu konnten für *ppl2* und *ppl1ppl2* unter Kurztag Bedingungen in einem ersten Experiment Blüten mit kleineren Petalen, hervorgerufen durch vermindertes Zellwachstum, beobachtet werden. Dieser Phänotyp scheint spezifisch für Kurztag Bedingungen zu sein, da unter Langtag Bedingungen keine Unterschiede zu Col-0 Blüten auftraten.

Diskussion

4 Diskussion

4.1 Welche Funktion besitzen PPL1 und PPL2 in der Blütenentwicklung?

Die phänotypischen Untersuchungen in dieser Arbeit von ppl1, ppl2 und ppl1ppl2 sowie PPL1 ÜE 5-6 konnten einen möglichen Einfluss sowohl des PPL1 als auch des PPL2 Proteins auf die Entwicklung von Petalen in A. thaliana zeigen. Die Differenzierung und das Wachstum von Petalen wurden bereits früh als Beispiel für die Organentwicklung in Pflanzen untersucht. Hierbei wurde deutlich, dass in den verschiedenen Entwicklungsphasen der Petalen auch unterschiedliche Faktoren eine Rolle spielen. In der Blütenentwicklungs-Phase 7 und 8 läuft eine schnelle Zellteilung ab, deren Plateau in den Phasen 9 bis 11 erreicht ist und in Phase 12 ausklingt. Beginnend von der Phase 9 bis hin zur Phase 13 erfolgt daraufhin das Zellwachstum (Irish, 2008). Während dieser Phasen und bei dem Übergang von der einen zur anderen Phase wird ein präzise reguliertes Netzwerk an Proteinen verwendet. Ein Beispiel ist die E3 Ubquitin Ligase BB (BIG BROTHER) welche durch gezielten Abbau von funktionalen Proteinen der frühen Phasen dafür verantwortlich ist, den Übergang der Zellteilung zum Zellwachstum zu gewährleisten (Disch et al., 2006). Zur Einordnung der Funktion von PPL1 zeigt die Analyse der Expression in unterschiedlichen Phasen der Blütenentwicklung, dass PPL1 erst nach der Phase 12 messbare exprimiert wird (Anhang 2, Anhang 8). Es ist daher anzunehmen, dass der Einfluss von PPL1 im Bereich des Zellwachstums und nicht der Zellteilung bei Petalen liegt. Dies wird auch durch die in ersten phänotypischen Untersuchungen generierten Daten unterstützt, da in der ppl1 Linie weniger Zellen pro definierter Fläche, also größere Zellen, beobachtet werden konnten (3.5, Abbildung 25). Eine Literaturrecherche hat ergeben, dass die bpe-1 Linie und die opr3 Linie sehr ähnliche Phänotypen, mit vergrößerten Petalen, aufweisen. Das Biosynthese Enzym OPR3 (12-OXOPHYTODIENOIC ACID REDUCTASE3) der Jasmonat-Biosynthese und BPEp, durch JA regulierte Expression, zeigen beide hohe Expressionslevel in Blüten der Entwicklungsphase 13 und 14 (Brioudes et al., 2009). Die präzise temporale Expression stimmt mit dem Expressionsmuster von PPL1 überein (Anhang 2, Anhang 8). Dieser Hinweis auf eine Funktion in der hormonellen Regulation durch JA könnte für PPL1 durch die Ergebnisse der Mikroarray Analysen in der Überexpressionslinie 7-5 unterstützt werden, da veränderte Genexpressionsmuster von Genen der JA Synthese detektiert werden konnten (Abbildung 13). Da die vergrößerten Petalen scheinbar auch in der Überexpressionslinie 5-6 auftreten, könnte der phänotypische Effekt nicht allein durch einen Verlust des PPL1 Proteins

sondern durch eine generelle Misregulation hevorgerufen sein (Anhang 11). Der Vergleich der experimentellen PPL1-Daten mit den Publikationen über Mutanten mit ähnlichem Phänotyp legt nahe, dass PPL1 einen regulatorischen Einfluss auf das Zellwachstum von Petalen in den späten Phasen der Entwicklung hat und dieser eventuell ebenfalls der Regulation durch JA unterliegt. Um diese Hypothese weiter zu untersuchen, müssten die PPL1-Ergebnisse verifiziert und eine Analyse des Transkriptoms in Blüten unterschiedlicher Phasen (Phase 10, 12, 14 und 16) der PPL1 *knock-out* Linie durchgeführt werden. Weiterhin könnte die äußerliche Anwendung von JA auf Knospen der *ppl1* und 5-6 Linie zeigen, ob der WT-Phänotyp, wie bei *bpe-1* und *opr3* beschrieben, wieder hergestellt werden kann (Brioudes et al., 2009).

Laut den Daten des Arabidopsis eFP Browsers zeigt zumindest MPK3 (At3g45640) eine geringe relative Expression in Petalen der Blütenentwicklungsphase 15. Es ist daher möglich, dass die Aktivierung einer MAP Kinase Kaskade die Phosphorylierung von PPL1 initiiert, was zur Erkennung von post-translationalen Modifikationen wie Methylierungen an Histonen führt und die Limitierung des Zellwachstums auslöst.

Sowohl die proteinbiochemischen Analysen als auch die phänotypischen Untersuchungen zeigten, dass PPL2 im Vergleich zu PPL1 bei gleicher oder unterschiedlicher Funktion einer unterschiedlichen Regulation unterliegt. Die im Vergleich zu Col-0 größeren Petalen der *ppl1* Linie konnten sowohl unter Langtag als auch unter Kurztag Bedingungen beobachtet werden. Daraus lässt sich ableiten, dass die Regulation der PPL1 Funktion unabhängig von der Tageslänge erfolgt. Im Gegensatz dazu zeigten die Linien *ppl2* und *ppl1ppl2* im Vergleich zu Col-0 einen nur bei Kurztag Bedingungen auftretenden Phänotyp von kleineren Petalen. Da das Kurztag-Experiment aus Zeitgründen nur einmal durchgeführt werden konnte, sind weitere Verifizierungen notwendig. PPL1 und PPL2 scheinen demnach unterschiedlich durch Umweltbedingungen beeinflusst zu werden. Der identische Phänotyp von *ppl1ppl2* und *ppl2* könnte ein Hinweis auf eine dominante Funktion von PPL2 sein. Es besteht weiterhin die Möglichkeit, dass der Phänotyp von *ppl1* auf sogenannten *off-targets* in der CRISPR-Cas9 Methode basiert. Um dies auszuschließen sollte mindestens eine weitere unabhängige Linie identifiziert und beide Linien mit Col-0 rückgekreuzt und genetisch komplementiert werden.

In *A. thaliana* wird die Blütenbildung sowohl unter Langtag als auch unter Kurztag Bedingungen initiiert. Unter Langtag wird der Beginn der Blütenbildung von der Verlagerung des FT Proteins aus Blättern in das apikale Meristem initiiert (1.4.1). Die Blütenentwicklung unter Kurztag Bedingungen hingegen scheint von dem Phytohormon Gibberellin abhängig zu sein (Mutasa-Göttgens and Hedden, 2009). Dabei wirkt Gibberellin nicht über den FT

Signalweg sondern induziert direkt über DELLA Proteine die Expression von LFY und SOC1 (Bao et al., 2019). Anhand dieser Regulationsmechanismen ist es möglich, dass der positive (PPL2) oder negative (PPL1) Einfluss auf das Zellwachstum in Petalen aus sich verändernden Signalen während Kurztag oder Langtag Bedingungen resultiert. Ein Beispiel für die unterschiedliche Regulation zwischen Kurztag und Langtag ist NFL (NO FLOWERING IN SD), da *nfl* unter Langtag Bedingungen keine Unterschiede zu den Col-0 Blüten zeigt, jedoch unter Kurztag Bedingungen nicht in der Lage ist Blüten auszubilden (Sharma et al., 2016). In Bezug auf die Daten dieser Arbeit scheint PPL2 eine regulierende Wirkung auf das Wachstum aller Blütenorgane zu besitzen, da nicht nur die Petalen sondern die Blüten als Ganzes verkleinert waren (Abbildung 25 B, D). Dies unterstützt die Hypothese, dass es sich bei der Regulation von PPL2 um einen allgemeineren Einfluss handelt da PPL2 auch ein weniger spezifisches Expressionsmuster zeigt.

Eine Funktion von PPL1 und PPL2 in der Organentwicklung in Blüten korreliert mit dem Vorhandensein von orthologen Genen ausschließlich in blühenden Pflanzen (Abbildung 4). Die Konservierung unterstreicht die wichtige Rolle dieser Proteine bei der Entwicklung der Reproduktionsorgane (Anhang 3). Inwieweit die Funktion als MAP Kinase Substrate dabei eine Rolle spielt, kann mit den gegebenen Daten nicht vorhergesagt werden. Es scheint jedoch in der Kombination mit der Interaktion mit Histonen eine unbekannte und obligatorische Regulationsebene in der Blütenentwicklung zu ermöglichen.

4.2 PPL1 und PPL2 sind MAP Kinase Substrate

Die Identifizierung von MAP Kinase Substraten mittels Screening Verfahren mit hohem Durchsatz und meist artifiziellen Interaktionen (Yeast-Two Hybrid) oder synthetischen Peptiden beziehungsweise Protein-Mikroarray bildet nur die erste Stufe der Validierung eines Proteins als physiologisches MAP Kinase Substrat (Mizoguchi et al., 1998; Feilner et al., 2005). PPL1 wurde in einem Protein-Mikroarray Screen identifiziert und aufgrund seiner putativen PHD-Domäne für weitere Untersuchungen ausgewählt (Feilner et al., 2005). Für PPL1 und dem homologen Protein PPL2 sollte zunächst die Interaktion mit MAP Kinasen bestätigt und ihre Funktion als MAP Kinase Substrate in *A. thaliana* untersucht werden.

Für beide Proteine konnte die Lokalisation im Zellkern in *A. thaliana* Protoplasten und *N. benthamiana* Blättern gezeigt werden (Abbildung 5, Anhang 4). Dabei konnten für PPL1, seltener für PPL2, ebenfalls Signale im Zytoplasma beobachtet werden. Eine Erklärung für diese Abweichung zwischen den homologen Proteinen kann die unterschiedliche Expression beider Gene sein. Da *PPL1* sehr spezifisch während der Blütenentwicklung exprimiert wird

und keine detektierbare Expression in Blättern gezeigt werden konnte, stellen sowohl die Mesophyll-Protoplasten als auch die intakten *N. benthamiana* Blätter artifizielle Systeme dar (Anhang 4, Abbildung 13). Es ist daher möglich, dass die Lokalisation von PPL1 in Zellen von Petalen auf den Zellkern begrenzt ist. Weiterhin kann ebenso die 35S-Promoter gesteuerte Überexpression zu einer zusätzlichen Lokalisation im Zytoplasma führen. Übereinstimmend mit der Lokalisation konnten für PPL2 im Zellkern und für PPL1 im Zellkern und Zytoplasma die Interaktion mit den PAMP-induzierten Kinasen MPK3, MPK6, MPK4 und MPK11 über BIFC Analysen gezeigt werden (Abbildung 6) (Missal, 2014).

Sowohl für PPL1 als auch für PPL2 konnten mit Hilfe von *in silico* Analysen vorhergesagt werden, dass es sich um Proteine handelt die eine PHD-ähnliche Domäne, zwei MAP Kinase Phosphorylierungsstellen außerhalb dieser Domäne und einen hochkonservierten C-Terminus besitzen. Davon ausgehend, und in Kombination mit den BIFC Daten, lag die Hypothese nahe, dass es sich um MAP Kinase Substrate handelt. Zur Einordnung dieser Hypothese wurden proteinbiochemische Methoden zur Analyse der MAP Kinase Phosphorylierung angewandt.

Für eine übersichtliche Eingruppierung der großen Zahl an möglichen und bestätigten MAP Kinase Substraten wurden fünf Kriterien für physiologische MAP Kinase Substrate formuliert (Zhang et al., 2018). Hierbei handelt es sich um [1] effiziente in vitro Phosphorylierung, [2] in vivo Phosphorylierung als Antwort auf ein bekanntes Signal zur Aktivierung der MAP Kinase Kaskaden, [3] in vivo Phosphorylierung derselben Phosphorylierungsstellen wie in den in vitro Analysen, [4] keine Phosphorylierung durch inaktivierte Kinase Mutanten und [5] die Demonstration der Funktion dieser Phosphorylierung auch mit Hilfe von Phospho-Null Mutanten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte sowohl für PPL1 als auch für PPL2 eine [1] in vitro Phosphorylierung durch MPK3, MPK4 und MPK6 gezeigt werden. Basierend auf dem Vergleich mit dem MAP Kinase Substrat MBP wurde postuliert, dass MPK3 die bevorzugte MAP Kinase für die PPL-Proteine ist (Abbildung 7). Da bei den Phospho-Null Mutanten PPL1^{AA} und PPL2^{AA} nahezu keine *in vitro* Phosphorylierung detektiert werden konnte, scheint die Phosphorylierung spezifisch für eine oder beide prolin-gerichteten MAP Kinase Phosphorylierungsstellen zu sein (Anhang 6 B). Zur Bestätigung dieser Daten ist es jedoch notwendig, das Experiment mit den Phospho-Null Mutanten zu wiederholen beziehungsweise Einzel-Phospho-Null Mutanten zu verwenden und dabei könnten als weitere Kontrolle die inaktiven Varianten von MPK3, MPK4 und MPK6 dienen.

Neben der *in vitro* Phosphorylierung können mit Hilfe der *in vivo* Phosphorylierung unter physiologischen Bedingungen aussagekräftigere Informationen ermittelt werden. Innerhalb

dieser Arbeit konnte die [2] in vivo Phosphorylierung von PPL1 und PPL2 durch MPK3 und MPK6 mittels phostagTM SDS-PAGE Analysen gezeigt werden. In Anbetracht der phänotypischen Analysen und Expressionsdaten erscheint es möglich, dass die Aktivierung der verantwortlichen MAP Kinase Kaskade durch die flg22 Behandlung möglich ist, jedoch keinen Hinweis auf eine Funktion in der Pathogen-Abwehr darstellt (3.5, Anhang 8). Vor allem die geringe Phosphorylierungs-Verschiebung von PPL1 im Vergleich zu PPL2 könnte auf eine Überproduktion in den falschen Zelltypen zurückzuführen sein (Abbildung 8, Abbildung 9). Über die Verwendung der Phospho-Null Mutanten PPL1^{AA} und PPL2^{AA} in den in vivo Phosphorylierungs Analysen wird sichergestellt, dass die jeweilige [3] Phosphorylierung an diesen Aminosäuren stattfand (Abbildung 8). In dieser Arbeit wurden [4] keine Untersuchungen mit inaktiven Mutanten der direkt übergeordneten Kinasen MPK3, MPK4 und MPK6 durchgeführt. Es wurde jedoch bei den in vivo Phosphorylierungs-Versuchen die inaktive PcMKK5^{KR} verwendet und in diesem Fall auch keine Phosphorylierung detektiert. Sodass auch dieser Punkt teilweise gezeigt werden konnte. Die [5] Funktion der Phosphorylierung von PPL1 und PPL2 konnte mit den verwendeten Methoden nicht abschließend geklärt werden. Es ist möglich, dass die Phosphorylierung einen Effekt auf die Stabilität des Proteins hat. Aufgrund der ähnlichen Daten der Phospho-Null Mutanten im Vergleich zu den WT-Proteinen scheint es möglicherweise eine indirekte Regulation zu sein (Abbildung 11 B). Eine mögliche Hypothese wäre, dass eine E3-Ubquitin Ligase über Ubiquitinierung unter Bedingungen ohne MAP Kinase Aktivierung PPL2 dem Abbau über das 26S Proteasom zuführt. Bei der Behandlung mit flg22 werden die MAP Kinasen MPK3/MPK6 aktiviert und phosphorylieren PPL2. Zusätzlich dazu wird die Aktivität der E3 Ligase durch post-translationale Modifikationen vermindert und gleichzeitig die Aktivität eines weiteren Proteins, welches PPL2 dem Abbau zuführt, erhöht. Die Phosphorylierung von PPL2 könnte die Erkennung durch das zweite Protein verhindern und die Proteinstabilität dadurch erhöhen. Bei der Verwendung der Phospho-Null Mutante (PPL2^{AA}) kann diese Phosphorylierung nicht mehr stattfinden. Wenn die Phosphorylierung allein für die Regulation des Abbaus verantwortlich wäre, würde der Proteinlevel auch nach flg22 Behandlung gleich bleiben. Wenn jedoch die Behandlung mit flg22 einen aktivierenden Einfluss auf ein zweites Protein zeigt, könnte der dadurch verstärkte Abbau, welcher nicht durch Phosphorylierung verhindert werden kann, zu den verringerten Proteinleveln führen (Abbildung 26). Bei der Verwendung einer Phospho-Mimikry Mutante (PPL2^{DD}) würde die Proteinstabilität eventuell auch ohne flg22 Behandlung erhöht werden, sofern das zuständige Protein dadurch beeinflusst wird. Eine flg22 Behandlung würde an dem weiteren Status des Proteins nichts ändern und es sollte sich wie das phosphorylierte WT-Protein verhalten.



<u>Abbildung 26 Hypothese zum Abbau über das 26S Proteasom von PPL2.</u> Dargestellt ist eine Hypothese über die Abbau-Rate von PPL2 und PPL2^{AA} ohne flg22 Behandlung und von PPL2 und PPL2^{AA} nach flg22 Behandlung. Dabei könnte der Abbau möglicherweise von zwei unbekannten Proteinen abhängig sein.

Die Ergebnisse für PPL1 sind hingegen so variabel, dass eine klare Regulation mit diesen Daten nicht gezeigt werden konnte (Abbildung 11). Es sind daher Untersuchungen der Proteinstabilität in Blütenzellen sinnvoll zum Beispiel unter Verwendung des Zell-freien Abbau-Assays mit Infloreszenz- oder Blütenmaterial. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von Komplementations-Linien mit PPL2 oder PPL1 unter endogenem Promoter, dabei könnten sowohl der nicht gestresste als auch der gestresste Zustand untersucht werden. Dadurch wäre es möglich zu verfolgen, ob die Proteinstabilität sich in diesen Zellen im Vergleich zu Blattzellen unterscheidet. Beide Varianten wurden bereits erfolgreich bei der Analyse von SPOROCYTELESS als MPK3 und MPK6 Substrat in der Antheren Entwicklung angewandt (Zhao et al., 2017). Zusammenfassend können MAP Kinase Phosphorylierungen einen Einfluss auf die Proteinstabilität von PPL1 und PPL2 haben, vermutlich stellen sie jedoch nur einen Teil der Regulation dar.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PPL1 und PPL2 drei der fünf Kriterien für physiologische MAP Kinase Substrate erfüllen und somit die Einordnung als Substrate vertreten werden kann. Es ist jedoch anzumerken, dass der Auslöser für die Aktivierung der zuständigen MAP Kinasen vermutlich kein PAMP/DAMP darstellt. Bei PPL1 zum Beispiel sollten endogene Liganden im Zusammenhang mit der Blütenentwicklung in Betracht gezogen werden. Für PPL2 konnte ebenfalls ein Einfluss auf die Blütenentwicklung gezeigt werden, wobei sich jedoch die Regulation der Funktion zwischen PPL1 und PPL2 zu unterscheiden scheint (Abbildung 25, 3.5). Zur weiteren Aufklärung der Funktion scheint eine Identifizierung von weiteren Interaktionspartnern unabdingbar, welche aufgrund der

vorhandenen Löslichkeitsprobleme jedoch mit den etablierten Methoden nur schwer möglich war.

4.3 Eine Bewertung der *proximity-labeling* Methode in A. *thaliana* Protoplasten

Mit der Etablierung der proximity-labeling Methode mittels Biotin Ligase können Probleme der Löslichkeit von Zielproteinen und Interaktoren umgangen und eine in vivo Markierung durchgeführt werden. Um weitere Analysen zu PPL1/PPL2 Interaktionspartnern durchführen zu können, sollte diese Methode für das A. thaliana Protoplasten System optimiert werden. Zur Durchführung von Experimenten im Pflanzensystem scheinen sowohl die TurboID Ligase als auch die verkürzte Version (miniTurboID) aufgrund ihrer höheren Aktivität bei niedrigeren Temperaturen die Enzyme der Wahl zu sein. Das konnte in dieser Arbeit für das verwendete A. thaliana Protoplasten-System als auch in der Literatur in stabilen A. thaliana Linien und mit infiltriertem N. benthamiana Material gezeigt werden (Mair et al., 2019). Zusätzlich dazu war es möglich neben der geeignetsten Biotin Ligase (TurboID) auch die entsprechend optimierten Biotin-Konzentrationen und Zeiträume der Biotin-Behandlung zu etablieren (3.4.1, Abbildung 16) und diese korreliern ebenfalls mit Ergebnissen der Literatur (Mair et al., 2019). Mit Hilfe einer Kernpräparation konnte die vorherrschende Lokalisation der verwendeten Konstrukte überprüft werden, ohne diese durch das Einführen einer Fluoreszenz-Markierung weiter zu vergrößern (3.4.3, Abbildung 19). Durch eine zusätzliche Markierung könnten Probleme der korrekten Faltung und der Interaktion der Zielproteine mit Interaktoren auftreten, die der Spezifität der Methode entscheidend entgegen wirken würden. Während der Optimierung der massenspektrometrischen Messungen konnten synthetische Kontaminationen auf die verwendeten Streptavidin beads zurückverfolgt werden, welche möglicherweise durch den on bead Verdau generiert worden sind. Der Versuch die angereicherten Proteine mittels Elution von den beads zu entfernen und in einem in-gel Verdau zu fragmentieren ist im Zuge dieser Arbeit nicht gelungen (Anhang 9). Dies kann vermutlich durch die starke Interaktion zwischen Biotin und den Streptavidin der beads erklärt werden, da auch schon bei den Analysen der Aufarbeitung und Anreicherung mittels Western Blot Probleme im Bereich der Elution aufgetreten sind (Anhang 10). Weiterhin eluieren reale Interaktoren, meist mit mehrfachen Biotinylierungen, mit einer schlechteren Effizienz. Dadurch könnten gerade diese Proteine im Zuge der Methode nicht identifiziert werden. Da jedoch bei der geringen Konzentration an Proteinen aus dem limitierten Material der Protoplasten die Kontaminationen die eigentlichen Signale überlagert haben, müssten Alternativen dafür gefunden werden. Einerseits wäre die Verwendung einer niedrigeren Konzentration der Streptavidin *beads* möglich. Dabei wären Versuche zur Optimierung der ausreichenden Bindungsfähigkeit zu der Verringerung der Kontaminations-Signale notwendig. Andererseits besteht ebenfalls die Möglichkeit die Bindung zwischen Biotin und Streptavidin zu umgehen und stattdessen auf die Verwendung von Biotin-Antikörper zu setzen (Udeshi et al., 2017).

Neben diesen technischen Optimierungen ist es zusätzlich möglich, den kompletten Versuchs-Aufbau soweit anzupassen, dass möglichst wenig Falsch-Positive Ergebnisse generiert werden. Neben der Optimierung der Biotin-Konzentration, des Behandlungszeitraumes und der Aufarbeitung wurde eine weitere Kontrolle in Form des inerten CFP-Proteins mitgeführt. Es ist bekannt, dass CFP sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma zu finden ist (Anhang 4 C). Es konnte jedoch im Zuge dieser Arbeit gezeigt werden, dass die CFP-TurboID Fusion nicht in dem Zellkern lokalisiert ist (Abbildung 19). Dies könnte möglicherweise auf die Verdopplung der Proteingröße zurückzuführen sein. Aus diesem Grund sollten für weitere Untersuchungen Kontrollen mit gleicher Lokalisation wie den Zielproteinen verwendet werden, da sich die potenziellen Interaktoren zwischen den Kompartimenten (Zellkern oder Zytoplasma) unterscheiden. Trotzdem wurden die generierten Datensätze in dieser Arbeit um alle in der CFP-Kontrolle aufgetauchten Proteine korrigiert. Bei dieser Methode könnten jedoch Interaktoren mit geringer Abundanz aussortiert oder Proteine identifiziert werden, die aufgrund von unspezifischer Bindung der beads-Matrix oder an biotinylierten Proteinen mit auf gereinigt wurden. Weiterhin ist die eindeutige Identifizierung bei der Verwendung des onbead Verdaus der über Streptavidin beads angereicherten Proteine über den Biotin-Anhang nicht möglich, da alle mit Biotin markierten Peptide an den beads verbleiben. Bei dem in gel-Verdau könnten diese Peptide theoretisch vermessen werden, sollte die Elution dieser Proteine von den beads effizienter möglich sein. Da auch dies, wie bereits beschrieben, ein Problem darstellt, sind weitere Methoden der eindeutigen Zuordnung von Peptiden von Vorteil.

Eine Methode um vor allem die biotinylierten Peptide zu messen ist die DiDBiT (*direct detection of biotin-containing tags*). Hierbei werden die Probenextrakte zuerst verdaut und danach die Biotin-Peptide mittels Streptavidin *beads* angereichert. Während des Waschprotokolls werden alle nicht biotinylierten Peptide entfernt und nach der Peptid-Elution können die biotinylierten Peptide mittels MS/MS gemessen werden (Schiapparelli et al., 2014). Der Vorteil dieser Methode ist die direkte und ausschließliche Identifizierung von Peptiden mit einem Biotin-Anhang. Dadurch ist es auch möglich, Proteine zu identifizieren die eventuell durch eine schlechte Zugänglichkeit des Biotin-Anhangs, durch Komplex-

Bildung oder veränderter Faltung über die herkömmlichen Methoden nicht an die *beads* binden würden und somit nicht identifiziert werden könnten (Schiapparelli et al., 2014).

Ein weiteres Problem stellt die eigentlich genutzte Unspezifität der Biotin-Ligase dar. Auch mit Kontrollen im selben Kompartiment, zum Beispiel ein CFP-TurboID Konstrukt mit NLS (nuclear localisation signal), könnten reale Interaktionspartner mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit auch in der Kontrolle auftauchen. Bei einer unbewerteten Aussortierung der Ergebnisse würden diese Proteine ebenfalls herausfallen. Zur Differenzierung zwischen realen Interaktionspartnern und zufälligen Ereignissen bietet sich eine Markierungsmethode wie zum Beispiel das TMTTM (tandem mass tag) System (ThermoFisher Scientific) an. Die Markierung erfolgt dabei mit unterschiedlichen isobaren TMT Reagenzien welche sich in ihrer Isotopen Verwendung unterscheiden. Diese Reagenzien bilden kovalente Bindungen mit primären Aminen (Lysinen und N-Termini) aus und können mittels MS/MS Analysen voneinander unterschieden werden. Zu vergleichende Proben werden mit unterschiedlichen TMT Reagenzien behandelt und anschließend zur Messung miteinander vereinigt. Anhand der Verhältnisse der einzelnen Anhänge zueinander können Aussagen über die Abundanz der einzelnen Peptide in den verwendeten Proben getroffen werden. Diese Methode stellt neben dem Mitführen von unspezifischen Kontrollen eine Möglichkeit dar, bei der das Vorhandensein von Proteinen quantifiziert und damit präziser zwischen den Proben unterschieden werden kann.

Obwohl die Optimierung der proximity-labeling Methode in dieser Arbeit nicht abgeschlossen werden konnte, wurden die generierten Daten zur Kontrolle der Methode ausgewertet. Anhand dieser Daten konnten vier mögliche Kandidaten für die stets als Hintergrund, mittels strep-POD, detektierbaren Proteine im Bereich von 30 kDa und 80 kDa identifiziert werden (3.4.6). Diese vier Proteine gehören zu 12 Genprodukten aus A. thaliana in denen die biotin/lipoyl attachment domain zu finden ist. Diese Domäne besitzt das Motiv (Ala/Val)-Met-Lys-(Met/Leu) welches das enthaltene Lysin als biotinylierte Aminosäure definiert und ist in Untereinheiten und deren Isoformen einer Acetyl-CoA Carboxylase zu finden (Shivaiah, Ding et al. 2020). Die Bestimmung der bereits biotinyliert vorliegenden Proteine zeigt die generelle Fähigkeit der etablierten Methode biotinylierte Proteine anzureichern und mittels zu identifizieren. Leider war die Detektion von Peptiden möglicher MS/MS Interaktionspartner in PPL1 Proben nicht möglich. Eine Erklärung für die unzureichende Biotinylierung von potenziellen Interaktoren durch PPL1-TurboID liegt vermutlich in der falschen spatiotemporalen Umgebung in der reale Interaktionspartner nicht exprimiert werden, wie es auch für PPL1 nicht der Fall wäre. Im Gegensatz dazu konnten in PPL2 Proben vier potenzielle Interaktionspartner identifiziert werden. Bei diesen Proteinen handelt es sich um MTHFR2, VAB2, HSC-70-1 und ein GYF-Domänen Protein. Bei der MTHFR2 handelt es sich um ein Enzym welches eine Reduktion in der Methionin Synthese katalysiert und sich damit in den Kohlenstoff-Metabolismus einordnen lässt (Roje et al., 1999). Das *VAB2* Gen kodiert für die ATP Synthase Einheit B1 der Vakuole (Ma et al., 2012). Über das GYF-Domänen Protein ist wenig bekannt. Die enthaltene GYF-Domäne stellt eine Adaptor Domäne dar, welche über die Erkennung von prolin-reichen Sequenzen Proteininteraktionen vermittelt (Kofler and Freund, 2006). Eine Untergruppe der HSP70s spielt eine Rolle in der Entwicklung und der Reaktion auf abiotischen Stress. Dabei zeigen *knock-out* Mutanten höherer Ordnung Änderungen der Genexpression von Genen der Blütenentwicklung sowie der Cytokinin, Brassinosteroid und Abscisinsäure Signalwege (Leng et al., 2017). Sowohl innerhalb dieser kleinen Auswahl als auch innerhalb der kompletten Liste der möglichen Interaktionspartner von PPL2 sind auf den ersten Blick wenige Gemeinsamkeiten zu erkennen.

Eine genaue Einordnung der Ergebnisse kann nicht erfolgen, da es sich lediglich um nicht reproduzierte Ergebnisse während der Optimierung handelt. Dennoch scheint es für PPL2 zu spezifischen Biotinylierungs-Ereignissen gekommen zu sein auch wenn die unvollständigen Daten die Identifizierung von echten Interaktionspartnern erschweren. Anhand der Ergebnisse besteht die Möglichkeit, dass die PHD-ähnliche Domäne von PPL2, und eventuell auch PPL1, in ihrer Funktion eher einer RING-Domäne gleicht. Dabei könnten die identifizierten Proteine Substrate darstellen, die mit der E3 Ubiquitin Ligase PPL2 interagieren um dem Proteinabbau zugeführt zu werden. Es ist jedoch genauso möglich, dass es sich hierbei um zufällig markierte Proteine im Zellkern handelt welche durch den Vergleich mit der CFP-Kontrolle aus dem Zytoplasma nicht heraus sortiert werden konnten. Zusätzlich dazu konnten keine Histone als Interaktionspartner identifiziert werden. Möglicherweise ist dies ein Detektionsproblem welches durch die Verwendung von mehr Ausgangsmaterial, bevorzugt von stabilen Linien, gelöst werden könnte. Die Interaktion der PPL-Proteine mit Histon3 könnte mit der Funktion einer RING-Domäne über den Abbau von Histonen oder gezielt eingeführten post-translationalen Modifikationen erklärt werden (3.3.4, Abbildung 15) (Bourbousse et al., 2012).

Um aussagekräftige Daten für die Auswertung zu erhalten, ist es erforderlich mindestens drei biologisch unabhängige Messungen durchzuführen. Hierfür sollten die bereits erwähnten Methoden zur eindeutigen Identifizierung von realen Interaktoren angewendet werden (DiDBiT und parallel TMT Markierung). Weiterhin wäre die Verwendung von stabilen

79

Linien mit induzierbarem Promoter sinnvoll, da die nachfolgenden Analysen dann in definierten Organen, zum Beispiel von Blüten der Phase 14 oder Phase 15 für PPL1, durchgeführt werden könnten. Damit könnte man die bisherigen Probleme verringern und mit höherer Wahrscheinlichkeit reale Interaktionspartner anreichern und identifizieren. Zur Bestätigung der Interaktoren sollte die Interaktion zwischen den jeweiligen Proteinen durch weitere Methoden wie zum Beispiel BIFC oder FRET (Förster-Resonanzenergietransfer) Analysen bestätigt werden.

Die Methode der *in vivo* Biotinylierung durch eine Biotin Ligase birgt ein enormes Potenzial zur Identifizierung von Signalwegen von den Rezeptoren über Signal Kaskaden bis hin zu Proteinkomplexen als Substrate. In dieser Arbeit konnten viele Optimierungen der Methode für die Anwendung im pflanzlichen System erarbeitet werden. Dabei war es möglich, die erfolgreiche Biotinylierung und Anreicherung dieser Proteine zu zeigen. Mit weiteren Optimierungen können die Probleme der Detektion oder auch der Elution biotinylierter Proteine verbessert werden um dann eine vielversprechende Methode zur Identifizierung von neuen, physiologischen Interaktionspartnern zu erhalten.

Zusammenfassung

5 Zusammenfassung

Im Zuge dieser Arbeit war es möglich zwei paraloge Proteine, PPL1 und PPL2, aus *A. thaliana* als MAP Kinase Substrate von MPK3 und MPK6 einzuordnen. Die Ergebnisse deuten auf eine mögliche bevorzugte Phosphorylierung durch die MPK3 hin. Durch die Phosphorylierung kann die Stabilität der Proteine beeinflusst werden, das scheint jedoch nicht die primäre Funktion der Phosphorylierung zu sein. Den Zusammenhang einer Funktion innerhalb der Pathogen-Abwehr konnte im Gegensatz zu Vor-Experimenten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Vielmehr zeigten phänotypische Untersuchungen eine spezifische Funktion in der Blütenentwicklung. Mit diesen Daten korreliert die Beobachtung, dass zu PPL1 und PPL2 homologe Proteine ausschließlich in Blütenpflanzen auftreten. Die Rolle dieser Proteine scheint eine spezifische Regulation innerhalb der Blütenentwicklung zu sein, möglicherweise zu unterschiedlichen Zeitpunkten oder Umweltbedingungen. Zusätzlich ist durch die Interaktion mit einem Histon Protein eine Verbindung zu epigenetischen Signalen möglich, was neue Möglichkeiten für Regulationsmechanismen aufzeigt.

Für weitere Analysen dieser konservierten Funktion ist die Identifizierung von noch unbekannten Interaktionspartnern essenziell. Aufgrund der eingeschränkten Möglichkeiten von konventionellen Methoden für PPL1 und PPL2 wurden eine *proximity-labeling* Methode, die mittels Biotinylierung von potenziellen Interaktoren durch die TurboID Biotin-Ligase arbeitet, im *A. thaliana* Protoplasten System etabliert. Dabei konnten wichtige Schritte der Probenaufarbeitung sowie der massenspektrometrischen Messung verbessert werden. Obwohl noch weitere Optimierungen notwendig sind, konnten erste potenzielle Interaktionsproteine für PPL2 identifiziert werden. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich unter physiologischen Bedingungen Interaktionspartner zu identifizieren und damit zum Beispiel ganze Signalwege zu analysieren.

6 Literaturverzeichnis

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215: 403–410.
- Alvarez-Buylla, E.R., Benítez, M., Corvera-Poiré, A., Chaos Cador, A., de Folter, S., Gamboa de Buen, A., Garay-Arroyo, A., García-Ponce, B., Jaimes-Miranda, F., Pérez-Ruiz, R.V., Piñeyro-Nelson, A., and Sánchez-Corrales, Y.E. (2010). Flower development. Arab. Book 8: e0127.
- Bannister, A.J. and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. Cell Res. 21: 381–395.
- Bao, S., Hua, C., Huang, G., Cheng, P., Gong, X., Shen, L., and Yu, H. (2019). Molecular Basis of Natural Variation in Photoperiodic Flowering Responses. Dev. Cell **50**: 90-101.e3.
- Becker, A. and Ehlers, K. (2016). Arabidopsis flower development--of protein complexes, targets, and transport. Protoplasma 253: 219–230.
- Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S., Patron, N.J., and Nekrasov, V. (2015). Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. Curr. Opin. Biotechnol. 32: 76–84.
- **Benjamini, Y. and Hochberg, Y.** (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol. **57**: 289–300.
- Bethke, G., Pecher, P., Eschen-Lippold, L., Tsuda, K., Katagiri, F., Glazebrook, J., Scheel, D., and Lee, J. (2012). Activation of the Arabidopsis thaliana mitogen-activated protein kinase MPK11 by the flagellin-derived elicitor peptide, flg22. Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI 25: 471–480.
- Bethke, G., Unthan, T., Uhrig, J.F., Pöschl, Y., Gust, A.A., Scheel, D., and Lee, J. (2009). Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in Arabidopsis thaliana via ethylene signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **106**: 8067–8072.
- Bi, G., Zhou, Z., Wang, W., Li, L., Rao, S., Wu, Y., Zhang, X., Menke, F.L.H., Chen, S., and Zhou, J.-M. (2018). Receptor-Like Cytoplasmic Kinases Directly Link Diverse Pattern Recognition Receptors to the Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades in Arabidopsis. Plant Cell 30: 1543–1561.
- **Bienz, M.** (2006). The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. Trends Biochem. Sci. **31**: 35–40.
- Bourbousse, C., Ahmed, I., Roudier, F., Zabulon, G., Blondet, E., Balzergue, S., Colot, V., Bowler, C., and Barneche, F. (2012). Histone H2B monoubiquitination facilitates the rapid modulation of gene expression during Arabidopsis photomorphogenesis. PLoS Genet. 8: e1002825.
- Branon, T.C., Bosch, J.A., Sanchez, A.D., Udeshi, N.D., Svinkina, T., Carr, S.A., Feldman, J.L., Perrimon, N., and Ting, A.Y. (2018). Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. Nat. Biotechnol. 36: 880–887.
- Brioudes, F., Joly, C., Szécsi, J., Varaud, E., Leroux, J., Bellvert, F., Bertrand, C., and Bendahmane, M. (2009). Jasmonate controls late development stages of petal growth in Arabidopsis thaliana. Plant J. Cell Mol. Biol. 60: 1070–1080.

- Cai, H., Zhao, L., Wang, L., Zhang, M., Su, Z., Cheng, Y., Zhao, H., and Qin, Y. (2017). ERECTA signaling controls Arabidopsis inflorescence architecture through chromatinmediated activation of PRE1 expression. New Phytol. 214: 1579–1596.
- Cao, Y., Liang, Y., Tanaka, K., Nguyen, C.T., Jedrzejczak, R.P., Joachimiak, A., and 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**.
- Capili, A.D., Schultz, D.C., RauscherIII, F.J., and Borden, K.L. (2001). Solution structure of the PHD domain from the KAP-1 corepressor: structural determinants for PHD, RING and LIM zinc-binding domains. EMBO J. 20: 165–177.
- Cheng, Y., Cao, L., Wang, S., Li, Y., Wang, H., and Zhou, Y. (2014). Analyses of Plant Leaf Cell Size, Density and Number, as Well as Trichome Number Using Cell Counter Plugin. Bio-Protoc. 4: e1165.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J.D.G., Felix, G., and Boller, T. (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. Nature **448**: 497–500.
- Cho, S.K., Larue, C.T., Chevalier, D., Wang, H., Jinn, T.-L., Zhang, S., and Walker, J.C. (2008). Regulation of floral organ abscission in Arabidopsis thaliana. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105: 15629–15634.
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.-F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.-M., and Gascuel, O. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. Nucleic Acids Res. 36: W465-469.
- **Disch, S., Anastasiou, E., Sharma, V.K., Laux, T., Fletcher, J.C., and Lenhard, M.** (2006). The E3 ubiquitin ligase BIG BROTHER controls arabidopsis organ size in a dosage-dependent manner. Curr. Biol. CB **16**: 272–279.
- Djamei, A., Pitzschke, A., Nakagami, H., Rajh, I., and Hirt, H. (2007). Trojan horse strategy in Agrobacterium transformation: abusing MAPK defense signaling. Science **318**: 453–456.
- Earley, K.W., Haag, J.R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K., and Pikaard, C.S. (2006). Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. Plant J. Cell Mol. Biol. 45: 616–629.
- Edwards, K., Johnstone, C., and Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic Acids Res. 19: 1349.
- Feilner, T. et al. (2005). High throughput identification of potential Arabidopsis mitogen-activated protein kinases substrates. Mol. Cell. Proteomics MCP 4: 1558–1568.
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., and Boller, T. (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. Plant J. Cell Mol. Biol. 18: 265–276.
- Feys, B.J., Wiermer, M., Bhat, R.A., Moisan, L.J., Medina-Escobar, N., Neu, C., Cabral, A., and Parker, J.E. (2005). Arabidopsis SENESCENCE-ASSOCIATED GENE101 Stabilizes and Signals within an ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 Complex in Plant Innate Immunity. Plant Cell 17: 2601–2613.
- Gao, X., Chen, X., Lin, W., Chen, S., Lu, D., Niu, Y., Li, L., Cheng, C., McCormack, M., Sheen, J., Shan, L., and He, P. (2013). Bifurcation of Arabidopsis NLR immune signaling via Ca²⁺- dependent protein kinases. PLoS Pathog. 9: e1003127.

- Heese, A., Hann, D.R., Gimenez-Ibanez, S., Jones, A.M.E., He, K., Li, J., Schroeder, J.I., Peck, S.C., and Rathjen, J.P. (2007). The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104: 12217–12222.
- Howe, K.L. et al. (2019). Ensembl Genomes 2020—enabling non-vertebrate genomic research. Nucleic Acids Res. 48: D689–D695.
- Irish, V.F. (2008). The Arabidopsis petal: a model for plant organogenesis. Trends Plant Sci. 13: 430–436.
- Joo, S., Liu, Y., Lueth, A., and Zhang, S. (2008). MAPK phosphorylation-induced stabilization of ACS6 protein is mediated by the non-catalytic C-terminal domain, which also contains the cisdeterminant for rapid degradation by the 26S proteasome pathway. Plant J. Cell Mol. Biol. 54: 129–140.
- Katsir, L., Davies, K.A., Bergmann, D.C., and Laux, T. (2011). Peptide signaling in plant development. Curr. Biol. CB 21: R356-364.
- Khan, M., Youn, J.-Y., Gingras, A.-C., Subramaniam, R., and Desveaux, D. (2018). In planta proximity dependent biotin identification (BioID). Sci. Rep. 8: 9212.
- Kim, D.I., Jensen, S.C., Noble, K.A., Kc, B., Roux, K.H., Motamedchaboki, K., and Roux, K.J. (2016). An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling. Mol. Biol. Cell 27: 1188–1196.
- Kofler, M.M. and Freund, C. (2006). The GYF domain. FEBS J. 273: 245–256.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680–685.
- Lampard, G.R., Macalister, C.A., and Bergmann, D.C. (2008). Arabidopsis stomatal initiation is controlled by MAPK-mediated regulation of the bHLH SPEECHLESS. Science 322: 1113– 1116.
- Lassowskat, I., Böttcher, C., Eschen-Lippold, L., Scheel, D., and Lee, J. (2014). Sustained mitogen-activated protein kinase activation reprograms defense metabolism and phosphoprotein profile in Arabidopsis thaliana. Front. Plant Sci. 5: 554.
- Lee, J., Rudd, J.J., Macioszek, V.K., and Scheel, D. (2004). Dynamic changes in the localization of MAPK cascade components controlling pathogenesis-related (PR) gene expression during innate immunity in parsley. J. Biol. Chem. 279: 22440–22448.
- Lee, J.S., Kuroha, T., Hnilova, M., Khatayevich, D., Kanaoka, M.M., McAbee, J.M., Sarikaya, M., Tamerler, C., and Torii, K.U. (2012). Direct interaction of ligand-receptor pairs specifying stomatal patterning. Genes Dev. 26: 126–136.
- Leng, L., Liang, Q., Jiang, J., Zhang, C., Hao, Y., Wang, X., and Su, W. (2017). A subclass of HSP70s regulate development and abiotic stress responses in Arabidopsis thaliana. J. Plant Res. 130: 349–363.
- Letunic, I. and Bork, P. (2018). 20 years of the SMART protein domain annotation resource. Nucleic Acids Res. 46: D493–D496.
- Li, B., Jiang, S., Yu, X., Cheng, C., Chen, S., Cheng, Y., Yuan, J.S., Jiang, D., He, P., and Shan, L. (2015). Phosphorylation of trihelix transcriptional repressor ASR3 by MAP KINASE4 negatively regulates Arabidopsis immunity. Plant Cell 27: 839–856.

- Li, H., Ilin, S., Wang, W., Duncan, E.M., Wysocka, J., Allis, C.D., and Patel, D.J. (2006). Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. Nature 442: 91–95.
- Li, Y. and Li, H. (2012). Many keys to push: diversifying the "readership" of plant homeodomain fingers. Acta Biochim. Biophys. Sin. 44: 28–39.
- Lin, Q., Zhou, Z., Luo, W., Fang, M., Li, M., and Li, H. (2017). Screening of Proximal and Interacting Proteins in Rice Protoplasts by Proximity-Dependent Biotinylation. Front. Plant Sci. 8: 749.
- Liu, Y. and He, C. (2016). Regulation of plant reactive oxygen species (ROS) in stress responses: learning from AtRBOHD. Plant Cell Rep. 35: 995–1007.
- Lockstone, H.E. (2011). Exon array data analysis using Affymetrix power tools and R statistical software. Brief. Bioinform. 12: 634–644.
- Logemann, E., Birkenbihl, R.P., Ülker, B., and Somssich, I.E. (2006). An improved method for preparing Agrobacterium cells that simplifies the Arabidopsis transformation protocol. Plant Methods 2: 16.
- López-González, L., Mouriz, A., Narro-Diego, L., Bustos, R., Martínez-Zapater, J.M., Jarillo, J.A., and Piñeiro, M. (2014). Chromatin-dependent repression of the Arabidopsis floral integrator genes involves plant specific PHD-containing proteins. Plant Cell 26: 3922–3938.
- Lyzenga, W.J., Booth, J.K., and Stone, S.L. (2012). The Arabidopsis RING-type E3 ligase XBAT32 mediates the proteasomal degradation of the ethylene biosynthetic enzyme, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 7. Plant J. Cell Mol. Biol. **71**: 23–34.
- Ma, B., Qian, D., Nan, Q., Tan, C., An, L., and Xiang, Y. (2012). Arabidopsis vacuolar H+-ATPase (V-ATPase) B subunits are involved in actin cytoskeleton remodeling via binding to, bundling, and stabilizing F-actin. J. Biol. Chem. 287: 19008–19017.
- Madeira, F., Park, Y.M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A.R.N., Potter, S.C., Finn, R.D., and Lopez, R. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. Nucleic Acids Res. 47: W636–W641.
- Mair, A., Xu, S.-L., Branon, T.C., Ting, A.Y., and Bergmann, D.C. (2019). Proximity labeling of protein complexes and cell-type-specific organellar proteomes in Arabidopsis enabled by TurboID. eLife 8.
- Majovsky, P., Naumann, C., Lee, C.-W., Lassowskat, I., Trujillo, M., Dissmeyer, N., and Hoehenwarter, W. (2014). Targeted proteomics analysis of protein degradation in plant signaling on an LTQ-Orbitrap mass spectrometer. J. Proteome Res. 13: 4246–4258.
- MAPK Group (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. Trends Plant Sci. 7: 301–308.
- Meng, X., Wang, H., He, Y., Liu, Y., Walker, J.C., Torii, K.U., and Zhang, S. (2012). A MAPK cascade downstream of ERECTA receptor-like protein kinase regulates Arabidopsis inflorescence architecture by promoting localized cell proliferation. Plant Cell 24: 4948–4960.
- Meng, X., Xu, J., He, Y., Yang, K.-Y., Mordorski, B., Liu, Y., and Zhang, S. (2013a). Phosphorylation of an ERF transcription factor by Arabidopsis MPK3/MPK6 regulates plant defense gene induction and fungal resistance. Plant Cell **25**: 1126–1142.

- Meng, X., Xu, J., He, Y., Yang, K.-Y., Mordorski, B., Liu, Y., and Zhang, S. (2013b). Phosphorylation of an ERF transcription factor by Arabidopsis MPK3/MPK6 regulates plant defense gene induction and fungal resistance. Plant Cell **25**: 1126–1142.
- **Missal, A.** (2014). Analysen zum Einfluss eines PHD-Domänen Proteins auf die abwehrrelevante Genexpression in Arabidopsis thaliana.
- Mizoguchi, T., Ichimura, K., Irie, K., Morris, P., Giraudat, J., Matsumoto, K., and Shinozaki, K. (1998). Identification of a possible MAP kinase cascade in Arabidopsis thaliana based on pairwise yeast two-hybrid analysis and functional complementation tests of yeast mutants. FEBS Lett. **437**: 56–60.
- Mutasa-Göttgens, E. and Hedden, P. (2009). Gibberellin as a factor in floral regulatory networks. J. Exp. Bot. 60: 1979–1989.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., and Kimura, T. (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. J. Biosci. Bioeng. 104: 34–41.
- Nitta, Y., Ding, P., and Zhang, Y. (2014). Identification of additional MAP kinases activated upon PAMP treatment. Plant Signal. Behav. 9: e976155.
- **Okada, T., Endo, M., Singh, M.B., and Bhalla, P.L.** (2005). Analysis of the histone H3 gene family in Arabidopsis and identification of the male-gamete-specific variant AtMGH3. Plant J. Cell Mol. Biol. **44**: 557–568.
- Ó'Maoiléidigh, D.S., Graciet, E., and Wellmer, F. (2014). Gene networks controlling Arabidopsis thaliana flower development. New Phytol. 201: 16–30.
- Oostdyk, L.T., Shank, L., Jividen, K., Dworak, N., Sherman, N.E., and Paschal, B.M. (2019). Towards improving proximity labeling by the biotin ligase BirA. Methods San Diego Calif 157: 66–79.
- Ordon, J., Gantner, J., Kemna, J., Schwalgun, L., Reschke, M., Streubel, J., Boch, J., and Stuttmann, J. (2017). Generation of chromosomal deletions in dicotyledonous plants employing a user-friendly genome editing toolkit. Plant J. Cell Mol. Biol. **89**: 155–168.
- Patharkar, O.R. and Walker, J.C. (2015). Floral organ abscission is regulated by a positive feedback loop. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112: 2906–2911.
- Pecher, P., Eschen-Lippold, L., Herklotz, S., Kuhle, K., Naumann, K., Bethke, G., Uhrig, J., Weyhe, M., Scheel, D., and Lee, J. (2014). The Arabidopsis thaliana mitogen-activated protein kinases MPK3 and MPK6 target a subclass of 'VQ-motif'-containing proteins to regulate immune responses. New Phytol. 203: 592–606.
- Peña, P.V., Davrazou, F., Shi, X., Walter, K.L., Verkhusha, V.V., Gozani, O., Zhao, R., and Kutateladze, T.G. (2006). Molecular mechanism of histone H3K4me3 recognition by plant homeodomain of ING2. Nature 442: 100–103.
- Peng, Y., van Wersch, R., and Zhang, Y. (2018). Convergent and Divergent Signaling in PAMP-Triggered Immunity and Effector-Triggered Immunity. Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI 31: 403–409.

- Pitzschke, A., Djamei, A., Teige, M., and Hirt, H. (2009). VIP1 response elements mediate mitogenactivated protein kinase 3-induced stress gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106: 18414–18419.
- Qiu, J.-L. et al. (2008a). Arabidopsis MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. EMBO J. 27: 2214–2221.
- Qiu, J.-L., Zhou, L., Yun, B.-W., Nielsen, H.B., Fiil, B.K., Petersen, K., Mackinlay, J., Loake, G.J., Mundy, J., and Morris, P.C. (2008b). Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinases MKK1 and MKK2 have overlapping functions in defense signaling mediated by MEKK1, MPK4, and MKS1. Plant Physiol. 148: 212–222.
- Ranf, S., Eschen-Lippold, L., Pecher, P., Lee, J., and Scheel, D. (2011). Interplay between calcium signalling and early signalling elements during defence responses to microbe- or damageassociated molecular patterns. Plant J. Cell Mol. Biol. 68: 100–113.
- Rio, D.C., Ares, M., Hannon, G.J., and Nilsen, T.W. (2010). Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). Cold Spring Harb. Protoc. 2010: pdb.prot5439.
- Ritchie, M.E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C.W., Shi, W., and Smyth, G.K. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. Nucleic Acids Res. 43: e47.
- Roje, S., Wang, H., McNeil, S.D., Raymond, R.K., Appling, D.R., Shachar-Hill, Y., Bohnert, H.J., and Hanson, A.D. (1999). Isolation, characterization, and functional expression of cDNAs encoding NADH-dependent methylenetetrahydrofolate reductase from higher plants. J. Biol. Chem. 274: 36089–36096.
- Roux, K.J., Kim, D.I., Raida, M., and Burke, B. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. J. Cell Biol. **196**: 801–810.
- Schiapparelli, L.M., McClatchy, D.B., Liu, H.-H., Sharma, P., Yates, J.R., and Cline, H.T. (2014). Direct detection of biotinylated proteins by mass spectrometry. J. Proteome Res. 13: 3966–3978.
- Schindler, U., Beckmann, H., and Cashmore, A.R. (1993). HAT3.1, a novel Arabidopsis homeodomain protein containing a conserved cysteine-rich region. Plant J. Cell Mol. Biol. 4: 137–150.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat. Methods 9: 671–675.
- Schneider-Poetsch, T., Ju, J., Eyler, D.E., Dang, Y., Bhat, S., Merrick, W.C., Green, R., Shen, B., and Liu, J.O. (2010). Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. Nat. Chem. Biol. 6: 209–217.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., and Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. BMC Mol. Biol. 7: 3.
- Sharma, N., Xin, R., Kim, D.-H., Sung, S., Lange, T., and Huq, E. (2016). NO FLOWERING IN SHORT DAY (NFL) is a bHLH transcription factor that promotes flowering specifically under short-day conditions in Arabidopsis. Dev. Camb. Engl. 143: 682–690.
- Shi, C.-L., Stenvik, G.-E., Vie, A.K., Bones, A.M., Pautot, V., Proveniers, M., Aalen, R.B., and Butenko, M.A. (2011). Arabidopsis class I KNOTTED-like homeobox proteins act

downstream in the IDA-HAE/HSL2 floral abscission signaling pathway. Plant Cell **23**: 2553–2567.

- Shi, X. et al. (2006). ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. Nature 442: 96–99.
- Southern, E. (2006). Southern blotting. Nat. Protoc. 1: 518–525.
- Stenvik, G.-E., Tandstad, N.M., Guo, Y., Shi, C.-L., Kristiansen, W., Holmgren, A., Clark, S.E., Aalen, R.B., and Butenko, M.A. (2008). The EPIP peptide of INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION is sufficient to induce abscission in arabidopsis through the receptor-like kinases HAESA and HAESA-LIKE2. Plant Cell **20**: 1805–1817.
- Sun, T., Nitta, Y., Zhang, Q., Wu, D., Tian, H., Lee, J.S., and Zhang, Y. (2018). Antagonistic interactions between two MAP kinase cascades in plant development and immune signaling. EMBO Rep. 19.
- Szklarczyk, D., Gable, A.L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N.T., Morris, J.H., Bork, P., Jensen, L.J., and Mering, C. von (2019). STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. Nucleic Acids Res. 47: D607–D613.
- Tabassum, N., Eschen-Lippold, L., Athmer, B., Baruah, M., Brode, M., Maldonado-Bonilla, L.D., Hoehenwarter, W., Hause, G., Scheel, D., and Lee, J. (2019). Phosphorylationdependent control of an RNA granule-localized protein that fine-tunes defence gene expression at a post-transcriptional level. Plant J. Cell Mol. Biol.
- Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., and Pickart, C.M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. EMBO J. 19: 94–102.
- Trempel, F., Ranf, S., Scheel, D., and Lee, J. (2016). Quantitative Analysis of Microbe-Associated Molecular Pattern (MAMP)-Induced Ca2+ Transients in Plants. In Environmental Responses in Plants: Methods and Protocols, P. Duque, ed, Methods in Molecular Biology. (Springer: New York, NY), pp. 331–344.
- Uchida, N., Lee, J.S., Horst, R.J., Lai, H.-H., Kajita, R., Kakimoto, T., Tasaka, M., and Torii, K.U. (2012). Regulation of inflorescence architecture by intertissue layer ligand-receptor communication between endodermis and phloem. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109: 6337– 6342.
- Udeshi, N.D. et al. (2017). Antibodies to biotin enable large-scale detection of biotinylation sites on proteins. Nat. Methods 14: 1167–1170.
- Vie, A.K., Najafi, J., Liu, B., Winge, P., Butenko, M.A., Hornslien, K.S., Kumpf, R., Aalen, R.B., Bones, A.M., and Brembu, T. (2015). The IDA/IDA-LIKE and PIP/PIP-LIKE gene families in Arabidopsis: phylogenetic relationship, expression patterns, and transcriptional effect of the PIPL3 peptide. J. Exp. Bot. 66: 5351–5365.
- Walter, M., Chaban, C., Schütze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Näke, C., Blazevic, D., Grefen, C., Schumacher, K., Oecking, C., Harter, K., and Kudla, J. (2004). Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. Plant J. Cell Mol. Biol. 40: 428–438.
- Wang, F., Shang, Y., Fan, B., Yu, J.-Q., and Chen, Z. (2014). Arabidopsis LIP5, a positive regulator of multivesicular body biogenesis, is a critical target of pathogen-responsive MAPK cascade in plant basal defense. PLoS Pathog. 10: e1004243.

- Wang, H., Ngwenyama, N., Liu, Y., Walker, J.C., and Zhang, S. (2007). Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in Arabidopsis. Plant Cell **19**: 63–73.
- Waszczak, C., Carmody, M., and Kangasjärvi, J. (2018). Reactive Oxygen Species in Plant Signaling. Annu. Rev. Plant Biol. 69: 209–236.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V., and Provart, N.J. (2007). An "Electronic Fluorescent Pictograph" Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. PLOS ONE 2: e718.
- Wu, F.-H., Shen, S.-C., Lee, L.-Y., Lee, S.-H., Chan, M.-T., and Lin, C.-S. (2009). Tape-Arabidopsis Sandwich - a simpler Arabidopsis protoplast isolation method. Plant Methods 5: 16.
- Xu, J. and Chua, N.-H. (2012). Dehydration stress activates Arabidopsis MPK6 to signal DCP1 phosphorylation. EMBO J. 31: 1975–1984.
- Yamada, K. et al. (2016). The Arabidopsis CERK1-associated kinase PBL27 connects chitin perception to MAPK activation. EMBO J. **35**: 2468–2483.
- Yan, H., Zhao, Y., Shi, H., Li, J., Wang, Y., and Tang, D. (2018). BRASSINOSTEROID-SIGNALING KINASE1 Phosphorylates MAPKKK5 to Regulate Immunity in Arabidopsis. Plant Physiol. 176: 2991–3002.
- Yang, P., Fu, H., Walker, J., Papa, C.M., Smalle, J., Ju, Y.-M., and Vierstra, R.D. (2004). Purification of the Arabidopsis 26 S proteasome: biochemical and molecular analyses revealed the presence of multiple isoforms. J. Biol. Chem. **279**: 6401–6413.
- Yang, Z. et al. (2018). EBS is a bivalent histone reader that regulates floral phase transition in Arabidopsis. Nat. Genet. 50: 1247–1253.
- Yoo, S.-D., Cho, Y.-H., and Sheen, J. (2007). Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. Nat. Protoc. 2: 1565–1572.
- Zhang, M., Su, J., Zhang, Y., Xu, J., and Zhang, S. (2018). Conveying endogenous and exogenous signals: MAPK cascades in plant growth and defense. Curr. Opin. Plant Biol. 45: 1–10.
- Zhang, Y., Wang, P., Shao, W., Zhu, J.-K., and Dong, J. (2015). The BASL polarity protein controls a MAPK signaling feedback loop in asymmetric cell division. Dev. Cell 33: 136–149.
- Zhao, F., Zheng, Y.-F., Zeng, T., Sun, R., Yang, J.-Y., Li, Y., Ren, D.-T., Ma, H., Xu, Z.-H., and Bai, S.-N. (2017). Phosphorylation of SPOROCYTELESS/NOZZLE by the MPK3/6 Kinase Is Required for Anther Development. Plant Physiol. 173: 2265–2277.
- Zhao, T., Zhan, Z., and Jiang, D. (2019). Histone modifications and their regulatory roles in plant development and environmental memory. J. Genet. Genomics Yi Chuan Xue Bao 46: 467– 476.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D.G., Boller, T., and Felix, G. (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacteriummediated transformation. Cell 125: 749–760.

7 Anhang



Anhang 1 Darstellung von Arabidopsis eFP Browser Daten von PPL1 und PPL2 bei biotischem und abiotischem Stress. Expressions-Werte von (A) At1g02070 (PPL1) und (B) At3g60520 (PPL2) relativ zu dem Mittelwert aller gemessenen Werte (Arabidopsis eFP Browser von bar.toronto.ca) Auftragung mittels GraphpadPrism5.



Anhang 2 Darstellung von Arabidopsis eFP Browser Daten von PPL1 und PPL2 in der Blütenentwicklung. Abruf der Expression von At1g02070 (PPL1) und At3g60520 (PPL2) über Arabidopsis eFP Browser von bar.toronto.ca. Teilweise Darstellung der Expressions(**A**, **C**) -Diagramme (Phase 12/15 der Blütenentwicklung) und (**B**, **D**)-Muster in Blüten (Phase 15) relativ zu dem Mittelwert aller gemessenen Werte der Proben.



<u>Anhang 3 Darstellung von PPL1 orthologen Genen aus Kreuzblütlern.</u>(**A**) Phylogenetischer Baum zur Darstellung der Aufteilung in PPL1- und PPL2-ähnliche Proteinsequenzen. Die Berechnung und Darstellung erfolgte mit Phylogeny.fr. Die passenden Genbezeichnungen und Sequenzen sind in Anhang 15 aufgeführt. Rote Zahlen = *branch support values* (**B**) Darstellung konservierter Aminosäuren in orthologen Proteinen aus *A. thaliana*, *A. lyrata*, *Brassica oleracea*, *Brassica napus* und *Brassica rapa*. Es wurde dasselbe Daten-Set wie bei A verwendet. Darstellung erfolgte mit weblogo im Anschluss an ein multiples Alignment mit MUSCLE. Rote Sterne = MAP Kinase Phosphorylierungsstellen

Anhang



Anhang 4 Kern-Lokalisation von PPL1 und PPL2 in *N. benthamiana*, PPL1 Überexpressionslinien und CFP Lokalisation in *A. thaliana* Protoplasten.(**A**) Transiente Expression von *pEarly104-YFP-PPL1* und *pEarly104-YFP-PPL2* in *N. benthamiana* Blättern für 24h. Anschließende Untersuchung am konfokalen Fluoreszenzmikroskop. (**B**) Kernpräparation aus Blattmaterial der *pEarly201-HA-PPL1* ÜE-Linien 5-6 und 7-5 sowie Col-0. Die Detektion erfolgte mittels Western Blot (PPL1 Protein: HA-Antikörper, endogene Histone: H3 Antikörper). Z = zytoplasmatische Fraktion, W = Waschung, K = Kernfraktion (**C**) Transiente Expression von *pUGW15-CFP* in *A. thalian*a Col-0 Protoplasten. Die CFP-Signale wurden 16 h nach Transformation mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Dargestellt sind die Ergebnisse eines von 4 unabhängigen Experimenten. Anzahl Protoplasten=13



Anhang 5 Proteinelution (GST-PPL1, GST-PPL2), und Histon3 *pull down* Assay mit GST-PPL1, GST-<u>PPL1mutPHD und GST-PPL2</u>. (A) Coomassie Brilliant Blue (CBB) gefärbtes SDS-Gel zur Darstellung der Proteinelution von GST-PPL1 und GST-PPL2 von GSH-Sepharose mittels reduziertem Glutathion. iP = immobilisiertes Protein (C) Histon *pull down* Experiment mit Col-0 Zellkern-Extrakt und den rekombinanten GST-PPL1, GST-PPL2, GST-PPL1mutPHD und GST Proteinen. Die Detektion erfolgte mittels Western Blot (H3 Antikörper).



Anhang 6 *In vitro* Phosphorylierungs-Assay mit Phospho-Null Mutanten und *in vivo* Phosphorylierung in *A. thaliana* Col-0 Protoplasten. (A) Die *in vitro* Inkubation von rekombinant gereinigtem GST-PPL1, GST-PPL1^{AA}, GST-PPL2 und GST-PPL2^{AA} mit rekombinant gereinigtem und aktiviertem MPK3, MPK4 oder MPK6 Protein und χ^{32} P-ATP. Die Coomassie Brilliant Blue (CBB) Färbung diente als Ladekontrolle. Experiment wurde einmal durchgeführt. (B) Transiente Expression von *HA-PPL1* allein, mit *c-myc-PcMKK5^{DD}* oder mit *c-myc-PcMKK5^{KR}* in *A. thaliana* Protoplasten. Die Behandlung mit 100 nM flg22 für eine Stunde erfolgte 16h nach der Transformation. Daraufhin wurden alle Proben eingefroren und mittels phostagTM SDS-PAGE aufgetrennt. Die Analyse erfolgte über Western Blot Detektion (HA oder c-myc Antikörper (AK)). Dargestellt sind die Ergebnisse eines von 3 unabhängigen Experimenten. Die Aminoschwarz Färbung diente als Ladekontrolle



<u>Anhang 7 Darstellung der T-DNA Insertion der SALK_091010 Linie.</u> (A) Graphische Dartsellung der Lokalisation der T-DNA Insertion in der 3` UTR von *PPL1*. Gelber Balken = Promoter Region; grauer Balken = Exon (**B**) Semiquantitative PCR mit Blüten cDNA zweier Pflanzen der *ppl1_SALK* Linie bzw. von Col-0. *EF1* α diente als Kontrolle.



<u>Anhang 8 Expression von PPL1 und PPL2 in ppl1, ppl2, ppl1ppl2 und Col-0 Blüten.</u> Analyse der Expressionslevel von PPL1 (A) und PPL2 (B) in vier unterschiedlichen Blüten-Entwicklungsstufen von ppl1, ppl2, ppl1ppl2 und Col-0 mittels semiquantitativer Echt-Zeit PCR. Jede Probe ist ein Pool aus mindestens 8 Blüten von 4 Pflanzen der entsprechenden Linie. (C) Darstellung der veränderten Nukleotidsequenz von ppl1 mit der resultierenden Aminosäuresequenz. Grün = Start-Codon, Türkis = Insertion, Rot = frühzeitiges Stop-Codon. Bestätigt durch 3 unabhängige Sequenzierungen.

Anhang



Anhang 9 Chromatogramm der PPL2-Probe nach *in gel*-Verdau. Die Proteinextraktion aus *A. thaliana* Protoplasten erfolgte laut Extraktionsprotokoll 3 (nur SDS im Extraktionspuffer, alle Puffer in MS-grade Wasser). Nach der weiteren Aufarbeitung und der Separation biotinylierter Proteine mittels Streptavidin *beads* erfolgte die Elution mit anschließender Auftrennung im SDS-Trenngel und dem *in gel*-Verdau.



<u>Anhang 10 Kontroll-Western der Probenaufarbeitung Messung 3.</u> Transiente Expression von *PPL1-TbID*, *PPL2-TbID*, *H3-TbID* und *CFP-TurboID* in *A. thaliana* Protoplasten. Die Behandlung für eine Stunde mit 50 μ M Biotin erfolgte 16 h nach der Transformation. Anschließend erfolgte die Proteinextraktion und die Anreicherung biotinylierter Proteine mittels Streptavidin *beads*. Die Analyse erfolgte mittels Western Blot. Die erwartete Proteingröße wird durch einen roten Stern markiert. uP = untransformierte Protoplasten, Ex = Extrakt, P = Pellet, UB = ungebundene Fraktion, E1 und E2 = Eluat 1 und 2 der gebundenen Proteine von den Streptavidin *beads*.



<u>Anhang 11 Phänotypische Darstellung der Fläche, Breite und Länge von Petalen der Blüten von Col-0,</u> <u>ppl1, ppl2, ppl1ppl2 und PPL1 ÜE 5-6.</u> Die Anzucht der Pflanzen bis zur Blüte erfolgte unter Langtag Bedingungen in einem Experiment. Die Petale wurden von den weiteren Bestandteilen der Blüten separiert und mit Hilfe von ImageJ analysiert. Zur statistischen Auswertung wurde eine One-way ANOVA mit Dunn's Post Test durchgeführt. n \geq 18 Petale (je 4 Pflanzen, 1-2 Blüten pro Pflanze).

Bezeichnung	Verwendung	Sequenz
At3g60520_5	Gen-Amplifikation	caccatggtggatettgaaag
At3g60520_3	Gen-Amplifikation	ctaacacataacatccttgagaagc
PPL2_S82A_forw2	Mutagenese-PCR	gaggtetegggegeeteateaceaaateaaaca
PPL2_S82A_rev2	Mutagenese-PCR	ctggtctcggcgccgaatattccgaccggtac
PPL2_S113A_forw	Mutagenese-PCR	aaggtetegggegeetagaeeggee
PPL2_S113A_rev	Mutagenese-PCR	aaggteteggegeeggeaegeeag
H3.1_5	Gen-Amplifikation	caccatggctcgta ccaagc
H3.1_3	Gen-Amplifikation	ttaagccctctcgcctctaattc
pENTR-	Mutagenese-PCR	aaaggtetegeettageeetetegeetetaatt
H3woSTop_rev		

Anhang 12 Primer für Gen-Amplifikation, Mutagenese Reaktion und Southern-Sonde Amplifikation

pENTR_woSTop_forw	Mutagenese-PCR	aaaggtetegaagggtgggegegeegace
PPL2_woStop_rev	Mutagenese-PCR	aaaggtetegeettacacataacateettgagaage
CFP_w/oStop_forw	Mutagenese-PCR	aaaggteteggaceeagetttettgtacaaa
CFP_w/oStop_rev	Mutagenese-PCR	aaaggteteeggteettgtacagetegteea
BASTA-F	Amplifikation Southern Sonde	aactteegtaeegageegea
BASTA-R	Amplifikation Southern Sonde	gctgaagtccagctgccagaaac

Anhang 13 Primer für Genotypisierung und Generierung der CRISPR-Cas9 Konstrukte.

Bezeichnung	Verwendung	Sequenz
SALK_139823_RP2	Genotypisierung	ggccacatggaatacctaaagc
SALK_139823_LP	Genotypisierung	ttatttatggaccgacttgcg
SALK_126470_RP	Genotypisierung	aagateteacegtetaetgeg
SALK_126470_LP	Genotypisierung	attgtgtcaagatcatcgtgc
PPL1_A_O1	CRISPR Cas9 – Primer	attggagagagtgtgttgcatgtg
PPL1_A_O2	CRISPR Cas9 -Primer	aaaccacatgcaacacactctctc
PPL1_B_O1	CRISPR Cas9 -Primer	attgagcaacgttgctagacatgg
PPL1_B_O2	CRISPR Cas9 -Primer	aaacccatgtctagcaacgttgct
PPL1_A_P5	Genotypisierung	gacggcaagcaaactctctagt
PPL1_B_P3	Genotypisierung	ttccgatctgtttgagaagtca
PPL2_A_O1	CRISPR Cas9 -Primer	attgagaagagtgtgttgcatgtg
PPL2_A_O2	CRISPR Cas9 -Primer	aaaccacatgcaacacactcttct
PPL2_B_O1	CRISPR Cas9 -Primer	attgtgctgtttgatttggtgatg
PPL2_B_O2	CRISPR Cas9 -Primer	aaaccatcaccaaatcaaacagca
PPL2_A_P5	Genotypisierung	tteeteteetteatatteteeg
PPL2_B_P3	Genotypisierung	gaagettgtacetacgagtggc

Anhang 14 Primer für quantitative Echt-Zeit-PCR .

Bezeichnung	Verwendung	
PPL1_qPCR_fwd	RT-Primer	tttctccgacaagctcttcag
PPL1_qPCR_rev	RT-Primer	tctagcaacgttgctcagctt
PPL1_probe	Sonde Tagman	FAM-acggccagtttgcggagccta-BHQ1

PPL2_qPCR_fwd	RT-Primer	tcttgaaagaagagtgtgttgcat
PPL2_qPCR_rev	RT-Primer	tggatcagcttgctctttgtaa
PPL2_probe	Sonde Tagman	FAM-tgcagcaagtgccttaatcgctttc-BHQ1
PP2A_5	RT-Primer	gaccggagccaactaggac
PP2A-3	RT-Primer	aaaacttggtaacttttccagca
PP2A _probe	Sonde Tagman	FAM-atctggtgcctgcatatgctcgtc-BHQ1

Anhang 15 Zuordnung und Sequenzen für den phylogentischen Baum der Kreuzblütler.

Benennung	Genbezeichnung	Sequenz
A.thaliana_	AT1G02070	mervccmcgdvgfsdklfscghcrcrfqhsycsnyygqfaepteicdwcrsddrklsn
1	[Arabidopsis	varhggssskkpsssvky endfsnrseyspghrikhnnnrhdqvakgvagdgggvtspgrade and the set of the se
	thalianal	ktatrrykllkdvmc
A.thaliana_	AT3G60520	mvdlerrvccmcgdvgffdklfhcskclnrfqhsycssyykeqadpikicdwcqceak
2	[Arabidopsis	srtgakhgvnggsskrsyrseyssphhqikqqeinqttsssippaadkgktgvpsprpatrigen and the standard strength
	thaliana]	rykllkdvmc
B.napus 1	gb CDY38044.1	mekvccmcgdvgfsdklfrcghcrnrfqhsycsnyysefaepteicdwcqsddkklss
· -	[Brassica nanus]	vakhggssfssskkkkasssvnyesgvtnqseypsgggikhdnnhhdqvaksvvagp
		agggvpsprtamrrykllkdvrc
B.napus_2	ref XP_013722206.1	mekmccmcgdvgfsdklfrcghcrnrfqhsycsnyysefaepteicdwcqsddkkls
-	[Brassica napus]	svakkggssvssskkkkasssvnyesgvtnqseypsgggikhdnnhhdqvaksvvag
		pagggvpsprtamrrykllkdvrc
B.napus_3	ref XP_013730436.1	mekmccmcgdvgfsdklfrcghcrnrfqhsycsnyysefaepteicdwcqsddkkls
	[Brassica napus]	svakkggssvssskkkkasssvnyesgvtnqseypsgggikhdnnhhdqvaksvvag
	-	pagggmpsprtatrrykllkdvrc
B.napus_4	gb CDX71802.1	mvdlerkvccmcgdvgffdklfhcskclnrfqhsycssyykeqgdpikicdwcqfeak
	[Brassica napus]	srtgakhgvsvgsskrsyrslyssanqvkqqeinqitasssippvaekgkssvpsprtatrr
		ykllkdvmc
B.napus_5	gb CDY41160.1	mvdlerkvccmcgdvgffdklfhcskclnrfqhsycssyykeqggpikicdwcqfeak
	[Brassica napus]	srtgakhgvsvgsskrsyrseyssanqiknqeinqitasssippvadkgktsvpsprtatrr
		ykllkdvmc
B.napus_6	gb CDX98421.1	mvdlerrvccmcgdvgfidklfhcskclnrfqhsycssyykeqadpikicdwcqwear
	[Brassica napus]	sptgakhgvkgrsskrsyrseyssahqikqqeinqittsssippatdkgktgapsprsatrr
	-	ykllkdvmc
B.napus_7	gb CDX67832.1	mvdlerrvccmcgdvgfidklfhcskclnrfqhsycssyykeqadpikicdwcqwear
	[Brassica napus]	sptgakhgvksrsskrsyrseyssahqikqqeinqittsssippatdkgktgapsprsatrr

		ykllkdvmc
B.oleracea_	ref XP_013601044.1	mekvccmcgdvgfsdklfrcghcrnrfqhsycsnyysefaepteicdwcqsddkklss
1	[Brassica oleracea]	vakhggssfssskkkkasssvnyesgvtnqseypsgggikhdnnhhdqvaksvvagp
		agggvpsprtatrrykllkdvrc
B.oleracea_	ref XP_013602785.1	mvdlerkvccmcgdvgffdklfhcskclnrfqhsycssyykeqgdpikicdwcqfeak
2	[Brassica oleracea]	srtgakhgvsvgsskrsyrseyssanqikqqeinqitasssippvaekgktsvpsprtatrr
		ykllkdvmc
B.oleracea_	ref XP_013590522.1	mvdlerrvccmcgdvgfidklfhcskclnrfqhsyvftylycssyykeqadpikicdwc
3	[Brassica oleracea]	qwears ptgakhgvkgrsskrsyrseys sahqikqqe inqitts ssippatdkgktgaps parameters and the set of the se
		rsatrrykllkdvmc
B.rapa_1	ref XP_009118854.1	mekvccmcgdvgfsdklfrcghcrnrfqhsycsnyysefaepteicdwcqsddkklss
	[Brassica rapa]	vakkggssvssskkkkasssvnyesgvtnqseypsgggikhdnnhhdqvaksvvagp
		agggmpsprtatrrykllkdvrc
B.rapa_2	ref XP_009116732.1	mvdlerkvccmcgdvgffdklfhcskclnrfqhsycssyykeqgdpikicdwcqfeak
	[Brassica rapa]	srtgakhgvsvgsskrsyrseyssanqiknqeinqitasssippvadkgktsvpsprtatrr
		ykllkdvmc
A.lyrata_1	gb EFH68288.1	mervccmcgdvgfsdklfscghcrcrlqhsycsnyysefaepakicdwcrsddrklgn
	[Arabidopsis lyrata]	varhggssskkssssvnyendeftnrpdyssgreinhnnnhhgqvaegvagagggvps
		pktatrrykllkdvmc
A.lvrata 2	gb EFH54599.1	mvdlerrvccmcgdvgffdklfhcskclnrfqhsycssyykeqadpikicdwcqceak
	[Arabidonsis lyrata]	srtgakhganggsskrsyrseyssahhqikqqeihqttsssippaaekgksgvpsprpatr
		rykllkdvmc
Danksagung

Danksagung

Ich bedanke mich bei Dr. Justin Lee und Prof. Dr. Dierk Scheel für die Möglichkeit diese Arbeit am IPB anzufertigen und die damit verbundende Finanzierung. Die fruchtvollen thematischen Diskussionen haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Bei Prof. Dr. Ingo Heilmann bedanke ich mich für die Unterstützung als Mentor und einen unvoreingenommenen Blick auf meine Daten.

Bei der AG Proteomanalytik unter Dr. Wolfgang Hoehenwarter (IPB Halle) möchte ich mich für die Messung und Bewertung meiner BioID Proben bedanken. Für die große Unterstützung bei der Prozessierung und Auswertung meiner Microarray Daten danke ich Dr. Benedikt Athmer (IPB Halle). Bei Dr. Andreas Fischer (AG Entwicklungsbiologie, MLU) bedanke ich mich für die Hilfe bei den Histon-Interaktionsversuchen.

Bei meinen ehemaligen Studenten Julia Lohmann und Susanne Neumann bedanke ich mich für die Arbeit an BioID Projekten.

Bei den Gutachtern dieser Arbeit und der Prüfungskommission bedanke ich mich für die aufgebrachte Zeit zur Begutachtung meiner Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Lennart Eschen-Lippold, meinem Bank-Nachbarn, für all die Hilfe im Labor bei technischen und inhaltlichen Belangen. Vorallem aber möchte ich Ihm für die immer positive Stimmung und Motivation danken, die glücklicherweise oft auf mich abgefärbt hat. Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe "Zelluläre Signaltransduktion" (Dr. Naheed Tabassum, Dr. Martin Weyhe, Fabian Trempel, Dr. Manaswieta Baruah, Dr. Lennart Eschen-Lippold, Dr. Xijuan Jiang, Dr. Lore Westphal und Nicole Bauer) für die anregenden Diskussionen und die schöne Arbeitsatmosphäre. Bei Domenika Thieme und Carsten Proksch bedanke ich mich für die aufmunternden und motivierenden Gespräche im Büro.

Allen Mitarbeitern der Abteilung "Signal- und Entwicklungsbiologie", sowie der neuen Abteilung "Biochemie pflanzlicher Interaktionen", danke ich für die freundliche Atmosphäre und Unterstützung.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern des IPB danken, die für diese hervorragende Infrastruktur sorgen und mir damit ebenfalls viel geholfen haben.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für jede Unterstützung die mir den Freiraum für diese Arbeit ermöglicht hat.

Vielen Dank!

Lebenslauf

Persönliche Information

Name:Annekatrin Sawusch geb. MissalNationalität:deutschGeboren:am 12.04.1990 in Halle/Saale

Ausbildung und wissenschaftlicher Werdegang

10/2014 – 12/2019	Doktorand der AG "Zelluläre Signaltransduktion" (neu "Biochemie pflanzlicher Interaktionen" unter Prof. Dr. Tina Romeis) am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (IPB) in Halle/Saale Prof. Dr. Dierk Scheel, Dr. Justin Lee Thema der Dissertation: "Charakterisierung zweier MAP Kinase
10/2012 - 08/2014	Substrate mit PHD-Domanen in <i>Arabidopsis thaliana</i>
10/2012 - 00/2014	Martin Luthar Universität Helle Wittenberg
	Wartin-Lutier Oniversität Hane- wittenberg
	Masterarbeit in der AG "Zelluläre Signaltransduktion" am Leibniz- Institut für Pflanzenbiochemie (IPB) in Halle/Saale,
	Prof. Dr. Dierk Scheel, Dr. Justin Lee
	Thema: "Analysen zum Einfluss eines PHD-Domänen Proteins auf die abwehrrelevante Genexpression in <i>Arabidopsis thaliana</i> "
10/2008 - 07/2012	Bachelorstudium Biochemie,
	Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg
	Bachlorarbeit in der Abt. Angewandte Biowissenschaftliche Forschung, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg Biozentrum
	PD Dr. Margret Köck
	Thema: "Enzymatische Charakterisierung drei Phosphat-Mangel induzierter Phosphatasen aus <i>Phaseolus vulgaris</i> "
09/2003 - 05/2008	Abitur am Domgymnasium Merseburg
Publikationen: keine	

Halle (Saale),_____

Annekatrin Sawusch

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich durch meine Unterschrift an Eides statt, dass ich die eingereichte Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Es sind ausschließlich die von mir angegeben Quellen und Hilfsmittel verwendet worden. Sämtliche wörtliche und nicht wörtliche Zitate habe ich als solche gekennzeichnet.

Mit dieser Dissertationsschrift bewerbe ich mich erstmalig um die Erlangung eines Doktorgrades.

Halle(Saale), _____

Annekatrin Sawusch