

Die Interaktion von 14-3-3 Proteinen mit NON- PHOTOTROPIC HYPOCOTYL 3: Untersuchungen zur Komplexbildung und funktionellen Bedeutung

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
M. Sc. Tanja Schmidt
aus Erfurt

Tübingen
2022

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

22.03.2022

Dekan:

Prof. Dr. Thilo Stehle

1. Berichterstatter/-in:

Prof. Dr. Claudia Oecking

2. Berichterstatter/-in:

Prof. Dr. Klaus Harter

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis.....	X
1. Einleitung	1
1.1. Auxin.....	1
1.2. PIN-Proteine.....	2
1.3. Blaulichtperzeption.....	4
1.4. Phototropine.....	5
1.5. NPH3/RPT2-artige Proteinfamilie (NRL).....	7
1.5.1. NPH3: Ein Schlüsselprotein im Phototropismus	7
1.5.2. RPT2.....	9
1.5.3. Weitere NRLs.....	10
1.6. 14-3-3 Proteine	11
1.7. Ziel dieser Arbeit	13
2. Material	15
2.1. Feinchemikalien und Verbrauchsmaterialien	15
2.2. Oligonukleotide/ Primer	16
2.3. Vektoren.....	16
2.4. Antikörper.....	16
2.5. Enzyme	17
2.6. Organismen.....	17
3. Methoden	19
3.1. Mikrobiologische Methoden.....	19
3.1.1. Anzucht der Bakterien	19
3.1.2. Transformation von Bakterien	19
3.1.3. Heterologe Proteinexpression in Bakterien.....	20
3.2. Pflanzen-Methoden	20
3.2.1. Anzucht der Pflanzen	20

Inhalt

3.2.2.	Transformation der Pflanzen	21
3.2.3.	Bestimmung der phototropen Reaktion etiolierter Keimlinge	22
3.2.4.	Blaulich-Bestrahlung von <i>N. benthamiana</i>	22
3.2.5.	Blaulich-Bestrahlung von <i>A. thaliana</i> -Keimlingen	22
3.2.6.	Evaluierung stabil transformierter homozygoter <i>Arabidopsis</i> -Linien.....	22
3.3.	Nukleinsäure-Methoden	23
3.3.1.	Plasmid-Aufreinigung und Sequenzierung.....	23
3.3.2.	Restriktion der Plasmide, Agarose-Gelelektrophorese und Visualisierung.....	23
3.3.3.	PCR-Methoden	24
3.3.4.	Klonierungen.....	26
3.4.	Biochemische Methoden	27
3.4.1.	<i>In vitro</i> Transkription und Translation	27
3.4.2.	Aufreinigung GST-getaggtter Proteine aus Bakterien	27
3.4.3.	Quantifizierung des Proteingehaltes.....	28
3.4.4.	SDS-PAGE	28
3.4.5.	Färbung der SDS-Gele.....	29
3.4.6.	Proteintransfer auf Nitrocellulose-Membran	30
3.4.7.	Immunologischer Nachweis von Proteinen.....	30
3.4.8.	Proteinextraktion aus Pflanzengewebe	31
3.4.9.	Zell-Fraktionierung (Mikrosomenpräparation)	31
3.4.10.	Co-Immunopräzipitation	32
3.4.11.	MS-Analyse (PCT)	33
3.4.12.	Lipid-Overlay-Assay	34
3.4.13.	Liposomen-Bindeassay	34
3.4.14.	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)	35
4.	Ergebnisse	37
4.1.	Die Interaktion von 14-3-3 und NPH3 erfolgt <i>in planta</i> über ein C-terminales Bindemotiv.....	38
4.2.	Die Bindung von 14-3-3 an NPH3 erfolgt in Abhängigkeit von Blaulicht.....	39

Inhalt

4.3. Die Assoziation von 14-3-3 an NPH3 beeinflusst dessen zelluläre Lokalisation sowie die phototrope Reaktion.....	45
4.4. Der C-terminale Bereich von NPH3 ist essentiell für die Bindung an polyacide Phosphoglycerolipide.....	47
4.5. Eine amphipathischen Helix im C-terminalen Teil von NPH3 ist essentiell für die Bindung an polyacide Phosphoglyceride <i>in vitro</i>	52
4.6. Die Bedeutung der subzellulären Lokalisation von NPH3 für seine Funktion in der phototropen Reaktion.....	56
4.7. NPH3 zirkuliert zwischen Plasmamembran und Cytosol.....	60
4.8. Identifizierung von Licht-abhängigen <i>in vivo</i> Phosphorylierungspositionen in NPH3	64
4.9. Untersuchung einzelner Phosphorylierungspositionen auf Veränderungen des Phosphorylierungsstatus von NPH3 sowie dessen Lokalisation.....	70
5. Diskussion.....	77
5.1. Molekularer Mechanismus der Plasmamembran-Assoziation von NPH3.....	77
5.2. Auswirkung und physiologische Signifikanz der Interaktion von 14-3-3 und NPH3.....	79
5.3. Posttranslationale Modifikationen von NPH3: Ein derzeitiger Kenntnisstand	81
5.4. Neuartiges Modell zur phototropen Reaktivität von NPH3	82
5.5. Blaulicht-induzierte Modifikationen von <i>in vivo</i> -Phosphorylierungsstellen in NPH3.....	85
6. Zusammenfassung.....	91
7. Literaturverzeichnis:	95
8. Danksagung	107

Abkürzungsverzeichnis

A	Amper
A	Alanin
<i>A.thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A.tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ABCB19	ATP-BINDING CASSETTE 19
AGC	cAMP-dependent protein kinase A, cGMP-dependent protein kinase G, phospholipid-dependent protein kinase C
AHA	H ⁺ -ATPase
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AUX1/LAX	AUXIN-RESISTANT 1/LIKE AUX1
Bakt.	Bakterien
Bidest.	Doppelt destilliert
BKI1	BRI1 KINASE INHIBITOR 1
BL	mit Blaulicht belichtet
b, bp	Basenpaare
BLUS1	BLUE LIGHT SIGNALING 1
BRI1	BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1
BSA	Rinderserumalbumin
BTB	<i>Broad complex, tramtrack, bric a brac</i>
BZR1	BRASSINAZOLE RESISTANT 1
°C	Grad Celsius
Cam	Chloramphenicol
CAV	Caveolin
CBB	Coomassie-Brilliantblau
CBC1	CONVERGENCE OF BLUE LIGHT AN CO ₂ 1
CDS	Coding sequence
CHX	Cycloheximid
CINV1	Cytosolische Invertase 1
CLSM	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
CPT1	Coleoptile Phototropism 1
CRL	Cullin-ring ubiquitin ligase
CRY	Cryptochrom
CT	C-terminale 51 Aminosäuren von NPH3
D	etioliert, in Dunkelheit inkubiert
D	Aspartat
D6PK	D6 Protein-Kinase
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotid-Triphosphat
DOT3	DEFECTIVELY ORGANIZED TRIBUTARIES 3
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E	Glutamat
EIN2	Ethylene-insensitive 2

Inhalt

ENP	ENHANCER OF PINOID
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FKF1	Flavin-binding kelch repeat F-box 1
FMN	Flavinmononukleotid
g	Gramm
g	(Zentrifugation) G-Zahl, Beschleunigungsgröße
Gent	Gentamycin
GFP	Green fluorescent protein
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HA	Hämagglutinin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
Hyg	Hygromycin
IAA	Indol-3-Essigsäure
IDR	<i>Intrinsically disordered regions</i>
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
k	Kilo-
K	Lysin
Kan	Kanamycin
l	Liter
L	Leucin
L	mit Blaulicht belichtet
LB	Left border
LC	Liquid-Chromatography
LKP2	LOV kelch protein 2
LOV	Light, oxygen and voltage
LPA	Lysophosphatidsäure
LPC	Lysophosphocholin
LUV	Large unilamellar vesicles
m	Meter
m	Milli-
M	Molar
M	Methionin
μ	Micro-
MAB4	MACCHI-BOU 4
MDR1	MULTIPLE DRUG RESISTANCE 1
MEL	MAB4/ENP/NPY1-like
min	Minute
MS (Medium)	Murashige & Skoog
MS	Massenspektrometrie
NCH1	NRL PROTEIN FOR CHLOROPLAST MOVEMENT 1
n	Nano-
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
NPH	Non-phototropic hypocotyl
NPY1	NAKED PINS IN YUCCA 1
NRL	NPH3/RPT2-like

Inhalt

OD	Optische Dichte
p	Pico-
P35S	35S-Promotor
PA	Phosphatidsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAO	Phenylarsinoxid
PAS	Per-ARNT-Sim
PBS	Phosphate-buffered Saline
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCT	Proteome Center Tübingen
PE	Phosphatidylethanolamin
Pfl.	Pflanzen
PGP19	P-GLYCOPROTEIN 19
phot	Phototropin
Phy	Phytochrom
PI	Phosphatidylinositol
PI4P	Phosphatidylinositol-4-Phosphat
PID	PINOID
PIF	PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR
PIN	Pin-formed
PKS	PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE
PM	Plasmamembran
POD	Peroxidase
POZ	<i>Pox virus and zinc finger</i>
PS	Phosphatidylserin
pS744A	Antikörper gegen C-terminales Peptid von NPH3 mit phosphoryliertem Serin an Position 744
PVP	Polyvinylpyrrolidon
R	Arginin
RB	Right border
R-D	Retransfer in Dunkelheit
RFP	Red fluorescent protein
rpm	Rounds per minute
RPT	Root Phototropism
S	Serin
s, sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Spec	Spectinomycin
SPS1	Saccharose-Phosphatsynthase 1
T	Threonin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-buffered saline
T-DNA	Transferierte DNA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TnT	Transkription und Translation (<i>in vitro</i> -System)
TX-100	Triton™-X-100
UV	Ultraviolett

Inhalt

(v/v)	volume/volume
vs.	versus
W	Tryptophan
WAG	WAVY ROOT GROWTH
WT	Wildtyp
(w/v)	weight/volume
Y2H	Yeast-two-Hybrid-System
Zeo	Zeoxanthin
ZTL	Zeitlupe

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 4.1: NPH3 und 14-3-3 (Omega) interagieren in planta	38
Abbildung 4.2: NPH3 bindet 14-3-3 Blaulicht-abhängig	40
Abbildung 4.3: 14-3-3 bindet Blaulicht-abhängig an NPH3	43
Abbildung 4.4: Die Bindung von 14-3-3 an NPH3 ist für die phototrope Reaktion in Keimlingen von <i>A. thaliana</i> notwendig	45
Abbildung 4.5: Die Bindung von 14-3-3 an NPH3 beeinflusst dessen subzelluläre Lokalisation in <i>A. thaliana</i>	46
Abbildung 4.6: Der C-terminale Bereich von NPH3 enthält putativ basisch und hydrophobe Motive und zeigt in vitro eine Präferenz für polyacide Phospholipide	50
Abbildung 4.7: Die C-terminalen 51 Aminosäuren von NPH3 binden an Liposomen mit negativ geladenen Phosphoglyceriden	51
Abbildung 4.8: Zwei BH-Motive befinden sich im C-terminalen Bereich von NPH3	52
Abbildung 4.9: In silico-Analyse: der Austausch der basischen oder hydrophoben Aminosäuren der C-terminalen BH-Motive von NPH3 zu Alanin verringert deren berechneten BH-Score	53
Abbildung 4.10: Veränderungen der BH-Motive verringern die Assoziation von NPH3 an polyacide Phosphoglyceride in vitro	54
Abbildung 4.11: Veränderungen der BH-Motive im C-terminalen Bereich von NPH3 verringern die Bindung an polyacide Phosphoglyceride enthaltende Liposomen	55
Abbildung 4.12: subzelluläre Lokalisation von NPH3-Varianten in transgenen Linien von <i>A. thaliana</i> in <i>nph3-7</i>	57
Abbildung 4.13: Veränderungen des C-terminalen Bereiches von NPH3 beeinträchtigen die phototrope Reaktion in stabil transformierten Linien im <i>nph3-7</i> -Hintergrund von <i>A. thaliana</i> unabhängig von <i>phot1</i>	59
Abbildung 4.14: NPH3 zyklisiert zwischen Plasmamembran und Cytoplasma in transgenen <i>nph3-7</i> -Linien von <i>A. thaliana</i>	61
Abbildung 4.15: Der Phosphorylierungsstatus von NPH3 wird durch Blaulicht verändert	63
Abbildung 4.16: Bereits identifizierte in vivo Phosphorylierungspositionen in NPH3 aus der Literatur	66
Abbildung 4.17: MS-Analysen zur Identifizierung von Phosphorylierungsunterschieden in etilierten und Blaulicht-behandelten Keimlingen geben Hinweise auf Blaulicht-regulierte Phosphorylierungspositionen in NPH3	68
Abbildung 4.18: Einteilung der detektierten Phosphorylierungspositionen und jener aus der Literatur in Cluster	69
Abbildung 4.19: Die Mimikrierung/ Unterbindung der Phosphorylierung ausgewählter Positionen verändert nicht die subzelluläre Lokalisation von NPH3 in Blättern von <i>N. benthamiana</i>	72
Abbildung 4.20: Die Mimikrierung der Phosphorylierung an bis zu fünf Positionen in NPH3 beeinflusst dessen elektrophoretisches Laufverhalten aus Blattextrakten von <i>N. benthamiana</i>	74
Abbildung 5.1: Zyklus-Modell von NPH3	84

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 2-1: verwendete Vektoren</i>	<i>16</i>
<i>Tabelle 2-2: verwendete erste und zweite Antikörper für die Immunoblot-Detektionen.....</i>	<i>16</i>
<i>Tabelle 2-3: Verwendete Enzyme</i>	<i>17</i>
<i>Tabelle 2-4: verwendete Medien.....</i>	<i>18</i>
<i>Tabelle 2-5: verwendete Antibiotika zur Selektion von Bakterien und Pflanzen</i>	<i>18</i>
<i>Tabelle 3-1: Elongationsparameter der unterschiedlichen DNA-Polymerasen</i>	<i>24</i>
<i>Tabelle 3-2: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgelen (in ml).....</i>	<i>29</i>
<i>Tabelle 3-3: verwendete Pufferkombinationen zur Extraktion von Proteinen aus Pflanzenmaterial für Co-Immunopräzipitation</i>	<i>33</i>
<i>Tabelle 4-1: Daten der MS-Analyse der 14-3-3:GFP-Coimmunopräzipitation.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabelle 4-2: Rohdaten sowie normalisierte Daten aus zwei MS-Analysen nach GFP:NPH3-Präzipitation.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabelle 4-3: D/BL-Verhältnisse aus zwei MS-Messungen zur Detektion und Quantifizierung von Phosphorylierungspositionen in NPH3</i>	<i>67</i>

1. Einleitung

Als sessile Lebewesen sind Pflanzen optimal an ihren Standort angepasst. Der bemerkenswerten Entwicklungsplastizität von Pflanzen kommt zudem eine Schlüsselrolle bei Adaptationsprozessen an sich verändernde lokale abiotische und/oder biotische Bedingungen zu. Die phototrope Reaktion demonstriert dies auf beeindruckende Weise. Bereits im Keimlingsstadium richten Pflanzen ihr Wachstum zum einfallenden Licht aus, um photosynthetisch aktive Organe optimal zur Lichtquelle auszurichten.

1.1. Auxin

Darwin's Substanz

Charles Darwin und dessen Sohn Francis beobachteten bereits vor 140 Jahren, dass sich sowohl mono- als auch dikotyledone Pflanzen in Richtung eines seitlich eintreffenden Lichtreizes neigen (Darwin, 1880). Bei Versuchen mit Coleoptilen (Schutzorgane für das erste Blatt bei Poaceae) fanden sie heraus, dass die Perzeption des Lichtreizes in der Spitze der Coleoptile erfolgt, sich jedoch der basal gelegene Teil der Coleoptile in Richtung des Lichtreizes krümmt. Peter Boysen-Jensen vermutete 1913 eine Substanz, welche von der Spitze des Keimlings basal diffundiert und dort ein differentielles Wachstum auslöst (Christie und Murphy, 2013).

Die Cholodny-Went-Hypothese

Frits Went identifizierte Darwin's Substanz 1929 als das Pflanzenhormon Auxin in *Avena sativa* (Went, 1929). Die Cholodny-Went-Hypothese besagt, dass Tropismen aus einer Umverteilung von Auxin resultieren, welche durch einen gerichteten Reiz wie Gravitation oder Perzeption eines (Blaulicht)-Reizes ausgelöst wird (Cholodny, 1927; Went und Thimann, 1937). Unilateraler Lichteinfall resultiert in der Etablierung eines lateralen Auxingradienten, welcher höhere Auxinkonzentrationen auf der vom Licht abgewandten Seite aufweist. Dieser Gradient setzt sich longitudinal abwärts im Hypokotyl fort, sodass die Auxin-induzierte Zellstreckung ein asymmetrisches Längenwachstum zwischen der belichteten und der beschatteten Seite des Hypokotyls auslöst. Der Keimling krümmt sich zur Lichtquelle hin (positiver Phototropismus), die Wurzel neigt sich von der Lichtquelle weg (negativer Phototropismus) (Went und Thimann, 1937; Esmon *et al.*, 2006; Holland *et al.*, 2009; Christie und Murphy, 2013).

1. Einleitung

Polarer Auxin-Transport

Das Phytohormon Auxin ist für nahezu alle pflanzlichen Entwicklungsprozesse von Bedeutung und der polare Auxin-Transport spielt dabei eine zentrale Rolle. Im Sproß erfolgt der Transport beispielsweise strikt von der Spitze zur Basis. Dieser polare Transport ermöglicht den Aufbau vektorieller Auxin-Gradienten, welche differentiellen Wachstumsprozessen zugrunde liegen und Auxin-Maxima etablieren, welche positionelle Signale für die Organogenese darstellen (Swarup *et al.*, 2001; Grunewald und Friml, 2010; Ganguly *et al.*, 2012).

Gemäß des chemiosmotischen Modells kann das natürliche Auxin Indol-3-Essigsäure (IAA), welches im Apoplasten (pH ~5.5) vornehmlich in der protonierten Form IAAH vorliegt, durch die Membran der Pflanzenzelle frei diffundieren und somit in die Zelle gelangen (Raven, 1975). Nicht protoniertes IAA gelangt über sogenannte Auxin-Influx-Carrier (z. B. Mitglieder der AUXIN-RESISTANT 1/LIKE-AUX1 Proteinfamilie (AUX1/LAX)) in die Zelle. Der neutrale pH im Cytosol führt zur Deprotonierung von IAAH zu IAA⁻. Als schwache Säure kann Auxin nicht mehr frei über die Plasmamembran diffundieren und muss aktiv durch Auxin-Efflux Carrier aus der Zelle heraus transportiert werden. Die Lokalisation dieser Efflux-Carrier gibt somit die Richtung des Auxintransportes vor.

Zu den Auxin-Efflux-Carriern zählen ABCB19/MDR1/PGP19 (ATP-BINDING CASSETTE 19 /MULTIPLE DRUG RESISTANCE 1 /P-GLYCOPROTEIN 19) beziehungsweise ABCB1/PGP1 (Noh *et al.*, 2001; Geisler *et al.*, 2005; Blakeslee *et al.*, 2007; Bouchard *et al.*, 2006), welche auch in den Auxintransport über größere Distanzen in der Pflanze involviert sind. ABCB19 wirkt sich dabei negativ auf den Phototropismus aus (Noh *et al.*, 2003). Die wohl wichtigsten Auxin-Efflux-Carrier sind jedoch Vertreter der PIN-FORMED (PIN)-Proteine.

1.2. PIN-Proteine

In *Arabidopsis* existieren acht PIN-FORMED Proteine (PINs) (Krecek *et al.*, 2009), welche als Auxin-Efflux-Carrier fungieren. Ihren Namen erhielten sie aufgrund des Phänotypes der Pflanzen, welche kein funktionales PIN1 ausbilden, da diese Pflanzen keine bzw. rudimentäre Blüten ausbilden (Okada *et al.*, 1991; Galweiler *et al.*, 1998). Die Lokalisation aller acht PIN-Proteine in Membranen wird durch jeweils zehn Transmembrandomänen ermöglicht, wobei eine hydrophile cytoplasmatische Schleife von jeweils fünf Transmembrandomänen flankiert wird (Krecek *et al.*, 2009). In der PIN-Protein-Familie werden kanonische (lange) und nicht-kanonische (kürzere) Proteine unterschieden, wobei die Länge der hydrophilen Schleife variiert. Zu den kurzen, nicht-kanonischen PINs zählen PIN5 und PIN8. Sie lokalisieren vorrangig in Endosomen oder dem Endoplasmatischen Retikulum und sind somit nicht in den interzellulären Auxin-Transport involviert, erhalten jedoch die intrazelluläre Auxin-Homöostase

1. Einleitung

aufrecht (Mravec *et al.*, 2009; Ding *et al.*, 2012). Die kanonischen Proteine PIN1 bis PIN4 und PIN7 sind im Allgemeinen Zelltyp-spezifisch exprimiert, lokalisieren in der Plasmamembran und determinieren durch ihre subzelluläre Polarität die Richtung des Auxin-Fluxes im entsprechenden Gewebe (Wisniewska *et al.*, 2006). Ihre Lokalisation in der Plasmamembran wird unter anderem durch die hydrophile Schleife beeinflusst, die jedoch für die polare subzelluläre Verteilung der PIN-Proteine unerheblich zu sein scheint (Ganguly *et al.*, 2014). In Bezug auf die Wurzel lokalisiert PIN1 basal in vaskulären Zellen und vermittelt den Transport von Auxin zur Wurzelspitze, während PIN2 apikal in der Epidermis vorliegt und dort den Auxintransport Richtung Wurzelbasis bewerkstelligt (Müller *et al.*, 1998; Galweiler *et al.*, 1998). PIN3 ist unter anderem im Hypokotyl exprimiert und hier wurde eine Beeinflussung der subzellulären Polarität in Abhängigkeit von Blaulicht beschrieben (Ding *et al.*, 2011). In Dunkelheit befindet sich PIN3 sowohl an der inneren als auch an der äußeren lateralen Membran von Endodermis-Zellen des Hypokotyls etiolierter Keimlinge, verlagert sich jedoch bei unilateraler Bestrahlung mit Blaulicht zur inneren lateralen Seite der Membran. PIN3 ist zudem in die gravitrope Antwort involviert (Friml *et al.*, 2002 a; Rakusova *et al.*, 2011). PIN4 ist für die Verteilung von Auxin in der Wurzelspitze essentiell, da PIN4 durch die basale Lokalisation in Endodermis- und Cortex-Zellen und der unpolaren Verteilung in der Columella Auxin in die Wurzelspitze befördert (Friml *et al.*, 2002 b). Besonders wichtig für die frühe Entwicklung ist jedoch PIN7, welches zusammen mit PIN1 einen apikal-basalen Auxin-Gradienten während der Embryogenese etabliert (Friml *et al.*, 2003). Für die positive phototrope Antwort sind die Proteine PIN3, PIN4 und PIN7 essentiell, wobei einzig die Triple-Mutante *pin3 pin4 pin7* keine phototrope Antwort mehr aufweist, während Doppel- oder Einzelmutanten der PINs noch phototrop reagieren (Willige *et al.*, 2013).

PIN-Proteine zyklieren kontinuierlich mittels endozytotischem Vesikeltransport zwischen Plasmamembran und Endosomen. Die endosomale Rezyklierung zur Plasmamembran ermöglicht folglich eine schnelle Veränderung der subzellulären Polarität als Folge von Umwelteinflüssen (Friml *et al.*, 2002 a, Feraru *et al.*, 2012).

Die Aktivität der PINs als Auxin-Efflux-Carrier wird über die Phosphorylierung bestimmter Positionen innerhalb der hydrophilen Schleife gesteuert (Weller *et al.*, 2017). Insgesamt existieren fünf Phosphorylierungspositionen, welche in den hydrophilen Schleifen der kanonischen PINs konserviert sind (Huang *et al.*, 2010; Zourelidou *et al.*, 2014). Diese Aminosäurereste werden durch Mitglieder der AGCVIII (cAMP-dependent protein kinase A, cGMP-dependent protein kinase G, phospholipid-dependent protein kinase C)-Proteinkinase-Familie, D6-Protein-Kinase (D6PK) und PINOID (PID), *in vitro* phosphoryliert, wobei die unterschiedlichen Positionen von beiden Kinasen – wenn auch mit unterschiedlichen Präferenzen - phosphoryliert werden. In Oozyten von *Xenopus laevis* wurde der PIN1-

1. Einleitung

vermittelte Auxin-Efflux durch D6PK und PID aktiviert (Huang *et al.*, 2010; Zourelidou *et al.*, 2014). D6PK und PID sind jedoch funktionell divergent (Zourelidou *et al.*, 2009; Zourelidou *et al.*, 2014). Eine Überexpression der apolar lokalisierenden Kinase PID, nicht jedoch der polar lokalisierenden D6PK, induziert eine Verschiebung der subzellulären Polarität von PIN1 von der basalen zur apikalen Seite in Wurzelzellen (Dhonukshe *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2010). Die erwähnten Präferenzen für die Phosphorylierungspositionen in PIN1 sind jedoch nicht ausreichend, um die differentiellen Effekte der zwei Kinasen zu erklären (Weller *et al.*, 2017). Neben PIN1 wird auch die Polarität von PIN3 durch PID sowie die homologen Kinasen WAG1 (WAVY ROOT GROWTH 1) und WAG2 beeinflusst (Ding *et al.*, 2011; Rakusova *et al.*, 2011).

Darüber hinaus wurde beschrieben, dass die NPH3-ähnlichen Proteine MAB4 (MACCHI-BOU 4), MEL1 und MEL2 (MAB4/ENP/NPY1-like) die subzelluläre Polarität von PIN-Proteinen aufrecht erhalten (Furutani *et al.*, 2014). Ein aktuelles Modell beschreibt die Ausbildung eines PID:PIN:MAB4/MELs-Multiproteinkomplexes in der Plasmamembran. Die Phosphorylierung der PIN-Proteine durch PID hat dabei einen positiven Einfluss auf die Rekrutierung der MAB4/MEL-Proteine an die Plasmamembran, wodurch die laterale Diffusion der PIN-Proteine eingeschränkt wird und die Polarität letzterer aufrecht erhalten bleibt (Glanc *et al.*, 2021).

Zudem ist bekannt, dass die 14-3-3-Isoformen der Epsilon-Gruppe zur Polarität der PIN-Proteine beitragen (Keicher *et al.*, 2017). Die Reduktion der Expression von drei ubiquitär exprimierten 14-3-3-Isoformen mittels RNA-Interferenz führte zu veränderten Auxin-Verteilungsmustern und damit assoziierten typischen „Auxintransport-Phänotypen“ in transgenen Keimlingen. Im Hinblick auf die zu beobachtenden Veränderungen in der polaren Verteilung von PIN-Proteinen wurde eine 14-3-3-vermittelte Regulation der Rezyklierung zur Plasmamembran als wahrscheinliche Ursache angesehen (Keicher *et al.*, 2017).

1.3. Blaulichtperzeption

Das Reziprozitätsgesetz der Fotografie besagt, dass die totale Energie, welche bei einer Fotoaufnahme auf den Film trifft, abhängig von Belichtungszeit und Lichtintensität ist. Hierbei kann Licht mit niedriger Intensität über eine längere Zeit ebenso viel Energie liefern wie ein kurzer Lichtpuls von hoher Intensität (Bunsen und Roscoe, 1862). Julius von Sachs fand 1864 heraus, dass Blaulicht mit einer Wellenlänge von 390 bis 500 nm den besten Stimulus für die phototrope Reaktion darstellt (Christie und Murphy, 2013). In Pflanzen gibt es zwei Phasen der phototropen Reaktion (Christie, 2007). Der erste positive Phototropismus ist abhängig von der eintreffenden Lichtenergie eines Blaulichtpulses und ist lediglich mit einer Krümmung der Coleoptilspitze assoziiert. Die Wirkung des Blaulichtpulses unterliegt hierbei dem Bunsen-Roscoe-Gesetz der Reziprozität, sodass längere Blaulichtpulse mit niedriger Intensität den

1. Einleitung

gleichen Effekt erzielen wie kürzere Blaulichtpulse mit höherer Intensität (Christie und Murphy, 2013). Die Energie des insgesamt bei dem Keimling eintreffenden Blaulichtpulses ist gering. Der zweite positive Phototropismus ist zeitabhängig, sodass der Blaulichtpuls über eine längere Zeitspanne erfolgen muss und dadurch zu einer phototropen Krümmung der gesamten Coleoptile führt (Christie und Murphy, 2013). In beiden Fällen weisen die mit Blaulicht behandelten Keimlinge selbst dann noch eine phototrope Reaktion auf, wenn diese nach dem Blaulichtpuls wieder in Dunkelheit inkubiert wurden (Haga und Sakai, 2012). Der zweite positive Phototropismus wird außerdem durch kontinuierliche Blaulicht-Bestrahlung induziert.

Neben Blaulicht kann auch Ultraviolett-Strahlung (315 – 380 nm UV-A, 280 – 315 nm UV-B) eine phototrope Reaktion auslösen (Liscum *et al.*, 2014; Fankhauser und Christie, 2015). In Pflanzen erfolgt die Perzeption von UV-B durch den Rezeptor UVR8 (Jenkins, 2014), welcher auch in die Perzeption von Blaulicht involviert ist (Demarsy *et al.*, 2012). Für die phototrope Reaktion sind jedoch lediglich die beiden Phototropine phot1 und phot2 essentiell (Huala *et al.*, 1997; Christie *et al.*, 1998; Christie, 2007; Rademacher und Offringa, 2012).

1.4. Phototropine

Phototropine wurden erstmals 1988 als Plasmamembran-lokalisierte Proteine in etiolierten Erbsen-Keimlingen (*Pisum sativum*) beschrieben, die durch Blaulicht phosphoryliert werden (Gallagher *et al.*, 1988). Später wurden die *Arabidopsis*-Mutanten *nph1* bis *nph4* (NON PHOTOTROPIC HYPOCOTYL1-4) beschrieben, welche keine phototrope Antwort nach unilateraler Belichtung zeigten (Liscum und Briggs, 1995). NPH1 erwies sich als Apoprotein eines Photorezeptors, der später als Phototropin 1 (phot1) bezeichnet wurde (Christie *et al.*, 1998).

Ebenso wie PID, WAG1, WAG2 und D6PK gehören auch Phototropine zu der Proteinfamilie der Pflanzen-spezifischen AGCVIII-Kinasen, wobei Phototropin 1 und 2 die Untergruppe AGC4-Kinasen ausbilden, während PID sowie WAG1 und WAG2 der Untergruppe AGC3 zugeordnet werden (Galvan-Ampudia und Offringa, 2007). PIN1 wird jedoch nicht durch phot1 aktiviert, ebenso wenig wird PIN3 durch phot1 *in vitro* phosphoryliert (Zourelidou *et al.*, 2009; Ding *et al.*, 2011).

In höheren Pflanzen wie *Arabidopsis* gibt es zwei Phototropine, Phototropin 1 (phot1) und Phototropin 2 (phot2) (Huala *et al.*, 1997; Christie *et al.*, 1998; Christie, 2007; Rademacher und Offringa, 2012). Im Blaulicht von geringer Intensität induziert phot1 die phototrope Reaktion, unter höheren Blaulichtintensitäten agieren phot1 und phot2 redundant (Liscum und Briggs, 1995; Sakai *et al.*, 2000; Sakai *et al.*, 2001). Beide Phototropine sind in weitere Blaulicht-abhängige Vorgänge involviert, etwa die Regulation der Stomata-Öffnung (Kinoshita

1. Einleitung

et al., 2001), die Entfaltung und Positionierung der Blätter (Sakamoto und Briggs, 2002; Inoue *et al.*, 2008 b) sowie die Bewegung und Ausrichtung von Chloroplasten im Licht (Sakai *et al.*, 2001).

Phototropine enthalten eine C-terminal lokalisierte Serin/Threonin-Kinase-Domäne, welche den AGCVIII-Kinase-Domänen zugeordnet wird. Die N-terminale, photosensorische Region enthält zwei LOV-Domänen (*light, oxygen and voltage*), LOV1 und LOV2 (Huala *et al.*, 1997; Christie *et al.*, 1998; Christie, 2007; Rademacher und Offringa, 2012). Diese LOV-Domänen gehören zu der Familie der PAS (Per-ARNT-Sim)-Domänen, welche in anderen Sensorproteinen enthalten sind (Huala *et al.*, 1997; Freddolino *et al.*, 2013). Die LOV-Domänen bestehen aus fünf Beta-Sheets und mehreren Alpha-Helices. Zwischen einem konservierten Cystein der LOV-Domäne und einem Blaulicht-absorbierenden Flavinmononukleotid-Chromophore (FMN) besteht im inaktiven Zustand eine nicht-kovalente Bindung (Christie *et al.*, 1998; Christie *et al.*, 1999; Sakai *et al.*, 2001; Freddolino *et al.*, 2013). Wird die LOV-Domäne belichtet, so bildet sich eine kovalente Bindung zwischen dem Schwefel des Cysteins und dem Kohlenstoffatom des FMNs aus (Christie, 2007; Christie *et al.*, 2015). Durch die Formation des FMN-Cysteinyll-Adduktes wird die Kinase-Aktivität von phot1 und phot2 aktiviert und es kommt zu einer Autophosphorylierung, die für die Funktion essentiell ist (Inoue *et al.*, 2008 a; Inoue *et al.*, 2011). Obwohl LOV1 und LOV2 strukturell ähnlich sind, dient LOV1 der Dimerisierung, während LOV2 für die Autophosphorylierung von phot1 unerlässlich ist (Matsuoka und Tokutomi, 2005; Christie, 2007; Inoue *et al.*, 2008 a; Kaiserli *et al.*, 2009). Es wird angenommen, dass in Dunkelheit zwei Helices der LOV2-Domäne mit der C-terminal lokalisierten Serin-Threonin-Kinasedomäne interagieren und diese inhibieren (Okajima, 2016). Die Blaulicht-induzierte Formation des FMN-Cysteinyll-Adduktes führt zu einer Konformationsänderung der LOV2-Domäne, die diese Autoinhibierung unterbindet (Inoue *et al.*, 2008 a; Okajima, 2016).

Die reversible Blaulicht-induzierte Aktivierung der Autophosphorylierung von phot1 sowie dessen Dephosphorylierung in Dunkelheit wird als Photocycling bezeichnet. Die Geschwindigkeit des Photocyclings kann durch den Austausch bestimmter Aminosäuren in der LOV2-Domäne reduziert oder erhöht werden (Hart *et al.*, 2019). Durch Aminosäureaustausche, welche zu einer Verlangsamung des Photozyklus von phot1 führen, verringert sich die Fähigkeit zur phototropen Reaktion in Keimlingen von *A. thaliana*. Schneller photozyklisierende Varianten zeigen hingegen eine vergleichbare phototrope Reaktion wie der Wildtyp.

In Dunkelheit lokalisieren phot1-Monomere an der Plasmamembran, der Mechanismus der Membranassoziation ist bislang ungeklärt (Sakamoto und Briggs, 2002; Xue *et al.*, 2018). Durch Blaulicht erhöht sich die Mobilität von phot1 an der Plasmamembran, dieses dimerisiert

1. Einleitung

und translokalisiert in Mikrodomänen. Ein Großteil des aktivierten Photorezeptors verbleibt weiterhin an der Plasmamembran, ein Teil wird jedoch über Endocytose internalisiert (Sakamoto und Briggs, 2002; Wan *et al.*, 2008; Kaiserli *et al.*, 2009). Diese Plasmamembran-Dissoziation scheint jedoch nicht essentiell für die phototrope Antwort zu sein (Preuten *et al.*, 2015).

Ungeachtet der Bedeutung der phot1-Kinase-Aktivität für phot1-vermittelte Prozesse sind wenige Transphosphorylierungssubstrate von phot1 bekannt. Dazu gehören BLUS1 (BLUE LIGHT SIGNALING 1, Takemiya *et al.*, 2013) und CBC1 (CONVERGENCE OF BLUE LIGHT AND CO₂ 1, Hiyama *et al.*, 2017), die an der Blaulicht-induzierten Stomata-Öffnung beteiligt sind, während die Phosphorylierung von ABCB19 (Christie *et al.*, 2011) sowie von PKS4 (PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 4, Demarsy *et al.*, 2012) den Hypokotyl-Phototropismus moduliert.

In Abhängigkeit von der Blaulicht-induzierten Autophosphorylierung konnten 14-3-3-Proteine der Non-Epsilon-Gruppe als Interaktionspartner von phot1 identifiziert werden, welche in Dunkelheit wieder dissoziieren (Kinoshita *et al.*, 2003; Inoue *et al.*, 2008 a; Sullivan *et al.*, 2009; Tseng *et al.*, 2012). Die Bindestelle für 14-3-3 befindet sich in der Hinge1-Region zwischen den beiden LOV-Domänen von phot1, während die Position für die funktionell essentielle phot1-Autophosphorylierung in dessen Kinasedomäne liegt. Eine physiologische Bedeutung der Interaktion von 14-3-3 konnte bislang nicht nachgewiesen werden (Inoue *et al.*, 2008 a; Sullivan *et al.*, 2009).

Weitere Interaktionspartner von phot1 sind Mitglieder der NRL (NPH3/RPT2-*like*) -Familie, welche im folgenden Kapitel vorgestellt werden.

1.5. NPH3/RPT2-artige Proteinfamilie (NRL)

Die NRL (NON PHOTOTROPIC HYPOCOTYL 3/ ROOT PHOTOTROPISM 2-*like*)-Proteinfamilie ist pflanzenspezifisch und umfasst 33 Mitglieder in *Arabidopsis thaliana* (Pedmale *et al.*, 2010). Namensgebend für diese NRL-Proteinfamilie sind die beiden Mitglieder NPH3 (NON PHOTOTROPIC HYPOCOTYL3, Motchoulski und Liscum, 1999) und RPT2 (ROOT PHOTOTROPISM 2, Sakai *et al.*, 2000).

1.5.1. NPH3: Ein Schlüsselprotein im Phototropismus

Erstmals wurde NPH3 im Jahre 1995 beschrieben. Hier zeigte Mutantenlinien im Vergleich zu Wildtypen keine phototrope Antwort auf unilaterale Blaulichtreize (Liscum und Briggs, 1995, *siehe Kapitel 1.4*). Die Loci erhielten die Bezeichnungen NPH1-4 (NON PHOTOTROPIC HYPOCOTYL 1-4). Wie bereits beschrieben entpuppte sich NPH1 später als Blaulichtrezeptor

1. Einleitung

phot1. NPH3 identifizierte man als Interaktionspartner von phot1 (Motchoulski und Liscum, 1999).

INPH3-*loss of function*-Mutanten sind bei unilateraler Blaulichtbestrahlung unabhängig von der Lichtintensität nicht mehr zu einer phototropen Antwort fähig (Liscum und Briggs, 1995; Motchoulski und Liscum, 1999; Inada *et al.*, 2004). Da die Autophosphorylierung von phot1 jedoch unbeeinträchtigt ist, wirkt NPH3 offensichtlich *downstream* von phot1 (Liscum und Briggs, 1995) und ist für die Ausbildung eines lateralen Auxingradienten bei der phototropen Reaktion essentiell (Haga *et al.*, 2005). Erstaunlicherweise spielt NPH3 keine Rolle in weiteren Phototropin-abhängigen Prozessen, wie beispielsweise der Öffnung der Stomata oder der Chloroplasten-Bewegung (Inada *et al.*, 2004).

Wie alle Mitglieder der NRL-Familie enthält NPH3 eine zentrale NPH3-Domäne, deren Funktion jedoch bislang unbekannt ist (Motchoulski und Liscum, 1999). N-terminal weist NPH3 eine BTB (*broad complex, tramtrack, bric a brac*) /POZ (*pox virus and zinc finger*) -Domäne auf, welche ebenso wie die im C-terminalen Bereich lokalisierte Coiled Coil-Domäne Protein-Protein-Interaktionen vermittelt (Motchoulski und Liscum, 1999). Tatsächlich interagiert NPH3 nicht nur mit phot1, sondern auch mit weiteren Proteinen der Signalkette, u.a. PKS1, PKS2 (de Carbonnel *et al.*, 2010) und RPT2, einem weiteren Mitglied der NRL-Proteinfamilie (Inada *et al.*, 2004). Für die Assoziation mit phot1 ist der C-terminale Bereich von NPH3 inklusive Coiled Coil Domäne verantwortlich (Motchoulski und Liscum, 1999), während der N-terminale Bereich einschließlich der BTB-Domäne für die Interaktion mit RPT2 benötigt wird (Inada *et al.*, 2004). *In vivo* bilden NPH3 und phot1 sowie phot2 zusammen mit PKS1 und PKS2 vermutlich einen Proteinkomplex, welcher an die Plasmamembran assoziiert (Lariguet *et al.*, 2006; de Carbonnel *et al.*, 2010).

Vergleichbar zu phot1 handelt es sich bei NPH3 um ein Plasmamembran-assoziiertes Protein. Auch hier ist der molekulare Mechanismus der Membranssoziation ungeklärt, jedoch scheint der C-terminale Bereich inklusive Coiled Coil Domäne von Bedeutung zu sein (Inoue *et al.*, 2008 b). Interessanterweise liegt NPH3 in etiolierten Keimlingen in phosphorylierter Form vor und wird nach Belichtung schnell dephosphoryliert – eine posttranslationale Modifikation, die aufgrund einer veränderten elektrophoretischen Mobilität des Proteins visualisiert werden kann (Pedmale und Liscum, 2007; Tsuchida-Mayama *et al.*, 2008). Die Phosphorylierung in Dunkelheit kann unabhängig von phot1 beobachtet werden (Pedmale und Liscum, 2007) und findet an zahlreichen Aminosäureresten von NPH3 statt (Tsuchida-Mayama *et al.*, 2008; Kimura *et al.*, 2021). Die Licht-induzierte und strikt phot-abhängige Dephosphorylierung (Pedmale und Liscum, 2007) korreliert mit einer Licht-induzierten Veränderung der subzellulären Lokalisation von NPH3 (Haga *et al.*, 2015). Während NPH3 in Dunkelheit an die Plasmamembran assoziiert, bildet es nach Belichtung aggregierte Partikel im Cytosol aus

1. Einleitung

(Haga *et al.*, 2015). Später konnte gezeigt werden, dass es sich dabei um membranlose biomolekulare Kondensate handelt, die offensichtlich konzentrationsabhängig im Cytoplasma gebildet werden (Reuter *et al.*, 2021). Sowohl die Licht-induzierte Dephosphorylierung von NPH3 als auch die cytosolische Kondensatbildung sind bei Re-Transfer in Dunkelheit reversibel (Pedmale und Liscum, 2007; Haga *et al.*, 2015). Ein Faktor, der für die Re-Etablierung des phosphorylierten Zustands und der Plasmamembran-Assoziation von NPH3 benötigt wird, scheint der Interaktionspartner RPT2 zu sein (Haga *et al.*, 2015). Zusammengefasst haben diese Beobachtungen zu einem Modell geführt, demzufolge der Phosphorylierungszustand von NPH3 die subzelluläre Lokalisierung und Funktion des Proteins bestimmen: die phot-unabhängige Phosphorylierung ist für die Funktion von NPH3 essentiell, um phototrope Signalprozesse an der Plasmamembran in Zusammenspiel mit phot1 zu initiieren, während die phot1-abhängige Dephosphorylierung die Internalisierung von NPH3 bedingt und so die Aktivität reduziert (Haga *et al.*, 2015; Sullivan *et al.*, 2019; Liscum *et al.*, 2020)

Christian Throm konnte 2017 in seiner Dissertation mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse zeigen, dass NPH3 mit 14-3-3 interagieren (Throm, 2017). Die Bindestelle für 14-3-3-Proteine konnte im C-terminalen Bereich *downstream* der Coiled Coil-Domäne von NPH3 identifiziert werden. Dies eröffnete die Frage nach der physiologischen Signifikanz sowie der funktionellen Konsequenz dieser Interaktion.

1.5.2.RPT2

ROOT PHOTOTROPISM 2 (RPT2) wurde ursprünglich im Zusammenhang mit Mutanten entdeckt, welche eine verringerte phototrope Antwort zeigten (Okada und Shimura, 1992). *RPT2*-Mutanten reagieren bei sehr schwacher Blaulichtintensität unter $0,1 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ normal phototrop, bei höheren Intensitäten werden jedoch signifikante Beeinträchtigungen der phototropen Reaktion deutlich (Sakai *et al.*, 2000; Inada *et al.*, 2004; Haga *et al.*, 2015). Ebenso wie NPH3 lokalisiert auch RPT2 an der Plasmamembran und coimmunopräzipitiert in *Arabidopsis* mit phot1 (Inada *et al.*, 2004; Lariguet *et al.*, 2006). In einem Yeast two-Hybrid (Y2H)-Assay interagiert der die BTB-Domäne enthaltende N-terminale Bereich von RPT2 mit der entsprechenden Domäne von NPH3 sowie den LOV-Domänen von phot1 (Inada *et al.*, 2004).

Die Blaulicht-abhängige Autophosphorylierung von phot1 hat keine Auswirkung auf die Interaktion mit RPT2 (Inada *et al.*, 2004; Kimura *et al.*, 2020). Ebenso beeinträchtigt RPT2 weder die Blaulicht-induzierte Dephosphorylierung noch die Plasmamembran-Dissoziation von NPH3 (Haga *et al.*, 2015). Wie bereits erwähnt, kann bei Überführung belichteter Keimlinge in Dunkelheit (oder auch bei verlängerter Belichtung) sowohl eine Re-Lokalisation von NPH3 an die Plasmamembran als auch die Re-Phosphorylierung des Proteins beobachtet werden.

1. Einleitung

Diese Prozesse finden in *rpt2* Null-Allelen nicht oder sehr verzögert statt (Haga *et al.*, 2015). Zudem ist bekannt, dass das instabile RPT2-Protein im Blaulicht phot1-abhängig stabilisiert wird (Kimura *et al.*, 2020) und unter diesen Bedingungen einen Komplex mit NPH3 und phot1 ausbilden kann (Haga *et al.*, 2015). Dies hat zu der Hypothese geführt, dass RPT2 für die Rekonstitution des aktiven phot1-NPH3 Komplexes an der Plasmamembran von Bedeutung ist.

1.5.3. Weitere NRLs

Ein weiteres Protein der NRL-Familie ist NCH1 (NRL PROTEIN FOR CHLOROPLAST MOVEMENT 1) (Suetsugu *et al.*, 2016), das zur gleichen phylogenetischen Subgruppe wie RPT2 gehört. Dieses Protein lokalisiert – ähnlich wie RPT2 und NPH3 – an der Plasmamembran und ist zur Interaktion mit phot1 befähigt. Sowohl NCH1 als auch RPT2 agieren *downstream* von phot1 und phot2 bei der Akkumulationsbewegung von Chloroplasten im Licht, sie sind jedoch nicht an der Ausweichbewegung von Chloroplasten aus Starklicht beteiligt.

Ebenfalls zur Familie der NRL-Proteine gehörig sind MACCHI-BOU (MAB4)/ ENHANCER OF PINOID (ENP)/NAKED PINS IN YUC MUTANTS (NPY1) – nachfolgend als MAB4 bezeichnet – sowie die homologen Proteine MAB4/ENP/NPY1-LIKE (MEL) 1 bis 4 (Furutani *et al.*, 2011). MAB4 zeigte in protodermalen Zellen der Cotyledonen von *Arabidopsis*-Embryonen eine identische periphere Polarität wie PIN1. MEL1 und MEL2 sind zwar auch in den protodermalen Zellen der Cotyledonen-Spitzen sowie in den provaskulären Zellen der Radicula-Spitze zu finden, jedoch lokalisieren diese basal. MEL3 und MEL4 lokalisieren hingegen basal in unterschiedlichen Geweben der Wurzelspitze in *Arabidopsis*-Embryonen. MAB4 trägt zur polaren Lokalisation von PIN1 während der Entwicklung der Cotyledonen in *Arabidopsis*-Embryonen bei, während MEL1 und MEL2 einen Einfluss auf die Lokalisation von PIN1 in provaskulären Zellen haben (Furutani *et al.*, 2007; Furutani *et al.*, 2011). Zudem tragen MEL1-4 spezifisch zur Regulation der subzellulären Polarität von PIN1 und PIN2 in der Wurzelspitze bei und regulieren so den Auxin-Transport (Furutani *et al.*, 2011). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass MAB4/MELs gemeinsam mit AGC-Kinasen die Polarität von PIN-Proteinen durch die Ausbildung eines Multiprotein-Komplexes aufrechterhalten (Glanc *et al.*, 2021). Demnach werden MAB4/MELs durch Interaktion mit PIN an die Plasmamembran rekrutiert und diese Assoziation wird durch PID-vermittelte PIN-Phosphorylierung verstärkt. Als Folge der Komplexbildung wird die laterale Diffusion der PIN-Proteine in der Membran limitiert.

Unter Einbezug der Tatsache, dass sowohl MAB4/MELs und NPH3 als auch PID und phot1 homologe Proteine sind, ergeben sich somit auf molekularer Ebene Ähnlichkeiten zwischen Organogenese und Phototropismus (Cheng *et al.*, 2008).

1. Einleitung

1.6. 14-3-3 Proteine

Ihren ungewöhnlichen Namen erhielten 14-3-3 Proteine nach zweidimensionaler Auftrennung abundanter Proteine des Rinderhirns gemäß ihres jeweiligen Laufverhaltens (Moore und Perez, 1967). Heute ist bekannt, dass Mitglieder der 14-3-3-Familie hochkonservierte Proteine darstellen, die W-förmige Dimere ausbilden und in die Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse über Protein-Protein-Interaktionen eingebunden sind (Ichimura *et al.*, 1987; Robinson *et al.*, 1994; Ferl, 1996; van Heusden, 2005). Die Assoziation von 14-3-3-Proteinen an eine Vielzahl zellulärer Polypeptide erfolgt im Allgemeinen sequenzspezifisch und phosphorylierungsabhängig (Muslin *et al.*, 1996; Yaffe *et al.*, 1997; Coblitz *et al.*, 2005; Ganguly *et al.*, 2005). Die Komplexbildung mit 14-3-3 ist essentiell für die Modifikation der Aktivität, Konformation oder Lokalisation des phosphorylierten Zielproteins (Mackintosh, 2004).

In eukaryotischen Zellen existieren meist mehrere 14-3-3-Isoformen. *Arabidopsis* exprimiert 13 Isoformen, welche zwei phylogenetischen Gruppen, der ursprünglichen Epsilongruppe sowie der Nicht-Epsilon-Gruppe zugeordnet werden können (DeLille *et al.*, 2001; Rosenquist *et al.*, 2001; Sehnke *et al.*, 2002).

14-3-3-Proteine assoziieren an den C-Terminus der H⁺-ATPase, einer bedeutenden Protonenpumpe der pflanzlichen Plasmamembran, welche einen sekundär aktiven Transport von Nährstoffen und Ionen ermöglicht. Die autoinhibitorische C-terminale Domäne der H⁺-ATPase senkt die Aktivität der Protonenpumpe, durch die Phosphorylierung des C-terminalen Bindemotives assoziieren 14-3-3 und induzieren so eine Konformationsänderung, welche die autoinhibitorische Aktivität der C-terminalen Domäne aufhebt und somit die Aktivität der Protonenpumpe erhöht wird (Oecking C., 1997; Kinoshita und Shimazaki, 1999; Ueno *et al.*, 2005; Speth *et al.*, 2010). In Schließzellen wird die Stomata-Öffnung durch die Blaulicht-induzierte Phosphorylierung der H⁺-ATPase in Abhängigkeit von Phototropin induziert (Ueno *et al.*, 2005).

Ebenfalls zu den Zielproteinen von 14-3-3 gehört BZR1 (BRASSINAZOLE RESISTANT 1), ein wichtiger Transkriptionsfaktor in der Signalweiterleitung des Brassinoid-Pathways (Ryu *et al.*, 2007), dessen Import in den Nukleus durch die Assoziation von 14-3-3 verhindert wird, sodass BZR1 im Cytoplasma verbleibt. Binden Brassinosteroide an die in der Plasmamembran befindlichen Rezeptoren, so wird BZR1 von 14-3-3 freigegeben und lokalisiert in den Nukleus, während 14-3-3 an einen weiteren Bindepartner assoziiert, BKI1 (BRI1 KINASE INHIBITOR 1; Wang *et al.*, 2011), welcher zuvor vom Brassinoidrezeptor BRI1 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1) dissoziierte.

1. Einleitung

14-3-3-Proteine sind zudem Negativ-Regulatoren der Auxin-induzierten Wachstumsreaktion zur Vermeidung von Schatten. Hierbei interagieren 14-3-3-Proteine lichtabhängig mit PIF7 (PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 7), dem Hauptregulator dieser Schatten-Vermeidungsreaktion (Huang *et al.*, 2018) und verhindern somit dessen Lokalisation in den Nukleus.

Weitere Interaktionspartner von 14-3-3-Proteinen sind Phototropin 1 und 2 (Kinoshita *et al.*, 2003; Inoue *et al.*, 2008 a; Tseng *et al.*, 2012; *siehe Kapitel 1.4*). Hierbei interagiert phot1 vorrangig mit Mitgliedern der Nicht-Epsilon-Gruppe (Sullivan *et al.*, 2009). In einem Y2H-Assay interagiert phot2 mit der 14-3-3-Isoform Lambda, allerdings zeigte diese Interaktion keine physiologische Relevanz bezüglich der phototropen Reaktion *in vivo* (Tseng *et al.*, 2012).

Die Mitglieder der Epsilon-Gruppe sind an der Regulation des Auxin-abhängigen Wachstumsprozesses in *Arabidopsis* beteiligt, da sie die subzelluläre Polarität von PIN-Proteinen beeinflussen, was sich auf den gerichteten Auxintransport im gesamten pflanzlichen Organismus auswirkt (Keicher *et al.*, 2017; *siehe Kapitel 1.2*).

1. Einleitung

1.7. Ziel dieser Arbeit

Das Protein NPH3 spielt eine Schlüsselrolle in der Blaulicht-induzierten Reaktion von Pflanzen, es agiert *downstream* von dem Photorezeptor Phototropin1. Obwohl NPH3 hydrophil ist, assoziiert das Protein in Dunkelheit an die Plasmamembran. Der Mechanismus dieser Plasmamembranlokalisation wurden bisher nicht untersucht, somit ist dieser Aspekt von Interesse für die Untersuchungen dieser Arbeit.

Des Weiteren ist bereits publiziert worden, dass NPH3 zwar in etiolierten Keimlingen an die Plasmamembran assoziiert, jedoch nach Belichtung des etiolierten Keimlings mit (Blau)-Licht von dieser dissoziiert und cytosolische Partikel bildet (Haga *et al.*, 2015). Hier existieren bereits mehrere Modelle, welche die physiologische Bedeutung der Blaulicht-bedingten Veränderung der Lokalisation von NPH3 zu erklären versuchen, jedoch noch nicht eindeutig bewiesen werden konnten (Haga *et al.*, 2015; Sullivan *et al.*, 2019). Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher Experimente durchgeführt, welche die Lokalisation von NPH3 in Dunkelheit sowie die Veränderung dieser Lokalisation durch Irradiation mit Blaulicht genauer untersuchen.

In unserer Arbeitsgruppe wurde von Christian Robert Thom herausgefunden, dass 14-3-3 und NPH3 Bindepartner sind (Thom, 2017). 14-3-3-Proteine beeinflussen auch die Lokalisation und Aufrechterhaltung der Polarität von PIN-Proteinen (Keicher *et al.*, 2017). Sowohl NPH3 als auch PIN-Proteine spielen wichtige Rollen in der phototropen Antwort. Ebenso wurde bereits publiziert, dass phot1 ein Bindepartner von 14-3-3-Proteinen ist, diese Assoziation jedoch keinerlei Auswirkungen auf den Phototropismus hat (Kinoshita *et al.*, 2003). Da 14-3-3 jedoch eine wichtige Rolle in der Auxin-Verteilung während der phototropen Reaktion inne zu haben scheinen, wird besonders die Interaktion von NPH3 und 14-3-3 näher untersucht in Bezug auf Veränderungen z. B. der Lokalisation von NPH3 durch Blaulichtirradiation und die phototrope Antwort in Keimlingen.

Doch nicht nur die subzelluläre Lokalisation von NPH3 verändert sich durch Blaulichtirradiation des Keimlings, sondern auch der Phosphorylierungsstatus des Proteins (Motchoulski und Liscum, 1999). NPH3, welches aus etiolierten Keimlingen stammt, zeigt eine geringere elektrophoretische Mobilität auf als NPH3 aus belichteten Keimlingen. Die Proteinbande mit der geringeren elektrophoretischen Mobilität entspricht einem stärker phosphorylierten Protein als jene Proteinbande mit erhöhter elektrophoretischer Mobilität, welches als dephosphoryliert gilt. Im Rahmen dieser Arbeit werden somit auch putativ Blaulicht-abhängige Phosphorylierungspositionen in NPH3 ermittelt, welche zur Dephosphorylierung des Proteins in belichteten Keimlingen beitragen.

1. Einleitung

2. Material

2.1. Feinchemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden in Analyse-Qualität von den folgenden Firmen bezogen:

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Roche, Mannheim

VWR International GmbH, Erlangen

Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig

Life technologies, Carlsbad (Kalifornien), USA

Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande

Multimed Wicker GmbH, Giengen

Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (Kalifornien), USA

Avanti Polar Lipids, Alabaster (Alabama), USA

GE Healthcare, München

Echelon Biosciences Inc., Salt Lake City, USA

Eppendorf, Hamburg

New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main

SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg

Bayer CropScience Deutschland GmbH, Langenfeld

Merck Chemicals GmbH, Darmstadt

Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren

AppliChem GmbH, Darmstadt

Chromotek GmbH, Planegg

Promega GmbH, Walldorf

Biomers.net GmbH, Ulm

NipponGenetics, Düren

QIAGEN, Hilden

Merck KGaA, Darmstadt

Eurogentech, Lüttich, Belgien

2. Material

2.2. Oligonukleotide/ Primer

Alle Oligonukleotide und Primer wurden von Biomers.net GmbH (Ulm) geliefert und entsprachen den Laborstandardbedingungen.

2.3. Vektoren

Die folgend aufgelisteten Vektoren wurden entweder als Grundlage für die Klonierungen weiterer Konstrukte oder aber für die Erstellung von Fusionskonstrukten im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

Tabelle 2-1: verwendete Vektoren

Vektoren	Herkunft/ Referenz
pDONR™201/207/221/Zeo (Kan/Gent/Zeo)	Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig
pGEM®-T Easy (Amp)	Promega GmbH, Mannheim
pGADT7 AD (Amp)	Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich (Chien <i>et al.</i> , 1991)
pGBKT7 DNA-BD (Kan)	Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich (Louvét <i>et al.</i> , 1997)
pB7WGR2 (Spec (Bakt.), Basta® (Pfl.))	Karimi <i>et al.</i> , 2002, Ghent, Belgien
pH7WGF2 (Spec (Bakt.), Hyg (Pfl.))	Karimi <i>et al.</i> , 2002, Ghent, Belgien
pFRETgc-2in1-CN (Spec (Bakt.), Basta® (Pfl.))	Hecker <i>et al.</i> , 2015, Plant Phys
pFRETgc-2in1-NC (Spec (Bakt.), Basta® (Pfl.))	Hecker <i>et al.</i> , 2015, Plant Phys
pDONR221-P1P4 (Kan, Cam)	Life Technologies, Carlsbad (Kalifornien), USA
pDONR221-P3P2 (Kan, Cam)	Life Technologies, Carlsbad (Kalifornien), USA

2.4. Antikörper

Folgende Antikörper wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

Tabelle 2-2: verwendete erste und zweite Antikörper für die Immunoblot-Detektionen

Antikörper gegen	Firma	Verdünnung	Bezogen aus
GFP	Life Technologies, Carlsbad (Kalifornien), USA	1:1000	Kaninchen
RFP (5F8)	Chromotek GmbH, Planegg	1:1000	Ratte

2. Material

Myc	Chromotek GmbH, Planegg	1:1000	Ratte
HA (hohe Affinität)	Roche, Mannheim	1:2000	Ratte
GST	GE Healthcare, München	1:2000	Ziege
pS744A	Eurogentech, Lüttich	1:100	Kaninchen
Ziege (POD)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	1:10.000	
Ratte (POD)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	1:10.000	Ziege
Kaninchen (POD)	Promega GmbH, Walldorf	1:10.000	Ziege

2.5. Enzyme

Nachfolgende Enzyme wurden verwendet:

Tabelle 2-3: Verwendete Enzyme

Enzym:	Firma:
AccuPrime™ Pfx DNA Polymerase (Invitrogen™)	Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig
Taq-DNA Polymerase	Eigenproduktion am ZMBP
Taq-DNA Polymerase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Alkalische Phosphatase (CIP)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Gateway® BP bzw. LR Clonase® Enzyme Mix	Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig
Restriktionsenzyme (Endonukleasen)	Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig
RNase A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
T4-DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig

2.6. Organismen

Pflanzenlinien: In dieser Arbeit wurde *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia-0 (Col-0) verwendet sowie die T-DNA-Insertionslinie *nph3-7* (SALK_122544) (Kansup *et al.*, 2014), um stabile Transformationslinien zu generieren. Des Weiteren wurde *Nicotiana benthamiana* für transiente Transformationen verwendet.

2. Material

Bakterienstämme: Zur Propagation von Plasmiden eigneten sich die *Escherichia coli*-Stämme XL1-blue (Agilent, Waldbronn) und One Shot® TOP10 (Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig). Für die Proteinexpression in Bakterien wurde der Stamm BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (Agilent, Waldbronn) verwendet. Um Pflanzen stabil sowie transient zu transformieren wurde der *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm GV3101 (Koncz und Schell, 1986, Szeged, Ungarn) benötigt.

Tabelle 2-4: verwendete Medien

Medium:	Firma:	Anzucht von:
<i>2xYT-Medium</i> 1,6 % (w/v) Trypton/Pepton 1% (w/v) BD Bacto™ Hefe-Extrakt 0,5 % (w/v) NaCl pH 7.4 (HCl)	BD Biosciences GmbH, Heidelberg	Bakterien, zur Expression von Proteinen
<i>LB-Agar, Luria/Miller</i> <i>LB-Medium, Luria/Miller</i>	Carl Roth, Karlsruhe	Transformation von <i>A. tumefaciens</i> und <i>E. coli</i> , Plasmidpropagation
<i>Murashige & Skoog-Medium</i> („basal salt mixture“) 4,4 g/l MS-Medium 1% Saccharose pH 5.8 (KOH)	Duchefa Biochemie B. V, Haarlem, Niederlande	Anzucht von <i>A. thaliana</i>

Folgende Antibiotika-Stocklösungen wurden eingesetzt mit einer Verdünnung von 1:1000 beziehungsweise im Falle von Hygromycin mit einer Verdünnung von 1:2000:

Tabelle 2-5: verwendete Antibiotika zur Selektion von Bakterien und Pflanzen

Antibiotikum	Konzentration	Lösungsmittel
Ampicillin (Bakt.)	100 mg/ml	H ₂ O
MS-X (Pfl.)	20 mM	H ₂ O
Cycloheximid (Pfl.)	100 mM	H ₂ O
Gentamycin (Bakt.)	10 mg/ml	H ₂ O
Hygromycin B (Pfl.)	50 mg/ml (1:2000)	PBS
Kanamycin (Bakt., Pfl.)	50 mg/ml	H ₂ O
Rifampicin (Bakt.)	100 mg/ml	DMSO
Spectinomycin (Bakt.)	50 mg/ml	H ₂ O

3. Methoden

3.1. Mikrobiologische Methoden

3.1.1. Anzucht der Bakterien

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in 5 ml Flüssigmedium. Hier wurde je nach weiterer Prozessierung entweder 2YT-Medium für die Proteinexpression oder LB-Medium für die Propagierung von Plasmiden genutzt. Je nach Resistenz der transformierten Plasmide enthielten die Medien die jeweiligen Antibiotika, um transformierte Bakterien zu selektieren und Kontaminationen zu vermeiden. Die Medien wurden mit einer Kolonie von einer LB-Agar-Platte angeimpft und über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubiert.

Agrobacterium tumefaciens wurde ebenfalls in 5 ml LB-Medium unter Selektionsdruck angezogen, jedoch bei 28°C inkubiert.

3.1.2. Transformation von Bakterien

Chemisch kompetente *E. coli*-Stämme wurden anhand des Protokolls von 1990 (Inoue *et al.*, 1990) generiert.

Um jene chemisch kompetenten Zellen zu transformieren, wurden bei -80°C tiefgefrorene Aliquots auf Eis aufgetaut und etwa 100 bis 150 ng Plasmid-DNA hinzugegeben. Nach weiterer fünfminütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen einem Hitzeschock von 30 Sekunden bei 45 °C ausgesetzt, danach wurden sie erneut für zwei Minuten auf Eis gekühlt. Eiskaltes LB-Medium wurde zu jedem Transformationsansatz hinzugegeben (700µl) und die Bakterien anschließend bei 37°C für eine Stunde inkubiert, sodass die mit dem Plasmid transformierten Resistenz-Marker exprimiert werden konnten. Anschließend wurden die Zellen für drei Minuten bei 5.000xg abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Bakterienpellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Die gesamte Lösung wurde auf LB-Agar-Platten mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum ausgestrichen und die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert.

Kompetente *A. tumefaciens* Bakterien wurden durch Schockfrieren in flüssigem Stickstoff generiert. Um diese zu transformieren, wurde zu einem Aliquot schockgefrorener Bakterien 100 bis 150 ng Plasmid-DNA hinzugefügt und die Zellen anschließend für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Es folgten fünf Minuten in flüssigem Stickstoff, in welchem die Bakterien erneut schockgefroren wurden, um darauf folgend für fünf Minuten bei 37°C dem Hitzeschock ausgesetzt zu sein. Zu dem Aliquot wurde 1 ml LB-Medium hinzugefügt und die Bakterien für zwei bis drei Stunden bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Von dem Gesamtansatz wurden

3. Methoden

100µl auf eine LB-Agar-Platte mit jeweiligem Selektionsdruck ausplattiert. Die Bakterien wuchsen innerhalb von zwei Tagen bei 28°C.

3.1.3.Heterologe Proteinexpression in Bakterien

Die Expression von Proteinen in Bakterien erfolgte anhand des *E. coli*-Stammes BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (Agilent, Waldbronn).

Kultivierung von Bakterien für Proteinexpression:

Zur Anzucht der Bakterien wurde eine Kolonie einer LB-Agar-Platte mit transformierten Bakterien in fünf Millilitern 2YT-Medium mit Antibiotikum über Nacht bei 37°C angezogen. Nach circa 16 Stunden wurden die fünf Milliliter Bakterienkultur bei 5000xg für drei Minuten abzentrifugiert und in 500µl 2YT-Medium resuspendiert. Davon wurden 300µl Bakteriensuspension in 300 ml 2YT-Medium und 660 mM Sorbitol mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum bei 30°C inokkuliert (180 rpm), bis die Kultur eine optische Dichte OD₆₀₀ von 0,6 erreicht hat. Die Kulturen kühlen anschließend für 30 min auf Eis ab.

Induktion der Proteinexpression:

Um die Proteinexpression zu induzieren, wurde der auf Eis abgekühlten Hauptkultur 0,1 mM IPTG hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen bei 22°C über Nacht und 180rpm inkubiert. Nach circa 16 Stunden wurden die Zellen für 30 Minuten bei 4000xg und 4°C pelletiert und mit 30 ml PBS gewaschen. Die Pellets wurden für mindestens 24 Stunden bei -20°C gelagert, bis sie weiter prozessiert wurden.

3.2. Pflanzen-Methoden

3.2.1.Anzucht der Pflanzen

Die verwendeten Pflanzen wurden für die stabile und transiente Transformation im zentralen Gewächshaus des Zentrums für Molekularbiologie der Pflanzen angezogen. Dafür wurden Samen auf Erde ausgestreut und diese anschließend über Nacht bei 4°C stratifiziert. Die Pflanzen wuchsen unter Standardkonditionen (16h Licht, 150µmol/m²s, 40-60% Luftfeuchtigkeit, 22°C).

Wurden etiolierte Keimlinge benötigt, wurden die Samen der gewünschten Linien mit Ethanol (70% Ethanol für 10 min, 100% Ethanol für 5 min) sterilisiert und auf Platten mit ½ MS, 1% Saccharose und 1% Phytoagar ausgebracht. Die Platten wurden über Nacht bei 4°C gelagert und am nächsten Tag für 4 Stunden Licht exponiert, um die Keimung zu synchronisieren. Die Platten wurden nach der Belichtung doppelt in Alufolie eingepackt und bei Raumtemperatur für zwei Tage im Dunkeln gelagert.

3. Methoden

3.2.2. Transformation der Pflanzen

Stabile Transformation von A. thaliana

Um *Arabidopsis thaliana* stabil zu transformieren, müssen die Pflanzen etwa fünf Wochen alt sein, sodass sich bereits Knospen gebildet haben, welche jedoch noch nicht aufgeblüht sind.

Zur Transformation wurden *Agrobacterium tumefaciens*-Kulturen verwendet, welche zwei Tage vor der Transformation mit einer Kolonie pro Vorkultur in 5 ml LB-Medium und dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 28°C bei 220 rpm inkubiert wurden. Diese Kulturen wurden am Tag vor der Transformation in 200 ml LB-Flüssigmedium unter Selektionsdruck überführt und nochmals für eine Nacht bei 28°C inkubiert. Am Tag der Transformation wurden die Zellen bei 4000rpm für 20 min pelletiert und in 200 ml Transformationsmedium (1/2 MS, 5% Saccharose, 150µl/l Silwet) resuspendiert. Die Pflanzen wurden in der Bakteriensuspension circa eine Minute über Kopf geschwenkt, sodass nur die Knospen mit der Lösung in Berührung kamen, nicht jedoch die Blätter der Pflanzen, um Immunreaktionen seitens der Pflanzen zu vermeiden.

Die Pflanzen wurden anschließend bis zur Samenernte weiter unter Standardbedingungen kultiviert und die Samen dieser Pflanzen später auf Resistenz getestet.

Transiente Transformation von N. benthamiana

Die transiente Transformation erfolgte nach einem abgewandelten Protokoll von Grefen *et al.*, 2010.

Am Tag vor der transienten Transformation wurde eine Kolonie einer LB-Agar-Platte mit Agrobakterien in 5 ml LB-Flüssigmedium und Antibiotika angeimpft und über Nacht bei 28°C inkubiert. Nach circa 16 Stunden wurden 500µl der angewachsenen Vorkultur in 4,5 ml frisches LB-Medium mit Antibiotika überführt und für vier bis fünf Stunden bei 28°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend für drei Minuten bei 5000xg pelletiert und das Bakterienpellet in 1 ml AS-Puffer (10mM MgCl₂, 10mM MES pH 5.6, 150µM Acetosyringon) resuspendiert. Von der Suspension wurden 100µl verwendet, um die optische Dichte OD₆₀₀ einer 1:10-Verdünnung in Wasser zu bestimmen. Die restliche Menge der Suspension wurde in 5 ml AS-Puffer auf eine OD₆₀₀ von 0,1 – 0,15 eingestellt und die Verdünnung für 30 min auf Eis inkubiert.

Diese Lösung wurde anschließend mit Hilfe einer 1ml-Plastikspritze ohne Kanüle an der Unterseite der Blätter von vier Wochen alten *Nicotiana benthamiana* infiltriert. Die Pflanzen wurden für zwei Tage Konstantlicht-Konditionen exponiert und die Blätter anschließend geerntet.

3. Methoden

3.2.3. Bestimmung der phototropen Reaktion etiolierter Keimlinge

Mit Hilfe eines Zahnstochers wurden einzelne sterilisierte Keimlinge (70% Ethanol für 10 min, 100% Ethanol für 5 min) auf einer ½ MS-Phytoagarplatte ausgebracht, diese über Nacht bei 4°C stratifiziert und am nächsten Tag für vier Stunden belichtet, ehe die Platte in aufrechter Position und doppelt in Aluminiumfolie eingepackt bei Raumtemperatur im Dunkeln verwahrt wurde, sodass die Keimlinge etioliert wuchsen. Nach zwei Tagen wurden die Platten in aufrechter Position in eine Blaulichtkammer (Werkstatt ZMBP) gestellt und von einer Seite mit Blaulicht ($1\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) bestrahlt, während die nicht dem Licht zugewandten Seiten der Platte mit schwarzem Karton abgeschirmt wurden. Nach 24 Stunden im Blaulicht wurden die Platten aus dem Licht herausgenommen, die Richtung des Blaulichtes vermerkt und die Platten eingescannt. Die Krümmungswinkel der Hypokotyle wurde anschließend mit dem Programm Fiji (ImageJ extended) bestimmt.

3.2.4. Blaulicht-Bestrahlung von *N. benthamiana*

Nach transienter Transformation von *N. benthamiana*-Blättern wurden die Pflanzen für mindestens 24 Stunden in konstantem Licht inkubiert. Anschließend wurden die Pflanzen für circa 16 Stunden in Dunkelheit gehalten und aus den transformierten Blättern mit Hilfe des Deckels eines 1,5 ml-Reaktionsgefäßes Blattscheiben ausgestanzt, welche mit der Unterseite nach oben in eine mit Wasser gefüllten Petrischale gelegt wurden. Diese so präparierten Blattscheiben bekamen anschließend einen Blaulichtreiz von oben mit der Stärke von circa $4,5\mu\text{mol}/\text{m}^2 \times \text{s}^{-1}$ für 40 Minuten, bevor sie wieder für eine Stunde in Dunkelheit transferiert wurden.

3.2.5. Blaulicht-Bestrahlung von *A. thaliana*-Keimlingen

Sterilisierte Keimlinge von *A. thaliana* wurden auf einer ½ MS-Phytoagarplatte (1% Phytoagar) ausgebracht und anschließend über Nacht bei 4°C stratifiziert. Nach vier Stunden konstanter Belichtung wurden die Keimlinge für 44 bis 48 Stunden etioliert angezogen. Nach einem anschließenden apikalen Blaulicht-Reiz mit einer Intensität von etwa $1\mu\text{mol}/\text{m}^2 \times \text{s}^{-1}$ für circa 30 bis 40 Minuten wurden die Keimlinge wieder für eine Stunde in Dunkelheit transferiert.

3.2.6. Evaluierung stabil transformierter homozygoter *Arabidopsis*-Linien

Zuvor mit Ethanol sterilisierte Samen wurden auf ½MS-Phytoagarplatten unter Selektionsdruck ausgebracht, über Nacht bei 4°C stratifiziert und anschließend unter konstantem Licht gelagert. Die resistenten Pflanzen wurden auf Erde transferiert und unter Standardbedingungen bis zur Reife der Samen gezogen. Das Saatgut jeder Pflanze wurde erneut sterilisiert und auf Phytoagar-Platten unter Selektionsdruck ausgebracht. Nach erfolgter Stratifizierung und einer Woche Wachstum auf der Platte wurden die Keimlinge auf ihre Resistenz untersucht. Waren drei Viertel der gekeimten Pflanzen resistent, wurden die

3. Methoden

resistenten Keimlinge auf Erde transferiert und wieder unter Standardbedingungen bis zur Reife der Samen gezüchtet. Das Saatgut wurde erneut sterilisiert, auf Platten unter Selektionsdruck ausgebracht, stratifiziert und unter Konstantlicht zur Keimung gebracht. Sind nun alle Keimlinge resistent, hat man eine homozygote Linie gefunden.

Bei manchen Linien blieb zwar die Resistenz im Laufe der Generationen erhalten, doch die Linien exprimierten nicht das gewünschte Konstrukt. Hier wurden die Keimlinge im Alter von zwei bis drei Tagen am Fluoreszenzbinokular (Zeiss, Axio Zoom.V16) überprüft sowie die Proteinexpression via Western Blot untersucht (Erläuterung folgt).

3.3. Nukleinsäure-Methoden

3.3.1. Plasmid-Aufreinigung und Sequenzierung

Die Aufreinigung aus den *E. coli*-Stämmen TOP10 oder XL1-blue zur Lagerung der Plasmide wurde anhand des GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Alternativ erfolgte die Plasmidisolierung für eine Kolonie-PCR nach den Protokollen von Birnboim und Doly, 1979 beziehungsweise Birnboim, 1983.

Die Konzentration und Qualität der isolierten DNA wurde photometrisch am NanoDrop® bestimmt (ND-1000 Spectrometer, NanoDrop Technologies, Wilmington, USA).

Die Sequenzierung der klonierten und isolierten Plasmide wurde bei den Firmen Eurofins Genomics (Ebersberg) und Genewiz (Leipzig) in Auftrag gegeben.

3.3.2. Restriktion der Plasmide, Agarose-Gelelektrophorese und Visualisierung

In einem Restriktionsansatz konnten sowohl Plasmide als auch PCR-Fragmente geschnitten werden. Hierfür wurden 1-5µg DNA mit den entsprechenden Endonukleasen sowie den vom Hersteller (Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig) empfohlenen Puffer versetzt und nach Herstellerangaben inkubiert.

Die geschnittenen Fragmente wurden mittels einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Hierfür wurde ein Agarosegel mit 1% Agaroseanteil sowie 1:40 MidoriGreen Advance (NipponGenetics, Düren) in 1xTAP-Puffer (40mM Tris/HAc pH 7.5, 20mM Natriumacetat, 1mM EDTA) hergestellt, die Proben mit 3xLadepuffer (0,1% Bromophenolblau, 50% Glycerin) versetzt und mit dem Größenstandard GeneRuler 1kb+ DNA Ladder (Invitrogen, Karlsruhe) auf das Gel aufgetragen.

Die gewünschten Fragmente wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und mittels NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up Kit von Macherey-Nagel™ aufgereinigt.

3. Methoden

Zur Visualisierung der DNA im Agarosegel wurde das Geldokumentationssystem E-BOX VX2 2.0 MP der Firma Vilber (VWR International GmbH Life Science Competence Center, Erlangen) eingesetzt.

3.3.3.PCR-Methoden

Zu Klonierzwecken sowie zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet (Mullis *et al.*, 1986). Für die verschiedenen Anwendungszwecke der PCR wurden unterschiedliche *Taq*-Polymerasen verwendet. In Reaktionsansätzen von entweder 20 oder 50 µl sind die jeweiligen Primer (20 pmol), die Template DNA (10-100 ng), Desoxynucleotid-Triphosphate (10 mM pro dNTP) sowie die entsprechenden DNA-Polymerase-Puffer zu den DNA-Polymerasen enthalten. Zu jedem PCR-Ansatz wird 1mM MgCl₂ hinzugefügt (im Falle von AccuPrime™ *Pfx* DNA Polymerase (Invitrogen™) 20-50 mM KCl), um die Anlagerung der Primer an das Template zu erleichtern. Die PCR-Programme gestalten sich je nach verwendeter DNA-Polymerase zum Teil unterschiedlich, gemeinsam sind jedoch folgende Schritte:

Die **Denaturierung** der Template-DNA erfolgt bei 95 °C. Diese Temperatur wird anfangs zwei Minuten gehalten, in den Zyklen verkürzt sich die Zeitspanne auf 30 Sekunden. Die **Anlagerung** der Primer an das Template erfolgt je nach Primerlänge bei höheren Temperaturen (52°C, 30 Sekunden) oder im Falle der Adapterprimer bei niedrigeren Temperaturen (45°C, 30 Sekunden). Je nach verwendeter DNA-Polymerase variieren die **Elongationsparameter**, was in folgender Tabelle zu sehen ist:

Tabelle 3-1: Elongationsparameter der unterschiedlichen DNA-Polymerasen

DNA-Polymerase	Elongationsparameter
AccuPrime™ <i>Pfx</i> DNA Polymerase (Invitrogen™)	68°C, 1min/kb
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	72°C, 15-30sec/kb
ZMBP „Haus-Taq“-Polymerase	72°C, 1min/kb
<i>Taq</i> -Polymerase (New England Biolabs)	68°C, 1min/kb

Für Denaturierung, Anlagerung der Primer und Elongation wurden 30 Zyklen berechnet. Die finale Elongationszeit von fünf bis zehn Minuten bei der jeweiligen Elongationstemperatur der DNA-Polymerase schloss die PCR ab.

PCR für klassische Klonierung

Für die PCR der klassischen Klonierung wurden Primer eingesetzt, welche das jeweilige Endstück (ca. 20 Basen) des gewünschten Templates sowie die anzufügende Restriktionsschnittstelle beinhalten (+TAT). Bei dieser PCR wird die Phusion™ High-Fidelity DNA

3. Methoden

Polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig) und das oben erläuterte Protokoll verwendet. Das Produkt der PCR entspricht dem gewünschten Template, an welches N- und C-terminal die jeweiligen Schnittstellen angeknüpft sind.

Gerichtete in vitro-Mutagenese-PCR

Bei der gerichteten *in vitro*-Mutagenese werden die Primer so konstruiert, dass die zu verändernde Sequenz in der Mitte der Primer liegt und sowohl *upstream* als auch *downstream* jeweils bis zu 20 Basen des Templates angefügt sind. Beide Primer überlappen sich komplett, sodass bei keinem der beiden ein Überhang besteht, wenn sich beide aneinander anlagern würden. Als Template werden hier nur vollständige Vektoren verwendet, auf welchen Punktmutationen eingefügt werden sollen. Hierfür wurden hauptsächlich Templates verwendet, welche auf dem Vektor pGEM®-T Easy basieren (Promega GmbH, Mannheim). Die Vorgehensweise bei dieser PCR unterscheidet sich von der klassischen Klonierungs-PCR und basiert auf dem Protokoll des „QuikChange® II site-directed mutagenesis kit“ (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA).

Die Mutagenese-PCR besteht aus zwei unterschiedlichen PCR-Durchläufen und wurde mit AccuPrime™ Pfx DNA Polymerase von Invitrogen™ durchgeführt.

Im ersten Durchlauf wurde pro Primer ein eigener PCR-Ansatz (50 µl) angefertigt, die Anlagerungstemperatur der Primer wurde auf 55°C gehoben und es wurden nur acht Zyklen angesetzt.

Von den zusammengehörigen Primern wurden je 25 µl des einen mit 25 µl des anderen Ansatzes gemischt und frische DNA-Polymerase hinzugefügt. Wieder wurde die Anlagerungstemperatur der Primer auf 55°C gehoben und 25 Zyklen für die Reaktion anberaumt. Anschließend wurde der PCR-Ansatz mit dem Kit NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up Kit von Macherey-Nagel™ aufgereinigt und nach Herstellerangaben mit Dpn1 verdaut, um das Template abzubauen und nur die während der PCR entstandenen Plasmide später zu transformieren.

Adapter-PCR

Die Adapter-PCR läuft in zwei Phasen ab, die verwendete DNA-Polymerase ist Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase von Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig.

Für die erste PCR (50 µl) wurden Primer entworfen, welche 22-24 Basen des Endstückes vom gewünschten Template aufweisen sowie daran angeknüpft 14 Basen der *att-sites*, welche an das Template angehängt werden sollen. Von diesen Primern werden nur 4 pmol eingesetzt.

3. Methoden

Die PCR mit diesem PCR-Ansatz umfasst zehn Zyklen und hat eine Primer-Anlagerungs-Temperatur von 52°C.

Der zweite Teil der PCR besteht aus 10 µl des ersten PCR-Ansatzes als Template und Adapter-Primern, welche die vollen *att-sites* abdecken sowie allen weiteren Komponenten des PCR-Ansatzes. Das Temperaturprogramm erfolgt in zwei Stufen. Die erste Stufe umfasst acht Zyklen mit einer Anlagerungstemperatur von 45°C für 30 Sekunden, die zweite Stufe beinhaltet 22 Zyklen mit einer Anlagerungstemperatur von 52°C. Das PCR-Produkt wird anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen und nach erfolgter Gelelektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt, um es für die weitere Klonierung zu verwenden.

Kolonie-PCR

Um zu überprüfen, ob nach einer Klonierung und Transformation in Bakterien das gewünschte Template vollständig und in der richtigen Orientierung in den Zielplasmid eingefügt wurde, wurden Kolonie-PCRs durchgeführt, bei welchen das Template eine mit der Pipettenspitze gepickte Bakterienkolonie war, welche in 40 µl Wasser gelöst wurde. Von dieser Suspension wurden 4µl pro PCR-Ansatz eingesetzt. Die verwendeten DNA-Polymerasen waren entweder die am Lehrstuhl isolierte *Taq*-Polymerase oder die *Taq*-Polymerase von New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main mit dem jeweiligen Puffer. Das Volumen des PCR-Ansatzes betrug 20µl und die Primer-Anlagerungstemperatur wurde standardgemäß auf 52°C gesetzt.

3.3.4.Klonierungen

Je nach Zielkonstrukt konnten Vektoren genutzt werden, welche bereits Promotor und Tag aufwiesen (Karimi *et al.*, 2002) beziehungsweise Vektoren verwendet werden, in welche man mittels klassischer Klonierung die einzelnen Komponenten separat einfügt.

Restriktions-Ligations-Klonierung

Um das PCR-Produkt in den Vektor pGEM®-T Easy (Promega GmbH, Mannheim) einzubringen, wurde das PCR-Produkt aufgereinigt und mit der *Taq*-Polymerase von New England Biolabs ein Adenin-Überhang angefügt (68°C, 30 Minuten). Dieses Konstrukt konnte nun in den Leervektor pGEM®-T Easy mit dem Enzym T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG (Braunschweig)) eingefügt werden. War die Ligation gelungen und das Template vollständig sequenziert, wurde dieser Plasmid ebenso wie der gewünschte Zielplasmid mit den jeweiligen Restriktionsenzymen nach Herstellerangaben geschnitten. Der offene Zielvektor sowie das geschnittene Template konnten nun ebenfalls mit dem Enzym T4 DNA Ligase verknüpft werden.

3. Methoden

Gateway-Klonierung

Diese Klonierungsstrategie basiert auf dem Sequenz-spezifischen Rekombinationssystem des Lambda-Phagen, welcher die Vorgehensweise nutzt um Phagen-DNA in das Chromosom von *E. coli* einzuschleusen. Hierbei spielen Rekombinationsstellen in der DNA des Phagen (attP) als auch in der von *E. coli* (attB) eine Rolle. Mit Hilfe der Enzyme Integrase und „Integration Host Factor“ können diese beiden att-Sequenzen zusammengefügt werden, sodass das eingeschleuste DNA-Stück im Zielgenom von den AttL- und attR-Sequenzen flankiert wird.

BP-Reaktion: Die in der Adapter-PCR gebildeten PCR-Fragmente enthalten bereits die attB-sites. Die vorgesehenen „Entry“-Vektoren (pDONR™) weisen attP-sites auf. Die Reaktion erfolgte entsprechend des Protokolls des Herstellers (Invitrogen™ - Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig). Die „Entry“-Klone enthalten nach der BP-Reaktion das gewünschte Fragment, welches nun von attL-sites flankiert wird.

LR-Reaktion: Im nächsten Schritt werden die attL-sites der „Entry“-Vektoren mit den attR-sites der Zielvektoren rekombiniert. So entsteht ein Vektor mit dem gewünschten Fragment, eingebettet in auf dem Vektor vorgegebenen Promotoren, Tags und Terminatoren. Auch diese Reaktion erfolgte entsprechend des Protokolls des Herstellers (Invitrogen™ - Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig).

3.4. Biochemische Methoden

3.4.1. *In vitro* Transkription und Translation

Für die *in vitro* Transkription und Translation wurde das TnT® Quick Coupled Transcription/Translation System für Konstrukte mit T7-Promotor von Promega GmbH (Walldorf) verwendet. Hierfür wurde die CDS des gewünschten Proteins in die Vektoren pGADT7 oder pGBKT7 kloniert. Die Ausführung des Protokolls erfolgte nach Herstellerangaben.

3.4.2. Aufreinigung GST-getagter Proteine aus Bakterien

Die Bakterienpellets wurden gewogen und anschließend in 5 ml/g Bakterienpellet B-PER™ Bacterial Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig) gelöst. Der Lösung wurde zusätzlich cComplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Mannheim) hinzugefügt, um den Abbau der exprimierten Proteine zu verhindern. Die Suspension wurde anschließend bei Raumtemperatur für 20 Minuten invertiert. Davon dienten 50µl als Fraktion des Gesamtproteins, welche bei -20°C eingefroren wurde. Das Lysat wurde anschließend bei 16.000xg, 4°C für 30 Minuten abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet verworfen. Von dem Überstand dienten 50µl als Fraktion „lösliche Proteine“. Die

3. Methoden

Aufreinigung der GST-getaggen Fusionsproteine erfolgte über GSTrap FF Columns (GE Healthcare, München). Hierfür wurde der Überstand zweimal über eine vorher mit PBS äquilibrierte Säule gegeben. Vom Durchlauf der Säule wurden erneut 50µl abgenommen und als Fraktion „nicht-gebundene Proteine“ bei -20°C verwahrt. Die Säule wurde anschließend mit dem zehnfachen Säulenvolumen PBS gewaschen, wobei von dem Durchlauf der Waschfraktion 50µl abgenommen und gelagert wurden. Die Säule wurde darauf folgend mit 4 ml Elutionspuffer (10mM reduziertes Glutathion, 50 mM Tris/HCl pH 8.0) eluiert. Das Eluat konnte anschließend in Vivaspin™ ultrafiltration spin columns (GE Healthcare, München) einreduziert und in PBS umgepuffert werden, sodass die aufgereinigten Proteine in einem Endvolumen von 400µl PBS gelöst vorlagen um aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren zu werden. Die Aliquots wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.4.3. Quantifizierung des Proteingehaltes

Um den Proteingehalt der aufgereinigten Proteine zu bestimmen, wurde die Protein-Färbelösung Roti®-Quant (Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dies betraf auch die Erstellung der Eichgerade mit Verdünnungen von Rinderserumalbumin (BSA).

Nach der Bestimmung des Proteingehaltes der aufgereinigten Proben wurden unterschiedliche Volumen der Proteinproben auf ein Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid (SDS)-Gel aufgetragen. Als Referenz für die vorliegende Proteinmenge wurde BSA in den Mengen 1µg, 2µg und 3µg auf demselben Gel aufgetragen. Nach Färbung des Gels mit Coomassie-Brilliantblau wurde die Bandenstärke der Fusionsproteine mit der Bandenstärke der BSA-Proben verglichen und durch Schätzen die Quantität des Proteingehaltes getaggt Proteine in den Proben festgestellt.

3.4.4. SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; Laemmli, 1970) wurde zur Auftrennung von denaturierten Proteingemischen nach ihrer relativen molekularen Masse verwendet. Zur Präparation der Gele wurde ein fertig gemischter Acrylamid-Bisacrylamid-Mix von Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, verwendet (Rotiphorese Gel 30). Je nach zu erwartenden Proteingrößen wurden unterschiedliche Polyacrylamidkonzentrationen im Trenngel verwendet. Hierfür wurde zunächst das Trenngel gegossen und mit 70% Ethanol überschichtet. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde der Ethanol entfernt und das Sammelgel mit 5 % Polyacrylamidanteil aufgegossen, in welches ein Kamm mit der benötigten Anzahl Probenaschen platziert wurde. Für die SDS-PAGE wurde SDS-Puffer verwendet (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS).

3. Methoden

Die Zusammensetzung der verschiedenen Trenngele sowie des Sammelgels sind folgender Tabelle zu entnehmen. Trenn- und Sammelgelpuffer sind zwei unterschiedliche Lösungen. Der Trenngelpuffer besteht aus 1,5 M Tris-HCl pH 8.8, der Sammelgelpuffer aus 0,5 M Tris-HCl pH 6.8. Die Angaben beziehen sich jeweils auf ein Gel.

Tabelle 3-2: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgelen (in ml)

	Trenngel (ml)			Sammelgel (ml)
	8 %	10 %	12 %	5 %
H₂O	2,3	1,9	1,6	0,595
Trenn-/Sammelgelpuffer	1,3	1,3	1,3	0,25
10 % SDS	0,05	0,05	0,05	0,01
Rotiphorese Gel 30	1,3	1,7	2	0,134
10 % APS	0,05	0,05	0,05	0,01
TEMED	0,005	0,005	0,005	0,001

Je nach Art der aufzutragenden Proben wurden unterschiedliche Probenpuffer sowie Denaturierungstemperaturen verwendet. Für Proben aus Pflanzenmaterial wurde ein zweifacher SDS-Ladepuffer (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% Glycerin, 0,01% Bromophenolblau, eine Tablette cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail auf 10 ml (Roche, Mannheim)) mit frisch zugesetztem DTT (100 mM) verwendet, während für aufgereinigte und *in vitro* translatierte und transkribierte Proben ein zweifacher SDS-Ladepuffer (100 mM Tris-HCl pH 6.8, 20% Glycerin, 8% SDS, 0,01% Bromophenolblau, eine Tablette cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail auf 10 ml (Roche, Mannheim)) mit 10% Beta-Mercaptoethanol versetzt wurde. Die Proben der Aufreinigung oder TnT wurden anschließend bei 95°C für 5 Minuten denaturiert, während Pflanzenproben auf 70°C für 6 Minuten erhitzt wurden. Als Referenz für die Proteingröße wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10 bis 180 kDa, Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig) verwendet. Für die Elution nach Coimmunopräzipitation von Tabakproben wurde teilweise zweifacher Urea-Puffer auf die Proben gegeben. Dieser besteht aus 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 3% SDS, 7 M Harnstoff, 30% Glycerin, 0,25 M DTT sowie 0,005% Bromophenolblau.

3.4.5.Färbung der SDS-Gele

Coomassie-Brilliantblau-Färbung

Das Polyacrylamidgel wurde für 30 Minuten in Coomassie®Brilliantblau (CBB)-Lösung (0,5 g CBB R250 in 100 ml H₂O bidestilliert, 0,5 g CBB G250 in 100 ml Methanol, 20 ml Essigsäure) unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wird die unspezifische Hintergrundfärbung

3. Methoden

mit einem Gemisch aus Methanol (40%) und Essigsäure (10%) entfärbt. Dieses Gemisch wird alle 30 Minuten ausgetauscht, bis die Proteinbanden klar zu erkennen sind.

Silberfärbung

Um die Proteine im Polyacrylamidgel anzufärben, wurde diese mit Silberionen nach der Methode von Blum *et al.*, 1987 gefärbt. Das Gel wurde für eine Stunde in Fixierlösung (50% Methanol, 12% Essigsäure, 0,05% Formaldehyd) fixiert. Nach dreimaligem Waschen in 50% Ethanol für jeweils 15 Minuten wurde das Gel für eine Minute in 0,2 g/l Natriumthiosulfat vorbehandelt und anschließend dreimal mit Kranwasser abgespült, ehe es für 20 Minuten mit 2 g/l Silbernitrat und 0,075% Formaldehyd getränkt wurde. Nach zweimaligem Abspülen mit Kranwasser wurde Entwicklerlösung (60 g/l Natriumcarbonat, 0,05% Formaldehyd, 4 mg/l Natriumthiosulfat) auf das Gel gegeben und dann solange geschwenkt, bis Markerbanden sowie Proteinbanden deutlich sichtbar wurden. Anschließend wird das Gel rasch dreimal mit Leitungswasser abgespült und die Entwicklung des Gels für 30 Minuten in 50% Methanol und 12 % Essigsäure gestoppt. Anschließend wird das Gel für 30 Minuten in Wasser inkubiert und eingescannt.

3.4.6. Proteintransfer auf Nitrocellulose-Membran

Proteine, welche zuvor durch die SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt wurden, werden mit dieser Methode auf eine Nitrocellulose-Membran (0,2 µm) übertragen. Hierfür wurde die Blotkammer „TE 22 Mini Tank Transfer Unit“ der GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg) verwendet sowie die Methode von Towbin *et al.*, 1979. Der verwendete Towbin-Puffer bestand aus 20% (v/v) Ethanol, 150 mM Glycin, 20 mM Tris und 0,01% (w/v) SDS. Geblottet wurde entweder über Nacht bei 4°C und 35V oder für 2 Stunden bei 200mA und Raumtemperatur.

Um den Transfer der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran zu überprüfen, wurde die Membran mit Ponceau-S-Färbelösung (0,1% Ponceau-S, 5% Essigsäure) reversibel gefärbt. Nach mehrmaligem Spülen mit Wasser kamen so die Proteinbanden auf der Membran zum Vorschein. Das restliche Ponceau-S wurde mit Blockinglösung (4% Milchpulver in TBS, s.u.) abgewaschen.

3.4.7. Immunologischer Nachweis von Proteinen

Nachdem die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in 4% Milchpulver in TBS (50 mM Tris/HCl pH 7,8, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ x 6H₂O) geblockt war, wurde die Blockinglösung verworfen und der erste Antikörper (*siehe* Tabelle 2-2: verwendete erste und zweite Antikörper für die Immunoblot-Detektionen *Tabelle 2-2*) in entsprechender Verdünnung in frischer Blockinglösung auf die Membran gegeben. In diesem inkubierte die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der erste Antikörper

3. Methoden

abgenommen und die Membran dreimal mit TBS-T (TBS mit 0,2% TWEEN®20) gewaschen, bevor sie im zweiten Antikörper in frischer Blockinglösung für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran erneut dreimal mit TBS-T gewaschen und anschließend mit Amersham ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent von GE Healthcare (München) detektiert. Für die Detektion des Chemilumineszenz-Signals wurde der Amersham Imager 600 von GE Healthcare verwendet.

3.4.8. Proteinextraktion aus Pflanzengewebe

Je nach Pflanzenmaterial gab es unterschiedliche Protokolle zur Proteinextraktion aus pflanzlichem Material.

Für den **Screen der Proteinexpression** in stabil transformierten *A. thaliana*-Pflanzen wurde von 5-6 Wochen alten Pflanzen jeweils ein Blatt genommen und in einem 1,5ml-Reaktionsgefäß mit Glasperlen überführt. Das Blatt wurde dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit Hilfe des TissueLyser II von QIAGEN (Hilden) für eine Minute bei einer Amplitude von 30 feingeschreddert. Sofort wurden 80µl zweifacher Probenpuffer mit frischem DTT hinzugefügt und die Proben auf 70°C für 6 Minuten erhitzt. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten bei 5000xg und Raumtemperatur abzentrifugiert, bevor von dem Überstand 15µl auf ein SDS-Gel geladen wurde.

Für die **Co-Immunopräzipitation** wurde entweder Pflanzenmaterial von *Nicotiana benthamiana*-Blättern oder etiolierte Keimlinge von *Arabidopsis thaliana* verwendet. Das Material wurde unter flüssigem Stickstoff in einem Mörser klein gemörsert und anschließend in einen eisgekühlten Mörser überführt, in welchen der Extraktionspuffer mit einem Verhältnis von 1 g Pflanzenmaterial zu 2 ml Extraktionspuffer (*siehe Tabelle 3-3*) hinzugegeben wurde. Dieses Gemisch wurde für weitere 20 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend erneut gemörsert und dann in einem 15ml-Reaktionsgefäß bei 4°C für eine Stunde invertiert. Anschließend wurden die Proben bei 4°C und 4000xg für 45 Minuten abzentrifugiert und der Überstand weiterverwendet. Je nach Material wurden unterschiedliche Puffer für die Extraktion der Proteine genutzt (*siehe Tabelle 3-3*).

3.4.9. Zell-Fraktionierung (Mikrosomenpräparation)

Die gesamte Präparation der Mikrosomen verläuft bei 4°C Raumtemperatur. Zwei Blätter von transient transformiertem Tabak (*N. benthamiana*) werden in flüssigem Stickstoff gemörsert. Pro gemörsertem Blatt erfolgt die Zugabe von 4 ml Extraktionspuffer (50mM HEPES pH 7.8, 500mM Saccharose, 3mM DTT, 3mM EDTA, 1% PVP, cCOMPLETE Protease Inhibitor (Roche, Mannheim), PhosSTOP SERVA) und anschließendem Mörsern. Das Pflanzenextrakt wird nun bei 10.000 x g für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand durch einen Miracloth-Filter gegeben. Durch Ultrazentrifugation bei 100.000 x g für 45 Minuten bei 4°C wird das Filtrat

3. Methoden

in eine mikrosomale (Pellet) und eine lösliche Fraktion (Überstand) unterteilt. Insgesamt wurden drei Pellets in je 100 µl Mikrosomenpuffer gelöst (50 mM HEPES pH 7.8, 150 mM NaCl, 300 mM Saccharose, cOMplete Protease Inhibitor (Roche, Mannheim), PhosSTOP SERVA) und gepottert, anschließend wurden die gepotterten Pellets der gleichen Ausgangsprobe vereint und in 5 µl-Schritten mit insgesamt 15 µl TX-100 versetzt. Diese Lösung solubilisierte für 20 Minuten bei 4°C und konstanter Rotation und nachfolgender Rotation bei Raumtemperatur für 10 Minuten. Die solubilisierten Mikrosomen zentrifugierten nochmals für 30 Minuten bei 4°C und 50.000 x g, der daraus resultierende Überstand wurde als Input für die nachfolgende CoIP verwendet.

3.4.10.Co-Immunopräzipitation

Für die CoIP wurden die Agarose-Traps für das grün-fluoreszierende Protein (GFP) von Chromotek (Planegg) verwendet. Diese wurden in dem jeweils verwendeten Extraktionspuffer gewaschen und equilibriert. Dabei wurden 50 µl GFP-Traps auf das Extrakt aus 3 g Pflanzenmaterial berechnet. Das Pflanzenextrakt aus dem Pflanzenmaterial (*siehe 3.4.8*) wurde durch einen Miracloth-Filter (Merck KGaA, Darmstadt) gegeben, bevor es weiter verwendet wurde. Von dem gefilterten Extrakt werden 50 µl abgenommen und als Gesamtprotein eingefroren. Das restliche Extrakt wurde auf die gewaschenen Beads gegeben und beides zusammen bei 4°C für eine Stunde invertiert. Anschließend wurden die Proben für 15 Minuten bei 4°C und 1000xg zentrifugiert und 50 µl von dem Überstand als Fraktion „nicht-gebundene Proteine“ eingefroren, der restliche Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden die Beads dreimal in 2 ml des jeweiligen Waschpuffer I (*siehe* Tabelle 3-3: verwendete Pufferkombinationen zur Extraktion von Proteinen aus Pflanzenmaterial für Co-Immunopräzipitation *Tabelle 3-3*) gewaschen. Nach dem Transfer der Beads in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurden die Beads noch zweimal mit je 1 ml des jeweiligen Waschpuffer II gewaschen.

Für die nachfolgende MS-Analyse wurden die Beads entweder noch dreimal mit 20mM Ammoniumbicarbonat-Puffer gewaschen und dann ohne Überstand bei -20°C bis zur Analyse gelagert (NPH3-Pulldown) oder mit 50 µl 2xProbenpuffer mit Beta-Mercaptoethanol für 5 Minuten auf 95°C erhitzt und der Überstand zum Proteome Center Tübingen gebracht (14-3-3-Pulldown).

3. Methoden

Tabelle 3-3: verwendete Pufferkombinationen zur Extraktion von Proteinen aus Pflanzenmaterial für Co-Immunopräzipitation

	Keimlinge <i>A. thaliana</i>	Blätter <i>N. benthamiana</i>	Mikrosomen <i>N. benthamiana</i>
Extraktionspuffer	50 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 0,75% Triton™ X-100, 1 Tablette PI (cOmplete™ Proteaseinhibitor Cocktail /50 ml (Roche), 1 Tablette PhosSTOP™/ 10 ml (Roche, Mannheim)	25 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 2mM DTT, 0,5% (w/v) DOC, 1% (v/v) NP40, 1 Tablette PI (cOmplete™ Proteaseinhibitor Cocktail /50 ml (Roche), 1 Tablette PhosSTOP™/ 10 ml (Roche, Mannheim)	Siehe Mikrosomenpuffer in <i>Kapitel 3.4.9</i>
Waschpuffer I	50 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% (v/v) Triton™ X-100	Siehe Extraktionspuffer	50 mM HEPES pH 7.8, 150 mM NaCl, 0,2 % TX-100
Waschpuffer II	50 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl	25 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl	50 mM HEPES pH 7.8, 150 mM NaCl

3.4.11.MS-Analyse (PCT)

Die Proben des GFP-Pulldowns (epsilon:GFP oder GFP:NPH3) wurden jeweils vollständig vom Proteome Center Tübingen (PCT) prozessiert. Im Falle der epsilon:GFP-Proben wurden diese im Gel mit Trypsin verdaut, bevor der Verdau in einem Proxeon Easy-nLC gekoppelt an QExactiveHF Massenspektrometer gemessen wurde (60 min, Top7, HCD).

Die Daten wurden anschließend per MaxQuant Software (Vs. 1.5.2.8) verarbeitet, wobei das Spektrum gegen die Datenbank von *A. thaliana* (UniProt Database) abgeglichen wurde. Die Rohdaten wurden mit einer *False Discovery Rate* von 1% untersucht.

Aus jeweils zwei biologischen Replikaten wurden Proteine exkludiert, welche entweder im Pulldown von GFP auftauchten oder aber nur in einem der zwei Experimente vorkamen. Die Signalintensitäten der putativen und auch bereits bekannten 14-3-3-Interaktoren wurden nach Epsilon-GFP normalisiert und anschließend das relative Verhältnis zwischen den un- und den Blaulicht-behandelten ermittelt.

Die Proben des GFP:NPH3-Pulldowns wurden *on-beads* mit Trypsin verdaut, wobei das Standardprotokoll des PCT verwendet wurde. Anschließend wurden auch diese Proben in

3. Methoden

einem Proxeon Easy-nLC gekoppelt an QExactiveHF Massenspektrometer gemessen (37 min, Top12, HCD für verdünnte Proben, 60 min, Top7, HCD für die finale Messung).

Die Rohdaten wurden wieder mit der MaxQuant Software (Version 1.5.2.8 mit integrierter Andromeda-Peptid-Suchmaschine) prozessiert, wobei das Spektrum gegen die Datenbank von *A. thaliana* (UP 0000 0654 8_3702_complete_2019-02-13.fasta) sowie die Sequenz von GFP:RPT3 abgeglichen wurde. Die Mindestpeptidlänge betrug hierbei vier Aminosäuren und Phospho(STY) wurde als mögliche variable Modifikation inkludiert.

3.4.12.Lipid-Overlay-Assay

Um zu testen, ob aufgereinigte Proteine speziell an bestimmte Lipidarten binden, gibt es die Möglichkeit des *in vitro* Lipid-Overlay-Assays. Bei diesem werden verschiedene Lipide verwendet, welche auf einer Membran immobilisiert vorliegen. Durch Inkubation dieser Membranstreifen mit dem aufgereinigten Protein und der nachfolgenden Immunodetektion des aufgereinigten Proteins lässt sich feststellen, an welche Lipidarten das zu untersuchende Protein gebunden hat. Somit können auch Ladungspräferenzen des Proteins festgestellt werden. Die verwendeten Lipid-Membranen wurden von Echelon Biosciences Inc., Salt Lake City, USA bezogen (PIP Strips™). Bei der Durchführung des Protokolls wurden die Angaben des Herstellers eingehalten, wobei PBS als Puffer verwendet und 0,1 µg/ml Protein eingesetzt wurde.

3.4.13.Liposomen-Bindeassay

Eine weitere *in vitro*-Methode zur Evaluation der Bindung eines Proteins an Lipide mit bestimmten Eigenschaften stellt der Liposomen-Bindeassay dar. Hier werden große einschichtige Vesikel (*large unilamellar vesicles*, LUV) gebildet, welche mit aufgereinigten Proteinen inkubiert werden. Anschließend werden die Vesikel pelletiert, sodass auch das an die LUVs bindende Protein mit im Pellet enthalten ist. Per Western Blot kann festgestellt werden, ob die hinzugegebenen Proteine sich in der Fraktion des Überstandes befinden oder ob sie an die LUVs gebunden haben und deshalb im Pellet nachzuweisen sind. Die Durchführung der Methode erfolgte nach dem Protokoll aus Munnik, 2013 mit wenigen folgenden Abweichungen:

Zu den Proteinproben wurde zusätzlich zum 6xBindepuffer noch 1xcOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Mannheim) hinzugegeben. Anschließend wurden die Proteine für 20 Minuten bei 50.000xg zentrifugiert, um bei der späteren Zugabe nur den Überstand und somit lösliche Proteine zu den Liposomen hinzuzugeben. Damit wurde verhindert, dass sich später im Pellet der Liposomen-Fraktion präzipitierte Proteine befinden, welche nicht an die Liposomen gebunden haben.

3. Methoden

Nachdem die Proteine zusammen mit den Liposomen für 45 Minuten bei Raumtemperatur zusammen inkubiert wurden, wurden die Liposomen für 30 Minuten bei 12°C pelletiert und anschließend das Pellet dreimal mit 1xBindepuffer gewaschen.

Auf ein SDS-Gel wurden 4µl des Überstandes sowie 8µl des Liposomenpellets aufgetragen.

3.4.14. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

Sowohl etiolierte Keimlinge von *A. thaliana* als auch Blattproben von *N. benthamiana* wurden am „Spectral Confocal & multiphoton system“ Leica TCS SP8 (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Mikroskopie und Histologie, Wetzlar) durchgeführt nach Angaben des Herstellers. Die unterschiedlichen Fluorophore wurden mit Lasern der Wellenlängen 488 nm für GFP und 561 nm für RFP angeregt, während die Signale der jeweiligen Fluorophore in den Emissionsbereichen 505 bis 530 nm für GFP und 600 bis 630 nm für RFP detektiert wurden.

Die Aufnahmen wurden anschließend mit dem Programm LAS-X lite (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Mikroskopie und Histologie, Wetzlar) prozessiert.

3. Methoden

4. Ergebnisse

Mithilfe einer Hefe-2-Hybrid-Sichtung (Y2H) wurden von vorigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe putative Interaktionspartner der 14-3-3-Proteine identifiziert (Jaspert *et al.*, 2011). Hierfür wurde eine cDNA-Bibliothek aus drei Tage alten *Arabidopsis*-Keimlingen verwendet, für welche vier Isoformen der 14-3-3-Proteine aus *Arabidopsis* - Epsilon, Kappa, Omega und Upsilon - als Köder dienten. Unter anderem konnten vier Proteine der NRL-Familie als Interaktionspartner der 14-3-3-Proteine identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um NPH3 (NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTYL 3), NPY3 (NAKED PINS IN YUCCA MUTANTS 3), ENP/NPY1 (ENHANCER OF PINOID/ NAKED PINS IN YUCCA MUTANTS 1) sowie RPT2 (ROOT PHOTOTROPISM 2). NPH3 wurde jedoch als einziges der NRL-Proteine in den Sichtungen aller vier 14-3-3-Isoformen identifiziert und anschließend in einer Y2H-Analyse unter Verwendung der Vollängen-cDNA bestätigt (Throm, 2017). In einer späteren Y2H-Analyse konnte die Interaktion zwischen 14-3-3 und ENP sowie DOT3 (DEFECTIVELY ORGANIZED TRIBUTARIES 3), einem weiteren NRL-Protein, nachgewiesen werden (Reuter *et al.*, 2021).

Um die Bindestelle für 14-3-3 in NPH3 zu identifizieren, wurden mithilfe einer Y2H-Analyse verschiedene NPH3-Deletionskonstrukte auf ihre Interaktion mit 14-3-3 analysiert. Da die phosphorylierbaren Bindestellen in den Zielproteinen von 14-3-3 meist in einer intrinsisch ungeordneten Region (IDR, *intrinsically disordered regions*, Bustos und Iglesias, 2006) lokalisiert sind, welche keine Sekundärstrukturen ausbildet, wurde die Proteinsequenz von NPH3 diesbezüglich untersucht. Da sich sowohl im N-terminalen als auch im C-terminalen Bereich von NPH3 IDRs befinden (Piovesan *et al.*, 2021), wurden entsprechend verkürzte Varianten von NPH3 für die Y2H-Analyse verwendet. Die N-terminal um 54 Aminosäuren verkürzte Form von NPH3 enthielt die BTB-Domäne und zeigte eine 14-3-3-Assoziation. Wurde jedoch der Bereich *downstream* der Coiled Coil-Domäne deletiert (C-terminale 51 Aminosäuren), fand keine Assoziation von 14-3-3 an NPH3 statt. Dies deutete darauf hin, dass die 14-3-3-Bindestelle im C-terminalen Bereich lokalisiert liegt. Aktuelle Untersuchungen zu proteomweiten *in vivo* Phosphorylierungsstellen machen deutlich, dass folgende Positionen in NPH3 phosphoryliert vorliegen: S722, S723, S744 und S746 (Mergner *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). Diese Serine wurden gegen Alanin ausgetauscht. Einzig der Austausch der drittletzten Aminosäure - des Serins an Position 744 - zu Alanin bewirkte, dass 14-3-3 nicht mehr an NPH3 im Y2H assoziierte (Throm, 2017; Reuter *et al.*, 2021; Sullivan *et al.*, 2021). Die Mimikrierung einer phosphorylierten Aminosäure durch den Austausch des Serins zu Glutamat oder Aspartat bewirkte jedoch keine 14-3-3-Assoziation. Dies war nicht überraschend, da 14-3-3 nur in wenigen Fällen an Zielproteine mit Phosphorylierungs-

4. Ergebnisse

mimikrierung seiner Zielproteine assoziiert (Johnson *et al.*, 2010). Ein Serin an drittletzter Position ist auch in RPT2, NPY3 und ENP/NPY1 konserviert. Dies entspricht einem C-terminal lokalisierten Bindemotiv für 14-3-3-Proteine ((S/T)ⁿx(x)-COOH, Coblitz *et al.*, 2005).

4.1. Die Interaktion von 14-3-3 und NPH3 erfolgt *in planta* über ein C-terminales Bindemotiv

Um die Ergebnisse des Y2H-Assays zur Interaktion von 14-3-3 und NPH3 *in planta* zu verifizieren, wurden Blätter von *N. benthamiana* mit 2in1-Vektoren (pFRETgc-2in1-NC-Vektoren, Hecker *et al.*, 2015) transient transformiert und in kontinuierlichem Licht gehalten (Abbildung 4.1 A). Diese erlauben die Co-Expression der GFP-getaggen 14-3-3-Isoform Omega und mCherry-getaggttem NPH3 beziehungsweise NPH3-S744A. Durch Verwendung der 2in1-Vektoren kann sichergestellt werden, dass beide Proteine in etwa gleichen Mengen exprimiert in einer transformierten Zelle vorliegen. Die Tabakblätter wurden zwei Tage nach transients Transformation geerntet und ein Totalproteinextrakt hergestellt, um anschließend eine Immunpräzipitation von entweder NPH3 oder 14-3-3 durchzuführen.

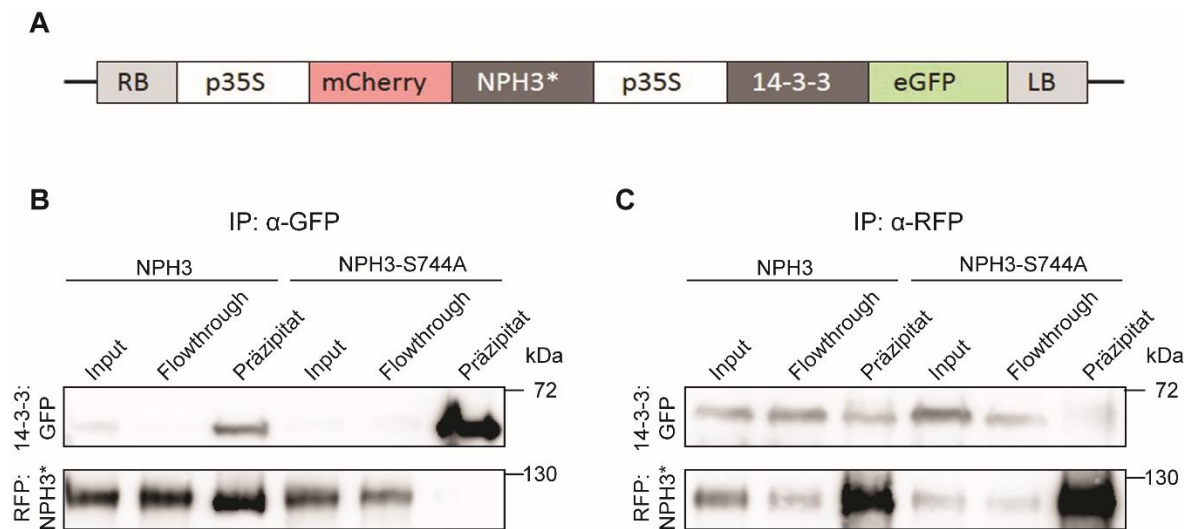


Abbildung 4.1: NPH3 und 14-3-3 (Omega) interagieren *in planta*

Blätter von *N. benthamiana* wurden mit 2in1-Vektoren transient transformiert, welche die Expression von 14-3-3:GFP (Isoform Omega) und mCherry:NPH3-Varianten unter Kontrolle eines 35S-Promotors erlauben. **A** Schematische Darstellung der 2in1-Plasmide. NPH3* bezeichnet eine der beiden NPH3-Varianten, NPH3 (unverändertes Protein) oder NPH3-S744A. **B** Immunpräzipitation (IP) von 14-3-3:GFP mit Immundetektion von 14-3-3:GFP (oben) sowie RFP:NPH3* (unten) nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine aus Input, Flowthrough und Präzipitat. **C** IP von mCherry:NPH3* mit Immundetektion von 14-3-3:GFP (oben) und RFP:NPH3* (unten) nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine aus Input, Flowthrough und Präzipitat.

Die Immundetektion weist RFP:NPH3 im 14-3-3:GFP-Präzipitat nach, jedoch nicht die Bindemutante RFP:NPH3-S744A (Abbildung 4.1 B). Wurde RFP:NPH3 immunpräzipitiert, konnte auch 14-3-3:GFP im Präzipitat nachgewiesen werden (Abbildung 4.1 C). Letzteres war

4. Ergebnisse

jedoch nicht im Präzipitat von RFP:NPH3-S744A enthalten. Durch die Substitution des Serins an Position 744 in NPH3 wurde hier die Interaktion von 14-3-3 und NPH3 unterbunden und somit die Ergebnisse der Y2H-Analysen *in planta* bestätigt (Reuter *et al.*, 2021).

4.2. Die Bindung von 14-3-3 an NPH3 erfolgt in Abhängigkeit von Blaulicht

NPH3 liegt in etiolierten Keimlingen in phosphorylierter Form vor und wird durch Blaulicht dephosphoryliert (Pedmale und Liscum, 2007). Da die Assoziation von 14-3-3 im Allgemeinen phosphorylierungsabhängig erfolgt, kann vermutet werden, dass in etiolierten Keimlingen phosphoryliert vorliegendes NPH3 von 14-3-3 gebunden wird und selbige im Blaulicht dissoziieren.

Um den Einfluss von Licht auf die Interaktion von 14-3-3 und NPH3 zu untersuchen, wurde eine stabil transformierte *Arabidopsis*-Linie verwendet, welche die GFP-getaggte 14-3-3-Isoform Epsilon unter der Kontrolle des nativen Promotors exprimiert (Keicher *et al.*, 2017). Als Kontrolle diente eine transgene Linie, die freies GFP unter der Kontrolle des Ubiquitin10-Promotors bildet. Die Keimlinge wurden drei Tage etioliert angezogen und entweder in Dunkelheit belassen oder für 30 Minuten mit Blaulicht ($1\mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$) bestrahlt. Anschließend erfolgte die Aufbereitung der Proben unter rotem Sicherheitslicht (*Abbildung 4.2 A*). Nach Immunopräzipitation (IP) der GFP-getaggtten Polypeptide wurden Proteine des Rohextraktes und des Präzipitats elektrophoretisch aufgetrennt und durch eine Silberfärbung visualisiert. Sowohl GFP-IP-Proben als auch Epsilon:GFP-IP-Proben wiesen vergleichbare Mengen des präzipitierten Proteins auf (*Abbildung 4.2 B*). Anschließend wurden die Immunopräzipitate vom Proteomcenter Tübingen (PCT) mit Trypsin verdaut und per LC-MS/MS analysiert. Es wurden zwei unabhängige biologische Replikate durchgeführt und Proteine, die eine Assoziation an GFP zeigten, wurden aus der Liste der epsilon:GFP-Interaktionspartner eliminiert, sodass unspezifisch interagierende Proteine ausgeschlossen werden konnten. Die Signalintensitäten bekannter 14-3-3-Interaktoren wurden an die normalisierte Abundanz des *bait*-Proteins angepasst. Während bekannte 14-3-3-Interaktionspartner wie die cytosolische Invertase CINV1 (Gao *et al.*, 2014; Throm, 2017) oder die H⁺-ATPasen AHA1 und AHA2 (Jahn *et al.*, 1997; Fuglsang *et al.*, 1999; Hayashi *et al.*, 2010) sowie EIN2 (ETHYLENE INSENSITIVE 2; Jaspert *et al.*, 2011) und SPS1 (SACCHAROSE-PHOSPHAT SYNTHASE 1; Börnke, 2005) keine Unterschiede in den Proteinintensitäten von etiolierten zu Blaulicht-behandelten Keimlingen aufwiesen, zeigten die Intensitäten von NPH3-Peptiden hoch signifikante Unterschiede auf (*Abbildung 4.2 C, Tabelle 4-1*). Die Bindung von 14-3-3 an NPH3 erfolgte demnach in Abhängigkeit von Blaulicht.

4. Ergebnisse

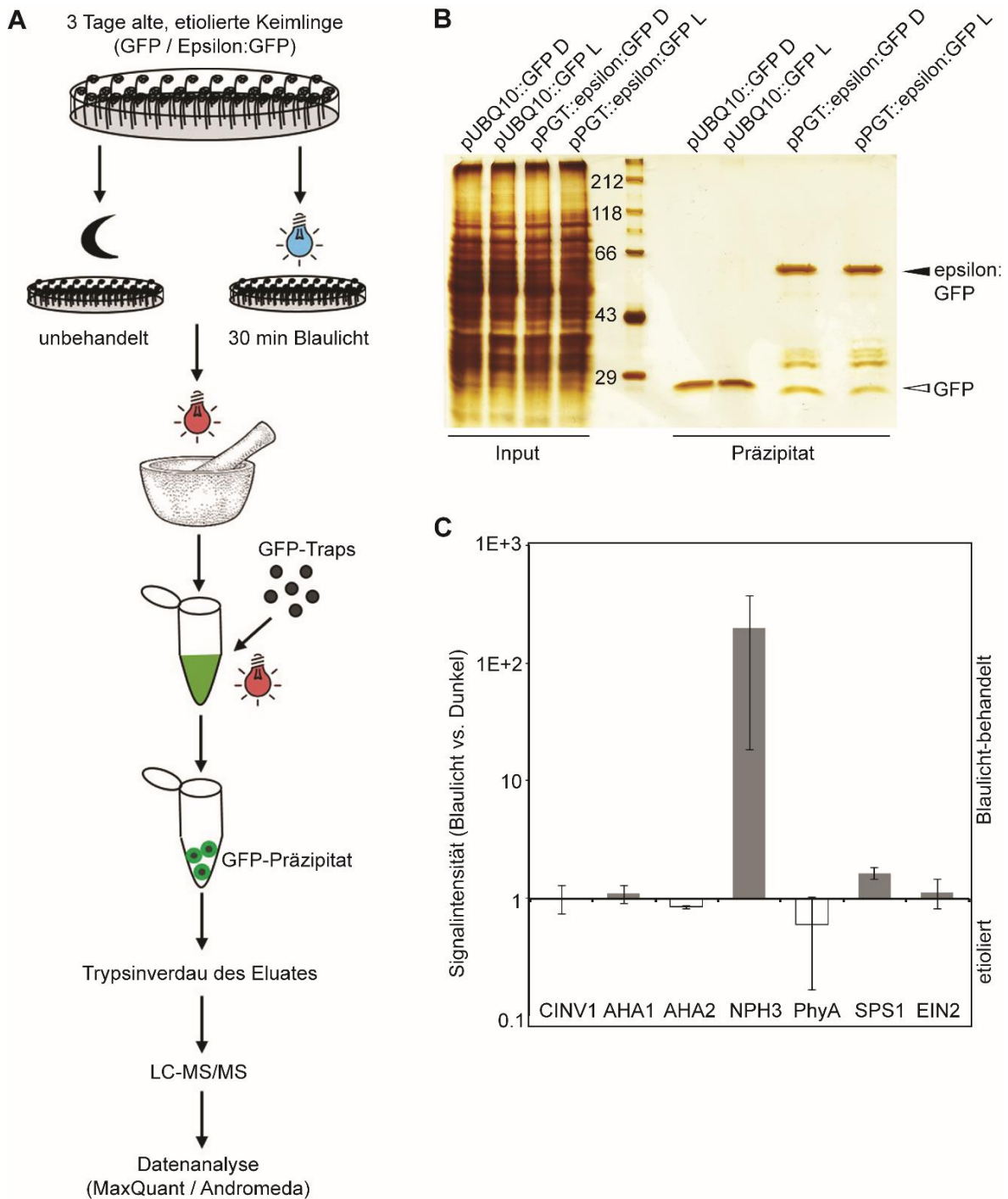


Abbildung 4.2: NPH3 bindet 14-3-3 Blaulicht-abhängig

A Schematische Darstellung der CoIP-MS Analyse von stabilen transgenen *Arabidopsis*-Linien (GFP in Col-0, Epsilon:GFP in Col-0): 3 Tage auf $\frac{1}{2}$ MS-Agar angezogene etiolierte Keimlinge der jeweiligen Linien wurden entweder in Dunkelheit belassen (D) oder für 30 Minuten mit Blaulicht bestrahlt (L), anschließend in rotem Sicherheitslicht aufbereitet und aus dem Rohextrakt unter rotem Sicherheitslicht GFP beziehungsweise Epsilon:GFP präzipitiert. Das mit Trypsin verdaute Präzipitat wurde anschließend in einer LC-MS/MS vermessen, die Datenanalyse erfolgte mit MaxQuant und integriertem Andromeda, **B** Silberfärbung eines SDS-Gels mit dem Präzipitat der Immunpräzipitation von GFP und 14-3-3 Epsilon:GFP sowie des Inputs, **C** Mittelwerte der Signalintensitäten aus zwei MS-Messungen der Präzipitate aus **B** nach deren Trypsinverdau. Die Intensitäten wurden nach Epsilon:GFP normalisiert und im Verhältnis von Peptidintensitäten aus Blaulicht-behandelten Proben zu jenen aus etiolierten Keimlingen dargestellt

4. Ergebnisse

Tabelle 4-1: Daten der MS-Analyse der 14-3-3:GFP-Coimmunopräzipitation

Rohdaten sowie nach 14-3-3 epsilon:GFP (GRF10) normalisierte Werte der Intensitäten der immunpräzipitierten Proteine, D: Proben der etiolierten Keimlinge, L: Proben der Blaulicht-behandelten Proben, kDa: Kilodalton, R1: Experiment 1, R2: Experiment 2, rot unterlegt: Baitprotein GRF10 bzw epsilon:GFP, grün unterlegt: NPH3, gelb unterlegt: Verhältnis der normalisierten Intensitäten von Blaulicht-behandelten zu unbehandelten Probe

AGI-Code	Gen-name	Beschreibung	Molekulargewicht (kDa)	Peptide R1		Sequence coverage R1 (%)		Intensitäten R1		Normalisierte Intensitäten R1		Intensitäten (L/D) R1
				D	L	D	L	D	L	D	L	
AT1G22300	GRF10	14-3-3-like protein GF14 epsilon	28,9	32	30	79,5	79,5	3E+11	4E+11	3E+11	3E+11	1
AT1G35580	CINV1	Alkaline/neutral invertase CINV1	62,834	35	32	64,2	64,2	3E+10	3E+10	3E+10	2E+10	0,735
AT2G18960	AHA1	ATPase 1, plasma membrane-type	104,22	31	36	36,4	43,4	3E+09	4E+09	3E+09	4E+09	1,28
AT4G30190	AHA2	ATPase 2, plasma membrane-type	104,4	33	37	39,9	42,6	4E+08	4E+08	4E+08	3E+08	0,819
AT5G64330	NPH3	Non-phototropic hypocotyl 3	81,872	5	22	7,4	39	5E+07	1E+09	5E+07	9E+08	18,5
AT1G09570	PhyA	Phytochrome A	125,02	1	1	0,9	1,2	5E+06	6E+06	4E+06	4E+06	1,02
AT5G11110	SPS1	Sucrose-phosphate synthase 1	117,32	13	18	15,6	22,7	2E+08	5E+08	2E+08	4E+08	1,819
AT5G03280	EIN2	Ethylene-insensitive protein 2	140,95	6	9	6,6	9	8E+07	1E+08	8E+07	1E+08	1,45
AT3G45780	phot1	Phototropin-1, Blaulicht-Photorezeptor	111,69	10	14	8,8	14,7	2E+08	3E+08	2E+08	3E+08	1,61

AGI-Code	Gen-name	Beschreibung	Molekulargewicht (kDa)	Peptide R2		Sequence coverage R2 (%)		Intensitäten R2		Normalisierte Intensitäten R2		Intensitäten (L/D) R2
				D	L	D	L	D	L	D	L	
AT1G22300	GRF10	14-3-3-like protein GF14 epsilon	28,9	33	33	76,4	76,4	3E+11	4E+11	3E+11	3E+11	1
AT1G35580	CINV1	Alkaline/neutral invertase CINV1	62,834	31	30	61,2	57	3E+10	4E+10	3E+10	3E+10	1,275
AT2G18960	AHA1	ATPase 1, plasma membrane-type	104,22	33	30	41,5	36,1	3E+08	3E+08	2E+08	2E+08	0,895
AT4G30190	AHA2	ATPase 2, plasma membrane-type	104,4	34	31	38,9	36	3E+09	3E+09	3E+09	3E+09	0,87
AT5G64330	NPH3	Non-phototropic hypocotyl 3	81,872	1	14	1,5	24,4	0	5E+08	igentlich	4E+08	377
AT1G09570	PhyA	Phytochrome A	125,02	4	1	5,1	1,6	2E+07	4E+06	2E+07	3E+06	0,166
AT5G11110	SPS1	Sucrose-phosphate synthase 1	117,32	8	9	12,8	14,4	1E+08	2E+08	1E+08	2E+08	1,4615
AT5G03280	EIN2	Ethylene-insensitive protein 2	140,95	5	3	5,1	2,7	5E+07	5E+07	4E+07	4E+07	0,807
AT3G45780	phot1	Phototropin-1, Blaulicht-Photorezeptor	111,69	8	3	9	3,4	9E+07	8E+07	8E+07	6E+07	0,73

4. Ergebnisse

Die Daten aus diesen MS-Messungen zeigen eine klare Interaktion von 14-3-3 und NPH3 im Blaulicht. Unter der Voraussetzung, dass 14-3-3-Assoziation normalerweise phosphorylierungsabhängig erfolgt, steht dieses Ergebnis im offenbaren Gegensatz zur Licht-induzierten Dephosphorylierung von NPH3 (Pedmale und Liscum, 2007).

Um diese Ergebnisse aus *Abbildung 4.2* unabhängig zu bestätigen, wurde die *loss-of-function-Arabidopsis*-T-DNA-Insertionslinie *nph3-7* (Kansup *et al.*, 2014) mit GFP:NPH3 transformiert. *Abbildung 4.3 A* zeigt die stabile Expression von GFP:NPH3 unter Kontrolle des konstitutiv exprimierenden Promotors p35S sowohl in Zellen des Hypokotyls als auch in jenen der Wurzelspitze. Als Referenzlinie wurde erneut Col-0 verwendet, welche unter Kontrolle des Ubiquitin10-Promotors freies GFP exprimiert. Diese und die generierte GFP:NPH3-exprimierende *nph3-7*-Linie wurden wie bereits in *Abbildung 4.2* beschrieben verarbeitet (*Abbildung 4.3 C*).

Abbildung 4.3 D zeigt die Verhältnisse der gemäß NPH3 normalisierten Signalintensitäten in den GFP-Immunpräzipitationen aus Blaulicht-behandelten und etiolierten Keimlingen von zwei biologischen Replikaten. Von 13 in *Arabidopsis* vorkommenden 14-3-3-Isoformen liegen 11 im NPH3-Präzipitat vor. Die zwei nicht nachweisbaren Isoformen sind Pi und Iota, beide gehören der Epsilon-Untergruppe an, wobei Iota ausschließlich in Pollen zu finden ist, während Pi nur in der chalazalen Endosperm-Cyste des Samens vorkommt (Keicher *et al.*, 2017). Bei den detektierten Isoformen wird deutlich, dass die Intensitäten von allen 14-3-3-Isoformen in Blaulicht-behandelten Proben wesentlich höher sind als jene in den Dunkelproben. Augenscheinlich wird NPH3 nicht von den Isoformen einer der beiden Unterfamilien bevorzugt, da sowohl Mitglieder der Epsilon-Unterfamilie als auch Isoformen der Non-Epsilon-Unterfamilie mit NPH3 immunopräzipitieren. Als Referenz diente phot1, ein bekannter Interaktionspartner von NPH3 (Lariguet *et al.*, 2006; de Carbonnel *et al.*, 2010; Haga *et al.*, 2015), welches in etiolierten Keimlingen höhere Intensitäten aufwies als in den Blaulicht-behandelten Proben. Weitere Blaulicht-regulierte Interaktionspartner von NPH3 konnten jedoch nicht identifiziert werden. Die Daten aus *Abbildung 4.3* bestätigen die Ergebnisse der MS-Messungen des 14-3-3:GFP-Pulldowns. Die Interaktion zwischen NPH3 und 14-3-3 erfolgt in Abhängigkeit von Blaulicht.

Die Daten zu *Abbildung 4.3 D* sind in *Tabelle 4-2* zu finden.

4. Ergebnisse

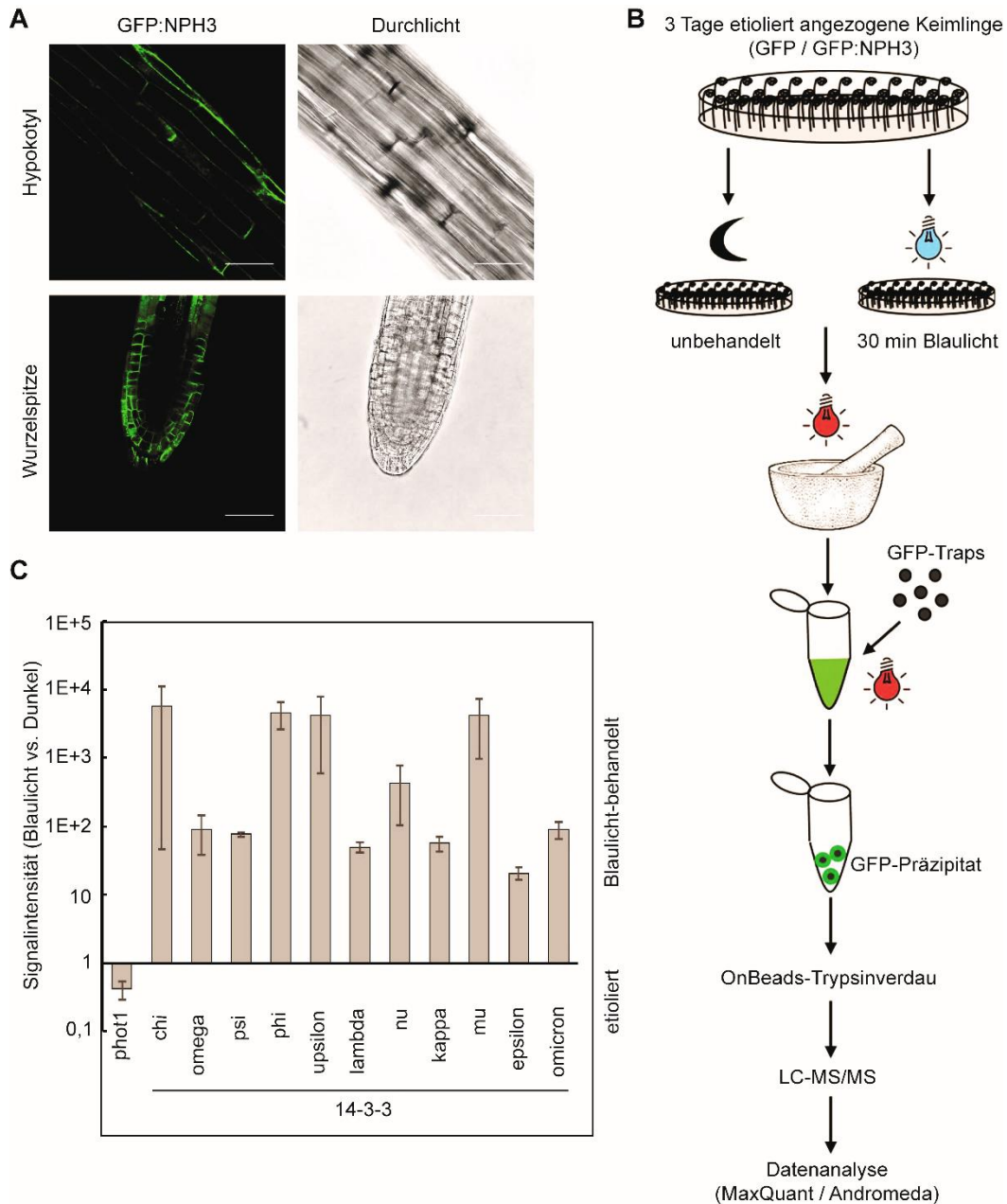


Abbildung 4.3: 14-3-3 bindet Blaublicht-abhängig an NPH3

A Etablierung einer stabilen Pflanzenlinie in *A. thaliana*, welche konstitutiv GFP:NPH3 im *nph3-7*-Hintergrund exprimiert. CLSM-Aufnahmen von 3 Tage etioliert angezogenen Keimlingen wurden zusammen mit Lea Reuter aufgenommen. **B** Schematische Darstellung des Experiments: 3 Tage etioliert angezogene Keimlinge von stabilen Linien (konstitutive Expression von GFP bzw. GFP:NPH3) wurden teils für 30 Minuten mit Blaublicht bestrahlt und anschließend in rotem Sicherheitslicht prozessiert. Die Immunopräzipitation von GFP bzw. GFP:NPH3 erfolgte in rotem Sicherheitslicht, die Präzipitate wurden onBeads mit Trypsin verdaut und per LC-MS/MS detektiert. Die Datenanalyse erfolgte mit dem Programm MaxQuant und integriertem Andromeda. **C** Signalintensitäten aus zwei MS-Messungen der Trypsin-verdauten Präzipitate von *phot1* und den detektierten 14-3-3-Isoformen. Die Intensitäten wurden nach GFP:NPH3 genormt und im Verhältnis von Peptiden aus Blaublicht-behandelten zu jenen aus unbehandelten Keimlingen dargestellt.

4. Ergebnisse

Tabelle 4-2: Rohdaten sowie normalisierte Daten aus zwei MS-Analysen nach GFP:NPH3-Präzipitation

Daten zu Abbildung 4.3 D: Gemäß NPH3 normalisierte Signalintensitäten sowie Rohdaten der MS-Analyse nach Immunopräzipitation von GFP:NPH3, D: Proben der etiolierten Keimlinge, L: Proben der Blaulicht-behandelten Keimlinge, rot: NPH3 als bait-Protein, gelb: Verhältnis der normalisierten Signalintensitäten der Proben L zu D

AGI-Code	Gen-name	Beschreibung	Molekulargewicht (kDa)	Peptide R1		Sequence coverage R1 (%)		Intensitäten R1		Normalisierte Intensitäten		Intensitäten (L/D) R1
				D	L	D	L	D	L	D	L	
AT5G64330	NPH3	Non phototropic hypocotyl 3	110,39	59	58	66,9	65,7	1,4E+11	1,7E+11	1E+11	1E+11	1
AT4G09000	GRF1	14-3-3 like protein GF1 Chi	29,931	1	13	3,7	57,7	0	1,4E+09	1E+05	1E+09	11208,21557
AT1G78300	GRF2	14-3-3 like protein GF2 Omega	29,161	3	14	13,5	61,8	1,6E+07	2,8E+09	2E+07	2E+09	142,0695662
AT5G38480	GRF3	14-3-3 like protein GF3 Psi	28,606	2	15	8,6	62,4	7,5E+07	6,4E+09	8E+07	5E+09	70,19977866
AT1G35160	GRF4	14-3-3 like protein GF4 Phi	30,194	1	14	3,7	62,2	0	7,8E+08	1E+05	6E+08	6467,499164
AT5F16050	GRF5	14-3-3 like protein GF5 Upsilon	30,182	1	14	3,7	47	0	9,5E+08	1E+05	8E+08	7818,883586
AT5G10450	GRF6	14-3-3 like protein GF6 Lambda	27,975	3	12	16,1	57,7	1,1E+07	8E+08	1E+07	7E+08	57,85291554
AT3G02520	GRF7	14-3-3 like protein GF7 Nu	29,824	1	11	3,8	37,4	0	9,2E+07	1E+05	8E+07	756,5834848
AT5G65430	GRF8	14-3-3 like protein GF8 Kappa	28,028	3	12	17,3	53,6	2,2E+07	1,9E+09	2E+07	2E+09	70,16942037
AT2G42590	GRF9	14-3-3 like protein GF9 Mu	30,968	1	6	3,6	27,2	0	8,7E+08	1E+05	7E+08	7233,1762
AT1G22300	GRF10	14-3-3 like protein GF10 Epsilon	28,9	3	11	11,4	50,8	1,2E+08	3,6E+09	1E+08	3E+09	24,70764744
AT1G34760	GRF11	14-3-3 like protein GF11 Omicron	27,514	2	3	7,5	15,4	0	1,4E+07	1E+05	1E+07	115,4467667
AT3G45780	phot1	Phototropin-1, Blaulicht-Photorezeptor	111,69	7	4	8	4,6	7,7E+07	4E+07	8E+07	3E+07	0,430981103
AGI-Code	Gen-name	Beschreibung	Molekulargewicht (kDa)	Peptide R2		Sequence coverage R2 (%)		Intensitäten R2		Normalisierte Intensitäten		Intensitäten (L/D) R2
				D	L	D	L	D	L	D	L	
AT5G64330	NPH3	Non phototropic hypocotyl 3	110,39	64	73	75	79,4	3E+11	5E+11	1E+11	1E+11	1
AT4G09000	GRF1	14-3-3 like protein GF1 Chi	29,931	5	18	26,2	71,9	3,6E+08	2,8E+10	2E+08	8E+09	46,43731281
AT1G78300	GRF2	14-3-3 like protein GF2 Omega	29,161	7	17	37,8	66	1,4E+08	8,7E+09	6E+07	2E+09	37,50159976
AT5G38480	GRF3	14-3-3 like protein GF3 Psi	28,606	6	13	33,7	52,2	7,2E+07	9,9E+09	3E+07	3E+09	81,14938653
AT1G35160	GRF4	14-3-3 like protein GF4 Phi	30,194	2	15	10,1	63,3	0	9,3E+09	1E+06	3E+09	2561,187806
AT5F16050	GRF5	14-3-3 like protein GF5 Upsilon	30,182	3	14	14,2	56,3	0	2,1E+09	1E+06	6E+08	579,6796528
AT5G10450	GRF6	14-3-3 like protein GF6 Lambda	27,975	6	12	28,2	57,3	8,5E+07	5,8E+09	4E+07	2E+09	40,64776576
AT3G02520	GRF7	14-3-3 like protein GF7 Nu	29,824	3	14	14,3	64,2	6,2E+07	1,1E+10	3E+07	3E+09	100,2685976
AT5G65430	GRF8	14-3-3 like protein GF8 Kappa	28,028	4	12	17,3	53,2	1,8E+08	1,3E+10	8E+07	4E+09	42,67798655
AT2G42590	GRF9	14-3-3 like protein GF9 Mu	30,968	1	10	3,8	44,1	0	3,4E+09	1E+06	1E+09	951,8281944
AT1G22300	GRF10	14-3-3 like protein GF10 Epsilon	28,9	6	12	27,6	49,2	2,6E+08	7,2E+09	1E+08	2E+09	16,20590734
AT1G34760	GRF11	14-3-3 like protein GF11 Omicron	27,514	2	7	7,1	43,7	0	2,3E+08	1E+06	6E+07	63,67507083
AT3G45780	phot1	Phototropin-1, Blaulicht-Photorezeptor	111,69	11	8	13,6	10,2	3E+08	2E+08	1E+08	6E+07	0,39538695

4. Ergebnisse

Da die Bindung von 14-3-3 an ihre Zielproteine in den meisten Fällen phosphorylierungsabhängig ist (Coblitz *et al.*, 2005), liegt das als 14-3-3-Bindestelle identifizierte Serin an Position 744 in NPH3 vermutlich in Blaulicht-bestrahlten Keimlingen phosphoryliert vor. Frühere Publikationen zeigten jedoch, dass NPH3 in etiolierten Keimlingen stärker phosphoryliert vorliegt als in Blaulicht-behandelten Keimlingen. Die mutmaßliche Phosphorylierung der 14-3-3-Bindestelle S744 steht hier im klaren Gegensatz zu der bisher angenommenen gesamten Dephosphorylierung des Proteins im Blaulicht (Pedmale und Liscum, 2007; Tsuchida-Mayama *et al.*, 2008; Sullivan *et al.*, 2019).

4.3. Die Assoziation von 14-3-3 an NPH3 beeinflusst dessen zelluläre Lokalisation sowie die phototrope Reaktion

Um die funktionelle Relevanz der Blaulicht-induzierten Interaktion von 14-3-3 und NPH3 zu analysieren, wurden unabhängige transgene Linien im Hintergrund der *Arabidopsis*-T-DNA-Insertionslinie *nph3-7* generiert (Kansup *et al.*, 2014). Hierbei handelt es sich um eine *loss-of-function*-Linie, die keine phototrope Reaktion zeigt. Es wurden N-terminal mit GFP fusioniertes NPH3 beziehungsweise NPH3-S744A unter der Kontrolle des 35S-Promotors exprimiert. Letzteres ist nicht zur Interaktion mit 14-3-3 befähigt.

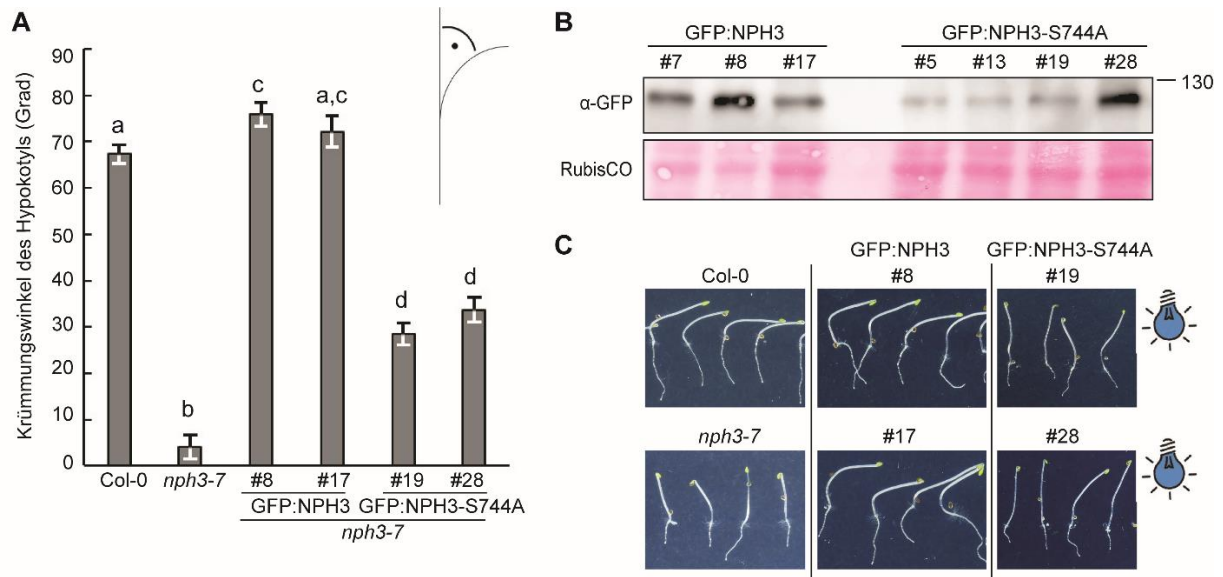


Abbildung 4.4: Die Bindung von 14-3-3 an NPH3 ist für die phototrope Reaktion in Keimlingen von *A. thaliana* notwendig

Keimlinge unabhängiger transgener Linien von *A. thaliana nph3-7*, welche konstitutiv GFP:NPH3 sowie GFP:NPH3-S744A exprimieren, **A** Krümmungswinkel der Hypokotyle von etiolierten Keimlingen nach 24 Stunden unilateraler Blaulicht-Bestrahlung ($n \geq 30$). **B** (Experiment durchgeführt mit Lea Reuter) Immunologischer Nachweis der exprimierten NPH3-Fusionskonstrukte, Ladekontrolle: Ponceau-S, **C** Beispiele für Hypokotylkrümmung der Keimlinge aus **A**

4. Ergebnisse

Es wurden jeweils mindestens zwei unabhängige transgene Linien generiert, deren Expression der GFP-getaggten Proteine mittels Immunodetektion analysiert wurde (*Abbildung 4.4 B*). Ausgewählte Linien wurden zwei Tage etioliert angezogen und anschließend für 24 Stunden unilateralem Blaulicht ($1 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$) ausgesetzt.

Die konstitutive Expression von GFP:NPH3 komplementiert die Linie *nph3-7*, sodass diese bei Bestrahlung mit unilateralem Blaulicht phototrop reagiert. Die Unterschiede in der Expression der Transgene (#8 vs. #17) haben offensichtlich keine Auswirkung auf die Fähigkeit, den *nph3-7*-Phänotypen zu komplementieren (*Abbildung 4.4 B*). Linien, welche konstitutiv GFP:NPH3-S744A exprimieren, weisen eine partielle phototrope Antwort auf, die Krümmung der Hypokotyle in Richtung des Blaulichts ist signifikant reduziert (*Abbildung 4.4 C*). Auch hier wird deutlich, dass selbst eine starke Expression von GFP:NPH3-S744A den Phänotyp von *nph3-7* nicht rettet. Die Interaktion mit 14-3-3 ist demnach essentiell für die Funktion von NPH3 in der phototropen Reaktion von *A. thaliana*.

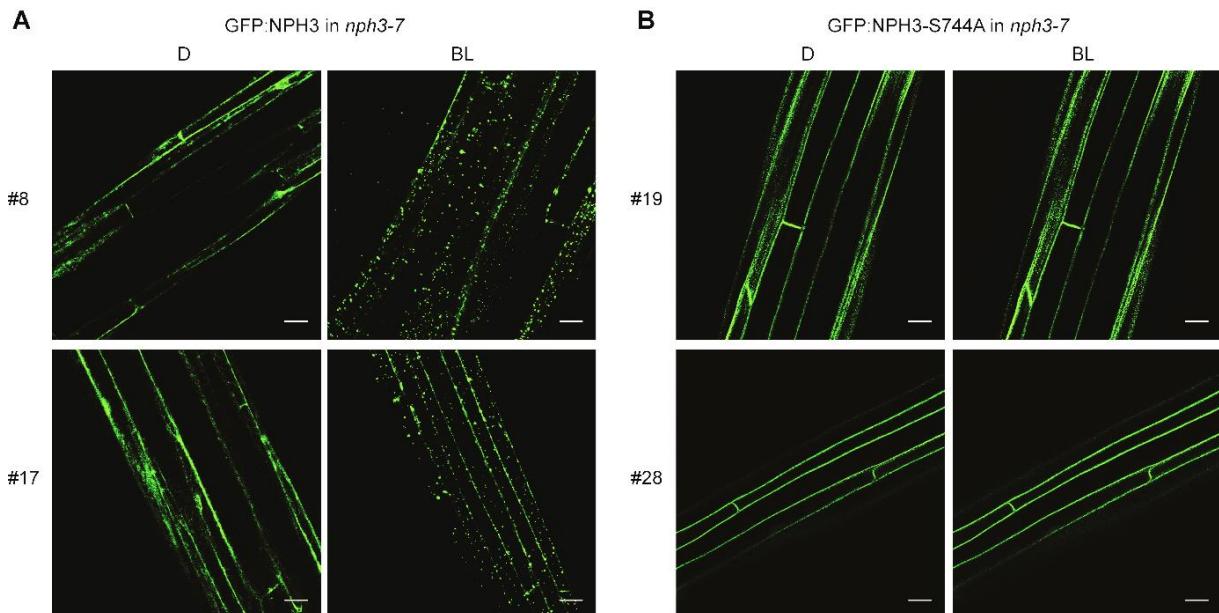


Abbildung 4.5: Die Bindung von 14-3-3 an NPH3 beeinflusst dessen subzelluläre Lokalisation in *A. thaliana*

CLSM-Aufnahmen von Hypokotylen transgener Keimlinge, welche GFP:NPH3 (**A**) oder GFP:NPH3-S744A (**B**) in je zwei unabhängigen stabilen Linien von *A. thaliana nph3-7*. 2 Tage etioliert angezogene Keimlinge vor (D) und nach circa 5 min Blaulicht-Laserbestrahlung (BL), 10%-GFP-Laser, Maßstab 25 μm

Bereits 1999 fand man durch subzelluläre Fraktionierung heraus, dass NPH3 in etiolierten Keimlingen an die Plasmamembran lokalisiert (Motchoulski und Liscum, 1999). Um zu untersuchen, inwiefern die Unterbindung der 14-3-3-Assoziation einen Einfluss auf die Lokalisation von NPH3 in der Zelle hat, wurden etiolierte Keimlinge dieser transgenen Linien mittels CLSM auf die Lokalisation der NPH3-Fusionsproteine untersucht. In den stabilen Linien #8 und #17 lokalisiert GFP:NPH3 in Dunkelheit an der Plasmamembran, dissoziiert von dieser

4. Ergebnisse

als Folge von Blaulicht-Bestrahlung und bildet im Cytosol dynamische Partikel (*Abbildung 4.5 A*). Die Blaulicht-induzierte Dissoziation von NPH3 von der Plasmamembran sowie die Ausbildung cytosolischer Partikel wurde bereits beschrieben (Haga *et al.*, 2015). Unsere Arbeitsgruppe konnte belegen, dass es sich bei diesen Partikeln um membranlose biomolekulare Kondensate handelt (Reuter *et al.*, 2021).

Auch GFP:NPH3-S744A lokalisiert in etiolierten Keimlingen der Linien #19 und #28 an der Plasmamembran. Die Mutation der 14-3-3-Bindestelle in NPH3 hat somit keine Auswirkungen auf die Plasmamembran-Assoziation in Dunkelheit. Im Gegensatz zu GFP:NPH3 verbleibt GFP:NPH3-S744A jedoch auch nach Blaulicht-Bestrahlung an der Plasmamembran. Die Mutation der 14-3-3-Bindestelle verhindert somit die Blaulicht-induzierte Plasmamembran-Dissoziation von NPH3. Dies lässt vermuten, dass die Blaulicht-induzierte Assoziation von 14-3-3 an NPH3 (*Abbildung 4.2, Abbildung 4.3*) für die Internalisierung in cytosolische Kondensate notwendig ist.

4.4. Der C-terminale Bereich von NPH3 ist essentiell für die Bindung an polyacide Phosphoglycerolipide

Die Assoziation des hydrophilen Proteins NPH3 an die Plasmamembran in etiolierten Keimlingen ist bereits seit der Entdeckung des Proteins bekannt (Motchoulski und Liscum, 1999), der zugrundeliegende molekulare Mechanismus ist jedoch ungeklärt. Prinzipiell gibt es unterschiedliche Mechanismen der Proteinassoziation an die Plasmamembran, wie etwa die posttranslationale Modifikation mit Lipidankern, elektrostatische Interaktionen mit Phospholipiden oder hydrophobe Interaktionen durch hydrophobe Schleifen beziehungsweise amphipathische Helices. Ebenso können Proteine assoziieren, indem diese mit integralen Proteinen der Plasmamembran interagieren. Von MACCHI-BOU 4/ MAB4 (ENP1)-like (MAB4/MEL), einem weiteren Mitglied der NRL-Familie, ist bekannt, dass es durch PIN-Proteine an die Plasmamembran rekrutiert wird (Glanc *et al.*, 2021). Erste Hinweise zur Membranassoziation von NPH3 lieferte die Coexpression mit der katalytischen Domäne des Sac1p-Proteins aus *S. cerevisiae* (Reuter *et al.*, 2021). Diese Domäne wird auf der Grundlage von Myristoylierung und Palmitoylierung in der pflanzlichen Plasmamembran verankert und dephosphoryliert Phosphatidylinositol-4-Phosphat zu Phosphatidylinositol, wodurch die Elektronegativität der Plasmamembran in Pflanzen reduziert wird (Simon *et al.*, 2016; Gronnier *et al.*, 2017). Bei Coexpression von SAC1, nicht jedoch der inaktiven Version SAC1_{DEAD}, lag NPH3 bereits in Dunkelheit in cytosolischen Kondensaten vor. Die Reduktion der negativen Ladung der Plasmamembran durch SAC1 führte dazu, dass NPH3 in Dunkelheit von der Plasmamembran dissoziiert – ein normalerweise Blaulicht-induzierter Effekt. Fraglich ist jedoch, ob durch SAC1 NPH3 direkt oder ein Interaktionspartner von der Plasmamembran

4. Ergebnisse

dissoziiert, wie es für MAB4/MEL beschrieben wurde (Glanc *et al.*, 2021). Mittels Protein-Lipid-Overlay konnte jedoch eindeutig gezeigt werden, dass *in vitro* transkribiertes und translatiertes NPH3 direkt an polyacide Phospholipide bindet (*Abbildung 4.6 C*).

Phosphoglyceride bestehen aus Glycerin, welches an zwei Hydroxylgruppen mit Fettsäuren verestert vorliegt. Eine Phosphatgruppe bindet das Glycerol an der dritten, endständigen Hydroxylgruppe sowie die jeweilige für das Phospholipid charakteristische Kopfgruppe. Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) sind Phosphoglycerolipide mit neutraler Ladung, während Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidsäure (PA) sowie Phosphatidylinositol (PI) eine negative Nettoladung aufweisen. Auch Lysophosphatidsäure (LPA) und Lysophosphocholin (LPC) sind einfach negativ geladen. Mehrfach negativ geladene Phosphoglycerolipide enthalten Phosphoinositol, welches an den Positionen 3,4 oder 5 phosphoryliert vorliegt. Phospholipide mit einfach phosphoryliertem Phosphoinositol wie Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P), Phosphatidylinositol-4-Phosphat (PI4P) und Phosphatidylinositol-5-Phosphat (PI5P) sind in Summe zweifach negativ geladen. Diese Nettoladung ist in Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat (PI(3,4)P₂), Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat (PI(3,5)P₂), Phosphatidyl-inositol-4,5-Bisphosphat (PI(4,5)P₂) und Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PI(3,4,5)P₃) entsprechend erhöht. Phosphoinositide spielen in Pflanzen eine wichtige Rolle in der Entwicklung. Allerdings konnten PI(3,4)P₂ und PI(3,4,5)P₃ bislang nicht in Pflanzen detektiert werden (Heilmann, 2016). Phosphoinositide sind überwiegend an der cytoplasmatischen Seite der Plasmamembran zu finden. Innerhalb der Membran regulieren Phosphoinositide integrale Membranproteine oder markieren Membranareale, an welche periphere Membranproteine rekrutiert werden (Takenawa, 2010; Heilmann, 2016). Auch die biophysikalischen Eigenschaften der Plasmamembran können durch den Einfluss von Phosphoinositiden verändert werden (Lundbaek *et al.*, 2010; Heilmann, 2016).

Bei einer Lipid-Overlay-Analyse wurden Membranen verwendet, welchen verschiedene Phosphoglycerolipidarten aufgetropft wurden (im Folgenden als PIP-Strips bezeichnet, Schema siehe *Abbildung 4.6 C*). NPH3 bindet in dieser Analyse an mehrfach negativ geladene Phosphoglyceride, eine schwache Interaktion ist auch mit PA zu erkennen (*Abbildung 4.6 C*).

Die Anreicherung von basischen Aminosäuren ist ein bereits bekanntes Motiv, dass zur Interaktion mit den negativ geladenen Phospholipiden der Membran befähigt. Vertreter der AGCVIII-Kinasen, wie beispielsweise das Protein D6PK oder PINOID, binden über ein Lysinreiches Motiv an Phospholipide der pflanzlichen Plasmamembran (Zegzouti *et al.*, 2006; Hammond und Balla, 2015; Simon *et al.*, 2016).

Zur Identifizierung potentieller Bindemotive in NPH3 wurde die Proteinsequenz von NPH3 auf sogenannte BH-Motive untersucht (durchgeführt von Prof. Dr. Claudia Oecking, Brzeska *et al.*,

4. Ergebnisse

2010). Diese zeichnen sich durch Anreicherungen basischer und hydrophober Aminosäuren aus. Es wurde bereits vermutet, dass der die Coiled Coil-Domäne umfassende C-terminale Bereich für die Assoziation von NPH3 an die Plasmamembran von Bedeutung ist (Inoue *et al.*, 2008 b). In diesem Bereich befindet sich auch die 14-3-3-Bindestelle. Eine Fenstergröße von 11 Aminosäuren wurde hier verwendet, wie es für die Detektion terminaler Motive empfohlen wird (Brzeska *et al.*, 2010). Die Analyse der Proteinsequenz von NPH3 zeigte *downstream* der Coiled Coil-Domäne zwei putative BH-Motive im C-terminalen Bereich (*Abbildung 4.6 D*).

Um die Ergebnisse der *in silico*-BH-Analyse zu überprüfen, wurde der C-terminale Bereich *downstream* der Coiled Coil von NPH3 deletiert (NPH3 Δ C). Zudem wurden die C-terminalen 51 Aminosäuren als Fusion mit GST in Bakterien exprimiert und über Affinitätschromatographie aufgereinigt (GST:CT). Die Menge der Fusionsproteine wurde nach Proteinbestimmung durch elektrophoretische Auftrennung und anschließende Proteinfärbung mittels Coomassie-Brilliantblau® abgeglichen. Als Referenz dienten bekannte Mengen an BSA (*Abbildung 4.6 A*). Da NPH3 Δ C und NPH3 nicht in Bakterien exprimiert werden konnten, wurden mittels *in vitro* Transkription und Translation (TnT) HA-Fusionsproteine gewonnen, deren Expressionsstärken anhand einer Immundetektion verglichen wurde (*Abbildung 4.6 B*). Die so gewonnenen Proteine wurden mit den PIP Strips inkubiert und die Bindung an Phospholipide anschließend durch den immunologischen Nachweis der GST-beziehungsweise HA-getaggten Proteine auf den Membranen visualisiert (*Abbildung 4.6 C*).

Die C-terminal verkürzte Form NPH3 Δ C wies im Protein-Lipid-Overlay keine Affinität zu Phosphoglycerolipiden auf, unabhängig ihrer Nettoladungen. Das Fusionsprotein GST:CT wiederum assoziiert an mehrfach negativ geladene Phosphoinositide und an PA, ähnlich wie das Vollängenprotein NPH3. Daraus resultiert, dass die C-terminalen 51 Aminosäuren von NPH3 ausreichen, um *in vitro* an mehrfach negativ geladene Phosphoinositide zu assoziieren. Posttranslationale Modifikationen spielen bei der Assoziation des C-terminalen Fragmentes an mehrfach geladene Phosphoinositide offenbar keine Rolle. Ebenfalls wird deutlich, dass die Assoziation von NPH3 nicht auf Interaktionen mit integralen Membranproteinen oder an die Plasmamembran assoziierenden Proteinen basiert, sondern durch Protein-Lipid-Interaktionen induziert wird.

4. Ergebnisse

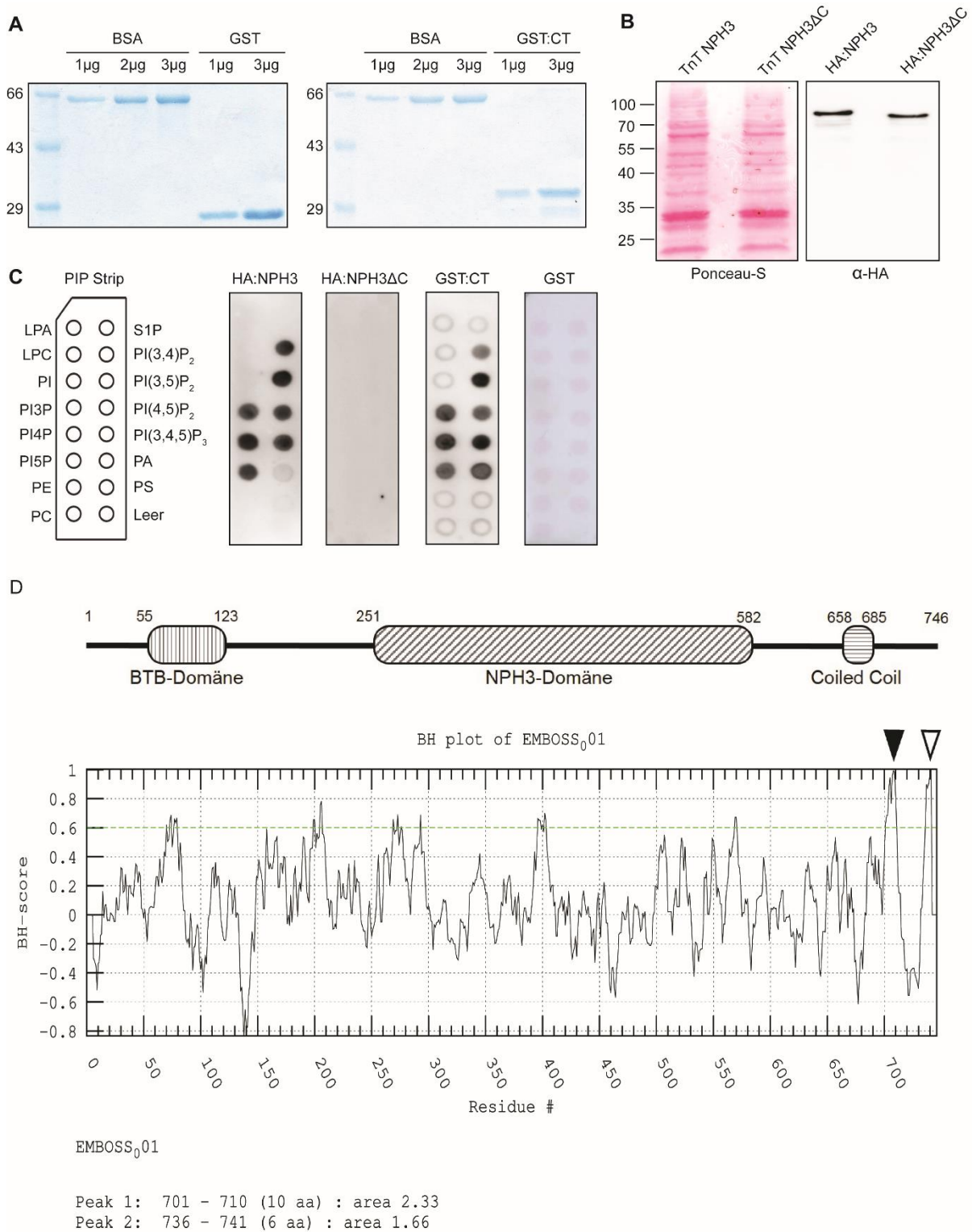


Abbildung 4.6: Der C-terminale Bereich von NPH3 enthält putativ basisch und hydrophobe Motive und zeigt *in vitro* eine Präferenz für polyacide Phospholipide

A Coomassie-Brilliantblau-Färbung elektrophoretisch aufgetrennter GST- und GST-Fusionsproteine, welche in Bakterien exprimiert und aus jenen chromatographisch aufgereinigt wurden. BSA dient als Ladekontrolle. **B** Ponceau-S und HA-Immundetektion der TnT-Ansätze von NPH3 und NPH3ΔC nach deren elektrophoretischer Auftrennung. **C** Schema eines PIP Strips sowie HA-Immundetektionen von PIP Strips inkubiert mit HA:NPH3 oder HA:NPH3ΔC, GST-Immundetektionen von PIP Strips inkubiert mit GST oder GST:CT. **D** BH-Plot mit BH-Scores für jede Aminosäure mit einer Fenstergröße von 11 Aminosäuren pro Vergleich berechnet. Der Schwellenwert beträgt 0,6. Schwarze und weiße Pfeilspitzen zeigen die putativen BH-Domänen im C-terminalen Bereich (<https://hpcwebapps.cit.nih.gov/bhsearch/>)

4. Ergebnisse

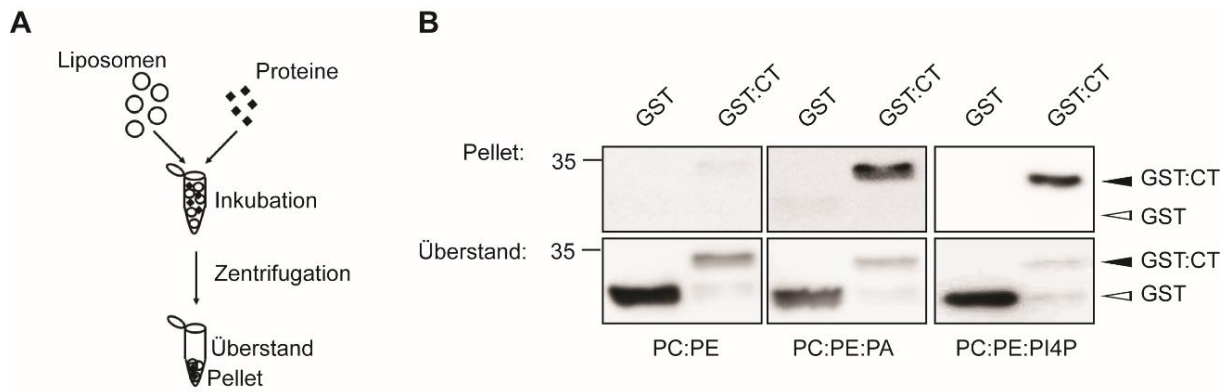


Abbildung 4.7: Die C-terminalen 51 Aminosäuren von NPH3 binden an Liposomen mit negativ geladenen Phosphoglyceriden

A Schematischer Versuchsablauf eines Liposomen-Bindeassays, bei welchem Proteine und Liposomen inkubiert und anschließend zentrifugiert werden. Der Ansatz wird somit in ungebundene Proteine im Überstand und an Liposomen gebundene Proteine im Pellet geteilt. **B** Immunologischer Nachweis der Proteine im Pellet sowie im Überstand. Die Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und nach GST immunodetektiert. Die weiße Pfeilspitze markiert GST, die schwarze Pfeilspitze zeigt GST:CT. PC Phosphatidylcholin, PE Phosphatidylethanolamin, PA Phosphatidsäure, PI4P Phosphatidylinositol-4-Phosphat

Da die Membran mit den immobilisierten Lipiden ein artifizielles System darstellt, wurde die Phospholipidbindung von NPH3 in unilamellaren Vesikeln (*large unilamellar vesicles*, LUV) mit gezielt ausgewählten Komponenten getestet. Diese wurden mit Hilfe eines Extruders unter Verwendung definierter Lipidsuspensionen hergestellt. Die Lipide in den LUVs bilden hier die für Membranen typische *bilayer* aus und liegen in Form von Vesikeln (Liposomen) vor. Als Gerüst für die LUVs dienten neutrale Phosphoglyceride wie PC und PE. Als Vertreter der mehrfach negativ geladenen Phosphoglyceride wurde in diesem Falle PI4P und PA verwendet. Die Proteine GST sowie GST:CT wurden mit den LUVs inkubiert und das Gemisch anschließend zentrifugiert, sodass sich die nicht an die LUVs bindenden Proteine im Überstand befanden und die LUVs mit den an sie gebundenen Proteinen präzipitierten (Abbildung 4.7 A).

Proteine des Pellets und des Überstandes wurden elektrophoretisch aufgetrennt und immunodetektiert. LUVs, welche aus PC und PE bestanden, zeigten keine Assoziation von NPH3. Enthielten die LUVs jedoch negativ geladene Phosphoglyceride (PA oder PI4P), so war eine eindeutige Bindung der C-terminalen Domäne von NPH3, nicht jedoch von GST, nachweisbar. Diese Ergebnisse zeigen, dass die C-terminalen 51 Aminosäuren von NPH3 eine Assoziation an Membranbilayer ermöglichen, welche negativ geladene Phosphoglyceride enthalten. Dies geschieht unabhängig von posttranslationalen Modifikationen oder Interaktionen mit anderen Proteinen.

4. Ergebnisse

4.5. Eine amphipathischen Helix im C-terminalen Teil von NPH3 ist essentiell für die Bindung an polyacide Phosphoglyceride *in vitro*

Da die C-terminalen 51 Aminosäuren von NPH3 *in vitro* für die Assoziation des Proteins an mehrfach negativ geladene Phosphoglyceride essentiell sind, wurde dieser Bereich genauer untersucht. Wie bereits beschrieben, wurden im entsprechenden Bereich zwei Motive mit signifikanten BH-Scores identifiziert (Abbildung 4.6 D). Ein Motiv befindet sich nahe der 14-3-3-Bindestelle und ist besonders Arginin-reich. Das zweite Motiv ist *upstream* des ersten Motives lokalisiert und angereichert mit hydrophoben und basischen Aminosäuren (Abbildung 4.9).

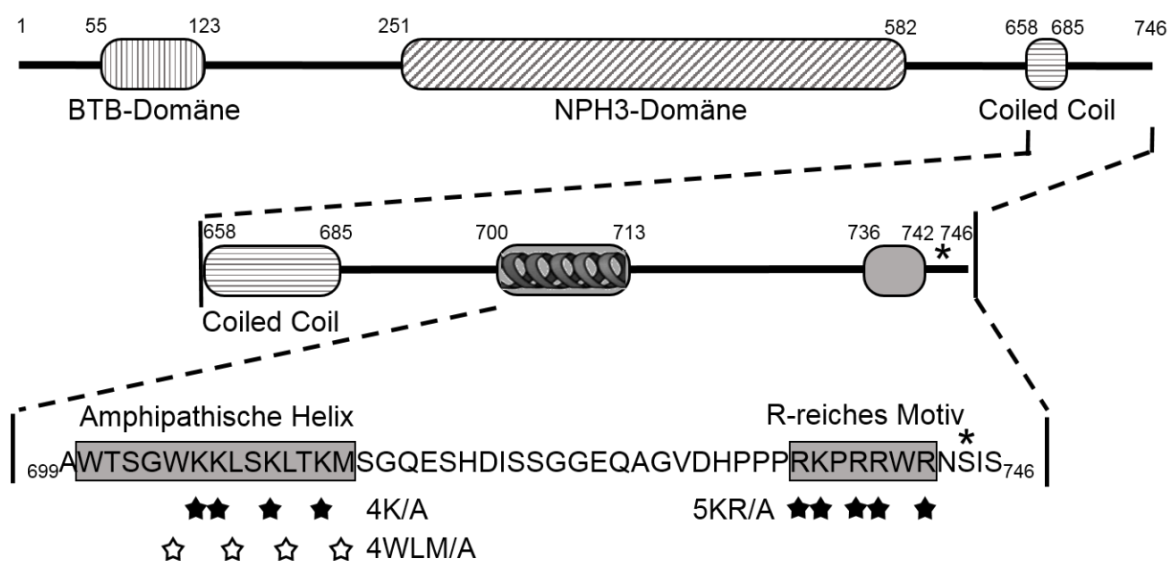


Abbildung 4.8: Zwei BH-Motive befinden sich im C-terminalen Bereich von NPH3

Drei unterschiedliche BH-Motiv-Mutanten wurden generiert, 4K/A (schwarze Sterne, links) und 4WLM/A (weiße Sterne): Austausch von vier basischen beziehungsweise vier hydrophoben Aminosäuren zu Alanin in der amphipathischen Helix. 5KR/A (schwarze Sterne, rechts): Austausch fünf basischer Aminosäuren zu Alanin im Arginin-reichen BH-Motiv nahe der 14-3-3-Bindestelle, Asterisk: 14-3-3-Bindestelle

In silico-Analysen legen hier die Ausbildung einer amphipathischen Helix nahe. Basische Aminosäuren akkumulieren somit auf einer Seite der Helix, während die andere Seite aus hydrophoben Aminosäuren besteht (Abbildung 4.9 B). Die Hydrophobizität der amphipathischen Helix wurde verringert, indem vier hydrophobe Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht wurden. Ein Austausch der vier basischen Aminosäuren reduzierte zudem auch die positive Ladung der amphipathischen Helix. In dem BH-Motiv nahe der 14-3-3-Bindestelle konnte durch den Austausch von fünf basischen Aminosäuren zu Alanin der BH-Score dieses BH-Motives unter den Schwellenwert von 0,6 reduziert werden (Abbildung 4.9 A). Diese

4. Ergebnisse

wurden gegen Alanin ausgetauscht. Im Motiv nahe der 14-3-3-Bindestelle wurden fünf basische Aminosäuren zu Alanin substituiert (5KR/A).

Diese HA-getaggten Vollängen-Konstrukte der BH-Motiv-Varianten von NPH3 wurden *in vitro* transkribiert und translatiert, elektrophoretisch aufgetrennt und mittels HA-Immunodetektion die Expression der jeweiligen Proteine verglichen (*Abbildung 4.10 A*). Anschließend wurde die Bindung der NPH3-Mutanten an Phosphoglyceride mittels eines Lipid-Overlay-Assays geprüft (*Abbildung 4.10 B*). Die Helix-Mutanten NPH3-4WLM/A und NPH3-4K/A zeigen im Vergleich zu NPH3 eine signifikant reduzierte Affinität zu mehrfach negativ geladenen Phosphoglyceriden. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass die Helix und besonders deren amphipathische Eigenschaft wichtig für die Assoziation von NPH3 an Phosphoglyceride ist. Doch auch die Veränderung des Arginin-reichen BH-Motives (NPH3-5KR/A) verringert die Bindung von NPH3 an polyacide Phosphoglyceride deutlich.

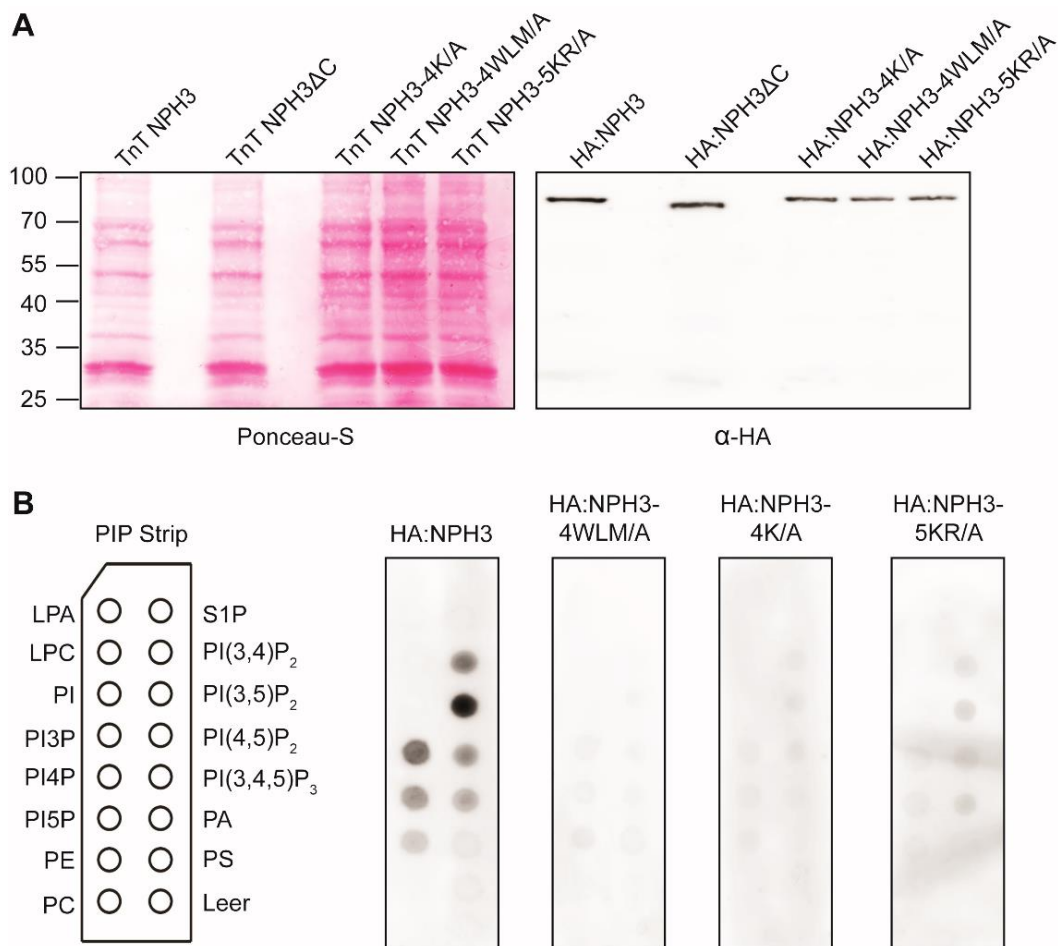


Abbildung 4.10: Veränderungen der BH-Motive verringern die Assoziation von NPH3 an polyacide Phosphoglyceride *in vitro*

A Ponceau-S und HA-Immunodetektion von *in vitro* transkribierten und translatierten NPH3-Varianten, **B** Schematische Darstellung eines PIP Strips (links), HA-Immunodetektionen von HA:NPH3 (zweites von links), HA:NPH3-4WLM/A (mittig) beziehungsweise HA:NPH3-4K/A (zweites von rechts) und HA:NPH3-5KR/A (rechts)

4. Ergebnisse

Anschließend wurden die NPH3-Mutanten im physiologischeren Kontext von Lipidbilayern auf ihre Bindungsfähigkeit an Phosphoglyceride untersucht. Die entsprechenden Varianten wurden in die C-terminalen 51 Aminosäuren von NPH3 eingeführt und mit GST fusioniert. Die Mengen der aus Bakterien aufgereinigten Fusionsproteine wurden nach Proteinbestimmung und elektrophoretischer Auftrennung durch Coomassie-Brilliantblau-Färbung angeglichen (*Abbildung 4.11 A*). Die Proteine wurden mit LUVs inkubiert (*Abbildung 4.11 B*) und nach Zentrifugation im Überstand und in den Pellets elektrophoretisch aufgetrennt und immunologisch nachgewiesen (*Abbildung 4.11 C und D*).

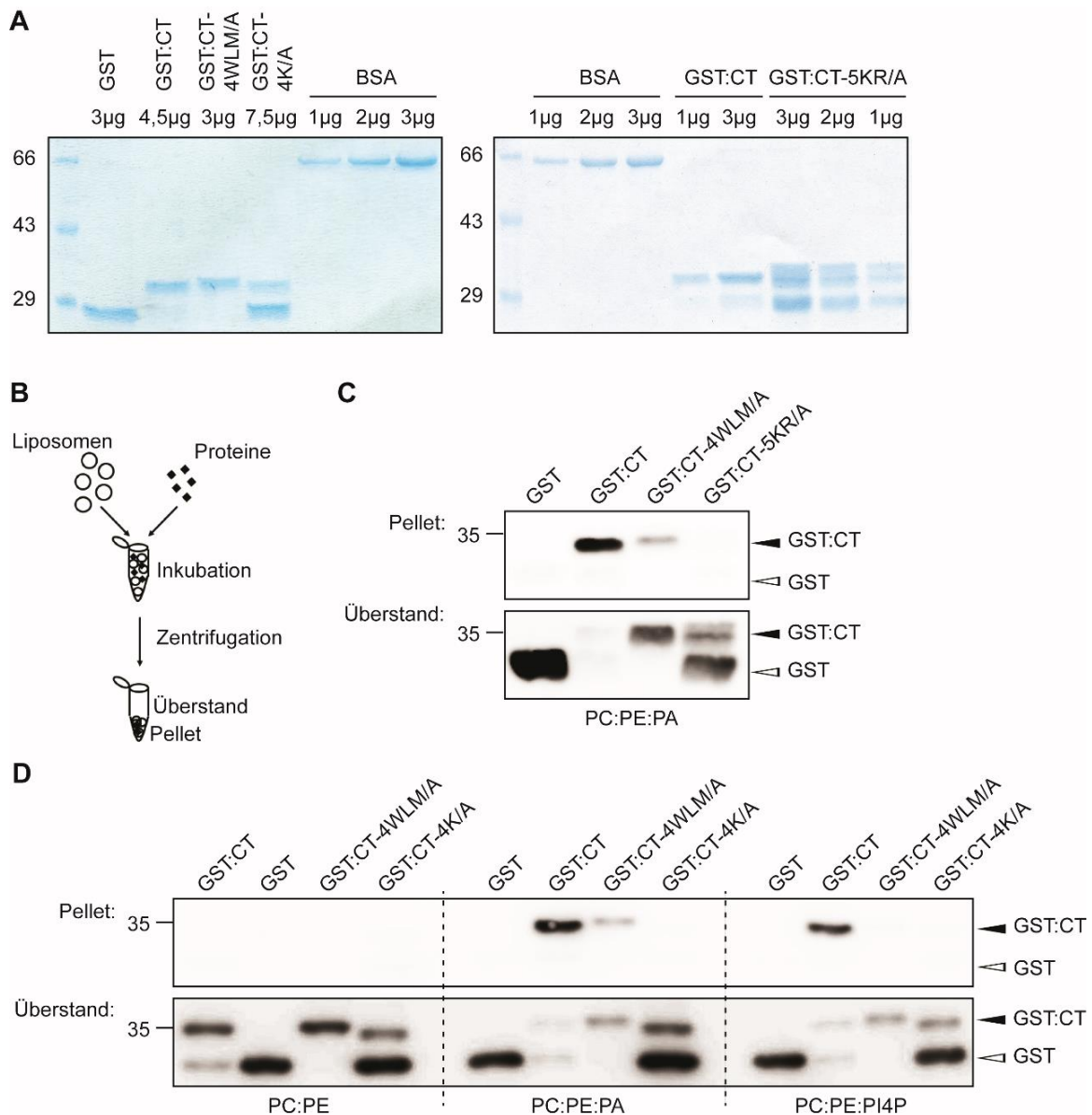


Abbildung 4.11: Veränderungen der BH-Motive im C-terminalen Bereich von NPH3 verringern die Bindung an polyacide Phosphoglyceride enthaltende Liposomen

A Coomassie-Brilliantblau-Färbungen elektrophoretisch aufgetrennter GST:CT-Varianten nach deren Aufreinigung aus *E. coli*. **B** Schematischer Ablauf des Liposomen-Assays: Liposomen und Proteine werden inkubiert und anschließend zentrifugiert. An Liposomen gebundene Proteine verbleiben im Pellet und ungebundenes Protein liegt im Überstand vor, **C** und **D** GST-Immundetektionen elektrophoretisch aufgetrennter Fraktionen von Überstand und Pellet: PC Phosphatidylcholin, PE

4. Ergebnisse

Phosphatidylethanolamin, PA Phosphatidsäure, PI4P Phosphatidylinositol-4-Phosphat, weiße Pfeilspitze GST, schwarze Pfeilspitze GST:CT-Varianten (-4WLM/A, -4K/A, -5KR/A)

Hier bindet GST:CT an LUVs, welche negativ geladene Phosphoglyceride (PA bzw. PI4P) enthalten, nicht jedoch an LUVs mit neutralen Phosphoglyceriden wie PC und PE. Dies bestätigt die Ergebnisse der Lipid Overlay-Assays aus *Abbildung 4.10 B*. Der Austausch basischer Aminosäuren zu Alanin in den jeweiligen BH-Motiven führte jedoch dazu, dass der C-terminale Bereich von NPH3 nicht mehr an Liposomen mit polyaciden Phosphoglyceriden assoziiert (GST:CT-5KR/A und GST:CT-4K/A). Die basischen Aminosäuren beider Motive im C-terminalen Bereich von NPH3 scheinen somit essentiell für die Assoziation von NPH3 an negativ geladene Phosphoglyceride wie PA und PI4P *in vitro* zu sein. Lediglich der Austausch der hydrophoben Aminosäuren zu Alanin in der amphipathischen Helix (GST:CT-4WLM/A) zeigte eine Restaffinität für LUVs mit PA oder PI4P. Da auch Alanin eine hydrophobe Aminosäure ist, jedoch eine wesentlich kleinere Seitenkette aufweist als die ausgetauschten Aminosäuren, bleibt die hydrophobe Seite der Helix zwar erhalten, jedoch sind die Seitenketten der Alanine weniger exponiert. Die basischen Aminosäuren sind noch in der Helix enthalten, was die Bindung an LUVs mit negativ geladenen PA oder PI4P weiterhin ermöglicht. In *Nicotiana benthamiana* lokalisiert GFP:NPH3-5KR/A jedoch in Dunkelheit an der Plasmamembran, ebenso wie eine um die C-terminalen 28 Aminosäuren verkürzte Variante von NPH3 (NPH3 Δ C28), welche das Arginin-reiche BH-Motiv nicht mehr enthält (Reuter *et al.*, 2021). Die beiden Varianten der amphipathischen Helix zeigten in Dunkelheit im Tabak keine Membranlokalisation.

Die amphipathische Helix ist somit nicht nur von Bedeutung für die elektrostatische Interaktion von NPH3 mit negativ geladenen Phospholipiden *in vitro*, sondern auch für die Membranassoziation des Proteins in Dunkelheit *in vivo*.

4.6. Die Bedeutung der subzellulären Lokalisation von NPH3 für seine Funktion in der phototropen Reaktion

Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte die Bedeutung der amphipathischen Helix für die Assoziation von NPH3 an die Plasmamembran beziehungsweise an darin enthaltene negativ geladene Phosphoglyceride nachgewiesen werden. Um die Resultate der transient in Tabak transformierten Konstrukte zu verifizieren, wurden GFP-Fusionskonstrukte mit den NPH3-Varianten in die *Arabidopsis*-T-DNA-Insertionslinie *nph3-7* eingebracht.

Die Variante NPH3-4K/A weist in der ursprünglich amphipathischen Helix keine basischen Aminosäuren auf, eine weitere Variante von NPH3 wurde um C-terminale 28 Aminosäuren verkürzt, wodurch sowohl die 14-3-3-Bindestelle als auch das Arginin-reiche BH-Motiv entfernt

4. Ergebnisse

wurden (GFP:NPH3 Δ C28). In beiden Varianten ist jeweils nur ein BH-Motiv verändert oder deletiert worden, das jeweils andere BH-Motiv ist vollständig enthalten. Ein weiteres Konstrukt, welches N-terminale Deletionen von 54 Aminosäuren aufweist, wurde ebenfalls stabil in Linien von *nph3-7* eingebracht (NPH3 Δ N54). In dieser verkürzten Form von NPH3 sind beide C-terminal gelegenen BH-Motive vollständig enthalten, gleichzeitig kann somit ein eventueller Einfluss des N-terminalen Bereiches von NPH3 auf dessen Lokalisation untersucht werden.

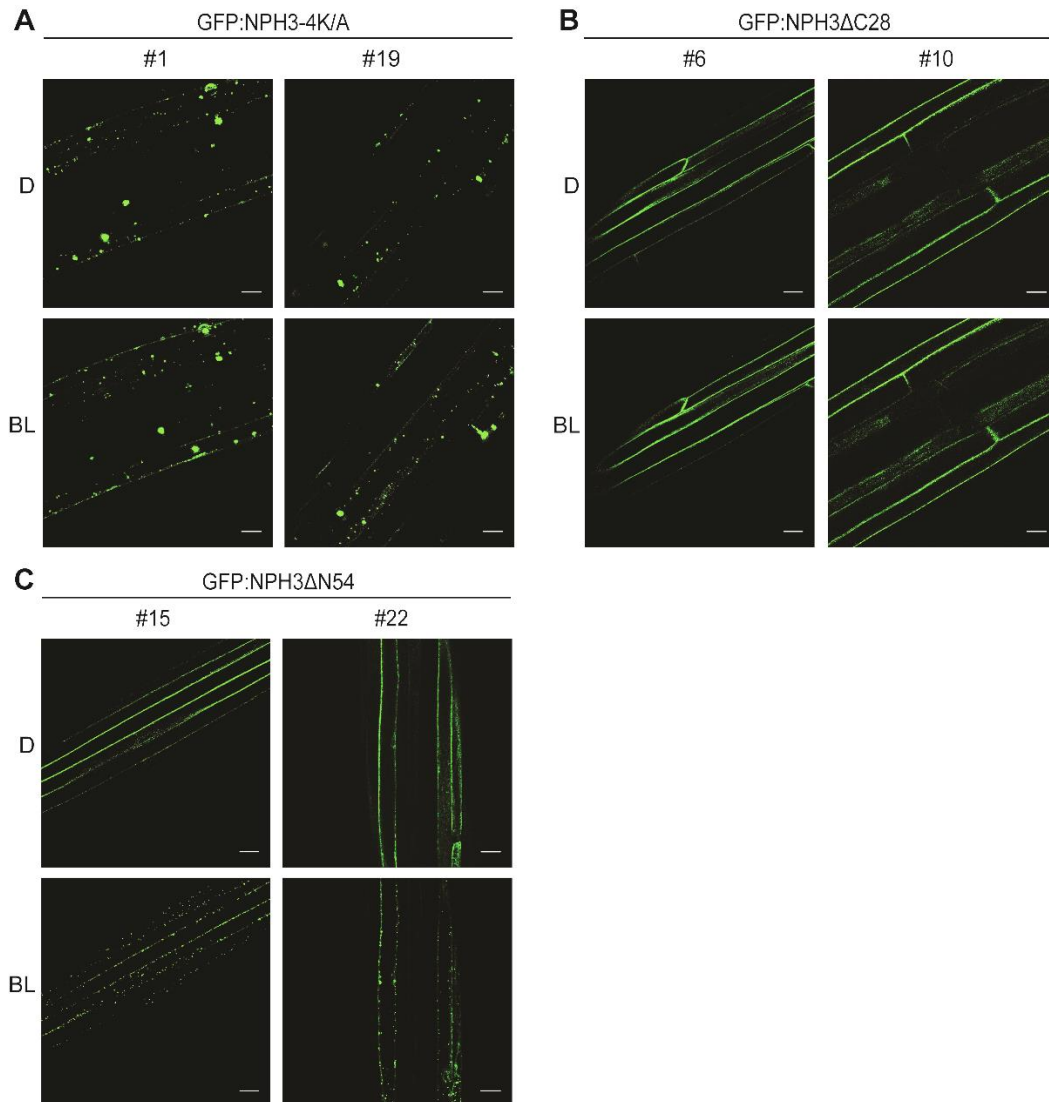


Abbildung 4.12: subzelluläre Lokalisation von NPH3-Varianten in transgenen Linien von *A. thaliana* in *nph3-7*

CLSM-Aufnahmen von GFP:NPH3-Varianten in 2 Tage etioliert angezogenen Keimlingen von *A. thaliana* *nph3-7* vor (D) und nach 10 min Bestrahlung mit einem Blaulicht-Laser (BL). Untersucht wurden jeweils zwei unabhängige Linien pro Konstrukt. Maßstab 50 μ m

In je zwei unabhängigen stabilen Linien wurden die bereits in *N. benthamiana* gewonnenen Daten zur subzellulären Lokalisation bestätigt (Reuter *et al.*, 2021), da auch hier GFP:NPH3-4K/A konstitutiv cytosolische Kondensate bildet. Enthält das Protein noch die vollständige amphipathische Helix (GFP:NPH3 Δ C28), befindet sich das Protein sowohl in Dunkelheit als

4. Ergebnisse

auch in Blaulicht-behandelten Keimlingen an der Plasmamembran (*Abbildung 4.12*), vergleichbar zu GFP:NPH3-S744A (*Abbildung 4.5*). Die N-terminale Deletion hat indes keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von NPH3, da GFP:NPH3 Δ N54 wie auch GFP:NPH3 in etiolierten Keimlingen an der Plasmamembran lokalisiert und nach Blaulicht-Bestrahlung cytosolische Kondensate ausbildet (*Abbildung 4.5, Abbildung 4.12*). Durch die Veränderungen des C-terminalen Bereiches wurden somit Linien generiert, in welchen NPH3 entweder konstitutiv cytosolische Kondensate ausbildet (GFP:NPH3-4K/A) oder konstitutiv an die Plasmamembran lokalisiert (GFP:NPH3 Δ C28). Die GFP:NPH3-Fusionskonstrukte verhielten sich somit in den transgenen *Arabidopsis*-Linien vergleichbar wie in den transient transformierten *Nicotiana*-Blättern.

Ein kürzlich publiziertes Modell bezeichnet die Plasmamembran-assoziierte Form von NPH3 als aktive Version, die die phototrope Reaktion ermöglicht. Hingegen ist NPH3, welches in cytosolischen „Aggregaten“ vorliegt, gemäß diesem Modell inaktiv (Sullivan *et al.*, 2019). Durch Veränderungen der amphipathischen Helix wird die subzelluläre Lokalisation von NPH3 beeinträchtigt. Die Frage ist nun, inwieweit sich die subzelluläre Lokalisation auf die Funktion von NPH3 auswirkt und damit die phototrope Antwort in Keimlingen beeinträchtigt.

Zur Untersuchung dieser Frage wurden die Keimlinge der transgenen *A. thaliana*-Linien etioliert angezogen und nach zwei Tagen für 24 Stunden unilateralem Blaulicht ausgesetzt. Die Keimlinge des Wildtyps Col-0 zeigten eine deutliche Krümmung des Hypokotyls zur Blaulichtquelle hin, während die Keimlinge der *loss-of-function*-Linie *nph3-7* keine phototrope Reaktion zeigten (*Abbildung 4.13 A und B*). Jene Linien, welche die Version von NPH3 mit der veränderten amphipathischen Helix enthalten, reagierten ebenfalls nicht phototrop, vergleichbar mit *nph3-7* (GFP:NPH3-4K/A). Die hydrophoben Aminosäuren der Helix scheinen nicht auszureichen, damit NPH3 an die Plasmamembran assoziieren kann. Die basischen Aminosäuren der amphipathischen Helix sind essentiell für die Lokalisation von NPH3 an der Plasmamembran und damit auch für die Fähigkeit zur phototropen Reaktion des Keimlings. Die C-terminal verkürzte Form GFP:NPH3 Δ C28 rettet den *nph3-7*-Phänotypen nur partiell, ähnlich wie GFP:NPH3-S744A (*Abbildung 4.5*). Sowohl GFP:NPH3 Δ C28 als auch GFP:NPH3-S744A lokalisieren in Dunkelheit und im Blaulicht an die Plasmamembran. Auch der alleinige Austausch der basischen Aminosäuren im Arginin-reichen BH-Motiv hat keine Auswirkungen auf die Lokalisation von NPH3 an die Plasmamembran in Dunkelheit, was in transient transformierten Blättern von *N. benthamiana* bereits gezeigt werden konnte (Reuter *et al.*, 2021). In GFP:NPH3 Δ C28 und GFP:NPH3-S744A kann 14-3-3 nicht mehr assoziieren. Die Veränderung dieses BH-Motives wirkt sich somit zwar *in vitro* negativ auf die Bindung an Phosphoglyceride aus, die Mutante assoziiert jedoch *in vivo* weiterhin an die Plasmamembran.

4. Ergebnisse

Beide Mutanten bestätigen, dass die konstitutive Lokalisation an die Plasmamembran nicht die aktive Form von NPH3 darstellt, welche für die phototrope Reaktion notwendig ist.

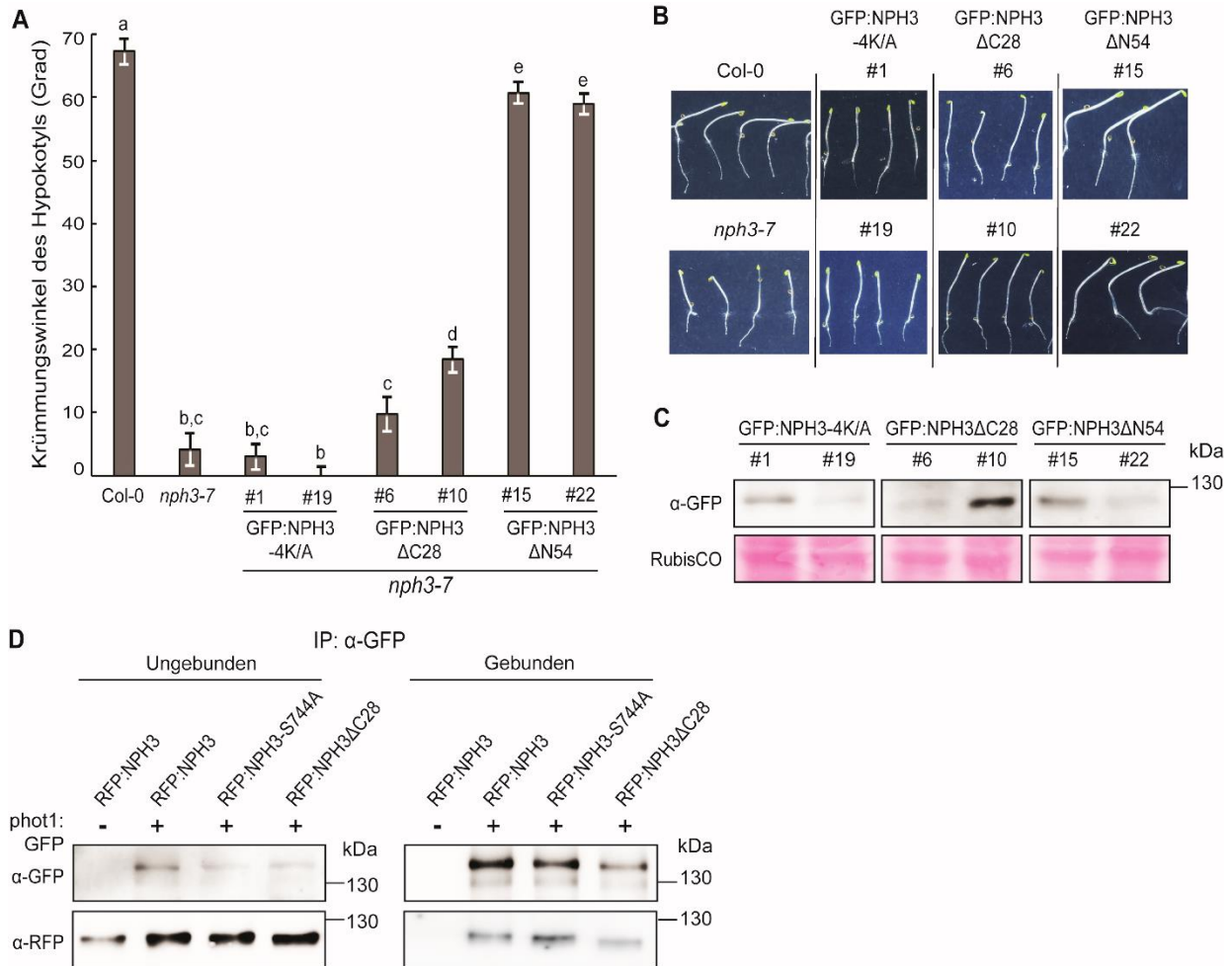


Abbildung 4.13: Veränderungen des C-terminalen Bereiches von NPH3 beeinträchtigen die phototrope Reaktion in stabil transformierten Linien im *nph3-7*-Hintergrund von *A. thaliana* unabhängig von phot1. Stabile Linien von *A. thaliana nph3-7* mit GFP:NPH3-Varianten -4K/A, ΔC28 und ΔN54 unter der Kontrolle des 35S-Promotors. **A** Krümmungswinkel der Hypokotyle von 2 Tage etiiert angezogenen Keimlingen nach 24 Stunden unilateralem Blaulichtreiz ($1 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$). **B** Beispiele für Keimlinge aus A. Diese wurden 2 Tage etiiert angezogen und anschließend für 24 h mit Blaulicht bestrahlt. **C** GFP-Immundetektion der GFP:NPH3-Varianten in den stabilen Linien. Ponceau-S von RubisCO dient als Ladekontrolle. **D** Co-Immunopräzipitation von phot1:GFP und RFP-getaggtgen NPH3-Varianten aus solubilisierten Mikrosomen transient transformierter *N. benthamiana*-Blätter

Um ausschließen zu können, dass auch der N-terminale Bereich für die Lokalisation von Bedeutung ist, wurden Keimlinge transients Linien generiert, welche GFP:NPH3ΔN54 exprimieren. Diese wurden zur Untersuchung der Proteinlokalisierung ebenfalls zwei Tage etiiert angezogen und anschließend per CLSM untersucht. Bleibt der C-terminale Bereich von NPH3 unverändert, kann die phototrope Antwort in *nph3-7* wiederhergestellt werden, obwohl das Protein N-terminal verkürzt vorliegt. Der N-terminale Abschnitt von NPH3 *upstream* der BTB-Domäne ist somit nicht essentiell für die phototrope Reaktion. Zudem

4. Ergebnisse

verhält sich GFP:NPH3 Δ N54 wie GFP:NPH3, da beide in Dunkelheit an die Plasmamembran lokalisieren und im Blaulicht cytosolische Kondensate bilden (*Abbildung 4.5, Abbildung 4.12*).

Es wurde bereits beschrieben, dass Phototropin1 (phot1) an den Bereich von NPH3 bindet, welcher die Coiled Coil-Domäne und den Bereich *downstream* dieser umfängt (Motchoulski und Liscum, 1999). Die partiell phototrope Reaktion der Linien, welche konstitutiv Plasmamembran-assoziierte NPH3-Varianten exprimieren, könnte durch die Deletionen oder Veränderungen im C-terminalen Bereich erklärt werden, welche gegebenenfalls die Interaktion von phot1 und NPH3 unterbinden. Um dies zu untersuchen, wurden sowohl RFP:NPH3 als auch die beiden konstitutiv an der Plasmamembran lokalisierenden Varianten RFP:NPH3-S744A und RFP:NPH3 Δ C28 mit phot1:GFP in Blättern von *N. benthamiana* coexprimiert. Mittels subzellulärer Fraktionierung wurden mikrosomale Proteine aus den Extrakten der Blätter gewonnen und phot1:GFP anschließend immunopräzipitiert. Aus den Immundetektionen der Präzipitate wird ersichtlich, dass sowohl RFP:NPH3 als auch RFP:NPH3-S744A sowie RFP:NPH3 Δ C28 zur Interaktion mit phot1:GFP befähigt sind (*Abbildung 4.13 D*). Die Interaktion von phot1 und NPH3 findet somit nicht *upstream* der Helix-ausbildenden BH-Domäne statt. Die signifikant reduzierten phototropen Antworten der GFP:NPH3 Δ C28 und GFP:NPH3-S744A exprimierenden Linien kann somit nicht durch die reduzierte Interaktion von phot1 und NPH3 erklärt werden.

Zusammengefasst sind weder konstitutiv Plasmamembran-assoziierte noch konstitutiv in cytosolischen Kondensaten vorliegende NPH3-Varianten in der Lage, den Phänotyp des *nph3-7*-Hintergrundes zu retten. Einzig GFP:NPH3 Δ N54, welches in etiolierten Keimlingen an der Plasmamembran lokalisiert und erst nach Blaulicht-Irradiation in cytosolischen Kondensaten vorliegt, kann die phototrope Reaktion im *nph3-7*-Hintergrund wieder herstellen, vergleichbar zu GFP:NPH3. Das Modell von 2019, welches besagt, dass Plasmamembran-assoziiertes NPH3 die phototrope Reaktion des Keimlinges vermittelt, während die cytosolisch aggregierende Variante inaktiv ist, ist somit widerlegt (Sullivan *et al.*, 2019), da die konstitutiv Plasmamembran-ständigen Varianten GFP:NPH3-S744A und GFP:NPH3 Δ C28 noch immer eine signifikant reduzierte phototrope Antwort im Vergleich zu GFP:NPH3 und auch zu Col-0 aufweisen.

4.7. NPH3 zirkuliert zwischen Plasmamembran und Cytosol

Wie bereits in *Abbildung 4.5 A* ersichtlich wurde, befindet sich GFP:NPH3 in etiolierten transgenen Keimlingen an der Plasmamembran und bildet in Blaulicht-behandelten Keimlingen cytosolische Kondensate aus. Könnte somit ein Zusammenhang zwischen der

4. Ergebnisse

veränderten Lokalisation von NPH3 nach Blaulichtbehandlung und dem Mechanismus der Funktion von NPH3 bei der phototropen Reaktion bestehen?

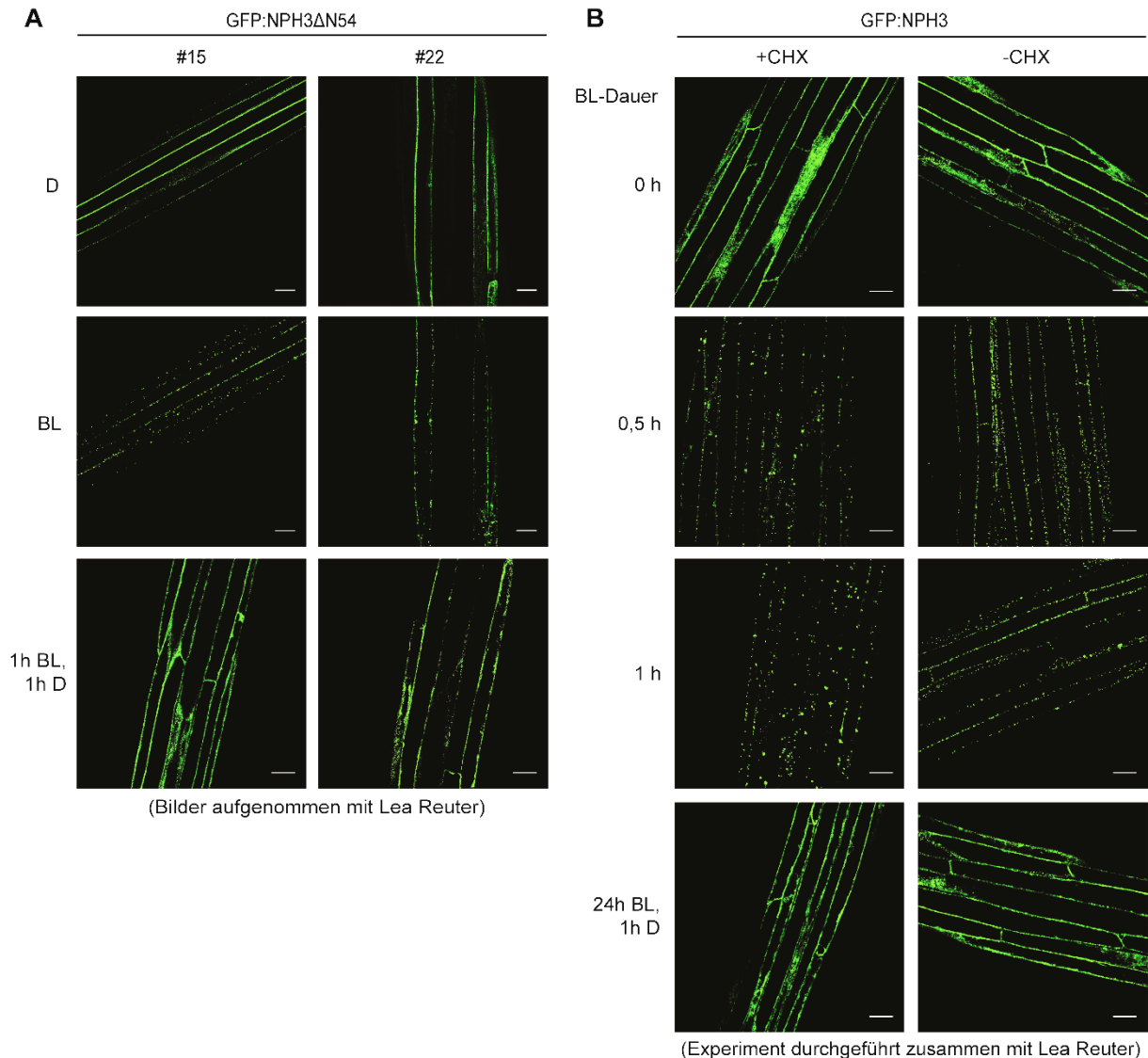


Abbildung 4.14: NPH3 zyklisiert zwischen Plasmamembran und Cytoplasma in transgenen *nph3-7*-Linien von *A. thaliana*

CLSM-Aufnahmen etioliert angezogener Keimlinge transgener Linien in *A. thaliana nph3-7*. **A** Keimlinge, welche GFP:NPH3ΔN54 exprimieren, wurden zwei Tage etioliert angezogen (D), anschließend für 10 Minuten mit GFP-Laser bestrahlt (BL) beziehungsweise für 1h in $1 \text{ mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ Blaulicht inkubiert und danach für 1h in Dunkelheit transferiert (1h BL 1h D), **B** CLSM-Aufnahmen von 35S::GFP:NPH3 stabil exprimiert in *A. thaliana nph3-7*. Etiolierte Keimlinge (D) zwei Stunden nach Transfer auf Platten mit Cycloheximid (+CHX) oder ohne (-CHX), nach 0,5 und 1 h Blaulicht-Behandlung mit $1 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$, bevor diese wieder für eine Stunde in Dunkelheit zurück transferiert wurden (1h BL, 1h D). Maßstab: 25 μm

Keimlinge transienter *nph3-7*-Linien, welche GFP:NPH3 oder GFP:NPH3ΔN54 exprimieren, wurden zwei Tage etioliert angezogen und anschließend via CLSM untersucht. Nach einem Blaulichtreiz von $1 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ für eine beziehungsweise 24 Stunden wurden die Keimlinge wieder in Dunkelheit zurück transferiert und nach einer Stunde erneut die GFP-Fusionsproteine detektiert. Vergleichbar mit GFP:NPH3 lokalisierte auch GFP:NPH3ΔN54 in etiolierten Keimlingen an der Plasmamembran und bildete nach Blaulicht-Irradiation

4. Ergebnisse

cytosolische Kondensate (*Abbildung 4.5, Abbildung 4.12*). Nach dem Transfer zurück in Dunkelheit lokalisierte sowohl GFP:NPH3 als auch GFP:NPH3 Δ N54 wieder an die Plasmamembran (*Abbildung 4.14 A*).

Um ausschließen zu können, dass Plasmamembran-ständiges NPH3 in Keimlingen, welche in Dunkelheit zurück transferiert wurden, auf dessen Neusynthese zurückzuführen ist, wurden die Keimlinge mit Cycloheximid (CHX) behandelt. Hierfür wurden Keimlinge mit konstitutiver Expression von GFP:NPH3 zwei Stunden vor Beginn der CLSM-Aufnahmen unter rotem Sicherheitslicht auf MS/Phytoagarplatten ohne (-CHX) oder mit 100 mM Cycloheximid (+CHX) transferiert (*Abbildung 4.14 B*). CHX hemmt die Neusynthese von Proteinen, indem es die Elongationsphase der eukaryotischen Translation blockiert (Poehlsgaard und Douthwaite, 2005). Sowohl in CHX- als auch in unbehandelten etiolierten Keimlingen lokalisiert GFP:NPH3 in an der Plasmamembran. Sobald die Keimlinge Blaulicht ausgesetzt wurden, formierten sich Kondensate im Cytosol. Nach einer Stunde im Blaulicht wurden die Proben wieder in Dunkelheit transferiert. Nach einer Stunde Dunkelheit befand sich GFP:NPH3 wieder an der Plasmamembran, unabhängig davon ob die Proben mit oder ohne CHX behandelt worden waren.

Die Lokalisation von GFP:NPH3 an der Membran nach Retransfer der Keimlinge in Dunkelheit ist demzufolge nicht auf die Neusynthese von GFP:NPH3 zurückzuführen, sondern ein Resultat der Zyklierung des Proteins zwischen Plasmamembran und Cytosol. Sowohl die Assoziation an die Plasmamembran als auch die Dissoziation von dieser und die darauffolgende Ausbildung von Kondensaten im Cytosol sind reversible Zustände und könnten womöglich durch posttranslationale Modifikationen reguliert werden.

Beide Varianten, sowohl GFP:NPH3 als auch GFP:NPH3 Δ N54, zirkulieren zwischen Plasmamembran und Cytosol und konnten zudem die phototrope Reaktion im *nph3-7*-Hintergrund in *A. thaliana* wieder herstellen (*Abbildung 4.4, Abbildung 4.13*). Im Modell von Sullivan *et al.*, 2019 wurde die Plasmamembran-lokalisierte Form von NPH3 als stark phosphoryliert bezeichnet. Zudem ging bereits aus früheren Publikationen hervor, dass NPH3 aus etiolierten Keimlingen stärker phosphoryliert vorliegt als NPH3 aus belichteten Keimlingen (Pedmale und Liscum, 2007; Tsuchida-Mayama *et al.*, 2008). Die Dephosphorylierung des Proteins im Licht wurde anhand einer modifizierten Mobilität bei der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen festgestellt, welche bei NPH3 aus Licht-behandelten Keimlingen höher ausfällt als bei NPH3 in etiolierten oder in Dunkelheit inkubierten Keimlingen. Die Phosphorylierung von NPH3 in etiolierten Keimlingen ist unabhängig von phot1, die Dephosphorylierung von NPH3 und damit dessen veränderte elektrophoretische Mobilität sind im Gegenzug phot1-abhängig (Motchoulski und Liscum, 1999; Pedmale und Liscum, 2007). Die ebenfalls im Blaulicht stattfindende Phosphorylierung der 14-3-3-Bindestelle S744 erfolgt

4. Ergebnisse

dabei direkt durch phot1 (Sullivan *et al.*, 2021). Somit ist die Phosphorylierung des Gesamtproteins NPH3 in Dunkelheit nicht von phot1 beeinflusst, dafür ist jedoch die Phosphorylierung der 14-3-3-Bindestelle und ebenso die Dephosphorylierung des Gesamtproteins im Blaulicht phot1- und Blaulicht-abhängig. Da die Dephosphorylierung des Gesamtproteins und die Phosphorylierung der 14-3-3-Bindestelle S744 im Zusammenhang stehen könnten und die Assoziation von 14-3-3 die Lokalisation und Funktionalität von NPH3 bedingt, könnte auch die Veränderung der Phosphorylierung des Gesamtproteins wichtig für dessen Funktionalität sein.

Zur Untersuchung des Gesamtphosphorylierungsstatus der unterschiedlich lokalisierenden NPH3-Varianten wurden transgene Linien für zwei Tage etioliert angezogen (D) und anschließend eine Stunde mit Blaulicht ($1\mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$) belichtet (BL). Anschließend wurden die Keimlinge für eine weitere Stunde in Dunkelheit transferiert (R-D). Nach Aufarbeitung und elektrophoretischer Auftrennung der Proben wurden durch Immundetektion der Proteine Unterschiede in der elektrophoretischen Mobilität ersichtlich (*Abbildung 4.15*).

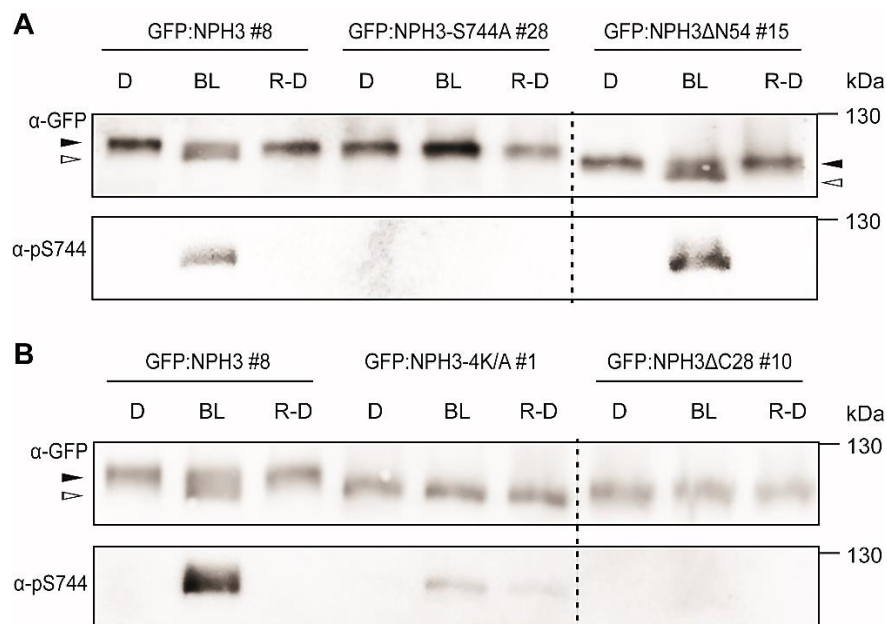


Abbildung 4.15: Der Phosphorylierungsstatus von NPH3 wird durch Blaulicht verändert

Veränderungen der elektrophoretischen Mobilität von GFP:NPH3-Versionen aus transgenen *A. thaliana*-Keimlingen nach Immundetektion von GFP (durchgeführt zusammen mit Lea Reuter). 2 Tage etioliert angezogene Keimlinge (D) wurden eine Stunde mit Blaulicht behandelt (BL) und anschließend für eine weitere Stunde erneut in Dunkelheit gehalten (R-D). **A Oben:** Immunodetektionen von GFP:NPH3, GFP:NPH3-S744A und GFP:NPH3ΔN54. **Unten:** Immunodetektion des S744-phosphorylierungsspezifischen Peptidantikörpers. **B Oben:** Immunodetektionen von GFP:NPH3, GFP:NPH3-4K/A sowie GFP:NPH3ΔC28. Weiße Pfeilspitzen entsprechen dephosphoryliertem NPH3, schwarze Pfeilspitzen zeigen phosphoryliertes NPH3. **Unten:** Immunodetektion des S744-phosphorylierungsspezifischen Peptidantikörpers. Gestrichelte Linien trennen die verkürzten GFP:NPH3-Varianten von den Volllängen-Proteinen, da sich deren Proteinbanden nicht auf gleicher Höhe mit denen der GFP:NPH3-Proteinbanden befinden.

4. Ergebnisse

Wie zuvor bereits publiziert konnte auch hier die Dephosphorylierung von in diesem Falle NPH3 im (Blau)-Licht verifiziert werden (Motchoulski und Liscum, 1999; Pedmale und Liscum, 2007; Sullivan *et al.*, 2021). Mittels eines Phosphorylierungs-spezifischen Peptid-Antikörpers konnte bei GFP:NPH3 in den Blaulichtproben auch die Phosphorylierung der 14-3-3-Bindestelle S744 detektiert werden. Hierdurch wird ersichtlich, dass die 14-3-3-Bindestelle S744 in Blaulicht-behandelten Proben in NPH3 phosphoryliert vorliegt. Dies stimmt mit den Resultaten überein, dass 14-3-3 Blaulicht-abhängig an NPH3 assoziiert (*Abbildung 4.2, Abbildung 4.3, Abbildung 4.1*). Deutlich wird auch, dass die Phosphorylierung der 14-3-3-Bindestelle im Blaulicht konträr zu der Dephosphorylierung des Gesamtproteins GFP:NPH3 erfolgt. Beide Varianten, welche zwischen Plasmamembran und Cytosol zirkulieren (GFP:NPH3 und GFP:NPH3 Δ N54), weisen eine Blaulicht-abhängige Dephosphorylierung des Gesamtproteins sowie Blaulicht-abhängige Phosphorylierung der 14-3-3-Bindestelle auf.

Kann die 14-3-3-Bindestelle in GFP:NPH3-S744A nicht mehr phosphoryliert werden, wird das Gesamtprotein nicht Blaulicht-abhängig dephosphoryliert. In dieser Variante kann somit keiner der beiden Blaulicht-abhängigen Prozesse stattfinden, ebenso wenig wie in der C-terminal deletierten Variante GFP:NPH3 Δ C28. Beide Varianten lokalisieren konstitutiv an der Plasmamembran. Die konstitutiv in Kondensaten vorliegende Variante GFP:NPH3-4K/A hingegen liegt sowohl in den Dunkel- als auch in den Blaulicht-Proben in dephosphorylierter Form vor. Die Phosphorylierung der 14-3-3-Bindestelle S744 im Blaulicht ist in dieser Variante noch möglich. Somit erfolgt die Blaulicht-abhängige Phosphorylierung der 14-3-3-Bindestelle unabhängig von der Dephosphorylierung des Gesamtproteins. Zusammengefasst erfolgt Blaulicht-abhängig eine Veränderung der Lokalisation des Proteins und eine Veränderung im Phosphorylierungsstatus des Gesamtproteins und der 14-3-3-Bindestelle, wobei die Veränderung der Phosphorylierung des Gesamtproteins mit der Veränderung der Lokalisation von NPH3 korreliert.

4.8. Identifizierung von Licht-abhängigen *in vivo* Phosphorylierungspositionen in NPH3

In Dunkelheit liegt NPH3 stärker phosphoryliert vor als nach Belichtung (Motchoulski und Liscum, 1999; Pedmale und Liscum, 2007; Tsuchida-Mayama *et al.*, 2008; Sullivan *et al.*, 2019; *Abbildung 4.15*), die Phosphorylierung der 14-3-3-Bindestelle S744 findet jedoch im Blaulicht statt, was im offensichtlichen Gegensatz zu der Blaulicht-induzierten Dephosphorylierung des Gesamtproteins steht. Dementsprechend stellt sich die Frage nach weiteren Positionen in NPH3, deren Phosphorylierungsstatus in Abhängigkeit von Blaulicht modifiziert wird.

4. Ergebnisse

Insgesamt 49 Positionen werden in NPH3 *in silico* als potentielle Phosphorylierungsstellen deklariert (NetPhos 2.0: <http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/webface2.fcgi?jobid=60AFA228000065EFF2C81C48&wait=20>). Lediglich 23 Positionen davon wurden in im Licht angezogenen Keimlingen tatsächlich in NPH3 *in vivo* identifiziert und publiziert (*Abbildung 4.16*).

Erste Analysen zu Phosphorylierungspositionen wurden 2008 vorgenommen (Tsuchida-Mayama *et al.*, 2008). Hier wurde die Proteinsequenz von NPH3 anhand des Programmes NetPhos 2.0 auf mögliche Phosphorylierungspositionen untersucht. Insgesamt ergaben sich dabei 22 Positionen. Diese wurden jeweils gegen Alanin ausgetauscht und die so entstandenen Mutanten in transgenen *A. thaliana-nph3-loss-of-function*-Linien exprimiert. Etiolierte Keimlinge wurden entweder in Dunkelheit belassen oder mit Blaulicht bestrahlt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Extrakte ergab sich, dass der Austausch der Serine an den Positionen 213, 223 und 237 zu Alanin bereits eine erhöhte elektrophoretische Mobilität von NPH3 in etiolierten Keimlingen bedingten. Somit scheinen diese drei Positionen für die phot1-unabhängige Phosphorylierung von NPH3 in Dunkelheit von Bedeutung zu sein. Allerdings stellte sich heraus, dass diese drei Positionen nicht von Bedeutung für die Funktion von NPH3 in der phototropen Antwort sind. Die transgenen Linien mit den einzelnen sowie gleichzeitigen Alanin-Substitutionen an diesen drei Positionen und sogar die Deletion des Bereiches, welcher diese drei Positionen umfasst, zeigten eine normale phototrope Antwort wie jene des Wildtypes. Später wurden diese drei Positionen erneut identifiziert. Für eine MS-Analyse wurden dabei etiolierte Keimlinge verwendet. Anhand dieser Analyse konnten neben den drei bereits aufgeführten Positionen vier weitere Phosphorylierungspositionen identifiziert werden, welche in etiolierten Proben detektiert wurden (Kimura *et al.*, 2021). Auch in vorigen Publikationen wurden Phosphorylierungspositionen identifiziert, diese wurden jedoch ausschließlich in im Licht angezogenen Pflanzen detektiert (*Abbildung 4.16*).

Bei der Untersuchung von Veränderungen des Phosphoproteoms in Wurzeln, induziert durch die exogene Applikation von Auxin, wurden vier Phosphorylierungspositionen in NPH3 identifiziert (Zhang *et al.*, 2013). Weitere Positionen wurden bei den Untersuchungen zu Änderungen des Phosphoproteoms identifiziert, welche durch Ethylen oder osmotischen Stress induziert werden (Xue *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013). Zwei Jahre später wurden sechs bis dahin unbekannte Phosphorylierungspositionen in NPH3 entdeckt, als Zielproteine zweier Serin/Threonin-Proteinkinasen im Zusammenhang mit DNA-Schäden untersucht wurden (Roitinger *et al.*, 2015). Aus einer Proteom-weiten Analyse wurden Zielproteine verschiedener Proteinkinasen bei unterschiedlichen Stressreaktionen in *A. thaliana* identifiziert (Wang *et al.*, 2020). Mittels LC-MS/MS untersuchte man Proben von im Licht gewachsenen Keimlingen, welche Stressreaktionen ausgesetzt wurden, hervorgerufen durch flg22, Wasserstoffperoxid, Kältebehandlung, hohe Konzentrationen von Kalium, Natriumchlorid oder die Applikation von

4. Ergebnisse

Abscisinsäure. Hier wurden 10 Phosphorylierungspositionen in NPH3 identifiziert, welche vorher noch nicht publiziert waren. Mergner et al. 2020 verwendete ebenfalls im Licht angezogene Keimlinge, um die Expression verschiedener Proteine sowie deren Phosphorylierung in unterschiedlichen Gewebearten von *Arabidopsis thaliana* anhand von MS-Datensätzen zu untersuchen. Aus der Analyse des gesamten Phosphoproteoms unterschiedlicher Gewebe von *A. thaliana* ergaben sich dabei 14 Phosphorylierungspositionen in NPH3, von welchen eine in vorigen Publikationen nicht identifiziert wurde.

Anhand der bereits publizierten Phosphorylierungsstellen konnten insgesamt 23 Positionen in NPH3 ermittelt werden, deren Phosphorylierungen aufgrund von exogenen Einflüssen reguliert werden. Zusätzlich geben die Experimente mit etiolierten Keimlingen auch erste Hinweise auf Blaulicht-regulierte Phosphorylierungspositionen (Tsuchida-Mayama et al., 2008; Kimura et al., 2021).

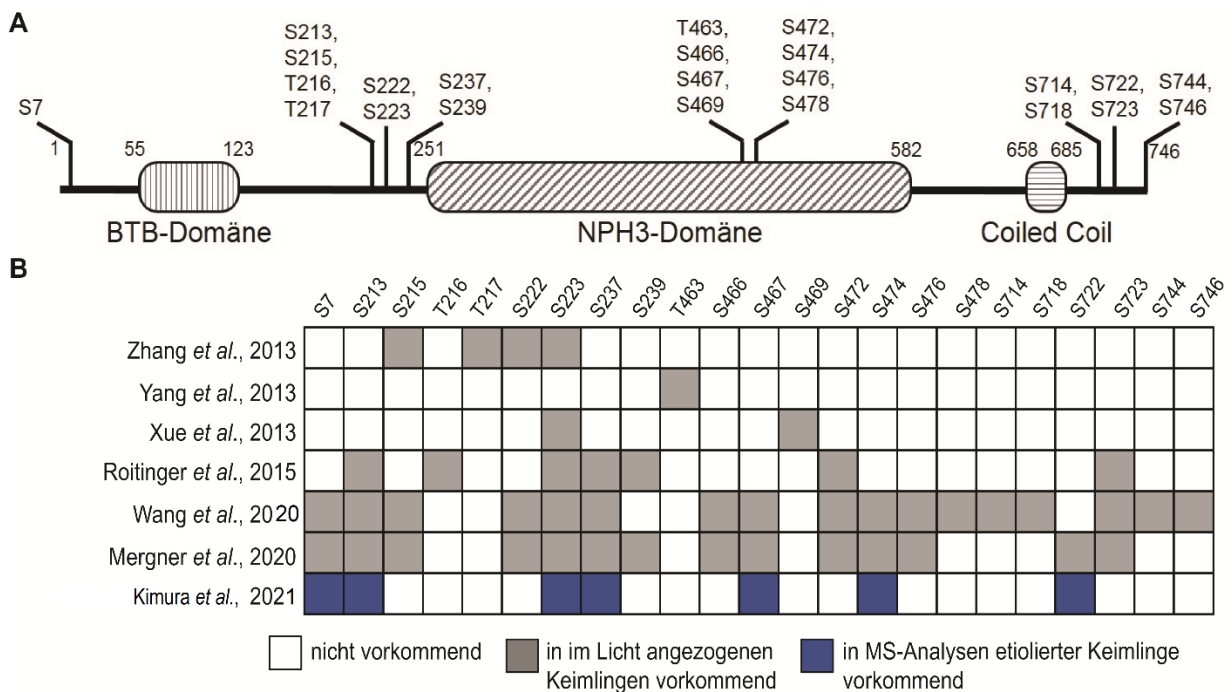


Abbildung 4.16: Bereits identifizierte *in vivo* Phosphorylierungspositionen in NPH3 aus der Literatur

A Schematische Zusammenfassung der Phosphorylierungspositionen aus der Literatur sowie deren Lokalisation im Protein NPH3. **B** Vorkommen der Phosphorylierungspositionen aufgeschlüsselt nach der jeweiligen Publikation. Grau: detektierte Phosphorylierungspositionen aus in Licht angezogenen Pflanzen. Dunkelblau: detektierte Phosphorylierungspositionen aus etiolierten transgenen Keimlingen

Zur Analyse und Identifizierung von Blaulicht-bedingten Veränderungen der Phosphorylierung von NPH3 wurden MS-Analysen von Proben aus transgenen *A. thaliana-nph3-7*-Keimlingen durchgeführt, welche konstitutiv GFP:NPH3 exprimieren. Diese wurden drei Tage etioliert angezogen und entweder in Dunkelheit belassen oder anschließend für 30 Minuten mit Blaulicht behandelt (Abbildung 4.17 A). Hierfür wurden pro Behandlung sechs Gramm Pflanzenmaterial verwendet, aus dessen Extrakt in rotem Sicherheitslicht GFP:NPH3

4. Ergebnisse

immunopräzipitiert wurde. Die Präzipitate wurden anschließend vom Proteom Center Tübingen weiterverarbeitet, indem diese OnBeads mit Trypsin verdaut und die Peptide anschließend differenziell durch Dimethylierung markiert wurden. Für die Dimethylierung wurde dabei entweder Deuterium verwendet, welches ein natürliches und stabiles Isotop von Wasserstoff ist und die Dunkelproben damit als „schwer“ (H) markiert. Die Blaulicht-behandelten Proben erhielten eine Dimethylierung mit „leichtem“ Wasserstoff (L). Die Proben wurden anschließend vereint und das Mischverhältnis von H zu L anhand einer MS-Messung determiniert und optimiert. Durch nachfolgende LC-MS/MS-Analyse und Auswertung mittels des Programmes Maxquant mit integriertem Andromeda wurden somit die Verhältnisse der phosphorylierten Peptide in einem Messdurchgang untersucht (*Tabelle 4-3*).

Tabelle 4-3: D/BL-Verhältnisse aus zwei MS-Messungen zur Detektion und Quantifizierung von Phosphorylierungspositionen in NPH3

Die Zahlen geben das Verhältnis der gelabelten und quantifizierten Peptide aus Dunkelproben zu Blaulichtproben an, mit x sind jene Phosphorylierungspositionen markiert, welche zwar ungelabelt in den Messungen detektiert wurden, jedoch nicht quantifiziert wurden

D/BL-Verhältnisse	S213	S215	T217	S222	S223	S237	S467	S469	S472	S474	S722	S723
Exp. 1	x			x	1,64	8,62	x	x		0,18	x	0,47
Exp. 2	x	x	0,978	x	1,91	x	x		x	2,14		

Wie aus **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** entnommen werden kann, zeigen die D/BL-Verhältnisse von S474 in beiden Messungen unterschiedliche Tendenzen, da die Phosphorylierung von S474 in der ersten Messung vorwiegend in den unbehandelten Proben detektiert wurde, jedoch in der zweiten Messung überwiegend in der Blaulicht-behandelten Probe vorkommt. Das Verhältnis der Peptide in den gelabelten Proben wird in *Abbildung 4.17 B* dargestellt. Die Positionen S223 sowie S237 wurden in den Proben etiolierter Keimlinge häufiger detektiert als in den belichteten Keimlingen. Anders verhält es sich für die Phosphorylierung von S723, welche in den Blaulicht-behandelten Proben häufiger auftritt als in unbehandelten Proben. Die Häufigkeit der Phosphorylierung von S217 differiert hingegen nur wenig zwischen unbehandelten und Blaulicht-behandelten Keimlingen. Anhand der gelabelten und besonders der ungelabelten, detektierten Positionen wird deutlich, dass durch die Detektion der markierten Peptide die Häufigkeit der Phosphorylierungspositionen in den jeweiligen Proben quantifiziert werden kann. Da jedoch weitaus mehr Phosphorylierungspositionen in den Proben zu finden sind, als markiert werden konnten, muss diese Methode noch optimiert werden, um möglichst alle detektierbaren Phosphorylierungspositionen quantifizieren zu können.

4. Ergebnisse

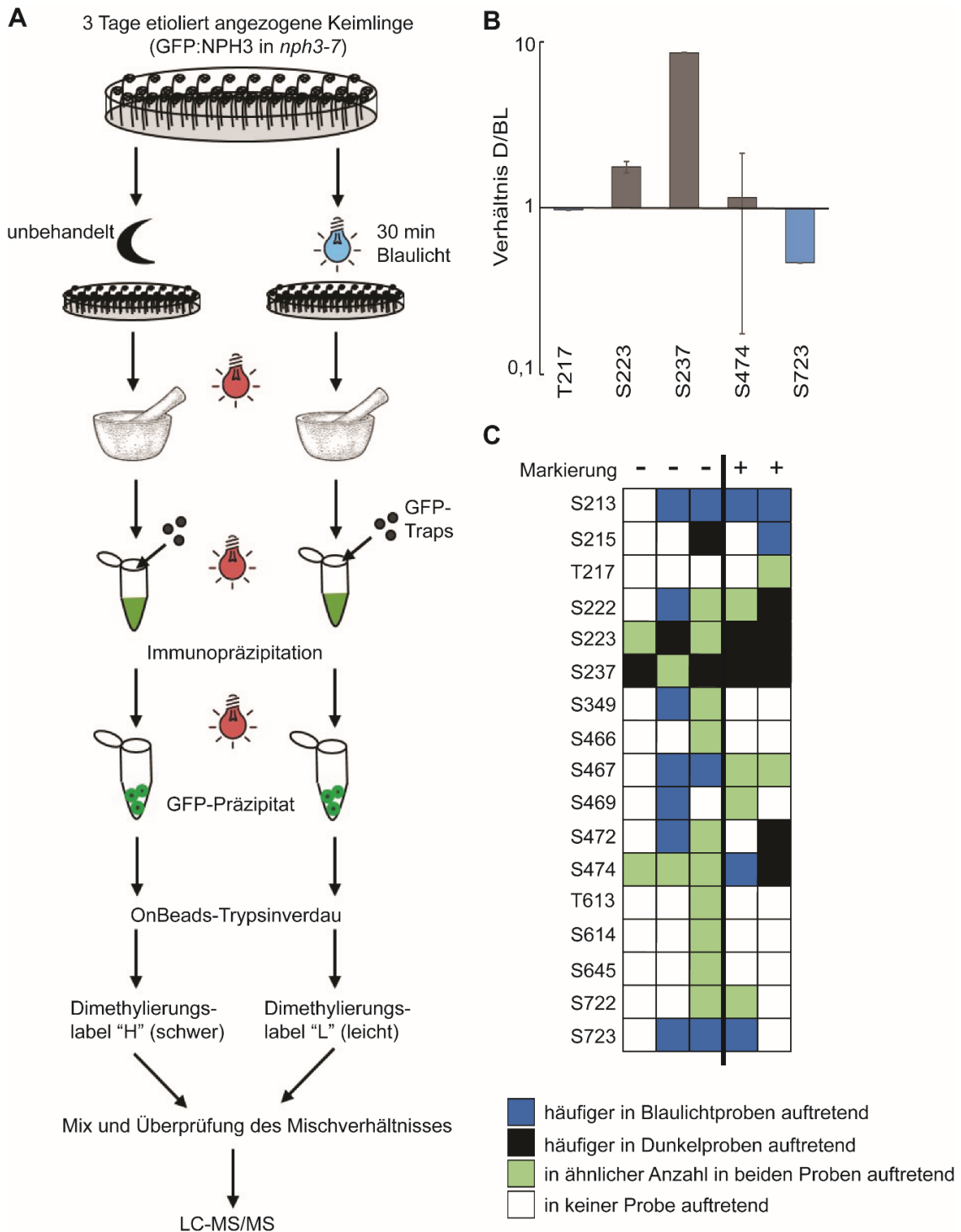


Abbildung 4.17: MS-Analysen zur Identifizierung von Phosphorylierungsunterschieden in etiolierten und Blaulicht-behandelten Keimlingen geben Hinweise auf Blaulicht-regulierte Phosphorylierungspositionen in NPH3

A Schematische Darstellung der experimentellen Durchführung zur Detektion von Phosphorylierungspositionen in Keimlingen von *A. thaliana nph3-7*, welche konstitutiv GFP:NPH3 exprimieren. Die Keimlinge wurden 3 Tage etioliert angezogen und anschließend teils für 30 Minuten mit Blaulicht bestrahlt. Die Extraktion und GFP-Immunopräzipitation erfolgte unter rotem Sicherheitslicht. Im PCT wurden die Präzipitate mit Trypsin verdaut und durch Dimethylierung „schwer“ (H) oder „leicht“ (L) markiert. Ein Gemisch aus beiden Proben wurde per LC-MS/MS detektiert. **B** Darstellung der D/BL-Verhältnisse aus zwei biologischen Replikaten mit gelabelten Peptiden. **C** Darstellung der Tendenz detektierter Phosphorylierungspositionen fünf biologischer Replikate ohne Markierungen.

4. Ergebnisse

Bei der Detektion und Auswertung der Daten der GFP:NPH3-Immunopräzipitationen aus *Abbildung 4.3* wurde parallel zu der Suche nach Peptiden auch die Detektion von Phosphorylierungspositionen und –peptiden vorgenommen. Anhand dieser insgesamt fünf biologischen Replikate wurden somit weitere Phosphorylierungspositionen in NPH3 identifiziert sowie deren Häufigkeitstendenz bestimmt (*Abbildung 4.17 C*).

Für einige detektierte Phosphorylierungspositionen konnten keine Unterschiede in der Häufigkeit zwischen den Dunkel- und den Blaulichtproben detektiert werden (T217, S466, T613, S614 und S645). Die Häufigkeit der Phosphorylierung anderer Positionen ergab keine Tendenz für Dunkel- oder Blaulichtproben (S215, S222, S349, S469, S472 und S474), was deren Blaulicht-regulierte Phosphorylierung ausschließt. Die Positionen S213 und S237 wurden besonders häufig in den Blaulichtproben detektiert, was auf deren Blaulicht-induzierte Phosphorylierung hinweist. Die Aminosäuren S223 und S237 akkumulierten dagegen in den unbehandelten Proben, was mit den Messungen der markierten Proben übereinstimmt und auf Positionen hindeutet, welche durch Blaulicht dephosphoryliert werden.

Aus diesen Daten lassen sich erste Rückschlüsse ziehen, inwiefern sich Blaulicht auf die Phosphorylierung einzelner Positionen in NPH3 auswirkt. Hier sind jedoch weitere Experimente mit markierten Peptiden nötig, um möglichst alle Phosphorylierungspositionen detektieren und quantifizieren zu können.

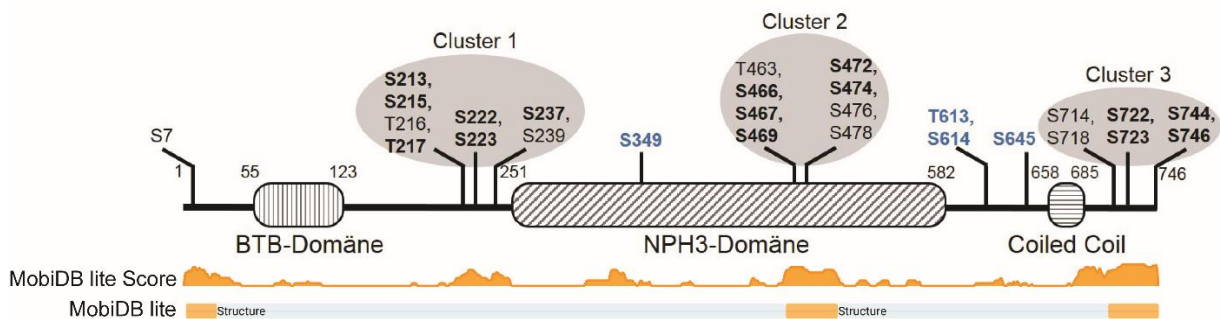


Abbildung 4.18: Einteilung der detektierten Phosphorylierungspositionen und jener aus der Literatur in Cluster

Schematische Darstellung von NPH3 mit Phosphorylierungspositionen aus der Literatur und jenen, welche im Rahmen dieser Arbeit detektiert wurden, dick hervorgehoben sind jene Phosphorylierungsstellen, welche sowohl in dieser Arbeit als auch in bisherigen Publikationen detektiert wurden; blau hervorgehoben sind die Phosphorylierungspositionen, welche ausschließlich im Rahmen dieser Arbeit detektiert wurden; berechnete Scores der Datenbank MobiDB zeigen intrinsisch ungeordnete Regionen (IDR) im Protein NPH3

Die im Rahmen dieser Arbeit detektierten und aus der Literatur bekannten Phosphorylierungspositionen lassen sich in drei Cluster einteilen, welche in *Abbildung 4.18* dargestellt sind. Diese Cluster befinden sich in intrinsisch ungeordneten Regionen (*intrinsically disordered regions, IDRs*), welche sich durch repetitive Elemente in der Aminosäuresequenz auszeichnen. Die Akkumulation potentieller Phosphorylierungspositionen in IDRs ist bereits bekannt, da IDRs

4. Ergebnisse

keine Sekundärstrukturen ausbilden und somit zugänglicher für posttranslationale Modifikationen sind als Regionen, welche Sekundärstrukturen ausbilden (Iakoucheva *et al.*, 2004). In IDRs befinden sich bis zu zehnmal mehr phosphorylierbare Serine als in geordneten Regionen, was die Lokalisation der Phosphorylierungscluster in NPH3 erklärt.

Das erste Cluster befindet sich zwischen BTB- und NPH3-Domäne zwischen den Positionen 213 und 239. Ein zweites Cluster liegt in der NPH3-Domäne und umfasst die Aminosäuren 466 bis 478. Das dritte Cluster liegt *downstream* der Coiled Coil-Domäne, hinter der amphipathischen Helix beginnend mit S714 und am C-Terminus endend. Alle drei Cluster befinden sich in intrinsisch ungeordneten Regionen in NPH3.

4.9. Untersuchung einzelner Phosphorylierungspositionen auf Veränderungen des Phosphorylierungsstatus von NPH3 sowie dessen Lokalisation

Zur Untersuchung einzelner Phosphorylierungspositionen wurden ausgewählte Serine in einzelnen Clustern entweder mit Aspartat (Mimikrierung der Phosphorylierung) oder Alanin substituiert (Verhinderung der Phosphorylierung dieser Position) (*Abbildung 4.19 A*).

Im ersten Cluster fiel die Wahl auf die Serine an den Positionen 213, 223 und 237, da diese bereits publiziert wurden (Tsuchida-Mayama *et al.*, 2008). Die Substitution der Serine zu Alanin zeigte im Vergleich zu NPH3 eine erhöhte Mobilität bei der elektrophoretischen Auftrennung von Extrakten aus etiolierten Keimlingen, jedoch keine Veränderung der phototropen Reaktion. Die Phosphomimikrierung der jeweiligen Serine wurde in dieser Publikation jedoch nicht getestet. In den MS-Messungen waren die Phosphorylierungspositionen S223 und S237 jedoch besonders auffällig, da deren Intensitäten in den Blaulichtproben wesentlich geringer ausfielen als in den Proben etiolierter Keimlinge, was auf eine Blaulicht-abhängige Dephosphorylierung hindeutet. Um zu eruieren, ob die Substitution der Serine gegen Aspartat einen Einfluss auf die Lokalisation und eventuell auch auf die phototrope Reaktion von Keimlingen hat, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Einzelmutanten S213D, S223D und S237D erzeugt.

Motchoulski und Liscum zeigten 1999, dass die NPH3-Domäne in allen NRLs konserviert ist. Phosphorylierungspositionen in dieser Domäne könnten somit für die Funktion von NPH3 von Bedeutung sein. Die Aminosäuren S469 und S474 des zweiten Clusters, welches sich in der NPH3-Domäne befindet, wurden entweder beide gegen Alanin (S2A) oder Aspartat (S2D) ausgetauscht. Eine Quintuple-Mutante wurde ebenfalls generiert, in welcher sowohl des ersten Clusters als auch jene des zweiten gegen Aspartat ausgetauscht wurde (S5D).

4. Ergebnisse

Im dritten Cluster befinden sich zwei Serine zwischen den im C-terminalen Bereich lokalisierten BH-Domänen. Phosphoryliertes Serin in Position 723 wurde in drei von fünf MS-Messungen identifiziert und wies in jedem Experiment höhere Intensitäten in den Blaulicht-behandelten als in den etioliert angezogenen Keimlingen auf (*Abbildung 4.17 B und C*). Somit besteht die Wahrscheinlichkeit, dass diese Phosphorylierung dieser Position Blaulicht-abhängig und wichtig für die phototrope Reaktion ist. Das benachbarte Serin an Position 722 tauchte ebenfalls in der Publikation von Mergner et al. 2020 auf. Beide Positionen wurden einzeln entweder zu Alanin oder Aspartat substituiert.

Abbildung 4.19 A fasst alle in NPH3 veränderten Phosphorylierungspositionen zusammen, welche im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden. Um die zelluläre Lokalisation und eventuelle Abweichungen in den Mutanten zu visualisieren, wurden Konfokal-Aufnahmen jeder Phosphorylierungsmutante erstellt. Hierfür wurden Blätter von *N. benthamiana* transient mit Vektoren transformiert, welche die Expression von RFP:NPH3-Phosphomutanten ermöglichen. Die Pflanzen wurden für 24 Stunden konstant belichtet und anschließend für mindestens weitere 16 Stunden an Dunkelheit adaptiert. Alle NPH3-Phosphovarianten lokalisierten in den Dunkelproben an der Plasmamembran (*Abbildung 4.19 B*) und dissoziierten von dieser nach Bestrahlung mit Blaulicht. Jedoch bewirkte der Austausch der zwei Serine an Positionen 469 und 474 zu Aspartat, dass NPH3 im Cytosol keine Kondensate bildete, sondern ausschließlich an cytoplasmatische Stränge lokalisierte. Alle anderen RFP:NPH3-Phosphovarianten bildeten im Blaulicht cytosolische Kondensate, vergleichbar wie RFP:NPH3..

Um den Phosphorylierungsstatus der Gesamtproteine in Abhängigkeit von Blaulicht zu untersuchen, wurden Extrakte aus Blättern von transient transformierten *N. benthamiana* elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert. Hier wurden die RFP:NPH3-Phosphoversionen verwendet, welche bereits per CLSM untersucht wurden (*Abbildung 4.20 A*). Die Pflanzen wurden hierfür nach 24 Stunden konstanter Belichtung für mindestens weitere 16 Stunden in Dunkelheit gelagert (D), anschließend für eine Stunde mit $4,5 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ Blaulicht bestrahlt (BL) und danach für eine weitere Stunde erneut in Dunkelheit gelagert (R-D).

Auch hier weist RFP:NPH3 im Blaulicht eine höhere elektrophoretische Mobilität auf als in den Dunkelproben. Die Blaulicht-abhängige Veränderung des Phosphorylierungsstatus des Gesamtproteins ist somit nicht nur in etiolierten Keimlingen von *A. thaliana* nachweisbar, sondern auch in transient transformierten Blättern von *N. benthamiana* (*Abbildung 4.15, Abbildung 4.20*). Auch die Blaulicht- und phot1-abhängige Phosphorylierung von S744 findet statt. Nach dem Transfer der Proben zurück in Dunkelheit liegt RFP:NPH3 wieder stärker phosphoryliert vor, die 14-3-3-Bindestelle S744 hingegen wurde dephosphoryliert.

4. Ergebnisse

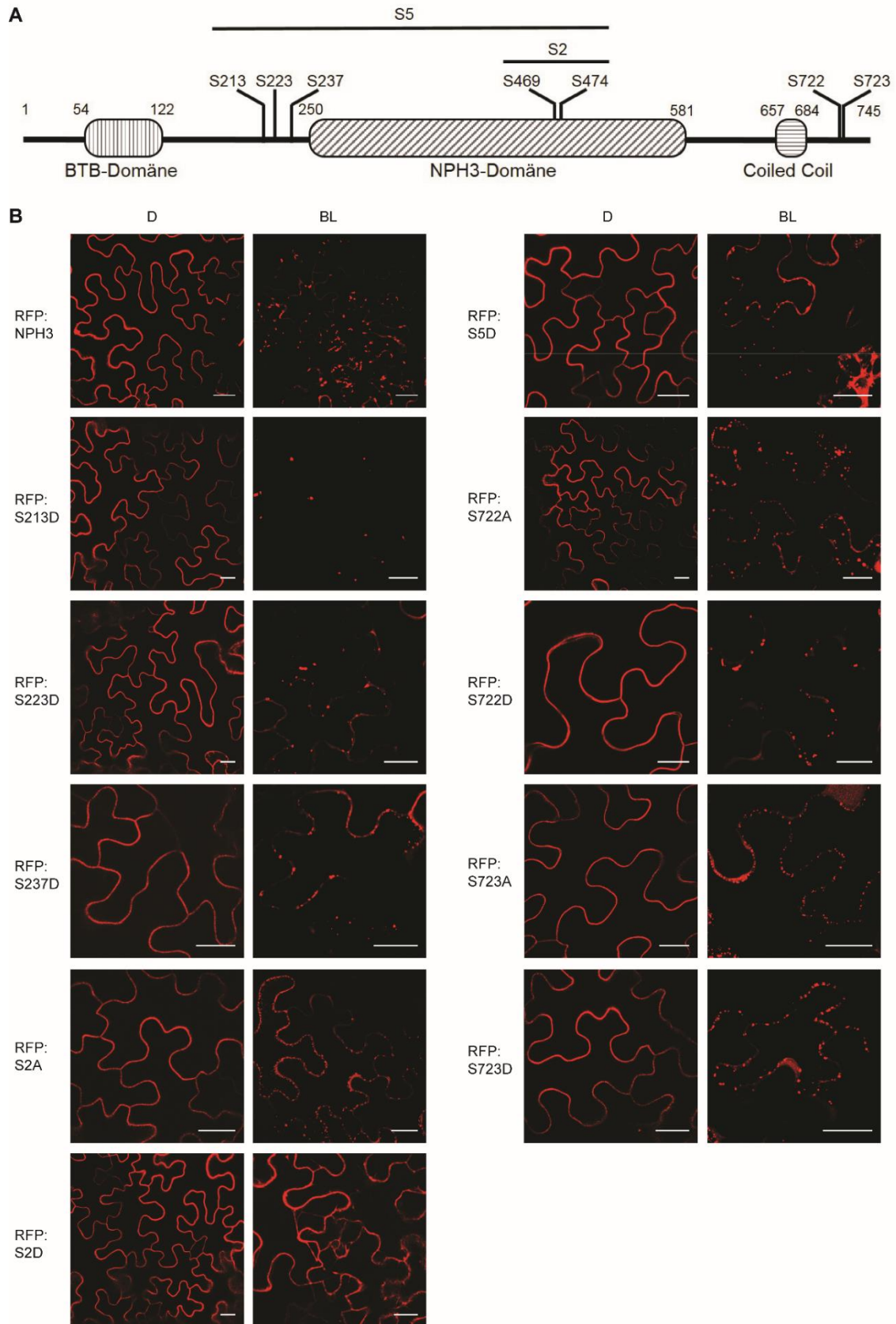


Abbildung 4.19: Die Mimikrierung/ Unterbindung der Phosphorylierung ausgewählter Positionen verändert nicht die subzelluläre Lokalisation von NPH3 in Blättern von *N. benthamiana*

A Schematische Abbildung der substituierten Phosphorylierungspositionen in NPH3. **B** CLSM-Aufnahmen transient transformierter Blätter von *N. benthamiana*, welche konstitutiv RFP:NPH3-Phosphovarianten exprimieren. Serine wurden zur Mimikrierung mit Aspartat (D) beziehungsweise

4. Ergebnisse

Verhinderung einer Phosphorylierung mit Alanin (A) an der jeweiligen Position substituiert. Nach der Transformation wurden die Pflanzen für 24 Stunden in Licht und anschließend für mindestens 16 Stunden in Dunkelheit inkubiert (D), die Bestrahlung mit 20% Blaulicht-Laser (BL) erfolgte für mindestens 10 Minuten, Maßstab 25 μm

Die einzelnen und simultanen Austausch aller drei Positionen S213, S223 und S237 zu Alanin bewirkte eine elektrophoretische Mobilität, welche der dephosphorylierten Form von NPH3 entspricht (Tsuchida-Mayama *et al.*, 2008). Die Serin-Substitutionen an den einzelnen Positionen 213, 223 und 237 zu Aspartat weisen jedoch in den Dunkelproben D die gleichen elektrophoretischen Mobilitäten auf wie RFP:NPH3 (*Abbildung 4.20*). Ebenfalls erfolgte im Blaulicht auch in diesen NPH3-Varianten die Dephosphorylierung des Gesamtproteins sowie die Phosphorylierung der 14-3-3-Bindestelle. Beide Vorgänge sind nach dem Transfer zurück in die Dunkelheit reversibel, die permanente Mimikrierung einer Phosphorylierung an den einzelnen Positionen 213, 223 und 237 hat somit keinen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus des Gesamtproteins und der 14-3-3-Bindestelle sowie auf die subzelluläre Lokalisation des Gesamtproteins.

Die simultane Substitution von zwei Serinen des zweiten Clusters zu Alanin (RFP:S2A) zeigt keine Veränderungen in der elektrophoretischen Mobilität im Vergleich zu RFP:NPH3 und hat keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation des Proteins (*Abbildung 4.19*, *Abbildung 4.20*). Der Austausch dieser zwei Serine gegen Aspartat (RFP:S2D) erlaubt zwar dessen Blaulicht-abhängige Dephosphorylierung, jedoch weist das Gesamtprotein eine geringere elektrophoretische Mobilität auf als RFP:NPH3, was auf die zwei Phosphomimikrierungen und damit zusätzlichen negativen Ladungen oder damit verbundene weitere Phosphorylierungen des Gesamtproteins zurückgeführt werden könnte. Die Blaulicht-abhängige Phosphorylierung der 14-3-3-Bindestelle erfolgt jedoch in dieser Mutante. Die zwei weiteren negativen Ladungen in RFP:S2D haben keinen Einfluss auf die Plasmamembranassoziation des Proteins in den Dunkelproben, scheinen jedoch negative Auswirkungen auf die Kondensatbildung im Blaulicht zu haben. Hier müssen jedoch weitere Experimente folgen.

Der simultane Austausch von fünf Serinen in NPH3 zu Aspartat (Positionen 213, 223, 237, 469 und 474) (RFP:S5D) ermöglicht die phot1-abhängige Phosphorylierung von S744 sowie die Dissoziation des Proteins von der Plasmamembran im Blaulicht mit Ausbildung cytosolischer Kondensate. Allerdings erfolgt die Dissoziation von der Plasmamembran im Blaulicht bei RFP:S5D unabhängig von der Dephosphorylierung des Gesamtproteins. Die Bildung cytosolischer Kondensate von RFP:S5D im Blaulicht verhält sich gegensätzlich zu der diffusen cytoplasmatischen Lokalisation von RFP:S2D. In einer früheren Publikation wurden die drei Serine des ersten Clusters zu Alanin substituiert, um die Phosphorylierung dieser Positionen zu unterbinden, sodass NPH3 bereits in etiolierten Keimlingen eine höhere elektrophoretische Mobilität aufwies, welche der dephosphorylierten Form entspricht (Tsuchida-Mayama *et al.*,

4. Ergebnisse

2008). Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass unter anderem die simultane Phosphomimikrierung aller drei Positionen dazu führt, dass RFP:S5D im Blaulicht nicht mehr dephosphoryliert wird. Die drei Serine an den Positionen 213, 223 und 237 sind somit essentiell für die elektrophoretisch detektierbare posttranslationale Modifikation von NPH3 im Blaulicht.

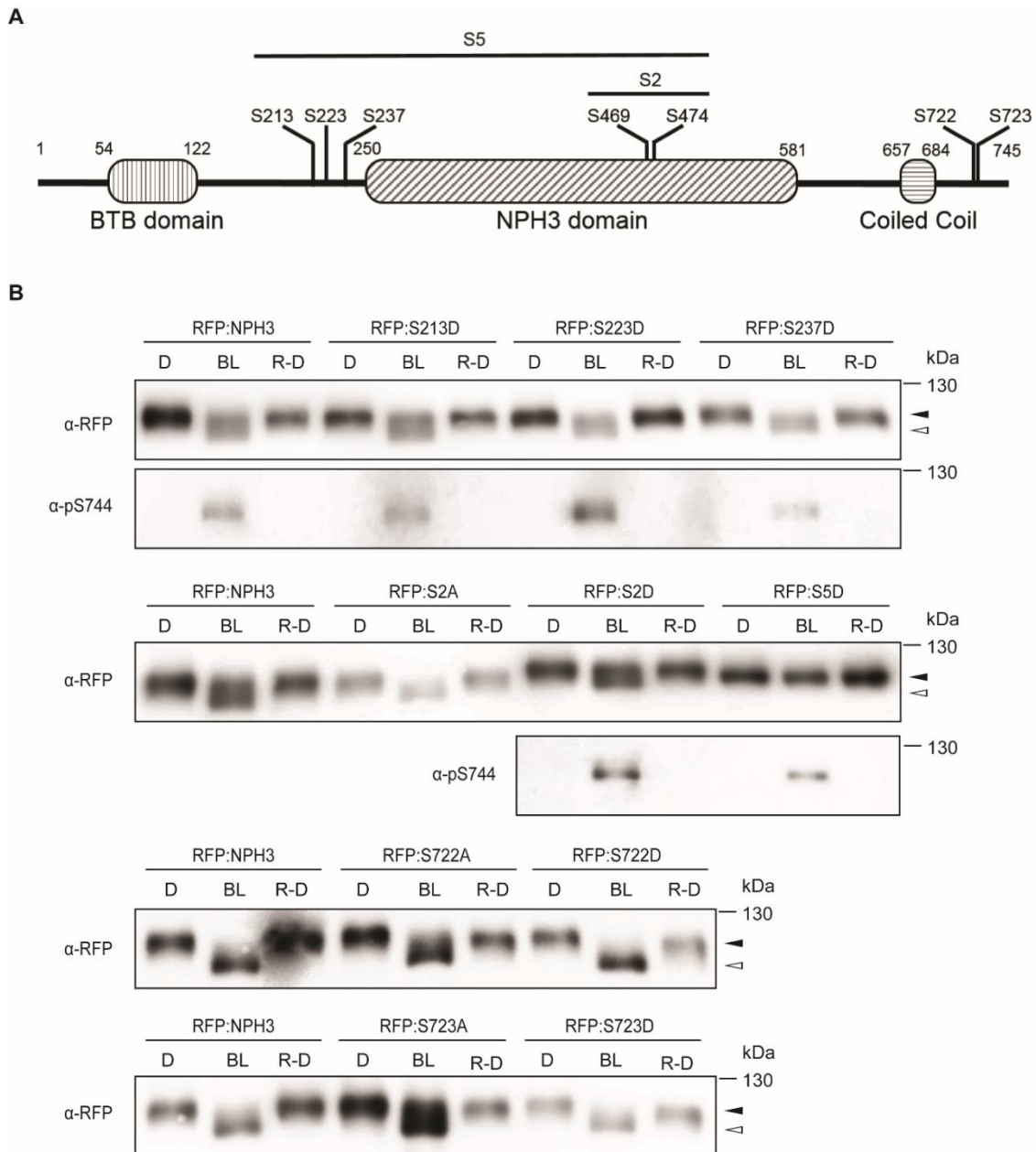


Abbildung 4.20: Die Mimikrierung der Phosphorylierung an bis zu fünf Positionen in NPH3 beeinflusst dessen elektrophoretisches Laufverhalten aus Blattextrakten von *N. benthamiana*

A Schematische Darstellung der veränderten Phosphorylierungspositionen in NPH3. **B** Immunodetektionen von RFP und pS744 von RFP:NPH3-Phosphorylierungsvarianten, welche in transient transformierten Blättern von *N. benthamiana* exprimiert wurden. Diese wurden 24 Stunden Posttransformation in Konstantlicht und für weitere 16 Stunden in Dunkelheit gehalten (D), anschließend 1 h mit Blaulicht bestrahlt ($4,5 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$, BL) und eine weitere Stunde in Dunkelheit transferiert (R-D). Die schwarze Pfeilspitze entspricht der phosphorylierten Form von NPH3, die weiße Pfeilspitze zeigt die elektrophoretische Mobilität der dephosphorylierten Form von NPH3.

4. Ergebnisse

Die mimikrierte Phosphorylierung beziehungsweise die Unterbindung der Phosphorylierung der beiden Serine zwischen den C-terminal lokalisierten BH-Domänen hat weder einen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus des Gesamtproteins noch auf Veränderungen in der subzellulären Lokalisation von NPH3 in Abhängigkeit von Blaulicht.

Weiterführende Experimente wären differentielle *in vivo*-Analysen, welche statistisch signifikante Aussagen über die Funktionalität von NPH3 in Dunkelheit und im Blaulicht zulassen, wie beispielsweise weiterer Coimmunopräzipitationen der NPH3-Phosphovarianten aus stabilen *nph3-7-Arabidopsis*-Linien, welche sowohl etioliert als auch mit Blaulicht behandelt wurden. Ebenso muss die Methode zur Markierung der Phosphopeptide optimiert werden.

Zudem ist die Generierung transgener Linien notwendig, welche einzelne Phosphorylierungsvarianten von NPH3 in den ersten beiden Clustern stabil exprimieren. Diese werden auf ihre Fähigkeit zur phototropen Reaktion untersucht, wobei erste Anhaltspunkte hierbei die Resultate von NPH3-Varianten liefern, in welchen gleichzeitig sieben Serine entweder zu Alanin (NPH3-SA) oder Glutamat (NPH3-SE) substituiert wurden (Kimura *et al.*, 2021). Hierbei handelt es sich um die Positionen S7, S213, S223, S237, S467, S474 und S722, sodass Serine in mehreren IDRs von NPH3 ausgetauscht wurden. Bei Blaulichtintensitäten von $1,7 \times 10^{-1} \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ verlief die phototrope Antwort der transgenen Linien, welche die Septuple-Mutante NPH3-SA exprimierten, vergleichbar wie die von NPH3 in transgenen Linien. Lediglich die Linien, welche die Septuple-Mutante NPH3-SE exprimierten, reagierten bei dieser Blaulicht-Intensität nicht phototrop, obwohl NPH3-SE bei dieser Blaulicht-Intensität von der Plasmamembran dissoziiert und cytosolische Kondensate bildet. Nach zweistündiger Irradiation mit dieser Lichtintensität lokalisiert jedoch NPH3-SA teilweise wieder an die Plasmamembran, während NPH3-SE nicht wieder an die Plasmamembran assoziiert, sondern noch immer in cytosolischen Kondensaten vorliegt. Wurde eine geringere Blaulicht-Intensität von $1,7 \times 10^{-3} \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ verwendet, reagierten beide Septuple-Linien phototrop, wengleich die Linien mit NPH3-SE verzögert reagierten. Da in dieser Septuple-Mutante aus dem letzten Cluster lediglich S722 substituiert wurde, in Phosphoanalysen der MS-Messungen jedoch S723 in den Blaulichtproben höhere Intensitäten aufwies als in den Dunkelproben (*Abbildung 4.17 C*), würde die phototrope Reaktion einer transgenen Linie interessant sein, welche eine Substitution des Serins an Position 723 zu Alanin oder Aspartat in NPH3 aufweist.

Da RPT2 für die Relokalisation von NPH3 an die Plasmamembran im Blaulicht von Bedeutung ist (Haga *et al.*, 2015), wäre die Untersuchung der Interaktion von RPT2 und der Quintuple-Mutante NPH3-S5D ebenfalls interessant, da diese auch im Blaulicht permanent phosphoryliert vorliegt. Zusätzlich wäre hier auch die Untersuchung der Interaktion von RPT2 mit einer Triple-Mutante von NPH3 wichtig, bei welcher die Serine an den drei Positionen 213,

4. Ergebnisse

223 und 237 zu Alanin substituiert werden. Da eine Version mit diesen drei Substitutionen in NPH3 konstitutiv dephosphoryliert vorliegt (Kimura *et al.*, 2021), jedoch nach längerer Blaulicht-Bestrahlung wieder an die Plasmamembran assoziiert, wäre zu erwarten, dass diese NPH3-Version mit RPT2 interagiert.

5. Diskussion

5.1. Molekularer Mechanismus der Plasmamembran-Assoziation von NPH3

Es war bereits bekannt, dass NPH3 in Dunkelheit an die Plasmamembran assoziiert (Motchoulski und Liscum, 1999; Inoue *et al.*, 2008 a; Haga *et al.*, 2015; Sullivan *et al.*, 2019). Der zugrundeliegende molekulare Mechanismus war jedoch ungeklärt. Erste Hinweise auf eine Phospholipid-abhängige Assoziation des Proteins ergaben Experimente unter Einsatz eines genetischen Werkzeugs, der katalytischen Domäne von Sac1p aus *S. cerevisiae*, welche Phosphatidylinositol-4-Phosphat (PI4P) zu Phosphatidylinositol (PI) dephosphoryliert und somit die Elektronegativität der Plasmamembran in Pflanzen reduziert (Simon *et al.*, 2016; Gronnier *et al.*, 2017). Bei der Expression von Sac1p konnte beispielsweise beobachtet werden, dass das Pflanzen-spezifische Membran-gebundene Protein Remorin von der Plasmamembran dissoziiert (Gronnier *et al.*, 2017). Ähnlich wie Sac1p reduziert auch die Chemikalie Phenylarsinoxid (PAO) den Gehalt von PI4P in der Plasmamembran, indem es die Phosphorylierung von PI zu PI4P unterbindet. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Proteine, welche normalerweise durch die Interaktion mit anionischen Phospholipiden an der Plasmamembran lokalisieren, unter Einwirkung von PAO von der Plasmamembran dissoziierten. Hierzu zählen PID und Proteine der BKI-Proteinfamilie, aber auch D6PK (Barbosa *et al.*, 2016; Simon *et al.*, 2016).

Die Coexpression von Sac1p und NPH3 hatte eine Dissoziation von NPH3 von der Plasmamembran in Dunkelheit zur Folge (Reuter *et al.*, 2021). Demnach ist die Elektronegativität der Plasmamembran direkt oder indirekt für die Membranassoziation von NPH3 essentiell. Mittels Protein-Lipid-Overlays konnte nachfolgend eindeutig gezeigt werden, dass *in vitro* transkribiertes und translatiertes NPH3 direkt an immobilisierte polyacide Phospholipide bindet (*Abbildung 4.6 C*). Eine elektrostatische Assoziation an die Plasmamembran auf der Grundlage einer direkten Interaktion basischer Aminosäuremotive mit polyaciden Phospholipiden ist bereits von den Proteinkinasen PID und D6PK bekannt (Zegzouti *et al.*, 2006; Barbosa *et al.*, 2016). Im C-terminalen Bereich von NPH3 befinden sich *downstream* der Coiled Coil-Domäne zwei putative BH-Motive (*Abbildung 4.6 D*), die sich durch die Anreicherung basischer und hydrophober Aminosäuren auszeichnen (Brzeska *et al.*, 2010). Tatsächlich war eine C-terminal deletierte Version von NPH3 nicht mehr zur direkten Bindung an mehrfach negativ geladene Phosphoglyceride fähig (*Abbildung 4.6*), während sich die C-terminalen 51 Aminosäuren als Fusion mit GST als ausreichend erwiesen (*Abbildung 4.6 C*). Dies konnte mittels Liposomen-Bindetests bestätigt werden (*Abbildung 4.7*).

5. Diskussion

Da sich beide putativen BH-Motive innerhalb des 51 Aminosäuren umfassenden C-terminalen Bereiches befinden, stellt sich die Frage, welches der beiden Motive für die Assoziation des Proteins an die Plasmamembran von Bedeutung ist oder ob gar beide dazu benötigt werden. Hängt die Assoziation von NPH3 an die Plasmamembran ausschließlich von elektrostatischen Interaktionen ab oder könnte die Interaktion von 14-3-3 und NPH3 eine zusätzliche Rolle spielen, da sich die 14-3-3-Bindestelle nahe des BH-Motives befindet, welches besonders viele Arginine aufweist?

Bei näherer Untersuchung des C-terminalen Segmentes von NPH3 wird für eines der beiden BH-Motive die Ausbildung einer amphipathischen Helix vorhergesagt (*Abbildung 4.9 B*), wobei eine Seite der Helix überwiegend basische Aminosäuren aufweist, während die andere Seite vorrangig hydrophobe Aminosäuren enthält. Dies wirft die Frage auf, ob zusätzlich zu elektrostatischen Interaktionen der basischen Aminosäuren mit der Plasmamembran auch hydrophobe Wechselwirkungen bei der Assoziation von NPH3 mit der Plasmamembran eine Rolle spielen.

Der Austausch der basischen Aminosäuren des R-reichen BH-Motives verminderte *in vitro* die Bindung des C-terminalen Fragmentes an mehrfach negativ geladene Phosphoglycerolipide. Bei transienter Expression der entsprechenden NPH3-Mutanten als Fluorophor-getaggte Proteine in *N. benthamiana* konnte jedoch beobachtet werden, dass einzig Veränderungen der Amphiphilität oder der Hydrophobizität der amphipathischen Helix dazu führten, dass NPH3 bereits in Dunkelheit nicht mehr an die Plasmamembran lokalisiert, während die Veränderungen des R-reichen BH-Motives keinen Einfluss auf die Lokalisation von NPH3 an die Plasmamembran in Dunkelheit hatten (Reuter *et al.*, 2021). Durch die Veränderungen von Amphiphilität oder Hydrophobizität konnte das C-terminale Fragment von NPH3 nicht mehr an mehrfach negativ geladene Phosphoglyceride *in vitro* binden (*Abbildung 4.10 B, D*, *Abbildung 4.11 B, D*).

Aus den *in vitro*-Untersuchungen ging hervor, dass vorrangig die basischen Aminosäuren der amphipathischen Helix für die Bindung des C-terminalen Fragmentes von NPH3 an mehrfach negativ geladene Phosphoglyceride notwendig sind (*Abbildung 4.11 B, D*) – der Austausch der hydrophoben Aminosäuren erlaubte demgegenüber noch eine schwache Bindung an Liposomen mit polyaciden Phospholipiden. Eine attraktive Hypothese ist somit, dass ein erster Kontakt zu den mehrfach negativ geladenen Phospholipiden der Membran durch die basische Seite der amphipathischen Helix von NPH3 ermöglicht wird und nachfolgend eine partielle Penetration der Membran erfolgt.

Die Funktionsweise der amphipathischen Helix von NPH3, einem konventionellen Bindemotiv, unterscheidet sich somit von der Membran-Assoziation des Proteins Remorin, welches als Nanodomänen-organisierendes Protein angesehen wird und in verschiedene Antworten auf

5. Diskussion

biotische und abiotische Stimuli involviert ist. Bei Remorin interagieren die basischen Aminosäuren der C-terminal gelegenen Helix ausschließlich mit den Phospholipiden der Plasmamembran (Perraki *et al.*, 2012; Gronnier *et al.*, 2017). *Downstream* dieser Helix befindet sich eine hydrophobe nicht-helikale Region, welche in die Lipidphase eintaucht und sich dort verankert.

Ähnlich wie NPH3 besitzt die Lipidkinase PIP5K einen intrinsisch ungeordneten Bereich, welcher vermutlich bei Kontakt mit Membranlipiden eine amphipathische Helix bildet (Fairn *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2016; Nishimura *et al.*, 2019). Durch die basische Seite der amphipathischen Helix verankert sich PIP5K an der Plasmamembran und insertiert mit der hydrophoben Seite der Helix in die hydrophobe Phase des Bilayers (Nishimura *et al.*, 2019).

Von einem weiteren Mitglied der NPH3/RPT2-Familie – MAB4/ENP – wurde ebenfalls beschrieben, dass dieses an die Membran lokalisiert. Während die Lokalisation von NPH3 an die Plasmamembran durch eine amphipathische Helix erfolgt und das Protein durch die Assoziation von 14-3-3 von der Plasmamembran dissoziiert, wird MAB4/ENP von PIN-Proteinen an die Plasmamembran rekrutiert (Glanc *et al.*, 2021). Da zudem die Interaktion zwischen NPH3 und PIN-Proteinen bisher nicht gezeigt werden konnte, liegen der Membranlokalisation von NPH3 und jener von MAB4/ENP unterschiedliche Mechanismen zugrunde.

5.2. Auswirkung und physiologische Signifikanz der Interaktion von 14-3-3 und NPH3

Es wurde bereits herausgefunden, dass NPH3 ein Bindepartner der 14-3-3-Proteine ist (Throm, 2017). Mittels Y2H konnten Hinweise erhalten werden, dass die 14-3-3-Bindestelle sich nahe des C-Terminus von NPH3 befindet (Throm, 2017). Hierbei handelt es sich um ein Bindemotiv Typ III (Coblitz *et al.*, 2005; Ganguly *et al.*, 2005), welches die zu phosphorylierende Aminosäure an drittletzter C-terminaler Position (S744) aufweist.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die 14-3-3-Assoziation an NPH3 sowie die Bindestelle (S744) mittels Coimmunopräzipitation (CoIP) transient in *N. benthamiana* exprimierter Fluorophor-getaggtter Polypeptide verifiziert werden. Die Substituierung des Serins in Position 744 von NPH3 durch ein nicht-phosphoryliebares Alanin verhinderte die Komplexbildung mit 14-3-3 (*Abbildung 4.1*) und lässt vermuten, dass S744 in NPH3 *in planta* phosphoryliert vorliegen muss, um eine 14-3-3-Assoziation zu ermöglichen.

Unter Einsatz etiolierter, transgener *Arabidopsis*-Keimlinge, die entweder 14-3-3 epsilon-GFP oder GFP-NPH3 (*nph3 loss-of-function* Hintergrund) exprimierten, konnte in CoIP-Analysen,

5. Diskussion

die mit MS-basierter Proteinidentifizierung gekoppelt waren, klar gezeigt werden, dass die Komplexbildung zwischen NPH3 und 14-3-3-Proteinen in Abhängigkeit von Blaulicht erfolgt (*Abbildung 4.2, Abbildung 4.3*). Eine Präferenz von NPH3 für Epsilon- oder Nicht-Epsilon-Mitglieder der 14-3-3-Isoformen lag bei der CoIP von GFP:NPH3 nicht vor (*Abbildung 4.3*), was jedoch auf die Ausbildung von 14-3-3-Heterodimeren zurückzuführen sein (Wu *et al.*, 1997; Chaudhri *et al.*, 2003; Benzinger *et al.*, 2005). Tatsächlich konnten wir zeigen, dass NPH3 sowohl mit der 14-3-3-Isoform Epsilon (Epsilon-Untergruppe, *Abbildung 4.2 C*) als auch mit der Isoform Omega (Nicht-Epsilon-Untergruppe, *Abbildung 4.1 B*) interagiert.

In etiolierten Keimlingen lokalisiert NPH3 an die Plasmamembran und die Aktivierung von phot1 führt zu einer schnellen Dissoziation von der Membran und die Ausbildung cytosolischer Aggregate (Haga *et al.*, 2015; *Abbildung 4.5 A*). Bemerkenswerterweise ist diese BL-induzierte Veränderung in der subzellulären Lokalisation nicht bei NPH3-Varianten zu beobachten, die aufgrund einer gerichteten Mutagenese (NPH3-S744A) oder Deletion (NPH3 Δ C28) nicht mehr zur 14-3-3-Interaktion fähig sind (*Abbildung 4.5, Abbildung 4.12*). Die Blaulicht-abhängige Bindung von 14-3-3 an NPH3 scheint somit für die Dissoziation von NPH3 von der Plasmamembran essentiell zu sein. Bedenkt man, dass die für die Plasmamembran-Assoziation von NPH3 verantwortliche amphipathische Helix circa 30 bis 45 Aminosäuren *upstream* vom 14-3-3-Bindemotiv lokalisiert, muss von einer 14-3-3-vermittelten substanziellen Konformationsänderung ausgegangen werden, die eine Einbettung in die Membran effektiv unterbindet. Die 14-3-3-Assoziation ist auch von physiologischer Signifikanz, da sich die Unterbindung der 14-3-3-Interaktion mit NPH3 negativ auf die phototrope Reaktion in transgenen *Arabidopsis*-Keimlingen ausbildet (*Abbildung 4.4*).

phot1 wird ebenfalls Blaulicht-abhängig von Mitgliedern der Nicht-Epsilon-Gruppe der 14-3-3-Proteine gebunden (Inoue *et al.*, 2008 a; Sullivan *et al.*, 2009). Im Gegensatz zu NPH3 scheint die Komplexbildung von phot1 und 14-3-3 jedoch nicht von funktioneller Bedeutung für die phototrope Reaktion zu sein (Inoue *et al.*, 2008 a). Zudem interagieren die LOV-Domänen von phot1 mit dem C-terminalen Bereich von NPH3 (Motchoulski und Liscum, 1999), welcher unter anderem die 14-3-3-Bindestelle enthält (*Abbildung 4.8*). Die Bedeutung der 14-3-3-Assoziation im Hinblick auf die Interaktion von phot1 und NPH3 ist bislang ungeklärt. Darüber hinaus ist von phot1 bekannt, dass es Blaulicht-induziert von der Plasmamembran dissoziiert (Sakamoto und Briggs, 2002; Wan *et al.*, 2008; Kaiserli *et al.*, 2009). Im Gegensatz zu NPH3, welches nach phot1-Aktivierung cytosolisch lokalisiert und konzentrationsabhängig Kondensate ausbildet (Reuter *et al.*, 2021), gelangt phot1 über Endocytose in die Zelle (Sakamoto und Briggs, 2002; Wan *et al.*, 2008; Kaiserli *et al.*, 2009). Zudem konnte eine konstitutiv Plasmamembran-assoziierte Version von phot1 auf der Grundlage eines Lipidankers generiert

5. Diskussion

werden, welche sich, im Gegensatz zu NPH3 (*Abbildung 4.5*), im Hinblick auf die phototrope Antwort als voll funktionsfähig erwies.

5.3. Posttranslationale Modifikationen von NPH3: Ein derzeitiger Kenntnisstand

Unabhängig von phot1 liegt NPH3 phosphoryliert vor, wogegen Licht die phot1-abhängige Dephosphorylierung induziert, welche als veränderte elektro-phoretische Mobilität detektierbar ist (Liscum und Briggs, 1995; Pedmale und Liscum, 2007). Bereits existierende Modelle besagen, dass durch die stärkere Phosphorylierung in Dunkelheit die Lokalisation an der Plasmamembran zu einer Ausbildung eines phot1:NPH3-Komplexes führt und somit die phototrope Reaktion verstärkt wird. Die Licht- und phot1-bedingte Dephosphorylierung führt zu einer Dissoziation des Proteins NPH3 von phot1 und von der Plasmamembran, was eine reduzierte phototrope Antwort und somit eine Inaktivierung von NPH3 zur Folge hat (Haga *et al.*, 2015; Christie *et al.*, 2018; Sullivan *et al.*, 2019; Liscum *et al.*, 2020).

Zudem wurden drei Phosphorylierungspositionen identifiziert, welche durch den Austausch von Serinen zu nicht phosphorylierbaren Alaninen zu einer bereits dephosphorylierten Form von NPH3 in Dunkelheit führten (Tsuchida-Mayama *et al.*, 2008). Vier weitere Positionen wurden später identifiziert, deren Phosphorylierung abhängig von Blaulicht zu sein scheint (Kimura *et al.*, 2021). Der jeweilige Austausch aller sieben Positionen gegen die Phosphorylierungs-mimikrierende Aminosäure Glutamat (NPH3SE) veränderte weder die Plasmamembran-Assoziation des Proteins in Dunkelheit noch die Blaulicht-induzierte Dissoziation. Dies stellt die Bedeutung der mit der Dissoziation von der Plasmamembran einhergehenden Dephosphorylierung von NPH3 in Frage, da NPH3SE sowohl in Dunkelproben als auch in Blaulicht-belichteten Proben eine geringere elektro-phoretische Mobilität aufweist, welche NPH3 in Dunkelproben entspricht. Werden die sieben Positionen in NPH3 gegen Alanin ausgetauscht (NPH3SA), so zeigt diese Mutante bereits in Dunkelheit eine erhöhte elektro-phoretische Mobilität, welche NPH3 in Blaulicht-belichteten Proben entspricht. Jedoch zeigt auch NPH3SA die Assoziation an die Plasmamembran in Dunkelheit, was wiederum der Bedeutung der Dephosphorylierung im Zusammenhang mit der Dissoziation von der Plasmamembran widerspricht. Stabil NPH3SA exprimierende *nph3-loss-of-function*-Linien weisen keine physiologischen Konsequenzen auf, da die Linien phototrop reagieren und somit die reduzierte Aktivität von dephosphoryliertem NPH3 in der phototropen Reaktion widerlegen.

Die von uns erhaltenen Ergebnisse lassen eine Licht-induzierte Phosphorylierung der 14-3-3-Bindestelle S744 vermuten. Tatsächlich erkannte ein Phosphosite-spezifischer Antikörper (a-pS744) RFP:NPH3, nicht jedoch RFP:NPH3-S744A ausschließlich in Blaulicht-behandelten

5. Diskussion

transient transformierten Blättern von *N. benthamiana* (Reuter *et al.*, 2021). Dies konnte unter Einsatz stabiler transgener *nph3-loss-of-function*-Linien verifiziert werden, welche GFP-getaggtter NPH3-Varianten exprimierten (*Abbildung 4.15*). Die Phosphorylierung der 14-3-3-Bindestelle S744 erfolgt durch *phot1* in Abhängigkeit von Blaulicht (Sullivan *et al.*, 2021). Neben der Phosphorylierung von S744 hat die Aktivierung von *phot1* die bereits erwähnte Dephosphorylierung von NPH3 zur Folge, die eine erhöhte elektrophoretische Mobilität von NPH3 bedingt (*Abbildung 4.15*). Somit induziert die Blaulicht-induzierte Aktivierung von *phot1* einerseits die Phosphorylierung der 14-3-3-Bindestelle S744 und andererseits die Dephosphorylierung anderer Aminosäuren von NPH3. Erstaunlicherweise sind beide posttranslationalen Prozesse bei NPH3-S744A nicht zu beobachten, was vermuten lässt, dass die *phot1*-abhängige Dephosphorylierung von NPH3 eine Folge der *phot1*-abhängigen Phosphorylierung der Position ist.

Bereits 2007 konnte gezeigt werden, dass die Licht-induzierte Dephosphorylierung von NPH3 bei Retransfer belichteter Keimlinge in Dunkelheit reversibel ist, da NPH3 wieder eine geringere elektrophoretische Mobilität aufwies und somit wieder in stärker phosphorylierter Form vorzuliegen scheint (Pedmale und Liscum, 2007; *Abbildung 4.15*). Auffälligerweise hat solch ein Retransfer in Dunkelheit die Dephosphorylierung der 14-3-3-Bindestelle S744 zur Folge, so dass die damit verbundene 14-3-3 Dissoziation für die ebenfalls zu beobachtende Re-Assoziation an die Plasmamembran verantwortlich zu sein scheint (*Abbildung 4.14 B*).

5.4. Neuartiges Modell zur phototropen Reaktivität von NPH3

Die bis zum Jahr 2019 erstellten Modelle hinsichtlich Korrelation von Phosphorylierungszustand, subzellulärer Lokalisation und phototroper Reaktivität von NPH3 wurden im vorangehenden Kapitel bereits vorgestellt. Eine der Kernaussagen - die *phot1*-abhängige Dephosphorylierung bewirkt die Dissoziation von NPH3 von der Plasmamembran (PM) – konnte durch unsere Analysen zur subzellulären Lokalisation und zum Phosphorylierungszustand von NPH3-S744A (*Abbildung 4.5 B*, *Abbildung 4.15*) bereits widerlegt werden. Die Unterbindung der *phot1*-abhängigen Phosphorylierung von S744 verhindert die Interaktion mit 14-3-3 Proteinen (*Abbildung 4.1*) und die Dissoziation von der Plasmamembran (*Abbildung 4.5*). Demzufolge ist die *phot1*-induzierte und phosphorylierungsabhängige (S744) 14-3-3-Assoziation an NPH3 für die PM-Dissoziation von entscheidender Bedeutung (Reuter *et al.*, 2021). Die zweite Kernaussage besagter Modelle ist, dass die Plasmamembran-ständige Form von NPH3, die sich durch eine *phot1*-unabhängige Phosphorylierung auszeichnet, die Aktivität im Hinblick auf die phototrope Reaktivität vermittelt. Bei NPH3-S744A handelt es sich um eine konstitutiv Plasmamembran-lokalisierende Version, die jedoch – entgegen der Modelle - den Phänotyp der *nph3-loss-of-*

5. Diskussion

function-Mutante nur partiell komplementiert (Abbildung 4.4). Mittels CoIP konnte ausgeschlossen werden, dass die signifikant reduzierte Aktivität von NPH3-S744A auf eine reduzierte Interaktion mit phot1 zurückzuführen ist (Abbildung 4.13 D).

Um die Bedeutung der subzellulären Lokalisierung für die Funktionalität von NPH3 im Detail zu untersuchen, wurden weitere Varianten von NPH3 in *nph3-7* exprimiert und ihre subzelluläre Lokalisation sowie ihr Phosphorylierungszustand in etiolierten, BL-behandelten oder in Dunkelheit retransferierten Keimlingen analysiert. Parallel dazu erfolgte die Ermittlung ihrer phototropen Reaktivität. Hierbei entpuppte sich die Version GFP:NPH3-4K/A als konstitutiv Kondensat-bildende NPH3-Variante, während GFP:NPH3 Δ C28 sowohl in Dunkelheit als auch in Blaulicht konstitutiv an der Plasmamembran lokalisiert (Abbildung 4.12 A, B). Einzig die Version GFP:NPH3 Δ N54 lokalisierte ähnlich wie GFP:NPH3 in Dunkelheit an der PM und bildete im Blaulicht Kondensate im Cytosol (Abbildung 4.12 C).

Die konstitutiv Kondensat-ausbildende Variante GFP:NPH3-4K/A zeigte zudem bereits in Dunkelheit die phot1-abhängige und durch eine erhöhte elektrophoretische Mobilität detektierbare Dephosphorylierung (Abbildung 4.15), welche jener von GFP:NPH3 nach Blaulicht-Belichtung entspricht. Der Hinweis, dass die Dephosphorylierung des Proteins auf die Kondensatbildung zurück zu führen sein könnte, konnte jedoch ausgeschlossen werden (Reuter *et al.*, 2021). Stattdessen erweist sich die Theorie der Blaulicht-abhängigen Phosphorylierung der 14-3-3-Bindestelle S744 an der PM als attraktiv, da sich auch die Kondensate aus GFP:NPH3-4K/A zum Teil in räumlicher Nähe zur Plasmamembran lokalisieren. Die phot1-bedingte Phosphorylierung von NPH3 findet jedoch ausschließlich an der Plasmamembran statt, da beide konstitutiv an der Plasmamembran lokalisierenden Varianten GFP:NPH3-S744A und GFP:NPH3 Δ C28 auch im Blaulicht in stärker phosphorylierter Form vorliegen. Dies bestätigt sich auch in der Phosphorylierung der Variante GFP:NPH3 Δ N54 in Dunkelheit, welche im Blaulicht eine erhöhte elektrophoretische Mobilität aufweist und an der 14-3-3-Bindestelle S744 phosphoryliert vorliegt.

Deutlich zeigt sich hier auch, dass weder die konstitutiv Kondensate ausbildende Version GFP:NPH3-4K/A noch die beiden konstitutiv an die Plasmamembran lokalisierenden Varianten GFP:NPH3-S744A und GFP:NPH3 Δ C28 dazu fähig sind, den Phänotypen von *nph3-7* zu komplementieren (Abbildung 4.4, Abbildung 4.13). Alleine die Fusionsproteine GFP:NPH3 sowie GFP:NPH3 Δ N54 retten den Phänotypen von *nph3-7*. Diese zeichnen sich durch die (Blau)Licht-vermittelte dynamische Veränderung ihrer subzellulären Lokalisation zwischen Plasmamembran und Cytosol aus.

Das Modell von 2019 wurde somit wiederlegt (Abbildung 5.1). Verbleibt NPH3 durch Veränderung oder Entfernung der 14-3-3-Bindestelle an der Plasmamembran, so erfolgt keine phototrope Reaktion des Keimlings auf unilateral einfallendes Blaulicht. Durch die

5. Diskussion

Veränderung der amphipathischen Helix und der damit einhergehenden konstitutiven Kondensatbildung ist der Keimling ebenfalls nicht zu einer phototropen Antwort fähig. Folglich ermöglichen nur jene NPH3-Varianten eine phototrope Reaktion, welche zwischen Plasmamembran und Cytosol zirkulieren.

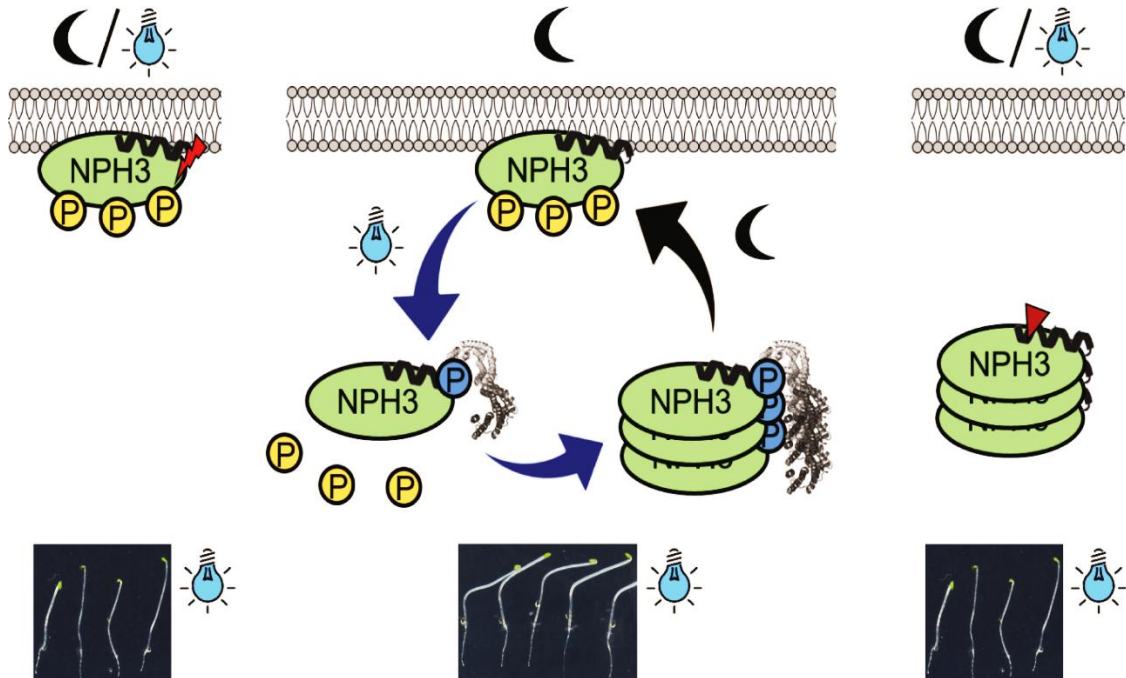


Abbildung 5.1: Zyklus-Modell von NPH3

Keimlinge mit konstitutiv an der Plasmamembran lokalisierendem ebenso wie konstitutiv cytosolische Kondensate ausbildendem NPH3 sind nicht zu einer phototropen Reaktion fähig (rechts außen und links außen); nur durch Dissoziation von der Plasmamembran durch Assoziation von 14-3-3 und die Möglichkeit, wieder an die Plasmamembran zu relokalisieren, bleibt NPH3 funktional und die phototrope Antwort im Keimling erhalten

Bemerkenswerterweise zeigen jene stabilen transgenen *nph3-7*-Linien mit konstitutiv an der Plasmamembran lokalisierenden Versionen von NPH3 (GFP:NPH3-S744A und GFP:NPH3ΔC28) eine schwache phototrope Reaktion, obwohl beide NPH3-Varianten nicht mit 14-3-3 interagieren können (Abbildung 4.4 C, Abbildung 4.13 B). Diese phototrope Restfunktionalität könnte auf das Zusammenwirken der konstitutiv Plasmamembran-lokalisierenden NPH3-Varianten mit weiteren Mitgliedern der NRL-Familie zurückzuführen sein. Tatsächlich wird die Expression von RPT2 durch Blaulicht induziert und stabilisiert (Kimura *et al.*, 2020), des Weiteren spielt RPT2 in der phototropen Reaktion eine wichtige Rolle (Haga *et al.*, 2015). Sowohl RPT2 als auch DOT3 (DEFECTIVELY ORGANIZED TRIBUTARIES 3), welches ebenfalls zur NRL-Familie gehört, sowie MAB4/ENP interagieren im Y2H mit 14-3-3 (Reuter *et al.*, 2021). Durch den jeweiligen Austausch der drittletzten Aminosäure in RPT2, DOT3 und MAB4/ENP interagieren diese im Y2H nicht mehr mit 14-3-3, was darauf hindeutet, dass die Phosphorylierungs-abhängige Interaktion mit 14-3-3 nicht nur auf NPH3 beschränkt ist, sondern einen verbreiteten Mechanismus innerhalb der NRL-Familie darstellt. Eine weitere Erklärung für die marginale phototrope Reaktion transgener *nph3-7*-Keimlinge, welche

5. Diskussion

GFP:NPH3-S744A exprimieren, wäre eine Reorganisation des Proteins an der Plasmamembran, welche durch Blaulicht induziert wird und somit zumindest eine marginale phototrope Antwort ermöglicht.

Die zyklische Bewegung zwischen Plasmamembran und Cytosol findet sich nicht nur bei NPH3, sondern auch bei dem *upstream* agierenden Photorezeptor phot1. Einst bestand die Hypothese, dass die Licht-induzierte Internalisierung des Photorezeptors mit der durch Licht beeinflussten Relokalisierung von Auxintransportern in Verbindung steht (Sakamoto und Briggs, 2002). Spätere Studien mit an der Plasmamembran immobilisiertem phot1 zeigten jedoch, dass die Funktionalität des Photorezeptors nicht durch die permanente Lokalisation an die Plasmamembran beeinflusst wurde (Preuten *et al.*, 2015). Die dynamische Veränderung der subzellulären Lokalisation beeinflusst somit nicht die Funktionalität von phot1, scheint jedoch für die Funktion von NPH3 in der phototropen Antwort essentiell zu sein. Die Dissoziation von NPH3 von der Plasmamembran, welche durch Licht und die Assoziation von 14-3-3 induziert wird, könnte zudem die Polarität von PIN-Proteinen in Abhängigkeit von Blaulicht beeinflussen. Zum einen beeinflussen 14-3-3-Proteine die subzelluläre polare Lokalisation von PIN-Auxin-Efflux-Carriern und somit auch den gerichteten Auxin-Transport (Keicher *et al.*, 2017). Zum anderen lieferten Coexpressionsstudien von Fluorophor-getaggen PIN- und NPH3-Proteinen erste Hinweise darauf, dass deren Lokalisation in getrennten Domänen der Plasmamembran erfolgte (Dittiger, 2021). MEL-Proteine (MAB4/ENP-like), welche ebenfalls der Familie der NRL-Proteine angehören, zeigten wiederum eine polare Lokalisation entlang der Plasmamembran, welche fast identisch zu jener der PIN-Proteine war (Furutani *et al.*, 2011; Furutani *et al.*, 2014). Zudem wird die subzelluläre Polarität der PIN-Proteine aufrechterhalten, indem deren laterale Diffusion durch MEL-Proteine limitiert wird (Glanc *et al.*, 2021). Eine Hypothese wäre, dass NRL-Proteine in die Dynamik der subzellulären Polarität oder die Aufrechterhaltung dieser von PIN-Auxin-Carriern involviert sind und somit die Verteilung von Auxin reguliert wird. Da einige NRL-Proteine mit 14-3-3 interagieren, könnte die phosphorylierungsabhängige Assoziation von 14-3-3 eine essentielle Rolle in der Regulation der Polarität von PIN-Proteinen spielen.

5.5. Blaulicht-induzierte Modifikationen von *in vivo*-Phosphorylierungsstellen in NPH3

Bislang ist man davon ausgegangen, dass NPH3 durch Aktivierung von phot1 in etiolierten Keimlingen dephosphoryliert wird (Pedmale und Liscum, 2007; Tsuchida-Mayama *et al.*, 2008; Kimura *et al.*, 2020). Aktuelle Arbeiten konnten jedoch deutlich machen, dass Blaulicht zudem zu einer Phosphorylierung der Bindestelle für 14-3-3-Proteine (S744) in NPH3 führt (*Abbildung 4.15*; Reuter *et al.*, 2021; Sullivan *et al.*, 2021).

5. Diskussion

Um ein umfassendes Bild über *in vivo* NPH3-Phosphorylierungsstellen und ihre Modifikation durch das Lichtregime zu erhalten, wurden zunächst publizierte Daten – vornehmlich aus proteomweiten Analysen zur Identifizierung von *in vivo* Phosphorylierungsstellen – gesichtet (*Abbildung 4.16*). Diese waren im Allgemeinen mit Licht-gewachsenen *Arabidopsis thaliana* in unterschiedlichen Entwicklungsphasen durchgeführt worden und liefern somit einen vorläufigen Überblick über Aminosäuren, die offensichtlich im Licht phosphoryliert vorliegen. Hinzu kamen Phosphorylierungsstellen, die in einer Studie unter Verwendung etiolierter Keimlinge identifiziert worden waren (Kimura *et al.*, 2021). Parallel zu diesen Literaturrecherchen wurden *in vivo* Phosphorylierungsstellen mittels Immunopräzipitation von GFP:NPH3 und anschließenden MS-Analysen identifiziert. Die etiolierten transgenen Keimlinge verblieben dazu entweder in Dunkelheit oder wurden für 30 Minuten Blaulicht-behandelt. Bei zwei der insgesamt fünf durchgeführten IP-MS-Experimente erfolgte eine differentielle Markierung, um Veränderungen der Phosphorylierungsstärke quantitativ detektieren zu können. Im Summe konnten so zahlreiche der bereits bekannten phosphorylierten Aminosäuren verifiziert und erste Hinweise auf eine differentielle Phosphorylierung in Abhängigkeit von Blaulicht erhalten werden (*Abbildung 4.17*). Es ergibt sich eine deutliche Einteilung der Positionen in drei Cluster, die jeweils IDR's entsprechen (*Abbildung 4.18*).

Sieben dieser Phosphorylierungspositionen wurden in etiolierten Keimlingen identifiziert und mittels IP-MS detektiert (Kimura *et al.*, 2021). Anschließend erfolgte der Austausch dieser Phosphorylierungspositionen entweder zu Alanin oder zu Glutamat. Die jeweiligen Austausche zeigten jedoch keinerlei Einfluss auf die Plasmamembran-Lokalisation von NPH3 in Dunkelheit. Auch bei den Untersuchungen bezüglich der Blaulicht-induzierten Dissoziation des Proteins von der Plasmamembran zeigten die Austausche der Phosphorylierungsstellen keinerlei Auswirkungen. Dies bestätigt indirekt, dass die Dephosphorylierung offensichtlich nicht für die Dissoziation des Proteins NPH3 von der Plasmamembran verantwortlich ist (Reuter *et al.*, 2021). Sechs dieser sieben Positionen konnten auch im Rahmen dieser Arbeit als phosphoryliert identifiziert werden (*Abbildung 4.17*). Die Positionen S223 und S237 werden auf der Grundlage der differentiellen Analyse im Blaulicht dephosphoryliert (*Abbildung 4.17*). Ein komplett anderes Szenario scheint jedoch im Hinblick auf die Positionen S213 und S723 vorzuliegen. S213 tauchte in vier von fünf Messungen auf, wobei die Intensitäten in den Blaulichtproben stets höher waren als jene der Dunkelproben (*Abbildung 4.17*). Dies verweist auf eine Blaulicht-induzierte Phosphorylierung der Aminosäuren S213 sowie S723. Allerdings haben die Einzelaustausche der Serine an den Positionen 213, 223, 237 und 723 gegen Aspartat (S213D, S223D, S237D, S723D) beziehungsweise gegen Alanin (S723A) keinen Effekt auf die Lokalisation von NPH3 an die Plasmamembran in Dunkelheit beziehungsweise dessen Dissoziation und Ausbildung cytosolischer Kondensate im Blaulicht (*Abbildung 4.19*).

5. Diskussion

RFP:NPH3-Varianten mit den einzelnen Serin-Substitutionen gegen Aspartat im ersten Cluster (S213D, S223D, S237D) weisen zudem in Blaulicht-belichteten Blättern von *N. benthamiana* eine höhere elektrophoretische Mobilität auf als jene aus in Dunkelheit inkubierten Blättern, was auf eine Dephosphorylierung des Proteins durch Blaulicht hindeutet, vergleichbar mit jener von RFP:NPH3 aus gleich behandelten Blättern (*Abbildung 4.20*). Die Substitution von S723 gegen Alanin (S723A) und auch gegen Aspartat (S723D) zeigte ebenfalls eine höhere elektrophoretische Mobilität in den Blaulicht-behandelten Proben im Vergleich zu jenen der Dunkelproben, sodass auch diese Position die Blaulicht-induzierte Dephosphorylierung des Proteins nicht beeinträchtigt.

Zudem wurden aus jedem der Phosphorylierungscluster zwei bis drei Serine ausgewählt und entweder deren Phosphorylierung durch Aspartat mimikriert oder durch Alanin unterbunden (*Abbildung 4.19*). Auch hier wurden vorläufige Untersuchungen zur Lokalisation und Phosphorylierungsstatus durchgeführt, wobei weder die Substitutionen der Serine gegen Aspartat (S2D, S722D) noch gegen Alanin (S2A, S722A) Auswirkungen auf die Plasmamembranlokalisierung von NPH3 in Dunkelheit beziehungsweise dessen Dissoziation im Blaulicht hatten. Lediglich der Austausch S2D zeigte auch nach längerer Blaulichtbelichtung von 40 Minuten keine Ausbildung cytosolischer Kondensate, allerdings sind dies nur vorläufige Ergebnisse. Die Austausche der Serine in diesen Positionen (S2A, S2D, S722A, S722D) zeigten in den Blaulichtproben eine erhöhte elektrophoretische Mobilität verglichen mit jenen aus den Dunkelproben. Dies zeigt, dass diese Phosphorylierungspositionen keinen Einfluss auf die Blaulicht-induzierte Dephosphorylierung von NPH3 haben, allerdings zeigte die Variante RFP:NPH3-S2D bereits in den Dunkelproben eine geringere elektrophoretische Mobilität als RFP:NPH3. Dies könnte auf die Substitutionen selbst zurück zu führen sein, da die Austausche der zwei Serine gegen Aspartat Phosphorylierung mimikrieren und somit die elektrophoretische Mobilität verringern.

Für die simultanen Austausche der Serine an den Positionen 213, 223 und 237 zu Alanin konnte bereits gezeigt werden, dass eine erhöhte elektrophoretische Mobilität von NPH3 – entsprechend einem Licht-induzierten dephosphorylierten Zustand – in Dunkelheit zu beobachten ist. Dies lässt vermuten, dass die Licht-induzierte Dephosphorylierung dieser Reste maßgeblich zur Veränderung der Mobilität beiträgt (Tsuchida-Mayama *et al.*, 2008). Dies konnte durch Untersuchung einer Mehrfach-Aspartat-Substitution (S213, S223, S237, S469, S474: S5D, *Abbildung 4.20*) untermauert werden, da die elektrophoretische Mobilität von NPH3 sowohl aus belichteten als auch aus den Dunkelproben stets der phot1-unabhängig phosphorylierten Form von NPH3 aus etiolierten Keimlingen entsprach (RFP:S5D, *Abbildung 4.20 B Mitte*). Da an RFP:NPH3-S5D in den Blaulichtproben der Phosphorylierungsantikörper pS744 detektiert werden kann, hat die fehlende Dephosphorylierung – welche anhand einer

5. Diskussion

erhöhten elektrophoretischen Mobilität in den Blaulichtproben detektiert werden kann – keinen Einfluss auf die 14-3-3-Assoziation und die Lokalisation in cytosolischen Kondensaten. Die Austausch der Aminosäuren S213, S223 und S237 gegen Alanin und ebenso die Deletion des Bereiches, welcher diese Positionen enthält, beeinflusste in transgenen Keimlingen nicht deren Fähigkeit zur phototropen Reaktion (Tsuchida-Mayama *et al.*, 2008).

Die oben erwähnten NPH3-Mutanten, bei denen die in etiolierten Keimlingen vorliegenden Phosphorylierungsstellen simultan gegen Alanin (SA) oder Glutamat (SE) ausgetauscht wurden, wurden auch hinsichtlich ihrer phototropen Reaktivität analysiert (Kimura *et al.*, 2021). Die Substitution zu Glutamat verzögert die phototrope Reaktion der Keimlinge leicht bei einer sehr schwachen Blaulicht-Intensität ($1,7 \times 10^{-3} \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$), bei höheren Intensitäten ($1,7 \times 10^{-1} \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$) war die phototrope Reaktion jedoch signifikant reduziert im Vergleich zum Wildtyp. Die Phänotypen von YFP:NPH3 im *rpt2-loss-of-function*-Hintergrund sowie von YFP:NPH3-SE in *nph3-7* wiesen bei $0,17 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ vergleichbare, wenngleich auch wesentlich geringere phototrope Reaktionen auf als YFP:NPH3 in *nph3-7*. Zudem weisen sowohl YFP:NPH3 im *rpt2 nph3*-Hintergrund als auch YFP:NPH3-SE im *nph3*-Hintergrund eine höhere Anzahl an Kondensaten nach längerer Blaulicht-Bestrahlung (1 bis 2 Stunden) auf als YFP:NPH3 im *nph3*-Hintergrund. In diesen Linien erfolgt der Retransfer von NPH3 zurück an die Plasmamembran auch nach längerer Blaulicht-Belichtung nicht in dem Maße wie im Wildtyp, sodass der mangelnde Retransfer für die reduzierte phototrope Reaktion verantwortlich zu sein scheint. Somit ist nicht nur die Dissoziation von NPH3 von der Plasmamembran essentiell für die phototrope Reaktion, sondern auch die Reassoziierung des Proteins an die Plasmamembran scheint von Bedeutung für den Phototropismus zu sein.

Keine der im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Substitutionen hatte einen Einfluss auf die Lokalisation von NPH3 in etiolierten Keimlingen, da sich ausnahmslos alle Varianten in den Dunkelproben an der Plasmamembran befanden. Nach Blaulicht-Applikation dissoziierten alle Varianten von der Plasmamembran und diffundierten in das Cytoplasma, wo diese bis auf die Variante RFP:S2D cytosolische Kondensate ausbildeten, ähnlich wie RFP:NPH3. Keine der Phosphorylierungspositionen hat demnach eine Auswirkung auf die Ausbildung der amphipathischen Helix, da bei jeder NPH3-Variante die Assoziation an die Plasmamembran gewährleistet ist. Da auch die 14-3-3-Bindeposition in keiner der Substitutionen verändert wurde, kann diese weiterhin phosphoryliert werden und die Assoziation von 14-3-3 ermöglichen, sodass alle NPH3-Varianten im Blaulicht von der Membran dissoziieren. Dies bestätigt bereits veröffentlichte Ergebnisse, in welchen die sieben Phosphorylierungsstellen S7, S213, S223, S237, S467, S474 und S722 weder für die Assoziation von NPH3 an die Plasmamembran in Dunkelheit noch an die Dissoziation des Proteins von der Plasmamembran im Blaulicht bedeutsam sind (Kimura *et al.*, 2021).

5. Diskussion

Von 12 bisher identifizierten Phosphorylierungspositionen scheinen nur zwei dieser Positionen im Blaulicht dephosphoryliert zu werden. Vier weitere Positionen scheinen jedoch Blaulicht-abhängig phosphoryliert zu werden, sodass dies dem Dogma der Licht-induzierten Dephosphorylierung von NPH3 widerspricht.

Bezüglich der identifizierten Phosphorylierungspositionen aus den transgenen Linien lassen sich jedoch nur vorläufige Resultate ablesen. Zum einen sollte die Coimmunopräzipitation mit darauffolgendem Labeling mindestens dreimal wiederholt werden, um die Ausbeute an präzipitiertem Protein und somit möglichst vielen identifizierten Phosphorylierungspositionen zu erhöhen und somit einen möglichst vollständigen Überblick über Blaulicht-regulierte Phosphorylierungspositionen zu erhalten. Des Weiteren böte die Präzipitation von konstitutiv Membran-lokalisierendem (GFP:NPH3-S744A) und konstitutiv Kondensat-ausbildendem Protein (GFP:NPH3-4K/A) Aufschluss über mögliche Veränderungen zwischen der dephosphorylierten und der stärker phosphorylierten NPH3-Variante und gibt somit Hinweise auf Phosphorylierungsunterschiede von NPH3 in Dunkelheit und in Blaulicht.

Ferner sollten NPH3-Varianten erstellt werden, welche entweder die dephosphorylierte oder die phosphorylierte Form des Proteins mimikrieren, wobei sich hierbei die Austausch der Positionen gegen Alanin oder gegen Aspartat auf die Ergebnisse der durchzuführenden Immunopräzipitationen beziehen. Diese werden zunächst in transient transformierten Blättern von *N. benthamiana* exprimiert, um die Auswirkungen der Phosphosite-Austausche auf die subzelluläre Lokalisation beziehungsweise die elektrophoretische Mobilität der Proteine sowie die Blaulicht-induzierte Phosphorylierbarkeit der 14-3-3-Bindestelle (S744) zu ermitteln. Die anschließende Generierung transgener Linien im *nph3-7*-Hintergrund gibt sodann Aufschluss über die Fähigkeit zur phototropen Reaktion.

5. Diskussion

6. Zusammenfassung

Das Überleben einer Pflanze als sessiles Lebenwesen hängt von ihrer Anpassungsfähigkeit an lokale Standortbedingungen ab. Zur Optimierung der Photosynthese-Effizienz sind Pflanzen bereits im frühen Keimlingsstadium zur phototropen Reaktion fähig. Diese resultiert in einer Krümmung des Hypokotyls in Richtung des einfallenden Lichtes und wird durch die Ausbildung eines lateralen Auxin-Gradienten verursacht. Das Plasmamembran-assoziierte Protein NPH3 (NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTYL 3) ist – wie der *upstream* agierende Blaulichtrezeptor Phototropin 1 (*phot1*) – essentiell für die phototrope Reaktion.

Der molekulare Mechanismus der Membran-Rekrutierung des hydrophilen NPH3-Proteins war lange Zeit ungeklärt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte auf der Grundlage von Protein-Lipid *overlays* und Liposomen-Bindetests gezeigt werden, dass die C-terminalen 51 Aminosäuren von NPH3 direkt an polyacide Phospholipide binden. In dieser Region wurden zwei Motive identifiziert, die zahlreiche basische Aminosäuren aufweisen. Nachfolgende Analysen von zielgerichteten NPH3-Mutanten machten deutlich, dass sowohl elektrostatische als auch hydrophobe Interaktionen einer amphipathischen Helix die Assoziation von NPH3 an die Plasmamembran bedingen.

NPH3 wurde als putativer Interaktionspartner von sogenannten 14-3-3-Proteinen identifiziert. Letztere interagieren sequenzspezifisch und phosphorylierungsabhängig mit einer Vielzahl von Polypeptiden und modulieren deren Aktivitätsstatus. Pflanzliche 14-3-3 tragen zur polaren Lokalisierung von Auxin-Efflux-Carriern – sogenannten PIN-Proteinen – bei und könnten demnach durch Regulation von NPH3 für den veränderten Transport von Auxin während der phototropen Reaktion verantwortlich sein. Im Rahmen dieser Arbeit konnte sowohl die NPH3:14-3-3-Komplexbildung als auch das NPH3-Bindemotiv (S744) mittels Co-Immunopräzipitation verifiziert werden. Transgene *nph3-loss-of-function*-Linien, die GFP:NPH3 beziehungsweise GFP:NPH3-S744A exprimieren, wurden etabliert und im Detail analysiert. So konnte auf der Grundlage von MS-gekoppelten Immunopräzipitationen gezeigt werden, dass die NPH3:14-3-3-Interaktion ausschließlich im Blaulicht und nicht in Dunkelheit stattfindet. CLSM machte deutlich, dass die Inhibierung der 14-3-3-Bindungsstelle (GFP:NPH3-S744A) die Plasmamembran-Assoziation in Dunkelheit nicht beeinflusst, jedoch kann – im Gegensatz zu GFP:NPH3 – eine Blaulicht-induzierte Dissoziation von der Membran nicht beobachtet werden. Demzufolge scheint die Licht-induzierte 14-3-3-Bindung eine substantielle Konformationsänderung u. a. der amphipathischen Helix zur Folge zu haben, die eine Einbettung in die Membran unterbindet. Darüber hinaus war die Fähigkeit von GFP:NPH3-S744A, den Hypokotyl-Phototropismus in einer *nph3-loss-of-function*-Mutante wiederherzustellen, signifikant gegenüber GFP:NPH3 reduziert. Dies lieferte einen

6. Zusammenfassung

wesentlichen Hinweis, dass die 14-3-3-vermittelte Plasmamembran-Dissoziation von NPH3 für die phototrope Reaktivität von Bedeutung ist. Bemerkenswerterweise ist dieser Licht-induzierte Prozess in Dunkelheit reversibel. Die detaillierte Analyse von weiteren transgenen *nph3-loss-of-function*-Linien, die GFP:NPH3-Varianten mit entweder konstitutiv Kondensatbildender oder konstitutiver Plasmamembran-Lokalisation exprimieren, ermöglichte die Entwicklung eines neuartigen Modells zur phototropen Reaktivität von NPH3. Demzufolge ist die durch das Lichtregime (Dunkelheit – Blaulicht – Dunkelheit) regulierte Zirkulation von NPH3 (Plasmamembran – Cytosol – Plasmamembran) essentiell für die Funktion.

Die Blaulicht-abhängigen Modifikationen des Phosphorylierungsstatus von NPH3 sind hochkomplex. Einerseits gibt es gemäß der Literatur Aminosäuren, die in Dunkelheit phosphoryliert vorliegen und durch Blaulicht dephosphoryliert werden. Andererseits konnten wir eine Licht-vermittelte Phosphorylierung der 14-3-3-Bindestelle (S744) nachweisen, die – ebenso wie die Modifikation der subzellulären Lokalisation von NPH3 – in Dunkelheit reversibel ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Experimente zur direkten Identifizierung von *in vivo*-Phosphorylierungsstellen in NPH3 und ihre Modifikation durch das Lichtregime durchgeführt. Die statistisch noch nicht signifikanten Ergebnisse verweisen auf eine größere Bedeutung von Licht-induzierten Phosphorylierungen als bisher angenommen. Weitere Experimente sollten es zukünftig ermöglichen, NPH3-Austausch-Varianten zu generieren, deren „mimikrierter“ Phosphorylierungszustand dem in Dunkelheit oder Licht entsprechen. Diese Mutanten sind für die Aufklärung der Funktion dieser komplexen Phosphorylierungsänderungen von Bedeutung.

Summary

As sessile organisms, plants are challenged by diverse environmental cues and their survival depends on the ability to adapt to ever-changing local conditions. Phototropism allows plants to re-orientate their shoot growth towards a directional light source and serves to optimize photosynthetic efficiency. Here, the generation of a lateral auxin gradient characterized by a higher hormone concentration on the shaded side allows for differential growth. The plasma membrane associated NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTYL 3 (NPH3), acting downstream of the blue light receptor PHOTOTROPIN 1 (*phot1*), is a major player in the phototropic response.

The molecular mechanism of membrane association of the hydrophilic NPH3 remained unresolved for more than 20 years. Based on protein-lipid overlays and liposome binding assays we could show that NPH3 directly binds polyacidic phospholipids via its C-terminal domain, required for membrane association *in vivo*. Two motifs enriched in basic amino acids could be identified within this region. Detailed analyses using site-directed NPH3 mutant

6. Zusammenfassung

versions indicated both electrostatic and hydrophobic interactions of an amphipathic helix to determine membrane association.

NPH3 was identified as a putative interaction partner of so called 14-3-3 proteins. The latter are known to interact with a multitude of polypeptides in a sequence-specific and phosphorylation-dependent manner, thereby modulating the activity status of the client. Taking into consideration that plant 14-3-3 proteins are required for pronounced polar distribution of auxin-efflux carriers, 14-3-3 mediated regulation of NPH3 might account for BL-triggered changes in auxin transport. By means of co-immunoprecipitation both the 14-3-3:NPH3 complex formation and the 14-3-3 binding motif of NPH3 (S744) could be verified *in planta*. Therefore, transgenic *nph3 loss-of function* Arabidopsis lines expressing either GFP-NPH3 or GFP-NPH3-S744A were established and analyzed in detail. Immunoprecipitation coupled with MS-based protein identification revealed 14-3-3 to interact with NPH3 in a strict blue light (BL) dependent manner. Intriguingly, mutation of the 14-3-3-binding site does not affect plasma membrane association of NPH3 in darkness but prevents BL-triggered membrane dissociation, suggesting that light-induced binding of 14-3-3

proteins to the presumably phosphorylated residue S744 is required to internalize NPH3 from the plasma membrane into the cytosol. Consequently, light-induced 14-3-3 binding is expected to induce a substantial conformational change that liberates the NPH3 amphipathic helix from the membrane. Furthermore, the capability of GFP-NPH3-S744A to restore the severe impairment of hypocotyl phototropism in the *nph3 loss-of function* was severely affected as compared to GFP-NPH3, suggesting 14-3-3 mediated NPH3 membrane release to be essential for phototropic hypocotyl bending. Given that the BL-triggered processes are reversible in darkness, further transgenic lines expressing NPH3 variants either constitutively localizing to the cytosol or to the plasma membrane were generated and subsequently analyzed. This allowed us to propose a novel model according to which light-regulated and 14-3-3-driven cycling of NPH3 between the plasma membrane and the cytosol critically determine NPH3 function in mediating phototropic signaling in Arabidopsis.

The light-triggered modifications of the phosphorylation pattern of NPH3 are highly complex. On the one hand, several residues of the PM-associated NPH3 seem to be phosphorylated both in darkness and upon re-transfer of irradiated seedlings to darkness. Apart from that, BL-induced and phosphorylation-dependent (S744) 14-3-3 binding seems to be responsible for the release of NPH3 into the cytosol, temporally correlating with a light-triggered dephosphorylation of NPH3. We therefore initiated experiments to directly identify NPH3 *in vivo* phosphorylation sites in darkness and upon BL irradiation. The preliminary results suggest a greater importance of light-induced phosphorylation events than previously anticipated. However, additional analyses are required to provide a statistically significant basis for future work. In this regard, NPH3 versions mirroring the phosphorylation state either in darkness or

6. Zusammenfassung

upon BL will be generated by exchanging the identified residues for non-phosphorylatable or phosphomimicking amino acids, respectively. The detailed analysis should provide evidence for the functional significance of the complex (de)phosphorylation events.

7. Literaturverzeichnis:

Barbosa, I. C., Shikata, H., Zourelidou, M., Heilmann, M., Heilmann, I. and Schwechheimer, C. (2016) 'Phospholipid composition and a polybasic motif determine D6 PROTEIN KINASE polar association with the plasma membrane and tropic responses', *Development*, 143(24), pp. 4687-4700.

Benzinger, A., Popowicz, G. M., Joy, J. K., Majumdar, S., Holak, T. A. and Hermeking, H. (2005) 'The crystal structure of the non-liganded 14-3-3sigma protein: insights into determinants of isoform specific ligand binding and dimerization', *Cell Res*, 15(4), pp. 219-27.

Birnboim, H. C. (1983) 'A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA', *Methods Enzymol*, 100, pp. 243-55.

Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979) 'A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA', *Nucleic Acids Res*, 7(6), pp. 1513-23.

Blakeslee, J. J., Bandyopadhyay, A., Lee, O. R., Mravec, J., Titapiwatanakun, B., Sauer, M., Makam, S. N., Cheng, Y., Bouchard, R., Adamec, J., Geisler, M., Nagashima, A., Sakai, T., Martinoia, E., Friml, J., Peer, W. A. and Murphy, A. S. (2007) 'Interactions among PIN-FORMED and P-glycoprotein auxin transporters in Arabidopsis', *Plant Cell*, 19(1), pp. 131-47.

Blum, H., Beier, H. and Gross, H. J. (1987) 'Improved Silver Staining of Plant-Proteins, Rna and DNA in Polyacrylamide Gels', *Electrophoresis*, 8(2), pp. 93-99.

Börnke, F. (2005) 'The variable C-terminus of 14-3-3 proteins mediates isoform-specific interaction with sucrose-phosphate synthase in the yeast two-hybrid system', *J Plant Physiol*, 162(2), pp. 161-8.

Bouchard, R., Bailly, A., Blakeslee, J. J., Oehring, S. C., Vincenzetti, V., Lee, O. R., Paponov, I., Palme, K., Mancuso, S., Murphy, A. S., Schulz, B. and Geisler, M. (2006) 'Immunophilin-like TWISTED DWARF1 modulates auxin efflux activities of Arabidopsis P-glycoproteins', *J Biol Chem*, 281(41), pp. 30603-12.

Brzeska, H., Guag, J., Remmert, K., Chacko, S. and Korn, E. D. (2010) 'An experimentally based computer search identifies unstructured membrane-binding sites in proteins: application to class I myosins, PAKS, and CARMIL', *J Biol Chem*, 285(8), pp. 5738-47.

Bunsen, R. W. and Roscoe, H. E. (1862) 'On The Measurement of the Chemical Action of Direct and Diffuse Sunlight', *Photochemical Researches*.

Bustos, D. M. and Iglesias, A. A. (2006) 'Intrinsic disorder is a key characteristic in partners that bind 14-3-3 proteins', *Proteins*, 63(1), pp. 35-42.

Chaudhri, M., Scarabel, M. and Aitken, A. (2003) 'Mammalian and yeast 14-3-3 isoforms form distinct patterns of dimers in vivo', *Biochem Biophys Res Commun*, 300(3), pp. 679-85.

Cheng, Y., Qin, G., Dai, X. and Zhao, Y. (2008) 'NPY genes and AGC kinases define two key steps in auxin-mediated organogenesis in Arabidopsis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(52), pp. 21017-22.

Chien, C. T., Bartel, P. L., Sternglanz, R. and Fields, S. (1991) 'The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(21), pp. 9578-82.

7. Literaturverzeichnis

- Cholodny, N. (1927) 'Wuchshormone und Tropismen bei den Pflanzen', *Biol. Zentralbl.*, 47, pp. 604-626.
- Christie, J. M. (2007) 'Phototropin blue-light receptors', *Annu Rev Plant Biol*, 58, pp. 21-45.
- Christie, J. M., Blackwood, L., Petersen, J. and Sullivan, S. (2015) 'Plant flavoprotein photoreceptors', *Plant Cell Physiol*, 56(3), pp. 401-13.
- Christie, J. M. and Murphy, A. S. (2013) 'Shoot phototropism in higher plants: new light through old concepts', *Am J Bot*, 100(1), pp. 35-46.
- Christie, J. M., Reymond, P., Powell, G. K., Bernasconi, P., Raibekas, A. A., Liscum, E. and Briggs, W. R. (1998) 'Arabidopsis NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism', *Science*, 282(5394), pp. 1698-701.
- Christie, J. M., Salomon, M., Nozue, K., Wada, M. and Briggs, W. R. (1999) 'LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(15), pp. 8779-83.
- Christie, J. M., Suetsugu, N., Sullivan, S. and Wada, M. (2018) 'Shining Light on the Function of NPH3/RPT2-Like Proteins in Phototropin Signaling', *Plant Physiol*, 176(2), pp. 1015-1024.
- Christie, J. M., Yang, H., Richter, G. L., Sullivan, S., Thomson, C. E., Lin, J., Titapiwatanakun, B., Ennis, M., Kaiserli, E., Lee, O. R., Adamec, J., Peer, W. A. and Murphy, A. S. (2011) 'phot1 inhibition of ABCB19 primes lateral auxin fluxes in the shoot apex required for phototropism', *PLoS Biol*, 9(6), pp. e1001076.
- Coblitz, B., Shikano, S., Wu, M., Gabelli, S. B., Cockrell, L. M., Spieker, M., Hanyu, Y., Fu, H., Amzel, L. M. and Li, M. (2005) 'C-terminal recognition by 14-3-3 proteins for surface expression of membrane receptors', *J Biol Chem*, 280(43), pp. 36263-72.
- Darwin, C. a. F. (1880) *The Power of Movement in Plants*.
- de Carbonnel, M., Davis, P., Roelfsema, M. R., Inoue, S., Schepens, I., Lariguet, P., Geisler, M., Shimazaki, K., Hangarter, R. and Fankhauser, C. (2010) 'The Arabidopsis PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE2 protein is a phototropin signaling element that regulates leaf flattening and leaf positioning', *Plant Physiol*, 152(3), pp. 1391-405.
- DeLille, J. M., Sehne, P. C. and Ferl, R. J. (2001) 'The arabidopsis 14-3-3 family of signaling regulators', *Plant Physiol*, 126(1), pp. 35-8.
- Demarsy, E., Schepens, I., Okajima, K., Hersch, M., Bergmann, S., Christie, J., Shimazaki, K., Tokutomi, S. and Fankhauser, C. (2012) 'Phytochrome Kinase Substrate 4 is phosphorylated by the phototropin 1 photoreceptor', *EMBO J*, 31(16), pp. 3457-67.
- Dhonukshe, P., Huang, F., Galvan-Ampudia, C. S., Mahonen, A. P., Kleine-Vehn, J., Xu, J., Quint, A., Prasad, K., Friml, J., Scheres, B. and Offringa, R. (2010) 'Plasma membrane-bound AGC3 kinases phosphorylate PIN auxin carriers at TPRXS(N/S) motifs to direct apical PIN recycling', *Development*, 137(19), pp. 3245-55.
- Ding, Z., Galvan-Ampudia, C. S., Demarsy, E., Langowski, L., Kleine-Vehn, J., Fan, Y., Morita, M. T., Tasaka, M., Fankhauser, C., Offringa, R. and Friml, J. (2011) 'Light-mediated polarization of the PIN3 auxin transporter for the phototropic response in Arabidopsis', *Nat Cell Biol*, 13(4), pp. 447-52.

7. Literaturverzeichnis

- Ding, Z., Wang, B., Moreno, I., Duplakova, N., Simon, S., Carraro, N., Reemmer, J., Pencik, A., Chen, X., Tejos, R., Skupa, P., Pollmann, S., Mravec, J., Petrasek, J., Zazimalova, E., Honys, D., Rolcik, J., Murphy, A., Orellana, A., Geisler, M. and Friml, J. (2012) 'ER-localized auxin transporter PIN8 regulates auxin homeostasis and male gametophyte development in Arabidopsis', *Nat Commun*, 3, pp. 941.
- Dittiger, L. (2021) *Establishment of proximity labeling to identify spatially restricted interaction partners of NPH3 in planta*. Master of Science, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Esmon, C. A., Tinsley, A. G., Ljung, K., Sandberg, G., Hearne, L. B. and Liscum, E. (2006) 'A gradient of auxin and auxin-dependent transcription precedes tropic growth responses', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(1), pp. 236-41.
- Fairn, G. D., Ogata, K., Botelho, R. J., Stahl, P. D., Anderson, R. A., De Camilli, P., Meyer, T., Wodak, S. and Grinstein, S. (2009) 'An electrostatic switch displaces phosphatidylinositol phosphate kinases from the membrane during phagocytosis', *J Cell Biol*, 187(5), pp. 701-14.
- Fankhauser, C. and Christie, J. M. (2015) 'Plant phototropic growth', *Curr Biol*, 25(9), pp. R384-9.
- Feraru, E., Feraru, M. I., Asaoka, R., Paciorek, T., De Rycke, R., Tanaka, H., Nakano, A. and Friml, J. (2012) 'BEX5/RabA1b regulates trans-Golgi network-to-plasma membrane protein trafficking in Arabidopsis', *Plant Cell*, 24(7), pp. 3074-86.
- Ferl, R. J. (1996) '14-3-3 Proteins and Signal Transduction', *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 47, pp. 49-73.
- Freddolino, P. L., Gardner, K. H. and Schulten, K. (2013) 'Signaling mechanisms of LOV domains: new insights from molecular dynamics studies', *Photochem Photobiol Sci*, 12(7), pp. 1158-70.
- Friml, J., Benkova, E., Blilou, I., Wisniewska, J., Hamann, T., Ljung, K., Woody, S., Sandberg, G., Scheres, B., Jurgens, G. and Palme, K. (2002 b) 'AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in Arabidopsis', *Cell*, 108(5), pp. 661-73.
- Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R. and Jurgens, G. (2003) 'Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis', *Nature*, 426(6963), pp. 147-53.
- Friml, J., Wisniewska, J., Benkova, E., Mendgen, K. and Palme, K. (2002 a) 'Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis', *Nature*, 415(6873), pp. 806-9.
- Fuglsang, A. T., Visconti, S., Drumm, K., Jahn, T., Stensballe, A., Mattei, B., Jensen, O. N., Aducci, P. and Palmgren, M. G. (1999) 'Binding of 14-3-3 protein to the plasma membrane H(+)-ATPase AHA2 involves the three C-terminal residues Tyr(946)-Thr-Val and requires phosphorylation of Thr(947)', *J Biol Chem*, 274(51), pp. 36774-80.
- Furutani, M., Kajiwara, T., Kato, T., Treml, B. S., Stockum, C., Torres-Ruiz, R. A. and Tasaka, M. (2007) 'The gene MACCHI-BOU 4/ENHANCER OF PINOID encodes a NPH3-like protein and reveals similarities between organogenesis and phototropism at the molecular level', *Development*, 134(21), pp. 3849-59.
- Furutani, M., Nakano, Y. and Tasaka, M. (2014) 'MAB4-induced auxin sink generates local auxin gradients in Arabidopsis organ formation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(3), pp. 1198-203.

7. Literaturverzeichnis

- Furutani, M., Sakamoto, N., Yoshida, S., Kajiwara, T., Robert, H. S., Friml, J. and Tasaka, M. (2011) 'Polar-localized NPH3-like proteins regulate polarity and endocytosis of PIN-FORMED auxin efflux carriers', *Development*, 138(10), pp. 2069-78.
- Gallagher, S., Short, T. W., Ray, P. M., Pratt, L. H. and Briggs, W. R. (1988) 'Light-mediated changes in two proteins found associated with plasma membrane fractions from pea stem sections', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(21), pp. 8003-7.
- Galvan-Ampudia, C. S. and Offringa, R. (2007) 'Plant evolution: AGC kinases tell the auxin tale', *Trends Plant Sci*, 12(12), pp. 541-7.
- Galweiler, L., Guan, C., Muller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A. and Palme, K. (1998) 'Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue', *Science*, 282(5397), pp. 2226-30.
- Ganguly, A., Park, M., Kesawat, M. S. and Cho, H. T. (2014) 'Functional Analysis of the Hydrophilic Loop in Intracellular Trafficking of Arabidopsis PIN-FORMED Proteins', *Plant Cell*, 26(4), pp. 1570-1585.
- Ganguly, A., Sasayama, D. and Cho, H. T. (2012) 'Regulation of the polarity of protein trafficking by phosphorylation', *Mol Cells*, 33(5), pp. 423-30.
- Ganguly, S., Weller, J. L., Ho, A., Chemineau, P., Malpoux, B. and Klein, D. C. (2005) 'Melatonin synthesis: 14-3-3-dependent activation and inhibition of arylalkylamine N-acetyltransferase mediated by phosphoserine-205', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(4), pp. 1222-7.
- Gao, J., van Kleeff, P. J., Oecking, C., Li, K. W., Erban, A., Kopka, J., Hinch, D. K. and de Boer, A. H. (2014) 'Light modulated activity of root alkaline/neutral invertase involves the interaction with 14-3-3 proteins', *Plant J*, 80(5), pp. 785-96.
- Geisler, M., Blakeslee, J. J., Bouchard, R., Lee, O. R., Vincenzetti, V., Bandyopadhyay, A., Titapiwatanakun, B., Peer, W. A., Bailly, A., Richards, E. L., Ejendal, K. F., Smith, A. P., Baroux, C., Grossniklaus, U., Muller, A., Hrycyna, C. A., Dudler, R., Murphy, A. S. and Martinoia, E. (2005) 'Cellular efflux of auxin catalyzed by the Arabidopsis MDR/PGP transporter AtPGP1', *Plant J*, 44(2), pp. 179-94.
- Glanc, M., Van Gelderen, K., Hoermayer, L., Tan, S., Naramoto, S., Zhang, X., Domjan, D., Vcelarova, L., Hauschild, R., Johnson, A., de Koning, E., van Dop, M., Rademacher, E., Janson, S., Wei, X., Molnar, G., Fendrych, M., De Rybel, B., Offringa, R. and Friml, J. (2021) 'AGC kinases and MAB4/MEL proteins maintain PIN polarity by limiting lateral diffusion in plant cells', *Curr Biol*, 31(9), pp. 1918-1930 e5.
- Grefen, C., Donald, N., Hashimoto, K., Kudla, J., Schumacher, K. and Blatt, M. R. (2010) 'A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies', *Plant J*, 64(2), pp. 355-65.
- Gronnier, J., Crowet, J. M., Habenstein, B., Nasir, M. N., Bayle, V., Hosy, E., Platre, M. P., Gouguet, P., Raffaele, S., Martinez, D., Grelard, A., Loquet, A., Simon-Plas, F., Gerbeau-Pissot, P., Der, C., Bayer, E. M., Jaillais, Y., Deleu, M., Germain, V., Lins, L. and Mongrand, S. (2017) 'Structural basis for plant plasma membrane protein dynamics and organization into functional nanodomains', *Elife*, 6.
- Grunewald, W. and Friml, J. (2010) 'The march of the PINs: developmental plasticity by dynamic polar targeting in plant cells', *EMBO J*, 29(16), pp. 2700-14.

7. Literaturverzeichnis

- Haga, K. and Sakai, T. (2012) 'PIN auxin efflux carriers are necessary for pulse-induced but not continuous light-induced phototropism in Arabidopsis', *Plant Physiol*, 160(2), pp. 763-76.
- Haga, K., Takano, M., Neumann, R. and Iino, M. (2005) 'The Rice COLEOPTILE PHOTOTROPISM1 gene encoding an ortholog of Arabidopsis NPH3 is required for phototropism of coleoptiles and lateral translocation of auxin', *Plant Cell*, 17(1), pp. 103-15.
- Haga, K., Tsuchida-Mayama, T., Yamada, M. and Sakai, T. (2015) 'Arabidopsis ROOT PHOTOTROPISM2 Contributes to the Adaptation to High-Intensity Light in Phototropic Responses', *Plant Cell*, 27(4), pp. 1098-112.
- Hammond, G. R. and Balla, T. (2015) 'Polyphosphoinositide binding domains: Key to inositol lipid biology', *Biochim Biophys Acta*, 1851(6), pp. 746-58.
- Hart, J. E., Sullivan, S., Hermanowicz, P., Petersen, J., Diaz-Ramos, L. A., Hoey, D. J., Labuz, J. and Christie, J. M. (2019) 'Engineering the phototropin photocycle improves photoreceptor performance and plant biomass production', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(25), pp. 12550-12557.
- Hayashi, Y., Nakamura, S., Takemiya, A., Takahashi, Y., Shimazaki, K. and Kinoshita, T. (2010) 'Biochemical Characterization of In Vitro Phosphorylation and Dephosphorylation of the Plasma Membrane H⁺-ATPase', *Plant and Cell Physiology*, 51(7), pp. 1186-1196.
- Hecker, A., Wallmeroth, N., Peter, S., Blatt, M. R., Harter, K. and Grefen, C. (2015) 'Binary 2in1 Vectors Improve in Planta (Co)localization and Dynamic Protein Interaction Studies', *Plant Physiol*, 168(3), pp. 776-87.
- Heilmann, I. (2016) 'Phosphoinositide signaling in plant development', *Development*, 143(12), pp. 2044-55.
- Hiyama, A., Takemiya, A., Munemasa, S., Okuma, E., Sugiyama, N., Tada, Y., Murata, Y. and Shimazaki, K. I. (2017) 'Blue light and CO₂ signals converge to regulate light-induced stomatal opening', *Nat Commun*, 8(1), pp. 1284.
- Holland, J. J., Roberts, D. and Liscum, E. (2009) 'Understanding phototropism: from Darwin to today', *J Exp Bot*, 60(7), pp. 1969-78.
- Huala, E., Oeller, P. W., Liscum, E., Han, I. S., Larsen, E. and Briggs, W. R. (1997) 'Arabidopsis NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain', *Science*, 278(5346), pp. 2120-3.
- Huang, F., Zago, M. K., Abas, L., van Marion, A., Galvan-Ampudia, C. S. and Offringa, R. (2010) 'Phosphorylation of conserved PIN motifs directs Arabidopsis PIN1 polarity and auxin transport', *Plant Cell*, 22(4), pp. 1129-42.
- Huang, X., Zhang, Q., Jiang, Y., Yang, C., Wang, Q. and Li, L. (2018) 'Shade-induced nuclear localization of PIF7 is regulated by phosphorylation and 14-3-3 proteins in Arabidopsis', *Elife*, 7.
- Iakoucheva, L. M., Radivojac, P., Brown, C. J., O'Connor, T. R., Sikes, J. G., Obradovic, Z. and Dunker, A. K. (2004) 'The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation', *Nucleic Acids Res*, 32(3), pp. 1037-49.
- Ichimura, T., Isobe, T., Okuyama, T., Yamauchi, T. and Fujisawa, H. (1987) 'Brain 14-3-3 protein is an activator protein that activates tryptophan 5-monooxygenase and tyrosine 3-

7. Literaturverzeichnis

monoxygenase in the presence of Ca²⁺, calmodulin-dependent protein kinase II', *FEBS Lett*, 219(1), pp. 79-82.

Inada, S., Ohgishi, M., Mayama, T., Okada, K. and Sakai, T. (2004) 'RPT2 is a signal transducer involved in phototropic response and stomatal opening by association with phototropin 1 in *Arabidopsis thaliana*', *Plant Cell*, 16(4), pp. 887-96.

Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990) 'High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids', *Gene*, 96(1), pp. 23-8.

Inoue, S., Kinoshita, T., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Doi, M. and Shimazaki, K. (2008 a) 'Blue light-induced autophosphorylation of phototropin is a primary step for signaling', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(14), pp. 5626-5631.

Inoue, S., Kinoshita, T., Takemiya, A., Doi, M. and Shimazaki, K. (2008 b) 'Leaf positioning of *Arabidopsis* in response to blue light', *Molecular Plant*, 1(1), pp. 15-26.

Inoue, S., Matsushita, T., Tomokiyo, Y., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Kinoshita, T. and Shimazaki, K. (2011) 'Functional analyses of the activation loop of phototropin2 in *Arabidopsis*', *Plant Physiol*, 156(1), pp. 117-28.

Jahn, T., Fuglsang, A. T., Olsson, A., Bruntrup, I. M., Collinge, D. B., Volkmann, D., Sommarin, M., Palmgren, M. G. and Larsson, C. (1997) 'The 14-3-3 protein interacts directly with the C-terminal region of the plant plasma membrane H(+)-ATPase', *Plant Cell*, 9(10), pp. 1805-14.

Jaspert, N., Throm, C. and Oecking, C. (2011) 'Arabidopsis 14-3-3 proteins: fascinating and less fascinating aspects', *Front Plant Sci*, 2, pp. 96.

Jenkins, G. I. (2014) 'The UV-B photoreceptor UVR8: from structure to physiology', *Plant Cell*, 26(1), pp. 21-37.

Johnson, C., Crowther, S., Stafford, M. J., Campbell, D. G., Toth, R. and MacKintosh, C. (2010) 'Bioinformatic and experimental survey of 14-3-3-binding sites', *Biochem J*, 427(1), pp. 69-78.

Kaiserli, E., Sullivan, S., Jones, M. A., Feeney, K. A. and Christie, J. M. (2009) 'Domain Swapping to Assess the Mechanistic Basis of *Arabidopsis* Phototropin 1 Receptor Kinase Activation and Endocytosis by Blue Light', *Plant Cell*, 21(10), pp. 3226-3244.

Kansup, J., Tsugama, D., Liu, S. and Takano, T. (2014) 'Arabidopsis G-protein beta subunit AGB1 interacts with NPH3 and is involved in phototropism', *Biochem Biophys Res Commun*, 445(1), pp. 54-7.

Karimi, M., Inze, D. and Depicker, A. (2002) 'GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation', *Trends Plant Sci*, 7(5), pp. 193-5.

Keicher, J., Jaspert, N., Weckermann, K., Moller, C., Throm, C., Kintzi, A. and Oecking, C. (2017) 'Arabidopsis 14-3-3 epsilon members contribute to polarity of PIN auxin carrier and auxin transport-related development', *Elife*, 6.

Kimura, T., Haga, K., Nomura, Y., Higaki, T., Nakagami, H. and Sakai, T. (2021) 'Phosphorylation of NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL3 affects photosensory adaptation during the phototropic response', *Plant Physiol*, 187(2), pp. 981-995.

Kimura, T., Tsuchida-Mayama, T., Imai, H., Okajima, K., Ito, K. and Sakai, T. (2020) 'Arabidopsis ROOT PHOTOTROPISM2 Is a Light-Dependent Dynamic Modulator of Phototropin1', *Plant Cell*, 32(6), pp. 2004-2019.

7. Literaturverzeichnis

- Kinoshita, T., Doi, M., Suetsugu, N., Kagawa, T., Wada, M. and Shimazaki, K. (2001) 'Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening', *Nature*, 414(6864), pp. 656-60.
- Kinoshita, T., Emi, T., Tominaga, M., Sakamoto, K., Shigenaga, A., Doi, M. and Shimazaki, K. (2003) 'Blue-light- and phosphorylation-dependent binding of a 14-3-3 protein to phototropins in stomatal guard cells of broad bean', *Plant Physiol*, 133(4), pp. 1453-63.
- Kinoshita, T. and Shimazaki, K. (1999) 'Blue light activates the plasma membrane H(+)-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells', *EMBO J*, 18(20), pp. 5548-58.
- Koncz, C. and Schell, J. (1986) 'The Promoter of TI-DNA Gene 5 Controls the Tissue-Specific Expression of Chimeric Genes Carried by a Novel Type of Agrobacterium Binary Vector', *Molecular and General Genetics*, 204, pp. 383-396.
- Krecek, P., Skupa, P., Libus, J., Naramoto, S., Tejos, R., Friml, J. and Zazimalova, E. (2009) 'The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters', *Genome Biol*, 10(12), pp. 249.
- Laemmli, U. K. (1970) 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', *Nature*, 227(5259), pp. 680-5.
- Lariguet, P., Schepens, I., Hodgson, D., Pedmale, U. V., Trevisan, M., Kami, C., de Carbonnel, M., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Liscum, E. and Fankhauser, C. (2006) 'PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 1 is a phototropin 1 binding protein required for phototropism', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(26), pp. 10134-9.
- Liscum, E., Askinosie, S. K., Leuchtman, D. L., Morrow, J., Willenburg, K. T. and Coats, D. R. (2014) 'Phototropism: growing towards an understanding of plant movement', *Plant Cell*, 26(1), pp. 38-55.
- Liscum, E. and Briggs, W. R. (1995) 'Mutations in the NPH1 locus of Arabidopsis disrupt the perception of phototropic stimuli', *Plant Cell*, 7(4), pp. 473-85.
- Liscum, E., Nittler, P. and Koskie, K. (2020) 'The continuing arc toward phototropic enlightenment', *J Exp Bot*, 71(5), pp. 1652-1658.
- Liu, A., Sui, D., Wu, D. and Hu, J. (2016) 'The activation loop of PIP5K functions as a membrane sensor essential for lipid substrate processing', *Sci Adv*, 2(11), pp. e1600925.
- Louvet, O., Doignon, F. and Couzet, M. (1997) 'Stable DNA-binding yeast vector allowing high-bait expression for use in the two-hybrid system', *Biotechniques*, 23(5), pp. 816-8, 820.
- Lundbaek, J. A., Collingwood, S. A., Ingolfsson, H. I., Kapoor, R. and Andersen, O. S. (2010) 'Lipid bilayer regulation of membrane protein function: gramicidin channels as molecular force probes', *J R Soc Interface*, 7(44), pp. 373-95.
- Mackintosh, C. (2004) 'Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes', *Biochem J*, 381(Pt 2), pp. 329-42.
- Matsuoka, D. and Tokutomi, S. (2005) 'Blue light-regulated molecular switch of Ser/Thr kinase in phototropin', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(37), pp. 13337-42.
- Mergner, J., Frejno, M., List, M., Papacek, M., Chen, X., Chaudhary, A., Samaras, P., Richter, S., Shikata, H., Messerer, M., Lang, D., Altmann, S., Cyprys, P., Zolg, D. P., Mathieson, T., Bantscheff, M., Hazarika, R. R., Schmidt, T., Dawid, C., Dunkel, A., Hofmann, T., Sprunck, S., Falter-Braun, P., Johannes, F., Mayer, K. F. X., Jurgens, G., Wilhelm, M., Baumbach, J., Grill, E., Schneitz, K., Schwechheimer, C. and Kuster, B. (2020) 'Mass-spectrometry-based draft of the Arabidopsis proteome', *Nature*, 579(7799), pp. 409-414.

7. Literaturverzeichnis

- Moore, B. and Perez, V. J. (1967) 'Specific acidic proteins of the nervous system', *Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration*. New Jersey: Prentice Hall, pp. 343-359.
- Motchoulski, A. and Liscum, E. (1999) 'Arabidopsis NPH3: A NPH1 photoreceptor-interacting protein essential for phototropism', *Science*, 286(5441), pp. 961-4.
- Mravec, J., Skupa, P., Bailly, A., Hoyerova, K., Krecek, P., Bielach, A., Petrasek, J., Zhang, J., Gaykova, V., Stierhof, Y. D., Dobrev, P. I., Schwarzerova, K., Rolcik, J., Seifertova, D., Luschnig, C., Benkova, E., Zazimalova, E., Geisler, M. and Friml, J. (2009) 'Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter', *Nature*, 459(7250), pp. 1136-40.
- Müller, A., Guan, C., Galweiler, L., Tanzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennett, M., Wisman, E. and Palme, K. (1998) 'AtPIN2 defines a locus of Arabidopsis for root gravitropism control', *EMBO J*, 17(23), pp. 6903-11.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986) 'Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction', *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1, pp. 263-73.
- Munnik, T. (2013) 'Analysis of D3-,4-,5-phosphorylated phosphoinositides using HPLC', *Methods Mol Biol*, 1009, pp. 17-24.
- Muslin, A. J., Tanner, J. W., Allen, P. M. and Shaw, A. S. (1996) 'Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine', *Cell*, 84(6), pp. 889-97.
- Nishimura, T., Gecht, M., Covino, R., Hummer, G., Surma, M. A., Klose, C., Arai, H., Kono, N. and Stefan, C. J. (2019) 'Osh Proteins Control Nanoscale Lipid Organization Necessary for PI(4,5)P2 Synthesis', *Mol Cell*, 75(5), pp. 1043-1057 e8.
- Noh, B., Bandyopadhyay, A., Peer, W. A., Spalding, E. P. and Murphy, A. S. (2003) 'Enhanced gravi- and phototropism in plant *mdr* mutants mislocalizing the auxin efflux protein PIN1', *Nature*, 423(6943), pp. 999-1002.
- Noh, B., Murphy, A. S. and Spalding, E. P. (2001) 'Multidrug resistance-like genes of Arabidopsis required for auxin transport and auxin-mediated development', *Plant Cell*, 13(11), pp. 2441-54.
- Oecking C., P. M., Hagemeyer J., Hagemann K. (1997) 'Topology and target interaction of the fusicoccin-binding 14-3-3 homologs of *Commelina communis*', *The Plant Journal*, 12, pp. 441-453.
- Okada, K. and Shimura, Y. (1992) 'Aspects of recent developments in mutational studies of plant signaling pathways', *Cell*, 70(3), pp. 369-72.
- Okada, K., Ueda, J., Komaki, M. K., Bell, C. J. and Shimura, Y. (1991) 'Requirement of the Auxin Polar Transport System in Early Stages of Arabidopsis Floral Bud Formation', *Plant Cell*, 3(7), pp. 677-684.
- Okajima, K. (2016) 'Molecular mechanism of phototropin light signaling', *J Plant Res*, 129(2), pp. 149-57.
- Pedmale, U. V., Celaya, R. B. and Liscum, E. (2010) 'Phototropism: mechanism and outcomes', *Arabidopsis Book*, 8, pp. e0125.

7. Literaturverzeichnis

- Pedmale, U. V. and Liscum, E. (2007) 'Regulation of phototropic signaling in Arabidopsis via phosphorylation state changes in the phototropin 1-interacting protein NPH3', *J Biol Chem*, 282(27), pp. 19992-20001.
- Perraki, A., Cacas, J. L., Crowet, J. M., Lins, L., Castroviejo, M., German-Retana, S., Mongrand, S. and Raffaele, S. (2012) 'Plasma membrane localization of Solanum tuberosum remorin from group 1, homolog 3 is mediated by conformational changes in a novel C-terminal anchor and required for the restriction of potato virus X movement]', *Plant Physiol*, 160(2), pp. 624-37.
- Piovesan, D., Necci, M., Escobedo, N., Monzon, A. M., Hatos, A., Micetic, I., Quaglia, F., Paladin, L., Ramasamy, P., Dosztanyi, Z., Vranken, W. F., Davey, N. E., Parisi, G., Fuxreiter, M. and Tosatto, S. C. E. (2021) 'MobiDB: intrinsically disordered proteins in 2021', *Nucleic Acids Res*, 49(D1), pp. D361-D367.
- Poehlsgaard, J. and Douthwaite, S. (2005) 'The bacterial ribosome as a target for antibiotics', *Nat Rev Microbiol*, 3(11), pp. 870-81.
- Preuten, T., Blackwood, L., Christie, J. M. and Fankhauser, C. (2015) 'Lipid anchoring of Arabidopsis phototropin 1 to assess the functional significance of receptor internalization: should I stay or should I go?', *New Phytol*, 206(3), pp. 1038-50.
- Rademacher, E. H. and Offringa, R. (2012) 'Evolutionary Adaptations of Plant AGC Kinases: From Light Signaling to Cell Polarity Regulation', *Front Plant Sci*, 3, pp. 250.
- Rakusova, H., Gallego-Bartolome, J., Vanstraelen, M., Robert, H. S., Alabadi, D., Blazquez, M. A., Benkova, E. and Friml, J. (2011) 'Polarization of PIN3-dependent auxin transport for hypocotyl gravitropic response in Arabidopsis thaliana', *Plant J*, 67(5), pp. 817-26.
- Raven, J. A. (1975) 'Transport of Indoleacetic Acid in Plant Cells in Relation to pH and Electrical Potential Gradients, and its Significance for Polar IAA Transport', *New Phytologist*, 74, pp. 163-172.
- Reuter, L., Schmidt, T., Manishankar, P., Throm, C., Keicher, J., Bock, A., Droste-Borel, I. and Oecking, C. (2021) 'Light-triggered and phosphorylation-dependent 14-3-3 association with NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTYL 3 is required for hypocotyl phototropism', *Nat Commun*, 12(1), pp. 6128.
- Robinson, K., Jones, D., Patel, Y., Martin, H., Madrazo, J., Martin, S., Howell, S., Elmore, M., Finnen, M. J. and Aitken, A. (1994) 'Mechanism of inhibition of protein kinase C by 14-3-3 isoforms. 14-3-3 isoforms do not have phospholipase A2 activity', *Biochem J*, 299 (Pt 3), pp. 853-61.
- Roitinger, E., Hofer, M., Kocher, T., Pichler, P., Novatchkova, M., Yang, J., Schlogelhofer, P. and Mechtler, K. (2015) 'Quantitative phosphoproteomics of the ataxia telangiectasia-mutated (ATM) and ataxia telangiectasia-mutated and rad3-related (ATR) dependent DNA damage response in Arabidopsis thaliana', *Mol Cell Proteomics*, 14(3), pp. 556-71.
- Rosenquist, M., Alsterfjord, M., Larsson, C. and Sommarin, M. (2001) 'Data mining the Arabidopsis genome reveals fifteen 14-3-3 genes. Expression is demonstrated for two out of five novel genes', *Plant Physiol*, 127(1), pp. 142-9.
- Ryu, H., Kim, K., Cho, H., Park, J., Choe, S. and Hwang, I. (2007) 'Nucleocytoplasmic shuttling of BZR1 mediated by phosphorylation is essential in Arabidopsis brassinosteroid signaling', *Plant Cell*, 19(9), pp. 2749-62.

7. Literaturverzeichnis

- Sakai, T., Kagawa, T., Kasahara, M., Swartz, T. E., Christie, J. M., Briggs, W. R., Wada, M. and Okada, K. (2001) 'Arabidopsis nph1 and npl1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(12), pp. 6969-74.
- Sakai, T., Wada, T., Ishiguro, S. and Okada, K. (2000) 'RPT2. A signal transducer of the phototropic response in Arabidopsis', *Plant Cell*, 12(2), pp. 225-36.
- Sakamoto, K. and Briggs, W. R. (2002) 'Cellular and subcellular localization of phototropin 1', *Plant Cell*, 14(8), pp. 1723-1735.
- Sehnke, P. C., DeLille, J. M. and Ferl, R. J. (2002) 'Consummating signal transduction: the role of 14-3-3 proteins in the completion of signal-induced transitions in protein activity', *Plant Cell*, 14 Suppl, pp. S339-54.
- Simon, M. L., Platre, M. P., Marques-Bueno, M. M., Armengot, L., Stanislas, T., Bayle, V., Caillaud, M. C. and Jaillais, Y. (2016) 'A PtdIns(4)P-driven electrostatic field controls cell membrane identity and signalling in plants', *Nat Plants*, 2, pp. 16089.
- Speth, C., Jaspert, N., Marcon, C. and Oecking, C. (2010) 'Regulation of the plant plasma membrane H⁺-ATPase by its C-terminal domain: what do we know for sure?', *Eur J Cell Biol*, 89(2-3), pp. 145-51.
- Suetsugu, N., Takemiya, A., Kong, S. G., Higa, T., Komatsu, A., Shimazaki, K., Kohchi, T. and Wada, M. (2016) 'RPT2/NCH1 subfamily of NPH3-like proteins is essential for the chloroplast accumulation response in land plants', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(37), pp. 10424-9.
- Sullivan, S., Kharshiing, E., Laird, J., Sakai, T. and Christie, J. M. (2019) 'Deetiolation Enhances Phototropism by Modulating NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTYL3 Phosphorylation Status', *Plant Physiol*, 180(2), pp. 1119-1131.
- Sullivan, S., Thomson, C. E., Kaiserli, E. and Christie, J. M. (2009) 'Interaction specificity of Arabidopsis 14-3-3 proteins with phototropin receptor kinases', *FEBS Lett*, 583(13), pp. 2187-93.
- Sullivan, S., Waksman, T., Paliogianni, D., Henderson, L., Lutkemeyer, M., Suetsugu, N. and Christie, J. M. (2021) 'Regulation of plant phototropic growth by NPH3/RPT2-like substrate phosphorylation and 14-3-3 binding', *Nat Commun*, 12(1), pp. 6129.
- Swarup, R., Friml, J., Marchant, A., Ljung, K., Sandberg, G., Palme, K. and Bennett, M. (2001) 'Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the Arabidopsis root apex', *Genes Dev*, 15(20), pp. 2648-53.
- Takemiya, A., Sugiyama, N., Fujimoto, H., Tsutsumi, T., Yamauchi, S., Hiyama, A., Tada, Y., Christie, J. M. and Shimazaki, K. I. (2013) 'Phosphorylation of BLUS1 kinase by phototropins is a primary step in stomatal opening', *Nature Communications*, 4.
- Takenawa, T. (2010) 'Phosphoinositide-binding interface proteins involved in shaping cell membranes', *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 86(5), pp. 509-23.
- Throm, C. R. 2017. Identifizierung und Charakterisierung von „NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTYL 3“ als neuartiger Interaktionspartner pflanzlicher 14-3-3 Proteine. In: ZMBP (ed.). Tübingen.

7. Literaturverzeichnis

- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) 'Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9), pp. 4350-4.
- Tseng, T. S., Whippo, C., Hangarter, R. P. and Briggs, W. R. (2012) 'The role of a 14-3-3 protein in stomatal opening mediated by PHOT2 in Arabidopsis', *Plant Cell*, 24(3), pp. 1114-26.
- Tsuchida-Mayama, T., Nakano, M., Uehara, Y., Sano, M., Fujisawa, N., Okada, K. and Sakai, T. (2008) 'Mapping of the phosphorylation sites on the phototropic signal transducer, NPH3', *Plant Science*, 174(6), pp. 626-633.
- Ueno, K., Kinoshita, T., Inoue, S., Emi, T. and Shimazaki, K. (2005) 'Biochemical characterization of plasma membrane H⁺-ATPase activation in guard cell protoplasts of Arabidopsis thaliana in response to blue light', *Plant Cell Physiol*, 46(6), pp. 955-63.
- van Heusden, G. P. (2005) '14-3-3 proteins: regulators of numerous eukaryotic proteins', *IUBMB Life*, 57(9), pp. 623-9.
- Wan, Y. L., Eisinger, W., Ehrhardt, D., Kubitscheck, U., Baluska, F. and Briggs, W. (2008) 'The subcellular localization and blue-light-induced movement of phototropin 1-GFP in etiolated seedlings of Arabidopsis thaliana(W)', *Molecular Plant*, 1(1), pp. 103-117.
- Wang, H., Yang, C., Zhang, C., Wang, N., Lu, D., Wang, J., Zhang, S., Wang, Z. X., Ma, H. and Wang, X. (2011) 'Dual role of BK1 and 14-3-3 s in brassinosteroid signaling to link receptor with transcription factors', *Dev Cell*, 21(5), pp. 825-34.
- Wang, P., Hsu, C. C., Du, Y., Zhu, P., Zhao, C., Fu, X., Zhang, C., Paez, J. S., Macho, A. P., Tao, W. A. and Zhu, J. K. (2020) 'Mapping proteome-wide targets of protein kinases in plant stress responses', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(6), pp. 3270-3280.
- Weller, B., Zourelidou, M., Frank, L., Barbosa, I. C., Fastner, A., Richter, S., Jurgens, G., Hammes, U. Z. and Schwechheimer, C. (2017) 'Dynamic PIN-FORMED auxin efflux carrier phosphorylation at the plasma membrane controls auxin efflux-dependent growth', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(5), pp. E887-E896.
- Went, F. A. F. C. (1929) 'Plant Movements', *Proc. Int. Congr. Plant Sci.*
- Went, F. W. and Thimann, K. V. (1937) 'Phytohormones', *Macmillan, New York.*
- Willige, B. C., Ahlers, S., Zourelidou, M., Barbosa, I. C., Demarsy, E., Trevisan, M., Davis, P. A., Roelfsema, M. R., Hangarter, R., Fankhauser, C. and Schwechheimer, C. (2013) 'D6PK AGCVIII kinases are required for auxin transport and phototropic hypocotyl bending in Arabidopsis', *Plant Cell*, 25(5), pp. 1674-88.
- Wisniewska, J., Xu, J., Seifertova, D., Brewer, P. B., Ruzicka, K., Blilou, I., Rouquie, D., Benkova, E., Scheres, B. and Friml, J. (2006) 'Polar PIN localization directs auxin flow in plants', *Science*, 312(5775), pp. 883.
- Wu, K., Lu, G., Sehnke, P. and Ferl, R. J. (1997) 'The heterologous interactions among plant 14-3-3 proteins and identification of regions that are important for dimerization', *Arch Biochem Biophys*, 339(1), pp. 2-8.
- Xue, L., Wang, P., Wang, L., Renzi, E., Radivojac, P., Tang, H., Arnold, R., Zhu, J. K. and Tao, W. A. (2013) 'Quantitative measurement of phosphoproteome response to osmotic stress in

7. Literaturverzeichnis

arabidopsis based on Library-Assisted eXtracted Ion Chromatogram (LAXIC)', *Mol Cell Proteomics*, 12(8), pp. 2354-69.

Xue, Y., Xing, J., Wan, Y., Lv, X., Fan, L., Zhang, Y., Song, K., Wang, L., Wang, X., Deng, X., Baluska, F., Christie, J. M. and Lin, J. (2018) 'Arabidopsis Blue Light Receptor Phototropin 1 Undergoes Blue Light-Induced Activation in Membrane Microdomains', *Mol Plant*, 11(6), pp. 846-859.

Yaffe, M. B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P. R., Aitken, A., Leffers, H., Gambin, S. J., Smerdon, S. J. and Cantley, L. C. (1997) 'The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity', *Cell*, 91(7), pp. 961-71.

Yang, Z., Guo, G., Zhang, M., Liu, C. Y., Hu, Q., Lam, H., Cheng, H., Xue, Y., Li, J. and Li, N. (2013) 'Stable isotope metabolic labeling-based quantitative phosphoproteomic analysis of Arabidopsis mutants reveals ethylene-regulated time-dependent phosphoproteins and putative substrates of constitutive triple response 1 kinase', *Mol Cell Proteomics*, 12(12), pp. 3559-82.

Zegzouti, H., Anthony, R. G., Jahchan, N., Bogre, L. and Christensen, S. K. (2006) 'Phosphorylation and activation of PINOID by the phospholipid signaling kinase 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PKD1) in Arabidopsis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(16), pp. 6404-9.

Zhang, H., Zhou, H., Berke, L., Heck, A. J., Mohammed, S., Scheres, B. and Menke, F. L. (2013) 'Quantitative phosphoproteomics after auxin-stimulated lateral root induction identifies an SNX1 protein phosphorylation site required for growth', *Mol Cell Proteomics*, 12(5), pp. 1158-69.

Zourelidou, M., Absmanner, B., Weller, B., Barbosa, I. C., Willige, B. C., Fastner, A., Streit, V., Port, S. A., Colcombet, J., de la Fuente van Bentem, S., Hirt, H., Kuster, B., Schulze, W. X., Hammes, U. Z. and Schwechheimer, C. (2014) 'Auxin efflux by PIN-FORMED proteins is activated by two different protein kinases, D6 PROTEIN KINASE and PINOID', *Elife*, 3.

Zourelidou, M., Muller, I., Willige, B. C., Nill, C., Jikumaru, Y., Li, H. and Schwechheimer, C. (2009) 'The polarly localized D6 PROTEIN KINASE is required for efficient auxin transport in Arabidopsis thaliana', *Development*, 136(4), pp. 627-36.

8. Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Claudia Oecking für die Bereitstellung des spannenden Promotionsthemas sowie für die intensive Betreuung danken. Ebenfalls bedanke ich mich für die wertvollen Tipps und die Unterstützung bei der Fertigstellung sowie für die Begutachtung dieser Arbeit. Nicht zuletzt bezieht sich dieser Dank auch auf die zahlreichen und geduldigen Gespräche, welche meine Experimente in die richtige Richtung gelenkt haben, auch wenn anschließend bestimmte Bleistifte plötzlich unauffindbar gewesen waren.

Ebenfalls danke ich Prof. Dr. Klaus Harter für die Anregungen und kritischen Fragen, Denkanstöße und Anregungen sowie für die zweite Begutachtung dieser Arbeit.

Des Weiteren danke ich Nicole Doppstadt und Elke Fischer für die Geduld und Hilfsbereitschaft bei allen administrativen Aufgaben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Kolleginnen Jutta, Andrea, Prabha, Lea und Svenja. Die vielen Diskussionen bei Mittagessen, Kaffee und Tee, Lea's unnachahmlichen Kuchen und die immerwährende gute Laune am Arbeitsplatz verlieh der täglichen Zusammenarbeit eine Menge Spaß und Motivation. Jutta's grüner Daumen und Andrea's Erfahrungen bezüglich Klonierungen und Hefetransformation haben mir zudem so manches graue Haar erspart. Auch meinem ehemaligen Kollegen Christian Throm danke ich für die perfekte Vorbereitung sowie die gute Einarbeitung in das Thema, auch für die aufschlussreichen Gespräche und Anregungen sowie die geradezu unerschöpfliche Versorgung mit Papern verdanke ich mitunter ihm. Die gemeinsame Zeit mit euch war wunderbar!

Bei den Leuten der Pflanzenbiochemie bedanke ich mich für die wunderbare Zeit in Tübingen, für zahlreiche Theaterbesuche, Sommerfeiern, Fasnets- und Weihnachtsfeiern, Spieleabende, Stocherkahnfahrten und die eine oder andere Tasse Kaffee gekrönt mit wunderbarer Gesellschaft und erheiternden Gesprächen.

Ebenfalls bedanke ich mich bei der Pflanzenphysiologie des ZMBP für den reibungslosen Ablauf sowie die gute Atmosphäre und Kooperation im Laboralltag. Dem Team des Gewächshauses gilt an dieser Stelle ebenfalls ein besonderer Dank, da sie als Herzstück des Institutes viele Experimente überhaupt erst durch ihre Arbeit ermöglichen.

Besonders bedanke ich mich bei meiner Familie und bei meinem Partner Christoph für ihre immerwährende Unterstützung und ihren Rückhalt, ohne euch wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen.