

**Identifizierung und Charakterisierung von
„NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTYL 3“
als neuartiger Interaktionspartner
pflanzlicher 14-3-3 Proteine**

Dissertation

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

vorgelegt von
Christian Robert Throm
aus Heidelberg

Tübingen
2017

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

| | |
|-----------------------------------|-------------------------------|
| Tag der mündlichen Qualifikation: | 04.07.2017 |
| Dekan: | Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel |
| 1. Berichterstatter: | Prof. Dr. Claudia Oecking |
| 2. Berichterstatter: | Prof. Dr. Klaus Harter |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Inhaltsverzeichnis..... | I |
| Abbildungsverzeichnis..... | VII |
| Tabellenverzeichnis..... | IX |
| 1 Einleitung..... | 1 |
| 1.1 14-3-3 Proteine..... | 1 |
| 1.1.1 Allgemeine Informationen, Entdeckung..... | 1 |
| 1.1.2 Isoformen in <i>Arabidopsis</i> , phylogenetischer Stammbaum | 2 |
| 1.1.3 Struktur, Expressions-Muster, subzelluläre Lokalisation | 3 |
| 1.2 Charakterisierte Interaktionspartner von 14-3-3 Proteinen, Regulations-Mechanismen bzgl. der Interaktionspartner | 5 |
| 1.2.1 Die Nitrat-Reduktase (NR) – Inaktivierung der Enzymaktivität..... | 5 |
| 1.2.2 Die P-Typ H ⁺ -ATPase – Aktivierung der Enzymaktivität | 6 |
| 1.2.3 „BRASSINAZOLE-RESISTANT 1“ (BZR1) – Veränderung der subzellulären Lokalisation .. | 9 |
| 1.2.4 Der „florigen activation complex“ (FAC) – „FLOWERING LOCUS T“ (FT) und „FLOWERING LOCUS D“ (FD) – Gerüst-Funktion/„Scaffolding“ | 10 |
| 1.3 Die phototrope Reaktion und andere BL-induzierte Prozesse..... | 11 |
| 1.3.1 Informations-Quelle Licht – relevante Wellenlängenbereiche, für die Perzeption verantwortliche Photorezeptoren..... | 11 |
| 1.3.2 Der Phototropismus | 12 |
| 1.4 Experimentelle Herangehensweise..... | 20 |
| 2 Material und Methoden..... | 21 |
| 2.1 Geräte und Software | 21 |
| 2.2 Feinchemikalien und Verbrauchsmaterialien | 24 |
| 2.3 Puffer und Lösungen | 29 |
| 2.4 Vektoren..... | 37 |
| 2.4.1 Klonierungs -Vektoren..... | 37 |
| 2.4.2 Hefe-2-Hybrid-Vektoren..... | 38 |
| 2.4.3 Vektoren zur Expression von Fusions-Proteinen..... | 38 |
| 2.4.4 Binäre Pflanzen-Vektoren zur stabilen <i>A. tumefaciens</i> -vermittelten Transformation von <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen | 39 |
| 2.4.5 cDNA-Bibliothek | 39 |
| 2.5 Oligonukleotide/Primer..... | 39 |
| 2.5.1 Gateway™-Primer für die Klonierung von Konstrukten zur Expression von N-term. RFP- bzw. C-term. BiFC-Fusions-Proteinen..... | 39 |
| 2.5.2 Gateway™-Primer für die Klonierung von Konstruktion zur Expression von rBiFC-2in1-Fusions-Proteinen..... | 40 |
| 2.5.3 Primer für die Klonierung von Konstrukten für das Hefe-2-Hybrid-System..... | 41 |

| | | |
|--------|--|----|
| 2.5.4 | Primer für die gerichtete Mutagenese von DNA-Konstrukten..... | 43 |
| 2.5.5 | Primer für die Klonierung von Konstrukten zur Expression von C-term. BiFC-Fusions-Proteinen | 43 |
| 2.5.6 | Primer für die Klonierung von Konstrukten zur Expression von C-term. mGFP4-Fusions-Proteinen bzw. der stabilen Transformation/Komplementation von <i>Arabidopsis</i> -Linien | 44 |
| 2.5.7 | Primer für die Klonierung von Konstrukten zur Expression von C-term. RFP-Fusions-Proteinen | 45 |
| 2.5.8 | Primer für die Klonierung von Konstrukten zur Expression von N-term. RFP-Fusions-Proteinen | 46 |
| 2.5.9 | Primer für die Klonierung von Konstrukten zur stabilen Transformation/Komplementation von <i>Arabidopsis</i> -Linien | 47 |
| 2.5.10 | Sonstige Primer | 47 |
| 2.6 | Biologisches Material | 48 |
| 2.6.1 | Antikörper | 48 |
| 2.6.2 | Enzyme | 49 |
| 2.6.3 | Bakterien-Stämme..... | 50 |
| 2.6.4 | Hefe-Stämme..... | 50 |
| 2.6.5 | Pflanzen-Material | 50 |
| 2.6.6 | Pflanzen-Zellkultur..... | 52 |
| 2.7 | Bakterien-Anzucht..... | 53 |
| 2.7.1 | Antibiotika-Stock-Lösungen | 53 |
| 2.7.2 | Übernachtskulturen | 53 |
| 2.7.3 | Präparation von chemisch-kompetenten <i>E. coli</i> DH5 α /XL1-Blue-Bakterien-Zellen..... | 53 |
| 2.7.4 | Präparation von kompetenten <i>A. tumefaciens</i> C58C1/GV3101-Bakterien-Zellen..... | 54 |
| 2.7.5 | Lagerung von Bakterien-Stämmen (Glycerol-Stocks/Stammkulturen)..... | 54 |
| 2.8 | Molekularbiologische Methoden | 54 |
| 2.8.1 | Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR)..... | 54 |
| 2.8.2 | Bakterien-Kolonie-PCR | 55 |
| 2.8.3 | Hefe-Kolonie-PCR | 55 |
| 2.8.4 | Gerichtete <i>in vitro</i> -Mutagenese von DNA-Konstrukten..... | 56 |
| 2.8.5 | Präparation von Plasmid-DNA aus einer Bakterien-Übernachtskultur..... | 57 |
| 2.8.6 | Präparation von genomischer DNA (gDNA) aus Pflanzen | 57 |
| 2.8.7 | Präparation von Gesamt-RNA aus Pflanzen | 58 |
| 2.8.8 | Reverse Transkription von mRNA zu cDNA | 58 |
| 2.8.9 | Restriktion von DNA | 58 |
| 2.8.10 | DNA-Agarose-Gelelektrophorese..... | 59 |
| 2.8.11 | Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen..... | 59 |
| 2.8.12 | Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren (DNA/RNA) | 59 |
| 2.8.13 | Ligation | 59 |

| | | |
|--------|--|----|
| 2.8.14 | Gateway™ Rekombinations-Klonierungstechnologie (Invitrogen™)..... | 60 |
| 2.8.15 | Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> DH5α/XL1-Blue- und One Shot® TOP10-Bakterien-Zellen durch Hitzeschock..... | 61 |
| 2.8.16 | Transformation von kompetenten <i>A. tumefaciens</i> C58C1/GV3101-Bakterien-Zellen durch Hitzeschock | 61 |
| 2.8.17 | Sequenzierungs-Reaktionen/Analyse..... | 62 |
| 2.9 | Das Hefe-2-Hybrid-System | 62 |
| 2.9.1 | Herstellung kompetenter Hefe-Zellen (<i>S. cerevisiae</i> PJ69-4a/Y187)..... | 63 |
| 2.9.2 | PEG 3350-vermittelte Transformation von Hefe-Zellen (<i>S. cerevisiae</i> PJ69-4a/Y187) mit Plasmid-DNA | 64 |
| 2.9.3 | Semiquantitative Analyse der Intensität von Protein-Protein-Interaktionen mittels Hefe-2-Hybrid-System bzw. Hefe-Wachstums-Tests | 64 |
| 2.10 | Biochemische Methoden..... | 65 |
| 2.10.1 | Protein-Extraktion aus Hefe-Zellen (<i>S. cerevisiae</i> PJ69-4a/Y187) | 65 |
| 2.10.2 | Bestimmung der Protein-Konzentration | 65 |
| 2.10.3 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese..... | 66 |
| 2.10.4 | Coomassie® Brilliantblau G 250-Färbung von Polyacrylamid-Gelen..... | 67 |
| 2.10.5 | Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose/PVDF-Membranen..... | 67 |
| 2.10.6 | Ponceau S-Färbung von Nitrocellulose/PVDF-Membranen | 67 |
| 2.10.7 | Immunologischer Nachweis von Proteinen..... | 68 |
| 2.11 | Pflanzen-Anzucht/-Propagierung..... | 69 |
| 2.11.1 | Anzucht und Propagierung von <i>A. thaliana</i> - und <i>N. benthamiana</i> -Pflanzen | 69 |
| 2.11.2 | Anzucht von <i>Arabidopsis</i> -Keimlingen in Petrischalen | 69 |
| 2.11.3 | Anzucht von etiolierten <i>Arabidopsis</i> -Keimlingen | 69 |
| 2.12 | Herstellung von <i>A. thaliana</i> -Kreuzungs-Linien | 69 |
| 2.13 | Stabile bzw. transiente Transformation von <i>A. thaliana</i> -Protoplasten/Pflanzen und <i>N. benthamiana</i> -Blättern | 70 |
| 2.13.1 | Transiente Transformation von <i>A. thaliana</i> -Protoplasten | 70 |
| 2.13.2 | Transiente Transformation von <i>N. benthamiana</i> -Blättern | 70 |
| 2.13.3 | Stabile Transformation von <i>A. thaliana</i> -Pflanzen mittels „floral dip“ | 71 |
| 2.14 | Bestimmung der phototropen Reaktion von etiolierten <i>A. thaliana</i> -Keimlingen..... | 71 |
| 2.15 | BFA-, Cantharidin- und FM® 4-64-Applikation an etiolierte <i>Arabidopsis</i> -Keimlinge..... | 72 |
| 2.16 | Zusätzlich angewandte Fluoreszenz-basierte bildgebende Verfahren via CLSM (FRET-FLIM, rBiFC) | 72 |
| 2.16.1 | FRET-FLIM-Studien in transient-transformierten <i>N. benthamiana</i> -Blättern | 72 |
| 2.16.2 | rBiFC-Studien in transient-transformierten <i>N. benthamiana</i> -Blättern | 73 |
| 2.17 | Mikroskopische Untersuchungen..... | 74 |
| 2.17.1 | Epifluoreszenz-Mikroskopie von etiolierten <i>Arabidopsis</i> -Keimlingen | 74 |
| 2.17.2 | Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) von <i>Arabidopsis</i> -Protoplasten, etiolierten <i>Arabidopsis</i> -Keimlingen und <i>N. benthamiana</i> -Blättern | 74 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 3 | Ergebnisse | 75 |
| 3.1 | Identifizierung putativer Interaktionspartner von 14-3-3 Isoformen mittels Hefe-2-Hybrid-System | 75 |
| 3.1.1 | Sichtung einer cDNA-Bibliothek unter Verwendung der 14-3-3 Isoform epsilon als Köder | 75 |
| 3.1.2 | <i>In silico</i> -Analysen der putativen Interaktionspartner..... | 78 |
| 3.2 | Untersuchungen zur Interaktion von 14-3-3 Isoformen mit Proteinen der NPH3-Familie mittels Hefe-2-Hybrid-System..... | 84 |
| 3.2.1 | Die Proteine der NPH3-Familie und ihr Auftreten in den Sichtungen mit den verschiedenen Isoformen..... | 84 |
| 3.2.2 | Bestätigung der Interaktion von 14-3-3 Isoformen und ausgewählter Proteine der NPH3-Familie..... | 86 |
| 3.2.3 | Identifizierung des 14-3-3 Bindemotivs in den NPH3-Familien-Proteinen | 87 |
| 3.3 | Mikroskopische Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation der NPH3-Familien-Proteine sowie ihrer Interaktion mit 14-3-3 Isoformen..... | 93 |
| 3.3.1 | Lokalisation in transient-transformierten <i>A. thaliana</i> -Protoplasten bzw. <i>N. benthamiana</i> -Blättern | 93 |
| 3.3.2 | Koexpressions- und Interaktions-Studien in transient-transformierten <i>A. thaliana</i> -Protoplasten bzw. <i>N. benthamiana</i> -Blättern | 99 |
| 3.4 | Untersuchungen zur physiologischen Relevanz der 14-3-3/NPH3-Interaktion | 112 |
| 3.4.1 | Identifizierung und Analyse einer <i>nph3</i> -„loss-of-function“-Mutante | 112 |
| 3.4.2 | Transformation der <i>nph3</i> -„loss-of-function“-Mutante | 113 |
| 3.4.3 | Analyse der phototropen Reaktion | 114 |
| 3.4.4 | Analyse des Blatt-Krümmungs-Index | 118 |
| 3.5 | Mikroskopische Untersuchungen bzgl. Stimulus-abhängigen Veränderungen in der subzellulären Lokalisation von NPH3-Familien-Proteinen in stabil-transformierten <i>A. thaliana</i> -Keimlingen..... | 120 |
| 3.5.1 | Stimulus-abhängige subzelluläre Lokalisation in stabil-transformierten <i>A. thaliana</i> -Keimlingen | 120 |
| 4 | Diskussion..... | 129 |
| 4.1 | Hefe-2-Hybrid-Sichtung/en – Beitrag zur Aufklärung des pflanzlichen 14-3-3 Interaktoms | 129 |
| 4.2 | Identifizierung des 14-3-3 Bindemotivs in NPH3-Familien-Proteinen | 131 |
| 4.3 | Subzelluläre Lokalisation der unterschiedlichen NPH3-Familien-Proteine/NRLs, gegenseitige Beeinflussung bzgl. ihrer Lokalisation..... | 133 |
| 4.4 | Physiologische Relevanz der 14-3-3/NPH3-Interaktion | 138 |
| 4.4.1 | Auswirkungen der 14-3-3/NPH3-Interaktion auf die Blatt-Spreitung..... | 139 |
| 4.4.2 | Auswirkungen der 14-3-3/NPH3-Interaktion auf die BL-abhängige Inhibierung des Hypokotyl-Wachstums | 142 |
| 4.4.3 | Auswirkungen der 14-3-3/NPH3-Interaktion auf die BL-abhängige positive phototrope Reaktion des Hypokotyls..... | 144 |
| 4.5 | Zellbiologische Auswirkungen von diversen Stimuli auf die NPH3-Lokalisation..... | 148 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.5.1 | Auswirkungen der BL-Irradiation und Brefeldin A- bzw. Cantharidin-Applikation auf die subzelluläre Lokalisation von NPH3 | 149 |
| | Zusammenfassung..... | 157 |
| | Summary | 159 |
| | Literaturverzeichnis | 161 |
| | Anhang | |
| | Danksagung | |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Abbildung 1 Phylogenetischer Stammbaum der dreizehn 14-3-3 Isoformen aus <i>A. thaliana</i> | 3 |
| Abbildung 2 Protein-Struktur eines 14-3-3 Dimers. | 4 |
| Abbildung 3 Vereinfachte Darstellung des Hefe-2-Hybrid-Systems. | 63 |
| Abbildung 4 Venn-Diagramm zur Darstellung der Anzahl der putativen IPs, die in den Schnittmengen der verschiedenen Sichtungen mit den unterschiedlichen 14-3-3 Isoformen aufgetreten sind. | 78 |
| Abbildung 5 Gruppen-Einteilung der putativen IPs aller vier Isoformen anhand ihrer „gene ontology“-Annotation bei TAIR. | 80 |
| Abbildung 6 Phylogenetischer Stammbaum der NPH3-Familien-Proteine aus <i>A. thaliana</i> | 85 |
| Abbildung 7 Bestätigung der Interaktion von verschiedenen 14-3-3 Isoformen (epsilon, kappa, omega) mit NPH3 mittels des Hefe-2-Hybrid-Systems. | 86 |
| Abbildung 8 NPH3-Versionen, die im Hefe-2-Hybrid-System zur Identifizierung des 14-3-3 Bindemotivs eingesetzt wurden. | 88 |
| Abbildung 9 Hefe-2-Hybrid-Analyse zur Identifizierung des 14-3-3 Bindemotivs in NPH3. | 89 |
| Abbildung 10 Alignment des C-terminalen Bereichs C2 von NPH3, RPT2 und ENP/NPY1. | 90 |
| Abbildung 11 Hefe-2-Hybrid-Analyse zur Identifizierung des 14-3-3 Bindemotivs an Position 743 von NPH3. | 91 |
| Abbildung 12 Expressions-Analyse und Immunodetektion der im Hefe-2-Hybrid-System eingesetzten NPH3-Proteine und der 14-3-3 Isoform epsilon. | 92 |
| Abbildung 13 Identifizierung des 14-3-3 Bindemotivs an Position 569 in ENP/NPY1 und an Position 591 in RPT2. | 93 |
| Abbildung 14 Subzelluläre Lokalisation von NPH3 in Arabidopsis-Protoplasten. | 95 |
| Abbildung 15 Subzelluläre Lokalisation von NPH3-S743A in Arabidopsis-Protoplasten. | 96 |
| Abbildung 16 Subzelluläre Lokalisation von NPH3- Δ C51/N2 in Arabidopsis-Protoplasten. | 97 |
| Abbildung 17 Subzelluläre Lokalisation von NPH3- Δ N146 in Arabidopsis-Protoplasten. | 97 |
| Abbildung 18 Subzelluläre Lokalisation von NPH3 in Tabak-Blättern. | 98 |
| Abbildung 19 Koexpression von NPH3 und ENP/NPY1 in Arabidopsis-Protoplasten. | 100 |
| Abbildung 20 Subzelluläre Lokalisation von PIN1 in Arabidopsis-Protoplasten. | 101 |
| Abbildung 21 Koexpression von PIN1 und NPH3 in Arabidopsis-Protoplasten. | 102 |
| Abbildung 22 Subzelluläre Lokalisation von 14-3-3 Isoform epsilon in Arabidopsis-Protoplasten. ... | 104 |
| Abbildung 23 Koexpression von NPH3 und der 14-3-3 Isoform epsilon in Arabidopsis-Protoplasten. | 105 |
| Abbildung 24 Koexpression von NPH3 und 14-3-3 Isoform epsilon in Tabak-Blättern. | 107 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 25 FRET-FLIM-Analyse von NPH3/NPH3-S743A und der 14-3-3 Isoform epsilon in Tabak-Blättern..... | 108 |
| Abbildung 26 Ratiometrische bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation-von NPH3/NPH3-S743A und 14-3-3 Isoform epsilon in Tabak-Blättern. | 110 |
| Abbildung 27 Analyse der ratiometrischen bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation-von NPH3/NPH3-S743A und 14-3-3 Isoform epsilon in Tabak-Blättern. | 111 |
| Abbildung 28 Schematische Darstellung des NPH3-Genlokus mit T-DNA-Insertionsstelle und Lage der Genotypisierungs-Primer. | 112 |
| Abbildung 29 Genotypisierung der NPH3 GABI-Kat T-DNA-Insertions-Linie und entsprechenden Komplementations- bzw. Transformations-Linien auf genomischer Ebene..... | 113 |
| Abbildung 30 Semiquantitative RT-PCR der NPH3 GABI-Kat T-DNA-Insertions-Linie und deren Komplementations- bzw. Transformations-Linien..... | 114 |
| Abbildung 31 Qualitative Darstellung der phototropen Reaktion der verschiedenen Pflanzen-Linien. | 115 |
| Abbildung 32 Quantitative Analyse der phototropen Reaktion der verschiedenen Pflanzen-Linien anhand der Messung ihres Hypokotyl-Winkels..... | 116 |
| Abbildung 33 Quantitative Analyse der Hypokotyl-Länge der verschiedenen Pflanzen-Linien nach BL- Bestrahlung. | 117 |
| Abbildung 34 Quantitative Analyse des Blatt-Krümmungs-Index der unterschiedlichen Pflanzen-Linien. | 119 |
| Abbildung 35 Subzelluläre Lokalisation von NPH3 in stabil-transformierten Arabidopsis Col-0-Keimlingen zum Zeitpunkt t = 0 min bzw. t = 10 min..... | 121 |
| Abbildung 36 Subzelluläre Lokalisation von NPH3 bzw. NPH3-S743A in stabil-transformierten Arabidopsis Col-0-Keimlingen zum Zeitpunkt t = 0 min bis t = 10 min. | 122 |
| Abbildung 37 Subzelluläre Lokalisation von NPH3-S743A in stabil-transformierten Arabidopsis Col-0-Keimlingen zum Zeitpunkt t = 0 min bzw. t = 10 min..... | 123 |
| Abbildung 38 Subzelluläre Lokalisation von NPH3- Δ C51/N2 bzw. NPH3- Δ N146 in stabil-transformierten Arabidopsis Col-0-Keimlingen zum Zeitpunkt t = 0 min bzw. t = 10 min..... | 124 |
| Abbildung 39 Subzelluläre Lokalisation von NPH3 in stabil-transformierten Arabidopsis Col-0-Keimlingen in Abhängigkeit des Phosphatase-Inhibitors Cantharidin. | 125 |
| Abbildung 40 Subzelluläre Lokalisation von NPH3-S743A in stabil-transformierten Arabidopsis Col-0-Keimlingen in Abhängigkeit des Phosphatase-Inhibitors Cantharidin. | 126 |
| Abbildung 41 Subzelluläre Lokalisation von NPH3, NPH3-S743A, NPH3- Δ C51/N2 und NPH3- Δ N146 in stabil-transformierten Arabidopsis Col-0-Keimlingen in Abhängigkeit von Brefeldin A (BFA). | 128 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 42 Modell bzgl. der subzellulären Lokalisation von „PIN-FORMED“-Proteinen, ENP/NPYs/MELs und NPH3 an/in der PM von Arabidopsis-Protoplasten..... | 137 |
| Abbildung 43 Modelle bzgl. der Internalisierung von NPH3 nach BL-Irradiation. | 154 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1 Zusammensetzung des Sammelgels bzw. der Trenngele. | 67 |
| Tabelle 2 Anzahl der sequenzierten PCR-Produkte bzw. der putativen IPs aus den Sichtungen einer cDNA-Bibliothek mittels des Hefe-2-Hybrid-Systems unter Verwendung von vier unterschiedlichen 14-3-3 Isoformen als Köder. | 76 |
| Tabelle 3 Anzahl der putativen IPs, die in den Schnittmengen oder exklusiv in den verschiedenen Sichtungen mit den unterschiedlichen 14-3-3 Isoformen aufgetreten sind. | 76 |
| Tabelle 4 Putative IPs von 14-3-3 Proteinen, die in allen vier cDNA-Sichtungen identifiziert wurden. | 77 |
| Tabelle 5 Transkriptionsfaktoren, die als putative IPs der 14-3-3 Isoform epsilon mittels Hefe-2-Hybrid-Sichtung identifiziert wurden. | 79 |
| Tabelle 6 Vergleich der sechs unterschiedlichen Sichtungen/Studien zur Identifizierung neuer pflanzlicher 14-3-3 IPs. | 82 |
| Tabelle 7 Putative IPs, die in unterschiedlichen Studien zur Ermittlung des 14-3-3 Interaktoms mehrfach identifiziert wurden (s. auch Tabelle 6). | 83 |
| Tabelle 8 Auftreten von Mitgliedern der NPH3-Familie als putative IPs in den Hefe-2-Hybrid-Sichtungen mit den vier verschiedenen 14-3-3 Isoformen (epsilon, kappa, omega und upsilon). | 84 |
| Tabelle 9 Vergleich der Interaktion von verschiedenen 14-3-3 Isoformen mit NPH3, RPT2 und ENP/NPY1 mittels des Hefe-2-Hybrid-Systems. | 87 |
| Tabelle 10 Vergleich der Interaktion zwischen dem NPH3-Vollängen-Protein, dem NPH3- Δ C51/N2-Deletions-Protein und den mutierten NPH3-Proteinen, die an Position 743 (Ser (S)) einen AS-Austausch aufweisen (Ala (A), Asp (D), Glu (E)), mit verschiedenen 14-3-3 Isoformen (epsilon, kappa, omega)..... | 92 |

1 Einleitung

1.1 14-3-3 Proteine

1.1.1 Allgemeine Informationen, Entdeckung

Pflanzen sind sessile Organismen, sie müssen sich auf die an ihrem Standort, in ihrem Ökosystem vorherrschenden Umwelt-Bedingungen einstellen bzw. auf die sich ständig ändernden Außeneinflüsse reagieren. Für die Detektion bzw. Perzeption diesbezüglicher Signale und Reize besitzen sie spezifische Rezeptoren, die dann, über die unterschiedlichsten Signaltransduktion-Wege, entsprechende physiologische Antworten und Reaktionen initiieren.

Ein wichtiger Mechanismus in der Signal-Weiterleitung stellt die Phosphorylierung von Proteinen dar. Eine Phosphorylierung durch eine aktive Kinase kann eine Konformations-Änderung des Substrats bzw. Zielproteins verursachen und so einen direkten Einfluss auf dessen Aktivität ausüben (Groban et al., 2006; Latzer et al., 2008); sie kann aber auch indirekt als Signal für andere Proteine dienen, um an das so modifizierte Protein zu binden.

Eine Gruppe von Proteinen die Sequenz-spezifisch und Phosphorylierungs-abhängig andere Proteine binden, sind die sogenannten 14-3-3 Proteine. Sie üben durch direkte Protein-Protein-Interaktion regulatorische Funktionen auf ihre Zielproteine aus. Ein 14-3-3 Dimer kann die gebundenen IPs in ihrer Aktivität, Lokalisation, Konformation, der Interaktions-Fähigkeit mit anderen Proteinen und in der Stabilität beeinflussen bzw. regulieren (Mackintosh, 2004).

Des Weiteren können 14-3-3 Proteine auch als Gerüst („Scaffold“) fungieren und somit die Ausbildung der gebundenen IP zu einem hetero- bzw. multimeren Komplex bewerkstelligen; hierdurch können zwischen den komplexierten IPs anderweitige Wechselwirkungen und Modifikations-Prozesse stattfinden („molecular anvil hypothesis“ (Yaffe, 2002)).

14-3-3 Proteine kommen ubiquitär in allen Eukaryonten vor, besitzen selbst keine enzymatische Aktivität und wurden erstmals als Aktivator- bzw. Inhibitor-Proteine von unterschiedlichen Enzymen (Monoxygenasen, Hydroxylasen, Protein-Kinasen) in Protein-Fractionen von Ratten- bzw. Schafgehirnen entdeckt (Yamauchi et al., 1981; Ichimura et al., 1988; Aitken et al., 1990; Toker et al., 1990).

Die Bindung der IPs ist, bis auf wenige Ausnahmen, Phosphorylierungs-abhängig (Ottmann et al., 2007; Ito et al., 2014, 2014); für die 14-3-3 Interaktion muss ein spezifisches Serin oder Threonin in einem definierten AS-Motiv des Zielproteins phosphoryliert vorliegen. Bis dato sind drei Konsensus-Motive identifiziert worden: zwei endogene (Modus I (RSX(S/T)^PXP) bzw. Modus II (RXY/FX(S/T)^PXP)), und ein C-terminal endständiges Bindemotiv (Modus III ((S/T)^PX_{1/2}-COOH) (Muslin et al., 1996; Yaffe

et al., 1997; Yaffe, 2002; Obenauer et al., 2003; Coblitz et al., 2005; Coblitz et al., 2006; Johnson et al., 2010; Madeira et al., 2015)).

Der Name 14-3-3 beruht auf dem Auffinden der Proteine in einer spezifischen Fraktion eines aufgereinigten Homogenisats aus Rinderhirn (Fraktion #14) bzw. ihren charakteristischen Laufeigenschaften mittels bestimmten Auftrennungs-Verfahren (Zellulose-Chromatographie (Bande #3), Stärke-Gelelektrophorese (Bande #3) (Moore and Perez, 1968)).

Die Erstbeschreibung in Pflanzen fand als sog. G-Box-bindende Faktoren in *Z. mays* statt (de Vetten et al., 1992). In diversen anderen Pflanzenspezies sowie in *Arabidopsis* wurde ihre Homologie zu den ursprünglich in Säugetieren entdeckten 14-3-3 Proteinen beschrieben bzw. ihre regulatorische Aktivität auf ihre IPs festgestellt (Lu et al., 1992; Ferl et al., 1994; Jarillo et al., 1994; Lu et al., 1994).

1.1.2 Isoformen in *Arabidopsis*, phylogenetischer Stammbaum

In allen bislang untersuchten uni- und multizellulären Organismen wurde eine unterschiedliche Anzahl an Genen gefunden, die jeweils für verschiedene 14-3-3 Isoformen codieren; die Genfamilie in *Arabidopsis* besteht aus dreizehn Isoformen, die in zwei Gruppen unterteilt werden können (DeLille et al., 2001; Rosenquist et al., 2001): die ursprünglichere „epsilon-Gruppe“, bestehend aus den fünf Isoformen pi, epsilon, omicron, mu und iota, und die „nicht-epsilon-Gruppe“, mit den acht Isoformen lambda, kappa, upsilon, nu, psi, omega, phi und chi (s. Abbildung 1). Die „epsilon-Gruppe“ spaltet sich in zwei weitere Subgruppen auf; so gruppieren pi, epsilon und omicron (46,5 % Identität) in einer, mu und iota (74 % Identität) in einer anderen Subgruppe. Auch die „nicht-epsilon-Gruppe“ lässt sich weiter aufteilen; so bilden die Isoformen lambda und kappa (93,5 % Identität), upsilon, nu und psi (82,2 % Identität) sowie omega, phi und chi (85,5 % Identität) jeweils eine separate Subgruppe.

Ein Alignment der dreizehn Isoformen verdeutlicht weitere Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede (s. Abbildung 44, s. Anhang); ihre Länge variiert von 245 bis 268 AS; alle Isoformen verfügen über eine hochkonservierte Kernregion und unterscheiden sich, je nach Gruppen- bzw. Subgruppen-Zugehörigkeit, deutlich in ihren N- bzw. C-Termini; der C-Terminus wird auch als der verantwortliche Teil für die Spezifität bzw. die unterschiedliche Affinität bzgl. favorisierter IPs diskutiert (Sehnke and Ferl, 2000; Sehnke et al., 2006; Cardasis et al., 2007; Manak and Ferl, 2007; Swatek et al., 2011; Pallucca et al., 2014).

In multizellulären Organismen mit mehreren 14-3-3 Isoformen führt die Redundanz bzgl. der regulatorischen Aktivität zu Kompensations-Effekten, d.h. phänotypische Auffälligkeiten bei Single-„knockout“-Mutanten wurden in *Arabidopsis* nur in wenigen Fällen beschrieben (Tseng et al., 2012). Distinkte phänotypische Unterschiede waren nur ersichtlich, wenn gesamte Untergruppen in ihrer Expression gehemmt bzw. herunterreguliert wurden (Weckermann, 2008; Gao et al., 2014; van Kleeff

alpha-Helices aus (Shen et al., 2003), wovon die ersten vier das Interface zur Dimerisierung zu Homo- und Heterodimeren darstellen (Wu et al., 1997; Abarca et al., 1999; Denison et al., 2011; Sluchanko and Gusev, 2012); die restlichen fünf Helices sind für die Ausbildung der sogenannten amphipathischen Grube, in der die entsprechenden IPs gebunden bzw. koordiniert werden, verantwortlich (Yang et al., 2006). Die Struktur des C-terminalen Bereichs der Proteine konnte nicht aufgelöst werden, eine zehnte alpha-Helix wird für diesen Teil aber postuliert (Shen et al., 2003).

Für ein 14-3-3 Dimer ergibt sich eine W- oder Boot-artige Quartärstruktur mit zwei putativen Bindestellen für einen bzw. zwei IPs (Yaffe, 2002; Chi et al., 2015).

Die Assoziation von Polyaminen und bivalenten Kationen an spezifische saure AS-Reste in Helix acht der 14-3-3 Proteine (führt zur Ladungs-Neutralisation) hat einen positiven Effekt auf die Bindung von spezifischen IPs (Lu et al., 1994; Athwal and Huber, 2002; Shen and Huber, 2006). Dies ist auf den hypervariablen C-Terminus, der als autoinhibitorische Domäne gilt, zurückzuführen; die postulierte zehnte alpha-Helix, die unter Kationen-Bindung (Mg^{2+} , Ca^{2+}) an Helix acht für die IPs den Eingang zur amphipathischen Grube freigibt, spielt darin vermutlich die entscheidende „Gatekeeper“-Rolle (Shen et al., 2003; Pallucca et al., 2014).

Erhöhte 5'-AMP-Konzentrationen (mögliche Nukleotid-Bindestelle zwischen Helix acht und neun der 14-3-3 Proteine) sowie die Phosphorylierung eines spezifischen Tyrosins in der amphipathischen Grube haben bzgl. der Bindung von verschiedenen 14-3-3 „Targets“ ebenfalls einen erheblichen Einfluss (Camoni et al., 2001; Giacometti et al., 2004).

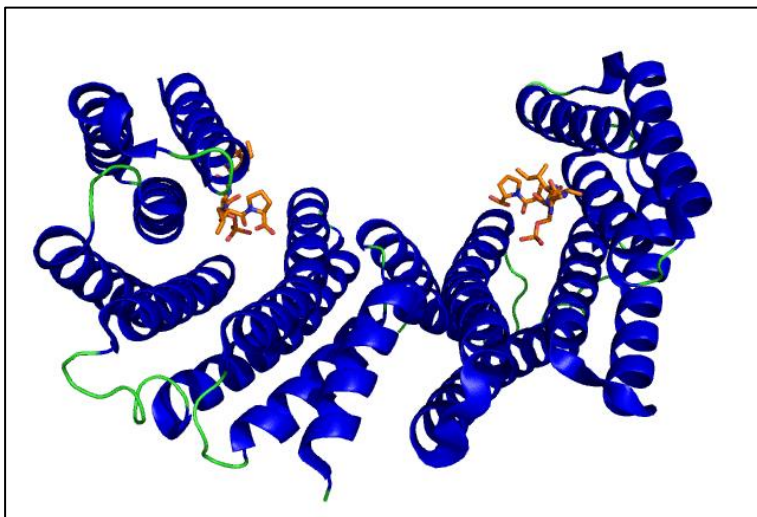


Abbildung 2 Protein-Struktur eines 14-3-3 Dimers. Das Homodimer setzt sich aus zwei Monomeren zusammen, hier aus der humanen 14-3-3 Isoform gamma (blau: alphahelicale Bereiche, grün: „Linker“-Regionen), und wird im Komplex mit zwei gebundenen Phospho-Serin-Peptiden (braun) dargestellt (Yang et al., 2006).

Die Expression und Lokalisation von 14-3-3 Proteinen wurde in *Arabidopsis* in verschiedenen Organen, Geweben und Zellen untersucht; ein definiertes exklusives Auftreten spezifischer Isoformen in distinkten Geweben konnte diesbezüglich nur für iota (Pollen), omicron (Antheren-Gewebe), pi (Antheren-Gewebe, Chalaza-Cyste) und chi (Antheren-Gewebe, Pollen, Stigma) nachgewiesen werden, alle anderen Isoformen waren relativ ubiquitär in der ganzen Pflanze exprimiert (Daugherty et al., 1996; Paul et al., 2005; Weckermann, 2008).

Die subzelluläre Lokalisation von 14-3-3 Proteinen ist größtenteils zytoplasmatisch und nukleär, jedoch kommen sie auch in anderen Zell-Kompartimenten (chloroplastidär) und an der PM assoziiert vor (Korthout and de Boer, 1994; Bihn et al., 1997; Sehnke et al., 2000; Jarvis and Soll, 2001; Aducci et al., 2002).

1.2 Charakterisierte Interaktionspartner von 14-3-3 Proteinen, Regulations-Mechanismen bzgl. der Interaktionspartner

14-3-3 Proteine interagieren mit einer Vielzahl von Proteinen aus den unterschiedlichsten Bereichen des pflanzlichen Organismus. Anhand einiger ausgewählter und gut charakterisierter IPs sollen die verschiedenen Regulations-Mechanismen und Auswirkungen der Interaktion mit 14-3-3 Proteinen etwas detaillierter beschrieben werden.

1.2.1 Die Nitrat-Reduktase (NR) – Inaktivierung der Enzymaktivität

Die NR aus *S. oleracea* war eines der ersten pflanzlichen Enzyme, für das eine regulatorische Funktion ihrer Aktivität durch die Bindung mit 14-3-3 Proteinen aufgeklärt wurde.

Die NR bildet im Zytoplasma pflanzlicher Zellen ein Homodimer, das unter Verwendung der hauptsächlich aus der Photosynthese stammenden Reduktionsäquivalente $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$ die Reduktion von Nitrat (NO_3^-) zu Nitrit (NO_2^-) katalysiert.

Die Phosphorylierungs-abhängige sehr schnelle Inaktivierung der NR wird durch diverse Kinasen (CDPKs, SNF1-related) initiiert; die Aktivierung der Kinasen findet durch unterschiedliche Stimuli (erhöhte Ca^{2+} -Konzentrationen als Antwort auf veränderte Licht-Verhältnisse, zu hohe Nitrat-, zu niedrige CO_2 - bzw. Zucker-Konzentrationen und Mangel an Reduktionsäquivalenten), die unmittelbar auf die Einstellung der Photosynthese zurückzuführen sind, statt (Douglas et al., 1997; Douglas et al., 1998; Sugden et al., 1999; Lambeck et al., 2010). Dies ist nötig, da Nitrit, das Produkt der Reduktions-Reaktion, toxisch für die Zelle ist und in der Folge-Reaktion aus Mangel an Reduktionsäquivalenten nicht mehr weiter zu Ammonium (NH_4^+) reduziert werden könnte.

Für die funktionale Inaktivierung des Enzyms wurde nach Phosphorylierung die Bindung eines inhibierenden Protein-Dimers postuliert (Spill and Kaiser, 1994; Bachmann et al., 1995; Glaab and Kaiser, 1995; Mackintosh et al., 1995). Das inhibierende Protein, das an Position 543 der AS-Sequenz der phosphorylierten NR aus *S. oleracea* in einer Modus I-ähnlichen Art und Weise bindet (RTA(S)^PTP), wurde als 14-3-3 Dimer identifiziert (Bachmann et al., 1996; Bachmann et al., 1996; Bachmann et al., 1996; Moorhead et al., 1996). Die 14-3-3 Bindestelle für die NR aus *Arabidopsis* wurde ebenfalls identifiziert; das für die Bindung benötigte phosphorylierte Serin liegt in der Gelenkregion 1 zwischen der Molybdopterin- und der Häm-bindenden-Domäne an Position 534 der AS-Sequenz, eingebettet in einem Modus I-ähnlichen Motiv (KSV(S)^PTP (Su et al., 1996; Kanamaru et al., 1999)).

Der N-terminale Bereich der NR verfügt über eine zweite unabhängige 14-3-3 Bindestelle (Chi et al., 2015); die nicht über die amphipathische Grube der 14-3-3 Proteine vermittelte Interaktion wirkt kooperativ zu der konventionellen NR/14-3-3 Bindung und bewirkt eine Veränderung in der Tertiär-Struktur der NR.

Es liegen unterschiedliche Affinitäten verschiedener 14-3-3 Isoformen bzgl. der Bindung an die NR vor ($\omega > \lambda > \kappa > \nu > \chi > \psi > \epsilon \gg \epsilon$) bzw. führen diesbezüglich zu einer reduzierten Inaktivierung des Enzyms (Lambeck et al., 2010).

Kinetische Studien hinsichtlich des funktionalen Mechanismus ergaben, dass nach 14-3-3 Bindung der Elektronentransfer vom Häm zur Molybdopterin-Domäne und somit auf das Nitrat unterbunden wird (Lambeck et al., 2012); eine durch die 14-3-3 Assoziation induzierte Konformations-Änderung der NR (Übergang von der geschlossenen in die offene Form), die zu einer Distanzvergrößerung zwischen den beiden Domänen führt, wird diesbezüglich postuliert (Chi et al., 2015).

Bei der Reaktivierung der NR spielen Phosphatasen vom PP2A-Typ eine wesentliche Rolle (MacKintosh and Meek, 2001); die regulatorische Untereinheit PP2A B55 dephosphoryliert die NR nach einem Dunkel/Licht-Übergang als Antwort auf die Wiederaufnahme der Photosynthese, das gebundene 14-3-3 Dimer dissoziiert ab und die Inhibierung der Enzymaktivität wird aufgehoben (Heidari et al., 2011).

1.2.2 Die P-Typ H⁺-ATPase – Aktivierung der Enzymaktivität

Auch die P-Typ H⁺-ATPase ist ein Zielprotein von 14-3-3 Proteinen (Oecking et al., 1997; Fuglsang et al., 1999; Svannelid et al., 1999; Maudoux et al., 2000). Die in Pflanzen und Pilzen vorkommende PM-ständige H⁺-ATPase bewerkstelligt unter ATP-Hydrolyse den Transport von Protonen (H⁺) aus dem Zytoplasma in den extrazellulären Raum bzw. Apoplasten ($\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+_{\text{innen}} \rightarrow \text{ADP} + \text{PO}_4^{3-} + \text{H}^+_{\text{außen}}$). Von den insgesamt elf in *Arabidopsis* vorkommenden Isoformen, sind die Isoformen AHA1 und AHA2 die höchst abundanten bzw. am stärksten exprimierten; sie sind für das Wachstum der

Pflanze essentiell, ein Doppel-„knockout“ der verantwortlichen Gene ist letal (Haruta et al., 2010). Durch die Bildung und Aufrechterhaltung eines Membran-überspannenden H^+ -Gradienten ist die H^+ -ATPase in Pflanzen für die Bewerkstelligung bzw. Energetisierung (sekundär aktiver Transport) zahlreicher physiologischer Prozesse verantwortlich (Beladung des Phloems, Aufnahme gelöster Stoffe in die Wurzel, Spitzen-Wachstum von Pollenschläuchen und Wurzelhaaren, Öffnung von Stomata, Pflanzen-Wachstums-Bewegungen, Salz- und Osmo-Toleranz, Regulation des intrazellulären pH-Werts, Ansäuerung des Apoplasten und der Zellwand (Palmgren, 2001)).

Um die Beteiligung an einer derart großen Anzahl an Prozessen zu koordinieren bzw. zu integrieren, muss die Aktivität der H^+ -ATPase sehr stark reguliert werden; dies findet über posttranslationale Modifikationen, interagierende Proteine und *Cis*-wirksame autoinhibitorische Domänen (diskrete intramolekulare Interaktionen mit negativen Effekten auf die Enzym-Aktivität) statt. Kristallisations-Studien bzgl. der Protein-Struktur von AHA2 zeigten das Vorhandensein von zehn Trans-Membran-Helices sowie zwei spezifischen regulatorischen Domänen auf (Jahn et al., 2001; Pedersen et al., 2007)). Sie befinden sich sowohl N- als auch C-terminal (beide Termini lokalisieren zytoplasmatisch), wobei die C-terminale Domäne (R-Region) den primär ausschlaggebenden autoinhibitorischen Regulations-Mechanismus beinhaltet; eine Abspaltung dieses Bereichs hat eine deutlich erhöhte Aktivität des Enzyms zur Folge (Jahn et al., 1997; Axelsen et al., 1999; Ekberg et al., 2010).

Die Applikation von Fusicoccin (Diterpen-Glukosid, Pilztoxin) bewirkt ebenfalls eine extrem erhöhte und irreversible Aktivierung der H^+ -ATPase in Pflanzen (Marre, 1979). Bei Untersuchungen bzgl. der Aufklärung des FC-Rezeptors wurden primär 14-3-3 Proteine und kurze Zeit später auch die H^+ -ATPase als die beiden Proteine identifiziert, die FC kooperativ binden (Korthout and de Boer, 1994; Marra et al., 1994; Oecking et al., 1994; Jahn et al., 1997; Oecking et al., 1997; Oecking et al., 1997; Baunsgaard et al., 1998; Fullone et al., 1998). Bei näherer Analyse stellte sich heraus, dass 14-3-3 die H^+ -ATPase an deren extremen C-Terminus bindet und dass FC diese Interaktion sozusagen als „molekularen Klebstoff“ irreversibel arretiert/stabilisiert (Fuglsang et al., 1999; Svanneid et al., 1999; Maudoux et al., 2000; Jelich-Ottmann et al., 2001; Wurtele et al., 2003). Hierdurch ist eine Inhibierung des H^+ -Transports durch die C-terminale autoinhibitorische Domäne nicht mehr möglich und die H^+ -ATPase ist konstitutiv aktiv.

Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse wurde die 14-3-3 Bindestelle der H^+ -ATPase für diverse Pflanzenspezies identifiziert (*A. thaliana*, *N. tabacum*, *S. oleracea*, *V. faba* (Olsson et al., 1998; Fuglsang et al., 1999; Svanneid et al., 1999; Maudoux et al., 2000; Emi et al., 2001; Jelich-Ottmann et al., 2001)); sie befindet sich am äußersten C-Terminus des Proteins (R-Region), stellt ein Motiv des Modus III dar ((S/T)^PX_{1/2}-COOH) und besitzt die AS-Sequenz YTV-COOH; das Threonin muss für die 14-3-3 Interaktion phosphoryliert vorliegen (Coblitz et al., 2005; Coblitz et al., 2006; Johnson et al., 2010).

Analysen hinsichtlich der Binde-Spezifität gegenüber der H⁺-ATPase (AHA2) ergaben, dass Isoformen der „nicht-epsilon-Gruppe“ (phi, chi, nu und psi) *in vitro* die höchsten Affinitäten aufwiesen (rekombinant exprimierte Proteine/Peptide, SPR-Analysen (Rosenquist et al., 2000)); Untersuchungen in Mais-Karyopsen bestätigten diese Ergebnisse („Overlay“-Assays, Aktivitäts-Messungen, SPR-Analysen (Pallucca et al., 2014)). Im Gegensatz dazu wiesen in *Arabidopsis* alle untersuchten Isoformen, unabhängig von ihrer Gruppen-Zugehörigkeit, eine vergleichbar starke Binde-Affinität gegenüber der H⁺-ATPase auf (*in vivo*-Messungen bzgl. der H⁺-Transport-Aktivität (Alsterfjord et al., 2004)). Das Expressions-Level und die subzelluläre Lokalisation der jeweiligen Isoform in den untersuchten Zellen/Geweben muss hinsichtlich der Analyse der Binde-Spezifität jedoch berücksichtigt werden; nicht jede 14-3-3 Isoform wird ubiquitär in der Pflanze exprimiert bzw. lokalisiert an der PM (Alsterfjord et al., 2004; Weckermann, 2008).

Neben der 14-3-3 Bindestelle wirken weitere Bereiche des C-Terminus bei der Feinregulation der H⁺-ATPase-Aktivität mit (Portillo, 2000; Jelich-Ottmann et al., 2001; Fuglsang et al., 2003; Speth et al., 2010). Diese regulatorischen Effekte basieren wahrscheinlich auf Struktur-verändernden Mechanismen die auf die Bindung von 14-3-3 Einfluss haben; so konnte gezeigt werden, dass weitere Phosphorylierungen in der C-terminalen autoinhibitorischen Domäne sowohl unterstützend als auch inhibierend auf die 14-3-3 Interaktion wirken (Fuglsang et al., 2007; Speth et al., 2010).

Diverse exogene und endogene Stimuli haben Auswirkungen auf den Phosphorylierungs-Status der H⁺-ATPase und deren Aktivität. So konnte in *V. faba* eine BL-induzierte Phosphorylierung des C-Terminus, sowie die darauffolgende 14-3-3 Assoziation und die daraus resultierende Stomata-Öffnung nachgewiesen werden (Kinoshita and Shimazaki, 1999; Emi et al., 2001; Kinoshita and Shimazaki, 2001; Kinoshita et al., 2003). Die Applikation von spezifischen Kinase (K-252a)/Phosphatase (Calyculin A)-Inhibitoren bzw. physiologische ABA-Konzentrationen konnten die BL-induzierte Phosphorylierung der H⁺-ATPase in Schließ-Zellen jedoch inhibieren bzw. vollständig unterbinden (Hayashi et al., 2011). Phototropin-defiziente Protoplasten (*phot1/2*-Doppel-„knockout“), konnten ebenfalls keinen H⁺-Transport als Antwort auf BL mehr bewerkstelligen (Ueno et al., 2005); die H⁺-ATPase wurde jedoch nicht als direktes Substrat der Phototropine (AGCVIII-Kinasen) identifiziert (Hayashi et al., 2010). Die externe Gabe von Auxin zu Hypokotyl-Segmenten von etiolierten *Arabidopsis*-Keimlingen hatte ebenfalls eine Phosphorylierung sowie Aktivierung der H⁺-ATPase und eine darauffolgende Elongation der Hypokotyl-Segmente zur Folge (Takahashi et al., 2012). Dies stellt eine direkte Verbindung zur sogenannten Säure-Wachstums-Hypothese her, nach der der Apoplast bzw. die Zellwand für die Zellstreckung angesäuert werden muss.

Bzgl. den verantwortlichen Kinasen und Phosphatasen, die den Phosphorylierungszustand der H⁺-ATPase auf die unterschiedliche Stimuli hin verändern, ist bis dato nur sehr wenig bekannt. Eine im Kalzium-„Signaling“ involvierte Kinase (PKS5) phosphoryliert die H⁺-ATPase am C-Terminus (S931)

und verhindert hierdurch eine 14-3-3 Assoziation (Fuglsang et al., 2007). Diverse Untersuchungen postulieren des Weiteren eine Beteiligung von CDPKs („calcium-dependent protein kinases“), PKCs („protein kinases C“) und LRR-RKs („leucin-rich repeat receptor kinases“ (Xing et al., 1996; Lino et al., 1998; Caesar et al., 2011; Witthoft et al., 2011; Ladwig et al., 2015)). Für zwei im ABA-„Signaling“ involvierte Phosphatasen des PP2C-Typs (ABI1, ABI2) konnte ebenfalls eine Beteiligung bzgl. der BL-induzierten Aktivierung der H⁺-ATPase aufgezeigt werden (Hayashi et al., 2011). Die verantwortliche/n Kinase/n bzw. Phosphatase/n, die die 14-3-3 Bindestelle am extremen C-Terminus der H⁺-ATPase phosphoryliert/en bzw. dephosphoryliert/en, sind jedoch nach wie vor unbekannt.

1.2.3 „BRASSINAZOLE-RESISTANT 1“ (BZR1) – Veränderung der subzellulären Lokalisation

BZR1 ist ein weiteres in Pflanzen vorkommendes Protein das als „Gold-Standard“-IP von 14-3-3 beschrieben wurde.

Es wurde in zwei unabhängigen genetischen Sichtungen als positiver Regulator des BR-Signaltransduktions-Weges entdeckt (Wang et al., 2002; Yin et al., 2002); die Mutante (*bzr1*) war gegenüber dem BR-Synthese-Hemmstoffes „Brassinazole“ resistent und wies charakteristische phänotypische Merkmale auf (eingerollte Blätter, vermehrtes Wachstum des Hypokotyls).

Das Protein ist ein Repressor der Transkription von spezifischen BR-induzierten Genen. In phosphorylierter Form wird BZR1 durch 14-3-3 Bindung (molekulares Chaperon) vom Transfer in den Nukleus zurückgehalten (Retention) bzw. zurück ins Zytoplasma exportiert (Bai et al., 2007; Gampala et al., 2007; Ryu et al., 2007; Ryu et al., 2008). Alternativ wird es in dieser Form über das 26S-Proteasom degradiert (He et al., 2002).

Die verantwortliche Kinase BIN2, die ebenfalls im BR-„Signaling“ eine wesentliche Rolle spielt, phosphoryliert BZR1 im Kontext eines 14-3-3 Bindemotivs des Modus I (RSX(S₁₇₃)^PXP (Gampala et al., 2007)).

Die antagonistisch wirkende Phosphatase (PP2A), die die Retention von BZR1 im Zytoplasma aufhebt und den Transfer des Repressors in den Nukleus wiederherstellt, wurde von Tang et al. (2011) entdeckt.

Ein zweiter indirekter Mechanismus zur Regulation von BZR1 wird über eine konkurrierende Interaktion mit 14-3-3 vermittelt. Unter BR-Perzeption durch den verantwortlichen BR-Rezeptor-Komplex, bestehend aus der Rezeptor-Kinase BRI1 („BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1“, LRR-RLK) und dem Korezeptor BAK1 („BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1“, LRR-RLK), dissoziiert der hierdurch phosphorylierte Kinase-Inhibitor BKI1 („BRI1 KINASE INHIBITOR 1“) von der PM und interagiert im Zytoplasma mit 14-3-3; somit steht 14-3-3 nicht mehr zur Bindung von BZR1 zur Verfügung, dessen Transfer in den Nukleus wird wieder ermöglicht und die entsprechende Expression von BR-induzierten Genen wird reprimiert (Wang and Chory, 2006; Wang et al., 2011).

1.2.4 Der „florigen activation complex“ (FAC) – „FLOWERING LOCUS T“ (FT) und „FLOWERING LOCUS D“ (FD) – Gerüst-Funktion/„Scaffolding“

Eine kürzlich durchgeführte Untersuchung, die sowohl biochemische, zellbiologische als auch genetische Ansätze elegant miteinander kombinierte, bestätigte eindrucksvoll, dass 14-3-3 Proteine essentielle Komponenten des „florigen activation complex“ (FAC) sind; dieser Komplex initiiert das Blühen in der Kurztag-Pflanze Reis (Taoka et al., 2011).

Der Begriff „Florigen“ wurde erstmals 1936 eingeführt und bezieht sich auf ein Molekül, das in Blättern unter induktiven photoperiodischen Bedingungen gebildet und anschließend in den Spross-Apex transportiert wird (Chailakhyan, 1936). Es konnte der Beweis erbracht werden, dass das Protein FT („FLOWERING LOCUS T“) in der fakultativen Langtag-Pflanze *Arabidopsis* solch ein Langstrecken-Signal darstellt (Mathieu et al., 2007). Im Spross-Apex initiiert ein Komplex aus FT und dem bZIP-TF FD („FLOWERING LOCUS D“) über transkriptionelle Aktivierung von Blüten-Identitäts-Genen die Blüten-Bildung (Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005).

Eine Hefe-2-Hybrid-Sichtung mit Hd3a (FT-Homolog aus *O. sativa*) als Köder, identifizierte sowohl diverse 14-3-3 Isoformen aus Reis als auch OsFD1, das Reis-Homolog von FD aus *Arabidopsis*, als putative IPs (Taoka et al., 2011).

Die ursprünglich überraschende Beobachtung, dass Hd3a nicht zu einer direkten Interaktion mit OsFD1 befähigt ist, war der Anlass für detailliertere Untersuchungen, die aufzeigten, dass 14-3-3 diese Interaktion vermittelt.

Bemerkenswerterweise sind die 14-3-3 Bindestellen von Hd3a und OsFD1 räumlich voneinander getrennt bzw. findet die Bindung unabhängig voneinander statt; das bedeutet, dass die beiden Proteine in einer unterschiedlichen Art und Weise von 14-3-3 gebunden werden. OsFD1, dessen Koordinierung in der amphipathischen Grube eines 14-3-3 Monomers Phosphorylierungs-abhängig stattfindet, stellt ein typisches Zielprotein von 14-3-3 dar. Die Bindestelle besitzt ein Modus I-ähnliches Motiv (RSX(S/T)^PXP), ist aber am äußersten C-Terminus von OsFD1 (OsFD1-S192) bzw. AtFD lokalisiert (AtFD-T282). Im Gegensatz zu OsFD1/AtFD und den meisten physiologischen Zielproteinen, muss Hd3a/FT nicht phosphoryliert vorliegen um an 14-3-3 zu binden. Die Kristall-Struktur des Hd3a/14-3-3 Komplexes zeigt einen erstaunlichen Unterschied im Vergleich zu den typischen/kanonischen 14-3-3 Interaktionen auf: ein unphosphoryliertes Hd3a-Monomer bindet jeweils „on top“ eines jeden 14-3-3 Monomers und verlängert hierdurch die W-artige Struktur eines 14-3-3 Dimers (Taoka et al., 2011).

Kristalle, die in der Gegenwart des phosphorylierten OsFD1 Peptids gezüchtet wurden, erlaubten letztendlich die Modellierung des gesamten FAC (bestehend aus 14-3-3, OsFD1 und Hd3a). Obwohl 14-3-3 die Hd3a/OsFD1-Interaktion vermittelt, kommen die beiden Proteine nicht in direkten Kontakt

zueinander; dies lässt die Vermutung zu, dass 14-3-3 als eine Art Plattform fungiert und räumliche Nähe, aber keine direkte Interaktion der beiden Proteine ermöglicht (Taoka et al., 2011).

Auf der Basis zellbiologischer Daten schlagen Taoka et al. (2011) ein Modell vor, in dem 14-3-3 als zytoplasmatischer Rezeptor für das „Florigen“ (Hd3a) im Spross-Apex agiert. Sobald dieses Protein-Paar (14-3-3/Hd3a) in den Zellkern überführt wird, bildet sich zusammen mit dem phosphorylierten OsFD1 ein ternärer Komplex aus, der in Folge dessen im Nukleus zurückgehalten wird und Gene aktiviert, die essentiell für die Blüten-Bildung sind.

Letztendlich bestätigten Experimente, die mit veränderten nicht mehr zur Bindung an 14-3-3 befähigte Versionen von Hd3a und OsFD1 durchgeführt wurden, eindrucksvoll die *in vivo*-Signifikanz der 14-3-3 Assoziation für die Ausbildung der Blüte in Reis.

Basierend auf den aktuellen strukturellen Erkenntnissen sollte somit fast jeder IP von 14-3-3 der ein C-terminal endständiges Bindemotiv besitzt fähig sein, an den Hd3a/14-3-3 Komplex zu binden; was die Spezifität des Hd3a/14-3-3 Komplexes bestimmt ausnahmslos mit OsFD1 zu interagieren, ist bis dato aber noch unbekannt.

1.3 Die phototrope Reaktion und andere BL-induzierte Prozesse

Wie schon anhand der verschiedenen, gut charakterisierten IPs dargestellt, wirken 14-3-3 Proteine an einer Vielzahl von Prozessen regulatorisch mit. Diese Abläufe beinhalten grundlegende Funktionen wie z.B. die Energetisierung von Transport-Prozessen (P-Typ H^+ -ATPase (Aufbau eines H^+ -Gradienten)) sowie die Versorgung der Pflanze mit essentiellen Substanzen (NR (NO_3^- -Reduktion, Bereitstellung von NH_4^+ für die Protein/Nukleinsäure-Synthese)). Neben diesen größtenteils metabolisch einzuordnenden Prozessen, wurde den 14-3-3 Proteinen neuerdings auch eine regulatorische Beteiligung bei der Übertragung von Signalen, wie z.B. im Bereich der Pflanzen-Hormone (BZR1 (BR-„Signaling“)) und der Blüten-Bildung (FAC (FT-Transfer, FT/FD-„Scaffolding“)) zugesprochen. Welche Rolle sie bei Licht-abhängigen Prozessen, speziell BL-induzierten Reaktion wie z.B. dem Phototropismus, spielen, wurde bis dato aber noch nicht detailliert aufgelöst.

1.3.1 Informations-Quelle Licht – relevante Wellenlängenbereiche, für die Perzeption verantwortliche Photorezeptoren

Licht ist für die Pflanze nicht nur die zur Durchführung der Photosynthese benötigte Energie-Ressource, sondern wirkt auch als Stimulus bzw. Außenreiz auf eine Vielzahl andere pflanzliche Prozesse ein; Beispiele hierfür sind die Keimung (verantwortliche/r Photorezeptor/en: phy), die Deetiologung/Entwicklung des Keimlings (phy, cry), die Detektion/Wahrnehmung von Nachbar-

Pflanzen bzw. die Schattenvermeidungs-Reaktion (phy, cry, UVR8), die Blüten-Bildung (phy, cry, ztl), der Phototropismus (PHOT (UVR8, phy)) die Chloroplasten-Bewegungen (PHOT) und die Stomata-Öffnung (PHOT) (Fankhauser and Staiger, 2002; Sullivan and Deng, 2003; Kim et al., 2007; Tilbrook et al., 2013). Ein weites Spektrum des von der Sonne emittierten Lichts (elektromagnetische Strahlung) wird als Informations-Quelle genutzt; die wichtigsten Wellenlängen, die als Signale von der Pflanze wahrgenommen werden, sind das relativ kurzwellige Licht aus dem UV-Bereich (280 bis 320 nm), das BL (320 bis 550 nm) und das rote bzw. dunkelrote Licht (RL, FRL, 600 bis 750 nm). Aber nicht nur die Qualität des Lichts (Wellenlänge λ (nm)), sondern auch die Intensität (Beleuchtungsstärke E ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)), die Einstrahldauer (Zeit t (s)) sowie der Einstrahlwinkel (Winkel \angle ($^\circ$)) beinhalten spezifische Informationen. Um die distinkten Licht-Signale zu detektieren und die darin zugrundeliegenden Informationen zu verarbeiten, besitzen Pflanzen unterschiedliche Photorezeptoren, die nach der Perzeption die charakteristischen physiologischen Prozesse und Reaktionen initiieren. Für die Perzeption des UV-Lichts ist der UV-B-Rezeptor (UVR8) verantwortlich, BL wird von den ZEITLUPE-Proteinen (ZTL, FKF1, LKP2), den Cryptochromen (cry1/2) und den Phototropinen (PHOT1/2) detektiert, RL wird über die Phytochrome (phyA/B/C/D/E) wahrgenommen. Hinsichtlich der phototropen Reaktion, der Stomata-Öffnung und den Chloroplasten-Bewegungen ist speziell das BL der ausschlaggebende Wellenlängenbereich (zu einem geringen Anteil auch UV-B und RL).

1.3.2 Der Phototropismus

Unter dem Begriff Phototropismus versteht man im engeren Sinne das gerichtete Wachstum bzw. die Reorientierung pflanzlicher Organe in Richtung einer einfallenden Licht-Quelle (positiver Phototropismus (Hypokotyl): zum Licht hin, negativer Phototropismus (Wurzel): vom Licht weg).

Charles und Francis Darwin beschrieben bzgl. ihren Experimenten mit Gras-Keimlingen eine mysteriöse Substanz, die in der Spitze der Koleoptile, wo primär die Perzeption des Lichts abläuft, gebildet und sprossabwärts transportiert wird; hier findet das gerichtete Wachstum als Antwort auf dieses Signal statt (Darwin et al., 1880). Die Substanz wurde als das Pflanzen-Hormon Auxin identifiziert, was entscheidend dazu beitrug die sog. Cholodny-Went-Theorie aufzustellen (Went and Thimann, 1937). Die Theorie postuliert, dass ein Tropismus (gerichteter Wachstums-Prozess) aus einer lateralen Umverteilung von Auxin als Antwort auf einen gerichteten Reiz resultiert. In Bezug auf die phototrope Reaktion eines Keimlings bedeutet dies, dass nach BL-Perzeption primär ein longitudinaler Transport (ausgehend vom Sprossapikal-Meristem den Spross abwärts) und darauffolgend eine transversale/laterale Auxin-Umverteilung, von der belichteten zur beschatteten Seite, stattfinden muss, was die Etablierung eines Auxin-Gradienten bewerkstelligt; dies führt zu

einer differentiellen Auxin-induzierten Zellstreckung in den unterschiedlichen Geweben (belichtet < beschattet) und somit zu einer Krümmung des Keimlings in Richtung der Licht-Quelle.

Um die fundamentalen Mechanismen des Phototropismus verstehen zu können, sollen die an den primären Prozessen beteiligten/bis dato bekannten Proteine beschrieben werden (Liscum et al., 2014).

Die Phototropine (PHOTs) sind die primären Rezeptoren, die den BL-induzierten Phototropismus sowie andere BL-vermittelte Reaktionen modulieren. Höhere Pflanzen besitzen zwei PHOTs (PHOT1/2 (Huala et al., 1997; Jarillo et al., 2001; Suetsugu and Wada, 2013)). Unter niedrigen BL-Intensitäten kontrolliert PHOT1 den Phototropismus; unter moderaten bis hohen BL-Verhältnissen agieren PHOT1 und PHOT2 redundant (Liscum and Briggs, 1995; Sakai et al., 2000; Sakai et al., 2001). Sie vermitteln noch weitere durch BL-induzierte Reaktionen; beide PHOTs regulieren redundant die Stomata-Öffnung (Kinoshita et al., 2001), die Entwicklung/Spreitung der Kotyledonen/Blätter sowie deren Positionierung (Sakamoto and Briggs, 2002; Ohgishi et al., 2004; Takemiya et al., 2005; Inoue et al., 2008; Han et al., 2013). Außerdem modulieren die PHOTs die Chloroplasten-Bewegungen; unter niedrigen Licht-Verhältnissen stimulieren sie die Chloroplasten-Akkumulation (Sakai et al., 2001), unter hohen Intensitäten initiiert PHOT2 die Chloroplasten-„Avoidance“-Reaktion (Jarillo et al., 2001; Kagawa et al., 2001; Sakai et al., 2001; Kasahara et al., 2002).

Die PHOTs weisen einen identischen strukturellen Aufbau auf: die N-terminale Hälfte beinhaltet die photosensorische Region, die C-terminale Hälfte die Protein-Kinase-Domäne (PKD (Christie, 2007; Tokutomi et al., 2008; Suetsugu and Wada, 2013)). Der photosensorische Teil besteht aus zwei Domänen, LOV1 (für „light, oxygen and voltage“) und LOV2, an die jeweils ein Flavin-Mono-Nukleotid-Molekül (FMN) als Licht-absorbierende Gruppe assoziiert ist (Huala et al., 1997; Christie et al., 1998; Christie, 2007). Im Dunkeln ist das FMN-Molekül nicht-kovalent mit den LOV-Domänen assoziiert; nach BL-Absorption wird ein reversibler „Photozyklus“ initiiert, indem das aktivierte FMN ein kovalentes Addukt mit einem Cystein-Rest der LOV-Domänen ausbildet (Christie et al., 1999; Salomon et al., 2000; Christie et al., 2002). Der LOV1-Domäne wird die Regulation der Rezeptor-Di/Multi-Merisierung zugesprochen (Salomon et al., 2004; Nakasako et al., 2008; Nakasone et al., 2013); LOV2 scheint die Regulation der PKD über einen BL-induzierten Derepressions-Mechanismus auszuüben (Christie et al., 2002; Harper et al., 2003; Harper et al., 2004; Jones et al., 2007; Jones and Christie, 2008; Nakasako et al., 2008; Tokutomi et al., 2008). In Abwesenheit von Licht findet eine sterische Inhibierung der PKD durch LOV2 statt. Nach BL-Absorption kommt es zu strukturellen Veränderungen, was zur Derepression der PKD und zu multiplen Autophosphorylierungs-Prozessen führt (Inoue et al., 2008; Sullivan et al., 2008; Inoue et al., 2011). Die phosphorylierten PHOTs scheinen die aktivierte Form darzustellen (Christie, 2007; Tokutomi et al., 2008).

Die PKD der PHOTs bilden die AGC4-Unterfamilie der AGC-VIII-Superfamilie aus (Galvan-Ampudia and Offringa, 2007). Mehrere AS-Reste der PHOT1-PKD sind für ihre Funktion und die Signal-Übertragung essentiell. Eine inaktive Kinase-Mutante von PHOT1 schwächte die Signaltransduktion und entsprechende Reaktionen ab (Christie et al., 2002; Inoue et al., 2008). Mehrere Autophosphorylierungs-Stellen sind für die PHOT-Funktion entscheidend (Salomon et al., 2003; Inoue et al., 2008; Sullivan et al., 2008): Austausch zu Alanin resultierten in einem Defekt diverser BL-vermittelter Prozesse (Inoue et al., 2008); die Autophosphorylierung scheint für die PHOT1-Signaltransduktion essentiell zu sein.

Beide PHOTs assoziieren in dunkel-gewachsenen Keimlingen an der PM (Christie, 2007). Ein Teil von PHOT-GFP-Fusions-Proteinen relokalisiert als Antwort auf BL intrazellulär (Sakamoto and Briggs, 2002; Kong et al., 2006; Kong et al., 2007; Aihara et al., 2008; Kong and Nagatani, 2008; Wan et al., 2008); PHOT2 relokalisiert am Golgi-Apparat (Kong et al., 2006; Kong et al., 2007; Aihara et al., 2008; Kong and Nagatani, 2008), der Zielort von PHOT1 konnte bis jetzt nicht aufgeklärt werden (Sakamoto and Briggs, 2002; Han et al., 2008; Wan et al., 2008). PHOT1-GFP assoziiert als Reaktion auf BL mit Clathrin, was vermuten lässt, dass es über eine Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert wird (Kaiserli et al., 2009; Roberts et al., 2011). Die Autophosphorylierung von PHOT1 scheint sowohl für die Internalisierung (Kaiserli et al., 2009) als auch für die phototrope Reaktion essentiell zu sein (Inoue et al., 2008). Interessanterweise verstärkt die Retention von PHOT1 an der PM den Phototropismus (RL-abhängige Phytochrom A (RL/FRL-Rezeptor)-vermittelte Reaktion (Han et al., 2008)).

In Zellen von Pilzen und Tieren induziert die Liganden-Bindung oftmals die Mono/Multi-Ubiquitinierung eines PM-lokalisierten Rezeptors und hat eine Clathrin-vermittelte Endozytose zur Folge (Haglund and Dikic, 2012). Ergebnisse, dass PHOT1 nach niedrigen BL-Intensitäten Mono/Multi-ubiquitiniert wird und dass diese posttranslationale Modifikation für eine normale phototrope Reaktion nötig ist (Roberts et al., 2011), lassen einen ähnlichen Mechanismus für die BL-induzierte Internalisierung von PHOT1 vermuten.

Diverse IPs der PHOTs spielen hinsichtlich des Phototropismus entscheidende Rollen. „NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTYL 3“ (NPH3) wurde ursprünglich als eine phototrope „loss-of-function“-Mutante in *Arabidopsis* identifiziert (Liscum and Briggs, 1995); das Gen kodiert für ein Protein mit einer N-terminalen „Broad-complex, Tramtrack, and Bric-à-brac“ (BTB)- (Pfam, PF03000) und einer C-terminalen „Coiled Coil“-Domäne (Motchoulski and Liscum, 1999; Pedmale et al., 2010). NPH3 ist in *Arabidopsis* eines von 33 Mitgliedern der „NPH3/RPT2-Like“-Protein-Familie (NRLs), die durch die zentrale NPH3-Domäne charakterisiert wird (Motchoulski and Liscum, 1999; Inada et al., 2004; Pedmale and Liscum, 2007; Pedmale et al., 2010; Sakai and Haga, 2012). Das Protein assoziiert offenbar über seine C-terminale Domäne mit der PM (Motchoulski and Liscum, 1999; Inada et al.,

2004) und ist unter niedrigen (PHOT1-abhängig) und hohen BL-Intensitäten (PHOT1/2-abhängig) für die phototrope Signaltransduktion essentiell (Motchoulski and Liscum, 1999; Roberts et al., 2011). NPH3 kolokalisiert mit PHOT1 an der PM und interagiert auch physisch mit dem Rezeptor (Motchoulski and Liscum, 1999); die Interaktion wird über den N-Terminus von PHOT1 (LOV-Domänen) und die C-terminale „Coiled Coil“-Region von NPH3 vermittelt (Motchoulski and Liscum, 1999; Inada et al., 2004).

Der Phosphorylierungs-Status von NPH3 moduliert dessen Funktion bzgl. der phototropen Signaltransduktion (Pedmale and Liscum, 2007; Haga et al., 2015); im Dunkeln liegt NPH3 phosphoryliert vor, nach BL-Exposition dominiert die dephosphorylierte Form. Dieser Prozess ist PHOT1-abhängig; die Inhibierung der Dephosphorylierung (genetisch/pharmakologisch) verhindert die phototrope Reaktion und lässt vermuten, dass die dephosphorylierte Form von NPH3 für die Signaltransduktion essentiell ist. Für die Dephosphorylierung von NPH3 ist vermutlich eine Protein-Phosphatase des Typ 1 bzw. 2A verantwortlich (Pedmale and Liscum, 2007); ein „Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) 3/6“-Komplex ist bei der Phosphorylierung von NPH3 (S466) im Dunkeln involviert (Hoehenwarter et al., 2013).

NPH3 interagiert mit CULLIN3 (CUL3), als Substrat-Adapter für einen CRL3^{NPH3} (für „Cullin-RING ubiquitin ligase“-Komplex, der PHOT1 ubiquitiniert (Roberts et al., 2011). Unter hohen BL-Intensitäten wurde PHOT1 Mono/Multi- und Poly-ubiquitiniert; die Poly-Ubiquitinierung scheint den Photorezeptor für die Degradierung über das 26S-Proteasom zu markieren, was ein Mittel darstellt, die Signaltransduktion unter diesen Licht-Verhältnissen abzuschwächen. Unter niedrigen BL-Intensitäten wurde PHOT1 Mono/Multi-ubiquitiniert; genetische Studien zeigten, dass die Mono/Multi-Ubiquitinierung von PHOT1 für die Etablierung phototroper Reaktionen nötig ist (Roberts et al., 2011).

„ROOT PHOTOTROPISM 2“ (RPT2) ist ein weiteres Mitglied der NRLs (Motchoulski and Liscum, 1999; Inada et al., 2004; Pedmale and Liscum, 2007; Sakai and Haga, 2012). Obwohl ursprünglich in einer Sichtung von *Arabidopsis*-Keimlingen mit Defekten bzgl. des Wurzel-Phototropismus identifiziert (Okada and Shimura, 1992), weisen *rpt2*-Mutanten unter hohen BL-Intensitäten (PHOT1/2-abhängig) einen gestörten Hypokotyl-Phototropismus auf; unter niedrigen BL-Bedingungen (PHOT1-abhängig) reagieren sie aber normal (Sakai et al., 2000). Der spezifisch auftretende Phänotyp (hohe BL-Intensitäten) kann zum Teil dadurch erklärt werden, dass die Transkription von RPT2 durch BL und RL in einer Intensität-abhängigen Art und Weise, über die Aktivität der Cryptochrome (cry, BL) und Phytochrome (phy, RL) induziert wird (Sakai et al., 2000; Tsuchida-Mayama et al., 2010).

RPT2 assoziiert, analog zu den PHOTs und NPH3, an der PM und interagiert *in planta* sowohl mit PHOT1 als auch NPH3 (Inada et al., 2004). Die Interaktion von RPT2 mit dem N-terminalen Teil von PHOT1 (LOV-Domänen) findet über die N-terminale RPT2-Hälfte (BTB-Domäne) statt (Inada et al.,

2004). Die Hetero-Dimerisierung von RPT2 und NPH3 wird ebenfalls über die BTB-Bereiche beider Proteine vermittelt (Inada et al., 2004). Es ist nicht bekannt, ob RPT2 und CUL3 interagieren; interessanterweise binden Proteine die BTB-Domänen beinhalten ihren entsprechenden CRL3-Komplex als Homo-/Heterodimer bzw. Oligomer (Perez-Torrado et al., 2006). Dies lässt Spekulationen zu, dass der Phototropismus unter niedrigen BL-Intensitäten die Aktivität von CRL3^{NPH3} benötigt, während unter hohen BL-Intensitäten die Funktion von CRL3^{NPH3/RPT2} ausschlaggebend ist (Hohm et al., 2013).

Es gibt vier „PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE“ (PKS)-Proteine in *Arabidopsis* (de Carbonnel et al., 2010); PKS1 wurde ursprünglich in einem „Screen“ für phyA-interagierende Proteine identifiziert (Fankhauser et al., 1999). PKS1/2/4 werden mit PHOT1-vermittelten BL-Prozessen in Verbindung gebracht (Hypokotyl/Wurzel-Phototropismus, Blatt-Spreitung/Positionierung (Lariguet et al., 2006; Boccalandro et al., 2008; de Carbonnel et al., 2010)). PKS1 interagiert *in planta* sowohl mit PHOT1 als auch NPH3 (Lariguet et al., 2006). PKS4 interagiert *in planta* ebenfalls mit PHOT1 und stellt ein Substrat für die Phosphorylierung durch PHOT1 dar (Demarsy et al., 2012). Obwohl PKS4 für die phototrope Signaltransduktion nicht essentiell ist, hat seine Licht-abhängige Phosphorylierung evtl. eine Funktion in einer negativen „Feedback“-Schleife, die den Phototropismus reguliert (Demarsy et al., 2012). PKS-Proteine sind evtl. bei der Regulation von Licht-abhängigen Veränderungen des Auxin-Transports involviert (de Carbonnel et al., 2010).

ABCB19, ein Mitglied der „ATP binding cassette B“ (ABCB)-Familie von Trans-Membran-Transportern (Verrier et al., 2008) und Auxin-Efflux-„Carrier“ (Blakeslee et al., 2007), interagiert *in planta* mit PHOT1 und stellt ebenfalls ein *in vitro*-Substrat für die Phosphorylierung durch PHOT1 dar (Christie et al., 2011); im HeLa-Zell-System wird die Auxin-Efflux-Aktivität von ABCB19 durch eine PHOT1-abhängige Phosphorylierung inhibiert (Christie et al., 2011). Interessanterweise weisen *abcb19*-„loss-of-function“-Mutanten eine verstärkte phototrope Reaktion auf (Noh et al., 2003); dies stimmt mit dem Modell überein, dass die PHOT1-vermittelte Inhibierung der ABCB19-Aktivität den Ablauf der phototropen Krümmung positiv beeinflusst (Christie and Murphy, 2013; Spalding, 2013).

Um zu erklären wie tropistische Reaktionen molekular etabliert werden, wird die Cholodny-Went-Hypothese herangezogen (Went and Thimann, 1937). Auxin (IAA) und seine durch die Umwelt-regulierte differentielle Akkumulation spielen diesbezüglich die Hauptrolle. Obwohl die *de novo*-Synthese von Auxin in fast allen Pflanzen-Geweben stattfinden kann (Peer et al., 2011; Ljung, 2013), wird die differentielle Auxin-Akkumulation, als Reaktion auf tropistische Stimulation, durch Veränderungen des Auxin-Transports (Lang-/Kurzstrecken) bewerkstelligt (Christie and Murphy, 2013; Hohm et al., 2013; Ljung, 2013; Spalding, 2013). Thermodynamische Eigenschaften (Vorkommen von IAA als Ion, pH-Unterschied zwischen dem Zellinneren (neutral) und der umgebenden Zellwand (sauer)) bestimmen, dass der Auxin-Efflux für den interzellularen Transport

vermittelt werden muss (Goldsmith, 1977). Zur Etablierung eines chemiosmotischen Modells stellen drei Klassen von Auxin-Transportern die molekularen Strukturen zur Verfügung (Spalding, 2013).

Es gibt acht „PIN-FORMED“ (PIN)-Proteine in *Arabidopsis*: PIN1/2/3/4 und PIN7 sind kanonische Transport-Proteine und vermitteln den Auxin-Efflux an der PM; PIN5/6/8 sind verkürzt und sind für den intrazellulären Auxin-Transport verantwortlich (Krecek et al., 2009; Christie and Murphy, 2013). Die kanonischen PINs lokalisieren größtenteils asymmetrisch (polar) an der PM; PIN1/2 agieren offenbar als die wichtigsten Auxin-Efflux-„Carrier“ im Spross und in der Wurzel während der Entwicklung (Grunewald and Friml, 2010; Christie and Murphy, 2013). PIN3/4/7 weisen eine eingeschränkte Expression auf und ihre intrazelluläre Lokalisation (apolar/polar) ist bzgl. Entwicklungs- und Umwelt-bezogener Signalen besonders sensibel (Grunewald and Friml, 2010; Christie and Murphy, 2013). PIN3 ist z.B. in Hypokotyl/Wurzel-Zellen von Dunkel-angezogenen *Arabidopsis*-Keimlingen apolar verteilt; die phototrope Stimulation induziert eine polare PIN3-Relokalisation auf die laterale Seite spezifischer Zellen, vermutlich durch Veränderungen der ARF-GEF-abhängigen endozytotischen Rezyklierung bzw. durch Transzytose von der Außen- zur Innen-Seite der PM der Zellen, was die Ausbildung eines PIN3-Gradienten über den Hypokotyl/Wurzel-Querschnitt zur Folge hat (Friml et al., 2002; Ding et al., 2011; Kleine-Vehn et al., 2011; Zhang et al., 2013). Dies ist analog zur Etablierung eines Trans-Hypokotyl-Gradienten von Auxin als Reaktion auf eine unilaterale BL-Irradiation, die mittels eines Auxin-„responsiven“ Reporters (DR5rev::GFP) beobachtet werden kann (Friml et al., 2002; Ding et al., 2011). Die Ausbildung der PIN3-Polarität und des Auxin-Gradienten werden in einem *phot1*-Hintergrund komplett aufgehoben (Ding et al., 2011). *pin3*-„Null“-Mutanten weisen allerdings nur eine moderate Reduktion ihres phototropen Reaktions-Vermögens auf (Christie et al., 2011; Ding et al., 2011; Zhang et al., 2013). Zusätzliche Auxin-Transporter müssen deshalb zur Etablierung des lateralen Auxin-Gradienten beitragen. Analysen von Keimlingen mit Mutationen in mehreren PIN-Genen lassen vermuten, dass alle kanonischen PINs unter spezifischen Bedingungen bzgl. phototroper Reaktionen involviert sind (Christie et al., 2011; Ding et al., 2011; Haga and Sakai, 2012; Wan et al., 2012; Willige et al., 2013).

Drei (ABCB1/4/19) der 21 Mitglieder der ABCB-Familie sind Auxin-Transporter (Verrier et al., 2008; Peer et al., 2011); sie weisen aber keine starke polare intrazelluläre Lokalisation an der PM auf (Cho et al., 2007; Wu et al., 2007). ABCB1/4 sind nicht beim Phototropismus involviert, jedoch haben *abcb19*-Mutanten eine verstärkte phototrope Reaktion (Noh et al., 2003; Nagashima et al., 2008). ABCB19 agiert bzgl. des longitudinalen Auxin-Transports kooperativ mit PIN1 (Noh et al., 2003), vermutlich über eine ABCB19-abhängige Stabilisierung der PIN-Lokalisation an der PM (Blakeslee et al., 2007; Titapiwatanakun et al., 2009). Der Verlust der ABCB19-Funktion, durch Mutation (Noh et al., 2003; Nagashima et al., 2008) oder über eine PHOT1-abhängige Phosphorylierung (Christie et al.,

2011), führte zu einer erhöhten Auxin-Konzentration im Hypokotyl (oberhalb der Elongationszone (Christie et al., 2011)).

Die protonierte Form von IAA (IAAH, kommt in der Zellwand vor) kann passiv in die Zelle eintreten; die dissoziierte Form (IAA⁻, ca. 85 % des Auxins in der Zellwand) kann nur durch einen vermittelten Transport in die Zelle überführt werden (Goldsmith, 1977). Die Identifizierung des „AUXIN RESISTANT 1“ (AUX1)-Gens war der erste Beweis für einen Auxin-Influx-„Carrier“ (Bennett et al., 1996). AUX1 ist ein Mitglied der AUX1/LAX („LIKE-AUX1“-)Familie (besteht aus vier Genen) in *Arabidopsis*; die Proteine besitzen Ähnlichkeit zu AS-Transportern (Swarup and Peret, 2012) und agieren bzgl. des Auxin-Influges als IAA⁻/H⁺-Symporter (Yang et al., 2006; Swarup et al., 2008; Peret et al., 2012). Die phototropen Phänotypen von *aux/lax*-Mutanten sind subtil und häufig konditional. Die *aux1*-„loss-of-function“-Mutante bedingt einen verstärkten Wurzel-Phototropismus (Okada and Shimura, 1992), hat aber keinen Einfluss auf den Hypokotyl-Phototropismus (Watahiki et al., 1999; Stone et al., 2008). Die Kombination von *aux1*- mit *lax2*- und *lax3*-Mutationen (Christie et al., 2011) bzw. mit der *nph4/arf7*-„Null“-Mutation (Stone et al., 2008) hat jedoch geringfügige Defekte hinsichtlich des Hypokotyl-Phototropismus zur Folge. Der AUX1/LAX-vermittelte Auxin-Influx ist vermutlich nicht essentiell für den Phototropismus, kann aber unter Auxin-Mangel oder wenn das Reaktionsvermögen bzgl. des Hormons beeinträchtigt ist eine Rolle spielen (Stone et al., 2008; Hohm et al., 2013).

Die Phosphorylierung der Auxin-Efflux-„Carrier“ (ABCs, PINs) durch die AGC-VIII-Superfamilie der Protein-Kinasen wurde als weiterer Regulations-Mechanismus des Auxin-Transports identifiziert (Dhonukshe, 2011; Lofke et al., 2013; Offringa and Huang, 2013). Die Transport-Kapazität von ABCB19 wird durch die Phosphorylierung durch PHOT1 (AGC4-Kinase) supprimiert (Christie et al., 2011). PIN3 stellt ein *in vitro*-Substrat für die „D6 PROTEIN KINASE“ (D6PK, AGC1-Kinase) dar (Zourelidou et al., 2009); die PIN3-Phosphorylierung *in planta* war in *d6pk*-Mutanten, die eine gestörte phototrope Reaktion des Hypokotyls aufweisen, aufgehoben (Willige et al., 2013). Die D6PK-vermittelte Phosphorylierung von PIN3 ist BL- bzw. PHOT-unabhängig; die PHOT1-abhängige Relokalisation von PIN3 läuft in *d6pk*-Mutanten ebenfalls normal ab (Willige et al., 2013). Der longitudinale polare Auxin-Transport ist im Hypokotyl von *d6pk*-Mutanten beeinträchtigt; dies lässt vermuten, dass die D6PK-abhängige Phosphorylierung von PIN3 (evtl. PIN4/7) die Transport-Aktivität positiv beeinflusst (Willige et al., 2013).

Die AGC3-Unterfamilie (beinhaltet PID („PINOID“), WAG1/2 (Galvan-Ampudia and Offringa, 2007)), weist ebenfalls eine Beteiligung bzgl. des Auxin-Transports auf; AGC3-Kinasen operieren vermutlich zusammen mit den ARF-GEFs in einer regulatorischen Schleife, um die intrazelluläre Rezyklierung und die polare PIN-Lokalisation zu kontrollieren (Dhonukshe, 2011; Lofke et al., 2013; Offringa and Huang, 2013). PIN3 ist ein *in vitro*-Substrat für die Phosphorylierung durch PID; *pid/wag1/2*-Triple-

Mutanten weisen eine supprimierte BL-induzierte laterale PIN3-Relokalisation und ein supprimiertes phototropes Reaktions-Vermögen auf (Ding et al., 2011). Die BFA (Inhibitor von Komplexen des vesikulären „Traffickings“ die ARF-GEFs beinhalten)-Behandlung von Keimlingen führt zu einer gestörten PIN3-Relokalisation als Reaktion auf die phototrope Stimulation (Ding et al., 2011). Keimlinge, die eine „loss-of-function“-Mutation in GNOM (ARF-GEF das im PIN-„Trafficking“ involviert ist (Dhonukshe, 2011; Lofke et al., 2013)) tragen, weisen einen reduzierten Hypokotyl-Phototropismus auf (Ding et al., 2011). Die Aktivität von AGC3 und ARF-GEFs haben vermutlich Auswirkungen auf die PHOT1-abhängige laterale PIN3-Relokalisation.

Die Ubiquitinierung erwies sich als ein weiteres dynamisches Mittel die PIN-Funktionen zu regulieren (Korbei and Luschnig, 2013; Lofke et al., 2013). Bis dato besteht noch kein Zusammenhang zwischen der PIN-Ubiquitinierung und dem Phototropismus, jedoch wird die PIN2-Funktion bzgl. des Wurzel-Gravitropismus durch dessen Ubiquitinierung dramatisch beeinflusst (Leitner et al., 2012; Leitner et al., 2012). PIN2 verändert, als Reaktion auf gravitrope Stimulation, seine laterale Abundanz an der PM über den Wurzel-Querschnitt (Abas et al., 2006), ähnlich der dynamischen Umverteilung von PIN3 in phototrop-stimulierten Wurzeln (Zhang et al., 2013). Die gravitrope Umverteilung von PIN2 scheint das Ergebnis aus der Kombination einer differentiellen Stabilisierung des Transporters an der PM und Veränderungen endozytotischer Sortierungs-Prozesse zu sein, was zur Markierung und zur Degradierung von PIN2 über die lytische Vakuole führt (Korbei and Luschnig, 2013). Die Poly-Ubiquitinierung von PIN2 scheint diesen Prozess, zumindest in Teilen, zu regulieren (Leitner et al., 2012; Leitner et al., 2012).

PHOT1 und PHOT2 werden nach BL-Aktivierung durch Endozytose von der PM internalisiert (Sakamoto and Briggs, 2002; Kong et al., 2006; Kong et al., 2007; Aihara et al., 2008; Kong and Nagatani, 2008; Wan et al., 2008). Dieses Ereignis scheint für das phototrope Reaktions-Vermögen von PHOT1 nötig zu sein (Kaiserli et al., 2009). Die internalisierten PHOTs könnten die phototrop-aktive Form der Rezeptoren darstellen (s. endosomale Signaltransduktions-Modelle (Contento and Bassham, 2012; Haglund and Dikic, 2012)); es erscheint aber ebenso plausibel, dass die reine An- oder Abwesenheit von PHOT1 an der PM für die Signal-Weiterleitung entscheidend ist. Die Relokalisation von PHOT1 beeinflusst evtl. die PM-Abundanz oder das intrazelluläre „Trafficking“ anderer Moleküle (z.B. der PINs oder ABCB-Proteine) und verändert dadurch ihre Aktivität und die Etablierung eines lateralen Auxin-Gradienten. Die Tatsache, dass PHOT1, NPH3, RPT2, PKS-, ABCB- und PIN-Proteine, aufgrund ihrer diversen Protein-Protein-Interaktionen, zusammen in Mikro-Domänen an/in der PM „clustern“, unterstützt ein solches Szenario (Titapiwatanakun et al., 2009; Yang et al., 2013).

Über die BL-induzierte Signaltransduktion finden ebenfalls transkriptionelle Veränderungen hinsichtlich der Expression unterschiedlicher relevanter Gene statt, auf diese soll in diesem Zusammenhang aber nicht näher eingegangen werden.

1.4 Experimentelle Herangehensweise

Um neue IPs für 14-3-3 Proteine zu finden und deren Beteiligung in physiologisch relevanten Prozessen zu untersuchen, wurden bislang diverse Ansätze in unterschiedlichen Organismen unternommen. Den primär im tierischen System entdeckten 14-3-3 Proteinen wurde ursprünglich eine regulatorische Funktion im Zell-Wachstum, in der Zell-Teilung, in Apoptose-Prozessen, bei Krebs-verursachenden Abläufen und neuerdings auch im Zell-„Signaling“ zugesprochen; die Zahl anderer regulatorischer Prozesse in denen sie eine funktionale Rolle übernehmen erhöhte sich seither konstant.

Zu Beginn der Untersuchungen bzgl. der vorliegenden Arbeit waren für pflanzliche 14-3-3 Proteine fast ausschließlich im Metabolismus beteiligte IPs bekannt; ihre Identifizierung wurde, bis auf wenige Ausnahmen, durch Protein-Affinitäts-Aufreinigung und anschließender MS-Analyse bewerkstelligt. Bis zu diesem Zeitpunkt waren noch keine proteomweiten Sichtungen mit dem Hefe-2-Hybrid-System, das ebenfalls eine geeignete und vielversprechende Methode zur Identifizierung neuer IPs darstellt, durchgeführt worden.

Dies veranlasste uns eine cDNA-Bibliothek mittels Hefe-2-Hybrid-System auf neue IPs von 14-3-3 Proteinen zu untersuchen. Die aus den Sichtungen gewonnenen Daten bzgl. neuen putativen IPs wurden analysiert und eine Fokussierung auf definierte IPs fand statt; die Interaktion wurde mit den entsprechenden Vollängen-Proteinen verifiziert, die 14-3-3 Bindestelle identifiziert und die subzelluläre Lokalisation der wildtypischen und der nicht mehr zur Interaktion befähigten veränderten Proteine analysiert. Die 14-3-3 Interaktion wurde auf ihre physiologische Relevanz untersucht und die eventuellen Auswirkungen auf den Phänotyp charakterisiert. Aus den experimentell gewonnenen und den aus der Literatur soweit bekannten Ergebnissen wurde ein hypothetisches Modell erstellt und eventuelle Mechanismen abgeleitet.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Software

| | |
|--|--|
| Analysewaage, MC1 AC 120 S | Sartorius AG, Göttingen |
| Autoklav, DX-150 | Systemec GmbH, Linden |
| Autoklav, Vapoklav Typ 500 | H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim |
| Aufrechtes Mikroskop, Axiophot | Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena |
| Blotkammer, TE 22 Mini Tank Transfer Unit | GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg |
| Blaulicht-Kammer | Universitätswerkstatt, Tübingen |
| Compact FLIM und FCS Upgrade Kit | PicoQuant GmbH, Berlin |
| Digitalkamera, EOS 700D, EOS DSLRs | Canon Deutschland GmbH, Krefeld |
| DURAN® Vakuum Exsikkator | DURAN Glastechnik GmbH & Co. KG, Wertheim/Main |
| Elektronische Dosierhilfe, EDOS® 5222 | Eppendorf AG, Hamburg |
| Farbrohr für Leuchtstoffröhren (T12), blau | EUROLITE GmbH, Sankt Augustin |
| Flachbettkammer für Agarosegele | Universitätswerkstatt, Bochum |
| Fluoreszenz-Mikroskop, ECLIPSE 90i | Nikon Instruments Europe B.V., Düsseldorf |
| Fluoreszenz-Stereomikroskop, MZ FLIII | Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar |
| Geldokumentationssystem, E-BOX VX2 2.0 MP | VWR International GmbH Life Science Competence Center, Erlangen |
| Homogenisator nach Potter-Elvehjem, Micro Tissue Grinder (0,5 ml) | Wheaton Industries Inc., Millville, NJ, USA |
| Horizontalschüttler, Rotamax 120 | Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach |
| Inkubator/Brutschrank, BD 400 | Binder GmbH, Tuttlingen |
| Inkubator/Brutschrank, HettCube 600R | Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen |
| Inkubator/Brutschrank, UM 660 | Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach |
| Inkubationsschüttler, Certomat BS-1 | Sartorius AG, Göttingen |
| Inkubationsschüttler, Certomat IS | Sartorius AG, Göttingen |
| Inkubationsschüttler, G24 Environmental Incubator Shaker | New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, NJ, USA |
| Inkubationsschüttler, Innova 44 | New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, NJ, USA |

| | |
|--|--|
| Klimakonstantkammer | Universitätswerkstatt, Bochum |
| Konfokale Laser-Scanning-Mikroskope, Spectral Confocal & multiphoton system Leica TCS SP2 Confocal Laser Scanning Platform Leica TCS SP8 | Leica Mikrosysteme CMS GmbH, Wetzlar Leica Mikrosysteme CMS GmbH, Wetzlar |
| Laborglas-Reinigungs- und Desinfektionsautomat, G 7883 | Miele & Cie. KG, Gütersloh |
| Magnetrührer mit Heizung, MR 3001 K | Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach |
| Medizinischer Drucker, P93DW | Mitsubishi Electric Europe B.V., Ratingen |
| Microplate reader, Safire | Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz |
| Mikrowelle, MWG 775 H | Clatronic International GmbH, Kempen |
| Milli-Q® Reference Wasseraufbereitungssystem | Merck Chemicals GmbH, Darmstadt |
| Minigel G41, vertikale PAGE-Apparatur | Biometra GmbH, Göttingen |
| Mini-PROTEAN® 3 Elektrophorese- und Blot-System | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| NanoDrop, ND-1000 Spectrophotometer V3.5 | NanoDrop Technologies, LLC, Wilmington, DE, USA |
| PCR-Gerät, Mastercycler gradient | Eppendorf AG, Hamburg |
| PCR-Gerät, Mastercycler personal | Eppendorf AG, Hamburg |
| PCR-Gerät, peqSTAR 96X Universal Gradient | VWR International GmbH Life Science Competence Center, Erlangen |
| PCR-Gerät, PTC-100™ Thermal Cycler | MJ Research, Inc., Waltham, MA, USA |
| pH-Messgerät, FiveEasy™ FE20 | Mettler-Toledo GmbH, Gießen |
| Pinzette, Dumont WA # 5 - FST Exclusive (Biology) | Manufactures D'Outils Dumont SA, Montignez, Schweiz |
| Präzisionswaage, PLJ-C | KERN & SOHN GmbH, Balingen-Frommern |
| Rührgerät, RZR 2041 | Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach |
| Scanner, EXPRESSION 1680 PRO | Epson Deutschland GmbH, Meerbusch |
| Scanner, PERFECTION V700 PHOTO | Epson Deutschland GmbH, Meerbusch |
| Scherbenerzeuger, Scotsman® MF 36 | Hubbard Systems, Great Blakenham, U.K. |
| Schüttler/„Shaker“, POLYMAX 1040 | Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach |
| Schüttler/„Shaker“, TPM-2 | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht |

Software:

| | |
|---|---|
| Adobe® Acrobat® 9 PRO, Illustrator® CS5, Photoshop® CS5 | Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA |
| CLC Main Workbench 7.7.3 | CLC bio, Aarhus C, Denmark |
| EndNote® X8 | Clarivate™ Analytics, Boston, MA, USA |
| ImageJ 1.44p | Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, http://imagej.nih.gov/ij/ , 1997-2016 |
| Leica LAS AF Lite | Leica Mikrosysteme CMS GmbH, Wetzlar |
| MetaMorph 6.2 r5 | Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA |
| Microsoft® Office Standard 2010 | Microsoft Corporation, Santa Rosa, CA, USA |
| SigmaPlot 8.0 | Systat Software GmbH, Erkrath |
| SigmaStat 3.0 | Systat Software GmbH, Erkrath |
| SymPhoTime 64 | PicoQuant GmbH, Berlin |
| Vector NTI® Version 11.5 | Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig |
| Spannungsgeber, Electrophoresis Power Supply E865 | Consort bvba, Turnhout, Belgien |
| Spannungsgeber, PowerPac 300 und 1000 | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| Spektrophotometer, BioSpectrometer® basic | Eppendorf AG, Hamburg |
| Spektrophotometer, Ultrospec 3100 <i>pro</i> | GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg |
| Stereomikroskop (Binokular), Wiloskop - F, Zoom mit Stativ ST - AD LED | Helmut Hund GmbH, Wetzlar |
| Sterilbank, AIREGARD Laminar Airflow work station | ibs tecnomara GmbH, Fernwald |
| Sterilbank, Laminar flow | BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen |
| Thermoblock, ThermoStat <i>plus</i> | Eppendorf AG, Hamburg |
| Ultraschall-Homogenisator, SONOPULS GM 70 | BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin |
| UV-Handlampe, NU-6 | Konrad Benda Laborgeräte, Wiesloch |
| Vortex, REAX top | Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach |

Zentrifugen:

| | |
|---|--|
| High Speed Refrigerated Centrifuge, J2-21 (mit SS-34 Rotor) | Beckman Coulter GmbH, Krefeld |
| Micro Centrifuge, 5415D/R und 5417R (mit F-45-24-11/F-45-30-11 Rotor) | Eppendorf AG, Hamburg |
| Micro Ultracentrifuge, himac CS120FNX (mit S55A2 Rotor) | Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan |
| Multipurpose Centrifuge, 5810R (mit A-4-81 Rotor) | Eppendorf AG, Hamburg |
| Superspeed Centrifuge, Sorvall™ RC-3B (mit GSA Rotor) | Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig |
| Superspeed Centrifuge, Sorvall™ RC-5C (mit GSA Rotor) | Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig |
| Superspeed Centrifuge, Sorvall™ R6 Plus (mit Fiberlite™ F12-6 x 500 LEX Rotor) | Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig |
| Ultracentrifuge, Sorvall™ WX80 (mit T-8100 Rotor) | Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig |

Alle weiteren Geräte entsprachen dem Laborstandard.

2.2 Feinchemikalien und Verbrauchsmaterialien

| | |
|--|--|
| 1 kb DNA Ladder | New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main |
| 3-AT (3-Amino-1,2,4-triazole) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Acetosyringon, (3',5'-Dimethoxy-4'-hydroxyacetophenone) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Adenin | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Albumin Fraction V (BSA, „bovine serum albumin“) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Ameisensäure | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |

| | |
|---|--|
| Ammoniumsulfat | Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS) | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg |
| Ampicillin | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Basta® | Bayer CropScience Deutschland GmbH, Langenfeld |
| BCIP/NBT Color Development Substrate, Promega™ (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, nitro blue tetrazolium) | Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig |
| BD Bacto™ Agar | BD Biosciences GmbH, Heidelberg |
| BD Bacto™ Hefe-Extrakt | BD Biosciences GmbH, Heidelberg |
| BD BBL™ Rinder-Extrakt | BD Biosciences GmbH, Heidelberg |
| Benzylaminopurin (BAP), 6-Benzylaminopurine solution (1 mg/ml) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Brefeldin A (BFA) | Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig |
| Bromphenolblau | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Calciumchlorid | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Cantharidin | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Carbenicillin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Chloramphenicol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| cOmplete™ ULTRA Tabletten, EDTA-frei | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Coomassie® Brilliantblau G 250 | Merck Chemicals GmbH, Darmstadt |
| Cycloheximid | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Desoynukleotid-Mix (Deoxynucleotide Mix, dNTPs) | Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig |
| Difco™ LB Agar, Miller (LB-Medium, fest) | BD Biosciences GmbH, Heidelberg |
| Difco™ LB Broth, Miller (LB-Medium, flüssig) | BD Biosciences GmbH, Heidelberg |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Dithiotreitol (DTT) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Entwickler, Carestream® Kodak®, GBX developer/replenisher | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Essigsäure (Eisessig) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Ethanol | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |

| | |
|--|--|
| Ethidiumbromid | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Film, Amersham Hyperfilm™ ECL | GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg |
| Filterpapier, Faltenfilter Sorte 598 (D: 125 mm) | Hahnemühle FineArt GmbH, Dassel |
| Filterpapier, Rundfilter MN 640 m (D: 90 mm) | MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren |
| Fixierer, Carestream® Kodak®, GBX fixer/replenisher | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| FM® 4-64 Dye (N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4- (6-(4-(Diethylamino) Phenyl) Hexatrienyl) Pyridinium Dibromide) | Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig |
| Gel-Ladepuffer (6x) | VWR International GmbH Life Science Competence Center, Erlangen |
| GeneRuler 1 kb DNA Ladder | Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig |
| GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder | Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig |
| Gentamycin Sulfat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Glukose | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Glycerin (≥99,7 % (v/v)) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Glycin | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Greiner CELLSTAR® multiwell culture plates | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Histidin | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Herring Sperm DNA, Promega™ | Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig |
| Hygromycin B | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Immobilon®-P Membran, PVDF (0,45 µm, 26,5 cm x 3,75 m-Rolle) | Merck Chemicals GmbH, Darmstadt |
| Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA Ladder | Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig |
| Isopropanol, 2-Propanol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Isostar Powerplay High Protein 90 neutral | Wander AG, Neuenegg, Schweiz |
| Kaliumacetat | Merck Chemicals GmbH, Darmstadt |
| Kaliumchlorid | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |

| | |
|---|--|
| Kaliumhydroxid | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Kanamycin Sulfat | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg |
| Leucin | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Lithiumacetat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Luminol (3-Aminophthalhydrazid) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Lysin | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Magnesiumchlorid | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Magnesiumsulfat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Mercaptoethanol (β -Mercaptoethanol) | Merck Chemicals GmbH, Darmstadt |
| Methanol | Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig |
| MS-Salze, Murashige & Skoog-Medium („basal salt mixture“) | Duchefa Biochemie B.V, Haarlem, Niederlande |
| Natriumacetat | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Natriumazid | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Natriumchlorid | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Natriumhydroxid | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Natriumhypochloritlösung (12 % (w/v)) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Natriumlaurylsulfat (SDS, „sodium dodecyl sulfate“) | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg |
| Natriumsulfid | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, Kit | MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren |
| NucleoSpin® Plasmid, EasyPure Miniprep Kit | MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren |
| NucleoSpin® RNA Plant, Kit | MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren |
| <i>p</i> -Cumarsäure („ <i>p</i> -Coumaric acid“) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (10 bis 250 kDa) | Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig |
| PARAFILM® M (roll size 4 in. x 125 ft) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Polyethylenglycol 3350 (PEG 3350) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, ≥ 98.5 %) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Phyto-Agar | GOLD BIOTECHNOLOGY, INC.®, St. Louis, MO, USA |
| PIPES (Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Ponceau S | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |

| | |
|--|--|
| Protran® Nitrocellulose Transfer Membran (0,2 µm) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| QIAEX II Gel Extraction Kit | QIAGEN GmbH, Hilden |
| QIAprep Spin Miniprep Kit | QIAGEN GmbH, Hilden |
| Rifampicin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| RNeasy Plant Mini Kit | QIAGEN GmbH, Hilden |
| Roti®-Mark STANDARD Protein-Marker | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Roti®-Quant (5x, Bradford-Reagenz) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Salzsäure | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Schwefelsäure | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| SeaKem™ LE Agarose | Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig |
| Silwet L-77 | Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig |
| Spectinomycin Sulfat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder | Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig |
| Sterilfilter, Nalgene™ 25mm Syringe Filters (SCFA, 0,2 µm) | Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig |
| Sulfadiazin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Tetracyclin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Trypton/Pepton aus Casein | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| TWEEN® 20 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Wasserstoffperoxid 30 % (v/v) ROTIPURAN® | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Whatman® gel blotting paper, Grade GB003 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Yeast Nitrogen Base (YNB, w/o amino acids) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Yeast Synthetic Drop-out Medium Supplements, (w/o Trp, Leu, Ade, His (SD-WLAH)) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Zeocin™ | Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig |

Alle weiteren Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden in Analyse-Qualität von den Firmen Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe), Duchefa Biochemie B.V (Haarlem, Niederlande), SERVA

Electrophoresis GmbH (Heidelberg), Sigma Aldrich Chemie GmbH (München) und Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG (Braunschweig) und bezogen.

2.3 Puffer und Lösungen

2xYT-Medium:

- 1,6 % (w/v) Trypton/Pepton - 16 g/l
- 1 % (w/v) BD Bacto™ Hefe-Extrakt - 10 g/l
- 0,5 % (w/v) NaCl - 5 g/l
- pH 7,4 (HCl)
- autoklavieren

Agarose-Gel-Ladepuffer (3x):

- 0,1 % (w/v) Bromphenolblau - 10 mg/10 ml
- 10 mM EDTA - 200 µl/10 ml 0,5 M EDTA (aus Stock)
- 50 % (v/v) Glycerin - 5 ml/10 ml ≥99,7 % (v/v) Glycerin
- pH 8 (KOH)

AP-Puffer (Alkalische Phosphatase-Puffer):

- 150 mM NaCl - 3 ml/100 ml 5 M NaCl (aus Stock)
- 100 mM Tris-HCl - 10 ml/100 ml 1 M Tris-HCl (aus Stock)
- 1 mM MgCl₂ - 0,1 ml/100 ml 1 M MgCl₂ (aus Stock)
- 0,1 % (v/v) TWEEN® 20 - 0,1 ml/100 ml 100 % (v/v) TWEEN® 20
- pH 9 (NaOH)
- vor der immunologischen Detektion 5 ml AP-Puffer mit 33 µl NBT (50 mg/ml in 70 % DMF) und 16,5 µl BCIP (50 mg/ml in 100 % DMF) versetzen

APS-Lösung (Ammoniumpersulfat, 10 % (w/v)):

- 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat - 1 g/10 ml
- Aliquots a 1 ml herstellen, bei -20 °C lagern
- Arbeits-Aliquot bei 4 °C lagern

Brefeldin A-Lösung (BFA, 1000x):

- 50 mM BFA - 5 mg/357 µl, in DMSO lösen
- Aliquots a 10 µl herstellen, bei -20 °C lagern

CaCl₂-Pufferlösung:

- 60 mM CaCl₂ - 8,82 g/l
- 15 % (v/v) Glycerin - 150 ml/l ≥99,7 % (v/v) Glycerin
- 10 mM PIPES - 3,02 g/l
- pH 7,0 (KOH)
- autoklavieren, bei 4 °C lagern

Cantharidin-Lösung (1000x):

- 50 mM Cantharidin - 25 mg/2,548 ml, in DMSO lösen
- Aliquots a 100 µl herstellen, bei -20 °C lagern

Coomassie® Brilliantblau G 250-Färbelösung:

- 0,1 % (w/v) Coomassie® Brilliantblau G 250 - 1 g/l
- 50 % (v/v) Methanol - 500 ml/l 100 % (v/v) Methanol
- 10 % (v/v) Essigsäure - 100 ml/l 100 % (v/v) Essigsäure (Eisessig)
- vollständig durch Rühren lösen (3 h), über Faltenfilter (Sorte 598) filtrieren

Coomassie®-Entfärbelösung:

- 40 % (v/v) Methanol - 400 ml/l 100 % (v/v) Methanol
- 10 % (v/v) Essigsäure - 100 ml/l 100 % (v/v) Essigsäure (Eisessig)

Edwards/Extraktions-Puffer:

- 200 mM Tris-HCl - 40 ml/200 ml 1M Tris-HCl (aus Stock)
- 250 mM NaCl - 10 ml/200 ml 5M NaCl (aus Stock)
- 25 mM EDTA - 5 ml/200 ml 1M EDTA (aus Stock)
- 0,5 % (w/v) SDS - 10 ml/200 ml 10 % (w/v) SDS (aus Stock)
- pH 7,5 (HCl)

FM[®] 4-64-Lösung (1500x):

- 3 mM FM[®] 4-64 - 1 mg/549 µl
- Aliquots a 10 µl herstellen, bei -20 °C lagern

Glycerin-Lösung (50 % (v/v)):

- 50 % (v/v) Glycerin - 50 ml/100 ml ≥99,7 % (v/v) Glycerin
- autoklavieren

Infiltrations-Medium:

- 10 mM MES - 500 µl/50 ml 1 M MES (aus Stock)
- 10 mM MgCl₂ - 333 µl/50 ml 1,5 M MgCl₂ (aus Stock)
- 150 µM Acetosyringon - 50 µl/50 ml 150 mM Acetosyringon (aus Stock)
- pH 5,6 (KOH)

LB-Medium, fest (LB Agar, Miller (Luria-Bertani)):

- 4 % (w/v) Difco™ LB Agar, Miller - 40 g/l
- autoklavieren

LB-Medium, flüssig (LB Broth, Miller (Luria-Bertani)):

- 2,5 % (w/v) Difco™ LB Broth, Miller - 25 g/l
- autoklavieren

Lösungen für die ECL (verbesserte Chemilumineszenz („enhanced chemiluminescence“)):

- *p*-Cumarsäure-Lösung:
 - 90 mM *p*-Cumarsäure - 148 mg/10 ml, in DMSO lösen
 - Aliquots a 1 ml herstellen, bei -20 °C lagern
- Luminol-Lösung:
 - 250 mM Luminol – 443 mg/10 ml, in DMSO lösen
 - Aliquots a 1 ml herstellen, bei -20 °C lagern
- Lösung A:
 - 0,1 M Tris base – 0,5 ml/5 ml 1M Tris base (aus Stock)
 - 0,2 mM Cumarsäure – 11,1 µl/5 ml 90 mM *p*-Cumarsäure (aus Stock)
 - 1,25 mM Luminol - 25 µl/5 ml 250 mM Luminol (aus Stock)
 - pH 8.5 (KOH)
 - vor Gebrauch frisch herstellen

- Lösung B:
 - 3 % (v/v) H₂O₂ – 100 µl/ml 30 % (v/v) H₂O₂
 - vor Gebrauch frisch herstellen

Lösungen für die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien (nach Birnboim and Doly (1979)):

- Lösung I:
 - 50 mM Glukose - 10 ml/200 ml 1M Glukose (aus Stock)
 - 10 mM EDTA - 2 ml/200 ml 1M EDTA (aus Stock)
 - 25 mM Tris-HCl - 5 ml/200 ml 1M Tris-HCl (aus Stock)
- Lösung II:
 - 0,2 M NaOH - 1 ml/10 ml 2M NaOH (aus Stock)
 - 1 % (w/v) SDS - 1 ml/10ml 10 % (w/v) SDS (aus Stock)
 - vor Gebrauch frisch herstellen
- Lösung III:
 - 3 M Kaliumacetat - 29,4 g/100 ml
 - 1,8 M Ameisensäure - 5,4 ml/100 ml 100 % (v/v) Ameisensäure

MS-Medium, flüssig bzw. fest (Murashige & Skoog-Medium, 1x):

- 0,433 % (w/v) MS-Salze („basal salt mixture“) - 4,33 g/l
- 1 % (w/v) Saccharose - 10 g/l, optional
- 1 % (w/v) Phyto-Agar - 10 g/l, optional
- autoklavieren
- MS-Phyto-Agar-Platten gießen, optional

Natriumhypochloritlösung (5 % (w/v)):

- 5 % (w/v) Natriumhypochlorit - 41,67 ml/100 ml 12 % (w/v) Natriumhypochloritlösung
- 1 % (v/v) TWEEN® 20 - 1 ml/100 ml 100 % (v/v) TWEEN® 20

PMSF-Lösung (Phenylmethylsulfonylfluorid):

- 1 % (w/v) PMSF - 100 mg/10 ml, in Isopropanol lösen
- Aliquots a 1 ml herstellen, bei -20 °C lagern

Ponceau S-Färbelösung:

- 0,1 % (w/v) Ponceau S - 1 g/l
- 1 % (v/v) Essigsäure - 10 ml/l 100 % (v/v) Essigsäure (Eisessig)

Probenpuffer (für Proteinextrakte aus Hefe):

- 37,5 % (v/v) SDS-Gel-Ladepuffer (4x Laemmli-Puffer) - 375 µl/ml
- 118,75 mM Tris base - 25 µl/ml 1M Tris base (aus Stock)
- 8,75 % (v/v) β-Mercaptoethanol - 12,5 µl/ml 100 % (v/v) β-Mercaptoethanol
- 0,01 % (w/v) PMSF - 10 µl/ml 1 % (w/v) PMSF-Lösung (aus Stock)
- vor Gebrauch frisch herstellen

Puffer S (für *Taq*-DNA-Polymerase, 10x):

- 100 mM Tris base - 10 ml/100 ml 1 M Tris base (aus Stock)
- 500 mM KCl - 20 ml/100 ml 2,5 M KCl (aus Stock)
- 15 mM MgCl₂ - 1 ml/100 ml 1,5 M MgCl₂ (aus Stock)
- 0,1 % (v/v) TWEEN® 20 - 0,1 ml/100 ml 100 % (v/v) TWEEN® 20
- pH 8,8 (KOH)

Puffer und Lösungen für das Hefe-2-Hybrid-System:

- 3-AT-Lösung (3-Amino-1,2,4-triazole):
 - 3 M 3-AT - 2,522 g/10 ml
 - mit Sterilfilter (Nalgene™ Syringe Filter) sterilfiltrieren
- Adenin-Lösung (0,2 % (w/v)):
 - 0,2 % (w/v) Adenin - 200 mg/100 ml
 - mit Sterilfilter (Nalgene™ Syringe Filter) sterilfiltrieren
- Glukose-Lösung (40 % (w/v)):
 - 40 % (w/v) Glukose - 40 g/100 ml
 - mit Sterilfilter (Nalgene™ Syringe Filter) sterilfiltrieren
- Hering-Sperma-DNA:
 - 0,1 % (w/v) Herring Sperm DNA Promega™ - 10 mg/ml
 - Aliquots a 300 µl herstellen, bei -20 °C lagern, mehrere „freeze/thaw“-Prozesse vermeiden, vor Gebrauch Aliquot/s auftauen, im Thermoblock denaturieren (20 min, 90 °C), auf Eis lagern
- Lithiumacetat-Puffer (10x):
 - 1M Lithiumacetat - 6,6 g/100 ml
 - pH 7,5 (Essigsäure)
 - autoklavieren

- PEG 3350-Lösung:
 - 62,5 % (w/v) PEG 3350 - 50 g/80 ml, in Milli-Q® H₂O (steril, 50 °C) lösen
 - Aliquots a 8 ml herstellen, bei -20 °C lagern, vor Gebrauch Aliquot auftauen und jeweils 1 ml TE- (10x) sowie Lithiumacetat-Puffer (10x) zugeben (End-Konzentration 50 % (w/v) PEG 3350)
- TE-Puffer (10x):
 - 100 mM Tris-HCl - 10 ml/100 ml 1 M Tris-HCl (aus Stock)
 - 10 mM EDTA - 1 ml/100 ml 1M EDTA (aus Stock)
 - pH 7.5 (HCl)
 - autoklavieren
- SD-WL/Selektions-Medium, flüssig bzw. fest („SD-Media“ w/o Trp, Leu):
 - 0,67 % (w/v) „Yeast Nitrogen Base“ (YNB) - 3,35 g/475 ml
 - 0,061 % (w/v) „Yeast SD-Supplements“ (w/o Trp, Leu, Ade, His) - 0,305 g/475 ml
 - 0,003 % (w/v) Adenin - 15 mg/475 ml
 - 0,002 % (w/v) Histidin - 10 mg/475 ml
 - 2 % (w/v) BD Bacto™ Agar - 10 g/475 ml, optional
 - pH 5,8 (NaOH)
 - autoklavieren
 - 2 % (w/v) Glukose - 25 ml/500 ml 40 % (w/v) Glukose-Lösung (steril, aus Stock)
 - SD-WL-Agar-Platten (Selektions-Medium) gießen, optional
- SD-WLA/Interaktions-Medium, flüssig bzw. fest („SD-Media“ w/o Trp, Leu, Ade):
 - 0,67 % (w/v) „Yeast Nitrogen Base“ (YNB) - 3,35 g/475 ml
 - 0,061 % (w/v) „Yeast SD-Supplements“ (w/o Trp, Leu, Ade, His) - 0,305 g/475 ml
 - 0,002 % (w/v) Histidin - 10 mg/475 ml
 - 2 % (w/v) BD Bacto™ Agar - 10g/475 ml, optional
 - pH 5,8 (NaOH)
 - autoklavieren
 - 2 % (w/v) Glukose - 25 ml/500 ml 40 % Glukose-Lösung (steril, aus Stock)
 - 0 bis 15 mM 3-AT - 0 bis 2,5 ml/500 ml 3 M 3-AT-Lösung (steril, aus Stock)
 - SD-WLA-Agar-Platten (Interaktions-Medium) gießen, optional

- YPDA-Medium, flüssig bzw. fest („Yeast Peptone Dextrose Adenine“):
 - 2 % (w/v) Trypton/Pepton - 20 g/935 ml
 - 1 % (w/v) BD Bacto™ Hefe-Extrakt - 10 g/935 ml
 - 2 % (w/v) BD Bacto™ Agar - 20 g/935 ml, optional
 - autoklavieren
 - 2 % (w/v) Glukose - 50 ml/985 ml 40 % Glukose-Lösung (steril, aus Stock)
 - 0,003 % (w/v) Adenin - 15 ml/l 0,2 % (w/v) Adenin-Lösung (aus Stock, steril)
 - YPDA-Agar-Platten gießen, optional

RNase A-Lösung:

- 1 % (w/v) RNase A - 10 mg/ml
- bei -20 °C lagern, vor Gebrauch bei 95 °C inkubieren (5 min), auf Eis lagern

Sammelgel-Puffer für SDS-Gele:

- 0,5 M Tris-HCl - 6,06 g/100 ml
- pH 6,8 (HCl)

SDS-Lösung („Sodium dodecyl sulfate“/Natriumlaurylsulfat, 10 % (w/v)):

- 10 % (w/v) SDS - 10 g/100 ml

SDS-Gel-Ladepuffer (4x Laemmli-Puffer):

- 250 mM Tris-HCl - 2,5 ml/8 ml 1M Tris-HCl (aus Stock)
- 8 % (w/v) SDS - 0,8 ml/8 ml 10 % (w/v) SDS (aus Stock)
- 40 % (v/v) Glycerin - 4 ml/8 ml ≥99,7 % (v/v) Glycerin
- 0,004 % (w/v) Bromphenolblau - 0,4 mg/8 ml
- pH 6,8 (HCl)
- 20 % (v/v) β-Mercaptoethanol - 2 ml/10 ml 100 % (v/v) β-Mercaptoethanol, vor Gebrauch zugeben

SDS-Gel-Laufpuffer (10x):

- 0,25 M Tris base - 30,2 g/l
- 1,92 M Glycin - 144 g/l
- 1 % (w/v) SDS - 100 ml/l 10 % (w/v) SDS (aus Stock)
- pH 8,3 (HCl)
- vor Gebrauch 100 ml SDS-Gel-Laufpuffer (10x) mit 900 ml Milli-Q® H₂O mischen

SOC-Medium („Super Optimal Broth with Catabolite repression“):

- 2 % (w/v) Trypton/Pepton - 2 g/100 ml
- 0,5 % (w/v) BD Bacto™ Hefe-Extrakt - 0,5 g/100 ml
- 10 mM NaCl - 1 ml/100 ml 1 M NaCl (aus Stock)
- 2,5 mM KCl - 0,1 ml/100 ml 2,5 M KCl (aus Stock)
- 10 mM MgCl₂ - 0,667 ml/100 ml 1,5 M MgCl₂ (aus Stock)
- 10 mM MgSO₄ - 1 ml/100 ml 1 M MgSO₄ (aus Stock)
- 20 mM Glukose - 0,36 g/100 ml Glukose
- autoklavieren
- Aliquots a 5 ml herstellen

TAE-Puffer (50x):

- 2 M Tris base - 242 g/l
- 5,71 % (v/v) Essigsäure - 57,1 ml/l 100 % (v/v) Essigsäure (Eisessig)
- 50 mM EDTA - 50 ml/l 1 M EDTA (aus Stock)
- pH 8,5 (HCl)

TBS-Puffer (10x):

- 200 mM Tris base - 24,23 g/l
- 1,5 M NaCl - 87,66 g/l
- pH 7,5 (HCl)
- vor Gebrauch 100 ml TBS-Puffer (10x) mit 900 ml Milli-Q® H₂O mischen

Transfer-Puffer (10x):

- 250 mM Tris base - 30,3 g/l
- 1,92 M Glycin - 144,1 g/l
- pH 8,3 (NaOH)
- vor Gebrauch 100 ml Transfer-Puffer (10x) mit 200 ml 100 % (v/v) Methanol (20 % (v/v)) und 700 ml Milli-Q® H₂O mischen (statt Methanol kann alternativ auch Ethanol eingesetzt werden)

Transformations-Medium:

- 0,2165 % (w/v) MS-Salze (basal salt mixture) - 0,65 g/300 ml
- 5 % (w/v) Saccharose - 15 g/300 ml
- 0,05 % (v/v) Silwet L-77 - 150 µl/300 ml Silwet L-77-Lösung
- 0,0444 µM BAP - 10 µl/300 ml BAP-Lösung (1 mg/ml)

Trenngel-Puffer für SDS-Gele:

- 1,5 M Tris-HCl - 18,17 g/100 ml
- pH 8,8 (NaOH)

YEB-Medium:

- 0,5 % (w/v) Trypton/Pepton - 5 g/l
- 0,5 % (w/v) BD BBL™ Rinder-Extrakt - 5 g/l
- 0,1 % (w/v) BD Bacto™ Hefe-Extrakt - 1 g/l
- 0,5 % (w/v) Saccharose - 5 g/l
- 0,05 % (w/v) MgCl₂ - 0,5 g/l
- autoklavieren

Zymolyase®-Lösung (4x):

- 1 % (w/v) Zymolyase® - 10 mg/ml
- bei -20 °C lagern, vor Gebrauch 0,25 % (w/v) Zymolyase®-Arbeitslösung herstellen (mit Natriumphosphat-Puffer (100 mM, pH 7,5 (H₃PO₄)) verdünnen)

2.4 Vektoren

2.4.1 Klonierungs-Vektoren

- pDONR™201/207/221/Zeo
(Kan^R/Gent^R/Kan^R/Zeo^R)
Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV &
Co KG, Braunschweig
- pGEM®-T Easy (Amp^R)
Promega GmbH, Mannheim
- pJET1.2/blunt (Amp^R)
Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV &
Co KG, Braunschweig

2.4.2 Hefe-2-Hybrid-Vektoren

- pGADT7 AD (Amp^R) Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich, Chien et al. (1991)
- pGBKT7 DNA-BD-14-3-3 Isoform (14-3-3 Isoformen: pi, epsilon, omicron, mu, iota, kappa, lambda, upsilon, nu, psi, chi, phi, omega (Amp^R)) Oecking, modifiziert nach Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich, Louvet et al. (1997)
- pGBKT7 DNA-BD (Kan^R) Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich, Louvet et al. (1997)

2.4.3 Vektoren zur Expression von Fusions-Proteinen

(BiFC/rBiFC-, mGFP4- bzw. RFP-Vektoren)

- pB7WGR2 (Spec^R (Bakt.), Basta^{®R} (Pfl.)) Karimi et al. (2002), Ghent, Belgien
- pBiFCt-2in1-CN (Spec^R (Bakt.)) Grefen and Blatt (2012), Glasgow, UK
- pPGTkan (Spec^R (Bakt.), Kan^R (Pfl.)) Schumacher, modifiziert nach Allen et al. (2000) (pPTkan(+), s.u.), unveröffentlicht, Tübingen/Heidelberg
- pSAT6-RFP-C1 (Amp^R (Bakt.)) Chung et al. (2005), New York, NY, USA
- pSAT6-RFP-N1 (Amp^R (Bakt.)) Chung et al. (2005), New York, NY, USA
- pSPYCE (Kan^R (Bakt.)) Walter et al. (2004), Münster
- pSPYCE-GW (Amp^R (Bakt.)) Lahaye, modifiziert nach Walter et al. (2004) (pSPYCE, s.o.), unveröffentlicht, München/Tübingen
- pSPYNE (Kan^R (Bakt.)) Walter et al. (2004), Münster
- pSPYNE-152STOP (Kan^R (Bakt.)) Oecking, modifiziert nach Walter et al. (2004) (pUC-SPYNE, s.o.), unveröffentlicht, Tübingen
- pSPYNE-GW (Amp^R (Bakt.)) Lahaye, modifiziert nach Walter et al. (2004) (pSPYNE, s.o.), unveröffentlicht, München/Tübingen
- pUC-SPYCE (Amp^R (Bakt.)) Walter et al. (2004), Münster
- pUC-SPYNE (Amp^R (Bakt.)) Walter et al. (2004), Münster

- pUC-SPYNE-152STOP (Amp^R (Bakt.)) Oecking, modifiziert nach Walter et al. (2004) (pUC-SPYNE, s.o.), unveröffentlicht, Tübingen

2.4.4 Binäre Pflanzen-Vektoren zur stabilen *A. tumefaciens*-vermittelten Transformation von *Arabidopsis*-Pflanzen

- pPTkan(+) (Spec^R (Bakt.), Kan^R (Pfl.)) Allen et al. (2000), San Diego, CA, USA
- pPGTkan (Spec^R (Bakt.), Kan^R (Pfl.)) Schumacher, modifiziert nach Allen et al. (2000) (pPTkan(+), s.o.), unveröffentlicht, Tübingen/Heidelberg

2.4.5 cDNA-Bibliothek

- pACT-„cDNA-Bibliothek“ (Amp^R (Bakt.)) Kim et al. (1997), erstellt aus mRNA, die aus drei Tage alten, etiolierten *A. thaliana* Col-0-Keimlingen isoliert wurde, TAIR Accession – Library: 2271252, zur Verfügung gestellt von „*Arabidopsis* Biological Resource Center“ (ABRC), Stock#: CD4-22

2.5 Oligonukleotide/Primer

- #### 2.5.1 Gateway™-Primer für die Klonierung von Konstrukten zur Expression von N-term. RFP- bzw. C-term. BiFC-Fusions-Proteinen (Gateway™ „Entry“-Klone: pDONR™201/207/221/Zeo_attP1-attP2, Gateway™ „Expression/Destination“-Klone: pB7WGR2_attR1-attR2 (N-term. RFP) und pSPYCE-GW/pSPYNE-GW_attR1-attR2 (C-term. n/cYFP))

14-3-3 Isoform epsilon

- CT-At14.3eps_CDS_GW_attB1_F (51 nt):
GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGAGAATGAGAGGGAAAA
- CT-At14.3eps_CDS_GW_attB2_R (50 nt):
GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTAGTTCTCATCTTGAGGCT

ENP/NPY1/MEL1

- CT-ENP_CDS_GW_attB1_F (51 nt):
GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGAAGTTCATGAAGCTAGG
- CT-ENP_CDS_GW_attB2_R (50 nt):
GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCACGATATCGAATGTCTGC
- CT-ENP-S569A_GW_attB2_R (50 nt):
GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCACGATATCGCATGTCTGC

NPH3

- CT-NPH3_CDS_GW_attB1_F (51 nt):
GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGATGTGGGAATCTGAGAG
- CT-NPH3_CDS_GW_attB2_R (50 nt):
GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCATGAAATTGAGTTCCTCC
- CT-NPH3_dC51_CDS_GW_attB2_R (50 nt):
GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCATGGCGTGTCTTCACTT
- CT-NPH3_dN125_CDS_GW_attB1_F (51 nt):
GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGTCAGGATTACGTTGTGC
- CT-NPH3_dN146_CDS_GW_attB1_F (51 nt):
GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGATCTTCAAGACAGAAGC
- CT-NPH3_S743A_CDS_GW_attB2_R (50 nt):
GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCATGAAATTGCGTTCCTCC

RPT2

- CT-RPT2_CDS_GW_attB1_F (51 nt):
GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGCAACAGAAGGAAAAAA
- CT-RPT2_CDS_GW_attB2_R (50 nt):
GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTAAGAGATTGAGAATCTTC
- CT-RPT2-S591A_CDS_GW_attB2_R (50 nt):
GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTAAGAGATTGCGAATCTTC

2.5.2 Gateway™-Primer für die Klonierung von Konstruktion zur Expression von rBiFC-2in1-Fusions-Proteinen (Gateway™ „Entry“-Klone: pDONR™201/207/221/Zeo_attP1-attP4/attP3-attP2, Gateway™ „Expression/Destination“-Klone: pBiFCt-2in1-CN_attR3-attR2_attR1-attR4 (C- bzw. N- term. n/cYFP))

14-3-3 Isoform epsilon

- 14-3-3eps_attB1_F (35 nt):
AAAAAGCAGGCTTAATGGAGAATGAGAGGGAAAAG

- 14-3-3eps_ *attB4*_R (34 nt):
GAAAAGTTGGGTGGTTCTCATCTTGAGGCTCATC
- 14-3-3eps_ *attB3*_F (35 nt):
ATAATAAAGTTGTAATGGAGAATGAGAGGGAAAAG
- 14-3-3eps_ *attB2*_R (34 nt):
AGAAAAGCTGGGTGGTTCTCATCTTGAGGCTCATC

Adapter-Primer (mit *attB_x*-Sites, für Gateway™-Adapter-PCRs)

- *attB1*_adapter (29 nt):
GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
- *attB2*_adapter (29 nt):
GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT
- *attB3*_adapter (26 nt):
GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTG
- *attB4*_adapter (29 nt):
GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGGGT

NPH3

- NPH3_ *attB1*_F (35 nt):
AAAAAGCAGGCTTAATGATGTGGGAATCTGAGAGC
- NPH3_STOP_ *attB4*_R (34 nt):
GAAAAGTTGGGTGTCATGAAATTGAGTTCCTCCA
- NPH3_744A_STOP_ *attB4*_R (40 nt):
GAAAAGTTGGGTGTCATGAAATTGCGTTCCTCCATCGTCT
- NPH3_ *attB3*_F (35 nt):
ATAATAAAGTTGTAATGATGTGGGAATCTGAGAGC
- NPH3_STOP_ *attB2*_R (34 nt):
AGAAAAGCTGGGTGTCATGAAATTGAGTTCCTCCA
- NPH3_744A_STOP_ *attB2*_R (40 nt):
AGAAAAGCTGGGTGTCATGAAATTGCGTTCCTCCATCGTCT

2.5.3 Primer für die Klonierung von Konstrukten für das Hefe-2-Hybrid-System (pGADT7, pGBKT7)

ENP/NPY1/MEL1

- SM-ENP-*Bam*HI_F (29 nt):
TATggatccatATGAAGTTCATGAAGCTA

- SM-ENP-*Xho*I_R (27 nt):
TATctcgagTCACGATATCGAATGTCT
 - CT-ENP-S569A-*Xho*I_R (27 nt):
TATctcgagTCACGATATcgcATGTCT
- NPH3
- CT-NPH3-*Eco*RI_F (27 nt):
TATgaattcATGATGTGGGAATCTGAG
 - CT-NPH3-*Sma*I_R (27 nt):
TATcccgggTCATGAAATTGAGTTCCT
 - CT-NPH3-S743A-*Sma*I_R (27 nt):
TATcccgggTCATGAAATtgcGTTCCCT
 - CT-NPH3-S743D-*Sma*I_R (27 nt):
TATcccgggTCATGAAATgtcGTTCCCT
 - CT-NPH3-S743E-*Sma*I_R (27 nt):
TATcccgggTCATGAAATctcGTTCCCT
 - MG-NPH3-C4-*Eco*RI_F (27 nt):
TATgaattcTTGAGAGTGGTGGTTCAA
 - MG-NPH3-C4-*Sma*I_R (30 nt):
TATcccgggTCAGGTCCAAGCCGAAGAAGA
 - MG-NPH3-C4-*Eco*RI_F (27 nt):
TATgaattcTTGAGAGTGGTGGTTCAA
 - MG-NPH3-C4-*Sma*I_R (20 nt):
TATcccgggTCAGGTCCAAGCCGAAGAAGA
 - SM-NPH3-C1-*Eco*RI_F (27 nt):
TATgaattcTATGGTCTCTCCGCCGG
 - SM-NPH3-C2-*Eco*RI_F (27 nt):
TATgaattcGCTCAGAACGAGAGGTTG
 - SM-NPH3-C3-*Eco*RI_F (27 nt):
TATgaattcGACCAGCGGTTGGAAGAA
 - SM-NPH3-N1-*Sma*I_R (30 nt):
TATcccgggTCACATCCCTACGCGTTTCTC
- RPT2
- CT-RPT2-*Nde*I_F (27 nt):
TATcatatgATGGCAACAGAAGGAAAA
 - CT-RPT2-*Sma*I_R (27 nt):
TATcccgggTTAAGAGATTGAGAATCT

- CT-RPT2-*Sma*I-S591A_R (27 nt):
TATcccgggTTAAGAGATTGcGAATCT

2.5.4 Primer für die gerichtete Mutagenese von DNA-Konstrukten (auf Grundlage des pGEM®-T Easy-Templates)

NPH3

- MG-NPH3-S614A_F (33 nt):
GCTTTAGCCAACACAgcaCTCAAGGAGTCAACC
- MG-NPH3-S614A_R (33 nt):
GGTTGACTCCTTGAGtgcTGTGTTGGCTAAAGC
- MG-NPH3-S618A_F (33 nt):
ACATCACTCAAGGAGgcaACCACTTTAGGAGAA
- MG-NPH3-S618A_R (33 nt):
TTCTCCTAAAGTGGTtgcCTCCTTGAGTGATGT

2.5.5 Primer für die Klonierung von Konstrukten zur Expression von C-term. BiFC-Fusions-Proteinen (pUC-SPYNE/SPYCE)

14-3-3 Isoform epsilon

- CT-At14.3eps-*Bam*HI_F (27 nt):
TATggatccATGGAGAATGAGAGGGAA
- CT-At14.3eps-*Sma*I_R_(-STOP_I) (27 nt):
TATcccgggGTTCTCATCTTGAGGCTC

NPH3

- CT-NPH3-*Bam*HI_F (27 nt):
TATggatccATGATGTGGGAATCTGAG
- CT-NPH3-*Sma*I_R_(-STOP_I) (27 nt):
TATcccgggTGAAATTGAGTTCCTCCA
- CT-NPH3-S743A-*Sma*I_R_(-STOP_I) (27 nt):
TATcccgggTGAAATtgcGTTTCCTCCA

2.5.6 Primer für die Klonierung von Konstrukten zur Expression von C-term.
mGFP4-Fusions-Proteinen bzw. der stabilen Transformation/Komplementation von
Arabidopsis-Linien (pPGTkan)

14-3-3 Isoform epsilon

- CT-At14.3eps_ *Sma*I_F (27 nt):
TATcccgggATGGAGAATGAGAGGGAA
- CT-At14.3eps_ *Bam*HI_R_(-STOP_II) (28 nt):
TATggatcccGTTCTCATCTTGAGGCTC

ENP/NPY1/MEL1

- CT-ENP- *Sma*I_F (27 nt):
TATcccgggATGAAGTTCATGAAGCTA
- CT-ENP- *Bam*HI_R_(-STOP_II) (28 nt):
TATggatcccCGATATCGAATGTCTGCG
- CT-ENP-S569A- *Bam*HI_R_(-STOP_II) (28 nt):
TATggatcccCGATATcgcATGTCTGCG

NPH3

- CT-NPH3- *Sma*I_F (27 nt):
TATcccgggATGATGTGGGAATCTGAG
- CT-NPH3- *Bam*HI_R_(-STOP_II) (28 nt):
TATggatcccTGAAATTGAGTTCCTCCA
- CT-NPH3-dC51- *Bam*HI_R_(-STOP_II) (28 nt):
TATggatcccTGGCGTGTCTTCACTTT
- CT-NPH3-dN125- *Sma*I_F (30 nt):
TATcccgggATGTCAGGATTACGTTGTGCA
- CT-NPH3-dN146- *Sma*I_F (30 nt):
TATcccgggATGATCTTCAAGACAGAAGCT
- CT-NPH3-S743A- *Bam*HI_R_(-STOP_II) (28 nt):
TATggatcccTGAAATtgcGTTCTCCA

PIN1

- CT-PIN1- *Sma*I_F (27 nt):
TATcccgggATGATTACGGCGGCGGAC
- CT-PIN1- *Bam*HI_R_(-STOP_I) (28 nt):
TATggatcccTAGACCCAAGAGAATGTA

RPT2

- CT-RPT2-*Sma*I_F (27 nt):
TATcccgggATGGCAACAGAAGGAAAA
- CT-RPT2-*Bsp*HI_R_(-STOP_II) (28 nt):
TATtcatgacAGAGATTGAGAATCTTCG
- CT-RPT2-S591A-*Bsp*HI_R_(-STOP_II) (28 nt):
TATtcatgacAGAGATTGCGAATCTTCG

2.5.7 Primer für die Klonierung von Konstrukten zur Expression von C-term. RFP-Fusions-Proteinen (pSAT6-RFP-N1)

14-3-3 Isoform epsilon

- CT-At14.3eps-*Eco*RI_F (27 nt):
TATgaattcATGGAGAATGAGAGGGAA
- CT-At14.3eps-*Sma*I_R_(-STOP_I) (27 nt):
TATcccgggGGCCTCATCCATCTGCTC

ENP/NPY1/MEL1

- CT-ENP-*Eco*RI_F:
TATgaattcATGAAGTTCATGAAGCTA
- CT-ENP-*Sma*I_R_(-STOP_III):
TATcccgggCGATATCGAATGTCTGCG
- CT-ENP-S569A-*Sma*I_R_(-STOP_III):
TATcccgggCGATATcgcATGTCTGCG

NPH3

- CT-NPH3-*Eco*RI_F (27 nt):
TATgaattcATGATGTGGGAATCTGAG
- CT-NPH3-*Sma*I_R_(-STOP_I) (27 nt):
TATcccgggTGAAATTGAGTTCCTCCA
- CT-NPH3-dC51-*Sma*I_R_(-STOP_I) (27 nt):
TATcccgggTGGCGTGTCTTCACTTT
- CT-NPH3-dN125-*Eco*RI_F (30 nt):
TATgaattcATGTCAGGATTACGTTGTGCA
- CT-NPH3-dN146-*Eco*RI_F (30 nt):
TATgaattcATGATCTTCAAGACAGAAGCT
- CT-NPH3-S743A-*Sma*I_R_(-STOP_I) (27 nt):
TATcccgggTGAAATtgcGTTCTCCA

2.5.8 Primer für die Klonierung von Konstrukten zur Expression von N-term.

RFP-Fusions-Proteinen (pSAT6-RFP-C1)

14-3-3 Isoform epsilon

- CT-At14.3eps-*EcoRI*_F_(+1) (28 nt):
TATgaattcaATGGAGAATGAGAGGGAA
- CT-At14.3eps-*SmaI*_R (27 nt):
TATcccgggTTAGTTCTCATCTTGAGG

ENP/NPY1/MEL1

- CT-ENP-*EcoRI*_F_(+1) (28 nt):
TATgaattcaATGAAGTTCATGAAGCTA
- CT-ENP-*SmaI*_R (27 nt):
TATcccgggTCACGATATCGAATGTCT
- CT-ENP-S569A-*SmaI*_R (27 nt):
TATcccgggTCACGATATcgcATGTCT

NPH3

- CT-NPH3-*EcoRI*_F_(+1) (28 nt):
TATgaattcaATGATGTGGGAATCTGAG
- CT-NPH3-*SmaI*_R (27 nt):
TATcccgggTCATGAAATTGAGTTCCT
- CT-NPH3-dC51-*SmaI*_R (27 nt):
TATcccgggTCATGGCGTGTTCTTCAC
- CT-NPH3-dN125-*EcoRI*_F_(+1) (31 nt):
TATgaattcaATGTCAGGATTACGTTGTGCA
- CT-NPH3-dN146-*EcoRI*_F_(+1) (31 nt):
TATgaattcaATGATCTTCAAGACAGAAGCT
- CT-NPH3-S743A-*SmaI*_R (27 nt):
TATcccgggTCATGAAATtgcGTTTCCT

RPT2

- CT-RPT2-*PstI*_F_(+2) (29 nt):
TATctgcagaaATGGCAACAGAAGGAAAA
- CT-RPT2-*SmaI*_R (27 nt):
TATcccgggTTAAGAGATTGAGAATCT
- CT-RPT2-S591A-*SmaI*_R (27 nt):
TATcccgggTTAAGAGATtgcGAATCT

2.5.9 Primer für die Klonierung von Konstrukten zur stabilen Transformation bzw. Komplementation von *Arabidopsis*-Linien (pPTkan(+))

NPH3

- CT-NPH3-*Bam*HI_F (27 nt):
TATggatccATGATGTGGGAATCTGAG
- CT-NPH3-*Sall*_R (27 nt):
TATgtcgacTCATGAAATTGAGTTCCT
- CT-NPH3-S743A-*Sall*_R (27 nt):
TATgtcgacTCATGAAATtgcGTTTCCT

2.5.10 Sonstige Primer

- 3' AD Sequencing Primer (20 nt):
AGATGGTGCACGATGCACAG
- 3' DNA-BD Sequencing Primer (20 nt):
TTTTTCGTTTTAAAACCTAAGAGTC
- ACT1_F (19 nt):
GGCGATGAAGCTCAATCCAAACG
- ACT1_R (21 nt):
GGTCACGACCAGCAAGATCAAGACG
- ACT2_F (Actin) (20 nt):
TCCAAGCTGTTCTCTCCTTG
- ACT2_R (Actin) (20 nt):
GAGGGCTGGAACAAGACTTC
- ADScreening-Amp_F (28 nt):
CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCC
- ADScreening-Amp_R (29 nt):
GTGAACTTGCGGGTTTTTCAGTATCTACGATT
- ccDB-out (17 nt):
AGAGCCGTTATCGTCTG
- CM_EGFP_F (19 nt):
CAAGGGCGAGGAGCTGTTC
- CM_EGFP_R (22 nt):
TTACTTGTACAGCTCGTCCATG
- CM_mGFP4_F (23 nt):
AGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTCAC

- CM_mGFP4_R (22 nt):
TGTATAGTTCATCCATGCCATG
- CmR-out (18 nt):
ATCCAGCTGAACGGTCTG
- M13-FP (18 nt):
TGTAACGACGGCCAGT
- M13-RP (18 nt):
CAGGAAACAGCTATGACC
- MG-GABIseq_LB_R (GABI-Kat: o8409) (23 nt):
ATATTGACCATCATACTCATTGC
- MG-NPH3_T-DNA_WT_F (18 nt):
GGATCTCACGGCAACTAA
- MG-NPH3_T-DNA_WT_R (18 nt):
TGTGGAGGGATTATGCTG
- SALK_LBb1 (22 nt):
GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT
- SALK_LBb1.3 (19 nt):
ATTTTGCCGATTTTCGGAAC
- SALK_TL2 (23 nt):
CAATCAGCTGTTGCCCGTCTCAC
- T7 Sequencing Primer (21 nt):
TAATACGACTCACTATAGGGC

2.6 Biologisches Material

2.6.1 Antikörper

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Anti-c-Myc Antikörper (primär, monoklonal (Klon 9E10), IgG1κ, Maus (MABE282), 1:400) | <p>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München</p> |
| <ul style="list-style-type: none"> • Anti-HA Antikörper (primär, monoklonal (Klon HA-7), IgG1, Maus (H3663), 1:2000) | <p>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München</p> |

- Anti-Maus IgG (ganzes Molekül) Alkalische Phosphatase-Antikörper (sekundär, polyklonal, AP-Konjugat, Ziege (A3562), 1:30000) Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
- Anti-Maus IgG (ganzes Molekül) Peroxidase-Antikörper (sekundär, polyklonal, Peroxidase-Konjugat, Kaninchen (A9044), 1:80000 - 160000) Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

2.6.2 Enzyme

- AccuPrime™ *Pfx* DNA Polymerase (Invitrogen™) Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig
- Alkalische Phosphatase (CIP) New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
- Gateway® BP Clonase® Enzyme Mix Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig
- Gateway® LR Clonase® Enzyme Mix Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig
- KAPA2G™ Robust PCR Kit Kapa Biosystems, Inc., Wilmington, MA, USA
- Klenow Enzym (Fragment der DNA-Polymerase I) Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
- Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig
- Restriktions-Enzyme (Endonukleasen) (AluI (10 U/μl), BamHI (10 U/μl), Bsu15I (Clal, 10 U/μl), DpnI (10 U/μl), EcoRI (10 U/μl), EcoRV (Eco32I, 10 U/μl), HindIII (10 U/μl), KpnI (10 U/μl), MspI (HpaII, 10 U/μl), NdeI (10 U/μl), NotI (10 U/μl), PaeI (BspHI, 10 U/μl), PstI (10 U/μl), PvuII (10 U/μl), SacI (10 U/μl), SalI (10 U/μl), ScaI (10 U/μl), SmaI (10 U/μl), XbaI (10 U/μl), XhoI (10 U/μl)) Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig
- RevertAid RT Reverse Transcription Kit Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig

- RiboLock RNase Inhibitor Thermo Fisher Scientific Inc. Germany
BV & Co KG, Braunschweig
- RNase A Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
München
- T4-DNA-Ligase Promega GmbH, Mannheim
- *Taq*-DNA Polymerase Eigenproduktion am Lehrstuhl,
Tübingen
- Zymolyase® 100T AMS Biotechnology (Europe) Ltd.,
Abingdon, U.K.

2.6.3 Bakterien-Stämme

- *E. coli* DH5α (Tet^R) Meselson and Yuan (1968),
Cambridge, MA, USA
- *E. coli* One Shot® TOP10 (Tet^R) Thermo Fisher Scientific Inc. Germany
BV & Co KG, Braunschweig
- *E. coli* XL1-Blue (Tet^R) Bullock et al. (1987), Agilent
Technologies Inc., Santa Clara, CA,
USA
- *A. tumefaciens* C58C1 (Rif^R, Gent^R, Kan^R) Deblaere et al. (1985), Brüssel,
Belgien
- *A. tumefaciens* GV3101 (Rif^R, Gent^R, Kan^R) Koncz and Schell (1986), Szeged,
Ungarn

2.6.4 Hefe-Stämme

- *S. cerevisiae* PJ64-4A James et al. (1996), Madison, WI, USA
- *S. cerevisiae* Y187 Takara Bio Europe,
Saint-Germain-en-Laye, Frankreich

2.6.5 Pflanzen-Material

- *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., var. Columbia
 - Col-0: Wildtyp- bzw. Hintergrund-Linie, zur Verfügung gestellt von NASC (Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre/The European *Arabidopsis* Stock Centre, NASC ID: N1092 (Scholl et al., 2000; Meinke and Scholl, 2003))

- *nph3-8*: GABI-Kat T-DNA-Insertions-Linien von NPH3 (GK-275E03-015095 (Kleinboelting et al., 2012)), zur Verfügung gestellt von NASC (Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre/The European *Arabidopsis* Stock Centre, NASC ID: N426355 (Scholl et al., 2000; Meinke and Scholl, 2003))

Taxonomie von *A. thaliana* (L.) Heynh. (modifiziert nach "the Integrated Taxonomic Information System on-line database (ITIS)", www.itis.gov, [Sep-17])

| | |
|-----------------|---|
| „Kingdom“ | Plantae (plants) |
| „Subkingdom“ | Viridiplantae |
| „Infrakingdom“ | Streptophyta (land plants) |
| „Superdivision“ | Embryophyta |
| „Division“ | Tracheophyta (vascular plants, tracheophytes) |
| „Subdivision“ | Spermatophytina (seed plants, spermatophytes) |
| „Class“ | Magnoliopsida |
| „Superorder“ | Rosanae |
| „Order“ | Brassicales |
| „Family“ | Brassicaceae (crucifer) |
| „Genus“ | <i>Arabidopsis</i> Heynh. (rockcress) |
| „Species“ | <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh. (mouse-ear cress) |

A. thaliana (L.) Heynh. gehört zur Domäne Eucaryota (Eukaryoten), Reich Plantae (Pflanzen), Unterreich Tracheobionta (Gefäßpflanzen), Überabteilung Spermatophyta (Samenpflanzen), Abteilung Magnoliophyta (Bedecktsamer), Klasse Rosopsida (Dreifurchenpollen-Zweikeimblättrige), Unterklasse Rosidae (Rosenähnliche), Ordnung Brassicales (Kreuzblütlerartige), Familie Brassicaceae (Kreuzblütengewächse), Gattung *Arabidopsis* (Schmalwand).

- *Nicotiana benthamiana* Domin
- *Nicotiana tabacum* L. cv.

Taxonomie von *N. benthamiana* Domin und *N. tabacum* L. cv. (modifiziert nach "the Integrated Taxonomic Information System on-line database (ITIS)", www.itis.gov, [Sep-17])

| | |
|-----------------|--|
| „Kingdom“ | Plantae (plants) |
| „Subkingdom“ | Viridiplantae |
| „Infrakingdom“ | Streptophyta (land plants) |
| „Superdivision“ | Embryophyta |
| „Division“ | Tracheophyta (vascular plants, tracheophytes) |
| „Subdivision“ | Spermatophytina (seed plants, spermatophytes) |
| „Class“ | Magnoliopsida |
| „Superorder“ | Asteranae |
| „Order“ | Solanales |
| „Family“ | Solanaceae (nightshades) |
| „Genus“ | <i>Nicotiana</i> L. (tobacco) |
| „Species“ | <i>Nicotiana benthamiana</i> Domin |
| „Species“ | <i>Nicotiana tabacum</i> L. (cultivated tobacco) |

N. benthamiana Domin und *N. tabacum* L. cv. gehören zur Domäne Eucaryota (Eukaryoten), Reich Plantae (Pflanzen), Unterreich Tracheobionta (Gefäßpflanzen), Überabteilung Spermatophyta (Samenpflanzen), Abteilung Magnoliophyta (Bedecktsamer), Klasse Magnoliopsida (Einfurchenpollen-Zweikeimblättrige), Unterklasse Asteridae (Asterähnliche), Ordnung Solanales (Nachtschattenartige), Familie Solanaceae (Nachtschattengewächse), Gattung *Nicotiana* (Tabak).

2.6.6 Pflanzen-Zellkultur

- *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., var. Columbia
 - von der Wildtyp-Linie (Col-0) erstellte, im Dunkeln gehaltene Wurzel-Zellkultur (Schumacher, unveröffentlicht, Tübingen/Heidelberg), ursprünglich zur Verfügung gestellt von NASC (Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre/The European *Arabidopsis* Stock Centre, NASC ID: N1092 (Scholl et al., 2000; Meinke and Scholl, 2003))

2.7 Bakterien-Anzucht

2.7.1 Antibiotika-Stock-Lösungen

Die Lagerung der verwendeten Antibiotika erfolgte als entsprechende Stock-Lösung (500x bzw. 1000x, -20 °C). Die Antibiotika wurden den unterschiedlichen Medien nach dem Autoklavieren zugegeben.

- Ampicillin (Bakt.): 100 mg/ml (1000x), in Milli-Q® H₂O
- Basta®(Pfl.): 50 mg/ml (1000x), in Milli-Q® H₂O
- Carbenicillin (Bakt.): 100 mg/ml (1000x), in Milli-Q® H₂O
- Chloramphenicol (Bakt.): 25 mg/ml (1000x), in Milli-Q® H₂O/EtOH
- Cycloheximid (Pfl.): 30 mg/ml (1000x), in Milli-Q® H₂O
- Gentamycin (Bakt.): 10 mg/ml (1000x), in Milli-Q® H₂O
- Hygromycin B (Pfl.): 50 mg/ml (1000x) in Milli-Q® H₂O
- Kanamycin (Bakt./Pfl.): 50 mg/ml (1000x), in Milli-Q® H₂O
- Rifampicin (Bakt.): 50 mg/ml (500x), in DMSO
- Spectinomycin (Bakt.): 50 mg/ml (1000x), in Milli-Q® H₂O
- Sulfadiazin (Pfl.): 7,5 mg/ml (1000x), in Milli-Q® H₂O
- Tetracyclin (Bakt.): 10 mg/ml (1000x), in Milli-Q® H₂O/EtOH

2.7.2 Übernachtskulturen

Die Anzucht von *E. coli*-Übernachtskulturen erfolgte in sterilen Reagenzgläsern. Die Kulturen wurden zur Isolierung von Plasmid-DNA, für die Inokulation von Hauptkulturen und zum Erstellen von Stammkulturen verwendet. Hierzu wurde Flüssig-Medium (5 ml, LB-, 2xYT- oder YEB-Medium (Green and Sambrook, 2012)) mit dem entsprechenden Selektions-Antibiotikum versetzt, mit Bakterien angeimpft (Einzelkolonie von einer Agar-Platte bzw. aus Glycerol-Stock) und über Nacht im Inkubationsschüttler inkubiert (ca. 16 h, 37 °C, 220 rpm).

2.7.3 Präparation von chemisch-kompetenten *E. coli* DH5 α /XL1-Blue-Bakterien-Zellen

Zur Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* DH5 α /XL1-Blue-Zellen wurde eine Hauptkultur (200 ml, 2xYT-Medium, Tet) mit einer zuvor angezogenen Übernachtskultur (5ml, 2xYT-Medium, Tet) inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,65 im Inkubationsschüttler inkubiert (37 °C, 220 rpm). Anschließend wurde die Hauptkultur auf Eis gehalten (ca. 30 min) und subsequent pelletiert (15 min, 4 °C, 4000 g). Das Bakterien-Pellet wurde in CaCl₂-Pufferlösung resuspendiert (200 ml, steril, eiskalt), auf Eis belassen (1 h) und nochmals pelletiert (s.o.). Dieser Waschschrift wurde mit sich

verkleinernden Volumina der CaCl_2 -Pufferlösung (100 ml bzw. 5 ml, s.o.) wiederholt. Schließlich wurde das Bakterienpellet in CaCl_2 -Pufferlösung resuspendiert (2 ml) und die daraus erstellten Aliquots (100 μl) in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der chemisch-kompetenten Bakterien-Aliquots erfolgte bei -80°C .

2.7.4 Präparation von kompetenten *A. tumefaciens* C58C1/GV3101-Bakterien-Zellen

Zur Herstellung kompetenter *A. tumefaciens* C58C1/GV3101-Zellen wurde eine Bakterien-Übernachtskultur (5 ml, YEB-Medium) in eine Hauptkultur (100 ml, YEB-Medium, Rifampicin und Gentamycin) überführt und diese bis zu einer OD_{600} von 0,5 im Inkubationsschüttler kultiviert (ca. 6 h, 28°C , 160 rpm). Nach Abkühlen der Hauptkultur im Eisbad wurden die Zellen pelletiert (10 min, 3000 g) und das Pellet in YEB-Medium (1 ml) resuspendiert. Die daraus erstellten Aliquots (200 μl) wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

2.7.5 Lagerung von Bakterien-Stämmen (Glycerol-Stocks/Stammkulturen)

Für die Langzeitlagerung von Bakterien (*A. tumefaciens* bzw. *E. coli*) wurden Glycerol-Stocks angelegt (1 ml). Dazu wurde die entsprechende Bakterien-Übernachtskultur (600 μl , LB- bzw. YEB-Medium) mit einer Glycerin-Lösung (400 μl , 50 % (v/v)) vereinigt, gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C .

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur spezifischen Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde die Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR) eingesetzt (Mullis et al., 1986). In den Reaktionsansätzen (20 oder 50 μl) für die PCRs befanden sich die Template-DNA (genomische DNA, cDNA oder Plasmid-DNA, 10 bis 100 ng), spezifische Oligonukleotide/Primer (20 pmol), Desoxynukleotid-Triphosphate (10 mM je dNTP), DNA-Polymerase-Puffer (Puffer S (10x, *Taq*) bzw. Phusion™ HF-Puffer (5x, Phusion™ DNA-Polymerase)) und die jeweilige DNA-Polymerase (*Taq*-DNA-Polymerase (Eigenproduktion) bzw. Phusion™ DNA-Polymerase (1 U)). Als Initialschritt wurde eine Denaturierung (30 s, $95^\circ\text{C}/98^\circ\text{C}$ (1)) der Template-DNA durchgeführt. Die Amplifizierung erfolgte über eine spezifische Anzahl von Zyklen (28 bis 35, Wiederholung der Schritte 2 bis 4), bestehend aus Denaturierung (30 s, $95^\circ\text{C}/98^\circ\text{C}$ (2)), Hybridisierung der Oligonukleotide/Primer (30 s, spezifische Temperatur zwischen 50°C und 70°C (3)) und Synthese für die entsprechende Elongationszeit (Amplifikat- und Polymerase-abhängig,

68 °C/72 °C (4)). Als letzter Schritt erfolgte eine abschließende Kettenverlängerung (10 min, 68 °C/72 °C (5)).

2.8.2 Bakterien-Kolonie-PCR

Um zu überprüfen, ob *E. coli*-Bakterien-Kolonien (frisch nach Transformation auf einer LB-Agar-Platte gewachsen) das erwünschte Konstrukt in sich trugen (inklusive des Inserts und dessen Orientierung), wurde die sogenannte Kolonie-PCR angewendet. Hierbei wurde eine Bakterien-Kolonie mit einer Pipetten-Spitze gepickt, diese in einen vorbereiteten PCR-Ansatz überführt und anschließend in einem Mini-Reaktionsgefäß mehrmals auf und ab pipettiert (50 µl, Milli-Q® H₂O, „Backup“). Diese Prozedur wurde mit der gewünschten Anzahl der zu untersuchenden Bakterien-Kolonien wiederholt. Die PCR-Reaktionsansätze beinhalteten die entsprechenden Mengen und Volumina der o.a. Bestandteile. Die PCRs wurden, bis auf einen zuvor durchgeführten Bakterien-Aufschluss (5 min, 95 °C (0)), unter den bereits beschriebenen Bedingungen für den Initialschritt (Denaturierung (1)), die Denaturierung (2), die Hybridisierung der Oligonukleotide/Primer (3), die Synthese der DNA (4) sowie für die abschließende Kettenverlängerung (5) durchgeführt (s. Kapitel 2.8.1). Für den Nachweis und die Orientierung des Inserts wurden sowohl Insert-spezifische als auch eine Kombination aus Vektor-Backbone- und Insert-spezifischen Oligonukleotiden/Primer verwendet. Nach Abschluss der PCR und darauffolgendem Nachweis sowie Analyse der ggf. vorhandenen PCR-Produkte aus den jeweiligen gepickten Bakterien-Kolonien via Agarose-Gelelektrophorese, konnten die positiven Kolonien aus der „Backup“-Lösung in neue Bakterien-Übernachtskulturen überimpft werden und standen somit für weitere Zwecke zur Verfügung (Präparation von Plasmid-DNA).

2.8.3 Hefe-Kolonie-PCR

Um herauszufinden, welche Inserts in die Hefe-2-Hybrid-Plasmide (pACT) der „Interaktions-positiven“ Hefe-Kolonien, die aus der Sichtung der cDNA-Bibliothek (CD4-22 (Kim et al., 1997)) mit der 14-3-3 Isoform epsilon als Köder stammten, integriert waren, wurde eine sogenannte Hefe-Kolonie-PCR mit anschließender Sequenzierungs-Reaktion der PCR-Amplifikate durchgeführt. Bevor die Kolonie-PCRs vorgenommen werden konnten, mussten die auf SD-WLA-Agar-Platten (Interaktions-Medium) kultivierten Hefe-Kolonien/Zellen einem lytischen Verdau ihrer Zellwand durch Zymolyase® unterzogen werden. Dazu wurde mit einer Pipetten-Spitze etwas von den jeweiligen Hefe-Kolonien (zuvor auf der Rückseite der Petrischale markiert/benannt) aufgenommen, in ein Mikro-Reaktionsgefäß mit Zymolyase®-Arbeitslösung überführt (15 µl), dort durch mehrmaliges Pipettieren resuspendiert, die Reaktionsansätze für ein gewisse Zeit bei RT (20 min), 37 °C (5 min) sowie 95 °C (5 min) inkubiert und anschließend mit Milli-Q® H₂O verdünnt (60 µl, 1:5). Ein Aliquot dieser Verdünnung (5 µl, der Rest wurde für etwaige Wiederholungen bei -20 °C gelagert)

diente als Template für die darauffolgende Kolonie-PCR. Die PCR-Reaktionsansätze beinhalteten, bis auf eine speziell für „schwierige“ PCRs geeignete DNA-Polymerase (KAPA2G™ Robust DNA Polymerase), die entsprechende Mengen und Volumina der o.a. Bestandteile. Die PCRs wurden unter den bereits beschriebenen Bedingungen für die Denaturierung (1), die Hybridisierung der Oligonukleotide/Primer (2), die Synthese der DNA (3) sowie für die abschließende Kettenverlängerung durchgeführt (s. Kapitel 2.8.1). Für die Amplifizierung wurden Plasmid-spezifische Oligonukleotide/Primer (ACT1_F/R) verwendet. Nach Abschluss der PCR und Nachweis der ggf. vorhandenen PCR-Produkte aus den jeweiligen verdauten Hefe-Kolonien via Agarose-Gelelektrophorese, wurden die amplifizierten DNA-Fragmente direkt aus den Reaktionsansätzen mit Hilfe des NucleoSpin® Gel und PCR „Clean-up“ Kits (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren) oder des QIAEX II Gel Extraction Kits (QIAGEN GmbH, Hilden) entsprechend den Angaben der Hersteller isoliert und aufgereinigt. Die so präparierten DNA-Fragmente standen jetzt für weitere Zwecke zur Verfügung (Sequenzierungs-Reaktion/Analyse).

2.8.4 Gerichtete *in vitro*-Mutagenese von DNA-Konstrukten

Die gerichtete *in vitro*-Mutagenese wurde nach dem Protokoll des „QuikChange® II site-directed mutagenesis kit“ (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) durchgeführt. Die Methode basiert auf der zyklischen Mutagenese-Oligonukleotid/Primer-gerichteten Replikation einer doppelsträngigen Plasmid-DNA. Im anschließenden Restriktionsverdau mit einer spezifischen Restriktions-Endonuklease (*DpnI*, Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig) wird nur methylierte, also parentale DNA restringiert. Die darauf folgende Transformation von kompetenten Bakterien mit diesem Restriktionsansatz, ergibt Bakterien, die die mutierten Konstrukte beinhalten bzw. amplifizieren.

Der Reaktionsansatz (50 µl) beinhaltete die zu mutagenisierende Plasmid-DNA (5 bis 50 ng), die beiden komplementären Mutagenese-Oligonukleotide/Primer (jeweils 125 ng), Desoxynukleotid-Triphosphate (10 mM je dNTP), Phusion™ HF-Puffer (5x, 10 µl) sowie Phusion™ DNA-Polymerase (1 µl, 1 U). Die Amplifizierung erfolgte bei gleichzeitiger Mutagenese der Konstrukte; hierbei wiederholten sich (12 bis 18x) die Denaturierung (30 s, 98 °C (1)), die Hybridisierung der Oligonukleotide/Primer (30 s, spezifische Temperatur zwischen 50 und 70 °C (2)) und die Synthese der neuen DNA-Stränge (30 s/kb, 72 °C (3)). Der Reaktionsansatz wurde mit einem spezifischen Restriktionsenzym (*DpnI*, 10 U) versetzt und im Inkubator inkubiert (1 h, 37 °C). Anschließend wurden chemisch kompetente *E. coli* DH5α/XL1-Blue-Bakterien-Zellen mit dem Restriktionsverdau transformiert, der Transformationsansatz auf entsprechenden LB-Agar-Platten ausgestrichen, die Platten inkubiert (über Nacht, 37 °C) und die darauf gewachsenen Bakterien-Kolonien für weitere Zwecke verwendet (Kolonie-PCR, Anzucht von Übernackkulturen).

2.8.5 Präparation von Plasmid-DNA aus einer Bakterien-Übernachtskultur

Die für analytische Zwecke (Restriktionsverdau) vorgesehene Plasmid-DNA, wurde „quick-and-dirty“, nach der modifizierten Methode von Birnboim and Doly (1979), isoliert. Dazu wurde eine Bakterien-Übernachtskultur (5 ml, LB-Medium) pelletiert (2 min, 13200 rpm), das daraus resultierende Pellet in Lösung I (200 µl) resuspendiert, frisch hergestellte Lösung II (200 µl) dazugegeben, der Reaktionsansatz invertiert (10x) und auf Eis inkubiert (5 min). Nach Zugabe von Lösung III (200 µl) wurde erneut invertiert (5x) und nochmals auf Eis inkubiert (10 min). Durch Zentrifugation (5 min, 13200 rpm) wurden die anderen bakteriellen Bestandteile vom Überstand abgetrennt, dieser in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit RNase A-Lösung (7 µl, 10 mg/ml) versetzt und im Inkubator inkubiert (15 min, 37 °C). Anschließend wurde Isopropanol (600 µl, eiskalt) dazugegeben, die Lösung invertiert (10x) und zentrifugiert (15 min, 13200 rpm). Nach vorsichtigem Abkippen des Überstands wurde das Pellet mit Ethanol gewaschen (500 µl, eiskalt, 10x invertiert, zentrifugiert, 10 min, 13200 rpm) und der Überstand verworfen. Nach Abschluss des Trocknungs-Prozesses (15 min, 60 °C) wurde das DNA-Pellet in Milli-Q® H₂O (50 µl) aufgenommen und konnte für weitere Zwecke verwendet werden.

Saubere Plasmid-DNA, die für präparative Zwecke (Klonierungen, Transformationen) oder Sequenzierungs-Reaktionen/Analysen benötigt wurde, wurde durch das NucleoSpin® Plasmid EasyPure Miniprep Kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren) bzw. das QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) aus einer Bakterien-Übernachtskultur (5 ml, LB-Medium) entsprechend den Angaben der Hersteller präpariert.

2.8.6 Präparation von genomischer DNA (gDNA) aus Pflanzen

Die Isolierung von genomischer DNA aus *A. thaliana*-Pflanzen wurde leicht modifiziert nach dem Protokoll von Edwards et al. (1991) bzw. Kasajima et al. (2004) durchgeführt; dazu wurden Blatt-Stücke (ca. 5 x 5 mm) in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß geerntet, mit Edwards/Extraktions-Puffer (400 µl) versetzt und mit einem Mikropistill gemörsert. Der durch Zentrifugation (1 min, 13200 rpm) von den übrigen Blatt-Bestandteilen abgetrennte Überstand (300 µl) wurde in ein anderes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, die sich darin befindliche genomische DNA mit Isopropanol gefällt (300 µl, eiskalt, 10x invertiert, zentrifugiert, 5 min, 13200 rpm) und anschließend mit Ethanol gewaschen (500 µl, eiskalt, 10x invertiert, zentrifugiert, 5 min, 13200 rpm). Nach dem Trocknungs-Prozess (30 min, RT) wurde das DNA-Pellet in Milli-Q® H₂O (40 µl) aufgenommen und konnte für weitere Zwecke eingesetzt werden (Genotypisierung via PCR (1 µl gDNA/20 µl PCR-Ansatz, größere Volumina hatten eine inhibierende Wirkung auf die PCRs)).

2.8.7 Präparation von Gesamt-RNA aus Pflanzen

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurde das NucleoSpin® RNA Plant Kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren) bzw. das RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) entsprechend den Angaben der Hersteller verwendet. Die Konzentration und Qualität der RNA wurde photometrisch (NanoDrop, ND-1000 Spectrophotometer V3.5, NanoDrop Technologies, LLC, Wilmington, DE, USA) anhand des OD₂₆₀/OD₂₈₀-Verhältnisses bestimmt.

2.8.8 Reverse Transkription von „messenger“ RNA (mRNA) zu „complementary“ DNA (cDNA)

Zur Herstellung von cDNA wurde das RevertAid RT Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Die so hergestellte cDNA wurde für semiquantitative RT-PCRs eingesetzt.

2.8.9 Restriktion von DNA

2.8.9.1 Restriktion für die Klonierung von DNA-Fragmenten

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurden Bakterien-Zellen der *E. coli*-Stämme DH5α, XL1-Blue und One Shot® TOP10 verwendet. Nach Präparation der Plasmid-DNA aus den jeweiligen Bakterien-Überkulturen durch das dafür eingesetzte Miniprep Kit, stand die Plasmid-DNA für die weitere Restriktion zur Verfügung. DNA-Fragmente, die via PCR amplifiziert wurden, wurden über DNA-Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, aus dem Gel ausgeschnitten, durch ein Gel und PCR „Clean-up“ Kit aufgereinigt und konnten ebenfalls für die Restriktion eingesetzt werden.

Die präparativen Restriktionsansätze (80 µl) enthielten DNA (1 bis 5 µg) sowie die entsprechende/n Restriktions-Endonuklease/n (10 bis 20 U). Bei allen Restriktionen wurden die vom Hersteller (Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig) empfohlenen Puffer (10x) verwendet. Restriktionen mit zwei Enzymen wurden entweder parallel oder sequentiell, in dem/den vom Hersteller für den jeweiligen Doppelverdau empfohlenen Puffer/n (s. „DoubleDigest Calculator—Thermo Scientific“), durchgeführt. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte bei den vom Hersteller empfohlenen Temperaturen (3 h).

2.8.9.2 Überprüfung von putativen Konstrukten durch Restriktionsverdau der Plasmid-DNA

Die Vermehrung von Konstrukten, die durch gerichtete *in vitro*-Mutagenese erstellt wurden bzw. die für die Klonierung von diversen anderen Vektoren benötigt wurden (Y2H-, BiFC-, rBiFC-, Fusions-, Transformations/Komplementations-Konstrukte), erfolgte in Bakterien-Zellen der *E. coli*-Stämme DH5α, XL1-Blue und One Shot® TOP10. Im Anschluss an die Plasmid-Präparation nach Birnboim and

Doly (1979) erfolgte die analytische Restriktion in einem Ansatz (10 bzw. 20 μl) der die zu untersuchende DNA (0,5 bis 1 μg), die entsprechende/n Restriktions-Endonuklease/n (5 bzw. 10 U) sowie den vom Hersteller empfohlenen Puffer enthielt (10x, 1 bzw. 2 μl , Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig). Der Restriktionsverdau wurde bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur im Thermoblock/Inkubator durchgeführt (1 bis 3 h).

2.8.10 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse restringierter putativer Konstrukte, zur Überprüfung der Restriktions-Effizienz und zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten eingesetzt. Die Gele enthielten Agarose (0,8 bzw. 2 % (w/v)) sowie Ethidiumbromid (0,5 $\mu\text{g/ml}$, Zugabe nach Erhitzen und Abkühlen der Agarose-Lösung) und wurden mit TAE-Puffer (1x) hergestellt. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit Agarose-Gel-Ladepuffer (3x) versetzt. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Stromstärke (80 mA) in TAE-Puffer (1x) durchgeführt (45 bis 120 min).

2.8.11 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach Auftrennung durch Agarose-Gelelektrophorese wurde das gewünschte DNA-Fragment unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten, in ein leeres Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Masse des Gel-Stücks über die Feinwaage bestimmt. Die Isolierung und Aufreinigung des DNA-Fragments wurde mit Hilfe des NucleoSpin® Gel und PCR „Clean-up“ Kits (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren) oder des QIAEX II Gel Extraction Kits (QIAGEN GmbH, Hilden) entsprechend den Angaben der Hersteller durchgeführt.

2.8.12 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren (DNA/RNA)

Die Quantität bzw. Qualität von Nukleinsäuren (DNA/RNA) wurde photometrisch über das NanoDrop, ND-1000 Spectrophotometer V3.5 entsprechend den Angaben des Herstellers (NanoDrop Technologies, LLC, Wilmington, DE, USA) bestimmt. Abweichend zum Standardprotokoll, wurde allerdings das doppelte Volumen der zu untersuchenden DNA/RNA-Lösung (2 statt 1 μl) eingesetzt.

2.8.13 Ligation

Ligationen wurden nur mit gelelektrophoretisch aufgetrennten und via Kits aufgereinigten DNA-Fragmenten (sowohl restringierte linearisierte Plasmide als auch restringierte Teil-Fragmente/PCR-Produkte) durchgeführt. Nach Aufreinigung wurde die Konzentration der DNA-Fragmente photometrisch bestimmt (s.o.), ihre Stoffmenge kalkuliert (n, die mittlere molare Masse von

dsDNA/bp wurde als ca. 660 g/Mol angenommen) und das Insert/Vektor-Verhältnis ($n_{\text{Insert}}/n_{\text{Vektor}}$) im Ligations-Ansatz eingestellt (3:1 bis 5:1). Der Ansatz (10 μl bzw. 20 μl) enthielt die zu ligierenden DNA-Fragmente (in Summe 50 bis 400 ng), T4-DNA-Ligasepuffer (2x, 5 bzw. 10 μl) und T4-DNA-Ligase (1 bzw. 2 μl (ca. 1 bis 2 U), Promega GmbH, Mannheim). Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte für 3 h (RT) bzw. alternativ über Nacht (14 °C).

2.8.14 Gateway™ Rekombinations-Klonierungstechnologie (Invitrogen™)

2.8.14.1 BP-Reaktion

Die Herstellung der Gateway™ „Entry“-Klone (pDONR™_CDS/Sequenz_attL_x-attL_x) über eine BP-Rekombinations-Reaktion, wurde entsprechend des Protokolls der/s Technologie-Entwickler/Herstellers (Invitrogen™ – Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig) durchgeführt. Die dazu primär benötigten, mit entsprechenden „attachment sites“ (attB_x) ausgestatteten, DNA-Fragmente/PCR-Produkte, wurden mit Gen/CDS-spezifischen attB_x-Fusions-Primer über PCR amplifiziert und mit den gewünschten, die korrespondierenden „attachment sites“ (attP_x) tragenden, pDONR™-Vektoren in einer BP-Clonase®-vermittelten Reaktion rekombiniert (1 h). Der BP-Reaktionsmix wurde anschließend in chemisch-kompetente *E. coli* One Shot® TOP10-Bakterien-Zellen transformiert, der Transformations-Ansatz auf LB-Agar-Platten ausplattiert, diese über Nacht im Inkubator inkubiert (37 °C) und die darauf gewachsenen Bakterienkolonien via Kolonie-PCR sowie Plasmid-Präparation mit anschließender Sequenzierungs-Reaktion analysiert. Die so erstellen Gateway™ „Entry“-Klone konnten für weitere Zwecke eingesetzt werden (LR-Reaktionen).

2.8.14.2 LR-Reaktion

Die Herstellung der Gateway™ „Expression/Destination“-Klone (in unserem Fall: pB7WGR2_CDS/Sequenz_attB1-attB2, pBiFct-2in1-CN_CDS₁/Sequenz₁_attB3-attB2 //_CDS₂/Sequenz₂_attB1-attB4), pSPYCE/SPYNE_GW_CDS/Sequenz_attB1-attB2) über eine LR-Rekombinations-Reaktion, wurde entsprechend des Protokolls der/s Technologie-Entwickler/Herstellers (Invitrogen™ – Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig) durchgeführt. Hierzu wurden die über eine LR-Reaktion erstellten „Entry“-Klone (pDONR™_CDS/Sequenz_attL_x-attL_x) mit den entsprechenden/korrespondierenden „leeren“ „Expression/Destination“-Vektoren (pX_attR_x-attR_x) in einer LR-Clonase®-vermittelten Reaktion rekombiniert (1 h). Der LR-Reaktionsmix wurde anschließend in chemisch-kompetente *E. coli* One Shot® TOP10-Bakterien-Zellen transformiert, der Transformations-Ansatz auf LB-Agar-Platten ausplattiert, diese über Nacht im Inkubator inkubiert (37 °C) und die darauf gewachsenen Bakterienkolonien via Kolonie-PCR sowie Plasmid-Präparation mit anschließender Sequenzierungs-

Reaktion analysiert. Die so erstellten Gateway™ „Expression/Destination“-Klone konnten für weitere Zwecke eingesetzt werden (*A. tumefaciens*-vermittelte transiente Transformation von *Arabidopsis*-Protoplasten und *N. benthamiana*-Pflanzen).

2.8.15 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* DH5 α /XL1-Blue- und One Shot® TOP10-Bakterien-Zellen durch Hitzeschock

Ein Aliquot chemisch kompetenter Bakterien-Zellen (50 μ l (One Shot® TOP10) bzw. 100 μ l (DH5 α /XL1-Blue)) wurde aufgetaut (auf Eis, langsam), mit einem Ligations-Ansatz (5 bis 10 μ l) bzw. Plasmid-DNA (1 μ l (50 pMol)) versetzt und auf Eis inkubiert (10 min (DH5 α /XL1-Blue) bzw. 30 min (One Shot® TOP10)). Anschließend wurde der Transformations-Ansatz für exakt 30 s (One Shot® TOP10) bzw. 2 min (DH5 α /XL1-Blue) bei 42 °C im Thermoblock gehalten (Hitzeschock), mit SOC- (250 μ l, One Shot® TOP10) bzw. LB-Medium (1 ml, DH5 α /XL1-Blue) versetzt und danach im Inkubationsschüttler inkubiert (1 h, 37 °C, 220 rpm). Im Anschluss an diese Regenerationsphase wurde der Ansatz pelletiert (2000 rpm, 2 min), der Überstand größtenteils (bis auf ca. 150 μ l) verworfen, das Bakterienpellet im restlichen Medium resuspendiert, die Bakteriensuspension in Teilen (50 bzw. 100 μ l) auf zwei LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Selektions-Antibiotikum ausplattiert und die Agar-Platten im Inkubator inkubiert (über Nacht, 37 °C).

2.8.16 Transformation von kompetenten *A. tumefaciens* C58C1/GV3101-Bakterien-Zellen durch Hitzeschock

Mit der auf Hofgen and Willmitzer (1988) zurückgehenden Methode zur Übertragung isolierter Plasmid-DNA auf Agrobakterien wurden zufriedenstellende Transformationsraten erzielt. Für die Transformation wurde ein Aliquot der kompetenten Bakterien-Zellen (200 μ l) aufgetaut (auf Eis, langsam), mit Plasmid-DNA versetzt (1 bis 5 μ g), auf Eis inkubiert (5 min) und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren (5 min). Das Auftauen der Zellen im Thermoblock (5 min, 37 °C) diente als Hitzeschock. Nach Zugabe von Medium (LB bzw. YEB, 1 ml) wurden die Zellen im Inkubationsschüttler kultiviert (2 bis 4 h, 28 °C, 160 rpm) und im Anschluss leicht an zentrifugiert (2 min, 2000 rpm). Der Überstand wurde größtenteils verworfen, das Pellet im restlichen Medium resuspendiert (ca. 150 μ l) und die Bakterien-Suspension auf LB-Agar-Platten, die mit den entsprechenden Selektions-Antibiotika versetzt waren, ausplattiert. Nach entsprechender Inkubationszeit im Inkubator (ca. 48 h, 28 °C) waren auf den Platten Kolonien mit transformierten Agrobakterien ersichtlich.

2.8.17 Sequenzierungs-Reaktionen/Analyse

Für die Sequenz-Analyse der unterschiedlichen Vektor-Systeme und PCR-Produkte, wurde die Firma GATC Biotech AG (Konstanz) beauftragt. Hierzu wurden DNA-Proben und zum Teil deren korrespondierende Oligonukleotide/Primer als Aliquots an die Firma versandt. Für eine erfolgreiche Sequenzierungs-Reaktion nach dem Sanger-Verfahren wurden folgende Proben-Voraussetzungen als Standard gefordert:

- Plasmid-Konzentration bzw. Volumen (je nach Größe): 30 bis 100 ng/μl, 20 μl
 - PCR-Produkt-Konzentration bzw. Volumen: 10 bis 50 ng/μl, 20 μl
 - Kunden-Primer-Konzentration bzw. Volumen: 10 pmol/μl, 20 μl
- Die Nukleotid-Lösungen durften kein EDTA enthalten.

Für die gängigen Vektor-Systeme bot die Firma eine umfangreiche Liste an Universal-Primer an, auf die für die Sequenzierungs-Reaktionen zurückgegriffen werden konnte. Nach Abschluss der Sequenz-Analyse wurden die Ergebnisse als „Download-File“ (.ab1 (ABI-Datei), .seq (SEQ-Datei), .fas (FAS-Datei)) auf der „Homepage“ der Firma (www.gatc-biotech.com) bereitgestellt. Die Chromatogramme sowie die daraus abgeleiteten Nukleotid-Sequenzen wurden mittels der CLC Main Workbench 7.7.3 (CLC bio, Aarhus C, Denmark) analysiert und mit den korrespondierenden/entsprechenden Sequenzen (NCBI, TAIR) sowie mit den *in silico*-erstellten Plasmiden/Vektoren abgeglichen (Veri-/Falsifizierung).

2.9 Das Hefe-2-Hybrid-System

Das Hefe-2-Hybrid-System wurde für die Sichtungen der cDNA-Bibliothek, die Bestätigung von Protein-Protein-Interaktionen und die Identifizierung des 14-3-3 Bindemotivs in den Protein-Sequenzen von IPs anhand des leicht modifizierten Protokolls („Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manual“) der Firma Clontech Laboratories, Inc. (A Takara Bio Company, Takara Europe, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) durchgeführt (s. Abbildung 3).

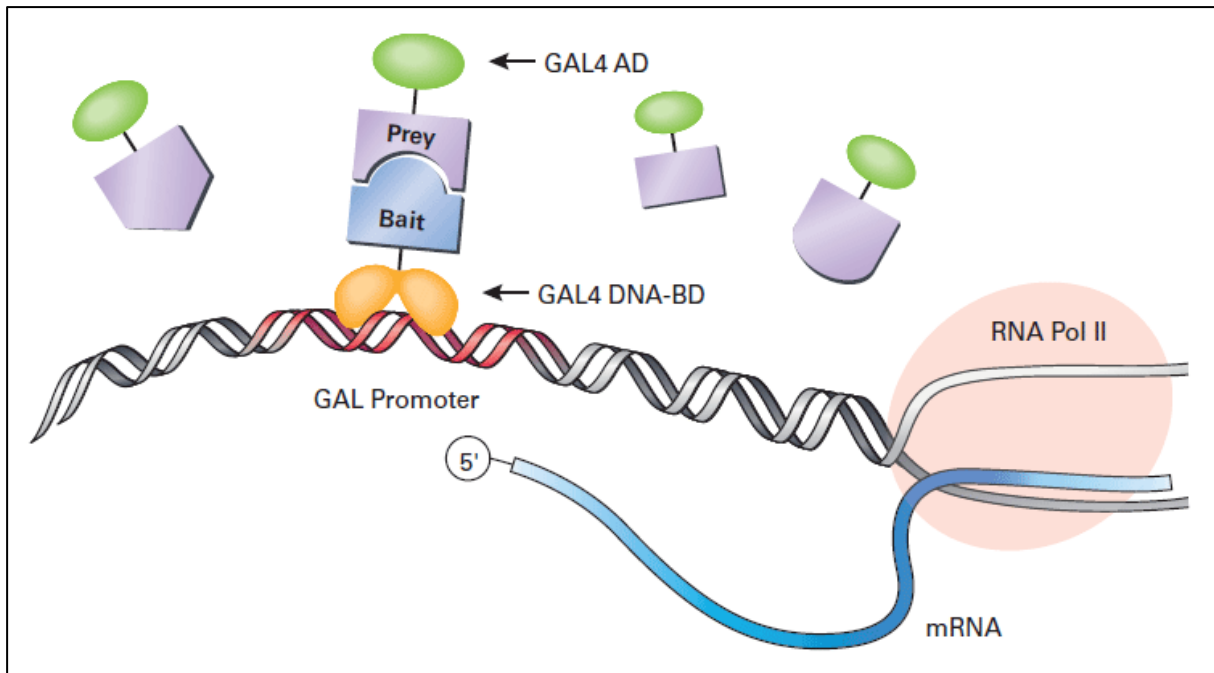


Abbildung 3 Vereinfachte Darstellung des Hefe-2-Hybrid-Systems. Die Transkription-aktivierenden Fusions-Proteine („Prey“/Beute-Proteine: „cDNA-Bibliothek“-kodierte Proteine:GAL4 AD) interagieren mit dem DNA-bindenden Fusions-Protein („Bait“/Köder-Protein: 14-3-3 Isoform epsilon:GAL4 DNA-BD); durch die Protein-Protein-Interaktion wird der GAL4-TF vollständig rekonstituiert, dieser bindet an den GAL Promoter und aktiviert hierüber die Expression der Reporter-Gene (verändert nach Clontech Laboratories, Inc., A Takara Bio Company, Mountain View, CA, USA; Abkürzungen: GAL4 AD: GAL4 Aktivierungs-Domäne, GAL4 DNA-BD: GAL4 DNA-Binde-Domäne, GAL „Promoter“: GAL Promotor, 5' (sprich: „5-Strich-Ende“): C5-Atom der endständigen Ribose (mit gebundenem Phosphatrest), Startpunkt des Transkripts, mRNA: „messenger“/Boten-RNA, RNA Pol II: RNA Polymerase II).

2.9.1 Herstellung kompetenter Hefe-Zellen (*S. cerevisiae* PJ69-4a/Y187)

Für die Herstellung der kompetenten Hefe-Zellen musste der für die Transformation ausgewählte Hefe-Stamm (*S. cerevisiae* PJ69-4a/Y187) aus einer Stammkultur (Glycerol-Stock, -80 °C) auf einer Agar-Platte („SD w/o Lys“- (PJ69-4a) bzw. YPDA-Medium (Y187)) ausgestrichen und diese im Inkubator inkubiert werden (ca. 4 d, 30 °C). Mit einer auf dieser Platte gewachsenen größeren Einzelkolonie wurde eine Vorkultur (Klein-Ansatz (KA): 30 ml bzw. Groß-Ansatz (GA): 90 ml, YPDA-Medium) inokuliert und diese über Nacht angezogen (30 °C, 240 rpm). Ein Teil davon (10 bis 12 ml (KA) bzw. 30 bis 36 ml (GA)) wurde in eine Hauptkultur überführt (300 ml (KA) bzw. 1000 ml (GA), YPDA-Medium, OD₆₀₀: 0,2 bis 0,3) und diese bis zur Verdopplung der ursprünglichen OD₆₀₀ (0,4 bis 0,6) im Inkubationsschüttler inkubiert (ca. 2 bis 3 h, 30 °C, 240 rpm). Die herangewachsene Hauptkultur wurde anschließend pelletiert (5 min, RT, 1000 g), der Überstand verworfen und das Pellet zunächst in TE- (1x, 30 ml (KA) bzw. 500 ml (GA)), resuspendiert, zentrifugiert, 5 min, RT, 1000 g) und anschließend in TE/Lithiumacetat-Puffer (je 1x, 20 ml (KA) bzw. 60 ml (GA)), resuspendiert, zentrifugiert, 5 min, RT, 1000 g) gewaschen. Die pelletierten Hefe-Zellen wurden in

TE/Lithiumacetat-Puffer resuspendiert (je 1x, 1,5 ml (KA) bzw. 8 ml (GA)) und waren nun kompetent für die PEG-vermittelte Transformation (für ca. 2 h, RT).

2.9.2 PEG 3350-vermittelte Transformation von Hefe-Zellen (*S. cerevisiae* PJ69-4a/Y187) mit Plasmid-DNA

Für die eigentliche Hefe-Transformation wurde Plasmid-DNA, die für die Bestätigung von Protein-Protein-Interaktionen und der Identifizierung des 14-3-3 Bindemotivs in der Protein-Sequenz von IPs (Klein-Ansatz (KA): pGBKT7_CDS₁ vs. pGADT7_CDS₂ (je 1 µl, 250 ng/µl)) bzw. für die Sichtung der cDNA-Bibliothek benötigt wurde (Groß-Ansatz (GA): pGBKT7-„14-3-3 Isoform epsilon“ (2 ml, 250 ng/µl) vs. pACT-„cDNA-Bibliothek“ (40 bis 200 µl, 250 ng/µl)), zusammen mit Hering-Sperma-DNA (5 µl (KA) bzw. 1 ml (GA), 10 mg/ml, „Carrier“-DNA) in Eppendorf-Reaktionsgefäße vorgelegt. Hierauf wurden die kompetenten Hefe-Zellen (50 µl (KA) bzw. 4 ml (GA), Vortex, s.o.) sowie PEG 3350-Lösung (300µl (KA) bzw. 30 ml (GA), 50 % (w/v), Vortex, vor Gebrauch frisch hergestellt) gegeben und der Transformations-Ansatz im Inkubationsschüttler inkubiert (30 min, 30 °C, 220 rpm). Nach Zugabe von DMSO (35 µl (KA) bzw. 3,5 ml (GA), 8x invertieren) wurde der Transformations-Ansatz im Thermoblock inkubiert (15 min, 42 °C, Hitzeschock) und auf Eis abgekühlt (1 bis 2 min). Im Anschluss daran wurde der Ansatz kurz an zentrifugiert (1 min, 13200 rpm), der Überstand verworfen, das Pellet in SD-WL-Medium (300 µl (KA) bzw. 6 ml (GA)) resuspendiert und die transformierten Hefe-Zellen (100 µl (KA) bzw. 100µl und 5,9 ml (GA)) auf Agar-Platten mit Selektions- (SD-WL) und Interaktions-Medium (SD-WLA) ausgestrichen. Danach wurden die Platten verschlossen (PARAFILM®) und im Inkubator inkubiert (3 bis 4 d, 30 °C).

2.9.3 Semiquantitative Analyse der Intensität von Protein-Protein-Interaktionen mittels Hefe-2-Hybrid-System bzw. Hefe-Wachstums-Tests

Zur semiquantitativen Analyse der Intensität von Protein-Protein-Interaktionen wurde das Hefe-2-Hybrid-System angewendet und mit den daraus resultierenden Hefe-Klonen Wachstums-Tests durchgeführt. Hierzu wurden „Interaktions-positive“ Klone (drei unterschiedliche Klone pro Transformation) von auf Agar-Platten mit Interaktions-Medium (SD-WLA) gewachsenen Hefe-Kolonien gepickt, in Glycerin-Lösung (100 µl, 10 % (v/v)) aufgenommen und gut gemischt. Daraus wurden Verdünnungen (1:50, 1 ml, 20 µl Hefe-Suspension, 980 µl Glycerin-Lösung (10 % (v/v))) erstellt, die OD₆₀₀ bestimmt und bei allen zu untersuchenden Ansätzen gleich eingestellt (OD₆₀₀: 0,05). Aus diesen Ansätzen wurden weitere Verdünnungen hergestellt (1:10 bzw. 1:100, 100 µl, mit Glycerin-Lösung (10 % (v/v))) und ein Aliquot von den Ausgangs-Ansätzen und den Verdünnungen (4 µl, X₁, X_{1:10}, X_{1:100}) zusammen auf Agar-Platten mit Selektions- (SD-WL) und Interaktions-Medium

(SD-WLA) getropft. Nach dem Trocknen der Platten (ca. 5 min) wurden sie verschlossen (PARAFILM®) und im Inkubator inkubiert (3 bis 4 d, 30 °C). Zur Dokumentation wurden die Platten mit den darauf gewachsenen Hefe-Kolonien eingescannt (600 dpi). Das Wachstum der entsprechenden Hefe-Klone, die die zu untersuchenden Proteine koexprimierten, lies auf die Intensität der Protein-Protein-Interaktion (semiquantitativ) rückschließen.

2.10 Biochemische Methoden

2.10.1 Protein-Extraktion aus Hefe-Zellen (*S. cerevisiae* PJ69-4a/Y187)

Die Protein-Extraktion aus Hefe-Zellen erfolgte über das adaptierte Protokoll von Yaffe and Schatz (1984). Dazu wurde der mit den entsprechenden Vektoren (pGADT7:CDS₁, pGBKT7:CDS₂) transformierte Hefe-Stamm (*S. cerevisiae* PJ64-4A/Y187) aus einer Stammkultur (Glycerol-Stock) auf Agar-Platten mit Interaktions-Medium (SD-WLA) ausgestrichen und diese im Inkubator inkubiert (3 d, 28 °C). Eine darauf gewachsene Einzel-Kolonie wurde in eine Flüssig-Kultur (YPDA-Medium, 25 ml) überführt, diese bis zu einer bestimmten Zelldichte (5×10^6) im Inkubationsschüttler kultiviert (ca. 3 bis 4 h, 30 °C, 220 rpm) und die darin gewachsenen Zellen pelletiert (5 min, RT, 1000 g). Nach dem Waschen des Pellets (Milli-Q® H₂O, 1x 1 ml, eiskalt, resuspendiert, zentrifugiert, 5 min, RT, 1000 g) wurden die Zellen in Milli-Q® H₂O aufgenommen (1 ml (10µl 1 % (w/v) PMSF (100 µg))), durch Zugabe von Natronlauge (150 µl 2 N NaOH (12 µl 100 % (v/v) β-Mercaptoethanol (8 % (v/v))), eiskalt) sowie mehrmaliges Invertieren (3x) aufgeschlossen und auf Eis inkubiert (10 min). Im Anschluss daran wurde Trichloressigsäure hinzugefügt (150 µl 100 % (v/v) TCA (50 % (v/v))), eiskalt, invertiert (3x) und abermals auf Eis inkubiert (10 min). Nach der Zentrifugation des Reaktionsansatzes (2 min, 13200 rpm) wurde das Pellet in Aceton gewaschen (1x 1 ml, eiskalt, resuspendiert, zentrifugiert, 2 min, 13200 rpm) der Überstand verworfen und etwaige Acetonreste durch Abdampfen entfernt. Das getrocknete Pellet wurde in Probenpuffer (100 µl) aufgenommen und resuspendiert. Der Protein-Extrakt wurde anschließend im Thermoblock denaturiert (10 min, 95 °C) und konnte nach dem Abkühlen für die SDS-Gelelektrophorese verwendet werden (7,5 µl).

2.10.2 Bestimmung der Protein-Konzentration

Die Bestimmung der Protein-Konzentration wurde über eine adaptierte Methode nach Bradford (1976) mit der Protein-Färbelösung Roti®-Quant entsprechend den Angaben des Herstellers (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) durchgeführt. Dazu wurde die zu bestimmende Protein-Probe (5 µl, 0,2 bis 4 µg/µl, evtl. verdünnen) zusammen mit Milli-Q® H₂O (795 µl) und Roti®-Quant (5x, 200 µl) in eine Plastik-Küvette pipettiert, der Reaktionsansatz invertiert (5x), bei RT inkubiert (mind. 5 min, RT)

und anschließend im Spektrophotometer (OD_{595}) gegen einen Blindwert (ohne Protein) vermessen. Die Konzentrations-Bestimmung erfolgte mit Hilfe einer Eichkurve, die als Referenz erstellt wurde (0 bis 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA (End-Konzentration im Reaktionsansatz)).

2.10.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung komplexer Protein-Gemische wurde über diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierbei wurden die Proteine im Sammelgel zu einer scharfen Bande fokussiert und in dem darauf folgenden Trenngel bzgl. ihres relativen Molekulargewichts aufgetrennt (Laemmli, 1970). Der Acrylamid-Gehalt des Sammelgels lag bei 4 %, der des Trenngels, in Abhängigkeit vom Molekulargewicht der zu detektierenden Proteine, zwischen 9 % und 12,5 % (s. Tabelle 1, (w/v)). Zunächst wurde das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation, wurde das Isopropanol entfernt, das Trenn- mit dem Sammelgel überschichtet und ein Kamm für die Ausbildung der Probenaschen platziert. Sobald das Sammelgel ausgehärtet war, wurde die Gel-Apparatur aufgebaut, mit SDS-Gel-Laufpuffer (1x) befüllt, der Kamm aus dem Gel entfernt und die Probenaschen ausgespült. Vor dem Auftragen der Proben wurden sie mit SDS-Gel-Lade- (4x Laemmli-Puffer) bzw. Probenpuffer versetzt und im Thermoblock denaturiert (10 min, 95 °C). Um nach dem Lauf eine Zuordnung der Proteine zu ihrem relativen Molekulargewicht zu gewährleisten, wurde zusätzlich ein Protein-Größenstandard (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder/Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig) aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke (20 mA/Gel) in SDS-Gel-Laufpuffer (1x). Nach Austritt des Bromphenolblaus (im SDS-Gel-Ladepuffer enthalten) aus dem Trenngel wurde der Lauf beendet (nach ca. 2h), das Sammelgel entfernt und das Trenngel gewaschen (Milli-Q® H_2O). Das Polyacrylamid-Gel und das darin aufgetrennte Protein-Gemisch konnte nun für weitere Zwecke eingesetzt werden (Coomassie® Brilliantblau G 250-Färbung, Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose/PVDF-Membran).

Tabelle 1 Zusammensetzung des Sammelgels bzw. der Trenngele. Das Sammelgel hatte für alle durchgeführten SDS-Gelelektrophoresen die gleiche Zusammensetzung (rechte Spalte, 4 % Acrylamid-Gehalt (w/v)). In Abhängigkeit vom relativen Molekulargewicht der zu detektierenden Proteine, wurden unterschiedliche Trenngel-Zusammensetzungen verwendet (linke Spalten, 9 bis 12,5 % Acrylamid-Gehalt (w/v)). Alle Volumen-Angaben sind in Milliliter (ml).

| Trenn-/Sammelgel [ml]: | 9 % | 11 % | 12,5 % | 4 % |
|-------------------------------|------------|-------------|---------------|------------|
| Milli-Q® H ₂ O | 2,880 | 2,433 | 2,100 | 3,033 |
| Trenn-/Sammelgel-Puffer | 1,667 | 1,667 | 1,667 | 1,250 |
| Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) | 2,000 | 2,450 | 2,777 | 0,667 |
| 10 % SDS (w/v) | 0,067 | 0,067 | 0,067 | 0,050 |
| 10 % APS (w/v) | 0,050 | 0,050 | 0,050 | 0,027 |
| TEMED | 0,005 | 0,005 | 0,005 | 0,017 |
| End-Volumen | 6,668 | 6,672 | 6,665 | 5,043 |

2.10.4 Coomassie® Brilliantblau G 250-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Für die Färbung der Polyacrylamid-Gele wurden diese auf einem Schüttler/„Shaker“ in Coomassie® Brilliantblau G 250-Färbelösung inkubiert (20 ml, 30 min, RT, 60 rpm). Nach dem Waschen der Gele (ca. 20 ml, Milli-Q® H₂O, 2x 2min, RT, 60 rpm) erfolgte das Entfärben in Coomassie®-Entfärbelösung (20 ml, RT, 60 rpm), die in bestimmten Zeitabständen (30 min) gegen neue ausgetauscht wurde. Die Entfärbung wurde solange durchgeführt, bis die unspezifische Hintergrund-Färbung entfernt und das Protein-Muster deutlich sichtbar war.

2.10.5 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose/PVDF-Membranen

Die in den Polyacrylamid-Gelen aufgetrennten Proteine wurden in dem Mini-PROTEAN® 3 Elektrophorese- und Blot-System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) bzw. in der Blotkammer „TE 22 Mini Tank Transfer Unit“ (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) elektrophoretisch auf eine Protran® Nitrocellulose Transfer Membran (0,2 µm, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) bzw. eine Immobilon®-P Membran (PVDF, 0,45 µm, Merck Chemicals GmbH, Darmstadt), die zuvor durch kurze Inkubation in Methanol aktiviert wurde (10 ml, 20s), nach der von Towbin et al. (1979) beschriebenen Methode übertragen (Transfer-Puffer (1x), 16 h, 2,5 mA/cm² Membran, RT bzw. 4°C).

2.10.6 Ponceau S-Färbung von Nitrocellulose/PVDF-Membranen

Durch eine reversible Färbung mit Ponceau S-Färbelösung (20 ml) konnte der Protein-Transfer aus dem Gel auf die entsprechende Membran überprüft werden (2 min, RT, 60 rpm). Die Proteine des Größenstandards (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder/Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig) dienten zusätzlich

als Kontrolle für den korrekten Transfer auf die Nitrocellulose/PVDF-Membran. Die Entfärbung der Membran wurde durch mehrmaliges Waschen (20 ml, Milli-Q® H₂O, 3x 2 min, RT, 60 rpm) bewerkstelligt.

2.10.7 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Für die immunologische Detektion von Proteinen mussten zuerst die unspezifischen Bindungsplätze auf der Nitrocellulose/PVDF-Membran durch Inkubation in einer Protein-Lösung (10 ml, TBS (1x), Albumin Fraction V/BSA (5 % (w/v)) bzw. Isostar Powerplay High Protein 90 neutral (5 % (w/v)), 2 h, 60 rpm) abgesättigt werden. Im Anschluss daran wurde die Membran mit einem Antigen-spezifischen Primär-Antikörper (Detektion der im Hefe-2-Hybrid-System zu analysierenden Proteine durch Anti-c-Myc-Antikörper, IgG, Maus (1:4000) bzw. Anti-HA-Antikörper, IgG, Maus (1:2000), 10 ml, TBS (1x), Albumin Fraction V/BSA (5 % (w/v)) bzw. Isostar Powerplay High Protein 90 neutral (5 % (w/v))) inkubiert (3 h, 60 rpm). Nach dem Waschen (10 ml, TBS (1x), 3x, 10 min, 60 rpm) wurde die Nitrocellulose/PVDF-Membran in einer Sekundär-Antikörper-Lösung (Anti-Maus IgG Alkalische Phosphatase-Antikörper/Konjugat (1:30000) bzw. Anti-Maus IgG Peroxidase-Antikörper/Konjugat (1:80000 - 160000), 10 ml, TBS (1x)) inkubiert (3 h, 60 rpm). Durch weitere Waschschrte (10 ml, TBS (1x), 1x, 10 min, 10 ml, AP-Puffer, 1x, 10 min bzw. 10 ml, TBS (1x), 2x, 10 min (ECL)) wurde das an die Membran unspezifisch gebundene Konjugat entfernt. Die Detektion des Sekundär-Antikörpers/der Signale erfolgte direkt auf der Membran (Inkubation der Membran in einer spezifischen Substrat-Lösung (5 ml, AP-Puffer, NBT (0,66 % (v/v)), BCIP 0,33 % (v/v))) bzw. alternativ auf einem Film via ECL (Dunkel-Inkubation der Membran in einer Folie zusammen mit einer spezifischen Substrat-Lösung (5 ml Lösung A, 15 µl Lösung B), Applikation des Films für eine gewisse Zeitdauer (30 s bis 5 min), Entwicklung und Fixierung des Films in den entsprechenden Reagenzien (20 ml, Entwickler, 1x, 1 min, 20 ml, H₂O, 1x, 1 min, 20 ml, Fixierer, 1x, 1min, 20 ml, H₂O, 1x, 1 min)). Die Reaktion fand so lange statt, bis die spezifischen Signale auf der Membran bzw. dem Film eindeutig ersichtlich waren. Durch Abgießen der Substrat-Lösung und Aufnahme der Membran in Milli-Q® H₂O bzw. Entfernung des Films von der Membran wurde die Detektion gestoppt. Nach dem Trocknungs-Prozess wurde die Membran bzw. der Film mit den sich darauf befindlichen Signalen eingescannt (600 dpi). Alle Inkubations- und Waschschrte wurden bei RT durchgeführt.

2.11 Pflanzen-Anzucht/-Propagierung

2.11.1 Anzucht und Propagierung von *A. thaliana*- und *N. benthamiana*-Pflanzen

Die Anzucht und Propagierung von *A. thaliana*- und *N. benthamiana*-Pflanzen erfolgte im zentralen Gewächshaus („Central Facilities“) des Zentrums für Molekularbiologie der Pflanzen (Eberhard Karls Universität Tübingen) unter Langtag-Bedingungen (L/D: 16 h/8 h, Licht-Intensität: ca. 125 $\mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (PAR), 20 bis 25 °C).

2.11.2 Anzucht von *Arabidopsis*-Keimlingen in Petrischalen

Zur Anzucht wildtypischer und transgener *Arabidopsis*-Keimlinge in Petrischalen wurde das entsprechende Saatgut oberflächensterilisiert (Natriumhypochlorit-Lösung (5 % (w/v), 0,5 ml, 5 min, 3x waschen, Milli-Q® H₂O, 1,5 ml, 5 min) und anschließend auf MS-Phyto-Agar-Platten (Murashige and Skoog, 1962), mit dem entsprechenden Selektions-Antibiotikum und optional mit Saccharose (1 % (w/v)) versetzt, ausgesät. Die Anzucht erfolgte im Anschluss an eine Stratifikationsphase (1 bis 2 d, 4 °C) in einer Klimakonstantkammer unter Langtag-Bedingungen (L/D: 16 h/8 h, Licht-Intensität: ca. 70 bis 90 $\mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (PAR), 23 °C).

2.11.3 Anzucht von etiolierten *Arabidopsis*-Keimlingen

Die Anzucht von etiolierten *Arabidopsis*-Keimlingen erfolgte unter nichtsterilen Bedingungen auf Filterpapier (Rundfilter) in Petrischalen; dazu wurde das entsprechende Saatgut auf das zuvor mit Leitungswasser (1,5 ml) benetzte Filterpapier ausgesät und die Schalen verschlossen (PARAFILM®). Nach einer Stratifikationsphase (1 bis 2 d, 4 °C) erfolgte die Induktion der Keimung durch eine Licht-Behandlung in der Klimakonstantkammer (4 h, 23 °C). Anschließend wurden die Petrischalen Licht-dicht mit Alufolie umschlossen und für die entsprechende Zeitdauer in die Klimakonstantkammer gestellt (88 bzw. 96 h, 23 °C).

2.12 Herstellung von *A. thaliana*-Kreuzungs-Linien

Das Kreuzen von *A. thaliana*-Pflanzen erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Ortrun Mittelsten Scheid (Gregor Mendel-Institut of Molecular Plant Biology, Austrian Academy of Sciences, Wien, Österreich). Als maternale Pflanzen wurden ca. drei bis vier Wochen alte Pflanzen, die fünf bis sechs Infloreszenzen entwickelt hatten, verwendet. Die ausgewählten paternalen Pflanzen hatten gerade begonnen Schoten zu entwickeln. Unter Verwendung des Stereomikroskops (Binokulars) wurden bei den maternalen Pflanzen alle sich entwickelnden Schoten, offene Blüten sowie Blüten die bereits eine weiße Spitze hatten mit einer feinen Schere entfernt. Bei den drei bis fünf übrigen Blüten

wurden mittels einer Spezial-Pinzette (z.B. Dumont WA # 5 - FST Exclusive (Biology), Schweiz) die unreifen, geschlossenen Antheren explantiert. Nach weiteren zwei bis drei Tagen wurden die Narben der Empfänger-Blüten, deren Oberfläche nun rau und klebrig war, mit reifen Antheren der Donor-Pflanzen bestrichen, sodass Pollen darauf haften blieben. Die hierdurch manuell bestäubten Blüten wurden durch feine Klebestreifen (zuvor beschriftet) markiert. Nach ca. fünfzehn bis fünfundzwanzig Tagen (abhängig von den Wachstums-Bedingungen und der entsprechenden Linie) waren die leicht gelblichen Schoten mit den hybriden Samen reif für die Ernte. Für die endgültige Reifung wurden die Schoten für ein paar Tage bei RT in Eppendorf-Reaktionsgefäßen gelagert. Die Selektion erfolgte nach errechneten Segregations-Verhältnissen auf MS-Phyto-Agar-Platten mit entsprechenden Selektions-Antibiotika.

2.13 Stabile bzw. transiente Transformation von *A. thaliana*-Protoplasten/Pflanzen und *N. benthamiana*-Blättern

2.13.1 Transiente Transformation von *A.thaliana*-Protoplasten

Die transiente Transformation von *Arabidopsis*-Protoplasten wurde von der Pflanzen-Transformations-Einheit („Central Facilities“) des Zentrums für Molekularbiologie der Pflanzen (Eberhard Karls Universität Tübingen) nach den Protokollen von Negrutiu et al. (1987) und Merkle et al. (1996) durchgeführt. Die Protoplasten wurden von Zellen einer im Dunkeln gewachsenen *A. thaliana* var. Col-0 Wurzel-Zellkultur (ca. eine Woche alt, Schumacher, unveröffentlicht, Tübingen/Heidelberg) präpariert und mit der/n entsprechenden Plasmid-DNAs (max. 40 µg, 40 µl) transformiert. Bei Doppel- bzw. Kotransformation (z.B. für BiFC- und Kollokalisations-Studien) wurde jeweils die Hälfte der Plasmid-Menge (max. 20 µg) für das entsprechende Konstrukt verwendet. Die Signale der transient in den Protoplasten exprimierten Proteine wurden nach der Transformation mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert (24 bis 48 h).

2.13.2 Transiente Transformation von *N. benthamiana*-Blättern

Für die transiente Transformation von Tabak-Blättern (*A. tumefaciens*-vermittelter Gentransfer) wurden ca. vier Wochen alte *N. benthamiana*-Pflanzen verwendet. Dazu wurden die entsprechend-transformierten *A. tumefaciens* C58C1/GV3101-Bakterien-Stämme angezogen und damit die Blätter infiltriert. Die optische Dichte der für die Infiltration verwendeten Agrobakterien-Stämme, wurde nach Anzucht (Bakterien-Übernacht- (5 ml, YEB-Medium, 24 h, 28 °C, 160 rpm) bzw. Tagkultur (5 ml, YEB-Medium, 4 h, 28 °C, 160 rpm)) und dem Pelletieren der Bakterien (2 min, 2000 rpm) mit Infiltrations-Medium eingestellt (OD₆₀₀: 0,1). Bei Koinfiltration bzw. Kotransformation (z.B. für BiFC-,

Kolokalisations- und FRET-FLIM-Studien) sollte das OD₆₀₀-Verhältnis (OD_{600}^1/OD_{600}^2) der entsprechend eingesetzten Stämme bei eins liegen. Die Bakterien-Suspension wurde auf Eis inkubiert (1h) und anschließend mit einer Spritze über die offenen Spaltöffnungen (Blatt-Unterseite) in den Interzellularraum des Blatt-Parenchyms der zuvor bei einer hohen relativen Luftfeuchtigkeit gehaltenen Pflanzen injiziert (4 h, ca. 90 bis 100 %). Die Transformanten wurden zur Regeneration im Dunkeln belassen (über Nacht). Bis zur Detektion der Fluoreszenz-Signale der transient-exprimierten Proteine in den Blatt-Epidermis-Zellen (nach ca. 24 bis 48 h, mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)) wurden die Pflanzen in einer Klimakonstantkammer unter Langtag-Bedingungen gehalten (L/D: 16 h/8 h, Licht-Intensität: ca. 70 bis 90 $\mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (PAR), 23 °C)).

2.13.3 Stabile Transformation von *A. thaliana*-Pflanzen mittels „floral dip“

Die Herstellung transgener *Arabidopsis*-Linien (stabile Transformation) wurde nach der “floral dip“-Methode von Clough and Bent (1998) mit voll aufgeblühten Pflanzen durchgeführt (4 bis 6 Wochen alt, in einer Klimakonstantkammer unter Langtag-Bedingungen herangezogen (L/D: 16 h/8 h, 20 bis 25 °C)). Dazu wurde der mit dem gewünschten Konstrukt transformierte *A. tumefaciens* C58C1/GV3101-Stamm angezogen (Bakterien-Übernacht- (5 ml, YEB-Medium, 24 h, 28 °C, 160 rpm) bzw. Hauptkultur (200ml, YEB-Medium, 24 h, 28 °C, 160 rpm)), die Bakterien pelletiert (20 min, 5500 rpm), das Pellet in Transformations-Medium (300 ml) resuspendiert, die Infloreszenzen der Pflanzen in diese Suspension getaucht (ca. 30 s.) und die Transformanten regeneriert (über Nacht, hohe relative Luftfeuchtigkeit (ca. 90 bis 100 %)). Die transformierten Pflanzen (T₀-Generation) wurden bis zur Samenreife in einer Klimakonstantkammer unter Langtag-Bedingungen herangezogen (L/D: 16 h/8 h, Licht-Intensität: ca. 70 bis 90 $\mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (PAR), 23 °C). Die Selektion der Folge-Generationen (T₁, T₂, T₃) fand auf MS-Phyto-Agar-Platten mit entsprechenden Selektions-Antibiotika statt. Die selektierten bzw. als positiv getesteten Keimlinge (Genotypisierung via PCR) wurden auf Erde pikiert und die Pflanzen bis zur Samenreife in einer Klimakonstantkammer unter Langtag-Bedingungen herangezogen.

2.14 Bestimmung der phototropen Reaktion von etiolierten *A. thaliana*-Keimlingen

Zur Analyse der phototropen Reaktion von etiolierten *Arabidopsis*-Keimlingen wurden die entsprechend angezogenen Linien (88 h im Dunkeln, 23 °C, s. Kapitel 2.11.3) unter Sicherheitslicht („Grünlicht“) in die BL-Kammer überführt und dort für eine gewisse Zeit unilateralem BL ausgesetzt (8 h, 1 $\mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (geringe Intensität/„low fluence rate“)). Für die qualitative Analyse wurden die Rundfilter aus den Petrischalen genommen, übereinstimmend auf eine Basis platziert und die Keimlinge mit einer Digitalkamera fotografiert (horizontal, aus einem Winkel von 90° zur

ursprünglichen BL-Quelle). Für die quantitative Auswertung der phototropen Reaktion wurde eine angemessene Anzahl von Keimlingen ($n = 35/\text{Linie}$) von den Rundfiltern auf einen Streifen Klebeband überführt und dieser von oben („Aufsicht“) fotografiert. Die Analyse der Aufnahmen und Bestimmung des Hypokotyl-Winkels der Keimlinge (Winkel zwischen den vertikalen und den abgeknickten Abschnitten der Hypokotyle, s. Ergebnisse) wurde mit Hilfe der ImageJ Software (<http://imagej.nih.gov/ij/>) unternommen.

2.15 BFA-, Cantharidin- und FM[®] 4-64-Applikation an etiolierte *Arabidopsis*-Keimlinge

Für Kolokalisations-Studien von mGFP4-Fusions-Proteinen mit dem Endozytose-Tracer FM[®] 4-64 in stabil-transformierten *Arabidopsis*-Keimlingen in An- und Abwesenheit von BFA oder Cantharidin wurden die auf Filterpapier angezogenen etiolierten Keimlinge (96 h im Dunkeln, 23 °C, s. Kapitel 2.11.3) unter Sicherheitslicht („Grünlicht“) in Greiner CELLSTAR[®] „multiwell culture plates“ mit MS-Medium (1x) überführt, das entsprechende Volumen der verschiedenen Lösungen (Inhibitoren: BFA [50 µM], Cantharidin [50 µM], Tracer/Farbstoffe: FM[®] 4-64 [2 µM] bzw. Mock-Lösungen: DMSO, Milli-Q[®] H₂O) zugegeben und der Inkubations-Ansatz entsprechend inkubiert (Cantharidin: 1 h, BFA: 2 h, im Dunkeln, RT). Vor der mikroskopischen Untersuchung wurden die Keimlinge auf Objektträger überführt und direkt im Anschluss analysiert.

2.16 Zusätzlich angewandte Fluoreszenz-basierte bildgebende Verfahren via CLSM (FRET-FLIM, rBiFC)

2.16.1 FRET-FLIM-Studien in transient-transformierten *N. benthamiana*-Blättern

Förster/(Fluoreszenz)-Resonanzenergietransfer (FRET) gekoppelt mit Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie („fluorescence lifetime imaging microscopy“ (FLIM)) ist eine geeignete Methode, um Protein-Protein-Interaktions-Studien im lebenden Organismus durchzuführen (Elangovan et al., 2002). Hierbei werden die zu untersuchenden Proteine jeweils mit einem von zwei sogenannten FRET-Paar-Fluorophoren fusioniert. Bei Protein-Protein-Interaktion kommen auch die beiden Fluorophore in unmittelbarer Nähe zueinander. Das angeregte Donor-Fluorophor (z.B. mGFP4) gibt nun nicht mehr seine ganze Energie in Form von Fluoreszenz und Wärme ab, sondern überträgt einen gewissen Anteil an das Akzeptor-Fluorophor (z.B. RFP) und regt dieses zu einem geringen Teil an (FRET). Hierdurch verringert sich die Fluoreszenz-Lebensdauer („fluorescence lifetime“ (FL)) des Donor-Fluorophors in einer messbaren Zeiteinheit. Da nur die Lebensdauer des Donor-Fluorophors bestimmt wird, ist eine Korrektur bezüglich des sogenannten „Durchblutens“, wie bei dem auf der

Intensitäts-Messung-basierenden FRET, nicht notwendig. Weiterhin ist die Konzentration bzw. Stöchiometrie der beteiligten Partnermoleküle in einem sehr großen Bereich irrelevant. Dieser physikalische Effekt ist somit eine geeignete Methode, um Interaktions-Studien zwischen an Fluorophor-gekoppelten Molekülen durchzuführen.

Um Protein-Protein-Interaktionen im pflanzlichen Organismus zu untersuchen (bzw. die Hefe-2-Hybrid-Ergebnisse *in planta* zu verifizieren), wurden die für Koexpressions-Studien verwendeten Fusions-Proteine ebenfalls für FRET-FLIM-Analysen in Tabak-Blättern eingesetzt. Dazu wurden *N. benthamiana*-Blätter mit den zu analysierenden Fusions-Konstrukten transformiert (s. Kapitel 2.13.2), die Pflanzen entsprechend inkubiert und die FRET-FLIM-Messungen mittels CLSM und den dafür geeigneten Einstellungen an der „Confocal Laser Scanning Platform“ Leica TCS SP8 (Leica Mikrosysteme CMS GmbH, Wetzlar), die zusätzlich mit einem „Compact FLIM und FCS Upgrade Kit“ (PicoQuant GmbH, Berlin) ausgestattet war, durchgeführt. Die Analyse der Messungen bzw. Bestimmung der Fluoreszenz-Lebensdauer des Donor-Fluophors (mGFP4) wurde mit der „Fluorescence Lifetime Imaging and Correlation Software“ SymPhoTime 64 (PicoQuant GmbH, Berlin) unternommen.

2.16.2 rBiFC-Studien in transient-transformierten *N. benthamiana*-Blättern

Die bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation (BiFC) beruht auf der funktionellen Rekonstitution von YFP auf der Grundlage der Interaktion zweier Proteine, die mit nicht fluoreszierenden Hälften des Fluorophors fusioniert wurden (nYFP und cYFP (Hu et al., 2002; Hu and Kerppola, 2003)). Evtl. auftretende Expressions-Unterschiede der einzelnen Proteine (Kotransformation bzw. Koexpression beider Proteine in einer Zelle essentiell) können im konventionellen BiFC-System nicht berücksichtigt werden; dieses Problem lässt sich mit einer Weiterentwicklung der Methode, dem sog. rBiFC (ratiometrische bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation (Grefen and Blatt, 2012; Hecker et al., 2015)) begegnen. Hierbei werden beide auf ihre Interaktion zu testenden Proteine auf einem Plasmid (2in1) codiert, das zusätzlich noch die Expression von freiem RFP ermöglicht. Somit wird die Expression beider Fusions-Proteine und des zur ratiometrischen Analyse benötigten freien RFPs in einer Zelle gewährleistet. Da die Expression aller drei CDSs über den gleichen Promotor (35S-Promotor) reguliert/gesteuert wird, lässt sich die Intensität des rekonstituierten YFP-Signals in Bezug auf das RFP-Signal ratiometrisch normieren und ermöglicht so eine Quantifizierung der relativen Intensität der Protein-Protein-Interaktion bzw. einen Vergleich der unterschiedlichen Interaktionen.

Um die *in planta*-Interaktion von spezifischen Proteinen zu untersuchen (bzw. die Hefe-2-Hybrid-Ergebnisse zu verifizieren), wurde die ratiometrische bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation („ratiometric bimolecular fluorescence complementation“ (rBiFC)) in transient-transformierten

Tabak-Blättern angewendet. Dazu wurden *N. benthamiana*-Blätter mit den zu analysierenden rBiFC-2in1-Konstrukten transformiert (s. Kapitel 2.13.2), die Pflanzen entsprechend inkubiert und die rBiFC-Aufnahmen mittels CLSM und den dafür geeigneten Einstellungen an der „Confocal Laser Scanning Platform“ Leica TCS SP8 (Leica Mikrosysteme CMS GmbH, Wetzlar) erstellt. Die ratiometrische Analyse der Aufnahmen bzw. Quantifizierung der relativen Intensität der Protein-Protein-Interaktion ($[\text{mittlere Intensität des YFP-Signals (komplettes Bild)}]/[\text{mittlere Intensität des RFP-Signals (komplettes Bild)}])$) wurde mit der ImageJ Software (<http://imagej.nih.gov/ij/>) unternommen.

2.17 Mikroskopische Untersuchungen

2.17.1 Epifluoreszenz-Mikroskopie von etiolierten *Arabidopsis*-Keimlingen

Die Epifluoreszenz-Mikroskopie von etiolierten *Arabidopsis*-Keimlingen wurde an den beiden Fluoreszenz-Mikroskopen ECLIPSE 90i (Nikon Instruments Europe B.V., Düsseldorf) und MZ FLIII (Stereomikroskop, Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar) anhand der Benutzer-Richtlinien/Instruktionen der Hersteller durchgeführt.

2.17.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) von *Arabidopsis*-Protoplasten, etiolierten *Arabidopsis*-Keimlingen und *N. benthamiana*-Blättern

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) von *Arabidopsis*-Protoplasten, etiolierten *Arabidopsis*-Keimlingen und *N. benthamiana*-Blättern wurde an dem „Spectral Confocal & multiphoton system“ Leica TCS SP2 und der „Confocal Laser Scanning Platform“ Leica TCS SP8 (Leica Mikrosysteme CMS GmbH, Wetzlar) anhand der Benutzer-Richtlinien/Instruktionen des Herstellers durchgeführt. Die Anregung der unterschiedlichen Fluorophore wurde mit spezifischen Laser-Einstellungen realisiert (mGFP4: 488 nm, RFP: 561 nm, YFP: 514 nm); die Signal-Detektion wurde ebenfalls bei spezifischen Emissions-Bereichen durchgeführt (mGFP4: 505 bis 530 nm, RFP: 584 bis 607 nm, YFP: 521 bis 553 nm). Die in der Arbeit gezeigten Aufnahmen wurden mithilfe der Software Leica LAS AF Lite (Leica Mikrosysteme CMS GmbH, Wetzlar) und Adobe® Photoshop® CS5 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA) bearbeitet und exportiert, die Bildinformationen wurden dabei nicht verändert.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung putativer Interaktionspartner von 14-3-3 Isoformen mittels Hefe-2-Hybrid-System

Die technologischen Entwicklungen von Hochdurchsatz-Verfahren zur Bestimmung des Interaktoms haben in den letzten Jahren unser Wissen über Protein-Interaktions-Netzwerke deutlich erhöht. Die meist verwendeten Methoden sind Sichtungen mittels Hefe-2-Hybrid-System (sehr gut etablierter genetischer *in vivo*-Ansatz) und die Affinitäts-Aufreinigung von Protein-Komplexen (gefolgt von massenspektroskopischer Analyse, biochemischer *in vitro*-Ansatz (Bruckner et al., 2009)). Die Mehrheit der bisher veröffentlichten und bekannten Protein-Protein-Interaktionen wurde auf der Grundlage des Hefe-2-Hybrid-Systems identifiziert. Daher haben wir uns ebenfalls für das Hefe-2-Hybrid-System entschieden, um neue IPs für 14-3-3 Proteine in *Arabidopsis* zu identifizieren.

3.1.1 Sichtung einer cDNA-Bibliothek unter Verwendung der 14-3-3 Isoform epsilon als Köder

Das Hefe-2-Hybrid-System ist eine äußerst effiziente Methode, putative IPs definierter Proteine zu identifizieren. Diesbezüglich wurde eine cDNA-Bibliothek, die aus drei Tage alten etiolierten *Arabidopsis*-Keimlingen erstellt wurde (Kim et al., 1997) gesichtet. Als Köder dienten vier unterschiedliche *Arabidopsis* 14-3-3 Isoformen (epsilon, kappa, omega und upsilon). Jede dieser Isoformen repräsentiert eine phylogenetische 14-3-3 Gruppe bzw. Subgruppe. Die Isoform epsilon wurde als Mitglied der gleichnamigen „epsilon-Gruppe“ ausgewählt. Die Isoformen kappa, omega und upsilon sind demgegenüber der „nicht-epsilon-Gruppe“ zuzuordnen und repräsentieren jeweils eine der drei phylogenetischen Subgruppen (s. Abbildung 1, s. Einleitung). Die entsprechenden Hefe-2-Hybrid-Sichtungen unter Verwendung dieser drei „nicht-epsilon“-Isoformen wurden von anderen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.

Die sequentielle Transformationen von *Saccharomyces cerevisiae* PJ69-4a-Hefe-Zellen mit den jeweiligen Hefe-2-Hybrid-Vektoren (pGBKT7-„14-3-3 Isoform“, pACT-„cDNA-Bibliothek“) im Mittel- und Großansatz ergaben für die vier verschiedenen Isoformen eine unterschiedliche Anzahl von „Interaktions-positiven“ Klonen. Pro Isoform wurden ca. 700.000 unabhängige Klone gesichtet. Nach Sequenzierung der mittels PCR amplifizierten, pACT-inserierten cDNA Fragmente wurden die gewonnenen Daten über das Online-Software-Tool „BLAST“ (Basic Local Alignment Search Tool (Altschul et al., 1990)) gegen eine Nukleotid-Datenbank für *Arabidopsis* abgeglichen.

Für die Isoform epsilon wurden 311, für kappa 222, für omega 103 und für upsilon 120 putative IPs identifiziert. Erwartungsgemäß gab es Überschneidungen zwischen den IPs der einzelnen Isoformen

(212), so dass von den insgesamt 756 Proteinen letztendlich 544 als im „Y2H-Screen“ identifizierte putative IPs verblieben (s. Tabelle 2).

Tabelle 2 Anzahl der sequenzierten PCR-Produkte bzw. der putativen IPs aus den Sichtungen einer cDNA-Bibliothek mittels des Hefe-2-Hybrid-Systems unter Verwendung von vier unterschiedlichen 14-3-3 Isoformen als Köder. Die IPs der jeweiligen 14-3-3 Isoformen (epsilon, kappa, omega und upsilon) bzw. die kumulierten Daten sind tabellarisch als Excel-Files auf der beigefügten CD verfügbar (s. Anhang).

| | epsilon | kappa | omega | upsilon | kumuliert |
|---------------------------|----------------|--------------|--------------|----------------|------------------|
| sequenzierte PCR-Produkte | 538 | 458 | 225 | 225 | 1446 |
| IPs (total) | 311 | 222 | 103 | 120 | 544 (756) |

Das wiederholte Auftreten einiger Proteine in mehreren Sichtungen impliziert, dass diese als putative IPs mehrerer oder aller vier eingesetzter Isoformen fungieren (s. Tabelle 3, s. Abbildung 4). So tauchten z.B. in der Sichtung mit epsilon 75 Proteine auf, die zudem mit kappa gefischt wurden; die Schnittmenge der Sichtungen zwischen epsilon und omega war 41, die mit epsilon und upsilon 47 (die Proteine aus den entsprechenden Schnittmengen sind tabellarisch als Excel-Files auf der beigefügten CD verfügbar, s. Anhang).

Tabelle 3 Anzahl der putativen IPs, die in den Schnittmengen oder exklusiv in den verschiedenen Sichtungen mit den unterschiedlichen 14-3-3 Isoformen aufgetreten sind.

| | epsilon vs. | | |
|------------------------------------|--------------------|--------------|----------------|
| | kappa | omega | upsilon |
| IPs epsilon (exklusiv) | 236 | 270 | 254 |
| IPs in der Schnittmenge | 75 | 41 | 47 |
| IPs kappa/omega/upsilon (exklusiv) | 147 | 62 | 73 |

Die in Tabelle 4 aufgeführten 18 Proteine tauchten in der Schnittmenge von allen vier Ansätzen auf (s. Abbildung 4), d.h. alle vier Isoformen sollten theoretisch befähigt sein, mit diesen Zielproteinen zu interagieren (nicht untersucht), eine Gruppen- oder Subgruppen-Spezifität bzgl. der Interaktion mit diesen Proteinen sollte nicht vorhanden sein. Die mit „ec“ gekennzeichneten IPs lokalisieren extrazellulär (Vorhersage der subzellulären Lokalisation mit SUBA3 (Tanz et al., 2013; Hooper et al., 2014)), eine *in vivo*-Interaktion ist demnach unwahrscheinlich. Das Hefe-2-Hybrid-System bedingt methodisch das Fischen solcher Proteine, da die Expression von zufällig erstellten cDNA-Klonen und die Lokalisation der teilweise verkürzten Proteinen im Kern eine artifizielle Interaktion ermöglicht.

Tabelle 4 Putative IPs von 14-3-3 Proteinen, die in allen vier cDNA-Sichtungen identifiziert wurden. ec – extrazellulär.

| Lokus | Primäres Gen-Symbol | |
|-----------|--|----|
| AT1G09070 | SOYBEAN GENE REGULATED BY COLD-2 (SRC2) | |
| AT1G22530 | PATELLIN 2 (PATL2) | |
| AT1G44160 | HEAT SHOCK PROTEIN 40/DnaJ peptide-binding protein (HSP40) | |
| AT1G68560 | ALPHA-XYLOSIDASE 1 (XYL1) | ec |
| AT1G75750 | GAST1 PROTEIN HOMOLOG 1 (GASA1) | |
| AT2G18280 | TUBBY LIKE PROTEIN 2 (TLP2) | |
| AT2G41100 | TOUCH 3 (TCH3) | |
| AT2G43150 | Proline-rich extensin-like family protein | ec |
| AT3G01280 | VOLTAGE DEPENDENT ANION CHANNEL 1 (VDAC1) | |
| AT3G04730 | INDOLEACETIC ACID-INDUCED PROTEIN 16 (IAA16) | |
| AT3G09260 | BETA-GLUCOSIDASE (PYK10) | |
| AT3G19390 | Granulin repeat cysteine protease family protein | |
| AT3G23640 | HETEROGLYCAN GLUCOSIDASE 1 (HGL1) | |
| AT4G05150 | Octicosapeptide/Phox/Bem1p family protein | |
| AT4G18010 | INOSITOL(1,4,5)P3 5-PHOSPHATASE II (IP5PII) | |
| AT5G08130 | BES1-INTERACTING MYC-LIKE 1 (BIM1) | |
| AT5G15090 | VOLTAGE DEPENDENT ANION CHANNEL 3 (VDAC3) | |
| AT5G64330 | NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTYL 3 (NPH3/RPT3) | |

Die prominentesten Proteine die in unseren vier Untersuchungen als 14-3-3 IPs identifiziert und in der entsprechenden Primär-Literatur auch schon detailliert untersucht und charakterisiert wurden, waren die Protonenpumpen bzw. P-Typ H⁺-ATPasen AHA1 und AHA2 (Jahn et al., 1997; Baunsgaard et al., 1998; Axelsen et al., 1999; Fuglsang et al., 1999; Svannelid et al., 1999; Maudoux et al., 2000), die zytosolische Invertase CINV1 (Gao et al., 2014), das in der BR-Signaltransduktion als negativer Modulator der Genexpression beteiligte Protein BES1 (Gampala et al., 2007), die Nitrat-Reduktase NIA1 (Bachmann et al., 1996; Bachmann et al., 1996; Bachmann et al., 1996; Moorhead et al., 1996; Kanamaru et al., 1999), der im ABA-„Signaling“ beteiligte Transkriptions-Regulator ABF3 (Sirichandra et al., 2010) und der bei diversen physiologischen Prozessen, wie z.B. der phototropen Antwort, mitverantwortliche BL-Rezeptor PHOT2 (Kinoshita et al., 2003; Tseng et al., 2012).

Eine tabellarische Auflistung mit den Interaktomen der einzelnen Isoformen und die kumulierten Ergebnisse sind tabellarisch als Excel-Files auf der beigefügten CD verfügbar (s. Anhang).

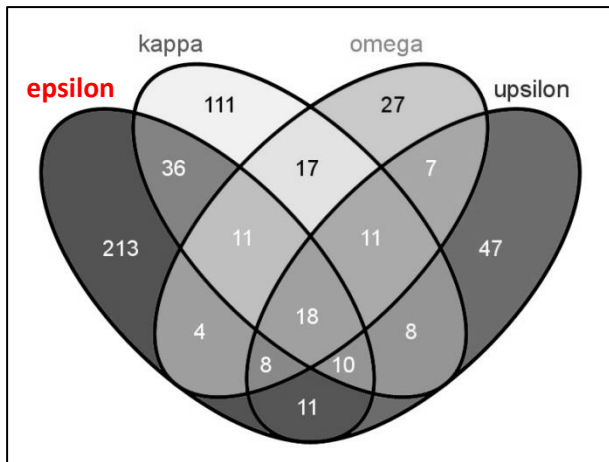


Abbildung 4 Venn-Diagramm zur Darstellung der Anzahl der putativen IPs, die in den Schnittmengen der verschiedenen Sichtungen mit den unterschiedlichen 14-3-3 Isoformen aufgetreten sind. Schnittmengen aller cDNA-Sichtungen im Überblick (die Proteine aus den entsprechenden Schnittmengen sind tabellarisch als Excel-Files auf der beigefügten CD verfügbar, s. Anhang).

3.1.2 *In silico*-Analysen der putativen Interaktionspartner

3.1.2.1 Klassifizierung der putativen Interaktionspartner anhand ihrer „gene ontology“-Annotation

Die identifizierten putativen IPs wurden bzgl. ihrer „gene ontology“ (Kategorie zelluläre Komponente/Kompartimente, molekulare Prozesse sowie biologische Prozesse) mittels des „GO-Tools“ von TAIR (Berardini et al., 2004) klassifiziert (s. Abbildung 5, s. Abbildung 45, s. Anhang).

Etwa 11 % der identifizierten putativen IPs von epsilon sind nukleär lokalisiert; integrale bzw. assoziierte PM-Proteine machen ca. 7 % aus; den Chloroplasten (9 %) und Plastiden (5 %) werden zusammen ca. 14 % zugeordnet; 7 % befinden sich laut ihrer GO im Zytosol, 7 % sind an der PM (s. Abbildung 5 A, epsilon).

In der Einteilung bzgl. der molekularen Funktion der IPs von epsilon findet man ca. 9 % in der Kategorie der Nukleotid-bindenden und ca. 8 % in der Gruppe der DNA/RNA-bindenden Proteine (s. Abbildung 5 B, epsilon).

Exemplarisch sind die IPs von epsilon, die TFs sind (2 %, s. Abbildung 5 B, epsilon), in Tabelle 5 aufgeführt. Interessanterweise sind darunter drei Proteine, die in der BR-Signaltransduktion eine Rolle spielen (BES1 (Gampala et al., 2007), BEE3 und BIM1). Aber auch Proteine, die in der Signalweiterleitung anderer Pflanzen-Hormone beteiligt sind, so z.B. Abscisinsäure (ABF3 (Sirichandra et al., 2010), MYBR1) und Auxin (IAA16, MYB77), sind in dieser Gruppe vorhanden. Zwei sogenannte „TUBBY-Like“-Proteine (TLP2/3) wurden ebenfalls „gefischt“; die funktionelle Bedeutung dieser TFs ist bis dato jedoch unbekannt.

Hinsichtlich der Klassifizierung der putativen IPs anhand ihrer Beteiligung in/an diversen biologischen Prozessen lässt sich keine eindeutige Schlussfolgerung ziehen (s. Abbildung 5 C, epsilon). Es tritt keine

favorisierte Beteiligung von epsilon in/an einem oder mehreren spezifischen biologischen Prozessen auf.

Table 5 Transkriptionsfaktoren, die als putative IPs der 14-3-3 Isoform epsilon mittels Hefe-2-Hybrid-Sichtung identifiziert wurden (s. Abbildung 5 B, Klassifizierung anhand der molekularen Funktion – „transcription factor activity“).

| Lokus | Primäres Gen-Symbol |
|-----------|---|
| AT1G19350 | BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1 (BES1) |
| AT1G43700 | VIRE2-INTERACTING PROTEIN 1 (VIP1) |
| AT1G73830 | BR ENHANCED EXPRESSION 3 (BEE3) |
| AT2G18280 | TUBBY LIKE PROTEIN 2 (TLP2) |
| AT2G47900 | TUBBY LIKE PROTEIN 3 (TLP3) |
| AT3G04730 | INDOLEACETIC ACID-INDUCED PROTEIN 16 (IAA16) |
| AT3G50060 | MYB DOMAIN PROTEIN 77 (MYB77) |
| AT4G34000 | ABSCISIC ACID RESPONSIVE ELEMENTS-BINDING FACTOR 3 (ABF3) |
| AT4G34990 | MYB DOMAIN PROTEIN 32 (MYB32) |
| AT5G08130 | BES1-INTERACTING MYC-LIKE PROTEIN 1 (BIM1) |
| AT5G44190 | GOLDEN2-LIKE 2 (GLK2) |
| AT5G67300 | MYB DOMAIN PROTEIN R1 (MYBR1) |

Vergleichbar zu der *in silico*-Analyse zur Klassifizierung der putativen IPs von epsilon wurden auch die vermeintlichen IPs der anderen drei Isoformen den unterschiedlichen Gruppen der GO-Kategorien zugeordnet (s. Abbildung 5). Diese Zuordnung entspricht in einem hohen Maße der Einteilung der IPs von epsilon. Es sind nur marginale Unterschiede ersichtlich; so weisen im Vergleich z.B. omega und epsilon einen höheren prozentualen Anteil ihrer putativen IPs in der Gruppe der nukleär lokalisierten Proteine (s. Abbildung 5 A), in der Gruppe der Proteine mit TF-Aktivität (s. Abbildung 5 B) und in den Gruppen der Proteine, die in der Signaltransduktion sowie der DNA-abhängigen Transkription beteiligt sind (s. Abbildung 5 C) auf. Dies könnte bedeuten, dass omega und epsilon evtl. einen größeren regulatorischen Einfluss bei der Genexpression ausüben als die beiden anderen Isoformen. Weiterführende Untersuchungen zwischen verschiedenen 14-3-3 Proteinen und ausgewählten TFs mittels Hefe-2-Hybrid-System und anderen Methoden zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktion (z.B. rBiFC, FRET-FLIM und MST („microscale thermophoresis“ (Wienken et al., 2010))) sollten detailliertere Ergebnisse hinsichtlich der komplexen Gruppen- und Subgruppen-Spezifität von 14-3-3 Proteinen bezüglich der Regulation der Genexpression liefern können. Die anhand der GO-Annotation durchgeführte Klassifizierung lässt diesbezüglich nur vage Aussagen zu.

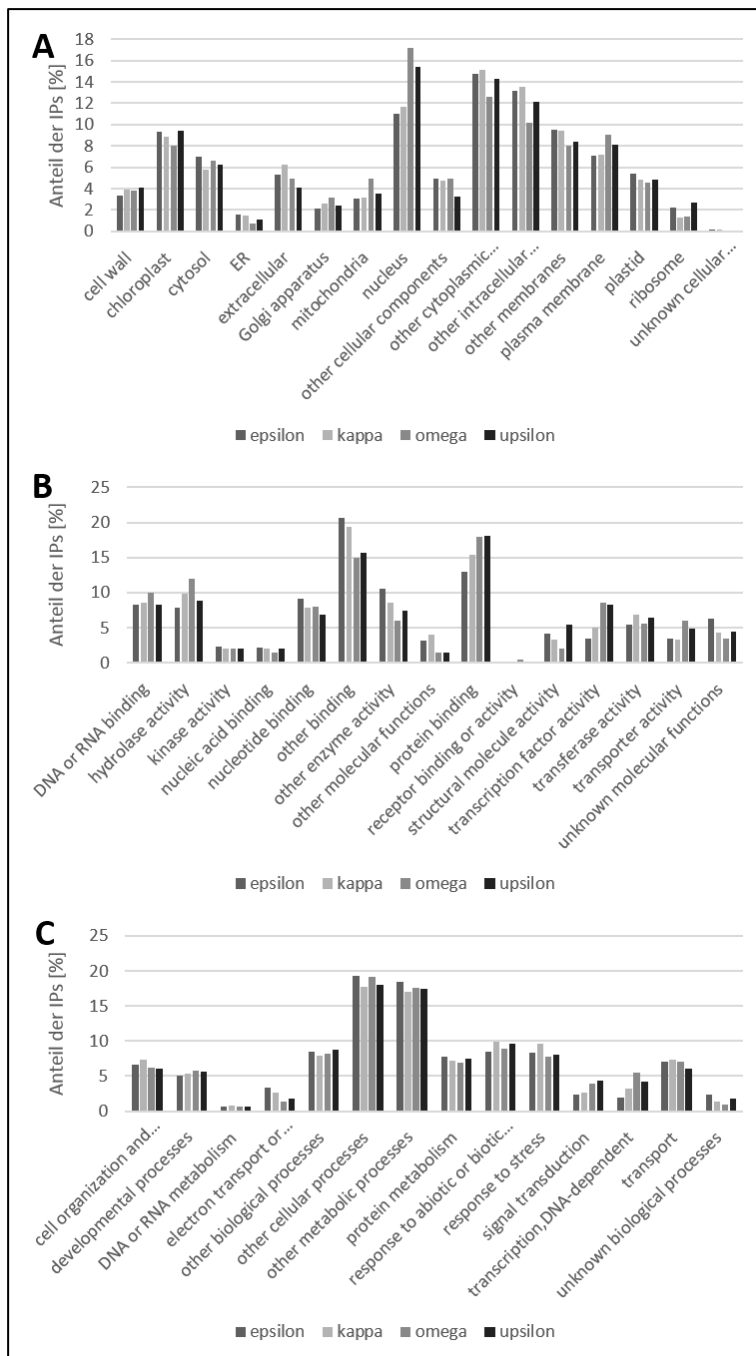


Abbildung 5 Gruppen-Einteilung der putativen IPs aller vier Isoformen anhand ihrer „gene ontology“-Annotation bei TAIR. Klassifizierung anhand des Vorkommens in unterschiedlichen zellulären Komponenten (A), der molekularen Funktion (B) und des Mitwirkens in unterschiedlichen biologischen Prozessen (C).

3.1.2.2 Vergleich mit anderen Studien zur Ermittlung des 14-3-3 Interaktoms

In den letzten Jahren wurden zahlreiche proteomweite Studien zur Identifizierung putativer IP von pflanzlichen 14-3-3 Isoformen durchgeführt. Dies wurde mit unterschiedlichen Methoden (Hefe-2-Hybrid-System, „Tandem/Antibody-Affinity-Purification“ mit anschließender massenspektroskopischer Identifizierung) und differierenden Versuchs-Ansätzen/Bedingungen (Spezies,

Entwicklungs-Stadium, Anzucht-Bedingungen, eingesetztes Gewebe) bewerkstelligt. Die charakteristischen Merkmale der sechs hier ausgewählten Studien sind in Tabelle 6 aufgeführt. Die daraus resultierenden Datensätze sowie die in unserem Labor experimentell ermittelten Daten dienen als Grundlage einer vergleichenden Analyse. Es wurden die Schnittmengen der Ergebnisse der verschiedenen Studien ermittelt bzw. ein Vergleich der GO-Annotation der Gesamtheit der jeweiligen Interaktome durchgeführt (s. Abbildung 46, s. Anhang).

Tabelle 6 Vergleich der sechs unterschiedlichen Sichtungen/Studien zur Identifizierung neuer pflanzlicher 14-3-3 IPs. Die Anzahl identifizierter putativer IPs aus den Sichtungen des „Arabidopsis interactome mapping consortiums“ – 2 (aimc (Arabidopsis Interactome Mapping, 2011)), von Chang – 3 (chang (Chang et al., 2009)), Paul – 4 (paul (Paul et al., 2009)), Schoonheim – 5 (schoo (Schoonheim et al., 2007)), Shin – 6 (shin (Shin et al., 2011)) und Swatek – 7 (swa (Swatek et al., 2011)) wurde mit den kumulierten Ergebnissen aus unseren vier Sichtungen – 1 (oec (s. Tabelle 2)) verglichen. Die Tabellen mit den putativen IPs aus den unterschiedlichen Schnittmengen der verschiedenen Sichtungen/Studien sind tabellarisch als Excel-Files auf der beigefügten CD verfügbar (s. Anhang). Y2H – „yeast two-hybrid system“/Hefe-2-Hybrid-System, TAP – „tandem affinity purification“, LC-MS/MS – „liquid chromatography tandem mass spectrometry“, AAP – „antibody affinity purification“, ORF – „open reading frame“, „overlap“ – Schnittmenge mit unseren Daten.

| Studie | Methode | Versuchsgegenstand | verwendete | IPs |
|-----------|--------------------------|--|---|-------------|
| | | | Isoform(en) | (overlap) |
| 1 (oec) | Y2H | cDNA-Bibliothek aus Arabidopsis-Keimlingen (etioliert angezogen) | epsilon, kappa, omega, upsilon | 544 |
| 2 (aimc) | Y2H | cDNA-Bibliothek aus Arabidopsis-Pflanzen (8000 ORFs) | diverse | 146 (9) |
| 3 (chang) | TAP / LC-MS/MS | Gesamt-Protein-Rohextrakt aus Arabidopsis-Pflanzen | omega | 129 (4) |
| 4 (paul) | AAP / LC-MS/MS | Gesamt-Protein-Rohextrakt aus Arabidopsis-Zellen (Suspensionskultur) | diverse | 131 (26) |
| 5 (schoo) | Y2H AAP / LC-MS/MS | cDNA-Bibliothek aus bzw. Gesamt-Protein-Rohextrakt aus Gerstenblättern | diverse | 116 (11) |
| 6 (shin) | AAP / LC-MS/MS | Gesamt-Protein-Rohextrakt aus Arabidopsis-Pflanzen | chi, kappa, phi | 406 (28) |
| 7 (swa) | AAP / LC-MS/MS | Gesamt-Protein-Rohextrakt aus Arabidopsis-Samen | chi, epsilon | 103 (18) |

Vergleicht man die Datensätze aus den oben angeführten Interaktions-Studien mit den von uns experimentell ermittelten Daten (kumulierte Ergebnisse aus allen vier cDNA-Sichtungen, s. Tabelle 2) ergeben sich daraus definierte Schnittmengen mit gemeinsam vorhandenen IPs (eine detaillierte Auflistung der Ergebnisse der Studien und die aus den Vergleichen resultierenden Schnittmengen sind tabellarisch als Excel-Files auf der beigefügten CD verfügbar, s. Anhang).

Bemerkenswerterweise traten definierte IPs in bis zu fünf Schnittmengen der Interaktom-Gegenüberstellungen auf (s. Tabelle 7). Neben vier 14-3-3 Isoformen (GRF1/2/9/10, Ausbildung von Homo-/Heterodimeren), zwei Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenasen (GAPC1, GAPC2) und zwei Fruktose-Bisphosphat-Aldolasen (FBA6, FBA8), wurde u.a. die zytosolische Invertase 1 (CINV1), der eukaryotische Translations-Initiationsfaktor 4A1 (EIF4A1), die Nitrat-Reduktase 1 (NIA1) und eine Enolase (LOS2) in mehreren Studien identifiziert.

Tabelle 7 Putative IPs, die in unterschiedlichen Studien zur Ermittlung des 14-3-3 Interaktoms mehrfach identifiziert wurden (s. auch Tabelle 6). Die Benennung der Spalten nach den entsprechenden Interaktions-Studien ist wie folgt: kumulierte Ergebnisse aus unseren vier Sichtungen – 1 (oec (s. Tabelle 2)), „Arabidopsis interactome mapping consortiums“ – 2 (aimc (Arabidopsis Interactome Mapping, 2011)), Chang – 3 (chang (Chang et al., 2009)), Paul – 4 (paul (Paul et al., 2009)), Schoonheim – 5 (schoo (Schoonheim et al., 2007)), Shin – 6 (shin (Shin et al., 2011)) und Swatek – 7 (swa (Swatek et al., 2011)).

| Lokus | Primäres Gen-Symbol | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|-----------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| AT1G13440 | GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE C2 (GAPC2) | + | | | + | + | + | + |
| AT3G04120 | GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE C1 (GAPC1) | + | | | + | + | + | + |
| AT1G35580 | CYTOSOLIC INVERTASE 1 (CINV1) | + | + | + | | | | + |
| AT3G13920 | EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 4A1 (EIF4A1) | + | + | + | + | | | |
| AT1G77760 | NITRATE REDUCTASE 1 (NIA1) | + | + | + | | | | |
| AT2G30870 | GLUTATHIONE S-TRANSFERASE PHI 10 (GSTF10) | + | | | + | | + | |
| AT2G36460 | FRUCTOSE-BISPHOSPHATE ALDOLASE 6 (FBA6) | + | | | + | | + | |
| AT3G09440 | HEAT SHOCK PROTEIN 70 (HSP70) | + | | | + | | | + |
| AT3G52930 | FRUCTOSE-BISPHOSPHATE ALDOLASE 8 (FBA8) | + | | | + | | + | |
| AT3G58610 | KETOL-ACID REDUCTOISOMERASE | + | | | + | | | + |
| AT4G30190 | H(+)-ATPASE 2 (AHA2) | + | + | | | | | + |
| AT4G38740 | ROTAMASE CYP 1 (ROC1) | + | | | + | | + | |
| AT5G02500 | HEAT SHOCK COGNATE PROTEIN 70-1 (HSC70-1) | + | | | + | | + | |
| AT5G17920 | METHIONINE SYNTHESIS 1 (ATMS1) | + | | | + | | | + |
| AT5G27000 | KINESIN 4 (ATK4) | + | + | + | | | | |

Der geringfügige „overlap“ zwischen den Ergebnissen der verschiedenen Interaktions-Studien und unseren Daten spiegelt die Situation wider, die auch schon in vergleichenden Analysen bzgl. des 14-3-3 Interaktoms für das tierische System beschrieben wurde (Jin et al., 2004; Meek et al., 2004; Pozuelo Rubio et al., 2004; Benzinger et al., 2005). Da die 14-3-3 Assoziation indirekt von Kinase-Aktivitäten abhängt, Kinasen ihre „Targets“ im Metabolismus und in der Signaltransduktion phosphorylieren, verändert sich auch die Zusammensetzung der 14-3-3 Zielproteine in Abhängigkeit

unterschiedlicher exogener, umweltbedingter bzw. zellulärer Stimuli. 14-3-3 Proteine könnten demzufolge als hochdynamische Integratoren diverser Signaltransduktions-Kaskaden dienen und je nach Bedingung und Stimulus auf eine Vielzahl von zellulären Prozessen Einfluss haben.

3.2 Untersuchungen zur Interaktion von 14-3-3 Isoformen mit Proteinen der NPH3-Familie mittels Hefe-2-Hybrid-System

3.2.1 Die Proteine der NPH3-Familie und ihr Auftreten in den Sichtungen mit den verschiedenen Isoformen

Bemerkenswerterweise wurde „NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTYL 3“ (NPH3/RPT3) jeweils mehrfach als putativer IP aller vier im Hefe-2-Hybrid-System verwendeter 14-3-3 Isoformen identifiziert (s. Tabelle 4). Neben diesem namensgebenden Vertreter der NPH3-Familien-Proteine (s. Einleitung), wurden noch vier weitere Mitglieder gefischt (s. Tabelle 8): das NPH3-Familien-Protein AT1G67900, NPY3 („NAKED PINS IN YUC MUTANTS 3“), ENP/NPY1 („ENHANCER OF PINOID“/„NAKED PINS IN YUC MUTANTS 1“) und RPT2 („ROOT PHOTOTROPISM 2“).

Tabelle 8 Auftreten von Mitgliedern der NPH3-Familie als putative IPs in den Hefe-2-Hybrid-Sichtungen mit den vier verschiedenen 14-3-3 Isoformen (epsilon, kappa, omega und upsilon).

| NPH3-Familien-Protein | epsilon | kappa | omega | upsilon |
|------------------------------|----------------|--------------|--------------|----------------|
| NPH3-fp (AT1G67900) | - | 1 | - | - |
| NPH3 (AT5G64330) | 4 | 3 | 9 | 3 |
| NPY3 (AT5G67440) | 1 | - | - | - |
| ENP/NPY1 (AT4G31820) | - | - | - | 2 |
| RPT2 (AT2G30520) | - | 1 | - | - |

In Abbildung 6 ist der phylogenetische Stammbaum der NPH3-Familien-Proteine (33 Mitglieder), basierend auf einem multiplen Sequenz-Alignment dargestellt. NPH3, NPH3-fp (AT1G67900), NPY3 und ENP/NPY1 lassen sich einer Gruppe zuordnen, RPT2 gehört einer anderen Gruppe an.

Neben der die Familie charakterisierenden NPH3-Domäne tauchen zwei weitere Protein-Domänen gehäuft in den Sequenzen der NPH3-Familien-Proteine auf (s. Abbildung 8): eine N-terminal lokalisierte BTB/POZ-Domäne („Bric-a-brac, Tramtrack, Broad-Complex/POX Virus and Zinc finger“-Domäne, vermittelt Protein-Protein-Interaktionen bzw. eine Homo- oder Hetero-Dimerisierung) und eine C-terminal lokalisierte „Coiled Coil“-Domäne (Doppelhelix ausbildende Struktur, weit verbreitet z.B. in TFs (bZIP-TFs), vermittelt Protein-Protein-Interaktionen).

Aufgrund des gehäuftten Vorkommens der NPH3-Familien-Proteine in unseren Sichtungen fokussierten wir unsere weiteren Analysen auf die 3 prominentesten Mitglieder, nämlich NPH3, ENP/NPY1 und RPT2 (s. Kapitel 3.2.2).

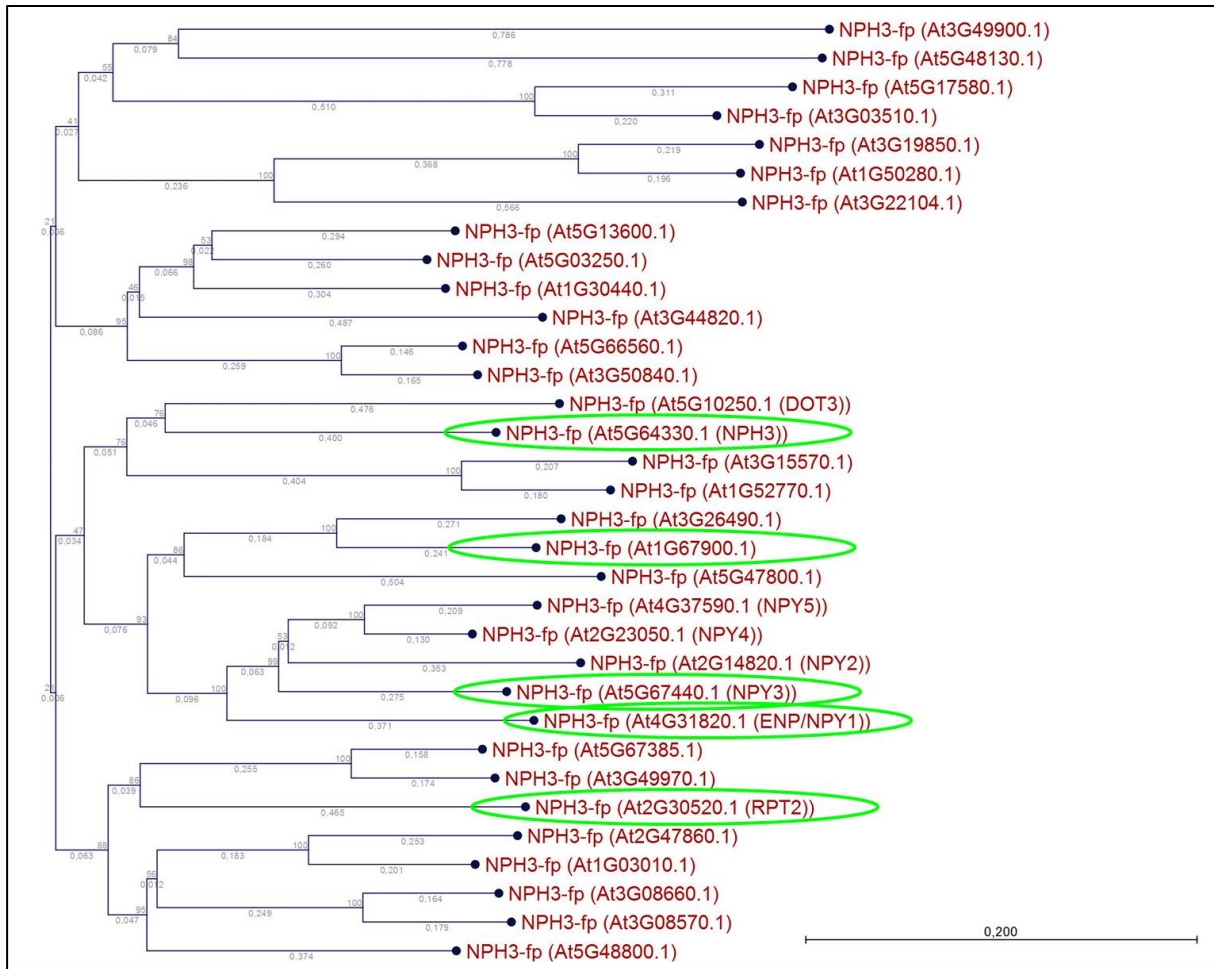


Abbildung 6 Phylogenetischer Stammbaum der NPH3-Familien-Proteine aus *A. thaliana*. 5 Proteine (NPH3, NPH3-fp (At1G67900.1), NPY3, ENP/NPY1 und RPT2) von insgesamt 33 Proteinen der NPH3-Familie wurden bei den Hefe-2-Hybrid-Sichtungen als putative 14-3-3 IPs identifiziert (s. Tabelle 4, s. Tabelle 8). Das multiple Sequenz-Alignment der homologen Proteine (s. PDF-File auf der beigefügten CD) wurde mit der CLC Main Workbench 6.9 (Neighbour-Joining Methode unter Verwendung von 1.000 Bootstrap Replikationen) durchgeführt und zur Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums eingesetzt.

3.2.2 Bestätigung der Interaktion von 14-3-3 Isoformen und ausgewählter Proteine der NPH3-Familie

Zunächst wurde die putative Interaktion zwischen NPH3 und 14-3-3 Proteinen unter Verwendung der Vollängen-cDNAs der entsprechenden NPH3-Familien-Proteine (NPH3, ENP/NPY1, RPT2) mittels Hefe-2-Hybrid-Analyse bestätigt. Abbildung 7 zeigt beispielhaft die Interaktion von NPH3 mit ausgewählten 14-3-3 Isoformen, alle weiteren Ergebnisse sind tabellarisch zusammengefasst (s. Tabelle 9, Originaldaten im Anhang (s. Abbildung 47, s. Abbildung 48, s. Abbildung 49)).

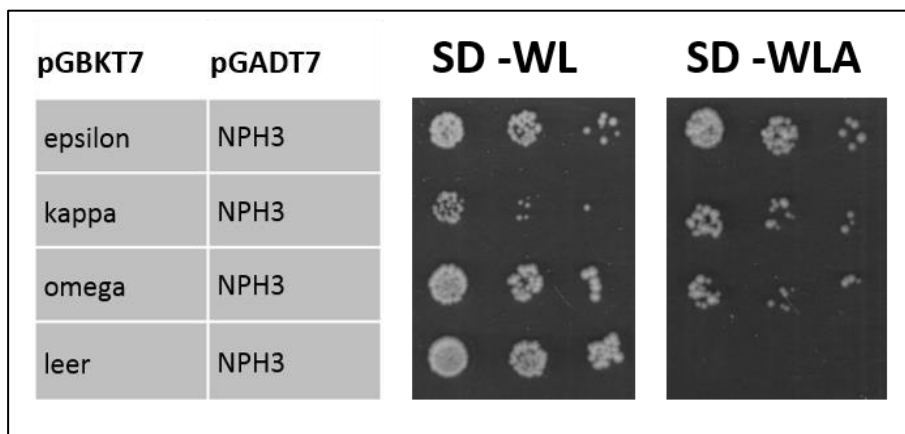


Abbildung 7 Bestätigung der Interaktion von verschiedenen 14-3-3 Isoformen (epsilon, kappa, omega) mit NPH3 mittels des Hefe-2-Hybrid-Systems. Die Transformations-Kontrolle der simultan-transformierten Hefen erfolgte auf „Synthetic Drop-out“-Medium ohne Tryptophan und Leucin (SD-WL), die Bestätigung der Protein-Protein-Interaktion erfolgte auf „Synthetic Drop-out“-Medium ohne Tryptophan, Leucin und Adenin (SD-WLA). Die ursprünglichen Hefe-Übernachtskulturen wurden auf eine OD_{600} von 0,05 eingestellt, davon wurde jeweils eine 1:10 und 1:100 Verdünnung erstellt und jeweils 4 μ l auf die entsprechenden Selektionsplatten getropft. Die Inkubation der Platten fand für 4 Tage bei 30 °C statt.

Tabelle 9 Vergleich der Interaktion von verschiedenen 14-3-3 Isoformen mit NPH3, RPT2 und ENP/NPY1 mittels des Hefe-2-Hybrid-Systems. Die unterschiedlichen 14-3-3 Isoformen wurden als pGBKT7-, die NPH3-Familien-Proteine als pGADT7-Konstrukte eingesetzt. Abbildungen zur Bestätigung der Interaktion zwischen den unterschiedlichen 14-3-3 Isoformen und NPH3, RPT2 und ENP/NPY1 sind im Anhang angefügt (s. Abbildung 47, s. Abbildung 48, s. Abbildung 49). +++ starke Interaktion, ++ normale Interaktion, - keine Interaktion, n.d. nicht durchgeführt.

| 14-3-3 Isoform | NPH3 | RPT2 | ENP/NPY1 |
|-----------------------------------|------|------|----------|
| pi (ϵ -Gruppe) | n.d. | n.d. | n.d. |
| epsilon (ϵ -Gruppe) | +++ | - | +++ |
| omicron (ϵ -Gruppe) | n.d. | n.d. | n.d. |
| mu (ϵ -Gruppe) | +++ | - | +++ |
| iota (ϵ -Gruppe) | +++ | - | +++ |
| kappa (non- ϵ -Gruppe) | +++ | +++ | +++ |
| lambda (non- ϵ -Gruppe) | +++ | ++ | +++ |
| upsilon (non- ϵ -Gruppe) | +++ | ++ | +++ |
| nu (non- ϵ -Gruppe) | +++ | - | +++ |
| psi (non- ϵ -Gruppe) | +++ | ++ | +++ |
| chi (non- ϵ -Gruppe) | +++ | +++ | +++ |
| phi (non- ϵ -Gruppe) | +++ | - | +++ |
| omega (non- ϵ -Gruppe) | +++ | +++ | +++ |

Während NPH3 und ENP/NPY1 mit allen getesteten 14-3-3 Isoformen interagieren, scheint die Interaktion von RPT2 Isoform-spezifisch zu sein. So konnte eine Assoziation von RPT2 an Mitglieder der „epsilon-Gruppe“ (epsilon, mu, iota) nicht nachgewiesen werden. Darüber hinaus war RPT2 nicht zur Interaktion mit den zwei „nicht-epsilon“-Mitgliedern nu und phi befähigt.

3.2.3 Identifizierung des 14-3-3 Bindemotivs in den NPH3-Familien-Proteinen

Um ein 14-3-3 Bindemotiv im NPH3 Protein näher einzugrenzen, wurden verschiedene C- und N-terminale Deletions-Konstrukte (s. Abbildung 8) hergestellt und im Hefe-2-Hybrid-System auf ihre Interaktions-Fähigkeit getestet.

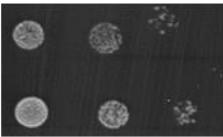
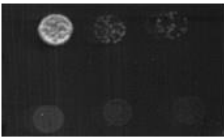
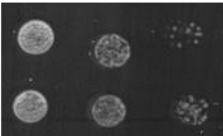
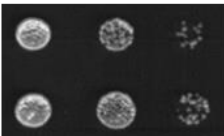
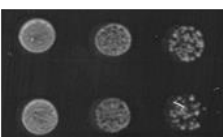

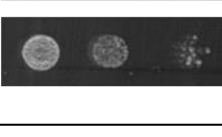

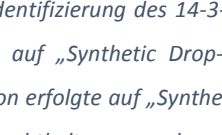
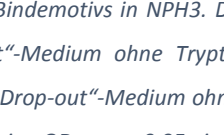
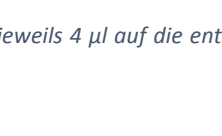
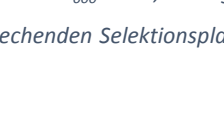
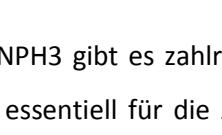
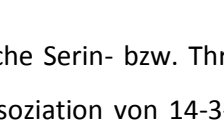
| pGBKT7 | pGADT7 | SD -WL | SD -WLA |
|-----------|---------|---|--|
| Volllänge | epsilon |  |  |
| N1 | epsilon |  |  |
| C1 | epsilon |  |  |
| C2 | epsilon |  |  |
| C3 | epsilon |  |  |
| C4 | epsilon |  |  |
| N2/ ΔC51 | epsilon |  |  |

Abbildung 9 Hefe-2-Hybrid-Analyse zur Identifizierung des 14-3-3 Bindemotivs in NPH3. Die Transformations-Kontrolle der simultan-transformierten Hefen erfolgte auf „Synthetic Drop-out“-Medium ohne Tryptophan und Leucin (SD-WL), die Bestätigung der Protein-Protein-Interaktion erfolgte auf „Synthetic Drop-out“-Medium ohne Tryptophan, Leucin und Adenin (SD-WLA). Die ursprünglichen Hefe-Übernachtskulturen wurden auf eine OD_{600} von 0,05 eingestellt, davon wurde jeweils eine 1:10 und 1:100 Verdünnung erstellt und jeweils 4 μ l auf die entsprechenden Selektionsplatten getropft. Die Inkubation der Platten fand für 4 Tage bei 30 °C statt.

Im C-terminalen Bereich C2 von NPH3 gibt es zahlreiche Serin- bzw. Threonin-Reste, die potentiell phosphorylierbar sind und somit essentiell für die Assoziation von 14-3-3 Proteinen sein könnten. Vergleicht man jedoch die AS-Sequenz der drei untersuchten NPH3-Familien-Proteine, so wird deutlich, dass das Serin an Position 743 von NPH3 (homologe Position in NPH3, ENP/NPY1 und RPT2, s. Abbildung 10), neben dem endständigen Serin, die einzige phosphorylierbare AS darstellt, die konserviert ist.

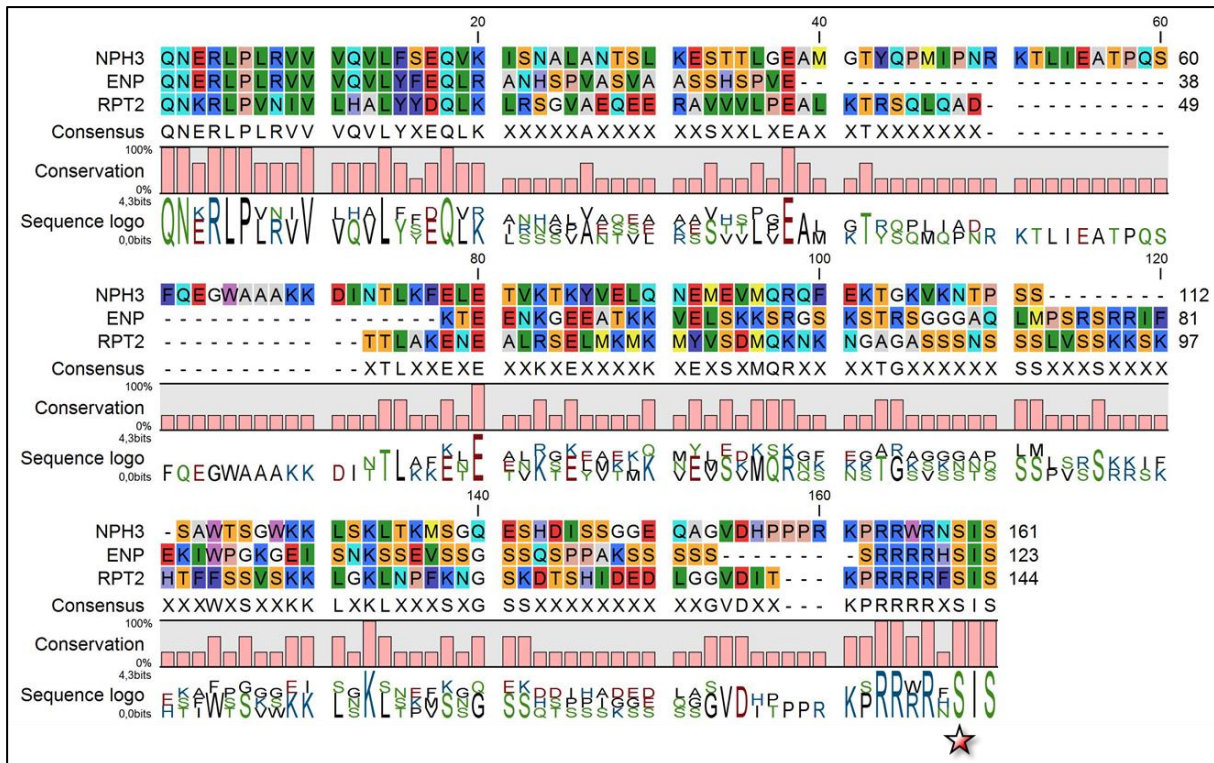


Abbildung 10 Alignment des C-terminalen Bereichs C2 von NPH3, RPT2 und ENP/NPY1. Das Serin in NPH3 an Position 74 ist in RPT2 und ENP/NPY1 konserviert (Modus III-Bindemotiv, s. Abbildung 13). Das multiple Sequenz-Alignment der Proteine wurde mit der CLC Main Workbench 6.9 (Neighbour-Joining Methode unter Verwendung von 1000 Bootstrap Replikationen) durchgeführt.

Tatsächlich konnte durch den Austausch des Serins 743 zu Alanin die Interaktion mit 14-3-3 vollständig unterbunden werden (s. Abbildung 11).

Demgegenüber hatte der zielgerichtete Austausch von zwei Serinen im C4-Bereich des NPH3 Volllänge-Proteins (S614A bzw. S618A) keinen Effekt auf die 14-3-3 Bindung (Daten nicht gezeigt).

Demzufolge scheint in NPH3 ein C-terminales Bindemotiv des Modus III ((S/T)^PX1-2-COOH) vorzuliegen (Coblitz et al., 2005; Coblitz et al., 2006). Erstaunlicherweise war aber das C3-Fragment (C-terminale 51 AS), das dieses Motiv enthält, nicht zur 14-3-3 Interaktion befähigt (s. Abbildung 9).

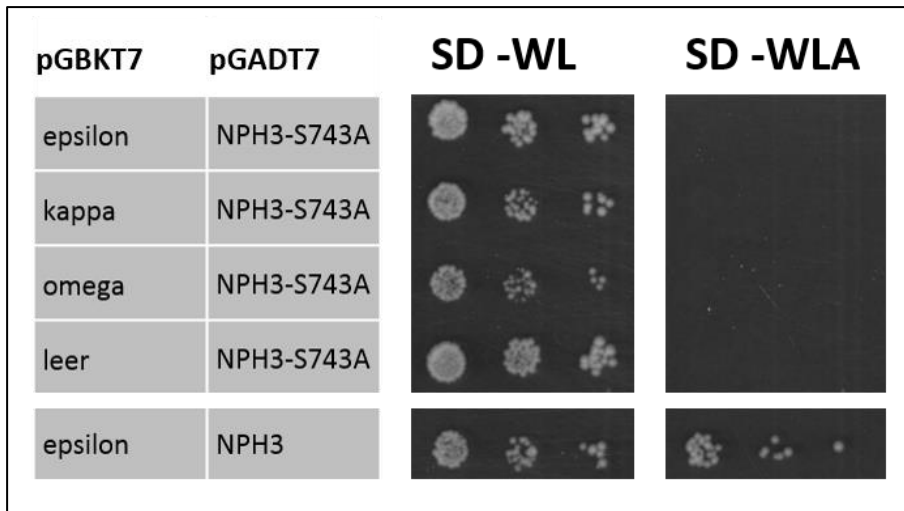


Abbildung 11 Hefe-2-Hybrid-Analyse zur Identifizierung des 14-3-3 Bindemotivs an Position 743 von NPH3. Die Transformations-Kontrolle der simultan-transformierten Hefen erfolgte auf „Synthetic Drop-out“-Medium ohne Tryptophan und Leucin (SD-WL), die Bestätigung der Protein-Protein-Interaktion erfolgte auf „Synthetic Drop-out“-Medium ohne Tryptophan, Leucin und Adenin (SD-WLA). Die ursprünglichen Hefe-Übernachtskulturen wurden auf eine OD_{600} von 0,05 eingestellt, davon wurde jeweils eine 1:10 und 1:100 Verdünnung erstellt und jeweils 4 μ l auf die entsprechenden Selektionsplatten getropft. Die Inkubation der Platten fand für 4 Tage bei 30 °C statt.

Um zu zeigen, dass das 14-3-3 Bindemotiv tatsächlich „Downstream“ von der „Coiled Coil“-Domäne liegt, wurde daher ein C-terminal um das C3-Fragment verkürztes Protein (N2, Δ C51) hergestellt, das erwartungsgemäß keine 14-3-3 Interaktion mehr aufwies (s. Abbildung 9). Möglicherweise ist die Phosphorylierung von Serin 743 essentiell für die 14-3-3 Assoziation, *per se* aber nicht ausreichend, um eine stabile Interaktion zu gewährleisten. Hierzu bedarf es ggf. einer „Upstream“ gelegenen strukturbildenden Domäne. Vergleichbares wurde bereits für die H^+ -ATPase beschrieben (Axelsen et al., 1999; Jelic-Ottmann et al., 2001; Fuglsang et al., 2003).

Es sollte nicht unerwähnt bleiben, dass eine *in vivo*-Phosphorylierung/Dephosphorylierung von Serin 743 in NPH3 bereits gezeigt wurde (Umezawa et al., 2013).

Da ein Austausch von Serin 743 zu Alanin die 14-3-3 Assoziation unterbindet, stellt sich im Gegenzug die Frage, ob eine Mimikrierung der Phosphorylierung (Austausch zu Asp, Glu) die 14-3-3 Interaktion erlaubt. Diesbezüglich wurden zwei NPH3-Konstrukte, die für einen Austausch an Position 743 von Serin (S) zu Asparaginsäure (D) bzw. Glutaminsäure (E) codieren, hergestellt und im Hefe-2-Hybrid-System auf die Interaktion mit 14-3-3 Proteinen untersucht.

Die modifizierten NPH3-Proteine (S743D, S743E) wiesen keine Interaktion mit 14-3-3 auf, eine Mimikrierung der Phosphorylierung erlaubte somit keine 14-3-3/NPH3-Interaktion (s. Tabelle 10, die Interaktions-Studien sind im Anhang angefügt (s. Abbildung 50, s. Abbildung 51)).

Dies ist in keiner Weise überraschend, da eine Mimikrierung der für die 14-3-3 Bindung benötigten Phosphorylierung nur in sehr wenigen Fällen eine Interaktion der untersuchten Zielproteine mit 14-3-3 ermöglichte (Johnson et al., 2010).

Tabelle 10 Vergleich der Interaktion zwischen dem NPH3-Vollängen-Protein, dem NPH3- Δ C51/N2-Deletions-Protein und den mutierten NPH3-Proteinen, die an Position 743 (Ser (S)) einen AS-Austausch aufweisen (Ala (A), Asp (D), Glu (E)), mit verschiedenen 14-3-3 Isoformen (epsilon, kappa, omega). Die unterschiedlichen 14-3-3 Isoformen wurden als pGBKT7-, die NPH3-Familien-Proteine als pGADT7-Konstrukte im Hefe-2-Hybrid-System eingesetzt. +++ starke Interaktion, - keine Interaktion, n.d. nicht durchgeführt.

| 14-3-3 Isoform | NPH3 | NPH3- Δ C51/N2 | NPH3-S743A | NPH3-S743D | NPH3-S743E |
|--------------------------|------|-----------------------|------------|------------|------------|
| epsilon (ϵ) | +++ | - | - | - | - |
| kappa (non- ϵ) | +++ | - | - | - | - |
| omega (non- ϵ) | +++ | n.d. | - | - | - |

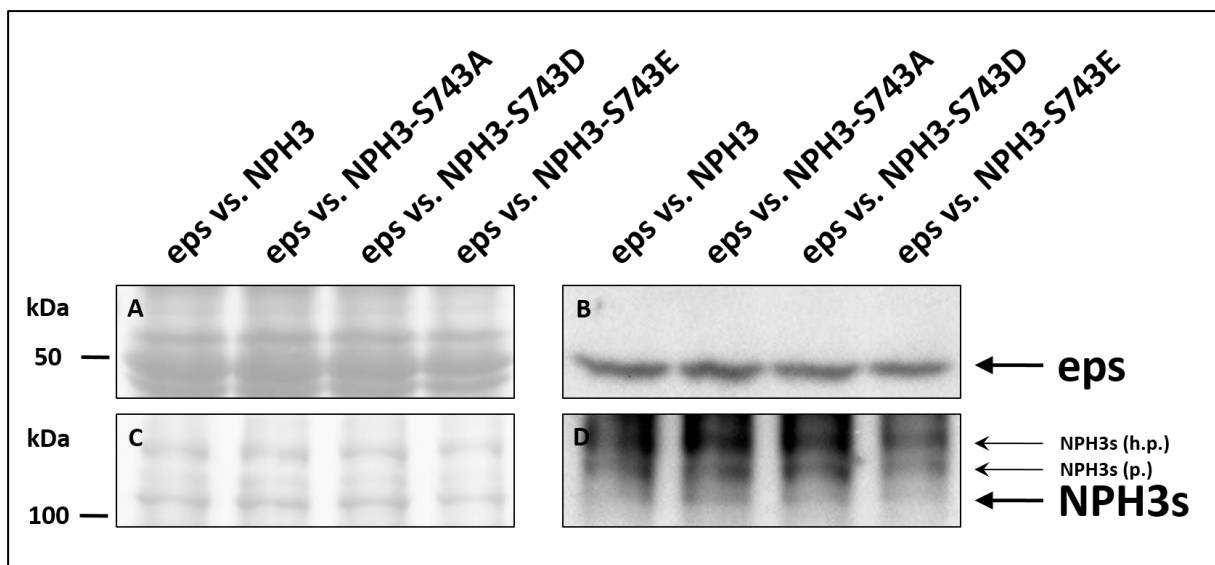


Abbildung 12 Expressions-Analyse und Immunodetektion der im Hefe-2-Hybrid-System eingesetzten NPH3-Proteine und der 14-3-3 Isoform epsilon. Das NPH3-Wildtyp-Protein und die jeweils an Position 743 in einer AS veränderten NPH3-Proteine (pGADT7-NPH3/NPH3-S743A/D/E, HA-Epitop) wurden bzgl. ihrer Interaktion mit der 14-3-3 Isoform epsilon (pGBKT7-eps, c-Myc-Epitop) heterolog in Hefe untersucht (s. Abbildung 7, s. Abbildung 9, s. Abbildung 10, s. Tabelle 10). Es wurden jeweils 7,5 μ l einer Gesamt-Protein-Extraktion aus einer 25 ml Flüssigkultur (YPDA-Medium) für die Immunodetektion verwendet. (A und C) Ponceau-S-Färbung der Nitrozellulose-Membran, (B und D) Immunodetektion der 14-3-3 Isoform epsilon (B, MW ca. 46 kDa, anti-HA-Antikörper) sowie von NPH3-Proteinen (D, MW ca. 101 kDa, anti-c-Myc-Antikörper). S Serin, A Alanin, D Asparaginsäure, E Glutaminsäure, p. phosphorylierte Formen, h.p. hoch-phosphorylierte Formen.

Exemplarisch für alle Proteine, die im Hefe-2-Hybrid-System eingesetzt und auf ihre Interaktion mit 14-3-3 Proteine getestet wurden, zeigt Abbildung 12 die Expressions-Analyse bzw. Immunodetektion

von NPH3, dessen drei Einzel-AS-Austausch-Varianten NPH3-S743A/D/E und von der simultan-exprimierten 14-3-3 Isoform epsilon.

Wie bereits erwähnt ist das Serin 743 in NPH3 sowohl in ENP/NPY1 als auch RPT2 konserviert (s. Abbildung 10). Dementsprechend hatte der Austausch des homologen C-terminalen Serin zu Alanin in ENP/NPY1 (S569A) und RPT2 (S591A) einen Verlust der 14-3-3 Interaktion zur Folge (s. Abbildung 13).

Alle drei NPH3-Familien-Proteine besitzen demzufolge ein C-terminales 14-3-3 Bindemotiv des Modus III ((S/T)^PX1-2-COOH (Coblitz et al., 2005; Coblitz et al., 2006)).

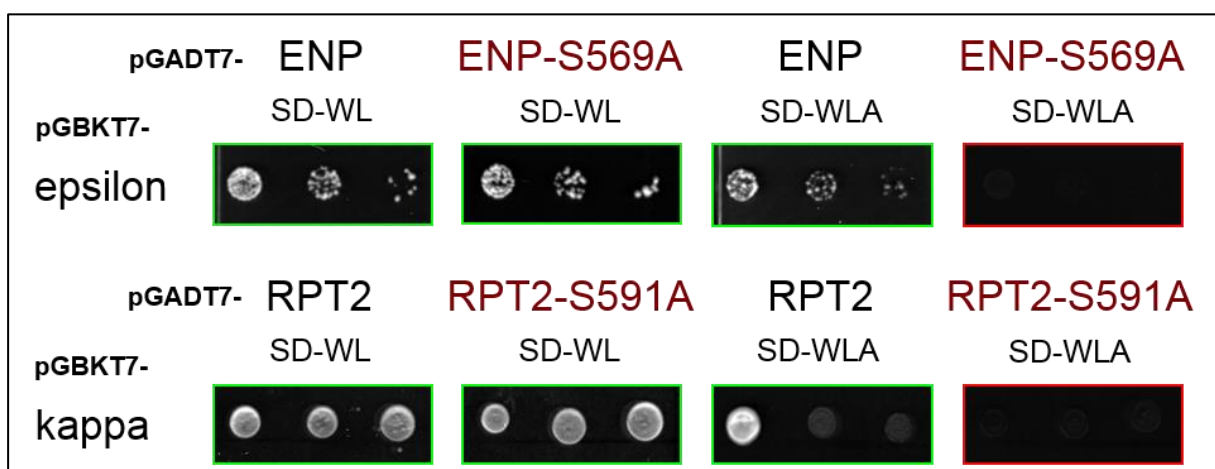


Abbildung 13 Identifizierung des 14-3-3 Bindemotivs an Position 569 in ENP/NPY1 und an Position 591 in RPT2. Die Transformations-Kontrolle der simultan-transformierten Hefen erfolgte auf „Synthetic Drop-out“-Medium ohne Tryptophan und Leucin (SD-WL), die Bestätigung der Protein-Protein-Interaktion erfolgte auf „Synthetic Drop-out“-Medium ohne Tryptophan, Leucin und Adenin (SD-WLA). Die ursprünglichen Hefe-Übernachtskulturen wurden auf eine OD_{600} von 0,05 eingestellt, davon wurde jeweils eine 1:10 und 1:100 Verdünnung erstellt und jeweils 4 μ l auf die entsprechenden Selektionsplatten getropft. Die Inkubation der Platten fand für 4 Tage bei 30 °C statt.

3.3 Mikroskopische Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation der NPH3-Familien-Proteine sowie ihrer Interaktion mit 14-3-3 Isoformen

3.3.1 Lokalisation in transient-transformierten *A. thaliana*-Protoplasten bzw. *N. benthamiana*-Blättern

Um die subzelluläre Lokalisation der NPH3-Familien-Proteine *in planta* zu analysieren, wurden Fusions-Proteine (mGFP4/RFP-Fusionen) der verschiedenen Vollängen-, Deletions- und Einzel-AS-Austausch-Proteine transient in *Arabidopsis*-Protoplasten bzw. Tabak-Blättern exprimiert und mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) untersucht.

3.3.1.1 Subzelluläre Lokalisation in transient-transformierten *A. thaliana*-Protoplasten

Obwohl NPH3 selbst keinerlei Trans-Membran-Domänen aufweist (s. Kapitel 3.2.1, s. Abbildung 8), wurde das Protein mittels Immunodetektion in mikrosomalen Membranen von *Arabidopsis* nachgewiesen (Motchoulski and Liscum, 1999; Lariguet et al., 2006).

Für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von NPH3 und dessen Varianten (NPH3-S743A, Δ C51/N2 bzw. Δ N146) wurden die entsprechenden codierenden Sequenzen in Vektoren kloniert, die eine Expression von N- bzw. C-terminalen mGFP4/RFP-Fusions-Proteinen unter Kontrolle des 35S-Promotors erlauben.

Nach transienter Expression in *Arabidopsis*-Protoplasten lokalisiert NPH3:mGFP4/RFP, wie bereits von Inoue et al. (2008) in Epidermis- und Schließ-Zellen von *V. faba* beschrieben, an der PM (s. Abbildung 14). Bemerkenswerterweise variierte die Verteilung von NPH3 von scheinbar homogen (s. Abbildung 14 C), über abgegrenzte großflächige „Cluster“ (s. Abbildung 14 B, D), bis hin zu distinkt punktförmigen Mustern (s. Abbildung 14 A) an der PM. Diese Variationen konnten nicht auf die Dauer der Expression oder den Einfluss von exogenen Faktoren, wie z.B. Licht-Behandlung, zurückgeführt werden.

Eine Maximum-Intensitäts-Projektion durch die z-Achse des Protoplasten der in Abbildung 14 B median geschnitten wurde, erlaubt eine dreidimensionale Rekonstruktion/Visualisierung, die zeigt, dass NPH3 (selbst bei scheinbar homogener Verteilung in der Medianen (s. Abbildung 14 B, C)) in distinkten Sub-Domänen der Membran vorliegt (s. Abbildung 14 D). Solche Mikro-Domänen in oder entlang der PM wurden auch im Hinblick auf andere integrale oder Membran-assoziierte Proteine beschrieben (Urbanus and Ott, 2012; Jarsch et al., 2014). Diese abgegrenzten, aber trotzdem dynamischen Strukturen/Domänen bieten die Möglichkeit, definierte Prozesse, wie z.B. Signal-Perzeption, Protein-Protein-Interaktion oder Transport-Prozesse gezielt zu steuern und somit spezifische Reaktionen/Antworten zu gewährleisten. So wäre in solchen Domänen z.B. eine exklusive Protein-Protein-Interaktion zwischen NPH3 und den BL-Rezeptoren PHOT1 und PHOT2 oder anderen am Phototropismus beteiligten Proteinen denkbar, die letztendlich die gerichtete Umverteilung von z.B. PIN-Proteinen (Auxin-Efflux-„Carrier“) bedingt.

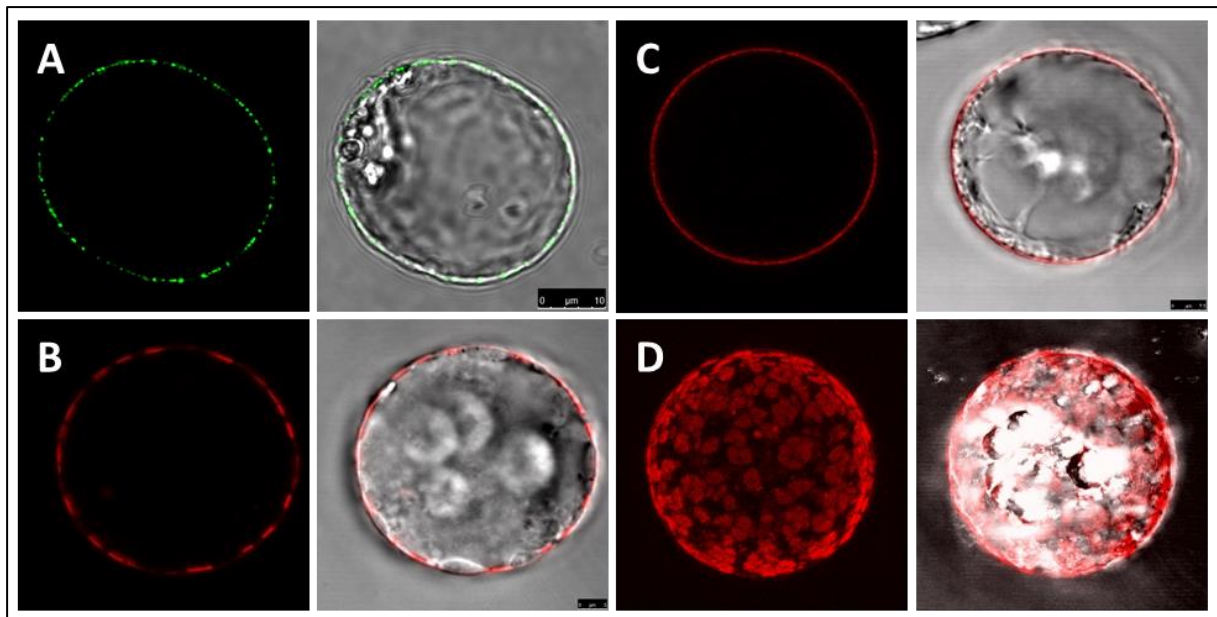


Abbildung 14 Subzelluläre Lokalisation von NPH3 in Arabidopsis-Protoplasten. Protoplasten einer Wurzel-Zellkultur wurden mit 35S::NPH3:mGFP4- bzw. 35S::NPH3:RFP-Konstrukten transformiert, die Proteine transient exprimiert und die Signale 24 bis 48 h nach der Transformation mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert. Die Aufnahmen **A**, **B** und **C** repräsentieren die unterschiedliche Verteilung von NPH3:mGFP an der PM eines Protoplasten und zeigen jeweils das Fluoreszenzsignal und die Überlagerung mit dem Durchlichtbild. Aufnahme **D** zeigt eine Maximum-Intensitäts-Projektion durch die z-Achse des Protoplasten der in Aufnahme **B** median geschnitten wurde (3D-Rekonstruktion).

Abbildung 15 zeigt die subzelluläre Lokalisation von NPH3-S743A:RFP, einer nicht mehr zur 14-3-3 Interaktion befähigten Mutante, in *Arabidopsis*-Protoplasten. Ein signifikanter Unterschied ist im Vergleich zum Wildtyp-Protein nicht ersichtlich.

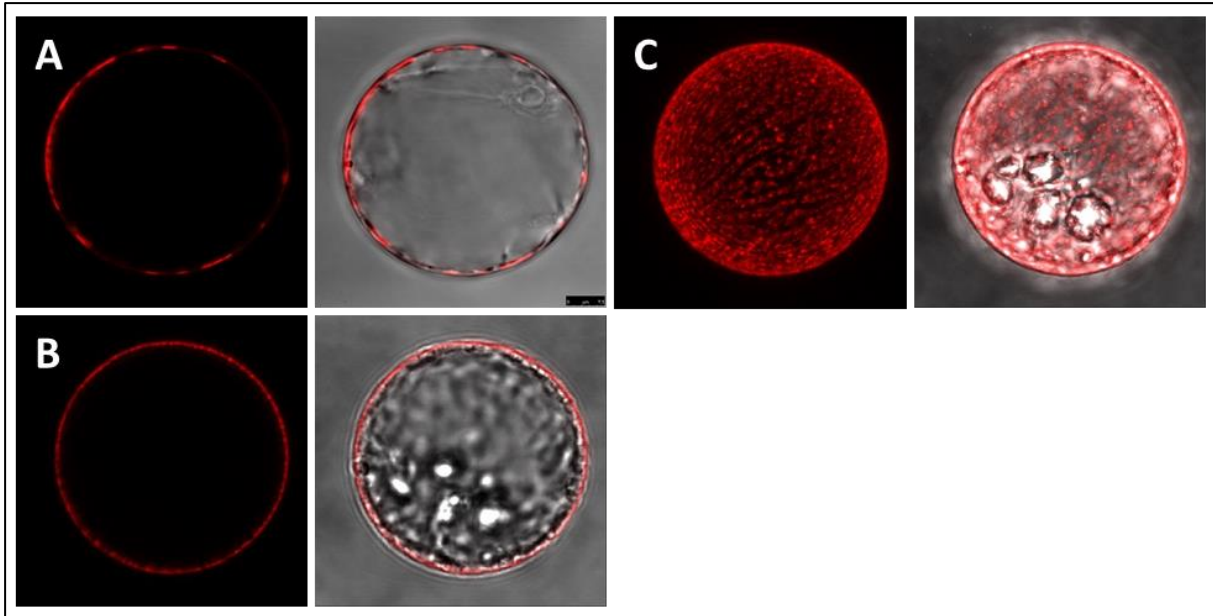


Abbildung 15 Subzelluläre Lokalisation von NPH3-S743A in *Arabidopsis*-Protoplasten. Protoplasten einer Wurzel-Zellkultur wurden mit 35S::NPH3-S743A:RFP -Konstrukten transformiert, die Proteine transient exprimiert und die Signale 24 bis 48 h nach der Transformation mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert. Die Aufnahmen **A** und **B** repräsentieren die unterschiedliche Verteilung von NPH3-S743A:RFP an der PM eines Protoplasten und zeigen jeweils das Fluoreszenzsignal und die Überlagerung mit dem Durchlichtbild. Aufnahme **C** zeigt eine Maximum-Intensitäts-Projektion durch die z-Achse des Protoplasten der in Aufnahme **B** median geschnitten wurde (3D-Rekonstruktion).

Im Gegensatz dazu bildet das C-terminal um 51 AS verkürzte NPH3:mGFP4-Fusions-Protein zahlreiche Partikel aus, die zum Teil eindeutig dem zytoplasmatischen Kompartiment zuzuordnen sind (s. Abbildung 16). Vergleichbares wurde bei Deletion der C-terminalen 65 AS nach Expression in Epidermis- bzw. Schließ-Zellen von *V. faba* beobachtet (Inoue et al., 2008).

Abbildung 16 **B** zeigt eine Maximum-Intensitäts-Projektion durch die z-Achse des Protoplasten der in Abbildung 16 **A** median geschnitten wurde (3D-Rekonstruktion/Visualisierung). Die erwähnten Partikel unterscheiden sich deutlich von den PM-assoziierten Domänen von NPH3 bzw. NPH3-S743A (s. Abbildung 14, s. Abbildung 15). Somit scheint der C-Terminus des Proteins, aber nicht die Fähigkeit mit 14-3-3 zu interagieren, für die Assoziation von NPH3 mit der PM von Bedeutung zu sein.

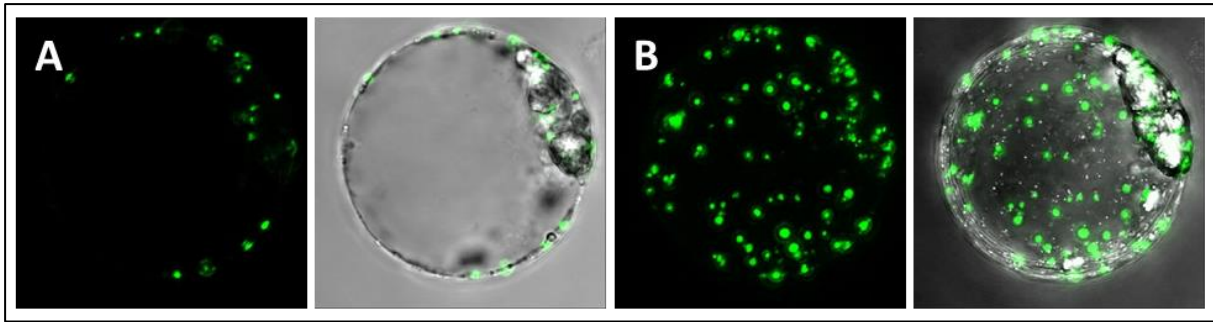


Abbildung 16 Subzelluläre Lokalisation von NPH3- Δ C51/N2 in *Arabidopsis*-Protoplasten. Protoplasten einer Wurzel-Zellkultur wurden mit 35S::NPH3- Δ C51/N2:mGFP4-Konstrukten transformiert, die Proteine transient exprimiert und die Signale 24 bis 48 h nach der Transformation mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert. Die Aufnahme **A** repräsentiert die Verteilung von NPH3- Δ C51/N2:mGFP4 innerhalb eines Protoplasten und zeigt jeweils das Fluoreszenzsignal und die Überlagerung mit dem Durchlichtbild. Aufnahme **B** zeigt eine Maximum-Intensitäts-Projektion durch die z-Achse des Protoplasten der in Aufnahme **A** median geschnitten wurde (3D-Rekonstruktion).

Eine überwiegende zytosolische Partikel-Lokalisation weist ebenfalls das NPH3- Δ N146:mGFP4-Fusions-Protein in transient-transformierten *Arabidopsis*-Protoplasten auf (s. Abbildung 17). Demzufolge scheinen sowohl die N-terminale als auch die C-terminale Domäne von NPH3 essentiell für die PM-Assoziation verantwortlich zu sein, eine Eliminierung einer Domäne hat eine Dissoziation von NPH3 von der PM zur Folge.

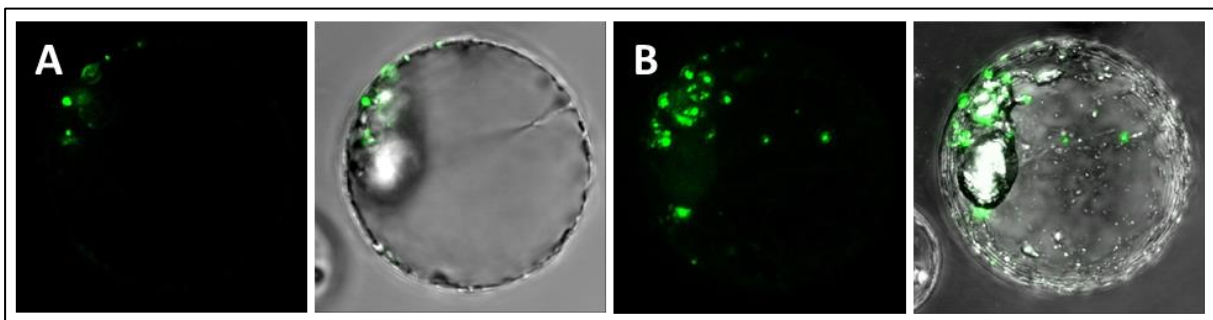


Abbildung 17 Subzelluläre Lokalisation von NPH3- Δ N146 in *Arabidopsis*-Protoplasten. Protoplasten einer Wurzel-Zellkultur wurden mit 35S::NPH3- Δ N146:mGFP4-Konstrukten transformiert, die Proteine transient exprimiert und die Signale 24 bis 48 h nach der Transformation mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert. Die Aufnahme **A** repräsentiert die Verteilung von NPH3- Δ N146:mGFP4 innerhalb eines Protoplasten und zeigt jeweils das Fluoreszenzsignal und die Überlagerung mit dem Durchlichtbild. Aufnahme **B** zeigt eine Maximum-Intensitäts-Projektion durch die z-Achse des Protoplasten der in Aufnahme **A** median geschnitten wurde (3D-Rekonstruktion).

3.3.1.2 Subzelluläre Lokalisation in transient-transformierten *N. benthamiana*-Blättern

Für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von NPH3 und dessen veränderter Version (NPH3-S743A) in Tabak-Blättern, wurden die entsprechenden codierenden Sequenzen in Vektoren

kloniert, die eine Expression von C-terminalen mGFP4-Fusions-Proteinen unter Kontrolle des 35S-Promotors erlauben.

In Abbildung 18 sieht man Tabak-Blätter, die NPH3:mGFP4 exprimieren. Die subzelluläre Lokalisation von NPH3 entsprach der Beschreibung in der Literatur (Inoue et al., 2008), jedoch variierte sie von homogen (A, C), über abgegrenzte großflächige „Cluster“ (B, D), bis hin zu distinkt punktförmigen Mustern (ebenfalls in B, D) entlang der PM der Tabakzellen.

Betrachtet man die Protein-„Cluster“/„Patches“ von NPH3:mGFP4, gewinnt man den Eindruck, dass NPH3, ebenfalls wie bei der Expression in Protoplasten (s. Abbildung 14) ersichtlich, distinkte Membran-assoziierte Domänen entlang der PM der Tabakzellen ausbildet (s. Abbildung 54, s. Anhang, s. Visualisierung/Video-File auf der beigefügten CD).

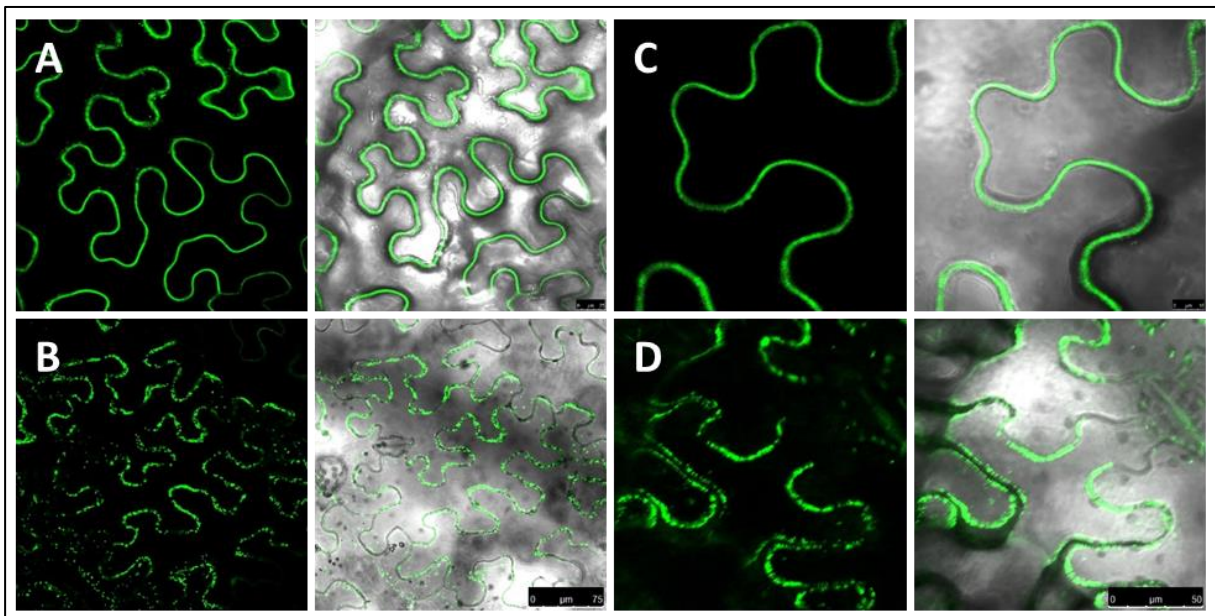


Abbildung 18 Subzelluläre Lokalisation von NPH3 in Tabak-Blättern. Tabak-Blätter wurden mittels *A. tumefaciens*-vermitteltem Gentransfer mit 35S::NPH3:mGFP4-Konstrukten transformiert, die Proteine transient exprimiert und die Signale 24 bis 48 h nach der Transformation mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert. Die Aufnahmen A bis D repräsentieren die unterschiedliche Verteilung von NPH3:mGFP4 an der PM von Tabakzellen und zeigen jeweils das Fluoreszenzsignal und die Überlagerung mit dem Durchlichtbild.

Die nicht mehr zur 14-3-3 Interaktion befähigte Mutante von NPH3 (NPH3-S743A) wurde ebenfalls hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation in Tabakzellen untersucht; einen Unterschied bzgl. der Lokalisation im Vergleich zum Wildtyp-Protein war nicht ersichtlich (s. Abbildung 55, s. Anhang).

3.3.2 Koexpressions- und Interaktions-Studien in transient-transformierten

A. thaliana-Protoplasten bzw. *N. benthamiana*-Blättern

Um die subzelluläre Kolokalisation der NPH3-Familien-Proteine und ihre Interaktion mit 14-3-3 Proteinen *in planta* zu analysieren, wurden Fusions-Proteine (mGFP4-, RFP- (bzgl. der FRET-FLIM-Analyse) und rBiFC- (n/cYFP) Fusionen) der verschiedenen Vollängen- und Einzel-AS-Austausch-Proteine transient in *Arabidopsis*-Protoplasten und Tabak-Blättern exprimiert und mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) untersucht.

3.3.2.1 Koexpressions-Studien von NPH3 und ENP/NPY1 in transient-transformierten

A. thaliana-Protoplasten

ENP/NPY1 gruppiert in einer anderen phylogenetischen Subgruppe der NPH3-Familien-Proteine als NPH3 (s. Abbildung 6, s. Ergebnisse). Das Expressions-Muster und insbesondere die Polarität der subzellulären Lokalisation von ENP/NPY1 entspricht während der Embryogenese (in globulären bzw. herzförmigen Stadien) weitestgehend der von PIN1 (Furutani et al., 2011). Diese Information veranlasste uns, die subzelluläre Kolokalisation von NPH3 und ENP/NPY1 in Protoplasten zu analysieren.

NPH3:mGFP4 zeigte die bereits beschriebene Lokalisation in der Zellperipherie entlang der PM (s. Abbildung 19), jedoch konnte ein geringer Anteil von NPH3 auch in zytoplasmatischen Strukturen/Kompartimenten der Protoplasten detektiert werden. Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Analyse von ENP/NPY1:RFP, allerdings war der zytoplasmatisch lokalisierte Anteil des Proteins deutlich höher als bei NPH3:mGFP4. Bemerkenswerterweise konnten die beiden Proteine nicht oder sehr selten in identischen Bereichen der Zelle detektiert werden; sie schlossen sich in ihrer Lokalisation gegenseitig aus. Eine Trennung der Domänen-artigen Strukturen in distinkte Bereiche nahe der PM ist auch in der Visualisierung der 3D-Rekonstruktion deutlich festzustellen (s. Abbildung 19 B).

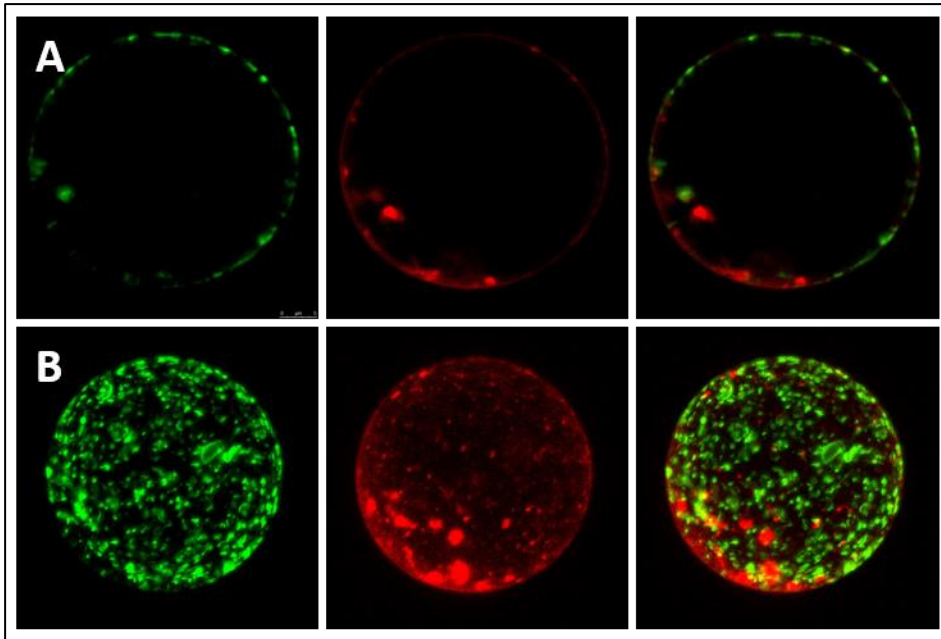


Abbildung 19 Koexpression von NPH3 und ENP/NPY1 in Arabidopsis-Protoplasten. Protoplasten einer Wurzel-Zellkultur wurden mit 35S::NPH3:mGFP4- und 35S::ENP/NPY1:RFP-Konstrukten kotransformiert, die Proteine transient exprimiert und die Signale 24 bis 48 h nach der Transformation mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert. Die Aufnahme A repräsentiert die Verteilung von NPH3:mGFP4 und ENP/NPY1:RFP innerhalb eines Protoplasten und zeigt jeweils das Fluoreszenzsignal (NPH3 – grün, ENP/NPY1 – rot) und die Überlagerung beider Signale. Aufnahme B zeigt eine Maximum-Intensitäts-Projektion durch die z-Achse des Protoplasten der in Aufnahme A median geschnitten wurde (3D-Rekonstruktion).

Ein reziproker Austausch der Fluorophore der beiden Proteine (ENP/NPY1:mGFP4, NPH3:RFP) hatte keinen Einfluss auf die detektierte subzelluläre Lokalisation (s. Abbildung 62, s. Anhang). Eine Kollokalisierung beider Proteine konnte nicht beobachtet werden.

3.3.2.2 Koexpressions-Studien von NPH3 und PIN1 in transient-transformierten

A. thaliana-Protoplasten

Die sogenannten „PIN-FORMED“-Proteine (PINs) sind PM-ständige Transporter, die den Auxin-Efflux aus Pflanzenzellen vermitteln (s. Einleitung). Ihre Verteilung in der Zelle ist polar, und diese Polarität bestimmt die Richtung des interzellulären Auxin-Flusses; dementsprechend spielen sie eine bedeutende Rolle im Aufbau von Auxin-Gradienten und -Maxima, u.a. bei tropistischen Antworten (Krecek et al., 2009). Die Stimulus-abhängige Modifikation der polaren subzellulären Lokalisation wird durch kontinuierliche/s Internalisierung und Rezyklierung der „PIN-FORMED“-Proteine zur PM ermöglicht. PIN3, das für die Auxin-Umverteilung bzgl. des Phototropismus hauptsächlich verantwortlich zu sein scheint, lokalisiert im Dunkeln gleichmäßig entlang der inneren und äußeren PM von Endodermiszellen des oberen Hypokotyl-Bereichs; unter einseitiger Licht-Einstrahlung

relokalisiert PIN3 größtenteils polar an die innere PM der Endodermiszellen (Licht-abgewandt), was letztendlich zur phototropen Reaktion des Hypokotyls führt (Ding et al., 2011). PIN1, ein weiterer Vertreter der „PIN-FORMED“-Proteine, lokalisiert in der Wurzel-Vaskulatur an der basalen PM und vermittelt so den Transport zur Wurzelspitze (Steinmann et al., 1999; Michniewicz et al., 2007).

Eine Korrelation zwischen der Lokalisation von Mitgliedern der NPH3-Familie und Proteinen der „PIN-FORMED“-Familie wurde erstmals von Treml et al. (2005) und Furutani et al. (2007) festgestellt. ENP/NPY1 (MAB4), ein Mitglied der NPH3-Familie und IP von 14-3-3 (s. Kapitel 3.2), kontrolliert während der Ausbildung von Organen, speziell der Kotyledonen, die Lokalisation von PIN1 an der PM; das Expressions-Muster und die subzelluläre Lokalisation beider Proteine waren identisch. Auch andere Mitglieder der NPH3-Familie, im speziellen die ENP/NPY-Subgruppe („MAB4/ENP-Like“ – MEL-Proteine), scheinen darin involviert zu sein und übernehmen redundante Funktionen. Multiple Mutanten der MEL-Proteine weisen zudem eine reduzierte Abundanz von „PIN-FORMED“-Proteinen auf bzw. zeigen Defekte in deren polaren Lokalisation (Furutani et al., 2011).

Um die Beziehung zwischen der NPH3- und PIN1-Lokalisation zu analysieren, wurden diverse NPH3- und PIN1-Fusions-Proteine in *Arabidopsis*-Protoplasten koexprimiert und mittels CLSM detektiert.

Abbildung 20 zeigt die Lokalisation von PIN1:mGFP4 in *Arabidopsis*-Protoplasten. Das überexprimierte Protein lokalisierte in/an der PM sowie in punktförmigen Partikeln, die über das Zytoplasma verteilt waren. Diese Strukturen wurden von Furutani et al. (2007) in Kolokalisations-Studien mit entsprechenden Markern als frühe (Kolokalisation mit ARA7) und Teile der späten Endosomen (Kolokalisation mit ARA6) identifiziert.

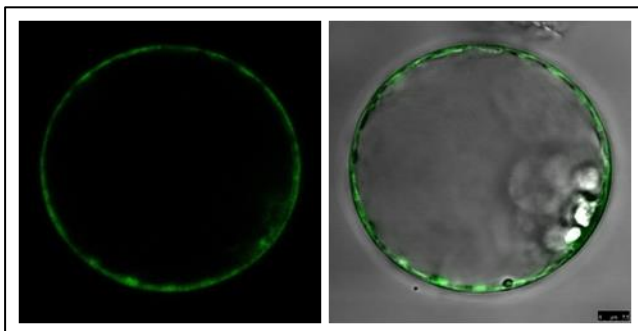


Abbildung 20 Subzelluläre Lokalisation von PIN1 in *Arabidopsis*-Protoplasten. Protoplasten einer Wurzel-Zellkultur wurden mit 35S::PIN1:mGFP4-Konstrukten transformiert, die Proteine transient exprimiert und die Signale 24 bis 48 h nach der Transformation mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert. Die Aufnahme repräsentiert die Verteilung von PIN1:mGFP4 innerhalb eines Protoplasten und zeigt jeweils das Fluoreszenzsignal und die Überlagerung mit dem Durchlichtbild.

Bei Koexpression von PIN1:mGFP4 und NPH3:RFP in *Arabidopsis*-Protoplasten (s. Abbildung 21) wiesen beide Proteine eine vergleichbare Lokalisation wie im Falle ihrer Einzelexpression auf (s. Abbildung 14, s. Abbildung 20).

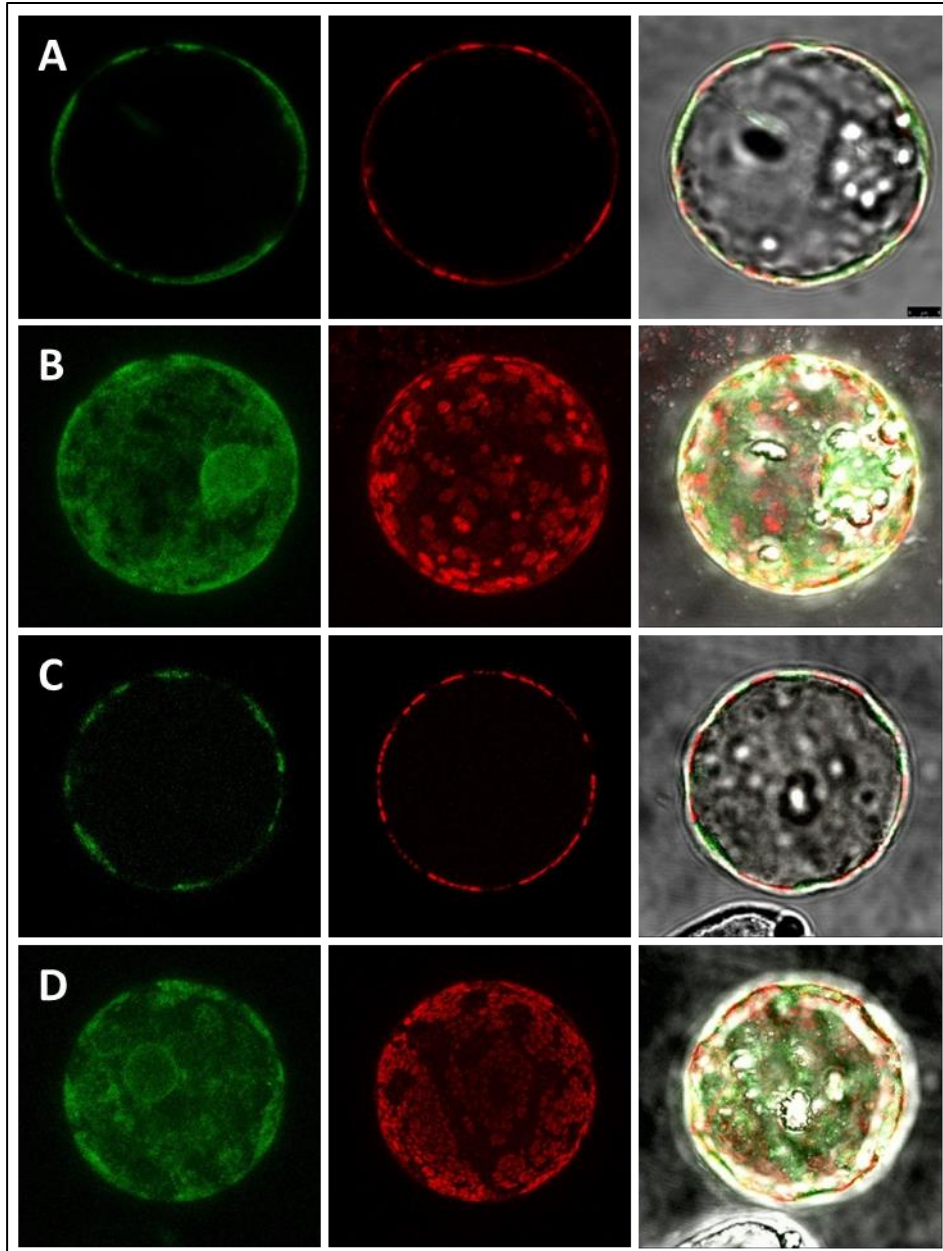


Abbildung 21 Koexpression von PIN1 und NPH3 in *Arabidopsis*-Protoplasten. Protoplasten einer Wurzel-Zellkultur wurden mit 35S::PIN1:mGFP4- und 35S::NPH3:RFP-Konstrukten kotransformiert, die Proteine transient exprimiert und die Signale 24 bis 48 h nach der Transformation mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert. Die Aufnahmen **A** und **C** repräsentieren die Verteilung von PIN1:mGFP4 und NPH3:RFP innerhalb eines Protoplasten und zeigen jeweils das Fluoreszenzsignal (PIN1 – grün, NPH3 – rot) und die Überlagerung mit dem Durchlichtbild. Aufnahmen **B** und **D** zeigen Maximum-Intensitäts-Projektionen durch die z-Achse der Protoplasten die in den Aufnahmen **A** und **C** median geschnitten wurden (3D-Rekonstruktion).

Bemerkenswerterweise war ihre Lokalisation in/an der PM jedoch eindeutig wechselseitig ausschließlich. „Patches“/Domänen, die das eine Protein beinhalteten, wechselten mit Domänen ab, die ausschließlich von dem anderen Protein besetzt wurden. Auch in den Visualisierungen der 3D-Rekonstruktionen lässt sich eine eindeutige Domänen-Bildung der zwei Proteine an oder in der PM erkennen (s. Abbildung 21 **B, D**).

Wie das Wildtyp-Protein wurde auch das an Position 743 mutierte NPH3-Protein (S743A) für Koexpressions-Studien mit PIN1 in *Arabidopsis*-Protoplasten eingesetzt. Die subzelluläre Lokalisation beider Proteine entsprach derer des Wildtyp-Proteins und PIN1, eine Kolokalisation entlang der PM war nicht ersichtlich (s. Abbildung 61, s. Anhang).

Die Tatsache, dass (i) NPH3 und ENP/NPY1 im Protoplasten-System nicht kolokalisieren, dass (ii) NPH3 und PIN1 in Protoplasten ebenfalls nicht kolokalisieren (sich gegenseitig in ihrer Lokalisation ausschließen) und die Information, dass (iii) ENP/NPY1 und PIN1 bei der Embryogenese in den gleichen Zellen exprimiert werden und insbesondere kolokalisiert sind, lassen Spekulationen bzgl. einer möglichen Beeinflussung der polaren Lokalisation von Mitgliedern der „PIN-FORMED“-Proteinen durch definierte Subgruppen der NPH3-Familien-Proteinen zu; die eine Subgruppe (MEL-Proteine) „markiert“ distinkte Bereiche der PM für die Lokalisation von PIN-Proteinen, während die andere Subgruppe (NPH3-Subgruppe) Bereiche eingrenzt, die für die PIN-Lokalisation nicht zur Verfügung stehen. Weitergehende Interaktions- und Kolokalisations-Studien mit diversen Kombinationen aus Proteinen beider Familien würden hinsichtlich dieser Fragestellung evtl. aufschlussreiche Erkenntnisse liefern.

3.3.2.3 Koexpressions-Studien von NPH3 und 14-3-3 Isoform epsilon in transient-transformierten *A. thaliana*-Protoplasten

In *Arabidopsis* wurden diverse Untersuchungen bzgl. der Gewebe-spezifischen Expression und der subzellulären Lokalisation von 14-3-3 Proteinen auf Einzelzell- wie auch auf Organismus-Ebene unternommen (Daugherty et al., 1996; Paul et al., 2005; Weckermann, 2008). Bis auf wenige Ausnahmen weisen alle Isoformen eine nahezu ubiquitäre Expression auf; ihre subzelluläre Lokalisation ist größtenteils zytoplasmatisch (Aducci et al., 2002) und nukleär (Bihn et al., 1997). Diesbezüglich ergibt sich die Fragestellung, ob eine Kolokalisation von 14-3-3 Proteinen mit dem PM-assoziierten in distinkten Spots auftretenden NPH3-Protein überhaupt gegeben ist.

Um die gemeinsame 14-3-3/NPH3-Lokalisation auf Einzelzell-Ebene zu untersuchen, wurden *Arabidopsis*-Protoplasten mit unterschiedlichen Fusions-Konstrukten kotransformiert und die exprimierten Proteine auf ihre Lokalisation hin untersucht.

In Abbildung 22 ist die subzelluläre Lokalisation der Isoform epsilon in Protoplasten zu sehen. Das 14-3-3 Protein lokalisierte sowohl zytoplasmatisch (s. Zytoplasmastränge) als auch nukleär. Auch andere Isoformen (kappa) wiesen die gleiche subzelluläre Lokalisation wie epsilon auf (nicht gezeigt).

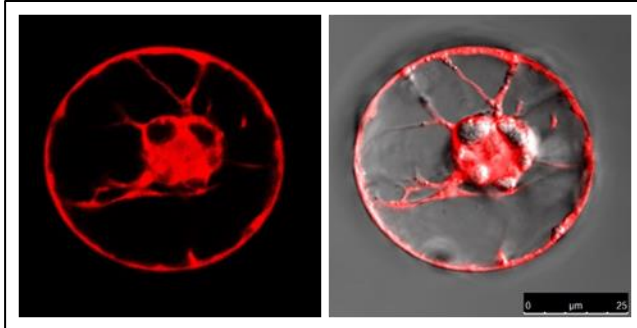


Abbildung 22 Subzelluläre Lokalisation von 14-3-3 Isoform epsilon in Arabidopsis-Protoplasten. Protoplasten einer Wurzel-Zellkultur wurden mit 35S::epsilon:RFP-Konstrukten transformiert, die Proteine transient exprimiert und die Signale 24 bis 48 h nach der Transformation mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert. Die Aufnahme repräsentiert die Verteilung von epsilon:RFP innerhalb eines Protoplasten und zeigt das Fluoreszenzsignal und die Überlagerung mit dem Durchlichtbild.

Im heterologen System (in Hefe) konnte gezeigt werden, dass 14-3-3 Proteine mit verschiedenen Mitgliedern der NPH3-Familie interagieren (s. Kapitel 3.2.2). Um zu überprüfen, ob diese Interaktion *in planta* räumlich überhaupt möglich ist, wurde NPH3:mGFP4 zusammen mit epsilon:RFP in Arabidopsis-Protoplasten koexprimiert.

Beide überexprimierten Proteine lokalisierten in den Protoplasten entsprechend den Einzeldarstellungen (s. Abbildung 14, s. Abbildung 22, s. Abbildung 23, s. Visualisierung/Video-File auf der beigefügten CD).

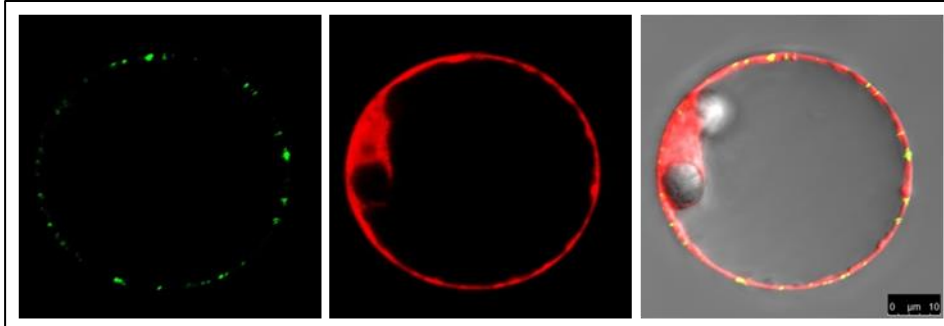


Abbildung 23 Koexpression von NPH3 und der 14-3-3 Isoform epsilon in Arabidopsis-Protoplasten. Protoplasten einer Wurzel-Zellkultur wurden mit 35S::NPH3:mGFP4- und 35S::epsilon::RFP-Konstrukten kotransformiert, die Proteine transient exprimiert und die Signale 24 bis 48 h nach der Transformation mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert. Die Aufnahme repräsentiert die Verteilung von NPH3:mGFP4 und epsilon::RFP innerhalb eines Protoplasten und zeigt jeweils das Fluoreszenzsignal (NPH3 – grün, epsilon – rot) und die Überlagerung mit dem Durchlichtbild.

Bemerkenswerterweise wurden PM-ständige Bereiche detektiert, in denen beide Proteine kolokalisieren (gelbe Signale in der Überlagerung), d.h. eine Interaktion in diesen Arealen ist theoretisch möglich.

Äquivalent zu der Analyse des Wildtyp-Proteins, wurde auch die mutierte Version von NPH3 (NPH3-S743A) zusammen mit der 14-3-3 Isoform epsilon in Protoplasten exprimiert und deren subzelluläre Lokalisation bestimmt; es traten keine Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp-Protein auf (s. Abbildung 58, s. Anhang).

Weiterführende 14-3-3/NPH3-Koexpressions- und Interaktions-Studien *in planta* wurden mittels FRET-FLIM und rBiFC in transient-ko-/transformierten *N. benthamiana*-Blättern durchgeführt (s. Kapitel 3.3.2.4, s. Kapitel 3.3.2.5, s. Kapitel 3.3.2.6).

3.3.2.4 Koexpressions-Studien von NPH3 und 14-3-3 Isoform epsilon in transient-transformierten *N. benthamiana*-Blättern

Um die 14-3-3/NPH3-Lokalisation auf Einzelzell-Ebene im Hintergrund eines multizellulären Organismus zu untersuchen bzw. die 14-3-3/NPH3-Interaktion *in planta* zu verifizieren, wurden Tabak-Blätter via *A. tumefaciens*-vermittelten Gentransfers mit unterschiedlichen Fusions-Konstrukten kotransformiert, die transient exprimierten Proteine hinsichtlich ihrer Lokalisation untersucht und ihre Interaktion bei Kolo­kalisierung mittels FRET-FLIM analysiert (s. Kapitel 3.3.2.5).

Abbildung 24 zeigt die Lokalisation von NPH3:mGFP4 bzw. epsilon:RFP. NPH3 lokalisierte, äquivalent zu dem Protoplasten-System (s. Kapitel 3.3.1.1, s. Abbildung 14) und der Einzelexpression (s. Kapitel 3.3.1.2, s. Abbildung 18), entlang der PM der transformierten Tabakzellen. Dies variierte allerdings in seinen Ausprägungen; so lokalisierte das Protein in manchen Zellen relativ homogen mit teilweise distinkten punktförmigen Mustern entlang der Membran (**A**), trat in anderen Zellen in abgegrenzten großflächigen „Cluster“ auf (**B, C**) bzw. besetzte nur punktförmige Muster des Plasmalemmas (**B, C**). Die 14-3-3 Isoform epsilon lokalisierte, wie schon beschrieben, zytoplasmatisch und nukleär in den Zellen. In den Überlagerungen der Aufnahmen erkennt man deutlich Bereiche entlang der PM, an/in denen beide Proteine kolo­kalisier­ten (gelbe Signale). Solche Bereiche wurden für die 14-3-3/NPH3-Interaktions-Studien mittels FRET-FLIM ausgewählt (s. Kapitel 3.3.2.5).

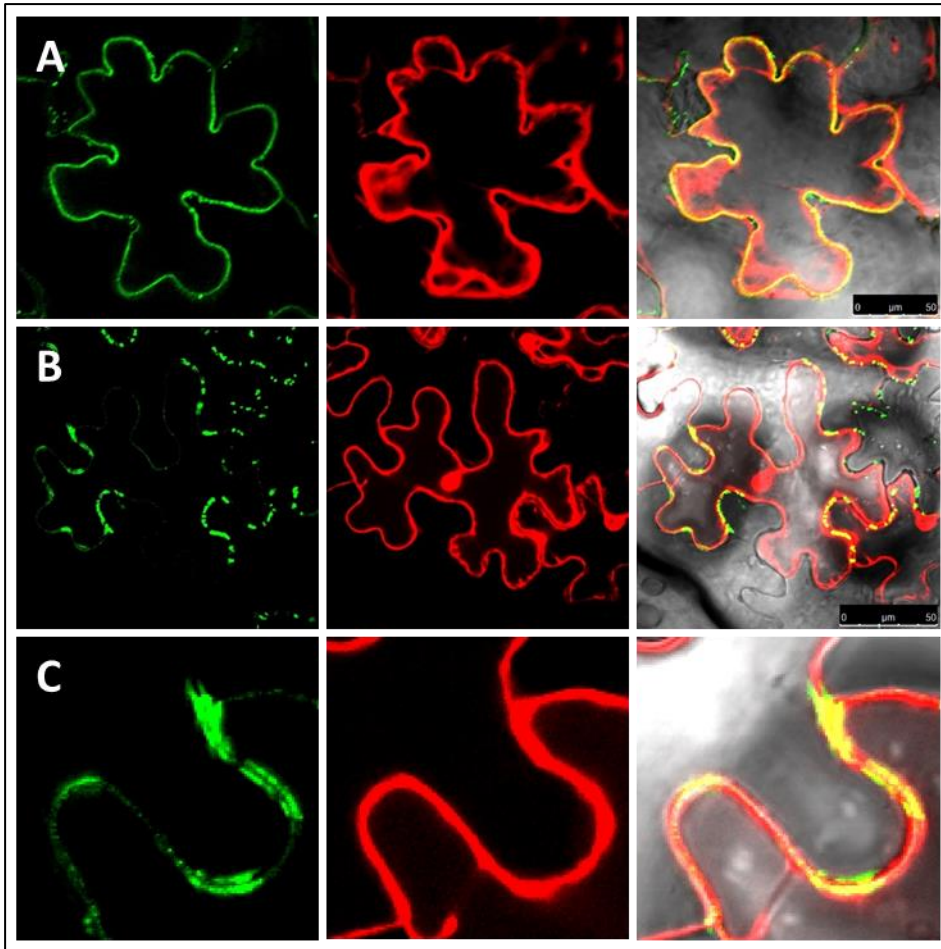


Abbildung 24 Koexpression von NPH3 und 14-3-3 Isoform epsilon in Tabak-Blättern. Tabak-Blätter wurden mittels *A. tumefaciens*-vermitteltem Gentransfer mit 35S::NPH3:mGFP4- und 35S::epsilon:RFP-Konstrukten kotransformiert, die Proteine transient exprimiert und die Signale 24 bis 48 h nach der Transformation mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert. Die Aufnahmen **A** und **B** repräsentieren die Verteilung von NPH3:mGFP4 und epsilon:RFP innerhalb von Tabakzellen und zeigen jeweils das Fluoreszenzsignal (NPH3 – grün, epsilon – rot) und die Überlagerung mit dem Durchlichtbild. Aufnahme **C** zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus Aufnahme **B** (Bereiche die zur FRET-FLIM-Analyse verwendet wurden).

Auch das mutierte NPH3-S743A-Protein wurde zusammen mit der 14-3-3 Isoform epsilon in Tabakzellen exprimiert. In Bezug auf die subzelluläre Lokalisation traten keine Unterschiede im Vergleich zu der Kombination mit dem Wildtyp-Protein auf. Für die FRET-FLIM-Analyse wurden ebenfalls Bereiche ausgewählt, in denen die beiden Proteine kolokalisierten (s. Abbildung 60, s. Anhang, s. Kapitel 3.3.2.5).

3.3.2.5 FRET-FLIM-Analyse von NPH3 und 14-3-3 Isoform epsilon in transient-transformierten *N. benthamiana*-Blättern

Die Interaktion zwischen NPH3 und 14-3-3 Proteinen wurde mittels Hefe-2-Hybrid-System bestätigt (s. Kapitel 3.2.2). Um die Interaktion auch im pflanzlichen Organismus zu verifizieren, wurden deshalb

die für die Koexpressions-Studien verwendeten Fusions-Proteine von NPH3 bzw. dessen mutierter Form NPH3-S743A und der 14-3-3 Isoform epsilon ebenfalls für Förster/(Fluoreszenz)-Resonanzenergietransfer (FRET) – Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie („fluorescence lifetime imaging microscopy“ (FLIM))-Analysen in Tabak-Blättern eingesetzt.

Abbildung 25 zeigt die FRET-FLIM-Daten bzgl. den Interaktions-Studien zwischen NPH3/NPH3-S743A:mGFP4 und epsilon:RFP. Die Fluoreszenz-Lebensdauer von NPH3:mGFP4 verringerte sich in Gegenwart von epsilon von ursprünglich 2,43 ns auf 2,34 ns. Für NPH3-S743A konnte keine Abnahme der Fluoreszenz-Lebensdauer des mGFP4-Signals in Gegenwart von epsilon detektiert werden; die Lebensdauer veränderte sich nicht, sondern blieb konstant bei 2,43 ns.

Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass das NPH3-Wildtyp-Protein zur 14-3-3 Interaktion *in planta* befähigt ist, das an AS-Position 743 mutierte Protein jedoch nicht.

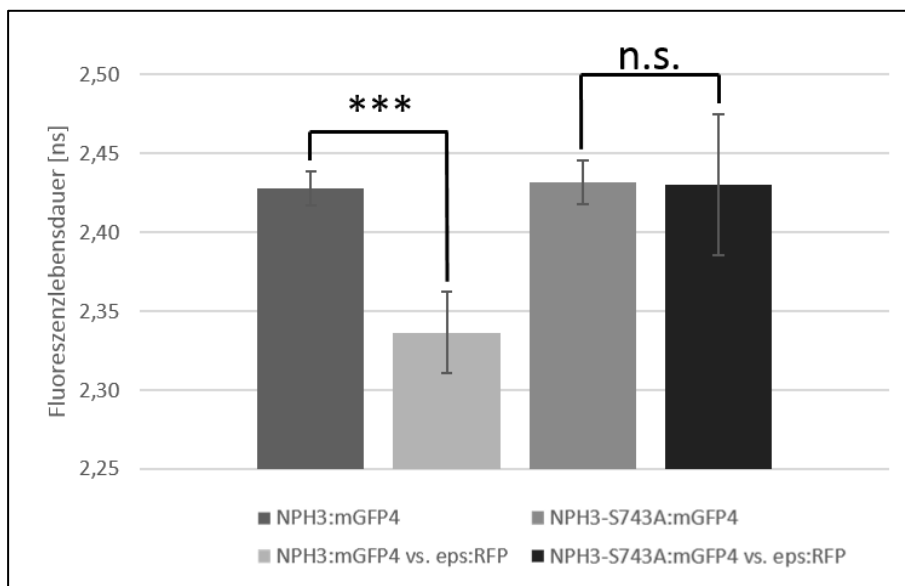


Abbildung 25 FRET-FLIM-Analyse von NPH3/NPH3-S743A und der 14-3-3 Isoform epsilon in Tabak-Blättern. Für die Interaktions-Studien mittels FRET-FLIM wurden Tabak-Blätter via *A. tumefaciens*-vermitteltem Gentransfer mit 35S::NPH3/NPH3-S743A:mGFP4- und 35S::epsilon:RFP-Konstrukten kotransformiert, die Proteine transient exprimiert, die Signale 24 bis 48 h nach der Transformation mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert (s. Abbildung 24, s. Abbildung 60) und die Fluoreszenz-Lebensdauer des Donors (NPH3/NPH3-S743A:mGFP4) in An- und Abwesenheit des Akzeptors (epsilon:RFP) bestimmt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus den Ergebnissen von 2 unabhängig wiederholten Versuchen ($n = 10$). Die statistische Signifikanz wurde mithilfe des „student's t-test“ ermittelt; *** $p < 0,005$, n.s. nicht signifikant unterschiedlich. Irrtumswahrscheinlichkeiten (p -Werte): NPH3:mGFP4/NPH3:mGFP4 vs. eps:RFP – $2,47E-17$, NPH3:mGFP4/NPH3-S743A:mGFP4 – $0,38$, NPH3:mGFP4/NPH3-S743A:mGFP4 vs. eps:RFP – $0,85$, NPH3:mGFP4 vs. eps:RFP/NPH3-S743A:mGFP4 – $3,71E-17$, NPH3:mGFP4 vs. eps:RFP/NPH3-S743A:mGFP4 vs. eps:RFP – $7,69E-10$, NPH3-S743A:mGFP4/NPH3-S743A:mGFP4 vs. eps:RFP – $0,89$.

3.3.2.6 rBiFC-Studien von NPH3 und 14-3-3 Isoform epsilon in transient-transformierten *N. benthamiana*-Blättern

Um die *in planta*-Interaktion von NPH3 und 14-3-3 durch eine unabhängige Methode zu verifizieren, wurde die ratiometrische bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation („ratiometric bimolecular fluorescence complementation“ (rBiFC)) in transient-transformierten Tabak-Blättern angewendet (Hu et al., 2002; Hu and Kerppola, 2003; Grefen and Blatt, 2012; Hecker et al., 2015).

Die subzelluläre Lokalisation der rekonstituierten YFP-Signale aus den Interaktions-Studien zwischen NPH3 und epsilon (s. Abbildung 26 **A** und **C**) entsprach in etwa dem Muster der Einzellexpression von NPH3 in Protoplasten (s. Abbildung 14) bzw. Tabakzellen (s. Abbildung 18); interessanterweise variierte die distinkt punktförmige Verteilung des rekonstituierten YFPs entlang der PM der Tabakzellen in Abhängigkeit der Licht-Intensität; die punktförmigen Signale in den im Dunkeln gehaltenen Pflanzen waren relativ klein und ebenmäßig (s. Abbildung 26 **A**), wohingegen die Signale in den belichteten Pflanzen größere Aggregate/„Cluster“ ausbildeten (s. Abbildung 26 **C**).

Das in einer AS veränderte NPH3-Protein (S743A) interagierte im Hefe-2-Hybrid-System (s. Kapitel 3.2.3, s. Abbildung 11) und der FRET-FLIM-Analyse (s. Kapitel 3.3.2.5, s. Abbildung 25) nicht mehr mit 14-3-3. Dieses Ergebnis ließ sich auch via rBiFC *in planta* bestätigen. Die Abbildung 26 **B** (im Dunkeln gehalten) und **D** (belichtet) zeigen YFP-Signale aus den Interaktions-Studien zwischen NPH3-S743A und epsilon; die Intensität der YFP-Signale war in beiden Versuchsansätzen sehr schwach, es bildeten sich keine distinkt punktförmigen Strukturen entlang der PM aus.

Das im BiFC-System bekannte Problem der unspezifischen Selbst-Rekonstitution des YFP-Moleküls aus den beiden Untereinheiten bedingt zu einem gewissen Teil das Auftreten eines Hintergrundsignals. Dies war bei den Interaktions-Studien zwischen NPH3/NPH3-S743A und epsilon ebenfalls der Fall.

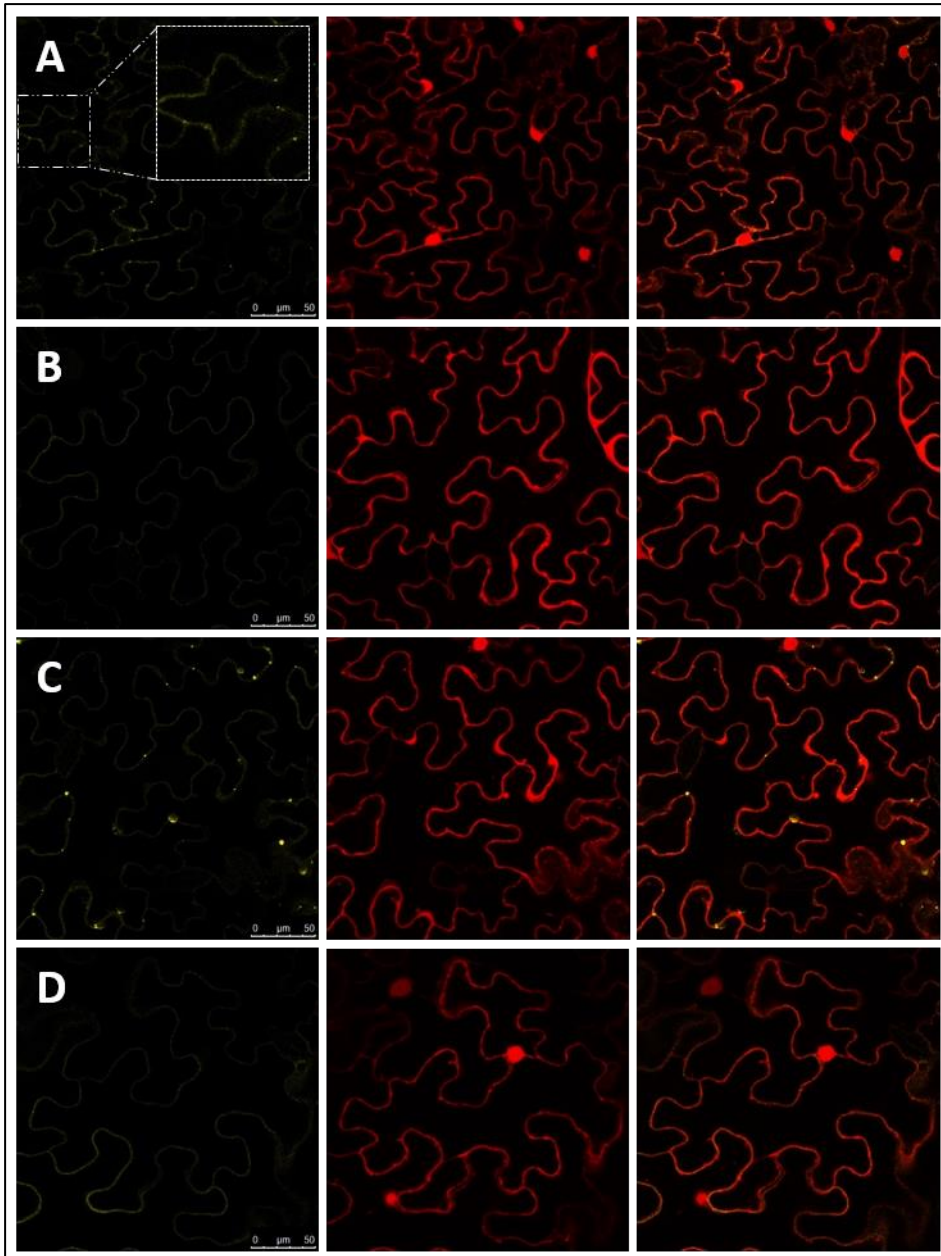


Abbildung 26 Ratiometrische bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation von NPH3/NPH3-S743A und 14-3-3 Isoform epsilon in Tabak-Blättern. Tabak-Blätter wurden mittels A. tumefaciens-vermitteltem Gentransfer mit dem 2in1-Konstrukt 35S::cYFP:NPH3/NPH3-S743A, 35S::mRFP, 35S::epsilon:nYFP transformiert, die Proteine transient exprimiert und die Signale 48 h nach der Transformation mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert. Die Pflanzen wurden nach der Infiltration/vor der Detektion im Dunkeln belassen (A und B) bzw. für 24 h konstant belichtet (C und D). Die Aufnahmen A und C repräsentieren die Verteilung des rekonstituierten YFP-Signals aus cYFP:NPH3 und epsilon:nYFP, B und D repräsentieren die Verteilung des marginal rekonstituierten YFP-Signals aus cYFP:NPH3-S743A und epsilon:nYFP innerhalb von Tabakzellen. Zusätzlich ist die Verteilung des mRFP-Signals (Transformations-Kontrolle bzw. Normierungsfaktor) zu sehen. Die Aufnahmen zeigen jeweils das Fluoreszenzsignal (YFP (NPH3/NPH3-S743A vs. epsilon) – gelb, mRFP – rot) bzw. die Überlagerung beider Signale.

Für die ratiometrische Analyse wurde das Verhältnis aus der mittleren Intensität des YFP-Signals (komplettes Bild) und der mittleren Intensität des RFP-Signals (komplettes Bild) gebildet (s. Abbildung 26). Das YFP/RFP-Verhältnis repräsentiert die relative Intensität der jeweiligen Interaktion.

Die ratiometrische Auswertung macht deutlich, dass das YFP/RFP-Verhältnis bei Analyse der 14-3-3/NPH3-Interaktion gegenüber der NPH3-S743A-Mutante signifikant gesteigert ist (s. Abbildung 27).

Darüber hinaus lässt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der rBiFC-Analyse im Licht und Dunkeln feststellen (s. Abbildung 27).

Dies deutet ggf. darauf hin, dass eine Interaktion von NPH3 und 14-3-3 Licht-abhängig auftritt.

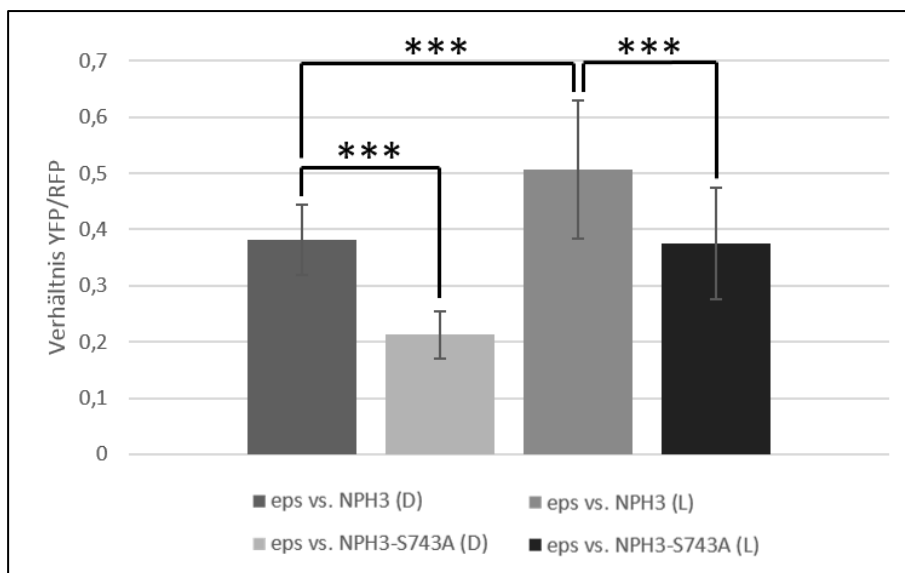


Abbildung 27 Analyse der ratiometrischen bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation von NPH3/NPH3-S743A und 14-3-3 Isoform epsilon in Tabak-Blättern. Für die Interaktions-Studien via rBiFC wurden Tabak-Blätter mittels *A. tumefaciens*-vermitteltem Gentransfer mit dem 2in1-Konstrukt 35S::cYFP:NPH3/NPH3-S743A, 35S::mRFP, 35S::epsilon:nYFP transformiert, die Proteine transient exprimiert und die Signale 48 h nach der Transformation mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert (s. Abbildung 26). Die Pflanzen wurden nach der Infiltration/ vor der Detektion im Dunkeln belassen (D) bzw. für 24 h konstant belichtet (L). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus den Ergebnissen von 2 unabhängig wiederholten Versuchen (in Summe: A (eps vs. NPH3 (D)) n = 62, B (eps vs. NPH3-S743A (D)) n = 56, C (eps vs. NPH3 (L)) n = 87, D (eps vs. NPH3-S743A (L)) n = 53). Die statistische Signifikanz wurde mithilfe des „student's t-test“ ermittelt; *** p < 0,005. Irrtumswahrscheinlichkeiten (p-Werte): eps vs. NPH3 (D) gg. eps vs. NPH3-S743A (D) – 4,30E-33, eps vs. NPH3 (D) gg. eps vs. NPH3 (L) – 2,26E-13, eps vs. NPH3 (L) gg. eps vs. NPH3-S743A (L) – 1,14E-10.

3.4 Untersuchungen zur physiologischen Relevanz der 14-3-3/NPH3-Interaktion

3.4.1 Identifizierung und Analyse einer *nph3*-„loss-of-function“-Mutante

Für Untersuchungen und Experimente bzgl. der physiologischen Relevanz der 14-3-3/NPH3-Interaktion *in planta*, wurden Pflanzen einer GABI-Kat T-DNA-Insertions-Linien von NPH3 (GK-275E03-015095, *nph3-8* (Kleinboelting et al., 2012)) analysiert. Die Insertionsstelle der T-DNA wurde mittels Sequenzierung durch GABI-Kat im Col-0-Genom bestimmt, annotiert und befindet sich am Anfang von Exon 4 des NPH3-Gens.

Die erhaltenen Samen der Linie wurden ausgesät, die Keimlinge auf das Vorhandensein der T-DNA-Insertion überprüft, heterozygote Pflanzen bis zum Stadium der Homozygotie propagiert und ihr „knockout“- bzw. „loss-of-function“-Status analysiert. Die Analyse der Linie wurde auf gDNA- und cDNA-Ebene mithilfe von geeigneten Genotypisierungs-Primer durchgeführt.

Die schematische Darstellung des NPH3-Genlokus mit der Annotation der T-DNA-Insertion und der zur Genotypisierung benutzten Primer ist in Abbildung 28 dargestellt.

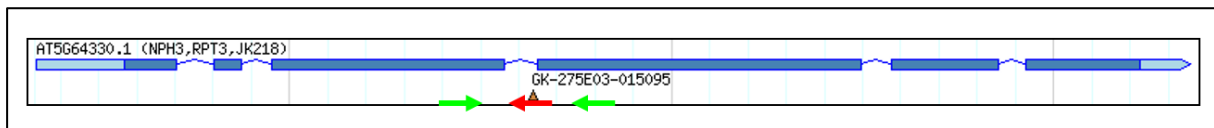


Abbildung 28 Schematische Darstellung des NPH3-Genlokus mit T-DNA-Insertionsstelle und Lage der Genotypisierungs-Primer. hellblaue Boxen: 5'/3'-UTRs, dunkelblaue Boxen: Exons 1-6, dunkelblaue Linien: Introns 1-5, roter Pfeil: T-DNA-spezifischer Primer, grüne Pfeile: Wildtyp/Komplementations-spezifische Primer (verändert nach TAIR).

Die mit T-DNA-spezifischen Primer via PCR auf gDNA-Ebene amplifizierten Produkte bestätigten das Vorhandensein der Insertion in der GABI-Kat-Linie (s. Abbildung 29 A, *nph3-8* #1/#2), die Wildtyp-spezifische Primer-Kombination ergab keine Signale (s. Abbildung 29 B); die Linie war somit homozygot. Auf Ebene der cDNA konnte kein Wildtyp-spezifisches Amplifikat nachgewiesen werden (s. Abbildung 30 A); es handelt sich also um eine „knockout“- bzw. „loss-of-function“-Mutante.

Die Linie wurde für Komplementations- bzw. Transformations-Zwecke (s. Kapitel 3.4.2) und für die Verwendung in weiteren physiologischen Untersuchungen und Experimenten eingesetzt (s. Kapitel 3.4.3, s. Kapitel 3.4.4).

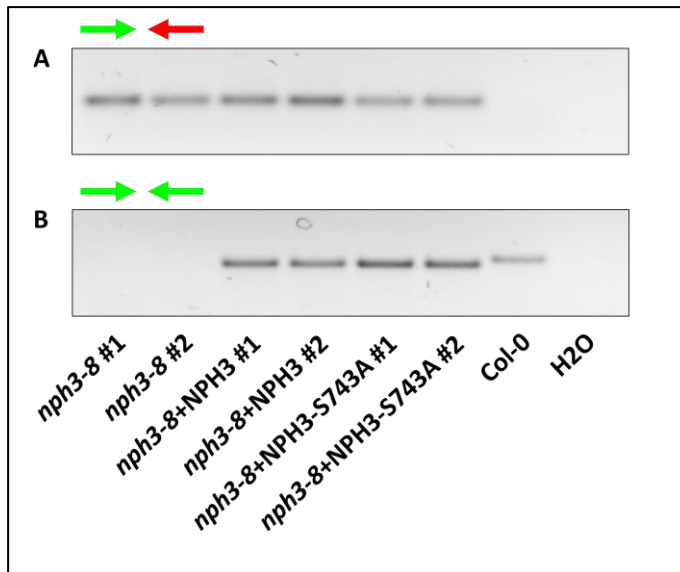


Abbildung 29 Genotypisierung der NPH3 GABI-Kat T-DNA-Insertions-Linie und entsprechenden Komplementations- bzw. Transformations-Linien auf genomischer Ebene. *nph3-8* – T-DNA-Insertions-Linie (GK-275E03-015095), *nph3-8+NPH3* – Komplementations-Linie, *nph3-8+NPH3-S743A* – Transformations-Linie, *Col-0* – Wildtyp. Die PCRs wurden auf gDNA der Linien durchgeführt. (A) Das mit einer T-DNA-spezifischen Primer-Kombination amplifizierte PCR-Produkt hatte eine Größe von ca. 750 bis 800 bp. (B) Das mit einer Wildtyp/Komplementations-spezifischen Primer-Kombination amplifizierte PCR-Produkt hatte eine Größe von 807 bp (*nph3-8+NPH3*/*NPH3-S743A*) bzw. 893 bp (*Col-0*, Intron-spezifische Verlängerung des PCR-Produkts).

3.4.2 Transformation der *nph3*-„loss-of-function“-Mutante

Die für die weiteren Experimente ausgewählte *nph3*-„loss-of-function“-Mutante (s. Kapitel 3.4.1) wurde mit zwei verschiedenen Konstrukten, die für die Wildtyp-spezifische Sequenz (p35S::CDS NPH3) und für die im 14-3-3 Bindemotiv mutierte Protein-Sequenz codieren (p35S::CDS NPH3-S743A, keine 14-3-3 Interaktion mehr möglich, s. Kapitel 3.2.3, s. Abbildung 11), stabil transformiert. Die Pflanzen wurden selektioniert und bis zum homozygoten Status in der T₄-Generation propagiert. Zur Genotypisierung der Linien auf gDNA- bzw. cDNA-Ebene wurden ebenfalls T-DNA- und Wildtyp-spezifische Primer-Kombinationen eingesetzt (s. Abbildung 28).

Die Komplementations- bzw. Transformations-Linien beinhalteten sowohl die T-DNA-Insertion (s. Abbildung 29 A, *nph3-8+NPH3* #1/#2, *nph3-8+NPH3-S743A* #1/#2) als auch die neu eingebrachten Komplementations- bzw. Transformations-Konstrukte (s. Abbildung 29 B). Auf cDNA-Ebene konnten die entsprechenden Transkripte via semiquantitativer RT-PCR ebenfalls nachgewiesen werden (s. Abbildung 30 A).

Diese Linien wurden ebenfalls in physiologischen Untersuchungen und Experimenten (s. Kapitel 3.4.3, s. Kapitel 3.4.4) eingesetzt und analysiert.

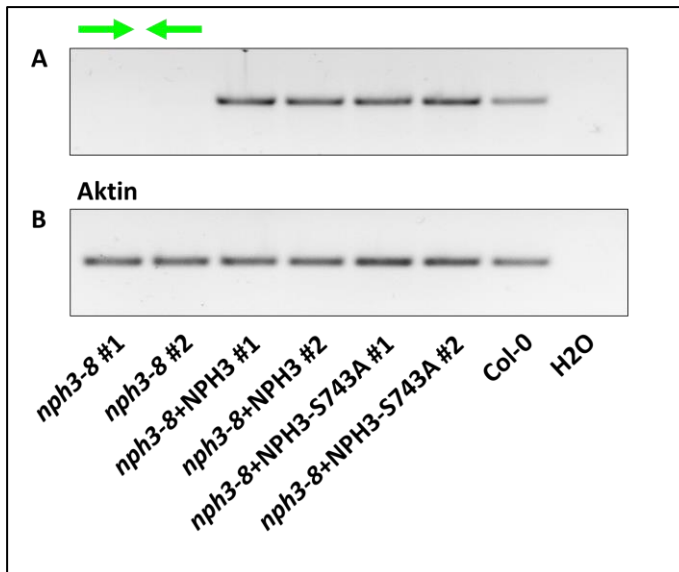


Abbildung 30 Semiquantitative RT-PCR der NPH3 GABI-Kat T-DNA-Insertions-Linie und deren Komplementations- bzw. Transformations-Linien. *nph3-8* – T-DNA-Insertions-Linie (GK-275E03-015095), *nph3-8+NPH3* – Komplementations-Linie, *nph3-8+NPH3-S743A* – Transformations-Linie, *Col-0* – Wildtyp. Die semiquantitativen RT-PCRs wurden auf cDNA der Linien durchgeführt. (A) Das mit einer Wildtyp/Komplementations-spezifischen Primer-Kombination amplifizierte RT-PCR-Produkt hatte eine Größe von 807 bp. (B) Das mit einer Aktin-2-spezifischen Primer-Kombination amplifizierte RT-PCR-Produkt hatte eine Größe von 388 bp (Expressions-Kontrolle).

3.4.3 Analyse der phototropen Reaktion

Die phototrope Reaktion einer Pflanze auf einen Licht-Stimulus stellt ein koordiniertes Zusammenspiel einer primären Inhibition des Hypokotyl-Wachstums (Parks et al., 2001) und einer anschließenden Initiierung des Streckungs-Wachstums auf der beschatteten Seite des Hypokotyls dar (Demarsy et al., 2012). Licht-Qualität und -Intensität werden von verschiedenen Photorezeptoren der Pflanzenzellen perzipiert, die Signale auf unterschiedlichen zellulären Ebenen integriert und entsprechende Antworten auf Zell- und Gewebe-Ebene initiiert, was wiederum zu einer gezielten phototropen Reaktion der Pflanze führt (Whippo and Hangarter, 2003).

Wie aus diversen grundlegenden Veröffentlichungen im Bereich des Phototropismus bekannt, reagieren etiolierte *nph3*-„knockout“-Keimlinge nicht mehr auf unilaterales BL diverser Intensitäten (Khurana and Poff, 1989; Khurana et al., 1989; Liscum and Briggs, 1995, 1996; Motchoulski and Liscum, 1999; Kansup et al., 2014).

Um die diesbezüglichen physiologischen Auswirkungen der 14-3-3/NPH3-Interaktion *in planta* zu untersuchen, wurden verschiedene NPH3-Versionen (Wildtyp-Form (NPH3), mutierte, nicht mehr mit 14-3-3 Proteinen interagierende Form (NPH3-S743A), s. Kapitel 3.2.3) in den *nph3*-„knockout“- bzw. „loss-of-function“-Hintergrund eingebracht (s. Kapitel 3.4.2).

Keimlinge der unterschiedlichen Linien (Col-0: *Arabidopsis thaliana* var. Columbia-0 - Wildtyp, *nph3-8*: T-DNA-Insertions-Linie für NPH3, *nph3-8+NPH3*: Komplementations-Linie, *nph3-8+NPH3-S743A*: Transformations-Linie) wurden für 88 h im Dunkeln angezogen und anschließend für 8 h mit unilateralem BL der Intensität $1 \mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bestrahlt.

In Abbildung 31 sind die Keimlinge der verschiedenen Linien nach entsprechender Behandlung aus einem 90° -Winkel zur ursprünglichen BL-Quelle abgebildet. Die wildtypischen Keimlinge (Col-0) wiesen eine starke phototrope Reaktion auf, d.h. ihre Hypokotyle krümmten sich in Richtung der BL-Quelle. Die Keimlinge der T-DNA-Insertions-Linie (*nph3-8*) reagierten nicht mehr positiv phototrop („NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTYL 3“); die entsprechenden Hypokotyle wuchsen relativ chaotisch in alle Richtungen. Die phototrope Reaktions-Fähigkeit der „loss-of-function“-Mutante konnte durch Überexpression der Wildtyp-cDNA von NPH3 vollständig regeneriert werden (*nph3-8+NPH3*). Im Gegensatz dazu konnte die Expression der mutierten NPH3-Version den Phänotyp nur partiell komplementieren (*nph3-8+NPH3-S743A*).

Dies deutet darauf hin, dass die Interaktion von 14-3-3 Proteinen mit NPH3 physiologisch von Bedeutung ist.

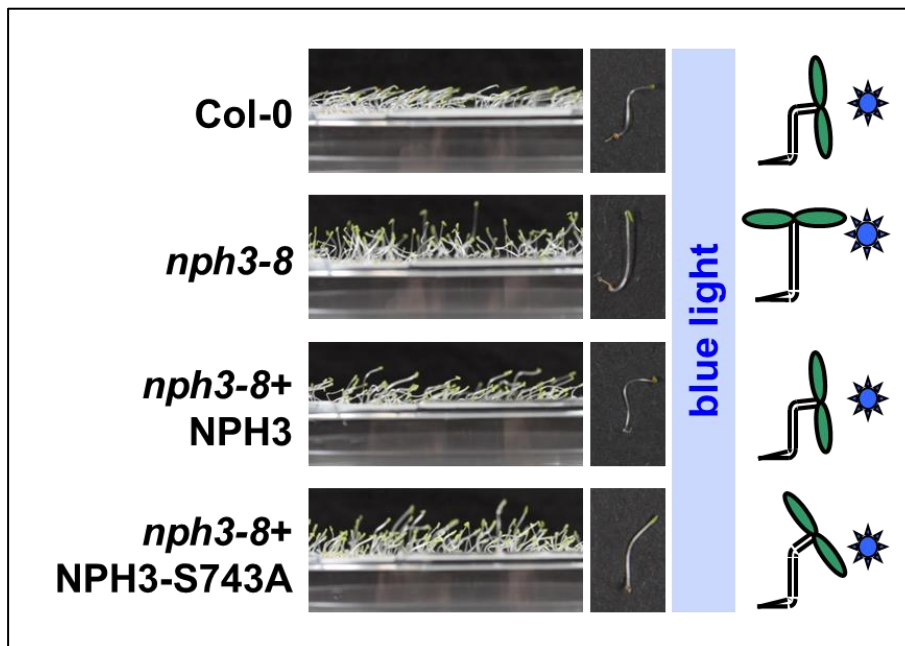


Abbildung 31 Qualitative Darstellung der phototropen Reaktion der verschiedenen Pflanzen-Linien. Keimlinge der unterschiedlichen Linien wurden für 88 h etiiert angezogen und anschließend für 8 h mit unilateralem BL ($1 \mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bestrahlt. Die Aufnahmen der Pflanzen-Linien/Keimlinge wurden in einem Winkel von 90° zur ursprünglich eingestrahlten BL-Quelle gemacht. Col-0 – Wildtyp, *nph3-8* – T-DNA-Insertions-Linie, *nph3-8+NPH3* – Komplementations-Linie, *nph3-8+NPH3-S743A* – Transformations-Linie, s. Abbildung 29, s. Abbildung 30.

Die quantitative Analyse hinsichtlich der phototropen Reaktion der unterschiedlichen Linien wurde über die Bestimmung des sogenannten Hypokotyl-Winkels (s. Abbildung 32) und der Hypokotyl-Länge (s. Abbildung 33) der Keimlinge durchgeführt.

Der Hypokotyl-Winkel wird von den vertikalen und den abgeknickten Abschnitten der Hypokotyle der zu vermessenden Keimlinge eingeschlossen (s. Abbildung 32, Schema rechte obere Ecke)

In Abbildung 32 sind die Mittelwerte aus der Analyse der Daten der verschiedenen Linien dargestellt. Für die T-DNA-Insertions-Linie von NPH3 (*nph3-8*) wurde ein mittlerer Hypokotyl-Winkel von 181° bestimmt. Die Transformations-Linie mit mutiertem 14-3-3 Bindemotiv (*nph3-8+NPH3-S743A*) hatte einen intermediären Wert von 146°. Col-0 sowie die Komplementations-Linie (*nph3-8+NPH3*) wiesen in der Analyse einen fast identischen Winkel von 103° auf.

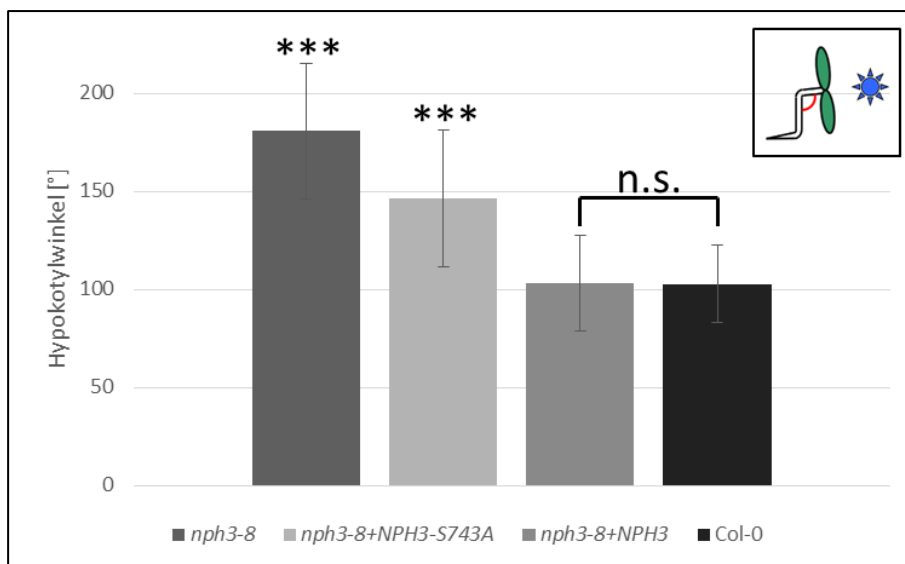


Abbildung 32 Quantitative Analyse der phototropen Reaktion der verschiedenen Pflanzen-Linien anhand der Messung ihres Hypokotyl-Winkels. Keimlinge der unterschiedlichen Linien wurden für 88 h etiiert angezogen, 8 h mit unilateralem BL ($1 \mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bestrahlt, auf einen geeigneten Hintergrund überführt, fotografisch dokumentiert und der entsprechende Hypokotyl-Winkel digital analysiert. Col-0 – Wildtyp, *nph3-8* – T-DNA-Insertions-Linie, *nph3-8+NPH3* – Komplementations-Linie, *nph3-8+NPH3-S743A* – Transformations-Linie, s. Abbildung 29, s. Abbildung 30. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus den Ergebnissen von 3 unabhängig wiederholten Versuchen (jeweils $n = 35$ /Linie). Die statistische Signifikanz wurde mithilfe des „student's t-test“ ermittelt; *** $p < 0,005$, n.s. nicht signifikant unterschiedlich. Irrtumswahrscheinlichkeiten (p -Werte): *nph3-8/nph3-8+NPH3-S743A* – $5,26\text{E-}12$, *nph3-8/nph3-8+NPH3* – $1,16\text{E-}47$, *nph3-8/Col-0* – $6,72\text{E-}50$, *nph3-8+NPH3-S743A/nph3-8+NPH3* – $4,08\text{E-}21$, *nph3-8+NPH3-S743A/Col-0* – $1,19\text{E-}22$, *nph3-8+NPH3/Col-0* – $0,85$.

Wie in der qualitativen Analyse der phototropen Reaktion der unterschiedlichen Linien schon ersichtlich wurde (s. Abbildung 31), hatte die Transformations-Linie mit der veränderten NPH3-Version (*nph3-8+NPH3-S743A*, keine 14-3-3 Interaktion mehr möglich) einen entscheidenden Defekt bezüglich des Phototropismus. Die Keimlinge konnten das unilateral eingestrahlte BL detektieren,

reagierten darauf, eine vollständige phototrope Antwort konnte allerdings nicht mehr bewerkstelligt werden.

Es ist bekannt, dass der phototropen Krümmung eine PHOT1-abhängige schnelle Inhibierung des Hypokotyl-Wachstums vorausgeht (Folta and Spalding, 2001; Parks et al., 2001). Um die Auswirkungen des Assoziations-Vermögens von 14-3-3 an NPH3 bzgl. diesen Effekts zu untersuchen, wurden die Keimlinge der unterschiedlichen Linien nach Abschluss der phototropen Reaktion ebenfalls auf ihre Hypokotyl-Länge untersucht.

In Abbildung 33 sind die Mittelwerte aus der Analyse der Daten der verschiedenen Linien dargestellt. Die *nph3*-„loss-of-function“-Mutante (*nph3-8*) wies die längsten Hypokotyle auf, ihre Länge betrug im Mittel 14,7 mm. Col-0-Keimlinge und Keimlinge der Komplementations-Linie (*nph3-8+NPH3*) hatten in etwa die gleiche Hypokotyl-Länge, ihre Länge betrug 11,9 mm. Äquivalent zu der quantitativen Auswertung des Hypokotyl-Winkels der unterschiedlichen Linien (s. Abbildung 32), hatte die Transformations-Linie (*nph3-8+NPH3-S743A*) einen intermediären Wert von 13,1 mm.

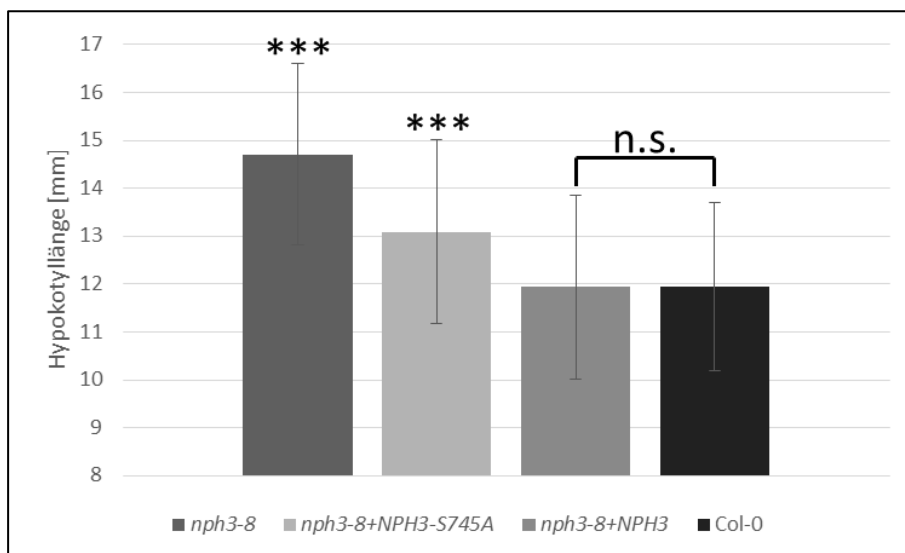


Abbildung 33 Quantitative Analyse der Hypokotyl-Länge der verschiedenen Pflanzen-Linien nach BL-Bestrahlung. Keimlinge der unterschiedlichen Linien wurden für 88 h etioliert angezogen, 8 h mit unilateralem BL ($1 \mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bestrahlt, auf einen geeigneten Hintergrund überführt, fotografisch dokumentiert und die entsprechenden Hypokotyl-Längen digital analysiert. Col-0 – Wildtyp, *nph3-8* – T-DNA-Insertions-Linie, *nph3-8+NPH3* – Komplementations-Linie, *nph3-8+NPH3-S743A* – Transformations-Linie, s. Abbildung 31, s. Abbildung 32. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus den Ergebnissen von 3 unabhängig wiederholten Versuchen (jeweils $n = 20$ /Linie). Die statistische Signifikanz wurde mithilfe des „student's t-test“ ermittelt; *** $p < 0,005$, n.s. nicht signifikant unterschiedlich. Irrtumswahrscheinlichkeiten (p -Werte): *nph3-8/nph3-8+NPH3-S743A* – $1,46\text{E-}05$, *nph3-8/nph3-8+NPH3* – $3,69\text{E-}12$, *nph3-8/Col-0* – $3,06\text{E-}12$, *nph3-8+NPH3-S743A/nph3-8+NPH3* – $1,58\text{E-}03$, *nph3-8+NPH3-S743A/Col-0* – $1,51\text{E-}03$, *nph3-8+NPH3/Col-0* – $0,98$.

Wie auch im Falle der qualitativen und quantitativen Analyse der phototropen Reaktion festgestellt, hatte die nicht mehr mögliche Interaktion des mutierten NPH3-Proteins (NPH3-S743A) mit 14-3-3 eine Auswirkung auf die Hypokotyl-Länge der Keimlinge, die Inhibierung des Hypokotyl-Wachstums war fehlreguliert.

3.4.4 Analyse des Blatt-Krümmungs-Index

Für die optimale Ausrichtung und Positionierung von Blättern in Richtung des eintreffenden photosynthetisch aktiven Lichts wurde in *Arabidopsis* eine Beteiligung der beiden BL-Rezeptoren PHOT1 und PHOT2 sowie von „Downstream“-Elementen in ihrer Signaltransduktion (NPH3, RPT2) nachgewiesen (Sakai et al., 2000; Inoue et al., 2008; Harada et al., 2013). Nicht nur die korrekte Positionierung der Petiolen und Blätter, sondern auch die Spreitung der Blätter, die sogenannte Blatt-Krümmung, war in Mutanten der beteiligten Proteine verändert; die Blatt-Ränder rollten sich in Richtung Blatt-Unterseite ein, d.h. die effektiv an der Photosynthese beteiligte Blatt-Fläche war vermindert (Sakamoto and Briggs, 2002; de Carbonnel et al., 2010).

Da auch NPH3 in der Signal-Weiterleitung, die zur Spreitung der Blätter führt, involviert ist, wurde der Blatt-Krümmungs-Index der unterschiedlichen Linien bestimmt. Hierfür wurde das 5. Blatt von Pflanzen, die unter Langtag-Bedingungen im Gewächshaus bis zum Wachstums-Stadium 1.11 (Col-0) angezogen wurden, geerntet, die Blatt-Fläche vor und nach der Präparation bestimmt und daraus das Verhältnis, der sogenannten Blatt-Krümmungs-Index (BKI = Blatt-Fläche vor Präparation/Blatt-Fläche nach Präparation), berechnet.

Die „loss-of-function“-Mutante (*nph3-8*) und die Transformations-Linie (*nph3-8+NPH3-S743A*) hatten einen BKI von 0,82; die Komplementations- (*nph3-8+NPH3*) und die Wildtyp-Linie (Col-0) wiesen einen BKI-Wert von jeweils 0,91 auf (s. Abbildung 34 A).

Zur Veranschaulichung des Effekts bzgl. der Blatt-Spreitung ist in Abbildung 34 B das jeweils 5. Blatt (Blick auf die Unterseite) von Pflanzen der unterschiedlichen Linien gezeigt.

Die Krümmung der Blatt-Ränder in Richtung Blatt-Unterseite ist bei der „loss-of-function“-Mutante (*nph3-8*) und der Transformations-Linie (*nph3-8+NPH3-S743A*) deutlich ersichtlich; die Spreitung der Blatt-Fläche ist im Vergleich zu der Komplementations- (*nph3-8+NPH3*) bzw. Wildtyp-Linie (Col-0) beeinträchtigt, es steht weniger Blatt-Fläche zur adäquaten Photosynthese-Leistung zur Verfügung.

Die Transformation der *nph3*-„loss-of-function“-Mutante mit einer nicht mehr zur 14-3-3 Interaktion befähigten Variante von NPH3, konnte den Defekt bzgl. der Spreitung der Blätter nicht komplementieren. Die 14-3-3/NPH3-Interaktion ist auch im Hinblick auf die NPH3-vermittelte Blatt-Krümmung physiologisch von Bedeutung.

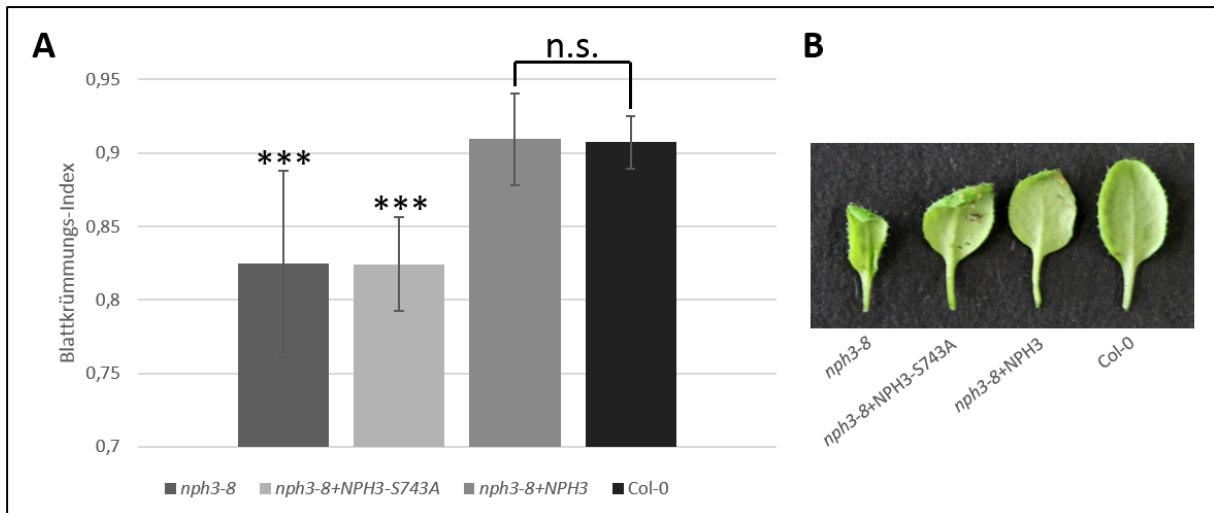


Abbildung 34 Quantitative Analyse des Blatt-Krümmungs-Index der unterschiedlichen Pflanzen-Linien. Pflanzen der unterschiedlichen Linien wurden unter Langtag-Bedingungen (L/D: 16 h/8 h, Licht-Intensität: ca. $125 \mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (PAR), 20 bis 25 °C) bis zum Wachstums-Stadium 1.11 (Col-0) angezogen, das jeweils 5. Rosettenblatt (B, Aufsicht auf die Blatt-Unterseite) geerntet, die Blatt-Fläche vor und nach der Präparation bestimmt und daraus das Verhältnis, den sogenannten Blatt-Krümmungs-Index (BKI = Blatt-Fläche vor Präparation/Blatt-Fläche nach Präparation) berechnet. nph3-8 – T-DNA-Insertions-Linie, nph3-8+NPH3-S743A – Transformations-Linie, nph3-8+NPH3 – Komplementations-Linie, Col-0 – Wildtyp, s. Abbildung 31, s. Abbildung 32. Die Daten (A) repräsentieren die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus den Ergebnissen von 3 unabhängig wiederholten Versuchen (jeweils $n = 20$ /Linie). Die statistische Signifikanz wurde mithilfe des „student’s t-test“ ermittelt; *** $p < 0,005$, n.s. nicht signifikant unterschiedlich. Irrtumswahrscheinlichkeiten (p -Werte): nph3-8/nph3-8+NPH3-S743A – 0,99, nph3-8/nph3-8+NPH3 – $3,99\text{E-}06$, nph3-8/Col-0 – $1,72\text{E-}06$, nph3-8+NPH3-S743A/nph3-8+NPH3 – $2,44\text{E-}10$, nph3-8+NPH3-S743A/Col-0 – $2,10\text{E-}12$, nph3-8+NPH3/Col-0 – 0,81.

3.5 Mikroskopische Untersuchungen bzgl. Stimulus-abhängigen Veränderungen in der subzellulären Lokalisation von NPH3-Familien-Proteinen in stabil-transformierten *A. thaliana*-Keimlingen

3.5.1 Stimulus-abhängige subzelluläre Lokalisation in stabil-transformierten *A. thaliana*-Keimlingen

Für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation der unterschiedlichen Versionen des NPH3-Proteins *in planta*, wurden *A. thaliana* var. Col-0-Wildtyp-Pflanzen mittels *A. tumefaciens*-vermitteltem Gentransfer stabil mit diversen NPH3:mGFP4-Fusions-Konstrukten transformiert. Die positiv auf die Insertion selektionierten Pflanzen wurden bis in die T₄-Generation propagiert und waren somit für das eingebrachte Allel homozygot.

3.5.1.1 Licht-abhängige Veränderung der subzellulären Lokalisation

Um die subzelluläre Lokalisation von NPH3 in *Arabidopsis*-Wildtyp-Pflanzen (Col-0) zu analysieren, wurden homozygote Keimlinge, die mit dem 35S::NPH3:mGFP4-Konstrukt stabil transformiert wurden, für 96 h etiiert angezogen und die Signale mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) in unterschiedlichen Pflanzenteilen/-Geweben detektiert.

Das überexprimierte NPH3-Protein lokalisierte unmittelbar nach Präparation der Keimlinge in oder entlang der PM von Zellen in der Elongations- (s. Abbildung 35 **A**) bzw. der Differenzierungszone der Hypokotyle (**B**) sowie im Wurzel-Gewebe der Pflanzen (**C**). Dies bestätigte unsere Ergebnisse aus dem Protoplasen- (s. Kapitel 3.3.1.1) bzw. Tabak-System (s. Kapitel 3.3.1.2) und die soweit in der Literatur bekannten Daten bezüglich des PM-assoziierten Auftretens von NPH3 in Pflanzen- bzw. *Arabidopsis*-Zellen (Motchoulski and Liscum, 1999; Lariguet et al., 2006; Inoue et al., 2008).

Interessanterweise änderte sich die Lokalisation von NPH3:mGFP4 durch kontinuierliche Licht-Einstrahlung (Durchlicht bzw. Anregung des mGFP4 durch den Laser (488 nm) am Mikroskop). Das ursprünglich Membran-ständige NPH3-Protein (s. Abbildung 35 **A**, **B** und **C**) dissoziierte in den unterschiedlichen Keimlings-Bereichen durch die Irradiation mit Licht (10 min) von der Membran bzw. bildete zytoplasmatische globuläre Strukturen/Kompartimente aus (s. Abbildung 35 **D**, **E** und **F**).

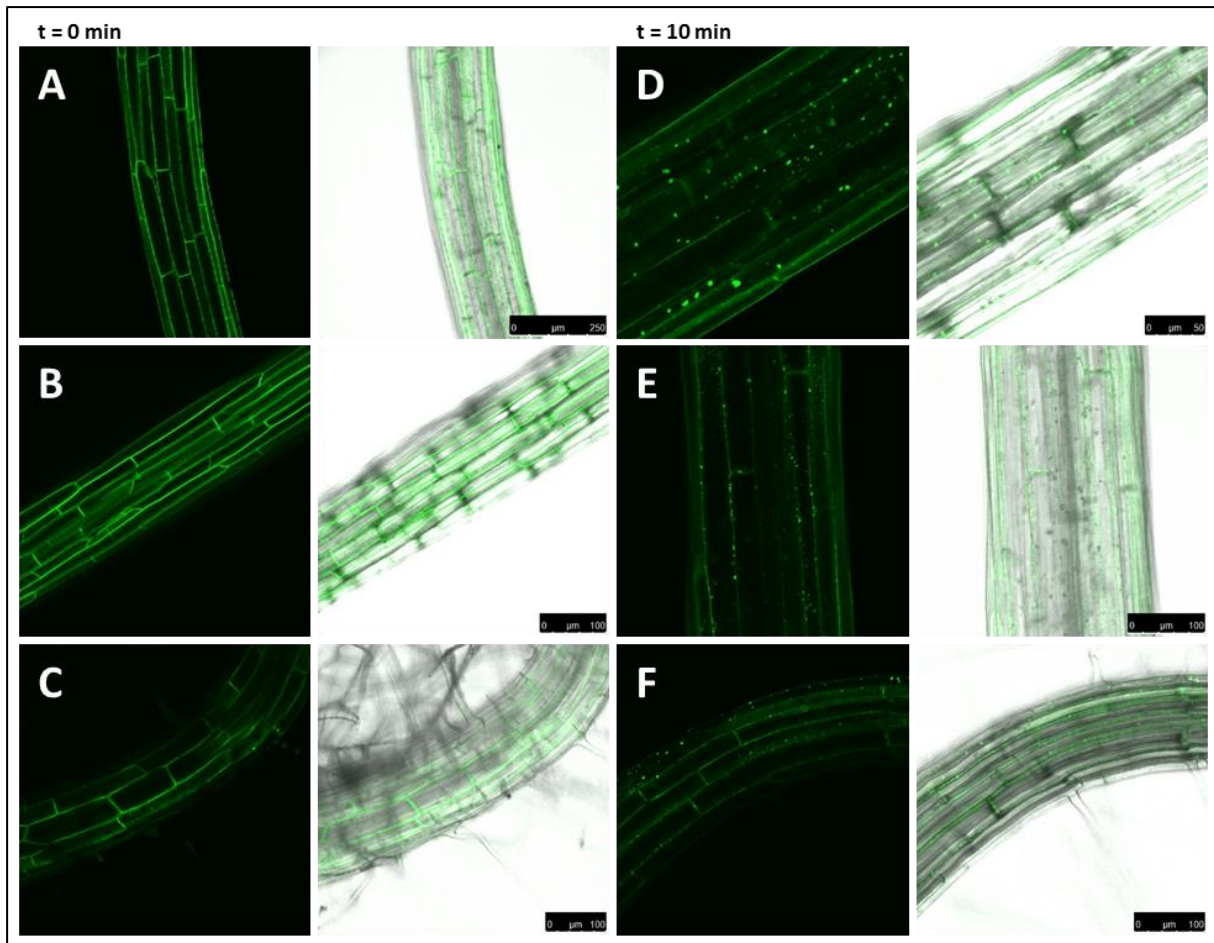


Abbildung 35 Subzelluläre Lokalisation von NPH3 in stabil-transformierten Arabidopsis Col-0-Keimlingen zum Zeitpunkt $t = 0$ min bzw. $t = 10$ min. Keimlinge, die stabil mit dem 35S::NPH3:mGFP4-Konstrukt transformiert wurden, wurden für 96 h im Dunkeln angezogen und die Signale mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert. **A, D** Elongationszone, **B, E** Differenzierungszone des mittleren Hypokotyl-Bereichs, **C, F** Wurzel-Gewebe. Die Keimlinge wurden unmittelbar nach der Präparation (**A, B, C** $t = 0$ min) bzw. nach zehnminütiger kontinuierlicher Durchlicht- bzw. Laser-Bestrahlung (**D, E, F** $t = 10$ min) mikroskopiert. Die Aufnahmen zeigen jeweils das Fluoreszenzsignal und die Überlagerung mit dem Durchlichtbild.

Abbildung 36 (**A** bis **D**) zeigt eine Abfolge von Zeitraffer-Aufnahmen von Hypokotylen (Elongationszone), in denen NPH3:mGFP4 überexprimiert wurde. Zu Beginn des Experiments lokalisierte NPH3 ausschließlich entlang der PM der Zellen (**A** $t = 0$ min), mit fortschreitender Zeitdauer bildeten sich vermehrt punktförmige bzw. globuläre Strukturen im Zytoplasma aus (**B** $t = 3:20$ min, **C** $t = 6:40$ min). Am Ende des Versuchs war nur noch ein Bruchteil des Proteins an der Membran zu detektieren, der weitaus größere Anteil befand sich in globulären Strukturen im Zytoplasma der Zellen (**D** $t = 10$ min). Die fortschreitende Dissoziation des Fusions-Proteins von der PM sowie die Ausbildung von globulären Strukturen/Kompartimenten über die Zeit sind deutlich zu ersehen (s. „time-lapse“-Visualisierung/Video-File auf der beigefügten CD).

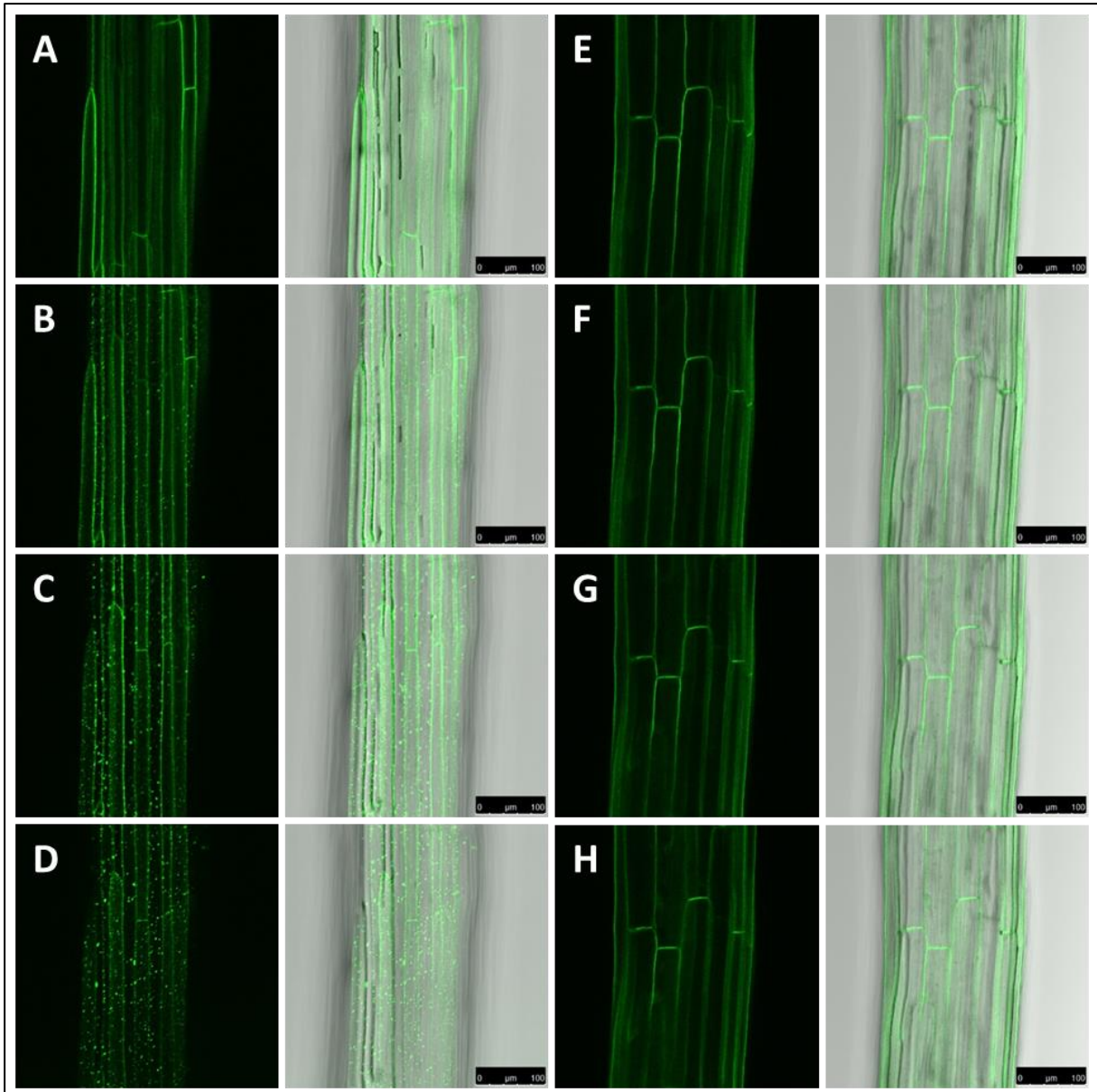


Abbildung 36 Subzelluläre Lokalisation von NPH3 bzw. NPH3-S743A in stabil-transformierten Arabidopsis Col-0-Keimlingen zum Zeitpunkt $t = 0$ min bis $t = 10$ min. Keimlinge, die stabil mit dem 35S::NPH3:mGFP4- bzw. mit dem 35S::NPH3-S743A:mGFP-Konstrukt transformiert wurden, wurden für 96 h im Dunkeln angezogen und die Signale mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert. Elongationszone des mittleren Hypokotyl-Bereichs. Die Keimlinge wurden unmittelbar nach der Präparation (A, E), nach 3:20-minütiger (B, F), nach 6:40-minütiger (C, G) und nach zehnmütiger (D, H) kontinuierlicher Durchlicht- bzw. Laser-Bestrahlung mikroskopiert. Die Aufnahmen zeigen jeweils das Fluoreszenzsignal und die Überlagerung mit dem Durchlichtbild.

Das in einer AS veränderte NPH3-S743A:mGFP4-Fusions-Protein wurde ebenfalls auf seine subzelluläre Lokalisation in *Arabidopsis* Col-0-Pflanzen hin untersucht. Das nicht mehr zur 14-3-3 Interaktion befähigte Protein lokalisierte in gleicher Weise wie das Wildtyp-Protein, es trat PM-assoziiert in Zellen der Elongationszone (s. Abbildung 37 A) sowie in den anderen Pflanzen-Geweben/Organen der etioliert angezogenen Keimlingen auf (nicht gezeigt). Erstaunlicherweise

verblieb das mutierte Protein, im Gegensatz zum Wildtyp-Protein, auch nach längerfristiger ($t = 10$ min) Bestrahlung mit Weiß- bzw. BL (Anregung durch den Laser) an der PM, dissoziierte nicht und bildete auch keine zytoplasmatischen globulären Strukturen/Kompartimente aus (s. Abbildung 37 **B**). Abbildung 36 (**E bis H**) zeigt eine Abfolge von Zeitraffer-Aufnahmen von Hypokotylen (Elongationszone), in denen NPH3-S743A:mGFP4 überexprimiert wurde. Die Membran-ständige Lokalisation änderte sich, wie schon beschrieben, über die Zeit hinweg nicht (**A** $t = 0$ min, **B** $t = 3:20$ min, **C** $t = 6:40$ min, **D** $t = 10$ min, s. „time-lapse“-Visualisierung/Video-File auf der beigefügten CD).

Das nicht mehr zur 14-3-3 Interaktion befähigte Protein ist in seiner Licht-abhängigen Relokalisation gestört, es treten drastische Effekte bezüglich der Dissoziation von der PM und der Bildung von zytoplasmatischen globulären Strukturen/Kompartimenten auf.

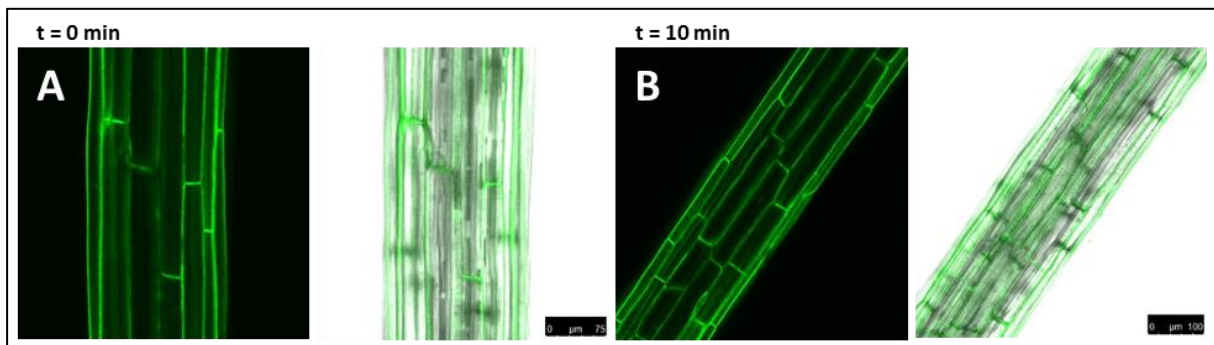


Abbildung 37 Subzelluläre Lokalisation von NPH3-S743A in stabil-transformierten *Arabidopsis Col-0*-Keimlingen zum Zeitpunkt $t = 0$ min bzw. $t = 10$ min. Keimlinge, die stabil mit dem 35S::NPH3-S743A:mGFP4-Konstrukt transformiert wurden, wurden für 96 h im Dunkeln angezogen und die Signale mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert. Elongationszone des mittleren Hypokotyl-Bereichs. Die Keimlinge wurden unmittelbar nach der Präparation (**A** $t = 0$ min) bzw. nach zehnminütiger kontinuierlicher Durchlicht- bzw. Laser-Bestrahlung (**B** $t = 10$ min) mikroskopiert. Die Aufnahmen zeigen jeweils das Fluoreszenzsignal und die Überlagerung mit dem Durchlichtbild.

Sowohl die subzelluläre Lokalisation von NPH3- Δ C51/N2:mGFP4 (s. Abbildung 38 **A**, Elongationszone des Hypokotyls) als auch die von NPH3- Δ N146:mGFP (s. Abbildung 38 **B**, Elongationszone des Hypokotyls) in stabil-transformierten etioliert angezogenen *Arabidopsis*-Keimlingen entsprach ihrer Lokalisation im Protoplasten-System (s. Kapitel 3.3.1.1, s. Abbildung 16, s. Abbildung 17). Beide Deletions-Proteine bildeten in Zellen aller Pflanzen-Geweben/Organen zytoplasmatische globuläre Strukturen/Kompartimente aus. Ein Licht-abhängiger Effekt auf die Lokalisation war nicht ersichtlich (s. Abbildung 38 **C** und **D**), auch nach längerer Bestrahlung mit Weißlicht bzw. BL (Durchlicht bzw. Anregung des mGFP4 durch den Laser (488 nm) am Mikroskop) trat keine Veränderung bzgl. der Lokalisation auf (s. Abbildung 63, s. Anhang).

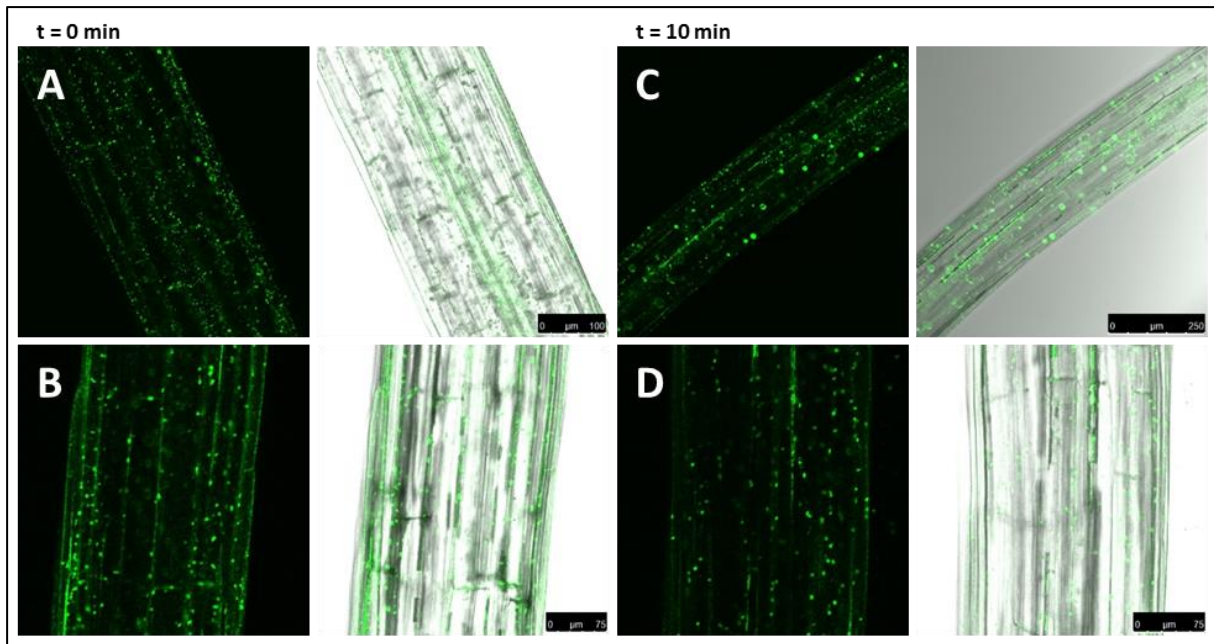


Abbildung 38 Subzelluläre Lokalisation von NPH3- Δ C51/N2 bzw. NPH3- Δ N146 in stabil-transformierten Arabidopsis Col-0-Keimlingen zum Zeitpunkt $t = 0$ min bzw. $t = 10$ min. Keimlinge, die stabil mit dem 35S::NPH3- Δ C51/N2:mGFP4 bzw. mit dem 35S::NPH3- Δ N146:mGFP4-Konstrukt transformiert wurden, wurden für 96 h im Dunkeln angezogen und die Signale mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert. Elongationszone des mittleren Hypokotyl-Bereichs. Die Keimlinge wurden unmittelbar nach der Präparation (A, B $t = 0$ min) bzw. nach zehnminütiger kontinuierlicher Durchlicht- bzw. Laser-Bestrahlung (C, D $t = 10$ min) mikroskopiert. Die Aufnahmen zeigen jeweils das Fluoreszenzsignal und die Überlagerung mit dem Durchlichtbild.

3.5.1.2 Cantharidin-abhängige Veränderung der subzellulären Lokalisation

Das natürlich in Ölkäfer vorkommende Monoterpen Cantharidin ist als Hemmstoff der Serin/Threonin-Phosphatasen Protein-Phosphatase 1 (PP1) und Protein-Phosphatase 2A (PP2A) bekannt (Li and Casida, 1992; Honkanen, 1993). Bei etiiert angezogenen *Arabidopsis*-Keimlingen inhibiert die Cantharidin-Applikation den PHOT1-vermittelten Phototropismus, verstärkt erstaunlicherweise aber den PHOT2-vermittelten Phototropismus (Pedmale and Liscum, 2007; Tseng and Briggs, 2010; Demarsy et al., 2012). Die Phosphatase-Aktivität hat somit eine antagonistische Rolle in der Signaltransduktion von PHOT1 bzw. PHOT2.

Um die Auswirkungen dieses Hemmstoffes auf den Phosphorylierungs-Status und evtl. auf die subzelluläre Lokalisation von NPH3 und dessen Varianten zu untersuchen, wurden stabil-transformierte etiierte Keimlinge der unterschiedlichen Linien in einer 50 μ M Cantharidin/MS- bzw. in einer Mock-Lösung inkubiert. Die Behandlung erfolgte für 1 h im Dunkeln, die Detektion der Signale wurde mittels CLSM durchgeführt.

Die mit der Mock-Substanz (Lösungsmittel, DMSO + MS) behandelten NPH3:mGFP4-Keimlinge zeigten die typische Lokalisation des Proteins entlang der PM der Zellen (s. Abbildung 39 A,

Elongationszone des Hypokotyls). Im Gegensatz dazu bewirkte die Inkubation der Keimlinge in der Cantharidin-Lösung eine Dissoziation von NPH3:mGFP4 unabhängig eines Licht-Stimulus (s. Abbildung 39 **B**). Das ursprünglich Membran-assoziierte Protein bildete durch die Anwendung des Phosphatase-Hemmstoffes zytoplasmatische globuläre Strukturen aus, dies allerdings schon vor der Licht-Behandlung.

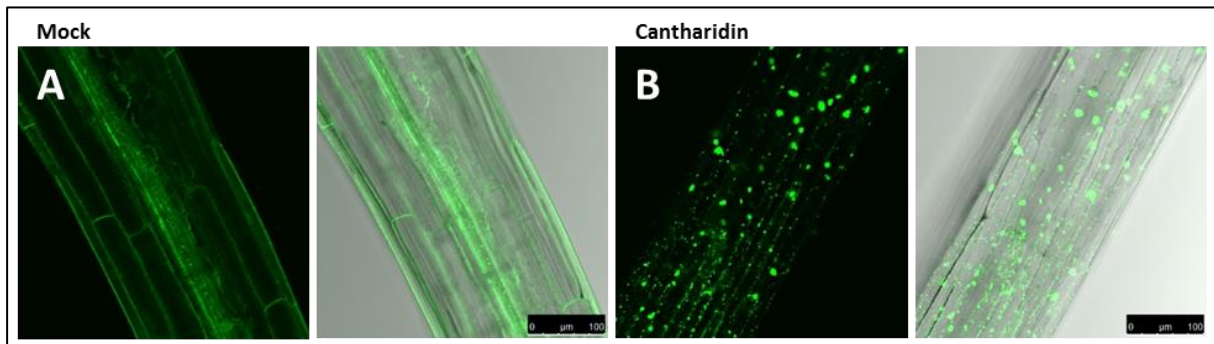


Abbildung 39 Subzelluläre Lokalisation von NPH3 in stabil-transformierten Arabidopsis Col-0-Keimlingen in Abhängigkeit des Phosphatase-Inhibitors Cantharidin. Keimlinge, die stabil mit dem 35S::NPH3:mGFP4-Konstrukt transformiert wurden, wurden für 96 h im Dunkeln angezogen, für 1 h in einer DMSO (Mock) bzw. in einer Cantharidin- (Phosphatase-Inhibitor [50 μ M])/MS-Lösung im Dunkeln inkubiert und die Signale mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert. Elongationszone des mittleren Hypokotyl-Bereichs. Die Keimlinge wurden unmittelbar nach der Mock- (A) bzw. Cantharidin-Inkubation (B) präpariert und mikroskopiert. Die Aufnahmen zeigen jeweils das Fluoreszenzsignal und die Überlagerung mit dem Durchlichtbild.

Die Arabidopsis-Keimlinge, die das mutierte NPH3-S743A:mGFP4-Protein exprimierten, verhielten sich nach Mock-Behandlung wie erwartet; das Protein lokalisierte entlang der PM (s. Abbildung 40 **A**). Die Cantharidin-Gabe bewirkte, vergleichbar zum Wildtyp-Protein, eine Relokalisation von NPH3-S743A:mGFP4 in zytosolische globuläre Strukturen/Kompartimente (s. Abbildung 40 **B**).

Die Ausbildung dieser Strukturen konnten beim Wildtyp-Protein entweder durch einen Licht-Stimulus, oder aber durch Cantharidin-Applikation induziert werden. Das in einer AS veränderte und nicht mehr zur 14-3-3 Interaktion befähigte NPH3-Protein war bezüglich des Licht-Stimulus insensitiv, bildete allerdings nach Cantharidin-Anwendung zytoplasmatische Kompartimente aus; dies scheint unabhängig von der 14-3-3 Assoziation zu sein.

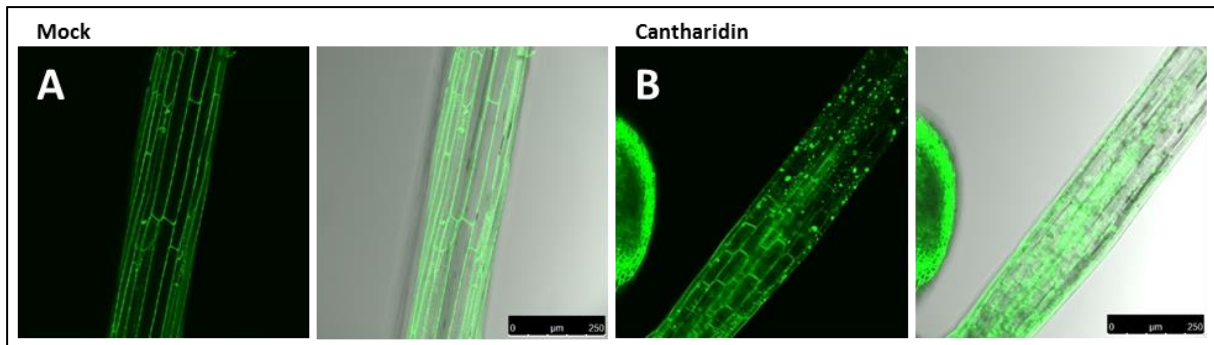


Abbildung 40 Subzelluläre Lokalisation von NPH3-S743A in stabil-transformierten *Arabidopsis* Col-0-Keimlingen in Abhängigkeit des Phosphatase-Inhibitors Cantharidin. Keimlinge, die stabil mit dem 35S::NPH3-S743A:mGFP4-Konstrukt transformiert wurden, wurden für 96 h im Dunkeln angezogen, für 1 h in einer DMSO (Mock) bzw. in einer Cantharidin- (Phosphatase-Inhibitor [50 µM])/ MS-Lösung im Dunkeln inkubiert und die Signale mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert. Elongationszone des mittleren Hypokotyl-Bereichs. Die Keimlinge wurden unmittelbar nach der Mock- (A) bzw. Cantharidin-Inkubation (B) präpariert und mikroskopiert. Die Aufnahmen zeigen jeweils das Fluoreszenzsignal und die Überlagerung mit dem Durchlichtbild.

Das NPH3- Δ C51/N2:mGFP4- und das NPH3- Δ N146:mGFP4-Protein lokalisierten in stabil-transformierten *Arabidopsis*-Keimlingen unabhängig von der Cantharidin-Gabe in zytosolischen globulären Strukturen/Kompartimenten (s. Abbildung 64, s. Anhang). Es waren keine Veränderungen zwischen unbehandelten und behandelten Keimlingen ersichtlich, die Cantharidin-Applikation hatte keinen Effekt auf die subzelluläre Lokalisation der Deletions-Proteine.

3.5.1.3 BFA-abhängige Veränderung der subzellulären Lokalisation

Zahlreiche PM-Proteine (u.a. „PIN-FORMED“-Proteine) werden kontinuierlich internalisiert und zur PM rezykliert. Dieser Prozess wird über intrazellulären Vesikel-Transport vermittelt. Die nach Belichtung und/oder Cantharidin-Behandlung beobachteten intrazellulären NPH3-Kompartimente könnten somit frühe Endosomen bzw. Teile des Trans-Golgi-Netzwerks (TGN) darstellen.

Brefeldin A (BFA) ist ein Pilztoxin, das zur Bildung sogenannter BFA-Kompartimente als Indikator für Endozytose- und Membran-Rezyklierungs-Prozesse führt (Robinson et al., 2008). In diesen BFA-Kompartimenten akkumulieren beispielsweise die PIN-Proteine (Geldner et al., 2003; Ding et al., 2011).

Mit Hilfe des Endozytose-Tracers FM[®] 4-64 (Fluoreszenz-Farbstoff), der ebenfalls in den BFA-Kompartimenten akkumuliert, lassen sich Kollokalisations-Studien bezüglich des Transports und „Traffickings“ von Proteinen in diesem Rezyklierungs-Weg durchführen.

Um den Verbleib des dissoziierten NPH3-Proteins von der PM in den zytosolischen globulären Strukturen näher zu untersuchen, wurden stabil-transformierte *Arabidopsis*-Keimlinge, die die unterschiedliche Versionen von NPH3:mGFP4 exprimierten, für 94 h etioliert angezogen, für weitere

2 h in einer BFA- [50 μ M]/FM[®] 4-64- [2 μ M] Lösung im Dunkeln inkubiert und die Signale anschließend via CLSM detektiert.

Alle vier untersuchten NPH3-Proteine (s. Abbildung 41) lokalisierten in Wurzel-Gewebe von *Arabidopsis*-Keimlingen nach BFA-Behandlung nicht in den beschriebenen BFA-Kompartimenten (deutliche FM[®] 4-64-Akkumulation ersichtlich), sondern verblieben im Falle des Wildtyp-Proteins (**A** NPH3:mGFP4) und der nicht mehr zur 14-3-3 Interaktion befähigten Mutante (**B** NPH3-S743A:mGFP4) an der PM bzw. lokalisierten im Falle der N- (**D** NPH3- Δ N146:mGFP4) und C-terminalen (**C** NPH3- Δ C51/N2:mGFP4) Deletions-Proteine in anderen zytosolischen Strukturen.

Die Behandlung der *Arabidopsis*-Keimlinge mit BFA hatte keinen Effekt auf die Lokalisation und die Rezyklierung von NPH3 und dessen Varianten. Die Ausbildung der globulären zytosolischen Strukturen unter Blau- oder Weißlicht-Bestrahlung wird über einen anderen endozytotischen Weg/Mechanismus als die Internalisierung und die Rezyklierung von PIN-Proteinen durchgeführt. Weiterführende Kollokalisations-Studien mit NPH3 und spezifischen Kompartiment-Markern bzw. Endozytose-Tracern könnten detailliertere Aufschlüsse über den Verbleib des Proteins im Zytosol oder anderen Zell-Bestandteilen liefern.

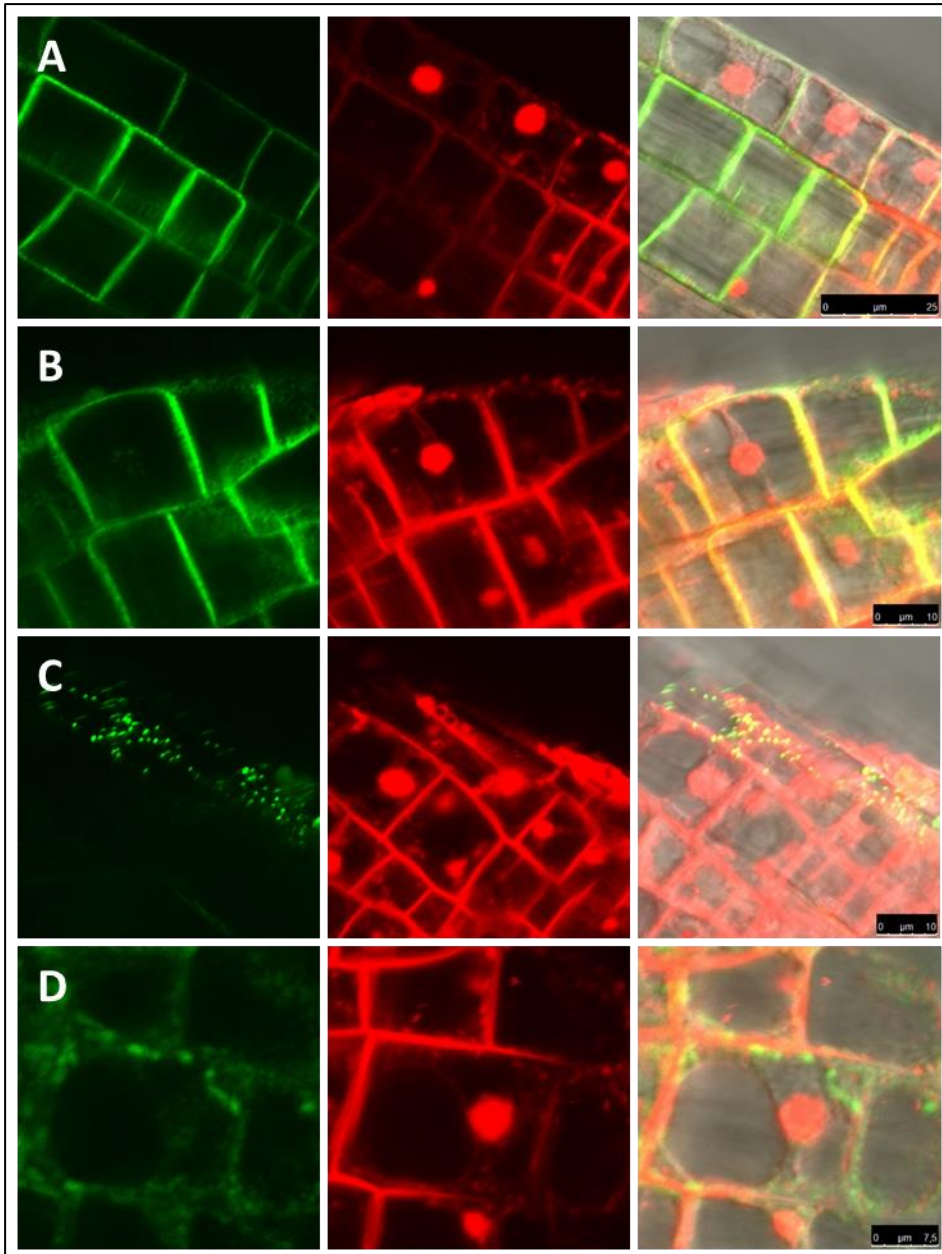


Abbildung 41 Subzelluläre Lokalisation von NPH3, NPH3-S743A, NPH3- Δ C51/N2 und NPH3- Δ N146 in stabil-transformierten *Arabidopsis Col-0*-Keimlingen in Abhängigkeit von Brefeldin A (BFA). Keimlinge, die stabil mit 35S::NPH3/NPH3-S743A/NPH3- Δ C51/NPH3- Δ N146:mGFP4-Konstrukten transformiert wurden, wurden für 96 h im Dunkeln angezogen, für 2 h in einer BFA- ([50 μ M])/FM[®] 4-64- (Endozytose-Tracer [2 μ M])/MS-Lösung im Dunkeln inkubiert und die Signale mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert. Wurzel-Gewebe von NPH3 (A), NPH3-S743A (B), NPH3- Δ C51/N2 (C) und NPH3- Δ N146 (D). Die Keimlinge wurden unmittelbar nach der BFA/FM[®] 4-64-Inkubation präpariert und mikroskopiert. Die Aufnahmen zeigen jeweils das Fluoreszenzsignal (NPH3/NPH3-S743A/NPH3- Δ C51/NPH3- Δ N146 – grün, FM[®] 4-64 – rot) und die Überlagerung mit dem Durchlichtbild.

4 Diskussion

4.1 Hefe-2-Hybrid-Sichtung/en – Beitrag zur Aufklärung des pflanzlichen 14-3-3 Interaktoms

Zum Zeitpunkt der Hefe-2-Hybrid-Sichtungen in unserem Labor, waren relativ wenige proteomweite Daten hinsichtlich des pflanzlichen 14-3-3 Interaktoms bekannt. Bis dahin stand die Aufklärung der Regulations-Mechanismen „bekannter“ IPs von 14-3-3 Proteinen im Zentrum des Interesses (z.B. bei der Nitrat-Reduktase und der PM-ständigen H⁺-ATPase, s. Einleitung).

Unsere Sichtungen waren eine der ersten umfangreichen Studien, um neue putative IPs von 14-3-3 Proteinen in Pflanzen zu identifizieren. Die Anzahl der identifizierten putativen IPs definierter 14-3-3 Isoformen in unseren Sichtungen wich zum Teil stark voneinander ab (epsilon: 311, kappa: 222, omega: 103, upsilon: 120, kumuliert: 544, s. Ergebnisse); dies könnte daran liegen, dass die eingesetzten Isoformen jeweils eine phylogenetische Gruppe bzw. Subgruppe der 14-3-3 Genfamilie repräsentieren (s. Abbildung 1, s. Einleitung), die gewisse Spezifitäten gegenüber definierten „Targets“ aufweisen (so z.B. die Isoformen der „nicht-epsilon-Gruppe“ gegenüber RPT2, s. Ergebnisse). Es sollte erwähnt werden, dass die von uns durchgeführten Sichtungen nicht sättigend waren (Grund hierfür waren unerwartet viele positive Hefe-Klone bzw. putative IPs); die Wahrscheinlichkeit, gemeinsame IPs unterschiedlicher Isoformen zu identifizieren wäre unter sättigenden Bedingungen evtl. größer gewesen. Unterschiede bzgl. der Spezifität der verschiedenen Isoformen gegenüber ihren IPs wurden schon in sich entwickelnden *Arabidopsis*-Samen festgestellt (Swatek et al., 2011). Im internen Vergleich der Sichtungen von Swatek et al. (2011) wies epsilon („epsilon-Gruppe“) mit ca. 47 % der identifizierten IPs (47/104) eine Isoform-spezifische Interaktion auf, während chi („nicht-epsilon-Gruppe“) mit 27 % (27/104) spezifisch interagiert; 26 % der identifizierten „Targets“ (27/104) wurden redundant von beiden Isoformen gebunden. Dies deutet auf eine bevorzugte Interaktion zwischen den unterschiedlichen Isoformen gegenüber spezifischen Proteinen und auf eine mögliche funktionale Spezialisierung unter den 14-3-3 Isoformen hin.

Die phylogenetische Analyse der 14-3-3 Proteine lässt vermuten, dass die „ursprünglichen“ Isoformen der „epsilon-Gruppe“ wahrscheinlich regulatorisch an grundlegenden eukaryotischen Prozessen beteiligt sind (Funktionen wie z.B. Transkription, Translation und Kompartimentierung (Vesikel-Transport, Membran-„Trafficking“)); von Isoformen der evolutiv jüngeren „nicht-epsilon-Gruppe“ wird angenommen, dass sie hingegen Organismus-spezifische Prozesse regulieren. Dies korreliert mit der Anzahl der identifizierten „Targets“ der unterschiedlichen Isoformen aus unseren Sichtungen; mit epsilon wurden die meisten putativen „Targets“ identifiziert, während mit den

verschiedenen Isoformen aus der „nicht-epsilon-Gruppe“ wesentlich weniger putative IPs gefischt werden konnten.

Die Unterschiede in der GO-Klassifizierung der IPs der verschiedenen Isoformen waren marginal. Die aus dieser Gruppierung resultierenden Überlegungen hinsichtlich einer vermehrten Beteiligung einzelner Isoformen bzw. Subgruppen an/in spezifischen Funktionen und Prozessen (omega und epsilon üben evtl. einen größeren regulatorischen Einfluss bei der Genexpression aus als epsilon und kappa, s. Ergebnisse) bzw. des Vorkommens in bestimmten Kompartimenten sind legitim, aber ohne Zweifel spekulativ. Eine detaillierte Analyse bzw. Verifizierung der putativen IPs aus unserer Studie durch geeignete Protein-Protein-Interaktions-Studien steht größtenteils noch aus.

In den von uns zum Vergleich herangezogenen Interaktom-Studien (s. Ergebnisse) wurden unterschiedliche Methoden und pflanzliche Organismen bzw. Entwicklungs-Stadien zur Identifizierung neuer putativer IPs von 14-3-3 Proteinen verwendet (Schoonheim et al., 2007; Chang et al., 2009; Paul et al., 2009; Arabidopsis Interactome Mapping, 2011; Shin et al., 2011; Swatek et al., 2011). Die Ergebnisse der einzelnen Sichtungen variieren relativ stark bzw. sind die Schnittmengen der Studien untereinander nicht sehr hoch (s. Ergebnisse). Dies hat mehrere Ursachen: das entsprechende Entwicklungs-Stadium des jeweiligen Organismus und die umweltbedingten Differenzen bedingen relativ große transkriptionelle Unterschiede; infolgedessen setzt sich auch der Pool an vorhandenen Proteinen bzw. putativen IPs unterschiedlich zusammen. Eine für die Interaktion mit 14-3-3 Proteinen bis auf wenige Ausnahmen essentielle Rolle spielt die Phosphorylierung der „Targets“ durch zum Teil Stimulus-abhängige Kinasen (z.B. wird BZR1 durch BIN2 nach Brassinosteroid-Perzeption phosphoryliert (Gampala et al., 2007)); auch diesbezüglich sind das Entwicklungs-Stadium und die Umwelt-Bedingungen ausschlaggebend; fehlt der entsprechende endo- oder exogene Reiz, bleibt eine Aktivierung der entsprechenden Kinase durch spezifische Signaltransduktions-Kaskaden aus (in heterologen Systemen wie z.B. der Hefe ist die verantwortliche Kinase evtl. gar nicht vorhanden), der putative IP taucht in der Sichtung nicht auf. Proteine und Enzyme, die im Grundmetabolismus benötigt werden („Housekeeping“-Prozesse), sind in fast allen Entwicklungs-Stadien essentiell notwendig und werden deshalb ubiquitär exprimiert. Solche 14-3-3 „Targets“ (z.B. die PM-ständigen H⁺-ATPasen (AHA1/2), die Enolase u.a., s. Ergebnisse) tauchten auch vermehrt in den unterschiedlichen Interaktom-Studien auf.

Anhand unserer Sichtungen und dem Vergleich der unterschiedlichen Studien lässt sich feststellen, dass 14-3-3 Proteine an/in fast allen pflanzlichen Funktionen und Prozessen, unabhängig von spezifischen Entwicklungs-Stadien oder den unterschiedlichen Umwelt-Bedingungen, beteiligt sind; sie üben wichtige regulatorische Funktionen im Grundmetabolismus, in sehr vielen physiologischen Prozessen und in deren Signaltransduktions-Kaskaden aus. 14-3-3 Proteine stellen somit dynamische Regulatoren bzw. Modulatoren dar, die wichtige Funktionen und Prozesse in der Pflanze steuern und

hierdurch eine abgestimmte Feinregulation ermöglichen. In Abhängigkeit des Entwicklungs-Zustands und von den jeweiligen Umwelteinflüssen „passen“ sie sich dynamisch an und regulieren die unter den gegebenen Umständen maßgeblichen Prozesse.

Eine eindeutige Aussage hinsichtlich der Redundanz bzw. Spezifität einzelner Isoformen bzgl. spezifischen „Targets“ lässt sich anhand unserer „Screens“ und aus dem Vergleich der unterschiedlichen Studien nicht machen. *In puncto* Homo- bzw. Hetero-Dimerisierung der verschiedenen 14-3-3 Isoformen sind bis dato *in planta* keine Daten bekannt, jedoch impliziert die Anzahl der Isoformen und die daraus möglichen Kombinationen zur Ausbildung von Homo- bzw. Heterodimeren *per se* ein immenses Potential, um spezifische Zielproteine gezielt zu binden und deren Beteiligung an den unterschiedlichen Prozessen individuell und spezifisch regulieren zu können.

4.2 Identifizierung des 14-3-3 Bindemotivs in NPH3-Familien-Proteinen

Das Protein „NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTYL 3“ (NPH3), das eine essentielle Funktion in der Signaltransduktion der phototropen Reaktion ausübt (s. Einleitung), wurde mehrfach als putativer IP aller vier in den Sichtungen eingesetzter 14-3-3 Isoformen identifiziert. Darüber hinaus wurden vier weitere Mitglieder der NPH3-Familie (NPH3-FP (AT1G67900), NPY3 („NAKED PINS IN YUC MUTANTS 3“), ENP/NPY1/MEL1 („ENHANCER OF PINOID“/„NAKED PINS IN YUC MUTANTS 1“/„MAB4/ENP-Like 1“), RPT2 („ROOT PHOTOTROPISM 2“)) gefischt.

Das vermehrte Auftreten von Proteinen aus dieser Familie (NPH3-Familie, NRLs („NPH3/RPT2-Like“ Proteine)) veranlasste uns, unserer Forschungsarbeiten auf NPH3, ENP/NPY1/MEL1 sowie RPT2 zu fokussieren. Obwohl Interaktionen zwischen 14-3-3 und Proteinen aus der NPH3-Familie schon in anderen proteomweiten Untersuchungen festgestellt wurden (Schoonheim et al., 2007; Sullivan et al., 2009), wurde deren Relevanz bzgl. physiologischer Prozesse, wie z.B. des Phototropismus, nicht näher untersucht. Zur Identifizierung des 14-3-3 Bindemotivs (in allen drei Proteinen) und zur detaillierten Analyse der physiologischen Bedeutung der 14-3-3/NPH3-Interaktion wurden daher von uns weitere Experimente durchgeführt.

Die Proteine der NPH3-Familie besitzen, wie schon in anderen Teilen dieser Arbeit erwähnt, charakteristische Domänen bzw. weisen Großteils einen homologen strukturellen Aufbau auf (s. Einleitung, s. Ergebnisse (Celaya and Liscum, 2005)). Neben der zentralgelegenen, namensgebenden NPH3-Domäne (funktionelle Bedeutung bis dato nicht bekannt (Finn et al., 2008)), besitzen einige Proteine eine zusätzliche N-terminal lokalisierte BTB/POZ- (vermittelt Protein-Protein-Interaktionen, Homo-/Hetero-Dimerisierung (Bardwell and Treisman, 1994; Aravind and Koonin, 1999; Stogios et al., 2005; Stogios et al., 2007)) sowie eine C-terminal lokalisierte „Coiled Coil“-

Domäne (vermittelt Protein-Protein-Interaktionen (Lupas, 1996; Lupas and Gruber, 2005)). Die Analyse aller 33 NPH3-Familien-Proteine aus *Arabidopsis* (s. Abbildung 6, s. Ergebnisse) auf diese strukturellen Merkmale ergab, dass 21 Proteine sowohl eine NPH3- als auch eine BTB/POZ-Domäne besitzen (darunter NPH3, ENP/NPY1/MEL1 und RPT2 (Kimura and Kagawa, 2006)); etwa die Hälfte davon, ca. 10 Proteine, weisen zusätzlich noch eine „Coiled Coil“-Domäne auf (darunter NPH3 und RPT2).

Die zum Großteil konservierten Domänen der NRLs haben für die Interaktion mit anderen Proteinen, aber auch für Wechselwirkungen innerhalb der NPH3-Familie, wichtige Funktionen. So konnte gezeigt werden, dass die Bindung von NPH3 an die N-terminale Domäne von PHOT1 über die C-terminale Domäne von NPH3, die u.a. die „Coiled Coil“-Domäne enthält, vermittelt wird (Motchoulski and Liscum, 1999; de Carbonnel et al., 2010). Erstaunlicherweise wird demgegenüber die Bindung von RPT2 an PHOT1 über die N-terminale Domäne von RPT2 (beinhaltet die BTB/POZ-Domäne) vermittelt (Inada et al., 2004; Sullivan et al., 2009). Eine Hetero-Dimersierung von NPH3 und RPT2 findet, gemäß Hefe-2-Hybrid-Analysen, ebenfalls über die N-Termini (BTB/POZ-Domänen) der beiden Proteine statt (Inada et al., 2004). Weiterhin wurde beschrieben, dass NPH3 über seine BTB/POZ-Domäne als Adapter für eine CULLIN3-basierende E3-Ubiquitin-Ligase fungiert (CRL3^{NPH3} (Stogios et al., 2005; Pedmale and Liscum, 2007)); nach Rekrutierung von PHOT1 als Substrat, wird dieses in Abhängigkeit der Licht- bzw. BL-Intensität ubiquitiniert. Niedrige bis moderate Licht-Intensitäten bewirken eine Mono/Multi-Ubiquitinierung von PHOT1, was im Anschluss an dessen Internalisierung über „Sorting“-Prozesse zu einer Relokalisation bzw. zu einer möglichen Degradierung des Proteins über die lytische Vakuole führen kann. Hohe Licht-Intensitäten haben eine Poly-Ubiquitinierung von PHOT1 und einen Abbau über das 26S-Proteasom zur Folge (Roberts et al., 2011). Letztendlich führt dies zu einer Veränderung der Abundanz von PHOT1 an der PM. Es wird postuliert, dass die Internalisierung ein Regulations-Mechanismus bzgl. der Sensitivität der BL-Perzeption darstellt; hierdurch wird eine Refraktärzeit zwischen der ersten und der zweiten phototropen Reaktion eingefügt (Roberts et al., 2011).

Wir konnten die Interaktion von 14-3-3 und NPH3 (Volllängen-Protein) auf Grundlage von Hefe-2-Hybrid-Analysen sowie *in planta* mittels FRET-FLIM-Untersuchungen und rBIFC-Studien bestätigen (s. Ergebnisse). Bemerkenswerterweise befindet sich das 14-3-3 Bindemotiv C-terminal von der „Coiled Coil“-Domäne und somit am extremen C-Terminus von NPH3 (Modus III (RN(S₇₄₃)IS-COOH)). Eine mutierte Version des Proteins (NPH3-S743A) war dementsprechend nicht mehr in der Lage, 14-3-3 zu binden (Hefe-2-Hybrid-Ergebnisse), hatte keine Reduktion der Fluoreszenz-Lebensdauer zur Folge (FRET-FLIM-Studien) bzw. führte zu einer signifikant verminderten YFP/RFP-Fluoreszenz-Intensität bei rBIFC-Untersuchungen (s. Ergebnisse). Ein aus ca. 50 AS bestehendes C-terminales NPH3-Fragment war im Y2H erstaunlicherweise nicht in der Lage, 14-3-3 zu binden; weitere

Domänen von NPH3 scheinen für die Interaktion nötig zu sein bzw. haben einen stabilisierenden Effekt auf den 14-3-3/NPH3-Komplex. Ein vergleichbarer Mechanismus ist auch von der PM-ständigen H⁺-ATPase bekannt; die Parallelen bestehen (i) in einem ebenfalls extrem C-terminal lokalisierten 14-3-3 Bindemotiv (Modus III) sowie (ii) in der Unfähigkeit des C-Terminus alleine, 14-3-3 zu binden (Axelsen et al., 1999; Jelich-Ottmann et al., 2001; Fuglsang et al., 2003).

Die 14-3-3 Bindestelle in ENP/NPY1/MEL1 und RPT2 befindet sich, äquivalent zu NPH3, am extremen C-Terminus der beiden Proteine. Diesbezüglich scheint ein konserviertes Bindemotiv des Modus III am/im extremen C-Terminus von fast allen NRLs vorzuliegen. *In silico*-Analysen der Protein-Sequenzen aller NPH3-Familien-Proteine zeigten auf, dass 29 von 33 NRLs ein konserviertes Serin, zwei weitere ein Threonin (-3 (1/33), -4 (1/33)) an entsprechender (-3 (19/33)) oder an einer ähnlichen Position (-4 (5/33), -5 (1/33), -6 (3/33), -7 (2/33)) in der AS-Sequenz ihres C-terminalen Bereichs besitzen (s. Excel-File auf der beigefügten CD (Tabelle 43, Analyse hinsichtlich des konservierten Serins im extremen C-Terminus der NPH3-Familien-Proteine/NRLs)). Alle Mitglieder der NPH3- (vier, -3, R(M/N/K)S(I/M)S-COOH), der RPT2- (drei, -3, R(H/F)SIS-COOH) und vier von fünf Mitgliedern der ENP/NPY/MEL-Subgruppe (-3, R(V/R/H)S(V/S/I)S-COOH, -4, TSKKH-COOH) weisen dieses Motiv auf und könnten somit, neben den drei verifizierten Proteinen (NPH3, RPT2, ENP/NPY1/MEL1), putative IPs von 14-3-3 sein (s. Abbildung 6, s. Ergebnisse), s. PDF-File auf der beigefügten CD (Alignment der NPH3-Familien-Proteine/NRLs)). Ein genereller Mechanismus, in dem 14-3-3 als Gerüst bzw. „Bridge“ für die Ausbildung eines multimeren Protein-Komplexes, bestehend aus NRLs und weiteren IP, fungiert, ist anhand dieser Daten gut vorstellbar.

4.3 Subzelluläre Lokalisation der unterschiedlichen NPH3-Familien-Proteine/NRLs, gegenseitige Beeinflussung bzgl. ihrer Lokalisation

Wie schon in der Einleitung thematisiert, lokalisieren 14-3-3 Proteine größtenteils zytoplasmatisch (Aducci et al., 2002) und nukleär (Bihn et al., 1997), sie kommen aber auch in anderen Zell-Kompartimenten (chloroplastidär (Sehnke et al., 2000; Jarvis and Soll, 2001)) und an der PM assoziiert vor (Korthout and de Boer, 1994).

Analysen hinsichtlich der subzellulären Lokalisation von NPH3-mGFP4/RFP (35S-Promotor) ergaben, dass das Fusions-Protein entlang der PM von Protoplasten, Tabakzellen und in Zellen von stabil-transformierten *Arabidopsis*-Keimlingen lokalisierte (s. Ergebnisse). Das Verteilungs-Muster an der PM variierte allerdings unabhängig von den Versuchs-Bedingungen bzw. von äußeren Einflüssen; obwohl NPH3 keine Trans-Membran-Domäne aufweist, lag es häufig unilaminar vor, bildete aber teilweise größere „Patches“ an der PM aus (Makro-Domänen) bzw. konzentrierte sich in distinkten punktförmigen Strukturen (Mikro-Domänen). Das nicht mehr zur 14-3-3 Interaktion befähigte Protein

(NPH3-S745A) wies das gleiche Lokalisations-Muster wie das wildtypische Protein auf. Die Deletion des N-terminalen (BTB/POZ-Domäne) aber auch des C-terminalen Bereichs des Proteins („Coiled Coil“-Domäne, 14-3-3 Bindemotiv) führte zu einer Aggregation in bis jetzt nicht identifizierte zytoplasmatischen Kompartimente. Sowohl die BTB/POZ- als auch die „Coiled Coil“-Domäne scheinen demnach eine Funktion bzgl. der PM-Assoziation zu haben; fehlt eine der beiden Domänen, hat dies eine Mislokalisierung des Proteins zur Folge. Insofern ist anzunehmen, dass diese beiden Domänen über Protein-Protein-Interaktion eine Assoziation von NPH3 an die PM bewerkstelligen.

NPH3 wurde erstmals in Protein-Fractionen der PM von *Arabidopsis*-Keimlingen immunologisch detektiert und später als PM-assoziiertes Phospho-Protein beschrieben (Motchoulski and Liscum, 1999; Lariguet et al., 2006). Die Dephosphorylierung von NPH3 ist Licht- und PHOT1-abhängig; nach BL-Bestrahlung war ein Unterschied der Laufeigenschaften des Proteins über eine SDS-PAGE ersichtlich (Motchoulski and Liscum, 1999; Pedmale and Liscum, 2007). Die subzelluläre Lokalisation des GFP-getaggten Proteins wurde primär in Epidermis- und Schließ-Zellen der Bohne (*V. faba*) analysiert (Inoue et al., 2008); NPH3 lokalisierte in der Zellperipherie, assoziiert an die PM. Das Verteilungs-Muster war größtenteils unilaminar entlang der PM. Eine Deletion der „Coiled Coil“-Domäne bzw. des extremen C-Terminus hatte eine Mislokalisierung des Proteins zur Folge; das subzelluläre Lokalisations-Muster zeigte zytoplasmatische, teilweise globuläre Aggregate.

Die subzelluläre Lokalisation von NPH3 in unseren Experimenten entsprach im Großen und Ganzen den in der Literatur beschriebenen Daten; allerdings war nicht bekannt, dass die N-terminal lokalisierte BTB/POZ-Domäne, neben der C-terminalen „Coiled Coil“-Domäne, ebenfalls die Assoziation an die PM vermittelt.

Ein ähnliches Lokalisations-Muster wie für NPH3, war auch bzgl. der subzellulären Lokalisation von ENP/NPY1/MEL1 (MAB4)-mGFP4 Fusions-Proteinen und dessen mutierter Version (ENP-S569A) in *Arabidopsis*-Protoplasten und in transient-transformierten Tabak-Blättern ersichtlich; die beiden Proteine assoziierten größtenteils in „Patches“ an der PM, waren aber ebenfalls in/an endosomalen Strukturen im Zytoplasma aufzufinden (s. Abbildung 52, s. Abbildung 53, s. Anhang). Dies stellt einen Unterschied zu NPH3 dar, das als Volllänge-Protein ausschließlich PM-assoziiert detektiert werden konnte.

Bis dato veröffentlichte Daten bzgl. der subzellulären Lokalisation von ENP/NPY1/MEL1 zeigen ebenfalls, dass das Protein in *Arabidopsis*-Protoplasten PM-assoziiert vorliegt, sich aber auch in/an einer Subpopulation von Endosomen (kolokalisierte mit einem spezifischen Marker für späte Endosomen (ARA6)) und in/an bis jetzt nicht identifizierten intrazellulären Kompartimenten befindet (Furutani et al., 2007).

RPT2 und dessen mutierte Variante (RPT2-S591A) lokalisierten in unseren Versuchsansätzen ebenfalls unilaminar an der PM von *Arabidopsis*-Protoplasten, bildeten allerdings keine „Patches“

bzw. punktförmige Strukturen wie etwa NPH3 oder ENP/NPY1/MEL1 aus (nicht aufgeführt). Eine zytoplasmatische bzw. endosomale Detektion war ebenso nicht ersichtlich.

Bemerkenswerterweise war bei Koexpressions-Studien von NPH3 und ENP/NPY1/MEL1, die unterschiedlichen Subgruppen der NRLs zuzuordnen sind, ein gegensätzliches Ausschließen („mutual exclusion“) beider Proteine an der PM von *Arabidopsis*-Protoplasten zu beobachten; in Arealen in/an denen das eine Proteine anzutreffen war, konnte das andere Protein nicht detektiert werden (s. Ergebnisse).

In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die polare Rezyklierung von PIN-Proteinen an die PM spezifisch von Proteinen der ENP/NPY/MEL-Subgruppe der NRLs determiniert wird. So kolokalisieren ENP/NPY1/MEL1 und PIN1 während der Entwicklung des *Arabidopsis*-Embryos in Primordien-Zellen der Kotyledonen in/an der apikalen PM (Furutani et al., 2007). Weitere NPY/MEL-Proteine (ENP/NPY/MEL-Subgruppe der NRLs, insgesamt fünf Proteine) agieren nicht nur während der Entwicklung von Organen (funktional redundant), sondern spielen auch bei physiologischen Prozessen, wie z.B. beim Wurzel-Gravitropismus, eine regulatorische Rolle. Multiple *npv*-Mutanten wiesen eine stark verminderte PIN-Abundanz an der PM auf bzw. führten zu Veränderungen in deren polaren Lokalisation. Des Weiteren zeigten *npv*-Mutanten eine erhöhte PIN2-Internalisierung von der PM auf; Auswirkungen auf das „Trafficking“ waren allerdings nicht ersichtlich. Alle NPY-Proteine lokalisierten polar in der Zellperipherie; die Polarität von ENP/NPY1/MEL1 entsprach in Zellen von Organ-Primordien (Kotyledonen, Blüten-Organen), der Epidermis sowie im Spross-Meristem weitestgehend der Polarität der PIN-Proteine (Furutani et al., 2011). Dies lässt vermuten, dass NPY/MEL-Proteine bei der Etablierung der subzellulären Polarität der PIN-Lokalisation eine Rolle spielen; sie rekrutieren PINs in einer polaren Art und Weise an die PM, regulieren deren Endozytose bzw. Internalisierung und kontrollieren so ihre Abundanz an der PM.

Mit den Informationen, dass NPH3 und ENP/NPY1/MEL1 sich gegenseitig in ihrer subzellulären Lokalisation an der PM von *Arabidopsis*-Protoplasten ausschließen und dass ENP/NPY1/MEL1 mit PINs an der PM in Zellen diverser Gewebe und Organe (Kotyledonen, Epidermis, Spross-Meristem) kolokalisiert, stellte sich die Frage, welche subzelluläre Lokalisation NPH3 und PIN-Proteine bei Koexpression aufweisen. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurden NPH3 und PIN1 in *Arabidopsis*-Protoplasten koexprimiert. Die Ergebnisse spiegelten ein identisches Szenario wie bei NPH3 und ENP/NPY1/MEL1 wider; PM-ständige Bereiche in/an denen exklusiv NPH3 vorkam, wechselten mit Bereichen ab, in denen ausschließlich PIN1 detektierbar war. Ein gegenseitiges Ausschließen („mutual exclusion“) beider Proteine in ihrer Lokalisation in bzw. an der PM war eindeutig festzustellen (s. Ergebnisse).

Eine direkte Interaktion zwischen NPH3 und PIN-Proteinen (zytoplasmatisch-lokalisierter hydrophiler „Loop“ von PIN2) konnte via Hefe-2-Hybrid-System nicht nachgewiesen werden. Unter Einbezug

unserer Daten aus den Kolo­kalisations-Studien ist eine Interaktion *in planta* auch eher unwahrscheinlich.

Versucht man die Informationen bzgl. der Relokalisation der „PIN-FORMED“-Proteine (Attraktion bzw. Arretierung von PINs durch NPYs/MELs an der PM), die Ergebnisse unserer Kolo­kalisations-Studien (NPH3 vs. ENP/NPY1/MEL1 bzw. NPH3 vs. PIN1 – gegensätzliches Ausschließen an der PM („mutual exclusion“)) sowie die Daten aus den Interaktions-Studien (soweit keine direkte Interaktion zwischen NPH3 und „PIN-FORMED“-Proteinen nachweisbar) logisch miteinander zu verknüpfen, bietet sich folgendes Szenario an: ENP/NPY1/MEL1 und andere NPY-Proteine rekrutieren spezifisch Mitglieder der „PIN-FORMED“-Proteine an definierte Areale in der PM und arretieren sie dort bzw. halten sie dort zurück; NPH3 und evtl. andere Mitglieder aus der NPH3-Subgruppe besetzen spezifisch andere Areale an der Membran (evtl. durch Protein-Protein-Interaktionen mit hier lokalisierten Proteinen (z.B. PHOT1/2 u.a.)) und verhindern hierdurch die Relokalisation von NPYs/MELs und demzufolge auch von „PIN-FORMED“-Proteinen in diese Bereiche der Pflanzenzelle (s. Abbildung 42). Eine Ausbildung von Makro-Domänen über die PM und infolgedessen eine Determinierung bzw. Etablierung von Zellpolarität würde hierdurch möglich sein; dies würde die Grundlage zur Ausbildung eines gerichteten Auxin-Transports, der für viele Entwicklungs-bezogene (z.B. Organogenese der Kotyledonen) und physiologische Prozesse (z.B. Gravitropismus, Phototropismus) essentiell notwendig ist, gewährleisten.

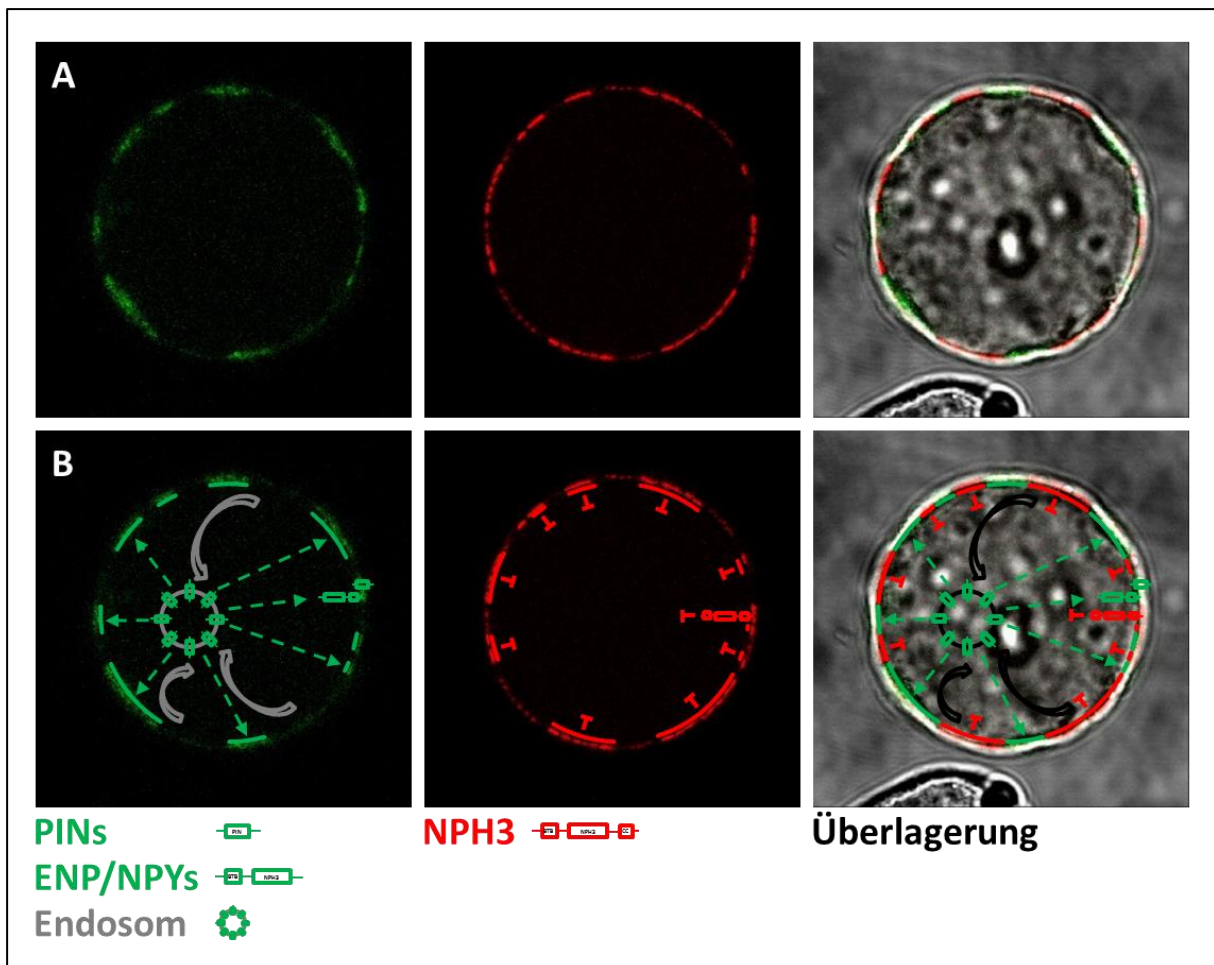


Abbildung 42 Modell bzgl. der subzellulären Lokalisation von „PIN-FORMED“-Proteinen, ENP/NPYs/MELs und NPH3 an/in der PM von Arabidopsis-Protoplasten. Die Proteine der verschiedenen Subgruppen der NPH3-Familien-Proteine/NRLs (NPYs/MELs vs. NPH3s) schließen sich in ihrer subzellulären Lokalisation an der PM gegenseitig aus („mutual exclusion“) und determinieren hierüber die Lokalisation von „PIN-FORMED“-Proteinen. NPYs (ENP/NPY1/MEL1 und andere MEL-Proteine) arretieren die PINs in bestimmten Arealen der PM. NPH3 besetzt spezifische Areale an der PM in denen die PINs nach Rezyklierung nicht relokalisieren. Aufnahme A repräsentiert das ursprüngliche Bild in Arabidopsis-Protoplasten (s. Ergebnisse, grün: PIN1:mGFP4, rot: NPH3:RFP), Aufnahme B ist das daraus erstellte/idealisierte Modell.

Eine Möglichkeit die polare Lokalisation und Abundanz der unterschiedlichen NRLs an der PM gezielt zu regulieren, wäre die transiente Bindung an spezifische PM-assozierte bzw. -integrierte IPs. Eine solche Interaktion könnte über 14-3-3 Proteine in Abhängigkeit des Phosphorylierungs-Status der jeweiligen „Targets“ vermittelt werden. Stimulus-abhängige Kinasen sowie Phosphatasen könnten den Phosphorylierungs-Status ihrer Zielproteine gezielt verändern und so die Ausbildung von Komplexen und deren gerichtete bzw. polare Lokalisation an der PM ermöglichen. Die Ausbildung von oligomeren Komplexen mit einer Beteiligung von Ubiquitin-Ligasen (z.B. CRL3^{NPH3} (Roberts et al., 2011)) wäre ebenfalls vorstellbar; die gezielte Ubiquitinierung entsprechender Substrate (z.B. PIN2 (Pan et al., 2009; Leitner et al., 2012; Leitner et al., 2012) oder PHOT1 (Roberts et al., 2011)) könnte

zu einer gerichteten Degradierung dieser „Targets“ führen und so deren Abundanz bzw. Halbwertszeit an der Membran regulieren.

4.4 Physiologische Relevanz der 14-3-3/NPH3-Interaktion

Pflanzen perzipieren BL über spezifische Rezeptoren (PHOT1/2) und ermitteln dadurch die vektorielle Richtung des einfallenden Lichts. Auf dieses primäre Detektions-Ereignis hin werden diverse Entwicklungs-bezogene Reaktionen initiiert; innerhalb kürzester Zeit tritt eine Inhibierung des Hypokotyl-Wachstums von etiolierten Keimlingen ein, bevor darauffolgend ein gerichtetes Wachstum (Tropismus) des Hypokotyls in Richtung des einfallenden Lichts erfolgt (positive erste und zweite phototrope Reaktion). Bei Licht-gewachsenen Keimlingen sowie älteren Pflanzen wird des Weiteren die Blatt-Stellung über die Petiolen und deren entsprechenden Winkel zur Spross-Achse modifiziert, sodass die photosynthetisch aktiven Wellenlängenbereiche des Lichts optimal eingefangen und hierdurch eine effizientere Photosynthese-Leistung erbracht werden kann. Um diese physiologischen Reaktionen auf die BL-Perzeption gezielt umsetzen zu können, müssen auf molekularer, aber auch auf intra- bzw. interzellulärer Ebene (Gewebe, Organ) viele Interaktions-, Signaltransduktions- und Transport-Prozesse koordiniert stattfinden, die von der Pflanze bzw. deren Zellen teilweise autonom, teilweise im Kontext zueinander, integriert und spezifisch reguliert werden. Je nach Reaktion finden ebenfalls Veränderungen der Protein-Expression (Transkription bzw. Translation) statt bzw. werden Proteine und Enzyme über unterschiedliche Mechanismen (Phosphorylierung, Ubiquitinierung etc.) auf posttranslationaler Ebene modifiziert und dadurch aktiviert, inhibiert, rekrutiert, transloziert oder degradiert. Ein Zusammenspiel vieler Prozesse bewerkstelligt letztendlich die entsprechenden BL-abhängigen Reaktionen.

In *nph3*-„knockout“-Pflanzen sind einige dieser BL-abhängigen Prozesse, wie z.B. die phototrope Reaktion von etiolierten Keimlingen und die Blatt-Spreitung/Stellung bei Licht-gewachsenen Pflanzen, gestört.

Um die physiologische Relevanz der 14-3-3/NPH3-Interaktion zu analysieren, wurden unterschiedliche Experimente hinsichtlich BL-abhängiger Reaktionen mit Keimlingen bzw. Pflanzen der *nph3-8*-„knockout“-Linie, des Wildtyps (Col-0), der Komplementations- (*nph3-8*+NPH3) und der Transformations-Linie (*nph3-8*+NPH3-S743A) unternommen; analysiert wurde die Inhibierung des Hypokotyl-Wachstums (geht dem differentiellen Wachstum bei der phototropen Reaktion voraus) sowie die positive phototrope Reaktion des Hypokotyls unter jeweils niedrigen Photonen-Flussdichten („low fluence rate“). Das phänotypische Erscheinungsbild der sogenannten Blatt-Spreitung („leaf flattening“) wurde ebenfalls untersucht.

Neben den morphologischen Unterschieden der Blätter, wurde in der Literatur ein weiterer Phänotyp für *nph3* und diverse andere Mutanten beschrieben; unter normalen Langtag-Bedingungen weisen Pflanzen der *nph3*-„knockout“-Linien eine abnormale Blatt-Stellung auf. Dieser Positionierungs-Phänotyp war auch unter unseren Versuchs-Bedingungen (s. Ergebnisse) eindeutig ersichtlich. Die Blatt-Stiele von Pflanzen der *nph3-8*-„knockout“-Linie waren im Vergleich zum Wildtyp deutlich flacher ausgerichtet (fast waagrecht); die Petiolen von wildtypischen Pflanzen (Col-0) waren aufgerichtet und schlossen mit der Horizontalen einen positiven Winkel ein. Die Transformations-Linie (*nph3-8+NPH3-S743A*) konnte den Zustand des Wildtyps nicht wiederherstellen; im Gegensatz dazu rekonstituierte die Komplementations-Linie (*nph3-8+NPH3*) das wildtypische Erscheinungsbild vollständig. Dieser Positionierungs-Phänotyp wurde von uns qualitativ bemerkt, jedoch nicht quantitativ analysiert. Die Interaktion von 14-3-3 mit NPH3 hat demzufolge gravierende Auswirkungen auf die Blatt-Stellung; die Unzulänglichkeit von NPH3, mit 14-3-3 zu interagieren, führt zu einer Fehl-Positionierung der Blätter.

4.4.1 Auswirkungen der 14-3-3/NPH3-Interaktion auf die Blatt-Spreitung

Die Blatt-Morphologie sowie -Stellung spielen zusammen mit dem Phototropismus wichtige Rollen bzgl. der Optimierung der Photosynthese-Leistung von grünen Pflanzen. Hinsichtlich der Analyse von BL-induzierten Prozessen wurden die meisten in der Literatur beschriebenen Experimente an etiolierten Keimlingen durchgeführt; die Entwicklung und das Verhalten älterer Pflanzen, im speziellen von grünen Blättern, wurde größtenteils nicht untersucht.

Mittlerweile ist bekannt, dass diverse Mutanten von Proteinen, die an BL-abhängigen Reaktionen beteiligt sind (z.B. *phot1/2*, *nph3*, *rpt2*, *pks's* u.a.), Entwicklungs-bezogene Phänotypen hinsichtlich ihrer Blatt-Morphologie aufweisen; Pflanzen mit diesbezüglichen Mutationen rollen ihre Blätter in unterschiedlicher Ausprägung in Richtung der Blatt-Unterseite (abaxial). Dieser zum Teil recht auffällige Phänotyp, die Blatt-Krümmung („leaf curling“), lässt sich durch die Bestimmung des sog. Blatt-Krümmungs-Index (BKI, „leaf curling index“) quantifizieren.

Um die Relevanz der 14-3-3/NPH3-Interaktion bzgl. des „leaf flattenings“ zu analysieren, wurden die jeweils 5. Blätter von wildtypischen Pflanzen (Col-0) bzw. der transgenen Pflanzen-Linien (unter Langtag-Bedingungen im Gewächshaus angezogen (L/D: 16 h/8 h, Licht-Intensität: ca. $125 \mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (PAR)), Wachstums-Stadium: 1.11 (Boyes et al., 2001)), geerntet, präpariert und hinsichtlich ihres BKI untersucht. Die für unsere Experimente verwendete *nph3-8*-„knockout“-Linie hatte einen wesentlich geringen BKI als der WT (Col-0); die Blätter rollten sich stark in Richtung der Blatt-Unterseite. Die mit der mutierten NPH3-Sequenz transformierte Linie (*nph3-8+NPH3-S745A*) konnte den WT-Phänotyp nicht rekonstituieren, ihr BKI war identisch mit dem der „knockout“-Linie.

Die Komplementations-Linie (*nph3-8+NPH3*) stellte den wildtypischen Phänotyp wieder vollständig her, ihr BKI lag im Bereich von Col-0 (s. Ergebnisse).

Keimlinge einer *nph3-* (*nph3-6*) sowie *phot1-(phot1-5)-*„knockout“-Linie, die unter normalem Weißlicht (L/D: 14 h/10 h, $50 \mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sieben Tage) angezogen und für fünf Tage mit moderaten RL- ($25 \mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und zusätzlich sehr niedrigen BL-Intensitäten ($0,1 \mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bestrahlt wurden, rollten ihre Blätter abaxial ein; des Weiteren waren die Blätter nach unten geneigt und die Petiolen horizontal ausgerichtet. Eine Erhöhung der BL-Intensität ($5 \mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) führte bei beiden Mutanten zu einem intermediären WT-Phänotyp (flache gespreitete Blätter, aufgerichtete Petiolen); diese BL-Intensität initiiert das PHOT2-abhängige „Signaling“, das unabhängig von PHOT1 erfolgt. Demzufolge werden NPH3 und PHOT1 unter diesen Bedingungen zur korrekten Ausbildung der Blatt-Morphologie bzw. -Positionierung benötigt; höhere BL-Intensitäten schwächen das phänotypische Erscheinungsbild ab, was auf eine PHOT1- bzw. NPH3-unabhängige Signaltransduktion hinweist (Inoue et al., 2008).

Interessanterweise hatte eine Deletion des C-Terminus von NPH3 (*nph3-201/202*, Teile der „Coiled Coil“-Domäne sowie des 14-3-3 Bindemotivs) hinsichtlich der Blatt-Spreitung bzw. -Positionierung den gleichen Effekt auf das phänotypische Erscheinungsbild wie ein *nph3-*„knockout“ (*nph3-6/nph3-8*) und glich im Aussehen der von uns erstellten Transformations-Linie (*nph3-8+NPH3-S743A*, s. Ergebnisse (Inoue et al., 2008)).

Das „leaf flattening“ wird durch den „knockout“ von NPH3, wie in der Literatur bekannt, drastisch beeinträchtigt, jedoch hat die Unfähigkeit von NPH3, mit 14-3-3 Proteinen zu interagieren (NPH3-S743A), die gleichen Auswirkungen auf die Blatt-Spreitung wie der „knockout“. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die 14-3-3/NPH3-Interaktion unter den gegebenen Bedingungen (Gewächshaus) für die korrekte Blatt-Ausbildung bzw. -Spreitung notwendig ist.

Die Analyse der physiologischen Relevanz von RPT2 hinsichtlich der Blatt-Spreitung und -Positionierung unter niedrigen, moderaten und starken BL-Intensitäten ($10, 25$ und $70 \mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ergab, dass RPT2 diese Prozesse über eine PHOT1-abhängige Art und Weise vermittelt. Das phänotypische Erscheinungsbild (Blatt-Spreitung bzw. -Stellung) von *rpt2*-Mutanten unter diesen Bedingungen glich dem von *phot1/2*-Doppel-Mutanten. Erstaunlicherweise zeigte eine *phot1/rpt2*-Doppel-Mutante unter Starklicht die Morphologie von wildtypischen Pflanzen; der zusätzliche „knockout“ von PHOT2 (*phot1/2/rpt2*) hob dies allerdings auf (Harada et al., 2013). Dies deutet darauf hin, dass bei höheren Licht-Intensitäten PHOT2 unabhängig von PHOT1 agiert und dass zur weiteren Signaltransduktion sowohl NPH3 als auch RPT2 umgangen werden.

Die Autophosphorylierung von PHOT1 und PHOT2 im Aktivierungs-„Loop“ ihrer C-terminal lokalisierten Kinase-Domäne ist für diverse BL-abhängige Prozesse von Bedeutung. Unter BL-Irradiation wird PHOT1 (S851) sehr schnell in einer Intensitäts-abhängigen Art und Weise

phosphoryliert und im Dunkeln graduell dephosphoryliert. Eine *phot1/2*-Doppel-Mutante, die mit einer veränderten CDS von PHOT1 (S849A/S851A) bzw. PHOT2 (S761A/S763A) transformiert wurde, wies hinsichtlich der Blatt-Morphologie bzw.-Positionierung jeweils ein abnormales phänotypisches Erscheinungsbild auf, ihre Blätter rollten sich abaxial ein und die Petiolen waren nach unten gerichtet. Im Gegensatz dazu führte die Expression einer CDS von PHOT2, die eine Mimikrierung der Phosphorylierung codiert (S761D/S763D), in der Doppel-Mutante (*phot1/2*) zu normalen BL-abhängigen Reaktionen der Pflanzen. Die PHOT2-Kinase-Aktivität *in planta* wurde durch den AS-Austausch ebenfalls nicht beeinträchtigt (Inoue et al., 2008; Inoue et al., 2011). Hieraus lässt sich ableiten, dass beide PHOTs unter entsprechender BL-Irradiation („low/high fluence rate“) an äquivalenten Positionen phosphoryliert werden und dass durch diese primären Autophosphorylierungs-Ereignisse das „Downstream-Signaling“ in beiden Signaltransduktions-Wegen zur korrekten Durchführung der Blatt-Entwicklung sowie zur adäquaten Positionierung der Blätter initiiert wird.

Die systematische Analyse von *pkcs*-Mutanten (*pkcs1/2/4*) ergab, dass PKS2 und zu einem geringeren Anteil auch PKS1, im gleichen Subset von PHOT-kontrollierten Reaktionen agieren wie NPH3, nämlich bei der Blatt-Spreitung sowie der Blatt-Positionierung. Sowohl PKS1/2 als auch NPH3 koimmunopräzipitieren mit PHOT1/2-GFP-Fusions-Proteinen aus *Arabidopsis*-Blatt-Extrakten. Die synergistische Interaktion zwischen *pkcs2*- und *nph3*-Mutanten deutet auf eine komplementäre Rolle beider Proteine bzgl. des PHOT-abhängigen „Signalings“ hinsichtlich dieser Reaktionen hin. Diesbezüglich weitere Hinweise ergaben genetische Studien, die PKS2, wie auch NPH3, in den Signaltransduktions-Wegen von PHOT1 und PHOT2 positionieren. Zusätzliche Ergebnisse lassen darauf schließen, dass PKS1/2 das „leaf flattening“ über die Auxin-Homöostase kontrollieren (de Carbonnel et al., 2010). Demzufolge operieren PKS-Proteine (PKS1/2) ergänzend zu NPH3 in den Signaltransduktions-Wegen von PHOT1 und PHOT2 und sind ebenfalls für die korrekte Ausführung der Blatt-Entwicklung und -Positionierung notwendig.

Unsere Experimente bestätigten die beschriebene Beteiligung von NPH3 hinsichtlich der Blatt-Spreitung; der relativ auffällige Phänotyp der *nph3-8*-„knockout“-Linie (starke Krümmung der Blätter) war schon qualitativ, im direkten Vergleich zu wildtypischen Pflanzen (Col-0), im Gewächshaus ersichtlich (s. Ergebnisse).

Das heißt, dass NPH3 nicht nur unter spezifischen Labor-Bedingungen (sehr niedrige BL-, moderate RL-Intensitäten (Inoue et al., 2008)), sondern auch unter Gewächshaus-Bedingungen für das „leaf flattening“ von Bedeutung ist (in abgeschwächter Form, s. Ergebnisse). Unter „low fluence rates“ ist RPT2 ebenfalls involviert. PHOTs initiieren durch primäre Autophosphorylierungen zum Teil alleine („low fluence rate“ – PHOT1), zum Teil parallel („high fluence rate“ – PHOT1 und PHOT2) das „Downstream-Signaling“ bzgl. der Blatt-Entwicklung und -Positionierung. PKS-Proteine (hauptsächlich

PKS2) weisen hinsichtlich des „Signalings“ eine synergistische bzw. komplementäre Wirkung mit/zu NPH3 auf.

Dass eine Beteiligung von 14-3-3 Proteinen bzw. deren Interaktion mit NPH3 hinsichtlich der Blatt-Spreitung ebenfalls von physiologischer Relevanz ist, war bis jetzt unbekannt. Wie genau 14-3-3 Proteine über ihre Bindung an spezifische „Targets“ (NPH3, RPT2, PHOT1/2, PKSs etc.) das „leaf flattening“ auf molekularer Ebene regulieren, lässt sich aufgrund der vorliegenden Daten nicht ergründen. Zwar wurde die Beteiligung und Funktion einzelner Proteine hinsichtlich der Blatt-Spreitung in distinkten Aspekten analysiert, wie aber der Gesamtprozess durch die vermeintliche Ausbildung eines multimeren Protein-Komplexes (mögliche Signal-Integration) und die weiterführende Signaltransduktion auf „Downstream“-Elemente stattfindet, ist bis dato noch nicht detailliert aufgeklärt.

4.4.2 Auswirkungen der 14-3-3/NPH3-Interaktion auf die BL-abhängige Inhibierung des Hypokotyl-Wachstums

BL inhibiert sehr rasch das Hypokotyl-Wachstum von etiolierten *Arabidopsis*-Keimlingen. Eine erste, PHOT-abhängige, schnelle Inhibierung ist schon kurze Zeit nach Bestrahlung mit hohen BL-Intensitäten (nach ca. 30 min) ersichtlich; eine durch die Aktivierung von spezifischen Anionen-Kanälen bewerkstelligte Depolarisierung der PM, ein transienter Anstieg der zyttoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration sowie eine Verzögerung der relativen Wachstums-Rate der Hypokotyle sind schon wenige Sekunden nach BL-Irradiation (nach ca. 30 s) zu detektieren (Parks et al., 1998; Folta and Spalding, 2001). Auch Phytochrome, im speziellen phyA, sind für die Inhibierung des Hypokotyl-Wachstums unter BL mitverantwortlich (Parks and Spalding, 1999; Lariguet and Fankhauser, 2004); wie der molekulare Mechanismus jedoch im Detail funktioniert, ist noch unbekannt.

Welche Relevanz NPH3 bzw. eine Interaktion von NPH3 mit 14-3-3 hinsichtlich der Inhibierung des Hypokotyl-Wachstums durch niedrige BL-Intensitäten über einen längeren Zeitraum hat (bislang in der Literatur nicht detailliert beschrieben), wurde durch die Analyse der Hypokotyl-Längen von Keimlingen der eingesetzten Linien nach Abschluss der phototropen Reaktion eruiert (s. Ergebnisse). Hypokotyle von Keimlingen der *nph3-8*-„knockout“-Linie waren nach 8 h Exposition mit unilateralem BL ($1 \mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) im Vergleich zum WT (Col-0) signifikant länger. Die Komplementations-Linie (*nph3-8+NPH3*) konnte den wildtypischen Phänotyp wieder vollständig herstellen. Die Transformations-Linie mit der mutierten NPH3-Sequenz (*nph3-8+NPH3-S743A*) wies demgegenüber einen intermediären Phänotyp auf; ihre Hypokotyl-Länge lag zwischen der der *nph3-8*-„knockout“- und der WT-Linie (Col-0, s. Ergebnisse). Die Inhibierung des Hypokotyl-Wachstums durch BL-Irradiation wird demnach durch die Unfähigkeit von NPH3, mit 14-3-3 Proteinen zu interagieren (NPH3-S743A), deutlich beeinträchtigt.

Folta and Spalding (2001) führten ebenfalls Experimente bzgl. der Beteiligung von NPH3 an der BL-induzierten Inhibierung des Hypokotyl-Wachstums durch, jedoch wichen ihre Versuchs-Bedingungen von unseren erheblich ab. Sie bestrahlten die Keimlinge für 2 h mit einer BL-Intensität von $80 \mu\text{Mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ („high fluence rate“); unter diesen Gegebenheiten sind beide BL-Rezeptoren (PHOT1/2) redundant für die Perzeption der hohen BL-Intensitäten verantwortlich und bewerkstelligen die entsprechenden Reaktionen zur Inhibierung des Hypokotyl-Wachstums. In unseren Experimenten setzten wir die Keimlinge für 8 h unilateralem BL der Intensität $1 \mu\text{Mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ („low fluence rate“) aus; bzgl. diesen niedrigen BL-Intensitäten ist nur PHOT1 für die Initiierung der Inhibierungs-Reaktionen maßgeblich. Hinsichtlich der Depolarisierung der PM, des Anstiegs der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und der Verzögerung der relativen Wachstums-Rate der Hypokotyle war NPH3 unter Starklicht-Bedingungen entbehrlich; *nph3*-„loss-of-function“-Mutanten reagierten wie wildtypische Pflanzen (Col-0 (Folta and Spalding, 2001)). In unseren Experimenten waren signifikante Unterschiede in den Hypokotyl-Längen der unterschiedlichen Linien ersichtlich, die durch Transformation der *nph3*-„knockout“-Linie mit dem wildtypischen NPH3-Protein vollständig komplementiert werden konnten (s. Ergebnisse).

Wie bereits erwähnt, wirken die beiden PHOTs in *Arabidopsis* teilweise redundant; PHOT1 vermittelt Reaktionen auf äußerst niedrige bis sehr hohe BL-Intensitäten, während PHOT2 nur bei höheren Intensitäten bedeutsam ist (Kinoshita et al., 2001; Sakai et al., 2001; Inoue et al., 2008). Die Unterschiede in der Gewebe-spezifischen Expression, der Expressions-Stärke bzw. in den N-terminal gelegenen photosensorischen LOV-Domänen der Proteine sind vermutlich für die höhere Sensitivität von PHOT1 gegenüber sehr geringen Intensitäten ausschlaggebend (Aihara et al., 2008). Unter hohen BL-Intensitäten ($100 \mu\text{Mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) ist hauptsächlich PHOT2, zu einem weniger großen Anteil jedoch auch PHOT1, für den transienten Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in *Arabidopsis*-Hypokotylen verantwortlich. Pharmakologische und genetische Experimente illustrieren, dass der durch hohe BL-Intensitäten induzierte Ca^{2+} -Anstieg über PHOT1 und/oder PHOT2 unterschiedlich moduliert wird; PHOT2 vermittelt den zytosolischen Ca^{2+} -Anstieg hauptsächlich über eine Freisetzung aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern (Vakuole, ER), wohingegen PHOT1 PM-lokalisierte Ca^{2+} -Kanäle aktiviert, wodurch apoplastisches Ca^{2+} in die Zelle gelangt (Zhao et al., 2013). Die Applikation von Ca^{2+} -Chelatoren an BL-induzierten Keimlingen verhindert den zytoplasmatischen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration und die PHOT1/2-abhängigen schnelle Inhibierung des Hypokotyl-Wachstums, jedoch nicht den PHOT1-vermittelten Phototropismus während der ersten 120 Minuten (Folta et al., 2003).

Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die schnellen und die verzögert stattfindenden BL-induzierten Inhibierungs-Reaktionen getrennte Prozesse darstellen; für die primär ablaufenden schnellen Reaktionen (Depolarisierung der PM, Aktivierung der Ca^{2+} -Kanäle und Verzögerung der relativen

Wachstums-Rate der Hypokotyle) wird NPH3 nicht benötigt, für die darauffolgenden Reaktionen (längerfristige Etablierung der Inhibierung des Hypokotyl-Wachstums, phototrope Reaktion des Hypokotyls) ist NPH3 und dessen Interaktion mit 14-3-3, zumindest unter niedrigen BL-Intensitäten, essentiell. Wie die entsprechenden Prozesse im Detail auf molekularer Ebene bewerkstelligt werden, ist noch unklar.

4.4.3 Auswirkungen der 14-3-3/NPH3-Interaktion auf die BL-abhängige positive phototrope Reaktion des Hypokotyls

Die BL-Perzeption und die dadurch initiierte Signaltransduktion über die daran beteiligten Elemente hat intrazellulär eine Relokalisation von PIN-Proteinen in der PM zur Folge; die daraus resultierende Etablierung eines Auxin-Gradienten über den Spross-Querschnitt führt zu einem differentiellen Streckungs-Wachstum der entsprechend positionierten Zelle/n und so letztendlich zu einem gerichteten Wachstum des jeweiligen Pflanzen-Organes (positiver Phototropismus des Sprosses, negativer Phototropismus der Wurzel).

Um die Beteiligung von NPH3 bzw. die Relevanz der 14-3-3/NPH3-Interaktion bzgl. der positiven phototropen Reaktion des Hypokotyls unter niedrigen BL-Intensitäten zu analysieren, wurden etiolierte Keimlinge des Wildtyps (Col-0) und der bereits beschriebenen transgenen *Arabidopsis*-Linien mit unilateralem BL bestrahlt und ihre diesbezügliche Reaktion (Hypokotyl-Krümmung) sowohl qualitativ als auch quantitativ ausgewertet (s. Ergebnisse). Die für unsere Versuche verwendete *nph3-8*-„knockout“-Linie wies nach unilateraler BL-Bestrahlung (8 h, $1 \mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, niedrige BL-Intensität) keine positive phototrope Reaktion des Hypokotyls auf. Wildtypische Keimlinge (Col-0) reagierten dagegen „voll“ phototrop, ihr Hypokotyl-Winkel lag nach Abschluss der Reaktion bei ca. 100° . Die Komplementations-Linie (*nph3-8+NPH3*) konnte den WT-Phänotyp wieder vollständig herstellen. Keimlinge der Transformations-Linie mit der mutierten NPH3-Sequenz (*nph3-8+NPH3-S745A*) wiesen einen intermediären Phänotyp auf; die Krümmung der Hypokotyle in Richtung der BL-Quelle war im Ansatz ersichtlich, der Grad der Krümmung war aber im Vergleich zum WT (Col-0) signifikant geringer; demzufolge war keine vollständige Komplementation der *nph3-8*-„knockout“-Linie möglich (s. Ergebnisse).

Der durch niedrige BL-Intensitäten hervorgerufene, intermediäre Phänotyp beruht evtl. auf einer verminderten Affinität von 14-3-3 gegenüber dem veränderten NPH3-Protein (NPH3-S743A). Im Hefe-2-Hybrid-System hatte der AS-Austausch eine vollständige Inhibierung des Hefe-Wachstums zur Folge; das C3-Fragment von NPH3 (die C-terminal letzten 51 AS, beinhaltet das 14-3-3 Bindemotiv) war jedoch nicht mehr eigenständig zur Interaktion mit 14-3-3 befähigt. (s. Ergebnisse). Dies lässt die Annahme zu, dass bei NPH3, äquivalent zu den PM-ständigen H^+ -ATPasen (PMAs, AHAs (Jelich-Ottmann et al., 2001; Fuglsang et al., 2003)), noch weitere Domänen für die Interaktion mit 14-3-3

Proteinen nötig sind; eine exklusive Mutation des 14-3-3 Bindemotivs scheint die Ausbildung des Komplexes *in planta* nicht vollständig zu unterbinden und eine reduzierte Signaltransduktion bzw. darauffolgende intermediäre phototrope Reaktion der Keimlinge kann demnach bewerkstelligt werden.

Wie schon beschrieben, wurde NPH3 ursprünglich in einem „Screen“ nach Mutanten mit veränderter phototroper Reaktion des Hypokotyls identifiziert (Khurana and Poff, 1989); die Mutante reagierte sowohl unter niedrigen als auch unter hohen BL-Intensitäten nicht mehr phototrop. NPH3 interagiert über den C-terminalen Bereich („Coiled Coil“-Domäne) mit dem N-terminalen/mittleren Bereich von PHOT1 (s. Einleitung, LOV1+LOV2-Domäne, via Y2H und Co-IP (Motchoulski and Liscum, 1999)).

PHOT1 wurde im gleichen „Screen“ wie NPH3 identifiziert (Khurana and Poff, 1989); die Mutante reagierte unter niedrigen BL-Intensitäten nicht mehr phototrop (Liscum and Briggs, 1995; Huala et al., 1997). PHOT2, das die phototrope Reaktion unter höheren BL-Intensitäten redundant mit PHOT1 bewerkstelligt, wurde erst später als weiterer BL-Rezeptor identifiziert (Jarillo et al., 2001). Eine *phot1/2*-Doppel-Mutante wies sowohl unter „low fluence rates“ als auch unter „high fluence rates“ keine phototrope Reaktion des Hypokotyls mehr auf (Sakai et al., 2001).

Im Dunkeln liegt NPH3 PM-assoziert und offensichtlich phosphoryliert vor; BL-Irradiation hat eine Dephosphorylierung zur Folge („Shift“ via SDS-PAGE ersichtlich (Motchoulski and Liscum, 1999; Lariguet et al., 2006; Tsuchida-Mayama et al., 2008; Haga et al., 2015)). In der *phot1*-Mutante findet diese Dephosphorylierung nicht mehr statt; eine Protein-Phosphatase des PP1- oder PP2A-Typs, die PHOT1-abhängig aktiviert wird, scheint hier verantwortlich zu sein (Pedmale and Liscum, 2007). Eine BL- bzw. PHOT1-abhängige Dephosphorylierung konnte für drei Serine, die zwischen der BTB/POZ- und der NPH3-Domäne von NPH3 lokalisiert sind (S212, S222, S236), bestätigt werden; Mutationen dieser Serine (Serin zu Alanin, Einzel-, Doppel- und Triple-Austausch/e, *nph3-7*-Hintergrund) hatten jedoch keine Auswirkungen auf die phototrope Reaktion der Keimlinge, d. h., sie sind diesbezüglich funktionell nicht von Bedeutung (Tsuchida-Mayama et al., 2008). Ein Alignment der AS-Sequenz dieses Bereichs bestätigt das konservierte Vorkommen dieser Serine in Homologen von NPH3 aus anderen Pflanzenspezies (z.B. aus *O. sativa* (CPT1 – „COLEOPTILE PHOTOTROPISM 1“), *M. truncatula*, *V. vinifera* und *L. japonicus*), innerhalb der NRLs von Arabidosis sind sie jedoch nur zu einem Teil konserviert (S212 (4/33), S222 (6/33), S236 (4/33) (Tsuchida-Mayama et al., 2008)). Über die Relevanz dieser Phosphorylierungsstellen hinsichtlich möglicher Interaktionen mit anderen Proteinen wird spekuliert.

Die Entdeckung, dass PHOT1 Licht- und Phosphorylierungs-abhängig mit 14-3-3 Proteinen interagiert, führte schon früh zu der Annahme, dass 14-3-3 Proteine hinsichtlich der phototropen Reaktion eine regulatorische Funktion ausüben. Durch die Identifizierung des 14-3-3 Bindemotivs in PHOT1 („Linker/Hinge“-Region zwischen den beiden LOV-Domänen, S350 und S376 bzw. S410) und die

darauffolgende Mutation von zwei der drei zur Interaktion mit 14-3-3 benötigten Bindestellen (S350A/S376A), schlossen Inoue et al. (2008), dass die Unfähigkeit von PHOT1 mit 14-3-3 zu interagieren, keinen Effekt auf PHOT1-vermittelte Reaktionen hat. Ein N-terminal um 447 AS verkürztes PHOT1-Protein (Deletion des N-Terminus, der LOV1-Domäne sowie der „Hinge“-Region (14-3-3 Bindestelle)) konnte die phototrope Reaktion ebenfalls noch vermitteln (Kinoshita et al., 2003; Inoue et al., 2008; Sullivan et al., 2008; Sullivan et al., 2009).

Das „Dogma“ der Dephosphorylierung von NPH3 nach BL-Irradiation sollte unter Einbezug der publizierten Daten und unserer Ergebnisse durchaus kritisch diskutiert werden. Es steht außer Frage, dass NPH3 nach BL-Bestrahlung PHOT1-abhängig dephosphoryliert wird, allerdings ist die Phosphorylierung des Serins im extremen C-Terminus für die Interaktion von NPH3 mit 14-3-3 essentiell (s. Einleitung, s. Ergebnisse). Während der Triple-Austausch der nach BL-Bestrahlung dephosphorylierten Serine keine Auswirkungen auf die phototrope Reaktion der Keimlinge hatte (Tsuchida-Mayama et al., 2008), konnte durch den Einzel-Austausch des Serins im 14-3-3 Bindemotiv von NPH3 (*nph3-8+NPH3-S743A*) eine signifikante Reduktion des phototropen Reaktions-Vermögens beobachtet werden (s. Ergebnisse).

Unsere FRET-FLIM-Analysen zwischen NPH3 und 14-3-3 wurden in Blatt-Epidermis-Zellen von Tabakpflanzen, die bis unmittelbar vor dem Experiment in Licht gehalten wurden, durchgeführt. Das Durchlicht und die Anregung des mGFP4 durch den Argon-Laser (488 nm) am Mikroskop (CLSM) stellen ebenfalls exogene Signale dar, die Auswirkungen auf den Phosphorylierungs-Status von NPH3 haben könnten. Die 14-3-3/NPH3-Interaktion war unter den gegebenen Bedingungen positiv (Reduktion der Fluoreszenz-Lebensdauer des mGFP4, s. Ergebnisse). Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass NPH3 nach bzw. unter Belichtung an Position S743 phosphoryliert vorliegt. Die Bestätigung dieser Licht-abhängigen Phosphorylierung und die Identifizierung der dafür verantwortlichen Kinase könnten hinsichtlich der Aufklärung des molekularen Mechanismus äußerst hilfreich sein, jedoch ist die Verifizierung der Phosphorylierung methodisch sehr anspruchsvoll, da das durch Trypsin-Verdau des Volllängen-Proteins entstehende C-terminale Peptid nur aus vier AS (...NS_(p)IS-COOH) besteht und deshalb via Massenspektroskopie (MS/MS) schwer zu detektieren ist. Trotz dieser Schwierigkeiten, konnte von Umezawa et al. (2013) eine durch ABA und Trockenstress induzierte Veränderung des Phosphorylierungs-Status (Dephosphorylierung) von NPH3 an dieser Position nachgewiesen werden; das spricht dafür, dass das verantwortliche Serin *in vivo* phosphoryliert wurde und dies prinzipiell *in planta* möglich ist bzw. stattfindet.

Diese Ergebnisse und Informationen lassen die Mutmaßung zu, dass NPH3, neben der multiplen Dephosphorylierung nach entsprechender Stimulation der Pflanzen (BL-Irradiation), ggf. gleichzeitig an anderen Positionen, darunter evtl. S743, phosphoryliert wird (s. Abbildung 43 **A**); das heißt, der

„Shift“ des Proteins im SDS-Gel muss als Indiz für eine alleinige Dephosphorylierung als „nicht eindeutig“ gewertet werden.

Alternativ kann auch über eine Dephosphorylierung einer die 14-3-3 Assoziation inhibierenden Phosphorylierungs-Stelle durch eine Phosphatase spekuliert werden (s. Abbildung 43 **B**). Dieses Szenario ist z.B. für die PM-ständigen H⁺-ATPasen (AHAs, PMAs) bekannt, bei denen zusätzliche Phosphorylierungs-Stellen in der C-terminalen autoinhibitorischen Domäne sowohl unterstützend als auch inhibierend auf die 14-3-3 Interaktion wirken (Fuglsang et al., 2007; Speth et al., 2010).

Neben NPH3 ist auch RPT2 hinsichtlich der phototropen Reaktion von Bedeutung. RPT2 wurde in einem „Screen“ als „loss-of-function“-Mutante (*rpt2-1*) bzgl. der negativen phototropen Reaktion der Wurzel auf BL identifiziert (Okada and Shimura, 1992, 1992). Die Mutante wies bei äußerst geringen BL-Intensitäten eine schwache positive phototrope Reaktion des Hypokotyls auf, interessanterweise schwächte sich die Reaktion aber mit Zunahme der Intensität immer weiter ab (Sakai et al., 2000); RPT2 ist somit als weitere/s Signaltransduktions-Element bzw. regulatorische Komponente an der PHOT1-induzierten phototropen Reaktion beteiligt. Analog zu NPH3 und PHOT1, wurde RPT2 in Mikrosomen-Fractionen von *Arabidopsis* nachgewiesen. Das Protein bildet mit PHOT1 über seinen N-terminalen Bereich einen Komplex aus (Inada et al., 2004; Sullivan et al., 2009; Haga et al., 2015) und interagiert ebenfalls über den N-Terminus mit NPH3 (Y2H-Studien, Hetero-Dimerisierung über die BTB/POZ-Domänen der beiden Proteine (Inada et al., 2004; Haga et al., 2015)).

Der starke Anstieg der PKS1-Expression in der Elongationszone des Hypokotyls unter BL war Anlass, die Funktion der gesamten PKS-Gen/Protein-Familie bzgl. des Phototropismus zu untersuchen; multiple *pks*-Mutanten (*pks1/2*, *pks2/4*, *pks1/4*, *pks1/2/4*) wiesen bei niedrigen BL-Intensitäten ($0,1 \mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) eine deutliche Reduktion bzw. vollständigen Verlust ihrer phototropen Reaktion auf. Des Weiteren interagiert PKS1 mit PHOT1 und NPH3 *in vivo* (Co-IPs von mikrosomalen Fractionen) und *in vitro* (Co-IPs von rekombinant- bzw. *in vitro*-transkribierten/translatierten Proteinen). Dies lässt vermuten, dass PKS-Proteine im Zusammenspiel mit PHOT1 und NPH3 die phototrope Reaktion bewerkstelligen (Lariguet et al., 2006).

Ein weiteres Protein, EHB1 („enhanced bending 1“), wurde als IP des PHOT1/NPH3-Komplexes identifiziert (Y3H-Sichtung) und agiert als negativer Regulator hinsichtlich der positiven phototropen Reaktion des Hypokotyls unter BL-Bestrahlung; die Mutante (*ehb1-2*) wies nach BL-Irradiation, im Vergleich zum Wildtyp, eine verstärkte Krümmung des Hypokotyls auf, hatte einen erniedrigten Schwellenwert bzgl. der phototropen Reaktion (die physiologisch aktive Licht-Intensität („fluence rate“) war um den Faktor 10 kleiner) und zeigte zusätzlich eine beschleunigte zweite positive phototrope Reaktion des Hypokotyls. Die EHB1/NPH3-Interaktion findet über den N-Terminus von NPH3 (BTB/POZ-Domäne) statt und ist auch ohne PHOT1 möglich; im Gegensatz dazu ist eine EHB1/PHOT1-Interaktion in Abwesenheit von NPH3 nicht möglich (Y2H-Studien). EHB1 besitzt eine

N-terminal lokalisierte C2-Domäne, die im Ca^{2+} -„Signaling“ (Ca^{2+} -Perzeption) eine Rolle spielt und die ebenfalls für die Assoziation von Proteinen an intrazelluläre Membran-Systeme verantwortlich ist; das Ca^{2+} -bindende Motiv könnte für den PHOT1-abhängigen Ca^{2+} -Influx ausschlaggebend sein. An seinem C-Terminus weist EHB1 eine nicht charakterisierte Domäne auf, die auch bei ARF-GAP Proteinen vorkommt; eine Kompetition von EHB1 mit ARF-GAPs hinsichtlich einer Beteiligung im Vesikel-„Trafficking“ wird deshalb diskutiert. Dies könnte ein möglicher Regulations-Mechanismus bzgl. der Relokalisation von „PIN-FORMED“-Proteinen in der PM darstellen (Knauer et al., 2011).

Diverse in der Literatur beschriebene *nph3*-„knockout“/„loss-of-function“-Mutanten (u.a. *nph3-8*, s. Ergebnisse) sind bzgl. BL „blind“; sie können sowohl unter niedrigen als auch unter hohen BL-Intensitäten keine phototrope Reaktion mehr bewerkstelligen. Die in unseren Versuchen eingesetzte Komplementations-Linie (*nph3-8+NPH3*), konnte den „knockout“-Phänotyp vollständig komplementieren. Bemerkenswert ist allerdings die direkte Beteiligung von 14-3-3 Proteinen an der phototropen Reaktion über die NPH3-Interaktion; die Transformations-Linie mit der mutierten NPH3-Sequenz (*nph3-8+NPH3-S743A*) war funktional beeinträchtigt und konnte den wildtypischen Phänotyp nur partiell wiederherstellen (s. Ergebnisse).

Im Gegensatz zur PHOT1/14-3-3 Interaktion, die für diesen Prozess funktional unerheblich ist, ist die Interaktion von NPH3 und 14-3-3 für eine korrekte Durchführung der phototropen Reaktion essentiell und somit physiologisch von Bedeutung.

4.5 Zellbiologische Auswirkungen von diversen Stimuli auf die NPH3-Lokalisation

Um Entwicklungs-bezogene und physiologische Prozesse auf Organismus-, Organ- und Gewebe-Ebene bewerkstelligen zu können, müssen zuvor auf zellulärer Ebene diverse intra- und inter-molekulare Reaktionen stattfinden. So hat z.B. die primäre BL-Perzeption durch PHOTs eine Autophosphorylierung der Rezeptor-Kinasen sowie eine Trans-Phosphorylierung spezifischer „Downstream“-Substrate zur Folge, was dann die Signaltransduktion hinsichtlich diverser BL-abhängiger zellulärer Antworten initiiert; im Zell- und Gewebe-Verband führt dies zu den entsprechenden Reaktionen der Organe (Spross, Wurzel, Blatt, Petiolus etc.).

Mit posttranslationalen Protein-Modifikationen gehen zum Teil Veränderungen hinsichtlich der subzellulären Lokalisation der Proteine einher; unter bestimmten Bedingungen werden PM-ständige bzw. PM-assoziierte Proteine nach entsprechender Modifikation (Phosphorylierung, Ubiquitinierung etc.) internalisiert (Clathrin-abhängig/unabhängig), sortiert (z.B. über das TGN) und dann entweder degradiert (über die lytische Vakuole bzw. das 26S-Proteasom) oder aber wieder an die PM rezykliert. Diese Prozesse bestimmen, neben der Neusynthese, die Abundanz der Proteine an/in

spezifischen Membranen und Kompartimenten, was hierdurch teilweise direkten regulatorischen Einfluss auf die Protein- bzw. Enzym-Aktivität hat.

4.5.1 Auswirkungen der BL-Irradiation und Brefeldin A- bzw. Cantharidin-Applikation auf die subzelluläre Lokalisation von NPH3

BL-abhängige Veränderungen der subzellulären Lokalisation wurden sowohl für PHOT1 als auch für PHOT2 beschrieben (s. Einleitung). Inwieweit „Downstream-Signaling“-Elemente dieser Rezeptor-Kinasen, im Speziellen NPH3, solchen Licht-abhängigen Veränderungen unterworfen sind bzw. werden, wurde anhand von Fusions-Proteinen (35S-Promotor, C-terminaler mGFP4-Tag) in den Hypokotylen etiolierter Keimlinge (für den Phototropismus relevanter Bereich) stabil-transformierter *Arabidopsis*-Linien (Col-0) untersucht. Das NPH3:mGFP4-Fusions-Protein dissoziierte unter Irradiation am Mikroskop innerhalb kürzester Zeit von der PM der Zellen und bildete zytoplasmatische globuläre Strukturen aus (s. Ergebnisse). Überraschenderweise verblieb das mutierte NPH3-Protein (NPH3-S743A:mGFP4) auch unter Belichtung an der PM; eine Dissoziation war über die detektierte Zeitspanne (ca. 10 min) nicht bzw. nur marginal ersichtlich. Die N- und C-terminal verkürzten Versionen von NPH3 (NPH3- Δ N146:mGFP/- Δ C51/N2:mGFP4) lagen schon vor Irradiation größtenteils zytoplasmatisch in globulären Strukturen vor; das Durchlicht bzw. die BL-Bestrahlung hatte dementsprechend keine Auswirkungen auf die subzelluläre Lokalisation der verkürzten Proteine. Eine Auflösung der zytoplasmatischen Strukturen und Reassoziierung des wildtypischen Proteins (NPH3:mGFP4) nach einer gewissen Refraktär-Zeit an die PM liegt durchaus im Bereich des Möglichen bzw. wurde von Haga et al. (2015) über eine längere Zeitspanne (24 h) auch detektiert, hinsichtlich dessen wurden von uns jedoch keine ausgedehnten Experimente durchgeführt (die maximale Irradiations-Dauer am CLSM lag bei ca. 20 min).

Neben den PM-assoziierten Proteinen PHOT1/2 und NPH3, finden Internalisierungs-Prozesse auch bei integralen PM-Proteinen, wie z.B. den PIN-Proteinen, den Aquaporinen (PIPs) und den Rezeptor-ähnlichen Kinasen (LRR-RLKs (z.B. BRI1, FLS2)) statt (Sakamoto and Briggs, 2002; Knieb et al., 2004; Wan et al., 2008; Kaiserli et al., 2009; McCaffrey and Macara, 2009; Lu et al., 2011; Antolin-Llovera et al., 2014; Luschnig and Vert, 2014; Chevalier and Chaumont, 2015; Haga et al., 2015; Martins et al., 2015). Die verantwortlichen Stimuli für die Internalisierung können zum einen endogenen Charakter haben, wie z.B. Hormone bei den LRR-RLKs (Brassinosteroide bei BRI1), oder können exogene Faktoren, wie z.B. PAMPs („pathogen associated molecular patterns“) und Nod-Faktoren bei den LRR-RLKs (flg22 und Noduline bei FLS2) sowie Licht (BL) bei den PHOTs und NPH3, darstellen.

Zur Analyse der spezifischen „Trafficking“-Routen und dem Verbleib der Proteine nach Endozytose bzw. Internalisierung (subzelluläre Lokalisation, Zielort) werden verschiedene Methoden bzw. eine Kombination aus ihnen angewendet. Die Koexpression der zu analysierenden Proteine mit

entsprechenden Marker-Proteinen, deren subzelluläre Lokalisation bekannt ist, wird oftmals als ein geeignetes Instrument eingesetzt; so markieren z.B. ARA6 und ARA7 frühe und späte Endosomen (Ueda et al., 2001; Ueda et al., 2004); SYP31, SYP41 und SYP61 „labeln“ den Cis/Trans-Golgi-Apparat und das TGN (Uemura et al., 2004). Die Applikation unterschiedlicher pharmakologisch wirksamer Substanzen zur Blockierung spezifischer „Trafficking“-Wege bietet eine Möglichkeit, detaillierte Aussagen zur Art und Weise der Internalisierung zu machen; so interagiert z.B. Brefeldin A (BFA) mit ARF-GEFs (z.B. GNOM, BIG-Familie (Richter et al., 2007)) und inhibiert hierdurch die Rezyklierung von Proteinen zur PM bzw. verhindert in hohen Konzentrationen den Protein-Transport vom TGN zur Vakuole (Baluska et al., 2002; Brandizzi et al., 2002; Nebenfuhr et al., 2002; Ritzenthaler et al., 2002); Wortmannin ist ein Phosphoinositid-3-Kinasen-(PI3Ks)-Inhibitor und blockiert bei Pflanzen in geringen Konzentrationen die Rezeptor-vermittelte Endozytose bzw. in höheren Konzentrationen den vakuolären Protein-Transport (Matsuoka et al., 1995; daSilva et al., 2005; Robinson et al., 2008; Wang et al., 2009).

PHOT1 lokalisiert im Dunkeln primär an der PM pflanzlicher Zellen; nach BL-Irradiation wird ein gewisser Anteil internalisiert und bildet punktförmige, mosaikartige Strukturen im Zytosol aus (Sakamoto and Briggs, 2002; Knieb et al., 2004; Wan et al., 2008; Kaiserli et al., 2009). Ein sehr geringer Anteil wird nach BL-Behandlung an der äußeren Chloroplasten-Membran aufgefunden (Kong et al., 2013). Für PHOT2, das im Dunkeln ebenfalls PM-assoziert vorliegt, konnte eine BL-abhängige Internalisierung und Assoziation an den Golgi-Apparat und an die äußere Chloroplasten-Membran nachgewiesen werden (Kong et al., 2006; Kong et al., 2013; Aggarwal et al., 2014). Interessanterweise korreliert die Assoziation an die Chloroplasten-Membran mit den Ergebnissen, dass PHOT2 exklusiv Chloroplasten-Bewegungen, wie z.B. die Chloroplasten-Vermeidungs-Reaktion, reguliert und dass die C-terminale Kinase-Domäne von PHOT2 alleine und im Dunkeln konstitutiv PHOT2-abhängige Reaktionen, wie z.B. die Stomata-Öffnung und die Chloroplasten-Vermeidungs-Reaktion, bewerkstelligen kann (Kong et al., 2007). Dies weist, trotz der hohen Redundanz von PHOT1 und PHOT2 hinsichtlich BL-induzierter Reaktionen, auf die funktionale Spezifität von PHOT2 bzgl. dieser Prozesse hin.

Die vergleichende Analyse des PHOT1/2-Gehalts (via Immuno-Detektion) vor und nach BL-Irradiation in zytosolischen und Membran-stammenden Fraktionen aus Protein-Aufreinigungen diverser Pflanzen-Spezies ergab, dass nur ca. 20 % der PHOTs durch BL-Bestrahlung internalisiert werden, ca. 80 % verbleiben an der PM (Knieb et al., 2004).

Die Akkumulation von PHOT1/2 und diversen PIN-Proteinen nach Applikation von BFA in sog. BFA-Kompartimenten (BFA inhibiert die Rezyklierung an die PM bzw. den Transport vom TGN zur Vakuole und initiiert die Ausbildung dieser Kompartimente) weist darauf hin, dass die Endozytose dieser Proteine Clathrin-abhängig abläuft (Dhonukshe et al., 2007; Kleine-Vehn et al., 2008; Wan et

al., 2008; Kaiserli et al., 2009; Sullivan et al., 2010). Darüber hinaus konnte eine direkte Interaktion von PHOT2 und der leichten Clathrin-Kette aufgezeigt werden (Aggarwal et al., 2014).

Die BL-abhängige Aktivierung von PHOT1 findet über Autophosphorylierungs-Prozesse statt (s. Einleitung (Inoue et al., 2008)). BLUS1 („BLUE LIGHT SIGNALING 1“), eine Kinase, die bzgl. der Stomata-Öffnung eine wichtige regulatorische Rolle spielt, wurde als direktes „Target“ der PHOTs nach BL-Irradiation identifiziert (Takemiya et al., 2013). Ein ähnlicher Mechanismus, eine Aktivierung über eine Kinase-Abfolge, könnte auch bzgl. der Internalisierung von NPH3 nach BL-Irradiation von Bedeutung sein (s. Abbildung 43 A).

Hinsichtlich einer Dephosphorylierung der PHOTs wird die Beteiligung von RCN1 (regulatorische Untereinheit einer Ser/Thr-Phosphatase des PP2A-Typs) und PRSL1 („PP1 regulatory subunit2-like protein1“, regulatorische Untereinheit einer Phosphatase des PP1C-Typs) diskutiert (Tseng and Briggs, 2010; Takemiya et al., 2013).

In Bezug auf zusätzliche posttranslationale Modifikationen konnte eine Ubiquitinierung von PHOT1 auf BL-Irradiation gezeigt werden (Roberts et al., 2011). Interessanterweise agiert NPH3 als Substrat-Adapter-Protein in dem CULLIN3-basierenden E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex CRL3^{NPH3}, der für die Ubiquitinierung von PHOT1 verantwortlich ist. Der Ubiquitinierungs-Status wird über die Intensität des applizierten BL moduliert; mit ansteigenden Photonen-Flussdichten findet ausgehend von einer Mono-, eine fortschreitende Multi- bis Poly-Ubiquitinierung statt; diese dient als Signal für die Clathrin-abhängige Endozytose von PHOT1, worauf der BL-Rezeptor entweder zurück an die PM rezykliert oder differentiell abgebaut (26S-Proteasom, lytische Vakuole) wird. In der *nph3-6*-Mutante findet die Ubiquitinierung nicht mehr statt; somit ist eine direkte Interaktion zwischen PHOT1 und NPH3 für diesen Prozess notwendig.

Inwieweit und ob die Ubiquitinierung von PHOT1 sowie die darauffolgende Internalisierung bzw. Degradierung überhaupt eine funktionale Relevanz aufweist, ist jedoch fraglich. Durch die funktionale Analyse von über artifizielle Lipidanker (Myristoylation, Farnesylation) an der PM arretierter PHOTs konnte gezeigt werden, dass die an der PM fixierten Proteine alle BL-induzierten Prozesse in gleicher Art und Weise und identischer Ausprägung wie die wildtypischen BL-Rezeptoren vermitteln konnten (Preuten et al., 2015); die Arretierung hatte keine Auswirkungen auf die Aktivität und den Protein-„Turnover“ (Degradierung) der PHOTs. Die funktionale Bedeutung der PHOT-Internalisierung wird deshalb in Frage gestellt (Liscum, 2016).

Einen ähnlichen BL-abhängigen Effekt, wie er bei den PHOTs zu beobachten ist, konnten wir für NPH3 (C-terminales mGFP4-Fusions-Protein) in Hypokotylen von stabil-transformierten etiolierten *Arabidopsis*-Keimlingen beobachten; nach BL-Irradiation wird das zuerst PM-assozierte Protein internalisiert und bildet globuläre zytoplasmatische Strukturen aus (s. Ergebnisse (Haga et al., 2015)). Eine Kolokalisation mit FM[®] 4-64 (Endozytose-Tracer) in BFA-Kompartimenten wurde für

NPH3:mGFP4 und dessen Varianten (NPH3-S743A:mGFP4/ Δ N146:mGFP4/ Δ C51/N2:mGFP4) in etiolierten Keimlingen nach BFA-Applikation nicht festgestellt (s. Ergebnisse). Spekulationen über eine direkte Beteiligung von NPH3 an der Clathrin-abhängigen Internalisierung von PHOT1 (Roberts et al., 2011) konnten durch diese Ergebnisse und die Ergebnisse von Haga et al. (2015) nicht bestätigt werden. Dies deutet darauf hin, dass NPH3 auf einem anderen „Trafficking“-Weg als z.B. die PHOTs und die PINs (beide Clathrin-abhängig) internalisiert wird. Welche subzellulären Komponenten diese von NPH3-ausgebildeten Strukturen nach BL-Bestrahlung darstellen und welche Endozytose-Route hierfür benutzt wird, konnte von uns allerdings nicht detailliert aufgeklärt werden.

Die qualitative Analyse unserer CLSM-Bilder bzgl. der Abundanz von NPH3:mGFP4 und dessen Varianten an der PM bzw. in den globulären zytoplasmatischen Strukturen ergab, dass das wildtypische Protein nach 10 Minuten größtenteils (ca. 90 %) internalisiert wurde; das mutierte Protein (NPH3-S743A:mGFP4) verblieb über die detektierte Zeitspanne (ca. 10 min) fast vollständig an der Membran, nur ein marginaler Anteil wurde internalisiert (ca. 5 bis 10 %). Die beiden am C- und N-Terminus verkürzten Proteine (NPH3- Δ N146:mGFP4/ Δ C51/N2:mGFP4) lagen schon zu Beginn der Untersuchungen fast vollständig in den globulären Strukturen vor, nur ca. 5 bis 10 % lokalisierten an der PM (s. Ergebnisse).

Die Expression von RPT2 hat ebenfalls Auswirkungen auf die Ausbildung der zytosolischen Strukturen und den Phosphorylierungs-Status (moderater Effekt) von NPH3 (Haga et al., 2015); in der *rpt2*-Mutante bilden sich mehr und größere globuläre zytoplasmatische Strukturen (YFP:NPH3) als in wildtypischen Pflanzen aus. Haga et al. (2015) postulieren ein Modell, in dem RPT2 durch die Komplex-Ausbildung mit NPH3 ein „Fine-tuning“ bzgl. der Desensibilisierung von PHOT1 hinsichtlich des Übergangs von niedrigen zu hohen BL-Intensitäten vermittelt.

Interessanterweise findet in der *phot1*-Mutante die Internalisierung von NPH3 nach BL-Irradiation ebenfalls nicht mehr statt (Haga et al., 2015). Somit scheint sowohl die primäre Signaltransduktion, ausgehend von PHOT1, als auch die Interaktion von 14-3-3 mit NPH3 für die Internalisierung von NPH3 essentiell zu sein.

Dies lässt die Spekulation zu, dass NPH3 BL- und PHOT1-abhängig, evtl. über eine dazwischengeschaltete, PHOT1-regulierte Kinase, am C-terminalen 14-3-3 Bindemotiv phosphoryliert wird, dies zur 14-3-3 Assoziation führt und so letztendlich die Internalisierung von NPH3 bewerkstelligt werden kann (s. Abbildung 43 A).

Alternativ dazu wäre eine Dephosphorylierung von NPH3 durch eine BL- bzw. PHOT1-abhängige Phosphatase an einer anderen als für die 14-3-3 Interaktion verantwortlichen Phosphorylierungs-Stelle denkbar; dadurch könnte die inhibierende Funktion auf die 14-3-3 Assoziation aufgehoben und das 14-3-3 Bindemotiv zugänglich werden, was eine Interaktion mit 14-3-3 und darauffolgend eine Internalisierung und die weitere Signaltransduktion ermöglichen könnte (s. Abbildung 43 B).

Für die Phosphorylierung von NPH3 zwischen der BTB/POZ- und der NPH3-Domäne wird auf Grundlage von indirekten Hinweisen die Protein Kinase CK2 oder eine noch unbekannte MAP-Kinase verantwortlich gemacht (Marques-Bueno et al., 2011, 2011); eine diesbezüglich detaillierte Bestätigung steht aber noch aus. Die zuständige Kinase, die die BL-abhängige Phosphorylierung des C-Terminus von NPH3 durchführt, konnte bis dato ebenfalls nicht identifiziert werden; das im 14-3-3 Bindemotiv befindliche Serin (S743) wird aber als Folge von Trockenstress und ABA-Applikation dephosphoryliert (Umezawa et al., 2013).

Die Dephosphorylierung von NPH3 zwischen der BTB/POZ- und der NPH3-Domäne sowie am C-terminalen 14-3-3 Bindemotiv wird vermutlich von Phosphatasen des PP1- oder PP2A-Typs durchgeführt; Pedmale and Liscum (2007) konnten zeigen, dass die Applikation des Phosphatase-Inhibitors Cantharidin die BL-abhängige Dephosphorylierung von NPH3 inhibiert und zudem die phototrope Reaktion von etiolierten *Arabidopsis*-Keimlingen auf unilaterales BL unterbindet. Cantharidin inhibiert generell Phosphatasen des PP1- und PP2A-Typs (geringe Konzentrationen inhibieren PP2A, höhere Dosen inhibieren zusätzlich PP1 (Honkanen, 1993)); aufgrund dessen muss die pleiotrope unspezifische Wirkung dieses Inhibitors auf andere zelluläre Reaktionen berücksichtigt werden.

Für die Analyse des Internalisierungs-Prozesses von NPH3 setzten wir in unseren Experimenten ebenfalls Cantharidin ein; NPH3:mGFP4 bildete in etiolierten *Arabidopsis*-Keimlingen nach Cantharidin-Applikation, aber schon vor BL-Irradiation, globuläre zytoplasmatische Strukturen aus (s. Ergebnisse). Das heißt, die globale Inhibierung von Phosphatasen des PP1- und PP2A-Typs führte zur Internalisierung von NPH3 im Dunkeln; es war kein BL-Stimulus für diesen Prozess notwendig.

Dies lässt die Vermutung zu, dass die verantwortlichen Kinase, die NPH3 nach BL-Irradiation phosphoryliert, über eine zweite Licht-aktivierte Kinase (Photropine?) und eine Dunkel-aktivierte Cantharidin-sensitive Phosphatase (PP1/PP2A?) reguliert werden könnte (s. Abbildung 43 A).

Im Alternativ-Modell, in dem NPH3 nach BL-Bestrahlung durch eine Cantharidin-insensitive primäre Phosphatase (keine Phosphatase des PP1/PP2A-Typs, selbst über eine Licht-aktivierte Kinase (PHOTs?) und eine Dunkel-aktivierte sekundäre Phosphatase (PP1/PP2A?) reguliert) an einer anderen als für die 14-3-3 Assoziation verantwortlichen Position (auf die 14-3-3 Interaktion inhibierend wirkende Phosphorylierung) dephosphoryliert wird, müsste die sekundäre Phosphatase, um den Aktivitäts-Status der primären Phosphatase aufrecht zu erhalten, durch Cantharidin inhibiert werden können (s. Abbildung 43 B).

Interessanterweise bildet NPH3-S743A:mGFP4 nach Cantharidin-Applikation ebenfalls zytoplasmatische Strukturen aus (s. Ergebnisse). Die Tatsache, dass das nicht mehr zur Phosphorylierung-befähigte Protein nach Cantharidin-Anwendung trotzdem internalisiert wird, weist auf einen komplexen Mechanismus hin; evtl. spielen noch weitere Phosphorylierungs-Stellen in

anderen NPH3-Bereichen oder strukturelle Komponenten, die von den unterschiedlichen Domänen ausgebildet werden (BTB/POZ-, „Coiled Coil“-Domäne, NPH3- Δ N146:mGFP4/- Δ C51/N2:mGFP4 lokalisieren *per se* im Zytosol, s. Ergebnisse), hinsichtlich der Internalisierung entscheidende Rollen. Der tatsächliche Sachverhalt konnte von uns nicht detailliert aufgeklärt werden.

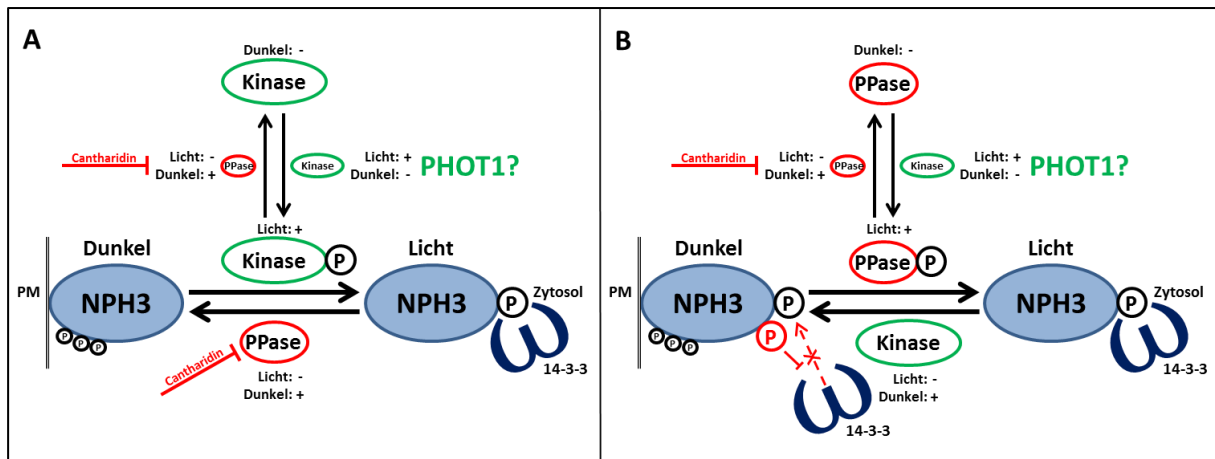


Abbildung 43 Modelle bzgl. der Internalisierung von NPH3 nach BL-Irradiation. **A** Modell 1: Eine über BL aktivierte Kinase (PHOT1?) phosphoryliert und aktiviert hierüber eine weitere Kinase, die für die Phosphorylierung von NPH3 am C-terminalen 14-3-3 Bindemotiv verantwortlich ist; die Phosphorylierung führt zur Assoziation von 14-3-3 und darauffolgend zur Internalisierung des Komplexes von der PM ins Zytosol. Im Gegensatz dazu führt Dunkelheit über Licht-regulierte Phosphatasen (PP2As?) zur Dephosphorylierung von NPH3 und der verantwortlichen Kinase (Inaktivierung), was die Reassoziierung von NPH3 an die PM zur Folge hat. Beide Dephosphorylierungs-Prozesse können über den Phosphatasen-Inhibitor Cantharidin inhibiert werden; somit lokalisiert NPH3 nach Cantharidin-Applikation auch im Dunkeln, noch vor BL-Irradiation, im Zytoplasma und assoziiert nicht an die PM. **B** Modell 2: Eine über BL aktivierte Kinase (PHOT1?) phosphoryliert und aktiviert hierüber eine Phosphatase, die für die Dephosphorylierung einer inhibierenden Phosphorylierungs-Stelle von NPH3 verantwortlich ist; die Dephosphorylierung führt dazu, dass das 14-3-3 Bindemotiv für die Assoziation von 14-3-3 wieder zugänglich wird. Nach 14-3-3 Assoziation erfolgt die Dissoziation und Internalisierung des Komplexes von der PM ins Zytosol. Im Gegensatz dazu führt Dunkelheit über eine Licht-regulierte Kinase zur Phosphorylierung von NPH3 und durch eine ebenfalls Licht-regulierte sekundäre Phosphatase zur Dephosphorylierung der verantwortlichen Phosphatase (Inaktivierung), was zur Reassoziierung von NPH3 an die PM führt. Die Dephosphorylierung (Inaktivierung) der verantwortlichen Phosphatase kann über den Phosphatase-Inhibitor Cantharidin unterbunden werden; somit lokalisiert NPH3 nach Cantharidin-Applikation auch im Dunkeln, noch vor BL-Irradiation, im Zytoplasma und assoziiert nicht an die PM.

Diverse an der Internalisierung von NPH3 direkt oder indirekt beteiligte Proteine sowie weitere an der BL-abhängigen Signaltransduktion involvierte Proteine sind IPs von 14-3-3 (z.B. PHOT1/2, RPT2, ENP/NPY1/MEL1 andere NRLs etc.).

Die Eliminierung des 14-3-3 Bindemotivs bei PHOT1 (Mutation von zwei der drei für die 14-3-3 Assoziation benötigten Bindestellen; PHOT1-S350A/S376A) hatte keine Auswirkungen auf BL-induzierte Prozesse wie z.B. den Phototropismus (Kinoshita et al., 2003; Inoue et al., 2008;

Sullivan et al., 2008). Wird allerdings die 14-3-3/NPH3-Interaktion durch eine Mutation bei NPH3 unterbunden, verbleibt das mutierte Protein (NPH3-S743A) an der PM. Die Internalisierung von NPH3 und des mutierten PHOT1-Proteins (PHOT1-S350A/S376A/S410A, keine 14-3-3 Assoziation mehr möglich) im Mutanten-Hintergrund wurde nicht untersucht (*phot1-5/phot2-1*+PHOT1-S350A/S376A/S410A±NPH3); dies wäre jedoch bzgl. der möglichen Ausbildung eines tri- oder oligomeren „Internalisierungs-Komplexes“, in dem 14-3-3 als Gerüst/„Scaffold“ bzw. „Linker“ zwischen den einzelnen Komponenten fungiert, von großem Interesse.

Eine Hetero-Dimerisierung bzw. Oligomerisierung von diversen NRLs (z.B. NPH3 und RPT2) über spezifische Domänen (BTB/POZ-Domäne) wäre ebenfalls möglich; dies könnte zur Rekrutierung spezifischer Kinasen (PHOT1?) führen, so Auswirkungen auf den Phosphorylierungs-Status der einzelnen Komponenten haben und hierüber deren subzelluläre Lokalisation beeinflussen.

Neben der Internalisierung von NPH3 werden makroskopisch sichtbare physiologische und Entwicklungs-bezogene Reaktionen, wie der Phototropismus und die Inhibierung des Hypokotyl-Wachstums von etiolierten Keimlingen sowie die Blatt-Spreitung/Stellung von Licht-gewachsenen Pflanzen, von der 14-3-3/NPH3-Interaktion betroffen (in den vorhergehenden Kapiteln detailliert beschrieben und diskutiert); für all diese Prozesse spielt die 14-3-3/NPH3-Interaktion eine bedeutende Rolle, inwieweit die Internalisierung von NPH3 für die anderen Prozesse funktional relevant ist (die PHOT1-Internalisierung ist bzgl. den bis dato untersuchten BL-abhängigen Reaktionen physiologisch irrelevant (Liscum, 2016)), diese Prozesse und das weitere „Downstream-Signaling“ evtl. sogar davon abhängen, bleibt noch zu untersuchen.

Zusammenfassung

14-3-3 Proteine sind eukaryotische Proteine, die Sequenz-spezifisch und Phosphorylierungs-abhängig mit zahlreichen anderen Proteinen interagieren. Infolgedessen modifizieren sie die Aktivität, Lokalisation oder Interaktions-Fähigkeit ihrer Zielproteine und sind somit an der Regulation diverser physiologischer Prozesse beteiligt.

Mittels eines Hefe-2-Hybrid-„Screens“, in dem die 14-3-3 Isoform epsilon als Köder verwendet wurde, wurde eine große Anzahl von putativen Interaktionspartnern (IPs) identifiziert. Zusätzlich zu den verschiedenen bereits beschriebenen IPs, erwiesen sich zahlreiche Proteine als neue putative Zielproteine von 14-3-3. Zu den letzteren gehörten fünf Mitglieder der „NPH3/RPT2-Like“-Protein-Familie (NRLs), von denen bekannt ist, dass sie bei phototropen Signaltransduktions-Ereignissen und Entwicklungs-Prozessen entscheidende Rollen spielen. In Bezug auf die prominentesten Mitglieder der NRL-Familie „NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTYL 3“ (NPH3), „ROOT PHOTOTROPISM 2“ (RPT2) und „ENHANCER OF PINOID“ (ENP)/„MACCHI-BOU 4“ (MAB4)/„NAKED PINS IN YUC MUTANTS 1“(NPY1) wurde die 14-3-3 Interaktion unter Verwendung der Volllängen-Proteine (Hefe-2-Hybrid) bestätigt und ein C-terminales 14-3-3 Bindemotiv identifiziert.

Die NPH3/14-3-3 Interaktion wurde über FRET-FLIM und rBiFC in transient-transformierten *N. benthamiana*-Blättern, die fluoreszenzmarkierte Proteine exprimierten, verifiziert. Wie erwartet, führte die Mutation des 14-3-3 Bindemotivs (NPH3-S743A) zu einer signifikant reduzierten Assoziation von 14-3-3.

CLSM-Studien zeigten, dass sowohl Wildtyp-NPH3 als auch das NPH3-S743A-Protein in transient-transformierten *Arabidopsis*-Protoplasten und Tabak-Blättern nahe an oder mit der Plasmamembran (PM) assoziiert sind. Hier war eine Variation von homogener Verteilung, über abgegrenzte großflächige „Cluster“, bis hin zu distinkt punktförmigen Mustern entlang der PM ersichtlich. Sowohl C- als auch N-terminale NPH3-Deletions-Proteine lokalisierten hingegen in globulären Strukturen im Zytoplasma.

Koexpressions-Studien, die in Protoplasten durchgeführt wurden, zeigten, dass sich NPH3 und ENP/MAB4/NPY1 sowie NPH3 und der Auxin-Efflux-„Carrier“ „PIN-FORMED 1“ (PIN1) in ihrer Lokalisation an der PM gegenseitig ausschließen. Die von NPH3 besetzten Regionen an der PM enthielten weder ENP/MAB4/NPY1 noch PIN1. Dieser interessante Befund deutet darauf hin, dass NRL-Proteine, die unterschiedlichen evolutionären Untergruppen angehören, wie NPH3 und ENP/MAB4/NPY1, Regionen an der PM bestimmen, wo PIN-Proteine lokalisieren.

Um die physiologische Relevanz der NPH3/14-3-3 Interaktion zu analysieren, wurden das Wildtyp- und das mutierte NPH3-Protein stabil in einer *nph3*-„loss-of-function“-Linie exprimiert, die keine phototrope Reaktion und eingerollte Blätter aufweist. Im Gegensatz zum NPH3-Wildtyp-Protein war

das mutierte Protein (NPH3-S743A) nicht in der Lage, die phototrope Reaktivität und den Blatt-Krümmungs-Defekt vollständig zu komplementieren. Demzufolge scheint die NPH3/14-3-3 Interaktion für bestimmte NPH3-vermittelte BL-Reaktionen von physiologischer Bedeutung zu sein.

Darüber hinaus wurde die Wirkung der BL-Behandlung auf Hypokotyle von etiolierten Keimlingen von Pflanzen, die ektopisch NPH3-mGFP4 exprimieren, analysiert. Bemerkenswerterweise führte die Exposition mit Licht zur Internalisierung des PM-lokalisierten NPH3-Proteins, das anschließend zytoplasmatische Granula ausbildete.

Eine Kollokalisierung von NPH3 und dem Endozytose-Tracer FM[®] 4-64 nach Brefeldin A (BFA, Inhibitor des „ADP ribosylation factor guanine nucleotide exchange factor“ (ARF-GEF)-abhängigen Vesikel-„Traffickings“-Applikation in BFA-Kompartimenten konnte nicht beobachtet werden, was vermuten lässt, dass die Internalisierung nicht von der Clathrin-vermittelten Endozytose (CME) abhängt.

Bemerkenswerterweise war eine solche Veränderung der subzellulären Lokalisation bei der Irradiation von Hypokotylen, die das mutierte NPH3-Protein exprimieren, nicht ersichtlich. Dies deutet darauf hin, dass die 14-3-3 Interaktion für die Licht-induzierte Internalisierung und die Funktion von NPH3 von Bedeutung ist.

Summary

14-3-3 proteins are eukaryotic proteins that interact with numerous proteins in a sequence-specific and phosphorylation-dependent manner. As a consequence, 14-3-3 modify the activity, localization, or interaction capability of their client proteins, and are thus involved in the regulation of various physiological processes.

A large number of putative interaction partners (IPs) has been identified by means of a yeast 2 hybrid screen in which the 14-3-3 isoform epsilon was used as bait. In addition to various already described IPs, numerous proteins turned out to be novel putative 14-3-3 target proteins. The latter included five members of the “NPH3/RPT2-Like” protein family (NRLs), which are known to play crucial roles in phototropic signal transduction events as well as developmental processes. With respect to the most prominent members of the NRL family “NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTYL 3” (NPH3), “ROOT PHOTOTROPISM 2” (RPT2) and “ENHANCER OF PINOID” (ENP)/“MACCHI-BOU 4” (MAB4)/“NAKED PINS IN YUC MUTANTS 1”(NPY1), the 14-3-3 interaction was confirmed using the full length proteins (yeast 2-hybrid) and a C-terminal 14-3-3 binding motif was identified.

The NPH3/14-3-3 interaction was verified via FRET-FLIM and rBiFC in transiently transformed *N. benthamiana* leaves expressing fluorescent labelled proteins. As expected, mutation of the 14-3-3 binding motif (NPH3-S743A) resulted in a significantly reduced association of 14-3-3s.

CLSM studies indicated that both wildtype NPH3 and the NPH3-S743A protein localize close to or associated with the plasma membrane (PM) in transiently transformed *Arabidopsis* protoplasts and tobacco leaves. Here, a variation of homogeneous distribution along the PM and clustering in distinct areas or even dot-like patterns along the PM was obvious. However, both C- and N-terminal truncated NPH3 proteins localized in globular structures in the cytoplasm.

Coexpression studies performed in protoplasts showed that NPH3 and ENP/MAB4/NPY1 as well as NPH3 and the auxin efflux carrier “PIN-FORMED 1” (PIN1) localize to the PM in a mutually exclusive manner. PM regions occupied by NPH3 did thus neither contain ENP/MAB4/NPY1 nor PIN1. This interesting finding suggests that NRL proteins belonging to different evolutionary subgroups, such as NPH3 and ENP/MAB4/NPY1, determine the regions, to where PIN proteins localize.

To analyze the physiological relevance of the NPH3/14-3-3 interaction, the wild-type and the mutated NPH3 protein were stably expressed in an *nph3* loss-of-function line that is incapable of phototropic bending and furthermore shows curled leaves. In contrast to the NPH3 wild-type protein, the mutated protein (NPH3-S743A) was not able to fully complement the phototropic reactivity and the leaf curvature defect. Consequently the NPH3/14-3-3 interaction seems to be of physiological importance for certain NPH3-mediated BL responses.

In addition the effect of BL treatment on hypocotyls of etiolated seedlings of plants ectopically expressing NPH3-mGFP4 was analyzed. Remarkably, light exposure led to internalization of the PM-localized NPH3 protein which subsequently formed granules within the cytoplasm.

A colocalization of NPH3 and the endocytosis tracer FM[®] 4-64 after the application of Brefeldin A (BFA, inhibitor of the "ADP ribosylation factor guanine nucleotide exchange factor" (ARF-GEF) dependent vesicle trafficking) in BFA compartments could not be observed, suggesting that the internalization does not depend on clathrin-mediated endocytosis (CME).

Remarkably such a change in subcellular localization was not apparent upon irradiation of hypocotyls expressing the mutated NPH3 protein. This suggests that the 14-3-3 interaction is important for light-induced internalization and the function of NPH3.

Literaturverzeichnis

- Abarca D, Madueno F, Martinez-Zapater JM, Salinas J** (1999) Dimerization of Arabidopsis 14-3-3 proteins: structural requirements within the N-terminal domain and effect of calcium. *FEBS Lett* **462**: 377-382
- Abas L, Benjamins R, Malenica N, Paciorek T, Wisniewska J, Moulinier-Anzola JC, Sieberer T, Friml J, Luschnig C** (2006) Intracellular trafficking and proteolysis of the Arabidopsis auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. *Nat Cell Biol* **8**: 249-256
- Abe M, Kobayashi Y, Yamamoto S, Daimon Y, Yamaguchi A, Ikeda Y, Ichinoki H, Notaguchi M, Goto K, Araki T** (2005) FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* **309**: 1052-1056
- Aducci P, Camoni L, Marra M, Visconti S** (2002) From cytosol to organelles: 14-3-3 proteins as multifunctional regulators of plant cell. *IUBMB Life* **53**: 49-55
- Aggarwal C, Banas AK, Kasprowicz-Maluski A, Borghetti C, Labuz J, Dobrucki J, Gabrys H** (2014) Blue-light-activated phototropin2 trafficking from the cytoplasm to Golgi/post-Golgi vesicles. *J Exp Bot* **65**: 3263-3276
- Aihara Y, Tabata R, Suzuki T, Shimazaki K, Nagatani A** (2008) Molecular basis of the functional specificities of phototropin 1 and 2. *Plant J* **56**: 364-375
- Aitken A, Ellis CA, Harris A, Sellers LA, Toker A** (1990) Kinase and neurotransmitters. *Nature* **344**: 594
- Allen GJ, Chu SP, Schumacher K, Shimazaki CT, Vafeados D, Kemper A, Hawke SD, Tallman G, Tsien RY, Harper JF, Chory J, Schroeder JI** (2000) Alteration of stimulus-specific guard cell calcium oscillations and stomatal closing in Arabidopsis det3 mutant. *Science* **289**: 2338-2342
- Alsterfjord M, Sehnke PC, Arkell A, Larsson H, Svennelid F, Rosenquist M, Ferl RJ, Sommarin M, Larsson C** (2004) Plasma membrane H(+)-ATPase and 14-3-3 isoforms of Arabidopsis leaves: evidence for isoform specificity in the 14-3-3/H(+)-ATPase interaction. *Plant Cell Physiol* **45**: 1202-1210
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ** (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410
- Antolin-Llovera M, Petutsching EK, Ried MK, Lipka V, Nurnberger T, Robatzek S, Parniske M** (2014) Knowing your friends and foes--plant receptor-like kinases as initiators of symbiosis or defence. *New Phytol* **204**: 791-802
- Arabidopsis Interactome Mapping C** (2011) Evidence for network evolution in an Arabidopsis interactome map. *Science* **333**: 601-607
- Aravind L, Koonin EV** (1999) Fold prediction and evolutionary analysis of the POZ domain: structural and evolutionary relationship with the potassium channel tetramerization domain. *J Mol Biol* **285**: 1353-1361
- Athwal GS, Huber SC** (2002) Divalent cations and polyamines bind to loop 8 of 14-3-3 proteins, modulating their interaction with phosphorylated nitrate reductase. *Plant J* **29**: 119-129
- Axelsen KB, Venema K, Jahn T, Baunsgaard L, Palmgren MG** (1999) Molecular dissection of the C-terminal regulatory domain of the plant plasma membrane H⁺-ATPase AHA2: mapping of residues that when altered give rise to an activated enzyme. *Biochemistry* **38**: 7227-7234
- Bachmann M, Huber JL, Athwal GS, Wu K, Ferl RJ, Huber SC** (1996) 14-3-3 proteins associate with the regulatory phosphorylation site of spinach leaf nitrate reductase in an isoform-specific manner and reduce dephosphorylation of Ser-543 by endogenous protein phosphatases. *FEBS Lett* **398**: 26-30
- Bachmann M, Huber JL, Liao PC, Gage DA, Huber SC** (1996) The inhibitor protein of phosphorylated nitrate reductase from spinach (*Spinacia oleracea*) leaves is a 14-3-3 protein. *FEBS Lett* **387**: 127-131
- Bachmann M, McMichael RW, Jr., Huber JL, Kaiser WM, Huber SC** (1995) Partial Purification and Characterization of a Calcium-Dependent Protein Kinase and an Inhibitor Protein Required for Inactivation of Spinach Leaf Nitrate Reductase. *Plant Physiol* **108**: 1083-1091

- Bachmann M, Shiraishi N, Campbell WH, Yoo BC, Harmon AC, Huber SC** (1996) Identification of Ser-543 as the major regulatory phosphorylation site in spinach leaf nitrate reductase. *Plant Cell* **8**: 505-517
- Bai MY, Zhang LY, Gampala SS, Zhu SW, Song WY, Chong K, Wang ZY** (2007) Functions of OsBZR1 and 14-3-3 proteins in brassinosteroid signaling in rice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 13839-13844
- Baluska F, Hlavacka A, Samaj J, Palme K, Robinson DG, Matoh T, McCurdy DW, Menzel D, Volkmann D** (2002) F-actin-dependent endocytosis of cell wall pectins in meristematic root cells. Insights from brefeldin A-induced compartments. *Plant Physiol* **130**: 422-431
- Bardwell VJ, Treisman R** (1994) The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif. *Genes Dev* **8**: 1664-1677
- Baunsgaard L, Fuglsang AT, Jahn T, Korthout HA, de Boer AH, Palmgren MG** (1998) The 14-3-3 proteins associate with the plant plasma membrane H(+)-ATPase to generate a fusicoccin binding complex and a fusicoccin responsive system. *Plant J* **13**: 661-671
- Bennett MJ, Marchant A, Green HG, May ST, Ward SP, Millner PA, Walker AR, Schulz B, Feldmann KA** (1996) Arabidopsis AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* **273**: 948-950
- Benzinger A, Muster N, Koch HB, Yates JR, 3rd, Hermeking H** (2005) Targeted proteomic analysis of 14-3-3 sigma, a p53 effector commonly silenced in cancer. *Mol Cell Proteomics* **4**: 785-795
- Benzinger A, Popowicz GM, Joy JK, Majumdar S, Holak TA, 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**: 219-227
- Berardini TZ, Mundodi S, Reiser L, Huala E, Garcia-Hernandez M, Zhang P, Mueller LA, Yoon J, Doyle A, Lander G, Moseyko N, Yoo D, Xu I, Zoeckler B, Montoya M, Miller N, Weems D, Rhee SY** (2004) Functional annotation of the Arabidopsis genome using controlled vocabularies. *Plant Physiol* **135**: 745-755
- Bihn EA, Paul AL, Wang SW, Erdos GW, Ferl RJ** (1997) Localization of 14-3-3 proteins in the nuclei of Arabidopsis and maize. *Plant J* **12**: 1439-1445
- Birnboim HC, Doly J** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523
- Blakeslee JJ, Bandyopadhyay A, Lee OR, Mravec J, Titapiwatanakun B, Sauer M, Makam SN, Cheng Y, Bouchard R, Adamec J, Geisler M, Nagashima A, Sakai T, Martinoia E, Friml J, Peer WA, Murphy AS** (2007) Interactions among PIN-FORMED and P-glycoprotein auxin transporters in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 131-147
- Boccalandro HE, De Simone SN, Bergmann-Honsberger A, Schepens I, Fankhauser C, Casal JJ** (2008) PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE1 regulates root phototropism and gravitropism. *Plant Physiol* **146**: 108-115
- Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Gortlach J** (2001) Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* **13**: 1499-1510
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Brandizzi F, Snapp EL, Roberts AG, Lippincott-Schwartz J, Hawes C** (2002) Membrane protein transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi in tobacco leaves is energy dependent but cytoskeleton independent: evidence from selective photobleaching. *Plant Cell* **14**: 1293-1309
- Bruckner A, Polge C, Lentze N, Auerbach D, Schlattner U** (2009) Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *Int J Mol Sci* **10**: 2763-2788
- Bullock WO, Fernandez JM, Short JM** (1987) Xl1-Blue - a High-Efficiency Plasmid Transforming RecA Escherichia-Coli Strain with Beta-Galactosidase Selection. *Biotechniques* **5**: 376-&

- Caesar K, Elgass K, Chen Z, Huppenberger P, Witthoft J, Schleifenbaum F, Blatt MR, Oecking C, Harter K** (2011) A fast brassinolide-regulated response pathway in the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **66**: 528-540
- Camoni L, Visconti S, Marra M, Aducci P** (2001) Adenosine 5'-monophosphate inhibits the association of 14-3-3 proteins with the plant plasma membrane H(+)-ATPase. *J Biol Chem* **276**: 31709-31712
- Cardasis HL, Sehne PC, Laughner B, Eyster JR, Powell DH, Ferl RJ** (2007) FTICR-MS analysis of 14-3-3 isoform substrate selection. *Biochim Biophys Acta* **1774**: 866-873
- Celaya RB, Liscum E** (2005) Phototropins and associated signaling: providing the power of movement in higher plants. *Photochem Photobiol* **81**: 73-80
- Chang IF, Curran A, Woolsey R, Quilici D, Cushman JC, Mittler R, Harmon A, Harper JF** (2009) Proteomic profiling of tandem affinity purified 14-3-3 protein complexes in *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics* **9**: 2967-2985
- Chevalier AS, Chaumont F** (2015) Trafficking of plant plasma membrane aquaporins: multiple regulation levels and complex sorting signals. *Plant Cell Physiol* **56**: 819-829
- Chi JC, Roeper J, Schwarz G, Fischer-Schrader K** (2015) Dual binding of 14-3-3 protein regulates *Arabidopsis* nitrate reductase activity. *J Biol Inorg Chem* **20**: 277-286
- Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, 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**: 9578-9582
- Cho M, Lee SH, Cho HT** (2007) P-glycoprotein4 displays auxin efflux transporter-like action in *Arabidopsis* root hair cells and tobacco cells. *Plant Cell* **19**: 3930-3943
- Christie JM** (2007) Phototropin blue-light receptors. *Annu Rev Plant Biol* **58**: 21-45
- Christie JM, Murphy AS** (2013) Shoot phototropism in higher plants: new light through old concepts. *Am J Bot* **100**: 35-46
- Christie JM, Reymond P, Powell GK, Bernasconi P, Raibekas AA, Liscum E, Briggs WR** (1998) *Arabidopsis* NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science* **282**: 1698-1701
- Christie JM, Salomon M, Nozue K, Wada M, Briggs WR** (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**: 8779-8783
- Christie JM, Swartz TE, Bogomolni RA, Briggs WR** (2002) Phototropin LOV domains exhibit distinct roles in regulating photoreceptor function. *Plant J* **32**: 205-219
- Christie JM, Yang H, Richter GL, Sullivan S, Thomson CE, Lin J, Titapiwatanakun B, Ennis M, Kaiserli E, Lee OR, Adamec J, Peer WA, Murphy AS** (2011) phot1 inhibition of ABCB19 primes lateral auxin fluxes in the shoot apex required for phototropism. *PLoS Biol* **9**: e1001076
- Chung SM, Frankman EL, Tzfira T** (2005) A versatile vector system for multiple gene expression in plants. *Trends Plant Sci* **10**: 357-361
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735-743
- Coblitz B, Shikano S, Wu M, Gabelli SB, Cockrell LM, Spieker M, Hanyu Y, Fu H, Amzel LM, Li M** (2005) C-terminal recognition by 14-3-3 proteins for surface expression of membrane receptors. *J Biol Chem* **280**: 36263-36272
- Coblitz B, Wu M, Shikano S, Li M** (2006) C-terminal binding: an expanded repertoire and function of 14-3-3 proteins. *FEBS Lett* **580**: 1531-1535
- Contento AL, Bassham DC** (2012) Structure and function of endosomes in plant cells. *J Cell Sci* **125**: 3511-3518
- Darwin C, Darwin FS, University of Leeds L** (1880) The power of movement in plants. John Murray, London :
- daSilva LL, Taylor JP, Hadlington JL, Hanton SL, Snowden CJ, Fox SJ, Foresti O, Brandizzi F, Denecke J** (2005) Receptor salvage from the prevacuolar compartment is essential for efficient vacuolar protein targeting. *Plant Cell* **17**: 132-148

- Daugherty CJ, Rooney MF, Miller PW, Ferl RJ** (1996) Molecular organization and tissue-specific expression of an Arabidopsis 14-3-3 gene. *Plant Cell* **8**: 1239-1248
- de Carbonnel M, Davis P, Roelfsema MR, Inoue S, Schepens I, Lariguet P, Geisler M, Shimazaki K, Hangarter R, Fankhauser C** (2010) The Arabidopsis PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE2 protein is a phototropin signaling element that regulates leaf flattening and leaf positioning. *Plant Physiol* **152**: 1391-1405
- de Vetten NC, Lu G, Ferl RJ** (1992) A maize protein associated with the G-box binding complex has homology to brain regulatory proteins. *Plant Cell* **4**: 1295-1307
- Deblaere R, Bytebier B, De Greve H, Deboeck F, Schell J, Van Montagu M, Leemans J** (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res* **13**: 4777-4788
- DeLille JM, Sehne PC, Ferl RJ** (2001) The Arabidopsis 14-3-3 family of signaling regulators. *Plant Physiol* **126**: 35-38
- Demarsy E, Schepens I, Okajima K, Hersch M, Bergmann S, Christie J, Shimazaki K, Tokutomi S, Fankhauser C** (2012) Phytochrome Kinase Substrate 4 is phosphorylated by the phototropin 1 photoreceptor. *EMBO J* **31**: 3457-3467
- Denison FC, Paul AL, Zupanska AK, Ferl RJ** (2011) 14-3-3 proteins in plant physiology. *Semin Cell Dev Biol* **22**: 720-727
- Dhonukshe P** (2011) PIN polarity regulation by AGC-3 kinases and ARF-GEF: a recurrent theme with context dependent modifications for plant development and response. *Plant Signal Behav* **6**: 1333-1337
- Dhonukshe P, Aniento F, Hwang I, Robinson DG, Mravec J, Stierhof YD, Friml J** (2007) Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in Arabidopsis. *Curr Biol* **17**: 520-527
- Ding Z, Galvan-Ampudia CS, Demarsy E, Langowski L, Kleine-Vehn J, Fan Y, Morita MT, Tasaka M, Fankhauser C, Offringa R, Friml J** (2011) Light-mediated polarization of the PIN3 auxin transporter for the phototropic response in Arabidopsis. *Nat Cell Biol* **13**: 447-452
- Douglas P, Moorhead G, Hong Y, Morrice N, MacKintosh C** (1998) Purification of a nitrate reductase kinase from Spinacea oleracea leaves, and its identification as a calmodulin-domain protein kinase. *Planta* **206**: 435-442
- Douglas P, Pigaglio E, Ferrer A, Halfords NG, MacKintosh C** (1997) Three spinach leaf nitrate reductase-3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinases that are regulated by reversible phosphorylation and/or Ca²⁺ ions. *Biochem J* **325 (Pt 1)**: 101-109
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C** (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* **19**: 1349
- Ekberg K, Palmgren MG, Veierskov B, Buch-Pedersen MJ** (2010) A novel mechanism of P-type ATPase autoinhibition involving both termini of the protein. *J Biol Chem* **285**: 7344-7350
- Elangovan M, Day RN, Periasamy A** (2002) Nanosecond fluorescence resonance energy transfer-fluorescence lifetime imaging microscopy to localize the protein interactions in a single living cell. *J Microsc* **205**: 3-14
- Emi T, Kinoshita T, Shimazaki K** (2001) Specific binding of vfl4-3-3a isoform to the plasma membrane H⁺-ATPase in response to blue light and fusicoccin in guard cells of broad bean. *Plant Physiol* **125**: 1115-1125
- Fankhauser C, Staiger D** (2002) Photoreceptors in Arabidopsis thaliana: light perception, signal transduction and entrainment of the endogenous clock. *Planta* **216**: 1-16
- Fankhauser C, Yeh KC, Lagarias JC, Zhang H, Elich TD, Chory J** (1999) PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in Arabidopsis. *Science* **284**: 1539-1541
- Ferl RJ, Lu G, Bowen BW** (1994) Evolutionary implications of the family of 14-3-3 brain protein homologs in Arabidopsis thaliana. *Genetica* **92**: 129-138

- Finn RD, Tate J, Mistry J, Coghill PC, Sammut SJ, Hotz HR, Ceric G, Forslund K, Eddy SR, Sonnhammer EL, Bateman A** (2008) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **36**: D281-288
- Folta KM, Lieg EJ, Durham T, Spalding EP** (2003) Primary inhibition of hypocotyl growth and phototropism depend differently on phototropin-mediated increases in cytoplasmic calcium induced by blue light. *Plant Physiol* **133**: 1464-1470
- Folta KM, Spalding EP** (2001) Unexpected roles for cryptochrome 2 and phototropin revealed by high-resolution analysis of blue light-mediated hypocotyl growth inhibition. *Plant J* **26**: 471-478
- Friml J, Wisniewska J, Benkova E, Mendgen K, Palme K** (2002) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. *Nature* **415**: 806-809
- Fuglsang AT, Borch J, Bych K, Jahn TP, Roepstorff P, Palmgren MG** (2003) The binding site for regulatory 14-3-3 protein in plant plasma membrane H⁺-ATPase: involvement of a region promoting phosphorylation-independent interaction in addition to the phosphorylation-dependent C-terminal end. *J Biol Chem* **278**: 42266-42272
- Fuglsang AT, Guo Y, Cui TA, Qiu Q, Song C, Kristiansen KA, Bych K, Schulz A, Shabala S, Schumaker KS, Palmgren MG, Zhu JK** (2007) Arabidopsis protein kinase PKS5 inhibits the plasma membrane H⁺-ATPase by preventing interaction with 14-3-3 protein. *Plant Cell* **19**: 1617-1634
- Fuglsang AT, Visconti S, Drumm K, Jahn T, Stensballe A, Mattei B, Jensen ON, Aducci P, Palmgren MG** (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**: 36774-36780
- Fullone MR, Visconti S, Marra M, Fogliano V, Aducci P** (1998) Fusaric acid effect on the in vitro interaction between plant 14-3-3 proteins and plasma membrane H⁺-ATPase. *J Biol Chem* **273**: 7698-7702
- Furutani M, Kajiwara T, Kato T, Trembl BS, Stockum C, Torres-Ruiz RA, 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**: 3849-3859
- Furutani M, Sakamoto N, Yoshida S, Kajiwara T, Robert HS, Friml J, Tasaka M** (2011) Polar-localized NPH3-like proteins regulate polarity and endocytosis of PIN-FORMED auxin efflux carriers. *Development* **138**: 2069-2078
- Galvan-Ampudia CS, Offringa R** (2007) Plant evolution: AGC kinases tell the auxin tale. *Trends Plant Sci* **12**: 541-547
- Gampala SS, Kim TW, He JX, Tang W, Deng Z, Bai MY, Guan S, Lalonde S, Sun Y, Gendron JM, Chen H, Shibagaki N, Ferl RJ, Ehrhardt D, Chong K, Burlingame AL, Wang ZY** (2007) An essential role for 14-3-3 proteins in brassinosteroid signal transduction in Arabidopsis. *Dev Cell* **13**: 177-189
- Gao J, van Kleeff PJ, Oecking C, Li KW, Erban A, Kopka J, Hinch DK, de Boer AH** (2014) Light modulated activity of root alkaline/neutral invertase involves the interaction with 14-3-3 proteins. *Plant J* **80**: 785-796
- Geldner N, Anders N, Wolters H, Keicher J, Kornberger W, Muller P, Delbarre A, Ueda T, Nakano A, Jurgens G** (2003) The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell* **112**: 219-230
- Giacometti S, Camoni L, Albumi C, Visconti S, De Michelis MI, Aducci P** (2004) Tyrosine phosphorylation inhibits the interaction of 14-3-3 proteins with the plant plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Biol (Stuttg)* **6**: 422-431
- Glaab J, Kaiser WM** (1995) Inactivation of Nitrate Reductase Involves N^r-Protein Phosphorylation and Subsequent Binding of an Inhibitor Protein. *Planta* **195**: 514-518
- Goldsmith MHM** (1977) The Polar Transport of Auxin. *Annual Review of Plant Physiology* **28**: 439-478

- Green M, Sambrook J** (2012) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition): Three-volume set*. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Grefen C, Blatt MR** (2012) A 2in1 cloning system enables ratiometric bimolecular fluorescence complementation (rBiFC). *Biotechniques* **53**: 311-314
- Groban ES, Narayanan A, Jacobson MP** (2006) Conformational changes in protein loops and helices induced by post-translational phosphorylation. *PLoS Comput Biol* **2**: e32
- Grunewald W, Friml J** (2010) The march of the PINs: developmental plasticity by dynamic polar targeting in plant cells. *EMBO J* **29**: 2700-2714
- Haga K, Sakai T** (2012) PIN auxin efflux carriers are necessary for pulse-induced but not continuous light-induced phototropism in Arabidopsis. *Plant Physiol* **160**: 763-776
- Haga K, Tsuchida-Mayama T, Yamada M, Sakai T** (2015) Arabidopsis ROOT PHOTOTROPISM2 Contributes to the Adaptation to High-Intensity Light in Phototropic Responses. *Plant Cell* **27**: 1098-1112
- Haglund K, Dikic I** (2012) The role of ubiquitylation in receptor endocytosis and endosomal sorting. *J Cell Sci* **125**: 265-275
- Han IS, Cho HY, Moni A, Lee AY, Briggs WR** (2013) Investigations on the photoregulation of chloroplast movement and leaf positioning in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **54**: 48-56
- Han IS, Tseng TS, Eisinger W, Briggs WR** (2008) Phytochrome A regulates the intracellular distribution of phototropin 1-green fluorescent protein in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **20**: 2835-2847
- Harada A, Takemiya A, Inoue S, Sakai T, Shimazaki K** (2013) Role of RPT2 in leaf positioning and flattening and a possible inhibition of phot2 signaling by phot1. *Plant Cell Physiol* **54**: 36-47
- Harper SM, Christie JM, Gardner KH** (2004) Disruption of the LOV- α helix interaction activates phototropin kinase activity. *Biochemistry* **43**: 16184-16192
- Harper SM, Neil LC, Gardner KH** (2003) Structural basis of a phototropin light switch. *Science* **301**: 1541-1544
- Haruta M, Burch HL, Nelson RB, Barrett-Wilt G, Kline KG, Mohsin SB, Young JC, Otegui MS, Sussman MR** (2010) Molecular characterization of mutant Arabidopsis plants with reduced plasma membrane proton pump activity. *J Biol Chem* **285**: 17918-17929
- Haseloff J, Amos B** (1995) GFP in plants. *Trends Genet* **11**: 328-329
- Hayashi M, Inoue S, Takahashi K, Kinoshita T** (2011) Immunohistochemical detection of blue light-induced phosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase in stomatal guard cells. *Plant Cell Physiol* **52**: 1238-1248
- Hayashi Y, Nakamura S, Takemiya A, Takahashi Y, Shimazaki K, Kinoshita T** (2010) Biochemical characterization of in vitro phosphorylation and dephosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Cell Physiol* **51**: 1186-1196
- He JX, Gendron JM, Yang Y, Li J, Wang ZY** (2002) The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 10185-10190
- Hecker A, Wallmeroth N, Peter S, Blatt MR, Harter K, Grefen C** (2015) Binary 2in1 Vectors Improve in Planta (Co)localization and Dynamic Protein Interaction Studies. *Plant Physiol* **168**: 776-787
- Heidari B, Matre P, Nemie-Feyissa D, Meyer C, Rognli OA, Moller SG, Lillo C** (2011) Protein phosphatase 2A B55 and A regulatory subunits interact with nitrate reductase and are essential for nitrate reductase activation. *Plant Physiol* **156**: 165-172
- Hoehenwarter W, Thomas M, Nukarinen E, Egelhofer V, Rohrig H, Weckwerth W, Conrath U, Beckers GJ** (2013) Identification of novel in vivo MAP kinase substrates in Arabidopsis thaliana through use of tandem metal oxide affinity chromatography. *Mol Cell Proteomics* **12**: 369-380
- Hofgen R, Willmitzer L** (1988) Storage of competent cells for Agrobacterium transformation. *Nucleic Acids Res* **16**: 9877
- Hohm T, Preuten T, Fankhauser C** (2013) Phototropism: translating light into directional growth. *Am J Bot* **100**: 47-59

- Honkanen RE** (1993) Cantharidin, another natural toxin that inhibits the activity of serine/threonine protein phosphatases types 1 and 2A. *FEBS Lett* **330**: 283-286
- Hooper CM, Tanz SK, Castleden IR, Vacher MA, Small ID, Millar AH** (2014) SUBAcon: a consensus algorithm for unifying the subcellular localization data of the Arabidopsis proteome. *Bioinformatics* **30**: 3356-3364
- Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK** (2002) Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* **9**: 789-798
- Hu CD, Kerppola TK** (2003) Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nat Biotechnol* **21**: 539-545
- Huala E, Oeller PW, Liscum E, Han IS, Larsen E, Briggs WR** (1997) Arabidopsis NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* **278**: 2120-2123
- Ichimura T, Isobe T, Okuyama T, Takahashi N, Araki K, Kuwano R, Takahashi Y** (1988) Molecular cloning of cDNA coding for brain-specific 14-3-3 protein, a protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 7084-7088
- Inada S, Ohgishi M, Mayama T, Okada K, 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**: 887-896
- Inoue S, Kinoshita T, Matsumoto M, Nakayama KI, Doi M, Shimazaki K** (2008) Blue light-induced autophosphorylation of phototropin is a primary step for signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 5626-5631
- Inoue S, Kinoshita T, Takemiya A, Doi M, Shimazaki K** (2008) Leaf positioning of Arabidopsis in response to blue light. *Mol Plant* **1**: 15-26
- Inoue S, Matsushita T, Tomokiyo Y, Matsumoto M, Nakayama KI, Kinoshita T, Shimazaki K** (2011) Functional analyses of the activation loop of phototropin2 in Arabidopsis. *Plant Physiol* **156**: 117-128
- Ito T, Nakata M, Fukazawa J, Ishida S, Takahashi Y** (2014) Phosphorylation-independent binding of 14-3-3 to NtCDPK1 by a new mode. *Plant Signal Behav* **9**: e977721
- Ito T, Nakata M, Fukazawa J, Ishida S, Takahashi Y** (2014) Scaffold Function of Ca²⁺-Dependent Protein Kinase: Tobacco Ca²⁺-DEPENDENT PROTEIN KINASE1 Transfers 14-3-3 to the Substrate REPRESSION OF SHOOT GROWTH after Phosphorylation. *Plant Physiol* **165**: 1737-1750
- Jahn T, Dietrich J, Andersen B, Leidvik B, Otter C, Briving C, Kuhlbrandt W, Palmgren MG** (2001) Large scale expression, purification and 2D crystallization of recombinant plant plasma membrane H⁺-ATPase. *J Mol Biol* **309**: 465-476
- Jahn T, Fuglsang AT, Olsson A, Bruntrup IM, Collinge DB, Volkmann D, Sommarin M, Palmgren MG, 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**: 1805-1814
- James P, Halladay J, Craig EA** (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**: 1425-1436
- Jarillo JA, Capel J, Leyva A, Martinez-Zapater JM, Salinas J** (1994) Two related low-temperature-inducible genes of Arabidopsis encode proteins showing high homology to 14-3-3 proteins, a family of putative kinase regulators. *Plant Mol Biol* **25**: 693-704
- Jarillo JA, Gabrys H, Capel J, Alonso JM, Ecker JR, Cashmore AR** (2001) Phototropin-related NPL1 controls chloroplast relocation induced by blue light. *Nature* **410**: 952-954
- Jarsch IK, Konrad SS, Stratil TF, Urbanus SL, Szymanski W, Braun P, Braun KH, Ott T** (2014) Plasma Membranes Are Subcompartmentalized into a Plethora of Coexisting and Diverse Microdomains in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana. *Plant Cell* **26**: 1698-1711
- Jarvis P, Soll J** (2001) Toc, Tic, and chloroplast protein import. *Biochim Biophys Acta* **1541**: 64-79
- Jelich-Ottmann C, Weiler EW, Oecking C** (2001) Binding of regulatory 14-3-3 proteins to the C terminus of the plant plasma membrane H⁺-ATPase involves part of its autoinhibitory region. *J Biol Chem* **276**: 39852-39857

- Jin J, Smith FD, Stark C, Wells CD, Fawcett JP, Kulkarni S, Metalnikov P, O'Donnell P, Taylor P, Taylor L, Zougman A, Woodgett JR, Langeberg LK, Scott JD, Pawson T** (2004) Proteomic, functional, and domain-based analysis of in vivo 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization. *Curr Biol* **14**: 1436-1450
- Johnson C, Crowther S, Stafford MJ, Campbell DG, Toth R, MacKintosh C** (2010) Bioinformatic and experimental survey of 14-3-3-binding sites. *Biochem J* **427**: 69-78
- Jones MA, Christie JM** (2008) Phototropin receptor kinase activation by blue light. *Plant Signal Behav* **3**: 44-46
- Jones MA, Feeney KA, Kelly SM, Christie JM** (2007) Mutational analysis of phototropin 1 provides insights into the mechanism underlying LOV2 signal transmission. *J Biol Chem* **282**: 6405-6414
- Kagawa T, Sakai T, Suetsugu N, Oikawa K, Ishiguro S, Kato T, Tabata S, Okada K, Wada M** (2001) Arabidopsis NPL1: a phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response. *Science* **291**: 2138-2141
- Kaiserli E, Sullivan S, Jones MA, Feeney KA, Christie JM** (2009) Domain swapping to assess the mechanistic basis of Arabidopsis phototropin 1 receptor kinase activation and endocytosis by blue light. *Plant Cell* **21**: 3226-3244
- Kanamaru K, Wang R, Su W, Crawford NM** (1999) Ser-534 in the hinge 1 region of Arabidopsis nitrate reductase is conditionally required for binding of 14-3-3 proteins and in vitro inhibition. *J Biol Chem* **274**: 4160-4165
- Kansup J, Tsugama D, Liu S, Takano T** (2014) Arabidopsis G-protein beta subunit AGB1 interacts with NPH3 and is involved in phototropism. *Biochem Biophys Res Commun* **445**: 54-57
- Karimi M, Inze D, Depicker A** (2002) GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* **7**: 193-195
- Kasahara M, Kagawa T, Oikawa K, Suetsugu N, Miyao M, Wada M** (2002) Chloroplast avoidance movement reduces photodamage in plants. *Nature* **420**: 829-832
- Kasajima I, Ide Y, Ohkama-Ohtsu N, Hayashi H, Yoneyama T, Fujiwara T** (2004) A protocol for rapid DNA extraction from Arabidopsis thaliana for PCR analysis. *Plant Molecular Biology Reporter* **22**: 49-52
- Khurana JP, Poff KL** (1989) Mutants of Arabidopsis thaliana with altered phototropism. *Planta* **178**: 400-406
- Khurana JP, Ren Z, Steinitz B, Parks B, Best TR, Poff KL** (1989) Mutants of Arabidopsis thaliana with decreased amplitude in their phototropic response. *Plant Physiol* **91**: 685-689
- Kim J, Harter K, Theologis A** (1997) Protein-protein interactions among the Aux/IAA proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 11786-11791
- Kim WY, Fujiwara S, Suh SS, Kim J, Kim Y, Han L, David K, Putterill J, Nam HG, Somers DE** (2007) ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature* **449**: 356-360
- Kimura M, Kagawa T** (2006) Phototropin and light-signaling in phototropism. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 503-508
- Kinoshita T, Doi M, Suetsugu N, Kagawa T, Wada M, Shimazaki K** (2001) Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* **414**: 656-660
- Kinoshita T, Emi T, Tominaga M, Sakamoto K, Shigenaga A, Doi M, 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**: 1453-1463
- Kinoshita T, Shimazaki K** (1999) Blue light activates the plasma membrane H(+)-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells. *EMBO J* **18**: 5548-5558
- Kinoshita T, Shimazaki K** (2001) Analysis of the phosphorylation level in guard-cell plasma membrane H⁺-ATPase in response to fusicoccin. *Plant Cell Physiol* **42**: 424-432
- Kleinboelting N, Huet G, Kloetgen A, Viehoveer P, Weisshaar B** (2012) GABI-Kat SimpleSearch: new features of the Arabidopsis thaliana T-DNA mutant database. *Nucleic Acids Res* **40**: D1211-1215

- Kleine-Vehn J, Dhonukshe P, Sauer M, Brewer PB, Wisniewska J, Paciorek T, Benkova E, Friml J** (2008) ARF GEF-dependent transcytosis and polar delivery of PIN auxin carriers in Arabidopsis. *Curr Biol* **18**: 526-531
- Kleine-Vehn J, Wabnik K, Martiniere A, Langowski L, Willig K, Naramoto S, Leitner J, Tanaka H, Jakobs S, Robert S, Luschnig C, Govaerts W, Hell SW, Runions J, Friml J** (2011) Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane. *Mol Syst Biol* **7**: 540
- Knauer T, Dummer M, Landgraf F, Forreiter C** (2011) A negative effector of blue light-induced and gravitropic bending in Arabidopsis. *Plant Physiol* **156**: 439-447
- Knieb E, Salomon M, Rudiger W** (2004) Tissue-specific and subcellular localization of phototropin determined by immuno-blotting. *Planta* **218**: 843-851
- Koncz C, 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 & General Genetics* **204**: 383-396
- Kong SG, Kinoshita T, Shimazaki K, Mochizuki N, Suzuki T, Nagatani A** (2007) The C-terminal kinase fragment of Arabidopsis phototropin 2 triggers constitutive phototropin responses. *Plant J* **51**: 862-873
- Kong SG, Nagatani A** (2008) Where and how does phototropin transduce light signals in the cell? *Plant Signal Behav* **3**: 275-277
- Kong SG, Suetsugu N, Kikuchi S, Nakai M, Nagatani A, Wada M** (2013) Both phototropin 1 and 2 localize on the chloroplast outer membrane with distinct localization activity. *Plant Cell Physiol* **54**: 80-92
- Kong SG, Suzuki T, Tamura K, Mochizuki N, Hara-Nishimura I, Nagatani A** (2006) Blue light-induced association of phototropin 2 with the Golgi apparatus. *Plant J* **45**: 994-1005
- Korbei B, Luschnig C** (2013) Plasma membrane protein ubiquitylation and degradation as determinants of positional growth in plants. *J Integr Plant Biol* **55**: 809-823
- Korthout HA, de Boer AH** (1994) A fusicoccin binding protein belongs to the family of 14-3-3 brain protein homologs. *Plant Cell* **6**: 1681-1692
- Krecek P, Skupa P, Libus J, Naramoto S, Tejos R, Friml J, Zazimalova E** (2009) The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biol* **10**: 249
- Ladwig F, Dahlke RI, Stuhrwohldt N, Hartmann J, Harter K, Sauter M** (2015) Phytosulfokine Regulates Growth in Arabidopsis through a Response Module at the Plasma Membrane That Includes CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED CHANNEL17, H⁺-ATPase, and BAK1. *Plant Cell* **27**: 1718-1729
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lambeck I, Chi JC, Krizowski S, Mueller S, Mehler N, Teige M, Fischer K, Schwarz G** (2010) Kinetic analysis of 14-3-3-inhibited Arabidopsis thaliana nitrate reductase. *Biochemistry* **49**: 8177-8186
- Lambeck IC, Fischer-Schrader K, Niks D, Roeper J, Chi JC, Hille R, Schwarz G** (2012) Molecular mechanism of 14-3-3 protein-mediated inhibition of plant nitrate reductase. *J Biol Chem* **287**: 4562-4571
- Lariguet P, Fankhauser C** (2004) Hypocotyl growth orientation in blue light is determined by phytochrome A inhibition of gravitropism and phototropin promotion of phototropism. *Plant J* **40**: 826-834
- Lariguet P, Schepens I, Hodgson D, Pedmale UV, Trevisan M, Kami C, de Carbonnel M, Alonso JM, Ecker JR, Liscum E, Fankhauser C** (2006) PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 1 is a phototropin 1 binding protein required for phototropism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 10134-10139
- Latzer J, Shen T, Wolynes PG** (2008) Conformational switching upon phosphorylation: a predictive framework based on energy landscape principles. *Biochemistry* **47**: 2110-2122

- Leitner J, Petrasek J, Tomanov K, Retzer K, Parezova M, Korbei B, Bachmair A, Zazimalova E, Luschnig C** (2012) Lysine63-linked ubiquitylation of PIN2 auxin carrier protein governs hormonally controlled adaptation of Arabidopsis root growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 8322-8327
- Leitner J, Retzer K, Korbei B, Luschnig C** (2012) Dynamics in PIN2 auxin carrier ubiquitylation in gravity-responding Arabidopsis roots. *Plant Signal Behav* **7**: 1271-1273
- Li YM, Casida JE** (1992) Cantharidin-binding protein: identification as protein phosphatase 2A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 11867-11870
- Lino B, Baizabal-Aguirre VM, Gonzalez de la Vara LE** (1998) The plasma-membrane H(+)-ATPase from beet root is inhibited by a calcium-dependent phosphorylation. *Planta* **204**: 352-359
- Liscum E** (2016) Blue Light-Induced Intracellular Movement of Phototropins: Functional Relevance or Red Herring? *Front Plant Sci* **7**: 827
- Liscum E, Askinosie SK, Leuchtman DL, Morrow J, Willenburg KT, Coats DR** (2014) Phototropism: growing towards an understanding of plant movement. *Plant Cell* **26**: 38-55
- Liscum E, Briggs WR** (1995) Mutations in the NPH1 locus of Arabidopsis disrupt the perception of phototropic stimuli. *Plant Cell* **7**: 473-485
- Liscum E, Briggs WR** (1996) Mutations of Arabidopsis in potential transduction and response components of the phototropic signaling pathway. *Plant Physiol* **112**: 291-296
- Liu D, Bienkowska J, Petosa C, Collier RJ, Fu H, Liddington R** (1995) Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. *Nature* **376**: 191-194
- Ljung K** (2013) Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* **140**: 943-950
- Lofke C, Luschnig C, Kleine-Vehn J** (2013) Posttranslational modification and trafficking of PIN auxin efflux carriers. *Mech Dev* **130**: 82-94
- Louvet O, Doignon F, Crouzet M** (1997) Stable DNA-binding yeast vector allowing high-bait expression for use in the two-hybrid system. *Biotechniques* **23**: 816-&
- Lu D, Lin W, Gao X, Wu S, Cheng C, Avila J, Heese A, Devarenne TP, He P, Shan L** (2011) Direct ubiquitination of pattern recognition receptor FLS2 attenuates plant innate immunity. *Science* **332**: 1439-1442
- Lu G, Delisle AJ, de Vetten NC, Ferl RJ** (1992) Brain proteins in plants: an Arabidopsis homolog to neurotransmitter pathway activators is part of a DNA binding complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 11490-11494
- Lu G, Rooney MF, Wu K, Ferl RJ** (1994) Five cDNAs encoding Arabidopsis GF14 proteins. *Plant Physiol* **105**: 1459-1460
- Lu G, Sehnke PC, Ferl RJ** (1994) Phosphorylation and calcium binding properties of an Arabidopsis GF14 brain protein homolog. *Plant Cell* **6**: 501-510
- Lupas A** (1996) Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci* **21**: 375-382
- Lupas AN, Gruber M** (2005) The structure of alpha-helical coiled coils. *Adv Protein Chem* **70**: 37-78
- Luschnig C, Vert G** (2014) The dynamics of plant plasma membrane proteins: PINs and beyond. *Development* **141**: 2924-2938
- Mackintosh C** (2004) Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes. *Biochem J* **381**: 329-342
- Mackintosh C, Douglas P, Lillo C** (1995) Identification of a Protein That Inhibits the Phosphorylated Form of Nitrate Reductase from Spinach (*Spinacia oleracea*) Leaves. *Plant Physiol* **107**: 451-457
- Mackintosh C, Meek SE** (2001) Regulation of plant NR activity by reversible phosphorylation, 14-3-3 proteins and proteolysis. *Cell Mol Life Sci* **58**: 205-214
- Madeira F, Tinti M, Murugesan G, Berrett E, Stafford M, Toth R, Cole C, MacKintosh C, Barton GJ** (2015) 14-3-3-Pred: improved methods to predict 14-3-3-binding phosphopeptides. *Bioinformatics* **31**: 2276-2283
- Manak MS, Ferl RJ** (2007) Divalent cation effects on interactions between multiple Arabidopsis 14-3-3 isoforms and phosphopeptide targets. *Biochemistry* **46**: 1055-1063

- Marques-Bueno MM, Moreno-Romero J, Abas L, De Michele R, Martinez MC** (2011) A dominant negative mutant of protein kinase CK2 exhibits altered auxin responses in Arabidopsis. *Plant J* **67**: 169-180
- Marques-Bueno MM, Moreno-Romero J, Abas L, de Michele R, Martinez MC** (2011) Linking protein kinase CK2 and auxin transport. *Plant Signal Behav* **6**: 1603-1605
- Marra M, Fullone MR, Fogliano V, Pen J, Mattei M, Masi S, Aducci P** (1994) The 30-kilodalton protein present in purified fusicoccin receptor preparations is a 14-3-3-like protein. *Plant Physiol* **106**: 1497-1501
- Marre E** (1979) Fusicoccin - Tool in Plant Physiology. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **30**: 273-288
- Martins S, Dohmann EM, Cayrel A, Johnson A, Fischer W, Pojer F, Satiat-Jeunemaitre B, Jaillais Y, Chory J, Geldner N, Vert G** (2015) Internalization and vacuolar targeting of the brassinosteroid hormone receptor BRI1 are regulated by ubiquitination. *Nat Commun* **6**: 6151
- Mathieu J, Warthmann N, Kuttner F, Schmid M** (2007) Export of FT protein from phloem companion cells is sufficient for floral induction in Arabidopsis. *Curr Biol* **17**: 1055-1060
- Matsuoka K, Bassham DC, Raikhel NV, Nakamura K** (1995) Different sensitivity to wortmannin of two vacuolar sorting signals indicates the presence of distinct sorting machineries in tobacco cells. *J Cell Biol* **130**: 1307-1318
- Maudoux O, Batoko H, Oecking C, Gevaert K, Vandekerckhove J, Boutry M, Morsomme P** (2000) A plant plasma membrane H⁺-ATPase expressed in yeast is activated by phosphorylation at its penultimate residue and binding of 14-3-3 regulatory proteins in the absence of fusicoccin. *J Biol Chem* **275**: 17762-17770
- McCaffrey LM, Macara IG** (2009) Widely conserved signaling pathways in the establishment of cell polarity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**: a001370
- Meek SE, Lane WS, Piwnica-Worms H** (2004) Comprehensive proteomic analysis of interphase and mitotic 14-3-3-binding proteins. *J Biol Chem* **279**: 32046-32054
- Meinke D, Scholl R** (2003) The preservation of plant genetic resources. Experiences with Arabidopsis. *Plant Physiol* **133**: 1046-1050
- Merkle T, Leclerc D, Marshallsay C, Nagy F** (1996) A plant in vitro system for the nuclear import of proteins. *Plant J* **10**: 1177-1186
- Meselson M, Yuan R** (1968) DNA restriction enzyme from E. coli. *Nature* **217**: 1110-1114
- Michniewicz M, Zago MK, Abas L, Weijers D, Schweighofer A, Meskiene I, Heisler MG, Ohno C, Zhang J, Huang F, Schwab R, Weigel D, Meyerowitz EM, Luschnig C, Offringa R, Friml J** (2007) Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux. *Cell* **130**: 1044-1056
- Moore BW, Perez VJ** (1968) *Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration*. A symposium, Woods Hole, Mass., 1967. Francis D. Carlson, Ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J., 1968. viii + 392 pp. *In*, p 1378
- Moorhead G, Douglas P, Morrice N, Scarabel M, Aitken A, MacKintosh C** (1996) Phosphorylated nitrate reductase from spinach leaves is inhibited by 14-3-3 proteins and activated by fusicoccin. *Curr Biol* **6**: 1104-1113
- Motchoulski A, Liscum E** (1999) Arabidopsis NPH3: A NPH1 photoreceptor-interacting protein essential for phototropism. *Science* **286**: 961-964
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H** (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273
- Murashige T, Skoog F** (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497
- Muslin AJ, Tanner JW, Allen PM, Shaw AS** (1996) Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* **84**: 889-897
- Nagashima A, Suzuki G, Uehara Y, Saji K, Furukawa T, Koshiba T, Sekimoto M, Fujioka S, Kuroha T, Kojima M, Sakakibara H, Fujisawa N, Okada K, Sakai T** (2008) Phytochromes and

- cryptochromes regulate the differential growth of *Arabidopsis* hypocotyls in both a PGP19-dependent and a PGP19-independent manner. *Plant J* **53**: 516-529
- Nakasako M, Zikihara K, Matsuoka D, Katsura H, Tokutomi S** (2008) Structural basis of the LOV1 dimerization of *Arabidopsis* phototropins 1 and 2. *J Mol Biol* **381**: 718-733
- Nakasone Y, Zikihara K, Tokutomi S, Terazima M** (2013) Photochemistry of *Arabidopsis* phototropin 1 LOV1: transient tetramerization. *Photochem Photobiol Sci* **12**: 1171-1179
- Nebenfuhr A, Ritzenthaler C, Robinson DG** (2002) Brefeldin A: deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. *Plant Physiol* **130**: 1102-1108
- Negrutiu I, Shillito R, Potrykus I, Biasini G, Sala F** (1987) Hybrid genes in the analysis of transformation conditions : I. Setting up a simple method for direct gene transfer in plant protoplasts. *Plant Mol Biol* **8**: 363-373
- Noh B, Bandyopadhyay A, Peer WA, Spalding EP, Murphy AS** (2003) Enhanced gravi- and phototropism in plant *mdr* mutants mislocalizing the auxin efflux protein PIN1. *Nature* **423**: 999-1002
- Obenauer JC, Cantley LC, Yaffe MB** (2003) Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic Acids Res* **31**: 3635-3641
- Oecking C, Eckerskorn C, Weiler EW** (1994) The fusicoccin receptor of plants is a member of the 14-3-3 superfamily of eukaryotic regulatory proteins. *FEBS Lett* **352**: 163-166
- Oecking C, Piotrowski M, Hagemann K** (1997) Mechanism of fusicoccin action. *Plant Physiology* **114**: 1501-1501
- Oecking C, Piotrowski M, Hagemeyer J, Hagemann K** (1997) Topology and target interaction of the fusicoccin-binding 14-3-3 homologs of *Commelina communis*. *Plant Journal* **12**: 441-453
- Offringa R, Huang F** (2013) Phosphorylation-dependent trafficking of plasma membrane proteins in animal and plant cells. *J Integr Plant Biol* **55**: 789-808
- Ohgishi M, Saji K, Okada K, Sakai T** (2004) Functional analysis of each blue light receptor, *cry1*, *cry2*, *phot1*, and *phot2*, by using combinatorial multiple mutants in *Arabidopsis* (vol 101, pg 2223, 2004). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 5696-5696
- Okada K, Shimura Y** (1992) Aspects of recent developments in mutational studies of plant signaling pathways. *Cell* **70**: 369-372
- Okada K, Shimura Y** (1992) Mutational Analysis of Root Gravitropism and Phototropism of *Arabidopsis-Thaliana* Seedlings. *Australian Journal of Plant Physiology* **19**: 439-448
- Olsson A, Sennelid F, Ek B, Sommarin M, Larsson C** (1998) A phosphothreonine residue at the C-terminal end of the plasma membrane H⁺-ATPase is protected by fusicoccin-induced 14-3-3 binding. *Plant Physiol* **118**: 551-555
- Ottmann C, Marco S, Jaspert N, Marcon C, Schauer N, Weyand M, Vandermeeren C, Duby G, Boutry M, Wittinghofer A, Rigaud JL, Oecking C** (2007) Structure of a 14-3-3 coordinated hexamer of the plant plasma membrane H⁺-ATPase by combining X-ray crystallography and electron cryomicroscopy. *Mol Cell* **25**: 427-440
- Ottmann C, Yasmin L, Weyand M, Veessenmeyer JL, Diaz MH, Palmer RH, Francis MS, Hauser AR, Wittinghofer A, Hallberg B** (2007) Phosphorylation-independent interaction between 14-3-3 and exoenzyme S: from structure to pathogenesis. *EMBO J* **26**: 902-913
- Pallucca R, Visconti S, Camoni L, Cesareni G, Melino S, Panni S, Torreri P, Aducci P** (2014) Specificity of epsilon and non-epsilon isoforms of *arabidopsis* 14-3-3 proteins towards the H⁺-ATPase and other targets. *PLoS One* **9**: e90764
- Palmgren MG** (2001) PLANT PLASMA MEMBRANE H⁺-ATPases: Powerhouses for Nutrient Uptake. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 817-845
- Pan J, Fujioka S, Peng J, Chen J, Li G, Chen R** (2009) The E3 ubiquitin ligase SCFTIR1/AFB and membrane sterols play key roles in auxin regulation of endocytosis, recycling, and plasma membrane accumulation of the auxin efflux transporter PIN2 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **21**: 568-580

- Parks BM, Cho MH, Spalding EP** (1998) Two genetically separable phases of growth inhibition induced by blue light in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol* **118**: 609-615
- Parks BM, Folta KM, Spalding EP** (2001) Photocontrol of stem growth. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 436-440
- Parks BM, Spalding EP** (1999) Sequential and coordinated action of phytochromes A and B during *Arabidopsis* stem growth revealed by kinetic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 14142-14146
- Paul AL, Liu L, McClung S, Laughner B, Chen S, Ferl RJ** (2009) Comparative interactomics: analysis of *Arabidopsis* 14-3-3 complexes reveals highly conserved 14-3-3 interactions between humans and plants. *J Proteome Res* **8**: 1913-1924
- Paul AL, Sehnke PC, Ferl RJ** (2005) Isoform-specific subcellular localization among 14-3-3 proteins in *Arabidopsis* seems to be driven by client interactions. *Mol Biol Cell* **16**: 1735-1743
- Pedersen BP, Buch-Pedersen MJ, Morth JP, Palmgren MG, Nissen P** (2007) Crystal structure of the plasma membrane proton pump. *Nature* **450**: 1111-1114
- Pedmale UV, Celaya RB, Liscum E** (2010) Phototropism: mechanism and outcomes. *Arabidopsis Book* **8**: e0125
- Pedmale UV, Liscum E** (2007) Regulation of phototropic signaling in *Arabidopsis* via phosphorylation state changes in the phototropin 1-interacting protein NPH3. *J Biol Chem* **282**: 19992-20001
- Peer WA, Blakeslee JJ, Yang H, Murphy AS** (2011) Seven things we think we know about auxin transport. *Mol Plant* **4**: 487-504
- Peret B, Swarup K, Ferguson A, Seth M, Yang Y, Dhondt S, James N, Casimiro I, Perry P, Syed A, Yang H, Reemmer J, Venison E, Howells C, Perez-Amador MA, Yun J, Alonso J, Beemster GT, Laplaze L, Murphy A, Bennett MJ, Nielsen E, Swarup R** (2012) AUX/LAX genes encode a family of auxin influx transporters that perform distinct functions during *Arabidopsis* development. *Plant Cell* **24**: 2874-2885
- Perez-Torrado R, Yamada D, Defosse PA** (2006) Born to bind: the BTB protein-protein interaction domain. *Bioessays* **28**: 1194-1202
- Portillo F** (2000) Regulation of plasma membrane H(+)-ATPase in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta* **1469**: 31-42
- Pozuelo Rubio M, Geraghty KM, Wong BH, Wood NT, Campbell DG, Morrice N, Mackintosh C** (2004) 14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking. *Biochem J* **379**: 395-408
- Preuten T, Blackwood L, Christie JM, 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**: 1038-1050
- Richter S, Geldner N, Schrader J, Wolters H, Stierhof YD, Rios G, Koncz C, Robinson DG, Jurgens G** (2007) Functional diversification of closely related ARF-GEFs in protein secretion and recycling. *Nature* **448**: 488-492
- Ritzenthaler C, Nebenfuhr A, Movafeghi A, Stussi-Garaud C, Behnia L, Pimpl P, Staehelin LA, Robinson DG** (2002) Reevaluation of the effects of brefeldin A on plant cells using tobacco Bright Yellow 2 cells expressing Golgi-targeted green fluorescent protein and COPI antisera. *Plant Cell* **14**: 237-261
- Roberts D, Pedmale UV, Morrow J, Sachdev S, Lechner E, Tang X, Zheng N, Hannink M, Genschik P, Liscum E** (2011) Modulation of phototropic responsiveness in *Arabidopsis* through ubiquitination of phototropin 1 by the CUL3-Ring E3 ubiquitin ligase CRL3(NPH3). *Plant Cell* **23**: 3627-3640
- Robinson DG, Jiang L, Schumacher K** (2008) The endosomal system of plants: charting new and familiar territories. *Plant Physiol* **147**: 1482-1492
- Robinson DG, Langhans M, Saint-Jore-Dupas C, Hawes C** (2008) BFA effects are tissue and not just plant specific. *Trends Plant Sci* **13**: 405-408

- Rosenquist M, Alsterfjord M, Larsson C, 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**: 142-149
- Rosenquist M, Sehne P, Ferl RJ, Sommarin M, Larsson C** (2000) Evolution of the 14-3-3 protein family: does the large number of isoforms in multicellular organisms reflect functional specificity? *J Mol Evol* **51**: 446-458
- Ryu H, Kim K, Cho H, Park J, Choe S, Hwang I** (2007) Nucleocytoplasmic shuttling of BZR1 mediated by phosphorylation is essential in Arabidopsis brassinosteroid signaling. *Plant Cell* **19**: 2749-2762
- Ryu H, Kim K, Hwang I** (2008) Spatial redistribution of key transcriptional regulators in brassinosteroid signaling. *Plant Signal Behav* **3**: 278-280
- Sakai T, Haga K** (2012) Molecular genetic analysis of phototropism in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **53**: 1517-1534
- Sakai T, Kagawa T, Kasahara M, Swartz TE, Christie JM, Briggs WR, Wada M, 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**: 6969-6974
- Sakai T, Wada T, Ishiguro S, Okada K** (2000) RPT2. A signal transducer of the phototropic response in Arabidopsis. *Plant Cell* **12**: 225-236
- Sakamoto K, Briggs WR** (2002) Cellular and subcellular localization of phototropin 1. *Plant Cell* **14**: 1723-1735
- Salomon M, Christie JM, Knieb E, Lempert U, Briggs WR** (2000) Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin. *Biochemistry* **39**: 9401-9410
- Salomon M, Knieb E, von Zeppelin T, Rudiger W** (2003) Mapping of low- and high-fluence autophosphorylation sites in phototropin 1. *Biochemistry* **42**: 4217-4225
- Salomon M, Lempert U, Rudiger W** (2004) Dimerization of the plant photoreceptor phototropin is probably mediated by the LOV1 domain. *FEBS Lett* **572**: 8-10
- Scholl RL, May ST, Ware DH** (2000) Seed and molecular resources for Arabidopsis. *Plant Physiol* **124**: 1477-1480
- Schoonheim PJ, Veiga H, Pereira Dda C, Friso G, van Wijk KJ, de Boer AH** (2007) A comprehensive analysis of the 14-3-3 interactome in barley leaves using a complementary proteomics and two-hybrid approach. *Plant Physiol* **143**: 670-683
- Sehne PC, Ferl RJ** (2000) Plant 14-3-3s: omnipotent metabolic phosphopartners? *Sci STKE* **2000**: pe1
- Sehne PC, Henry R, Cline K, Ferl RJ** (2000) Interaction of a plant 14-3-3 protein with the signal peptide of a thylakoid-targeted chloroplast precursor protein and the presence of 14-3-3 isoforms in the chloroplast stroma. *Plant Physiol* **122**: 235-242
- Sehne PC, Laughner B, Cardasis H, Powell D, Ferl RJ** (2006) Exposed loop domains of complexed 14-3-3 proteins contribute to structural diversity and functional specificity. *Plant Physiol* **140**: 647-660
- Shen W, Clark AC, Huber SC** (2003) The C-terminal tail of Arabidopsis 14-3-3 ω functions as an autoinhibitor and may contain a tenth α -helix. *Plant J* **34**: 473-484
- Shen W, Huber SC** (2006) Polycations globally enhance binding of 14-3-3 ω to target proteins in spinach leaves. *Plant Cell Physiol* **47**: 764-771
- Shin R, Jez JM, Basra A, Zhang B, Schachtman DP** (2011) 14-3-3 proteins fine-tune plant nutrient metabolism. *FEBS Lett* **585**: 143-147
- Sirichandra C, Davanture M, Turk BE, Zivy M, Valot B, Leung J, Merlot S** (2010) The Arabidopsis ABA-activated kinase OST1 phosphorylates the bZIP transcription factor ABF3 and creates a 14-3-3 binding site involved in its turnover. *PLoS One* **5**: e13935
- Sluchanko NN, Gusev NB** (2012) Oligomeric structure of 14-3-3 protein: what do we know about monomers? *FEBS Lett* **586**: 4249-4256
- Spalding EP** (2013) Diverting the downhill flow of auxin to steer growth during tropisms. *Am J Bot* **100**: 203-214

- Speth C, Jaspert N, Marcon C, 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**: 145-151
- Spill D, Kaiser WM** (1994) Partial-Purification of 2 Proteins (100 Kda and 67 Kda) Cooperating in the Atp-Dependent Inactivation of Spinach Leaf Nitrate Reductase. *Planta* **192**: 183-188
- Steinmann T, Geldner N, Grebe M, Mangold S, Jackson CL, Paris S, Galweiler L, Palme K, Jurgens G** (1999) Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science* **286**: 316-318
- Stogios PJ, Chen L, Prive GG** (2007) Crystal structure of the BTB domain from the LRF/ZBTB7 transcriptional regulator. *Protein Sci* **16**: 336-342
- Stogios PJ, Downs GS, Jauhal JJ, Nandra SK, Prive GG** (2005) Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome Biol* **6**: R82
- Stone BB, Stowe-Evans EL, Harper RM, Celaya RB, Ljung K, Sandberg G, Liscum E** (2008) Disruptions in AUX1-dependent auxin influx alter hypocotyl phototropism in Arabidopsis. *Mol Plant* **1**: 129-144
- Su W, Huber SC, Crawford NM** (1996) Identification in vitro of a post-translational regulatory site in the hinge 1 region of Arabidopsis nitrate reductase. *Plant Cell* **8**: 519-527
- Suetsugu N, Wada M** (2013) Evolution of three LOV blue light receptor families in green plants and photosynthetic stramenopiles: phototropin, ZTL/FKF1/LKP2 and aureochrome. *Plant Cell Physiol* **54**: 8-23
- Sugden C, Donaghy PG, Halford NG, Hardie DG** (1999) Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, nitrate reductase, and sucrose phosphate synthase in vitro. *Plant Physiol* **120**: 257-274
- Sullivan JA, Deng XW** (2003) From seed to seed: the role of photoreceptors in Arabidopsis development. *Dev Biol* **260**: 289-297
- Sullivan S, Kaiserli E, Tseng TS, Christie JM** (2010) Subcellular localization and turnover of Arabidopsis phototropin 1. *Plant Signal Behav* **5**: 184-186
- Sullivan S, Thomson CE, Kaiserli E, Christie JM** (2009) Interaction specificity of Arabidopsis 14-3-3 proteins with phototropin receptor kinases. *FEBS Lett* **583**: 2187-2193
- Sullivan S, Thomson CE, Lamont DJ, Jones MA, Christie JM** (2008) In vivo phosphorylation site mapping and functional characterization of Arabidopsis phototropin 1. *Mol Plant* **1**: 178-194
- Svennelid F, Olsson A, Piotrowski M, Rosenquist M, Ottman C, Larsson C, Oecking C, Sommarin M** (1999) Phosphorylation of Thr-948 at the C terminus of the plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase creates a binding site for the regulatory 14-3-3 protein. *Plant Cell* **11**: 2379-2391
- Swarup K, Benkova E, Swarup R, Casimiro I, Peret B, Yang Y, Parry G, Nielsen E, De Smet I, Vanneste S, Levesque MP, Carrier D, James N, Calvo V, Ljung K, Kramer E, Roberts R, Graham N, Marillonnet S, Patel K, Jones JD, Taylor CG, Schachtman DP, May S, Sandberg G, Benfey P, Friml J, Kerr I, Beeckman T, Laplaze L, Bennett MJ** (2008) The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nat Cell Biol* **10**: 946-954
- Swarup R, Peret B** (2012) AUX/LAX family of auxin influx carriers-an overview. *Front Plant Sci* **3**: 225
- Swatek KN, Graham K, Agrawal GK, Thelen JJ** (2011) The 14-3-3 isoforms chi and epsilon differentially bind client proteins from developing Arabidopsis seed. *J Proteome Res* **10**: 4076-4087
- Takahashi K, Hayashi K, Kinoshita T** (2012) Auxin activates the plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation during hypocotyl elongation in Arabidopsis. *Plant Physiol* **159**: 632-641
- Takemiya A, Inoue S, Doi M, Kinoshita T, Shimazaki K** (2005) Phototropins promote plant growth in response to blue light in low light environments. *Plant Cell* **17**: 1120-1127
- Takemiya A, Sugiyama N, Fujimoto H, Tsutsumi T, Yamauchi S, Hiyama A, Tada Y, Christie JM, Shimazaki K** (2013) Phosphorylation of BLUS1 kinase by phototropins is a primary step in stomatal opening. *Nat Commun* **4**: 2094

- Takemiya A, Yamauchi S, Yano T, Ariyoshi C, Shimazaki K** (2013) Identification of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 which mediates blue light signaling for stomatal opening. *Plant Cell Physiol* **54**: 24-35
- Tang W, Yuan M, Wang R, Yang Y, Wang C, Oses-Prieto JA, Kim TW, Zhou HW, Deng Z, Gampala SS, Gendron JM, Jonassen EM, Lillo C, DeLong A, Burlingame AL, Sun Y, Wang ZY** (2011) PP2A activates brassinosteroid-responsive gene expression and plant growth by dephosphorylating BZR1. *Nat Cell Biol* **13**: 124-131
- Tanz SK, Castleden I, Hooper CM, Vacher M, Small I, Millar HA** (2013) SUBA3: a database for integrating experimentation and prediction to define the SUBcellular location of proteins in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res* **41**: D1185-1191
- Taoka K, Ohki I, Tsuji H, Furuita K, Hayashi K, Yanase T, Yamaguchi M, Nakashima C, Purwestri YA, Tamaki S, Ogaki Y, Shimada C, Nakagawa A, Kojima C, Shimamoto K** (2011) 14-3-3 proteins act as intracellular receptors for rice Hd3a florigen. *Nature* **476**: 332-335
- Tilbrook K, Arongaus AB, Binkert M, Heijde M, Yin R, Ulm R** (2013) The UVR8 UV-B Photoreceptor: Perception, Signaling and Response. *Arabidopsis Book* **11**: e0164
- Titapiwatanakun B, Blakeslee JJ, Bandyopadhyay A, Yang H, Mravec J, Sauer M, Cheng Y, Adamec J, Nagashima A, Geisler M, Sakai T, Friml J, Peer WA, Murphy AS** (2009) ABCB19/PGP19 stabilises PIN1 in membrane microdomains in Arabidopsis. *Plant J* **57**: 27-44
- Toker A, Ellis CA, Sellers LA, Aitken A** (1990) Protein kinase C inhibitor proteins. Purification from sheep brain and sequence similarity to lipocortins and 14-3-3 protein. *Eur J Biochem* **191**: 421-429
- Tokutomi S, Matsuoka D, Zikihara K** (2008) Molecular structure and regulation of phototropin kinase by blue light. *Biochim Biophys Acta* **1784**: 133-142
- Towbin H, Staehelin T, 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**: 4350-4354
- Treml BS, Winderl S, Radykewicz R, Herz M, Schweizer G, Hutzler P, Glawischnig E, Ruiz RA** (2005) The gene ENHANCER OF PINOID controls cotyledon development in the Arabidopsis embryo. *Development* **132**: 4063-4074
- Tseng TS, Briggs WR** (2010) The Arabidopsis rcn1-1 mutation impairs dephosphorylation of Phot2, resulting in enhanced blue light responses. *Plant Cell* **22**: 392-402
- Tseng TS, Whippo C, Hangarter RP, Briggs WR** (2012) The role of a 14-3-3 protein in stomatal opening mediated by PHOT2 in Arabidopsis. *Plant Cell* **24**: 1114-1126
- Tsuchida-Mayama T, Nakano M, Uehara Y, Sano M, Fujisawa N, Okada K, Sakai T** (2008) Mapping of the phosphorylation sites on the phototropic signal transducer, NPH3. *Plant Science* **174**: 626-633
- Tsuchida-Mayama T, Sakai T, Hanada A, Uehara Y, Asami T, Yamaguchi S** (2010) Role of the phytochrome and cryptochrome signaling pathways in hypocotyl phototropism. *Plant J* **62**: 653-662
- Ueda T, Uemura T, Sato MH, Nakano A** (2004) Functional differentiation of endosomes in Arabidopsis cells. *Plant J* **40**: 783-789
- Ueda T, Yamaguchi M, Uchimiya H, Nakano A** (2001) Ara6, a plant-unique novel type Rab GTPase, functions in the endocytic pathway of Arabidopsis thaliana. *EMBO J* **20**: 4730-4741
- Uemura T, Ueda T, Ohniwa RL, Nakano A, Takeyasu K, Sato MH** (2004) Systematic analysis of SNARE molecules in Arabidopsis: dissection of the post-Golgi network in plant cells. *Cell Struct Funct* **29**: 49-65
- Ueno K, Kinoshita T, Inoue S, Emi T, 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**: 955-963
- Umezawa T, Sugiyama N, Takahashi F, Anderson JC, Ishihama Y, Peck SC, Shinozaki K** (2013) Genetics and phosphoproteomics reveal a protein phosphorylation network in the abscisic acid signaling pathway in Arabidopsis thaliana. *Sci Signal* **6**: rs8

- Urbanus SL, Ott T** (2012) Plasticity of plasma membrane compartmentalization during plant immune responses. *Front Plant Sci* **3**: 181
- van Heusden GP, Griffiths DJ, Ford JC, Chin AWTF, Schrader PA, Carr AM, Steensma HY** (1995) The 14-3-3 proteins encoded by the BMH1 and BMH2 genes are essential in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and can be replaced by a plant homologue. *Eur J Biochem* **229**: 45-53
- van Heusden GP, van der Zanden AL, Ferl RJ, Steensma HY** (1996) Four *Arabidopsis thaliana* 14-3-3 protein isoforms can complement the lethal yeast *bmh1 bmh2* double disruption. *FEBS Lett* **391**: 252-256
- van Kleeff PJ, Jaspert N, Li KW, Rauch S, Oecking C, de Boer AH** (2014) Higher order *Arabidopsis* 14-3-3 mutants show 14-3-3 involvement in primary root growth both under control and abiotic stress conditions. *J Exp Bot* **65**: 5877-5888
- Verrier PJ, Bird D, Burla B, Dassa E, Forestier C, Geisler M, Klein M, Kolukisaoglu U, Lee Y, Martinoia E, Murphy A, Rea PA, Samuels L, Schulz B, Spalding EJ, Yazaki K, Theodoulou FL** (2008) Plant ABC proteins--a unified nomenclature and updated inventory. *Trends Plant Sci* **13**: 151-159
- Walter M, Chaban C, Schutze K, Batistic O, Weckermann K, Nake C, Blazevic D, Grefen C, Schumacher K, Oecking C, Harter K, Kudla J** (2004) Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* **40**: 428-438
- Wan Y, Jasik J, Wang L, Hao H, Volkmann D, Menzel D, Mancuso S, Baluska F, Lin J** (2012) The signal transducer NPH3 integrates the phototropin1 photosensor with PIN2-based polar auxin transport in *Arabidopsis* root phototropism. *Plant Cell* **24**: 551-565
- Wan YL, Eisinger W, Ehrhardt D, Kubitscheck U, Baluska F, Briggs W** (2008) The subcellular localization and blue-light-induced movement of phototropin 1-GFP in etiolated seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* **1**: 103-117
- Wang H, Yang C, Zhang C, Wang N, Lu D, Wang J, Zhang S, Wang ZX, Ma H, Wang X** (2011) Dual role of BKI1 and 14-3-3 s in brassinosteroid signaling to link receptor with transcription factors. *Dev Cell* **21**: 825-834
- Wang J, Cai Y, Miao Y, Lam SK, Jiang L** (2009) Wortmannin induces homotypic fusion of plant prevacuolar compartments. *J Exp Bot* **60**: 3075-3083
- Wang X, Chory J** (2006) Brassinosteroids regulate dissociation of BKI1, a negative regulator of BRI1 signaling, from the plasma membrane. *Science* **313**: 1118-1122
- Wang ZY, Nakano T, Gendron J, He J, Chen M, Vafeados D, Yang Y, Fujioka S, Yoshida S, Asami T, Chory J** (2002) Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Dev Cell* **2**: 505-513
- Watahiki MK, Tatematsu K, Fujihira K, Yamamoto M, Yamamoto KT** (1999) The MSG1 and AXR1 genes of *Arabidopsis* are likely to act independently in growth-curvature responses of hypocotyls. *Planta* **207**: 362-369
- Weckermann K** (2008) Die 14-3-3 Protein-Familie in *Arabidopsis thaliana*: Untersuchungen zur funktionellen Redundanz versus Spezifität. Monographie. Eberhard Karls Universität Tübingen, Universitätsbibliothek Tübingen
- Went FW, Thimann KV** (1937) *Phytohormones*. MacMillan Company, New York.
- Whippo CW, Hangarter RP** (2003) Second positive phototropism results from coordinated co-action of the phototropins and cryptochromes. *Plant Physiol* **132**: 1499-1507
- Wienken CJ, Baaske P, Rothbauer U, Braun D, Duhr S** (2010) Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nat Commun* **1**: 100
- Wigge PA, Kim MC, Jaeger KE, Busch W, Schmid M, Lohmann JU, Weigel D** (2005) Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science* **309**: 1056-1059
- Willige BC, Ahlers S, Zourelidou M, Barbosa IC, Demarsy E, Trevisan M, Davis PA, Roelfsema MR, Hangarter R, Fankhauser C, Schwechheimer C** (2013) D6PK AGCVIII kinases are required for auxin transport and phototropic hypocotyl bending in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**: 1674-1688

- Witthoft J, Caesar K, Elgass K, Huppenberger P, Kilian J, Schleifenbaum F, Oecking C, Harter K** (2011) The activation of the Arabidopsis P-ATPase 1 by the brassinosteroid receptor BRI1 is independent of threonine 948 phosphorylation. *Plant Signal Behav* **6**: 1063-1066
- Wu G, Lewis DR, Spalding EP** (2007) Mutations in Arabidopsis multidrug resistance-like ABC transporters separate the roles of acropetal and basipetal auxin transport in lateral root development. *Plant Cell* **19**: 1826-1837
- Wu K, Lu G, Sehne P, Ferl RJ** (1997) The heterologous interactions among plant 14-3-3 proteins and identification of regions that are important for dimerization. *Arch Biochem Biophys* **339**: 2-8
- Wurtele M, Jelic-Ottmann C, Wittinghofer A, Oecking C** (2003) Structural view of a fungal toxin acting on a 14-3-3 regulatory complex. *EMBO J* **22**: 987-994
- Xiao B, Smerdon SJ, Jones DH, Dodson GG, Soneji Y, Aitken A, Gamblin SJ** (1995) Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways. *Nature* **376**: 188-191
- Xing T, Higgins VJ, Blumwald E** (1996) Regulation of Plant Defense Response to Fungal Pathogens: Two Types of Protein Kinases in the Reversible Phosphorylation of the Host Plasma Membrane H⁺-ATPase. *Plant Cell* **8**: 555-564
- Yaffe MB** (2002) How do 14-3-3 proteins work?-- Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett* **513**: 53-57
- Yaffe MB, Rittinger K, Volinia S, Caron PR, Aitken A, Leffers H, Gamblin SJ, Smerdon SJ, Cantley LC** (1997) The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell* **91**: 961-971
- Yaffe MP, Schatz G** (1984) Two nuclear mutations that block mitochondrial protein import in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 4819-4823
- Yamauchi T, Nakata H, Fujisawa H** (1981) A new activator protein that activates tryptophan 5-monooxygenase and tyrosine 3-monooxygenase in the presence of Ca²⁺-, calmodulin-dependent protein kinase. Purification and characterization. *J Biol Chem* **256**: 5404-5409
- Yang H, Richter GL, Wang X, Mlodzinska E, Carraro N, Ma G, Jenness M, Chao DY, Peer WA, Murphy AS** (2013) Sterols and sphingolipids differentially function in trafficking of the Arabidopsis ABCB19 auxin transporter. *Plant J* **74**: 37-47
- Yang X, Lee WH, Sobott F, Papagrigoriou E, Robinson CV, Grossmann JG, Sundstrom M, Doyle DA, Elkins JM** (2006) Structural basis for protein-protein interactions in the 14-3-3 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 17237-17242
- Yang Y, Hammes UZ, Taylor CG, Schachtman DP, Nielsen E** (2006) High-affinity auxin transport by the AUX1 influx carrier protein. *Curr Biol* **16**: 1123-1127
- Yin Y, Wang ZY, Mora-Garcia S, Li J, Yoshida S, Asami T, Chory J** (2002) BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell* **109**: 181-191
- Zhang KX, Xu HH, Yuan TT, Zhang L, Lu YT** (2013) Blue-light-induced PIN3 polarization for root negative phototropic response in Arabidopsis. *Plant J* **76**: 308-321
- Zhao X, Wang YL, Qiao XR, Wang J, Wang LD, Xu CS, Zhang X** (2013) Phototropins function in high-intensity blue light-induced hypocotyl phototropism in Arabidopsis by altering cytosolic calcium. *Plant Physiol* **162**: 1539-1551
- Zourelidou M, Muller I, Willige BC, Nill C, Jikumaru Y, Li H, Schwechheimer C** (2009) The polarly localized D6 PROTEIN KINASE is required for efficient auxin transport in Arabidopsis thaliana. *Development* **136**: 627-636

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------------|---|
| Δ | Delta/Deletion |
| ° C | Grad Celsius |
| (v/v) | Volumen pro Volumen, „volume per volume“ |
| (w/v) | Gewicht pro Volumen, „weight per volume“ |
| 35S | sehr starker viraler Promotor des Blumenkohlmosaikvirus („CaMV“), steuert die Transkription des ganzen viralen Genoms zur 35S-mRNA, „CaMV 35S promoter“ |
| A | Adenosin |
| A/Ala | Alanin |
| <i>A. thaliana</i> | <i>Arabidopsis thaliana</i> , die Acker-Schmalwand |
| <i>A. tumefaciens</i> | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , lateinisch für „Tumor machendes Ackerbakterium“, neuerdings auch bezeichnet als <i>Rhizobium radiobacter</i> |
| ABA | Abscisinsäure, „abscisic acid“ |
| AD | Aktivierungs-Domäne, „activation domain“ |
| ADP | Adenosindiphosphat, „adenosine diphosphate“ |
| AHA1/2 | H ⁺ -ATPase Isoform 1/2 aus <i>Arabidopsis</i> , „ <i>Arabidopsis</i> H ⁺ -ATPase isoform 1/2“ |
| Amp | Ampicillin |
| AMP | Adenosinmonophosphat, „adenosine monophosphate“ |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| ARF | Adenosyl-Ribosylierungs-Faktor, „ADP ribosylation factor“ |
| ARF | „auxin response factor“ |
| ARF-GAP | Adenosyl-Ribosylierungs-Faktor GTPase-aktivierendes Protein, „ADP ribosylation factor GTPase-activating protein“ |
| ARF-GEF | Adenosyl-Ribosylierungs-Faktor GTP-Austauschfaktor, „ADP ribosylation factor guanine nucleotide exchange factor“ |
| AS | Aminosäure/n |
| At | <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| ATP | Adenosintriphosphat, „adenosine triphosphate“ |
| Bakt. | Bakterien |
| bp | Basenpaar/e, „base pair/s“ |
| BiFC | bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation |

| | |
|----------------|---|
| BKI | Blatt-Krümmungs-Index |
| BL | Blaulicht |
| BLUS1 | „BLUE LIGHT SIGNALING 1“ |
| BR | Brassinosteroide |
| BTB/POZ-Domäne | „Bric-a-brac, Tramtrack, Broad-Complex/POX Virus and Zinc finger“-Domäne |
| bzgl. | bezüglich |
| bZIP | Leucin-Zipper, „basic leucine zipper domain“ |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | ungefähr, <i>circa</i> |
| Carb | Carbenicillin |
| CC | „Coiled Coil“-Domäne |
| CDS | codierende Sequenz, „coding sequence“ |
| cDNA | komplementäre DNA, „complementary DNA“ |
| CIP | Kalbsdarm-Phosphatase, „calf-intestinal alkaline phosphatase“ |
| CLSM | konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie, „confocal laser scanning microscopy“ |
| cm | Zentimeter |
| CME | Clathrin-vermittelte Endozytose, „clathrin-mediated endocytosis“ |
| C- | Carboxy- |
| c-Myc-tag | Polypeptid, abgeleitet vom c-Myc-Protein (mit dem Namen assoziierte Krankheit: Myelocytomatose) |
| Co-IP | Koimmunpräzipitation |
| Col-0 | Columbia, Wildtyp-Linie |
| CRL3 | „CUL3-Ring E3 ubiquitin ligase“ |
| cry1/2 | Cryptochrom/e 1/2, Blaulicht-Rezeptor/en |
| Cyc | Cycloheximid |
| d | Tag/e |
| D/Asp | Asparaginsäure |
| D | Dunkel/Dunkelheit |
| Da/kDa | Dalton/Kilodalton (atomare Masseneinheit) |
| dATP | Desoxyadenosintriphosphat |
| d.h. | das heißt |

| | |
|----------------|--|
| DNA | Desoxyribonukleinsäure, „deoxyribonucleic acid“ |
| DNA-BD | DNA-Binde-Domäne, „DNA binding domain“ |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| dpi | Punktdichte, „dots per inch“ |
| dsDNA | doppelsträngige DNA, „double stranded DNA“ |
| E/Glu | Glutaminsäure |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> , Kolibakterium |
| ec | extrazellulär, „extra cellular“ |
| ECL | verbesserte Chemilumineszenz, „enhanced chemiluminescence“ |
| EHB1 | „ENHANCED BENDING 1“ |
| engl. | Englisch |
| ENP | „ENHANCER OF PINOID“ |
| ER | endoplasmatisches Retikulum |
| etc. | und so weiter, <i>et cetera</i> |
| evtl. | eventuell |
| F/Phe | Phenylalanin |
| FAC | „florigen activation complex“ |
| FC | Fusicoccin, Diterpen-Glukosid, Pilztoxin |
| FD | „FLOWERING LOCUS D“ |
| FKF1 | „flavin-binding kelch repeat F box protein 1“, Blaulicht-Rezeptor |
| fp | Familien-Protein, „family protein“ |
| FRET-FLIM | Förster/(Fluoreszenz)-Resonanzenergietransfer–Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie („Förster resonance energy transfer–fluorescence-lifetime imaging microscopy“) |
| FT | „FLOWERING LOCUS T“ |
| g | Erd-/Normalfallbeschleunigung ($g_n = 9,80665 \text{ m s}^{-2}$) |
| g | Gramm |
| GA | Groß-Ansatz |
| GABI-Kat | „German plant genomics research program – Kölner <i>Arabidopsis</i> T-DNA lines“ |
| gDNA | genomische DNA, „genomic DNA“ |
| Gent | Gentamycin |
| gg | gegen |

| | |
|----------------------|---|
| ggf. | gegebenenfalls |
| GO | „gene ontology“ |
| GRF | „general regulatory factor“, andere Bezeichnung für 14-3-3 Proteine |
| H/His | Histidin |
| h | Stunde/n |
| H ⁺ | Proton/en |
| HA-tag | Polypeptid, abgeleitet vom „Human influenza hemagglutinin“-Glykoprotein |
| Hd3a | „FLOWERING LOCUS T“-Homolog aus Reis |
| Hyg | Hygromycin B |
| I/Ile | Isoleucin |
| IgG | Immunglobulin G, Gammaglobulin |
| IP | Immunopräzipitation |
| IP/IPs | Interaktionspartner |
| K/Lys | Lysin |
| KA | Klein-Ansatz |
| Kan | Kanamycin |
| kb/kbp | Kilobase/n (1000 Basenpaare), „kilo base pair/s“ |
| kg | Kilogramm |
| l | Liter |
| L | Licht |
| L/Leu | Leucin |
| <i>L. japonicus</i> | <i>Lotus japonicus</i> , eine Varietät des Gewöhnlichen Hornklee |
| LKP2 | „LOV kelch protein 2“, Blaulicht-Rezeptor |
| LOV | „light-oxygen-voltage-sensing“-Domäne |
| LRR-RLK | Leucin-reiche Rezeptor-ähnliche Kinase/n, „leucine-rich repeat receptor-like kinase/s“ |
| M/Met | Methionin |
| M | molar |
| <i>M. truncatula</i> | <i>Medicago truncatula</i> , Pflanzenart aus der Gattung des Schneckenklee |
| mA | Milliampere |
| MAB4 | „MACCHI-BOU 4“, andere Bezeichnung für ENP/NPY1/MEL1 |
| MAP | „mitogen-activated protein“ |

| | |
|-------------------------------|---|
| MELs | „MAB4/ENP-Like“-Proteine |
| mg | Milligramm |
| mGFP4 | modifiziertes Grün fluoreszierendes Protein, Derivat #4 (Haseloff and Amos, 1995) |
| MHA2 | H ⁺ -ATPase Isoform 2 aus Mais, „Maize H ⁺ -ATPase isoform 2“ |
| µg [micro] | Mikrogramm |
| µl [micro] | Mikroliter |
| µm [micro] | Mikrometer |
| min | Minute/n |
| mind. | mindestens |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mM | millimolar |
| mRNA | Boten-RNA, „messenger RNA“ |
| MS | Massenspektroskopie/massenspektroskopisch/e/r |
| MST | „microscale thermophoresis“ |
| N/Asn | Asparagin |
| <i>N. benthamiana/tabacum</i> | <i>Nicotiana benthamiana</i> , Tabak-Art aus der Sektion <i>Suaveolentes</i> bzw. <i>Nicotiana tabacum</i> , der Virginische Tabak |
| n.d. | nicht durchgeführt |
| n.s. | nicht signifikant unterschiedlich |
| N- | Amino- |
| ng | Nanogramm |
| nm | Nanometer |
| ns | Nanosekunden |
| NPH3 | „NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTYL 3“ |
| NPY | „NAKED PINS IN YUC MUTANTS“ |
| NR | Nitrat-Reduktase, „nitrate reductase“ |
| NRLs | „NPH3/RPT2-Like“-Proteine |
| <i>O. sativa</i> | <i>Oryza sativa</i> , der asiatische Reis |
| Os | <i>Oryza sativa</i> |
| OsFD1 | „FLOWERING LOCUS D“-Homolog aus Reis |
| P/Pro | Prolin |
| PAR | photosynthetisch aktive Strahlung, „photosynthetically active radiation“ |

| | |
|----------------------|---|
| PCR | Polymerase-Ketten-Reaktion, „polymerase chain reaction“ |
| Pfl./pfl. | Pflanzen/pflanzlich |
| PHOT1/2 | Phototropin/e 1/2, Blaulicht-Rezeptor/en |
| phyA/B/C/D/E | Phytochrom/e A/B/C/D/E, Rotlicht-Rezeptor/en |
| PINs | „PIN-FORMED“-Proteine |
| PKD | Protein-Kinase-Domäne |
| PKSs | „PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE“-Proteine |
| PM | Plasmamembran |
| PP | Protein-Phosphatase |
| R/Arg | Arginin |
| rBiFC | ratiometrische bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation |
| RFP | Rot fluoreszierendes Protein |
| Rif | Rifampicin |
| RL | Rotlicht |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | Umdrehungen pro Minute, „revolutions per minute“ |
| RPT2 | „ROOT PHOTOTROPISM 2“ |
| RT | Raumtemperatur, „room temperature“ |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion, „reverse transcription polymerase chain reaction“ |
| s | Sekunde/n |
| S/Ser | Serin |
| S | Svedberg (Sedimentations-Koeffizient) |
| s. | siehe |
| <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , die Bierhefe |
| <i>S. oleracea</i> | <i>Spinacia oleracea</i> , der Spinat |
| s.o./u. | siehe oben/unten |
| SDS-PAGE | Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, „sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis“ |
| sog. | sogenannt/e |
| Spec | Spectinomycin |
| spezif. | spezifisch/e |
| SPR | Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie, „surface plasmon resonance“ |
| ssDNA | einzelsträngige DNA, „single stranded DNA“ |

| | |
|--------------------|--|
| Sulf | Sulfadiazin |
| T/Thr | Threonin |
| T _x | Samen bzw. Pflanzen der Xten transformierten Generation, wobei T ₀ die ursprünglichen transformierten Pflanzen waren |
| T-DNA | Transfer-DNA, „transfer DNA“ |
| TAIR | „The <i>Arabidopsis</i> Information Resource“, www.arabidopsis.org |
| TF | Transkriptionsfaktor |
| Tet | Tetracyclin |
| TGN | Trans-Golgi-Netzwerk, „trans-Golgi network“ |
| U | Enzymeinheit |
| u.a. | unter anderem/n |
| UTRs, 5′/3′UTR | nichttranslatierte/r Bereich/e, „untranslated region/s“, 5′UTR: „leader“ Sequenz, beginnt am Transkriptionsstartpunkt und reicht bis zum Startcodon, 3′UTR: „trailer“ Sequenz, beginnt hinter dem Stopcodon und reicht bis zum Polyadenylierungsbeginn |
| UV | Ultraviolett |
| UVR8 | „UV-B resistance 8“, UV-B-Licht-Rezeptor |
| V/Val | Valin |
| <i>V. faba</i> | <i>Vicia faba</i> , die Ackerbohne |
| <i>V. vinifera</i> | <i>Vitis vinifera</i> , die Weinrebe |
| W/Trp | Tryptophan |
| w/o | ohne, „without“ |
| WT | Wildtyp/wildtypisch, „wild type“ |
| Y/Tyr | Tyrosin |
| Y2H | Hefe-2-Hybrid-System, „yeast two-hybrid system“ |
| Y3H | Hefe-3-Hybrid-System, „yeast three-hybrid system“ |
| YFP, n/cYFP | Gelb fluoreszierendes Protein, Amino- bzw. Carboxy-terminaler Teil des YFP |
| z.B. | zum Beispiel |
| <i>Z. mays</i> | <i>Zea mays</i> , der Mais |
| Zeo | Zeocin™ |
| ZTL | ZEITLUPE, Blaulicht-Rezeptor |
| ztl | ZEITLUPE-Proteine, Gruppe von Blaulicht-Rezeptoren |

Alignment der dreizehn 14-3-3 Isoformen aus *A. thaliana*

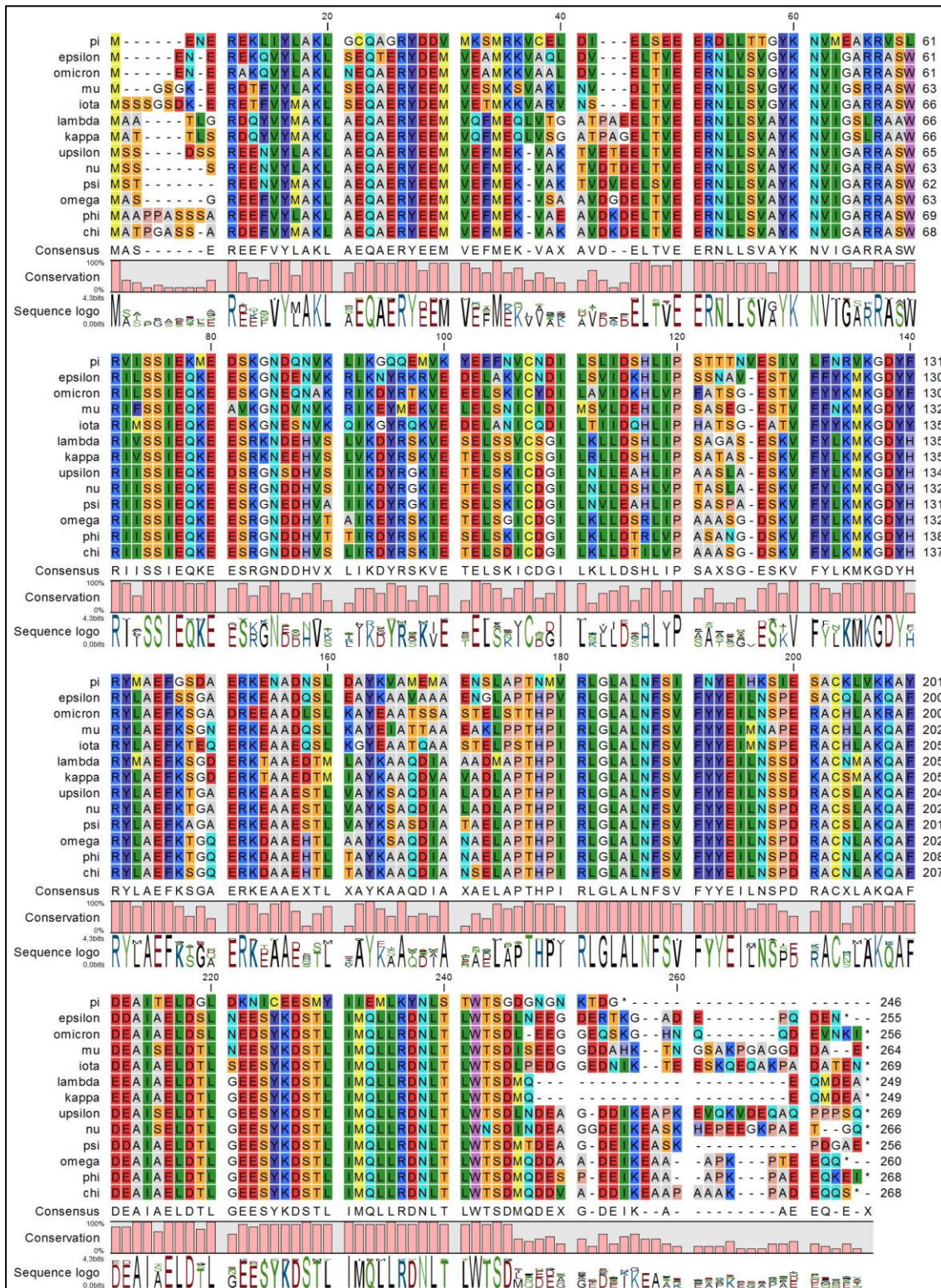


Abbildung 44 Alignment der dreizehn 14-3-3 Isoformen aus *A. thaliana*. Das multiple Sequenz-Alignment der Proteine wurde mit der CLC Main Workbench 6.9 (Neighbour-Joining Methode unter Verwendung von 10.000 Bootstrap Replikationen) durchgeführt.

Identifizierung putativer Interaktionspartner von 14-3-3 Isoformen mittels

Hefe-2-Hybrid-System

Sichtung einer cDNA-Bibliothek unter Verwendung der unterschiedlichen 14-3-3 Isoformen (epsilon, kappa, omega und upsilon) als Köder

Sequenzierte PCR-Produkte bzw. putative Interaktionspartner aus den Sichtungen einer cDNA-Bibliothek mittels des Hefe-2-Hybrid-Systems unter Verwendung von vier unterschiedlichen 14-3-3 Isoformen als Köder

Die putativen IPs der jeweiligen 14-3-3 Isoform (epsilon, kappa, omega und upsilon) bzw. die kumulierten Daten sind tabellarisch als Excel-Files auf der beigefügten CD verfügbar.

- putative IPs aus der Sichtung mit epsilon: Tabelle 01
- putative IPs aus der Sichtung mit kappa: Tabelle 02
- putative IPs aus der Sichtung mit omega: Tabelle 03
- putative IPs aus der Sichtung mit upsilon: Tabelle 04
- putative IPs aller Sichtungen (kumuliert): Tabelle 05

Putative Interaktionspartner, die „exklusiv“ in den verschiedenen Sichtungen mit den unterschiedlichen 14-3-3 Isoformen oder die in den Schnittmengen aufgetreten sind

Die putativen IPs, die „exklusiv“ in den verschiedenen Sichtungen mit den unterschiedlichen 14-3-3 Isoformen oder die in den Schnittmengen aufgetreten sind, sind tabellarisch als Excel-Files auf der beigefügten CD verfügbar.

- exklusive putative IPs aus der Sichtung mit epsilon: Tabelle 06
- exklusive putative IPs aus der Sichtung mit kappa: Tabelle 07
- exklusive putative IPs aus der Sichtung mit omega: Tabelle 08
- exklusive putative IPs aus der Sichtung mit upsilon: Tabelle 09

- putative IPs aus den Schnittmengen der Sichtungen: Tabelle 10 bis 34

Vergleich der Klassifizierung der putativen Interaktionspartner, die ausschließlich von einer spezifischen Isoform identifiziert wurden, anhand ihrer Gen-Ontologie-Annotation

Bei näherer Betrachtung der auf der GO-Annotation durchgeführten Einteilung der Proteine, die ausschließlich durch eine Isoform identifiziert wurden (Restmengen der einzelnen cDNA-Sichtungen, s. Abbildung 4 (Ergebnisse), epsilon 213 IPs, kappa 111 IPs, omega 27 IPs, upsilon 47 IPs), fällt kein

signifikant großer Unterschied bzgl. den unterschiedlichen Isoformen auf (s. Abbildung 45). Tendenziell weisen jedoch die Isoformen omega und upsilon, im Vergleich zu den beiden anderen Isoformen (wie in Kapitel 3.1.2.1 schon beschrieben), einen größeren prozentualen Anteil ihrer exklusiven IPs in Gruppen auf, die im weitesten Sinne etwas mit der Regulation der Genexpression zu tun haben („nucleus“ s. Abbildung 45 **A**, „transcription factor activity“ s. Abbildung 45 **B**, „transcription, DNA-dependent“ s. Abbildung 45 **C**, Ergebnisse).

Auch hier lässt sich keine genaue Angabe in Bezug auf die Gruppen-, und Subgruppen-Spezifität machen; alle in den cDNA-Sichtungen eingesetzten Isoformen interagieren zu relativ äquivalenten Anteilen mit Proteinen aus allen Bereichen der GO-Annotationen.

Vergleich mit anderen Studien zur Ermittlung des 14-3-3 Interaktoms

Eine detaillierte Auflistung der Ergebnisse der unterschiedlichen Studien und die aus den Vergleichen resultierenden Schnittmengen sind tabellarisch als Excel-Files auf der beigefügten CD verfügbar.

- kumulierte Ergebnisse aus unseren Sichtungen (**1 (oec)**): Tabelle 35
- Ergebnisse des *Arabidopsis* Interactome Mapping (2011) (**2 (aimc)**): Tabelle 36
- Ergebnisse von Chang et al. (2009) (**3 (chang)**): Tabelle 37
- Ergebnisse von Paul et al. (2009) (**4 (paul)**): Tabelle 38
- Ergebnisse von Schoonheim et al. (2007) (**5 (schoo)**): Tabelle 39
- Ergebnisse von Shin et al. (2011) (**6 (shin)**): Tabelle 40
- Ergebnisse von Swatek et al. (2011) (**7 (swa)**): Tabelle 41

- Schnittmengen der sieben Studien: Tabelle 42

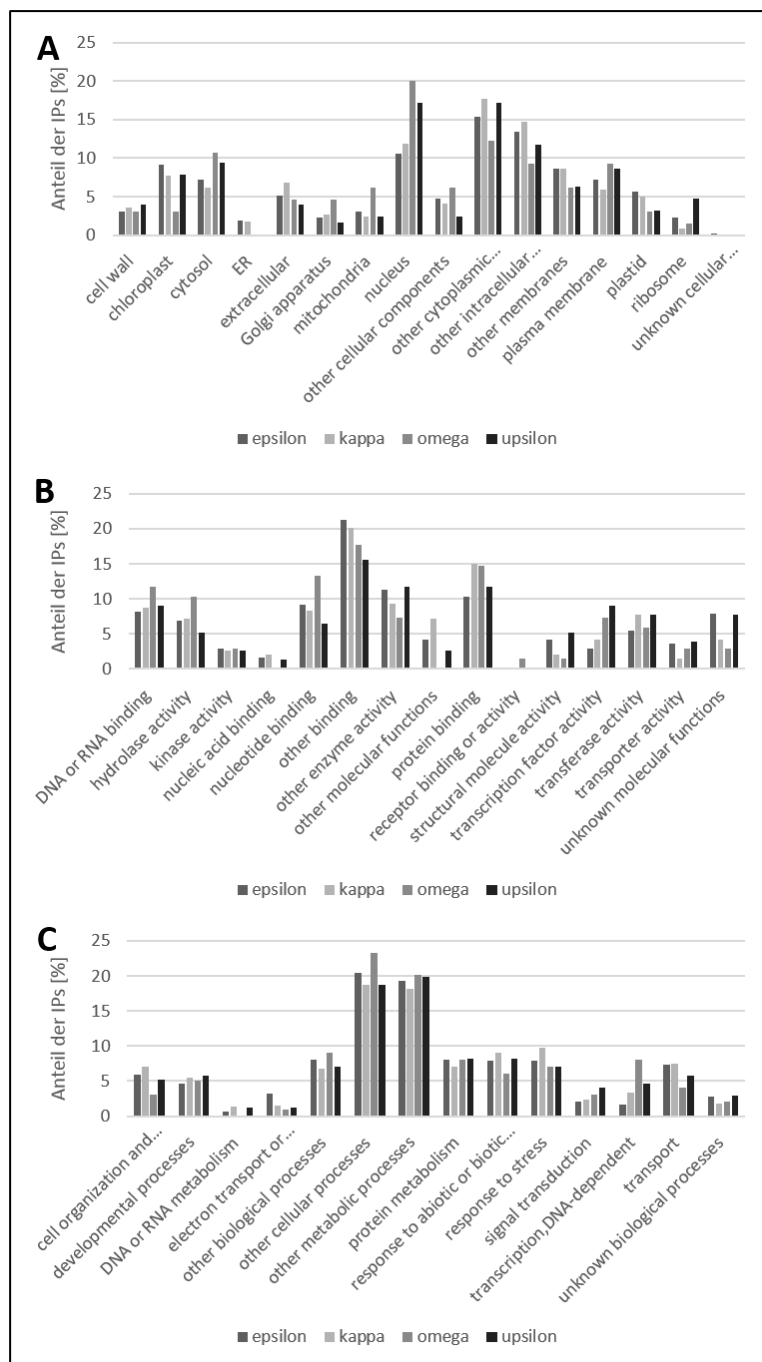


Abbildung 45 Gruppeneinteilung der putativen IPs, die ausschließlich durch eine Isoform identifiziert wurden, anhand ihrer Gen-Ontologie-Annotation bei TAIR. Klassifizierung anhand ihres Vorkommens in unterschiedlichen zellulären Komponenten (A), ihrer molekularen Funktion (B), und ihres Mitwirkens in unterschiedlichen biologischen Prozessen (C).

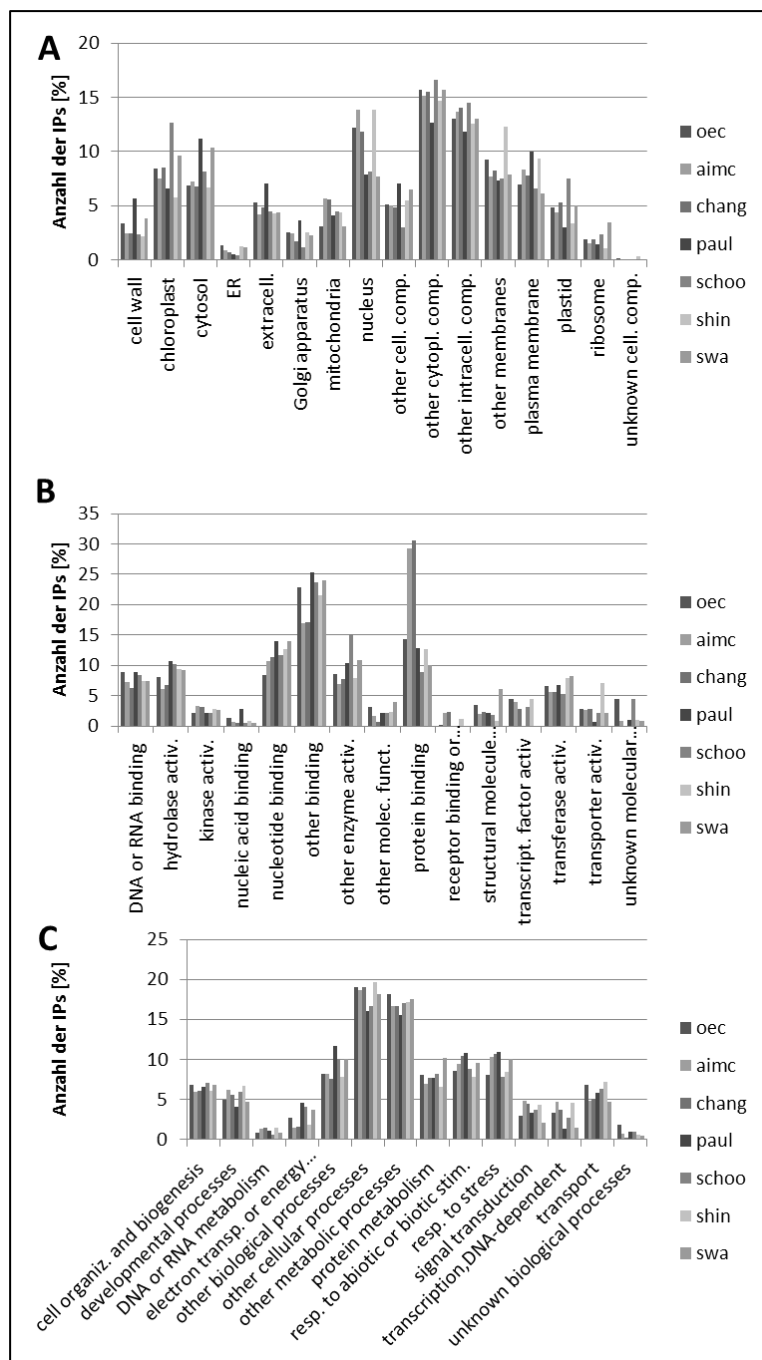


Abbildung 46 Gruppeneinteilung der putativen IPs der zu vergleichenden Interaktom-Sichtungen/Studien anhand ihrer Gen-Ontologie-Annotation bei TAIR. Klassifizierung anhand ihres Vorkommens in unterschiedlichen zellulären Komponenten (A), ihrer molekularen Funktion (B), und ihres Mitwirkens in unterschiedlichen biologischen Prozessen (C).

Untersuchungen zur Interaktion von 14-3-3 Isoformen mit Proteinen der NPH3-Familie mittels Hefe-2-Hybrid-System

Bestätigung der Interaktion von 14-3-3 Isoformen und ausgewählter Proteine der
NPH3-Familie

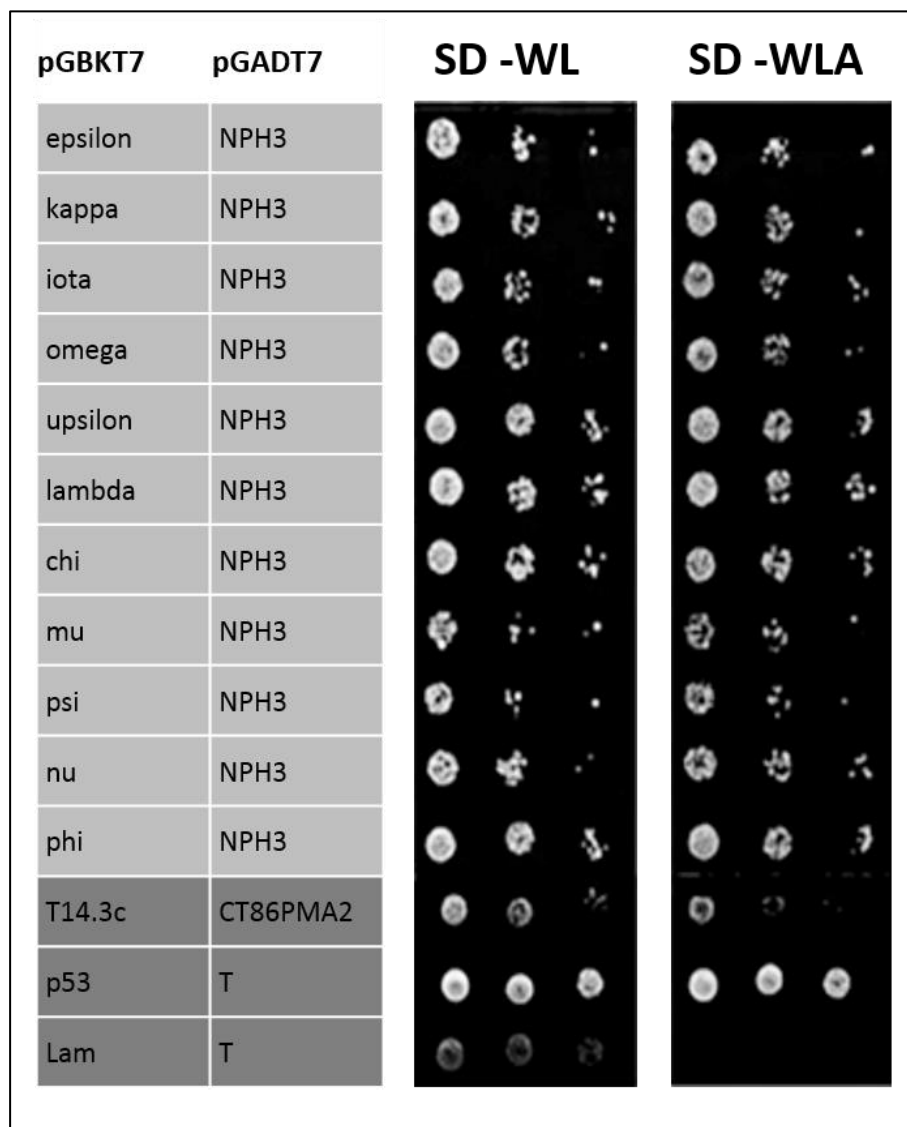


Abbildung 47 Bestätigung der Interaktion von versch. 14-3-3 Isoformen mit NPH3 mittels des Hefe-2-Hybrid-Systems. Die Transformations-Kontrolle der simultan-transformierten Hefen erfolgte auf „Synthetic Drop-out“-Medium ohne Tryptophan und Leucin (SD-WL), die Bestätigung der Protein-Protein-Interaktion erfolgte auf „Synthetic Drop-out“-Medium ohne Tryptophan, Leucin und Adenin (SD-WLA). Die ursprünglichen Hefe-Übernachtskulturen wurden auf eine OD_{600} von 0,05 eingestellt, davon wurde jeweils eine 1:10 und 1:100 Verdünnung erstellt und jeweils 4 μ l auf die entsprechenden Selektionsplatten getropft. Die Inkubation der Platten fand für 4 Tage bei 30 °C statt.

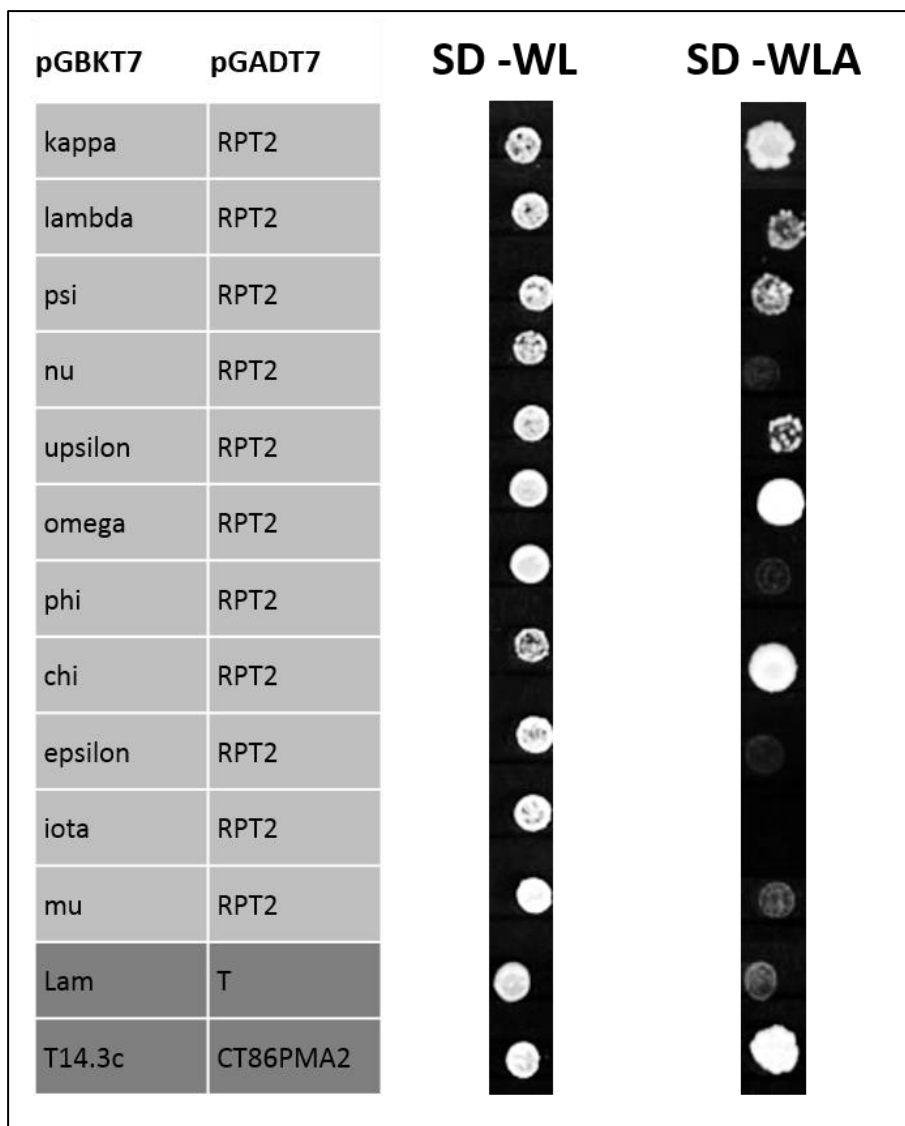


Abbildung 48 Bestätigung der Interaktion von versch. 14-3-3 Isoformen mit RPT2 mittels des Hefe-2-Hybrid-Systems. Die Transformations-Kontrolle der simultan-transformierten Hefen erfolgte auf „Synthetic Drop-out“-Medium ohne Tryptophan und Leucin (SD-WL), die Bestätigung der Protein-Protein-Interaktion erfolgte auf „Synthetic Drop-out“-Medium ohne Tryptophan, Leucin und Adenin (SD-WLA). Die ursprünglichen Hefe-Übernachtskulturen wurden auf eine OD_{600} von 0,05 eingestellt, davon wurde jeweils eine 1:10 und 1:100 Verdünnung erstellt und jeweils 4 μ l auf die entsprechenden Selektionsplatten getropft. Die Inkubation der Platten fand für 4 Tage bei 30 °C statt.

| pGBKT7 | pGADT7 | SD -WL | SD -WLA |
|---------|----------|--------|---------|
| iota | ENP | | |
| epsilon | ENP | | |
| mu | ENP | | |
| lambda | ENP | | |
| kappa | ENP | | |
| upsilon | ENP | | |
| nu | ENP | | |
| psi | ENP | | |
| phi | ENP | | |
| omega | ENP | | |
| chi | ENP | | |
| leer | ENP | | |
| T14.3c | CT86PMA2 | | |
| Lam | T | | |

Abbildung 49 Bestätigung der Interaktion von versch. 14-3-3 Isoformen mit ENP mittels des Hefe-2-Hybrid-Systems. Die Transformations-Kontrolle der simultan-transformierten Hefen erfolgte auf „Synthetic Drop-out“-Medium ohne Tryptophan und Leucin (SD-WL), die Bestätigung der Protein-Protein-Interaktion erfolgte auf „Synthetic Drop-out“-Medium ohne Tryptophan, Leucin und Adenin (SD-WLA). Die ursprünglichen Hefe-Übernachtskulturen wurden auf eine OD_{600} von 0,05 eingestellt, davon wurde jeweils eine 1:10 und 1:100 Verdünnung erstellt und jeweils 4 μ l auf die entsprechenden Selektionsplatten getropft. Die Inkubation der Platten fand für 4 Tage bei 30 °C statt.

Identifizierung des 14-3-3 Bindemotivs in den NPH3-Familien-Proteinen

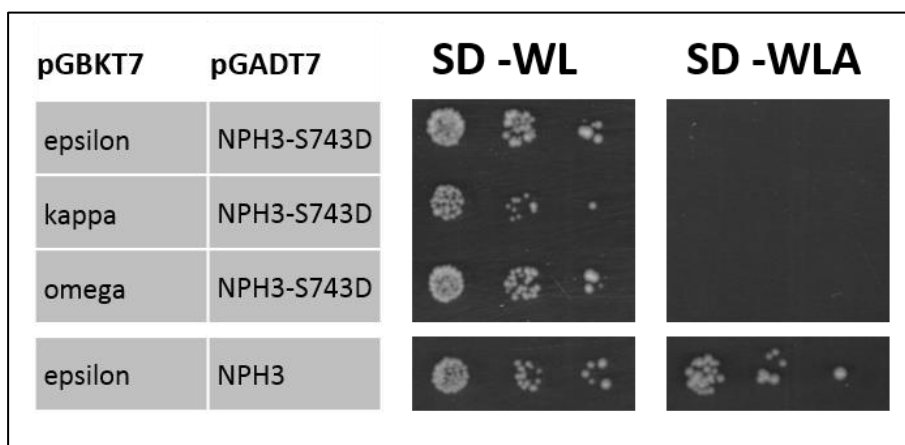
Mimikrierung der Phosphorylierung im 14-3-3 Bindemotiv von NPH3

Abbildung 50 Hefe-2-Hybrid-Analyse bzgl. der Mimikrierung der Phosphorylierung an Position 743 von NPH3 (Austausch von Serin (S) zu Asparaginsäure(D)). Die Transformations-Kontrolle der simultan-transformierten Hefen erfolgte auf „Synthetic Drop-out“-Medium ohne Tryptophan und Leucin (SD-WL), die Bestätigung der Protein-Protein-Interaktion erfolgte auf „Synthetic Drop-out“-Medium ohne Tryptophan, Leucin und Adenin (SD-WLA). Die ursprünglichen Hefe-Übernachtskulturen wurden auf eine OD_{600} von 0,05 eingestellt, davon wurde jeweils eine 1:10 und 1:100 Verdünnung erstellt und jeweils 4 μ l auf die entsprechenden Selektionsplatten getropft. Die Inkubation der Platten fand für 4 Tage bei 30 °C statt.

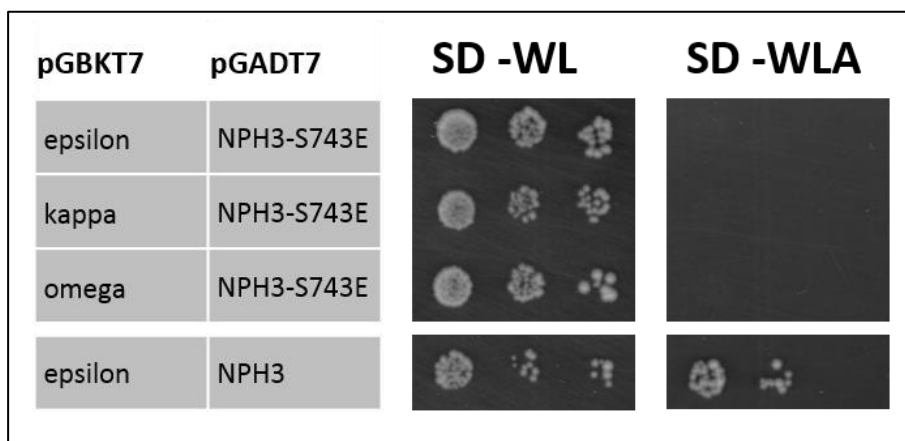


Abbildung 51 Hefe-2-Hybrid-Analyse bzgl. der Mimikrierung der Phosphorylierung an Position 743 von NPH3 (Austausch von Serin (S) zu Glutaminsäure(E)). Die Transformations-Kontrolle der simultan-transformierten Hefen erfolgte auf „Synthetic Drop-out“-Medium ohne Tryptophan und Leucin (SD-WL), die Bestätigung der Protein-Protein-Interaktion erfolgte auf „Synthetic Drop-out“-Medium ohne Tryptophan, Leucin und Adenin (SD-WLA). Die ursprünglichen Hefe-Übernachtskulturen wurden auf eine OD_{600} von 0,05 eingestellt, davon wurde jeweils eine 1:10 und 1:100 Verdünnung erstellt und jeweils 4 μ l auf die entsprechenden Selektionsplatten getropft. Die Inkubation der Platten fand für 4 Tage bei 30 °C statt.

Mikroskopische Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation der
NPH3-Familien-Proteine sowie ihrer Interaktion mit 14-3-3 Isoformen
Lokalisation in transient-transformierten *A. thaliana*-Protoplasten bzw.
N. benthamiana-Blättern

Subzelluläre Lokalisation in transient-transformierten A. thaliana-Protoplasten

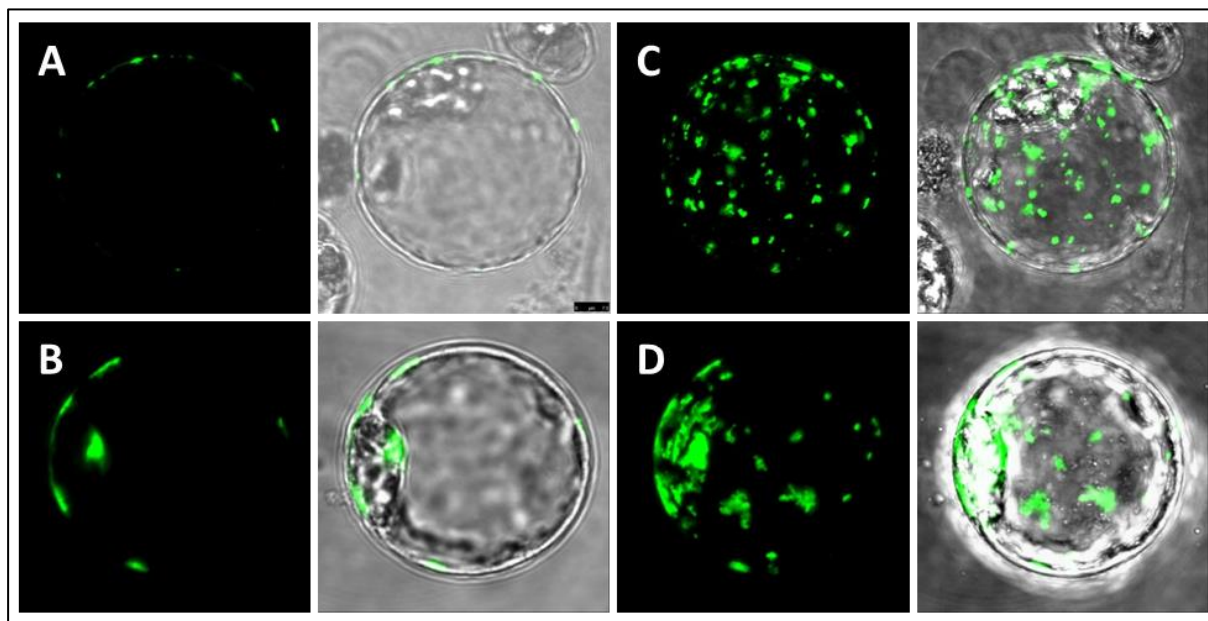


Abbildung 52 Subzelluläre Lokalisation von ENP in Arabidopsis-Protoplasten. Protoplasten einer Wurzel-Zellkultur wurden mit 35S::ENP:mGFP4-Konstrukten transformiert, die Proteine transient exprimiert, und die Signale 24h bis 48h nach der Transformation mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert. Die Aufnahmen **A** und **B** repräsentieren die unterschiedliche Verteilung von ENP:mGFP4 innerhalb eines Protoplasten und zeigen jeweils das Fluoreszenzsignal und die Überlagerung mit dem Durchlichtbild. Die Aufnahme **C** und **D** zeigen Maximum-Intensitäts-Projektionen durch die z-Achse der Protoplasten die in den Aufnahmen **A** und **B** median geschnitten wurden (3D-Rekonstruktionen).

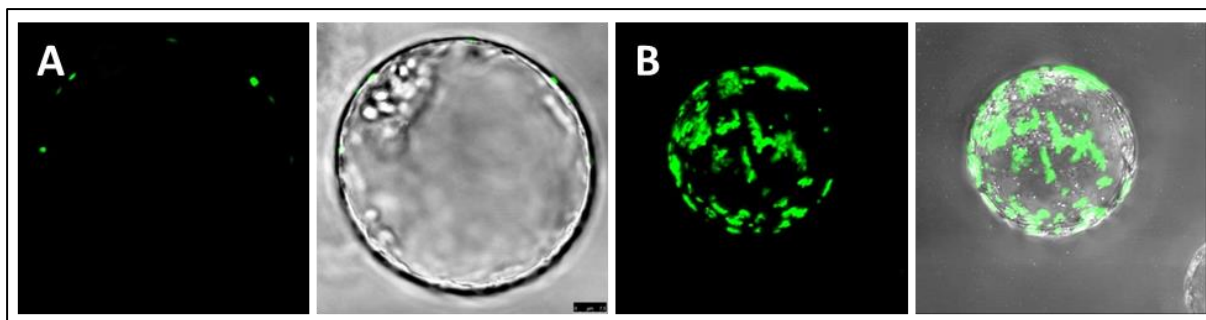


Abbildung 53 Subzelluläre Lokalisation von ENP-S569A in Arabidopsis-Protoplasten. Protoplasten einer Wurzel-Zellkultur wurden mit 35S::ENP-S569A:mGFP4-Konstrukten transformiert, die Proteine transient exprimiert, und die Signale 24h bis 48h nach der Transformation mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert. Die Aufnahme A repräsentiert die Verteilung von ENP-S569A:mGFP4 innerhalb eines Protoplasten und zeigt jeweils das Fluoreszenzsignal und die Überlagerung mit dem Durchlichtbild. Die Aufnahme B zeigt eine Maximum-Intensitäts-Projektion durch die z-Achse eines Protoplasten (3D-Rekonstruktion).

Subzelluläre Lokalisation in transient-transformierten *N. benthamiana*-Blättern

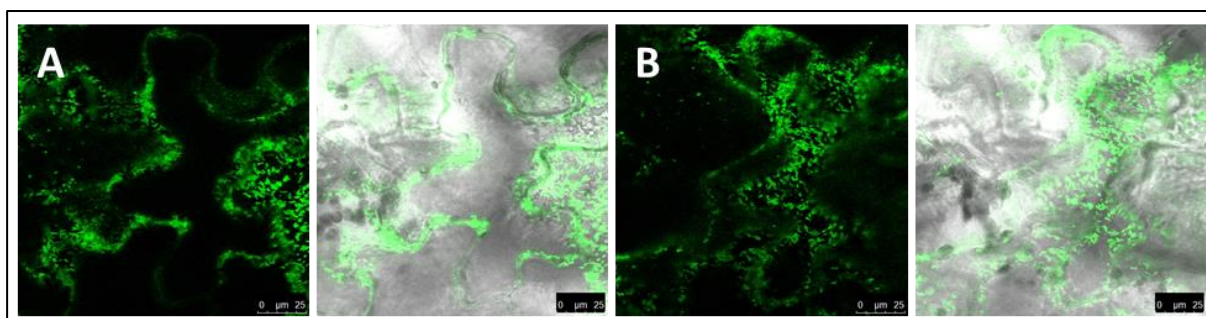


Abbildung 54 Subzelluläre Lokalisation von NPH3 in Tabak-Blättern. Tabak-Blätter wurden mittels *A. tumefaciens*-vermitteltem Gentransfer mit 35S::NPH3:mGFP4-Konstrukten transformiert, die Proteine transient exprimiert, und die Signale 24h bis 48h nach der Transformation mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert. Die Aufnahmen A und B repräsentieren die unterschiedliche Verteilung von NPH3:mGFP4 an der PM von Tabakzellen und zeigen jeweils das Fluoreszenzsignal und die Überlagerung mit dem Durchlichtbild (entnommen aus einem „Z-Stack“ eines transformierten Tabakblatts, unterschiedliche Schnittebenen).

Die Animation/Visualisierung (mGFP4-Signal) einer Abfolge von Bildern übereinanderliegender Gewebe-Schichten/Ebenen („Z-Stack“) einer Tabakzelle die NPH3:mGFP4 exprimiert, ist als Video-File auf der angefügten CD verfügbar.

Abbildung 55 zeigt Aufnahmen bzgl. der Expression von NPH3-S743A:mGFP4, der nicht mehr zur 14-3-3 Interaktion befähigten Mutante, in Tabak-Blättern. Einen Unterschied bzgl. der Lokalisation im Vergleich zum Wildtyp-Protein ist nicht ersichtlich.

Die hier ebenfalls auftretenden Variationen hinsichtlich der subzellulären Lokalisation des Proteins entlang der PM der Tabakzellen konnten nicht auf die Dauer der Expression oder den Einfluss von exogenen Faktoren, wie z.B. Licht-Behandlung, zurückgeführt werden.

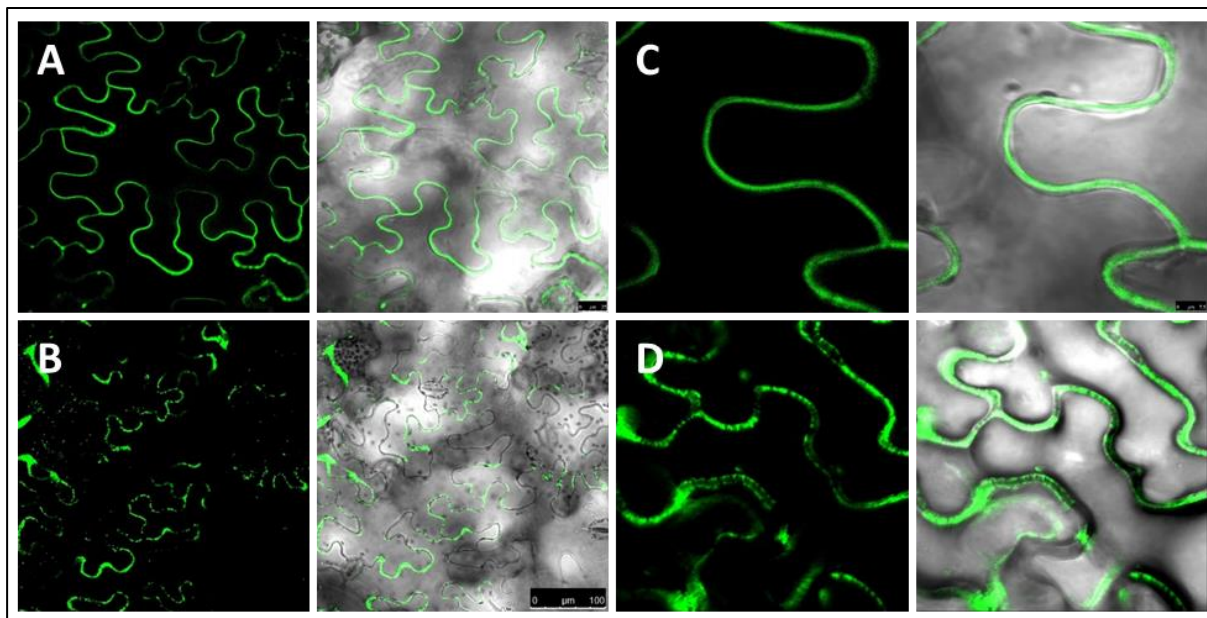


Abbildung 55 Subzelluläre Lokalisation von NPH3-S743A in Tabak-Blättern. Tabak-Blätter wurden mittels *A. tumefaciens*-vermitteltem Gentransfer mit 35S::NPH3-S743A:mGFP4-Konstrukten transformiert, die Proteine transient exprimiert, und die Signale 24h bis 48h nach der Transformation mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert. Die Aufnahmen A bis D repräsentieren die unterschiedliche Verteilung von NPH3-S743A:mGFP4 an der PM von Tabakzellen und zeigen jeweils das Fluoreszenzsignal und die Überlagerung mit dem Durchlichtbild.

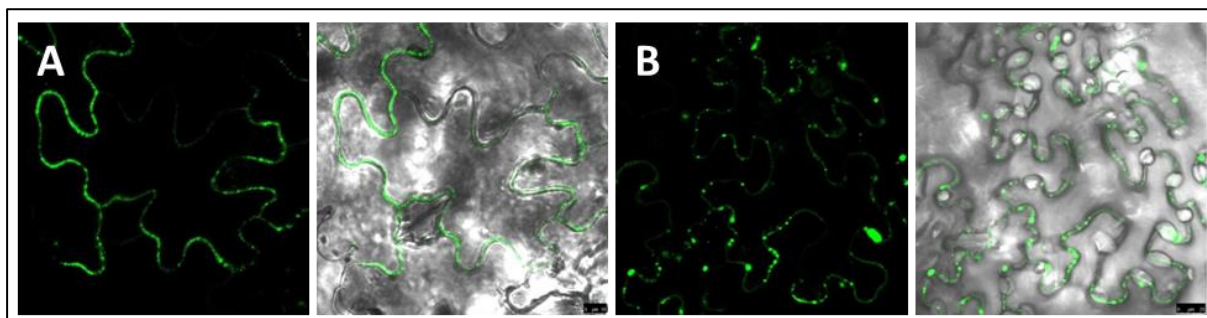


Abbildung 56 Subzelluläre Lokalisation von ENP in Tabak-Blättern. Tabak-Blätter wurden mittels *A. tumefaciens*-vermitteltem Gentransfer mit 35S::ENP:mGFP4-Konstrukten transformiert, die Proteine transient exprimiert, und die Signale 24h bis 48h nach der Transformation mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert. Die Aufnahmen A und B repräsentieren die unterschiedliche Verteilung von ENP:mGFP4 an der PM von Tabakzellen und zeigen jeweils das Fluoreszenzsignal und die Überlagerung mit dem Durchlichtbild.

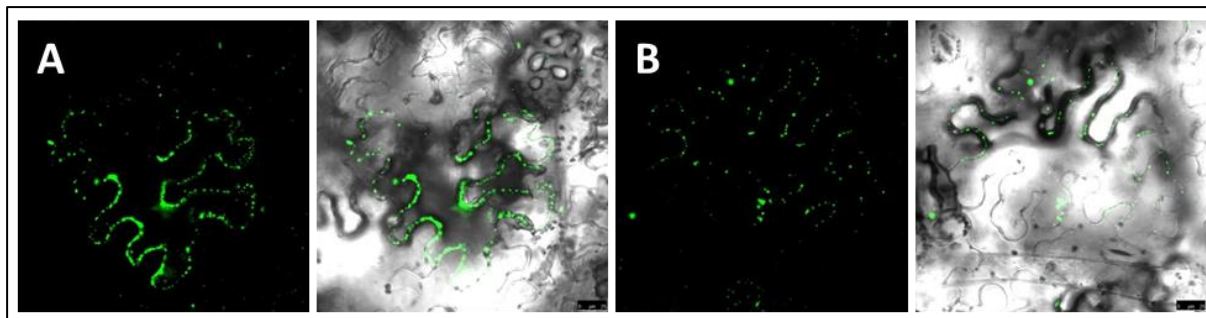


Abbildung 57 Subzelluläre Lokalisation von ENP-S569A in Tabak-Blättern. Tabak-Blätter wurden mittels *A. tumefaciens*-vermitteltem Gentransfer mit 35S::ENP-S569A:mGFP4-Konstrukten transformiert, die Proteine transient exprimiert, und die Signale 24h bis 48h nach der Transformation mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert. Die Aufnahmen **A** und **B** repräsentieren die unterschiedliche Verteilung von ENP-S569A:mGFP an der PM von Tabakzellen und zeigen jeweils das Fluoreszenzsignal und die Überlagerung mit dem Durchlichtbild.

Koexpressions- und Interaktions-Studien in transient-transformierten

A. thaliana-Protoplasten bzw. *N. benthamiana*-Blättern

Um die Koexpression und Interaktion der NPH3-Familien-Proteine mit 14-3-3 Proteinen *in planta* zu analysieren, wurden Fusions-Proteine (mGFP4-, RFP- (bzgl. der FRET-FLIM-Analyse), und BiFC- (nYFP/cYFP) Fusionen) der verschiedenen Vollängen-, und Einzel-AS-Austausch-Proteine transient in *Arabidopsis*-Protoplasten und Tabak-Blättern exprimiert und mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) untersucht.

Koexpressions-Studien von NPH3 und 14-3-3 Isoform epsilon in transient-transformierten

A. thaliana-Protoplasten

Äquivalent zu der Analyse des Wildtyp-Proteins, wurde auch die mutierte Version von NPH3 (NPH3-S743A) zusammen mit der 14-3-3 Isoform epsilon in Protoplasten exprimiert, und deren subzelluläre Lokalisation bestimmt; es traten keine Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp-Protein auf (s. Abbildung 58).

Auch in dieser Kombination traten Bereiche entlang der PM auf, in denen beide Proteine kolokalisierten (gelbe Signale in der Überlagerung). Hier sind 14-3-3 auch eindeutig zytoplasmatisch lokalisiert.

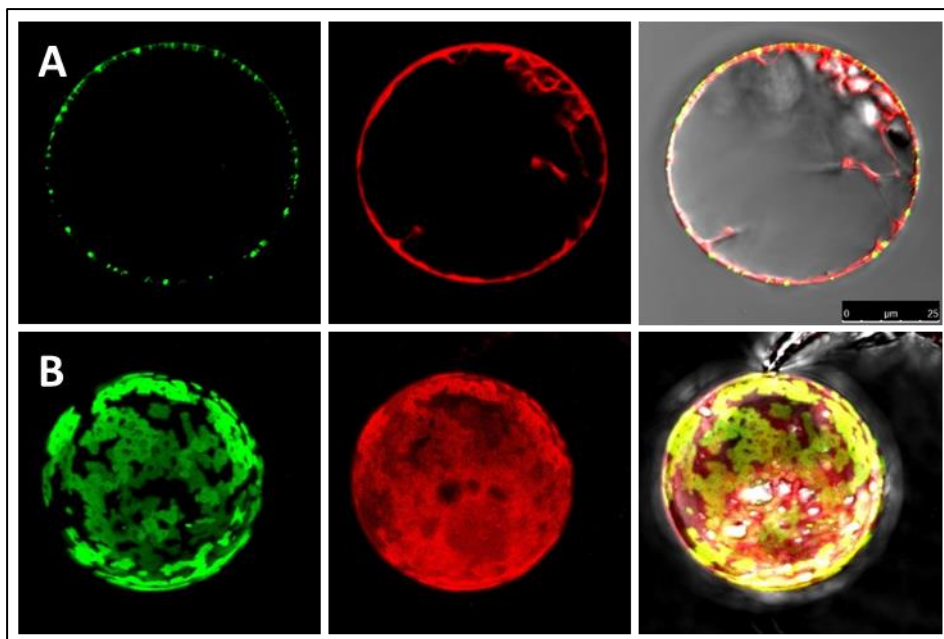


Abbildung 58 Koexpression von NPH3-S743A und der 14-3-3 Isoform epsilon in Arabidopsis-Protoplasten. Protoplasten einer Wurzel-Zellkultur wurden mit 35S::NPH3-S743A:mGFP4- und 35S::epsilon:RFP-Konstrukten kotransformiert, die Proteine transient exprimiert, und die Signale 24h bis 48h nach der Transformation mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert. Die Aufnahme **A** repräsentiert die Verteilung von NPH3-S743A:mGFP4 und epsilon:RFP innerhalb eines Protoplasten und zeigt jeweils das Fluoreszenzsignal (NPH3-S743A – grün, epsilon – rot) und die Überlagerung mit dem Durchlichtbild. Aufnahme **B** zeigt eine Maximum-Intensitäts-Projektion durch die z-Achse eines Protoplasten (3D-Rekonstruktion).

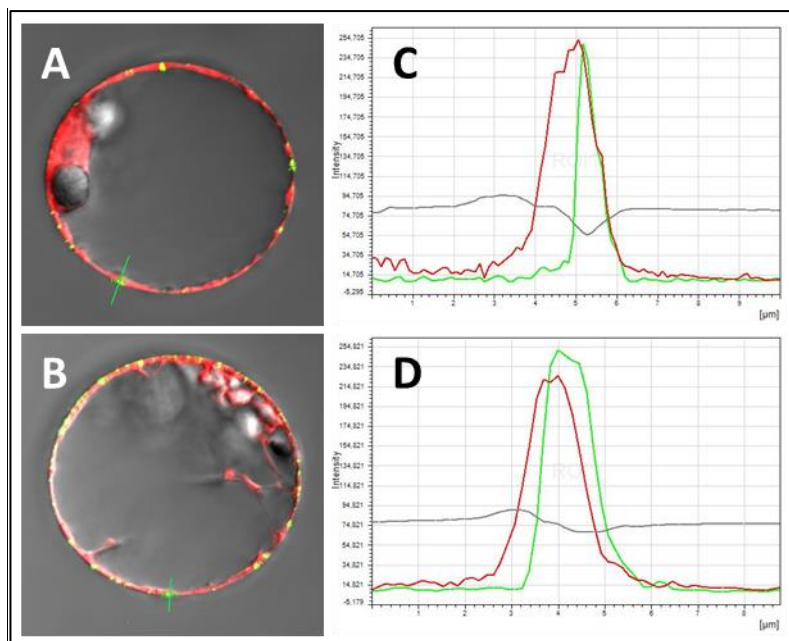


Abbildung 59 Koexpression von NPH3 bzw. NPH3-S743A und der 14-3-3 Isoform epsilon in Arabidopsis-Protoplasten. Protoplasten einer Wurzel-Zellkultur wurden mit 35S::NPH3/NPH3-S743A:mGFP4- und 35S::epsilon:RFP-Konstrukten kotransformiert, die Proteine transient exprimiert, und die Signale 24h bis 48h nach der Transformation mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert. Die Aufnahmen repräsentieren jeweils die Verteilung von NPH3:mGFP4 (A) bzw. von NPH3-S743A:mGFP4 (B) und epsilon:RFP innerhalb eines Protoplasten und zeigen jeweils die Überlagerung der Fluoreszenzsignale (NPH3/NPH3-S743A – grün, epsilon – rot) mit dem Durchlichtbild. Die Quantifizierung und die genaue Lokalisation der Fluoreszenzsignale über einer definierten Stelle an der Membran (ROI1, Länge: 10µm) wird in den Diagrammen C (NPH3 und epsilon) und D (NPH3-S743A und epsilon) dargestellt.

Die Animation/Visualisierung einer Maximum-Intensitäts-Projektion durch die z-Achse eines Protoplasten der NPH3:mGFP4 und epsilon:RFP koexprimiert (3D-Rekonstruktion, mGFP4-Signal, RFP-Signal und „merge“), ist als Video-File auf der angefügten CD verfügbar.

Koexpressions-Studien von NPH3 und 14-3-3 Isoform epsilon in transient-transformierten

N. benthamiana-Blättern

Auch das mutierte NPH3-S743A-Protein wurde zusammen mit der 14-3-3 Isoform epsilon in Tabakzellen exprimiert. In Bezug auf die subzelluläre Lokalisation traten keine Unterschiede im Vergleich zu der Kombination mit dem Wildtyp-Protein auf. Für die FRET-FLIM-Analyse wurden ebenfalls Bereiche ausgewählt, in denen die beiden Proteine kolokalisierten (s. Abbildung 60, s. Kapitel 3.3.2.3).

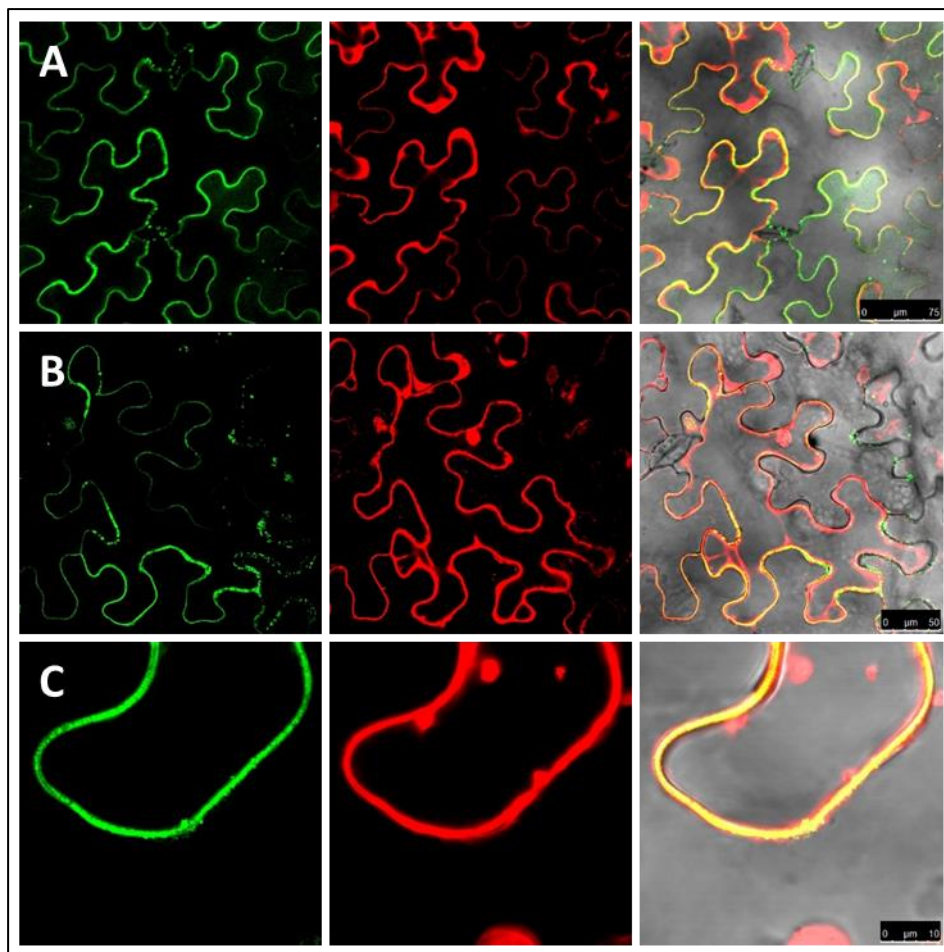


Abbildung 60 Koexpression von NPH3-S743A und 14-3-3 Isoform epsilon in Tabak-Blättern. Tabak-Blätter wurden mittels *A. tumefaciens*-vermitteltem Gentransfer mit 35S::NPH3-S743A:mGFP4- und 35S::epsilon::RFP-Konstrukten kotransformiert, die Proteine transient exprimiert, und die Signale 24h bis 48h nach der Transformation mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert. Die Aufnahmen A und B repräsentieren die Verteilung von NPH3-S743A:mGFP4 und epsilon::RFP innerhalb von Tabakzellen und zeigen jeweils das Fluoreszenzsignal (NPH3-S743A – grün, epsilon – rot) und die Überlagerung mit dem Durchlichtbild. Aufnahme C zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus Aufnahme B (Bereiche die zur FRET-FLIM-Analyse verwendet wurden).

Koexpressions-Studien von NPH3 und PIN1 in transient-transformierten *A. thaliana*-Protoplasten

Wie auch das Wildtyp-Protein, wurde auch das an Position 743 in einer AS veränderte NPH3-Protein (S743A) für Koexpressions-Studien mit PIN1 in *Arabidopsis*-Protoplasten eingesetzt; die subzelluläre Lokalisation beider Proteine entsprach derer des Wildtyp-Proteins und PIN1, eine Kollokalisierung entlang der PM war nicht ersichtlich (s. Abbildung 61). Sowohl PIN1:mGFP4 als auch NPH3-S743A:RFP besetzten Bereiche in oder entlang der PM, in denen das andere Protein nicht vorgekommen ist, sie schlossen sich in ihrem Auftreten/ihrer Lokalisation gegenseitig aus. Die Punktmutation in NPH3-S743A, die die Interaktion mit 14-3-3 unterbindet (s. Kapitel 3.2.3, s. Abbildung 8, s. Ergebnisse), hatte keinen Effekt bzgl. der Lokalisation mit PIN1.

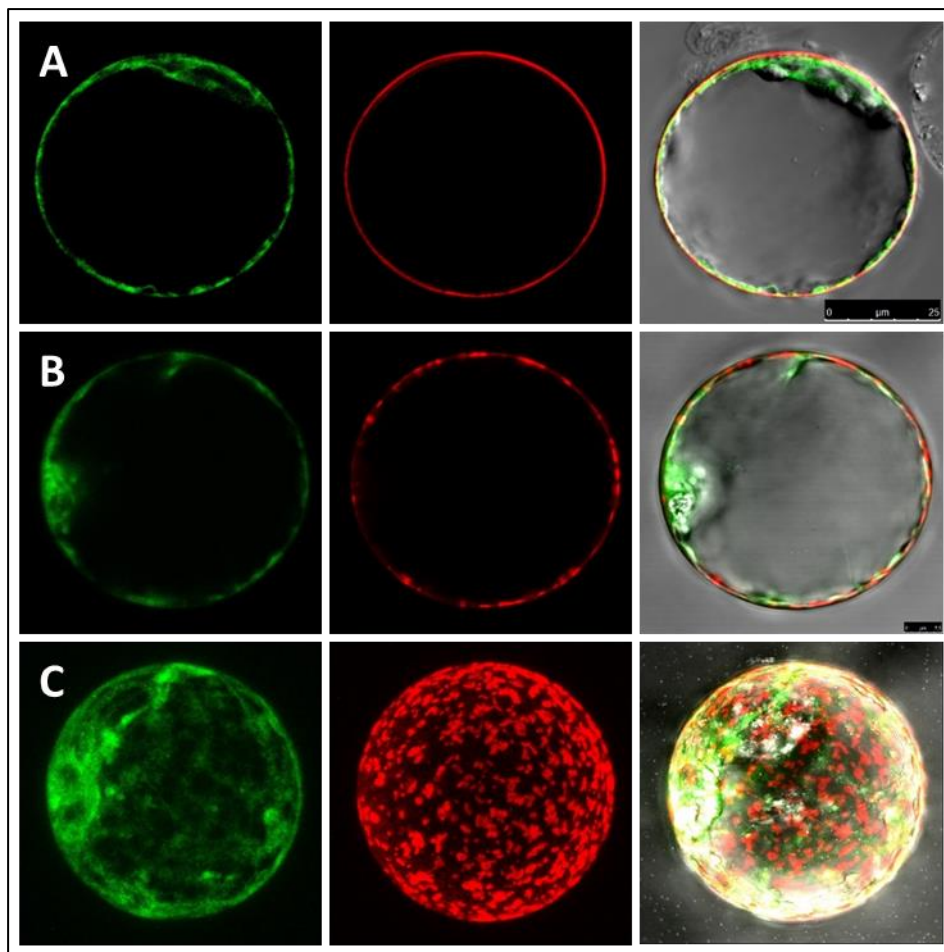


Abbildung 61 Koexpression von PIN1 und NPH3-S743A in Arabidopsis-Protoplasten. Protoplasten einer Wurzel-Zellkultur wurden mit 35S::PIN1:mGFP4- und 35S::NPH3-S743A:RFP-Konstrukten kotransformiert, die Proteine transient exprimiert, und die Signale 24h bis 48h nach der Transformation mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert. Die Aufnahmen **A** und **B** repräsentieren die Verteilung von PIN1:mGFP4 und NPH3-S743A:RFP innerhalb eines Protoplasten und zeigen jeweils das Fluoreszenzsignal (PIN1 – grün, NPH3-S743A – rot) und die Überlagerung mit dem Durchlichtbild. Aufnahme **C** zeigt eine Maximum-Intensitäts-Projektion durch die z-Achse des Protoplasten der in Aufnahme **B** median geschnitten wurde (3D-Rekonstruktion).

Koexpressions-Studien von NPH3 und ENP

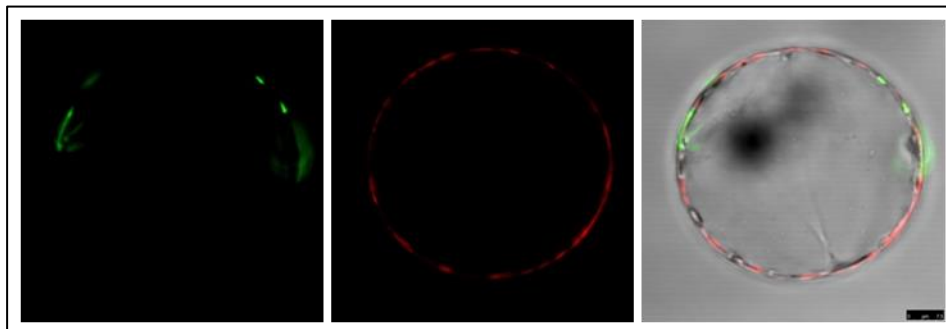


Abbildung 62 Koexpression von ENP und NPH3 in Arabidopsis-Protoplasten. Protoplasten einer Wurzel-Zellkultur wurden mit 35S::ENP:mGFP4- und 35S::NPH3:RFP-Konstrukten kotransformiert, die Proteine transient exprimiert, und die Signale 24h bis 48h nach der Transformation mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert. Die Aufnahme repräsentiert die Verteilung von ENP:mGFP4 und NPH3:RFP innerhalb eines Protoplasten und zeigt jeweils das Fluoreszenzsignal (ENP – grün, NPH3 – rot) und die Überlagerung mit dem Durchlichtbild.

Mikroskopische Untersuchungen bzgl. Stimulus-abhängigen Veränderungen in der subzellulären Lokalisation von NPH3-Familien-Proteine in stabil-transformierten *A. thaliana*-Keimlingen

Stimulus-abhängige subzelluläre Lokalisation in stabil-transformierten *A. thaliana*-Keimlingen
 Für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation der unterschiedlichen Versionen des NPH3-Proteins *in planta*, wurden *A. thaliana* var. Col-0-Wildtyp-Pflanzen mittels *A. tumefaciens*-vermitteltem Gentransfer stabil mit diversen NPH3:mGFP4-Fusions-Konstrukten transformiert. Die positiv auf die Insertion selektionierten Pflanzen wurden bis in die T4-Generation propagiert und waren somit für das eingebrachte Allel homozygot.

Licht-abhängige Veränderung der subzellulären Lokalisation

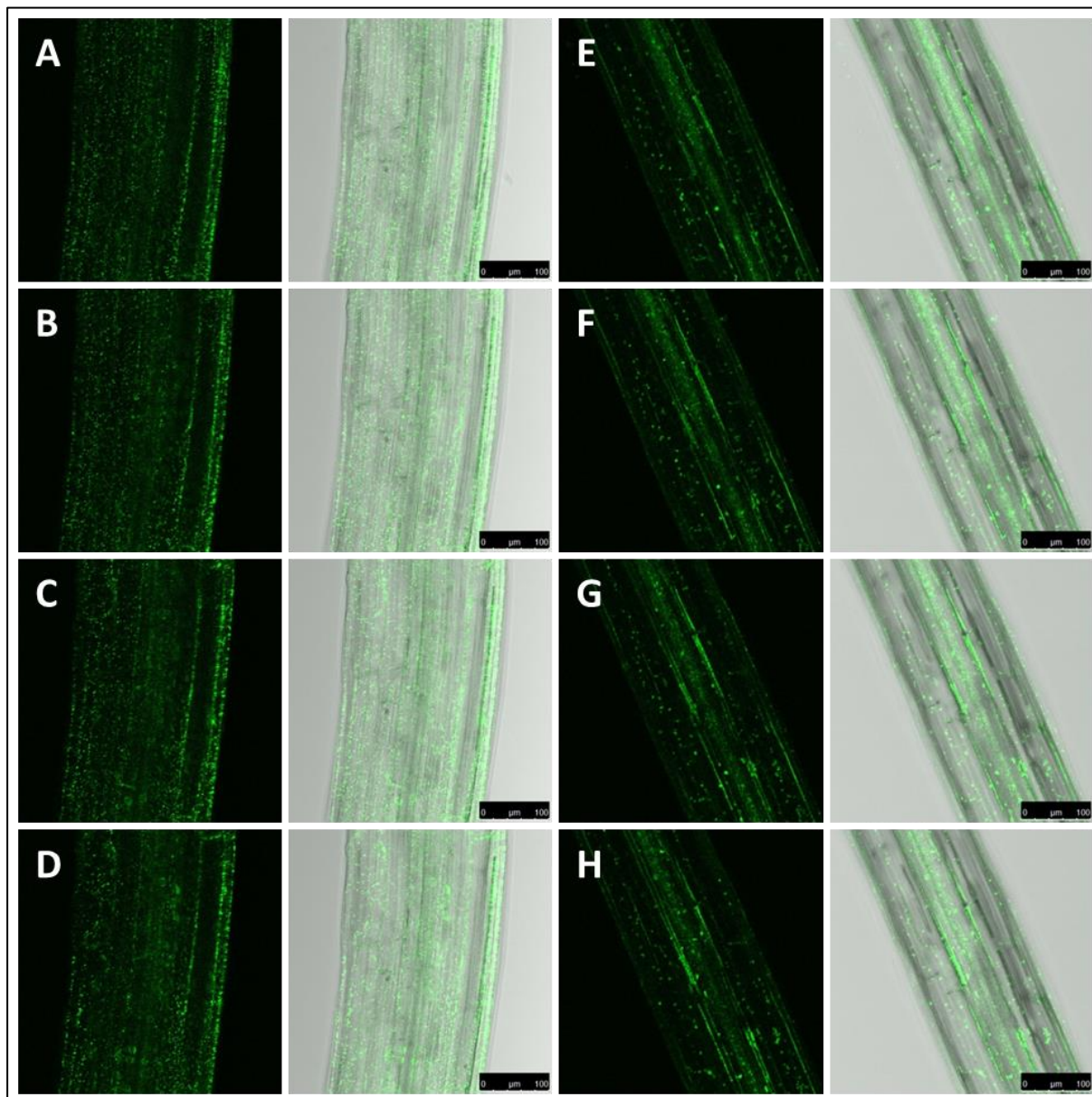


Abbildung 63 Subzelluläre Lokalisation von $NPH3-\Delta C51/N2$ bzw. von $NPH3-\Delta N146$ in stabil-transformierten *Arabidopsis Col-0*-Keimlingen zum Zeitpunkt $t = 0$ min bis $t = 10$ min. Keimlinge, die stabil mit dem $35S::NPH3-\Delta C51/N2:mGFP4$ - bzw. mit dem $35S::NPH3-\Delta I46:mGFP$ -Konstrukt transformiert wurden, wurden für 96 h im Dunkeln angezogen, und die Signale mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert. Elongationszone des mittleren Hypokotylbereichs. Die Keimlinge wurden unmittelbar nach der Präparation (A, E), nach 3:20-minütiger (B, F), nach 6:40-minütiger (C, G) und nach zehnminütiger (D, H) kontinuierlicher Durchlicht- bzw. Laser-Bestrahlung mikroskopiert. Die Aufnahmen zeigen jeweils das Fluoreszenzsignal und die Überlagerung mit dem Durchlichtbild.

Die Animationen/„time-lapse“-Visualisierungen (mGFP4-Signal, 10 min) eines *Arabidopsis*-Keimlings (*Col-0*, Hypokotyl) der $NPH3:mGFP4$ bzw. $NPH3-S743A:mGFP4$ exprimiert, sind als Video-Files auf der angefügten CD verfügbar.

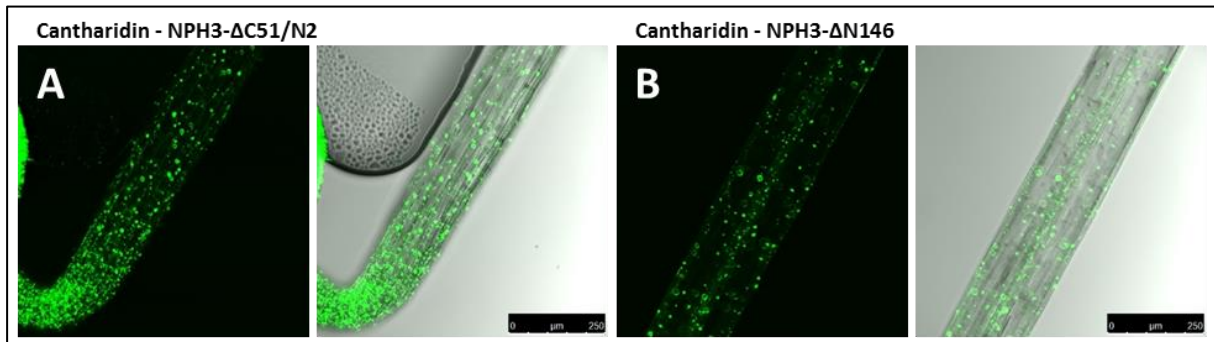
Cantharidin-abhängige Veränderung der subzellulären Lokalisation

Abbildung 64 Subzelluläre Lokalisation von NPH3- Δ C51/N2 bzw. von NPH3- Δ N146 in stabil-transformierten Arabidopsis Col-0-Keimlingen in Abhängigkeit des Phosphatase-Inhibitors Cantharidin. Keimlinge, die stabil mit dem 35S::NPH3- Δ C51/N2:mGFP4- bzw. mit dem 35S::NPH3- Δ N146:mGFP4-Konstrukt transformiert wurden, wurden für 96h im Dunkeln angezogen, für 1h in einer DMSO (Mock) bzw. in einer Cantharidin (Phosphatase-Inhibitor [50 μ M]) MS-Lösung im Dunkeln inkubiert, und die Signale mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert. Elongationszone des mittleren Hypokotyl-Bereichs. Die Keimlinge wurden unmittelbar nach der Mock- (nicht gezeigt) bzw. Cantharidin-Inkubation (A NPH3- Δ C51/N2:mGFP4, B NPH3- Δ N146:mGFP4) präpariert und mikroskopiert. Die Aufnahmen zeigen jeweils das Fluoreszenzsignal und die Überlagerung mit dem Durchlichtbild.

Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei meiner Doktormutter Prof. Dr. Claudia Oecking für die Überlassung des sehr interessanten Themas, der intensiven und hilfreichen Betreuung und der Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Ebenfalls danke ich Prof. Dr. Klaus Harter für seine motivierenden Worte und die Erstellung des zweiten Gutachtens.

Ein ganz besonderer Dank geht an die beste Kollegin der Welt, Jutta Keicher; ohne ihr offenes Ohr und ihren positiven Einfluss auf mich hätte ich dieses Projekt niemals zu Ende gebracht. „Lass Dich nicht unterkriegen, sei frech und wild und wunderbar!“ (Astrid Lindgren)

Stephan Müller und Marion Grieser gebührt der Dank für die primäre Initiierung dieses Projekts.

Meinen Kollegen/innen (Ex-Kollegen/innen) in der Pflanzenphysiologie (speziell meinem direkten Kollegen und Freund Om Narayan („bahut bahut dhanyabad!“), Dr. Chiara Menon, Dr. Anja Possert, Abhroop Garg, Dr. Debabrata Laha, Marcella Amorim, Dr. Marília Kaphan Freitas de Campos, Philipp Johnen, Tanja Schmidt, Andrea Bock und Prof. Dr. Gabriel Schaaf) sowie allen Mitarbeitern am Zentrum möchte ich für das angenehme Arbeitsklima, viele anregende Diskussionen und die nette gemeinsame Zeit danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei den vielen Menschen die am Zentrum etwas im Hintergrund stehen, den Mitarbeitern des Gewächshauses, der zentralen Einrichtungen (Administration, Pflanzen/Protoplasten-Transformation, Analytik, Mikroskopie, FACS, IT), der Werkstatt, der Spüldienste sowie der Reinigungsfirma; ohne sie würde ein funktionierender Betrieb und ein reibungsloser Ablauf der Experimente nicht möglich sein.

Weiterhin möchte ich mich auch bei Ariane Isele, Nadine Appenzeller, Anja Wiebusch und Jutta Pfeifer bedanken, die mich auf einem Teil meines schwierigen Weges begleitet haben.

Zu guter Letzt gilt mein innigster Dank meiner ganzen Familie, speziell meinen Eltern Dorothea und Linus Throm, meinen Geschwistern Gabriele Kolbensschlag, Michael Throm, meiner viel zu früh verstorbenen und nie vergessenen Schwester Antje Druck (mit ihren Familien) sowie meiner Freundin Jenny Friedrich, ohne deren immerwährende Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

„Nur ein Narr macht keine Experimente.“ (Charles Darwin)

In memoriam Antje Druck