

# ***Arabidopsis* 14-3-3 Epsilon-Gruppe: Ihre Bedeutung für Wachstums- und Differenzierungsprozesse**

## **Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Sarah Naumann

aus Trier

Tübingen

2015



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

Tag der mündlichen Qualifikation:

11.04.2016

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Claudia Oecking

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Klaus Harter

*Meinen Eltern*

Man merkt nie, was schon getan wurde, man sieht immer nur, was noch zu tun bleibt.  
(Marie Curie)

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	8
1. Einleitung.....	10
1.1 Die Familie der 14-3-3 Proteine .....	10
1.2 Die Familie der 14-3-3 Proteine in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	12
1.2.1 Proteomweite Untersuchungen zum 14-3-3 Interaktom in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	13
1.2.2 Physiologische Funktionen pflanzlicher 14-3-3 Proteine .....	14
1.2.3 Biologische Rolle spezifischer <i>Arabidopsis thaliana</i> 14-3-3 Isoformen .....	16
2. Material und Methoden .....	19
2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	19
2.1.1 Geräte.....	19
2.1.2 Chemikalien .....	21
2.1.3 Verbrauchsmaterialien .....	22
2.1.4 Plasmidvektoren .....	22
2.1.5 Bakterienstämme .....	23
2.1.6 Antikörper.....	23
2.1.7 Enzyme bzw. Enzymmischungen.....	24
2.1.8 Pflanzenlinien .....	24
2.1.9 Verwendete Oligonukleotide .....	26
2.1.10 Stammlösungen der wichtigsten Chemikalien .....	27
2.2 Anzucht und Transformation von Pflanzen.....	27
2.2.1 Anzucht von Pflanzen .....	27
2.2.2 Kreuzen.....	27
2.2.3 Sterilisieren und Aussäen von Samen auf Agarplatten .....	28
2.2.4 Pflanzenanzucht auf Selektionsmedium .....	28
2.2.5 Transiente Transformation von <i>N. benthamiana</i> .....	28
2.3 Färbung und Fixierung von Keimlingen.....	29
2.3.1 Färbung von Keimlingen mit Propidiumiodid.....	29
2.3.2 GUS-Färbung und Clearing .....	29
2.4 Anzucht und Transformation von Bakterien .....	30
2.4.1 Anzucht, Transformation und Lagerung von Bakterienzellen.....	30
2.5 Molekularbiologische Methoden .....	30
2.5.1 Gewinnung von RNA aus Pflanzen .....	30
2.5.2 Plasmidisolierung .....	31
2.5.3 Polymerase-Kettenreaktion .....	31

2.5.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarosegelen .....	31
2.6 Proteinbiochemische Methoden.....	31
2.6.1 Gewinnung von Proteinrohextrakt aus Blättern von <i>N. benthamiana</i> .....	31
2.6.2 Hefeaufschluß für die Analyse der Proteinexpression .....	32
2.6.3 Isolierung von Mikrosomen durch differentielle Zentrifugation.....	32
2.6.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen .....	33
2.6.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) .....	33
2.7 Aktivitätstest der vakuolären H <sup>+</sup> -Pyrophosphatase und vakuolären H <sup>+</sup> -ATPase.....	34
2.8 Immunologische Methoden .....	35
2.8.1 Western Blot (Wetblot) .....	35
2.8.2 Immundetektion mittels Chemilumineszenzreaktion .....	35
2.9 Ratiometrische Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (rBiFC) .....	36
2.10 Mikroskopische Analysen, Messungen und Auswertung.....	37
2.10.1 Mikroskopische Aufnahmen und digitale Nachbearbeitung.....	37
2.10.2 Auswertung und Messungen.....	37
3. Ergebnisse.....	39
3.1 Ethanol-induzierbare RNA Interferenz von 14-3-3 Epsilon Mitgliedern .....	39
3.1.1 Grundlegende Charakteristika der RNAi- und amiRNA-Linien .....	41
3.1.3 RNAi von 14-3-3 Epsilon Mitgliedern interferiert mit Auxin-Transport-abhängigen Prozessen.....	43
3.1.4 RNAi von 14-3-3 Epsilon Mitgliedern interferiert mit der Auxinverteilung .....	47
3.1.5 Untersuchungen zu prominenten (putativen) 14-3-3 Zielproteinen als Ursache des <i>emo</i> - Phänotyps.....	50
3.1.6 RNAi von 14-3-3 Epsilon Mitgliedern interferiert mit der Expression und der Abundanz von PIN Proteinen .....	59
3.1.7 Untersuchungen zum vakuolären pH-Wert und beteiligter H <sup>+</sup> Pumpen als Ursache des <i>emo</i> -Phänotyps .....	64
3.1.8 RNAi von 14-3-3 Epsilon Mitgliedern interferiert mit dem intrazellulären Vesikeltransport von PIN Proteinen.....	67
4. Diskussion.....	78
5. Zusammenfassung.....	91
6. Literatur .....	92
7. Danksagung .....	111

## Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	volume/volume
(w/v)	weight/volume
2,4 D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (synthetisches Auxin)
Å	Ångström
ACC	1-Aminocyclopropancarbonsäure/Vorstufe des Ethylens
AHA	<i>Arabidopsis</i> H <sup>+</sup> -ATPase
AlcA	ethanolinduzierbarer Promotor im RNAi-Konstrukt von <i>emo</i>
AlcR	Transkriptionsfaktor unter der Kontrolle eines 35S Promotors im RNAi-Konstrukt von <i>emo</i>
ami ( <i>emo</i> ) <sub>o</sub>	Eine „hairpin“ Struktur davon richtete sich simultan gegen zwei Isoformen (epsilon und mu), weist also „mismatches“ zu den entsprechenden mRNAs auf. Die zweite „hair pin“ Struktur richtet sich gegen die verbleibende dritte Isoform (omicron)
amiRNA	artificial microRNA/ künstliche microRNA
ARA7	AtRabF2b, ist ein Mitglied der kleinen Rab5 GTPasen und ist Teil des vakuolären Transportweges
ARF	auxin responsive transcription factor
ARF-GEFs	Guanin-Nukleotide-Austausch-Faktor für Arf1
AuxRE	auxin response element
AVP1	<i>Arabidopsis</i> vacuolar H <sup>+</sup> -Pyrophosphatase
BFA	Brefeldin A (Inhibitor der Exozytose und des vakuolären Transports)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CHX	Cycloheximid (Inhibitor der Endozytose)
cYFP	C-terminales Fragment des gelb-fluoreszierenden Proteins (YFP)
d	Tag
Dex	Dexamethason (künstliches Glucocorticoid)
DIK	Differentialinterferenzkontrast-Mikroskopie
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid); Träger der Erbinformation
DR5	Auxin-induzierbarer Promotor
<i>emo</i>	14-3-3 Mutante, benannt nach den drei Isoformen: epsilon, mu und omicron, welche Ethanol-abhängig repressiert wurden
eps	epsilon (14-3-3 Isoform)
EtOH	Ethanol
FC	Fusicoccin (Pilztoxin, das die Bindung zwischen der Autoinhibitorregion der membranständigen H <sup>+</sup> -ATPase und 14-3-3 Proteinen stabilisiert, dies führt zu einer konstitutiv aktiven H <sup>+</sup> -ATPase)
FM4-64	{N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(p-Diethylaminophenyl)-hexatrienyl} Pyridinium Dibromid} Ist ein lipophiler Styrylfarbstoff mit dem man das endocytische Trafficking sichtbar machen kann



GFP	grün fluoreszierende Protein (green fluorescent protein)
GUS	$\beta$ -Glucuronidase hydrolysiert X-Gluc, wodurch ein blauer Farbstoff entsteht
h	Stunde
HL	hydrophiler Loop des PIN2 Proteins
HRP	Meerrettich Peroxidase
IAA	Indol-3-essigsäure (indole-3-acetic acid)
kDa	Kilodalton (atomare Masseneinheit)
min	Minuten
MS	Murashige-Skoog-Medium (Pflanzennährmedium)
MVB/LE	Multivesikuläres Kompartiment/Späte Endosomen (multivesicular bodies/late endosomes)
MW	Molekulargewicht
NAA	1-Naphthyllessigsäure (Synthetisches Auxin; Inhibitor der Endozytose)
NPA	1-Naphthylphthalamsäure (Inhibitor des Auxintransports)
nYFP	N-terminales Fragment des gelb-fluoreszierenden Proteins (YFP)
OD	optische Dichte
om	omicron (14-3-3 Isoform)
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PI	Propidiumiodid (Farbstoff zur Anfärbung von Zellwänden)
PM	Plasmamembran
rBiFC	ratiometrische bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
RFP	rot fluoreszierendes Protein (red fluorescent protein)
RNAi	RNA-Interferenz/ RNA-Silencing (zielgerichteten Abschaltung von Genen)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunden
T-DNA	transferierte DNA
TGN	Trans-Golgi Netzwerk (trans-golgi network)
Van	Vanadat (Inhibitor für P-Typ-ATPasen)
-WL	ohne die Aminosäuren Tryptophan und Leucin im Medium
-WLA	ohne die Aminosäuren Tryptophan, Leucin und Alanin im Medium
WM	Wortmannin (Inhibitor des vakuolären Transports/Endozytose)
WT	Wildtyp
Y2H	Hefe-Zwei-Hybrid-System (yeast-two-hybrid)
YFP	gelb fluoreszierendes Protein (yellow fluorescent protein)
$\alpha$ -VHA-c	V-type proton ATPase subunit

## 1. Einleitung

Bedingt durch ihre weitgehend sessile Lebensweise, ist es für Pflanzen entscheidend, sich kurz- als auch langfristig auf unterschiedliche abiotische sowie biotische Umwelteinflüsse einzustellen. Um sich an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen, müssen Pflanzen Signale perzipieren, verarbeiten und in adäquate Antworten umsetzen. Proteinmodifikationsprozesse ermöglichen schnelle Anpassungen an veränderte Umwelteinflüsse und sind in Signalleitungsprozessen integriert. Posttranslationale Modifizierungen ermöglichen die dynamische Regulation von Proteinaktivität, Proteinstabilität sowie der subzellulären Lokalisation von Proteinen (Schlessinger, 2000; Olsen et al., 2006; Ptacek und Snyder, 2006). Zu den bekanntesten Modifizierungen zählen die Phosphorylierung, die Ubiquitinierung, die Glykosylierung, die oxidative Modifikationen und die Acetylierung. Die posttranslationale Proteinphosphorylierung ist ein entscheidender Signalmechanismus, der nahezu sämtliche Aspekte des zellulären Lebens in Eukaryoten reguliert. Häufig ist eine Kinase-vermittelte Phosphorylierung ausreichend, um das Zielprotein direkt zu modifizieren. In zahlreichen Fällen bedarf es jedoch zusätzlicher Adapter-Proteine, die an das phosphorylierte Zielprotein assoziieren, um so seine Aktivität zu modifizieren.

### 1.1 Die Familie der 14-3-3 Proteine

Sogenannte 14-3-3 Proteine werden als Phosphoserin/threonin Sensoren (Yaffe et al., 1997) bezeichnet, die phosphorylierungsabhängig mit einer Vielzahl zellulärer Proteine interagieren (Muslin et al., 1996). Diese von Moore und Perez beschriebene Proteinfamilie wurde 1967 während einer umfassenden Studie zu löslichen Proteinen in Rinderhirn entdeckt. Diese wurden mittels Diethylaminoethyl (DEAE)-Zellulose-Chromatographie und Stärke-Gel-Elektrophorese aufgetrennt. 14-3-3 Proteine erhielten ihren charakteristischen Namen 14-3-3 nach der Fraktion 14 in der DEAE-Zellulose-Chromatographie und den Koordinaten 3-3 der Stärke-Gel-Elektrophorese (Moore und Perez, 1967). Anfangs wurde angenommen, dass sich diese Proteinfamilie auf Nervengewebe beschränkt und ausschließlich in Säugetieren (Mammalia) vorkommt. Es zeigte sich jedoch, dass 14-3-3 Proteine in allen eukaryotischen Zellen vorliegen (Ichimura et al., 1987; Robinson et al., 1994; Ferl, 1996; van Heusden, 2005). Während niedere Eukaryoten, wie Hefe, nur zwei 14-3-3 Gene besitzen, liegen bei höheren Eukaryoten bis zu siebzehn 14-3-3 Gene vor (Wang und Shakes, 1996; Rosenquist et al., 2001). Dabei finden sich sieben hoch konservierte Isoformen bei den Mammalia (Wang und Shakes, 1996; Rosenquist et al., 2000), sechs in Baumwolle (Zhang et al., 2010), acht in Reis (Yao et al., 2007), fünf in Gerste (Schoonheim et al., 2007), 17 in Tabak (Konagaya et al., 2004) und 13 Isoformen (sowie zwei Pseudogene; Rosenquist et al., 2000 und 2001; DeLille et al., 2001) in dem hier untersuchten Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand).

14-3-3 Proteine sind lösliche und saure Proteine mit einem molekularen Gewicht von ca. 30kDa. Kristallstrukturen zeigen, dass die verschiedenen Isoformen eine sehr ähnliche

## 1. Einleitung

dreidimensionale Struktur aufweisen, die durch eine amphipathische Grube, in der die Bindung der Liganden erfolgt, charakterisiert ist (Liu et al., 1995; Xiao et al., 1995; Petosa et al., 1998; Würtele et al., 2003; Pallucca et al., 2014). 14-3-3 Proteine kommen als Dimere vor und jedes Monomer besitzt neun antiparallele  $\alpha$ -Helices (H1-H9), die amphipathische Liganden-Bindungsgrube wird aus den  $\alpha$ -Helices H3, H5, H7 und H9 gebildet. Diese Grube weist die Form einer Art Tasse auf, mit einer großen zentralen Rinne, die 35 Å breit, 35 Å hoch und 20 Å tief ist (Yaffe et al., 1997; Petosa, 1998). Die C-terminale Domäne zeigt die größten Sequenzunterschiede zwischen den Isoformen, diese ist in allen bekannten Strukturen nicht aufgelöst. Sie wird als Autoinhibitor diskutiert, die in Abwesenheit eines Liganden die amphipathische Grube besetzt (Shen et al., 2003).



### Abb. 1: Proteinbändermodell eines 14-3-3 Dimers

In diesem Modell zeigt sich die „W-förmige“ Struktur des 14-3-3 Dimers, mit den beiden amphipathischen Gruben, in der die Bindung der Zielproteine erfolgt (Quelle C. Oecking)

Für die Bindung von Interaktionspartnern scheint manchmal ein Monomer auszureichen (Igarashi et al., 2001), jedoch ist die dimere Form der 14-3-3 Proteine vorherrschend, wobei sowohl Homo- als auch Heterodimere gebildet werden können (Aitken et al., 1995; Jones et al., 1995; Hachiya et al., 1994; Wu et al., 1997; Benzinger et al., 2005; Wilker et al., 2005; Gardino et al., 2006). Die Bindung an ihre Interaktionspartner ist vorwiegend phosphorylierungsabhängig, eine Assoziation an unphosphorylierte Motive ist aber möglich. 14-3-3 binden im Allgemeinen jedoch phosphorylierungsabhängig und sequenzspezifisch. Solche hochaffinen Bindemotive sind R/KXXpS/pTXP (internal mode I) und R/KXXXpS/pTXP (internal mode II), dabei steht pS für Phosphoserin, pT für Phosphothreonin und X für einen beliebigen Rest. Des Weiteren gibt es noch ein C-terminal lokalisiertes drittes Bindemotiv pS/pTX<sub>1-2</sub>-COOH (C-terminal mode III) (de Boer et al., 2013). Viele 14-3-3 Bindungspartner besitzen zwei oder mehrere 14-3-3 Bindemotive (Johnson et al., 2010; Kostecky et al., 2009). Unter Verwendung von Peptiden, die zwei phosphorylierte Motive aufweisen, konnte gezeigt werden, dass sie mit einer deutlich höheren Affinität binden als die gleichen Peptide mit nur einem phosphorylierten Bindemotiv (Yaffe et al., 1997; Kostecky et al., 2009). 14-3-3 Proteinen selbst weisen nach der Bindung ihrer Zielproteine nur minimale Veränderungen

in ihrer Struktur auf (Benzinger et al., 2005; Macdonald et al., 2005; Wilker et al., 2005; Yang et al., 2006; Ottmann et al., 2007). Eine Assoziation hat somit vornehmlich Folgen für die Zielproteine.

Dabei kann die Interaktion mit 14-3-3 Proteinen:

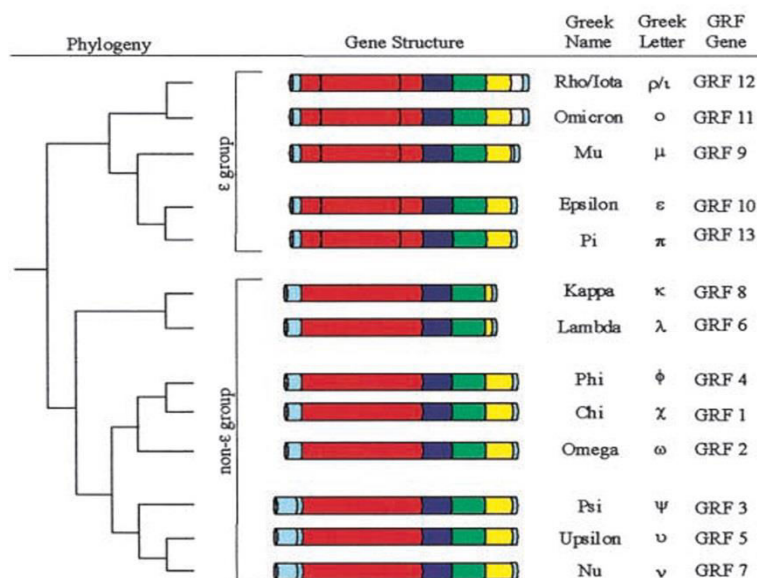
1) zu einer direkten Veränderung des Zielproteins führen, z. B. zu einer Aktivierung oder Inhibierung der Enzymaktivität (Jahn et al., 1997; Sveneslid et al., 1999; Alsterfjord et al., 2004; Sottocornola et al., 2006 und 2008; Duby und Boutry, 2009; Oecking und Jaspert, 2009; Denison et al., 2011).

2) eine physikalische Okklusion sequenzspezifischer oder struktureller Merkmale auslösen, was z.B. zu einer Inhibition von Protein-Protein oder Protein-DNA Interaktionen führt (Igarashi et al., 2001; Ishida et al., 2004), einen Schutz vor Dephosphorylierung oder proteolytischer Degradation bietet (Dobson et al., 2011), aber auch die subzelluläre Lokalisation beeinflussen kann (Bai et al., 2007; Gampala et al., 2007; Ryu et al., 2007 und 2010; Kim et al., 2009).

3) die Interaktion von zwei oder mehr Proteinen ermöglichen bzw. stabilisieren (Obsil et al., 2001; Ottmann et al., 2007).

## 1.2 Die Familie der 14-3-3 Proteine in *Arabidopsis thaliana*

*Arabidopsis thaliana* besitzt, wie bereits erwähnt, 13 hoch homologe 14-3-3 Isoformen (sowie zwei Pseudogene; Rosenquist et al., 2000 und 2001; DeLille et al., 2001). Die Nomenklatur dieser Isoformen basiert entweder auf griechischen Buchstaben oder der Bezeichnung „general regulatory factor“ GRF in Kombination mit Zahlen (siehe dazu Abb. 2;



**Abb.2: Stammbaum der 14-3-3 Proteine in *Arabidopsis thaliana***

Der Stammbaum der 14-3-3 Proteine in *Arabidopsis thaliana* mit den jeweiligen farblich markierten Genstrukturen und den dazugehörigen Kennzeichnungen mit griechischen Buchstaben und der jeweiligen GRF (general regulatory factor) Gennummer. Die 13 Isoformen der 14-3-3 Proteine Familie werden in in zwei phylogenetische Gruppen unterteilt die Epsilon und die Nicht-Epsilon (Non-Epsilon) Gruppe. Die Non-Epsilon Gruppe besteht aus drei phylogenetischen Subgruppen. Einzelne Exons werden entweder durch unterschiedliche Färbung oder Segmentierung abgegrenzt (Sehnke et al., 2002).

## 1. Einleitung

Rooney und Ferl, 1995). Diese 13 Isoformen können anhand ihrer Aminosäuresequenz in zwei phylogenetische Gruppen unterteilt werden, die Epsilon und die Nicht-Epsilon Gruppe (Non-Epsilon), die sich aus jeweils fünf [ $\mu$  (mu),  $\epsilon$  (epsilon),  $\pi$  (pi),  $\iota$  (iota), und  $\omicron$  (omicron)], beziehungsweise acht [ $\kappa$  (kappa),  $\lambda$  (lambda),  $\psi$  (psi),  $\nu$  (nu),  $\upsilon$  (upsilon),  $\omega$  (omega),  $\phi$  (phi), und  $\chi$  (chi)] Isoformen zusammensetzen (Jaspert et al., 2011; Paul et al., 2012; de Boer et al., 2013; Pallucca et al., 2014). Die Non-Epsilon Gruppe unterteilt sich nochmals in drei Subgruppen (siehe Abb. 2). Dabei ist die  $\kappa$  und  $\lambda$  umfassende Subgruppe phylogenetisch von den beiden anderen Subgruppen getrennt, letztere unterscheiden sich durch die Anwesenheit eines zusätzlichen Introns im untranslatierten Bereich am 5' Ende (DeLille et al., 2001).

### 1.2.1 Proteomweite Untersuchungen zum 14-3-3 Interaktom in *Arabidopsis thaliana*

14-3-3 Proteine scheinen nahezu an allen Prozessen in Pflanzen und Tieren beteiligt zu sein (MacKintosh, 2004; Chevalier et al., 2009; Oecking und Jaspert, 2009; Gökirmak et al., 2010; Denison et al., 2011; Johnson et al., 2011) und besitzen zahlreiche Interaktionspartner. Auf der Suche nach putativen 14-3-3 Interaktionspartnern wurden proteomweite Untersuchungen unternommen, dabei ergaben Analysen der letzten Jahre über 300 putative 14-3-3 Interaktionspartner. Für die Identifikation dieser Partner wurden verschiedene Methoden und Techniken verwendet, darunter die 14-3-3 Affinitätschromatographie mit Pflanzenextrakten (Shin et al., 2011; Swatek et al., 2011), die Tandemaffinitätsreinigung von 14-3-3 Komplexen (Chang et al., 2009) und das Hefe-Zwei Hybridsystem (Jaspert und Oecking, 2009). Bei allen angewandten Techniken wurde eine Vielzahl putativer Interaktionspartner detektiert, jedoch sind diese aufgrund unterschiedlichster Ausgangsmaterialien und Methoden nicht untereinander vergleichbar und folglich zeigt sich kaum eine Überlappung der gefundenen Interaktionspartner. Dies spricht wiederum für eine Rolle der 14-3-3 Proteine als dynamischer Integrator zahlreicher Prozesse (Oecking und Jaspert, 2009). So finden sich die putativen Interaktionspartner im primären Stoffwechsel, der Glykolyse und der *de novo* Fettsäuresynthese (Swatek et al., 2011), des Stickstoff- und Schwefelstoffwechsels (Shin et al., 2011), der Signaltransduktion, der Ionenhomöostase, der Hormonsignalübertragung, der Transkription und der Lipidsignalübertragung (Schoonheim et al., 2007; Chang et al., 2009; Jaspert und Oecking, 2009). Des Weiteren beziehen sich die proteomweiten Untersuchungen in *Arabidopsis* weitgehend auf die Mitglieder der Non-Epsilon Gruppe, nur eine Studie vergleicht Isoformen von beiden phylogenetischen Gruppen ( $\chi$  ( $\chi$ ) und  $\epsilon$  ( $\epsilon$ ); Swatek et al., 2011). Die Ergebnisse zeigen dabei nicht nur eine mögliche Isoform Spezifität mehrerer Zielproteine, sondern auch eine mögliche Präferenz für die 14-3-3 Dimerbildung zwischen phylogenetisch ähnliche 14-3-3 Isoformen. Daher könnte eine funktionale Spezialisierung zumindest zwischen den Mitgliedern der Non-Epsilon und der Epsilon Gruppe vorhanden sein. Darüber hinaus gibt es nur wenige Beispiele von 14-3-3 Interaktionspartnern, bei der die Wirkmechanismen genauer verifiziert und im Detail analysiert wurden.

### 1.2.2 Physiologische Funktionen pflanzlicher 14-3-3 Proteine

Einer der prominentesten Bindungspartner von 14-3-3 Proteinen ist die plasmamembranständige  $H^+$ -ATPase. Sie ist eine primär aktive Pumpe, die Wasserstoffionen gegen ein Konzentrationsgefälle vom Cytoplasma in den apoplasmatischen Raum transportiert und dadurch einen elektrochemischen Protonengradienten über der Plasmamembran aufbaut (Jahn et al., 1997; Michelet und Boutry, 1995; Morsomme und Boutry, 2000; Palmgren, 2001; Geislera und Murphy, 2006). Dieser ist die Antriebskraft für alle protonengekoppelten Cotransportsysteme, wie beispielsweise von: Nitrat, Saccharose, Glucose und Auxin. Die Aktivierung der membranständigen  $H^+$ -ATPase wird durch die Bindung von 14-3-3 Proteinen an die C-terminale Autoinhibitor-domäne ausgelöst (Jahn et al., 1997; Sveneslid et al., 1999; Alsterfjord et al., 2004; DUBY und Boutry, 2009; Oecking und Jaspert, 2009; Denison et al., 2011). Dabei konnte gezeigt werden, dass das vorletzte Threonin der C-terminalen Autoinhibitorregion phosphoryliert vorliegen muß (Olsson, 1998; Fuglsang et al., 1999).

Ein weiterer bedeutender Bindungspartner ist die Nitratreduktase (NR), sie ist Teil des Stickstoffstoffwechsels. Dieser ist notwendig für die Biosynthese von Aminosäuren und anderen stickstoffhaltigen Verbindungen der Zelle. Das Enzym spielt, wie bereits der Name verrät, bei der Nitratreduktion eine entscheidende Rolle, indem es die Reduktion von Nitrat ( $NO_3^-$ ) zu Nitrit ( $NO_2^-$ ) katalysiert. Die zweite Komponente des Nitrat-reduzierenden Systems ist die lichtabhängige Nitritreduktase, welche das für Pflanzen toxische Nitrit zu Ammonium ( $NH_4^+$ ) reduziert (Loqué et al., 2003). Um die Anreicherung und damit die toxische Wirkung von Nitrit im Dunkeln zu vermeiden, muss die Nitratreduktase im Dunkeln inhibiert werden. Dazu wird die Nitratreduktase mit Hilfe der Kalziumabhängigen Proteinkinase (calcium-dependent protein kinase/CDPK) und SnRK1 (sucrose non-fermenting related kinase 1) phosphoryliert, wodurch 14-3-3 Proteine binden und eine Inaktivierung ausgelöst wird. Im Licht wird die NR von einer Proteinphosphatase 2A dephosphoryliert, dies führt zu einer Dissoziation von 14-3-3 Proteinen und einer Aktivierung der NR (Huber et al., 1992; Bachmann et al., 1996 a und b; Sugden et al., 1999; MacKintosh et al., 2001).

Weitere prominente 14-3-3 Interaktionspartner zeigen sich auch in Signaltransduktionsprozessen von Phytohormonen z. B. Brassinosteroiden (BR). In Abwesenheit von Brassinosteroiden (BR) bindet der negative Regulator BKI1 (BRI1 kinase inhibitor 1) an die in der Membran lokalisierte Rezeptorkinase BRI1 (BR-insensitive 1), wodurch BRI1 inaktiviert wird. BIN2, eine Kinase (GSK/SHAGGY-like protein kinase BR-insensitive 2), ist hingegen aktiv und phosphoryliert die Transkriptionsfaktoren BZR1 (brassinazole resistant 1) und BRZ2/BES1 (brassinazole resistant 2/ BRI1-EMS-suppressor 1), wodurch diese ihre DNA-Bindungs-fähigkeit verlieren und die BR-gesteuerte Genexpression unterbunden wird. Eine Interaktion von 14-3-3 Proteinen mit den Transkriptionsfaktoren führt zudem zu ihrem Export aus dem Zellkern und einer Degradation im Proteasom (Bai et al., 2007; Gampala et al., 2007; Ryu et al., 2007 und 2010; Kim et al., 2009; Wang et al., 2013). In Anwesenheit von Brassinosteroiden phosphoryliert BRI1 den negativen Regulator BKI1, dieser liegt nun in seiner inaktiven Form vor, löst sich von der Plasmamembran ab und assoziiert mit 14-3-3 Proteinen im Cytoplasma. BIN2 wird durch die Phosphatase BSU1 (BRI1 suppressor 1) inaktiviert, somit werden BZR1

## 1. Einleitung

und BRZ2/BES1 nicht mehr phosphoryliert, eine Assoziation von 14-3-3 entfällt und die Transkriptionsfaktoren können an die DNA binden und die BR-gesteuerte Genexpression auslösen (Kim et al., 2011; Belkhadir et al., 2014; Maselli et al., 2014).

Ein weiterer Interaktionspartner ist RSG (repression of shoot growth), ein bZIP (Basic Leucine Zipper) Transkriptionsfaktor der Gibberellinsignaltransduktion (GA) in Tabak (*Nicotiana tabacum*) (Ishida et al., 2008). Unter normalen Bedingungen ist RSG sowohl im Nukleus als auch im Cytoplasma lokalisiert. Dabei induziert die dephosphorylierte Form im Nukleus die Transkription der GA-gesteuerten Gene. Die von NtCDPK1 (Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase) phosphorylierte Form ist hingegen im Cytoplasma lokalisiert und bildet mit 14-3-3 Proteinen einen Komplex, wodurch RSG nicht mehr in der Lage ist, in den Nukleus zu gelangen, um dort die Transkription von GA Biosynthese Enzymen zu aktivieren (Igarashi et al., 2001; Ishida et al., 2004 und 2008; Fukazawa et al., 2011). Unter GA-Mangel wird RSG im Zytoplasma dephosphoryliert und akkumuliert im Nukleus, wo es die Transkription der GA-gesteuerten Gene auslöst (Fukazawa et al., 2011).

Auch an lichtgesteuerten Prozessen scheinen 14-3-3 Proteine beteiligt zu sein. Phototropine sogenannte Blaulichtrezeptoren, sind wie der Name verrät, am lichtgerichteten Pflanzenwachstum (Phototropismus) beteiligt, aber auch bei der Chloroplastenbewegung, der Stomataöffnung in Schließzellen der Blätter oder beim Hypokotylwachstum. In *Arabidopsis* sind zwei Phototropine (PHOT1 und PHOT2) bekannt, diese besitzen zwei LOV-Domänen (LOV1 und LOV2; Light, Oxygen or Voltage), als Chromophor dient FMN (Flavinmononukleotid), das an jeweils eine LOV-Domäne bindet. Am C-terminalen Ende befindet sich eine Serin/Threonin Kinase. Durch Bestrahlung mit Licht des wirksamen Spektralbereichs kommt es zu einer reversiblen Strukturänderung der PHOT-Proteine und einer Autophosphorylierung. Mittels Hefe-Zwei-Hybridsystem (Yeast-Two-Hybrid, Y2H) und Pull-down assays konnte eine Interaktion von PHOT2 und 14-3-3 lambda gezeigt werden, für die die C-terminale Kinasedomäne von PHOT2 essenziell ist. Zudem scheint 14-3-3 lambda an der PHOT2-vermittelten Stomataöffnung beteiligt zu sein. So konnte detektiert werden, dass sowohl die „loss of function“ *lambda* Mutante als auch der Austausch von Ser-747 durch Alanin bei PHOT2 zu einer Verschlechterung der PHOT2-vermittelten Blaulicht-induzierten Stomataöffnung führt (Tseng et al., 2012). Wie PHOT2 die Öffnung der Stomata induziert ist nicht ganz geklärt, eine Vermutung ist, dass möglicherweise PHOT2 die membranständige H<sup>+</sup>-ATPase an der C-terminalen Autoinhibitor-domäne phosphoryliert, welches zu einer Assoziation von 14-3-3 Proteinen und der Aktivierung der Pumpe führt (Inoue et al., 2008 und 2011; Tseng et al., 2012; Takemiya et al., 2013; Wang et al., 2014; Adams et al., 2014). Es kommt zu einer Hyperpolarisation und dem Einströmen osmotisch aktiver Ionen (K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Malat) und Wasser in die Schließzellen. Die Schließzellen schwellen an und die Stomata öffnen sich (Daszkowska-Golec und Szarejko, 2013).

Weitere 14-3-3 Interaktionspartner in lichtgesteuerten Prozessen konnten mittels Hefe-Zwei-Hybridsystem detektiert werden. Wie beispielsweise in der photoperiodischen Blühkontrolle, z. B. *Arabidopsis* CONSTANS (CO) (Mayfield et al., 2007), der bZIP Transkriptions-

faktor FLOWERING LOCUS D (FD) und das „Florigen“ FLOWERING LOCUS T (FT) sowie die FT Homologen in Reis (heading date 3A, Hd3A) und Tomaten (SELF-PRUNING, SP) (Pnueli et al., 2001). In *Arabidopsis* bilden FT, FD und 14-3-3 Proteine höchstwahrscheinlich einen heterotrimeren Komplex, welcher die Expression der Blütenmeristem-Identitätsgene wie APETALA1 oder CAULIFLOWER induziert und somit die Blütenbildung auslöst. 14-3-3 fungiert dabei möglicherweise als eine Art Klammer (Jaspert und Oecking, unpubliziert). Die Interaktion von 14-3-3 mit Hd3a wurde mit *in vitro* „pull-down assay“ und bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC) in Reis Protoplasten nachgewiesen (Purwestri et al., 2009). Der in Reis identifizierte Interaktionspartner Hd3a (FT Homolog) bildet mit 14-3-3 einen Komplex, es folgt eine Translokation in den Nukleus und eine Bindung an den *Oryza sativa* (Os) FD1 Transkriptionsfaktor (FD Homolog). Der entstandene Komplex (florigen activation complex, FAC) induziert die Transkription von OsMADS15 (Homolog APETALA1, AP1) was schließlich zum Blühen der Pflanze führt (Taoka et al., 2011).

### 1.2.3 Biologische Rolle spezifischer *Arabidopsis thaliana* 14-3-3 Isoformen

Wie bereits erwähnt, unterteilt sich die Familie der 14-3-3 Proteine, in *Arabidopsis thaliana* in zwei phylogenetische Gruppen, die Epsilon und die Non-Epsilon Gruppe. Mitglieder der Epsilon Gruppe weisen eine höhere Homologie zu der tierischen Isoform Epsilon auf. Was die Vermutung nahe legt, dass die Mitglieder der Epsilon Gruppe für die grundlegenden eukaryotischen Funktionen zuständig sind (Aitken et al., 1992; Ferl et al., 1994; Wang und Shakes, 1996; Jaspert et al., 2011). Die Mitglieder der Non-Epsilon Gruppe haben hingegen möglicherweise organismusspezifische Funktionen (Jaspert et al., 2011). Ob die verschiedenen 14-3-3 Proteine unterschiedliche spezifische Bindepartner haben, oder ob eine funktionale Redundanz zwischen den Mitgliedern besteht, konnte bis jetzt nicht eindeutig geklärt werden, da eine Vielzahl der Untersuchungen *in vitro* und meist nur mit Vertretern einer phylogenetischen Gruppe überprüft wurden. Im Zuge von Lokalisationsstudien konnte zwar gezeigt werden, dass spezifische 14-3-3 Proteine in Organellen, wie im Nukleus, den Plastiden oder an der Plasmamembran und im Cytoplasma auftreten (de Vetten und Ferl, 1994; Bihn et al., 1997; May und Soll, 2000; Sehnke et al., 2000 und 2001; Bunney et al., 2001; Riedel et al., 2001; Aducci et al., 2002) und auch, dass das Spektrum der 14-3-3 Isoformen in Organellen ein anderes ist, als das der ganzen Zelle (Bihn et al., 1997; Sehnke et al., 2000 und 2002). Jedoch sprechen Untersuchungen der phylogenetischen Gruppen mit T-DNA Insertionslinien und RNAi Linien gegen eine Spezifität einzelner Isoformen sondern vielmehr für eine Spezifität der phylogenetischen Gruppe.

So stellt sich bei Untersuchungen der Non-Epsilon Gruppe mit T-DNA Insertionslinien heraus (van Kleeff et al., 2014), dass Einfach- und Doppelmутanten keinen offensichtlichen Phänotyp aufweisen (Weckermann und Oecking, 2009). Erst bei Dreifach- und Vierfachmutanten kann ein verkürztes Wachstum der Primärwurzel detektiert werden. Die Isoformkombination *kappa/lambda* lässt als Einzige eine reduzierte ACC Sensibilität erkennen, die nach Kleeff et al. 2014 auf einen möglichen Verlust der Interaktion dieser Isoformen mit den Zellwandproteinen der Peroxidasen (PER69) zurückzuführen ist (Irshad et



## 1. Einleitung

al., 2008; Shin et al., 2011), dies führt wiederum zu einer Zunahme der Zellstreckung, denn eine Verringerung der Zellstreckung wird durch die Peroxidase-katalysierte Vernetzungsaktivität in der Zellwand verursacht.

Im Vergleich dazu soll hingegen der Verlust der *mu* Isoform in der Epsilon Gruppe zu einem pleiotropen Phänotyp führen (T-DNA induzierten „knockdown“ *mu* Linie). So wurde beschrieben, dass Einzelmutanten von *At14-3-3 mu* zum einen eine Verzögerung der Blütenbildung unter Langtagbedingungen (Mayfield et al., 2007) und zum anderen eine erhebliche Reduktion im Wurzelwachstum im Vergleich zum Wildtyp bei Dauerlicht aufweisen (Mayfield et al., 2012). Auch Messungen des Wurzel/Spross Verhältnisses nach Phosphat-Behandlung ergeben bei der identischen *mu* Mutante einen signifikanten Unterschied in der Wurzellänge, jedoch ist dieser geringfügig (Cao et al., 2007; He et al., 2015). Eigene Analysen mit der identischen *mu* Linie unter gleichen Wachstumsbedingungen konnten den beschriebenen Phänotyp von Mayfield et al. 2012 hingegen nicht bestätigen. Auch frühere Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnten keinen offensichtlichen Phänotyp von *mu* Mutanten detektieren (Krysan et al., 1996 und 1999). Untersuchungen mit zwei transgenen *Arabidopsis* Linien, mit jeweils einem Antisense Konstrukt gegen *14-3-3 mu* bzw. gegen *14-3-3 epsilon* haben nur eine Zunahme der Stärkeproduktion in Blättern zur Folge (Sehnke et al., 2001). Loss-of function Mutanten von *omicron* weisen keinen offensichtlichen Phänotyp unter normalen Wachstumsbedingungen auf, jedoch scheint *omicron* möglicherweise bei der Fe-Mangeltoleranzreaktion eine Rolle zu spielen (Yang et al., 2013).

Es zeigt sich also, dass durch das Ausschalten bestimmter *14-3-3* Isoformen oder sogar ganzer Isoformsubgruppen wie in der Non-Epsilon Gruppe (*kl*) kein offensichtlicher Phänotyp erzeugt werden konnte. Vielmehr sprechen die bisher erhaltenen Ergebnisse für eine Redundanz der Isoformen in den phylogenetischen Gruppen untereinander, was wiederum gegen eine Spezifität der einzelnen Isoformen spricht.

Zurzeit finden sich für vier Mitglieder der Epsilon Gruppe keine knockout Mutanten. Um dieses Problem zu umgehen, wurden von Katrin Weckermann verschiedene RNAi Linien generiert. Vornehmlich der Isoformen, die ubiquitär in *Arabidopsis* exprimiert werden, nämlich *epsilon*, *mu* und *omicron* (*iota* und *pi* sind nur in Antheren exprimiert). Da die Einzel-RNAi Linien unter normalen Wachstumsbedingungen keinen offensichtlichen Phänotyp zeigten, wurde eine Dreifach-RNAi Mutante namens *emo* generiert. Dabei führt das Ethanol-induzierbare RNAi-Konstrukt in transgenen Pflanzen zu einer Reduktion der Expression der drei ubiquitär exprimierten Isoformen, wodurch die Epsilon Gruppe fast vollständig ausgeschaltet wird. Die entstandene *emo* Mutante weist einen pleiotropen Phänotyp auf. In dieser Arbeit sollte nun auf der Grundlage der *emo* Mutante die Epsilon Gruppe der *14-3-3* Proteine im Hinblick auf Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse genauer untersucht werden. Dabei sollte anfangs die These überprüft und bestätigt werden, dass es sich bei *emo* um eine Auxinmutante handelt, ausgelöst durch ein Problem mit dem Transport von Auxin. Im Folgenden werden nun Komponenten des polaren Auxintransports als auch generelle Komponenten des zellulären Systems wie z. B. die vakuoläre H<sup>+</sup>-ATPase oder die vakuoläre H<sup>+</sup>-Pyrophosphatase im Hinblick auf Expression und Aktivität genauer betrachtet. Auch der

intrazelluläre Vesikeltransport selbst wurde mit Hilfe von Inhibitoren und Markern analysiert. Die folgenden Untersuchungen geben einen Einblick darüber, welche möglichen Interaktionspartner von der Reduktion der Expression der drei Isoformen betroffen sein könnten und welche Komponenten als mögliche Ursachen für das Auxintransportproblem ausgeschlossen werden konnten.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

#### 2.1.1 Geräte

##### **Agarosegele**

Vilber

VWR International GmbH/Erlangen

##### **Binokular**

Binokular

Helmut Hund GmbH/Wetzlar

Fluo TM MZFLIII

Leica Microsystems GmbH/Wetzlar

##### **Blotkammer**

TE 22 tank transfer unit

GE Healthcare GmbH & Co. KG/Dornstadt

##### **Confocal**

Spectral Confocal & multiphoton system

Leica Microsystems GmbH/Wetzlar

Leica TCS SP2

Confocal Laser Scanning Microscope Leica

Leica Microsystems GmbH/Wetzlar

TCS SP8

##### **GelDoc+Digitaldrucker**

E-BOX VX2 Gel Documentation System

VWR International GmbH/Erlangen

Mitsubishi P93D

Mitsubishi Electric Europe B.V. /Ratingen

##### **Exsikkator**

Vakuum-Exsikkator

Duran group GmbH/Mainz

##### **Inkubator**

Environmental Incubator Shaker

New Brunswick Scientific Co. Inc. Edison  
N.J./USA

Certomat BS-1

Sartorius AG/Göttingen

Inkubator

Bachofer Laboratoriumsgeräte/Reutlingen

HettCube 600R

Hettich Holding GmbH & Co.  
oHG/Kirchlengern

##### **Magnetrührer**

Heidolph MR 3001 K; RSM-10 HS

Phoenix Instrument GmbH/Garbsen

##### **Microplate reader**

Safire

Tecan Group AG/Männedorf, Schweiz

##### **Mikro-Gewebe-Homogenisator**

Wheaton Micro tissue grinder 0,2 ml

Nico lab Laborspezialprodukte

**Differentialinterferenzkontrast-Mikroskop**

Axiophot

Carl Zeiss Microscopy GmbH/ Jena

**Kamera**

Canon Deutschland GmbH/ Krefeld

**Mikrowelle**

Sharp Electronics GmbH/Hamburg

**nanoDrop**

ND-1000 Spectrometer

NanoDrop Technologies/ Wilmington, USA

**PCR-Geräte**

Mastercycler personal

Eppendorf AG/Hamburg

PTC-100 Programmable Thermal Controller

MJ Research, Inc./Bloomberg

Peltier-Effect Cycling

peqSTAR 96x Universal

VWR International GmbH/Erlangen

**Photometer**

Ultraspec 3100pro

GE Healthcare GmbH & Co. KG/Dornstadt

**Schüttler**

TPM-2

Sarstedt AG & Co./Nümbrecht

**SDS-Gele+Zubehör**

Minigel G 41

Biometra biomedizinische Analytik  
GmbH/Göttingen

SDS-Gele+Zubehör

Bio-Rad Laboratories GmbH/München

**Spannungsgeber**

Power Pac 300

Bio-Rad Laboratories GmbH/München

**Sterilbank**

airegard laminar airflow work station

ibs tecnomara GmbH/Fernwald

**Tischzentrifugen**

Centrifuge 5415R

Eppendorf AG/Hamburg

Centrifuge 5415D

Eppendorf AG/Hamburg

CS 120 FX, himac

Hitachi, Ltd/Tokyo, Japan

Sorvall WX Ultra 80

Thermo Electron/Erlangen

**Zentrifugen**

Refrigerated Centrifuge RC-3B; Sorvall

Thermo Electron/Erlangen

Instruments

Centrifuge RC 6+ Sorvall

Thermo Electron/Erlangen

Die hier nicht aufgeführten Geräte entsprachen dem Laborstandard.

## 2. Material und Methoden

### 2.1.2 Chemikalien

<b>Chemikalien</b>	<b>Herkunft/Referenz</b>
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4D)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Brefeldin A (BFA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Casein (dephosphorylated from bovine mix)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Complete Ultra Tabletten, EDTA-frei	Roche, Mannheim
Cycloheximide (CHX)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Cyclohexylammoniumsalz der 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronsäure (X-Gluc)	VWR International GmbH, Erlangen
Dexamethason	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
dNTPs	Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig
FM4-64	Life technologies, Carlsbad, USA
Fusicoccin (FC)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Hygromycin B	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Luminol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
MS-Salze (Murashige-Skoog medium basal salt mixture)	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
MS-X	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
NAA (1-Naphthylessigsäure)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
NPA (1-Naphthylphthalamsäure)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
PowerPlay	Isostar, Courbevoie, Frankreich
p-Cumarsäure (4-Hydroxycimtsäure)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Tyrphostin A23 und A51	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Vanadat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Wortmannin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf

Die hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden in Analyse-Qualität von den Firmen Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe), Sigma Aldrich Chemie GmbH (Schnelldorf), life technologies (Carlsbad, USA), Duchefa Biochemie (Haarlem, Niederlande), SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg), Fermentas (St. Leon-Rot) und Machery-Nagel GmbH & Co. KG (Düren) bezogen.

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Herkunft/Referenz</b>
Culture Multiwell Plates	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Entwickler (developer and replenisher, Kodak GBX)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Film (High performance chemiluminescence film)	Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare
Fixierer (fixer and replenisher, Kodak GBX)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Gene Ruler 1kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc. Germany BV & Co KG, Braunschweig
Nitrocellulose (Protran Nitrocellulose Hybridization Transfer Membrane, 0.2 µm), Schleicher & Schuell	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Roti-Mark Standard Protein-Molekulargewichtsmarker	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Whatman Papier	Multimed Wicker GmbH, Giengen

Die hier nicht aufgeführten Verbrauchsmaterialien entsprachen dem Laborstandard.

### 2.1.4 Plasmidvektoren

<b>Vektoren</b>	<b>Herkunft/Referenz</b>
pGADT7	Clontech Laboratories, Inc., USA; Chien et al., 1991
pGBKT7	Clontech Laboratories, Inc., USA; Louret, O. F. et al., 1997
pTA7002	Aoyoma und Chua, 1997
V006 und V007	Grefen und Blatt, 2012
V258 und V259	Grefen und Blatt, 2012

## 2. Material und Methoden

### 2.1.5 Bakterienstämme

<b>Stamm</b>	<b>Herkunft/Referenz</b>
XL-1 Blue ( <i>E. coli</i> )	Bullock et al., 1987
GV3101 ( <i>A. tumefaciens</i> )	Koncz und Schell, 1986
TOP10 ( <i>E. coli</i> )	Wang und Wilkinson, 2000

### 2.1.6 Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Antigen</b>	<b>Herkunft/Referenz</b>
$\alpha$ -ATPase rabbit Antiserum	Aminosäuren 1-55 von AHA2	AG Oecking (ZMBP, Uni Tübingen)
$\alpha$ -GFP-rabbit Antiserum	Grün fluoreszierende Protein aus <i>Aequorea victoria</i>	Torrey Pines Biolabs, New Jersey
$\alpha$ -HA, monoklonal	Peptid des Influenza Hämagglutinin Proteins	Roche, Mannheim
$\alpha$ -c-myc, monoklonal, Klon 9.E10	EQKLISEEDLN, Peptid des menschlichen c-myc Proteins	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Schnellendorf
$\alpha$ -PIN1 rabbit, Antiserum	Aminosäuren 288–452 von PIN1	Paciorek et al., 2005
$\alpha$ -PIN2 rabbit, Antiserum	Aminosäuren 189–477 von PIN2	Abas et al., 2006
$\alpha$ -V-ATPase ( $\alpha$ -VHA-c (Det3)) rabbit, Antiserum	Det3, VHA Untereinheit C	Schumacher et al., 1999
$\alpha$ -V-PPase (AVP1), Antiserum Goat anti-mouse IgG (H+L), HRP conjugate; polyclonal	AVP1 Polypeptid Gamma Immunoglobine schwere und leichte Kette von Maus	Drozdowicz et al., 2003 Life technologies, Carlsbad, USA
Goat anti-rabbit IgG (H+L), HRP conjugate; polyclonal	Gamma Immunoglobulin von Kaninchen	Life technologies, Carlsbad, USA
Goat anti-rabbit IgG (H+L); Cy3 (Indocarbocyanin); polyclonal	Gamma Immunoglobulin von Kaninchen	Dianova, Hamburg, Germany
Goat anti-rat IgG (H+L), HRP conjugate; polyclonal	Gamma Immunoglobulin von Ratte	Life technologies, Carlsbad, USA

### 2.1.7 Enzyme bzw. Enzymmischungen

Enzyme bzw. Enzymmischungen	Herkunft/Referenz
Restriktionsenzyme	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG, Karlsruhe
<i>Taq</i> -Polymerase	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG, Karlsruhe
RNase	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG, Karlsruhe
RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG, Karlsruhe
BP- und LR-Clonase	Life technologies, Carlsbad, USA
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG, Karlsruhe

### 2.1.8 Pflanzenlinien

Pflanzenlinie	Herkunft/Referenz
<i>35S::mRFP-ARA7/RabF2b</i> (homozygot)	Haas et al., 2007 ( zur Verfügung gestellt von Dr. Manoj Singh, AG Jürgens, Tübingen)
<i>35S::mRFP-ARA7/RabF2b</i> x <i>PIN2::PIN2-GFP</i> und <i>PIN2::PIN2-GFP</i> x <i>emo-1</i> ) (Kreuzung zwischen <i>35S::mRFP-ARA7/RabF2b</i> und <i>PIN2::PIN2-GFP</i> WT und <i>emo-1</i> ; heterozygot)	Eigene Kreuzungen
<i>ami (em)o</i> (heterozygot)	Klonierung und Transformation: Dr. Nina Jaspert, ZMBP; <a href="http://www.wmd.weigelworld.org">www.wmd.weigelworld.org</a>
Col-0 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> , Wildtyp, WT)	The Salk Institute for Biological Studies, Joseph R. Ecker
<i>DR5<sub>rev</sub>::GFP</i> (homozygot)	Stock center, Ottenschläger et al., 2003



## 2. Material und Methoden

<i>DR5<sub>rev</sub>::GFP x emo-1</i> (Kreuzung zwischen <i>DR5<sub>rev</sub>::GFP</i> und <i>emo-1</i> ; homozygot)	Kreuzung Claudia Möller; im Laufe der Arbeit wurden drei unabhängige und homozygote Linien erhalten
<i>DR5::GUS</i> (homozygot)	Stock center, Lijsebettens et al., 1996
<i>DR5::GUS x emo-1</i> (Kreuzung zwischen <i>DR5::GUS</i> und <i>emo-1</i> ; homozygot)	Katrin Weckermann
<i>emo-1, emo-2</i> und <i>emo-3</i> (homozygot) pHan_Alca( <i>eopm</i> )	Katrin Weckermann, Dissertation 2008
<i>PIN1::PIN1-GFP</i>	Benkova et al., 2003
<i>PIN1::PIN1-GFP x emo-1</i> (Kreuzung zwischen <i>PIN1::PIN1-GFP</i> und <i>emo-1</i> ; homozygot)	Kreuzung Claudia Möller; im Laufe der Arbeit wurden drei unabhängige und homozygote Linien erhalten
<i>PIN2::PIN2-GFP</i>	Xu, J. und Scheres, 2005; AG Jürgens, Tübingen
<i>PIN2::PIN2-GFP x emo-1</i> (Kreuzung zwischen <i>PIN2::PIN2-GFP</i> und <i>emo-1</i> ; homozygot)	Kreuzung Claudia Möller; im Laufe der Arbeit wurden drei unabhängige und homozygote Linien erhalten
<i>PIN7::PIN7-GFP</i>	Vieten et al., 2005; AG Jürgens, Tübingen
<i>PIN7::PIN7-GFP x emo-1</i> (Kreuzung zwischen <i>PIN7::PIN7-GFP</i> und <i>emo-1</i> ; homozygot)	Kreuzung Claudia Möller; im Laufe der Arbeit wurden drei unabhängige und homozygote Linien erhalten
pta 7002 AHA2Δ93 in WT bzw. in <i>emo-1</i> (heterozygot)	Klonierung und Transformation: Dr. Nina Jaspert, ZMBP; Aoyoma und Chua, 1997;
<i>Nicotiana benthamiana</i>	Zur Verfügung gestellt von der Gärtnerei des ZMBPs Uni Tübingen

### 2.1.9 Verwendete Oligonukleotide

Primer	Sequenz (5'-3')
Actin-F(2.)	TCCAAGCTGTTCTCTCCTTG
Actin-R (2.)	GAGGGCTGGAACAAGACTTC
eGFP-F	CAAGGGCGAGGAGCTGTTC
eGFP-R	TACTTGTACAGCTCGTCCATG
mGFP4-F	AGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTCAC
mGFP4-R	TGTATAGTTCATCCATGCCATG
Analyse der pta 7002 AHA2Δ93 Linien	
GVG-F	ATGAAGCTACTGTCTTCTAT
GVG-R	AACATGTCCAGATCGAAATCGTCT
Rbcs-3A-R	TTTATTAACTCTTATCCATCCATTTGC
Analyse der <i>emo</i> -Linien	
020026-F (= mu-F)	ATCTTGAAAATCAGTCATGGGTTCT
At-eps-RNAi-F	TATGGATCCCTCGAGCTATCGCTATCTTGCGGA
At-mu-RNAi-R	TATATCGATGGTACCATTACCCCTCGGAAGCCG
At-omicron-RNAi-R	TATAAGCTTGAATTCTGTAGACAATTCCGTGCT
eps-c-R	GTCGACTTAGTTCTCATCTTGAGG
omicron-F (= 123168-F)	GAACGAGAGAGCGAAGCAAGT G
SN-PIN1-F	GTTAAGATCTCTGTACCTCAGGGGAA
SN-PIN1-R	GCCGCAAAGCTGCTCTTCTG
SN-PIN2-F	CAAAGACATGTACGATGTTTTAG
SN-PIN2-R	TAATTCATTGCATAAGGATCA
2in1 gateway	
<i>attB1</i> adapter	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
<i>attB2</i> adapter	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT
<i>attB3</i> adapter	GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTG
<i>attB4</i> adapter	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGGGT
Epsilon_ <i>attB1</i> _F	AAAAAGCAGGCTTAATGGAGAATGAGAGGGAA
Epsilon_STOP- <i>attB2</i> _R	AGAAAGCTGGGTGTTAGTTCTCATCTTGAGGCTC
Epsilon_STOP- <i>attB4</i> _R	GAAAAGTTGGGTTTAGTTCTCATCTTGAGGCTC
Epsilon- <i>attB2</i> _R	AGAAAGCTGGGTGTTCTCATCTTGAGGCTC
Epsilon- <i>attB3</i> _F	ATAATAAAGTTGTAATGGAGAATGAGAGGGAA
PIN2_HL_ <i>attB1</i> _F	AAAAAGCAGGCTTAATGCCCTCCAGACCGATGCG
PIN2_HL_ <i>attB4</i> _R NEU	GAAAAGTTGGGTGTTTCTAGGACCGGGACC
PIN2_HL- <i>attB2</i> _R	AGAAAGCTGGGTGTTTCTAGGACCGGGACC
PIN2_HL- <i>attB3</i> _F	ATAATAAAGTTGTAATGCCCTCCAGACCGATGCG
PIN2_HL-STOP- <i>attB2</i> _R	AGAAAGCTGGGTGTTATTCTAGGACCGGGACC

## 2. Material und Methoden

V258_1_F_27nt	CATTCTACAACACTACATCTAGTCAATTG
V258_1_R_27nt	TCATAAGGATACATGTTTAACCTAGAC
V258_2_F_24nt	ACCTGGCCGGCACTAGTCCTAGA
V258_2_R_27nt	ACTCTAGCATGGCCGCTTATAACAATT
V259_2_F	CATTCTACAACACTACATCTAGTCCTAGA
V259_2_R	CTCCTCTGAGATAAGCTTCTGTTCCAT

Y2H

---

PIN2-HL-EcoRI_F	TATGAATTCCCCCTCCAGACCGATGCG
PIN2-HL_STOP-Sall_R	TATGTGCGACTTATTTCTAGGACCGGGACC

### 2.1.10 Stammlösungen der wichtigsten Chemikalien

Inhibitor	Stammlösung	Lösungsmittel
<i>Brefeldin A (BFA)</i>	50 mM	DMSO
Cycloheximid (CHX)	50 mM	DMSO
1-Naphthylelessigsäure (NAA)	15 mM	1 M NaOH
FM4-64	30 mM	Wasser
Fusicoccin	05 mM	Ethanol
Tyrphostin A23 + A51	40 mM	DMSO
Wortmannin	15 mM	DMSO

## 2.2 Anzucht und Transformation von Pflanzen

### 2.2.1 Anzucht von Pflanzen

Die Anzucht von Keimlingen auf Festmedium erfolgte in einem Lichtschrank bei Dauerlicht von 68-86 Lux ( $\text{lm/m}^2$ ) und 20-23 °C. Pflanzen, die zur Nachtzucht dienten, wurden auf Erde in einer Phytokammer bzw. in der Gärtnerei unter Langtagbedingungen bei 20-25 °C angezogen.

### 2.2.2 Kreuzen

Als Mutterpflanze wurden Pflanzen mit Blüten gewählt, die noch vollständig geschlossen waren. Dies garantierte, dass die Staubbeutel (Antheren) noch nicht ausgereift sind und somit eine Eigenbefruchtung ausgeschlossen werden kann. Als Vaterpflanze wurden Pflanzen mit Blüten gewählt, an denen die Antheren vollständig ausgereift waren. Für das eigentliche Kreuzen entfernte man die Antheren der Mutterpflanze und führte eine Befruchtung mit den Pollen der Vaterpflanze durch.

### 2.2.3 Sterilisieren und Aussäen von Samen auf Agarplatten

Samen wurden entweder mit Sterilisationspuffer (für 5 -10 Minuten) oder Chlorgas (über Nacht) oberflächensterilisiert. Anschließend erfolgte die Aussaat auf 1 x MS-Medium mit 1 % (w/v) Saccharose (mit entsprechenden Antibiotika, siehe Tabelle 1 unter 2.2.4) und eine Stratifikation bei 4 °C.

#### Sterilisationspuffer

5 % (v/v) Natriumhypochlorit  
2 % (v/v) Triton X-100

#### Chlorgas

100 mL 20 %iger (v/v) Natriumhypochloritlösung  
3 mL 30 %iger (v/v) Chlorwasserstoff

Für die Anzucht etiolierter Keimlinge wurden die auf entsprechendem Festmedium ausgebrachten Samen für ca. 4-5 Stunden im Lichtschrank inkubiert und anschließend im Dunkeln bei konstanter Temperatur angezogen. Nach ca. 4-5 Tagen erfolgte die Auswertung.

### 2.2.4 Pflanzenanzucht auf Selektionsmedium

Zur Selektion von Pflanzen wurde 1x MS Festmedium mit 1 % (w/v) Saccharose mit den folgenden Antibiotika versetzt.

**Tabelle 1: Verwendete Pflanzenlinien mit entsprechenden Antibiotikaresistenzen und den dazugehörigen Antibiotikakonzentrationen.**

Pflanzenlinien	Resistenz	Antibiotika-Konzentration
<i>35S::mRFP-ARA7/RabF2b</i>	Kanamycin	50 mg/mL
<i>ami (emo)</i>	Basta/MS-X	20 mg/mL
<i>DR5<sub>rev</sub>::GFP</i> + Kreuzung	Sulfonamid/Sulfadiazin	5 mg/mL
<i>DR5::GUS</i> + Kreuzung	Sulfonamid/Sulfadiazin	5 mg/mL
<i>emo-1, emo-2</i> und <i>emo-3</i>	Basta/MS-X	20 mg/mL
<i>PIN1::PIN1-GFP</i> + Kreuzung	Kanamycin	50 mg/mL
<i>PIN2::PIN2-GFP</i> + Kreuzung	Basta/MS-X	20 mg/mL
<i>PIN7::PIN7-GFP</i> + Kreuzung	Kanamycin	50 mg/mL
pta 7002 AHA2Δ93 in WT bzw. in <i>emo-1</i>	Hygromycin	20 mg/mL

### 2.2.5 Transiente Transformation von *N. benthamiana*

Die transiente Transformation erfolgte nach Grefen et al., 2010. Dazu wurde ca. 300 µL einer Übernachtkultur von zuvor transformierten Agrobakterien in 5 mL LB Medium (versetzt mit Rif, Gen, Spec) überführt und bei 28 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3-0,6 angezogen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 3000g für 15 Minuten und 4 °C, das Pellet wurde zweimal mit eiskaltem MilliQ-Wasser gewaschen und erneut unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet resuspendierte man anschließend, in der entsprechenden Menge

## 2. Material und Methoden

von Infiltrationspuffer, bis man eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,2 erhielt. Es folgte ein Inkubationsschritt auf Eis für eine Stunde. Abschließend erfolgte die Infiltration der transformierten Agrobakterien mit einer Spritze (ohne Kanüle) in die Blattunterseite von 3-4 Wochen alten, zuvor gewässerten Tabakpflanzen. Die infiltrierten Pflanzen wurden eine Nacht im Dunkeln inkubiert und anschließend unter Langtagbedingungen und einer konstanter Temperatur von 21 °C angezogen. Die mikroskopische Untersuchung am Confocal erfolgte nach zwei Tagen. Dabei entfernte man infiltrierte Blätter und gab diese in eine mit Wasser gefüllte Spritze, auf die man ein Vakuum anlegte, um überschüssige Luft aus den Blattstücken zu ziehen. Anschließend konnte das Blattstück auf einen Objektträger gelegt werden und am Mikroskop untersucht werden.

### Infiltrationspuffer

10 mM	MES/KOH, pH 5,6
10 mM	MgCl <sub>2</sub>
150 µM	Acetosyringon

## 2.3 Färbung und Fixierung von Keimlingen

### 2.3.1 Färbung von Keimlingen mit Propidiumiodid

Um die Zellwände von Keimlingen anzufärben, wurden diese zusammen mit einer Propidiumiodidlösung (100 µg/µl) auf einen Objektträger gegeben und direkt im Anschluß mikroskopiert.

### 2.3.2 GUS-Färbung und Clearing

Die Keimlinge wurden dazu 30 Minuten in vorgekühltem Aceton (4 °C) inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit je 500 µL Färbepuffer ohne X-Gluc und schließlich die Färbung mit Färbelösung (+ X-Gluc) bei 37 °C im Dunkeln. Die Mutante *emo-1* wurde aufgrund hoher GUS-Aktivität nur für vier Stunden angefärbt, während die Färbung des Wildtyps über Nacht erfolgte. Zur besseren optischen Bestimmung von Zellstrukturen am Mikroskop wurde nach der GUS-Färbung ein „Clearing“ (Malamy & Benfey, 1997) durchgeführt. Dazu inkubierte man die angefärbten Keimlinge für 15 Minuten bei 57 °C in 0,24 N HCl in 20 % (v/v) Methanol. Es folgte eine weitere 15 minütige Behandlung bei Raumtemperatur in 7 % (w/v) NaOH in 60 % (v/v) Ethanol. Darauf folgten wieder drei Waschschrte in 40 %, 20 % und 10% (v/v) Ethanol für jeweils fünf Minuten. Anschließend inkubierte man die Keimlinge für 15 Minuten in 5 % (v/v) Ethanol mit 25 % (v/v) Glycerin. Für die endgültige Fixierung wurden die Keimlinge auf Objektträger mit 50 % (v/v) Glycerin überführt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

### Färbelösung

50 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1 mM	Kaliumferricyanid
2 mM	Kaliumferrocyanid
1 mM	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Glucuronid (X-Gluc)
1 %	Triton X-100

## 2.4 Anzucht und Transformation von Bakterien

### 2.4.1 Anzucht, Transformation und Lagerung von Bakterienzellen

Die Anzucht von *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens* erfolgte in Flüssig- oder Festmedium bei 37 °C bzw. bei 28 °C unter Selektionsdruck mit entsprechenden Antibiotika. Transformationen von kompetenten Bakterienzellen mit Plasmid-DNA wurden mit Hitzeschock bei 42 °C (*E. coli*) bzw. 37 °C (*A. tumefaciens*) durchgeführt.

Transformationen der rBiFC-Konstrukte erfolgte nach Anleitung (user guide: One Shot® TOP10 Competent Cells, invitrogen™ by life technologies™) in TOP10 Zellen. Transformierte Zellen wurden auf LB-Platten mit 100 µg/mL Spectinomycin, 40 µg/mL X-Gal und 0,1 mM IPTG ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bei der anschließenden Blau-Weiß-Selektion wurden weiße Kolonien mittels PCR (Vektor und Insert spezifische Primer) überprüft. Positive Kolonien wurden in 5 mL LB Medium (mit den entsprechenden Antibiotika) über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert, mit einem Plasmid-Kit (GeneJet Plasmid Miniprep Kit von Thermo Scientific, Lafayette, USA) aufgearbeitet und anschließend erneut in TOP10 Zellen transformiert. Unter der Voraussetzung, dass nach der Retransformation alle Kolonien weiß waren, wurden jeweils drei Kolonien erneut mittels PCR überprüft, in LB-Medium (mit den entsprechenden Antibiotika) angezogen, aufgearbeitet und erneut in TOP10 Zellen retransformiert. Danach erfolgte nochmals die Überprüfung von drei Kolonien mittels PCR. Zusätzlich wurden die Plasmide mit Restriktionsenzymen geschnitten. Erst dann erfolgte die Transformation in Agrobakterien (siehe dazu Kapitel 2.2.5).

**Tabelle 2: Liste verwendeter Antibiotika mit dazugehörigen Konzentrationen**

Antibiotika	Konzentration
Ampicillin (Amp)	100 µg/mL
Gentamycin (Gen)	10 µg/mL
Rifampicin (Rif)	50 µg/mL
Spectinomycin (Spec)	100 µg/mL
Streptomycin (Strep)	50 µg/mL
Tetracycline (Tetr)	10 µg/mL

## 2.5 Molekularbiologische Methoden

### 2.5.1 Gewinnung von RNA aus Pflanzen

Um RNA aus Pflanzen zu gewinnen, wurde das GeneJET RNA Purification Kit von Fermentas (St. Leon-Rot) eingesetzt. Die Konzentrations- und Qualitätsbestimmung der gewonnenen RNA erfolgte photometrisch am NanoDrop (NanoDrop® ND-1000 Spectrometer, NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) durch die Bestimmung des Quotienten  $OD_{260}/OD_{280}$ .

## 2. Material und Methoden

### 2.5.2 Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung erfolgte entweder mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit von Fermentas (St Leon-Rot) oder nach den Protokollen von Birnboim & Doly (1979) bzw. von Birnboim, H.C (1983).

### 2.5.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte mit Taq-Polymerase bzw. Phusion-Polymerase (Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG, Karlsruhe) in den von der Firmen empfohlenen Puffern mit 200  $\mu$ M Desoxyribonucleosidtriphosphate (dATPs, dCTPs, dGTPs, dTTPs). Für die durchgeführten PCRs wurden ca. 2 ng Original-DNA (Template) und 20 pmol der dazugehörigen Oligonukleotide (siehe Primerliste) in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l eingesetzt. Das PCR Programm bestand aus den folgenden Schritten:

Denaturierungsschritt 1	(10 Minuten/95 °C)
Denaturierungsschritt 2	(30 Sekunden/95 °C)
	Primerhybridisierungsschritt (30 Sekunden/Temperatur entsprechend Primerkombination)
Elongationsschritt 1	(30-60 Sekunden in Abhängigkeit von der Produktlänge/72 °C bzw. 68 °C)
Verlängerungsschritt	(10 Minuten/72 °C bzw. 68°C)

Schritte 2-4 wurden dabei 30-35 mal wiederholt (30-35 Zyklen).

### 2.5.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarosegelen

Die elektrophoretische Auftrennung von PCR Produkten wurde mithilfe von 0,8 bzw. 1 % Agarosegelen durchgeführt. Als Puffer diente ein 1x TA Puffer. Zum Anfärben für DNA und RNA kam Midori Green (Nippon Genetics Europe GmbH, Düren) zum Einsatz (1  $\mu$ L/50 mL Agarosegel). Als Größenstandard wurde der GeneRuler 1 kb DNA Ladder von Invitrogen (Karlsruhe) verwendet.

#### 1x TA Puffer

40 mM Tris/HAc, pH 7,5  
20 mM Natriumacetat  
1 mM EDTA

## 2.6 Proteinbiochemische Methoden

### 2.6.1 Gewinnung von Proteinrohextrakt aus Blättern von *N. benthamiana*

Die Blattstücke wurden zuerst in flüssigem Stickstoff gemörsert und anschließend mit Extraktionslösung (1:2) versetzt, bei 14000 rpm für 15 Minuten (Kühlzentrifuge Centrifuge 5415R, Eppendorf AG Hamburg, Deutschland) zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß (E-Cup, Eppendorf AG, Hamburg) überführt. Anschließend folgte dann die Zugabe von SDS-Probenpuffer (siehe Kapitel 2.6.5) im Verhältnis 1:1 und die Inkubation für 10 Minuten bei 95 °C. 20  $\mu$ L Probe wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen.

Extraktionslösung

4 M Harnstoff  
100 mM DTT

**2.6.2 Hefeaufschluß für die Analyse der Proteinexpression**

Transformierte Hefen zog man in einer 4 ml Übernacht-Kultur an und pelletierte sie durch Zentrifugation (Kühlzentrifuge Centrifuge 5415R, Eppendorf AG Hamburg, Deutschland). Das Pellet wurde in eiskalten MilliQ- Wasser resuspendiert und mit 148 µl NaOH und 12 µl β-Mercaptoethanol versetzt. Es erfolgte eine Inkubation für 10 Minuten auf Eis und die Zugabe von 160 µl 50 % (w/v) TCA. Anschließend wurde für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Danach folgte eine Zentrifugation für zwei Minuten bei 14000 rpm (4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl 1 M Tris gewaschen und anschließend für zwei Minuten bei 14000 rpm (4 °C) zentrifugiert. Nun konnte das Pellet getrocknet und in 50 µl SDS-Probenpuffer (siehe 2.6.5) resuspendiert, für fünf Minuten bei 95 °C inkubiert und je 5 µl auf ein SDS Gel aufgetragen werden.

**2.6.3 Isolierung von Mikrosomen durch differentielle Zentrifugation**

Ca. 1 g Pflanzenmaterial wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und mit 3,5 ml Homogenisierungspuffer versetzt. Anschließend folgte eine differentielle Zentrifugation:

Zentrifugation bei 5000 g, 10 min, 4 °C

Zentrifugation bei 10000 g, 15 min, 4 °C

Zentrifugation bei 110000 g, 45 min, 4 °C

Bei den ersten beiden Zentrifugationsschritten wurde jeweils das Pellet verworfen und der Überstand erneut zentrifugiert. Die im letzten Zentrifugationsschritt erhaltenen Pellets nahm man in 100 µl Resuspendierungspuffer pro g Frischgewicht auf, anschließend wurde mit einem Mikro-Handhomogenisator alles homogenisiert. Danach wurden die Mikrosomen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. (Alle hier durchgeführten Schritte fanden im Kühlraum bei 4 °C statt)

Homogenisierungspuffer

50 mM Tris pH 7,5  
5 mM EDTA  
3 mM DTT (frisch)  
0,5 % (w/v) Casein  
330 mM Saccharose  
1 % (w/v) PVP (frisch)  
1 mM Benzamidin  
1 mM PMSF  
3,5 µg mL<sup>-1</sup> E 64  
1 µg mL<sup>-1</sup> Pepstatin  
1 µg mL<sup>-1</sup> Leupeptin  
1 µg mL<sup>-1</sup> Aprotinin

Tablette Roche complete ultra (nach Herstellerempfehlung)

Resuspendierungspuffer

50 mM Tris pH 7,5  
10 % (v/v) Glycerol  
1 mM EDTA  
1 mM DTT (frisch)  
1 mM Benzamidin  
1 mM PMSF  
3,5 µg mL<sup>-1</sup> E 64  
1 µg mL<sup>-1</sup> Pepstatin  
1 µg mL<sup>-1</sup> Leupeptin  
1 µg mL<sup>-1</sup> Aprotinin  
Tablette Roche complete ultra (nach Herstellerempfehlung)



## 2. Material und Methoden

### 2.6.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte mit der Roti-Quant Proteinbestimmungslösung nach Bradford (Carl Roth GmbH + Co. KG/Karlsruhe). Als Standard wurde Rinderserumalbumin (BSA) verwendet.

### 2.6.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer molekularen Masse wurden Polyacrylamid-Gele nach Laemmli (1970) verwendet. Dazu versetzte man Proteinproben im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer, anschließend folgte ein Denaturierungsschritt entweder bei 37 °C (Mikrosomen) oder bei 95 °C für 10 Minuten. Die Proteine wurden in einem Sammelgel bei 10 mA (Mikrosomen) bzw. bei 20 mA konzentriert und im 11 %igen Polyacrylamid-Trenngel bei 20mA (Mikrosomen) bzw. bei 30 mA elektrophoretisch aufgetrennt. Es folgte entweder eine Färbung mit Coomassie oder eine elektrophoretische Übertragung der Proteine auf Nitrocellulose mittels Western Blot.

**Tabelle 3: Pipettierschema für Polyacrylamidgele**

Polyacrylamidkonzentration	Trenngel			Sammelgel
	12,5 %	11 %	9 %	4 %
Wasser	6,3 mL	7,3 mL	8,64 mL	9,7 mL
Trenn-bzw. Sammelgelpuffer	5 mL	5 mL	5 mL	3,7 mL
Polyacrylamid	8,33 mL	7,35 mL	6 mL	2 mL
10 % SDS	200 µL	200 µL	200 µL	150 µL
10 % APS	150 µL	150 µL	150 µL	80 µL
TEMED	15 µL	15 µL	15 µL	50 µL
	20 ml			15 ml

#### 1x Elektrodenpuffer

25 mM Tris  
192 mM Glycin  
0,1 % (w/v) SDS

#### Trenngelpuffer

1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

#### Probenpuffer

10 % (w/v) SDS  
50 % (v/v) Glycerol  
0,5 % (w/v) Bromphenolblau  
500 mM DTT  
310 mM Tris, pH 6,8

#### Sammelgelpuffer

1 M Tris-HCl, pH 6,8

#### 2.6.5.1 Coomassie-Färbung

Bei der Coomassie-Färbung handelt es sich um eine reversible Färbemethode, um Proteine unspezifisch anzufärben. Dazu wird nach der SDS-Elektrophorese das Gel für 30 Minuten in die Färbelösung inkubiert und anschließend mit Entfärber entfärbt.

Coomassie-Färbelösung

0,1	% (w/v) Coomassie Brilliant-Blau
40	% (v/v) Methanol
10	% (v/v) Essigsäure

Entfärber

40	% (v/v) Methanol
10	% (v/v) Essigsäure

**2.7 Aktivitätstest der vakuolären H<sup>+</sup>-Pyrophosphatase und vakuolären H<sup>+</sup>-ATPase**

Um die Aktivität der vakuolären H<sup>+</sup>-Pyrophosphatase und der vakuolären H<sup>+</sup>-ATPase zu bestimmen, macht man sich zunutze, dass beide H<sup>+</sup>-Pumpen Energie in Form von ATP bzw. Pyrophosphat verbrauchen und im Gegenzug anorganisches Phosphat freigesetzt wird. Dieses anorganische Phosphat wird bei den entsprechenden Aktivitätsmessungen unter Einsatz mikrosomaler pflanzlicher Membranen bestimmt. Dazu wurden Mikrosomen frisch hergestellt (siehe dazu Kapitel 2.6.3) und je 20 µL Mikrosomen (10 µg Endkonzentration) in einen spezifischen Puffer gegeben, der jeweils auf die Aktivitätsmessung der vakuolären H<sup>+</sup>-ATPase bzw. der vakuolären Pyrophosphatase abgestimmt war. Dieser Puffer enthielt für den Aktivitätstest der vakuolären H<sup>+</sup>-ATPase verschiedene Inhibitoren, um alle unerwünschten Pumpen abzuschalten, die ATP als Energiequelle nutzen (NaN<sub>3</sub>/F-Typ ATPasen, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>/P-Typ ATPasen und KNO<sub>3</sub>/V-Typ ATPasen für Kontrolle). Für den Aktivitätstest der vakuolären H<sup>+</sup>-Pyrophosphatase wurde KNO<sub>3</sub> als Aktivator eingesetzt. Zusätzlich enthielt der Puffer ATP bzw. Pyrophosphat als Energiequelle. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37°C wurde die Reaktion mit Zitronensäure abgestoppt und alles portionsweise in 96er well plates überführt. Anschließend versetzte man alles mit einer Lösung (AAM/acetone-acid-molybdate) aus Ammoniummolybdat (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> \* 4H<sub>2</sub>O, Schwefelsäure und Aceton, das zusammen mit dem freigesetzten Phosphat einen gelblichen Farbstoff (Molybdängelb) bildete, den man bei 355 nm photometrisch bestimmen konnte. Die Aktivitätstests der vakuolären H<sup>+</sup>-Pyrophosphatase und vakuoläre H<sup>+</sup>-ATPase wurden nach dem abgeänderten Protokoll (Heinonen und Lahti, 1981; Wang und Sze, 1985; Schumacher et al., 1999; Krebs et al., 2010) der FG Schumacher, Heidelberg durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten hitzeinaktivierte Mikrosomen. Die Absorptionmessungen erfolgten in einem microplate reader (Safire, Tecan, Männedorf, Schweiz) bei einer Wellenlänge von 355 nm.

Puffer für die Aktivitätsmessungder vakuolären H<sup>+</sup>-Pyrophosphatase der vakuolären H<sup>+</sup>-ATPase

25	mM Tris-MES, pH 7,5	25	mM Tris-MES, pH 7,5
2	mM MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	4	mM MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O
0,1	mM Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	50	mM KCl
0,02	% Brij 58	1	mM NaN <sub>3</sub>
0,2	µM PPI	1	mM Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>
50	mM Aktivator: KNO <sub>3</sub>	0,02	% Brij 35
		500	µM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
		50	mM Inhibitor: KNO <sub>3</sub>
		3	mM Mg*ATP

## 2. Material und Methoden

### 2.8 Immunologische Methoden

#### 2.8.1 Western Blot (Wetblot)

Hierbei werden Proteinen eines SDS-Gels elektrophoretisch auf eine Membran (Nitrocellulose) übertragen und immobilisiert. Die Western Blot Methode erfolge nach Towbin et al., 1979. Der Transfer fand bei Raumtemperatur (RT) und 200 mA für 90 Minuten bzw. für 105 Minuten (Mikrosomen) in einer Tankblotkammer (alternativ bei 63 mA über Nacht) statt.

##### Blotpuffer

20 mM Tris  
150 mM Glycin  
20 % (v/v) Methanol  
0,01 % (w/v) SDS

#### 2.8.1.1 Ponceau-Färbung

Die Ponceau-Färbung ist eine reversible Färbemethode, um eine Übertragung der Proteine vom SDS-Gel auf die Membran (Nitrocellulose) zu überprüfen. Hierzu wird die Nitrocellulose nach dem Blotten für ca. fünf Minuten in der Ponceau S Färbelösung inkubiert und anschließend mit VE-Wasser entfärbt.

##### Ponceau S-Färbelösung:

1 % (w/v) Ponceau S  
2 % (v/v) Essigsäure

#### 2.8.2 Immundetektion mittels Chemilumineszenzreaktion

Nach dem elektrophoretischen Transfer auf Nitrocellulose wurde der Proteinmarker auf der Nitrocellulose gekennzeichnet und unspezifische Bindestellen der Membran durch eine einstündige Inkubation (alternativ über Nacht bei 4 °C) in „Tris-buffered saline (TBS)“ mit 2 % (w/v) Powerplay abgesättigt. Danach folgte die Behandlung mit dem primären Antikörper in TBS mit 2 % (w/v) PowerPlay für eine Stunde unter leichtem Schütteln und schließlich drei Waschschritte mit 1x TBS für jeweils fünf Minuten, um unspezifische gebundenen Antikörper zu entfernen. Es folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (in PowerPlay), ebenfalls für eine Stunde, unter leichtem Schütteln. Danach wurde die Membran für jeweils fünf Minuten dreimal mit 1x TBS gewaschen. Es folgte die Chemilumineszenzreaktion zum Nachweis der an den 2ten Antikörper konjugierten Peroxidase.

##### PowerPlay

2 % PowerPlay in 1x TBS

##### TBS

50 mM Tris/HCl pH 7,8  
150 mM NaCl  
1 mM MgCl<sub>2</sub>

Dazu mischte man Lösung A, B und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wie unten angegeben. Dieser Ansatz wurde dann unter leichtem Schütteln für ca. zwei Minuten in der Lösung inkubiert und die Nitrocellulose anschließend zwischen zwei Folien fixiert und der Film (High performance chemiluminescence film, Amersham Hyperfilm ECL GE Healthcare) aufgelegt.

#### Arbeitslösung

Lösung A: 1 ml  
 Lösung B: 0,1 ml  
 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 0,3 µl

#### Lösung A

0,1 M Tris/HCl (pH 8,5)  
 50 mg Luminol

#### Lösung B

10 mg p-Coumaric acid in 10 ml DMSO

**Tabelle 4: Antikörperverdünnungen für die Chemilumineszenzreaktion**

Primärer Antikörper	Verdünnung	Sekundärer Antikörper	Verdünnung
α-HA, monoklonal	1:2000	Goat anti-rat IgG (H+L), HRP conjugate; polyclonal	1:10000
α-c-myc, monoklonal, Klon 9.E10	1: 400	Goat anti-mouse IgG (H+L), HRP	1:10000
α-PIN1 rabbit, Antiserum	1:2000	Goat anti-rabbit IgG (H+L), HRP conjugate; polyclonal	1:10000
α-PIN2 rabbit, Antiserum	1:2000	Goat anti-rabbit IgG (H+L), HRP conjugate; polyclonal	1:10000
α-GFP-rabbit Antiserum	1:5000	Goat anti-rabbit IgG (H+L), HRP conjugate; polyclonal	1:10000
α-V-ATPase (α-VHA-c (Det3)) rabbit, Antiserum	1:2000	Goat anti-rabbit IgG (H+L), HRP conjugate; polyclonal	1:10000
α-V-PPase (AVP1), Antiserum	1:5000	Goat anti-rabbit IgG (H+L), HRP conjugate; polyclonal	1:10000
α-ATPase rabbit Antiserum	1:2000	Goat anti-rabbit IgG (H+L), HRP conjugate; polyclonal	1:10000

## 2.9 Ratiometrische Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (rBiFC)

Die hier verwendete Methode der „ratiometrischen Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (rBiFC)“ (Grefen und Blatt, 2012) ist eine Kombination aus BiFCs und dem „2in1“ Klonierungssystem (einer auf Rekombination basierenden Klonierungsstrategie). Dabei werden die cDNA beider Interaktionspartner in einen Vektor kloniert, der sowohl für die N- als auch die C-terminale Hälfte von YFP kodiert. Des Weiteren erlaubt der Vektor die Expression von mRFP als Expressions- und Transformationskontrolle. Der Hauptvorteil ist die Möglichkeit der quantitativen Auswertung der BiFCs. Durch Ermittlung der Fluoreszenz-

## 2. Material und Methoden

Intensitäten beider Fluorophore kann das Verhältnis berechnet werden. Dies erlaubt es, Ergebnisse verschiedener Proteinpaare miteinander zu vergleichen und somit Interaktionsstärken in einem semi-quantitativen Ansatz zu vergleichen. Zusätzlich befinden sich c-myc und HA Epitope an den YFP-Hälften und ermöglichen eine Verifikation der Proteinexpression über Immundetektionen.

Zu Beginn der Klonierung wurden zuerst die gewünschten PCR-Produkte mithilfe verschiedener Primerkombinationen amplifiziert und über ein PCR clean-up, gel extraction kit von Machery-Nagel GmbH & Co. KG (Düren) aufgereinigt. Die Klonierung erfolgte nach dem Protokoll "Gateway® Technology: A universal technology to clone DNA sequences for functional analysis and expression in multiple systems" und den dazugehörigen Produkten von life technologies. Prinzipiell funktioniert die Klonierung wie folgt: Das gewünschte PCR Produkt wurde mit „attachment sites“ versehen und mittels Rekombination mit einer BP-Klonase in einen „entry vector“ (V006, V007) überführt. Entry-Klone wurden mittels Restriktionsenzymen auf das gewünschte PCR-Produkt überprüft und anschließend von GATC biotech AG, Konstanz sequenziert. Mit einer LR-Klonase wurden zwei unterschiedliche Entry-Klone in den gewünschten Zielvektor bzw. „destination vector“ (V259) gebracht. Als Negativkontrolle diente nYFP. Die erhaltenen Konstrukte wurden in TOP10 Zellen transformiert (siehe dazu Kapitel 2.4.1) und schließlich mittels Agrobakterien in Tabakpflanzen infiltriert (siehe dazu Kapitel 2.2.5). Nach der mikroskopischen Untersuchung am Confocal erfolgte die ratiometrische Auswertung mit ImageJ, indem das Verhältnis der Intensitäten YFP/RFP gemessen wurde.

### 2.10 Mikroskopische Analysen, Messungen und Auswertung

#### 2.10.1 Mikroskopische Aufnahmen und digitale Nachbearbeitung

Die confocalmikroskopischen Untersuchungen wurden an einem Leica TCS SP8 Confocal Scanning Microscope (Wetzlar, Germany) mit der dazugehörigen Software durchgeführt. Für die Differentialinterferenzkontrast-Mikroskopie (DIK) wurde ein Zeiss Axiophot verwendet. Binokulare Aufnahmen wurden mit Leica Fluo TM MZFLIII erstellt. Die in der Arbeit gezeigten Fotos wurden mithilfe des Programms Adobe Photoshop CS5 bearbeitet, ohne die Bildinformationen zu verändern.

#### 2.10.2 Auswertung und Messungen

Alle Messungen von Intensität, Fläche und Länge wurde mithilfe des Programms ImageJ (Freeware, NIH, Bethesda, MD, USA) ausgewertet. Um die Länge der Hypokotyle von etiolierten Keimlingen zu bestimmen, wurden die Keimlinge auf Agarplatten transferiert, gescannt und anschließend mit ImageJ vermessen. Zur Quantifizierung des Verhältnisses von intrazellulärem zu Plasmamembran PIN2 Signal (GFP) wurde das Verhältnis zwischen BFA-Kompartiment zu Plasmamembran bestimmt. Dazu wurde die Intensität von einer bestimmten Anzahl an Bildpunkten in der Mitte des BFA-Kompartiments bestimmt und ins Verhältnis gesetzt zu der gleichen Anzahl an Bildpunkten an der apikalen Plasmamembran (siehe dazu Kapitel 3.1.8.1). Für die BFA Washout-Versuche (siehe dazu Kapitel 3.1.8.2)

## 2. Material und Methoden

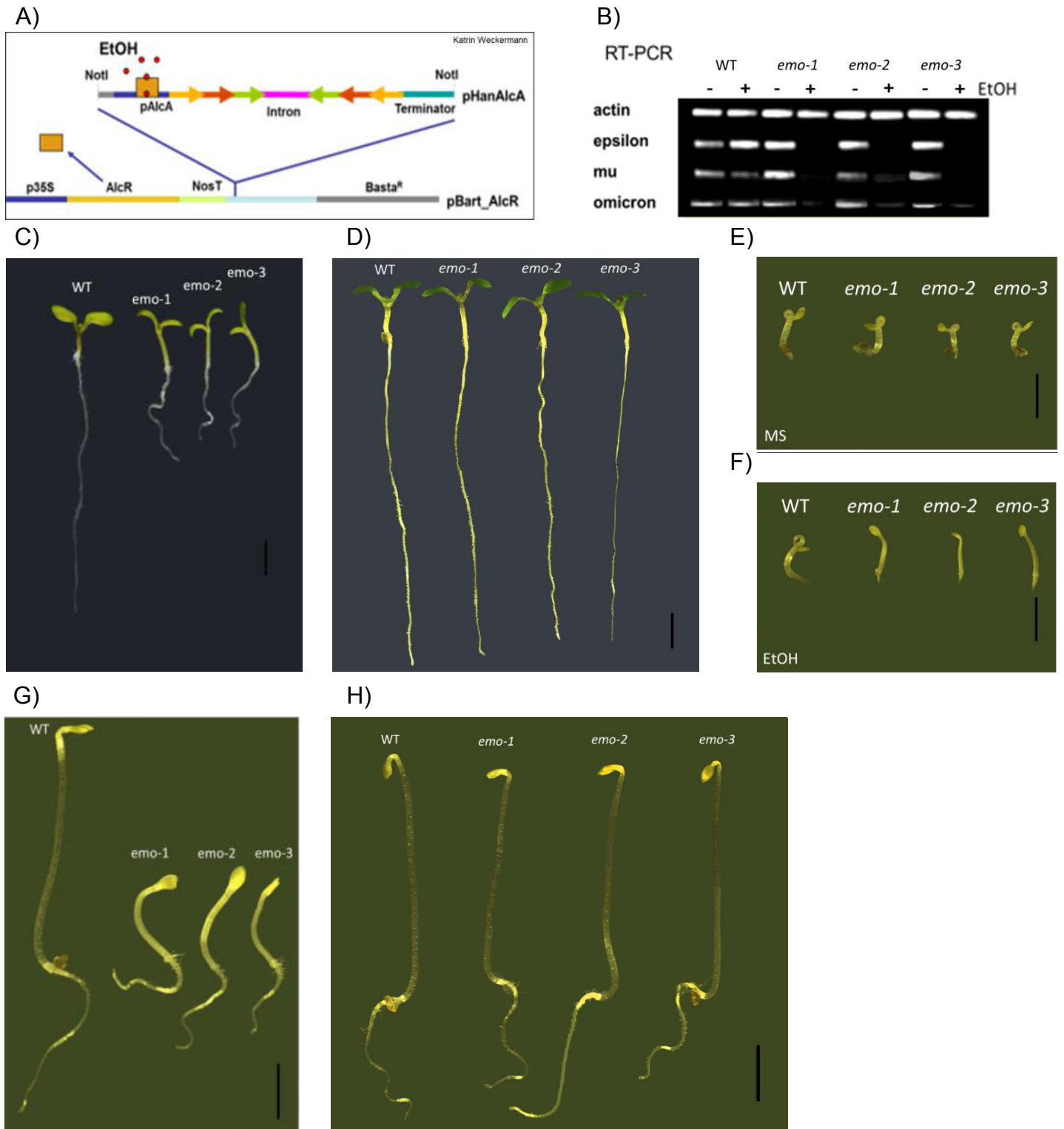
wurde dieses Verhältnis jeweils vor und nach dem Washout von BFA bestimmt und anschließend prozentual ins Verhältnis gesetzt.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Ethanol-induzierbare RNA Interferenz von 14-3-3 Epsilon Mitgliedern

Die Familie der 14-3-3 Proteine in *Arabidopsis thaliana* unterteilt sich, wie bereits erwähnt, in zwei große phylogenetische Gruppen, die Epsilon und die Non-Epsilon Gruppe (siehe dazu Einleitung Abb. 2). Die Epsilon Gruppe findet man in allen eukaryotischen Zellen und ihre Mitglieder sind höchstwahrscheinlich für die Regulation grundlegender eukaryotischer Funktionen verantwortlich. Die Mitglieder der Non-Epsilon Gruppe haben dagegen möglicherweise Organismus-spezifische Funktionen (Jaspert et al., 2011). Um genauere Informationen über die einzelnen Isoformen zu erhalten, wurden T-DNA-Insertionslinien untersucht. In der Non-Epsilon Gruppe weisen Einfach- und Doppelmутanten keinen phänotypischen Unterschied zum Wildtyp auf (Kleeff et al., 2014), dies weist auf eine funktionelle Redundanz der Isoformen hin. Dreifach- und Vierfachmutanten weisen ein verkürztes Wachstum der Primärwurzel auf. Auch scheint die Isoformkombination kappa/lambda möglicherweise spezifische Funktionen auszuführen, denn sie weist als einzige analysierte Doppelmутante eine reduzierte ACC Sensibilität auf, welches zu einer Zunahme der Zellstreckung führt. Nach Kleeff et al. 2014 ist dies auf einen möglichen Verlust der Interaktion dieser Isoformen mit den Zellwandlokalisierten Peroxidasen (peroxidase, PER69) zurückzuführen (Irshad et al., 2008; Shin et al., 2011), denn eine Verringerung der Zellstreckung wird durch die Peroxidase-katalysierte Vernetzungsaktivität in der Zellwand verursacht (Kleeff et al., 2014). Im Gegensatz dazu konnten für die Mitglieder der Epsilon Gruppe (bis auf eine omicron „loss of function“ Mutante) keine „knock-out“ T-DNA-Insertionslinien identifiziert werden. Ob dies auf eine mögliche Letalität zurückzuführen ist, ist nicht bekannt. Transgene Pflanzenlinien mit einem RNAi-Konstrukt gegen eine einzelne Isoform der Epsilon Gruppe (*epsilon*; *omicron*; *mu*) weisen nach eigenen Untersuchungen und nach Untersuchungen von Katrin Weckermann unter normalen Wachstumsbedingungen keinen Unterschied zu Wildtyppflanzen auf (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund generierte Katrin Weckermann ein RNAi Konstrukt (siehe dazu Abb. 3A), welches eine Ethanol-induzierbare Reduktion der Expression von drei Isoformen der Epsilon Gruppe in transgenen Pflanzen erlaubte (siehe dazu Abb. 3B und C; Katrin Weckermann, Dissertation 2008). Die Mutante wurde nach den drei Isoformen **epsilon**, **mu** und **omicron**, deren Expression Ethanol-abhängig reprimiert wird, **emo** genannt. Diese drei Isoformen werden in *Arabidopsis thaliana* mehr oder weniger ubiquitär exprimiert. Die zwei weiteren Mitglieder der Epsilon Gruppe, pi und iota, werden dagegen nur in Antheren oder Pollen exprimiert, somit sind sie für junge Keimlinge nicht essentiell (Katrin Weckermann, Dissertation 2008). Die Isoformen der Non-Epsilon Gruppe sind von der ethanolabhängigen Repression nicht betroffen, dies konnte anhand von RT-PCRs nachgewiesen werden. Somit konnte durch das RNAi Konstrukt ethanolabhängig die Epsilon Gruppe fast vollständig ausgeschaltet werden. Insgesamt wurden von Katrin Weckermann drei unabhängige, homozygote *emo*-Linien: *emo-1*, *emo-2* und *emo-3* generiert.

### 3. Ergebnisse



**Abb. 3:** Nach Ethanol-abhängiger Reduktion der Expression der drei Epsilon-Gruppen-Mitglieder zeigen die *emo* Mutanten einen pleiotropen Phänotyp im Licht und im Dunkeln

**A)** Schematische Darstellung des Ethanol-induzierbaren RNAi Konstrukts nach Katrin Weckermann; AlcR (Transkriptionsfaktor unter der Kontrolle des 35S Promotors), nach Ethanolinduktion kann der Transkriptionsfaktor AlcR an den Promotor AlcA binden und die Expression des RNAi Konstrukts auslösen. Diese beinhaltet spezifische cDNA Abschnitte der drei Isoformen epsilon, mu und omicron in Form eines „inverted repeats“, sodass sich eine hair pin Struktur bilden kann, die letztendlich zum RNA-Silencing bzw. RNA-Interferenz (RNAi) der drei Isoformen führt.

**B)** Semiquantitative RT-PCR Analyse der 14-3-3 Isoformtranskripte (epsilon, mu und omicron) in WT und den drei unabhängigen Mutantenlinien (*emo-1,-2,-3*) nach Wachstum auf Medium mit (+) und ohne (-) EtOH; als Kontrolle dient Aktin (Katrin Weckermann).



### 3. Ergebnisse

**C) und D)** Wachstum von WT und den drei unabhängigen *emo* Linien (*emo-1*, -2 und -3) auf 1x MS-Medium mit 1% Saccharose für drei Tage, anschließend Transfer auf 1x MS-Medium mit 1% Saccharose mit (C) oder ohne (D) 0,1 % (v/v) EtOH für vier Tage.

**E) und F)** Einfluß von ACC auf etiolierte Keimlinge von WT und den drei unabhängigen *emo* Linien (*emo-1/-2/-3*) die für vier Tage auf 1x MS Medium + 1 % Saccharose + 50 µM ACC im Dunkeln mit (F) und ohne (E) 0,1 % (v/v) EtOH.

**G) und H)** Wachstum von WT und den drei unabhängigen *emo* Linien (*emo-1*, -2 und -3) im Dunkeln für fünf Tage auf 1x MS Medium mit 1 % Saccharose ohne (H) oder mit (G) 0,1 (v/v) % EtOH.  
(C-H Maßstab=2 mm; Aufnahme: Canon)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine amiRNA Linie generiert (*ami(e)mo*), die ebenfalls Ethanol-abhängige die Expression der drei Isoformen epsilon, mu und omicron reduzieren sollte. Durch synthetische microRNAs (miRNA), so genannte artifizielle microRNA, wird gezielt die Expression einzelner Gene oder Gengruppen mit homologen Sequenzabschnitten stillgelegt. Daher wurden unter Zuhilfenahme der Website „www.wmd.weigelworld.org“ die amiRNAs konstruiert (Klonierung und Transformation Dr. Nina Jaspert). Dabei wurde ein Konstrukt generiert, das zwei „hair pin“ Strukturen ausbilden kann. Eine davon richtete sich simultan gegen zwei Isoformen (epsilon und mu), weist also „mismatches“ zu den entsprechenden mRNAs auf. Die zweite „hair pin“ Struktur richtet sich gegen die verbleibende dritte Isoform (omicron) (*ami(em)o*; siehe dazu Abb. 4E).

Die RT-PCR lässt bei Wildtyp keinen Unterschied in der Signalstärke der verschiedenen Isoformen in Ab- und Anwesenheit von Ethanol erkennen. Im Gegensatz dazu weisen *emo-1* und auch *ami(em)o* eine signifikante Reduktion der Expression von epsilon, mu und omicron nach Ethanolbehandlung auf (siehe dazu Abb. 3B und 4E). Diese Linie kann nun verwendet werden, um zu überprüfen, ob die Expression amiRNA-resistenter cDNAs der einzelnen Isoformen den Phänotyp deutlich abschwächen kann.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass nur unter der Verwendung von Ethanol die Reduktion der Expression der drei genannten Isoformen (epsilon, mu und omicron) in den drei unabhängigen *emo*-Linien (*emo-1*, -2, -3; siehe dazu Abb. 3B) und der *ami(em)o* Linie (siehe dazu Abb. 4E) erfolgt. Unter Wachstumsbedingungen ohne Ethanol weisen die genannten Mutanten keinen Unterschied zu Wildtyppflanzen auf (siehe dazu Abb. 3B, C und D und 4C, D und E).

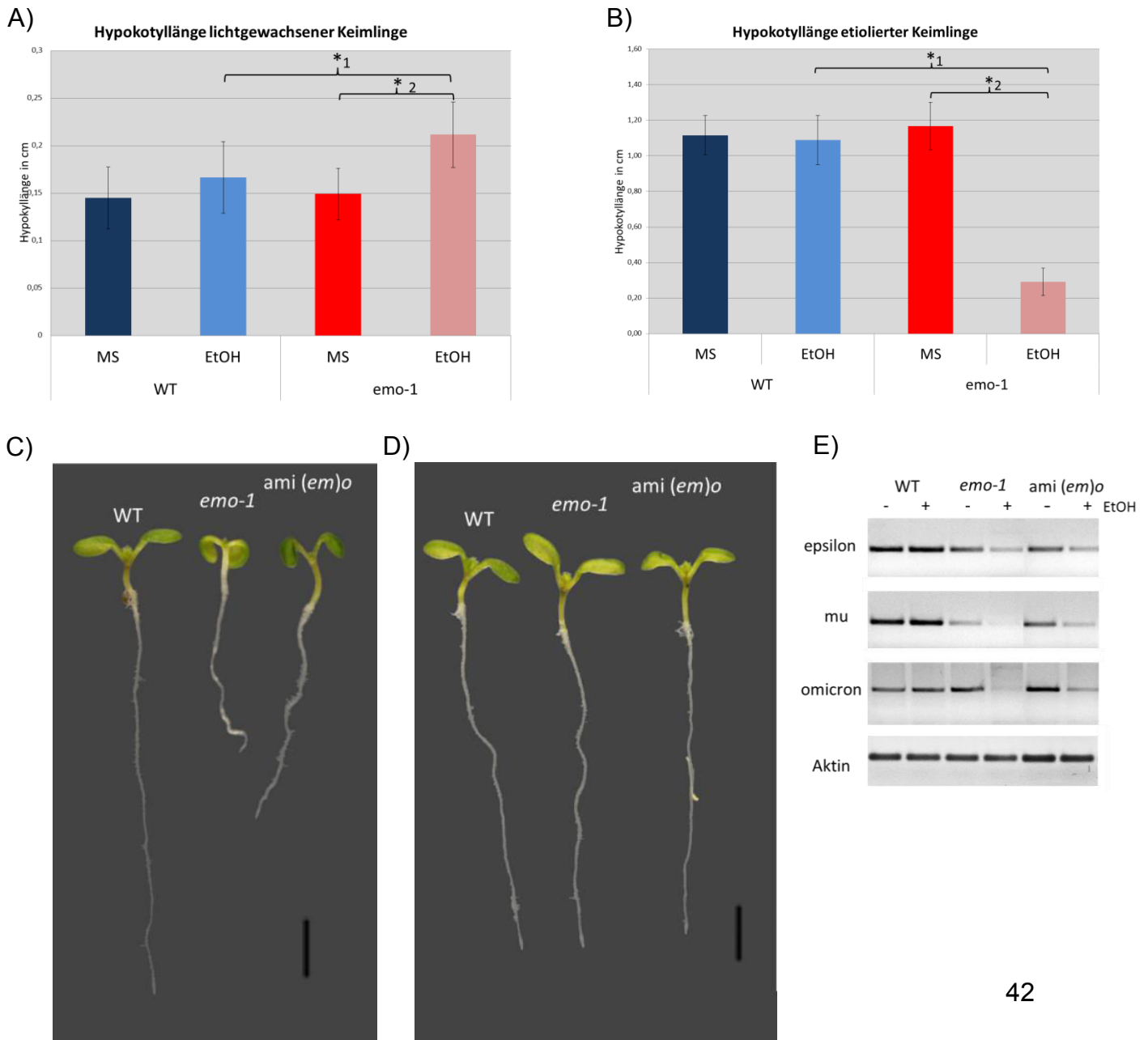
#### **3.1.1 Grundlegende Charakteristika der RNAi- und amiRNA-Linien**

Lichtgewachsene *emo* und *ami(em)o* Mutante zeigen als Folge einer Ethanolbehandlung einen pleiotropen Phänotyp (siehe dazu Abb. 3C, 4A und C), der im Vergleich zum Wildtyp die folgenden Charakteristika aufweist: Epinastische Blätter, ein verlängertes Hypokotyl, eine verkürzte, nicht strikt gravitrop wachsende Primärwurzel („wavy root“) und zudem fehlende Lateralwurzeln. Im etiolierten Zustand zeichnen sich die *emo* Mutanten durch ein stark verkürztes Hypokotyl und durch die Abwesenheit eines Plumulahakens aus (siehe dazu Abb. 3G und H, 4B).

Derartige Wachstumsdefekte können auf Störungen der Phytohormonhomöostase oder Phytohormonsensitivitäten zurückzuführen sein. Das verkürzte Hypokotylwachstum

### 3. Ergebnisse

etiolierter *emo*-Keimlinge konnte jedoch weder durch exogene Gabe von Gibberellinen oder Brassinosteroiden, noch durch AVG (Aminoethoxyvinylglycin), einem Hemmstoff der Ethylenbiosynthese, aufgehoben werden (C. Oecking persönliche Mitteilung). Somit ist die *emo* Mutanten weder defizient für Gibberelline und Brassinosteroide, noch besteht eine Überproduktion von Ethylen. Wie bereits erwähnt, bilden etiolierte *emo*-Keimlinge keinen Plumulahaken aus. Erstaunlicherweise kann auch durch ACC (1-Aminocyclopropan 1-carbonsäure), der Vorstufe von Ethylen, kein verstärkter Plumulahaken induziert werden (siehe dazu Abb. 3E und F). Sowohl die Ausbildung des Plumulahakens als auch die Ethyleninduzierte Verstärkung desselben sind mit der Synthese und dem Transport von Auxin in Zusammenhang gebracht worden (Vandenbussche et al., 2010). Es ist bekannt, dass die Auxinbiosynthese und die effiziente Auxintranslokation vom Meristem über die Kotyledonen ins Hypokotyl notwendig ist um eine korrekte Ausbildung des Plumulahakens zu garantieren. Unter Einbezug der Tatsache, dass lichtgewachsene *emo*-Keimlinge eine „welligwachsende“ Primärwurzel haben und keine Seitenwurzeln bilden, könnte der pleiotrope Phänotyp auf eine Veränderung Auxin-vermittelter Prozesse zurückzuführen sein.



### 3. Ergebnisse

#### **Abb. 4: Nach Ethanol-abhängiger Reduktion der Expression der drei Epsilon-Gruppen-Mitglieder zeigen die ami (*em*)o Mutanten einen pleiotropen Phänotyp im Licht**

**A)** Hypokotylmessungen sieben Tage alter lichtgewachsener Keimlinge (Anzucht siehe Abb. 3C und D) zeigen ein signifikant verlängertes Hypokotyl der Mutante (*emo-1*) auf Ethanolhaltigem Medium im Vergleich zum Wildtyp ( $p^{*1}=4,56151E-08$ ;  $p^{*2}=2,919E-16$ ;  $n=50$  Keimlinge).

**B)** Hypokotylmessungen fünf Tage alter etiolierter Keimlinge (Anzucht siehe Abb. 3G und H) zeigen ein signifikant verkürztes Hypokotyl der Mutanten (*emo-1*) auf Ethanolhaltigem Medium im Vergleich zum Wildtyp ( $p^{*1}=5,15512E-34$ ;  $p^{*2}=2,6612E-35$ ;  $n=30$  Keimlinge).

**C) und D)** Wachstum von WT, *emo-1* und ami (*em*)o für vier Tage auf 1x MS-Medium mit 1 % Saccharose, anschließend Transfer auf 1x MS-Medium mit 1 % Saccharose mit (C) und ohne (D) 0,1 % (v/v) EtOH für drei Tage. (Maßstab=2 mm; Aufnahmen: Canon).

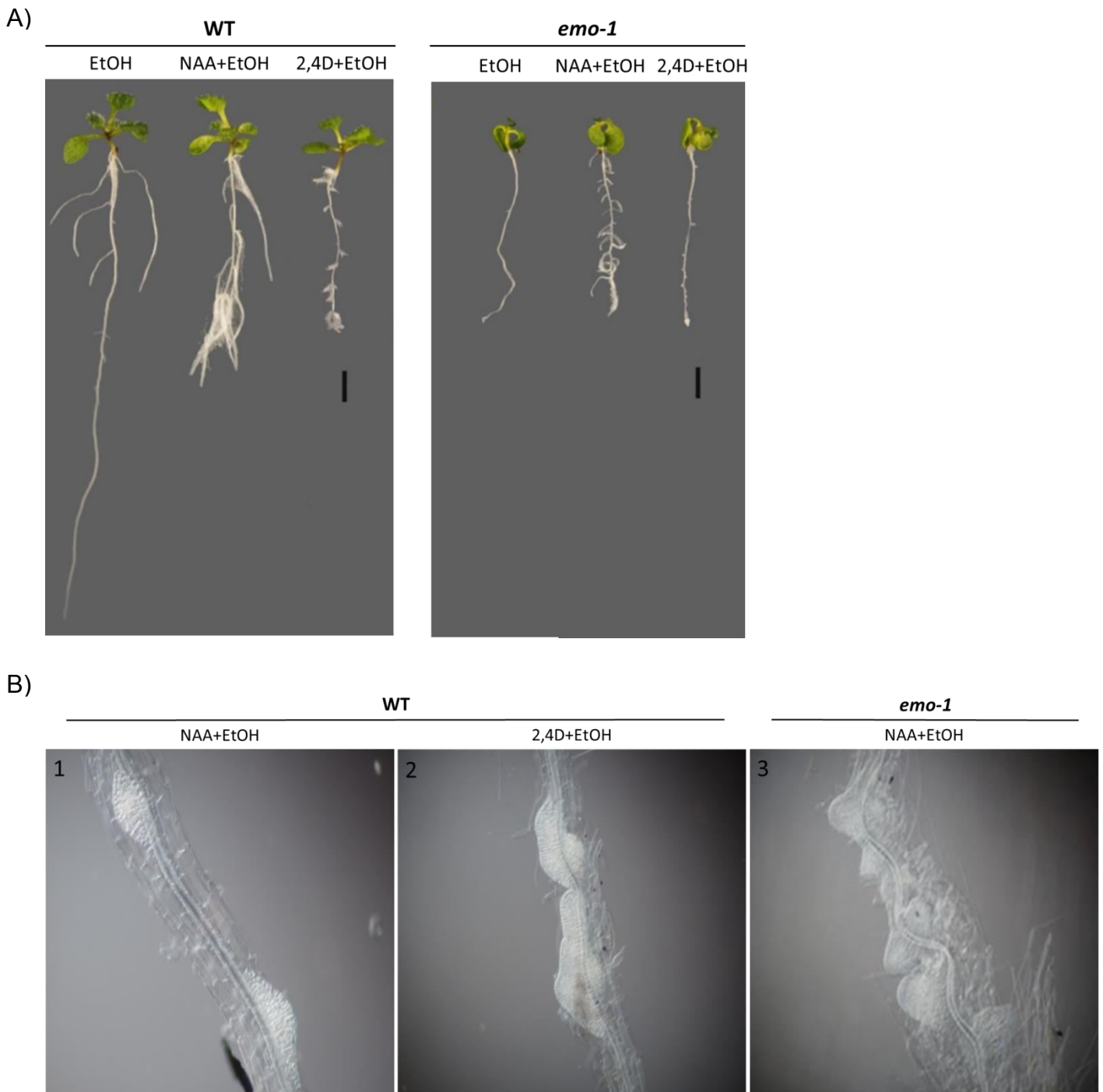
**E)** Semiquantitative RT-PCR Analyse der 14-3-3 Isoformtranskripte (epsilon, mu und omicron) in WT, *emo-1* und ami (*em*)o Keimlingen die wie nach (C) und (D) mit (+) und ohne (-) EtOH angezogen wurden, als Kontrolle dient Aktin (Aufnahmen: GelDoc; Anzucht der Keimlinge siehe G und H)

#### **3.1.3 RNAi von 14-3-3 Epsilon Mitgliedern interferiert mit Auxin-Transport-abhängigen Prozessen**

Zahlreiche Wachstums- und Differenzierungsprozesse sind von dem Phytohormon Auxin abhängig. Veränderungen Auxin-vermittelter Prozesse die, wie bereits erwähnt, ursächlich für den drastischen Phänotyp der *emo* Mutanten sein könnten, können Störungen in der Biosynthese, der Signaltransduktion oder des Transports von Auxin zugrunde liegen. Folgende Versuche zeigen, dass der pleiotrope Phänotyp letztendlich durch ein Transport-problem mit dem Phytohormon ausgelöst wird.

Um zu überprüfen, ob *emo* noch auf Auxin reagiert, wurde exogenes Auxin verwendet. Dabei ist bekannt, dass Auxin die Bildung von Seitenwurzeln (Lateralwurzeln) induziert (Reed et al., 1998). Dies beruht auf der transportabhängigen Etablierung eines Auxinmaximums in Perizykelzellen der Primärwurzel. Die beiden synthetischen Auxine, die für diesen Versuch eingesetzt wurden, waren 1-Naphthylessigsäure (NAA) und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) (siehe dazu Abb. 5). Während 2,4-D (genauso wie IAA) über AUX1, einen Auxin-Influx Transporter, in die Zelle transportiert wird, ist NAA unabhängig von AUX1 und kann durch Diffusion in die Zelle gelangen und diese über PIN-Efflux Carrier verlassen, was NAA zu einem „transportierbaren“ Auxin macht (Delbarre et al., 1996; Estelle, 1998; Marchant et al., 1999). Demgegenüber ist 2,4-D ein „nicht-transportierbares“ Auxin, da es nicht von Efflux Carriern transportiert wird.

In Abbildung 5A lässt sich erkennen, dass der Wildtyp nach Behandlung mit NAA eine deutlich verkürzte Primärwurzel mit langen Seitenwurzeln aufweist. Die Mutante zeigt auf NAA hingegen keine wesentliche Verkürzung der Primärwurzel im Vergleich zum Ethanol-induzierten Phänotyp. Bemerkenswerterweise kommt es zur Ausbildung von Seitenwurzeln, diese sind jedoch deutlich kürzer im Vergleich zu den Seitenwurzeln vom Wildtyp. Nach Behandlung mit 2,4-D lässt sich beim WT ebenfalls eine Reduktion der Primärwurzellänge im Vergleich zur Kontrolle erkennen, jedoch sind die ausgebildeten Seitenwurzeln deutlich kürzer als auf NAA. Bei der Mutante auf 2,4-D finden sich ebenfalls Seitenwurzeln, jedoch sind diese sehr kurz.



**Abb. 5: Wildtyp und *emo-1* nach Behandlungen mit dem Phytohormon Auxin**

**A)** Einfluß der synthetischen Auxine NAA und 2,4-D auf die Seitenwurzelbildung von WT und *emo-1* unter induktiven Bedingungen. Die Anzucht von WT und *emo-1* erfolgte für sechs Tage auf 1x MS Medium mit 1 % Saccharose, anschließend Transfer für sechs Tage auf 1x MS-Medium mit 0,1 % (v/v) EtOH, 250 nM NAA+0,1 % EtOH oder 50 nM 2,4-D + 0,1 % EtOH (Maßstab=2 mm; Aufnahmen: Canon).

**B)** DIK-Mikroskopische Aufnahmen von Seitenwurzelprimordien der Primärwurzel von WT und *emo-1* nach Behandlung mit exogenen Auxinen unter induktiven Bedingungen. Die Anzucht von WT und *emo-1* erfolgte jeweils für drei Tage auf 1x MS-Medium mit 1 % Saccharose mit anschließendem Transfer für zwei Tage auf 1x Medium mit 1  $\mu$ M NAA oder 0,1  $\mu$ M 2,4-D mit 0,1 (v/v) % EtOH. Der WT zeigt auf NAA+EtOH diskrete Seitenwurzelprimordien (1), im Gegensatz zu WT mit 2,4-D (2) bzw. *emo-1* mit NAA+EtOH (3), es zeigt sich eine hochgradige desorganisierte Proliferation von Perizykelzellen über große Regionen der Primärwurzel (Aufnahmen: Seitenwurzelprimordien, DIK).

### 3. Ergebnisse

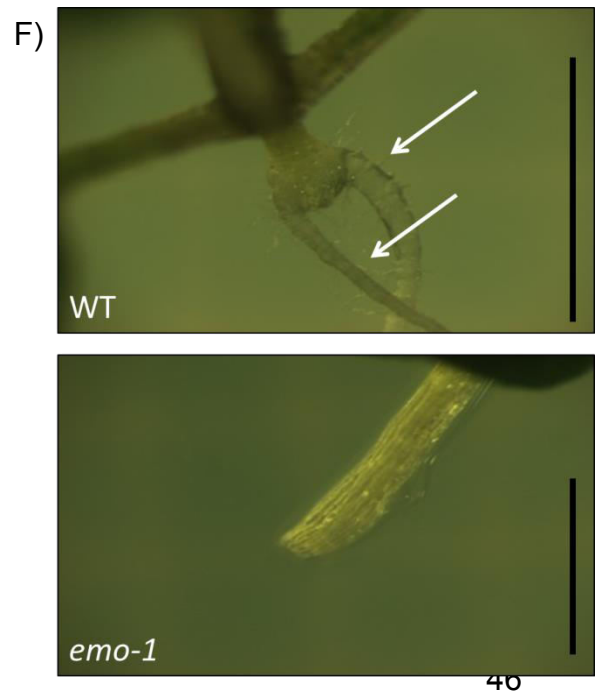
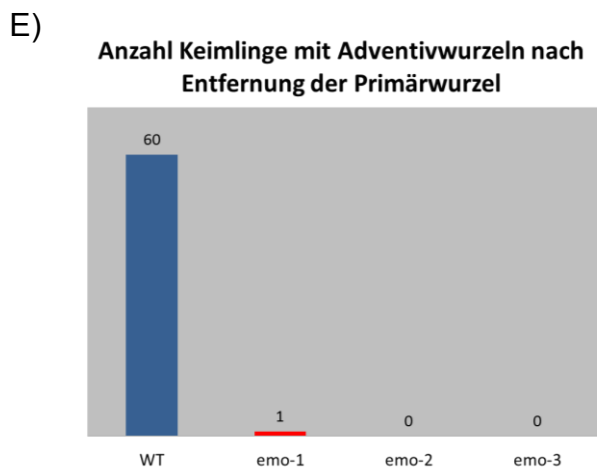
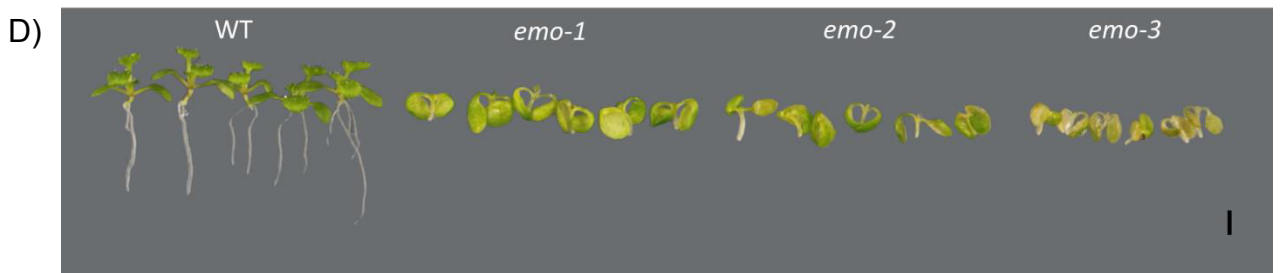
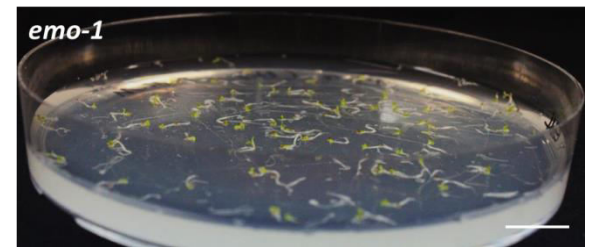
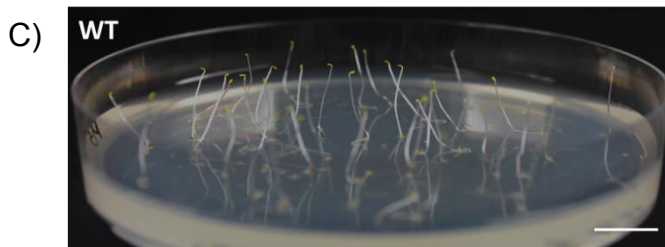
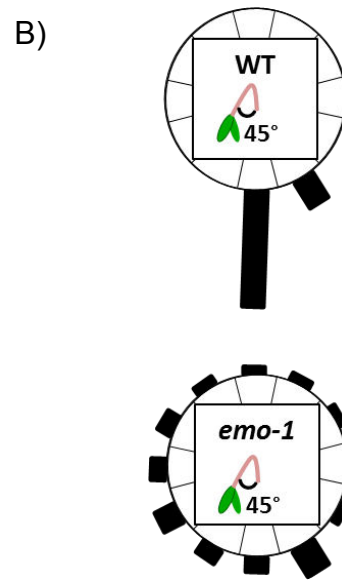
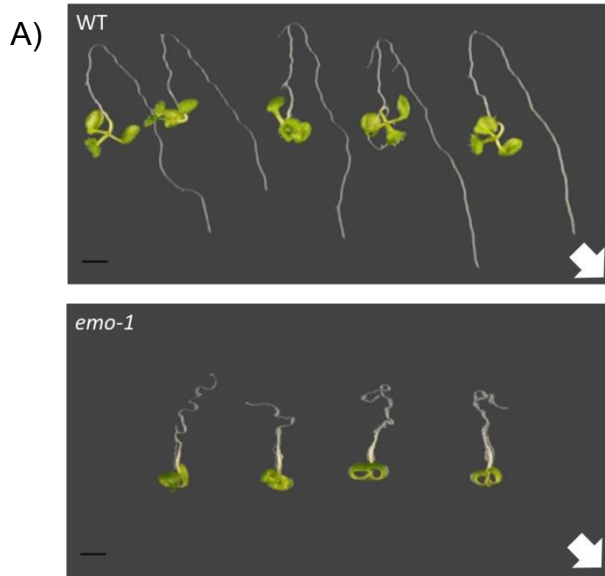
Es zeigt sich also, dass *emo-1* auf beide Auxine, also auf NAA und 2,4-D, reagiert. Jedoch ist diese Reaktion im Vergleich zum Wildtyp von hyposensitiver Natur. Auffällig dabei war, dass der Wildtyp nach Behandlung mit 2,4-D ein ähnliches Lateralwurzelmuster zeigt, wie die Mutante mit NAA (siehe dazu Abb. 5A). Bei Betrachtung im Differentialinterferenzkontrast-Mikroskop (DIK-Mikroskop) sieht man, dass die angelegten Seitenwurzelpremordien bei *emo-1* auf NAA eher tumorartig ausgebildet werden, vergleichbar mit Wildtyp, der mit 2,4-D behandelt wurde (siehe dazu Abb. 5B). Es lässt sich eine hochgradig desorganisierte Proliferation von Perizykelzellen über große Regionen der Primärwurzel erkennen. Da *emo-1* auf ein transportierbares Auxin wie der Wildtyp auf ein nicht-transportierbares Auxin reagiert, war dieses ein Hinweis darauf, dass *emo* höchstwahrscheinlich ein Problem mit dem Transport von Auxin hat.

Nach dem chemiosmotischen Modell wird der Transport von Auxin durch das Zusammenspiel zahlreicher Influx-(AUX1/LAX) und Efflux-(PIN Proteine) Carrier koordiniert (Friml und Wisniewska, 2004; Blakeslee et al., 2005; Blilou et al., 2005). Entscheidend bei diesem Transport ist die membranständige  $H^+$ -ATPase, denn sie baut, durch das stetige Pumpen von Wasserstoffionen in den apoplasmatische Raum, einen elektrochemischen Protonengradienten über die Plasmamembran auf (Jahn et al., 1997; Michelet und Boutry, 1995; Morsomme und Boutry, 2000; Palmgren, 2001; Geislera und Murphy, 2006). Dieser ist notwendig, denn durch den von der membranständigen  $H^+$ -ATPase erzeugten niedrigen pH-Wert der Zellwand, liegt Auxin außerhalb der Zelle in protonierter Form (HIAA) vor und kann durch Diffusion in die Zelle gelangen. In deprotonierter Form ( $IAA^-$ ) passiert Auxin unterstützt durch den aktiven Carrier-vermittelten Co-Transport (AUX1/LAX; Auxin-Influx-Carrier) die Membran (Overvoorde et al., 2010). In der Zelle im Cytoplasma herrscht hingegen ein neutraler pH-Wert, Auxin liegt in der deprotonierten Form ( $IAA^-$ ) vor und ist nicht mehr in der Lage, die Zelle durch Diffusion zu verlassen, erst durch die Hilfe und Aktivität der PIN Proteine ist dies möglich.

Daher wurden einige weitere Auxintransport-abhängige Prozesse in der Mutanten untersucht. Am Phänotyp der *emo* Mutanten lässt sich bereits erkennen, dass der Auxintransport in der Wurzel gestört sein muß. Denn die Mutante weist eine verkürzte, nicht strikt gravitrop wachsende Primärwurzel („wavy root“) und zudem fehlende Lateralwurzeln auf (siehe dazu Abb. 3C). Nach Gravistimulationsversuchen zeigte sich, dass *emo* unfähig ist, auf Schwerkraft und somit auf einen gravitropen Reiz zu reagieren (siehe dazu Abb. 6A und B). Um ein gravitropes Wachstum zu garantieren, ist eine asymmetrische Verteilung von Auxin in der Wurzelspitze notwendig (Müller et al., 1998; Marchant et al., 1999; Rashotte et al., 2000). Zudem ist, wie bereits erwähnt, die Bildung von Seitenwurzeln (Lateralwurzeln) nur durch die transport-abhängige Etablierung von Auxinmaxima in Perizykelzellen der Primärwurzel möglich. Somit scheint der akropetale als auch der basipetale Auxintransport in der Wurzel gestört zu sein.

Des Weiteren scheint ebenfalls ein Problem mit dem Auxintransport im Spross zu bestehen. Dies wurde daraus gefolgert, dass *emo-1* im etiolierten Zustand zum einen ein agravitropes

### 3. Ergebnisse



### 3. Ergebnisse

#### **Abb. 6: Untersuchungen physiologischer Auxintransport-abhängiger Prozesse**

**A)** Gravotropismusversuch von WT und *emo-1* Keimlingen, nach Wachstum der Keimlinge für drei Tage auf 1x MS-Medium, mit anschließendem Transfer für zwei Tage auf 1x MS-Medium mit 1 % Saccharose und 0,1 % (v/v) EtOH, danach Gravistimulation für sechs Tage/135°, weißer Pfeil zeigt Richtung der Gravistimulation an.

**B)** Auswertung des Gravotropismusversuchs von WT und *emo-1*, Auswertung mit je 30 Keimlingen; Maßstab=2 mm; Aufnahmen: Canon

**C)** Wachstum von WT und *emo-1* Keimlinge im Dunkeln für fünf Tage auf 1x MS Medium mit 1 % Saccharose und 0,1 % (v/v) EtOH (Maßstab= 1 cm; Aufnahmen: Canon).

**D)** Adventivwurzelbildung von WT und *emo* nach Entfernung der Primärwurzel. Wachstum von WT und den drei unabhängigen *emo*-Linien (*emo-1*, -2, -3) für drei Tage auf 1x MS Medium, anschließend Transfer für drei Tage auf 1x MS Medium mit 1 % Saccharose und 0,1 % (v/v) EtOH, Entfernung der Primärwurzel mit einer Schere und weiteres Wachstum für sechs Tage (Maßstab: 2mm).

**E)** Auswertung des Versuchs zur Adventivwurzelbildung (D) mit je 60 Keimlingen.

**F)** Vergrößerung des Sprossendes von WT und *emo-1* nach Entfernung der Primärwurzel. Adventivwurzeln sind durch Pfeile markiert (Aufnahmen: Fluo TM MZFLIII, Leica Microsystems GmbH/Wetzlar; Maßstab: 2mm).

Wachstum des Hypokotyls zeigt (siehe dazu Abb. 6C) und darüber hinaus keinen Plumulahaken ausbildet (siehe dazu Abb. 3G und H). Wie bereits erwähnt ist eine effiziente Auxintranslokation vom Meristem über die Kotyledonen ins Hypokotyl notwendig um eine korrekte Ausbildung des Plumulahakens zu garantieren. Zudem wurden nach chirurgischer Abtrennung der Primärwurzel keine Adventivwurzeln ausgebildet (Gutierrez et al., 2012, siehe dazu Abb. 6D, E und F). Adventivwurzeln, auch sprossbürtige Wurzeln genannt, entstehen aufgrund natürlicher oder veränderter Entwicklungsumstände (Geiss et al., 2009; Li et al., 2009), an oberirdischen Geweben. Auxin bzw. dessen Transport ist dabei ein Hauptfaktor für die Bildung dieser Wurzelform (Gutierrez et al., 2012).

Es zeigt sich also, dass sowohl der Transport vom Spross zur Wurzel (**basipetaler Auxintransport**), der Transport in der Wurzel zur Wurzelspitze (**akropetaler Auxintransport**) und der laterale Transport in der Wurzelspitze und der dazugehörige Transport der von der Wurzelspitze zur Wurzelbasis gerichtet ist (**basipetaler Auxintransport**) gestört bzw. inhibiert ist.

#### **3.1.4 RNAi von 14-3-3 Epsilon Mitgliedern interferiert mit der Auxinverteilung**

Um nun detaillierte Informationen über die Auxinverteilung in der Mutante zu erlangen, wurden Auxinreporter in die Linien eingekreuzt. Da alle drei unabhängigen *emo*-Linien quantitativ und qualitativ vergleichbar reagieren, wurden für alle weiteren Experimente und Kreuzungen als Grundlage *emo-1* verwendet. Es wurden Kreuzungen mit transgenen Pflanzen durchgeführt, die *DR5::GUS* (Ottenschläger et al., 2003) bzw. *DR5<sub>rev</sub>::GFP* (T. Lijsebettens et al., 1996) exprimieren. DR5 ist ein Promotor, der aus sieben „auxin response elements“ (AuxRE) besteht, welcher die Bindestelle für den Auxin gesteuerten Transkriptionsfaktor (auxin responsive transcription factor, ARF) ist (Ulmasov et al., 1995 und 1997). In Anwesenheit von Auxin wird Aux/IAA, ein Transkriptionsrepressor, degradiert und ARF kann die Auxin-induzierte Genexpression einleiten (Nanao et al., 2014).

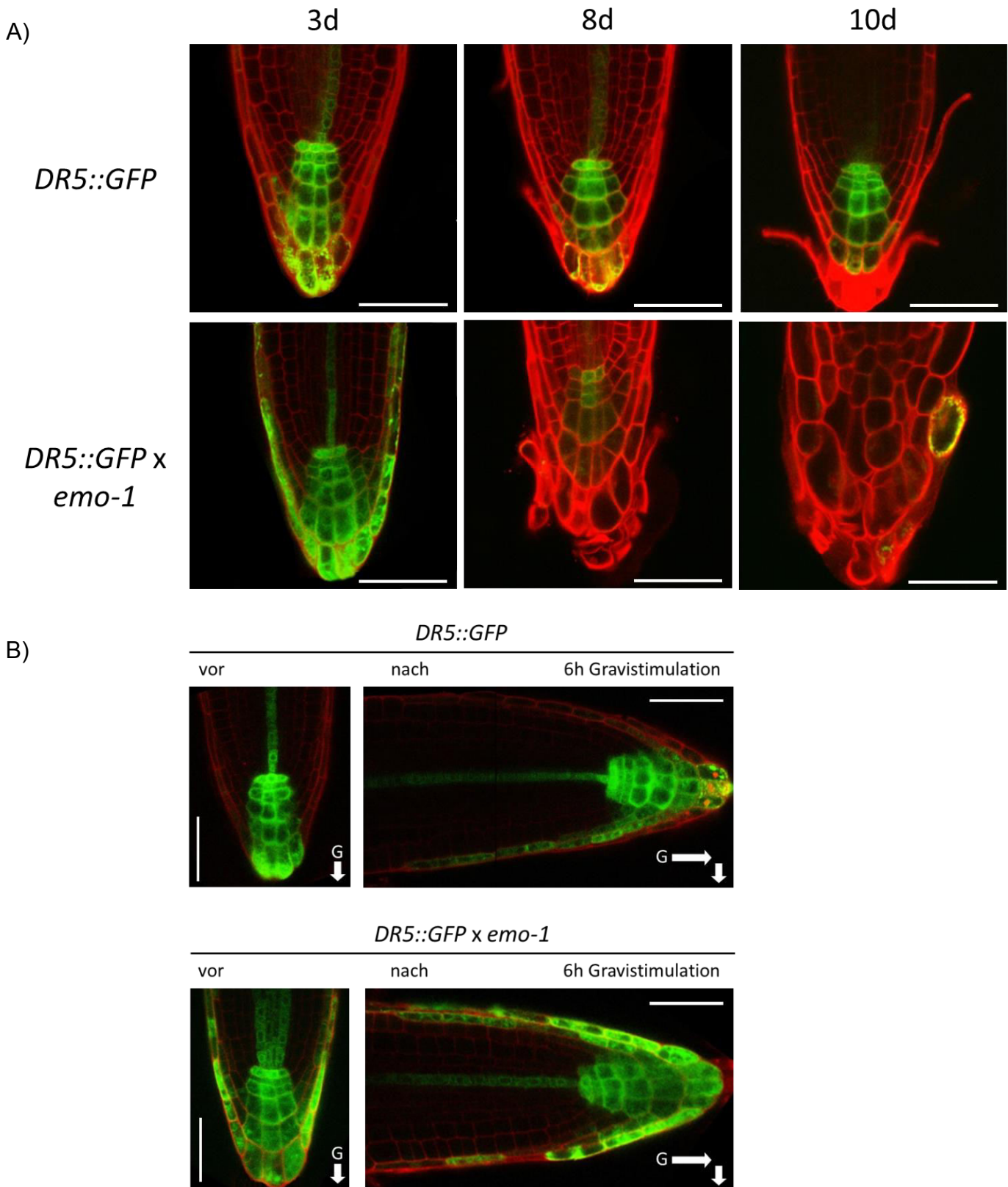
Die homozygoten transgenen Pflanzenlinien, die *DR5::GUS* bzw. *DR5<sub>rev</sub>::GFP* exprimieren wurden vom „NASC, The European *Arabidopsis* Stock Center“ erhalten. Des Weiteren wurden zu Beginn dieser Dissertation folgende Kreuzungen erhalten: Kreuzung *DR5::GUS* x *emo-1* (homozygot, Katrin Weckermann) und *DR5<sub>rev</sub>::GFP* x *emo-1* (heterozygot, Claudia Möller, während dieser Arbeit wurden jeweils drei unabhängige homozygote Linien erhalten und getestet), die jeweils homozygot für die Versuche eingesetzt wurden.

In den *DR5::GUS* Linien zeigt sich nach Ethanolbehandlung beim Wildtyp eine schwache GUS-Expression in Teilen der Kotyledonen (siehe dazu Abb. 8B1). Im Vergleich dazu weist die *emo-1* Mutante nach Ethanolbehandlung in den Kotyledonen eine starke GUS-Expression auf, die sich besonders in den Blattadern und den Hydathoden zeigt (siehe dazu Abb. 8B3). Diese hohe GUS-Aktivität in den Kotyledonen der Mutanten deutet auf eine Auxinüberproduktion hin, welches zu einer Ausbildung von epinastischen Blättern führt. Diese Effekte können auch durch NPA, einen Inhibitor für den Auxintransport (Lomax et al., 1995; Parry et al., 2001), ausgelöst werden. Durch eine Behandlung vom Wildtyp mit 1-Naphthylphthalamsäure (NPA; Lomax et al., 1995; Parry et al., 2001) konnten beide Effekte in Wildtyppflanzen reproduziert werden (siehe dazu Diplomarbeit C. Pychal).

In den *DR5<sub>rev</sub>::GFP* Linien lassen sich besonders gut die Syntheseorte von Auxin erkennen, denn GFP kann nicht wie der enzymatisch erzeugte blaue Farbstoff in den *DR5::GUS* Linien in andere Zellen diffundieren. Beim Wildtyp (*DR5<sub>rev</sub>::GFP*; siehe dazu Abb. 7A) zeigt sich nach Ethanolbehandlung eine Expression von GFP in Zellen des ruhenden Zentrums, der Kalyptra und der zentralen Wurzelhaube. Sowohl nach drei, acht als auch nach zehn Tagen bleibt dieses Expressionmuster erhalten. Bei der Mutanten (siehe dazu Abb. 7A) ist nach drei Tagen auf ethanolhaltigem Medium ähnlich wie beim Wildtyp eine Expression von GFP und somit eine Synthese von Auxin in Zellen des ruhenden Zentrums, der Kalyptra und der zentralen Wurzelhaube zu erkennen, jedoch kann man ein zusätzliches ektopisches Signal von GFP in der lateralen Wurzelhaube detektieren. Nach acht und zehn Tagen hingegen ist kaum noch eine differenzierte GFP-Expression sichtbar. Es zeigt sich eine graduelle Abnahme der GFP-Expression. Die an Auxin immer weiter verarmende Wurzelspitze führt schließlich zu einem Wurzelmeristemkollaps. Dieser Effekt der stetigen Abnahme an Auxin in der Wurzelspitze konnte anhand eines Versuchs mit radioaktivem IAA (persönliche Mitteilung C. Oecking) bestätigt werden. Bei diesem Versuch wurde mit radioaktivem Auxin (IAA) versetzte Agartröpfchen ca. 1 cm von der Wurzelspitze, an der Wurzel angebracht und nach einer bestimmten Zeit (ein, zwei und drei Tage) der Gehalt an radioaktivem IAA in der Wurzelspitze gemessen. Dabei zeigte sich, dass je länger die Mutante auf MS-Medium mit Ethanol wächst, desto mehr geht ihre Fähigkeit verloren, das radioaktive Auxin zur Wurzelspitze zu transportieren. Dies spricht dafür, dass der Transport zur Wurzelspitze nach und nach zusammenbricht. Es scheint, als würden durch den Verlust des Auxinmaximums in der Wurzelspitze die Zellen ihre Funktion verlieren, was in einem Haufen von aufgequollenen Zellen, ohne erkennbare zielgerichtete Funktion endet (Went, 1929; Thimann und Went, 1934; Petrášek und Friml, 2009; Overvoorde et al., 2010; Vernoux et al., 2010).



### 3. Ergebnisse



**Abb. 7: Untersuchungen der Auxinverteilung mit Hilfe des Auxin-responsiven Reporters *DR5<sub>rev</sub>::GFP* in Wurzelspitzen nach Langzeit- und Gravistimulationuntersuchungen**

A) *DR5<sub>rev</sub>::GFP* Expression in Wurzelspitzen von WT und *emo-1* nach drei, acht und zehn Tagen Wachstum auf ethanolhaltigem Medium. Die Anzucht von WT (*DR5<sub>rev</sub>::GFP*) und der Mutante (*DR5<sub>rev</sub>::GFP x emo-1*) erfolgte direkt auf 1x MS-Medium mit 1 % Saccharose und 0,1 % (v/v) EtOH für drei, acht und zehn Tage; (Anfärbung mit Propidiumiodid (rot), Maßstab=50 µm; Aufnahmen: Wurzelspitzen; Confocal SP2).

**B)** Einfluß einer Gravistimulation auf die DR5<sub>rev</sub>::GFP Expression von WT und *emo-1* Keimlingen. Die Anzucht von WT (DR5<sub>rev</sub>::GFP) und der Mutante (DR5<sub>rev</sub>::GFP x *emo-1*) erfolgte für vier Tage auf 1x MS-Medium mit 1 % Saccharose, anschließend Transfer für zwei Tage auf 1x MS-Medium mit 1% Saccharose und 0,1 % (v/v) EtOH, Gravistimulation für sechs Stunden/90° (weiße Pfeile: zeigen die Richtung der Gravistimulation an; Maßstab=50 µm; Aufnahmen: Wurzelspitzen, Confocal SP2).

Bei Gravistimationsversuchen zeigt sich beim Wildtyp eine asymmetrische Verteilung von Auxin in der lateralen Wurzelhaube (siehe dazu Abb. 7B). Dies garantiert ein gravitropes Wachstum (Müller et al., 1998; Marchant et al., 1999; Rashotte et al., 2000). Denn in der Wurzel wirkt Auxin in hohen Konzentrationen, im Gegensatz zum Spross, hemmend auf die Zellstreckung. Somit kommt es auf der zur Gravistimulation gerichteten Seite zu einer Ansammlung von Auxin in der lateralen Wurzelhaube. In *emo-1* hingegen ist die Gravistimulation wirkungslos auf die Auxinverteilung in der Wurzelspitze. Es lässt sich kein Unterschied in Abhängigkeit von der Gravistimulation erkennen (siehe dazu Abb. 7B), GFP ist ektopisch in der lateralen Wurzelhaube exprimiert.

Somit kann man zusammenfassend sagen, dass es durch den Verlust der Transportfähigkeit von Auxin in den *emo* Mutanten zu einer Ansammlung von Auxin in den oberirdischen Pflanzenteilen kommt. Dieses verursacht ein verlängertes Hypokotyl und epinastische Blätter im Licht, und ein verkürztes Hypokotyl ohne Plumulahaken im Dunkeln. Die Wurzel hingegen verarmt über die Dauer der Ethanolbehandlung an Auxin, was ein verkürztes Wurzelwachstum, den Verlust der Lateralwurzelbildung und schließlich den totalen Kollaps des Wurzelmeristems hervorruft. Diese Faktoren führen schließlich zum Tod des Keimlings.

Es zeigt sich also, dass *emo* eine Auxintransportmutante ist. Probleme mit der Auxinbiosynthese und der Auxinsignaltransduktion konnten als mögliche Faktoren ausgeschlossen werden. Denn die Mutante scheint zur Auxinproduktion befähigt zu sein, was sich an der hohen DR5::GUS-Expression in Kotyledonen nach Ethanolinduktion zeigt (siehe dazu Abb. 8B3). Auch scheint die Mutante noch auf Auxin zu reagieren. Dies lässt sich daran erkennen, dass die Mutante nach Zugabe von exogenem Auxin Lateralwurzeln ausbildet (Abb. 5; Diplomarbeit C. Pychal). Des Weiteren würde bei einem Problem mit der Signaltransduktion nicht zu einer DR5-abhängige Expression von GUS und GFP in der *emo-1* Mutanten kommen.

#### **3.1.5 Untersuchungen zu prominenten (putativen) 14-3-3 Zielproteinen als Ursache des *emo*-Phänotyps**

Durch die vorangehenden Versuche hat sich die These, dass *emo* eine Auxintransportmutante ist, bestätigt. Was könnte der Grund bzw. die Gründe für das Auxintransportproblem in *emo* sein? Welche direkten bzw. indirekten Interaktionspartner sind von der Reduktion der Expression der drei Isoformen betroffen? Um diese Fragestellung genauer zu erörtern, wurde damit begonnen, verschiedene Faktoren des polaren Auxintransports zu untersuchen.

### 3. Ergebnisse

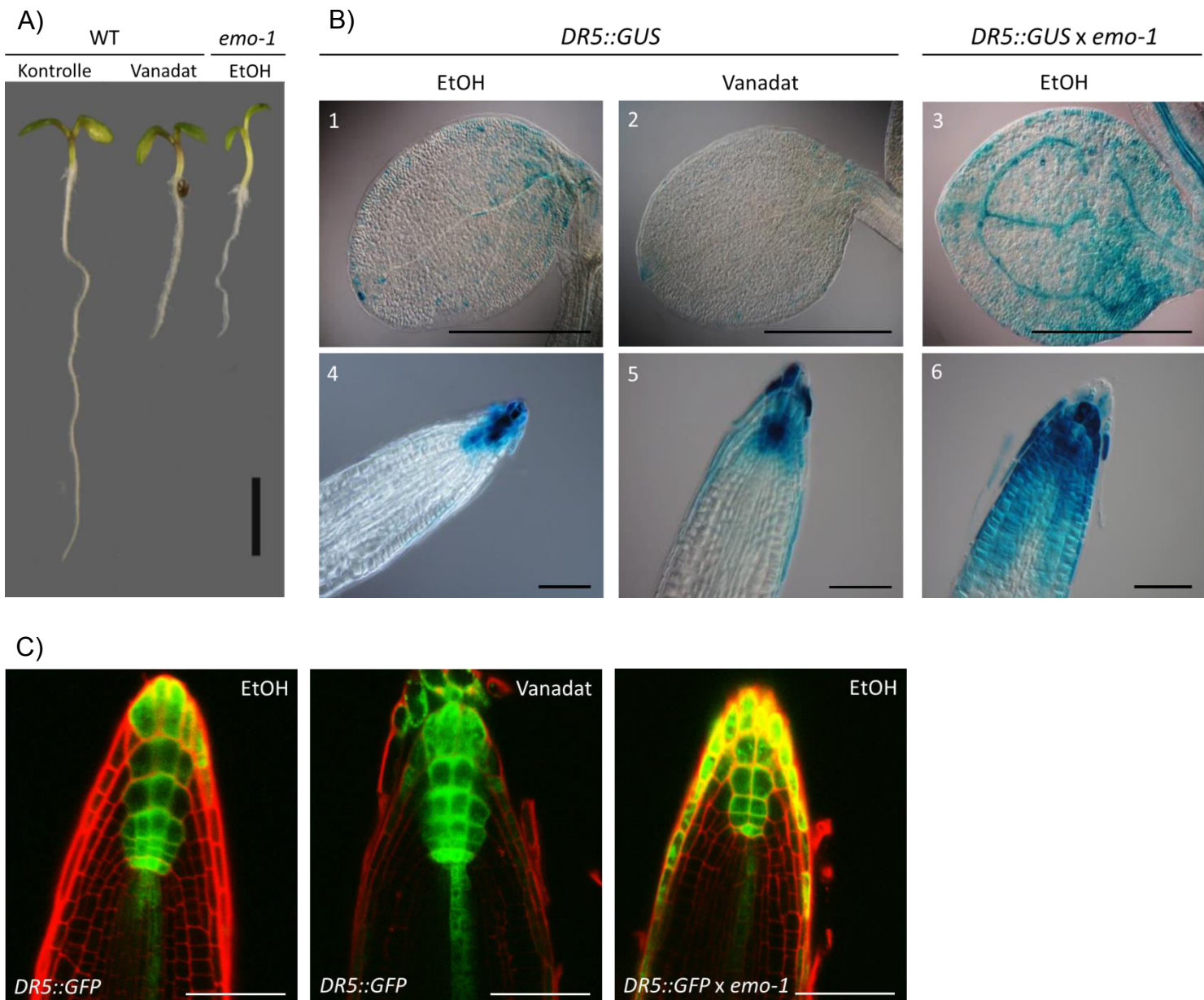
#### **3.1.5.1 Untersuchungen zur plasmamembranständigen H<sup>+</sup>-ATPase**

Die bereits genannte „chemiosmotische Hypothese“ des polaren Auxintransports (Rubery und Sheldrake, 1974; Goldsmith 1977,) besagt, dass ein elektrochemischer Protonengradient über der Plasmamembran notwendig ist, um Auxin mithilfe von AUX1 in die Zelle zu transportieren. Somit ist eine funktionale membranständige H<sup>+</sup>-ATPase notwendig, um den Gradienten aufrecht zu erhalten und Auxin effektiv in die Zelle zu transportieren.

Die Aktivität dieser P-Typ H<sup>+</sup>-ATPase wird effektiv reguliert eine Assoziation von 14-3-3 Proteinen führt zur Aktivierung des Enzyms (Fuglsang et al., 1999; Svannelid et al., 1999; Maudoux et al., 2000; Jelich-Ottmann et al., 2001; Palmgren et al., 2001; Borch et al., 2002). In *Arabidopsis* gibt es 11 verschiedene H<sup>+</sup>-ATPasen (AHA, für *Arabidopsis* H<sup>+</sup>-ATPase; Baxter et al., 2003), die jeweils etwa eine molekulare Masse von ca. 100 kDa aufweisen (Sussman, 1994). AHA1 und AHA2 sind dabei die vorherrschenden Isoformen, zudem konnte nachgewiesen werden, dass der Verlust beider („double-loss of function“ Mutanten) embryolethal wirkt (Haruta et al., 2010). Der C-Terminus umfaßt etwa 100 Aminosäuren und fungiert als Autoinhibitorregion (Palmgren et al., 1990, 1991; Palmgren, 2001; Banks et al., 2011). In *Arabidopsis* erfolgt die Aktivierung dieser Pumpe durch eine phosphorylierungsabhängige 14-3-3 Assoziation an die C-terminale Autoinhibitorregion (Fuglsang et al., 1999; Svannelid et al., 1999; Maudoux et al., 2000; Palmgren et al., 2001; Borch et al., 2002;). Daher wurde mit pharmakologischen und genetischen Methoden überprüft, ob eine reduzierte ATPase Aktivität ursächlich für den Phänotyp der *emo* Mutanten ist.

Vanadat inhibiert in höheren Konzentrationen P-Typ-ATPasen (Chatterjee et al., 1992; Hicks & Parsons, 1992; Xu et al., 2013). Die Hemmwirkung von Vanadat erfolgt durch Konkurrenz mit Phosphat (Mimikry) an der ATP-Phosphorylierungsstelle, einem konservierten Aspartatrest der ATPase (Bowman et al., 1979). Daher wurde überprüft, ob der *emo*-Phänotyp durch eine Behandlung des Wildtyps mit Vanadat mimikriert werden kann. Dies resultiert in einer signifikanten Reduktion des Primärwurzelwachstums bei gleichzeitiger verstärkter Ausbildung von Wurzelhaaren (siehe dazu Abb. 8A). Die Kotyledonen sowie das Hypokotyl sind im Vergleich zur Kontrolle unverändert. Im Vergleich dazu weist *emo-1* (siehe dazu Abb. 8A) auf MS-Medium mit Ethanol ein verlängertes Hypokotyl und epinastische Blätter auf. Die Wurzellänge von *emo-1* und dem Vanadatbehandelten Wildtyp sind vergleichbar.

Beim Auxin-induzierten GUS-Assay (siehe dazu Abb. 8B) zeigt sich nach Ethanolbehandlung beim Wildtyp (Kontrolle) eine schwache GUS-Expression in Teilen der Kotyledonen. Zudem zeigt sich in der Wurzelspitze eine Färbung vom ruhenden Zentrum, der Kalyptra und der zentralen Wurzelhaube, die bis in Teile der lateralen Wurzelhaube reicht. Bei den mit Vanadat behandelten Wildtyp kann ebenfalls kaum eine GUS-Expression in den Kotyledonen detektiert werden. Die Wurzelspitze zeigt genauso wie der Wildtyp eine Anfärbung des ruhenden Zentrums, der Kalyptra, der zentralen Wurzelhaube, die ebenfalls bis in Teile der lateralen Wurzelhaube reichen. Demgegenüber weisen große Teile der Kotyledonen bei *emo-1* (*DR5::GUS* x *emo-1*) eine starke GUS-Aktivität auf, besonders die Blattadern und Hydathoden zeigen eine starke Färbung. Auch die Wurzelspitze zeigt eine hohe GUS-Expression und zeugt somit von einem hohen Auxingehalt. Erst im Übergang von der meristematischen Zone zur Streckungszone nimmt die GUS-Färbung ab.



**Abb. 8: Vanadatbehandlungen des Wildtyps phänotypieren die *emo* Charakteristika nur partiell**

**A)** Einfluß von Vanadat auf das Wachstum von WT und *emo-1* nach Anzucht für drei Tage auf 1x MS-Medium mit 1 % Saccharose, anschließend Transfer für zwei Tage auf 1x MS-Medium + 1% Saccharose +/-250 μM Vanadat bzw. 0,1 % (v/v) EtOH; Maßstab=1 cm; Aufnahmen: Canon). Der Wildtyp (Mitte) zeigt nach Behandlung mit Vanadat, im Vergleich zum Wildtyp (links) ohne Behandlung ein verkürztes Wurzelwachstum, ähnlich dem von *emo-1* (rechts) auf 1x MS-Medium mit EtOH, jedoch zeigt der WT auf Vanadat keine epinastischen Blätter oder ein verlängertes Hypokotyl.

**B)** Einfluß von Vanadat auf die Expression von *DR5::GUS* in Kotyledonen und Wurzelspitzen. Anzucht von WT und *emo-1* erfolgte für drei Tage auf 1x MS-Medium mit 1 % Saccharose, dann Transfer für zwei Tage auf 1x MS-Medium + 1% Saccharose +/- 250 μM Vanadat bzw. 0,1 % (v/v) EtOH mit anschließender GUS-Assay und Clearing, siehe dazu Material und Methoden; Aufnahmen: DIK-Mikroskop; Kotyledonen (B1-3, Maßstab=5 mm) und Wurzelspitzen (B4-6, Maßstab=50 μm).

**C)** Einfluß von Vanadat auf die Expression von *DR5<sub>rev</sub>::GFP* in Kotyledonen und Wurzelspitzen. Anzucht von WT (*DR5<sub>rev</sub>::GFP*) und *emo-1* (*DR5<sub>rev</sub>::GFP x emo-1*) erfolgte für drei Tage auf 1x MS-Medium + 1% Saccharose, dann Transfer für zwei Tage auf 1x MS-Medium + 1% Saccharose +/- 250 μM Vanadat bzw. 0,1 % (v/v) EtOH; Maßstab=50 μm; Aufnahmen: Wurzelspitzen, Confocal SP2.

### 3. Ergebnisse

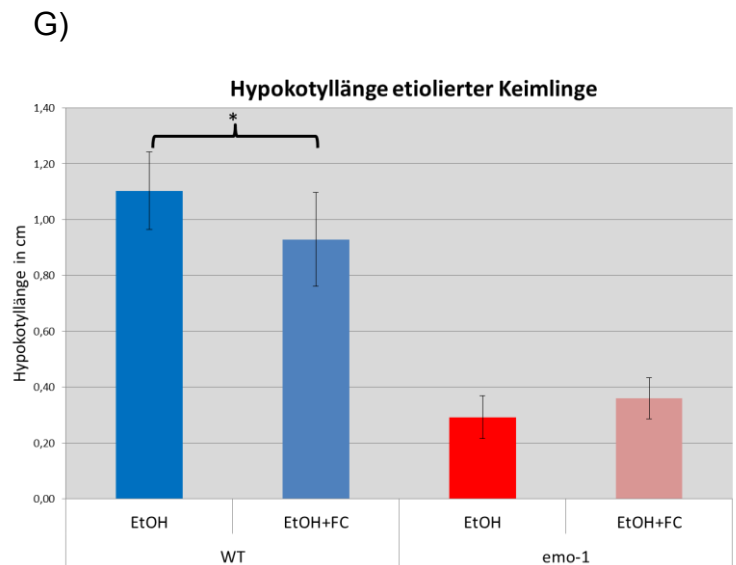
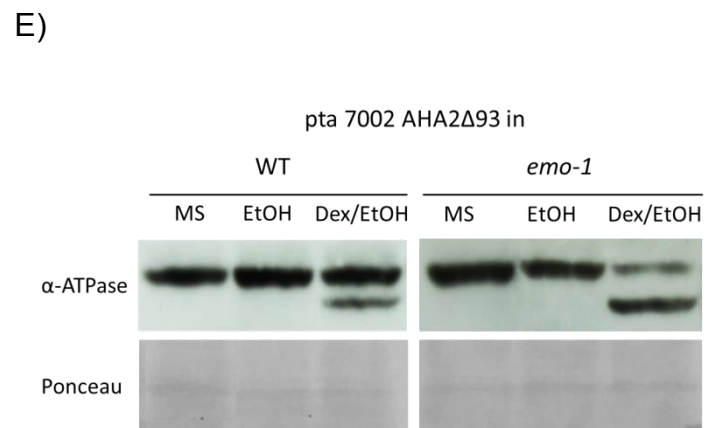
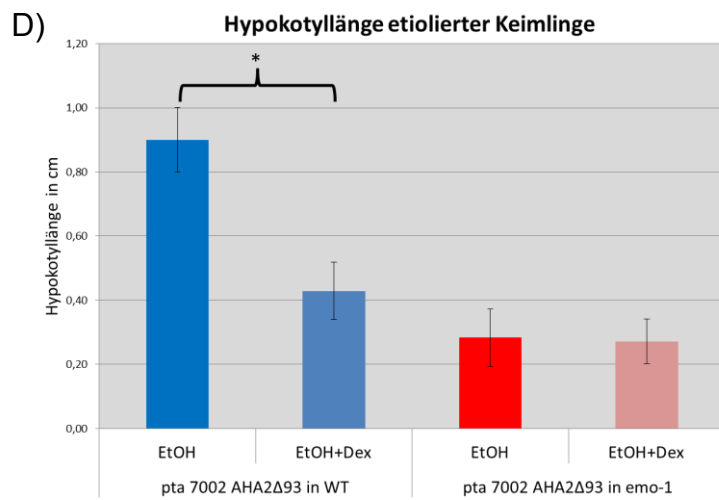
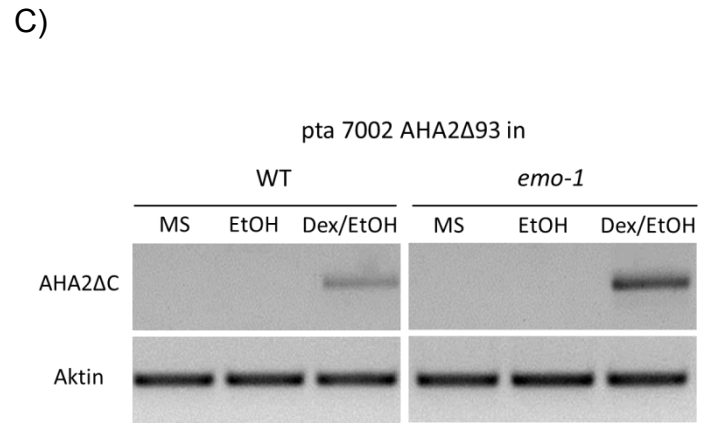
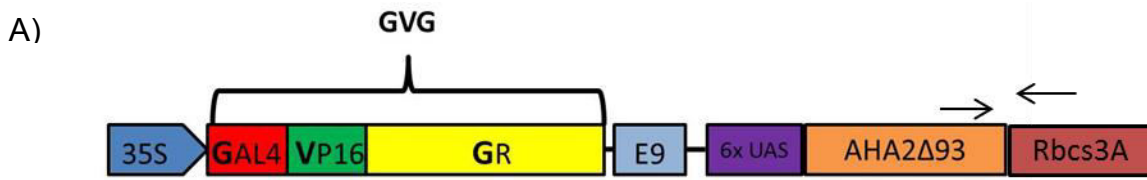
Bei den *DR5<sub>rev</sub>::GFP*-Linien (siehe dazu Abb. 8C) weisen sowohl Wildtyp (*DR5<sub>rev</sub>::GFP*), als auch der mit Vanadat behandelte Wildtyp, eine GFP-Expression und somit die Anwesenheit von Auxin im ruhenden Zentrum, der Kalyptra, der zentralen Wurzelhaube und Teile des Leitbündels auf. *Emo-1* (*DR5<sub>rev</sub>::GFP* x *emo-1*) zeigt zusätzlich ein ektopisches Signal in der lateralen Wurzelhaube. Dieses ist bei dem mit Vanadat behandelten Wildtyp nicht zu detektieren.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass man durch Vanadat beim Wildtyp zwar das Wurzelwachstum hemmen kann, jedoch wiesen die Kotyledonen und das Hypokotyl keine sichtbaren Veränderungen auf. Untersuchungen der *DR5::GUS* Linien lassen nur geringfügige Übereinstimmungen erkennen, wie beispielsweise die Expression von GUS in der lateralen Wurzelhaube. Dennoch zeigt Vanadat keinen wesentlichen Effekt auf die Kotyledonen beim Wildtyp, die bei *emo-1* nach Ethanolbehandlung eine hohe GUS-Aktivität aufweisen und somit von hohem Auxingehalt zeugen. Es muß jedoch bedacht werden, dass bei der GUS-Färbung der enzymatisch erzeugte blaue Farbstoff nicht auf einzelne Zellen begrenzt ist, sondern in andere Zellen diffundieren kann, was einen „GUS assay“, hinsichtlich genauer Bestimmung von Zelltypen, etwas problematisch macht. In den *DR5<sub>rev</sub>::GFP* Linien konnten keine Unterschiede zwischen Wildtyp bei An- oder Abwesenheit von Vanadat festgestellt werden. Somit ist abschließend zu sagen, dass durch die Hemmung der H<sup>+</sup>-ATPase im Wildtyp der *emo*-Phänotyp und alle übrigen Effekte nicht oder nur bedingt imitiert werden konnten.

Da nicht sicher war, ob die Pflanzen Vanadat wirklich effizient aufnehmen können, wurde zudem eine konstitutiv-aktive H<sup>+</sup>-ATPase in *emo-1* Mutanten eingebracht, um zu untersuchen, ob der Phänotyp komplementiert werden kann. Dazu wurde ein Dexamethason-induzierbares System verwendet (siehe dazu Abb. 9A), da eine konstitutive Expression einer konstitutiv-aktiven membranständigen H<sup>+</sup>-ATPase letal ist (de Boer, 1997). Die hier verwendete Form der H<sup>+</sup>-ATPase (AHA2) wurde um die C-terminale Autoinhibitor-domäne deletiert ( $\Delta 93$ ) und sollte somit unabhängig von 14-3-3 Proteinen aktiv sein (Gévaudant et al., 2007). Mittels RT-PCR (Abb. 9C) konnte gezeigt werden, dass die C-terminal verkürzte Form von AHA2 in Anwesenheit von Dexamethason sowohl im Wildtyp als auch in *emo-1*, exprimiert wird.

Im etiolierten Zustand (siehe dazu Abb. 9B) weist der Wildtyp sowohl in Ab- als auch Abwesenheit von Ethanol ein langes Hypokotyl und einen Plumulahaken auf. Die Expression der konstitutiv-aktiven H<sup>+</sup>-ATPase hat erstaunlicherweise eine Verkürzung des Hypokotyls und eine Öffnung der Kotyledonen zur Folge (keine Plumulahaken). Der Ethanolinduzierte Phänotyp der *emo-1* Mutanten ändert sich bei gleichzeitiger Dexamethasongabe nicht (siehe dazu Abb. 9B und D).

Um nachzuweisen, dass die C-terminal deletierte Version von AHA2 exprimiert wird und stabil ist, wurden mikrosomale Membranen aus sieben Tage alten Keimlingen präpariert. Immundetektionen (Abb. 9E) machen deutlich, dass sowohl beim Wildtyp als auch bei *emo-1*



### 3. Ergebnisse

#### **Abb. 9: Dexamethasoninduzierbare Expression einer konstitutiv-aktiven membranständigen H<sup>+</sup>-ATPase komplementiert den *emo-1* Phänotyp nicht**

**A)** Schematische Darstellung des Dexamethasoninduzierbaren Vektors pta 7002 AHA2Δ93, GVG wird bei Anwesenheit von Dexamethason in den Nukleus transportiert und induziert durch Assoziation mit dem Promotor 6x UAS die Transkription der konstitutiv-aktiven membranständigen H<sup>+</sup>-ATPase (AHA2Δ93).

GVG: DNA-Bindedomäne des Hefetranskriptionsfaktors GAL4; VP16: transaktive Domäne des Herpesvirus, GR: Rezeptordomäne des Glucocorticoidrezeptors aus Ratten; schwarze Pfeile zeigen den Sitz der Primerkombination an, die für den spezifischen Nachweis des AHA2Δ93 Transkripts verwendet wurde.

**B)** Einfluß einer konstitutiv-aktiven membranständigen H<sup>+</sup>-ATPase auf das Wachstum etiolierter WT und *emo-1* Keimlinge. Anzucht von WT und *emo-1* im Dunkeln für vier Tage auf 1x MS-Medium ohne oder versetzt mit 0,1 % (v/v) EtOH +/- 10 µM Dexamethason; Maßstab= 2 mm; Aufnahmen: etiolierte Keimlinge, Canon. Der Wildtyp (pta 7002 AHA2Δ93 in WT) mit einer konstitutiv-aktiven H<sup>+</sup>-ATPase zeigt geöffnete Kotyledonen und ein verkürztes Hypokotyl, im Gegensatz dazu, weist die Mutante (pta 7002 AHA2Δ93 in *emo-1*) keine signifikanten Unterschiede im Phänotyp zum Ethanolbehandelten Keimling auf.

**C)** Semiquantitative RT-PCR des AHA2Δ93 Transkripts in WT (pta 7002 AHA2Δ93 in WT) und *emo-1* (pta 7002 AHA2Δ93 in *emo-1*) (Anzucht siehe B).

**D)** Hypokotyllängenmessung etiolierter Keimlinge von Wildtyp (pta 7002 AHAΔ93 in WT) und der Mutanten (pta AHAΔ93 in *emo-1*). Unter Dexamethasonbehandlung (Dex+EtOH) ist beim WT das Hypokotyl signifikant verkürzt ( $p=5,21818E-26$ , n= 30 Keimlinge; Anzucht siehe B)

**E)** Immundetektionen in mikrosomalen Membranen von Wildtyp (pta 7002 AHA2Δ93) und der Mutanten (pta 7002 AHA2Δ93 in *emo-1*) mit α-ATPase Antikörper (AG Oecking). Die Anzucht erfolgte für vier Tage auf 1x MS-Medium, anschließend Transfer für drei Tage auf 1x MS-Medium ohne/oder mit 0,1 % (v/v) EtOH +/- 10 µM Dexamethason (C-terminal verkürzten Form von AHA2 bei ca. 90 kDa, die native Form von AHA2 liegt bei ca. 100 kDa. (Klonierung: Dr. Nina Jaspert).

**F)** Einfluß von Fusicoccin auf das Wachstum etiolierter Keimlinge von Wildtyp und *emo-1*. Phänotyp von WT und *emo-1* nach Anzucht im Dunkeln für vier Tage auf 1x MS-Medium mit 1 % Saccharose, ohne oder mit 0,1 (v/v) % EtOH +/- 5 µM Fusicoccin (Maßstab=2 mm; Aufnahmen: etiolierte Keimlinge, Canon).

**G)** Hypokotyllängenmessung etiolierter Keimlinge unter dem Einfluß von Fusicoccin. Der Wildtyp zeigt unter Fusicoccinbehandlung (EtOH+FC) eine signifikante Verkürzung ( $p=0,00029$ ) des Hypokotyls im Dunkeln, im Gegensatz zur Mutanten (n= 30 Keimlinge; Anzucht siehe F).

die native Form der membranständigen H<sup>+</sup>-ATPase bei ca. 100 kDa nachweisbar ist. In Mikrosomen Dexamethasonbehandelter Keimlinge ist die verkürzte Form der membranständigen H<sup>+</sup>-ATPase, die konstitutiv-aktive Form, bei ca. 90 kDa eindeutig immunologisch detektierbar. Die Expression ist in der *emo-1* Mutante deutlich höher als im Wildtyp. Die gleichzeitige Reduktion der Vollängen H<sup>+</sup>-ATPase in Mikrosomen von *emo-1* konnte nur bei gleichzeitiger Gabe von Dexamethason und Ethanol beobachtet werden, so dass die Vermutung nahe liegt, dass diese Reduktion Folge der starken Expression der konstitutiv-aktiven Form ist.

Zusammenfassend weisen diese Analysen darauf hin, dass die Expression einer konstitutiv-aktiven H<sup>+</sup>-ATPase den *emo-1* Phänotyp nicht komplementieren kann, demnach scheint dieser Phänotyp nicht auf eine 14-3-3 bedingte Reduktion der H<sup>+</sup>-ATPase Aktivität zu beruhen.

Die Auswirkungen der Expression einer konstitutiv-aktiven H<sup>+</sup>-ATPase waren erstaunlich und entsprachen nicht den Erwartungen auf das Wachstum etiolierter Wildtypkeimlinge (verkürztes Hypokotyl, geöffnete Kotyledonen, kein Plumulahaken). Um zu überprüfen, ob diese Effekte tatsächlich auf eine Aktivierung des Enzyms zurückzuführen sind, wurde daher das Pilztoxin Fusicoccin verwendet. Fusicoccin stabilisiert die phosphorylierungsabhängige Interaktion von der H<sup>+</sup>-ATPase und 14-3-3 Proteinen und führt somit 14-3-3 abhängig zu einer nahezu irreversiblen Aktivierung der Protonenpumpe (Ballio et al., 1964; Aducci et al., 1995). Unter Verwendung von Fusicoccin (siehe dazu Abb. 9F), zeigen sowohl Wildtyp als auch *emo-1* die gleichen Phänotypen wie die transgenen *pta7002* *AHA2Δ93* Linien unter Dexamethasongabe. Fusicoccin induziert ebenfalls ein signifikant verkürztes Hypokotyl und geöffnete Kotyledonen (kein Plumulahaken) im Wildtyp und hat keine signifikanten Veränderungen des Phänotyps bei der *emo-1* Mutante zur Folge (siehe dazu Abb. 9F und G). Demzufolge muß davon ausgegangen werden, dass die Dexamethasonabhängige Expression der C-terminal deletierten H<sup>+</sup>-ATPase tatsächlich eine Aktivitätssteigerung zur Folge hat. Es gibt somit keine Rettung der *emo-1* Mutante, durch die Expression einer konstitutiv-aktiven H<sup>+</sup>-ATPase. Demzufolge ist eine Inaktivierung des Enzyms nicht ursächlich für den *emo-1* Phänotyp.

### **3.1.5.2 Untersuchungen zur Interaktion von PIN2 mit 14-3-3 Isoformen**

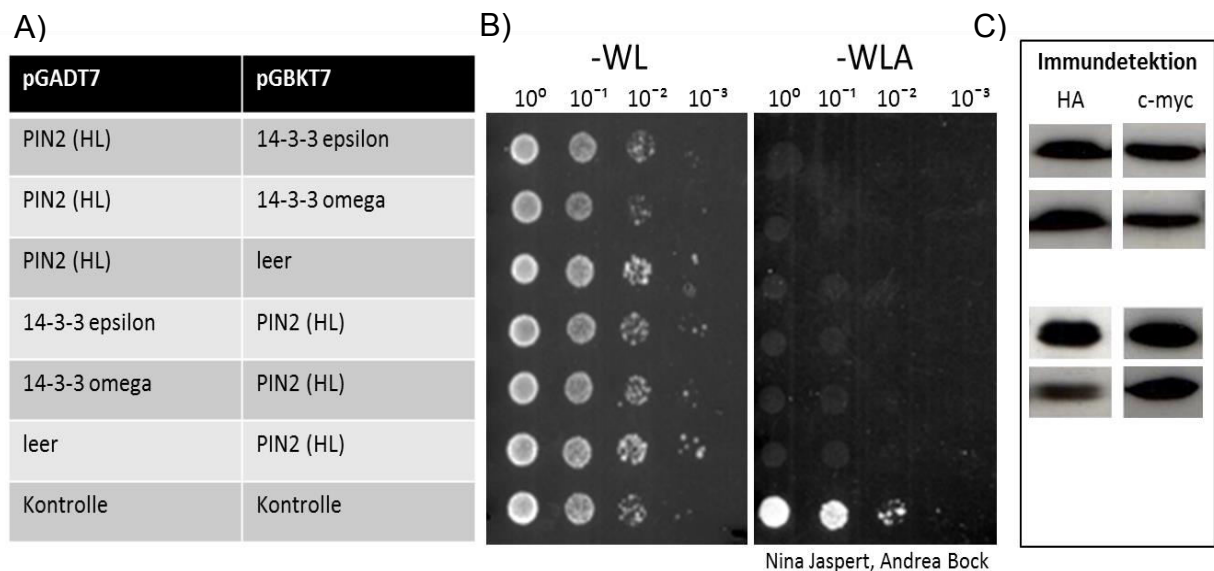
Die vorangegangenen Versuche haben deutlich gemacht, dass der reduzierte Auxintransport in den *emo*-Mutanten nicht auf die H<sup>+</sup>-ATPase als das bedeutende und maßgebliche 14-3-3 Zielprotein zurückzuführen werden kann. Ein mögliches ursächliches Zielprotein drängt sich förmlich auf. Sogenannte PIN Proteine sind Auxin-Efflux Carrier, die unter der Voraussetzung einer Plasmamembranlokalisation für den Transport von Auxin aus der Zelle verantwortlich sind. Da sie selbst eine subzelluläre Polarität aufweisen, wird so die Polarität des Auxinflusses festgelegt. Plasmamembranständige PIN Proteine (PIN1-4, PIN6-7; Petrásek et al., 2006; Wisniewska et al., 2006) zeichnen sich durch zwei transmembrane Domänen mit jeweils fünf transmembranen Regionen aus, welche durch einen zentralen hydrophilen Loop getrennt werden. Der hydrophile Loop ist im Cytosol lokalisiert (Petrásek et al., 2006; Wisniewska et al., 2006). Dieser wird von PINOID und verwandten Kinasen *in vitro* und in Protoplasten an mehreren Serinresten (Dhonukshe et al., 2010; Huang et al., 2010; Zhang et al., 2010) phosphoryliert (Michniewicz et al., 2007). Diese Phosphorylierungen haben Einfluß auf die subzelluläre Polarität der PIN Proteine (Michniewicz et al., 2007). Demzufolge wären PIN Proteine perfekte Zielproteine für 14-3-3 Proteine. Um eine mögliche Interaktion zwischen 14-3-3 und PIN Proteinen zu prüfen, wurde das Hefe-Zwei-Hybrid-System und die ratiometrische bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (rBiFC) angewendet. Dazu wurden zwei Isoformen der 14-3-3 Proteinfamilie ausgewählt, ein Vertreter der Epsilon Gruppe (epsilon) und ein Vertreter der Non-Epsilon Gruppe (omega). Des Weiteren wurde der hydrophile Loop von PIN2 (PIN-HL; ca. 30 kDa) gewählt, da dieser löslich ist und ein „tagging“ von N- und C-Terminus im Rahmen des rBiFCs nicht erfolversprechend ist, da beide Termini höchstwahrscheinlich im Apoplasten lokalisieren (Müller et al., 1998; Ganguly



### 3. Ergebnisse

et al., 2012). Beide Methoden wurden bereits erfolgreich zur Analyse von Interaktionen des PIN-HL eingesetzt (Křeček et al., 2009; Ganguly et al., 2012 und 2014).

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System (Y2H) ist eine der gängigsten Methoden zur Detektion von Protein-Protein Interaktionen (Fields und Song, 1989; Li und Herskowitz, 1993) und beruht auf der funktionellen Rekonstitution des GAL4-Transkriptionsfaktors. Dieser induziert die Expression eines definierten Reportergens, das im Falle des von uns verwendeten Hefestamms, eine Adenin-Prototrophie vermittelt. Die in Abbildung 10 gezeigte Immundetektion macht deutlich, dass sowohl PIN2-HL als auch die 14-3-3 Isoformen in den transformierten Hefen exprimiert werden. Eine Interaktion derselben kann jedoch aufgrund der nicht vorhandenen Adenin-Prototrophie der Hefe nicht nachgewiesen werden. Jedoch ist zu bedenken, dass dies auch ein falsch negatives Ergebnis sein könnte, denn die Interaktionsanalyse findet zum einen im Zellkern und zum anderen in einem anderen Organismus statt, somit könnte es möglich sein, dass sich die Proteine in dem veränderten Milieu anders falten



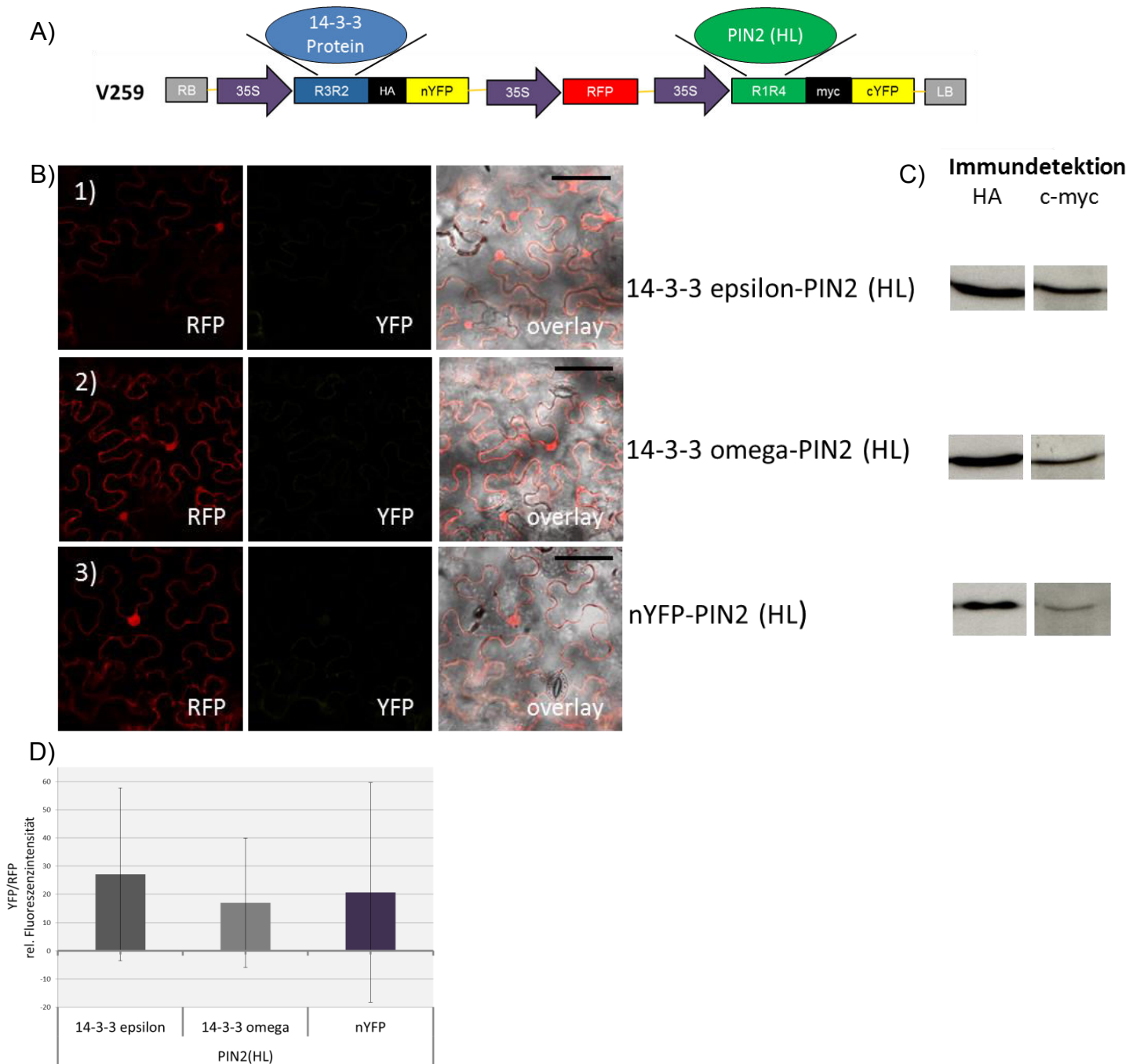
**Abb. 10: Hefe-Zwei-Hybrid-System (Y2H) zur Analyse einer möglichen Interaktion zwischen dem hydrophilen Loop von PIN2 (PIN2 (HL)) und den 14-3-3 Proteinen epsilon bzw. omega**

**A)** Tabellarische Aufstellung der Fusionsproteine: 14-3-3 epsilon, 14-3-3 omicron und PIN2 (HL) in den *S. cerevisiae* Vektoren pGADT7 und pGBKT7.

**B)** pGBKT7 und pGADT7 sind Hefevektoren, die für eine GAL4-AD (Aktivierungsdomäne) und eine GAL4-BD (Bindedomäne) kodieren. Die Interaktion zwischen FT und FD dient als Positivkontrolle. Hefezellen, die beide Plasmide tragen, wurden auf Selektionsmedium SD/-Tryptophan-Leucin (-WL) angezogen. Ein Wachstum auf SD/-Tryptophan-Leucin-Adenin (-WLA) ist nur möglich, wenn die beide Fusionsproteine (siehe A) miteinander interagieren. Die leeren Vektoren pGDKT7 und pGADT7 dienten als Negativkontrolle.

**C)** Immundetektion von PIN (HL) und den 14-3-3 Proteinen isoliert aus *S. cerevisiae* Zellen mit den Antikörpern HA (pGADT7; Roche, Mannheim) und c-myc (pGBKT7; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf).

(PIN2 (HL): hydrophiler Loop des PIN2 Proteins; Klonierung: C. Oecking; Hefetrafo und Tropftest: Andrea Bock)



**Abb. 11: Ratiometrische bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (rBiFC) zeigt keine Interaktion zwischen PIN (HL) und 14-3-3 Proteinen**

**A)** Schematische Darstellung des V259 Vektors mit den 14-3-3 Isoformen und dem PIN2-HL in den Klonierungskassetten. RB/LB, rechte/linke Grenze der T-DNA; R3R2, besteht aus der attR3 und der attR2 site; R1R4, besteht aus attR1 und attR4 site. Der Vektor verfügt zusätzlich über mRFP als Expressions- und Transformationskontrolle.

**B)** Epidermiszellen infiltrierter *N. benthamiana* Blätter, zwei Tage nach Infiltration mit Agrobakterien. Als Expressions- und Transformationskontrolle dient mRFP (Maßstab= 50 µm, Aufnahmen: Confocal SP8).

**C)** Immundetektion von PIN (HL) und den 14-3-3 Proteinen isoliert aus infiltrierten *N. benthamiana* Blattproben mit den Antikörpern HA (Roche, Mannheim) und c-myc (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Schnellendorf).

**D)** Relative Fluoreszenzintensität (%) (YFP/RFP), der Proben 14-3-3 epsilon-PIN2(HL), 14-3-3 omega-PIN2 (HL) und nYFP-PIN2(HL). Die Messungen der relativen Fluoreszenz wurden mit ImageJ durchgeführt (Daten sind Mittelwerte +/- Std von 30 Bildern, die von drei verschiedenen Blattoberflächenproben stammen und für jeden Versuchsansatz zufällig ausgewählt wurden. Erhaltene Werte sind nicht signifikant).

### 3. Ergebnisse

oder, dass die posttranslationalen Modifikationen der Hefe sich teilweise von *Arabidopsis* unterscheiden. Da es sich hier um ein „heterologes“ System handelt, wurde zusätzlich eine „in planta“ Interaktionsanalyse, die ratiometrische bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (rBiFC), durchgeführt.

Die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) ist eine *in vivo* Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen. Das Verfahren basiert auf der Komplementation zweier nicht fluoreszierender Fragmente eines fluoreszierenden Proteins, wie beispielsweise des hier verwendeten gelb fluoreszierenden Proteins (YFP). Durch Zusammenlagerung der beiden Fragmente wird ein intakter, fluoreszierender Komplex erzeugt (Hu et al., 2002; Walter et al., 2004). Der Vorteil der hier verwendeten Methode der „ratiometrischen Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (rBiFC)“ (Grefen und Blatt, 2012) gegenüber den konventionellen BiFCs ist, dass beide Interaktionspartner auf einem Vektor kodiert werden (2in1 System). Des Weiteren ist mRFP als Expressions- und Transformationskontrolle kodiert. Der Hauptvorteil ist jedoch die Möglichkeit der quantitativen Auswertung der BiFC-Daten. So können die Fluoreszenzintensitäten beider Fluorophore (mRFP und YFP), ins Verhältnis gesetzt werden und diese ratiometrische Messung erlaubt die Diskriminierung falsch positiver und eindeutig positiven Interaktome. Zusätzlich befinden sich c-myc und HA Epitope an den YFP-Hälften und ermöglichen eine Verifikation der Proteinexpression über Immundetektionen.

Die in Abbildung 11 gezeigte Immundetektion macht deutlich, dass sowohl PIN2-HL als auch die 14-3-3 Isoform in den transformierten Tabakblättern exprimiert werden, eine Interaktion derselben kann jedoch ausgeschlossen werden, denn die Auswertung der relativen Fluoreszenzintensität zeigt, dass sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Negativkontrolle und den eigentlichen Proben ergeben.

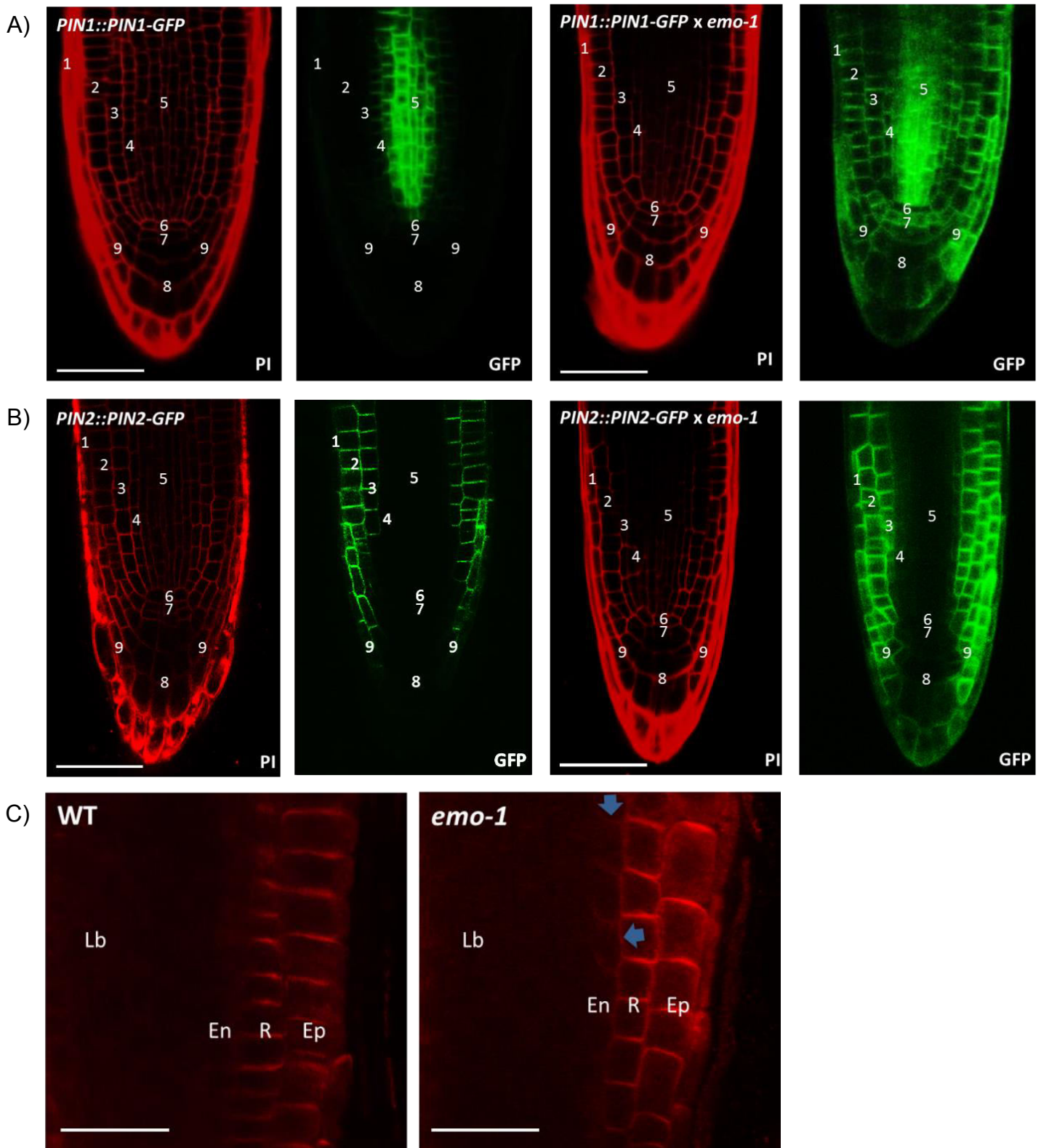
Es ist festzuhalten, dass sowohl im Hefe-Zwei-Hybridsystem als auch bei der ratiometrischen bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (rBiFC) keine Interaktion zwischen den beiden Komponenten festgestellt werden konnte.

#### **3.1.6 RNAi von 14-3-3 Epsilon Mitgliedern interferiert mit der Expression und der Abundanz von PIN Proteinen**

Zur weiteren Untersuchungen von PIN Proteinen, insbesondere ihrer subzellulären Lokalisation wurde *emo-1* mit verschiedenen *PIN::PIN-GFP* Linien gekreuzt. Zu Beginn dieser Arbeit wurden Samen von Kreuzungen zwischen *emo-1* und drei verschiedenen Linien erhalten, darunter: *PIN1::PIN1-GFP* (Benkova et al., 2003), *PIN2::PIN2-GFP* (Xu, J. und Scheres, 2005; AG Jürgens, Tübingen) und *PIN7::PIN7-GFP* (Vietsen et al., 2005; AG Jürgens, Tübingen). Im Laufe dieser Arbeit wurden von jeder Kreuzung jeweils drei unabhängige homozygote Linien generiert und analysiert.

##### **3.1.6.1 Untersuchungen zur Expression von PIN Proteinen in Wildtyp und *emo-1***

Da die membranständige H<sup>+</sup>-ATPase nicht die Ursache für den gestörten Auxintransport in *emo-1* ist und auch keine direkte Interaktion zwischen 14-3-3 und PIN-Proteinen detektiert



**Abb. 12: Expression der Auxin-Efflux Carrier PIN1 und PIN2 in WT und *emo-1***

Expression von *PIN::PIN-GFP* in vier Tage alten Keimlingen von **A)** Wildtyp (*PIN1::PIN1-GFP*) und der Mutante (*PIN1::PIN1-GFP x emo-1*) bzw. **B)** Wildtyp (*PIN2::PIN2-GFP*) und der Mutante (*PIN2::PIN2-GFP x emo-1*), die direkt auf 1x MS-Medium mit 1 % Saccharose und 0,1 (v/v) % EtOH angezogen wurden.

(laterale Wurzelhaube (1), Epidermiszellen (2), Rindenzellen (3), Endodermis (4), Leitbündel (5), ruhendes Zentrum (6), Kalyptra (7), zentralen Wurzelhaube (8), distalen Wurzelhaube (9); PI= Propidiumiodid, Maßstab=50  $\mu$ m; Aufnahmen: Wurzelspitzen, Confocal SP2)

### 3. Ergebnisse

**C)** Immunlokalisation von PIN2 in sieben Tage alten Wildtyp und *emo-1* Keimlingen. Die Keimlinge wurden vier Tage auf 1x MS-Medium mit 1 % Saccharose angezogen und anschließend für zwei Tage auf 1x MS-Medium mit 1 % Saccharose und 0,1 % (v/v) EtOH transferiert. Beim Wildtyp zeigt sich eine apikale Lokalisation von PIN2 in Epidermiszellen und eine basale Lokalisation von PIN2 in Rindenzellen. Die Mutante *emo-1* weist zusätzlich eine leichte Misexpression in Endodermiszellen (En; blaue Pfeile) und eine zusätzliche laterale Lokalisation von PIN2 in Rindenzellen (R; blaue Pfeile) auf (En=Endodermis, Ep=Epidermis, Lb=Leitbündel, R=Rindenzellen; Primärantikörper/PIN2 (Abas et al., 2006); Sekundärantikörper/Cy3 (Dianova, Hamburg, Germany); Immunlokalisation: Dr. Sandra Richter/AG Jürgens; Maßstab=20 µm; Aufnahmen: Wurzel, Confocal SP8).

werden konnte, wurden nun die Auxintransporter direkt untersucht. Dabei spielen AUX1/LAX und PIN Proteine eine wichtige Rolle, da sie als Auxin Influx- bzw. Efflux-Carrier fungieren. Eine Beeinträchtigung des AUX1-vermittelten Auxininfluxes in *emo-1* kann jedoch aufgrund der im Vorfeld erhaltenen Daten nahezu ausgeschlossen werden. So lösen sowohl IAA als auch 2,4-D eine Seitenwurzelbildung in ethanolbehandelten *emo-1* Mutanten aus (C. Oecking, persönliche Mitteilung). Beide Auxine werden über AUX1 in die Zelle importiert (Delbarre et al., 1996; Estelle, 1996 und 1998; Marchant et al., 1999). Zudem kann in *emo-1* eine starke Auxin-induzierte GUS-Expression in Kotyledonen und der Wurzelspitze nachgewiesen werden (siehe dazu Abb. 8B3 und B6). Dies setzt voraus, dass Auxine in die Zelle importiert werden. Demzufolge haben sich unsere Untersuchungen auf die PIN-Efflux Carrier konzentriert.

Im Wildtyp (siehe dazu Abb. 12A), kann PIN1-GFP vornehmlich im Zentralzylinder (5) und in der Endodermis (4) detektiert werden. Im Gegensatz dazu ist PIN1 in *emo-1* (*PIN1::PIN1-GFP* x *emo-1*) misexprimiert, da es zusätzlich in allen Zellen der Wurzelspitze exprimiert wird (lateralen Wurzelhaube (1), den Epidermiszellen (2), den Cortezzellen (3), im ruhenden Zentrum (6), der Kalyptra (7), der zentralen Wurzelhaube (8) und der distalen Wurzelhaube (9)). PIN2-GFP wird im Wildtyp (siehe dazu Abb. 12B) in Cortex- und Epidermiszellen (3, 2) exprimiert. In der *emo-1* Mutanten (*PIN2::PIN2-GFP* x *emo-1*) zeigt sich gegenüber Wildtyp eine zusätzliche PIN2 Expression in Teilen der zentralen (8), der distalen (9) und der lateralen Wurzelhaube (1).

Demzufolge sind PIN1 als auch PIN2 in *emo-1* misexprimiert. Die Expression von PIN7 wies im Vergleich zu Wildtyp keine wesentlichen Unterschiede auf, jedoch ist zu bedenken, dass die schwache PIN7-Expression zeitlich und räumlich eingeschränkt ist (Ferarù und Friml, 2008). Eine solche Misexpression und Mislokalisation von Transportern konnte bereits Vieten bei einer *pin2* Mutanten feststellen. Hier zeigte sich eine zusätzliche Lokalisation von PIN1 in Cortex- und Epidermiszellen. Nach Vieten ist dies auf eine Redundanz der Transporter zurückzuführen, dass heißt, die Carrier ersetzen sich gegenseitig, um wie vermutlich in diesem Fall, ein Auxinmaximum in der Wurzelspitze zu erhalten (Vieten et al., 2005). Dies kann jedoch nicht der Hauptgrund für das Auxintransportproblem sein und spricht eher für eine Folgereaktion aufgrund der gestörten Auxinhomeostase.

Auf der Grundlage der Confocalmikroskopie konnten nur marginale Unterschiede in der subzellulären Lokalisation der PIN Proteinen zwischen Wildtyp und *emo-1* festgestellt

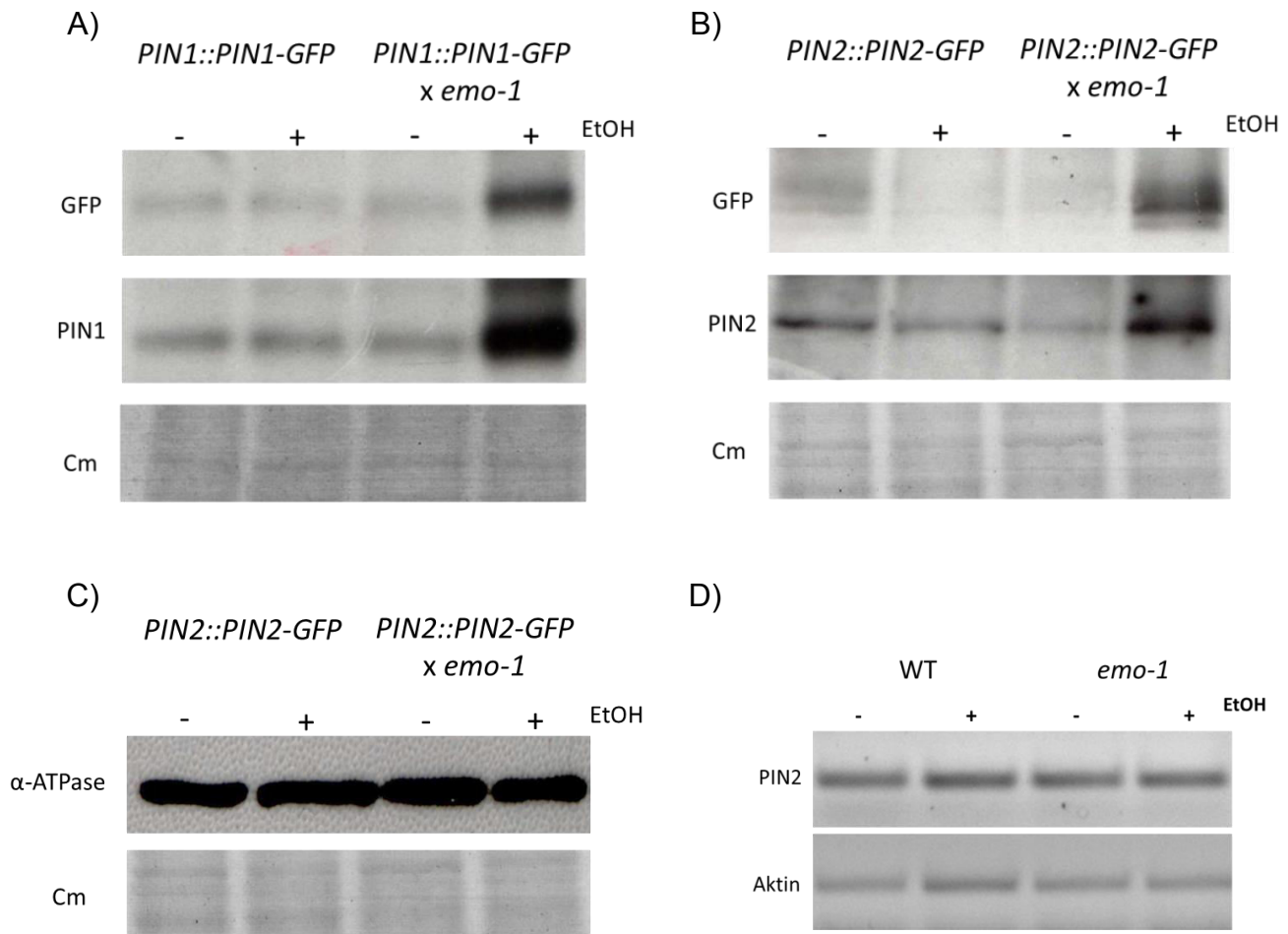
werden. Eine Immunlokalisation (siehe dazu Abb. 12C; PIN1 keine sichtbaren Unterschiede) machte jedoch deutlich, dass PIN2 in *emo-1* nicht auf die apikale (Epidermis) bzw. basale (Cortex) Seite beschränkt ist. Vielmehr kann PIN2 häufig auf der inneren lateralen Seite der Cortezellen nachgewiesen werden. Was für eine Veränderung der subzellulären Lokalisation und somit einer Veränderung der Polarität von PIN2 Proteinen spricht.

### **3.1.6.2 Abundanz von PIN Proteinen in Wildtyp und *emo***

Die in *emo-1* beobachtete Misexpression von PIN1- und PIN2-GFP sind als schwach bis moderat einzustufen. Um die Frage zu beantworten, ob diese Misexpression auf Ebene der Transkription oder Proteinabundanz detektierbar ist, wurden RT-PCR Analysen und Immun-detektionen in mikrosomalen Membranen aus Keimlingen oder Keimlingswurzeln durchgeführt.

Letztere zeigen, dass die Menge von PIN1 und PIN2 Proteinen signifikant in *emo-1* ausschließlich bei Ethanolbehandlung erhöht ist (siehe dazu Abb. 13A und B). Dies konnte sowohl mit GFP spezifischen Antikörpern als auch mit PIN1 und PIN2 spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Diese signifikante Erhöhung an PIN Proteinen steht in keinem Verhältnis zur eher schwachen Misexpression. Somit stellt sich die Frage nach dem Grund für die deutlich erhöhte Abundanz von PIN Proteinen in Mikrosomen von *emo-1*. Einemögliche Ursache dafür könnte eine höhere Transkription der PIN Gene sein. Jedoch zeigt die RT-PCR (siehe dazu Abb. 13D) keinen Unterschied im Gehalt der PIN2-mRNA zwischen Wildtyp und *emo-1* in An- und Abwesenheit von Ethanol. Um herauszufinden, ob auch andere Plasmamembranproteine in ihrer Abundanz erhöht sind, wurde die membranständige H<sup>+</sup>-ATPase (siehe dazu Abb. 13C) immunologisch in mikrosomalen Membranen nachgewiesen. Da sich kein signifikanter Unterschied in der H<sup>+</sup>-ATPase Menge zwischen Wildtyp und *emo-1* detektieren ließ, weisen die Ergebnisse darauf hin, dass PIN Proteine in der *emo-1* Mutante stabilisiert werden. So zeigt das starke *pin2* Allel *wav6-52* (Abas et al., 2006) eine zu *emo-1* vergleichbare Aktivität des Auxin-responsiven Promotors DR5 in der Wurzelspitze und eine signifikant erhöhte PIN2 Menge in Mikrosomen. Zudem weist der Phänotyp wie bei *emo* ein agravitropes Wachstum der Wurzel auf. Auf Grundlage ihrer Daten folgern die Autoren, dass PIN2 in *wav6-52* nicht effizient proteolytisch degradiert werden kann. Diese PIN2 Stabilisierung resultiert in einer deutlichen Veränderung der Auxin Verteilung in der Wurzel.

### 3. Ergebnisse



**Abb. 13: Abundanz von PIN Proteinen in mikrosomalen Membranen von Keimlingen bzw. Keimlingswurzeln**

**A)** Immundetektionen von PIN1 in mikrosomalen Membranen aus ganzen Keimlingen mit GFP-(Torrey Pines Biolabs, New Jersey) und PIN1 (Paciorek et al., 2005) spezifischen Antikörpern. Die Anzucht von WT (*PIN1::PIN1-GFP*) und *emo-1* (*PIN1::PIN1-GFP x emo-1*) erfolgte für vier Tage auf 1x MS-Medium mit 1 % Saccharose, anschließend wurden die Keimlinge für drei Tagen auf 1x MS-Medium mit 1 % Saccharose, ohne bzw. mit 0,1 (v/v) % EtOH transferiert.

**B)** Immundetektionen von PIN2 in mikrosomalen Membranen aus Wurzeln mit GFP-(Torrey Pines Biolabs, New Jersey) und PIN2 (Abas et al., 2006) spezifischen Antikörper. Die Anzucht erfolgte wie unter (A) beschrieben.

**C)** Immundetektionen der membranständigen H<sup>+</sup>-ATPase in mikrosomalen Membranen aus ganzen Keimlingen mit H<sup>+</sup>-ATPase (AG Oecking) spezifischen Antikörper in WT (*PIN2::PIN2-GFP*) und *emo-1* (*PIN2::PIN2-GFP x emo-1*) Keimlingen. Die Anzucht erfolgte wie unter (A) beschrieben.

**D)** Semiquantitative RT-PCR Analyse des PIN2 Transkripts in Wildtyp und *emo-1*. Aktin und dient als Kontrolle. Die Anzucht erfolgte wie unter (A) beschrieben.

(Cm=Coomassie; PIN1 Protein/67 kDa; PIN2 Protein/69 kDa; PM-ATPase/100 kDa; GFP/30 kDa; PIN2/409 bp; Aktin/ca. 450 bp)

### 3.1.7 Untersuchungen zum vakuolären pH-Wert und beteiligter H<sup>+</sup>-Pumpen als Ursache des *emo*-Phänotyps

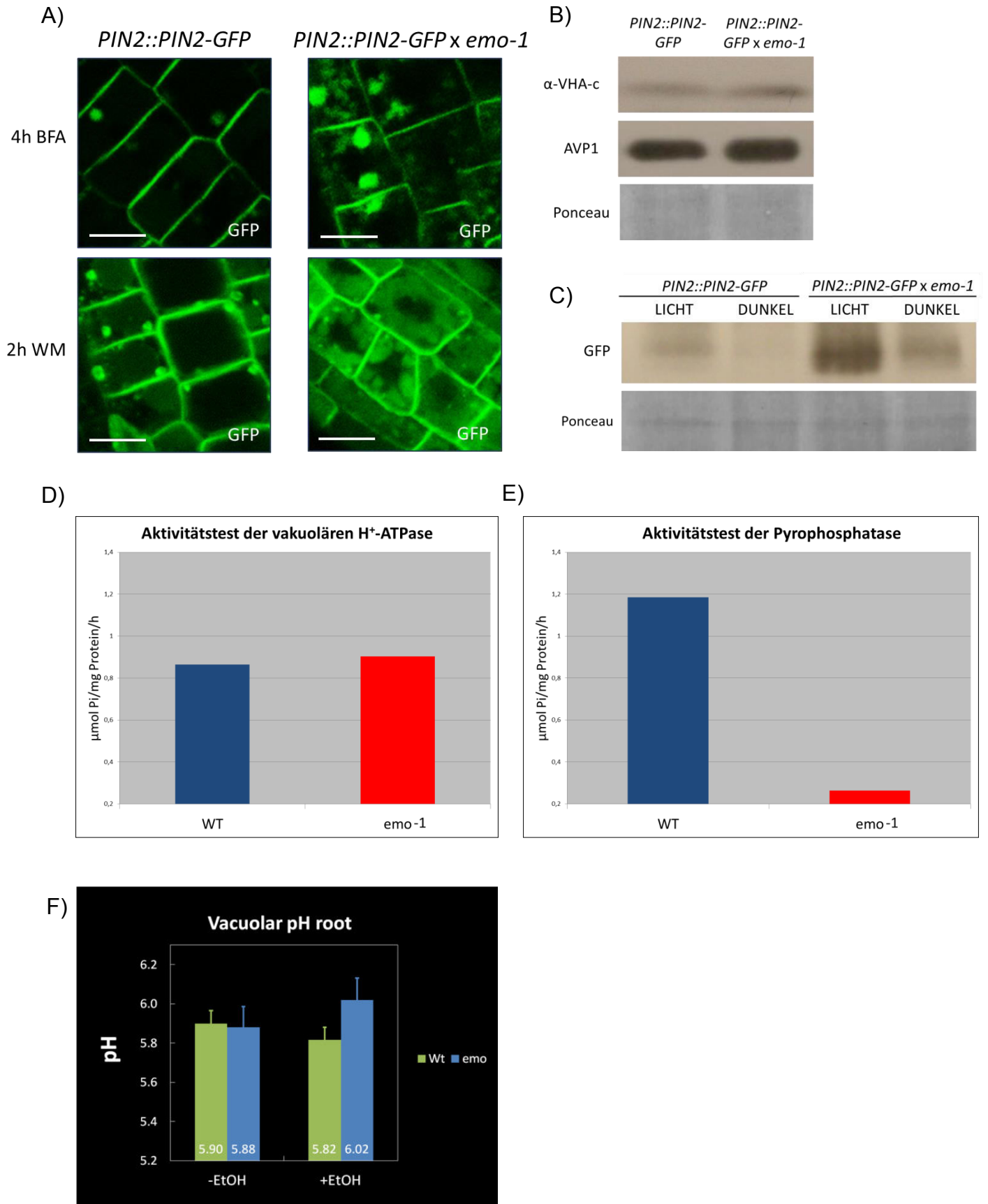
Da PIN Proteine in der Vakuole abgebaut werden, könnte ähnlich zu der *wav6-52* Mutante eine verminderte oder gestörte Degradation von PIN Proteinen in der Vakuole Ursache des *emo*-Phänotyps sein (Sieberer et al., 2000; Abas L, et al., 2006; Malenica et al., 2007; Laxmi et al., 2008; Kleine-Vehn et al., 2008). Um die PIN-GFP Proteine in der Vakuole visualisieren zu können, wurden die Pflanzen im Dunkeln inkubiert. Dies ermöglicht es im Allgemeinen, GFP-getaggte Proteine in der Vakuole sichtbar zu machen, da der pH-Wert der Vakuole höchstwahrscheinlich aufgrund einer verminderten Aktivität der vakuolären Pumpen, sprich der vakuolären H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase) und der H<sup>+</sup>-Pyrophosphatase (PPase) steigt (Hedrich et al., 1986; Hedrich und Schroeder, 1989; Sze et al., 1999; Maeshima, 2000).

Die im Dunkeln inkubierten Pflanzen wurden zusätzlich mit Inhibitoren des vakuolären Transports, wie Brefeldin A und Wortmannin, behandelt. Dies bot die Möglichkeit, den Transport in die Vakuole weitgehend zu inhibieren und die verbleibenden GFP-getaggten Proteine in der Vakuole sichtbar zu machen. Brefeldin A (BFA) ist ein bekannter Inhibitor für spezifische ARF-GEFs (ADP ribosylation factor guanine nucleotide exchange factor), denen nicht nur eine Rolle in der Regulation des Vesikeltransports, sondern auch in der Embryogenese zugeschrieben wird (Mayer et al., 1991 und 1993, Shevell et al., 1994, Busch et al., 1996, Richter et al., 2010). Ihre Hemmung durch BFA verursacht eine Inhibition der Exozytose und des vakuolären Transports. Dies führt zu einer Akkumulation von Plasmamembranproteinen in so genannten BFA-Kompartimenten (Steinmann et al., 1999; Geldner et al., 2001 und 2003; Grebe et al., 2002). Wortmannin ist ein Inhibitor der Endozytose und des vakuolären Traffickings, Zielproteine sind dabei Phosphatidylinositol-3-Kinasen und Phosphatidylinositol-4-Kinasen (Matsuoka et al., 1995; Krinke et al., 2007; Takáč et al., 2012). Nach Langzeitbehandlungen im Dunkeln mit den genannten Inhibitoren konnte noch ein starkes Signal an PIN2-GFP in der Vakuole der *emo-1* Mutante im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden (siehe dazu Abb. 14A). Dies könnte entweder durch einen Inhibitor-insensitiven Transport zur Vakuole oder durch einen verminderten Abbau in der Vakuole hervorgerufen werden. Da der pH-Wert für die Proteine in der Vakuole entscheidend ist, wurde sowohl der pH Wert als auch die Aktivität und Abundanz der vakuolären Pumpen untersucht.

Es zeigte sich, dass kein Unterschied in der Menge immunologisch nachweisbarer V-ATPase ( $\alpha$ -VHA-c, vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase) und PPase (AVP1, *Arabidopsis* vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase) zwischen Wildtyp und *emo-1* vorliegt (siehe dazu Abb. 14B). Dies trifft auch im Hinblick auf die Aktivität der V-ATPase zu (siehe dazu Abb. 14D). Jedoch ist die Aktivität der PPase in mikrosomalen *emo-1* Membranen drastisch gegenüber dem Wildtyp reduziert (siehe dazu Abb. 14E). Hier muß allerdings bedacht werden, dass der elektrochemische Protonengradient über dem Tonoplasten hauptsächlich von der vakuolären H<sup>+</sup>-ATPase und nur zu einem geringen Anteil von der H<sup>+</sup>-Pyrophosphatase generiert wird (Martinoia et al., 2007; Krebs et al., 2010; Etxeberria et al., 2012; Martinoia et al., 2012). Dementsprechend zeigte



### 3. Ergebnisse



**Abb. 14: Untersuchungen der vakuolären Pumpen und des vakuolären pH-Werts in Wildtyp und *emo-1***

**A)** Epidermiszellen vier Tage alter WT (*PIN2::PIN2-GFP*) und *emo-1* (*PIN2::PIN2-GFP* x *emo-1*) Keimlinge die auf 1x MS-Medium mit 1 % Saccharose und 0,1 % (v/v) EtOH angezogen wurden. Die Keimlinge wurden vor der mikroskopischen Untersuchung wie folgt behandelt: 24 h im Dunkeln inkubiert, vier Stunden 50  $\mu$ M BFA bzw. zwei Stunden 20  $\mu$ M WM (Maßstab=10  $\mu$ m; Aufnahmen: Epidermiszellen, Confocal SP2).

**B)** Immundetektion der V-ATPase sowie der PPase in mikrosomalen Membranen aus ganzen Keimlingen mit Antikörper gegen die vakuoläre  $H^+$ -Pyrophosphatase (AVP1, Drozdowicz et al., 2002) und die vakuoläre  $H^+$ -ATPase ( $\alpha$ -VHA-c, Schumacher et al., 1999). Die Anzucht der Keimlinge von WT (*PIN2::PIN2-GFP*) und *emo-1* (*PIN2::PIN2-GFP* x *emo-1*) erfolgte vier Tage auf 1x MS-Medium mit 1 % Saccharose, anschließend wurden die Keimlinge für drei Tagen auf 1x MS-Medium mit Saccharose und 0,1 % (v/v) EtOH transferiert.

**C)** Immundetektion von PIN2 in mikrosomalen Membranen aus ganzen WT (*PIN2::PIN2-GFP*) und *emo-1* (*PIN2::PIN2-GFP* x *emo-1*) Keimlingen mit GFP-Antikörper (Torrey). Die Anzucht wie unter (A) beschrieben. Dabei wurden die Keimlinge für das „dark treatment“ (DUNKEL) die letzten 24h der Ethanolinduktion im Dunkeln inkubiert.

**D)** Enzymatische Aktivität der vakuolären  $H^+$ -ATPase und **E)** der vakuolären  $H^+$ -Pyrophosphatase in Mikrosomen aus Keimlingen, die zuvor für vier Tage auf 1x MS-Medium mit 1 % Saccharose und anschließend für drei Tagen auf 1x MS-Medium mit 1 % Saccharose und 0,1 % (v/v) EtOH transferiert wurden.

**F)** Messung des vakuolären pH-Wertes mit dem pH Indikatorfarbstoff BCECF-AM von WT und *emo-1* auf Medium mit bzw. ohne Ethanol. Die Keimlinge wurden fünf Tage auf 1x MS Medium + 1 % Saccharose +/- 0,1 % (v/v) EtOH angezogen; Durchführung und Auswertung Melanie Krebs/FG Schumacher Heidelberg)

die Messung des vakuolären pH-Wertes mit BCECF-AM, einem Indikator für den vakuolären pH-Wert (Versuch wurden von AG Schumacher durchgeführt, Abb. 14F; Krebs et al., 2000) keine signifikanten Unterschiede.

Nach den Untersuchungen von Laxmi et al. 2008 findet trotz verminderter Aktivität der vakuolären Pumpen im Dunkeln ein Abbau in der Vakuole statt. Dies konnte er anhand der *det3-1* (de-etiolated) Mutante belegen, denn diese weist eine Beeinträchtigung der vakuolären  $H^+$ -ATPase auf, was zu einer verminderten vakuolären Funktion führt. Im Dunkeln inkubierte WT-Keimlinge zeigten demnach ein deutlich schwächeres PIN2-GFP Signal in der Vakuole, als die *det3-1* Mutante (Laxmi et al., 2008). Infolgedessen wurde überprüft, ob generell noch eine proteolytische Degradation von PIN2 in der Vakuole stattfinden kann, dazu wurden mikrosomale Membranen aus Keimlingen hergestellt, die man nach Transfer auf Ethanol-haltigem Medium entweder im Dauerlicht oder für die letzten 24 Stunden im Dunkeln inkubierte (siehe dazu Abb. 14C). PIN2-GFP Immundetektionen zeigen, dass sowohl bei Wildtyp als auch bei *emo-1* ein Abbau von PIN2 im Dunkeln stattfinden kann (siehe dazu Abb. 14C). Somit ist abschließend festzustellen, dass es möglicherweise zu einer leichten Alkalisierung des vakuolären pH-Wertes in *emo-1* kommt, jedoch scheint die proteolytische Degradation von Proteinen, per se in der Vakuole nicht beeinträchtigt zu sein.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass der hohe Gehalt an PIN Proteinen in mikrosomalen Membranen nicht durch eine gestörte oder verminderte Degradation in der Vakuole zu

### 3. Ergebnisse

erklären ist. Somit kann abschließend festgehalten werden, dass auch der vakuoläre pH-Wert keine grundlegende Ursache für den gestörten Auxintransport in *emo-1* sein kann.

#### **3.1.8 RNAi von 14-3-3 Epsilon Mitgliedern interferiert mit dem intrazellulären Vesikeltransport von PIN Proteinen**

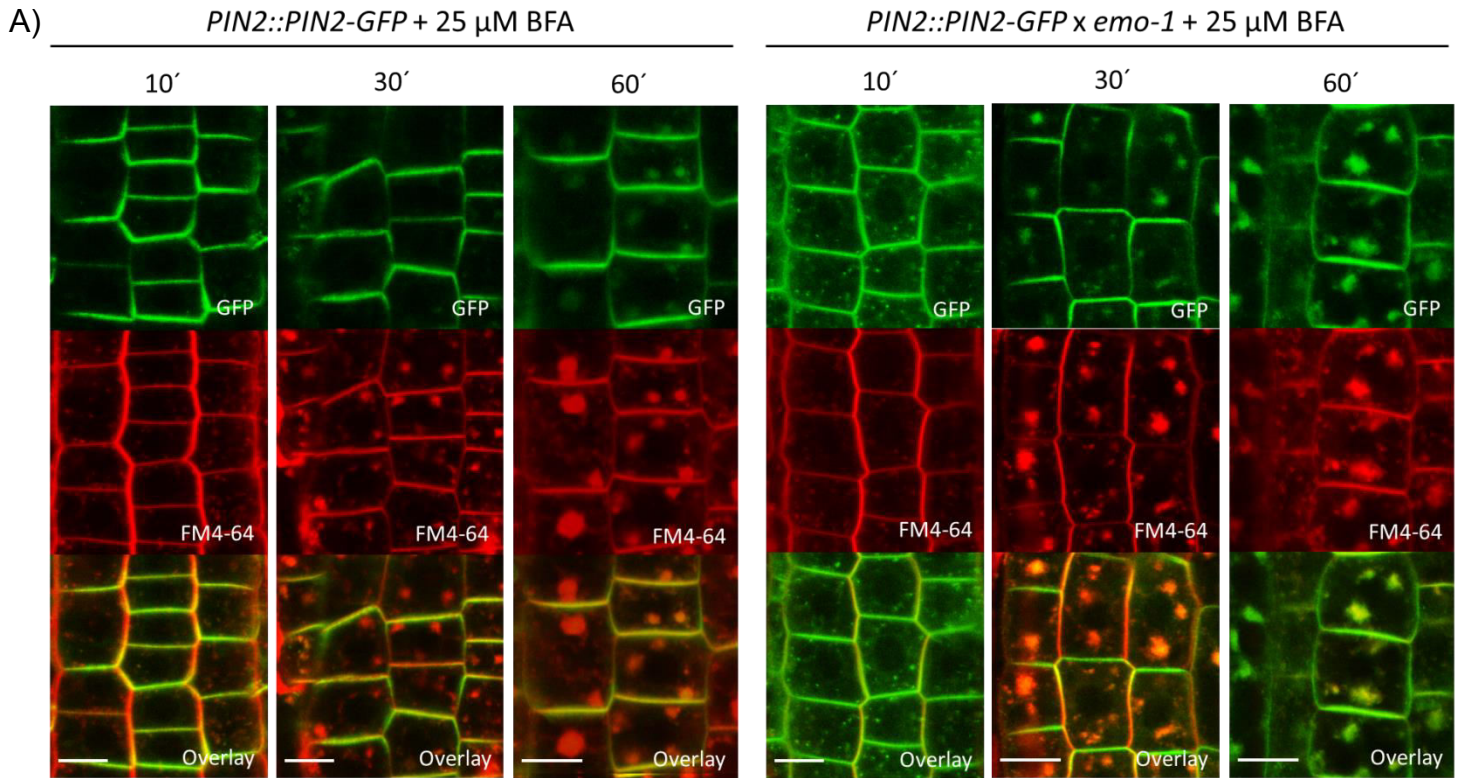
Der hohe PIN-Gehalt in *emo-1* Mikrosomen kann gegebenenfalls auf Probleme in intrazellulären Vesikeltransportprozessen beruhen. Plasmamembranständige PIN Proteine werden kontinuierlich endozytiert und zur Plasmamembran rezykliert bzw. zur Vakuole transportiert. Dies ermöglicht es, sehr schnell die asymmetrische subzelluläre Lokalisation der PIN Proteine in der Plasmamembran zu ändern. Diese wiederum ist grundlegend für die Richtung des polaren Auxintransports in Abhängigkeit von Umwelteinflüssen.

Das Endomembransystem umfasst die Gesamtheit der membranumschlossenen Zellkompartimente, die mithilfe von Endosomen bzw. Vesikel untereinander verbunden sind (siehe dazu Abb. 20). Internalisierte Plasmamembranproteine durchlaufen generell eine endozytische Sortierung von der Plasmamembran in frühe Endosomen. Diese sind Teil des Trans-Golgi Netzwerks (TGN/EE, trans-golgi network/early endosome/Trans-Golgi Netzwerk), von hier aus kann eine Rezyklierung zur Plasmamembran stattfinden, oder eine Ausbildung von multi-vesikulären Körperchen (MVB/LE; multivesicular bodies/late endosomes). Hier findet eine weitere Sortierung statt, entweder zurück zum TGNoder zur endgültigen Degradation in der lytischen Vakuole (Murphy et al., 2005; Jürgens und Geldner, 2007; Schellmann und Pimpl, 2009; Reyes et al., 2011; Robinson und Pimpl, 2013).

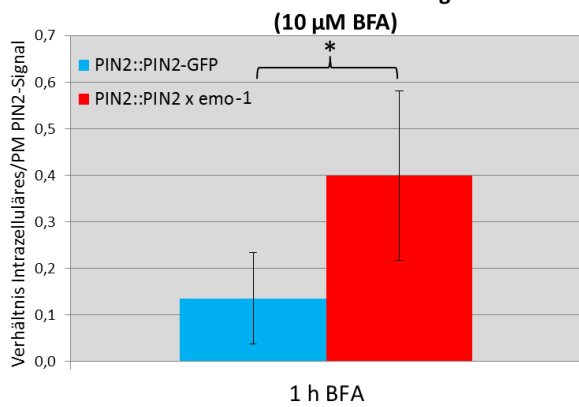
Um nun einzelne Prozesse des Vesikeltransports genauer zu untersuchen, wurden verschiedene Inhibitoren verwendet. Zu Beginn der Versuche wurde mit dem bereits erwähnten Brefeldin A (BFA) gearbeitet, einem Inhibitor für spezifische ARF-GEFs (siehe dazu Kapitel 3.1.7), das die Exozytose und den Weg zu den MVBs hemmt und so die Bildung sogenannter BFA-Kompartimente induziert (Steinmann et al., 1999; Geldner et al., 2001 und 2003; Grebe et al., 2002).

##### **3.1.8.1 Untersuchungen der Endozytose in Wildtyp und *emo-1***

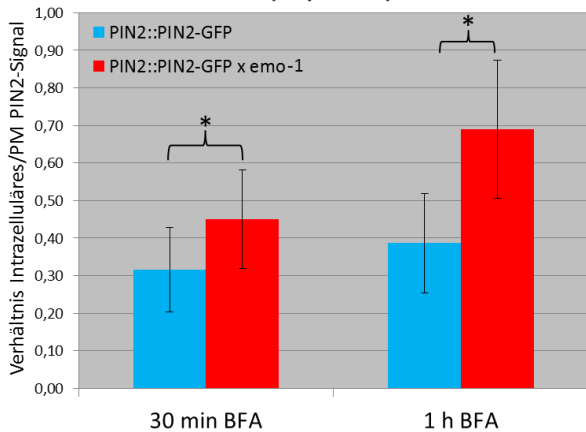
Um die Endozytose im Detail zu analysieren, wurde die Auswirkung unterschiedlicher BFA-Konzentrationen (10, 25 und 50  $\mu$ M) auf die Internalisation von PIN2-GFP in Wildtyp und *emo-1* zeitabhängig (10, 30 und 60 Minuten) bestimmt. Sowohl bei Wildtyp als auch bei *emo-1* befindet sich PIN2-GFP in den BFA-Kompartimenten. Auffällig ist, dass zu jedem untersuchten Zeitpunkt ein deutlich stärkeres PIN2-GFP Signal in den BFA-Kompartimenten in der *emo-1* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp nachweisbar ist (siehe dazu Abb. 15). Dies kann durch die Quantifizierung des Verhältnisses zwischen intrazellulärem PIN2-Signal und Plasmamembran lokalisiertem PIN2-GFP Signal in allen Fällen bestätigt werden (siehe dazu Abb. 15B) und könnte auf eine vermehrte Endozytose in *emo-1* zurückzuführen sein. Zudem sind die BFA-Kompartimente von *emo-1* gegenüber Wildtyp unförmig und wirken „ausgefranst“.



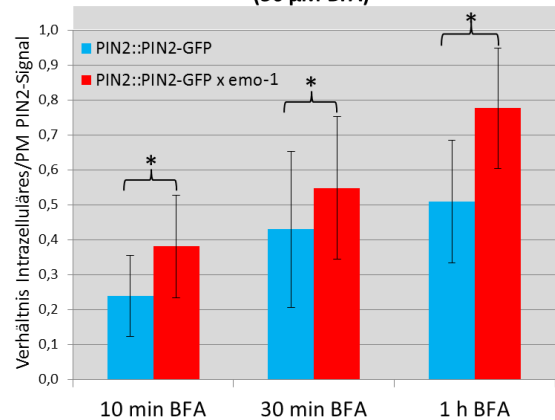
B) Quantifizierung des Verhältnisses von intrazellulärem und Plasmamembran PIN2 Signal



Quantifizierung des Verhältnisses von intrazellulärem und Plasmamembran PIN2 Signal (25  $\mu$ M BFA)



Quantifizierung des Verhältnisses von intrazellulärem und Plasmamembran PIN2 Signal (50  $\mu$ M BFA)



### 3. Ergebnisse

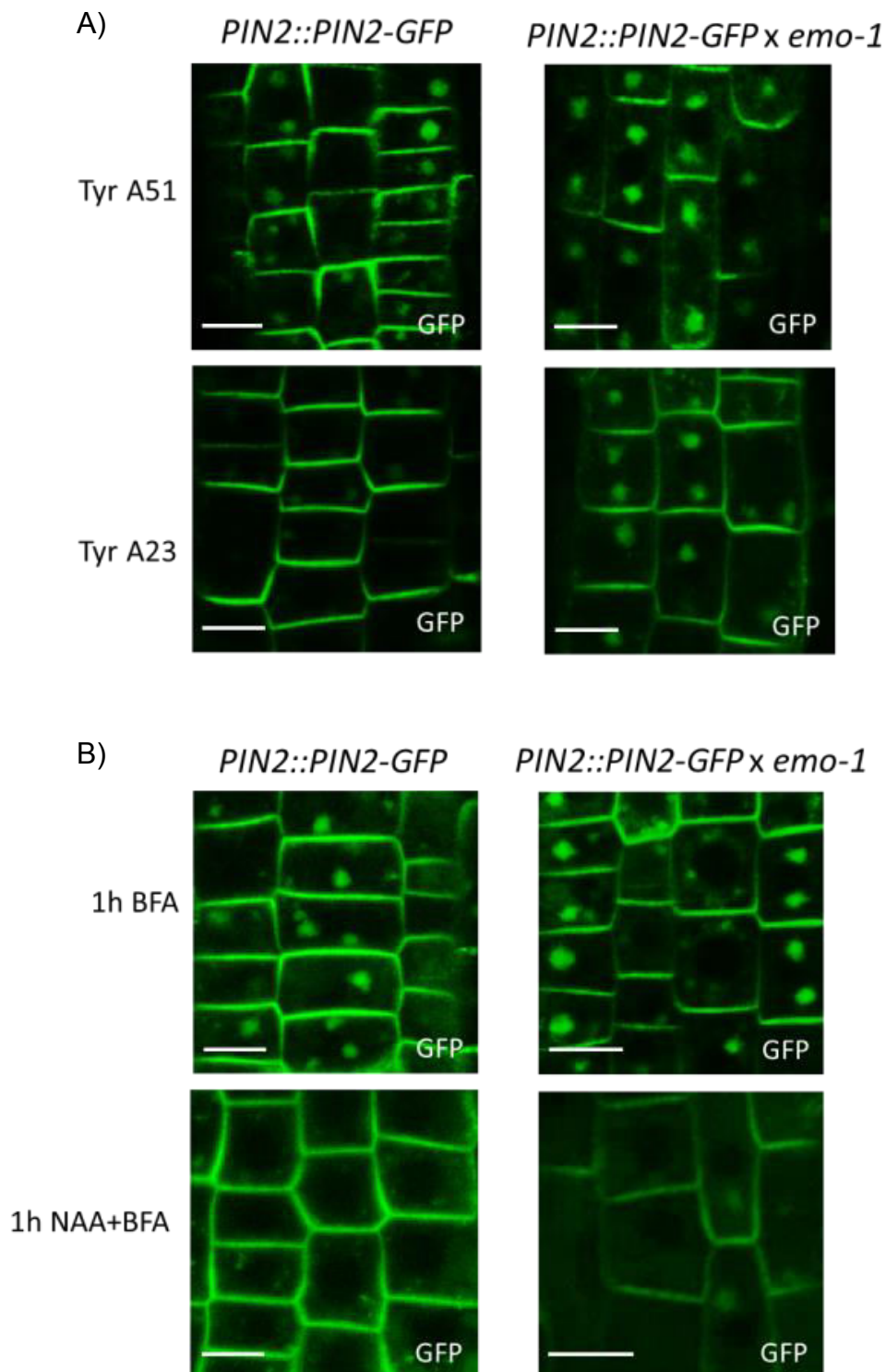
#### **Abb. 15: BFA-Behandlung von PIN2-GFP in Wildtyp (*PIN2::PIN2-GFP*) und der *emo-1* Mutante (*PIN2::PIN2-GFP x emo-1*)**

**A)** Epidermiszellenvier Tage alter WT (*PIN2::PIN2-GFP*) und *emo-1* (*PIN2::PIN2-GFP x emo-1*) Keimlinge, die auf 1x MS-Medium mit 1 % Saccharose und 0,1 % (v/v) EtOH angezogen wurden. Die Keimlinge wurden vor der mikroskopischen Untersuchung wie folgt behandelt: 25  $\mu$ M BFA und 2  $\mu$ M FM4-64 für 10 Minuten, 30 Minuten und eine Stunde (Maßstab=10  $\mu$ m; Aufnahmen: Epidermiszellen, Confocal SP8).

**B)** Relatives PIN2-GFP Signal in Epidermiszellen in WT und *emo-1* nach unterschiedlichen BFA-Konzentrationsbehandlungen. Auswertung der Quantifizierung des Verhältnisses von intrazellulärem PIN2 Signal (BFA-Kompartimente) und PIN2 Signal an der Plasmamembran mit vier Tage alten WT und *emo-1* Keimlingen, die wie unter A) angezogen und anschließend mit 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M oder 50  $\mu$ M BFA und 2  $\mu$ M FM4-64 für 10 Minuten, 30 Minuten bzw. eine Stunde behandelt wurden. Auswertung von je 30 Epidermiszellen von mindestens 15 verschiedenen Wurzelspitzen (30 BFA-Kompartimente/30 apikale Membranbereiche) von n=3 verschiedenen Versuchen.

Interessanterweise steuert Auxin seinen eigenen Transport, indem es die Endozytose hemmt. Dadurch wird die Menge an PIN Proteinen in der Membran erhöht und der Auxin-Efflux aus der Zelle gefördert (Morris, 2000; Berleth und Sachs, 2001; Paciorek et al., 2005). Neben Auxin scheint auch das Tyrphostin-Analog Tyrphostin A23 die Clathrin-abhängige Endozytose zu hemmen (Motley et al., 2003; Paciorek et al., 2005; Ortiz-Zapater et al., 2006; Dhonukshe et al., 2007; Robert et al., 2010). Dabei inhibiert Tyrphostin A23 die Interaktion der  $\mu$ 2 Untereinheit vom Clathrin-Adapter Komplexes AP-2 mit dem endocytischen Motiv, das sich in der cytoplasmatischen Domäne des Plasmamembranproteins findet (Motley et al., 2003; Ortiz-Zapater et al., 2006; Dhonukshe et al., 2007; Titapiwatanakun et al., 2009; Dambournet et al., 2011). Des Weiteren soll Tyrphostin A23 die Zellplattenentwicklung beeinträchtigen (Reichardt und G. Juergens, unpublizierte Daten). Somit wirkt Tyrphostin A23 auch im Bereich des Golgi, denn die Golgi-abhängige Sekretion spielt sowohl bei der Bildung von BFA-Kompartimenten als auch bei der Zytokinese eine Rolle (Reichardt et al., 2007). Als Negativkontrolle dient Tyrphostin A51 (Ortiz-Zapater et al., 2006; Dhonukshe et al., 2007; Pérez-Gómez und Moore, 2007), das keinen Effekt auf die Endozytose hat.

Nach der Behandlung mit Tyrphostin A23 (siehe dazu Abb. 16A) weist die Mutante ein deutlich höheres Signal von PIN2 in den BFA-Kompartimenten auf als der Wildtyp. Als Kontrolle diente Tyrphostin A51, hier zeigt sich, dass sowohl beim Wildtyp als auch bei der Mutante PIN2 in BFA-Kompartimenten lokalisiert ist. Somit scheint die Wirkung des Inhibitors in *emo-1* nicht gegeben zu sein. Als ein pflanzenendogener Endozytoseinhibitor wurde daher NAA eingesetzt. NAA ist ein synthetisches Auxin, das eine auxinanaloge Wirkung hat und ebenfalls wie Tyrphostin A23 ein Inhibitor der Clathrin-vermittelten Endozytose ist. NAA wirkt indirekt über ROP (Rho-like GTPase of plants) und RIC (ROP-interactive CRIB motif-containing protein) und bewirkt so eine Aktin-Stabilisierung, die höchstwahrscheinlich die Clathrin-vermittelte Endozytose unterbindet. ROP und sein Effektor RIC regulieren Clathrin Assoziationen mit der Plasmamembran für die Clathrin-vermittelte Endozytose sowie die Feedback Regulation durch Auxin (Chen et al., 2012). So wird ROP durch Auxin aktiviert, der aktivierte ROP-RIC Weg inhibiert die Internalisation von PIN



**Abb. 16: Einfluß von Tyrphostin A23 bzw. Tyrphostin A51 sowie NAA auf die BFA-Behandlung von PIN2-GFP in Wildtyp und *emo-1***

Epidermiszellen von vier Tage alten WT (*PIN2::PIN2-GFP*) und *emo-1* (*PIN2::PIN2-GFP x emo-1*) Keimlingen, die auf 1x MS-Medium mit 1 % Saccharose und 0,1 % (v/v) EtOH angezogen wurden. Vor der mikroskopischen Untersuchung wurden die Keimlinge für fünf Minuten mit FM4-64 vorbehandelt, dann 30 Minuten mit **A)** 45  $\mu$ M Tyrphostin A23 bzw. A51 oder **B)** mit 20  $\mu$ M NAA bzw. nur 1x MS-Medium behandelt und anschließend für eine Stunde mit **A)** 45  $\mu$ M Tyrphostin A23 bzw. A51 + 50  $\mu$ M BFA oder **B)** mit 50  $\mu$ M BFA +/- 10  $\mu$ M NAA behandelt (Maßstab= 10  $\mu$ m; Aufnahmen: Epidermiszellen, Confocal SP8).

### 3. Ergebnisse

Proteinen durch die stabilisierende Wirkung von RIC auf F-Aktin. Des Weiteren soll dieser inhibierende Effekt ebenfalls auf das endosomale Trafficking von PIN1/ARA7-markierten Endosomen zu Recyclingvesikeln wirken (Nagawa et al., 2012).

Nach der Behandlung mit NAA (siehe dazu Abb. 16B) in Kombination mit BFA zeigt sich, wie bereits auch bei Tyrphostin A23, eine Lokalisation von PIN2 in BFA-Kompartimenten bei *emo-1*, jedoch sind die BFA-Kompartimente deutlich schwächer (PIN2-GFP Signal) und auch nicht so zahlreich im Vergleich zum Tyrphostininhibitorversuch. Als Kontrolle diente hier BFA, bei der eine Lokalisation von PIN2 in BFA-Kompartimenten bei beiden gut zu erkennen ist.

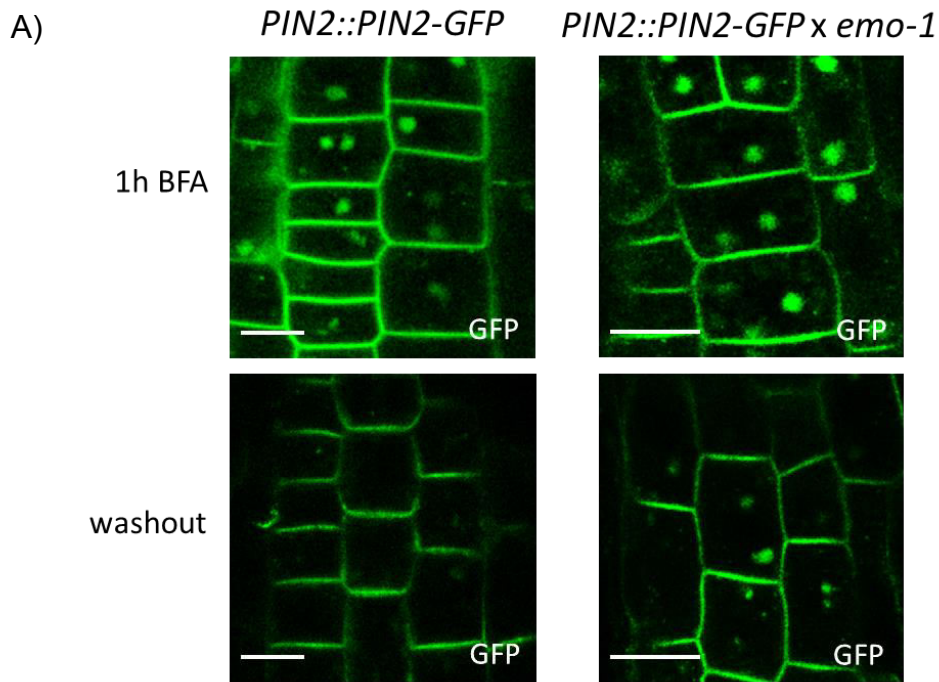
Beide Versuche zeigen eine Lokalisation von PIN2-GFP in BFA-Kompartimenten bei *emo-1*, jedoch scheint der inhibitorische Effekt von NAA im Vergleich zu Tyrphostin A23 deutlich stärker zu sein. Bei der Überprüfung der Endozytose mit Hilfe von FM4-64 {N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(p-Diethylamino-phenyl-hexatrienyl) Pyridinium Dibromid} einem lipophilen Styrylfarbstoff (Vida und Emr, 1995) mit dem man das endocytische Trafficking sichtbar machen kann, zeigte sich, dass es zu keiner vermehrten Endozytose kommt.

Demzufolge wäre eine vermehrte Endozytose nicht die Ursache der oben genannten Effekte. Eine mögliche Erklärung könnte ein Problem mit der Fusion von Vesikeln mit Membranen sein. Rab GTPasen sind kleine GTPasen, die zur Ras Superfamilie gehören, sie spielen eine Rolle im „membrane trafficking“, indem sie das „Tethering“ und die Fusion von Transportvesikeln und Organellen zu Zielmembrankompartimenten vermitteln. Sollten die endozytierten Vesikel nicht mehr mit den Membranen fusionieren, müsste es folglich viele mit PIN-Proteinen besetzte Vesikel/Endosomen geben, die sich im intrazellulären Raum befinden. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die höheren PIN2-GFP Signale und gleichermaßen für die Lokalisation von PIN2-GFP in BFA-Kompartimenten nach Behandlung mit Endozytoseinhibitoren in der *emo-1* Mutanten. Zusätzlich zeigen die BFA-Kompartimente eine Unförmigkeit, dies scheint auf ein mögliches Problem am TGN hinzudeuten.

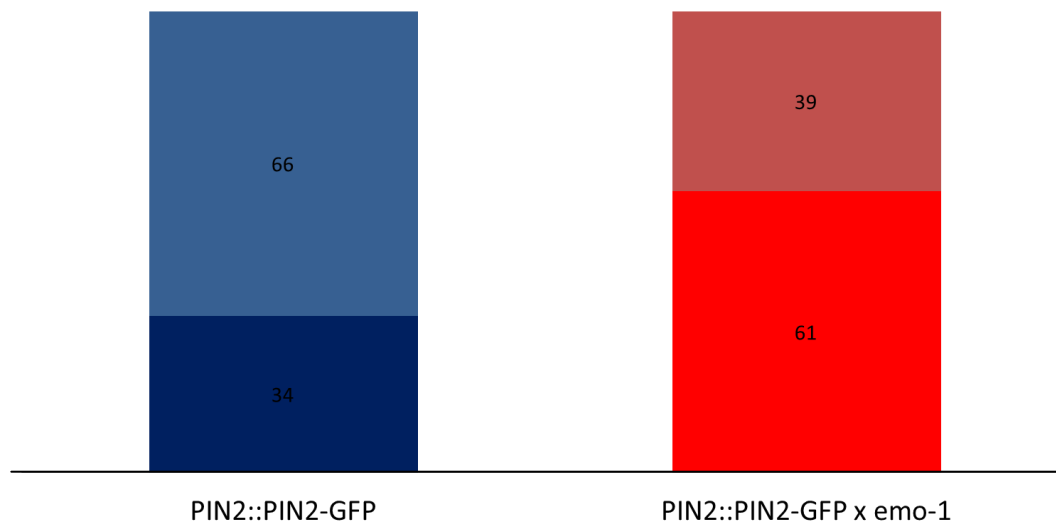
#### **3.1.8.2 Untersuchungen der Rezyklierung von PIN2 Proteinen zur Plasmamembran in Wildtyp und *emo-1***

Nach der Überprüfung der Endozytose konnte eine „deregulierte Endozytose“ als Ursache ausgeschlossen werden, stattdessen erhärtete sich der Verdacht dass im Bereich des TGNs und der Transportvesikel ein Defekt bestehen könnte. Aus diesem Grund wurden weitere Transportwege untersucht. Es ist bekannt, dass es nach dem Auswaschen von BFA zu einer Relokalisation von PIN Proteinen zurück an die Plasmamembran kommt (Geldner et al., 2001; Gang und Hong-Wie, 2007). Mit diesem Versuch wurde überprüft, ob es auch bei der *emo-1* Mutante zu einer effektiven Relokalisation von PIN Proteinen (in diesem Fall PIN2) an die Plasmamembran kommt.

In Abbildung 17 zeigt sich, dass es sowohl beim Wildtyp als auch bei *emo-1* nach der BFA-Behandlung (siehe dazu Abb. 17A) zu einer Lokalisation von PIN2-GFP in BFA-



B) Quantifizierung des Verhältnisses von intrazellulärem PIN2 (BFA-Kompartiment) zum PM-PIN2 Signal in %  
Vergleich von BFA-Kompartimenten vor und nach dem Washout von Brefeldin A



**Abb. 17: Rezyklierung von PIN2 Proteinen zurück an die Plasmamembran ist effizienter beim Wildtyp als bei der *emo-1* Mutante**

**A)** Epidermiszellen vier Tage alter WT (*PIN2::PIN2-GFP*) und *emo-1* (*PIN2::PIN2-GFP x emo-1*) Keimlinge. Wachstum auf MS-Medium mit 1 % Saccharose und 0,1 % (v/v) EtOH. Die Keimlinge wurden vor der mikroskopischen Untersuchung wie folgt behandelt: eine Stunde mit 50  $\mu$ M CHX + 0,1 % (v/v) EtOH, danach eine Stunde 50  $\mu$ M CHX + 50  $\mu$ M BFA + 2  $\mu$ M FM4-64 + 0,1 % (v/v) EtOH/für den Washout eine Stunde 50  $\mu$ M CHX + 0,1 % (v/v) EtOH. (Maßstab= 10  $\mu$ m; Aufnahmen: Epidermiszellen, Confocal SP8)



### 3. Ergebnisse

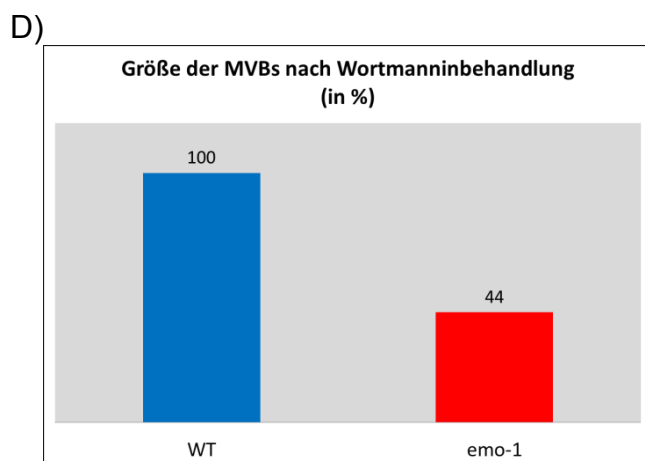
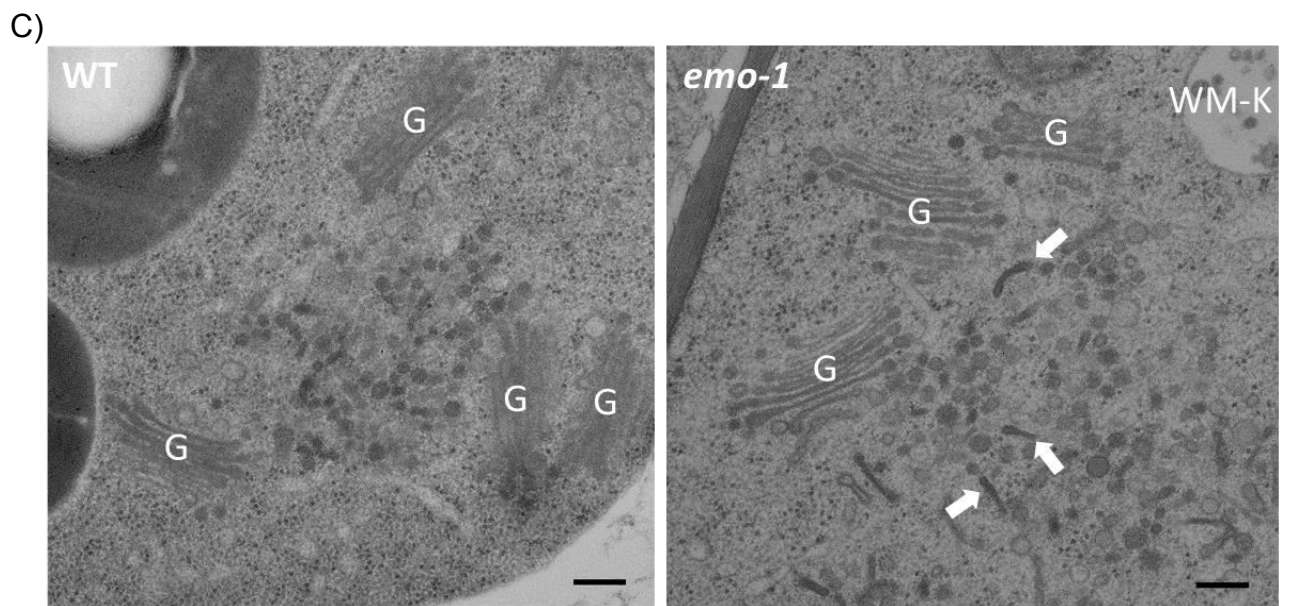
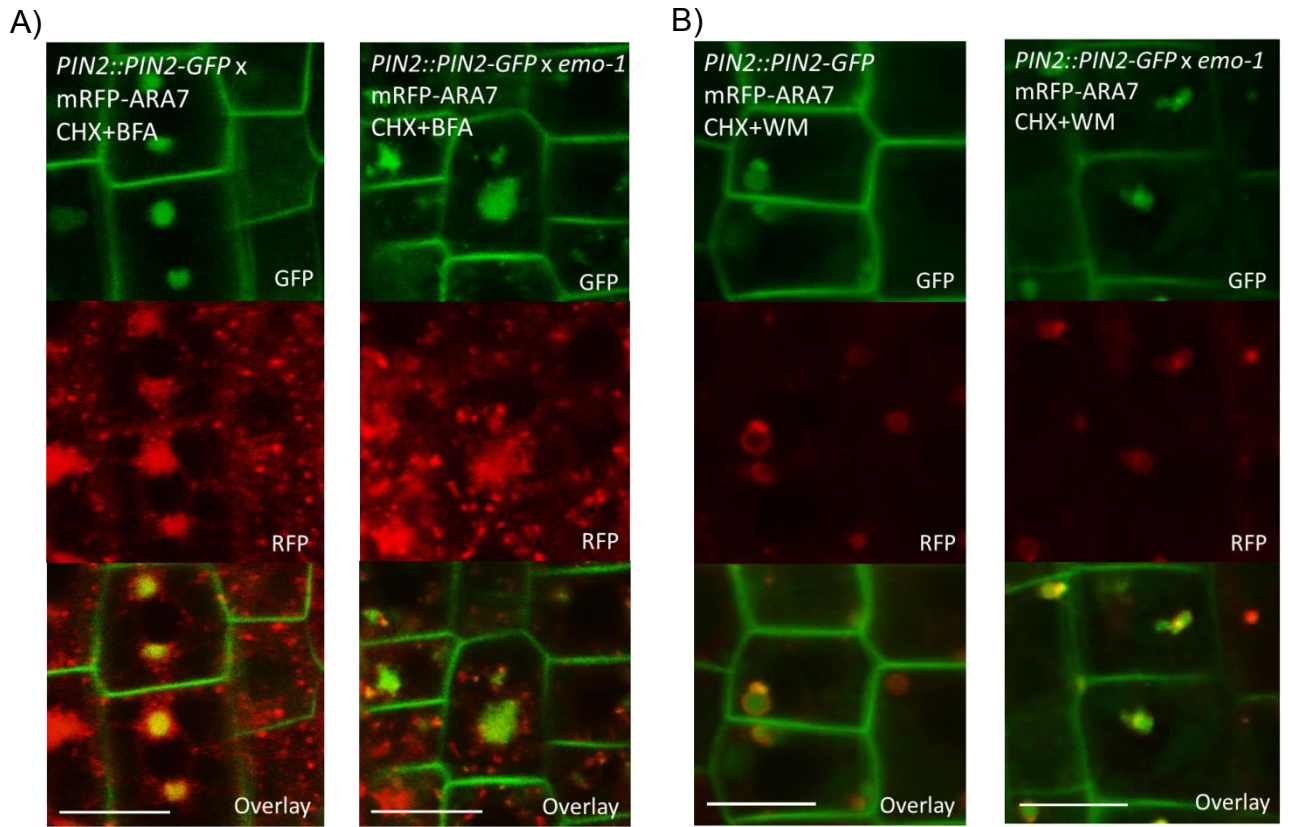
**B)** Prozentuale Auswertung des relativen PIN2-GFP Signal in Epidermiszellen vor und nach dem Washout von BFA. Ermittelt wurde das Verhältnis von intrazellulärem (BFA-Kompartiment) und PIN2-PM-Signal in Prozent von BFA-Kompartimenten vor und nach dem Auswaschen von BFA. Die Auswertung erfolgte mit je 50 BFA-Kompartimente/50 apikale PM Bereiche vor und nach dem washout-Versuch mit n=5 verschiedenen Versuchen.

Kompartimenten kommt, jedoch ist nach dem Auswaschen (Washout) von BFA nur im Wildtyp eine effiziente Rezyklierung von PIN2 zurück an die Plasmamembran erkennbar (siehe dazu Abb. 17). Der Transport von PIN2 Proteinen zurück an die Plasmamembran in *emo-1* scheint deutlich verlangsamt zu sein. Dies erhärtete die Vermutung, dass ein Defekt im Bereich des TGNs und der Transportvesikel bestehen könnte. Aus diesem Grund wurde nach einer Möglichkeit gesucht, das TGN sichtbar zu machen und somit mögliche Unstimmigkeiten zu entdecken. Dazu wurden Immunlokalisation mit einem TGN Marker, ARF1 (ADP-ribosylation factor, lokalisiert am Golgi und TGN; Robinson und Scheuring, 2011), durchgeführt (sowohl mit als auch ohne BFA bzw. WM). Jedoch zeigten sich diesbezüglich keine eindeutigen Unterschiede zwischen Wildtyp und *emo-1*. Allerdings konnte bereits zu Beginn der Inhibitorversuche, wie bereits erwähnt, eine Unförmigkeit der BFA-Kompartimente detektiert werden. Normalerweise befindet sich im Zentrum der BFA-Kompartimente das TGN (Trans-Golgi Netzwerk), welches von Golgi Stapeln und MVBs/LE umgeben ist (Robinson et al., 2008). Somit wurden ebenfalls die MVBs genauer untersucht, denn diese werden im Prozess einer Reifung vom TGN abgeschnürt.

#### **3.1.8.3 Untersuchungen der MVBs mit Hilfe des MVB-Markers ARA7**

Zur weiteren Analyse des intrazellulären Transportwege wurde damit begonnen, Kreuzungen zwischen *PIN2::PIN2-GFP* und *PIN2::PIN2-GFP x emo-1* Linien und *35S::mRFP-ARA7/RabF2b* (Manoj Singh, AG Jürgens) Linien durchzuführen. ARA7 (*AtRabF2b*) ist ein Mitglied der kleinen Rab5 GTPasen und ist Teil des vakuolären Transportweges. Lokalisiert ist es in den multivesikulären Körpern (MVB, multivesicular bodies), hauptsächlich aber markiert es eine Subdomäne des TGNs (Sohn et al., 2003; Kotzer et al., 2004; Lee et al., 2004; Haas et al., 2007). Bei den vorangegangenen Versuchen zeigte sich, dass ein Problem im Bereich des TGNs und der Transportvesikel bestehen könnte. Zudem konnte schon zu Beginn der Inhibitorversuche festgestellt werden, dass die BFA-Kompartimente bei *emo-1* im Vergleich zum Wildtyp häufig unförmiger erscheinen.

In Abbildung 18A lässt sich erkennen, dass sich beim Wildtyp ein gleichmäßiges PIN2-GFP Signal im Kern der BFA-Kompartimente befindet. Die ARA7-Markierung zeigt sich sowohl punktförmig um den Rand der BFA-Kompartimente in Form von MVBs, als auch einheitlicher im Zentrum des Kompartiments in Form der Subdomänenmarkierung des TGNs. In *emo-1* ist dieser Aufbau etwas ungleichmäßiger (siehe dazu Abb. 18A). Das PIN2-GFP Signal liegt nicht zentral und ist ungleichmäßiger, sprich es finden sich im BFA-Kompartiment Stellen mit verschiedenen PIN2-GFP Signalstärken. Die ARA7-Markierung der BFA-Kompartimente ist nicht klar erkennbar, viele MVBs liegen weit verteilt in der Zelle oder im BFA-Kompartiment selbst. Verwendet man statt BFA Wortmannin (siehe dazu Abb. 18B) als Inhibitor für den



### 3. Ergebnisse

#### **Abb. 18: Subzelluläre Lokalisation von ARA7 nach BFA-Behandlung von PIN2-GFP**

Epidermiszellen von vier Tage alten WT (*PIN2::PIN2-GFP/mRFP-ARA7*) und *emo-1* (*PIN2::PIN2-GFP x emo-1/mRFP-ARA7*) Keimlingen. Wachstum auf MS-Medium mit 1 % Saccharose und 0,1 % (v/v) EtOH. Die Keimlinge wurden vor der mikroskopischen Untersuchung wie folgt behandelt: eine Stunde 50  $\mu$ M CHX, anschließend **A**) eine Stunde 50  $\mu$ M CHX + 25  $\mu$ M BFA oder **B**) zwei Stunden 50  $\mu$ M CHX + 15  $\mu$ M WM im Dunkeln (mRFP-ARA7 (rot), ein Marker für die MVBs; PIN2-GFP (grün), Auxin-Efflux Carrier; Maßstab=10  $\mu$ m; Aufnahmen: Epidermiszellen, Confocal SP8)

**C**) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von vier Tage alten Wildtyp und *emo-1* Keimlingen nach Direktanzucht auf 1x MS-Medium mit 0,1 % (v/v) EtOH und nach Behandlung von vier Stunden mit 25  $\mu$ M BFA + 15  $\mu$ M WM im Dunkeln. Die Mutante (rechts) zeigt im Gegensatz zum Wildtyp (links) in den BFA-Kompartimenten tubuläre Bereiche (weiße Pfeile). Umgeben sind die BFA-Kompartimente, sowohl bei Wildtyp als auch bei *emo-1* mit Golgistapeln (G) (Maßstab=200 nm; G: Golgi, WM-K: Wortmannin-Kompartiment; Aufnahmen: EM, Dr. York-DieterStierhof(ZMBP))

**D**) Flächenbestimmung von multivesikulären Körperchen (MVBs) von WT und *emo-1* nach Wortmanninbehandlung (siehe dazu auch B). Die Messungen erfolgte mit ImageJ von je 100 MVBs von n=3 verschiedenen Versuchen; verglichen wurden die BFA-Kompartimente von *PIN2::PIN2-GFP* und *PIN2::PIN2-GFP x emo-1* aus (B).

vakuolären Transport, zeigt sich ein Anschwellen der MVBs mit einer deutlichen ARA7-Markierung am Rand beim Wildtyp. In der *emo-1* Mutante hingegen sind die MVBs deutlich kleiner und miteinander „verklumpt“ (siehe dazu Abb. 18B und D), die ARA7-Markierung am Rand der MVBs ist zwar erkennbar, jedoch nicht so eindeutig wie beim Wildtyp.

Es zeigte sich in diesen Linien, dass die unförmig erscheinenden BFA-Kompartimente in *emo-1* höchstwahrscheinlich durch den ungleichmäßigen Aufbau der BFA-Kompartimente aus TGN und MVBs entstehen. Der Kern aus PIN2-GFP ist nicht so zentriert wie im Wildtyp. Und auch nach Wortmannin Behandlung fällt auf, dass die MVBs deutlich kleiner sind (siehe dazu Abb. 18B und D). Somit scheinen die MVBs und Prozesse bezüglich der Bildung von MVBs gestört bzw. ganz unterbunden zu sein. Ein grundlegendes Problem scheint im Bereich des Trans-Golgi Netzwerks (TGNs) und der multivesikulären Körperchen (MVBs) zu liegen. Vorstellbar könnte dabei ein Defekt bei der Reifung der MVBs sein, dies würde zum einen den hohen Gehalt an PIN1 und PIN2 Proteinen in mikrosomalen Membranen erklären, aber auch die etwas unförmige Gestalt der BFA-Kompartimente, sowie die kleinen und teils verklumpten MVBs nach Wortmanninbehandlung. Normalerweise gibt es eine Subdomäne des TGNs, die bei der Reifung reich an ARA7 und PI3P wird und schließlich zum Abschnüren der fertigen MVBs führt (Singh et al., 2014). Es scheint fast so, als würde diese Abschnürung der MVBs vom TGN nicht richtig funktionieren bzw. unvollständig ablaufen, sodass MVBs am TGN möglicherweise gebunden bleiben, was die beiden optischen Effekte mit Brefeldin A und Wortmannin erklären würde und natürlich auch die Detektion der hohen PIN Protein Mengen in Mikrosomen. Auch das ungewöhnliche Bild im Elektronenmikroskop (siehe dazu Abb. 18C) würde auf diese Möglichkeit hindeuten, denn nach einer Langzeitbehandlung von Wildtyp und *emo-1* mit BFA und WM im Dunkeln, zeigt die Mutante tubuläre Bereiche in den BFA-Kompartimenten. Demzufolge scheint möglicherweise ein gestörter Transport zwischen TGN und MVBs zu bestehen.

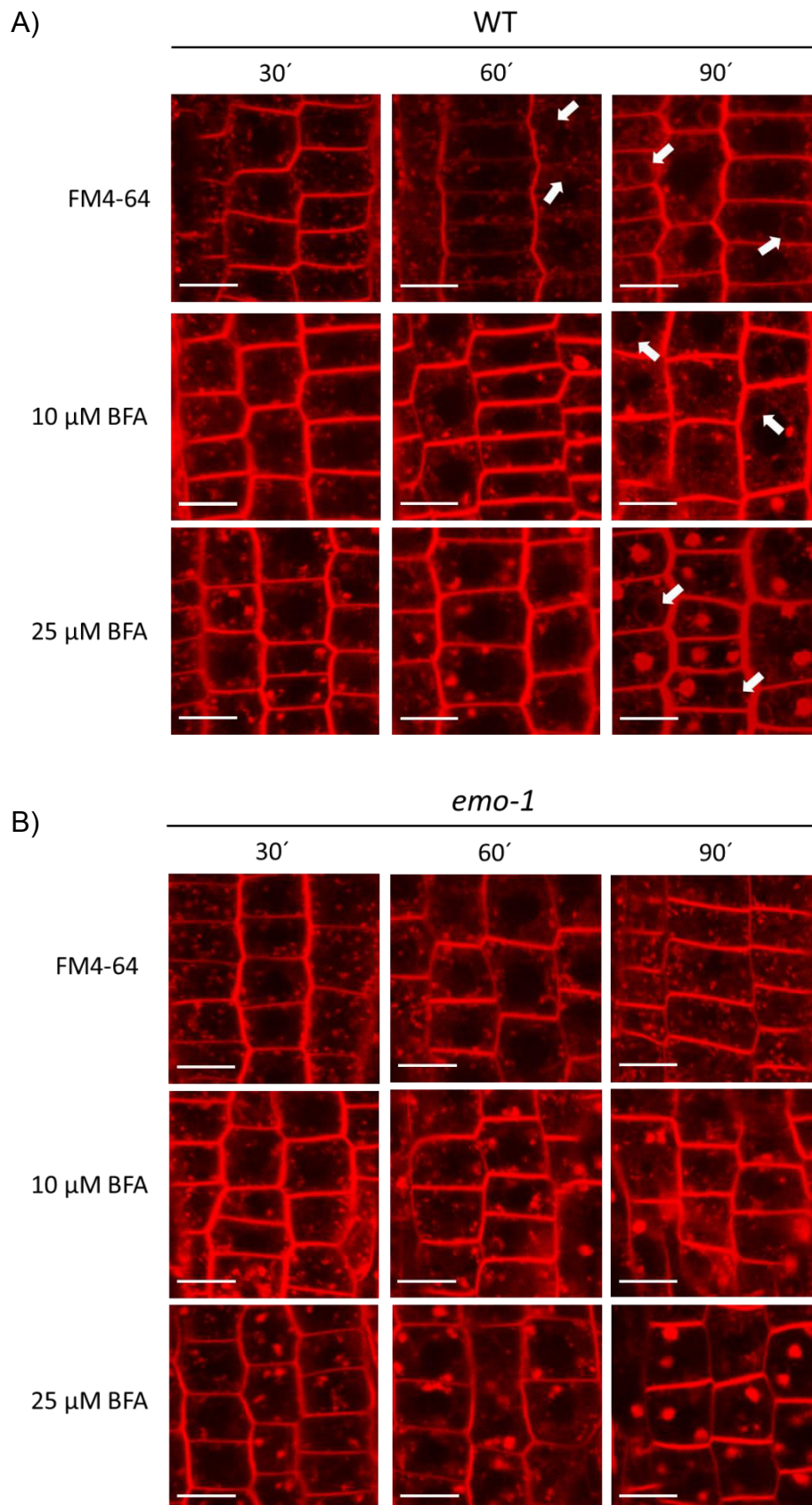


Abb. 19:

**Aufnahme von FM4-64 in die Zelle in Ab- und Anwesenheit von Brefeldin A in Wildtyp und *emo-1***

Epidermiszellen von vier Tage alten Keimlingen, die zuvor auf 1x MS-Medium mit 1 % Saccharose und 0,1 % (v/v) EtOH direkt angezogen wurden. Die Keimlinge wurden vor der mikroskopischen Untersuchung wie folgt behandelt: eine Stunde mit 50 μM CHX, 2 μM FM4-64+50 μM CHX+/- 10 μM BFA bzw. 25 μM BFA; weißer Pfeil: Markierung des Tonoplasten durch FM4-64; Aufnahmen: Epidermiszellen, Maßstab= 10 μm; Confocal SP8.

### 3. Ergebnisse

#### **3.1.8.4 Untersuchungen des vakuolärer Transports in Wildtyp und *emo-1***

Um die Theorie zu untermauern, dass möglicherweise ein Transportproblem zwischen TGN und MVBs besteht, wurde der Transport zur Vakuole noch eingehender untersucht. Aus diesem Grund führte man Versuche mit dem Farbstoff FM4-64 in Kombination mit den bereits genannten Inhibitor BFA durch. FM4-64 ist, wie bereits erwähnt, ein Marker für das endocytische Trafficking.

Abbildung 19A zeigt sich, dass ohne Inhibitor bereits nach einer Stunde eine leichte Markierung der Vakuole durch FM4-64 beim Wildtyp stattgefunden hat. Nach 90 Minuten ist die FM4-64 Markierung am Tonoplasten dann deutlich sichtbar. Unter Verwendung von BFA (10 und 25  $\mu\text{M}$ ) ist diese nach einer Stunde deutlich schwächer. Erst nach 90 Minuten ist die Tonoplastenmarkierung dann deutlich sichtbar. Bei der *emo-1* Mutanten (siehe dazu Abb. 19B) ist die FM4-64 Markierung auch nach 90 Minuten in allen drei Versuchsansätzen, also sowohl mit als auch ohne Inhibitor, sehr geringfügig oder garnicht zu erkennen. Dies unterstützt die These, dass der Transport zur Vakuole gestört bzw. verlangsamt ist und so mögliche Prozesse im Bereich der MVBs und des TGNs nicht mehr richtig ablaufen.

## 4. Diskussion

Wie bereits erwähnt, unterteilt sich die *Arabidopsis* 14-3-3 Familie in zwei phylogenetische Gruppen, die Epsilon und die Non-Epsilon Gruppe (siehe dazu Einleitung Abb. 2). Bisher analysierte Mutanten der Non-Epsilon Gruppe (insgesamt acht Mitglieder; „loss of function“ T-DNA Insertionslinien; sechs Einzel-, drei Doppel-, 12 Dreifach- und drei Vierfach-Mutanten) weisen unter normalen Wachstumsbedingungen bis auf eine marginale Verkürzung der Primärwurzel keine gravierenden Wachstumsstörungen auf (van Kleeff et al., 2014). Dies spricht für eine funktionelle Redundanz zwischen den Mitgliedern der Non-Epsilon Gruppe. Ein vollständiger „knockout“ bzw. eine vollständige Reduktion der Expression aller Non-Epsilon Gruppenmitglieder wurde bis jetzt nicht vorgenommen. Im Gegensatz zur Non-Epsilon Gruppe wurden in der Epsilon Gruppe (insgesamt fünf Mitglieder: epsilon, mu, omicron, pi, iota) bis auf eine „loss of function“ (omicron) keine „knockout“ T-DNA Insertionslinien identifiziert. Aus diesem Grund wurden RNAi Linien generiert, die unter anderem die Expression einzelner Epsilon Gruppenmitglieder reduzieren (*epsilon*, *mu*, *omicron*). Diese zeigen ebenfalls unter normalen Wachstumsbedingungen keinen Phänotyp. Auch Untersuchungen von omicron (Loss-of function Mutanten) und epsilon (Antisense Konstrukt gegen 14-3-3 epsilon) ergaben bis jetzt keinen offensichtlichen Phänotyp (Sehnke et al., 2001; Yang et al., 2013). Im Gegensatz dazu zeigten Untersuchungen einer T-DNA induzierten „knockdown“ *mu* Linie einen extremen Phänotyp mit einer deutlichen Verkürzung der Primärwurzel (Mayfield et al., 2012). Dieser Phänotyp konnte von uns jedoch mit der identischen *mu*-Linie unter gleichen Wachstumsbedingungen nicht bestätigt werden. Untersuchungen der besagten *mu*-Linie in anderen Arbeitsgruppen ergaben ebenfalls keinen oder einen geringfügigen Unterschied der Wurzellänge zwischen *mu* und dem Wildtyp (Cao et al., 2007; He et al., 2015).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der Epsilon Gruppe im Hinblick auf Wachstums- und Differenzierungsprozesse in *A. thaliana* untersucht. Da keine „knockout“ Mutanten für vier der insgesamt fünf Epsilon-Gruppenmitglieder identifiziert werden konnten, wurde von Katrin Weckermann die hier untersuchte Dreifach-RNAi Mutante *emo* generiert, die es erlaubt, in Anwesenheit von Ethanol drei der Epsilon-Gruppenmitglieder (*epsilon*, *mu*, *omicron*) in ihrer Expression zu reduzieren (drei unabhängige *emo*-Linien: *emo-1*, *emo-2* und *emo-3*; *emo-1* diente als Grundlage für alle weiteren Versuche und Kreuzungen; Katrin Weckermann, Dissertation 2008). Dabei ist zu beachten, dass die beiden verbleibenden Isoformen (*pi*, *iota*) nur in den Blüten exprimiert werden, sodass durch die erzeugte RNAi Linie eine nahezu vollständige Abschaltung der Epsilon Gruppe im Keimling erfolgt. Durch die Reduktion der Expression der erwähnten drei Isoformen wird ein drastischer und pleiotroper Phänotyp erzeugt, der durch epinastische Blätter, ein verlängertes Hypokotyl und ein reduziertes Wurzelwachstum ohne Lateralwurzeln im Licht charakterisiert ist.

#### 4. Diskussion

Etiolierte Keimlinge zeichnen sich gegenüber dem Wildtyp durch ein verkürztes Hypokotyl ohne Plumulahaken aus (siehe dazu Abb. 3).

Derartige Wachstumsdefekte können auf Störungen der Phytohormonhomöostase oder der Phytohormonsensitivität hindeuten. Auf der Grundlage zahlreicher physiologischer Untersuchungen konnte *emo* als Auxinmutante identifiziert werden (siehe dazu Kapitel 3.1.1). Ursächlich könnten somit Störungen in der Auxinbiosynthese, der Auxin-signaltransduktion oder dem polaren Transport von Auxin sein. Im Laufe der Arbeit zeigte sich, dass eine Inhibierung des polaren Auxintransports für den RNAi Phänotyp verantwortlich ist.

So weist der Spross Merkmale von Auxin-Überproduktionsmutanten wie z. B. *superroot* (*sur1* und *sur2*), *rooty* (*rtv*), *aberrant lateral root formation1* (*alf1*) oder auch dominanten *yucca* Mutanten (z.B. *yucca6*) auf, die sich durch epinastische Kotyledonen, eine erhöhte Apikaldominanz und gewellte Blätter auszeichnen (Boerjan et al., 1995; Celenza et al., 1995; King et al., 1995; Bak et al., 1998 und 2001; Barlier et al., 2000; Mikkelsen et al., 2000). Zudem konnte unter Einsatz des Auxin-responsiven Reporters *DR5::GUS* eine signifikant gegenüber dem Wildtyp gesteigerte GUS-Aktivität in den Kotyledonen von *emo-1* detektiert werden (siehe dazu Abb. 8B3), die durch eine Behandlung des Wildtyps mit dem Auxintransportinhibitor 1-Naphthylphthalamsäure (NPA; Lomax et al., 1995; Parry et al., 2001, siehe dazu Diplomarbeit C. Pychal) phänokopiert werden konnte. Überdies wird das Transportproblem dadurch verdeutlicht, dass das Hypokotyl etiolierter *emo*-Keimlinge agravitrop wächst (siehe dazu Abb. 6C) und, dass die Bildung von Adventivwurzeln nach chirurgischer Abtrennung der Primärwurzel unterbleibt (Gutierrez et al., 2012, siehe dazu Abb. 6D, E und F). Letzteres ist vom polar basipetalen Auxintransport im Spross abhängig.

Induzierte *emo*-Keimlinge zeigen eine stark verkürzte Primärwurzel ohne Lateralwurzeln (siehe dazu Abb. 3C). Dies spricht ebenfalls für eine Störung im Auxintransport, denn die Bildung von Lateralwurzeln wird durch die transportabhängige Etablierung eines Auxinmaximums in Perizykelzellen der Primärwurzel initiiert (Reed et al., 1998). Die Lateralwurzelbildung kann durch Behandlungen mit synthetischen Auxinen (1-Naphthylessigsäure/NAA; 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure/2,4D) bei *emo-1* ausgelöst werden, jedoch ist die Reaktion im Vergleich zum Wildtyp deutlich hyposensitiver. Zudem lässt sich an diesen Versuchen verifizieren, dass nach Behandlung von *emo-1* mit dem „transportierbaren Auxin“ NAA (NAA kann unabhängig von AUX1/Auxin Influx Carrier in die Zelle gelangen und über PIN Proteine/Auxin Efflux Carrier diese auch wieder verlassen) es zu einer hochgradig desorganisierten Proliferation von Perizykelzellen über große Regionen der Primärwurzel kommt, vergleichbar mit dem Wildtyp, der mit auf dem „nicht-transportierbaren Auxin“ 2,4-D (2,4D kann über AUX1 in die Zelle gelangen, wird aber nicht von PIN Proteinen aus der Zelle transportiert) behandelt wurde (siehe dazu Abb. 5B). Dies gibt ebenfalls ein Hinweis darauf, dass eine Störung im Auxintransport vorliegt. Zudem wird das Auxintransportproblem dadurch verdeutlicht, dass Wurzeln induzierter *emo*-Mutanten (Ethanolbehandlung für zwei Tage) nach sechsständiger Gravistimulation agravitrop wachsen. Dies beruht auf einer unveränderten und strikt symmetrischen Verteilung von Auxin in der Wurzelspitze (siehe dazu Abb. 7B). Eine Transport-abhängige asymmetrische Umverteilung von Auxin auf die gravistimulierte Seite in der Wurzelspitze ist jedoch

essenziell, um ein differentielles Wachstum zu gewährleisten (Müller et al., 1998; Marchant et al., 1999; Rashotte et al., 2000). Des Weiteren lässt sich feststellen, dass der Gehalt an Auxin in der Wurzel graduell mit der Dauer der Ethanolbehandlung abnimmt. So wird die Expression des Auxin-responsiven Reporters *DR5<sub>rev</sub>-GFP* kontinuierlich reduziert. Das nach drei Tagen auf ethanolhaltigem Medium erkennbare GFP-Signal (ruhendes Zentrum, Kalyptra, zentrale Wurzelhaube/ektopisches Signal von GFP in der lateralen Wurzelhaube nur bei induzierten *emo-1* Mutanten) bei *emo-1* Keimlingen weicht einem nach 10 Tagen kaum noch detektierbaren GFP-Signal in der Wurzelspitze. Korrelierbar mit der Auxinverarmung kann dann ein Kollaps des Wurzel-meristems beobachtet werden (siehe dazu Abb. 7A). Folglich sprechen auch die Effekte in der Wurzel für ein gestörtes Auxintransportproblem.

Überdies kann es sich bei *emo* nicht um eine Mutante mit gestörter Auxinsignaltransduktion wie z.B. *tir1* (*transport inhibitor response1*) oder *axr1-3/2-1* (*auxin-resistant*) handeln (Ruegger et al., 1998; Nagase et al., 2015). Denn dagegen spricht die bereits erwähnte ausgeprägte Auxin-induzierte GUS-Aktivität in den Kotyledonen (*DR5-GUS*; siehe dazu Abb. 8B3 und B6; Diplomarbeit C. Pychal), das verlängerte Hypokotyl im Licht (siehe dazu Abb. 3C) und die Reaktion der Wurzel auf exogenes Auxin (siehe dazu Abb. 5).

Somit kann es sich nach den äußeren Merkmalen der Mutante und den durchgeführten Versuchen nur um ein Auxintransportproblem handeln, wie z.B. bei den Mutanten *auxin resistant1* (*aux1*), *like-aux13* (*lax3*) oder *transport inhibitor response3* (*tir3*) (Ruegger et al., 1997; Casimiro et al., 2001; Gil et al., 2001; Swarup et al., 2001 und 2008; Marchant et al., 2002; Paciorek et al., 2005; De Smet et al., 2007; Yamaguchi et al., 2007).

Demzufolge kann man zusammenfassend sagen, dass es durch die Reduktion der Transportfähigkeit von Auxin in der *emo* Mutante in den oberirdischen Pflanzenteilen zu einer Anreicherung von Auxin kommt. Dieses verursacht ein verlängertes Hypokotyl und epinastische Blätter im Licht (Abb. 3C), und ein verkürztes Hypokotyl ohne Plumulahaken im Dunkeln (Abb. 3G). Die unterirdischen Pflanzenteile hingegen erfahren eine vollkommene Verarmung an Auxin, was ein verkürztes Wurzelwachstum, den Verlust der Lateralwurzelbildung und schließlich den totalen Kollaps des Wurzelmeristems hervorruft (Abb. 3C und 7A).

Der polare Auxintransport wird durch die koordinierte Aktivität zahlreicher Auxin-Influx (AUX1) und Efflux (PIN) Carrier vermittelt, die Auxin über die Plasmamembran transportieren (Friml und Wisniewska, 2004; Blakeslee et al., 2005; Blilou et al., 2005). Eine Beeinträchtigung des AUX1-vermittelten Auxininfluxes in *emo-1* konnte jedoch nahezu ausgeschlossen werden, denn sowohl IAA als auch 2,4-D, die über AUX1 in die Zelle importiert werden, lösen eine Seitenwurzelbildung in induzierten *emo-1* Mutanten aus (C. Oecking, persönliche Mitteilung; Delbarre et al., 1996; Estelle, 1998; Marchant et al., 1999). Überdies ist in *emo-1* eine starke Auxin-induzierte GUS-Expression in Kotyledonen und der Wurzelspitze nachgewiesen worden (siehe dazu Abb. 8B3 und B6), Voraussetzung dafür ist ein Import von Auxin in die Zelle.



#### 4. Diskussion

Entscheidend für den Import von Auxin ist zudem ein elektrochemischer Protonengradient, der von der plasmamembranständigen  $H^+$ -ATPase aufgebaut wird. Die Aktivierung dieser Pumpe erfolgt durch die phosphorylierungsabhängige Assoziation von 14-3-3 Proteinen an deren C-terminale Autoinhibitor-domäne (Fuglsang et al., 1999; Svenes et al., 1999; Maudoux et al., 2000; Jelich-Ottmann et al., 2001; Palmgren et al., 2001; Borch et al., 2002). Somit lag die Vermutung nahe, dass möglicherweise die Inhibierung dieser Pumpe die Ursache für den RNAi Phänotyp ist. Demzufolge müsste man davon ausgehen, dass die Mitglieder der Epsilon Gruppe als Master-Regulatoren für die plasmamembranständige  $H^+$ -ATPase dienen.

Aus diesem Grund wurde mit pharmakologischen und genetischen Ansätzen überprüft, ob eine reduzierte ATPase Aktivität ursächlich für den Phänotyp der *emo* Mutanten ist. Die Inhibierung der membranständigen  $H^+$ -ATPase durch Behandlung des Wildtyps mit Vanadat (Chatterjee et al., 1992; Hicks und Parsons, 1992; Xu et al., 2013) konnte den Phänotyp der Mutanten nur bedingt reproduzieren. Es zeigte sich eine Reduktion des Wurzelwachstums, jedoch konnte weder ein verlängertes Hypokotyl noch epinastische Blätter beobachtet werden (siehe dazu Abb. 8A). Auch Auxin-responsive GFP- und GUS-Reporterlinien zeigten im Wildtyphintergrund nach Vanadatbehandlung keine wesentlichen Übereinstimmungen mit der induzierten *emo-1* Mutante (siehe dazu Abb. 8B und C). Somit sprechen die erhaltenen Ergebnisse gegen die Hypothese einer Inhibierung der plasmamembranständige  $H^+$ -ATPase.

Bemerkenswerterweise hatte zudem die Expression einer konstitutiv-aktiven  $H^+$ -ATPase in der *emo-1* Mutante nicht die Komplementation des Phänotyps zur Folge. Hier war lediglich eine leichte Verdickung, aber keine signifikante Verlängerung des Hypokotyls etiolierter *emo-1* Keimlinge zu beobachten (siehe dazu Abb. 9B und D).

Erstaunlich waren jedoch die Auswirkungen der Expression der C-terminal deletierten  $H^+$ -ATPase auf das Wachstum etiolierter Wildtypkeimlinge (verkürztes Hypokotyl, geöffnete Kotyledonen, kein Plumulahaken). Um zu überprüfen, ob diese Effekte tatsächlich auf eine Aktivierung des Enzyms zurückzuführen sind, wurde das Pilztoxin Fusicoccin verwendet. Fusicoccin ist, wie bereits erwähnt, ein Pilztoxin, das den Komplex zwischen der membranständigen  $H^+$ -ATPase und 14-3-3 Proteinen irreversibel stabilisiert, sodass das Enzym konstitutiv aktiv ist (Ballio et al., 1964; Aducci et al., 1995). In unseren Versuchen konnten, nach einer viertägigen Anzucht im Dunkeln auf Fusicoccinhaltigem Medium, die identischen Effekte bei Wildtyp und *emo-1* beobachtet werden (siehe dazu Abb. 9F und G), wie bereits mit dem Dexamethason-induzierten System. Dies spricht dafür, dass die beobachteten Effekte des Dexamethason-induzierten System auf eine Aktivierung der  $H^+$ -ATPase zurückzuführen sind.

Andere Arbeitsgruppen beschreiben hingegen eine Verlängerung des Hypokotyls nach Fusicoccinbehandlung (Hayashi et al., 2014; Hohm et al., 2014). Zu bedenken ist jedoch, dass sich diese Messungen nur auf eine 60 minütige (Hayashi et al., 2014: Hypokotyllängenmessung in mm/Stunde) bzw. eine 2-24 stündige (Hohm et al., 2014: Blaulichtbehandlung, Messung der Hypokotylkrümmung) Behandlungsdauer etiolierter Keimlinge beziehen und es sich bei den hier gezeigten Versuchen um eine Langzeitbehandlung handelt. Dies deutet

darauf hin, dass eine kurzzeitige Fusicoccinbehandlung zu einer Steigerung der Zellstreckung führt und nach längerer Wirkzeit ein negativer Effekt auf das Wachstum auftritt.

Eine konstitutiv-aktive Version der H<sup>+</sup>-ATPase kann demzufolge den Phänotyp der *emo-1* Mutante nicht komplementieren. Somit muß ausgeschlossen werden, dass die Epsilon-Mitglieder Masterregulatoren der membranständigen H<sup>+</sup>-ATPase sind. Dies wird durch Oberflächenplasmonenresonanzanalysen (Surface Plasmon Resonance analysis) untermauert, die zeigen, dass die Isoformen der Non-Epsilon Gruppe effektiver an die Autoinhibitor-domäne der membranständigen H<sup>+</sup>-ATPase binden als die Vertreter der Epsilon Gruppe (Pallucca et al., 2014). Demzufolge muss davon ausgegangen werden, dass die Inhibierung der membranständigen H<sup>+</sup>-ATPase nicht ursächlich für den RNAi Phänotyp ist.

Eine weitere wichtige Komponente des Auxintransports sind PIN Proteine (Auxin Efflux Carrier). Sie zeichnen sich durch mehrere phosphorylierte Serinreste im zentralen hydrophilen Loop aus (Michniewicz et al., 2007; Dhonukshe, Zhang und Huang et al., 2010) und wären demzufolge geeignete Zielproteine für 14-3-3 Proteine. Eine direkte Interaktion zwischen dem hydrophilen Loop von PIN2 und 14-3-3 Proteinen konnte mittels des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems (Y2H) und der ratiometrischen bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (rBiFC) nicht nachgewiesen werden (siehe dazu Kapitel 3.1.5.2 und Abb. 10 und 11). Zu bedenken ist jedoch, dass diese Analysen nicht in *Arabidopsis*, sondern in Hefe und Tabak stattgefunden haben. Nichtsdestotrotz wurden beide Systeme bereits erfolgreich eingesetzt, um Interaktionen zwischen dem hydrophilen Loop von PIN2 und möglichen Interaktionspartnern zu detektieren (P-glycoprotein (PGP); dynamin-related proteins (DRPs); Blakeslee et al., 2007; Mravec et al., 2011). Somit ist festzuhalten, dass zumindest mit den hier angewandten Verfahren keine Interaktion zwischen PIN und 14-3-3 Proteinen festgestellt werden konnte.

Zur weiteren Analyse und im Besonderen um die subzelluläre Lokalisation von PIN Proteinen zu analysieren wurden *PIN::PIN-GFP* Linien (PIN1 und PIN2) generiert. Dabei konnte eine schwache Misexpression von PIN1 und PIN2 Proteinen in der induzierten *emo-1* Mutante beobachtet werden (siehe dazu Abb. 12). Misexpressionen bzw. Mislokalisationen von PIN-Transportern konnte bereits in *pin* Mutanten (*pin1,2,7*) und bei Wildtypkeimlingen nach Behandlung mit dem Auxintransportinhibitor NPA detektiert werden. Nach Vieten et al. 2005 ist dies auf eine Redundanz der Transporter zurückzuführen, dass heißt, die Carrier ersetzen sich gegenseitig, um ein Auxinmaximum in der Wurzelspitze zu erhalten. Dieser Effekt spricht jedoch für eine Folgereaktion aufgrund der gestörten Auxinhomöostase in *emo-1*.

Immunodetektionen mikrosomaler Proteine zeugen von einem stark erhöhten Gehalt an PIN1 bzw. PIN2 Proteinen in induzierten *emo-1* Keimlingen im Vergleich zum Wildtyp (siehe dazu Abb. 13A und B). Dieser steht jedoch in keinem Verhältnis zur detektierten Misexpression. Eine modifizierte Transkription konnte als Ursache für die erhöhte PIN-Proteinmenge ausgeschlossen werden (siehe dazu Abb. 13D). Folglich scheinen PIN1 und PIN2 Proteine in der *emo-1* Mutante stabilisiert zu sein. Eine Stabilisation von PIN2 wurde bereits in dem

#### 4. Diskussion

starken *pin2* Allel WAV6-52 beschrieben (Abas et al., 2006). Die *wav6-52* Mutante weist genau wie die *emo-1* Mutante ein agravitropes Wurzelwachstum, eine ektopische Expression von *DR5<sub>rev</sub>::GFP* in der lateralen Wurzelhaube, eine Stabilisation von PIN2 Proteinen in mikrosomalen Membranen und eine unveränderte Transkription von PIN2 Genen auf. Zurückzuführen sind die Effekte in der *wav6-52* Mutante auf einen einzelnen Aminosäureaustausch in PIN2 (Glycin zu Glutamat an Position 541), der möglicherweise dazu führt, dass PIN2 nicht effizient proteolytisch degradiert werden kann.

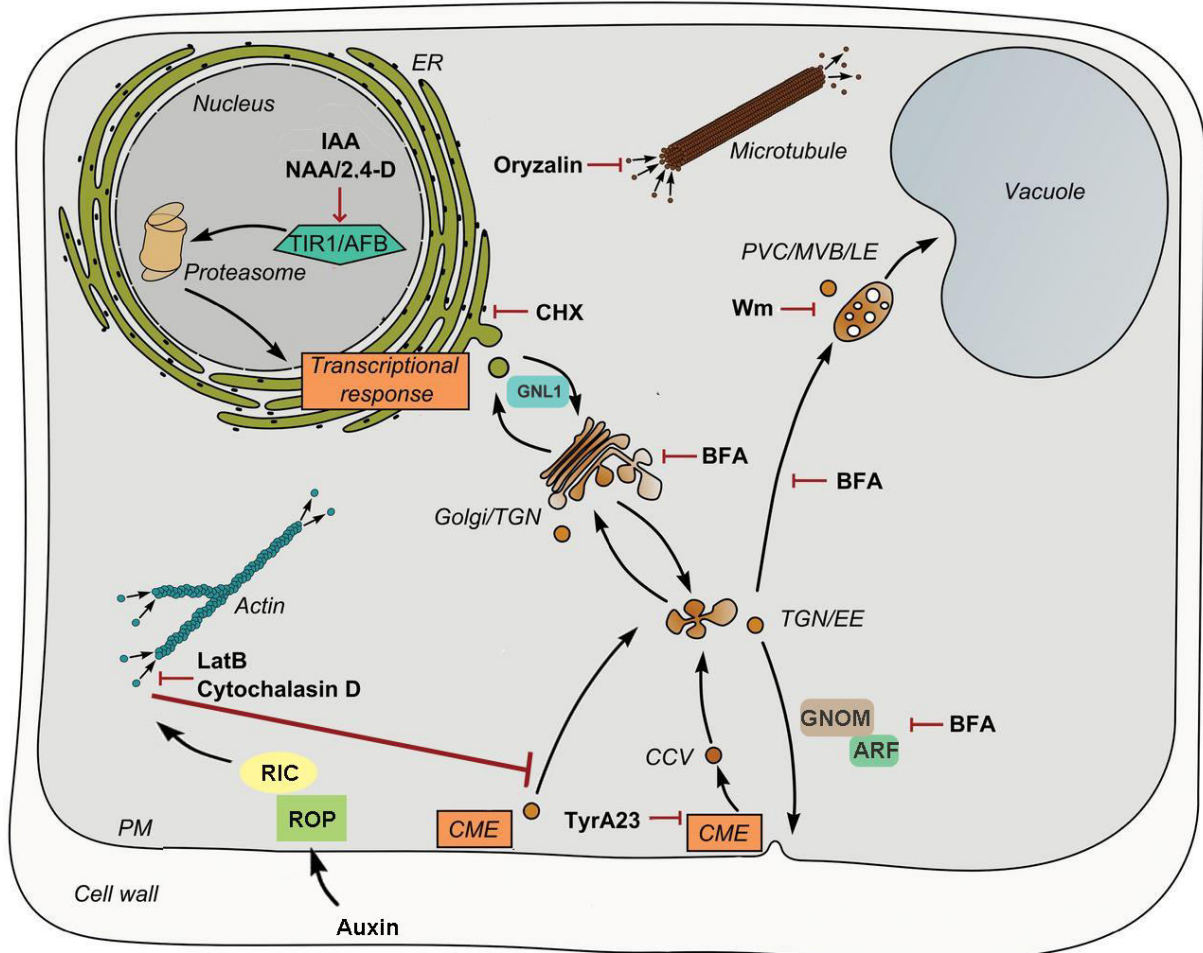
Sollte dies auch bei *emo* der Fall sein und PIN Proteine nicht mehr in der Vakuole abgebaut werden (Sieberer T, et al., 2000; Abas L, et al., 2006; Malenica et al., 2007; Kleine-Vehn et al., 2008; Laxmi et al., 2008), hätte dies die beobachtete Stabilisation zur Folge.

Um PIN-GFP Proteine in der Vakuole zu visualisieren, wurden die Keimlinge für 24 Stunden im Dunkeln inkubiert. Diesbezüglich wird davon ausgegangen, dass es aufgrund einer verminderten Aktivität der vakuolären Pumpen, sprich der vakuolären H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase/VHA, vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase) und der H<sup>+</sup>-Pyrophosphatase (PPase/AVP, *Arabidopsis* vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase), zu einem Anstieg des pH-Werts in der Vakuole kommt (Hedrich et al., 1986 und 1989; Hedrich und Schroeder, 1989; Sze et al., 1999; Maeshima, 2000) und GFP-getaggte Proteine sichtbar werden. Zusätzlich wurden die im Dunkeln inkubierten Pflanzen mit Inhibitoren des vakuolären Transports (vier Stunden Brefeldin A bzw. zwei Stunden Wortmannin der verbleibenden 24 stündigen Inkubationszeit im Dunkeln) behandelt. Und anschließend die verbleibenden GFP-getagkten Proteine in der Vakuole visualisiert. Brefeldin A (BFA) ist ein bekannter Inhibitor für spezifische ARF-GEFs (ADP ribosylation factor guanine nucleotide exchange factor), ihre Hemmung durch BFA bedingt eine Inhibition der Exozytose und des vakuolären Transports. Dies führt zu einer Akkumulation von Plasmamembranproteinen in so genannten BFA-Kompartimenten (Steinmann et al., 1999; Geldner et al., 2001 und 2003; Grebe et al., 2002). Wortmannin ist ein Inhibitor der Endozytose und des vakuolären Traffickings, Zielproteine sind dabei Phosphatidylinositol-3-Kinasen und Phosphatidylinositol-4-Kinasen (Matsuoka et al., 1995; Krinke et al., 2007; Takáč et al., 2012). In den Versuchen zeigte sich ein höheres Signal an PIN2-GFP in der Vakuole induzierter *emo-1* Keimlinge nach individueller Gabe beider Inhibitoren (siehe dazu Abb. 14A). Dies könnte auf eine verminderte Degradation und somit auf einen erhöhten pH-Wert in der Vakuole zurückzuführen sein, ausgelöst durch eine verminderte Aktivität oder Abundanz der vakuolären Pumpen. Immunodetektionen der beiden vakuolären Pumpen in mikrosomalen Membranen zeigten im Hinblick auf die Abundanz zwischen *emo-1* und Wildtyp keinen Unterschied (siehe dazu Abb. 14B). Durch anschließende Aktivitätstests konnte festgestellt werden, dass kein Unterschied in der Aktivität der vakuolären H<sup>+</sup>-ATPase besteht (siehe dazu Abb. 14D), jedoch die H<sup>+</sup>-Pyrophosphatase in *emo-1* kaum noch eine Aktivität aufweist (siehe dazu Abb. 14E). Nach Li et al. 2005 weist eine AVP1 (AVP, *Arabidopsis* vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase) Mutante (*avp1-1*) einen vergleichbaren Phänotyp zu *emo* auf. Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse von Ferjani anhand der *avp1/fugu5* „loss-of-function“ Mutante nur marginale Unterschiede zum Wildtyp, vielmehr scheint der detektierte Phänotyp von *avp1-1* allelspezifisch zu sein (Ferjani

et al., 2011). Die Hauptfunktion von AVP1 besteht nach Ferjani vornehmlich in der Hydrolyse von cytosolischem Pyrophosphat (PPi; Ferjani et al., 2011). AVP1 trägt dagegen kaum zum Aufbau eines elektrochemischen Protonengradient über den Tonoplasten bei (Martinoia et al., 2007 und 2012; Krebs et al., 2010; Etxeberria et al., 2012). Messungen des vakuolären pH-Werts mit BCECF-AM, einem Indikator für den vakuolären pH-Wert (Versuche wurden durch AG Schumacher durchgeführt; siehe dazu Abb. 14F), konnten nur einen sehr geringen vakuolären pH-Wert Unterschied zwischen *emo-1* Keimlingen (mit und ohne Ethanol) detektieren. Um zu überprüfen, ob eine proteolytische Degradation von PIN2 in der Vakuole stattfinden kann, wurden mikrosomale Membranen aus Keimlingen hergestellt, die man nach Transfer auf Ethanolhaltigem Medium entweder drei Tage im Dauerlicht oder für die letzten 24 Stunden der Inkubationszeit im Dunkeln inkubiert hatte (siehe dazu Abb. 14C). Denn trotz verminderter Aktivität der vakuolären Pumpen im Dunkeln kann nach Laxmi et al. 2008 ein Abbau in der Vakuole stattfinden. Dies konnte er anhand der *det3-1* (de-etiolated) Mutante belegen, denn diese weist eine Beeinträchtigung der vakuolären H<sup>+</sup>-ATPase auf, dies führt zu einer verminderten vakuolären Funktion. Im Dunkeln inkubierte Wildtyp Keimlinge zeigten demnach ein deutlich schwächeres PIN2-GFP Signal in der Vakuole, als die *det3-1* Mutante. Die PIN2-GFP Immundetektionen zeigen, dass sowohl bei Wildtyp als auch bei *emo-1* ein Abbau von PIN2 im Dunkeln stattfinden kann (siehe dazu Abb. 14C). Abschließend lässt sich zusammenfassend sagen, dass es möglicherweise zu einer leichten Alkalisierung des vakuolären pH-Wertes kommt, jedoch kann die proteolytische Degradation von Proteinen noch erfüllt werden. Somit kann auch die Vakuole bzw. der vakuoläre pH-Wert keine grundlegende Ursache für das Auxintransportproblem in *emo-1* sein.

Der hohe PIN-Gehalt in *emo-1* Mikrosomen kann gegebenenfalls auf Defekte in intrazellulären Vesikeltransportwegen beruhen. PIN Proteine sind in der Plasmamembran lokalisiert, können aber durch kontinuierliche Endozytose und Rezyklierung ihre subzelluläre Polarität ändern (Feraru und Friml, 2008). Dies ist ein entscheidender Regulationsmechanismus für den polaren Transport von Auxin (Kleine-Vehn und Friml, 2008). PIN Proteinen werden Clathrin-abhängig endozytiert (Dhonukshe et al., 2007) und durch die ARF-GEF-abhängige Exozytose vom TGN (Trans-Golgi Netzwerk, trans-golgi network) in REs (recycling endosomes) zurück zur Plasmamembran rezykliert (guanine-exchange factor of ADP-ribosylation factor; Geldner et al., 2001). ARF-GEFs sind essenziell für die Formierung von Vesikeln, unter den acht ARF-GEFs in *Arabidopsis* ist GNOM/*EMBRYO DEFECTIVE30* (*EMB30*) das einzige ARF-GEF, das essenziell für die basale PIN-Rezyklierung zuständig ist, während die apikale PIN und AUX1 Lokalisation und Dynamik in *gnom* Mutanten nicht betroffen ist (Fischer et al., 2006; Kleine-Vehn et al., 2006). Werden die PIN Proteine nicht zur Plasmamembran rezykliert, erfolgt ein Transport über das TGN zu den MVBs (multivesikulären Körperchen, multivesicular bodies), dort findet eine weitere Sortierung statt, entweder zurück zum TGN, oder zur endgültigen Degradation in die lytische Vakuole (Murphy et al., 2005; Jürgens und Geldner, 2007; Schellmann und Pimpl, 2009; Reyes et al., 2011; Robinson und Pimpl, 2013).

#### 4. Diskussion



**Abb. 20: Intrazellulärer Vesikeltransport von PIN Proteinen in *Arabidopsis thaliana***

Internalisierte PIN Proteine durchlaufen eine endozytische Sortierung von der Plasmamembran in frühe Endosomen. Diese sind Teil des Trans-Golgi Netzwerk (TGN/EE, trans-golgi network/ early endosome), von hier aus kann eine Rezyklierung zur Plasmamembran stattfinden, oder eine Ausbildung von multivesikulären Körperchen (PVC/MVB/LE; prevacuolar compartments/multivesicular bodies/late endosomes). Dort kann eine weitere Sortierung stattfinden, entweder zurück zum TGN, oder zur endgültigen Degradation in der lysischen Vakuole. Mithilfe von Inhibitoren ist es möglich, verschiedene intrazelluläre Vesikeltransportprozesse zu hemmen: Brefeldin A (BFA); Cycloheximid (CHX); Tyrphostin A23 (Tyr A23); Wortmannin (WM); Lantrunculin (LatB); Indol-3-Essigsäure (IAA); 1-Naphthylessigsäure (NAA); 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D).

endoplasmatisches Retikulum (ER); pre-vacuolar compartments (PVCs); clathrin-mediated endocytosis (CME); Rho-like GTPase (ROP); ROP-interactive CRIB motif-containing protein (RIC); Plasmamembran (PM); ADP-ribosylation factor (ARF); GNOM-LIKE 1 (GNL1).

Quelle: Doyle et al., 2015; die Abbildung wurde teilweise modifiziert)

Geeignete Inhibitoren erlauben eine spezifische Hemmung ausgesuchter intrazellulärer Vesikeltransportprozesse (siehe dazu Abb. 20). Interessanterweise hat die Behandlung der bereits erwähnten Inhibitoren BFA und WM zur Folge, dass sich die immunologisch nachweisbare Menge an PIN-Proteinen signifikant in mikrosomalen Membranen erhöht (Kleine-Vehn et al., 2008). Somit könnten Störungen in intrazellulären Transportprozessen ursächlich für die stark erhöhten PIN-Proteinmengen in *emo-1* sein.

Bei zeit- und konzentrationsabhängigen Versuchen unter Verwendung von BFA konnte festgestellt werden, dass die Akkumulation von PIN2-GFP in BFA-Kompartimenten in der *emo-1* Mutante signifikant gegenüber dem Wildtyp erhöht ist (siehe dazu Abb. 15). Als Ursache dafür könnte eine Steigerung des sekretorischen Weges, eine vermehrte Endozytose, eine verminderte Rezyklierung zurück zur Plasmamembran oder ein reduzierter Transport zur Vakuole sein.

Eine Modifikation der Sekretion konnte ausgeschlossen werden, da die beobachteten Effekte auch in Gegenwart des Proteinbiosyntheseinhibitors Cycloheximid nachweisbar waren.

Eine vermehrte Endozytose kann, wie beispielsweise bei den ROP6 bzw. RIC1 Mutanten (ROP/Rho-like GTPase; RIC/ROP-interactive CRIB motif-containing protein; vermitteln die Clathrin Assoziationen mit der Plasmamembran für die Clathrin-vermittelte Endozytose und die Feedback-Regulation durch Auxin; Chen et al., 2012) ursächlich für eine erhöhte BFA-Sensitivität sein. Aus diesem Grund wurde die Endozytose mit Hilfe von FM4-64, einem lipophilen Styrylfarbstoff (Vida und Emr, 1995) mit dem man das endocytische Trafficking sichtbar machen kann, überprüft. Dabei zeigte sich nach Kurzzeitversuchen kein Unterschied zwischen Wildtyp und der *emo-1* Mutanten, folglich kann eine vermehrte Endozytose ausgeschlossen werden.

Ein Grund für die vermehrten Akkumulationen von PIN2 Proteinen in BFA-Kompartimenten in der *emo-1* Mutante könnte in einer verminderten Rezyklierung von PIN Proteinen vom TGN zurück zur Plasmamembran liegen. Vergleichbar dazu ist die dominante *bex5* (BFA-visualized exocytic trafficking defective) Mutante, die ein „missense“ Mutation aufweist, welche zu einer Störung des konservierten Sequenzmotivs der kleinen GTPase (RabA1b, RAS GENES FROM RAT BRAINA1b) führt. Kleine GTPasen sind eine Art molekularer Schalter in der Signaltransduktionskette und liegen bei der Bindung von GTP (Guanosintriphosphat) in aktiver und bei der Bindung von GDP (Guanosindiphosphat) in deaktivierter Form vor. *Bex5* zeigt genauso wie *emo-1* eine vermehrte Proteinakkumulation in unförmigen BFA-Kompartimenten. Ihre Hauptaufgabe soll in der Regulation des Transports vom TGN/EE zur Plasmamembran bestehen (Feraru et al., 2012; Tanaka et al., 2014). Aus diesem Grund wurden BFA-Washout Versuche durchgeführt, denn es ist bekannt, dass das Auswaschen von BFA (BFA-Washout) zu einer Relokalisation von PIN Proteinen zurück an die Plasmamembran führt (Geldner et al., 2001; Gang und Hong-Wie, 2007). Dabei konnte bei *emo-1* im Vergleich zum Wildtyp eine verlangsamte Rezyklierung von PIN2-GFP Proteinen zurück an die Plasmamembran detektiert werden (siehe dazu Abb. 17). Jedoch ist eine verlangsamte Rezyklierung keine Erklärung für die erhebliche Stabilisation von PIN Proteinen in mikrosomalen Membranen.

Die vermehrte Akkumulation von PIN2-GFP in BFA-Kompartimenten könnte gegebenenfalls auf einen verminderten Transport zur Vakuole hindeuten, wie bei der Mutante HAPLESS13 (*Arabidopsis*  $\mu$ 1 Adaptin AP1M2 auch *HAPLESS13* (*HAP13*)) eine AP-Mutante (Park et al., 2013; Teh et al., 2013; Wang et al., 2013). So genannte Adapter Proteine (adapter protein, AP) koppeln Ladungen mit Mantelproteinen um Komplexe zu formen (Rothman et al., 1996; Simpson et al., 1996; Drake et al., 2000). Infolgedessen wurden Langzeitversuche mit FM4-64 (mit und ohne BFA) durchgeführt, mit dem Ergebnis, dass der Transport zur Vakuole

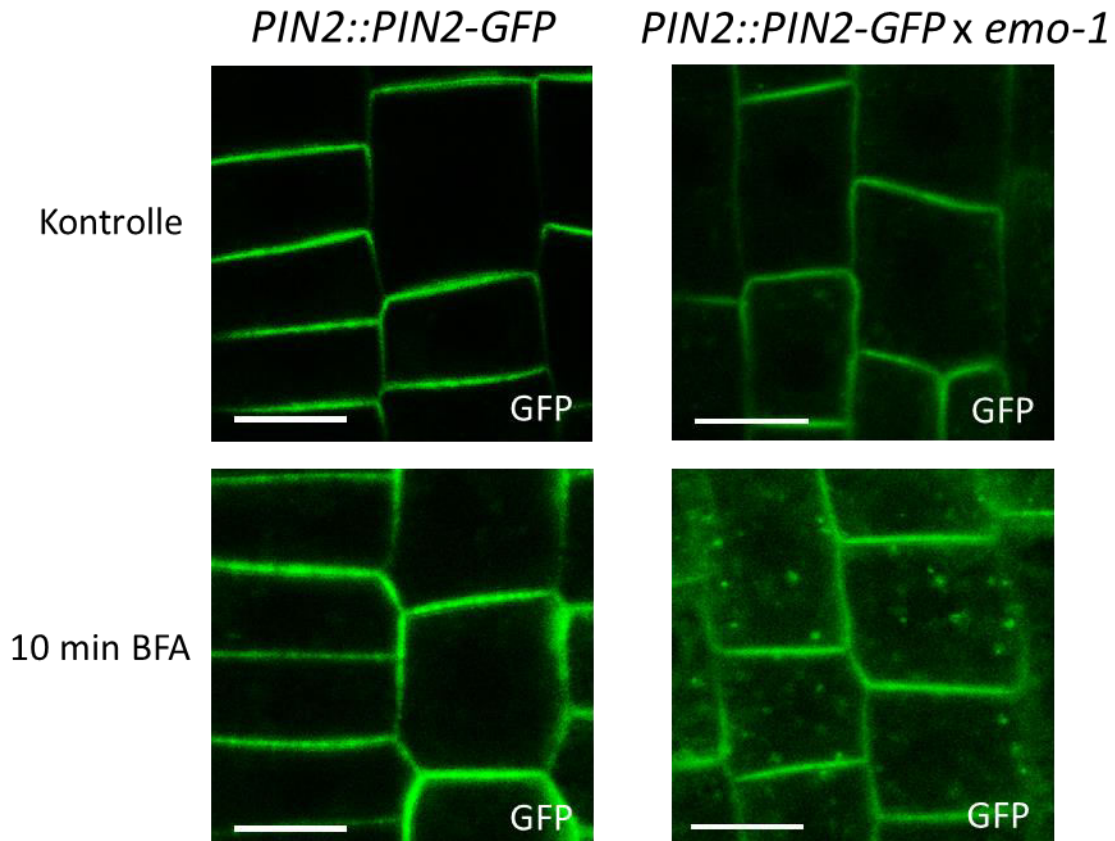
#### 4. Diskussion

(siehe dazu Abb. 19) verlangsamt ist. Über ARA7 Kreuzungen (ARA7/AtRabF2b ist ein Mitglied der kleinen Rab5 GTPasen und ist Teil des vakuolären Transportweges, dient als Marker für MVBs) konnte nach Wortmanninbehandlung (Wortmannin löst ein Anschwellen und eine Fusion der MVBs aus, dies führt zur Bildung von WM-Kompartimenten) ein Clustern der deutlich kleineren MVBs bei *emo-1* detektiert werden (siehe dazu Abb. 18B und D). Dies spricht möglicherweise dafür, dass Vesikel/Endosomen bzw. MVBs nicht mehr richtig vom TGN abgeschnürt werden können. Zusätzlich lässt sich eine Unförmigkeit von BFA-Kompartimenten erkennen (siehe dazu Abb. 18A). Normalerweise befindet sich im Zentrum der BFA-Kompartimente das TGN (Trans-Golgi Netzwerk), welches von Golgi Stapeln und MVBs/LE (multivesicular bodies/late endosomes) umgeben ist (Robinson et al., 2008). In *emo-1* ist dieser Aufbau nicht mehr klar erkennbar. Dieses spricht ebenfalls dafür, dass eine Störung bei der Abschnürung von Vesikel/Endosomen/MVBs vom TGN bestehen könnte.

Zudem zeigen *emo-1* Zellen mit GFP-getaggtten PIN Proteinen im cytoplasmatischen Raum ohne Behandlung ein eher diffuses Bild in den mikroskopischen Untersuchungen (siehe dazu Abb. 21), was möglicherweise dafür spricht, dass Vesikel/Endosomen nicht mehr richtig mit Membranen fusionieren können. So zeigt sich nach einer Kurzzeitbehandlung mit niedrigen BFA-Konzentrationen (10 min/10 mM BFA; siehe dazu Abb. 21) bereits deutlich erkennbare vesikuläre PIN2-GFP Akkumulationen, während im Wildtyp kaum eine Änderung zu detektieren ist. Erstaunlicherweise konnte zudem mit Tyrphostin A23 in Kombination mit BFA in *emo-1* (siehe dazu Abb. 16) eine Lokalisation von PIN2 in BFA-Kompartimenten beobachtet werden.

Tyrphostin A23 ist ein Endozytoseinhibitor und inhibiert die Interaktion der  $\mu 2$  Untereinheit vom Clathrin-Bindungs-AP-2 Adapter Komplex und dem endocytischen Motiv (Motley et al., 2003; Ortiz-Zapater et al., 2006; Dhonukshe et al., 2007; Titapiwatanakun et al., 2009; Dambournet et al., 2011). Dies führt beim Wildtyp dazu, dass PIN Proteine nicht mehr in BFA-Kompartimenten lokalisiert sind. Hingegen kommt es bei der *emo-1* Mutante zu einer Akkumulation von PIN2-GFP in BFA-Kompartimenten (siehe dazu Abb. 16), grundlegend dafür kann jedoch keine vermehrte Endozytose sein, denn diese wurde mit FM4-64 bereits überprüft. Untersuchungen von Dhonushke et al. 2007 konnten jedoch zeigen, dass nach Gabe von Tyrphostin A23 noch TGN/EE/RE in BFA-Kompartimenten zu finden sind. Dies konnte er anhand von TGN/Endosomen Markern (GNOM/ARF1 (ADP-ribosylation factor, lokalisiert am Golgi und TGN, VHA-a1/vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases-a1) belegen. Somit können folglich nur mit PIN2-GFP besetzte Vesikel in den BFA-Kompartimenten akkumulieren, die sich im cytoplasmatischen Raum befinden und bereits vor der Behandlung mit Tyrphostin A23 endozytiert wurden (Dhonushke et al., 2007). Dies unterstützt die Vermutung, dass sich in *emo-1* Mutanten eine Vielzahl von freien PIN2-besetzten Vesikeln im cytoplasmatischen Raum befinden, die zur Formierung von BFA-Kompartimenten (intrazelluläre vesikuläre Strukturen) nach Endozytoseinhibitorgabe führen.

Die deutlich stärkere Hemmung mit dem Endozytoseinhibitor NAA gegenüber Tyrphostin A23 bei der Mutante (verminderte Anzahl von BFA-Kompartimenten und das deutlich schwächere PIN2-GFP-Signal in BFA-Kompartimenten) lässt sich anhand der unter-



**Abb. 21: PIN2-GFP in Wildtyp (*PIN2::PIN2-GFP*) und der *emo-1* Mutante (*PIN2::PIN2-GFP x emo-1*) ohne (Kontrolle) und mit BFA-Behandlung**

Epidermiszellen vier Tage alter WT (*PIN2::PIN2-GFP*) und *emo-1* (*PIN2::PIN2-GFP x emo-1*) Keimlinge, die auf 1x MS-Medium mit 1 % Saccharose und 0,1 % (v/v) EtOH angezogen wurden. Die Keimlinge wurden vor der mikroskopischen Untersuchung wie folgt behandelt: 10  $\mu$ M BFA und 2  $\mu$ M FM4-64 für 10 Minuten (Maßstab=10  $\mu$ m; Aufnahmen: Epidermiszellen, Confocal SP8).

schiedlichen Wirkmechanismen begründen. NAA wirkt im Gegensatz zu Tyrphostin A23 nämlich indirekt über ROP (Rho-like GTPase) und seinen Effektor RIC (ROP-interactive CRIB motif-containing protein). ROP wird durch Auxin aktiviert, der aktivierte ROP-RIC Weg inhibiert die Internalisation von PIN Proteinen durch die stabilisierende Wirkung von RIC auf F-Aktin. Zudem soll die inhibierende Wirkung von NAA ebenfalls auf das endosomale Trafficking Einfluss nehmen (Chen et al., 2012; PIN1/ARA7-markierte Vesikel zu Recycling-Vesikel/leaf epidermal pavement cells; Nagawa et al., 2012). Durch diese Stabilisation von Aktin wird somit zum einen die Clathrin-vermittelte Endozytose unterbunden und zum anderen kann auch der Transport von bereits endozytierten Vesikeln über Aktin nicht mehr stattfinden. Folglich können sich Vesikel/Endosomen im Cytoplasma nicht mehr effektiv zu BFA-Kompartimenten formen.

Diese Ergebnisse sprechen somit dafür, dass Vesikel in *emo-1* nicht mehr effektiv mit der Plasmamembran bzw. generell mit Membranen fusionieren können. Auch hier könnte eine mögliche Ursache bei den Rab GTPasen liegen. Rab GTPasen sind kleine GTPasen, die zur Ras Superfamilie gehören, sie spielen eine Rolle im „membrane trafficking“, indem sie das „Tethering“ und die Fusion von Transportvesikeln und Organellen zu Zielmembranen



#### 4. Diskussion

vermitteln. Zu den Rab GTPasen gehören das pflanzenspezifische ARA6 (RabF1), ARA7 (RabF2b) und RHA1 (RabF2a), dabei sind die beiden letztgenannten ortholog zum tierischen Rab5 (Ueda et al., 2001; Vernoud et al., 2003). ARA6, ARA7 und RHA1 sind an MVBs lokalisiert (Ueda et al., 2004; Lee et al., 2004; Haas et al., 2007; Ebine et al., 2011; Bottanelli et al., 2011 und 2012). Einzelmutanten wie *ara7*, *rha1* und *ara6* weisen gegenüber Wildtyp keinen Unterschied auf, was möglicherweise auf eine funktionelle Redundanz zwischen den Rab5 Mitgliedern zurückzuführen ist. Jedoch sind Doppelmutanten wie *ara7rha1* oder knockout Aktivator Mutanten wie AtVPS9a (*VACUOLAR PROTEIN SORTING 9a* (*VPS9a*)) ist dabei ein Aktivator von allen Rab5 Mitgliedern in *A. thaliana*) letal (Goh et al., 2007; Ebine et al., 2011; Inoue et al., 2013). Zudem konnte in Mammalia Zellen festgestellt werden, dass 14-3-3 $\zeta$  (14-3-3 zeta) an p85, eine regulatorische Untergruppe von PI3-Kinasen (PI3K, Phosphoinositid-3-Kinasen) bindet, diese aktiviert und somit die PI3K Translokation zur Zellmembran erhöht (Neal et al., 2012). Diese wiederum soll Rab5 aktivieren (Runyan et al., 2012).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass es wahrscheinlich ist, dass mehrere Interaktionspartner in den Vesikeltransportprozessen durch die Reduktion der Expression der drei 14-3-3 Isoformen (epsilon, mu, omicron) betroffen sind. Denn schließlich wurde eine komplette phylogenetische Gruppe fast vollständig ausgeschaltet, der zudem grundlegende eukaryotische Funktionen zugesprochen werden. Welche spezifischen Proteine dabei beteiligt sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht herausgefunden werden. Hauptprobleme des Auxintransports scheinen jedoch insbesondere im Bereich von TGN und Transportvesikeln zu liegen. Die erhaltenen Ergebnisse deuten möglicherweise auf Schwierigkeiten bei der generellen Abschnürung bzw. Fusion von Vesikeln/Endosomen und auf eine gestörte Reifung der MVBs hin. Wie bei der *gnom* Mutanten kann auch bei *emo* nicht davon ausgegangen werden, dass die Störung im Auxintransport nicht ein sekundärer Effekt ist, der sich manifestiert und den eigentlichen Defekt bzw. die Defekte in den Hintergrund setzt (Shevell et al., 2000). So könnten möglicherweise Probleme im Zytoskelett bestehen, denn Interaktionstests bei Eukaryoten zeigen, dass direkte bzw. indirekte Interaktionen zwischen 14-3-3 Proteinen und Komponenten des Zytoskeletts detektierbar sind (Dorner et al., 1999; Kent et al., 2010; Robinson, 2010; Sluchanko und Gusev, 2010; Pignocchi et al., 2011; Lee et al., 2015).

Um einen genaueren Einblick darüber zu bekommen, welche Interaktionspartner in der *emo* Mutanten betroffen sind, müssen noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Die amiRNAi Linien bieten eine Möglichkeit eine Komplementation mit einzelnen Isoformen, sprich epsilon, mu und omicron durchzuführen und somit herauszufinden, welche Isoform den meisten Einfluss auf *emo* hat und zu einer Normalisierung des *emo* Phänotyps führt. Mithilfe eines Protein-Tags an den unterschiedlichen Isoformen könnte zudem eine Co-Immunpräzipitation durchgeführt und mögliche 14-3-3/Zielproteinkomplexe aus Pflanzen isoliert werden.

Ergänzende EM-Untersuchungen könnten ein detaillierteres Bild über mögliche Fusions- und Abschnürungsprobleme geben. Zudem sind Endosomen dadurch genauer im Detail (Form,

PIN2-GFP-Signalstärke und Menge) verifizierbar. Zusätzliche PIN2-GFP Markierungen in den EM-Aufnahmen (mit NAA und Tyrphostin A23 in Verbindung mit und ohne BFA) würden im Bezug auf die Menge der endozytierten Vesikel einen weiteren Einblick bieten und den inhibierenden Effekt von Tyrphostin A23 und NAA auch bei *emo-1* untermauern.

Auch sollten noch weitere Untersuchungen bezüglich des Zytoskeletts stattfinden, wie eine Anfärbung von Aktin und Tubulin, um noch einen genaueren Aufschluss zu bekommen, ob im Zytoskelett und somit im grundlegenden Vesikeltransport ein Problem besteht.

Um die Spezifität der Stabilisation von PIN Proteinen zu untermauern, sollten zusätzlich andere rezyklierende Membranproteine untersucht werden, die einen ähnlichen Transportweg wie PIN Proteine aufweisen.

## 5. Zusammenfassung

14-3-3 Proteine bilden eine Familie von hoch konservierten regulatorischen Molekülen, die in allen Eukaryoten exprimiert werden. Sie sind Phosphoserin/threonin Sensoren und modifizieren die Aktivität ihrer Zielproteine. In *Arabidopsis thaliana* werden 13 hoch homologe Isoformen exprimiert, die in zwei phylogenetische Gruppen unterteilt werden, die Epsilon und die Non-Epsilon Gruppe.

In dieser Arbeit sollte die Funktion und die genaue Bedeutung der 14-3-3 Epsilon Gruppe im Hinblick auf Wachstums- und Differenzierungsprozesse in *Arabidopsis thaliana* analysiert werden. Diesbezüglich wurde eine RNAi-Mutante untersucht, die eine ethanolabhängige Reduktion der Expression der drei Isoformen epsilon, mu und omicron führt. Diese *emo*-Mutante (drei unabhängige *emo*-Linien: *emo-1*, *emo-2* und *emo-3*; *emo-1* diente als Grundlage für alle weiteren Versuche und Kreuzungen) zeigt als Folge einer Ethanolinduktion einen pleiotropen Phänotyp, der sich im Licht durch epinastische Kotyledonen, ein verlängertes Hypokotyl und ein verkürztes Wurzelwachstum ohne Lateralwurzeln und im Dunkeln durch ein verkürztes Hypokotyl ohne Plumulahaken auszeichnet. Auf der Grundlage physiologischer Experimente und Untersuchungen und unter Einsatz von Auxin-responsiven Reportern (*DR5::GUS*, *DR5<sub>rev</sub>::GFP*) konnte eine Inhibierung des polaren Auxintransports als ursächlich für den *emo* Phänotyp aufgezeigt werden. Die Reduktion der Expression von *emo* führt demnach zu einer Akkumulation von Auxin in den oberirdischen Pflanzenteilen während die Wurzel an Auxin verarmt.

14-3-3 Proteine sind als Aktivatoren des plasmamembranständigen H<sup>+</sup>-ATPase bekannt, deren Aktivität entscheidend für den Import von Auxin in die Zelle und damit sekundär für den gerichteten Export ist. Pharmakologische und insbesondere genetische Ansätze, die eine induzierbare Expression einer konstitutiv aktiven H<sup>+</sup>-ATPase ermöglichen, machte deutlich, dass eine Inhibierung des Enzyms als Folge der reduzierten 14-3-3 Expression nicht die Ursache des *emo*-Phänotyps ist. Ebenso konnte mittels rBiFC und Y2H Experimente keine direkte Interaktion zwischen 14-3-3 und PIN Proteinen, bekannte Auxin Effluxcarrier, nachgewiesen werden. Immunologische Untersuchungen von *PIN::PIN-GFP* Linien zeigten jedoch, dass der PIN Gehalt in Mikrosomen aus ethanolinduzierten *emo*-Keimlingen signifikant gegenüber den Kontrollen gesteigert ist. Da dies nicht auf eine veränderte Transkription zurückzuführen war, wurden nachfolgend vesikuläre Transportprozesse im Detail analysiert. Die *in vivo* Visualisierung von PIN2 auf der zellulären Ebene in Kombination mit Vesikeltransportinhibitoren wie Brefeldin A und Wortmannin oder endosomale Markerproteine zeigte eindeutig, dass die reduzierte Expression von 14-3-3 Epsilon Mitgliedern eine Hemmung multipler endocytischer Transportwege zur Folge hat. So lassen sich Defekte im Transportweg vom TGN zur Vakuole sowie zur Plasmamembran nachweisen. Demzufolge sind 14-3-3 Epsilon Mitglieder für den endocytischen Vesikeltransport in pflanzlichen Zellen somit für Wachstums- und Differenzierungsprozesse von entscheidender Bedeutung.

## 6. Literatur

- Abas L., Benjamins R., Malenica N., Paciorek T., Wiśniewska J., Moulinier-Anzola J.C., Sieberer T., Friml J. und 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.
- Adams E., Diaz C. und Hong J. Y. und Shin R. (2014). 14-3-3 Proteins Participate in Light Signaling through Association with PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS. *Int. J. Mol. Sci.* 15 (12): 22801–22814.
- Aducci P., Camoni L., Marra M. und Visconti S. (2002). From cytosol to organelles: 14-3-3 proteins as multifunctional regulators of plant cell. *Iubmb Life* 53: 49–55.
- Aducci P., Marra M., Fogliano V. und Fullone M.R. (1995). Fusicoccin receptors: perception and transduction of the fusicoccin-signal. *J. Exp. Bot.*, 46: 1463–1478.
- Aitken A., Collinge D. B., van Heusden B. P H., Isobe T., Roseboom P. H., Rosenfield G. und Soll J. (1992). 14-3-3 proteins: a highly conserved widespread family of eukaryotic proteins. *Trends Biochem Sci* 17: 498–501
- Aitken A., Howell S., Jones D., Madrazo J., Martin H., Patel Y. und Robinson K. (1995). Post-translationally modified 14-3-3 isoforms and inhibition of protein kinase C. *Mol. Cell. Biochem.* 149–150 41–49.
- Alsterfjord M., Sehnke P.C., Arkell A., Larsson H., Svennelid F., et al. (2004) Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase and 14-3-3 isoforms of *Arabidopsis* leaves: evidence for isoform specificity in the 14-3-3/H<sup>+</sup>-ATPase interaction. *Plant Cell Physiol* 45: 1202–1210.
- Aoyama T. und Chua N.-H. (1997). A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J.* 11: 605–612.
- Bachmann M., Huber J. L., Athwal G. S., Wu K., Ferl R. J. und Huber S. C. (1996a). 14-3-3 proteins associated with the regulatory phosphorylation site of spinach leaf nitrate reductase in an isoform-specific manner and reduced dephosphorylation of Ser-543 by endogenous protein phosphatases. *FEBS Lett.* 398: 26–30.
- Bachmann M., Huber J. L., Liao P.-C., Gage D. A. und Huber S. C. (1996b). The inhibitor protein of phosphorylated nitrate reductase from spinach (*Spinacia oleracea*) leaves is a 14-3-3 protein. *FEBS Lett.* 387: 127–131.
- Bai M. Y., Zhang L. Y., Gampala S. S., Zhu S. W., Song W. Y., Chong K. und Wang Z. Y. (2007). Functions of OsBZR1 and 14-3-3 proteins in brassinosteroid signaling in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 13839–13844.
- Bak S., Nielsen H. L. und Halkier B. A. (1998). The presence of CYP79 homologs in glucosinolate-producing plants shows evolutionary conservation of the enzymes in the conversion of amino acid to aldoxime in the biosynthesis of cyanogenic glucosides and glucosinolates. *Plant Mol Biol* 38: 725–734.
- Bak S., Tax F. E., Feldmann K. A., Galbraith D. W. und Feyereisen R. (2001). CYP83B1, a cytochrome P450 at the metabolic branchpoint in auxin and indole glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 13: 101–111.
- Ballio A., Chain E.B., De Leo P., Erlanger B.F., Mauri M., et al. (1964) Fusicoccin: a new wilting toxin produced by *Fusicoccum amygdali* Del. *Nature*, 203, 297.

## 6. Literatur

- Banks J. A., Nishiyama T., Hasebe M., Bowman J.L., Gribskov M., dePamphilis C., Albert V.A., Aono N., Aoyama T., Ambrose B.A., et al. (2011). The Selaginella genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants. *Science* 332: 960–963.
- Barlier I., Kowalczyk M., Marchant A., Ljung K., Bhalerao R., Bennett M., Sandberg G. und Bellini C. (2000). The SUR2 gene of *Arabidopsis thaliana* encodes the cytochrome P450 CYP83B1, a modulator of auxin homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 14819–14824.
- Baxter I., Tchieu J., Sussman M. R., Boutry M., Palmgren M. G., Gribskov M., Harper J. F. und Axelsen K. B. (2003). Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol* 132: 618–628.
- Belkhadir Y., Yang L., Hetzel J., Dangl J. L. und Chory J. (2014). The growth-defense pivot: crisis management in plants mediated by LRR-RK surface receptors. *Trends Biochem Sci.* 39 (10):447-456.
- Benkova E., Michniewicz M., Sauer M., Teichmann T., Seifertova D., Jürgens G. und Friml J. (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115: 591–602.
- Benzinger A., Popowicz G. M., Joy J. K., Majumdar S., Holak T. A. und 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
- Berleth, T. und Sachs, T. (2001). Plant morphogenesis: Long-distance coordination and local patterning. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 57–62
- Bihn E. A., Paul A. L., Wang S. W., Erdos G. W. und Ferl R. J. (1997). Localization of 14-3-3 proteins in the nuclei of *Arabidopsis* and maize. *Plant J.* 12: 1439–1445.
- Birnboim H.C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Meth.Enzym.* Vol. 100: 243-255.
- Birnboim H.C. und Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl.Acids Res.* Vol. 7: 1513-1523.
- Blakeslee J. J., Bandyopadhyay A., Lee O. R., Mravec J., Titapiwatanakun B., Sauer M., Makam S. N., Cheng Y., Bouchard R., et al. (2007). Interactions among PIN-FORMED and P-Glycoprotein Auxin Transporters in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19(1): 131–147.
- Blakeslee J.J., Peer W.A., Murphy A.S. (2005). Auxin transport. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 8, pp. 1–7
- Blilou I., Xu J., Wildwater M., Willemsen V., Paponov I., Friml J., Heidstra R., Aida M., Palme K. und Scheres B. (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 433: 39–44.
- Boerjan W., Cervera M. T., Delarue M., Beeckman T., Dewitte W., Bellini C., Caboche M., Van Onckelen H., Van Montagu M. und Inzé D. (1995). Superroot, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. *Plant Cell* 7: 1405–1419.
- Borch J., Bych K., Roepstorff P., Palmgren M.G. und Fuglsang A.T. (2002). Phosphorylation-independent interaction between 14-3-3 protein and the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Biochemical Society Transactions* 30: 411–415.
- Bottanelli F., Foresti O., Hanton S. und Denecke J. (2011). Vacuolar transport in tobacco leaf epidermis cells involves a single route for soluble cargo and multiple routes for membrane cargo. *Plant Cell* 23: 3007-3025.

- Bottanelli F., Gershlick D. C. und Denecke J. (2012). Evidence for sequential action of Rab5 and Rab7 GTPases in prevacuolar organelle partitioning. *Traffic* 13: 338-354.
- Bowman B. J. und Slayman C. W. (1979). The effects of vanadate on the plasma membrane ATPase of *Neurospora crassa*. *J Biol Chem.* 254 (8): 2928-34.
- Bullock W.O., Fernandez M. und Short J.M. (1987). XL-1 Blue: a high efficient transforming recA *Escherichia coli* strain with  $\beta$ -galactosidase selection. *Bio Techniques* 5: 376-379.
- Bunney T. D., van Walraven H. S. und de Boer A. H. (2001). 14-3-3 protein is a regulator of the mitochondrial and chloroplast ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98: 4249-4254.
- Busch M., Mayer U. und Jürgens G. (1996). Molecular analysis of the *Arabidopsis* pattern formation of gene GNOM: gene structure and intragenic complementation. *Mol. Gen. Genet.* 250: 681–691.
- Cao A., Jain A., Baldwin J. C. und Raghothama K. G. (2007). Phosphate differentially regulates 14-3-3 family members and GRF9 plays a role in Pi-starvation induced responses. *Planta.* 226 (5): 1219-30.
- Casimiro I., Marchant A., Bhalerao R. P., Beeckman T., Dhooge S., Swarup R., et al. (2001). Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root inhibition. *Plant Cell* 13: 843-852.
- Celenza J. L. Jr., Grisa P. L. und Fink G. R. (1995). A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes* 9:2131-2142.
- Chang I. F., Curran A., Woolsey R., Quilici D., Cushman J. C., Mittler R., Harmon A. und Harper J. F. (2009). Proteomic profiling of tandem affinity purified 14-3-3 protein complexes in *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics* 9: 2967–2985.
- Chatterjee, D., Chakraborty, M., Leit, M., Neff, L., Jamsa-Kellokumpu, S., Fuchs, R. und Baron, R. (1992). Sensitivity to vanadate and isoforms of subunits A and B distinguish the osteoclast proton pump from other vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 6257-6261.
- Chen X., Naramoto S., Robert S., Tejos R., Löffke C., Lin D., Yang Z. und Friml J. (2012). ABP1 and ROP6 GTPase Signaling Regulate Clathrin-Mediated Endocytosis in *Arabidopsis* Roots. *Cell Press Current Biology* 22 (14): 1326–1332.
- Chevalier D., Morris E. R. und Walker J. C. (2009). 14-3-3 and FHA domains mediate phosphoprotein interactions. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60: 67–91.
- Chien C. T., Bartel P. L., Sternglanz R. und Fields S. (1991). The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88: 9578–9582.
- Dambournet D., Machicoane M., Chesneau L., Sachse M., Rocancourt M., et al. (2011). Rab35 GTPase and OCRL phosphatase remodel lipids and F-actin for successful cytokinesis. *Nat Cell Biol* 13: 981-988.
- Daszkowska-Golec A. und Szarejko I. (2013). Open or close the gate - stomata action under the control of phytohormones in drought stress conditions. *Front Plant Sci.* 4: 138.
- de Boer A.H.(1997). Fusicochin – a key to multiple 14–3–3 locks? *Trends Plant Sci.* 2: 41–77.
- de Boer, A.H., van Kleeff, P.J.M. und Gao, J. (2013). Plant 14-3-3 proteins as spiders in a web of phosphorylation. *Protoplasma*, 250: 425–440.

## 6. Literatur

De Smet I., Tetsumura T., De Rybel B., Frei dit Frey N., Laplace L., Casimiro I., Swarup R., Naudts M., Vanneste S., Audenaert D., Inzé D., Bennett M. J. und Beeckman T. (2007). Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*. *Development* 134 (4): 681-90.

de Vetten N.C. und Ferl R.J. (1994). Two genes encoding GF14 (14-3-3) proteins in *Zea mays*: Structure, expression, and potential regulation by the G-box binding complex. *Plant Physiol.* 106: 1593–1604.

Delbarre A., Muller P., Imhoff V. und Guern J. (1996). Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, naphthalene-1-acetic acid, and indole-3-acetic acid in suspension-cultured cells. *Planta* 198: 532–541.

DeLille J.M., Sehnke P.C. und Ferl R.J. (2001). The *Arabidopsis* 14-3-3 Family of Signaling Regulators1. *Plant Physiology* vol. 126 no. 1: 35-38.

Denison F. C., Paul A. L., Zupanska A. K. und Ferl R. J. (2011). 14-3-3 proteins in plant physiology. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22: 720–727.

Dhonukshe P., Aniento F., Hwang I., Robinson D.G., Mravec J., Stierhof Y.D. und Friml J. (2007). Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 20: 520–527.

Dhonukshe P., Huang F., Galvan-Ampudia C. S., Mahonen A. P., Kleine-Vehn J., Xu J., Quint A., Prasad K., Friml J., Scheres B. und Offringa R. (2010). Plasma membrane-bound AGC3 kinases phosphorylate PIN auxin carriers at TPRXS(N/S) motifs to direct apical PIN recycling. *Development.* 137 (19): 3245–3255.

Dobson M., Ramakrishnan G., Ma S., Kaplun L., Balan V., Fridman R., et al. (2011). Bimodal regulation of FOXO3 by AKT and 14-3-3. *Biochim Biophys Acta.* Volume 1813 (8): 1453–1464.

Dorner C., Ullrich A., Haring H. U. und Lammers R. (1999). The kinesin-like motor protein KIF1C occurs in intact cells as a dimer and associates with proteins of the 14-3-3 family. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 33654–33660.

Doyle S. M., Haeger A., Vain T., Rigal A., Viotti C., Łangowska M., Ma Q., Friml J., Raikhel N. V., Hicks G. R. und Robert S. (2015). An early secretory pathway mediated by GNOM-LIKE 1 and GNOM is essential for basal polarity establishment in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112 (7): E806-15.

Drake M. T., Zhu Y. und Kornfeld S. (2000). The assembly of AP-3 adaptor complex-containing clathrin-coated vesicles on synthetic liposomes. *Mol Biol Cell* 11:3723–3736.

Drozdowicz Y. M., Shaw M., Nishi M., Striepen B., Liwinski, H. A. Roos D. S. und Rea P. A. (2003). Isolation and Characterization of TgVP1, a Type I Vacuolar H<sup>+</sup>-translocating Pyrophosphatase from *Toxoplasma gondii* THE DYNAMICS OF ITS SUBCELLULAR LOCALIZATION AND THE CELLULAR EFFECTS OF A DIPHOSPHONATE INHIBITOR. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 1075-1085.

Duby G. und Boutry M. (2009). The plant plasma membrane proton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles. *Pflügers Arch.* 457: 645–655.

Ebine K., Fujimoto M., Okatani Y., Nishiyama T., Goh T., Ito E., et al. (2011). A membrane trafficking pathway regulated by the plant-specific RAB GTPase ARA6. *Nat. Cell Biol.* 13: 853-859.

Estelle M. (1996). Plant tropisms: the ins and outs of auxin. *Curr Biol* 6: 1589–1591.

- Estelle M. (1998). Polar Auxin Transport: New Support for an Old Model. *The Plant Cell* 10 (11): 1775-1778.
- Etxeberria E., Pozueta-Romero J. und Gonzalez P. (2012). In and out of the plant storage vacuole. *Plant Sci.* 190: 52-61.
- Feraru E. und Friml J. (2008). PIN Polar Targeting. *American Society of Plant Biologists Vol. 147:* 1553–1559.
- Feraru E., Feraru M. I., Asaoka R., Paciorek T., De Rycke R., Tanaka H., Nakano A. und Friml J. (2012). BEX5/RabA1b regulates trans-Golgi network-to-plasma membrane protein trafficking in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 24 (7): 3074-86.
- Ferjani A., Segami S., Horiguchi G., Muto Y., Maeshima M. und Tsukaya H. (2011). Keep an eye on PPI: the vacuolar-type H<sup>+</sup>-pyrophosphatase regulates postgerminative development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23 (8): 2895-2908.
- Ferl R.J. (1996). 14-3-3 proteins and signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol* 47: 49–73.
- Ferl R.J., Lu G. und Bowen B.W. (1994). Evolutionary implications of the family of 14-3-3 brain protein homologs in *Arabidopsis thaliana*. *Genetica* 92: 129–138.
- Fields S. und Song O. K. (1989). A novel genetic system to detect protein–protein interactions. *Nature* 340: 245–246.
- Fischer U., Ikeda Y., Ljung K., Serralbo O., Singh M., Heidstra R., Palme K., Scheres B. und Grebe M. (2006). Vectorial information for *Arabidopsis* planar polarity is mediated by combined AUX1, EIN2, and GNOM activity. *Curr Biol.* 16 (21): 2143–2149.
- Friml J. und Wisniewska J. (2004). Auxin as an intercellular signal. *Annu. Plant Rev.*, 16, pp. 1–26.
- Fuglsang A.T., Visconti S., Drumm K., Jahn T., Stensballe A., Mattei B., Jensen O.N., Aducci P. und Palmgren M.G. (1999). Binding of 14-3-3 protein to the plasmamembrane H<sup>+</sup>-ATPase AHA2 involves the three C-terminal residues Tyr946-Thr-Val and requires phosphorylation of Thr 947. *JBiol Chem.* 274: 36774–36780.
- Fukazawa J., Nakata M., Ito T., Matsushita A., Yamaguchi S. und Takahashi Y. (2011). bZIP transcription factor RSG controls the feedback regulation of NtGA20ox1 via intracellular localization and epigenetic mechanism. *Plant Signal Behav.* 6 (1): 26–28.
- Gampala S. S., Kim T. W., He J. X., Tang W., Deng Z., Bai M. Y., Guan S., Lalonde S., Sun Y., Gendron J. M., Chen H., Shibagaki N., Ferl R. J., Ehrhardt D., Chong K., Burlingame A. L. und Wang Z. Y. (2007). An essential role for 14-3-3 proteins in brassinosteroid signal transduction in *Arabidopsis*. *Dev. Cell* 13: 177–189.
- Gang L. und Hong-Wei X. (2007). *Arabidopsis* PLD $\zeta$ 2 Regulates Vesicle Trafficking and Is Required for Auxin Response. *The Plant Cell* 19 (1): 281-295.
- Ganguly A., Park M., Kesawat M. S. und Cho H.-T. (2014). Functional analysis of the hydrophilic loop in intracellular trafficking of *Arabidopsis* PIN-FORMED proteins. *Plant Cell* 1–17.
- Ganguly A., Sasayama D. und Cho H.T. (2012). Regulation of the polarity of protein trafficking by phosphorylation. *Mol. Cells* 33: 423–430.
- Gardino A. K., Smerdon S. J. und Yaffe M. B. (2006). Structural determinants of 14-3-3 binding specificities and regulation of subcellular localization of 14-3-3-ligand complexes: a comparison of the X-ray crystal structures of all human 14-3-3 isoforms. *Semin Cancer Biol* 16: 173–182



## 6. Literatur

- Geisler M. und Murphy A. (2006). The ABC of auxin transport: The role of p-glycoproteins in plant development. *FEBS Letters* Volume 580, Issue 4: 1094–1102.
- Geiss G., Gutierrez L. und Bellini C. (2009). Adventitious root formation: New insights and perspectives. In *Root Development*, T. Beekman, ed. Oxford: Wiley Blackwell: 376.
- Geldner N., Anders N., Wolters H., Keicher J., Kornberger W., Müller P., Delbarre A., Ueda T., Nakano A. und Jürgens G. (2003). The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell* 112: 219–230.
- Geldner N., Friml J., Stierhof Y. D., Jürgens G. und Palme K. (2001). Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* 413: 425–428.
- Gévaudant F., Duby G., von Stedingk E., Zhao R., Morsomme P. und Boutry M. (2007). Expression of a Constitutively Activated Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase Alters Plant Development and Increases Salt Tolerance. *Plant Physiology* 144 (4): 1763–1776.
- Gil P., Dewey E., Friml J., Zhao Y., Snowden K.C., Putterill J., et al. (2001). BIG: a calossin-like protein required for polar auxin transport in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 15: 1985–1997.
- Goh T., Uchida W., Arakawa S., Ito E., Dainobu T., Ebine K., et al. (2007). VPS9a, the common activator for two distinct types of Rab5 GTPases, is essential for the development of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 19: 3504–3515.
- Gökirmak T., Paul A. L. und Ferl R. J. (2010). Plant phosphopeptide-binding proteins as signaling mediators. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 527–532.
- Goldsmith M. H. M. (1977). The polar transport of auxin. *Annu Rev Plant Physiol* 28: 439–478.
- Grebe M., Friml J., Swarup R., Ljung K., Sandberg G., Terlou M., Palme K., Bennett M.J. und Scheres B. (2002). Cell polarity signaling in *Arabidopsis* involves a BFA-sensitive auxin influx pathway. *Curr. Biol.* 12: 329–334.
- Grefen C. und Blatt M.R. (2012). A 2in1 cloning system enables ratiometric Bimolecular Fluorescence Complementation (rBiFC). *Biotechniques* 53(5): 311–14
- Gutierrez L., Mongelard G., Flokov K. et al. (2012). Auxin controls *Arabidopsis* adventitious root initiation by regulating jasmonic acid homeostasis. *Plant Cell*, 24, 2515–2527.
- Haas T. J., Sliwinski M. K., Martinez D. E., Preuss M., Ebine K., Ueda T., Nielsen E., Odorizzi G. und Otegui M. S. (2007) The *Arabidopsis* AAA ATPase SKD1 is involved in multivesicular endosome function and interacts with its positive regulator LYST-INTERACTING PROTEIN5. *Plant Cell* 19: 1295–1312.
- Hachiya N., Komiya T., Alam R., Iwahashi J., Sakaguchi M., Omura T. und Mihara K. (1994). MSF, a novel cytoplasmic chaperone which functions in precursor targeting to mitochondria. *EMBO J.* 13: 5146–5154.
- Haruta M., Burch H.L., Nelson R.B., Barrett-Wilt G., Kline K.G., Mohsin S.B., Young J.C., Otegui M.S. und Sussman M.R. (2010). Molecular characterization of mutant *Arabidopsis* plants with reduced plasma membrane proton pump activity. *J Biol Chem* 285: 17918–17929.
- Hayashi Y., Takahashi K., Inoue S. und Kinoshita T. (2014). Abscisic acid suppresses hypocotyl elongation by dephosphorylating plasma membrane H (+)-ATPase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 55 (4): 845–853.

- He Y., Wu J., Lv B., Li J., Gao Z., Xu W., Baluška F., Shi W., Shaw P.C. und Zhang J. (2015). Involvement of 14-3-3 protein GRF9 in root growth and response under polyethylene glycol-induced water stress. *J Exp Bot.* 66 (8): 2271-2281.
- Hedrich R. und Schroeder J.I. (1989). The physiology of ion channels and electrogenic pumps in higher plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol Biol* 40: 539–569.
- Hedrich R., Flügge U.I. und Fernandez J.M. (1986). Patch-clamp studies of ion-transport in isolated plant vacuoles. *FEBS Lett.* 204: 228–232.
- Heinonen J.K. und Lahti R.J. (1981). A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Analytical Biochemistry* 113, 313-317.
- Hicks B.W. und Parsons S.M. (1992). Characterization of the P-type and V-type ATPases of cholinergic synaptic vesicles and coupling of nucleotide hydrolysis to acetylcholine transport. *J Neurochem.* 58(4):1211-20.
- Hohm T., Demarsy E., Quan C., Allenbach Petrolati L., Preuten T., Vernoux T., Bergmann S. und Fankhauser C. (2014). Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase regulation is required for auxin gradient formation preceding phototropic growth. *Mol Syst Biol.* 26 (10): 751.
- Hu C. D., Chinenov Y. und Kerppola T. K. (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* (4): 789-98.
- Huang F., Zago M. K., Abas L., van Marion A., Galvan-Ampudia C. S. und Offringa R. (2010). Phosphorylation of conserved PIN motifs directs *Arabidopsis* PIN1 polarity and auxin transport. *Plant Cell.* 222 (4): 1129–1142.
- Huber J. L., Huber S. C., Campbell W. H. und Redinbaugh M. G. (1992). Reversible light/dark modulation of spinach leaf nitrate reductase activity involves protein phosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.* 296: 58–65.
- Ichimura T., Isobe T., Okuyama T., Yamauchi T. und Fujisawa H. (1987). Brain 14-3-3 protein is an activator protein that activates tryptophan 5-monooxygenase and tyrosine 3-monooxygenase in the presence of Ca<sup>2+</sup>, calmodulin-dependent protein kinase II. *FEBS Lett* 219: 79–82.
- Igarashi D., Ishida S., Fukazawa J. und Takahashi Y. (2001). 14-3-3 proteins regulate intracellular localization of the bZIP transcriptional activator RSG. *The Plant Cell Online* 13: 2483–2497.
- Inoue S., Kinoshita T., Matsumoto M., Nakayama K. I., Doi M. und Shimazaki K. (2011). Blue light-induced autophosphorylation of phototropin is a primary step for signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105 (14): 5626-31.
- Inoue S., Matsushita T., Tomokiyo Y., Matsumoto M., Nakayama K. I., Kinoshita T. und Shimazaki K. (2008). Functional analyses of the activation loop of phototropin2 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 156 (1): 117-28.
- Irshad M., Canut H., Borderies G., Pont-Lezica R. und Jamet E. (2008). A new picture of cell wall protein dynamics in elongating cells of *Arabidopsis thaliana*: confirmed actors and newcomers. *BMC Plant Biology* 8, 94.
- Ishida S., Fukazawa J., Yuasa T. und Takahashi Y. (2004). Involvement of 14-3-3 signaling protein binding in the functional regulation of the transcriptional activator REPRESSION OF SHOOT GROWTH by gibberellins. *Plant Cell* 16: 2641–2651.

## 6. Literatur

- Ishida S., Yuasa T., Nakata M. und Takahashi Y. (2008). A tobacco calcium-dependent protein kinase, CDPK1, regulates the transcription factor REPRESSION OF SHOOT GROWTH in response to gibberellins. *Plant Cell* 20: 3273–3288.
- Jahn T., Fuglsang A.T., Olsson A., Bruntrup I. M., Collinge D. B., Volkmann D., Sommarin M. und Palmgren M.G., 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
- Jaspert N., Throm C., Oecking C. (2011). *Arabidopsis* 14-3-3 proteins: fascinating and less fascinating aspects. *Frontiers in Plant Science* 2: 96.
- Jelich-Ottmann C., Weiler E.W. und Oecking C. (2001). Binding of regulatory 14-3-3 proteins to the C terminus of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase involves part of its autoinhibitory region. *J. Biol. Chem.*, 276: 39852–39857.
- Johnson C., Crowther S., Stafford M. J., Campbell D. G., Toth R. und MacKintosh C. (2010). Bioinformatic and experimental survey of 14-3-3-binding sites. *Biochem. J.* 427: 69–78.
- Johnson C., Tinti M., Wood N. T., Campbell D. G., Toth R., Dubois F., Geraghty K. M., Wong B. H., Brown L. J., Tyler J., Gernez A., Chen S., Synowsky S. und MacKintosh C. (2011). Visualization and biochemical analyses of the emerging mammalian 14-3-3-phosphoproteome. *Mol. Cell Proteomics* 10 (10).
- Jones D. H., Ley S. und Aitken A. (1995). Isoforms of 14-3-3 protein can form homo- and heterodimers *in vivo* and *in vitro*: implications for function as adapter proteins. *FEBS Lett* 368: 55-58.
- Jürgens G. und Geldner N. (2007). The high road and the low road: trafficking choices in plants. *Cell* 130: 977-979.
- Katrin Weckermann (Dissertation 2008). Die 14-3-3 Protein-Familie in *Arabidopsis thaliana*: Untersuchungen zur funktionellen Redundanz versus Spezifität.
- Kent C. B., Shimada T., Ferraro G. P., Ritter B., Yam P. T., McPherson P. S., Charron F., Kennedy E. T. und Fournier A. E. (2010). 14-3-3 Proteins Regulate Protein Kinase A Activity to Modulate Growth Cone Turning Responses. *The Journal of Neuroscience* 30 (42): 14059 –14067.
- Kim T. W., Guan S., Burlingame A. L. und Wang Z. Y. (2011). The CDG1 kinase mediates brassinosteroid signal transduction from BRI1 receptor kinase to BSU1 phosphatase and GSK3-like kinase BIN2. *Mol Cell.* 43: 561–571.
- Kim T. W., Guan S., Sun Y., Deng Z., Tang W., Shang J. X., Sun Y., Burlingame A. L. und Wang Z.Y. (2009). Brassinosteroid signal transduction from cell-surface receptor kinases to nuclear transcription factors. *Nat Cell Biol* 11: 1254–1260.
- King J. J., Stimart D. P., Fisher R. H. und Bleecker A. B. (1995). A mutation altering auxin homeostasis and plant morphology in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 7: 2023–2037.
- Kleine-Vehn J., Dhonukshe P., Sauer M., Brewer P.B., Wiśniewska J., Paciorek T., Benková E. und Friml J. (2008). ARF GEF-dependent transcytosis and polar delivery of PIN auxin carriers in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 18: 526–531.
- Kleine-Vehn J., Dhonukshe P., Swarup R., Bennett M. und Friml J. (2006). Subcellular trafficking of the *Arabidopsis* auxin influx carrier AUX1 uses a novel pathway distinct from PIN1. *Plant Cell* 18 (11): 3171–3181.

- Konagaya K., Matsushita Y., Kasahara M. und Nyunoya H. (2004). Members of 14-3-3 protein isoforms interacting with the resistance gene product N and the elicitor of Tobacco mosaic virus. *J Gen Plant Pathol* 70: 221–231
- Koncz C. und Schell J. (1986). The promoter of TL-DNA genes 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen. Genet.* 204, 383-396.
- Kostecky B., Saurin A. T., Purkiss A., Parker P. J. und McDonald N. Q. (2009). Recognition of an intra-chain tandem 14-3-3 binding site within PKCepsilon. *EMBO Rep* 10: 983–989
- Kotzer A. M., Brandizzi F., Neumann U., Paris N., Moore I. und Hawes C. (2004). AtRabF2b (Ara7) acts on the vacuolar trafficking pathway in tobacco leaf epidermal cells. *J Cell Sci* 117: 6377–6389.
- Krebs, M., Beyhl, D., Görlich, E., Al-Rasheid, K. A. S., Marten, I., Stierhof, Y.-D., Hedrich, R. und Schumacher, K. (2010). *Arabidopsis* V-ATPase activity at the tonoplast is required for efficient nutrient storage but not for sodium accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 3251–6.
- Křeček P., Skůpa P., Libus J., Naramoto S., Tejos R., Friml J. und Zazimalová E. (2009). The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biol.* 10: 249.
- Krinke O., Ruelland E., Valentová O., Vergnolle C., Renou J.P., Taconnat L., Flemr M., Burketová L. und Zachowski A. (2007). Phosphatidylinositol 4-kinase activation is an early response to salicylic acid in *Arabidopsis* suspension cells. *Plant Physiol.* 144: 1347–1359.
- Krysan P. J., Young J. C., Tax F. und Sussman M. R. (1996). Identification of transferred DNA insertions within *Arabidopsis* genes involved in signal transduction and ion transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8145–8150.
- Krysan, P. J., Young, J. C. und Sussman, M. R. (1999). T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 11: 2283–2290.
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- Laxmi A., Pan J., Morsy M. und Chen R. (2008). Light plays an essential role in intracellular distribution of auxin efflux carrier PIN2 in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 3: 1510.
- Lee G. J., Sohn E. J., Lee M. H. und Hwang I. (2004). The *Arabidopsis* rab5 homologs rha1 and ara7 localize to the prevacuolar compartment. *Plant Cell Physiol* 45: 1211–1220.
- Lee P. L., Ohlson M. B. und Pfeffer S. R. (2015). The Rab6-regulated KIF1C kinesin motor domain contributes to Golgi organization. *eLife* 4: e06029.
- Lee Y. R. J. und Liu B. (2004). Cytoskeletal Motors in *Arabidopsis*. Sixty-One Kinesins and Seventeen Myosins. *Plant Physiology* 1364: 3877-3883.
- Li J. J. und Herskowitz I. (1993). Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system. *Science* 262: 1870–1874.
- Li J., Yang H., Peer W. A., Richter G., Blakeslee J., Bandyopadhyay A., Titapiwantakun B., Undurraga S., Khodakovskaya M., Richards E. L., Krizek B., Murphy A. S., Gilroy S. und Gaxiola R. (2005). *Arabidopsis* H<sup>+</sup>-PPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development. *Science*. 310 (5745): 121-125.

## 6. Literatur

- Li S.W., Xue L., Xu S., Feng H. und An L. (2009). Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. *Bot. Rev.* 75: 230–247.
- Liu D., Bienkowska J., Petosa C., Collier R.J., Fu H., et al. (1995). Crystal structure of the zeta-isoform of the 14-3-3 protein. *Nature* 376: 191–194.
- Lomax T.L., Muday G.K. und Rubery P.H. (1995). Auxin transport. In PJ Davies, ed, *Plant Hormones*, Ed 2. Kluwer, Amsterdam: 509–530.
- Loque D., Tillard P., Gojon A. und Lepetit M. (2003). Gene expression of the NO<sub>3</sub>- transporter NRT1.1 and the nitrate reductase NIA1 is repressed in *Arabidopsis* roots by NO<sub>2</sub>-, the product of NO<sub>3</sub>- reduction. *Plant Physiol.* 132: 958–967.
- Louret O. F., Doignon F. und Crouzet M. (1997). Stable DNA binding yeast vector allowing high bait expression for use in the two-hybrid system. *BioTechniques* 23: 816–819.
- Macdonald N., Welburn J.P., Noble M. E., Nguyen A., Yaffe M.B., Clynes D. et al. (2005). Molecular basis for the recognition of phosphorylated and phosphoacetylated histone h3 by 14-3-3. *Mol Cell* 20: 199–211
- Mackintosh C. (2004). Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes. *Biochem. J.* 381: 329–342.
- Mackintosh C. und Meek S. E. (2001). Regulation of plant NR activity by reversible phosphorylation, 14-3-3 proteins and proteolysis. *Cell Mol Life Sci.* 58 (2): 205-14.
- Maeshima M. (2000). Vacuolar H-pyrophosphatase. *Bioch. Biophys. Acta* 1465: 37–51.
- Malamy J.E. und Benfey P.N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124: 33–44.
- Malenica N, Abas, L., Benjamins, R., Kitakura, S., Sigmund, H. F., Jun, K. S., Hauser, M. T., Friml, J. und Luschnig, C. (2007). MODULATOR OF PIN genes control steady-state levels of *Arabidopsis* PIN proteins. *Plant J* 51:537–550.
- Marchant A., Bhalerao R., Casimiro I., Eklof J., Casero P. J., Bennett M., et al. (2002). AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling. *Plant Cell* 14:589-597.
- Marchant A., Kargul J., May S.T., Müller P., Delbarre A., Perrot-Rechenmann C. und Bennett M. J. (1999). AUX1 regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *EMBO J.* 18: 2066–2073.
- Martinoia E., Maeshima M. und Neuhaus H. E. (2007). Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *J. Exp. Bot.* 58: 83–102.
- Martinoia E., Meyer S., De A. A. und Nagy R. (2012). Vacuolar transporters in their physiological context. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63: 183–213.
- Maselli G. A., Slamovits C. H., Bianchi J. I., Vilarrasa-Blasi J., Caño-Delgado A.I. und Mora-García S. (2014). Revisiting the Evolutionary History and Roles of Protein Phosphatases with Kelch-Like Domains in Plants. *Plant Physiol.* 164 (3): 1527–1541.
- Matsuoka K., Bassham D.C., Raikhel N.V. und 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. und Morsomme P. (2000). A plant plasma membrane H<sup>+</sup>-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.
- May T. und Soll J. (2000). 14-3-3 proteins form a guidance complex with chloroplast precursor proteins in plants. *Plant Cell* 12: 53-63.
- Mayer U., Buttner G. und Jürgens G. (1993). Apical–basal pattern formation in the *Arabidopsis* embryo: studies on the role of the *gnom* gene. *Development* 117: 149–162.
- Mayer U., Torres Ruiz R. A., Berleth T., Misera S. und Jürgens G. (1991). Mutations affecting body organization in the *Arabidopsis* embryo. *Nature* 353: 402–407.
- Mayfield J. D., Folta K. M., Paul A. L. und Ferl R. J. (2007). The 14-3-3 proteins mu and upsilon influence transition to flowering and early phytochrome response. *Plant Physiology* 145: 1692–1702.
- Mayfield J. D., Paul A. L. und Ferl R. J. (2012). The 14-3-3 proteins of *Arabidopsis* regulate root growth and chloroplast development as components of the photosensory system. *Journal of Experimental Botany* 63: 3061–3070.
- Michelet B. und Boutry B. (1995) The Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase (A Highly Regulated Enzyme with Multiple Physiological Functions). *Plant Physiol.*, 108, pp. 1–6
- Michniewicz M., Zago M.K., Abas L., Weijers D., Schweighofer A., Meskiene I. et al. (2007). Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux. *Cell* 130: 1044–1056.
- Mikkelsen M. D., Hansen C. H., Wittstock U. und Halkier B. A. (2000). Cytochrome P450 CYP79B2 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid. *J Biol Chem* 275: 33712–33717.
- Moore B.W., Perez V.J. (1967). Specific acidic proteins of the nervous system in *Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration*. ed Carlson FD (Prentice-Hall, Inc, The Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA): 343–359.
- Morris D.A. (2000). Transmembrane auxin carrier systems—Dynamic regulators of polar auxin transport. *Plant Growth Regul.* 32: 161–172.
- Morsomme P. und Boutry M. (2000). The plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: Structure, function, and regulation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1465: 1–16.
- Motley A., Bright N. A., Seaman M. N. und Robinson M. S. (2003). Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *J. Cell Biol.* 162: 909–918.
- Mravec J., Petrášek J., Li N., Boeren S., Karlova R., Kitakura S., Pařezová M., Naramoto S., Nodzyński T., Dhonukshe P., Bednarek S. Y., Zažímalová E., de Vries S. und Friml J. (2011). Cell plate restricted association of DRP1A and PIN proteins is required for cell polarity establishment in *Arabidopsis*. *Curr Biol.* 21 (12):1055-60.
- Müller A., Guan C., Gälweiler L., Tänzler P., Huijser P., Marchant A., Parry G., Bennett M.J., Wisman E. und Palme K. (1998). AtPIN2 defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO J.* 17: 6903–6911.
- Murphy A. S., Bandyopadhyay A., Holstein S. E. und Peer W. A. (2005). Endocytotic cycling of PM proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56: 221-251.

## 6. Literatur

- Muslin A. J., Tanner J. W., Allen P. M. und Shaw A. S. (1996). Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* 84(6):889-897.
- Nagase T., Takase H., Sekiya J. und Prieto R. (2015). The *axhs1/dwf4* auxin-hypersensitive mutant of *Arabidopsis thaliana* defines a link for integration of auxin and brassinosteroid mediated root elongation. *Plant Biotechnology* 32, 125–137.
- Nagawa S., Xu T., Lin D., Dhonukshe P., Zhang X., Friml J., Scheres B., Fu Y. und Yang Z. (2012). ROP GTPase-dependent actin microfilaments promote PIN1 polarization by localized inhibition of clathrin-dependent endocytosis. *PLoS Biol* 10: e1001299.
- Nanao M. H., Vinos-Poyo T., Brunoud G., Thévenon E., Mazzoleni M., Mast D., Lainé S., Wang S., Hagen G., Li H., Guilfoyle T. J., Parcy F., Vernoux T. und Dumas R4 (2014). Structural basis for oligomerization of auxin transcriptional regulators. *Nat Commun.* 5: 3617.
- Neal C. L., Xu J., Ping Li M. S., Mori S., Jun Yang, M.S., Neal N. N., Zhou X., et al. (2012). Overexpression of 14-3-3 $\zeta$  in cancer cells activates PI3K via binding the p85 regulatory subunit. *Oncogene* 31 (7): 897–906.
- Obsil T., Ghirlando R., Klein D. C., Ganguly S. und Dyda F. (2001). Crystal structure of the 14-3-3 $\zeta$ :serotonin N-acetyltransferase complex: a role for scaffolding in enzyme regulation. *Cell* 105: 257–267.
- Oecking C. und Jaspert N. (2009). Plant 14-3-3 proteins catch up with their mammalian orthologs. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12 (6): 760–765.
- Olsen J.V., Blagoev B., Gnadt, F., Macek B., Kumar C., Mortensen P. und Mann M. (2006). Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 127, 635–648.
- Olsson A. (1998). A phosphothreonine residue at the C-terminal end of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase is protected by Fusicoccin-induced 14-3-3 binding. *Plant Physiol.* 118: 551–555
- Ortiz-Zapater E., Soriano-Ortega E., Marcote M.J., Ortiz-Masiá D. und Aniento F. (2006). Trafficking of the human transferrin receptor in plant cells: Effects of tyrphostin A23 and brefeldin A. *Plant J.* 48: 757–770.
- Ottenschläger I., Wolff P., Wolverson C., Bhalerao R. P., Sandberg G., Ishikawa H., Evans M. und Palme K. (2003). Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (5): 2987-91.
- Ottmann C., Marco S., Jaspert N., Marcon C., Schauer N., et al. (2007) Structure of a 14-3-3 coordinated hexamer of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by combining X-ray crystallography and electron cryomicroscopy. *Mol Cell* 25: 427–440.
- Overvoorde P., Fukaki H. und Beeckman T. (2010). Auxin control of root development. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2: 1–16.
- Paciorek T., Zažímalová E., Ruthardt N., Petrášek J., Stierhof Y.-D., Kleine-Vehn J., Morris D.A., Emans N., Jürgens G., Geldner N. und Friml J. (2005). Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature* 435: 1251–1256.
- Pallucca R., Visconti S, Camoni L., Cesareni G, Melino S., Panni S., Torreri P. und Aducci P. (2014). Specificity of  $\epsilon$  and Non- $\epsilon$  Isoforms of *Arabidopsis* 14-3-3 Proteins Towards the H<sup>+</sup>-ATPase and Other Targets. *PLoS One.* 9(3): e90764.

- Palmgren M.G. (2001). PLANT PLASMA MEMBRANE H<sup>+</sup>-ATPases: Powerhouses for Nutrient Uptake. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 817-845
- Palmgren M.G., Larsson C. und Sommarin M. (1990). Proteolytic activation of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by removal of a terminal segment. *J Biol Chem* 265: 13423–13426.
- Palmgren M.G., Sommarin M., Serrano R. und Larsson C. (1991) Identification of an autoinhibitory domain in the C-terminal region of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *J Biol Chem* 266: 20470–20475.
- Parry, G., Delbarre A., Marchant A., Swarup R., Napier R., Perrot-Rechenmann C. und Bennett M. J. (2001). Novel auxin transport inhibitors phenocopy the auxin influx carrier mutation *aux1*. *Plant J.* 25: 399–406.
- Park M., Song K., Reichardt I., Kim H., Mayer U., Stierhof Y.-D., Hwang I und Jürgens G.(2013) *Arabidopsis*  $\mu$ -adaptin subunit AP1M of adaptor protein complex 1 mediates late secretory and vacuolar traffic and is required for growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 10318–10323.
- Paul A. L., Denison F. C., Schultz E. R., Zupanska A. K. und Ferl R. J. (2012). 14-3-3 phosphoprotein interaction networks—does isoform diversity present functional interaction specification? *Frontiers in Plant Science* 3, 190.
- Perez-Gomez J. und Moore I. (2007). Plant endocytosis: it is clathrin after all. *Curr Biol* 17: R217–R219.
- Petosa C., Masters S.C., Bankston L.A., Pohl J., Wang B., et al. (1998). 14-3-3 $\zeta$  binds a phosphorylated Raf peptide and an unphosphorylated peptide via its conserved amphipathic groove. *J Biol Chem* 273: 16305–16310.
- Petrášek J., Friml J. (2009). Auxin transport routes in plant development. *Development* 136: 2675–2688
- Petrášek J., Mravec J., Bouchard R., Blakeslee J. J., Abas M., Seifertová D., Wiśniewska J., Tadele Z., Kubeš M., Čovanová M., et al.(2006). PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science* 312: 914–918.
- Pignocchi C. und Doonan J. H. (2011). Interaction of a 14-3-3 protein with the plant microtubule-associated protein EDE1. *Annals of Botany* 107: 1103–1109.
- Pnueli L., Gutfinger T., Hareven D., Ben-Naim O., Ron N., Adir N. und Lifschitz E. (2001). Tomato SP-interacting proteins define a conserved signaling system that regulates shoot architecture and flowering. *Plant Cell*.13(12): 2687-2702.
- Ptacek J., und Snyder M. (2006). Charging it up: global analysis of protein phosphorylation. *Trends Genet.*22: 545–554.
- Purwestri Y. A., Ogaki Y., Tamaki S., Tsuji H. und Shimamoto K. (2009). The 14-3-3 protein GF14c acts as a negative regulator of flowering in rice by interacting with the florigen Hd3a. *Plant Cell Physiol.* 50(3): 429-438.
- Rashotte A., Brady S., Reed R., Ante S. und Muday G. (2000). Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 122: 481–490.
- Reed, R.C., Brady, S.R. und Muday, G.K. (1998). Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 118, 1369–1378.



## 6. Literatur

- Reichardt I., Stierhof Y. D., Mayer U., Richter S., Schwarz H., et al. (2007). Plant cytokinesis requires de novo secretory trafficking but not endocytosis. *CurrBiol* 17: 2047-2053.
- Reyes F. C., Buono R. und Otegui M. S. (2011). Plant endosomal trafficking pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14: 666-673.
- Richter S., Anders N., Wolters H., Beckmann H., Thomann A., Heinrich R., et al. (2010). Role of the GNOM gene in *Arabidopsis* apical-basal patterning—from mutant phenotype to cellular mechanism of protein action. *Eur. J. Cell Biol.* 89: 138–144.
- Riedel J., Tischner R. und Mack G. (2001). The chloroplastic glutamine synthetase (GS-2) of tobacco is phosphorylated and associated with 14-3-3 proteins inside the chloroplast. *Planta* 213: 396-401.
- Robert S., et al. (2010). ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in *Arabidopsis*. *Cell* 143: 111–121.
- Robinson D. G. und Pimpl P. (2013). Clathrin and post-Golgi trafficking: a very complicated issue. *Trends Plant Sci.* 19: 134-139.
- Robinson D. G. und Scheuring D. (2011). ARF1 Localizes to the Golgi and the Trans-Golgi Network. *Plant Cell.* 23 (3): 846–849.
- Robinson D.G., Jiang L. und Schumacher K. (2008). The endosomal system of plants: Charting new and familiar territories. *Plant Physiol.* 147: 1482–1492.
- Robinson K., Jones D., Patel Y., Martin H., Madrazo J., Martin S., Howell S., Elmore M., Finnen M.J. und Aitken A. (1994). Mechanism of inhibition of protein kinase C by 14-3-3 isoforms: 14-3-3 isoforms do not have phospholipase A2 activity. *Biochem J* 299: 853–861.
- Robinson N. D. (2010). 14-3-3, an integrator of cell mechanics and cytokinesis. *Small GTPases* 1 (3): 165–169.
- Rooney M. F und Ferl R. J. (1995). Sequences of three *Arabidopsis* general regulatory factor genes encoding GF14 (14-3-3) proteins. *Plant Physiol.*107: 283–284.
- Rosenquist M., Alsterfjord M., Larsson C. und 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., Sehnke P., Ferl R.J. und Sommarin M., Larsson C. (2000) Evolution of the 14-3-3 protein family: does the large number of isoforms in multicellular organism reflect functional specificity? *J Mol Evol* 51: 446–458.
- Rothman J. E. und Wieland F. T. (1996). Protein sorting by transport vesicles. *Science*272:227–234.
- Rubery P. H. und Sheldrake A. R. (1974). Carrier-mediated auxin transport. *Planta* 118: 101–121.
- Ruegger M., Dewey E., Gray W. M., Hobbie L., Turner J. und Estelle M. (1998). The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. *Genes Dev.* 12: 198-207.
- Ruegger M., Dewey E., Hobbie .L, Brown D., Bernasconi P., Turner J., et al. (1997). Reduced naphthylphthalamic acid binding in the tir3 mutant of *Arabidopsis* is associated with a reduction in polar auxin transport and diverse morphological defects. *Plant Cell* 9: 745-757.
- Ryu H., Cho H., Kim K. und Hwang I. (2010). Phosphorylation dependent nucleocytoplasmic shuttling of BES1 is a key regulatory event in brassinosteroid signaling. *Mol. Cells* 29: 283–290.

- Ryu H., Kim K., Cho H., Park J., Choe S. und Hwang I. (2007). Nucleocytoplasmic shuttling of BZR1 mediated by phosphorylation is essential in *Arabidopsis* brassinosteroid signaling. *Plant Cell* 19: 2749–2762.
- Saito C. und Ueda T. (2009). Functions of RAB and SNARE proteins in plant life. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 274: 183-233.
- Schellmann S. und Pimpl P. (2009). Coats of endosomal protein sorting: retromer and ESCRT. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12: 670-676.
- Schlessinger J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103: 211–225.
- Schoonheim P. J., Veiga H., da Costa Pereira D., Friso G., van Wijk K. J. und de Boer A. H. (2007). A Comprehensive Analysis of the 14-3-3 Interactome in Barley Leaves Using a Complementary Proteomics and Two-Hybrid Approach. *Plant Physiol.* 143 (2): 670–683.
- Schumacher K., Vafeados D., McCarthy M., Sze H., Wilkins T., und Chory J. (1999). The *Arabidopsis* det3 mutant reveals a central role for the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in plant growth and development. *Genes Dev.* 13, 3259-3270.
- Sehnke P. C., Chung HJ, Wu K. und Ferl R. J (2001). Regulation of starch accumulation by granule-associated plant 14-3-3 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 765-770.
- Sehnke P. C., DeLille J. M. und Ferl R. J. (2002). Consummating signal transduction: the role of 14-3-3 proteins in completion of signal-induced transitions in protein activity. *Plant Cell* 14: S339-S354.
- Sehnke P. C., Henry R., Cline K. und Ferl R. J. (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.
- Shen W., Clark A. C. und Huber S. C. (2003). The C-terminal tail of *Arabidopsis* 14-3-3 $\omega$  functions as an autoinhibitor and may contain a tenth  $\alpha$ -helix. *Plant J* 34: 473–484.
- Shevell D. E., Kunkel T. und Chua N. H. (2000). Cell wall alterations in the *Arabidopsis* emb30 mutant. *Plant Cell* 12: 2047 -2060.
- Shevell D. E., Leu W. M., Gillmor C. S., Xia G., Feldmann K. A. und Chua N. H. (1994). EMB30 is essential for normal cell division, cell expansion, and cell adhesion in *Arabidopsis* and encodes a protein that has similarity to Sec7. *Cell.* 77: 1051–1062.
- Shin R., Jez J. M., Basra A., Zhang B. und Schachtman D. P. (2011). 14-3-3 proteins fine-tune plant nutrient metabolism. *FEBS Lett.* 585: 143–147.
- Sieberer T., Seifert G. J., Hauser M.T., Grisafi P., Fink G.R. und Luschnig C. (2000). Post-transcriptional control of the *Arabidopsis* auxin efflux carrier EIR1 requires AXR1. *Curr Biol* 10:1595–1598.
- Simpson F, Bright NA, West MA, et al. (1996). A novel adaptor-related protein complex. *J Cell Biol*133:749–760.
- Singh M., Krüger F., Beckmann H., Brumm S., Vermeer J. E. M., Munnik T., Mayer U., Stierhof Y. D., Grefen C., Schumacher K. und Jürgens G. (2014). Protein Delivery to Vacuole Requires SAND Protein-Dependent Rab GTPase Conversion for MVB-Vacuole Fusion. *Current Biology* 24 (12): 1383–1389.
- Sluchanko N. N. und Gusev N. B. (2010). 14-3-3 proteins and regulation of cytoskeleton. *Biochemistry (Mosc)* 75 (13): 1528-46.

## 6. Literatur

- Sohn E.J., Kim E.S., Zhao M., Kim S. J., Kim H., Kim Y. M., Lee Y. L., Hillmer S., Sohn U., Jiang L. und Hwang I. (2003). Rha1, an *Arabidopsis* Rab5 homolog, plays a critical role in the vacuolar trafficking of soluble cargo proteins. *Plant Cell*, 15: 1057–1070.
- Sottocornola B., Gazzarrini S., Olivari C., Romani G., Valbuzzi P., Thiel G. und Moroni A. (2008). 14-3-3 proteins regulate the potassium channel KAT1 by dual modes. *Plant Biol.* 10 (2): 231-236.
- Sottocornola B., Visconti S., Orsi S., Gazzarrini S., Giacometti S., Olivari C., Camoni L., Aducci P., Marra, M., Abenavoli A., Thiel G. und Moroni, A. (2006). The potassium channel KAT1 is activated by plant and animal 14-3-3 proteins. *J. Biol. Chem.* 281: 35735–35741.
- Steinmann T., Geldner N., Grebe M., Mangold S., Jackson C.L., Paris S., Galweiler L., Palme K. und Jurgens, G. (1999). Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science* 286: 316–318.
- Sugden C., Donaghy P. G., Halford N. G. und Grahame Hardie D. (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.
- Sussman M.R. (1994). Molecular analysis of proteins in the plant plasma membrane. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 45: 211-234.
- Svennelid F., Olsson A., Piotrowski M., Rosenquist M., Ottman C., Larsson C., Oecking C. und Sommarin M. (1999). Phosphorylation of Thr-948 at the C-terminus of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase creates a binding site for the regulatory 14-3-3 protein. *Plant Cell* 11: 2379–2391.
- Swarup K., Benková E., Swarup R., Casimiro I., Peret B., Yang Y., et al. (2008). The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nat. Cell Biol.* 10: 946-954.
- Swarup R., Friml J., Marchant A., Ljung K., Sandberg G., Palme K., et al. (2001). Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes Dev.* 15: 2648-2653.
- Swatek K. N., Graham K., Agrawal G. K. und Thelen J. J. (2011). The 14-3-3 isoforms chi and epsilon differentially bind client proteins from developing *Arabidopsis* seed. *J. Proteome Res.* 10: 4076–4087.
- Sze H., Li X. und Palmgren M.G. (1999). Energization of plant cell membranes by H-pumping ATPases: Regulation and biosynthesis. *Plant Cell* 11: 677–689.
- Takáč T., Pečan T., Samajova O., Ovecka M., Richter H., Eck C., et al. . (2012). Wortmannin treatment induces changes in *Arabidopsis* root proteome and post-golgi compartments. *J. Proteome Res.* 11: 3127–3142.
- Takemiya A., Yamauchi S., Yano T., Ariyoshi C. und Shimazaki K. (2013). Identification of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 which mediates blue light signaling for stomatal opening. *Plant Cell Physiol.* 54 (1): 24-35.
- Tanaka H., Nodzynski T., Kitakura S., Feraru M. I., Sasabe M., Ishikawa T., Kleine-Vehn J., Kakimoto T. und Friml J. (2014). BEX1/ARF1A1C is Required for BFA-Sensitive Recycling of PIN Auxin Transporters and Auxin-Mediated Development in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 55 (4): 737–749.
- Taoka K., Ohki I., Tsuji H., Furuita K., Hayashi K., Yanase T., Yamaguchi M., Nakashima C., Purwestri Y. A., Tamaki S., Ogaki Y., Shimada C., Nakagawa A., Kojima C. und Shimamoto K. (2011). 14-3-3 Proteins act as intracellular receptors for rice Hd3a florigen. *Nature* 476: 332–335.

- Teh O. K. und Moore I. (2007) An ARF-GEF acting at the Golgi and in selective endocytosis in polarized plant cells. *Nature* 448: 493–496.
- Thimann K.V. und Went F. W. (1934). *Proc. Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam*, 37: 456–459.
- Titapiwatanakun B., Blakeslee J. J., Bandyopadhyay A., Yang H., Mravec J., Sauer M., Cheng Y., Adamec J., Nagashima A., Geisler M., Sakai T., Friml J., Peer W. A. und Murphy A. S. (2009) ABCB19/PGP19 stabilises PIN1 in membrane microdomains in *Arabidopsis*. *Plant J* 57: 27–44.
- Towbin H., Staehelin T. und Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76 (9): 4350-4.
- Tseng T. S., Whippe C., Hangarter R. P. und Briggs W. R. (2012). The role of a 14-3-3 protein in stomatal opening mediated by PHOT2 in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24: 1114–1126.
- Ueda T., Uemura T., Sato M. H. und Nakano A. (2004). Functional differentiation of endosomes in *Arabidopsis* cells. *Plant J*. 40: 783–789.
- Ueda T., Yamaguchi M., Uchimiya H. und Nakano A. (2001). Ara6, a plant-unique novel type Rab GTPase, functions in the endocytic pathway of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J*. 20: 4730-4741.
- Ulmasov T., Hagen G. und Guilfoyle T.J. (1997 a). ARF1, a transcription factor that binds auxin response elements. *Science* 276, 1865–1868.
- Ulmasov T., Liu Z.-B., Hagen G. und Guilfoyle T.J. (1995). Composite structure of auxin response elements. *Plant Cell* 7, 1611–1623.
- Ulmasov T., Murfett J., Hagen G. und Guilfoyle T.J. (1997 b). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9, 1963–1971.
- Van Heusden G.P.H. (2005). 14-3-3 proteins: regulators of numerous eukaryotic proteins. *IUBMB Life* 57: 623–629.
- van Kleeff P. J. M., Jaspert N., Li W. K., Rauch S., Oecking C. und de Boer A. H. (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*. 2014 Nov; 65(20): 5877–5888.
- Van Lijsebettens, Wang X., Cnops G., Boerjan W., Desnos T., Höfte H. und Van Montagu M. (1996.) Transgenic *Arabidopsis* tester lines with dominant marker genes. *Molecular & general genetics* 251 (3): 365-72.
- Vandenbussche F., Petrásek J., Zádňíková P., Hoyerová K., Pesek B., Raz V., Swarup R., Bennett M., Zazimalová E., Benková E. und Van Der Straeten D. (2010). The auxin influx carriers AUX1 and LAX3 are involved in auxin-ethylene interactions during apical hook development in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Development*.137 (4): 597-606.
- Vernoud V., Horton A. C., Yang Z. und Nielsen E. (2003). Analysis of the small GTPase gene superfamily of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 131: 1191-1208.
- Vernoux T., Besnard F. und Traas J. (2010). Auxin at the shoot apical meristem. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a001487.
- Vida T. A. und Emr S. D. (1995). A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *JCB* 128 (5): 779-792.

## 6. Literatur

- Vieten A., Vanneste S., Wisniewska J., Benkova E., Benjamins R., Beeckman T., Luschnig C. und Friml J. (2005). Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* 132: 4521–4531.
- Walter M., Chaban C., Schütze K., Batistic O., Weckermann K., Nake C., Blazevic D., Grefen C., Schumacher K., Oecking C., Harter K. und Kudla, J. (2004). Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J.* 40: 428–438.
- Wang C., Shang J. X., Chen Q. X., Osés-Prieto J. A., Bai M. Y., Yang Y., Yuan M., Zhang J. L., Mu C. C., Deng Z., Wei C. Q., Burlingame A. L., Wang Z. Y. und Sun Y. (2013a). Identification of BZR1-interacting Proteins as Potential Components of the Brassinosteroid Signaling Pathway in *Arabidopsis* Through Tandem Affinity Purification. *Molecular & Cellular Proteomics* 12: 3653-3665.
- Wang C., Yan X., Chen Q., Jiang N., Fu W., Ma B., Liu J., Li C., Bednarek S. und Pan J. (2013b). Clathrin light chains regulate clathrin-mediated trafficking, auxin signaling, and development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25: 499–516.
- Wang J. und Wilkinson M. F. (2000). Site-directed mutagenesis of large (13-kb) plasmids in a single-PCR procedure. *BioTechniques* 29: 976-978.
- Wang W. und Shakes D. C. (1996). Molecular evolution of the 14-3-3 protein family. *J. Mol. Evol.* 43, 384-398.
- Wang Y. und Sze H. (1985). Similarities and differences between the tonoplast-type and the mitochondrial H<sup>+</sup>-ATPase of oat roots, *J. Biol. Chem.* 260, 10434-10443.
- Wang Y., Noguchi K., Ono N., Inoue S., Terashima I. und Kinoshita T. (2014). Overexpression of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in guard cells promotes light-induced stomatal opening and enhances plant growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111 (1): 533-8.
- Went F. W. (1929). *Proc. Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam*, 32: 35–39.
- Wickner W. und Schekman R. (2008). Membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15: 658–664.
- Wilker E. W., Grant R. A., Artim S. C. und Yaffe M. B. (2005). A structural basis for 14-3-3sigma functional specificity. *J Biol Chem* 280: 18891–18898.
- Wiśniewska J., Xu J., Seifertová D., Brewer P. B., Ruzicka K., Blilou I., Rouquié D., Benková E., Scheres B. und Friml J. (2006). Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science* 312: 883.
- Wu K., Lu G., Sehnke P. und Ferl R.J. (1997). The heterologous interactions among plant 14-3-3 proteins and identification of regions that are important for dimerization. *Arch. Biochem. Biophys.* 339: 2–8.
- Würtele M., Jelic-Ottmann C., Wittingholfer A. und 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 S.J., Jones D.H., Dodson G.G., Soneji Y., et al. (1995). Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways. *Nature* 376: 188–191.
- Xu W., Jia L., Shi W., Liang J., Zhou F., Li Q. und Zhang J. (2013). Abscisic acid accumulation modulates auxin transport in the root tip to enhance proton secretion for maintaining root growth under moderate water stress. *New Phytol.* 2013 Jan; 197(1):139-50.
- Xu J. und Scheres B. (2005). Cell Polarity: ROPing the ends together. *Curr Opin Plant Biol.* 8, 613-618.

- Yaffe M.B., Rittinger K., Volinia S., Caron P.R., Aitken A., Leffers H., Gamblin S.J., Smerdon S.J. und Cantley L.C. (1997). The structural basis for 14-3-3: phosphopeptide binding specificity. *Cell*. 91(7):961-71.
- Yamaguchi N., Suzuki M., Fukaki H., Morita-Terao M., Tasaka M. und Komeda Y. (2007). CRM1/BIG-mediated auxin action regulates *Arabidopsis* inflorescence development. *Plant Cell Physiol*. 48: 1275-1290.
- Yang J. L., Chen W. W., Chen L. Q., Qin C., Jin C. W., Shi Y. Z. und Zheng S. J. (2013). The 14-3-3 protein GENERAL REGULATORY FACTOR11 (GRF11) acts downstream of nitric oxide to regulate iron acquisition in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol*. 197 (3): 815-824.
- Yang X., Lee W.H., Sobott F., Papagrigoriou E., Robinson C.V. , Grossmann J. G. et al. (2006). Structural basis for protein–protein interactions in the 14-3-3 protein family. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 17237–17242
- Yao Y., Du Y., Jiang L. und Liu J. Y. (2007). Molecular analysis and expression patterns of the 14-3-3 gene family from *Oryza sativa*. *J Biochem Mol Biol* 40: 349–357
- Zárský V. und Potocký M. (2010). Recycling domains in plant cell morphogenesis: small GTPase effectors, plasma membrane signalling and the exocyst. *Biochem. Soc. Trans.* 38: 723-728.
- Zhang B., Karnik R., Wang Y., Wallmeroth N., Blatt R. M. und Grefen C. (2015). The *Arabidopsis* R-SNARE VAMP721 Interacts with KAT1 and KC1 K+ Channels to Moderate K+ Current at the Plasma Membrane. *The Plant Cell* 27 (6): 1697-1717.
- Zhang J., Nodzynski T., Pencik A., Rolcik J. und Friml J. (2010). PIN phosphorylation is sufficient to mediate PIN polarity and direct auxin transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107 (2): 918–922.

## 7. Danksagung

Danke an meine Doktormutter Prof. Dr. Claudia Oecking für die freundliche Überlassung des hochinteressanten Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und natürlich dafür, dass Sie mir gezeigt hat, wie wichtig Kontrollen und stetige Wiederholungen sind. Die Verwirrung ist nun vorbei.

Danke an Prof. Dr. Klaus Harter für die Übernahme der Zweitkorrektur und die Betreuung während des „graduate programs“.

Danke auch an Dr. York Stierhof für die wertvollen Tipps der Mikroskopie, die EM-Untersuchungen und die Betreuung während des „graduate programs“.

Dr. Nina Jaspert danke für die vielen nützlichen Tipps und Tricks während meiner Arbeit, den Spaß, für die Rettung aus den schwarzen Löchern und vor allem für die schönen Samstage.

Einen besonderen Dank geht an Jutta Keicher die zusammen mit mir das Problem *emo* angepackt und erfolgreich weitergeführt hat. Danke für den Beistand während der vielen, kalten Stunden im Kühlraum. Andrea Bock danke für die vielen netten Gespräche und die Durchführung der Hefetrafo und des Tropftests.

Danke an Dr. Sandra Richter für die wertvollen Tipps, diverse Samen und die Herstellung der zahlreichen Immunos. Dr. Misoon Park und Dr. Manoj Singh für die guten Ratschläge und die Spende an diversen Samen und Antikörpern.

Danke an die FG Schumacher besonders Dr. Melanie Krebs für die Untersuchungen des vakuolären pH-Werts mit BCECF-AM, die nützlichen Tipps für die Aktivitätstests und die Antikörper für die vakuolären Pumpen.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern danke, dass Ihr mich mein ganzes Leben lang begleitet und unterstützt habt. Danke auch an meine fünf geliebten Brüder, insbesondere meinen Bruder Peter. Du weißt, ohne Dich wäre ich niemals diesen Weg gegangen. Danke für Deine Unterstützung, Geduld und das Du immer ein offenes Ohr für mich hast (der Weg um den Kreisel hat sich gelohnt). Michael und Wolfgang danke für die stetig aufbauenden Worte und Unterstützung, die Ihr mir zuteilwerden lasst.

Danke an meine beste Freundin Nadushka, die in all den Jahren wie eine Schwester für mich geworden ist. Ich sage es Dir viel zu selten, doch unsere Freundschaft ist für mich etwas ganz Besonderes. Danke auch an meine Studienfreundinnen Natalie, Romina, Angela und Cecilia. Wir haben zusammen angefangen und wir beenden alles zusammen, ohne euch hätte alles nur halb soviel Spaß gemacht.

Zuletzt allen Mitarbeitern des ZMBPs insbesondere all denen einen besonderen Dank die mir während dieser Zeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben und die ich vergessen habe (war keine Absicht).

## Lebenslauf

Name: Sarah Naumann  
Geburtsdatum: 02.03.1984  
Geburtsort: Trier

Erhalt der Allgemeinen Hochschulreife: März 2004

Studium der Biologie:

Oktober 2005 bis  
März 2011: an der Johannes Gutenberg Universität Mainz. Diplomarbeit im Institut für Allgemeine Botanik zum Thema „Tiefemperatur-Absorptionsspektroskopie von LHCIIb zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Rekonstitutionskinetik“ unter der Leitung Prof. Dr. H. Paulsen

Seit September 2011: Doktorandin und wissenschaftliche Mitarbeiterin am Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen bei Prof. Dr. C. Oecking