



**Phosphoinositide im Kern pflanzlicher Zellen:
Kernlokalisierung der ubiquitären PI4P 5-Kinase PIP5K2 und
ihr Einfluss auf die Entwicklung von *Arabidopsis thaliana***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
„doctor rerum naturalium“

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I -Biowissenschaften-
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von
Angela Katharina Gerth

geboren am 9. Januar 1988 in Mainz

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05. März 2018

Gutachter: Prof. Dr. Ingo Heilmann
Prof. Dr. Bettina Hause
Prof. Dr. Markus Grebe

Diese Arbeit wurde betreut von Frau Dr. Mareike Heilmann in der Abteilung Zelluläre Biochemie an der MLU Halle-Wittenberg.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	v
1 Einleitung	1
1.1 Pflanzenentwicklung und Wachstum	1
1.1.1 Wurzelmeristem	2
1.1.2 Zellzyklus und Zellzykluskontrolle in pflanzlichen Zellen	5
1.2 Ort des Zellzyklus und der Genregulation: der pflanzliche Zellkern	7
1.2.1 Aktiver Kernimport von Proteinen und klassische Kernlokalisierungssignale	9
1.3 Phosphoinositide als mögliche Regulatoren nukleärer Prozesse	12
1.3.1 Strukturelle Funktionen von Lipiden und Signallipiden	12
1.3.2 Das pflanzliche Phosphoinositid-System	13
1.3.3 PI4P 5-Kinasen in Arabidopsis	15
1.3.4 Subzelluläre Verteilung von PIs, insbesondere PtdIns(4,5)P ₂ und PI-modifizierende Enzymen	16
1.3.5 Cytoplasmatische Funktionen von PtdIns(4,5)P ₂	18
1.3.6 Hinweise auf den Einfluss von PIs auf die pflanzliche Entwicklung	19
1.3.7 Hinweise auf Funktionen von PIs im Zellkern	20
1.4 Kriterien für einen biologisch relevanten aktiven Kernimport von PI4P 5-Kinasen	22
1.5 Zielstellung	23
2 Ergebnisse	24
2.1 PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P ₂ können im Zellkern von Arabidopsis nachgewiesen werden	25
2.2 Untersuchungen zur PI4P 5-Kinaseaktivität im pflanzlichen Zellkern	28
2.3 Die Fusion mit PIP5K2 führt zum Kerntransport eines cytosolischen Proteins	30
2.4 PIP5K2 interagiert mit α -Importinen	31
2.5 Die Kernlokalisierung von PIP5K2 wird über deren N-terminalen Domäne vermittelt	33
2.6 PIP5K2 besitzt funktionale Kernlokalisierungssignale	33
2.7 Die Substitution wichtiger Aminosäuren in NLS IV reduziert die Kernlokalisierung von PIP5K237	
2.8 Studien zur Komplementation der <i>pip5k1 pip5k2</i> -Doppelmutante mit PIP5K2-Varianten, die reduziert im Zellkern lokalisieren	40
2.8.1 Die Expression von <i>pPIP5K2::PIP5K2-NES_{PKIα}-EYFP</i> komplementiert die <i>pip5k1 pip5k2</i> -Doppelmutante	42
2.8.2 Bei Expression von <i>pPIP5K2::PIP5K2_{AAA}-EYFP</i> in der <i>pip5k1 pip5k2</i> -Doppelmutante wird der Entwicklungsphänotyp nicht vollständig komplementiert	42
2.9 Hinweise auf mögliche Funktionen von PIP5K2 im Zellkern	56

2.10	PIP5K2 interagiert mit dem Zellzyklusregulator Retinoblastoma related 1 (RBR1)	56
2.10.1	Die Interaktion von PIP5K2 und RBR1 wird über ein LxCxE-Motiv vermittelt.....	57
2.11	RBR1 bindet Phosphatidylinositol-Monophosphate	60
2.12	Untersuchungen zur Funktionalität der PIP5K2-RBR1-Interaktion	61
2.12.1	Es gibt keine Hinweise auf einen Einfluss von RBR1 auf die PI4P 5-Kinaseaktivität von PIP5K2	61
2.12.2	Die RBR1-Homöostase der <i>pip5k1 pip5k2</i> -Doppelmutante könnte verändert sein	63
2.12.3	Das Gewebemuster des Wurzelmeristems der <i>pip5k1 pip5k2</i> -Doppelmutante scheint nicht verändert.....	65
3	Diskussion	66
3.1	Nachweis nukleärer Phosphoinositide in Arabidopsis	66
3.2	Hinweise auf aktiven Kerntransport von PIP5K2.....	68
3.3	PIP5K2 interagiert mit α -Importinen.....	69
3.4	Identifizierung einer funktionalen NLS in PIP5K2.....	70
3.5	Mögliche Regulation der Kernlokalisierung von PIP5K2	72
3.6	Komplementationsstudien der <i>pip5k1 pip5k2</i> -Doppelmutante mit PIP5K2-Varianten mit reduzierter Kernlokalisierung.....	73
3.7	Hinweise auf kernlokalisierte Funktionen von PIP5K2 in der Kontrolle der Organentwicklung	75
3.8	PIP5K2 interagiert mit RBR1, ein Hinweis auf mögliche Funktionen von PIP5K2 im Zellkern ...	77
4	Zusammenfassung	80
5	Material und Methoden	82
5.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	82
5.2	Geräte.....	82
5.3	Enzyme und Größenstandards	82
5.4	Mikroorganismen	83
5.5	Pflanzen.....	83
5.6	Kulturmedien.....	84
5.6.1	Bakterienmedien	84
5.6.2	Hefemedien	85
5.6.3	Pflanzenmedium.....	85
5.6.4	Medienzusätze	86
5.7	Vektoren.....	86
5.8	Wachstumsbedingungen zur Anzucht von Arabidopsis.....	87
5.9	Präparation von RNA, DNA und cDNA aus biologischen Proben	88
5.9.1	Isolierung von RNA aus Arabidopsis.....	88
5.9.2	Isolierung von genomischer DNA aus Arabidopsis.....	88

5.9.3	Auftrennung von DNA und RNA in Agarosegelen	89
5.9.4	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	89
5.9.5	cDNA-Synthese	89
5.10	Quantifizierung von Transkriptmengen mittels real-time PCR (qPCR)	89
5.11	Molekularbiologische Methoden	90
5.11.1	Amplifikation von DNA-Fragmenten durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	90
5.11.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	91
5.11.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	91
5.11.4	Restriktion von DNA	91
5.11.5	Ligation	91
5.11.6	Präparation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	91
5.11.7	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	92
5.11.8	Überprüfung der erstellten Plasmide durch Sequenzierung.....	92
5.11.9	Gateway®-Klonierung.....	92
5.11.10	Herstellung und Transformation chemisch-kompetenter <i>A. tumefaciens</i>	92
5.11.11	Transformation von Arabidopsis-Pflanzen durch <i>A. tumefaciens</i>	93
5.11.12	Selektion transformierter Arabidopsispflanzen	93
5.12	Bioinformatische Datenbankvergleiche und Sequenzanalysen	94
5.13	3D-Strukturmodell von PIP5K2.....	94
5.14	Klonierungsstrategie für verwendete cDNA-Klone	94
5.14.1	PIP5K2-Fusionskonstrukte.....	94
5.14.2	RubisCO-mCherry-NLS-mCherry-Reporter	95
5.14.3	Erstellung von mutierten PIP5K2-Varianten	97
5.14.4	Erstellte Konstrukte für Hefe-Zwei-Hybrid-Studien	97
5.14.5	Konstrukte zur Proteinexpression in <i>E. coli</i>	99
5.14.6	Konstrukte zur transienten Expression in Tabakepidermiszellen	99
5.14.7	Konstrukte zur stabilen Transformation von Arabidopsis.....	100
5.15	Proteinexpression, Zellaufschluss und Proteinanreicherung.....	100
5.15.1	Rekombinante Proteinexpression in <i>E. coli</i>	100
5.15.2	Rekombinante Proteinexpression in Tabakepidermiszellen	101
5.15.3	Zellaufschluss von <i>E. coli</i> -Zellen durch Ultraschall	102
5.15.4	Zellaufschluss von <i>E. coli</i> -Zellen im Hochdruck-Homogenisierer.....	102
5.15.5	Aufschluss von Pflanzenzellen zur Herstellung von Proteinextrakten	103
5.15.6	Anreicherung von Proteinen mittels Affinitätschromatografie	103
5.15.7	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	103

5.15.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	104
5.15.9	Immundetektion auf Nitrocellulose-Membranen (Westernblot)	104
5.16	Bestimmung der PI4P 5-Kinaseaktivität <i>in vitro</i>	106
5.17	Untersuchungen zur Protein-Lipid-Interaktion	107
5.18	Untersuchungen zur Protein-Protein-Interaktion	107
5.18.1	Split-Ubiquitin-basiertes Hefe-Zwei-Hybridsystem	107
5.18.2	Dotblot.....	109
5.19	Immunhistochemischer Nachweis von Lipiden und Proteinen.....	109
5.20	Kernanreicherung	110
5.21	Transiente Expression in Zwiebelepidermiszellen	111
5.22	Mikroskopische Untersuchung stabil transformierter Arabidopsis-Wurzelzellen	112
5.22.1	Induktion der pWOX::ER-GFP-Expression durch Dexamethason.....	112
5.22.2	Propidiumiodid-Färbung der Zellwand.....	112
5.22.3	Subzelluläre Lokalisierung des PtdIns(4,5)P ₂ -Reporters PH _{PLC6} -EYFP	112
5.23	Mikroskopie.....	112
6	Literaturverzeichnis	113
7	Anhang	125
7.1	Zusätzliche Abbildungen zu den dargestellten Ergebnissen	125
7.2	Zusätzliche Informationen zu den genutzten Methoden.....	132
7.2.1	Mehrfachklonierungsstelle der pEntry-Vektoren	132
7.2.2	In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide	133
	Danksagung	136
	Lebenslauf	138
	Eidesstattliche Erklärung	139

Abkürzungsverzeichnis

5PTase	Inositolpolyphosphat-5-Phosphatasen
ATX1	ARABIDOPSIS HOMOLOG OF TRITORX1
BiP	Binding Immunoglobulin Protein
CDB	<i>cylin destruction box</i>
CDKs	Cyclin Dependent Kinases
CDP-DAG	Cytidindiphosphat-Diacylglycerin
CLE40	CLAVATA/EMBRYO SURROUNDING REGION40
CVL1/ARC4	CLAVATA/ARABIDOPSIS CRINKLY4
DP	Dimerization Partner
E2F	E2 Promotor Binding Factor
ER	endoplasmatisches Reticulum
H3K4me2	dimethliertes Lysin 4 in Histon 3
H3K4me3	trimethliertes Lysin 4 in Histon 3
HsHDAC1	humane Histondeacetylase 1
HsPIP5KI α	humane PI4P 5-Kinase Isoform α
HRP	Merretich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HsRb	humanes Retinoblastoma
IBB	Importin β -Bindedomäne
IMP α	α -Importin
MBP	Maltose-bindendes Protein
MORN	<i>membrane occupation and recognition nexus</i>
MSI	MULTICOPYSUPPRESSOR OF IRA
Mss4	PI4P 5-Kinase aus Hefe
MTM	Myotubularine
NES	Kernexportsequenz
NES _{PKIα}	NES des humanen cAMP-abhängiger Proteinkinase-Inhibitor
NLS	Kernlokalisierungssignal
NLS _{SV40}	NLS aus dem großen T-Antigen des Simian Virus 40
OST4	Oligosaccharyltransferase 4
PA	Phosphatidsäure
pCYCB	Cyclin B-Promotor
PHD	plant homeodomain

PH _{PLCδ}	PH-Domäne der humanen PLCδ
PI-PLC	PI-abhängige Phospholipase
PID	PINOID
PIN	PIN-FORMED
PIs	Phosphoinositide
PLT	PLETHORA
PTEN	phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten
PIP5K1	Phosphatidylinositol-4-Phosphat 5-Kinase Isoform 1
PIP5K2	Phosphatidylinositol-4-Phosphat 5-Kinase Isoform 2
PIP5K2 _{AAA}	PIP5K2 mit Alaninsubstitution der funktionalen NLS
PIP5K2 _{AxAxA}	PIP5K2 mit Alaninsubstitution des LxCxE-Motivs
PtdIns	Phosphatidylinositol
PtdIns(3)P	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
PtdIns(4)P	Phosphatidylinositol-4-Phosphat
PtdIns(5)P	Phosphatidylinositol-5-Phosphat
PtdIns(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
QC	ruhendes Zentrum (engl. <i>quiescent center</i>)
RAM	Wurzelspitzenmeristem (engl. <i>root apical meristem</i>)
RanBP	Ran binding protein
Ran-GEF	Guanine nucleotide exchange factor
RanGTP	GTP-gebundenes Ran
RanGAP1	GTPase-activating protein 1
Rbcl	große Unterheit von RubisCO
RBR1	Retinoblastoma-related 1
RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase
S6K1	S6-Kinase 1
SAC	Suppressor Of Actin
SAM	apikales Sprossmeristem (engl. <i>shoot apical meristem</i>)
SCR	SCARECROW
SHR	SHORT-ROOT
Vps34	vascular protein sorting 34
WOX5	WUSCHEL-RELATED HOMEBOX5

1 Einleitung

Wachstum und Entwicklung werden in Eukaryoten, und damit auch in Pflanzen, sowohl von inneren Entwicklungsprogrammen wie auch von äußeren Faktoren bestimmt und unterliegen damit regulatorischen Prozessen. Biotische und abiotische Änderungen werden von pflanzlichen Zellen als externes Signal, z.B. mit Rezeptoren wahrgenommen und durch Signalkaskaden übermittelt. Dies kann entweder über sukzessive Protein-Phosphorylierungen, Phytohormone, Signallipide wie z.B. Phosphoinositide oder einem Zusammenspiel aus all diesen Möglichkeiten realisiert werden. Bei der Signalweiterleitung kommt es zu kurzfristigen molekularen Änderungen an Plasmamembran und im Cytosol. Signale die bis in den Zellkern übermittelt werden, können dort zur Änderung der Genexpression führen und so die physiologischen Abläufe und Funktionen in der Zelle verändern. Als sessile Lebewesen sind Pflanzen verstärkt darauf angewiesen, sich vor Ort an die gegebenen Umstände anzupassen. Dazu können Pflanzen mit veränderter Entwicklung und Wachstum auf sich ändernde Umweltbedingungen reagieren. Dem liegt das Vorhandensein von dauerhafte Stammzellpopulationen, sogenannten Meristemen zugrunde, über die während des gesamten Lebenszyklus die Organentwicklung angepasst werden kann. Bei einer Vielzahl regulatorischer Prozesse spielen Phosphoinositide (PIs) eine Rolle. Dem pflanzlichen PI-System konnten zahlreiche Signalfunktionen an der Plasmamembran zugeordnet werden. In den letzten Jahren häufen sich die Hinweise auf regulatorische Funktion von PIs im Zellkern und während der pflanzlichen Entwicklung. Zum Beispiel werden Phosphoinositide, vor allem Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ($\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$) mit der Regulation des Zellzyklus, Chromatinkondensation, Histonmodifikationen und transkriptioneller Kontrolle in Verbindung gebracht. Unklar bleibt jedoch, ob $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -bildende Enzyme, die PI4P 5-Kinasen, aktiv in den Zellkern transportiert werden, durch welche Entwicklungssignale oder Umweltbedingungen die konditionale Lokalisierung im Zellkern reguliert wird und welche Funktionen PI4P 5-Kinasen im Zellkern besitzen. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Identifikation und Charakterisierung von Kernlokalisierungssignalen einer PI4P 5-Kinase aus Arabidopsis und den möglichen Einfluss auf die pflanzliche Entwicklung.

1.1 Pflanzenentwicklung und Wachstum

Pflanzenwachstum und -entwicklung wird durch das strengregulierte Zusammenspiel von Zellteilung, Zellwachstum und Zelldifferenzierung abgestimmt. Zu Beginn der pflanzlichen Entwicklung steht die einzellige befruchtete Zygote. Daraus formt sich durch asymmetrische Zellteilungen ein vielzelliger Embryo. Im sich entwickelndem Embryo sind die Strukturen der polaren Pflanzenkörperorganisation bereits angelegt. Im Gegensatz zu Tieren wird die Organentwicklung in Pflanzen während der

Embryogenese nicht abgeschlossen, sondern postembryonal während der gesamten Lebensspanne weitergeführt. Ermöglicht wird die pflanzliche postembryonale Organentwicklung durch die Existenz von Stammzellnischen, sogenannten Meristemen, die während der Embryogenese angelegt werden. In Meristemen wie z.B. dem apikalen Sprossmeristem (*shoot apical meristem*, SAM) und dem Wurzelspitzenmeristem (*root apical meristem*, RAM) werden durch asymmetrische Zellteilungen der Stammzellen Tochterzellen gebildet, die sich weiter teilen und nach Zelldifferenzierung zur Bildung neuer Organe führen (Nakajima & Benfey, 2002; Weigel & Jürgens, 2002; Perilli et al., 2012). Die Struktur und Größe pflanzlicher Organe wird durch ein bisher nicht vollständig verstandenes, komplexes Zusammenspiel verschiedener Phytohormone, Transkriptionsfaktoren, Enzymen, miRNAs und weiteren zum Teil nicht bekannten Faktoren reguliert, wodurch bestimmt wird welche Zellen sich teilen, wie hoch die Zellteilungsrate ist und wie und wann sich diese Zellen anfangen zu differenzieren (Perilli et al., 2012; Yruela, 2015). Im Gegensatz zu tierischen Zellen sind Pflanzenzellen von einer Zellwand umgeben, so dass pflanzliche Zellen nicht in der Lage sind den Ort ihrer Entstehung zu verändern, die jeweilige Zellidentität wird durch die Position im Gewebeverband bestimmt und die Differenzierung wird durch die benachbarten Zellen reguliert (Steeves & Sussex, 1989; Meyerowitz, 1997). Die Differenzierung von Zellen beginnt in einer bestimmten Entfernung zu den Stammzellen. Die Teilungsfähigkeit der Zellen nimmt ab und die Zellen beginnen durch die Vergrößerung der Vakuole mit dem für Pflanzen typischen Streckungswachstum (Perilli et al., 2012). Durch diese Streckung wird der Spross länger bzw. die Wurzelspitze tiefer ins Erdreich vorgeschoben, während die apikalen primären Meristeme weitere Zellen bilden (Schoof et al., 2000). Die Entwicklung einer Zelle wird bei Pflanzen nicht terminal determiniert, d.h. selbst ausdifferenzierte Zellen können durch den Einfluss von Phytohormonen zur Umdifferenzierung in einen anderen Zelltyp oder zur Reembryonalisierung veranlasst werden. Unter Laborbedingungen kann so aus einer Zelle unter Zugabe der Phytohormone Auxin und Cytokinin eine vollständige neue Pflanze regeneriert werden (Sugimoto et al., 2011). Obwohl Auxin und Cytokinin eine wichtige Funktion in der Balance zwischen Zellteilung und Zelldifferenzierung besitzen, und damit direkt die Meristemfunktion beeinflussen, ist nicht im Detail bekannt wie die Phytohormone auf molekularer Ebene wirken (Dewitte & Murray, 2003; Perilli & Sabatini, 2010; Perales & Reddy, 2012).

1.1.1 Wurzelmeristem

Schon während der Embryogenese bildet sich das primäre pflanzliche Wurzelmeristem. Die Stammzellen der Meristeme bleiben, im Gegensatz zu ausdifferenzierten Zellen, teilungsfähig. Diese Stammzellen teilen sich langsam und selten (Aichinger et al., 2012). Durch asymmetrische Zellteilung der Stammzellen entstehen zwei unterschiedliche Tochterzellen. Eine Tochterzelle fungiert an der ursprünglichen Position weiterhin als Stammzelle. Die zweite Tochterzelle weist eine höhere Zellteilungsrate auf und wird Teil einer Zellpopulation die sich kontrolliert teilt, bis sie aus dem Zellzyklus austritt und beginnt sich zu differenzieren (Abbildung 1.1; Perilli et al., 2012). Die Zellidentität der Tochterzellen wird durch die

Identität der Stammzellen bestimmt (Scheres, 2001; Gailloch et al., 2015). So bilden Tochterzellen der Columella-Stammzellen die Columella, Nachkommen der Zentralzylinder-Stammzellen den Zentralzylinder, Cortex-/Endodermis-Stammzellen den Cortex und die Endodermis und Stammzellen für Epidermis und seitliche Wurzelhaube eben diese Gewebe (Abbildung 1.1). Aus den Wurzelstammzellen entstehen demnach die unterirdischen Organe der Pflanze.

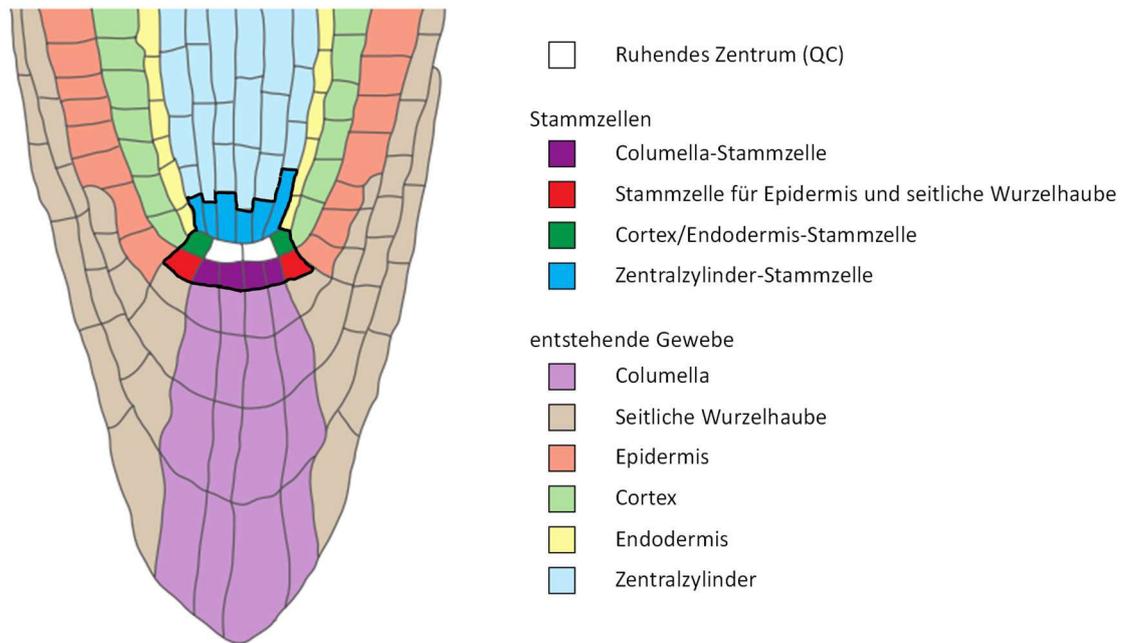


Abbildung 1.1 **Organisation des apikalen Wurzelmeristems (RAM)**. Um das ruhende Zentrum (QC, weiß) befinden sich die Columella-Stammzellen (lila), Stammzellen für Epidermis und seitliche Wurzelhaube (rot), Stammzellen für Cortex und Epidermis (grün) und Stammzellen zur Bildung des Zentralzylinders (blau). Die aus den Zellteilungen der Tochterzellen jedes Stammzelltyps hervorgegangenen Zellen differenzieren sich und bilden die verschiedenen Wurzelgewebe. Die aus Stammzellen entstehenden Gewebe sind in der gleichen Farbe weniger stark gefärbt dargestellt. Abbildung modifiziert nach Aichinger et al. (2012).

Im Zentrum der Stammzellen liegt das so genannte ruhende Zentrum (*quiescent center*, QC) des Meristems, das aus vier sich sehr selten teilenden Zellen besteht. Die Zellen des QC fördern die Zellteilung ihrer Nachbarzellen, den Stammzellen, verhindern aber gleichzeitig deren Differenzierung (Abbildung 1.1; Naway et al., 2005). Die Position des QC wird definiert durch einen PIN-FORMED (PIN)-Protein-vermittelten Auxingradienten vom SAM bis in die Wurzelspitze (Blilou et al., 2005), wobei die höchste Auxinkonzentration in den Zellen des QC vorliegt. Neben diesem basipetalen Auxintransport, wird auch lokal in der Wurzelspitze Auxin synthetisiert (Moubayidin et al., 2013). Die lokale Auxinkonzentration entlang des Auxingradienten definiert das Differenzierungsstadium jeder Zelle zwischen Spross- und Wurzelmeristem. Entsprechend dieses Gradienten werden die Auxin-induzierbaren Transkriptionsfaktoren der PLETHORA (PLT)-Familie exprimiert (Aida et al., 2004; Hofhuis et al., 2013). Durch eine starke PLT-Expression kann die Aktivität des QC und der umgebenen Stammzellen aufrechterhalten werden. Je größer die Entfernung zum QC, desto geringer die Auxinkonzentration, desto weniger PLT wird exprimiert und desto seltener teilen sich diese Zellen (Galinha et al., 2007). Im Gegensatz zur Auxinkonzentration

sind die Cytokiningehalte in der Wurzelspitze am geringsten und steigen in Richtung Spross an. Über das Zusammenspiel von Auxin und Cytokinin wird der Übergang der teilungsaktiven Zellen des proximalen Meristems zu sich differenzierenden, elongierenden Zellen reguliert (Benková & Hejác̃ko, 2009; Sozzani & Iyer-Pascuzzi, 2014). Während Auxin zur Erhaltung des Meristems und der Stammzellaktivität führt (Aida et al., 2004), treten die Zellen des Wurzelmeristems durch den Einfluss von Cytokinin aus dem Zellzyklus aus und differenzieren sich (Dello Iorio et al., 2007, 2008). Zusätzlich beeinflussen weitere Phytohormone die Zellteilung und -differenzierung. So führen Brassinosteroide sowohl zu einer Stimulation des Zellzyklus, in zu hoher Konzentration aber zum frühzeitigen Austritt aus dem Zellzyklus und zur Differenzierung (González-García et al., 2011). Gibberellinsäure wirkt vor allem in der Endodermis in dem es dort die Zellelongation reguliert, welches auch die Zellelongation und -teilung anderer meristematischer Gewebe beeinflusst (Ubeda-Tomás et al., 2009). Ethylen beeinflusst das Wurzelwachstum primär durch Inhibierung der Zellexpansion bei Austritt aus dem Zellzyklus, reguliert aber auch die Balance von Zellzyklus und -differenzierung im QC: eine erhöhte Ethylenkonzentration führt zu Zellteilung im QC (Ortega-Martinez et al., 2007). Die streng regulierte Konzentration unterschiedlicher Phytohormone in verschiedenen Bereichen des Wurzelmeristems führt zu einer sehr selektiven Genexpression. Durch die An- oder Abwesenheit bestimmter Phytohormone werden die entsprechenden Phytohormon-responsiven Gene entweder exprimiert oder reprimiert, eine Vielzahl der so regulierten Gene codieren für Transkriptionsfaktoren (Pacifici et al., 2015).

Neben dem Einfluss von Phytohormonen auf die Stammzellen-erhaltende Signale des QC, werden diese durch auch durch Signale differenzierter Zellen antagonistisch reguliert. Ablationsstudien zeigten, dass das Fehlen des QC zur Differenzierung der Stammzellen führt (van den Berg et al., 1997). Im QC wird der Transkriptionsfaktor WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 5 (WOX5) exprimiert, reprimiert dort die CyclinD-Expression und verhindert so die Zellteilung (Forzani et al., 2014). Das Fehlen von WOX5 führt zu einer spezifischen Differenzierung der Columella-Stammzellen (Sarkar et al., 2007). Die Expression von WOX5 außerhalb des QC und der Columella-Stammzellen wird unterdrückt. Dies geschieht durch CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION 40 (CLE40), ein Peptid, welches in differenzierten Columella-Zellen exprimiert wird. CLE40 wird sekretiert und vom CLAVATA1/ARABIDOPSIS CRINKLY4 (CVL1/ARC4)-Rezeptor der gleichen und benachbarten Zellen erkannt. Das führt über eine bisher nicht bekannte Signalkaskade zur Repression der WOX5-Expression (Stahl et al., 2013). WOX5 ist auch an der Erhaltung des proximalen Meristems beteiligt, kann dort aber auch durch redundante Signalwege ersetzt werden (Sarkar et al., 2007).

Parallel mit Auxin und PLT führt die Expression der Transkriptionsfaktoren wie SHORT-ROOT (SHR) und SCARECROW (SCR) zur asymmetrischen Zellteilung der Cortex-Endodermis-Stammzellen, welche die Ausbildung einer Zellschicht Endodermis und einer Zellschicht Cortex ermöglicht (Sozzani et al., 2010). SHR wird im Zentralzylinder exprimiert und gelangt von dort in die benachbarte Zellschicht (Nakajima et al., 2001). Dort lokalisiert SHR im Kern und initiiert die Expression seines Bindungspartners SCR (Cui et al.,

2007). In der Regel wird diese asymmetrische Zellteilung durch die Bindung von RBR1 an SCR unterbunden. Bei hohen Auxin-Konzentrationen wird die Bindung von RBR1 an SCR verhindert und die asymmetrische Teilung induziert (Cruz-Ramírez et al., 2012). Da reduzierte RBR1-Gehalte im QC ebenfalls die asymmetrische Zellteilung initiieren, scheint auch RBR1 selbst eine Funktion in der Erhaltung des QC zu spielen (Wildwater et al., 2005; Cruz-Ramírez et al., 2013).

Dass entwicklungspezifische Funktionen von RBR1 in der Regulation von Zellteilung und Erhaltung der Stammzellidentität nicht auf das Wurzelmeristem beschränkt sind, zeigt sich durch die Funktion von RBR1 in der irreversiblen Differenzierung von Stomata, welche vermutlich über Interaktion von RBR1 mit den Transkriptionsfaktor FAMA vermittelt wird (Matos et al., 2014). Wird diese Interaktion verhindert, kommt es nicht zu einer Differenzierung, sondern zu weiteren Zellteilungen (Matos et al., 2014). Außerdem reguliert RBR1 den Übergang vom Keimling zur autotrophen Pflanze, in dem es vermutlich durch Rekrutierung einer Histonmethylase zur Histontrimethylierung und somit für das Abschalten spät-exprimierter Gene der Embryonalentwicklung sorgt (Gutzat et al., 2012).

Inwieweit entwicklungspezifische Funktionen von RBR1 analog zur Zellzyklusregulation über CDK/Cyclin-abhängige Phosphorylierung reguliert werden, ist noch nicht bekannt. Hinweise darauf könnte die bereits erwähnte Funktionen von Cyclin D in der Balance zwischen Zellteilung und Differenzierung geben (Cruz-Ramírez et al., 2012; Forzani et al., 2014; Gutierrez, 2016). Neben zelltypspezifischen Funktionen von RBR1 ist RBR1 als Zellzyklusregulator allgemein in meristematischen Zellen an der Regulation von Zellzyklus und Differenzierung beteiligt (Borghi et al., 2010). Dabei ist die RBR1-Funktion dosissensitiv. So muss die RBR1-Menge im Meristem gering genug sein, um eine zu frühe Differenzierung zu verhindern aber hoch genug, um eine zu häufige Zellteilung zu verhindern (Wildwater et al., 2005; Wachsman et al., 2011).

1.1.2 Zellzyklus und Zellzykluskontrolle in pflanzlichen Zellen

In höheren Pflanzen teilen sich nur meristematische Zellen, wobei auch bereits differenzierte Zellen reembryonalisieren und wieder in den Zellzyklus eintreten können.

In allen Eukaryoten wird die Progression des Zellzyklus durch die temporäre Aktivität und das Zusammenspiel von verschiedenen Cyclinen und Cyclin-abhängiger Serin/Threonin-Kinasen (*cyclin dependent kinases*, CDKs) reguliert, die in höheren Eukaryoten mit RBR1 die Replikation der DNA initiieren (Cobrinik, 2005; Inzé & De Veylder, 2006). In Arabidopsis existieren 12 CDKs der Klassen CDKA, CDKB1 und CDKB2 und 49 Cycline die entsprechend ihrer Homologie mit menschlichen Cyclinen klassifiziert werden. Davon haben die 32 Cycline der A-, B-, D- und H-Cycline vermutlich Funktionen in der Zellzyklusregulation (Inzé & De Veylder, 2006). Über die Bildung spezifischer Cyclin/CDK-Komplexe wird das Fortschreiten des Zellzyklus reguliert. Die temporäre Expression der Cycline ist für einen geordneten Ablauf des Zellzyklus essentiell (Abbildung 1.2A). Sie unterliegen daher einer starken Regulation durch schnellen Abbau. So werden B-Cycline während der Mitose durch die Ubiquitinylierung ihrer Cyclin-Destruction-Box (CDB) für den proteasomalen Abbau markiert (Genschik et al., 1998). Zusätzlich wird auch die Aktivität der

CDK/Cyclin-Komplexe über Phosphorylierung oder die Bindung von CDK-Inhibitoren moduliert (Inzé & De Veylder, 2006).

In der G1-Phase (aus dem Englischen von *gap* = Lücke) wächst die Zelle und ist metabolisch sehr aktiv. Während dieser Phase bindet RBR1 den Heterodimer der Transkriptionsfaktoren Adenovirus E2 promoter binding factor (E2Fa) und dimerization partner (DP) (E2Fa-DP, Abbildung 1.2B; Ramirez-Parra et al., 1999; Sekine et al., 1999). In Homologie zum tierischen System wird angenommen, dass RBR1 eine Histondeacetylase rekrutiert, welche zur Kondensation des Chromatins führt und in dieser Zellzyklusphase die Expression S-Phase-spezifischer Gene verhindert (De Veylder et al., 2007). Ob sich eine Zelle teilt, wird durch die Initiation des Übergangs in die S-Phase entschieden. Die Expression von D-Cyclinen wird durch externe Faktoren wie der Nährstoffversorgung (Saccharose-Verfügbarkeit) und Wachstumsregulatoren, den Phytohormonen Auxin, Cytokinin, Bassinosteroiden und Gibberellinen reguliert (Abbildung 1.2B; Hu et al., 2000; Riou-Khamlichi et al., 1999, 2000; De Veylder et al., 1999). Bei Expression von Cyclin D bindet dieses über das LxCxE-Motiv an RBR1 und rekrutiert CDKA. Der aktive CyclinD/CDKA-Komplex hyperphosphoryliert RBR1. Die dadurch induzierte Konformationsänderung hebt die inhibitorische RBR1-Bindung an den Transkriptionsfaktor E2Fa-DP auf, welches zur Expression von Genen führt, die Funktionen in der Zellzykluskontrolle, DNA-Replikation und Chromatindynamik besitzen und als S-Phasen-spezifische Gene zusammengefasst werden (Abbildung 1.2B; Inzé & De Veylder, 2006). Im Folgenden werden A-Cycline während der S-Phase bis zur Mitose exprimiert (Abbildung 1.2A; Inzé & De Veylder, 2006). Nach DNA-Replikation in der S-Phase wird in der folgenden G2-Phase die replizierte DNA auf Vollständigkeit und Fehler überprüft und an die Mitosespindel angelagert (Komaki & Schnittger, 2016). Die Expression von B-Cyclinen reguliert dann den Übergang von G2-Phase zu Mitose, dabei sind vermutlich mehrere CDKs beteiligt: CDKB1 wird während der S-, G2-Phase und der Mitose exprimiert und CDKB2 während G2-Phase und Mitose (Abbildung 1.2A; Hirayama et al., 1991; Porceddu et al., 2001). Während der Mitose segregiert der doppelte Chromosomensatz in eukaryotischen Zellen. Durch die starre pflanzliche Zellwand ergeben sich Besonderheiten in der pflanzlichen Mitose. Das Präprophasenband, eine spezielle Cytoskelett-Struktur zeigen die Orientierung der Zellteilung an und bestimmen somit, in wieweit sich eine Zelle symmetrisch oder asymmetrisch und/oder periklin oder antiklin teilt (Gutierrez, 2016). An dieser Position bildet sich dann am Ende der Mitose in der späten Telephase der Phragmoplast, welcher die Ausbildung der Zellplatte ermöglicht (Jürgens, 2005). Am Ende der Mitose trennen Zellmembranen und Zellwand die beiden Tochterzellen, welche nun jeweils einen vollständigen Chromosomensatz enthalten (Jürgens, 2005). Nach Rekonstruktion der Kernhülle und Dekondensation des Chromatins beginnt die nächste G1-Phase (Dewitte & Murray, 2003; Inzé & De Veylder, 2006). Abhängig vom weiteren Schicksal der Zelle, wird sie wieder in die S-Phase eintreten und den Zellzyklus erneut durchlaufen oder sie beginnt sich zu differenzieren. Alternativ können Zellen auch in der G1-Phase arretieren und in die G0-Phase übergehen: Eine Art Ruhephase, in der sich Zellen nicht teilen, aber auch nicht differenzieren, sodass sie jederzeit wieder in den Zellzyklus eintreten können (den Boer & Murray, 2000).

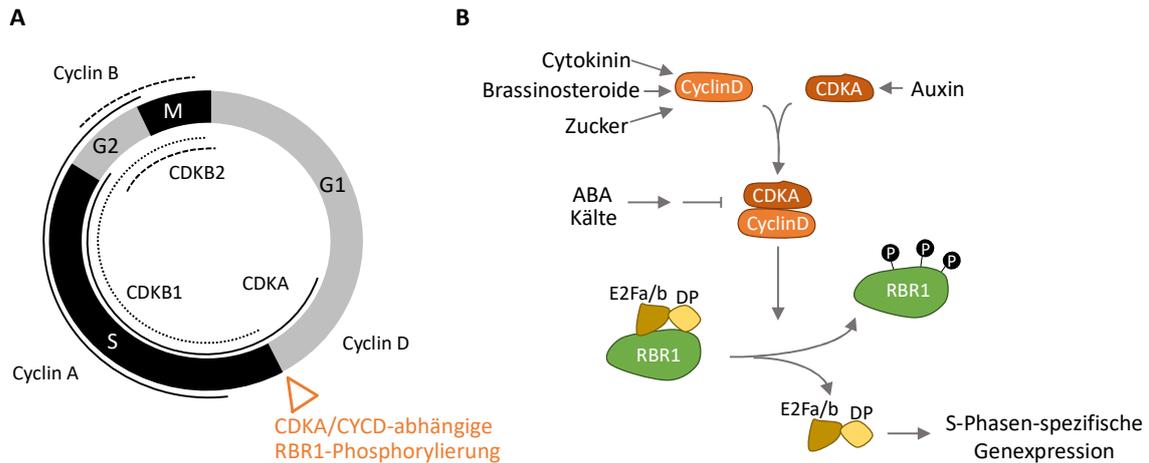


Abbildung 1.2 **Der pflanzliche Zellzyklus.** **(A)** Der Zellzyklus ist in vier Phasen unterteilt. Während der G1-Phase wächst die Zelle und kann auf Umwelteinflüsse reagieren. In der Synthese-Phase (S) wird das Genom verdoppelt (Replikation). In der G2-Phase wird die DNA auf Schäden überprüft und das Cytoskelett in Vorbereitung auf die Mitose (M) umstrukturiert. Während Mitose werden beide Chromosomensätze voneinander getrennt und die Zellteilung findet statt. Reguliert wird der Zellzyklus durch zyklisch exprimierte Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) und deren Aktivatoren, den Cyclinen. **(B)** Eine Ausnahme bilden die Cycline der Klasse D, deren Expression durch extrazelluläre Signale induziert wird. Als Hauptregulator für den Eintritt in den Zellzyklus gilt Retinoblastoma-related1 (RBR1). Durch Hyperphosphorylierung von CyclinD/CDKA am G1/S-Übergang ändert RBR1 seine Konformation, die Transkriptionsfaktoren E2Fa und DP werden frei und binden an E2F-Motiv-enthaltende Promotoren zur Expression S-Phase-spezifischer Gene. Abbildung nach Inzé & De Veylder (2006).

Während Cycline positiv auf das Voranschreiten des Zellzyklus wirken, kann die Progression des Zellzyklus durch 40S ribosomales Protein S6-Kinase 1 (S6K1) negativ reguliert werden. S6K1 phosphoryliert verschiedene ribosomale Proteine und reprimiert unter nährstoffarmen Bedingungen die Zellteilung, welches den Ploidiegrad stabilisiert (Henriques et al., 2010). Dazu bindet S6K1 an RBR1 und verhindert so die Kernlokalisierung von RBR1 und somit die E2F-abhängige Expression von S-Phasen-Genen (Henriques et al., 2010).

1.2 Ort des Zellzyklus und der Genregulation: der pflanzliche Zellkern

Viele der beschriebenen Prozesse wie die Regulation der Genexpression und des Zellzyklus finden im Zellkern statt. Der Zellkern ist von einer Doppelmembran, der sogenannten Kernhülle, umgeben. Zwischen den beiden Membranen befindet sich der perinukleäre Raum (Abbildung 1.3A). Die äußere Hüllmembran geht z. T. in die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) über, sodass die äußere Hüllmembran und der perinukleäre Raum ein Kontinuum mit ER-Membran und ER-Lumen bilden. Die Kernmembranen sind von Kernporen unterbrochen, die eine Verbindung zwischen Cytosol und Kerninnerem, dem Nukleoplasma, bilden (Abbildung 1.3). An den Kernporen fusionieren innere und äußere Kernmembran. Die Kernporen werden von sehr großen Multiproteinkomplexen, den Kernporenkomplexen gebildet. Der Kernporenkomplex ist in Eukaryoten hoch konserviert. In tierischen Zellen sind die Kernporenkomplexe 125 MDa, in Hefe 50 MDa groß. Der Kernporenkomplex in Arabidopsis ist dem humanen ähnlicher und

besteht aus mindestens 30 verschiedenen Nukleoporinen (Tamura et al., 2010). An seiner engsten Stelle bilden flexible, filamentöse Phe-Gly-reiche Nukleoporine ein dichtes Netzwerk, um die Diffusion von kleineren Makromoleküle in den Zellkern zu ermöglichen (Meier & Brkljacic, 2010; Strambio-De-Castilla et al., 2010; Tamura et al., 2010; Tamura & Hara-Nishimura, 2013). Makromoleküle größer als 40 kDa werden rezeptorvermittelt durch die Kernporen transportiert (Meier & Brkljacic, 2010; Raices & D'Angelo, 2012; Guo & Fang, 2014). Im Nucleoplasma können subnukleäre Kompartimente oder Strukturen identifiziert werden, die von keiner weiteren Membran umgeben sind (Abbildung 1.3; Narula et al., 2013; Petrovská et al., 2015).

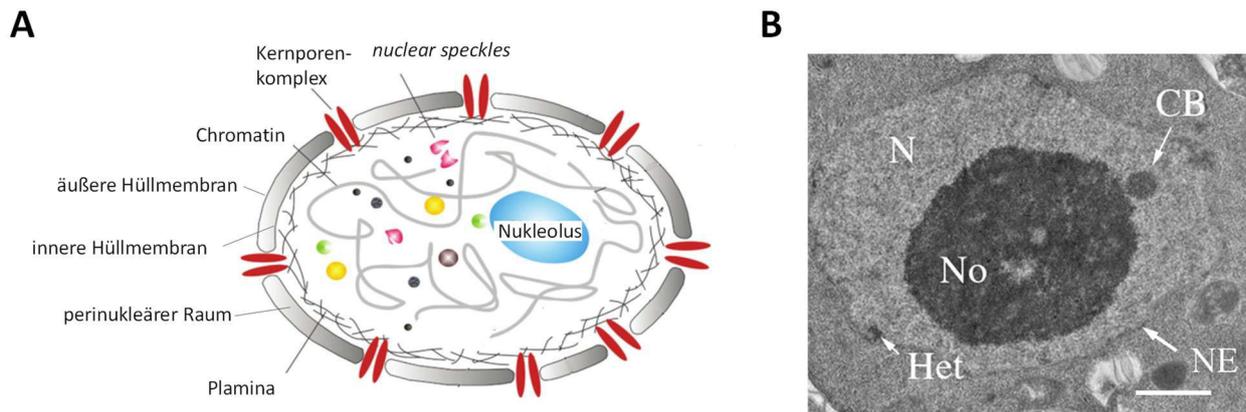


Abbildung 1.3 **Der Aufbau des pflanzlichen Zellkerns.** (A) Schematische Darstellung des Zellkerns mit den im Text beschriebenen subnukleären Strukturen (modifiziert nach Petrovská et al., 2015). (B) Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Zellkerns einer Arabidopsiswurzelzelle. Der Zellkern (N) wird begrenzt durch die Kernhülle (NE, nuclear envelope) und enthält den Nukleolus (No) mit subnukleolärer Kompartimentierung. Neben dem Nukleolus befindet sich ein Kajalkörper (CB). Regionen mit Heterochromatin (Het) sind auch erkennbar. Der Maßstab entspricht 1 μm (modifiziert nach Collier et al., 2006).

So befindet sich direkt unterhalb der inneren Kernhüllmembran eine Kernlamina, die in Pflanzen auch Plamina genannt wird, da die pflanzliche Kernlamina aus *nuclear matrix constituent*-Proteinen und nicht aus Homologen des tierischen Laminins besteht. Aufgrund von Ähnlichkeiten in der komplex fibrillär-geordnete Struktur ist sie nach der tierischen Kernlamina benannt. Sowohl die pflanzliche als auch die tierische Kernlamina beeinflussen die Kernstruktur und -größe (Ciska & Moreno Díaz de la Espina, 2014). Neben Komponenten des Kernporenkomplexes binden auch die Untereinheiten des *linker of nucleoskeleton and cytoskeleton*-Komplexes die Kernlamina, um diese mit dem cytosolischen Aktincytoskelett zu verbinden (Guo & Fang, 2014; Petrovská et al., 2015).

Bisher unbekannte Faktoren führen zu einer Assoziation des Chromatins an die Kernlamina (Ciska & Moreno Díaz de la Espina, 2014). Von Chromatin, welches an der Kernhülle und Kernlamina assoziiert, nimmt man an, dass es sich um nicht aktives Chromatin handelt. Aktives Chromatin hingegen interagiert mit Proteinen des Kernporenkomplexes oder befindet sich eher im Zentrum der Kernmatrix (Gorkin et al., 2014). In bestimmten Regionen des aktiven Chromatins kommt es häufiger zur Interaktion benachbarter Chromatinbereiche, in anderen weniger häufig. Durch diese Interaktionen ist eine transkriptionelle

Regulation möglich. Dabei ist die Lokalisierung jedes Chromosoms in sogenannten Chromosomen-Territorien festgelegt (Cremer & Cremer, 2010; Wang et al., 2015).

Die Kernmatrix enthält zudem eine Vielzahl verschiedener Kernkörper – subnukleäre membranlose Organellen mit unterschiedlichsten Funktionen (Abbildung 1.3). Dabei sind die Nukleoli die größten der Kernkörper im Zellkern und mikroskopisch ohne Anfärbung zu erkennen. Sie bestehen zu 85 % aus Proteinen und bilden sich dort, wo die chromosomale rDNA (DNA-Abschnitte, codierend für ribosomale RNA (rRNA)) lokalisiert (Kalmárová et al., 2007). In unterschiedlichen Subkompartimenten des Nukleolus befindet sich die rDNA, wird rRNA transkribiert und zu reifer rRNA prozessiert, um in Vorläufer von ribosomalen Untereinheiten zu assemblieren (Kalmárová et al., 2007; Stępiński, 2014; Petrovská et al., 2015). Zusätzlich finden sich Hinweise darauf, dass der Nukleolus Funktionen im mRNA-Export und in dessen Regulation besitzt (Stępiński, 2014). Als *nuclear speckles* werden dynamische Strukturen der Kernmatrix bezeichnet, die sich in Anzahl, Form und Größe unterscheiden und sich durch Temperatur, Stress und Transkriptionsaktivität ändern können. Diese Speckles werden als Speicherort für Splicing-Faktoren beschrieben, lokalisieren oft in der Nähe aktiver Transkription und sind von fibrillären Strukturen aus prä-mRNA umgeben (Reddy et al., 2012). Dabei lokalisieren unterschiedliche Splicing-Faktoren oft in unterschiedlichen Speckles (Lorkovic et al., 2008; Reddy et al., 2012; Guo & Fang, 2014). Speckles, deren Funktion gut untersucht sind, werden entweder nach den enthaltenen Proteinen, der Funktion der Speckles oder der Bedingungen unter denen sie sich bilden benannt (Li et al., 2002; Lorković & Barta, 2004; Van Buskirk et al., 2012; Liu et al., 2013; Petrovská et al., 2015).

1.2.1 Aktiver Kernimport von Proteinen und klassische Kernlokalisierungssignale

Der aktive Kernimport von Proteinen größer als 40 kDa durch den Kernporenkomplex ist in Hefe und tierischen Zellen gut charakterisiert. Im Gegensatz dazu ist über den pflanzlichen Kernimport deutlich weniger bekannt (Luo et al., 2013). Allerdings scheint der zugrunde liegende Mechanismus des Kernimports, wie der Aufbau des Kernporenkomplexes, in eukaryotischen Systemen so stark konserviert zu sein, dass der Mechanismus aus Hefe- und Tierzellen auf Pflanzen übertragbar ist (Smith et al., 1997; Haasen et al., 1999; Merkle, 2011; Tamura & Hara-Nishimura, 2013). Der Transport von Proteinen durch den Kernporenkomplex benötigt Energie und wird von Kerntransportrezeptoren in Kombination mit dem kleinen G-Protein Ran vermittelt (Görlich et al., 1994, 1995). An der cytosolischen Seite des Kernporenkomplex befindet sich *GTPase-activating protein1* (RanGAP1), welches mit RanBP1 die GTPase-Aktivität von Ran aktiviert, sodass im Cytosol kein GTP-gebundenes Ran (RanGTP) vorliegt (Bischoff et al., 1995; Bischoff & Görlich, 1997). RanGDP wird von *nuclear transport factor2* gebunden und in den Zellkern transportiert, wobei die Bindung von GDP an Ran stabilisiert wird (Ribbeck et al., 1998; Smith et al., 1998). In tierischen Zellen wurden in der Kernmatrix *Guanine nucleotide exchange factor*-Proteine (Ran-GEF) nachgewiesen, die den Austausch von RanGDP zu RanGTP beschleunigen (Bischoff & Ponstingl, 1991). Durch die Lokalisierung von RanGAP1 in Cytosol und RanGEFs in der Kernmatrix, kommt es zu einem

Konzentrationsgefälle von RanGTP zwischen Cytosol (kaum RanGTP, viel RanGDP) und Kerninnerem (viel RanGTP), welches die Richtung des nukleo-cytoplasmatischen Transports definiert (Merkle, 2011). Im Genom von Arabidopsis finden sich 18 Gene, die der Familie der β -Karyopherine, auch bekannt als β -Importine, angehören, einer Untergruppe der Ran-bindenden Kerntransportrezeptoren (*Ran binding protein*, RanBP) (Tamura & Hara-Nishimura, 2014). In Homologie mit dem tierischen System wird angenommen, dass β -Importine, die tatsächlich als Importine fungieren, ausschließlich RanGTP aber nicht RanGDP binden (Abbildung 1.4; Görlich et al., 1996; Merkle, 2011). β -Importine binden ihr Cargo in Abwesenheit von RanGTP und transportieren ihr Cargo in den Zellkern, wo der Cargo-Importin-Komplex bei RanGTP-Bindung dissoziiert (Abbildung 1.4).

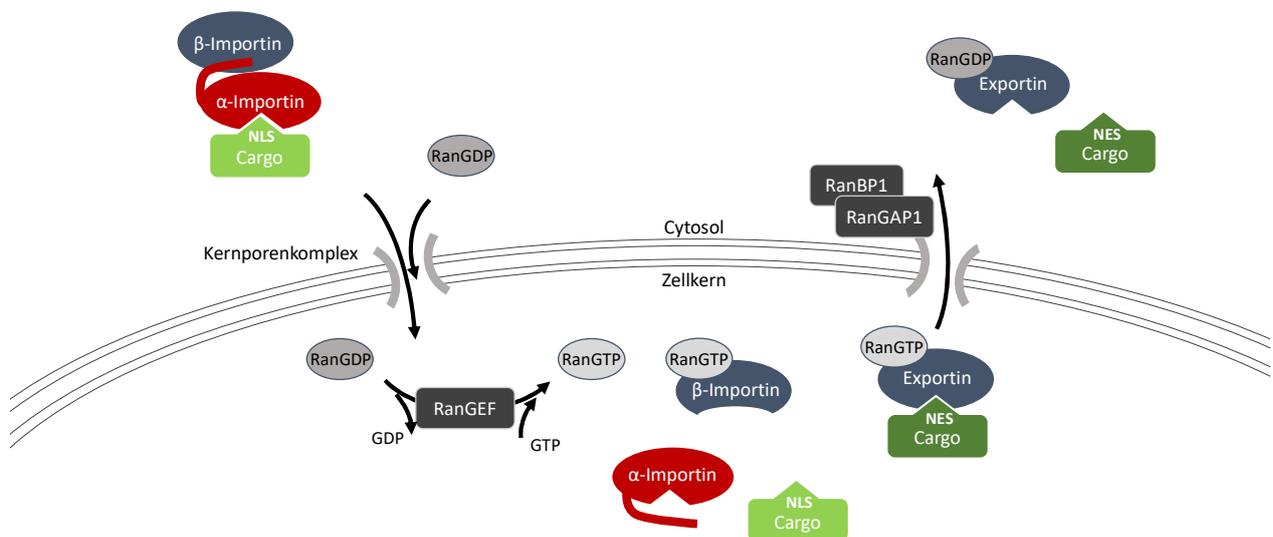


Abbildung 1.4 **Schematische Darstellung des Transports von Proteinen über die Kernmembran.** Nach Bildung des Cargo: α -Importin: β -Importin-Komplexes wird dieser durch den Kernporenkomplex in den Zellkern transportiert. Ausschließlich im Zellkern lokalisierte RanGEFs bewirken eine hohe RanGTP-Konzentration. Durch Bindung von RanGTP zerfällt der Cargo:Importin α :Importin β -Komplex in seine Bestandteile. Der Cargo verbleibt im Zellkern, während die Importine in das Cytosol zurückgeführt werden. Der Export von Cargos aus dem Zellkern wird von Exportinen vermittelt, die bei RanGTP eine erhöhte Affinität zu ihrem Cargo besitzen. Nach Transport des Cargo:Exportin-Komplexes in das Cytosol, wird die GTPase-Aktivität von Ran noch an den Kernporenkomplexen durch RanGAP aktiviert. RanGDP verlässt den Export-Komplex und dieser zerfällt.

Der klassische Transport von Proteinen in den Zellkern findet über einen Cargo: α -Importin: β -Importin-Komplex statt (Abbildung 1.4). Dabei dienen α -Importine als Adapterproteine für Importin β und ermöglichen die Erkennung unterschiedlicher Cargos, während die Interaktion von α -Importinen und Importin β bzw. Importin β mit RanGDP und dem Kernporenkomplex konserviert bleibt (Merkle, 2011; Lin et al., 2013). Arabidopsis besitzt neun α -Importin-Isoformen, IMP α 1 bis IMP α 9. Davon besitzen alle außer IMP α 8 eine Importin β -Bindedomäne (IBB) am N-Terminus des Proteins. Zehn Armadillo-Domänen sind in jeder Isoform zu finden und bilden eine große und eine kleine Bindungsstelle für Kernlokalisierungssignale (*nuclear localization signal*, NLS) von Proteinen, die für den Kerntransport

vorgesehen sind (Wirthmueller et al., 2013). Die IBB der α -Importine maskiert zunächst die NLS-Bindestellen. Bindet β -Importin an die IBB eines α -Importins, werden die NLS-Bindestellen zugänglich und können an ein Cargoprotein mit NLS binden (Chang et al., 2014). Der Cargo: α -Importin: β -Importin-Komplex gelangt durch den Kernporenkomplex in den Zellkern. Dort führt die Bindung von RanGTP an β -Importin zum Zerfall des Komplexes, da sich dadurch die Bindung mit α -Importin aufgehoben wird, in α -Importin die IBB zurück klappt und das Cargo im Zellkern freigesetzt wird (Merkle, 2011). Proteine, die in den Zellkern transportiert werden, besitzen häufig klassische NLS, in der Regel Lysin- und Arginin-reiche Aminosäuresequenzen, die die Bindung an α -Importine vermitteln und damit den Kernimport ermöglichen (Kalderon et al., 1984; Robbins et al., 1991). Klassische monopartite NLS besitzen eine Konsensussequenz aus drei oder vier basischen Aminosäuren (NLS der Klasse 1; vgl. Tabelle 1.1) während in bipartiten NLSs zwei Bereiche basischer Aminosäuren durch zehn bis zwölf Aminosäuren getrennt sind (NLS der Klasse 6, vgl. Tabelle 1; Chang & Williams, 2012; Marfori et al., 2012). Kosugi et al. (2009) haben herausgefunden, dass es zusätzlich unterschiedliche Klassen monopartierter NLS zu geben scheint, in denen neben basischen Aminosäuren auch hydrophobe Aminosäuren wie Prolin, Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan zur Funktionalität beitragen können (NLS der Klasse 2 und 3, vgl. Tabelle 1.1). Außerdem können flankierende, nicht basische Aminosäuren zur Funktionalität der NLS beitragen (NLS der Klassen 3, 4 und 5, vgl. Tabelle 1.1; Kosugi et al., 2009). In Abhängigkeit der Art der NLS wird auch die Bindung in die kleine und/oder große Bindetasche der α -Importine beeinflusst. Während monopartite NLS entweder in die kleine oder die große Bindestelle von α -Importinen binden, binden bipartite NLS an beide Bindungsstellen (Kosugi et al., 2009; Marfori et al., 2011; Chang et al., 2013b). Der Grad des Proteinimports in den Kern ist von der Affinität der NLS des Cargos zum NLS-bindenden α -Importin abhängig (Hodel et al., 2006).

Tabelle 1.1 **Einteilung von NLS aufgrund ihrer Konsensus-Sequenzen in sechs Klassen** (nach Kosugi et al., 2009). Die Daten basieren auf der Sequenzähnlichkeit α -Importin-gebundener Peptide aus einem Screening einer Peptid-Bibliothek. X: jede Aminosäure, (^DE) jede Aminosäure außer Asp oder Glu.

Einteilung der NLS	Konsensus-Sequenz	Bindung an α -Importin
Klasse 1 (monopartit)	KR(K/R)R oder K(K/R)RK	große Bindestelle
Klasse 2 (monopartit)	(P/R)XXKR(^DE)(K/R)	große Bindestelle
Klasse 3 (monopartit)	KRX(W/F/Y)XXAF	kleine Bindestelle
Klasse 4 (monopartit)	(R/P)XXKR(K/R)(^DE)	kleine Bindestelle
Klasse 5 (monopartit)	LGKR(K/R)(W/F/Y)	kleine Bindestelle
Klasse 6 (bipartit)	KRX ₁₀₋₁₂ K(KR)(KR) oder KRX ₁₀₋₁₂ K(KR)X(K/R)	große und kleine Bindestelle

Wie der Kernimport findet auch der Kernexport reguliert statt. β -Importine mit hoher Cargoaffinität bei RanGTP-Bindung werden als Exportine bezeichnet und transportieren Proteine vom Zellkern ins Cytosol. An der cytosolischen Seite des Kernporenkomplexes lokalisiert RanGAP, welches die GTPase-Aktivität von Ran aktiviert. Das gebundene GTP wird dephosphoryliert, der Exportkomplex dissoziiert und der Cargo wird freigesetzt (Merkle, 2011). Die Signalsequenz für den Kernexport von Proteinen (NES, *nuclear export*

signal) ist eine kurze Leucin-reiche Sequenz mit der Konsensussequenz $\phi X_{2-3}\phi X_{2-3}\phi X\phi$; dabei kann ϕ für Leu, Ile, Val, Phe oder Met und X für jede Aminosäure stehen (Kutay & Güttinger, 2005). Diese Signalsequenz wird in Arabidopsis durch die Exportine XPO1a und XPO1b erkannt (Haasen et al., 1999; Blanvillain et al., 2008). Im Kern freigesetzte α -Importine werden über ein α -Importin-spezifischen Kerntransportrezeptor ins Cytosol exportiert. CAS bindet α -Importine über deren C-Terminus, was durch die autoinhibierenden IBB-Domäne unterstützt wird (Haasen & Merkle, 2002)

1.3 Phosphoinositide als mögliche Regulatoren nukleärer Prozesse

1.3.1 Strukturelle Funktionen von Lipiden und Signallipiden

Jede eukaryotische Zelle und darin enthaltenen Organellen sind von Membranen umschlossen, die als semipermeable Abgrenzung eine wichtige Funktion für die Zelle einnehmen. Als Diffusionsbarriere ermöglichen Membranen die Aufrechterhaltung einer genau definierten elektrochemischen Umgebung in den verschiedenen Zellkompartimenten. Dadurch können die Organellen als separate, funktional spezialisierte Reaktionsräume agieren (Alberts et al., 2014). Gleichzeitig muss ein Austausch von Molekülen und Proteinen zwischen den Organellen bzw. Zellkompartimenten gewährleistet werden. Organellen besitzen deshalb unterschiedliche Import- und Export-Strategien, die durch Proteinkomplexe, welche in die abgrenzenden Membranen eingebettet sind, vermittelt werden und so einen gezielten Import und Export von z.B. Proteinen ermöglichen. Ein Beispiel für den Import und Export von Proteinen zwischen Zellkern und Cytosol wurde bereits unter Abschnitt 1.2.1 beschrieben.

Die Membranen, die die Zelle umgeben und die einzelnen Organellen abgrenzen, setzen sich aus verschiedenen Sphingolipiden und Sterolen aber vor allem aus Glycerophospholipiden, wie Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol (PtdIns) zusammen (Furt et al., 2011). Glycerophospholipide und Sphingolipide besitzen eine polare Kopfgruppe und einen hydrophoben „Lipidschwanz“. Um den Kontakt des Lipidteils mit Wasser zu vermeiden, lagern sich die Lipidteile in wässriger Umgebung zu einer Lipiddoppelschicht zusammen, wobei die hydrophile Kopfgruppe den Kontakt mit der wässrigen Umgebung vermittelt. Die Membransysteme verschiedener Organellen sind unterschiedlichen Reaktionsräumen zugewandt und durch eine spezifische Lipidzusammensetzung an die Funktion der Organellen angepasst (Lodish et al., 2012). König et al. (2008) zeigten für Arabidopsis, dass sich Plasmamembran, ER und Zellkerne in deren Lipidzusammensetzung besonders in den enthaltenen Mengen an Sterolglycosiden und Phosphatidylethanolamin unterscheiden (König et al., 2008). Eine weitere Differenzierung von Membranen findet durch die spezifische An- und Einlagerung verschiedener Proteine statt. So können Proteine auf unterschiedlichste Weise mit Membranen interagieren (Abbildung 1.5).

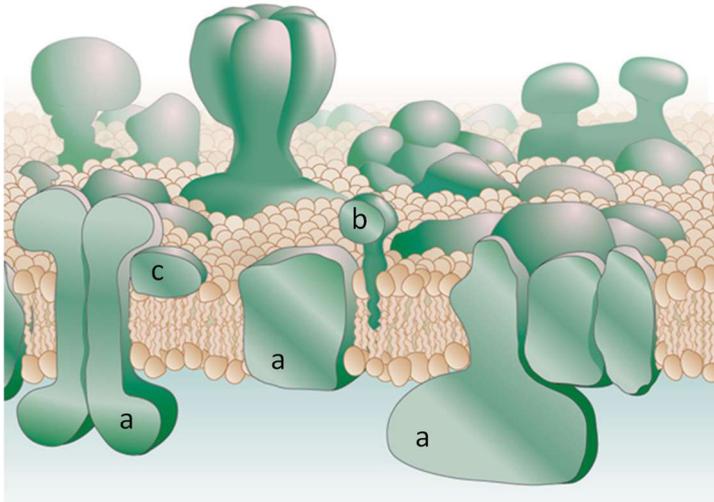


Abbildung 1.5 **Der Aufbau biologischer Membranen.** Nach dem Flüssig-Mosaik-Modell von Singer & Nicolson (1972), aktualisiert durch Engelman (2005): Demnach besitzen biologische Membranen eine hoch spezialisierte Lipid- (beige) und Protein- (grün) Zusammensetzung. Proteine können auf unterschiedliche Arten mit der Membran interagieren. Sie können durch hydrophobe Proteindomänen (a) oder durch Fettsäureanker (b) in den Lipidteil der Membran integrieren. Auch durch Interaktion mit der Kopfgruppe von Membranlipiden oder mit anderen Membranproteinen ist eine Assoziation mit der Membran möglich (c).

Proteine können über hydrophobe Proteindomänen direkt in die Membran eingelagert werden oder die Membran durchspannen. Durch Protein-Protein- oder Protein-Lipid-Interaktion können andere Proteine zusätzlich mit der Membran in Kontakt treten. Proteine können zusätzlich Fettsäure- oder Prenyl-Anker besitzen, die reversibel in die Membran integrieren und so eine Interaktion von Proteinen mit der Membran ermöglichen (Nicolson, 2014).

Neben den beschriebenen Lipiden, die primär strukturelle Funktionen in Membranen besitzen, existieren weiterhin Lipide mit Funktionen in der Signalübermittlung. Zu den pflanzlichen Signallipiden gehören Sphingolipide, freie Fettsäuren, Oxylipine, die aus der Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren hervorgegangen wie z.B. Jasmonsäure, bestimmte Sterole, bspw. Bassinosteroide und Glycerophospholipide wie Phosphatidsäure (PA) und Phosphoinositide (PIs). Im Gegensatz zu Strukturlipiden sind regulatorische Lipide deutlich weniger abundant. Die Synthese kann als Reaktion auf veränderte Phytohormongehalte, Trockenheit, Temperaturstress und Pathogenbefall kurzfristig verstärkt werden (Meijer & Munnik, 2003; Heilmann, 2016a). Diese Veränderungen sind zeitlich limitiert und der Ausgangszustand wird schnell wiederhergestellt. Der Umsatz von Signallipiden ist demnach deutlich höher als der von Strukturlipiden (Pical et al., 1999). Regulatorische Lipide können unter anderem die Membraneigenschaften verändern und für Proteine als Ankerpunkt in der Membran dienen und Funktionen von Membranproteinen modifizieren (Heilmann & Heilmann, 2015; Heilmann, 2016a).

1.3.2 Das pflanzliche Phosphoinositid-System

Als Phosphoinositide (PIs) bezeichnet man eine Gruppe von Phosphoglycerolipiden, die sich von PtdIns ableiten. Alle PIs haben eine D-*myo*-Inositol-Kopfgruppe, die an verschiedenen Positionen phosphoryliert vorliegen kann (Gerth et al., 2017). Die Synthese von PIs beginnt mit der Bildung von PtdIns, welches in der ER-Membran durch die PtdIns-Synthase aus Cytidindiphosphat-Diacylglycerin (CDP-DAG) und *myo*-Inositol synthetisiert wird (Collin et al., 1999; Löffke et al., 2008). Dabei wird *myo*-Inositol mit der Hydroxylgruppe der D1-Position mit der Phosphatgruppe des aktivierten Diacylglycerins verestert. Die D3,

D4 und D5 Hydroxyl-Gruppen der Inositolkopfgruppe sind sterisch für Phosphorylierungen zugänglich. Durch die Kombination von Phosphorylierungen der verschiedenen Hydroxylgruppen entstehen eine Vielzahl verschiedener PIs mit unterschiedlichen Funktionen (Abbildung 1.6). PtdIns kann durch PI-Kinasen, wie PI 3-Kinase (*vacuolar protein sorting 34*, Vps34) zu Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PtdIns(3)P), oder durch PI 4-Kinasen (PI4K α 1, PI4K α 2, PI4K β 1 und PI4K β 2) zu Phosphatidylinositol-4-Phosphat (PtdIns(4)P) phosphoryliert werden (Abbildung 1.6A; Welters et al., 1994; Stevenson et al., 1998; Xue et al., 1999). In Pflanzen wurde auch Phosphatidylinositol-5-Phosphat (PtdIns(5)P) nachgewiesen, welches durch die Dephosphorylierung von PtdIns(3,5)P₂ und PtdIns(4,5)P₂ entsteht (Abbildung 1.6A, Ndamukong et al., 2010; Nováková et al., 2014; Pribat et al., 2012; Williams et al., 2005; Zhong et al., 2005).

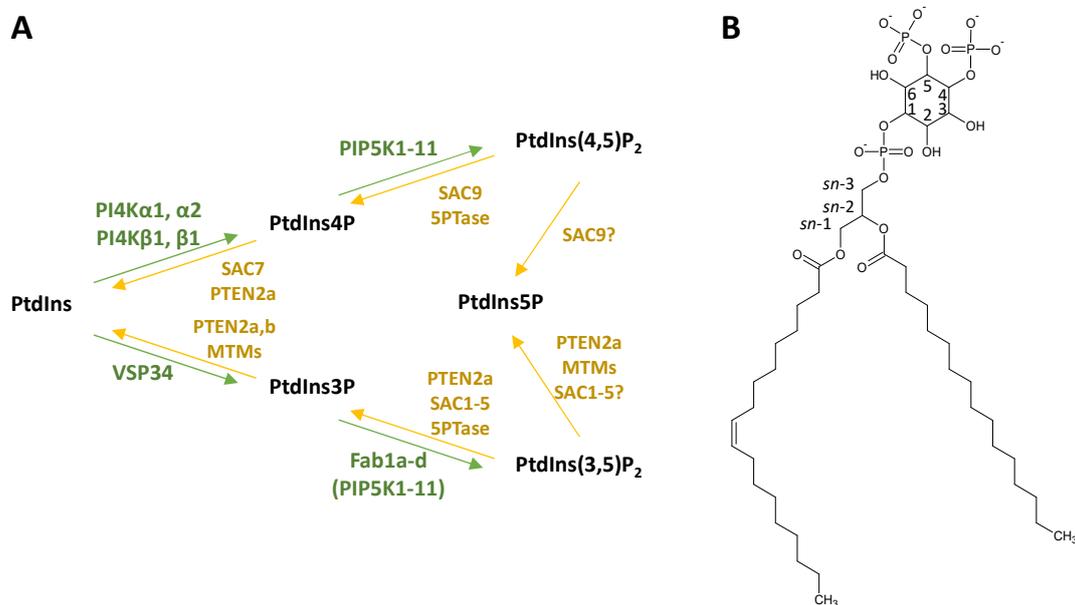


Abbildung 1.6 **Das pflanzliche PI-System.** (A) Nach der Synthese von PtdIns kann die Umwandlung der Phosphoinositide untereinander durch verschiedene PI-Kinasen (grün) und PI-Phosphatasen (gelb) erfolgen; Die entsprechenden PIs sind schwarz geschrieben. (B) Strukturformel von PtdIns(4,5)P₂: Der Inositolring ist an den Positionen D4 und D5 phosphoryliert und mit einer Phosphatgruppe an der D1-Position an das Glycerin-Rückgrat verestert. Die *sn*-1 und *sn*-2 des Glycerin-Rückgrats sind mit verschiedenen Fettsäuren verestert, beispielhaft sind die Fettsäuren 18:1 Δ 9 (in *sn*-1-Position) und 16:0 (in *sn*-2-Position) angegeben.

Die Phosphorylierung der PI-Monophosphate zu PI-Bisphosphaten erfolgt über PIP-Kinasen unterschiedlicher Substratspezifität. So wird PtdIns(3)P durch PI3P 5-Kinasen (Fab1a-Fab1d) bzw. PtdIns(4)P durch PI4P 5-Kinasen (PIP5K1 bis PIP5K11) zu den entsprechenden PI-Bisphosphaten PtdIns(3,5)P₂ und PtdIns(4,5)P₂ phosphoryliert (Abbildung 1.6). *in vitro* akzeptieren PI4P 5-Kinasen auch PtdIns(3)P als Substrat (Mueller-Roeber & Pical, 2002; Stenzel et al., 2008; Camacho et al., 2009; Bak et al., 2013). Eine PI5P 4-Kinase wurde in Pflanzen bisher nicht beschrieben (Meijer et al., 2001; Mueller-Roeber & Pical, 2002; Heilmann & Heilmann, 2015). Im Vergleich zu den PI- und PIP-Kinasen ist über die

PI-Phosphatasen deutlich weniger bekannt. Die verschiedenen Vertreter der Enzymfamilien *phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten* (PTEN), Myotubularine (MTMs), *suppressor of actin* (SAC) und Inositolpolyphosphat-5-Phosphatasen (5PTase) besitzen zu dem jeweils unterschiedliche Substratspezifitäten (Abbildung 1.6A; Heilmann, 2016a). So dephosphoryliert PTEN2a *in vitro* die Phosphatgruppe an Position D3 von PtdIns(3)P, PtdIns(3,4)P₂ und PtdIns(3,5)P₂. PTEN2b akzeptiert nur PtdIns(3)P als Substrat (Abbildung 1.6A; Pribat et al., 2012). MTMs sind Phosphatidylinositol-3-Phosphatasen, die PtdIns(3,5)P₂ und PtdIns(3)P jeweils zu PtdIns(5)P bzw. PtdIns dephosphorylieren (Ding et al., 2012). Bisher charakterisierte SAC-Phosphatasen (neun Isoformen, SAC1-SAC9) dephosphorylieren entweder PtdIns(4)P (SAC7), PtdIns(3,5)P₂ (SAC1-5) oder PtdIns(4,5)P₂ (SAC9), wobei bei den PI-Bisphosphaten nicht geklärt ist, welche Phosphatgruppe abgespalten wird (Williams et al., 2005; Zhong et al., 2005; Thole et al., 2008; Nováková et al., 2014). Enzyme der Familie der 5PTasen akzeptieren primär lösliche Inositol-Polyphosphate, wobei einige Isoformen PtdIns(4,5)P₂ als Substrat präferieren aber auch PtdIns(3,5)P₂ akzeptieren (Abbildung 1.6A; Ercetin & Gillaspay, 2004; Zhong & Ye, 2004; Zhong et al., 2004; Gunesequera et al., 2007). PIs können auch irreversibel durch PI-abhängige Phospholipasen C (PI-PLC) hydrolysiert werden. Durch die Ca²⁺-abhängige Aktivierung der PI-PLCs werden nicht nur die Menge an PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P₂ reduziert, sondern auch durch die Bildung der Hydrolyseprodukte Ins(1,4)P₂ bzw. Ins(1,4,5)P₃ und Diacylglycerin weitere Signalwege induziert (Pokotylo et al., 2014).

1.3.3 PI4P 5-Kinasen in Arabidopsis

Das am besten untersuchte Phosphoinositid ist PtdIns(4,5)P₂, welches durch PI4P 5-Kinasen gebildet wird. PI4P 5-Kinasen katalysieren die Phosphorylierung der D5-Position des PtdIns-Monophosphats PtdIns(4)P unter Bildung PtdIns(4,5)P₂, wobei *in vitro* auch PtdIns(3)P als Substrat akzeptiert wird (vgl. Abbildung 1.6; Stenzel et al., 2008; Camacho et al., 2009).

Im Arabidopsis-Genom sind elf PI4P 5-Kinasen-Isoformen kodiert. Wie ihre Homologen in Hefe und tierischen Zellen besitzen alle PI4P 5-Kinasen-Isoformen die konservierten Domänen Dimerisierungsdomäne und katalytische Domäne mit variablen Insert und *activation loop* (Abbildung 1.7; Mueller-Roeber & Pical, 2002). Die Isoformen PIP5K10 und PIP5K11 werden entsprechend ihres Aufbaus den Typ A PI4P 5-Kinasen zugeordnet. PI4P 5-Kinasen des Typs B, zu denen die Isoformen PIP5K1 bis PIP5K9 zählen, besitzen weitere pflanzenspezifische Domänen. Neben Existenz von MORN- und Linker-Domäne unterscheiden sich pflanzliche Typ B PI4P 5-Kinasen durch einen größeren N-Terminus von Typ A PI4P 5-Kinasen. Die MORN-Domäne besteht aus sieben bis acht Wiederholungen eines *membrane occupation and recognition nexus* (MORN)-Motivs und ist innerhalb der Typ B PI4P 5-Kinasen konserviert und über die Linkerdomäne mit der Dimerisierungsdomäne verbunden (Abbildung 1.7; Mueller-Roeber & Pical, 2002). Die Aminosäuresequenz der Linkerdomäne ist deutlich variabler und scheint für eine korrekte Lokalisierung der pflanzlichen PI4P 5-Kinasen an der Plasmamembran in der Spitze des wachsenden Pollenschlauchs essentiell zu sein (Stenzel et al., 2012). Diese Lokalisierung ist für alle untersuchten PI4P

5-Kinasen beobachtet worden, wobei Effekte bei Überexpression in Tabakpollenschläuchen unterschiedlich sind. Dabei führt die Überexpression von PIP5K4 oder PIP5K5 zu einer verstärkten Sekretion von Pektin und die Expression von PIP5K2, PIP5K10 und PIP5K11 zu einer Aggregation des Aktin-Cytoskeletts (Ischebeck et al., 2008, 2011; Stenzel et al., 2012). Da der unterschiedliche Phänotyp bei Überexpression von PIP5K2 und Tabak-PIP5K6 im Pollenschlauch durch einen Austausch der Linkerdomäne umkehrbar ist, wird angenommen, dass über die Linkerdomäne spezifische Protein-Protein-Interaktionen vermittelt werden (Stenzel et al., 2012; Heilmann & Heilmann, 2015).

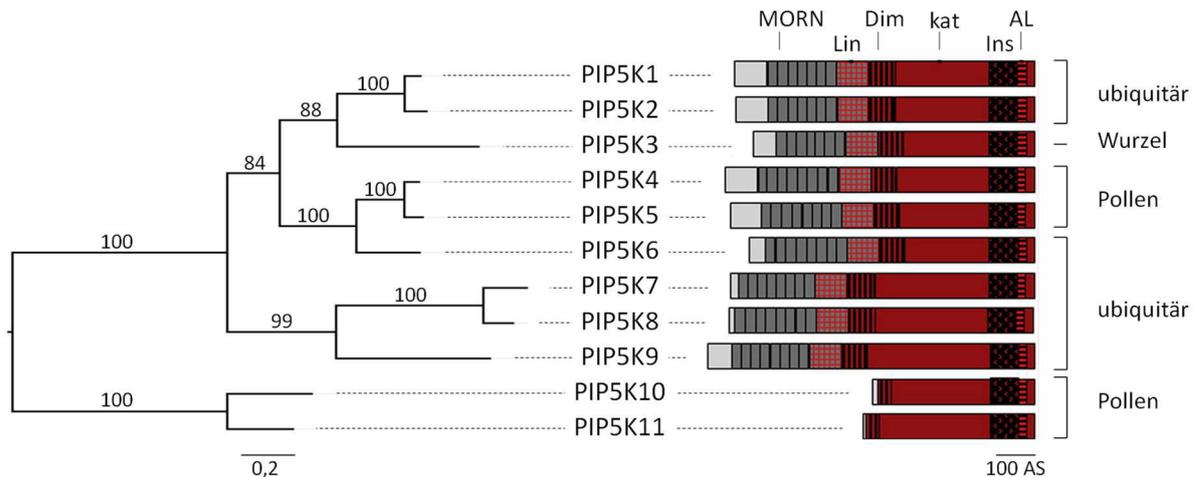


Abbildung 1.7 **Die Familie der Arabidopsis PI4P 5-Kinasen.** Phylogenetische Untersuchungen zeigen das Verwandtschaftsverhältnis der Familie der Arabidopsis PI4P 5-Kinasen (links). Die Aminosäuresequenzen von PIP5K1 bis PIP5K11 wurden mit MAFFT v7.305 (Katoh & Toh, 2010) aligniert und die Verwandtschaftsverhältnisse mittels Maximum-Likelihood-Analyse rekonstruiert (RAxML; Stamatakis et al., 2008), wobei als Außengruppe PIP5K10 und PIP5K11 festgelegt wurde. Die statistische Unterstützung ist durch *bootstrapping*-Werte angegeben (100-81: sehr gut gestützt, 80-70: gut gestützt, 70-51: schwach gestützt, ≤ 50 : nicht unterstützt). Die Astlänge gibt die Aminosäureaustausche pro Position an (siehe Maßstab). Die Domänenstruktur der PI4P 5-Kinasen ist rechts gezeigt: Die Dimerisierungsdomäne (Dim) und katalytische Domäne (kat) mit variablem Insert (Ins) und *activation loop* (AL) ist zum großen Teil konserviert. Die Isoformen PIP5K1 bis PIP5K9 besitzen zusätzlich eine *membrane occupation and recognition nexus* (MORN)-Domäne, die über eine Linker-Domäne (Lin) mit der Dimerisierungsdomäne verbunden ist (entnommen aus Heilmann & Heilmann, 2015). Zusätzlich ist angegeben in welchen Organen die jeweiligen Isoformen exprimiert werden (nach Heilmann, 2016a).

1.3.4 Subzelluläre Verteilung von PIs, insbesondere PtdIns(4,5)P₂ und PI-modifizierende Enzymen

PIs sind regulatorische Phospholipide und liegen daher hauptsächlich in Membranen vor. Während im tierischen System bereits Lokalisierungen außerhalb von Membranen, nämlich durch Lipid-Transport-Proteine gezeigt wurde (Kauffmann-Zeh et al., 1995; Lev, 2010), wurden in Pflanzen bisher nur membranassoziierte PIs detektiert. Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisierung wurde diese entweder nach Organellen-Fraktionierung biochemisch nachgewiesen oder *in vivo* visualisiert. Zur Visualisierung wurden zum einen Fusionsproteine eingesetzt, die aus einem Fluoreszenzprotein und einer für das jeweilige PI spezifischen Lipid-Bindedomäne bestehen (Vermeer et al., 2006, 2009; van Leeuwen et al., 2007; Simon et al., 2014). Zum anderen wurden PIs isoformspezifisch durch Antikörperbindung in immunhistochemischen Färbungen nachgewiesen (Hammond et al., 2009; Tejos et al., 2014). Dabei

lokalisieren nicht alle PI-Spezies in den selben Membranen. Gleiches gilt für die PI-modifizierende Enzyme. So lokalisieren PI 4-Kinasen im trans-Golgi-Netzwerk (Kang et al., 2011), während PtdIns(4)P nicht nur im Golgi-Apparat und *trans*-Golgi-Netzwerk sondern auch in den späten Endosomen und an der Plasmamembran zu detektieren ist (Vermeer et al., 2009). Durch die Lokalisierung von PI4P 5-Kinasen an der Plasmamembran (Lou et al., 2007; Ischebeck et al., 2008, 2011, 2013; Kusano et al., 2008; Tejos et al., 2014) kann dort auch PtdIns(4,5)P₂ detektiert werden (van Leeuwen et al., 2007; Ischebeck et al., 2011; Tejos et al., 2014). Während PtdIns(4,5)P₂ und PI4P 5-Kinasen lokal in der Spitze des wachsenden Pollenschlauchs lokalisieren (Ischebeck et al., 2008, 2011) konnte in Wurzelzellen für PtdIns(4)P, PtdIns(4,5)P₂ und PI4P 5-Kinasen eine erhöhte Lokalisierung an apikaler und basaler Plasmamembran gezeigt werden (Ischebeck et al., 2013; Tejos et al., 2014). Hinweise gibt es darauf, dass auch PtdIns(5)P an der Plasmamembran lokalisiert (Alvarez-Venegas et al., 2006a). PtdIns(3)P (Vermeer et al., 2006; Lee et al., 2008; Simon et al., 2014) und PtdIns(3,5)P₂ (Bak et al., 2013; Nováková et al., 2014) lokalisieren ebenso wie die PI 3-Kinase Vps34 (Welters et al., 1994; Lee et al., 2008) und PI3P 5-Kinasen (Hirano et al., 2015) in der Membran von späten Endosomen und vakuolären Membranen. Am Ende der Mitose kommt es sowohl zu einer Akkumulation von PtdIns(3)P-enthaltenen Vesikeln als auch von PtdIns(4,5)P₂ an den wachsenden Enden des Phragmoplasten (Vermeer et al., 2006; van Leeuwen et al., 2007). Wie im tierischen System kann durch die spezifische Lokalisierung unterschiedlicher PIs und PI-modifizierenden Enzymen in verschiedenen Membranen eine organellenspezifische Lipidzusammensetzung erreicht werden (Carlton & Cullen, 2005; Heilmann & Heilmann, 2015). Durch lokal erhöhte Konzentrationen spezifischer PIs und PI-modifizierender Enzyme können zusätzlich Mikrodomänen wie z. B. in der Pollenschlauchspitze determiniert werden.

Im Zellkern bzw. in der Kernhülle konnten verschiedene PI-Spezies nachgewiesen werden. Da dies bisher fast ausschließlich biochemisch gezeigt wurden, kann keine Aussage darüber getroffen werden, in wieweit sich die subnukleäre Lokalisierung verschiedener PIs unterscheidet. In Zellkernen von Karotten-Protoplasten wurde PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P₂ nachgewiesen (Hendrix et al., 1989). Ebenfalls in pflanzlichen Protoplasten ist die Existenz von kernlokalisierter PtdIns-, PI 3- und PI 4- und PIP-Kinaseaktivität gezeigt worden (Hendrix et al., 1989; Bunney et al., 2000; Dieck et al., 2012). In Sojabohnen-Keimlingen lokalisiert die PI 3-Kinase SPI3K-5p in Speckles (Bunney et al., 2000). Bei Überexpression von Arabidopsis PI4P 5-Kinasen in unterschiedlichen Zelltypen wurde für verschiedene PI4P 5-Kinasen neben der Plasmamembran-Lokalisierung eine deutliche Kernlokalisierung beobachtet, die aber im Gegensatz zu SPI3K-5p keine Strukturierung zeigt. So lokalisiert PIP5K9 in Zwiebel-Epidermiszellen, PIP5K11 in Tabak-Pollenschläuchen und PIP5K1 und PIP5K2 in Arabidopsis-Wurzelzellen im Zellkern (Lou et al., 2007; Camacho et al., 2009; Ischebeck et al., 2011, 2013; Tejos et al., 2014). Camacho et al. (2009) untersuchten auch die subzelluläre Lokalisierung von PIP5K2 in Tabak-Epidermiszellen, konnten dort aber keine Kernlokalisierung beobachten. Lokalisierungsstudien mit PIP5K1 und PIP5K2 unter Kontrolle des nativen Promotors bzw. einer schwachen Überexpression in Arabidopsis

zeigten, dass PIP5K1 und PIP5K2 in unterschiedlichen Bereichen des Wurzelmeristems unterschiedlich stark exprimiert werden und nicht in jeder Zelle im Zellkern lokalisieren (Tejos et al., 2014). In wieweit die Kernlokalisierung von PI4P 5-Kinasen biologisch relevant oder ein Artefakt der Überexpression ist, ist bisher nicht bekannt.

Hinweise auf biologisch relevante Kernlokalisierung von PI4P 5-Kinasen im pflanzlichen Zellkern zeigt die Kernlokalisierung von PIs im tierischen System. So wurden in Kernfraktionen tierischer Zellen ebenfalls PtdIns(4)P, PtdIns(4,5)P₂ und PI4P 5-Kinase-Aktivität nachgewiesen (Cocco et al., 1987; Boronenkov et al., 1998). Bei Entfernen der Kernhülle durch Detergenz wurde der Großteil von PtdIns, Diacylglycerol und PtdCho entfernt (Payraastre et al., 1992), der PtdIns(4,5)P₂-Gehalt jedoch nur auf 60 % reduziert (Vann et al., 1997). Die Hinweise auf eine Lokalisierung von PtdIns(4,5)P₂ in der Kernmatrix wurden durch Lokalisierungsstudien mit PtdIns(4,5)P₂-bindenden Plekstrin-Homologie (PH)-Domäne und PtdIns(4,5)P₂-spezifischen Antikörpern bestätigt: Diese Studien zeigten, dass humanes PtdIns(4,5)P₂ und humane PI4P 5-Kinasen im Zellkern in Speckles lokalisieren (Boronenkov et al., 1998; Watt et al., 2002; Mellman et al., 2008). Neben PtdIns(4,5)P₂ wurde auch für PtdIns(3)P und PtdIns(5)P eine Kernlokalisierung und für PtdIns(5)P sogar eine Chromatin-Assoziation gezeigt (Sindić et al., 2001; Jones et al., 2006).

1.3.5 Cytoplasmatische Funktionen von PtdIns(4,5)P₂

Durch die Lokalisierung verschiedener PIs in unterschiedlichen Membranen könnten PIs potentiell für die Definition von Membranidentitäten verantwortlich sein (Carlton & Cullen, 2005; Heilmann & Heilmann, 2015). Die Etablierung von PtdIns(4,5)P₂-enthaltenen Mikrodomänen in der Plasmamembran durch PI4P 5-Kinasen sind vor allem in Pollenschläuchen untersucht worden. Pollenschläuche sind extrem große Zellen, mit starkem polarem Wachstum, das unter anderem durch eine PtdIns(4,5)P₂-reiche Mikrodomäne an der Spitze des Pollenschlauchs ermöglicht wird (Ischebeck et al., 2008, 2011). Über diese Mikrodomänen, die durch das enge Zusammenspiel von PI4P 5-Kinasen mit PI-PLCs oder Phosphatasen aufrechterhalten und begrenzt werden (Ischebeck et al., 2008; Heilmann, 2016a), werden sowohl die Pektin-Sekretion als auch der Aufbau des Aktincytoskeletts reguliert (Ischebeck et al., 2008, 2011; Stenzel et al., 2012). In Wurzelzellen definiert unter anderem die polare Verteilung von PtdIns(4,5)P₂ die basale und apikale Seite der Zelle (Tejos et al., 2014). Auch spielt PtdIns(4,5)P₂ in der Spezifität der Clathrin-vermittelten Endocytose eine Rolle: So war in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante die Endocytose von PIN-Proteinen stark reduziert, während die gesamte Endocytose (gemessen über Internalisierung des Styryl-Farbstoffs FM 4-64) nur leicht reduziert war (Ischebeck et al., 2013). Zusätzlich ist die Lokalisierung der leichten Kette von Clathrin an der Plasmamembran in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp deutlich verändert (Ischebeck et al., 2013). Eine dynamische Veränderung der PI-Gehalte ermöglicht eine zelluläre Reaktion durch die Anpassung bekannter und nicht bekannter Funktionen von PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P₂ in Reaktion auf verschiedene Signale. So führt Salzstress und anderer osmotischer Stress zu einer erhöhten PtdIns(4,5)P₂-Synthese (Pical et al., 1999). Die verstärkte Synthese

zeigt sich zunächst in erhöhten PtdIns(4,5)P₂-Gehalten an der Plasmamembran, welche später auch in Clathrin-umhüllten endocytotischen Vesikeln erhöht sind (König et al., 2008). Wie bei Salzstress erhöhen sich bei Temperaturen größer 35 °C und bei Auxinbehandlung die PtdIns(4,5)P₂-Gehalte an der Plasmamembran von pflanzlichen Zellen (Mishkind et al., 2009; Tejos et al., 2014). Bei Verwundung kommt durch verstärkte Hydrolyse von PtdIns(4,5)P₂ zu einer transienten Reduktion von PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P₂ (Mosblech et al., 2008), während die Zugabe von Salicylsäure zu einer verstärkten PtdIns(4)P-Synthese führt (Krinke et al., 2007).

1.3.6 Hinweise auf den Einfluss von PIs auf die pflanzliche Entwicklung

Veränderungen des PI-Stoffwechsels in Arabidopsis führen zu einer Vielzahl unterschiedlicher, zum Teil sehr starker Wachstumsphänotypen führen, deren molekularen Mechanismen nicht hinreichend geklärt sind (Heilmann, 2016b). Arabidopsis-Mutanten mit reduzierter Expression von PI4P 5-Kinasen sind folgende Phänotypen beschrieben: reduziertes Wachstum (im Allgemeinen), Defekte in Wurzelwachstum (Wurzelhaare, gewellte Wurzel, verkürzte Wurzeln) und der Bildung des Leitgewebes, Störungen der zellulären polaren Verteilung von PIN-Proteinen und Veränderung in der Clathrin-vermittelten Endocytose, der Pektin-Sekretion, des Aktin-Cytoskeletts, eine veränderte Morphologie der Zellwand und eine gestörte Embryonalentwicklung (Ischebeck et al., 2008, 2011, 2013; Tejos et al., 2014; Heilmann, 2016b; Ugalde et al., 2016). Viele der Phänotypen lassen sich bekannten cytosolischen Funktionen des PI-Systems zuordnen, wie beispielsweise Vesikeltransport, Etablierung von Zellpolaritäten und Regulation des Aktin-Cytoskeletts (vgl. Abschnitt 1.3.5). Ein Hinweis auf eine direkte Funktion in der pflanzlichen Entwicklung gibt die Aktivität des Stammzellenfaktors POLTERGEIST, einer Proteinphosphatase, im CLE/WOX-Signalweg, die durch PtdIns(4)P-Bindung reguliert wird (Gagne & Clark, 2010). In Kombination mit der beobachteten Kernlokalisierung verschiedener PI4P 5-Kinasen, einer Vielzahl bekannter kernlokalisierter Funktionen des tierischen PI-Systems und ersten Hinweise auf eine Kernlokalisierung von pflanzlichen PIs (vgl. Abschnitt 1.3.4) wird in den letzten Jahren immer wieder die Möglichkeit von kernlokalisierten Funktionen des pflanzlichen PI-Systems diskutiert. Zusätzlich zu der von Ischebeck et al. (2013) und Tejos et al. (2014) gezeigten Kernlokalisierung von PIP5K1 und PIP5K2 gibt es weitere Hinweise auf eine kernlokalisierte, meristematische Funktion von PIP5K1 und PIP5K2. Der Nachweis der Promotor-GUS-Aktivität von PIP5K1 und PIP5K2 zeigte eine ubiquitäre Expression beider PI4P 5-Kinasen, wobei die Expression in der Wurzelspitze und in Blattprimordien am höchsten war, was auf eine spezifische Funktion in meristematischem Gewebe hinweist (Abbildung 1.8A-D; Ischebeck et al., 2013). Der starke Phänotyp der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante zeigt sich in erster Linie durch ein reduziertes Wachstum (Abbildung 1.8F und G; Ischebeck et al., 2013). In der weiteren Entwicklung bildet auch die *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante Stängel aus, aufgrund fehlender Apikaldominanz bilden sich nicht nur wenige große sondern viele kleine Stängel (Ischebeck et al., 2013). *pip5k1 pip5k2* bildet Knospen, wobei die Knospenentwicklung vor einer möglichen Befruchtung abbricht, was zur Sterilität der Pflanze führt

(persönliche Information von Dr. Till Ischebeck, Göttingen). Nicht nur die Entwicklung der oberirdischen Organe der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante ist beeinträchtigt, auch das Wurzelwachstum ist drastisch reduziert (Abbildung 1.8F und G; Ischebeck et al., 2013), welches in der Verkürzung des Wurzelmeristems der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante begründet sein könnte (Abbildung 1.8H und I; Tejos et al., 2014).

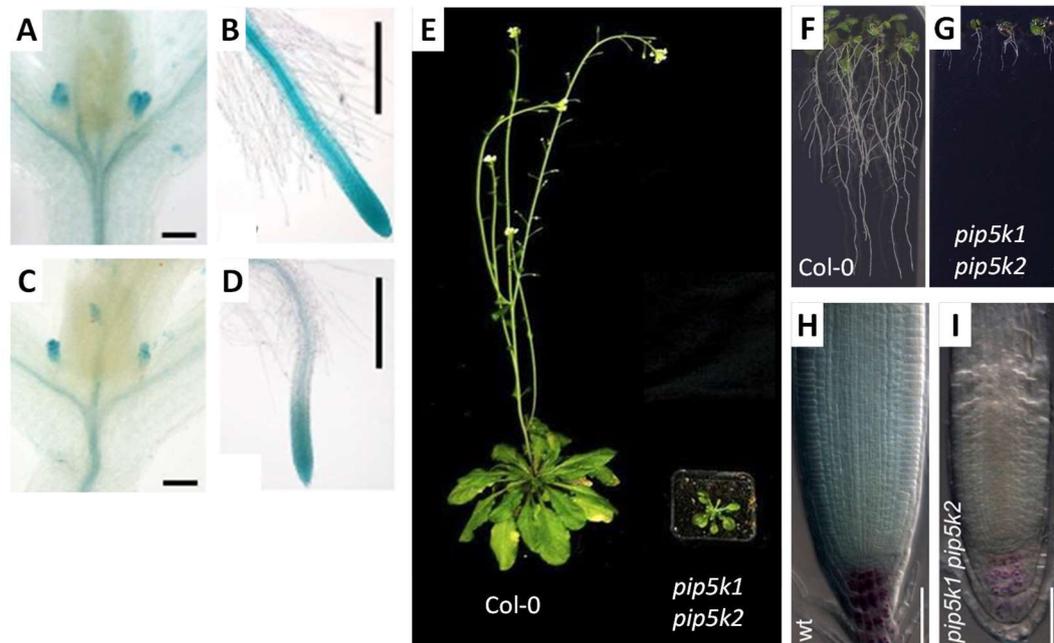


Abbildung 1.8 **Hinweise auf Funktionen von PIP5K1 und PIP5K2 in der pflanzlichen Organentwicklung.** (A-D) Histochemische Färbungen zeigen die GUS-Aktivität unter Kontrolle des endogenen Promotors von *PIP5K1* (A und B) und *PIP5K2* (C und D) in Blattprimordien sieben Tage alter Arabidopsiskeimlingen (A und C) und in der Wurzelspitze 21 Tage alter Arabidopsiskeimlingen (B und D) (entnommen aus Ischebeck et al., 2013). (E-I) Phänotyp der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante: Das allgemeine Wachstum (E), das Wurzelwachstum (F und G) und die Größe des Wurzelmeristems (H und I) sind in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante deutlich reduziert (entnommen aus Ischebeck et al., 2013 und Tejos et al., 2014).

1.3.7 Hinweise auf Funktionen von Pls im Zellkern

Die Existenz eines nukleären PI-Systems wurde erstmals 1983 für tierische Zellen beschrieben (Smith & Wells, 1983), seitdem wurden tierischen kernlokalisierten Pls vielfältige Prozesse zugeordnet (vgl. Abschnitt 1.3.4). So führt die stressbedingte Änderungen der Chromatin-assoziierten PtdIns(5)P-Gehalte zu einer Änderung der Chromatinassoziation von *HsING2* (Jones et al., 2006). *HsING2* bindet über einen *plant homeodomain* (PHD)-Finger sowohl PtdIns(5)P als auch trimetyliertes Lysin 4 in Histon 3 (H3K4me3) (Gozani et al., 2003; Peña et al., 2006; Shi et al., 2006). Die *HsING2*-Bindung führt zur Rekrutierung der Histondeacetylase *HsHADC1* und zur Modifizierung der Chromatinstruktur (Shi et al., 2006). Eine PtdIns(5)P-vermittelte Stressantwort kann somit die Chromatinstruktur modifizieren und die Genexpression modifizieren. Für tierisches PtdIns(4,5)P₂ sind neben Funktionen in der Assemblierung der Kernhülle (Byrne et al., 2005) vor allem Funktionen und Hinweise auf die Regulation von Transkription, Chromatinstruktur und Zellzyklus beschrieben worden. Tierisches PtdIns(4,5)P₂ modifiziert die

Chromatinstruktur durch die Bindung an Histon H1 bzw. an Chromatin-Remodellierungskomplexe und durch die Rekrutierung von Histon-Deacetylasen (Yu et al., 1998; Rando et al., 2002; Toska et al., 2012, 2014). Die PtdIns(4,5)P₂-abhängige Transkriptionsregulation findet sowohl über Phospholipid-bindende Transkriptionsfaktoren (Crowder et al., 2017) als auch über Aktivierung der nicht kanonischen Poly-A-Polymerase Star-PAP durch PtdIns(4,5)P₂-Synthese der gebundenen HsPIP5K1 α statt (Mohan et al., 2015). Weiterhin ist das Splicing der RNA bei reduzierter PtdIns(4,5)P₂-Verfügbarkeit deutlich verringert (Osborne et al., 2001). Außerdem ist im tierischen System ein starker Zusammenhang zwischen Zellzyklus und Phosphoinositidsystem beschrieben. Studien haben gezeigt, dass sich die Mengen von nuklärem PtdIns(4)P und PtdIns(5)P während der S-Phase verringern (York & Majerus, 1994; Clarke et al., 2001). Die Menge an nukleären PtdIns(4,5)P₂ ändert sich nicht, es konnte aber eine verstärkte Synthese von PtdInsP, PtdIns(4,5)P₂ und PtdOH bei Eintritt in die S-Phase nachgewiesen werden (Clarke et al., 2001). Zusätzlich führt eine Reduktion des PtdIns(4,5)P₂-Gehalts durch Überexpression von PI-PLC zu einer Zellteilung trotz Nährstoffmangel (Faenza et al., 2000). Da die Interaktion des Zellzyklusregulators Retinoblastoma mit PI4P 5-Kinasen im tierischen System zu einer deutlichen Erhöhung der PI4P 5-Kinaseaktivität führt, wird eine Funktion des kernlokalisierten PI-Systems in der tierischen Zellzyklusregulation angenommen (Divecha et al., 2002). Studien von Dieck et al. (2012) zeigten, dass die Expression von HsPIP5K1 α auch in Tabak-Zellkultur zu einer erhöhten PI4P 5-Kinaseaktivität und höhere PtdIns(4,5)P₂-Gehalten führt. Außerdem war die DNA-Synthese, die Acetylierung von Lysin 9 in Histon 3 und die RBR1-Phosphorylierung reduziert (Dieck et al., 2012), welches Hinweise darauf liefert, dass auch die pflanzliche Zellzyklusregulation mit dem pflanzlichen PI-System verknüpft ist. Da in pflanzlichen Zellen RBR1 auch wichtige Funktionen in der Regulation des Wurzelmeristems besitzt (vg. Abschnitt 1.1.1), würde eine Verknüpfung von kernlokalisierter PI-Funktion mit RBR1 auch eine direkte Funktion in der pflanzlichen Entwicklung suggerieren. Im Moos *Physcomitrella patens* wurden Einflüsse von PIs auf die Entwicklung beschrieben, die bekannte Funktionen von Arabidopsis-RBR1 widerspiegeln (Saavedra et al., 2015). Die Zellen von PTEN-Mutanten teilen sich häufiger und schon bei kleinerer Zellgröße als der Wildtyp. Transkriptlevel von RBR1 und S-Phase-spezifischer Gene sind erhöht und der Übergang von juvenilem zu adultem Entwicklungszustand beschleunigt (Saavedra et al., 2015).

Obwohl die Existenz des eukaryotischen PI-Systems konserviert ist, gibt es wichtige Unterschiede zwischen dem tierischen und pflanzlichen PI-System. In Pflanzen wurde bisher keine PI5P 4-Kinase beschrieben und die pflanzliche PI 3-Kinase akzeptiert PtdIns(4,5)P₂ nicht als Substrat (vgl. Abschnitt 1.3.2), wodurch das in Tieren sehr wichtige PtdIns(3,4,5)P₃ in Pflanzen nicht existiert. Daher können PI-Funktionen aus dem tierischen System nur als Hinweis auf ähnliche Funktionen im pflanzlichen System dienen, deren Funktionen aber nicht direkt übertragen werden (Ischebeck et al., 2010; Delage et al., 2013). Wie bereits in Abschnitt 1.3.4 beschrieben, konnten bereits unterschiedliche Komponenten des pflanzlichen PI-Systems im Zellkern nachgewiesen werden. Dabei wurde bisher nur der Kernlokalisierung der PI 3-Kinase SPI3K-5p in Sojabohnen-Keimlingen eine Funktion zugeordnet (Bunney et al., 2000). SPI3K-

5p lokalisiert dort in *nuclear speckles*, welche mit aktiver Transkription im Nukleolus (rDNA-Transkription) und in der Kernmatrix (rDNA- und tDNA-Transkription) assoziiert sind (Bunney et al., 2000). Im pflanzlichen System wurden bisher auch Hinweise auf Chromatin-assoziierte Funktionen von PtdIns-Monophosphate und PtdOH gefunden. So wurde in keimenden Weizenembryonen PtdOH in angereichertem Chromatin nachgewiesen (Minasbekyan et al., 2004) und Aktivität der Histon-Trimethyltransferase *Arabidopsis homolog of trithorax* (ATX1) wird über PtdIns(5)P-Bindung reguliert (Alvarez-Venegas et al., 2006a). Die Bindung an PtdIns(5)P erfolgt über deren PHD-Finger die Bindung di- oder tri-methylierten Histonen (H3K4me_{2/3}) vermittelt (Alvarez-Venegas et al., 2006a; Lee et al., 2009b). Eine Reduktion von nukleärem PtdIns(5)P bei Salzstress führt zu einer Veränderung der ATX1-Lokalisierung, welches die ATX1-abhängige Trimethylierung von Lysin 4 in Histon 3 (H3K4me₃) reduziert und zu Veränderungen in der Genexpression führt (Alvarez-Venegas et al., 2006a; Ndamukong et al., 2010). Neben exogener Zugabe von PtdIns(5)P verändert auch die Zugabe von PtdIns(4)P die Genexpression, wobei PI-Monophosphat-spezifische Antworten generiert werden (Alvarez-Venegas et al., 2006b).

Die Vielzahl der vorgestellten Daten gibt Hinweise darauf, dass pflanzliche PIs neben den gut beschriebenen cytosolischen und Plasmamembran-lokalisierten Funktionen auch im Zellkern Funktionen besitzen, welches eine regulierte Kernlokalisierung und Funktion pflanzlicher PI4P 5-Kinasen annehmen lässt.

1.4 Kriterien für einen biologisch relevanten aktiven Kernimport von PI4P 5-Kinasen

Zur Untersuchung einer funktionalen Kernlokalisierung von Proteinen und in dieser Arbeit im speziellen PI4P 5-Kinasen können enthaltene NLS aufgrund des gehäufteten Auftretens von basischen Aminosäuren in NLS bioinformatisch vorhergesagt werden. Dabei wird die untersuchte Proteinsequenz mit bereits bekannten NLS bioinformatisch verglichen werden (Brameier et al., 2007; Kosugi et al., 2009b; Nguyen Ba et al., 2009; Lin et al., 2013). Putative NLS werden dann experimentell untersucht, um deren Funktionalität nachzuweisen. Nach Lange et al. (2007) sollen funktionale NLS folgende Kriterien erfüllen:

1. Eine funktionale NLS muss notwendig sein, um das Protein in den Kern zu transportieren. Das heißt, der Kernimport bzw. die Kernlokalisierung muss deutlich gestört sein, wenn die putative NLS verändert ist.
2. Die putative NLS muss in der Lage sein, ein nicht verwandtes Protein in den Zellkern zu transportieren.
3. Das Protein muss mit seinem vermutlichen Import-Rezeptor interagieren.
4. Die Interaktion mit dem Import-Rezeptor muss durch die putative NLS vermittelt werden.

1.5 Zielstellung

Veröffentlichte Studien unserer und anderer Gruppen geben Hinweise auf Funktionen von pflanzlichen PI4P 5-Kinasen im Zellkern. Zunächst sollten Hinweise aus der Literatur auf eine Kernlokalisierung von PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P₂ zellbiologisch untersucht werden und PI4P 5-Kinaseaktivität im Zellkern von Arabidopsis nachgewiesen werden. Hauptziel der Arbeit war am Beispiel von PIP5K2 zu testen, ob die oben genannten Kriterien für einen aktiven Kerntransport für PI4P 5-Kinasen erfüllt sind. Um kernlokalisierte Funktionen von PIP5K2 in Arabidopsis zu untersuchen, sollten PIP5K2-Varianten, die eine reduzierte Kernlokalisierung zeigen, in Komplementationstests mit der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante genutzt werden. Zusätzlich sollten Hinweise aus dem tierischen System und den Studien von Dieck et al. (2012) auf eine Verbindung von PI4P 5-Kinasen und dem Zellzyklusregulator und Meristemorganisor RBR1 gezielt untersucht werden.

2 Ergebnisse

Phosphoinositide (PIs) und im Speziellen PtdIns(4,5)P₂ besitzen als regulatorische Phospholipide in allen eukaryotischen Systemen wichtige Signalfunktionen. In pflanzlichen Zellen sind PI4P 5-Kinasen u. a. an der Regulation des Vesikeltransports, des Aktinzytoskelets und der Stressantwort auf biotischen und abiotischen Stress beteiligt (Ischebeck et al., 2008, 2011; König et al., 2008; Stenzel et al., 2012; Heilmann & Heilmann, 2015; Heilmann, 2016a, 2016b). Nach und nach mehren sich die Hinweise auf Kernfunktionen pflanzlicher PI4P 5-Kinasen. In Studien mit fluoreszenzmarkierten Isoformen der Arabidopsis PI4P 5-Kinasen wurde in verschiedenen pflanzlichen Zelltypen eine Kernlokalisierung verschiedener PI4P 5-Kinaseisoformen beobachtet (Lou et al., 2007; Ischebeck et al., 2011, 2013; Tejos et al., 2014). Bisher unveröffentlichte Arbeiten zeigen, dass bei transienter Expression in Zwiebelepidermiszellen alle elf Isoformen der Arabidopsis PI4P 5-Kinasen im Zellkern lokalisieren (Abbildung 2.1).

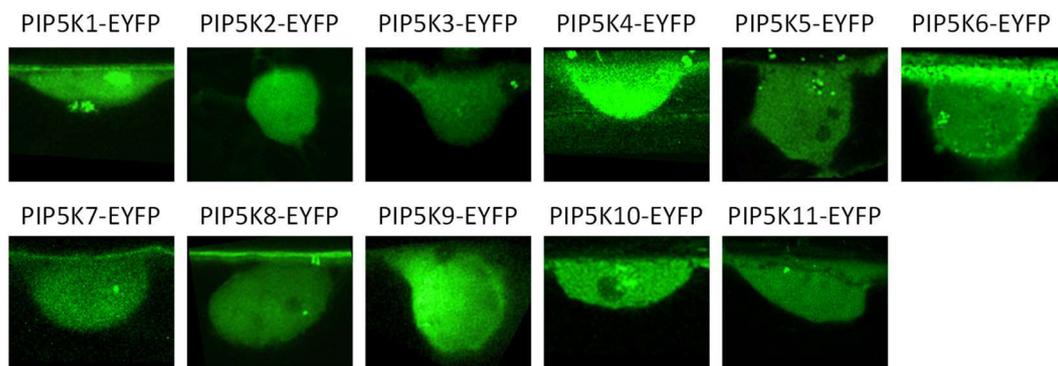


Abbildung 2.1 **PI4P 5-Kinasen lokalisieren im Zellkern von Zwiebelepidermiszellen.** Für Lokalisierungsstudien wurden PI4P 5-Kinase-EYFP-Konstrukte transient in Zwiebelepidermiszellen exprimiert (nicht publizierte Daten, Wilhelm Menzel).

Promotor-Expressionsstudien von PIP5K1 und PIP5K2 zeigten in Arabidopsiskeimlingen eine ubiquitäre Expression von PIP5K1 und PIP5K2 mit erhöhter Promotoraktivität in meristematischen Geweben (Ischebeck et al., 2013). Während die Einzelmutanten *pip5k1* und *pip5k2* leichte Wachstumsverzögerungen zeigen, ist der Phänotyp der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante deutlich gravierender: Sie zeigt ausgeprägten Zwergwuchs und ist nicht fertil (Ischebeck et al., 2013). Der starke Phänotyp der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante deutet auf eine essentielle Funktion der, scheinbar in großen Teilen redundanten, PI4P 5-Kinase-Isoformen PIP5K1 und PIP5K2, hin. In vorangegangenen Studien durch Dr. Till Ischebeck (Göttingen) wurde in die *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante ein GUS-basierter Marker eingekreuzt, der am Übergang von G₂-Phase zu M-Phase unter Kontrolle eines Cyclin B-Promotor exprimiert wird (pCYCB) und aufgrund der verwendeten *cyclin destruction box* (CDB) gegen Ende der Mitose abgebaut wird (Abbildung 2.2).

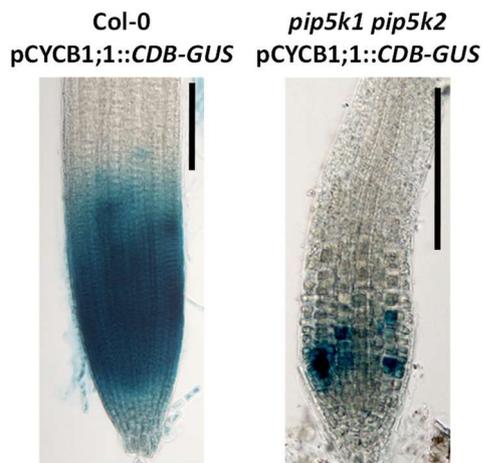


Abbildung 2.2 **Untersuchung der Zellteilungsaktivität im Arabidopsis-Wurzelmeristem von Wildtyp- und *pip5k1 pip5k2*-Keimlingen.** Nach Kreuzung des Zellzyklusmarkers *pCycB1;1::CDB-GUS* in *pip5k1 pip5k2* wurde die Promotoraktivität von *CyclinB1;1* in zehn Tage alten Keimlinge in Wildtyp- und *pip5k1 pip5k2*-Keimlingen durch GUS-Färbung nachgewiesen (nicht publizierte Daten von Dr. Till Ischebeck).

Durch Zugabe des GUS-Substrats können somit Zellen angefärbt werden, die sich zum Zeitpunkt der Färbung teilen. Die geringere Aktivität von CDB-GUS in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante deutet auf eine geringere Zellteilung im Wurzelmeristem hin (Abbildung 2.2). Eine reduzierte Teilungsfähigkeit im Wurzelmeristem von *pip5k1 pip5k2* impliziert auf regulatorische Funktionen von PIP5K1 und PIP5K2 in der Zellteilung hin. Zur detaillierten Untersuchung der Kernlokalisierung und möglicher Kernfunktionen wurde PIP5K2 ausgewählt, da PIP5K2 *in vitro* eine höhere PI4P 5-Kinaseaktivität als PIP5K1 zeigt (Stenzel et al., 2008; Ischebeck et al., 2013). In dieser Arbeit werden zunächst die systematischen Untersuchungen zur Kernlokalisierung von PIP5K2 gezeigt. Daran schließen sich Experimente zur Charakterisierung möglicher Kernfunktionen von PIP5K2 an.

2.1 PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P₂ können im Zellkern von Arabidopsis nachgewiesen werden

Um zu ergründen, ob ein nukleäres PI-System existiert, wurde zunächst die Existenz von kernlokalisierten PIs untersucht. Für *in vivo*-Lokalisierungsstudien von PIs in lebenden Zellen wurden Fusionsproteine aus PI-bindender Domäne und Fluoreszenzprotein genutzt. Die PH-Domäne der humanen PLC δ (PH_{PLC δ}) bindet spezifisch PtdIns(4,5)P₂ (Stauffer et al., 1998). van Leeuwen et al. (2007) zeigen, dass PH_{PLC δ} -EYFP in BY-2-Zellen in der Regel im Cytosol und nicht im Zellkern lokalisiert. Bei Salz- und Hitzestress akkumulierte PH_{PLC δ} -EYFP an der Plasmamembran. Bei Hitzestress kommt es zusätzlich zu einer Akkumulation von PtdIns(4,5)P₂ an der Kernhülle und im Nucleolus (Mishkind et al., 2009). In einigen der gezeigten Abbildungen der Arbeiten von van Leeuwen et al. (2007) und Mishkind et al. (2009) lokalisiert PH_{PLC δ} -EYFP auch im Zellkern, wobei diese Beobachtung im Text nicht erwähnt wird. In Zellen unterschiedlicher Arabidopsis-Gewebe wurde bisher keine Kernlokalisierung gezeigt, sondern neben der cytosolischen Lokalisierung eine bipolare Lokalisierung von PtdIns(4,5)P₂ an der apikalen und basalen Plasmamembran von Wurzelzellen (van Leeuwen et al., 2007). Die Zugabe von Auxin führt zur Akkumulation von PtdIns(4,5)P₂ an der Plasmamembran (Tejos et al., 2014).

In dieser Arbeit wurde eine Arabidopsis-Pflanzenlinie, die PH_{PLC δ} -EYFP stabil exprimierte, auf die Kernlokalisierung von PH_{PLC δ} -EYFP in Wurzelzellen dieser Pflanzen untersucht (Abschnitt 5.22.3). In

jedem der fünf Tage alten Keimlinge kann in allen Zellen eine Lokalisierung von PH_{PLC δ} -EYFP im Cytosol detektiert werden (Abbildung 2.3A). In den Zellen vieler Keimlinge lokalisiert PH_{PLC δ} -EYFP wie bereits publiziert nicht im Zellkern (Abbildung 2.3A links; van Leeuwen et al., 2007) während in anderen Keimlingen PH_{PLC δ} -EYFP in vielen Zellen deutlich im Zellkern lokalisiert (Abbildung 2.3A rechts). Die Beobachtung, dass es in manchen Fällen zu einer häufigen Kernlokalisierung kommt, könnte ein Hinweis auf eine Kernlokalisierung nach einem bisher unbekanntem Stimulus sein. Durch eine Kontrollfärbung mit Propidiumiodid konnte ausgeschlossen werden, dass es sich um Autofluoreszenz im Zellkern toter Zellen handelt (nicht gezeigt). Der PtdIns(4)P-Reporter EYFP-PH_{FAPP1} lokalisiert im Zellkern (Vermeer et al., 2009), wurde in dieser Arbeit aber nicht untersucht, da es durch eine Aminosäuresubstitution, die zur Aufhebung der PtdIns(4)P-Bindung führt, zu einer verstärkten Kernlokalisierung des Reporters kommt (Vermeer et al., 2009). Dadurch liegt der Kernlokalisierung von EYFP-PH_{FAPP1} vermutlich keine PtdIns(4)P-Bindung zugrunde.

Zur Bestätigung der Kernlokalisierung von PtdIns(4,5)P₂ wurde die Lokalisierung von PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ auch immunhistochemisch untersucht (Abschnitt 5.19). Fünf Tage alte Arabidopsiskeimlinge wurden nach einem Standardprotokoll fixiert, mit Antikörpern gegen PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P₂ perfudiert und der AlexaFluor-konjugierte sekundäre Antikörper mittels konfokaler Mikroskopie detektiert (Abschnitt 5.23, Abbildung 2.3B-E). In der Wurzelspitze von Wildtyp- und *pip5k1 pip5k2*-Keimlingen konnte PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ in der gesamten Kernmatrix des Zellkerns, aber nicht im Nucleolus nachgewiesen werden (Abbildung 2.3B). Dabei zeigte sich eine leicht strukturierte Lokalisierung von PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P₂ im Zellkern. Die Gegenfärbung der genomischen DNA im Zellkern mit DAPI färbte verstärkt Regionen, in denen die DNA als Heterochromatin dicht gepackt ist (Abbildung 2.3B, mittlere Spalte). An diesen Orten konnte keine Bindung der Antikörper gegen PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P₂ detektiert werden (Abbildung 2.3B, rechte Spalte). Da in den immunhistochemischen Untersuchungen keine Phosphoinositide an der Plasmamembran oder am Endomembransystem detektiert wurden, wie es in der Literatur beschrieben ist (Tejos et al., 2014), wurde eine zusätzliche Kontrolle durchgeführt, um die Integrität der Plasmamembran bzw. der Zellen insgesamt zu beurteilen. Dazu wurde die Lokalisierung einer H⁺-ATPase an der Plasmamembran immunhistochemisch untersucht (Abbildung 2.3C). Eine gleichmäßige, durchgängige Verteilung des Signals entlang der Plasmamembran in Wildtyp und *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante zeigte eine ordnungsgemäße Fixierung der Proteine während der Durchführung des Experiments. Signale durch unspezifische Bindung der sekundären Antikörper konnten durch Kontrollen ohne primären Antikörper ausgeschlossen werden (Abbildung 2.3D und E). Mit Hilfe der mikroskopischen Untersuchung eines lipidbindenden Reporterproteins und spezifischen Phosphoinositid-bindenden Antikörpern konnten sowohl PtdIns(4,5)P₂ als auch PtdIns(4)P in Zellkernen von Arabidopsiswurzelzellen nachgewiesen werden.

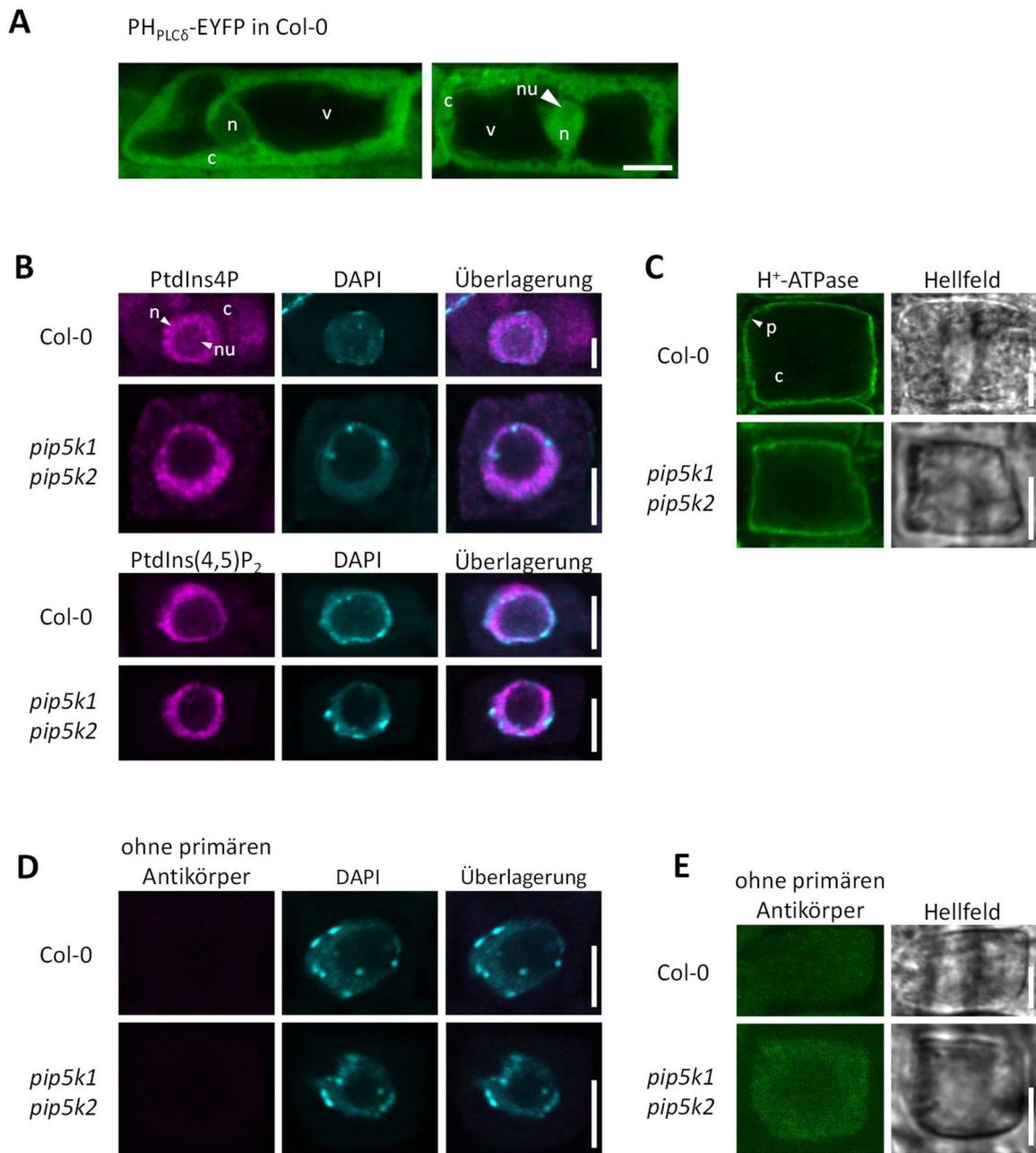


Abbildung 2.3 **Nachweis von PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P₂ in Zellkernen von Arabidopsiswurzelzellen.** (A) Der PtdIns(4,5)P₂-bindende Lipidreporter PH_{PLCδ}-EYFP lokalisiert in Wurzelepidermiszellen neben der bekannten cytosolischen Lokalisierung (links) auch im Zellkern (rechts). Untersucht wurden stabil transformierte fünf Tage alte Arabidopsis-Keimlinge. Das Experiment wurde viermal mit jeweils drei bis sieben Keimlingen durchgeführt. (B-E) Immunhistochemische Untersuchungen zur Kernlokalisierung von PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P₂. (B) Nachweis von PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P₂ in der Wurzelspitze von Arabidopsis Wildtyp (Col-0) und *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante. Zur Analyse der Kernlokalisierung wurde mit DAPI gegengefärbt und beide Kanäle übereinandergelegt. (C) Als Kontrolle wurde das Plasmamembranprotein H⁺-ATPase nachgewiesen. (D und E) Um eine unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers auszuschließen, wurden Kontrollen mitgeführt, bei denen kein primärer Antikörper genutzt wurde, sondern nur der sekundäre AlexaFluor® 555- (D) bzw. AlexaFluor® 488- (E) konjugierte Antikörper. Die Detektion erfolgte durch konfokale Laser-Raster-Mikroskopie. Magenta, AlexaFluor® 555; cyan, DAPI; grün, AlexaFluor® 488; Graustufen, Hellfeld. Das Experiment wurde zwei- bis viermal mit insgesamt mind. zehn Keimlingen durchgeführt. c, Cytosol; n, Zellkern; nu, Nucleolus; p, Plasmamembran; v, Vakuole. Der Maßstab entspricht in allen Abbildungen 5 µm.

2.2 Untersuchungen zur PI4P 5-Kinaseaktivität im pflanzlichen Zellkern

Neben der Kernlokalisierung von PI4P 5-Kinasen war der Nachweis von PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ im pflanzlichen Zellkern, also Substrat und Produkt der PI4P 5-Kinasen ein weiterer Hinweis auf eine Kernfunktion von PI4P 5-Kinasen im Zellkern. Zum Nachweis einer PtdIns(4,5)P₂-Synthese im Zellkern wurde die PI4P 5-Kinaseaktivität im Zellkern untersucht. Dazu wurden Zellkerne aus Blättern sechs Wochen alter Arabidopsispflanzen über einen Percoll-Stufengradienten angereichert (Folta & Kaufman, 2006; Abschnitt 5.20). Zur makroskopischen Analyse des hergestellten Roh- und Kernextrakts wurden Zellkerne mit Ethidiumbromid angefärbt, um die Intaktheit und Anreicherung der Zellkerne zu überprüfen und das Kernextrakt auf Chloroplastenverunreinigung zu untersuchen (Abbildung 2.4A). Chloroplasten können durch ihre Form und Struktur im Hellfeldbild von Zellkernen unterschieden werden, die Autofluoreszenz von Chlorophyll a (Abbildung 2.4A, blau) verifizierte die Zuordnung. Im Rohextrakt waren kaum Zellkerne, aber viele Chloroplasten erkennbar (Abbildung 2.4A). Schon im Hellfeldbild des Kernextrakts ist deutlich erkennbar, dass Chloroplasten abgereichert wurden. Die Ethidiumbromidfärbung zeigt, dass intakte Zellkerne angereichert wurden. Entsprechend der Abreicherung von Chloroplasten war die Proteinmenge der großen Untereinheit des Proteins Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (RubisCO, 53 kDa, das häufigste Protein in pflanzlichen Zellen) bei Auftrennung über SDS-PAGE (Abschnitt 5.15.8) im Kernextrakt deutlich reduziert, während niedermolekulare Proteine angereichert wurden (Abbildung 2.4B, CBB). Die Kernanreicherung wurde zusätzlich im Westernblot überprüft (Abschnitt 5.15.9). Mit einem Histon 3-Antikörper wurde die Anreicherung von Zellkernen nachgewiesen (Abbildung 2.4C, Kern-Marker, anti-H3). Im Vergleich zum Rohextrakt konnte deutlich mehr Histon 3 im Kernextrakt nachgewiesen werden. Da Kernhülle und ER kontinuierlich ineinander übergehen, lässt sich bei der Kernisolation auch eine leichte Anreicherung von ER-Membranen nicht vermeiden (Abbildung 2.4C, ER-Marker, anti-BiP (*Binding immunoglobulin protein*)). Der Plasmamembran-Antikörper anti-H⁺-ATPase zeigt weder im Rohextrakt noch im Kernextrakt ein Signal. Da die Funktionalität des Antikörpers in immunhistochemischen Studien gezeigt wurde (vgl. Abbildung 2.3C), könnte die eingesetzte Proteinkonzentration zu gering gewesen sein, um in diesem Experiment die H⁺-ATPase nachzuweisen. Eine starke Anreicherung von Plasmamembran im Kernextrakt ist aufgrund der hohen Detergenzkonzentration (1 % Triton X-100) während der Kernanreicherung unwahrscheinlich. In den präparierten Roh- und Kernextrakten wurde die PI4P 5-Kinaseaktivität gemessen. Dazu wurden die Proteingehalte der Extrakte bestimmt und die Proteinmengen als Referenzgröße im anschließenden PI4P 5-Kinaseaktivitätstest eingesetzt. Die Extrakte wurden mit PtdIns(4)P und γ [³³P]-ATP inkubiert, die Lipide durch Dünnschichtchromatographie getrennt und die Menge an gebildetem [³³P]-PtdIns(4,5)P₂ quantifiziert (Abschnitt 5.16, Abbildung 2.4D). Sowohl im Rohextrakt als auch in der angereicherten Kernfraktion konnte über die Bildung des PtdIns(4,5)P₂-Produkts PI4P 5-Kinaseaktivität nachgewiesen werden (Abbildung 2.4D). Durch die deutliche

Anreicherung von Zellkernen im Kernextrakt, könnte die dort nachgewiesene PI4P 5-Kinaseaktivität von kernlokalisierter PI4P 5-Kinase stammen. Für detailliertere Aussagen müsste die genutzte Methode zur Kernanreicherung optimiert werden und die Plasmamembranabreicherung durch einen funktionalen Plasmamembran-Marker, wie z. B. einen anderen Antikörper gegen plasmamembranlokalisierte H^+ -ATPase, gezeigt werden.

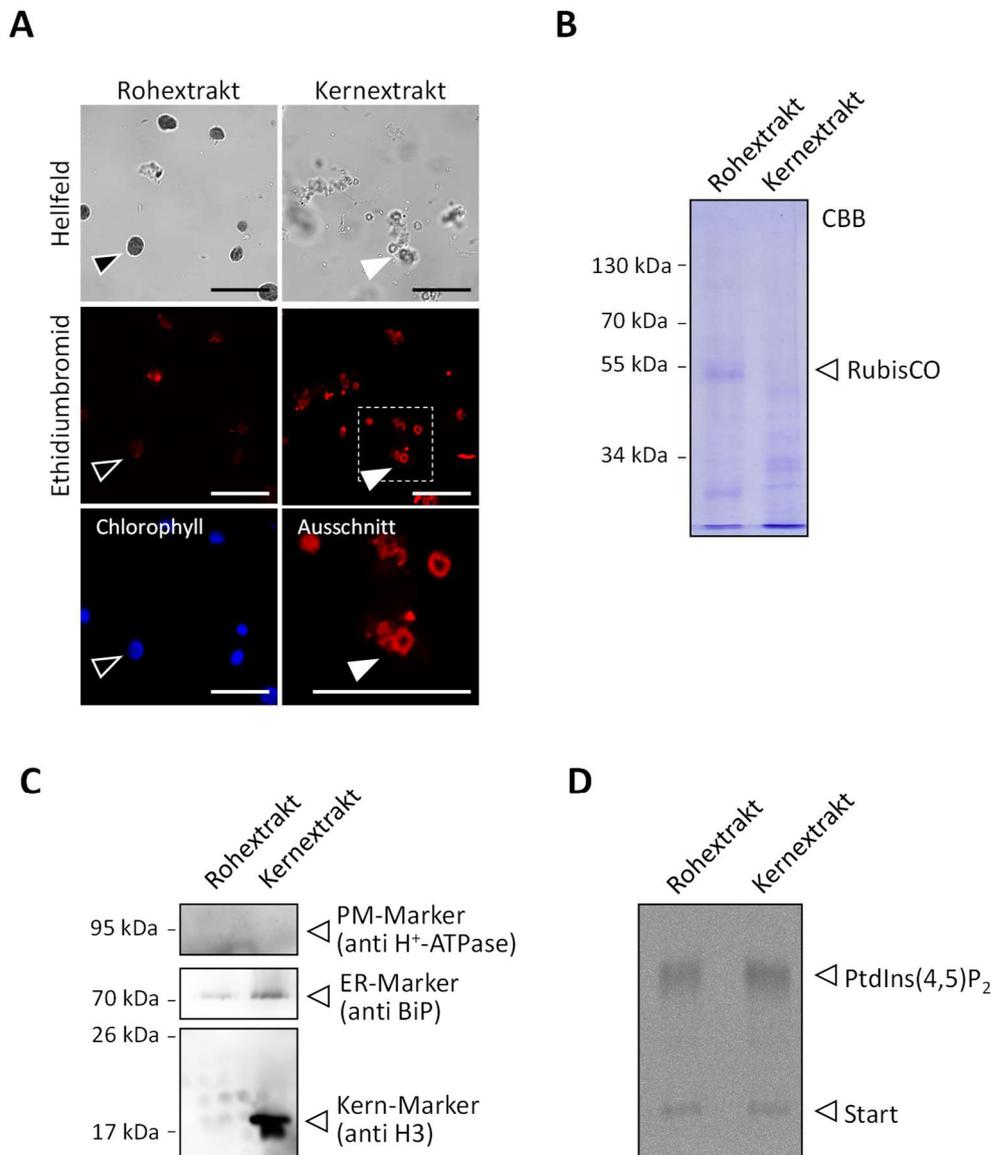


Abbildung 2.4 **PI4P 5-Kinaseaktivität im Zellkern von Arabidopsis**. Aus Rosettenblättern sechs Wochen alter Arabidopsispflanzen wurden über einen Percoll-Stufengradienten Kerne angereichert (Kernextrakt) und im Vergleich zu Rohextrakt analysiert. **(A)** Zur mikroskopischen Analyse der Extrakte wurden die Zellkerne mit Ethidiumbromid (rot) angefärbt und Chloroplasten über deren Autofluoreszenz (Chlorophyll, blau) detektiert. Der schwarze Pfeil markiert repräsentativ ein Chloroplast, der weiße Pfeil repräsentativ ein Zellkern. Die Aufnahmen wurden mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie gemacht. Der Maßstab entspricht 20 μ m. **(B)** Vergleich des Proteingehalts von Rohextrakt und Kernextrakt im Coomassie-Brilliantblau-gefärbten SDS-PAGE-Gel (CBB). **(C)** Spezifischer Nachweis der Organellenmarker H^+ -ATPase (Plasmamembran, 100 kDa), BiP (ER, 73 kDa) und H3 (Zellkern, 15 kDa) über Westernblot. **(D)** Bestimmung der PI4P 5-Kinaseaktivität in Roh- und Kernextrakt über den Einbau von [33 P]-Phosphat in PtdIns(4)P und Auftrennung der Reaktionsprodukte mittels Dünnschichtchromatografie. Die Abbildungen sind repräsentativ für drei Experimente.

2.3 Die Fusion mit PIP5K2 führt zum Kerntransport eines cytosolischen Proteins

Pflanzliche PI4P 5-Kinasen wurden bereits in Zwiebelepidermiszellen, Tabakpollenschläuchen und Arabidopsiswurzelzellen überexprimiert und dabei in vielen Fällen eine Kernlokalisierung beobachtet (Abbildung 2.1; Lou et al., 2007; Ischebeck et al., 2011, 2013; Tejos et al., 2014). Das Ausschlussvolumen für freie Diffusion durch den Kernporenkomplex liegt bei 40 bis 50 kDa (Meier & Brkljadic, 2010; Raices & D'Angelo, 2012). Insbesondere Typ B PI4P 5-Kinasen (Isoformen 1 bis 9) sind mit 80 bis 92 kDa (als EYFP-Fusion 106 bis 118 kDa) größer und sollten nicht passiv in den Kern diffundieren. Um passive Diffusion aufgrund eventueller konformationeller Besonderheiten von PI4P 5-Kinasen auszuschließen, wurde getestet, ob PIP5K2 in der Lage ist, die Kernlokalisierung eines cytosolischen Reporterkonstrukts zu vermitteln. Das erstellte Reporterkonstrukt ist ein Fusionsprotein bestehend aus der großen Untereinheit von RubisCO (RbcL, 53 kDa) und EYFP (27 kDa). *rbcL* ist im chloroplastidären Genom codiert. Eine ektopische Expression im Zellkern von Zwiebelepidermiszellen führt daher zu einer unspezifischen cytosolischen Lokalisierung (Abschnitt 5.21). Durch das Fehlen von Kernlokalisierungssignalen oder Transitpeptiden und durch die Größe des RbcL-EYFP-Konstrukts (80 kDa) lokalisierte RbcL-EYFP diffus im Cytosol aber nicht in Zellkernen von Zwiebelepidermiszellen (Abbildung 2.5A). Das Einfügen von PIP5K2 (87 kDa) zwischen RbcL und EYFP vermittelte die Kernlokalisierung des nun 167 kDa großen Reporterkonstrukts (Abbildung 2.5B). Eine passive Diffusion dieses großen Fusionsproteins ist unwahrscheinlich, da die Ausschlussgröße für passiven Kernimport wie erwähnt bei 40 bis 50 kDa liegt. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass PIP5K2 aktiv in den Zellkern transportiert wird.

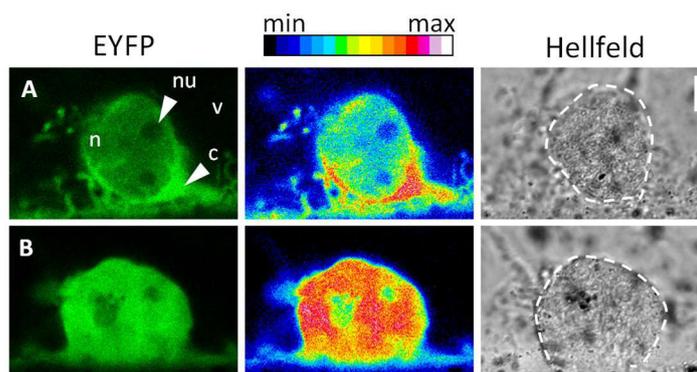


Abbildung 2.5 **Subzelluläre Lokalisierung von RbcL-EYFP und RbcL-PIP5K2-EYFP nach transienter Expression in Zwiebelepidermiszellen.** (A) RbcL-EYFP lokalisiert stark cytosolisch und zeigt nur schwache Fluoreszenz im Zellkern. (B) RbcL-PIP5K2-EYFP lokalisiert im Zellkern von Zwiebelepidermiszellen. Die EYFP-Fluoreszenz wurde mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie detektiert (links). Zur Hervorhebung der Fluoreszenzintensität wurde eine Falschfarben-Darstellung genutzt (Mitte). Das Hellfeldbild ist in der rechten Spalte gezeigt. Die gestrichelte weiße Linie hebt die Umrisse des Zellkerns hervor. Der Maßstab entspricht 10 µm, n = 3 - 5 mit insgesamt 18 bis 40 individuell transformierten Zellen je Konstrukt. c, Cytosol; v, Vakuole; n, Zellkern; nu, Nucleolus.

2.4 PIP5K2 interagiert mit α -Importinen

Der klassische Proteinimport in den Zellkern findet über einen α -Importin: β -Importin:Cargo-Komplex statt. Zur direkten Untersuchung der Interaktion von PI4P 5-Kinasen mit α -Importinen wurde ein Split-Ubiquitin-basiertes Hefe-Zwei-Hybridsystem gewählt (Abschnitt 5.18.1). Dieses System wurde dafür entwickelt, auch cytosolische und membranassoziierte Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen. Zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen mit α -Importinen bietet sich dieses System an, da α -Importine ihr Cargo im Cytosol binden und im Zellkern wieder freigeben. Ein weiterer Vorteil ist, dass das Split-Ubiquitin-basierte System ohne die obligatorische Fusion einer starken NLS an Köder- und Beuteprotein auskommt, welches in kernbasierten Systemen genutzt wird, um eine Kernlokalisierung der Proteine zu erzwingen. Eine spezifische Interaktion von Importinen mit einer endogenen NLS in Köder- oder Beuteprotein kann nur ohne zusätzliche NLS-Fusion untersucht werden. Um PIP5K2 im Cytosol zu halten, wurde PIP5K2 mit dem integralen ER-Protein Oligosaccharyltransferase 4 (OST4) fusioniert und am ER fixiert. OST4-PIP5K2 diente in den Interaktionsstudien als Köder. Da PIP5K2 ubiquitär in Arabidopsis exprimiert wird, wurden stark und ubiquitär exprimierte Importin α -Isoformen als Beute eingesetzt: IMP α 1, IMP α 2, IMP α 3, IMP α 4 und IMP α 6 (Wirthmueller et al., 2013). Nach Kotransformation von Köder und Beute in den Hefestamm NMY51 wurde der Interaktionstest durchgeführt (Abbildung 2.6A).

Dabei zeigte das gleichmäßige Wachstum bei Selektion ohne Leucin und Tryptophan, dass die Hefesuspension in gleicher Verdünnung im Interaktionstest eingesetzt wurde. Bei Protein-Protein-Interaktion war Wachstum auf dem Selektionsmedium -LWH möglich. Kein Wachstum im Interaktionstest bei Kotransformation von OST4-PIP5K2 mit den Köder IMP α 1 und IMP α 2 zeigt, dass PIP5K2 mit beiden Proteinen nicht interagiert. Wachstum der Hefe kotransformiert mit PIP5K2 und IMP α 3, IMP α 4 bzw. IMP α 6 zeigt eine Interaktion von PIP5K2 und den entsprechenden α -Importinen, wobei das Wachstum und somit die Interaktion mit IMP α 6 am stärksten war (Abbildung 2.6A). Die selektive und unterschiedlich starke Interaktion mit IMP α 3, IMP α 4 und IMP α 6 könnte auf eine differenzierte Regulation des Kerntransports hinweisen.

Die Interaktion von PIP5K2 mit IMP α 6 wurde über einen Dotplot verifiziert (Abschnitt 5.18.2, Abbildung 2.6B). Dazu wurden MBP (43kDa), MBP-PIP5K2 (129 kDa) und GST-IMP α 6 (82 kDa) heterolog in *E. coli* exprimiert und mittels Affinitätschromatographie angereichert (Abschnitt 5.15; Abbildung 2.6C). MBP und MBP-PIP5K2 wurden in vergleichbaren molaren Mengen auf eine Nitrocellulose-Membran aufgetragen und entweder mit Amidoschwarz gefärbt (Ladekontrolle) oder für den Interaktionstest mit GST-IMP α 6 inkubiert (Abbildung 2.6B). Durch das Auftragen äquimolarer Mengen von MBP und MBP-PIP5K2 ist die Amidoschwarz-Färbung von MBP schwächer als die von MBP-PIP5K2. Die Bindung von GST-IMP α 6 an MBP bzw. MBP-PIP5K2 wurde mit einem GST-spezifischen Antikörper (Abschnitt 5.15.9) und einem HRP-konjugierten sekundären Antikörper (Abschnitt 5.15.9) detektiert.

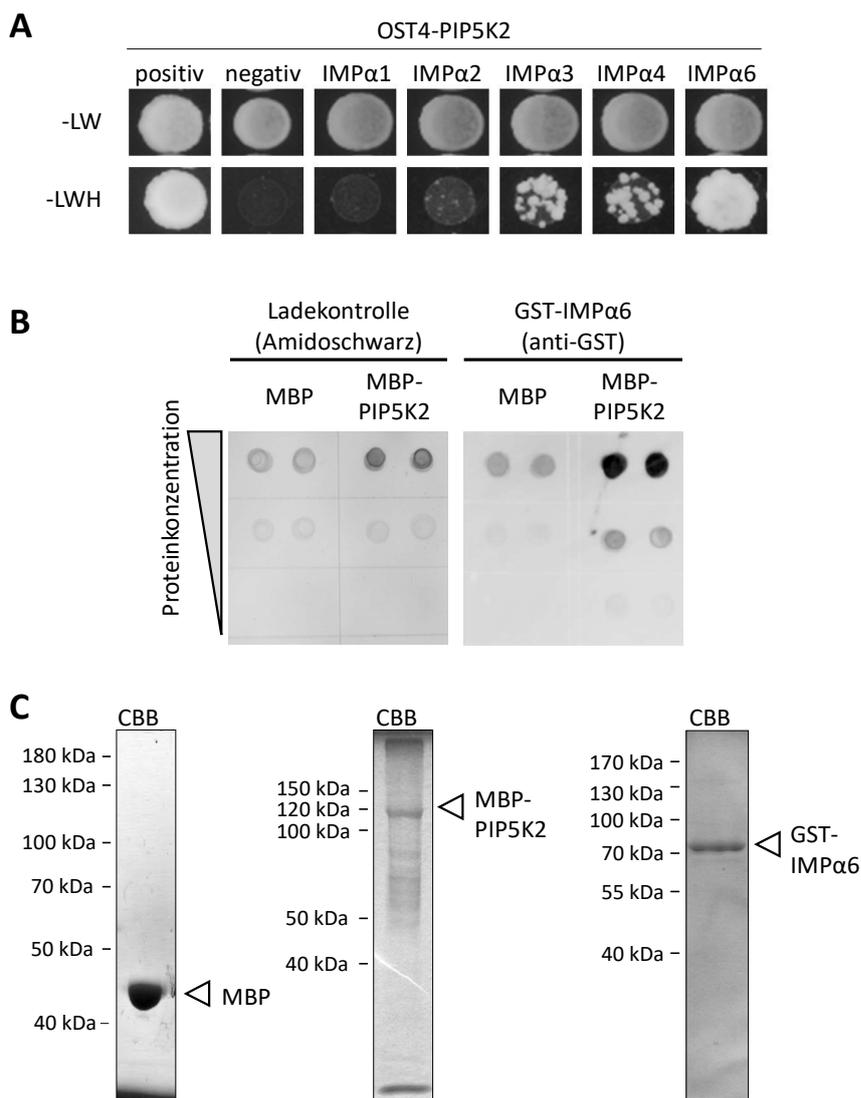


Abbildung 2.6 **Interaktionstests zwischen PIP5K2 und α -Importinen.** **(A)** Hefe-Zwei-Hybrid-Interaktionstest von PIP5K2 mit ubiquitär exprimierten α -Importinen. Zur Selektion wurde Hefesuspension auf Hefeselektionsplatten getropft: Das gleichmäßige Wachstum auf -LW-Selektionsmedium verifiziert eine gleichmäßige Verdünnung. Wachstum auf -LWH-Selektionsmedium zeigt die Interaktion der gebundenen Proteine. Gezeigt ist das Wachstum nach sieben Tagen Inkubation bei 30 °C. Das Experiment wurde dreimal mit jeweils fünf individuell transformierten Klonen durchgeführt. **(B)** Dotblot zur Verifizierung der Interaktion von PIP5K2 und IMP α 6. MBP und MBP-PIP5K2 wurden in vergleichbaren molaren Mengen (MBP-PIP5K2: 5 μ g; 1 μ g; 0,2 μ g) auf Nitrozellulose-Membran getropft und durch Amidoschwarzfärbung nachgewiesen bzw. nach Blockierung der Membran mit GST-IMP α 6 inkubiert. Die IMP α 6-Bindung wurde über einen GST-Antikörper und einen HRP-konjugierten sekundären Antikörper detektiert; n = 3. **(C)** Coomassie-Brilliantblau (CBB)-gefärbtes SDS-PAGE-Gel der in *E. coli* exprimierten und über Affinitätschromatographie angereicherten Proteine MBP (42 kDa), MBP-PIP5K2 (129 kDa) und GST-IMP α 6 (82 kDa).

Wie Abbildung 2.6B dargestellt, konnte mit Hilfe des Dotblots die Interaktion zwischen PIP5K2 und IMP α 6 bestätigt werden. Zwar war auch eine schwache Bindung von IMP α 6 an MBP zu detektieren, doch zeigte PIP5K2 eine deutlich stärkere Bindung an GST-IMP α 6 (Abbildung 2.6C) Dies bestätigt das Ergebnis der Hefe-Zwei-Hybrid-Studien. Die PIP5K2 mit IMP α 6 interagiert und deutet darauf hin, dass die bereits beobachtete Kernlokalisierung von PIP5K2 über den aktiven Kernimport mit Hilfe von α -Importinen reguliert wird.

2.5 Die Kernlokalisierung von PIP5K2 wird über deren N-terminale Domänen vermittelt

In eukaryotischen Zellen werden Proteine mit nukleären Funktionen nach der Proteinbiosynthese im Cytosol oder am ER in den Zellkern transportiert. Um Einzugrenzen welche Proteindomänen von PIP5K2 die Kernlokalisierung vermitteln, wurde PIP5K2 in eine N-terminal und eine C-terminale Hälfte geteilt. Die N-terminalen Domänen (AS 1-343) umfassen den N-Terminus, die MORN- und Linker-Domäne. Zu der C-terminalen Hälfte (AS 343-754) gehören die Dimerisierungsdomäne und katalytische Domäne. Die transiente Expression in Zwiebelepidermiszellen (Abschnitt 5.21) von PIP5K2₁₋₃₄₃-EYFP und PIP5K2₃₄₄₋₇₅₄-EYFP zeigte für beide Fusionsproteine cytosolische Lokalisierung (Abbildung 2.7), allerdings lokalisierte PIP5K2₁₋₃₄₃-EYFP zusätzlich auch deutlich in Zellkernen der Zwiebelepidermiszellen (Abbildung 2.7). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Kernlokalisierung-vermittelnde Signalsequenzen in den N-terminalen Domänen von PIP5K2 liegen.

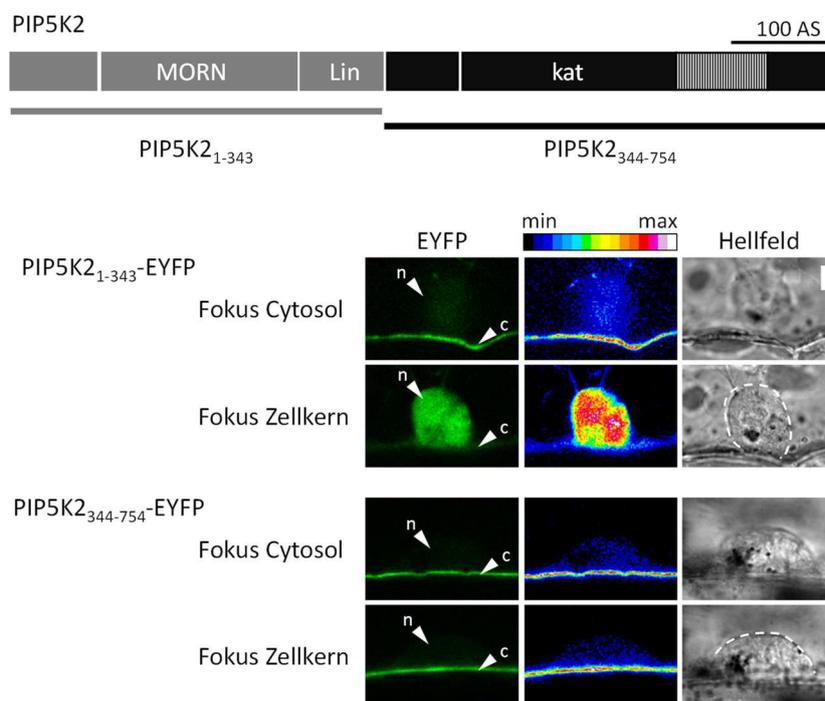


Abbildung 2.7 Eingrenzung der Kerntransport-vermittelnden Proteindomänen in PIP5K2.

Transiente Expression von PIP5K2₁₋₃₄₃-EYFP und PIP5K2₃₄₄₋₇₅₄-EYFP in Zwiebelepidermiszellen. Jede Zelle wurde zweimal aufgenommen und entweder das Cytosol (oben) bzw. der Zellkern (unten) fokussiert. Die EYFP-Fluoreszenz wurde mit konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie detektiert (links). Die Hervorhebung der Fluoreszenzintensität durch Falschfarbendarstellung wurde in Fiji erstellt (Mitte). Das Hellfeldbild ist jeweils ganz rechts gezeigt. Die gestrichelte weiße Linie hebt die Umrisse des Zellkerns hervor. Der Maßstab entspricht 10 µm, n = 3 mit insgesamt 15 bis 30 individuell transformierten Zellen je Konstrukt. c, Cytosol; n, Zellkern.

2.6 PIP5K2 besitzt funktionale Kernlokalisierungssignale

Die bisher dargestellten Experimente zeigen, dass PIP5K2 aktiv in den Zellkern transportiert wird, mit α -Importinen interagiert und die Kernlokalisierung durch N-terminale Domänen von PIP5K2 vermittelt wird. Eine Bindung des Cargos an α -Importine wird meist durch Kernlokalisierungssignale (NLS) vermittelt. Klassische NLS sind Arginin/Leucin-reiche Sequenzen im Cargoprotein, die durch Sequenzanalysen vorhergesagt werden können (Wirthmueller et al., 2013). Dazu wird die eingegebene Sequenz auf eine erhöhte Anzahl von basischen Aminosäuren geprüft und / oder mit bereits bekannten NLS verglichen. So wurde die Aminosäuresequenz von PIP5K2 mit Hilfe der Onlinesoftware cNLSmapper,

NLStradamus, NucPred und seqNLS analysiert (Abschnitt 5.12). Insgesamt werden sechs NLS vorhergesagt (Abbildung 2.8). Die NLS in der vollständigen Aminosäuresequenz von PIP5K2 ist im Anhang gezeigt (Abbildung 7.1). Davon befinden sich fünf NLS in den N-terminalen Domänen von PIP5K2, die Kernlokalisierung vermitteln. Eine NLS ist in der variablen Insertion der konservierten katalytischen Domäne vorhergesagt.

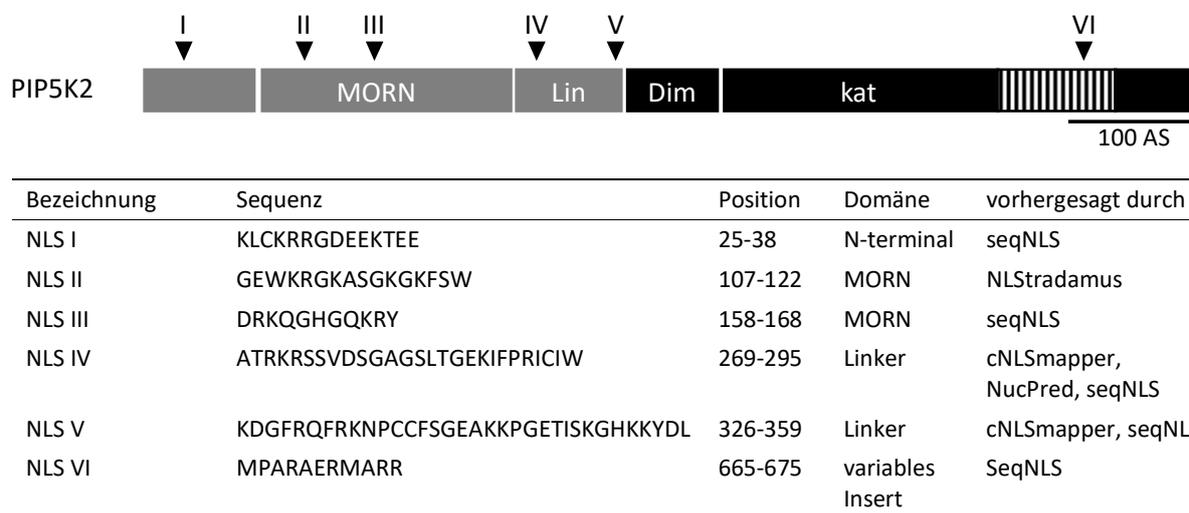


Abbildung 2.8 **Bioinformatisch vorhergesagte NLS in PIP5K2**. Die vorhergesagten NLS sind von I bis VI nummeriert und durch Pfeile in der Domänenstruktur von PIP5K2 markiert. MORN, Domäne aus Wiederholungen des MORN (*membrane occupation and recognition nexus*)-Motivs; Lin, Linker-Domäne; Dim, Dimerisierungsdomäne; kat, katalytische Domäne mit variablen Insert (gestreift). In der Tabelle sind die Sequenzen und genauen Positionen der vorhergesagten NLS aufgeführt und das Programm angegeben, mit dem die NLS vorhergesagt wurde. cNLSmapper: Kosugi et al., 2009b, NLStradamus: Nguyen Ba et al., 2009; NucPred: Brameier et al., 2007; SeqNLS: Lin et al., 2013.

Um eine Aussage über die Funktionalität der vorhergesagten NLS treffen zu können, wurden die vorhergesagten NLS jeweils in einen Rbcl-mCherry-Reporter kloniert (Abbildung 2.9B) und die RubisCO-mCherry-NLS-Fusionen individuell auf subzelluläre Lokalisierung hin untersucht (Abbildung 2.9B). Zur Quantifizierung wurde der Anteil der Zellen gezählt, in denen der Reporter im Zellkern lokalisiert und dem Anteil der Zellen gegenübergestellt, in denen keine Kernlokalisierung zu beobachten war (Abbildung 2.9C). Als Positivkontrolle diente dabei die NLS aus dem großen T-Antigen des Simian Virus 40 (NLS_{SV40}, Kalderon et al., 1984). Die Fusion mit NLS_{SV40} führt zur vollständigen Kernlokalisierung des Rbcl-mCherry-Reporterkonstrukts (Abbildung 2.9B). Als Negativkontrolle diente die Aminosäuresequenz EGRGAGA, welche bereits als Linker-Sequenz für ein EYFP-ER-Reporterkonstrukt beschrieben wurde (McCartney et al., 2004) und keine Kernlokalisierung vermitteln sollte. Die Negativkontrolle Rbcl-mCherry-EGRGAGA-mCherry zeigte vor allem cytosolische Lokalisierung und nur eine sehr schwache Kernlokalisierung. Die bioinformatisch vorhergesagten NLS I (₂₅KLCKRRGDEEKTEE₃₈), NLS II (₁₀₇GEWKRGKASGKGKFSW₁₂₂), NLS III (₁₅₈DRKQGHGQKRY₁₆₈) und NLS V (₃₂₆KDGFQRFRKNPCCFSGEAKKPGETISKGHKKYDL₂₉₅) fusioniert mit dem RubisCO-Reporter zeigten keine oder nur in sehr wenigen Zellen (0 bis 18 %) Kernlokalisierung. Hingegen führte die Fusion von NLS IV (₂₆₉ATKRSSVDSGAGSLTGEKIFPRICIW₂₉₅) und NLS VI (₆₆₅MPARAERMARR₆₇₅) mit dem RubisCO-Reporter

zu einer deutlichen Kernlokalisierung (Abbildung 2.9B). Etwa bei 82 % bzw. 72 % der beobachteten Zellen zeigten RubisCO-mCherry-NLS IV-mCherry und RubisCO-NLS VI-mCherry neben der cytosolischen Fluoreszenz auch im Kern mCherry-Fluoreszenz, und somit Kernlokalisierung (Abbildung 2.9B). Weder RubisCO-mCherry-NLS IV-mCherry noch RubisCO-NLS VI-mCherry zeigten, wie die Positivkontrolle RubisCO-mCherry-NLS_{SV40}-mCherry, ausschließlich Kernlokalisierung.

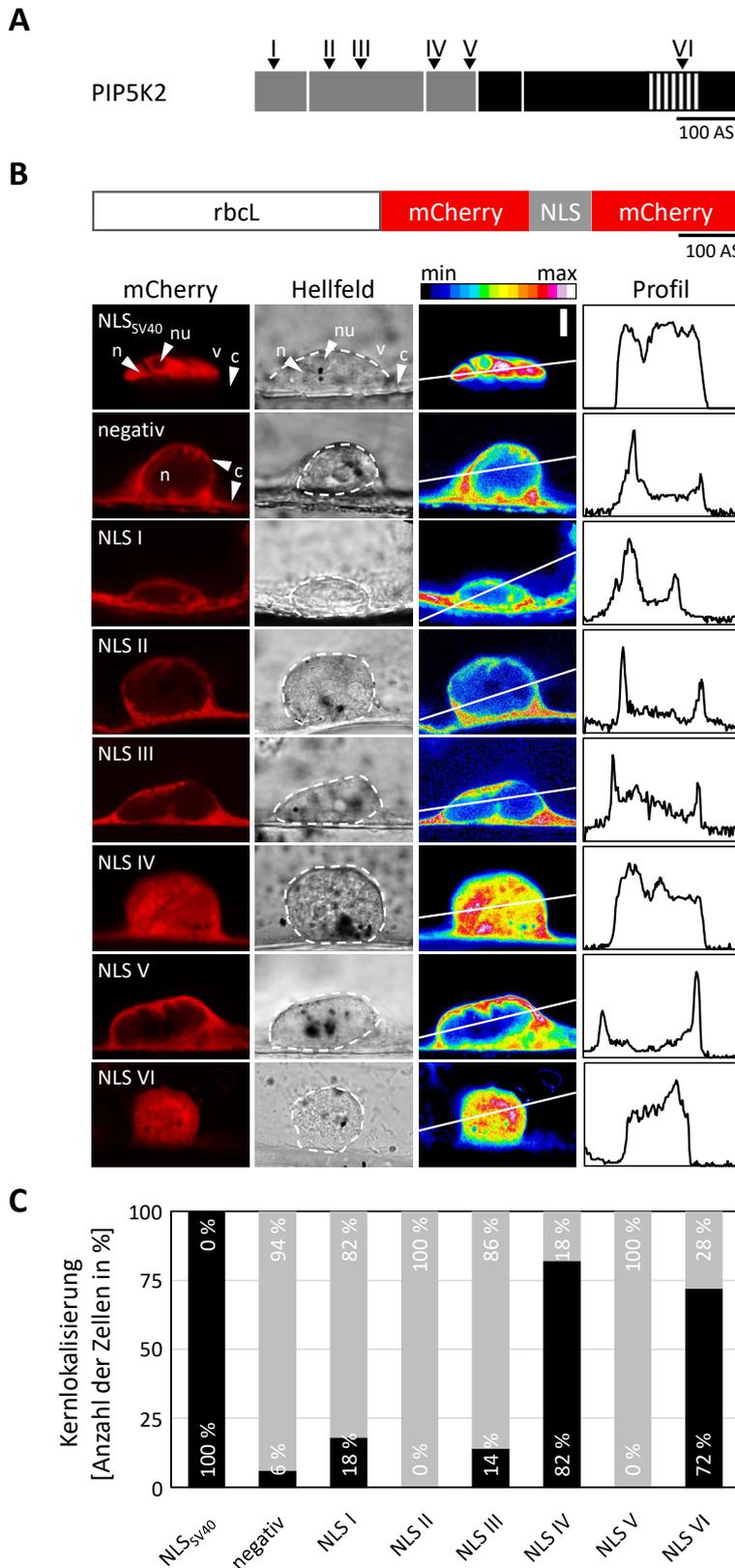


Abbildung 2.9 Identifizierung funktionaler NLS in PIP5K2. In PIP5K2 wurden sechs NLS bioinformatisch vorhergesagt. **(A)** Die Position der vorhergesagten NLS ist von I bis VI nummeriert und durch Pfeile in der Domänenstruktur von PIP5K2 markiert. **(B)** Die putativen NLS (NLS I bis NLS VI) wurden individuell in ein RbcL-mCherry-Reporterkonstrukt fusioniert und transient in Zwiebelepidermiszellen exprimiert. Als Positivkontrolle diente NLS_{SV40}, als Negativkontrolle EGRGAGA. c, Cytosol; v, Vakuole; n, Zellkern; nu, Nucleolus. Die mCherry-Fluoreszenz und das Hellfeldbild wurde mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie detektiert. Die gestrichelte weiße Linie hebt die Umrisse des Zellkerns hervor. Die Darstellung der Fluoreszenzintensitäten durch Falschfarbendarstellung (3. Spalte) und Fluoreszenzintensitätsprofile (4. Spalte) wurde mit Hilfe von Fiji erstellt. Der Maßstab entspricht 10 μ m, die Experimente wurden zwei- bis fünfmal mit insgesamt 16 bis 32 individuell transformierten Zellen je Konstrukt durchgeführt. c, Cytosol; v, Vakuole; n, Zellkern; nu, Nucleolus. **(C)** Übersichtsdiagramm zur Häufigkeit der Kernlokalisierung: Kernlokalisierung, schwarz; keine Kernlokalisierung, grau.

Um funktionale Aminosäuren in den identifizierten NLS IV und NLS VI einzugrenzen, wurden die putativ funktionalen Aminosäuren Arginin und Lysin gegen Alanin ausgetauscht und die so substituierte NLS individuell auf ihre Fähigkeit überprüft weiterhin Kernlokalisierung des RubisCO-Cargos zu vermitteln (Abbildung 2.10). Nach Alaninsubstitution von R271, K272, R273 in NLS IV (NLS IV_{AAA}:₂₆₉ATAAASSVDSGAGSLTGEKIFPRICIW₂₉₅) lokalisierte der RbcL-mCherry-Reporter nicht mehr im Zellkern (Abbildung 2.10B und C). Eine Substitution der vier Arginine R668, R671, R674, R675 in NLS VI (NLS VI_{AAAA}:₆₆₅MPAAAEAMAAA₆₇₅) reduziert den Anteil der Zellen in den das Reporterkonstrukt im Zellkern lokalisierte auf 10 % (Abbildung 2.10B und C).

Zwei der sechs vorhergesagten NLS in PIP5K2 konnten als NLS identifiziert und deren Funktionalität durch die Substitution wichtiger Aminosäuren reduziert werden. Beide NLS befinden sich in variablen Domänen der PI4P 5-Kinasen. NLS IV liegt in der variablen Linkerdomäne von PIP5K2. Bereits vorhandene biochemische Daten geben Hinweise darauf, dass die Linkerdomäne verantwortlich für isoformspezifische Protein-Protein-Interaktionen ist (Stenzel et al., 2012; Heilmann, 2016a).

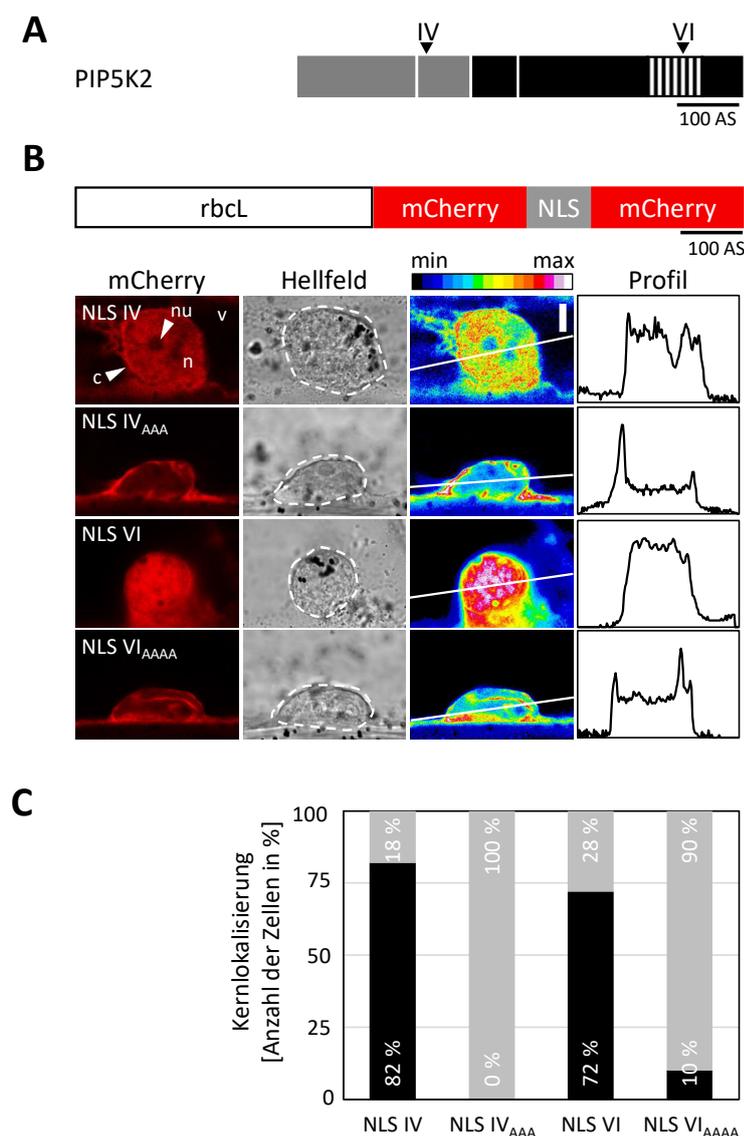


Abbildung 2.10 **Charakterisierung funktionaler NLS in PIP5K2.** Zur Charakterisierung der funktionalen NLS wurden potentiell wichtige Aminosäuren zu Alanin substituiert. **(A)** Die Position der funktionalen NLS IV und NLS VI ist durch Pfeile in der schematischen Domänenstruktur von PIP5K2 markiert. **(B)** Die RbcL-mCherry-Fusionskonstrukte bestehend entweder aus NLS IV oder NLS VI bzw. den Alanin-Substitutionsvarianten NLS IV_{AAA} und NLS VI_{AAAA} wurden transient in Zwiebelepidermiszellen exprimiert und mikroskopisch untersucht. Die mCherry-Fluoreszenz und das Hellfeldbild wurde mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie detektiert. Die gestrichelte weiße Linie hebt die Umrisse des Zellkerns hervor. Die Darstellung der Fluoreszenzintensitäten durch Falschfarbendarstellung (3. Spalte) und Fluoreszenzintensitätsprofile (4. Spalte) wurde mit Hilfe von Fiji erstellt. Der Maßstab entspricht 10 μ m, die Experimente wurden zwei- bis fünfmal mit insgesamt 16 bis 32 individuell transformierten Zellen je Konstrukt durchgeführt. c, Cytosol; v, Vakuole; n, Zellkern; nu, Nucleolus. **(C)** Übersichtsdiagramm zur Häufigkeit der Kernlokalisierung: Kernlokalisierung, schwarz; keine Kernlokalisierung, grau.

Der Sequenzvergleich aller elf PI4P 5-Kinase-Isoformen aus Arabidopsis zeigte, dass NLS IV nur in PIP5K1 und PIP5K2 konserviert ist, nicht aber in den anderen Isoformen von Arabidopsis (Abbildung 7.2A im Anhang). Hingegen ist NLS VI aus PIP5K2 mit leichten Abweichungen sowohl in PIP5K1 als auch in den Isoformen PIP5K4, PIP5K5 und PIP5K6 aus Arabidopsis zu finden (Abbildung 7.2A im Anhang). NLS IV und NLS VI sind in PIP5K2-Orthologen anderer höherer Pflanzenspezies konserviert (Abbildung 7.2B und 7.3B, Anhang). Auch PIP5K2 aus Selaginella und Physcomitrella besitzen konservierte Aminosäuren von NLS VI. NLS VI liegt nicht den N-terminalen Domänen von PIP5K2, die den Kerntransport vermitteln (Abbildung 2.7). Zusätzlich konnte die Alaninsubstitution, welche die Funktionalität von NLS VI im RbcL-mCherry-Reporter aufhebt (Abbildung 2.10), nicht in die PIP5K2-Proteinsequenz eingebracht werden. Daher konzentrieren sich die weiteren Analysen auf die Charakterisierung von NLS IV.

2.7 Die Substitution wichtiger Aminosäuren in NLS IV reduziert die Kernlokalisierung von PIP5K2

Die Substitution von NLS IV zu NLSIV_{AAA} führte dazu, dass das RubisCO-Reporterkonstrukt nicht mehr in den Zellkern von Zwiebelepidermiszellen transportiert wurde (vgl. Abbildung 2.10). Um herauszufinden in wie weit NLS IV an der Lokalisierung von PIP5K2 beteiligt ist, wurden die basischen Aminosäuren (R271, K272, R273) von NLS IV auch im Volllängenprotein PIP5K2 zu Alaninen substituiert. Die subzelluläre Lokalisierung des daraus resultierenden PIP5K2_{AAA}-EYFP-Proteins wurde transient in Zwiebelepidermiszellen untersucht (Abschnitt 5.21). Zur Kontrolle wurde PIP5K2-EYFP exprimiert. PIP5K2-EYFP lokalisierte wie bereits beschrieben sowohl im Cytosol als auch im Zellkern, jedoch nicht im Nucleolus (Abbildung 2.11A). Als weitere Kontrolle dienten PIP5K2 fusioniert an NLS_{SV40} bzw. an die starke Kernexportsequenz (NES) des humanen cAMP-abhängigen Proteinkinase-Inhibitors (NES_{PKI α} , Hauer et al., 1999). PIP5K2-NLS_{SV40}-EYFP lokalisierte nicht im Cytosol, sondern ausschließlich im Zellkern und im Gegensatz zu PIP5K2-EYFP lokalisierte PIP5K2-NLS_{SV40}-EYFP auch im Nucleolus (Abbildung 2.11B). Die Fusion von NES_{PKI α} an PIP5K2 führte zu einem ständigen Kern-Export des Proteins: PIP5K2-NES_{PKI α} -EYFP lokalisierte hauptsächlich im Cytosol, und zeigte nur eine sehr schwache Fluoreszenz im Zellkern (Abbildung 2.11C). Die ausschließliche Kernlokalisierung von PIP5K2-NLS_{SV40}-EYFP und die fast ausschließlich cytosolische Lokalisation von PIP5K2-NES_{PKI α} -EYFP deutet daraufhin, dass keine kleineren PIP5K2-EYFP- oder EYFP-Fragmente zwischen Zellkern und Cytoplasma diffundieren und PIP5K2-EYFP-Fusionen als intakte Proteine vorliegen.

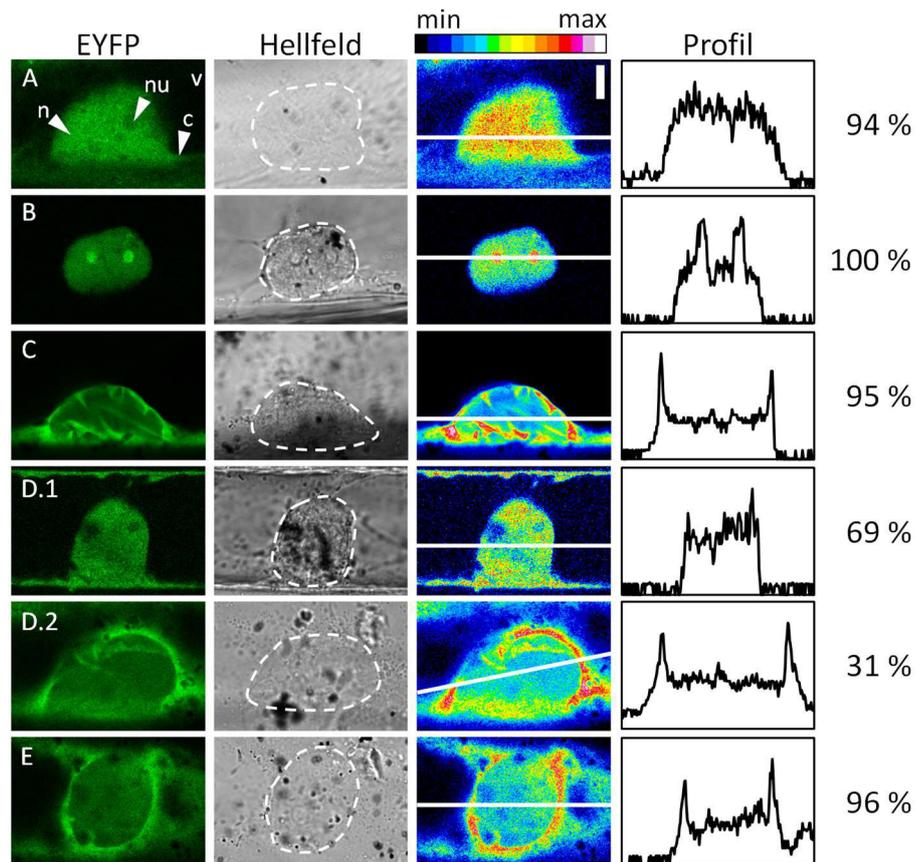


Abbildung 2.11 **Einfluss von Aminosäuresubstitutionen in NLS IV auf die Lokalisierung von PIP5K2-EYFP.** Transiente Expression von PIP5K2-EYFP-Varianten in Zwiebelepidermiszellen. **(A)** PIP5K2-EYFP, **(B)** PIP5K2-NLS_{SV40}-EYFP, **(C)** PIP5K2-NES_{PKI α} -EYFP, **(D.1 und D.2)** PIP5K2_{AAA}-EYFP, **(E)** PIP5K2_{AAA}-NES_{PKI α} -EYFP. Die EYFP-Fluoreszenz und das Hellfeldbild wurden mit konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie aufgenommen. Die gestrichelte weiße Linie hebt die Umrisse des Zellkerns hervor. Die Darstellung der Fluoreszenzintensitäten durch Falsch-farbendarstellung (3. Spalte) und Fluoreszenzintensitätsprofile (4. Spalte) wurde mit Hilfe von Fiji erstellt. Der Maßstab entspricht 10 μ m. Für wieviel Prozent der Zellen die gezeigte Lokalisierung repräsentativ ist, ist rechts in Prozent angegeben. Die Experimente wurden ein- bis fünfmal mit insgesamt 10 bis 36 individuell transformierten Zellen je Konstrukt wiederholt.

Die Aminosäureaustauschvariante PIP5K2_{AAA}-EYFP lokalisiert in 69 % der transformierten Zellen im Zellkern; in 31 % der transformierten Zellen war eine reduzierte Kernlokalisation zu beobachten (Abbildung 2.11D.1 und D.2). Somit führte der Aminosäureaustausch in NLS IV teilweise zum Ausschluss von PIP5K2 aus dem Zellkern, aber nicht zur vollständigen Reduktion der Kernlokalisation. Die zusätzliche Fusion von NES_{PKI α} an PIP5K2_{AAA} führt zu keiner weiteren Reduktion der noch vorhandenen Kernlokalisation in Vergleich zu PIP5K2-NES_{PKI α} -Fusion (Abbildung 2.11E). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kernlokalisation von PIP5K2 durch Fusion an NES_{PKI α} und durch Substitution wichtiger Aminosäuren in NLS IV reduziert werden konnte.

Um zu kontrollieren, dass die Aminosäuresubstitutionen in PIP5K2_{AAA} nicht zu einem vollständigen Funktionsverlust von PIP5K2 führten, wurden die PI4P 5-Kinaseaktivität der Substitutionsvariante PIP5K2_{AAA} mit der von Wildtyp-PIP5K2 verglichen. Die Aminosäureaustauschvariante PIP5K2_{AAA} wurde wie PIP5K2 als MBP-Fusion rekombinant in *E. coli* exprimiert und angereichert (129 kDa, Abschnitt 5.15

und Abbildung 2.12A). Zur Messung der PI4P 5-Kinaseaktivität wurden gleiche Mengen MBP-PIP5K2 bzw. MBP-PIP5K2_{AAA} mit PtdIns(4)P und γ [³³P]-ATP inkubiert und die Menge des gebildeten [³³P]-PtdIns(4,5)P₂ gemessen (Abschnitt 5.16).

Die PI4P 5-Kinaseaktivität von PIP5K2_{AAA} ist im Vergleich zu PIP5K2 nicht verringert (Abbildung 2.12B), sondern zeigt eine tendenziell erhöhte PI4P 5-Kinaseaktivität. Die Substitutionsvariante ist demnach nicht katalytisch inaktiv und kann für weitere Experimente eingesetzt werden.

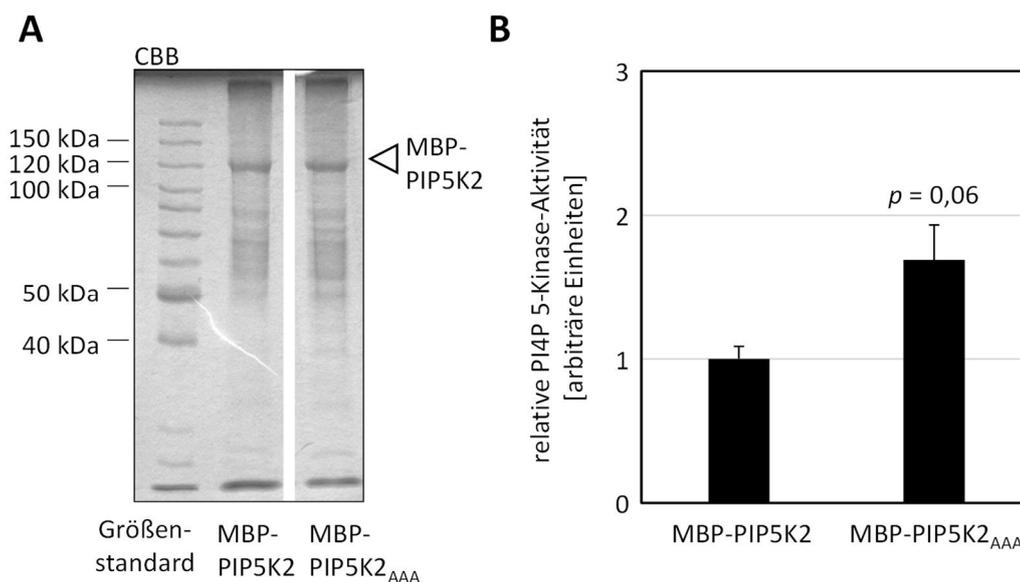


Abbildung 2.12 **PI4P 5-Kinaseaktivität von PIP5K2 und PIP5K2_{AAA}**. **(A)** MBP-PIP5K2 und MBP-PIP5K2_{AAA} wurde heterolog in *E. coli* exprimiert und angereichert. 15 μ g Protein der Elutionsfraktionen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie (CBB) angefärbt. Proteingrößen wurden mit einem Protein-Größenstandard abgeschätzt. weißes Dreieck, MBP-PIP5K2_{AAA}: 129 kDa. **(B)** Die PI4P 5-Kinaseaktivität gleicher Mengen MBP-PIP5K2 und MBP-PIP5K2_{AAA} wurde durch den Einbau von [³³P]-Phosphat in PtdIns(4)P gemessen. Das radioaktiv-markierte PtdIns(4,5)P₂ wurde mittels Phosphorimager detektiert. Die gemessene Aktivität wurde auf die Aktivität von PIP5K2 normalisiert. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung aus zwei bis drei unabhängigen Experimenten mit je drei technischen Replikaten. Die statistische Analyse wurde mit einem ungepaarten, zweiseitigen t-Test durchgeführt.

2.8 Studien zur Komplementation der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante mit PIP5K2-Varianten, die reduziert im Zellkern lokalisieren

Zur Analyse potentieller nukleärer Funktionen von PIP5K2 wurden Komplementationsstudien mit PIP5K2-Varianten durchgeführt, die reduziert im Zellkern lokalisieren. Wenn PIP5K2 nukleäre Funktionen besitzt, ist anzunehmen, dass diese PIP5K2-Varianten den starken Phänotyp der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante nicht in gleichem Ausmaß komplementieren können wie das Wildtyp-PIP5K2-Enzym. Eventuelle Unterschiede können Hinweise auf kernlokalisierte Funktionen liefern. Die *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante (Abbildung 2.13, Ischebeck et al., 2013) zeigt einen starken Zwergwuchs. Die Wurzeln von *pip5k1 pip5k2* sind deutlich kürzer als die des Wildtyps. Die Blätter sind deutlich kleiner und zeigen starke Anthocyaneinlagerung. Die Initiation der reproduktiven Phase ist verzögert und *pip5k1 pip5k2* zeigt eine reduzierte Apikaldominanz, welche zur Ausbildung übermäßig vieler Infloreszenzen führt. Die Blütenentwicklung bricht im Knospenstadium ab und resultiert in der Sterilität der Blüten (Abbildung 2.13, Ischebeck et al., 2013).

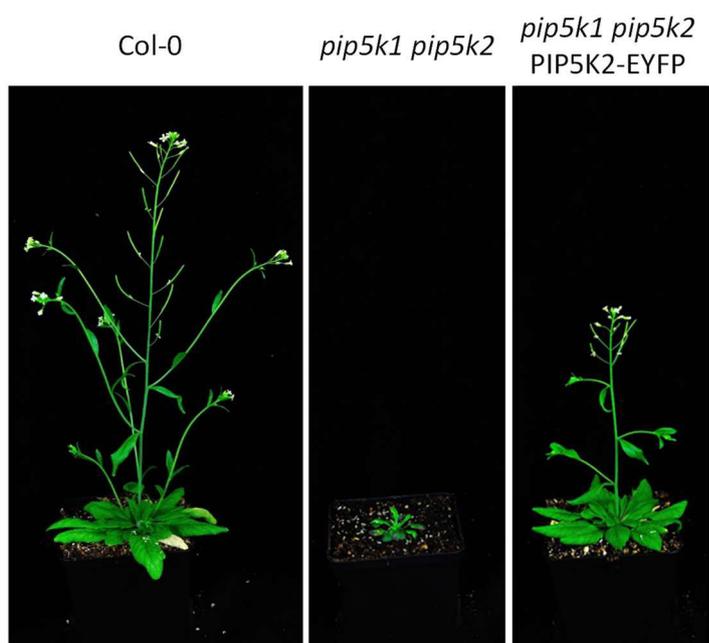


Abbildung 2.13 **PIP5K2-EYFP unter der Kontrolle des endogenen Promotors komplementiert die *pip5k1 pip5k2* Doppelmutante.** Gezeigt sind Aufnahmen sechs Wochen alter Pflanzen. Von links nach rechts: Wildtyp Col-0, *pip5k1 pip5k2* und *pip5k1 pip5k2* transformiert mit einer Expressionskassette für PIP5K2-EYFP unter Kontrolle des endogenen PIP5K2-Promotors. (nach Ischebeck et al., 2013).

Wird PIP5K2-EYFP unter endogenem Promotor (*pPIP5K2*) in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante exprimiert, komplementiert das den *pip5k1 pip5k2*-Phänotyp insoweit, dass der *pip5k1*-Phänotyp erreicht wird (Abbildung 2.13; Ischebeck et al., 2013). Die mit PIP5K2-EYFP transformierte *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante zeigte nur leichte Wachstumsverzögerung im Vergleich zum Wildtyp, Wuchsform und Fertilität sind wieder hergestellt (Abbildung 2.13, nach Ischebeck et al., 2013).

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Komplementationsstudien wurden EYFP (Kontrolle), PIP5K2_{AAA}-EYFP und PIP5K2-NES_{PK1α}-EYFP in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante unter Kontrolle des endogenen PIP5K2-Promotors exprimiert. Die Pflanzentransformation erfolgte über die Blütentauchmethode (Clough & Bent, 1998; Abschnitt 5.11.11). Aufgrund der Sterilität der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante wurden Pflanzen transformiert, die heterozygot für *PIP5K1* waren (*PIP5K1 pip5k1 pip5k2 pip5k2*). Positiv

transformierte *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutanten wurden über die eingebrachte Herbizidresistenz selektiert (Abschnitt 5.11.12) und genotypisiert. Dabei wurden die Pflanzen sowohl auf das Vorhandensein des Transgens als auch auf den Doppelmutanten-Hintergrund untersucht. Die Genotypisierung der selektierten Pflanzen erfolgte mit Hilfe spezifischer Primerkombinationen und ist im Anhang in Abbildung 7.4 dargestellt.

In transformierten Pflanzen mit dem richtigen genetischen Hintergrund der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante (Abschnitt 5.11.1 und 5.11.11) wurde zunächst die subzelluläre Lokalisierung von PIP5K2_{AAA}-EYFP, bzw. PIP5K2-NES_{PKI α} -EYFP untersucht. Wie bereits von Ischebeck et al. (2013) beschrieben, zeigen weder die mit Wildtyp PIP5K2-EYFP komplementierten *pip5k1 pip5k2*-Pflanzen noch die mit einer EYFP-Kontrolle transformierten *pip5k1 pip5k2*-Pflanzen mikroskopisch detektierbare Fluoreszenz (Abbildung 2.14). Lokalisierungsstudien sind dadurch in diesen Pflanzen nicht möglich. Im Gegensatz dazu konnte in den in dieser Arbeit erstellten *pip5k1 pip5k2*-Pflanzen die Fluoreszenz der eingebrachten PIP5K2-Varianten in Wurzelzellen deutlich detektiert werden (Abbildung 2.14). Sowohl PIP5K2-NES_{PKI α} -EYFP als auch PIP5K2_{AAA}-EYFP lokalisierten in den untersuchten Wurzelzellen an der Plasmamembran (Abbildung 2.14). Eine polare Verteilung wie von Ischebeck et al. (2013) und Tejos et al. (2014) beschrieben, ist vor allem für PIP5K2_{AAA}-EYFP zu beobachten. Während in Zwiebelepidermiszellen, die Kernlokalisierung nach Mutation der endogenen NLS (PIP5K2_{AAA}-EYFP) in 30 % der Zellen reduziert war (Abbildung 2.11), konnte in Arabidopsiswurzelzellen keine Kernlokalisierung für PIP5K2-NES_{PKI α} -EYFP und PIP5K2_{AAA}-EYFP beobachtet werden (Abbildung 2.14).

Um Hinweise auf mögliche Kernfunktionen von PIP5K2 zu erhalten, wurden *pip5k1 pip5k2* PIP5K2-NES_{PKI α} -EYFP und *pip5k1 pip5k2* PIP5K2_{AAA}-EYFP phänotypisch untersucht.

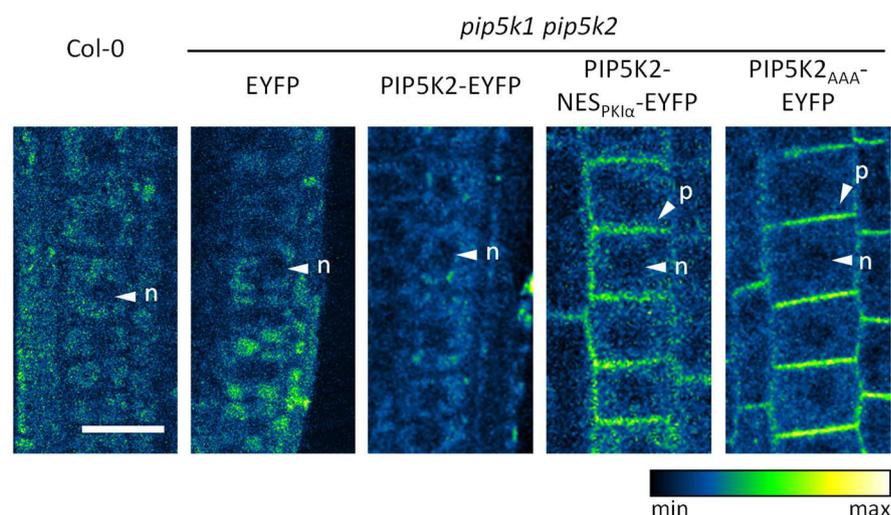


Abbildung 2.14 **Subzelluläre Lokalisierung von PIP5K2-EYFP-Varianten in Wurzelzellen von *pip5k1 pip5k2*.** Die in *pip5k1 pip5k2* eingebrachten Expressionskassetten befinden sich unter Kontrolle des endogenen *PIP5K2*-Promotors. Zur Bewertung der Hintergrundfluoreszenz wurde im Vergleich auch Col-0 untersucht. Die Fluoreszenz wurde mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie detektiert und ist in Falschfarben dargestellt. n = 2 für mind. drei Linien je Komplementation. n, Zellkern; p, Plasmamembran; Maßstab 20 μ m.

2.8.1 Die Expression von *pPIP5K2::PIP5K2-NES_{PK1α}-EYFP* komplementiert die *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante

Für phänotypische Untersuchungen wurden jeweils drei Linien *pip5k1 pip5k2 PIP5K2-NES_{PK1α}-EYFP* neben *pip5k1 pip5k2 PIP5K2-EYFP* und *pip5k1 pip5k2 EYFP*-Pflanzen unter Langtagbedingungen angezogen (Abschnitt 5.8). Die *pip5k1 pip5k2 PIP5K2-NES_{PK1α}-EYFP*-Pflanzen zeigten, bei den gewählten Anzuchtbedingungen keine phänotypischen Unterschiede zu den *pip5k1 pip5k2 PIP5K2-EYFP*-Pflanzen (Abbildung 2.15). Das Wachstum, die Blütenentwicklung und auch der Blühzeitpunkt waren zwischen *PIP5K2-NES_{PK1α}-EYFP* und Wildtyp *PIP5K2-EYFP* exprimierenden *pip5k1 pip5k2*-Pflanzen vergleichbar.

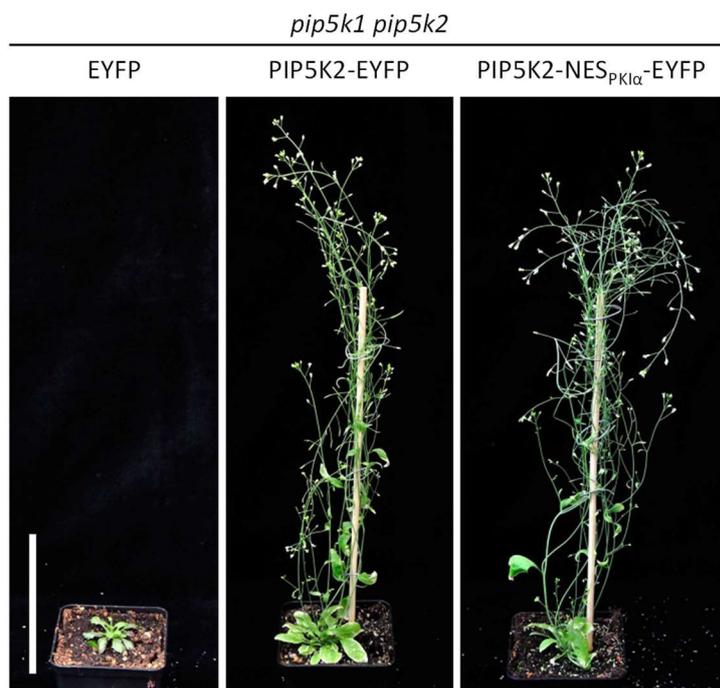


Abbildung 2.15 **Komplementationsstudie mit *PIP5K2-NES_{PK1α}-EYFP* exprimiert in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante.** EYFP, PIP5K2-EYFP bzw. PIP5K2-NES_{PK1α}-EYFP wurden unter Kontrolle des endogenen *PIP5K2*-Promotors in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante exprimiert. Gezeigt sind Aufnahmen acht Wochen alter Pflanzen. Maßstab 10 cm.

2.8.2 Bei Expression von *pPIP5K2::PIP5K2_{AAA}-EYFP* in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante wird der Entwicklungsphänotyp nicht vollständig komplementiert

Zur Untersuchung von Wachstumsphänotypen der in Abschnitt 2.8 beschriebenen *pip5k1 pip5k2 PIP5K2_{AAA}-EYFP*-Pflanzen wurden fünf unabhängige Transformationslinien L1, L7, L15, L23 und L30 ausgewählt. Diese Linien wurden positiv in der Genotypisierung sowohl als *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante als auch auf das Tragen des Transgens *PIP5K2_{AAA}* getestet (Abschnitt 2.8). Zusätzlich wurde auch Linie L14* untersucht, die bei der Genotypisierung positiv auf das Tragen des eingebrachten *PIP5K2_{AAA}*-Konstrukts aber als Einzelmutante für *pip5k2* identifiziert wurde. Diese insgesamt sechs Linien wurden parallel mit *pip5k1 pip5k2 PIP5K2-EYFP* und mit der EYFP-exprimierenden Doppelmutante unter Langtagbedingungen zunächst auf ½ MS-Festmedium steril angezogen (Abschnitt 5.8), um die

Wurzellänge mit der Software Fiji zu bestimmen. Die Wurzellängen sind in Abbildung 2.16A dokumentiert und in Abbildung 2.16B als Boxplots dargestellt. Die Wurzeln der mit *pPIP5K2::EYFP* transformierten Pflanzen waren, wie bei Ischebeck et al. (2013) für *pip5k1 pip5k2* beschrieben, stark verkürzt. Die Expression des EYFPs hatte somit keine Auswirkung auf den Wurzelphänotyp der Doppelmutante. Als eigentliche Kontrolle in diesem Experiment wurden die Doppelmutantenpflanzen komplementiert mit Wildtyp-PIP5K2-EYFP herangezogen. *pPIP5K2::PIP5K2_{AAA}-EYFP*-Pflanzen der Linien L1, L7 und L23 zeigten im Mittel signifikant verkürztes Wurzelwachstum im Vergleich zur Wildtyp-PIP5K2-EYFP-Doppelmutante (Abbildung 2.16A und B). Allerdings war die Ausprägung der verkürzten Wurzellänge bei L1 und L7 nicht homogen. Einzelne Pflanzen der Linien L1 und L7 hatten fast normal lange Wurzeln. Keimlinge der L30 zeigten etwas reduziertes Wurzelwachstum, welches sich aber nicht signifikant von der Wurzellänge der Wildtyp-PIP5K2-EYFP-Doppelmutante unterschied. Wurzeln von L15 zeigten kein Unterschied zu PIP5K2-EYFP-Doppelmutanten. Im Allgemeinen scheint sich die verkürzte Wurzellänge der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante durch Expression von PIP5K2_{AAA}-EYFP nicht in gleichem Maße wiederherzustellen zu lassen, wie durch Expression von PIP5K2-EYFP. Linie L14*, *pip5k2* Einzelmutante, die mit PIP5K2_{AAA}-EYFP transformiert wurde, zeigte signifikant reduziertes Wurzelwachstum im Vergleich zu PIP5K2-EYFP-Doppelmutanten, aber noch signifikant längere Wurzeln als L1, L7 und L23. Neben der Wurzellänge wurde die Meristemgröße beispielhaft für Linie L1 im Vergleich zu den Kontrollpflanzen, die entweder EYFP oder PIP5K2-EYFP exprimierten, untersucht (Abbildung 2.16C). Als gängiges Maß der Meristemgröße gilt die Anzahl meristematischer Cortezellen, wofür die Cortezellen vom ruhenden Zentrum (QC) bis zur ersten Cortezelle, die bereits Streckungswachstum zeigte, gezählt wurden (Schema in Abbildung 2.16C, weißer Pfeil; nach Dello Iorio et al. (2008)). Das Wurzelmeristem der Linie L1 war deutlich größer als bei der EYFP-exprimierenden Doppelmutante, aber es konnten signifikant weniger meristematische Cortezellen gezählt werden, als bei der mit PIP5K2-EYFP transformierten Doppelmutante (Abbildung 2.16C). Das verkürzte Wurzelwachstum korrelierte bei Linie L1 mit der verkürzten Wurzellänge.

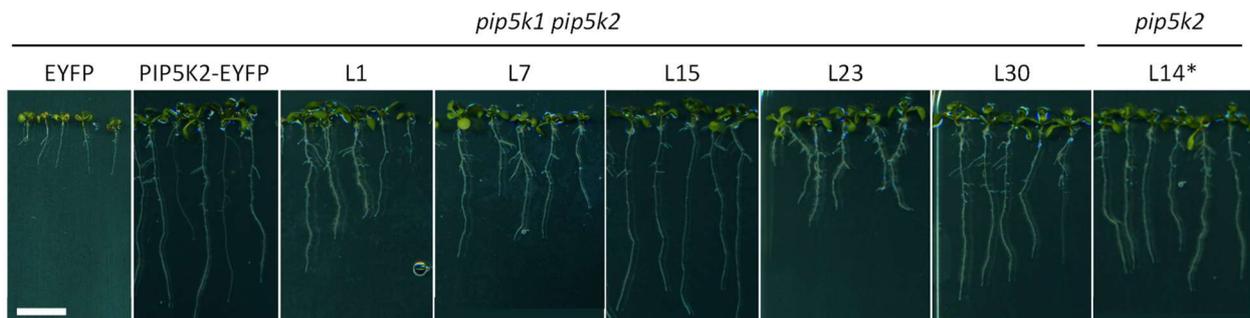
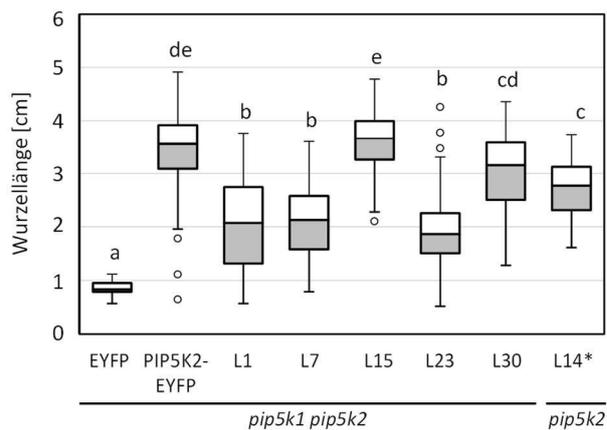
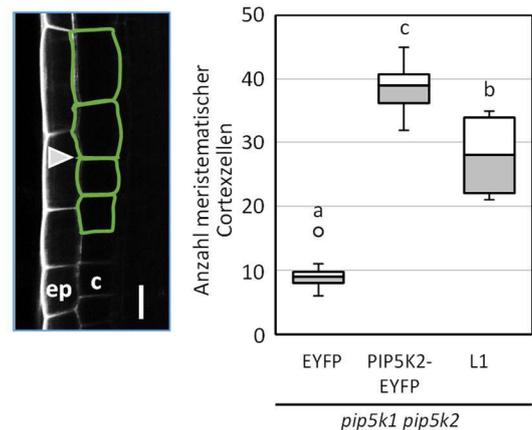
A**B****C**

Abbildung 2.16 **Wurzellänge sieben Tage alter *pip5k1 pip5k2*-PIP5K2^{AAA}-EYFP-Linien.** EYFP, PIP5K2-EYFP oder PIP5K2^{AAA}-EYFP wurden unter Kontrolle des endogenen PIP5K2-Promotors in *pip5k1 pip5k2* exprimiert. Selektierte Pflanzen wurden auf vertikalen ½ MS-Agarplatten unter Langtagbedingungen (16 h Licht) angezogen. **(A)** Dokumentation der Wurzellänge sieben Tage alter Keimlinge. Maßstab 1 cm. **(B)** Grafische Darstellung der Wurzellängen als Boxplot. Mit Hilfe des Programms Fiji wurde die Wurzellänge von 16 EYFP exprimierenden Keimlingen und 65-73 PIP5K2-EYFP oder PIP5K2^{AAA}-EYFP exprimierenden Keimlingen ausgewertet. Zur statistischen Analyse wurde eine zweiseitige ANOVA durchgeführt. Unterschiedliche Buchstaben repräsentieren statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$; Tukey Post-Hoc-Test). Die Abbildung ist repräsentativ für zwei Experimente. **(C)** Die Größe des Wurzelmeristems sechs Tage alter Keimlinge wurde über die Anzahl meristematischer Cortezellen bestimmt. Im Schema ist der Übergang (weißer Pfeil) von meristematischen Cortezellen zu differenzierten Cortezellen gezeigt. Zur Veranschaulichung ist die Zellwand dieser Zellen grün markiert. ep, Epidermis; c, Cortex; Maßstab 20 μ m. Ausgewertet wurde die Zellzahl von 10 Keimlingen je Linie. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe eines generalisierten linearen Modells mit angenommener Poisson-Verteilung beschrieben und mit einer zweiseitigen ANOVA auf Unterschiede überprüft. Unterschiedliche Buchstaben repräsentieren statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$; Tukey Post-Hoc-Test). Die zugrundeliegenden Daten der Abbildungsteile B und C sind im Anhang in Abbildung 7.5 gezeigt. L14*, Linie 14 besitzt Genotyp *pip5k2* PIP5K2^{AAA}-EYFP.

Um mögliche phänotypische Unterschiede über den gesamten Lebenszyklus der Arabidopsispflanzen zu dokumentieren, wurden jeweils 14 Pflanzen jeder *pip5k1 pip5k2* PIP5K2^{AAA}-EYFP-Linie (L1, L7, L15, L23, L30, L14*) zusammen mit der EYFP, bzw. der Wildform PIP5K2-EYFP exprimierenden Doppelmutante auf Erde ausgebracht und unter Langtagbedingungen angezogen (Abschnitt 5.8). In Abbildung 2.17 sind phänotypische Stellvertreter jeder der untersuchten Linien dargestellt. Wie oben bereits beschrieben, waren insbesondere Pflanzen der Linien L1 und L7 im Durchschnitt kleiner als die mit PIP5K2-EYFP komplementierte Doppelmutante (Abbildung 2.17). Die Ausprägung des Phänotyps war bei sechs Wochen alten Pflanzen noch stärker zu beobachten.

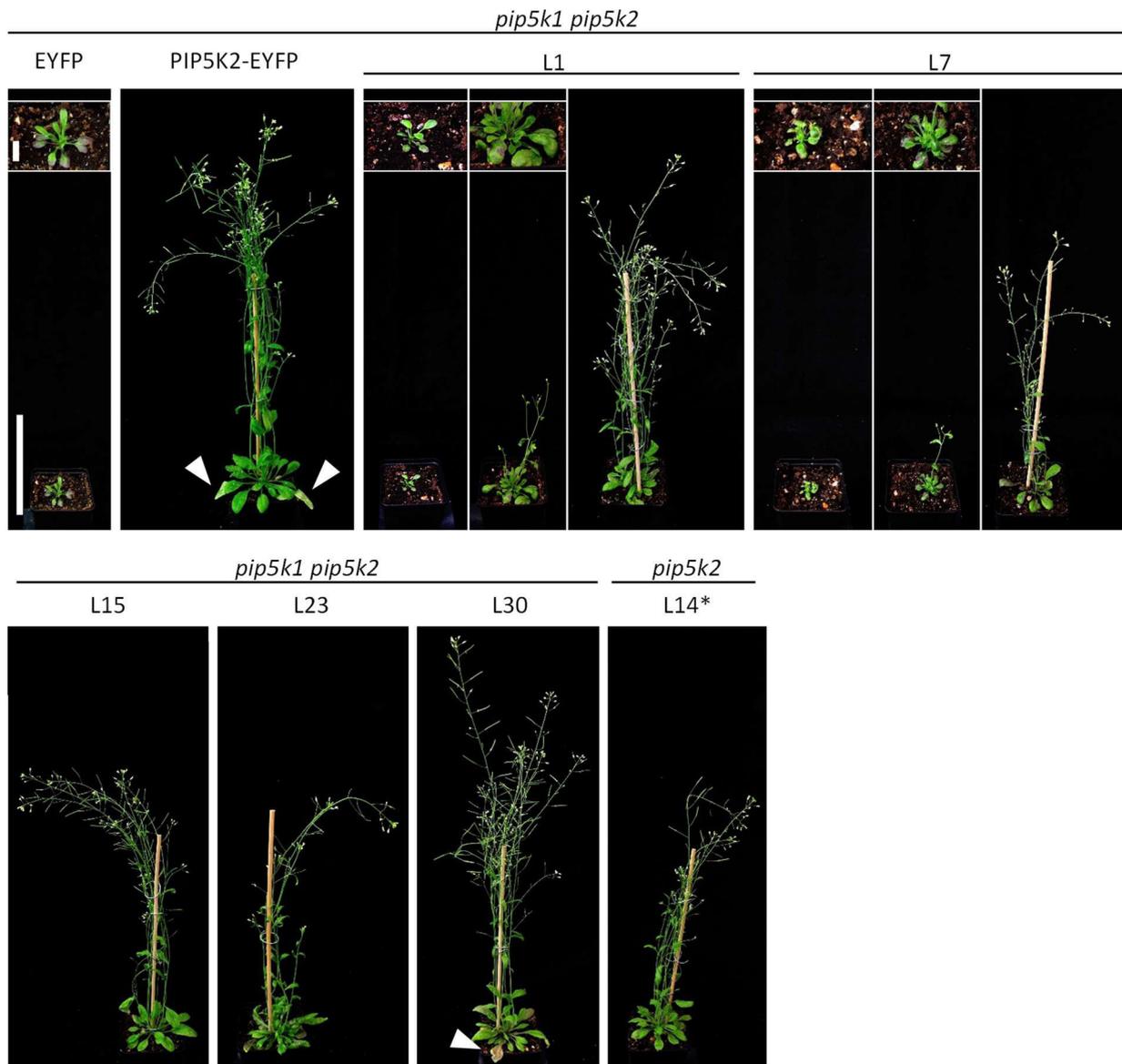


Abbildung 2.17 **Wachstumsphänotyp sechs Wochen alter *pip5k1 pip5k2* PIP5K2_{AAA}-EYFP Pflanzen.** EYFP, PIP5K2-EYFP bzw. PIP5K2_{AAA}-EYFP wurden unter Kontrolle des endogenen *PIP5K2*-Promotors in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante exprimiert. Gezeigt sind Aufnahmen sechs Wochen alter Pflanzen. Die gezeigten Pflanzen sind repräsentativ für 14 Pflanzen je Linie. Weiße Pfeile, bereits senescente Blätter; L14*, Linie 14 besitzt Genotyp *pip5k2* PIP5K2_{AAA}-EYFP. Maßstab 10 cm, in der Vergrößerung 1 cm.

Von 14 untersuchten Individuen der Linie L1 (*pip5k1 pip5k2* PIP5K2_{AAA}-EYFP) zeigten vier Pflanzen Zwergwuchs ähnlich der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante (starker Phänotyp), sechs Pflanzen wiesen eine intermediäre Wuchsform zwischen *pip5k1 pip5k2* EYFP und *pip5k1 pip5k2* PIP5K2-EYFP auf (Abbildung 2.17). Diese Pflanzen bildeten Infloreszenzen, deren Blüten nicht immer fertil waren (intermediärer Phänotyp). Weitere vier Pflanzen der Linie L1 zeigten ähnliches Wachstum wie die mit PIP5K2-EYFP-komplementierte *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante (schwacher Phänotyp). Ähnliches war bei Pflanzen der Linie L7 zu beobachten (Abbildung 2.17). Bei sieben Pflanzen der Linie L7 konnte ein starker Wachstumsphänotyp, also Zwergwuchs, beobachtet werden, bei vier Pflanzen wurde der beschriebene intermediäre Phänotyp beobachtet, d.h. diese Pflanzen wurden etwas größer als die *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante, bildeten wenige Infloreszenzen aus, welche nur zum Teil fertil waren. Drei Pflanzen der

Linie L7 zeigten einen eher schwachen Wachstumsphänotyp, bildeten aber Infloreszenzen, die vor allem fertile Blüten hervorbrachten. Diese drei Pflanzen der Linie L7 mit schwachem Phänotyp blieben insgesamt jedoch kleiner als die mit Wildtyp PIP5K2-EYFP komplementierte *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante. Aufgrund der starken Diversität im Phänotyp der Linien L1 und L7 sind im Anhang in Abbildung 7.6 alle 14 Pflanzen gezeigt. Pflanzen der Linien L15 und L30 zeigten bei Wachstum und Infloreszenzbildung keinen auffälligen Phänotyp im Vergleich zu *pip5k1 pip5k2* PIP5K2-EYFP-Pflanzen. Pflanzen der Linie L23 zeigten einen schwachen Wachstumsphänotyp und blieben etwas kleiner als die mit Wildtyp-PIP5K2-EYFP transformierten Doppelmutanten (Abbildung 2.17 und Abbildung 7.6 im Anhang). Pflanzen der Linie L23 zeigten reduziertes Wachstum und weniger Infloreszenz als die komplementierte PIP5K2-EYFP-Doppelmutante. Die Blüten der Linie L23 waren jedoch überwiegend fertil und bildeten Schoten. Der Phänotyp von L23 wurde deshalb als schwacher Wachstumsphänotyp bewertet (Abbildung 2.17). Pflanzen der L14*, *pip5k2*, welche PIP5K2_{AAA}-EYFP exprimiert, zeigen nur ein leicht reduziertes Höhenwachstum und die Expression von PIP5K2_{AAA}-EYFP in *pip5k2* hat keinen offensichtlichen Einfluss auf die Blütenentwicklung.

Insgesamt zeigten die Pflanzen der Linien L1, L7 und L23 eine verzögerte Entwicklung. Zum Zeitpunkt der Dokumentation (sechs Wochen unter Langtagbedingungen) waren bei den Kontrollpflanzen der Linie *pip5k1 pip5k2* PIP5K2-EYFP und den sich wie die Kontrolle entwickelnden Pflanzen der Linie L30 bereits senescente Blätter zu detektieren (Abbildung 2.17, weiße Pfeile), die bei den Pflanzen der Linien L1, L7 und L23 frühestens nach acht Wochen auftraten. Weitere phänotypische Untersuchungen, wie Blattgröße, Blattform, Entwicklung der Infloreszenzen, Blühzeitpunkt, Blütenmorphologie, Schotenbildung und Samenertrag der PIP5K2_{AAA}-EYFP exprimierenden *pip5k1 pip5k2* Linien werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

Neben dem teilweise immernoch stark ausgeprägten Wachstumsphänotyps der PIP5K2_{AAA}-EYFP exprimierenden *pip5k1 pip5k2*-Linien wurden blattmorphologische Veränderungen bei allen untersuchten PIP5K2_{AAA}-EYFP exprimierenden *pip5k1 pip5k2*-Linien festgestellt (Abbildung 2.18). Die Blätter der PIP5K2_{AAA}-EYFP exprimierenden Linien L1, L7 und L23 zeigten vor allem an den Blattunterseiten starke Anthocyaneinlagerungen, wodurch die Blätter rot-grün gefleckt aussahen (Abbildung 2.18). Die Anthocyanakkumulation in Blättern ist auch bei der Doppelmutante bereits beschrieben worden (Abbildung 2.18; Ischebeck et al., 2013). Bei allen Linien, außer bei Linie 15, waren die Blätter z.T. sehr asymmetrisch, an den Blatträndern eingekerbt oder wellig (Abbildung 2.18). Die Blätter der Linien L1 und L7 waren zusätzlich durchweg kleiner als die der mit PIP5K2-EYFP-komplementierten Doppelmutante und teilweise waren sie so klein wie die Blätter der Doppelmutante (Abbildung 2.18). Blätter der Linie L15 und L14* (*pip5k2* PIP5K2_{AAA}-EYFP) waren etwas kleiner als Blätter der PIP5K2-EYFP exprimierenden Doppelmutanten (Abbildung 2.18).

Zur genaueren Analyse des Blühzeitpunkts wurde der Blühzeitpunkt als der Tag bestimmt, an dem die primäre Infloreszenz einer Pflanze eine Höhe von 1 cm hatte (adaptiert von Knowles et al., 2014). Dabei wurden alle Pflanzen die bis zu einem Alter von 45 Tagen keine Infloreszenz ausbildeten, als Tag 45 gezählt (Abbildung 2.19). Wie bereits beschrieben, konnte bei keiner der mit EYFP transformierten *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutanten Infloreszenz bzw. Blütenentwicklung beobachtet werden (Ischebeck et al., 2013; Tejos et al., 2014). Die komplementierte Kontrolle *pip5k1 pip5k2* PIP5K2-EYFP blühte im Durchschnitt nach 29 Tagen (Abbildung 2.19).

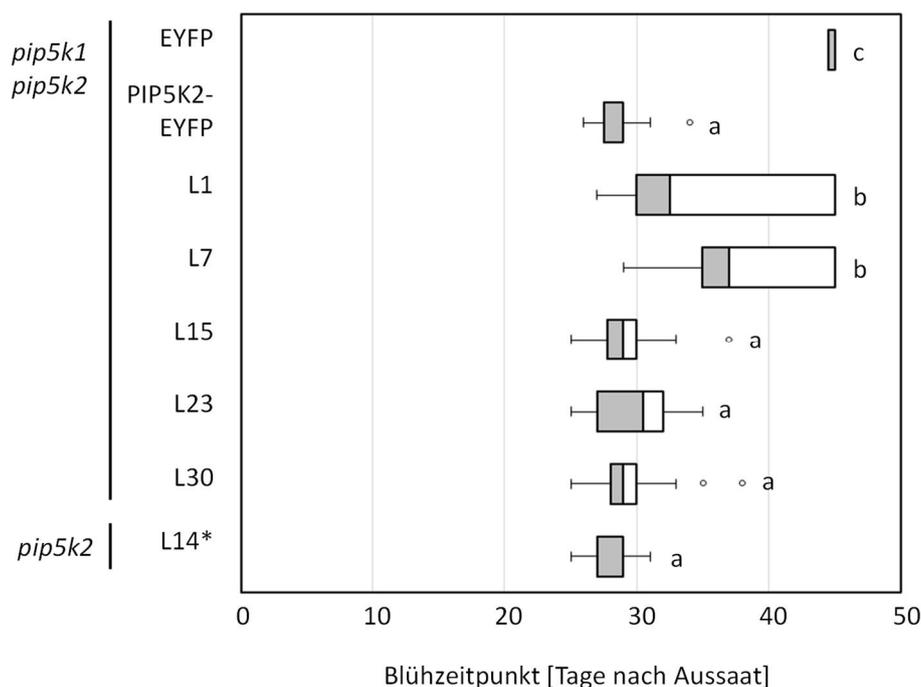


Abbildung 2.19 **Blühzeitpunkt bei PIP5K2_{AAA}-EYFP-Expression in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante.** EYFP, PIP5K2-EYFP bzw. PIP5K2_{AAA}-EYFP wurden unter Kontrolle des endogenen *PIP5K2*-Promotors in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante exprimiert. Der Blühzeitpunkt entspricht dem Tag nach Aussaat, an dem der Haupttrieb eine Höhe von 1 cm hatte. Pflanzen, die an Tag 45 oder später erst Infloreszenzen ausbildeten, wurden als Tag 45 gezählt. Insgesamt wurden 18 Pflanzen je Linie untersucht. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe eines generalisierten linearen Modells mit angenommener Poisson-Verteilung beschrieben und mit einer zweiseitigen ANOVA verglichen. Unterschiedliche Buchstaben repräsentieren statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$; Tukey Post-Hoc-Test). L14*, *pip5k2* PIP5K2_{AAA}-EYFP.

Die Expression von PIP5K2_{AAA}-EYFP in *pip5k1 pip5k2* kann die starke Verzögerung des Blühzeitpunkts der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante nur zum Teil aufheben. Bei Pflanzen der Linien L15, L23 und L30 entsprach der Beginn der Infloreszenzentwicklung dem der mit Wildtyp PIP5K2-EYFP komplementierten Doppelmutante. Der Blühzeitpunkt der Linien L1 und L7 war gegenüber der PIP5K2-EYFP komplementierten Doppelmutante deutlich verzögert. Im Mittel blühten die Pflanzen der Linien L1 und L7 nach 35 bzw. 39 Tagen, wobei vier Pflanzen der Linie L1 und sieben Pflanzen der Linie L7 wie die Doppelmutante bis zum Zeitpunkt 45 Tage nach Keimung keine Infloreszenzen bildeten (Abbildung 2.20). Die starke Entwicklungsverzögerung der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante konnte nur teilweise durch Expression von PIP5K2_{AAA}-EYFP komplementiert werden. Bei L14*, *pip5k2* PIP5K2_{AAA}-EYFP, entsprach der Blühzeitpunkt dem der mit Wildtyp PIP5K2-EYFP komplementierten Doppelmutante.

Zur Beschreibung von Blütenbildung, Schotenentwicklung und Phyllotaxis der mit PIP5K2_{AAA}-EYFP transformierten Doppelmutante wurden Primärfloreszenzen sechs Wochen alter Pflanzen untersucht (Abbildung 2.20 bis Abbildung 2.22). Da *pip5k1 pip5k2* EYFP wie oben bereits beschrieben keine Infloreszenzen ausbildete, wurde diese Pflanzenlinie bei den im Folgenden beschriebenen Versuchen nicht untersucht. Für die *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante wurde bereits beschrieben, dass sich nach sehr stark verzögerter Infloreszenzentwicklung (>45 Tage) nur einige wenige Blütenknospen bilden, die steril sind (Ischebeck et al., 2013). Die mit PIP5K2-EYFP komplementierte Doppelmutante bildete typische Kreuzblütler-Blüten, wie auch für den Wildtyp Col-0 beschrieben, mit vier Blütenblättern, sechs Staubblättern und zwei verwachsenen Fruchtblättern (Stempel) (Abbildung 2.20A und E). Die Blüten der mit PIP5K2_{AAA}-EYFP transformierten Doppelmutante hingegen wiesen z.T. starke Unregelmäßigkeiten auf. Zu beobachten waren Blüten bei denen die Kronenblätter, Staubblätter und Fruchtblätter fehlten, oder aber bei denen mehr als vier Kronenblätter und/oder zwei statt eines Stempels ausgebildet waren (Abbildung 2.20F-H). Die lockeren rispenartigen Blütenstände waren bei den PIP5K2_{AAA}-EYFP exprimierenden Linien asymmetrisch, wohingegen die mit PIP5K2-EYFP komplementierte Doppelmutante normale symmetrische Blütenrispen zeigten (Abbildung 2.20B-D). Viele Schoten der mit PIP5K2_{AAA}-EYFP transformierten Doppelmutante waren dünner und kürzer als die der komplementierten Doppelmutante und z.T. gekrümmt (Abbildung 2.20I-L). Diese Phänotypen waren besonders in L1, L7 und L23 zu beobachten, während sie in den Linien L15, L30 selten und *pip5k2* PIP5K2_{AAA}-EYFP nur sehr vereinzelt auftraten .

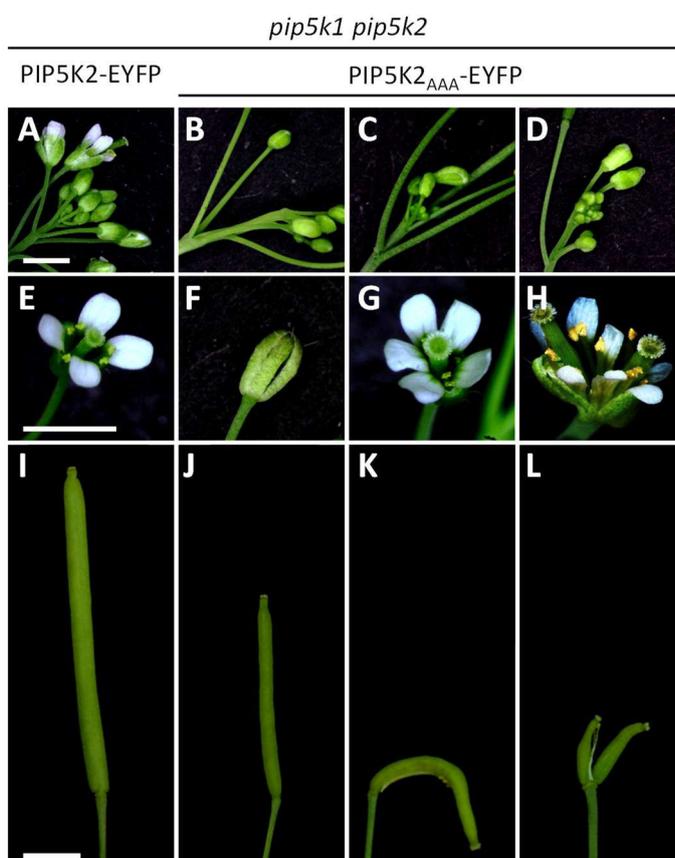
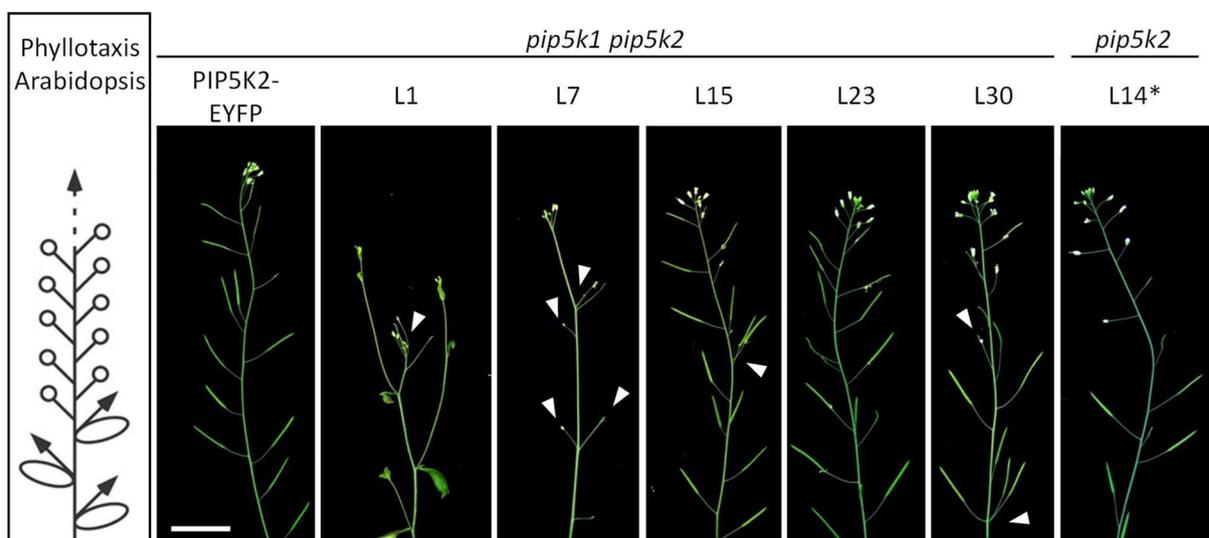


Abbildung 2.20 **Vereinzelte blütenmorphologische Auffälligkeiten bei PIP5K2_{AAA}-EYFP-Expression in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante.** PIP5K2-EYFP (A, E, I) bzw. PIP5K2_{AAA}-EYFP (B-D, F-H, J-L) unter Kontrolle des endogenen *PIP5K2*-Promotors in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante exprimiert. Gezeigt sind Detailaufnahmen sechs Wochen alter Pflanzen. EYFP-exprimierende Pflanzen zeigten zu diesem Zeitpunkt noch keinen Blütenstand. Dargestellt sind (A-D) der Blütenstand der Hauptinfloreszenz. (E-H) individuelle Blüten und (I-L) einzelne Schoten. Die Phänotypen sind in allen PIP5K2_{AAA}-EYFP-exprimierenden Linien jedoch nicht in jeder Pflanze und nicht an jeder Organanlage zu beobachten. Maßstab 2 mm.

Wie schon in Abbildung 2.20B-D dargestellt und beschrieben, zeigten die Blütenstände der PIP5K2_{AAA}-EYFP exprimierenden Doppelmutante starke Asymmetrien. Bei der Betrachtung der Infloreszenzen wurde deutlich, dass die entwickelnden Schoten nicht wie normalerweise in wechselständiger Anordnung, sondern asymmetrisch, ungleichmäßig an der Infloreszenz vorlagen (Abbildung 2.21). Auch bei der Kontrolle *pip5k1 pip5k2* PIP5K2-EYFP konnte eine leichte Unregelmäßigkeit der Schotenanordnung beobachtet werden (Abbildung 2.21A). Dies könnte darauf hindeuten, dass möglicherweise die *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante durch die Expression von PIP5K2 alleine nicht vollständig komplementiert wurde, und hier eine isoformspezifische Funktion von PIP5K1 fehlt. Der asymmetrische Phänotyp ist vor allem in Linie 1 und Linie 7 ausgeprägt, jedoch auch in Linie 15, Linie 23 und Linie 30 zu beobachten gewesen (Abbildung 2.21). Zusätzlich zeigte sich bei fast allen untersuchten Linien ektopische Blüten- und dadurch Schotenbildung (Abbildung 2.21, mit Pfeil markiert).

A



B

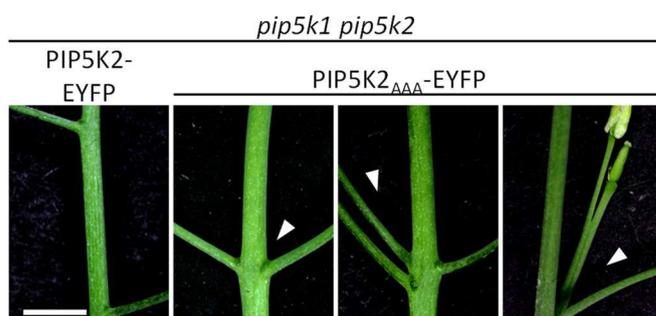


Abbildung 2.21 **Phyllotaxis bei PIP5K2_{AAA}-EYFP-Expression in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante.** EYFP, PIP5K2-EYFP bzw. PIP5K2_{AAA}-EYFP wurden unter Kontrolle des endogenen *PIP5K2*-Promotors in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante exprimiert. EYFP-exprimierende Pflanzen hatten zu diesem Zeitpunkt noch nicht geschossen und sind deswegen nicht gezeigt. **(A)** Aufnahmen des Haupttriebs sechs Wochen alter Pflanzen im Vergleich zu einer schematischen Darstellung der Arabidopsis-Phyllotaxis aus Reeves et al. (2002). Weiße Pfeile, ektopische Organbildung. L14* besitzt den Genotyp *pip5k2* PIP5K2_{AAA}-EYFP. Maßstab 2 cm. **(B)** Repräsentative Detailaufnahmen von Blütenstielen an Nodien unterschiedlicher Haupttriebe. Maßstab 2 mm.

Zur Quantifizierung der Blüten- und Schotenentwicklung wurde die Anzahl der gebildeten Schoten aller Linien im Alter von sieben Wochen alter Pflanzen untersucht (Abbildung 2.22A). Für diese Quantifizierung wurden bei den Linien L1 und L7 jeweils vierzehn Pflanzen und bei den Linien L15, L23, L30 und die Kontrollen jeweils zwei Pflanzen berücksichtigt. Die Gesamtmenge der gebildeten Schoten war bei *pip5k1 pip5k2* PIP5K2_{AAA}-EYFP Linie L1, L7, L15 und L23 geringer als bei der mit PIP5K2-EYFP komplementierten Doppelmutante (Kontrolle). Dabei zeigte L1 ausgesprochen große Unterschiede bei der Schotenzahl pro untersuchter Pflanze und L7 bildet fast keine Schoten (Abbildung 2.22A). Die Anzahl der Schoten von Pflanzen der Linie L30 und Linie L14*, *pip5k2* Einzelmutante, die mit PIP5K2_{AAA}-EYFP transformiert wurde, war vergleichbar mit der der komplementierten Doppelmutante (Abbildung 2.22A). Die Schotenbildung der untersuchten Linien konnten in drei Kategorien eingeteilt werden: Schoten der Kategorie 1 waren dick und gefüllt. Waren die Schoten dünner, war auch die Schotenlänge deutlich kürzer als Schoten von *pip5k1 pip5k2* PIP5K2-EYFP und wurden als Kategorie 2 eingestuft. Die dritte Kategorie bildeten sterile Blüten, die keine Schoten bildeten. Die Verteilung der Schoten-Phänotypen ist in Abbildung 2.22B und C gezeigt. Wie die Kontrollpflanzen *pip5k1 pip5k2* PIP5K2-EYFP bildeten Pflanzen der Linien L15 und L30 überwiegend normale Schoten aus (>85 %), nur ein geringer Anteil der Schoten war dünner und kürzer (6 und 13 %). Die Schoten der Linien L1, L7 und L23 gehörten hauptsächlich der zweiten Kategorie an (51 % bei L1, 70 % und 72 % bei L7 und L23) und waren dünner und daher auch deutlich kürzer als die Schoten der mit PIP5K2-EYFP komplementierten Doppelmutante. Bei den Linien L1, L7 und L23 wurden häufig statt einer Schote nur Überreste von Blüten, die steril waren (Kategorie 3) gezählt. Bei Linie L7 waren 18 % aller Blüten steril und bildeten keine Schoten. Bei den Linien L1 und L23 waren 2 % der Blüten steril. Diese sterilen Blüten (Kategorie 3) wurde nicht bei der Kontrolle (*pip5k1 pip5k2* komplementiert mit PIP5K2-EYFP) oder bei den Linien L15, L30 und L14* beobachtet. *pip5k2* PIP5K2_{AAA}-EYFP L14* bildete etwas weniger normale Schoten (69 %) und mehr verkürzte, dünne Schoten (31 %) als *pip5k1 pip5k2* PIP5K2-EYFP. Stereomikroskopische Analysen der Schoten zeigten, dass die Schoten, die der Kategorie 2 zugeordnet wurden, also kleiner und dünner waren als normale Schoten der Kategorie 1 weniger sich entwickelnde Samen enthielten (Abbildung 2.22C).

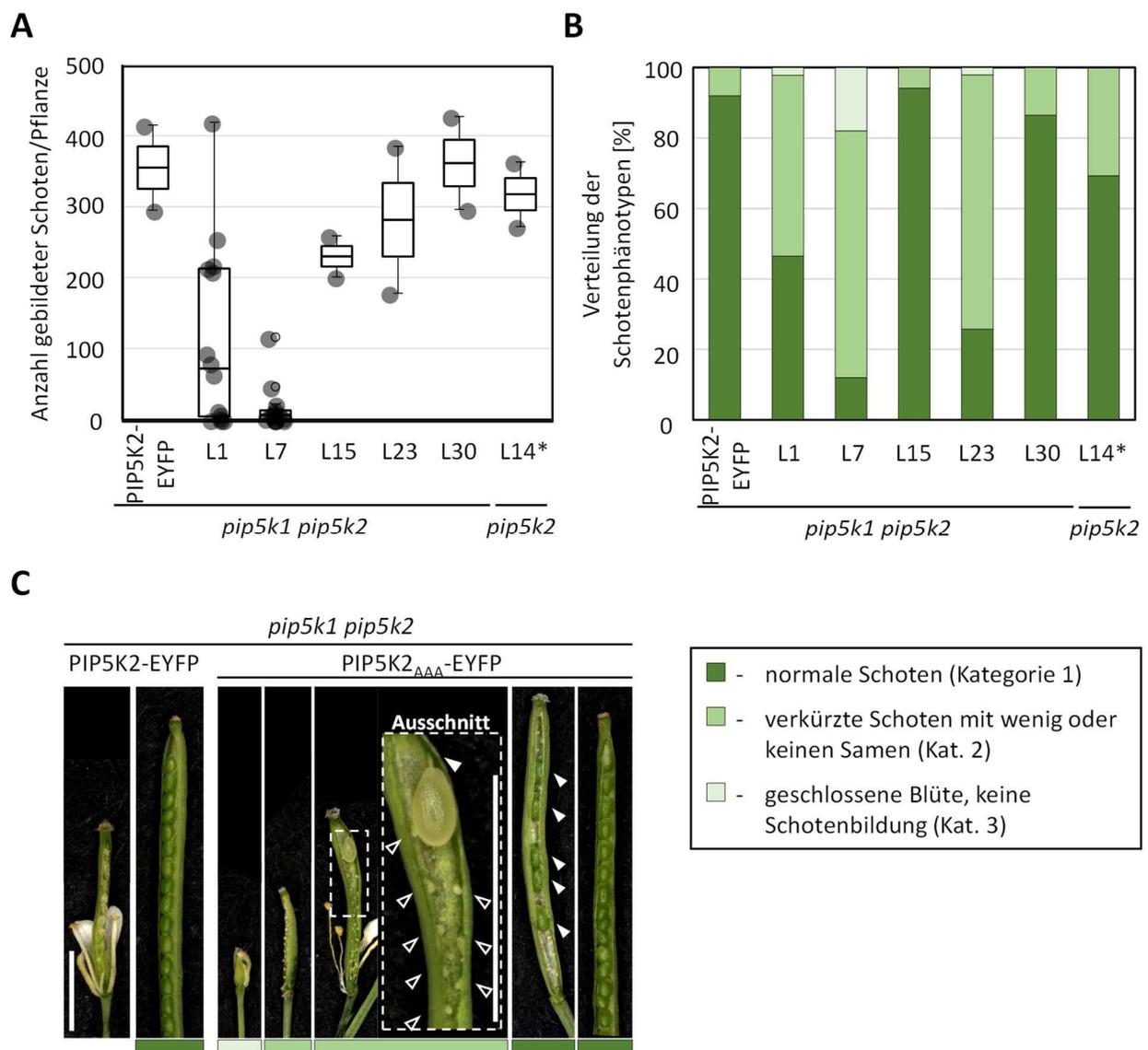


Abbildung 2.22 **Schotenbildung bei PIP5K2_{AAA}-EYFP-Expression in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante.** EYFP, PIP5K2-EYFP bzw. PIP5K2_{AAA}-EYFP wurden unter Kontrolle des endogenen *PIP5K2*-Promotors in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante exprimiert. Untersucht wurden sieben Wochen alte Pflanzen. EYFP-exprimierende Pflanzen hatten zu diesem Zeitpunkt noch keine Blütenstände gebildet und wurden nicht berücksichtigt. Der Anteil unterschiedlicher Schotenphänotypen wurde bei sieben Wochen alten Pflanzen ausgezählt. Dabei wurden jeweils zwei Pflanzen für PIP5K2-EYFP, PIP5K2_{AAA}-EYFP Linie 14*, Linie 15, Linie 23 und Linie 30 ausgezählt. Für Linie L1 und L7 wurden jeweils 14 Pflanzen ausgezählt. Es ist **(A)** die Anzahl der angelegten Blütenstände (blaue Punkte entsprechen der Anzahl einer Pflanze), als auch **(B)** die Verteilung der Schotenphänotypen dargestellt. **(C)** Bilder der stereomikroskopischen Untersuchung zeigen Schotenphänotypen im Detail. Weiße gefüllte Pfeile zeigen gesunde, reifende Embryonen; weiße ungefüllte Pfeile fehlende Embryonen; Maßstab 2 mm. Die Farblgende ist im schwarzen Kasten gezeigt und gilt für B und C. L14* besitzt den Genotyp *pip5k2* PIP5K2_{AAA}-EYFP.

Die Samengröße der reifen Samen war aber bei den verschiedenen untersuchten Linien und der PIP5K2-EYFP-Doppelmutante gleich (Abbildung 2.23A). Die geringere Anzahl von Samen (Embryonen) pro Schote und die insgesamt verringerte Schotenzahl pro Pflanze führte auch zu einem signifikant geringeren Samenertrag bei den Linien L1, L7 und L23 (Abbildung 2.23B). Der Samenertrag der Linien L15 und L30 war vergleichbar mit der Samenmenge der komplementierten Doppelmutante.

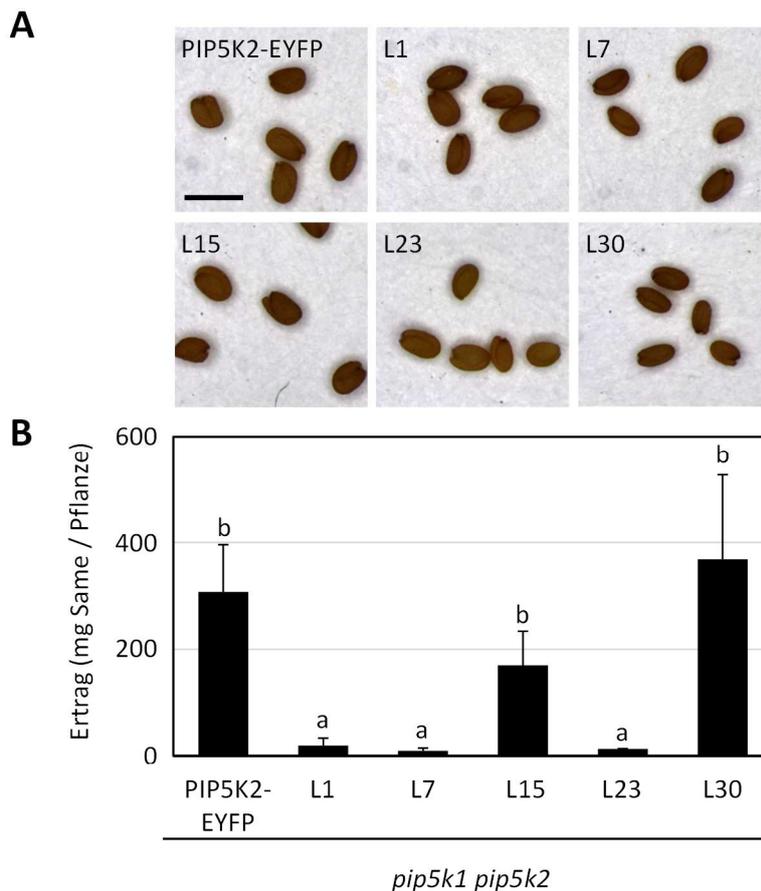


Abbildung 2.23 **Samengröße und Samenertrag bei PIP5K2_{AAA}-EYFP-Expression in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante.** EYFP, PIP5K2-EYFP bzw. PIP5K2_{AAA}-EYFP wurden unter Kontrolle des endogenen PIP5K2-Promotors in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante exprimiert. EYFP-exprimierende Doppelmutanten bildeten keine Samen und wurden nicht berücksichtigt. **(A)** Größenvergleich der Samen. Maßstab 2 mm. **(B)** Samen von zwei bis vier Pflanzen pro Linie wurden geerntet und gewogen. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung. Zur statistischen Analyse wurde eine zweiseitige ANOVA durchgeführt. Unterschiedliche Buchstaben repräsentieren statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$; Tukey Post-Hoc-Test).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Expression der reduziert im Kern lokalisierenden PIP5K2_{AAA}-EYFP in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante deren Phänotyp nicht vollständig komplementieren kann. Die detaillierte phänotypische Untersuchung der *pip5k1 pip5k2* PIP5K2_{AAA}-Linien zeigte, dass die untersuchten Phänotypen nicht in jeder Linie gleich stark ausgeprägt waren: Stärkere Phänotypen zeigten L1 und L7, L23 zeigte einen intermediären Phänotyp und L15 und L30 zeigten nur vereinzelt Auffälligkeiten. Da jedoch alle Phänotypen in vielen Linien auftraten, scheinen die phänotypischen Besonderheiten durch die Expression einer vermutlich nicht mehr kernlokalisierten PIP5K2, also von PIP5K2_{AAA}, verursacht zu werden und nicht durch eine unterschiedliche Beeinflussung des Genoms nach Agrobakterien verursachte Insertion an zufälliger Position. Durch das Mitführen von *pip5k2* PIP5K2_{AAA}-EYFP Linie 14* konnte der Einfluss einer möglichen Fehlfunktion von PIP5K2_{AAA}-EYFP an der Plasmamembran für den jeweiligen Phänotyp eingeschätzt werden. Da der Phänotyp in L14*, *pip5k2* PIP5K2_{AAA}-EYFP, nicht stärker ist, als der von L1, L7 und L23, ist es wahrscheinlich, dass die beobachteten Phänotypen nicht nur auf eine lokal erhöhte PIP5K1- bzw. PIP5K2-Aktivität zurückzuführen ist, sondern auch durch eine Reduktion der PIP5K2-Aktivität im Zellkern zu erklären ist.

Bestimmung der PIP5K2_{AAA}-Transkriptgehalte

Um zu untersuchen, in wieweit die Phänotypausprägung auf unterschiedliche Expressionsgehalte von PIP5K2_{AAA}-EYFP zurückzuführen ist, wurden die Transkriptmengen von *PIP5K2* bzw. *PIP5K2_{AAA}* und zur Kontrolle auch von *PIP5K1* mit Hilfe der *real time* qPCR (Abschnitt 5.10) in der Doppelmutante, der mit PIP5K2-EYFP komplementierten Linie und in den Linien L1, L7, L15, L23 und L30 der mit PIP5K2_{AAA}-EYFP transformierten Doppelmutante bestimmt. Zusätzlich wurde wie oben beschrieben auch L14*, die *pip5k2* Einzelmutante transformiert mit PIP5K2_{AAA}-EYFP untersucht. Die isolierte RNA und daraus resultierende cDNA stammt aus sieben Tage alten Keimlingen der jeweiligen Linien. Die *PIP5K1* und *PIP5K2*-Transkriptgehalte sind in Abbildung 2.24 gezeigt.

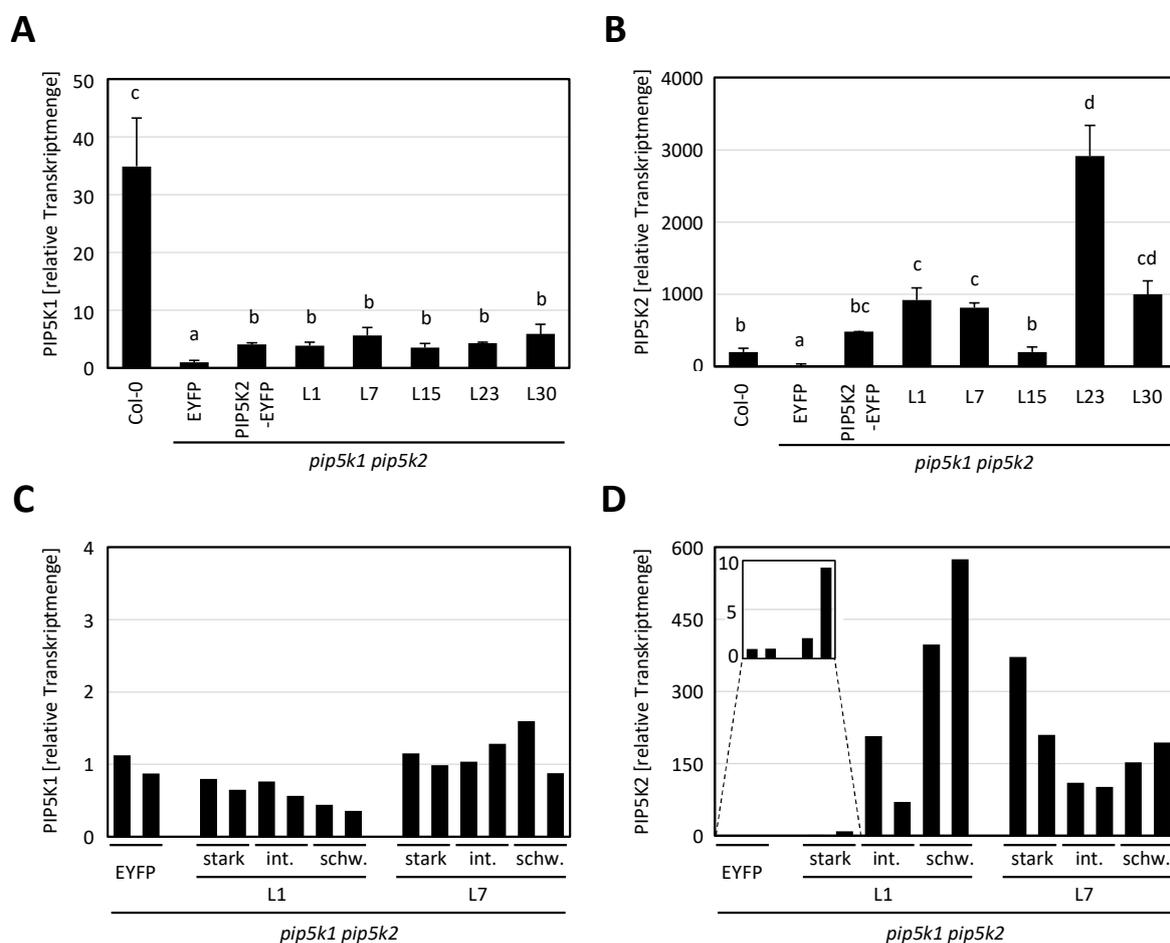


Abbildung 2.24 **PIP5K1-** und **PIP5K2-**Transkriptgehalte von *pip5k1 pip5k2* PIP5K2_{AAA}-EYFP-Pflanzen. EYFP, PIP5K2-EYFP bzw. PIP5K2_{AAA}-EYFP wurden unter Kontrolle des endogenen *PIP5K2*-Promotors in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante exprimiert. **(A)** Der Transkriptgehalt von *PIP5K1* und **(B)** *PIP5K2* sieben Tage alter Keimlinge wurde mittels qPCR bestimmt und sind als Mittelwert mit Standardabweichung gezeigt (n = 3). Zur statistischen Analyse wurde eine zweiseitige ANOVA durchgeführt. Unterschiedliche Buchstaben repräsentieren statistisch signifikante Unterschiede (p<0,05; Tukey Post-Hoc-Test). Für Untersuchungen zur Korrelation von Ausprägung des Phänotyps und PIP5K2-Transkriptgehalts wurde der **(C)** *PIP5K1*- und **(D)** *PIP5K2*-Transkriptgehalt in Blättern einzelner Individuen sechs Wochen alter Pflanzen der Linien L1 und L7 mit unterschiedliche Ausprägung des Phänotyps bestimmt. Beide biologischen Replikate sind nebeneinander gezeigt (int., intermediär; schw., schwach).

Wie schon beschrieben waren die *PIP5K1*-Transkriptgehalte in den Pflanzen mit *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutantenhintergrund deutlich niedriger als in der Col-0 Wildtyp-Kontrolle (Abbildung 2.24A; Ischebeck et al., 2013). Eine leichte aber dennoch signifikante Erhöhung der *PIP5K1*-Transkriptgehalte ist bei Expression von *PIP5K2* oder *PIP5K2_{AAA}* zu beobachten (Abbildung 2.24A). Durch die hohe Sequenzähnlichkeit von *PIP5K1* und *PIP5K2* kann es sein, dass die *PIP5K1*-Primer evtl. auch zu geringen Mengen an *PIP5K2* gebunden haben. Die *PIP5K2*-Transkriptgehalte (Abbildung 2.24B) sind in *pip5k1 pip5k2* EYFP-Keimlingen signifikant niedriger als in der Col-0-Wildtyp-Kontrolle. In allen, entweder mit *PIP5K2-EYFP* oder mit *PIP5K2_{AAA}-EYFP*, transformierten Doppelmutanten konnte *PIP5K2*-Transkript nachgewiesen werden. Insgesamt waren die *PIP5K2*-Transkriptgehalte bei allen untersuchten Linien, außer bei Linie L15, deutlich höher als beim Wildtyp Col-0 (Abbildung 2.24B). Der *PIP5K2*-Transkriptgehalt der Linie L15 war vergleichbar mit dem des Wildtyps (Abbildung 2.24B). Eine Korrelation zwischen *PIP5K2*-Transkriptgehalt und Phänotypausprägung konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 2.24B). Die Linien L1 und L7 zeigten z. T. sehr starke phänotypische Abweichungen von der *PIP5K2-EYFP*-Doppelmutante. Der *PIP5K2*-Transkriptgehalt von L1 und L7 ist aber vergleichbar mit der Linie L30, die am wenigsten phänotypische Abweichungen zur Wildtyp-komplementierten Doppelmutante zeigte. Die Linie L23 lag in den phänotypischen Abweichungen zwischen L1, L7 und L30, zeigte aber die höchsten *PIP5K2*-Transkriptgehalte (Abbildung 2.24B). Um eine mögliche Korrelation zwischen Transkriptgehalt und Phänotyp einzelner Individuen zu untersuchen, wurden die *PIP5K2*-Transkriptgehalte in Blättern sechs Wochen alter Pflanzen der Linien L1 und L7 untersucht (Abbildung 2.24D). Die Phänotypausprägung der Linien L1 und L7 zeigte die größte Varianz, so dass diese Linien als geeignete Kandidaten für eine korrelative Untersuchung ausgewählt wurden. Dazu wurde der Transkriptgehalt von Pflanzen mit starker, intermediärer und schwacher Phänotypausprägung untersucht. Die *PIP5K1*-Transkriptgehalte, die in Abbildung 2.24C dargestellt sind, zeigten für die mit *EYFP* oder mit *PIP5K2_{AAA}-EYFP*, transformierten Doppelmutanten gleich niedrige Transkriptmengen und dienten als Kontrolle für die *PIP5K2*-Transkriptgehaltsmessungen. Die gemessenen *PIP5K2*-Transkriptgehalte in Abbildung 2.24D zeigen, dass auch die *PIP5K2*-Transkriptgehalte adulter Pflanzen nicht mit dem Ausmaß der beobachteten Phänotypen korrelieren.

2.9 Hinweise auf mögliche Funktionen von PIP5K2 im Zellkern

Der Nachweis von PIs und PI4P 5-Kinaseaktivität in Arabidopsis-Zellkernen, die Identifizierung einer funktionalen NLS in PIP5K2 und die Interaktion von PIP5K2 mit α -Importinen bestärkte die Hypothese auf einen aktiven Kernimport und mögliche kernlokalisierte Funktionen von PIP5K2. Hinweise auf den Charakter möglicher Kernfunktionen von PI4P 5-Kinasen ergaben sich durch verbleibende Entwicklungsdefekte der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante nach Expression von PIP5K2_{AAA}-EYFP, einer PIP5K2-Variante deren Kernimport deutlich reduziert ist (Abschnitt 2.8.2). Bisher nicht publizierte Experimente von Dr. Till Ischebeck zeigten zudem, dass die Zellteilungsaktivität im Wurzelmeristem der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp stark reduziert zu sein scheint (Abbildung 2.2). In tierischen Zellen erhöht sich die Synthese von PtdIns(4,5)P₂ am Übergang des Zellzyklus von G1- zu S-Phase, während die Gesamtmenge an PtdIns(4,5)P₂ unverändert bleibt (Clarke et al., 2001). In einer weiteren Arbeit wurde gezeigt, dass humanes Retinoblastoma (*HsRb*), der Hauptregulator des G1-/S-Übergangs, mit *HsPIP5K1 α* interagiert und dadurch die Aktivität von *HsPIP5K1 α* *in vitro* und *in vivo* gesteigert wird (Divecha et al., 2002). Hinweise auf eine mögliche Kontrolle des pflanzlichen Zellzyklus durch PI4P 5-Kinasen ergeben sich aus Experimenten, die eine Reduktion der DNA-Synthese und der RBR1-Phosphorylierung durch Überexpression von *HsPIP5K1 α* in Tabakzellkultur beschreiben (Dieck et al., 2012). Wie das humane *HsRb* besitzt das pflanzliche Retinoblastoma-related 1 (RBR1) zentrale Aufgaben in der Zellzykluskontrolle (Ach et al., 1997; Kong et al., 2000; Inzé & De Veylder, 2006). Immer mehr Studien zeigen, dass Arabidopsis-RBR1 dadurch auch in der Balance von Meristemerhaltung und Zelldifferenzierung eine wichtige Rolle spielt (Wildwater et al., 2005; Borghi et al., 2010; Gutzat et al., 2012).

2.10 PIP5K2 interagiert mit dem Zellzyklusregulator Retinoblastoma related 1 (RBR1)

Um zu testen ob PIP5K2 mit RBR1 aus Arabidopsis interagiert, wurden Hefe-Zwei-Studien durchgeführt. Durch die starke Konservierung der Funktion von Retinoblastoma in Eukaryoten, könnte RBR1 auch im genutzten Hefestamm den Zellzyklus beeinflussen, welches wachstumsbasierte Interaktionstests stören würde. Um eine Kernlokalisierung von RBR1 zu vermeiden, wurde RBR1 im Split-Ubiquitin-basierten Hefe-Zwei-Hybrid-System durch eine OST4-Fusion am ER fixiert und als Köder und PIP5K2 als Beute eingesetzt (Abschnitt 5.18.1, Abbildung 2.25). Gleichmäßiges Wachstum bei Selektion ohne Leucin und Tryptophan zeigte, dass die Hefesuspension in gleicher Verdünnung im Interaktionstest eingesetzt wurde. Bei Protein-Protein-Interaktion ist Wachstum auf dem Selektionsmedium -LWHA möglich. Schwaches Wachstum der Negativkontrolle wies auf eine leichte Selbstaktivierung des Köders hin. Das Wachstum bei Kotransformation mit PIP5K2 war deutlich stärker als bei der Negativkontrolle: RBR1 und PIP5K2 scheinen *in vivo* zu interagieren (Abbildung 2.25).

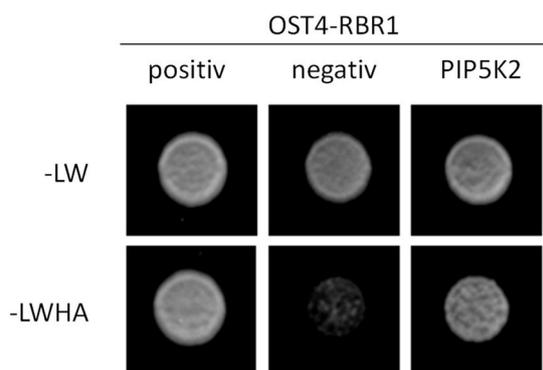


Abbildung 2.25 **Hefe-Zwei-Hybrid-Interaktionstest zwischen RBR1 und PIP5K2.** Das Köderkonstrukt OST4-RBR1 wurde mit Positiv- und Negativkontrolle bzw. PIP5K2 als Beute in den Hefestamm NMY51 kotransformiert. Für den Interaktionstest wurden Hefesuspension auf Hefeselektionsplatten getropft. Das gleichmäßige Wachstum auf der Selektion -LW zeigte, dass gleiche Konzentrationen Hefesuspension im Interaktionstest eingesetzt wurden. Wachstum auf der Selektion -LWHA zeigte die Interaktion der getesteten Proteine. Dokumentiert ist das Wachstum nach zwei Tagen Inkubation bei 30 °C. Das Experiment wurde dreimal mit je fünf individuell transformierten Klonen durchgeführt.

2.10.1 Die Interaktion von PIP5K2 und RBR1 wird über ein LxCxE-Motiv vermittelt

RBR1 bindet unterschiedlichste Proteinpartner über deren LxCxE-Motiv, darunter auch die Proteinkinase S6K1 (Nakagami et al., 1999; Henriques et al., 2010; Cruz-Ramírez et al., 2013). Sequenzanalysen zeigten in der Aminosäuresequenz von PIP5K2 ein LxCxE-Motiv ($_{520}$ VMGNLFCSEYRIQ $_{532}$): Dieses befindet sich in der katalytischen Domäne und wird von den Aminosäuren L524, C526 und E528 gebildet (Abbildung 2.26A). Um zu untersuchen, in wieweit das LxCxE-Motiv von PIP5K2 die Bindung von PIP5K2 an RBR1 vermittelt, wurden die funktionalen Aminosäuren L524, C526 und E528 jeweils zu Alanin substituiert (PIP5K2_{AXAXA}, vgl. Abschnitt 5.14.3). Die Protein-Protein-Interaktion von PIP5K2_{AXAXA} mit RBR1 wurde im Vergleich zur Interaktion von PIP5K2 mit RBR1 mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybridsystem untersucht (Abbildung 2.26B). Wie schon beschrieben konnte deutliches Hefewachstum auf LWH-Selektionsmedium bei Kotransformation von OST4-RBR1 mit PIP5K2 beobachtet werden, hingegen nur sehr schwaches Hefewachstum bei Kotransformation von OST4-RBR1 mit PIP5K2_{AXAXA}. Das Hefewachstum bei Kotransformation von OST4-RBR1 mit PIP5K2_{AXAXA} entsprach dem Wachstum der Negativkontrolle (Abbildung 2.26B). Die starke Abschwächung der Protein-Protein-Interaktion zwischen RBR1 und PIP5K2_{AXAXA}, also bei substituiertem LxCxE-Motiv, erlaubt die Eingrenzung der Interaktion zwischen RBR1 und PIP5K2 auf dieses Motiv.

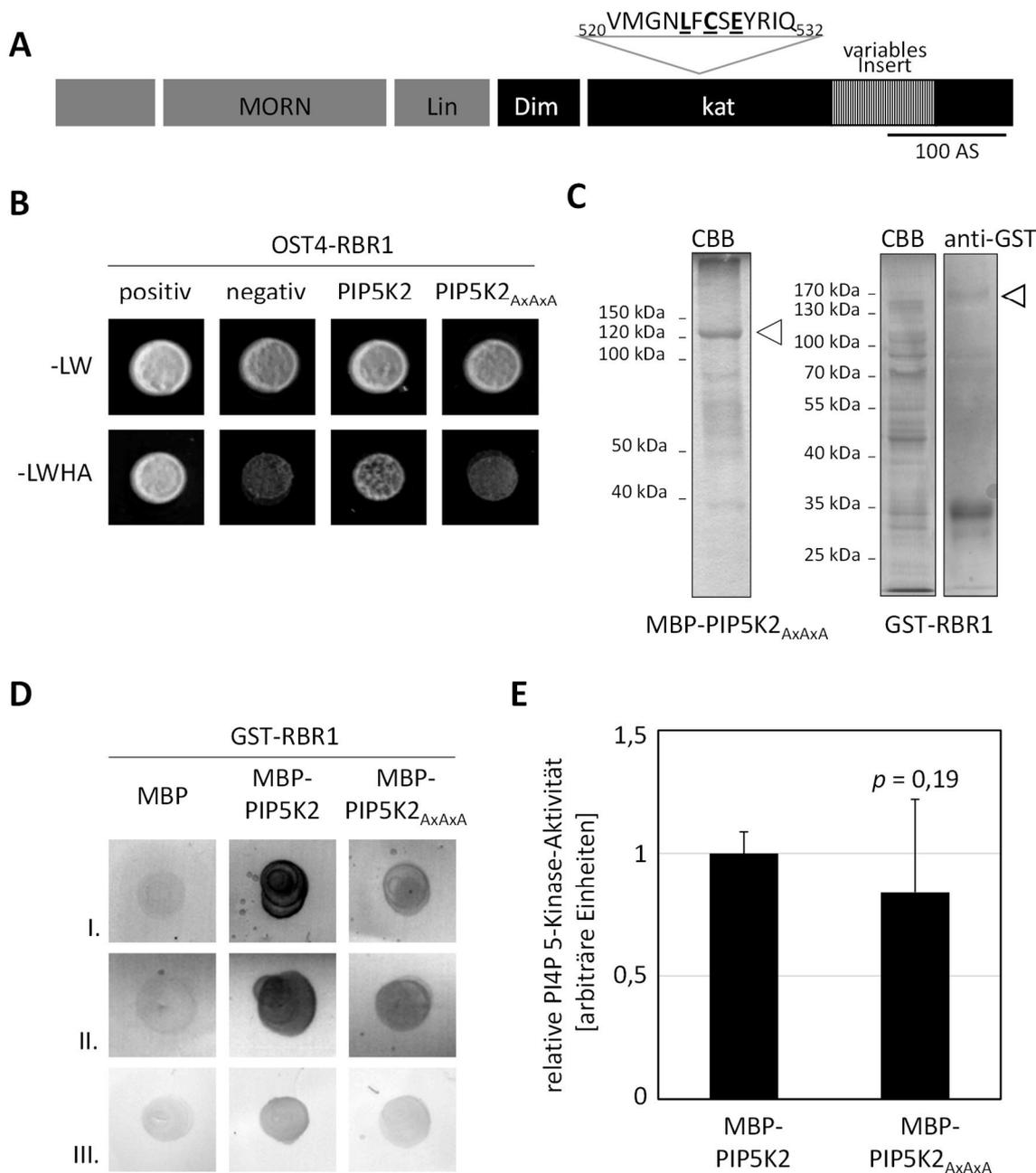


Abbildung 2.26 **PIP5K2 interagiert mit RBR1 über ein LxCxE-Motiv.** (A) PIP5K2 besitzt ein LxCxE-Motiv, welches sich in der katalytischen Domäne befindet. (B) Hefe-Zwei-Hybrid-Interaktionstest zwischen OST4-RBR1 (Köder) und PIP5K2 bzw. PIP5K2_{AxAxA} (Beute) im Hefestamm NMY51. Gleichmäßiges Wachstum auf -LW-Medium verifiziert das Einsetzen gleicher Mengen Hefesuspension. Wachstum auf der Selektion -LWHA zeigt die Interaktion der exprimierten Proteine. Dokumentiert ist das Wachstum nach zwei Tagen Inkubation bei 30 °C. Das Experiment wurde dreimal mit jeweils fünf individuell transformierten Klonen durchgeführt. (C) MBP-PIP5K2_{AxAxA} (angereichert, 129 kDa) und GST-RBR1 (Totalextrakt, 138 kDa) wurden für *in vitro*-Interaktionstests rekombinant in *E.coli* exprimiert. Gezeigt ist die SDS-PAGE mit Coomassie angefärbt (CBB) oder der Westernblot (anti-GST, spezifische Antikörperbindung und Detektion über sek. AP-konjugierten Antikörper). (D) Dotblot zur Interaktion von RBR1 und PIP5K2 bzw. PIP5K2_{AxAxA}. Rekombinant exprimierte und angereichertes MBP, MBP-PIP5K2 und MBP-PIP5K2_{AxAxA} wurde auf eine Nitrocellulose-Membran getropft und mit GST-RBR1-Totalextrakt inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels anti-GST-Antikörper. Gezeigt sind drei Experimente (I. bis III.). (E) Die PI4P 5-Kinaseaktivität wurde durch Inkubation von 1 µg MBP-PIP5K2 bzw. MBP-PIP5K2_{AxAxA} mit γ [³³P]-ATP und PtdIns(4)P gemessen. Das radioaktiv markierte PtdIns(4,5)P₂ wurde mittels Phosphorimager detektiert. Die Daten wurden auf die Aktivität von PIP5K2 normalisiert und zeigen den Mittelwert mit Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten mit je drei technischen Replikaten. Die statistische Analyse wurde mit einem ungepaarten, zweiseitigen t-Test durchgeführt.

Die Interaktion von RBR1 und PIP5K2 und der Einfluss der Substitution des LxCxE-Motivs wurde *in vitro* durch einen Dotblot verifiziert (Abschnitt 5.18.2). Dazu wurde zunächst MBP-PIP5K2_{AXAXA} wie MBP und MBP-PIP5K2 heterolog in *E.coli* exprimiert und angereichert (129 kDa, Abschnitt 5.15.2 und 5.15.6). MBP-PIP5K2_{AXAXA} wird wie MBP-PIP5K2 fast ausschließlich als Volllängenprotein mit wenig Translationsabbruch angereichert (Abbildung 2.26C, vgl. Abbildung 2.12C). GST-RBR1 (138 kDa) wurde nach Harashima & Schnittger (2012) exprimiert und als Totalextrakt eingesetzt (Abschnitt 5.15, Abbildung 2.26C). Angereichertes MBP, MBP-PIP5K2 und MBP-PIP5K2_{AXAXA} wurden in gleichen molaren Mengen auf eine Nitrocellulosemembran getropft, freie Bindestellen in der Membran blockiert und die Membran mit GST-RBR1-Totalextrakt inkubiert. Gebundenes GST-RBR1 wurde über Immunodetektion (Abbildung 2.26D). Die Interaktion von RBR1 mit PIP5K2 wurde bestätigt, die Bindung von RBR1 an PIP5K2_{AXAXA} war deutlich schwächer und stärkte dadurch die Hypothese, dass RBR1 PIP5K2 über deren LxCxE-Motiv bindet. Da PIP5K2_{AXAXA} etwas stärker als die MBP-Kontrolle gebunden wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Proteindomänen oder Motive von PIP5K2 mit RBR1 interagieren. Um die Funktionalität von PIP5K2_{AXAXA} zu testen, wurden MBP-PIP5K2 und MBP-PIP5K2_{AXAXA} in gleichen Proteinmengen im PI4P 5-Kinase-Aktivitätstest eingesetzt (Abschnitt 5.16). Die PI4P 5-Kinaseaktivität wurde über die Menge des gebildeten [³³P]-PtdIns(4,5)P₂ gemessen. Es war keine signifikante Änderung der Aktivität von MBP-PIP5K2_{AXAXA} im Vergleich zu MBP-PIP5K2 festzustellen (Abbildung 2.26E).

Ein Aminosäurevergleich der Arabidopsis PI4P 5-Kinasen (Abbildung 7.7A im Anhang) zeigte, dass nur die Isoformen PIP5K1, PIP5K2, PIP5K3 und PIP5K4 ein LxCxE-Motiv besitzen. Die Isoformen PIP5K5 und PIP5K6 besitzen ein auf LxC verkürztes Motiv. PIP5K7 und PIP5K8 besitzen ein MxCxE-Motiv (Abbildung 7.7A im Anhang). Lei et al. (1999) zeigten für das tierische System, dass die erste Position des LxCxE-Motivs auch nach Austausch mit ähnlichen Aminosäuren noch von Retinoblastoma gebunden wird. Ob tatsächlich auch das MxCxE-Motiv von PIP5K7 und PIP5K8 von RBR1 gebunden wird, müsste in weiteren Experimenten getestet werden. In den Isoformen PIP5K9, PIP5K10 und PIP5K11 ist kein LxCxE-Motiv vorhanden (Abbildung 7.7A im Anhang). Eine isoformspezifische Interaktion von Arabidopsis PI4P 5-Kinasen mit RBR1 ist somit denkbar. Untersuchte PIP5K2-Orthologe anderer höhere Landpflanzen, Selaginella und Physcomitrella besitzen ebenfalls ein (z. T. modifiziertes) LxCxE-Motiv (Abbildung 7.7B im Anhang). PIP5K2-Orthologe aus einzelligen Grünalgen besitzen kein LxCxE-Motiv (Abbildung 7.7B im Anhang). Die Existenz des LxCxE-Motivs in einzelnen Arabidopsis PI4P 5-Kinasen und in PIP5K2-Orthologen höherer Landpflanzen macht eine spezifische Funktionalität wahrscheinlich.

Um zu untersuchen inwieweit es wahrscheinlich ist, dass das LxCxE-Motiv an der Proteinoberfläche liegt und zugänglich für Protein-Protein-Interaktionen ist, wurde die Position des LxCxE-Motivs in einem Strukturmodell von PIP5K2 untersucht. Das Strukturmodell von PIP5K2 basiert auf der Röntgenkristallstruktur von HsPIP4KII β und wurde von Dr. Iris Thondorf erstellt (Abschnitt 5.13).

Da HsPIP4KII β keine N-terminale Domänen besitzt, konnten diese für PIP5K2 nicht modelliert werden. Nach dem jetzigen Modell wäre es möglich, dass sich das LxCxE-Motiv in der Proteinstruktur von PIP5K2

auf der gegenüberliegenden Seite der Öffnung des aktiven Zentrums befindet (Abbildung 2.27B). Dabei wären vor allem die Aminosäuren C526 und E528 des Motivs lösungsmittel exponiert (Abbildung 2.27C) und für die Interaktion mit anderen Proteinen zugänglich.

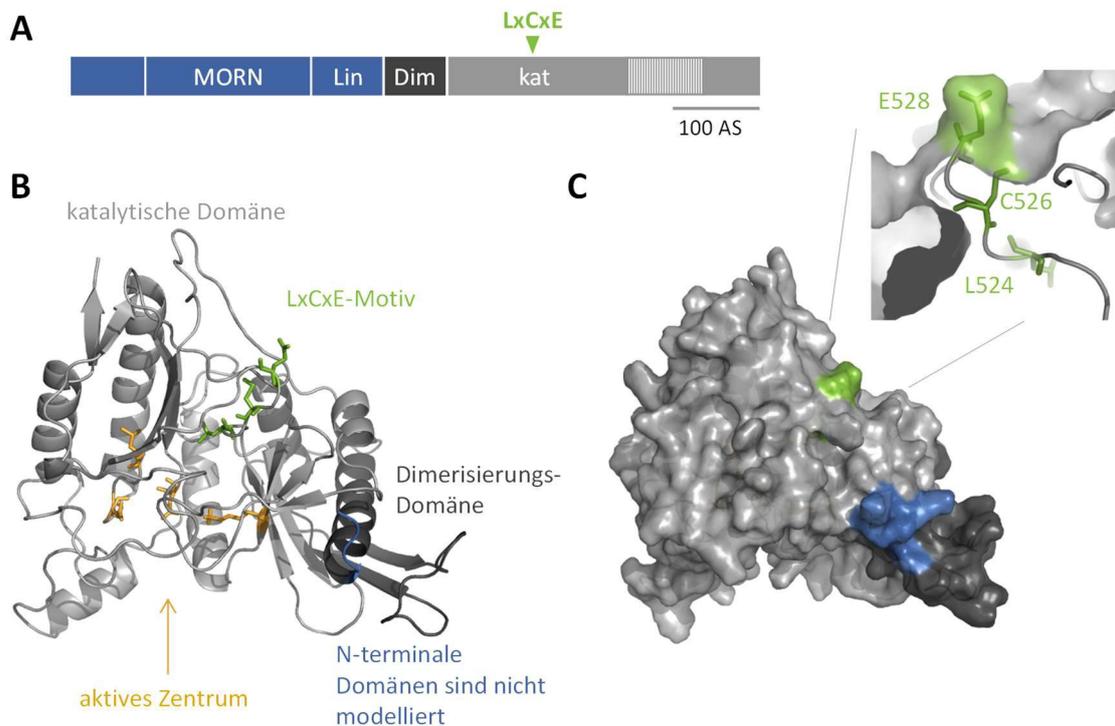


Abbildung 2.27 **Proteinstrukturmodell von PIP5K2 und wahrscheinliche Lage des LxCxE-Motivs.** (A) Das LxCxE-Motiv (grün) von PIP5K2 befindet sich in der konservierten katalytischen Domäne im C-terminalen Teil des Proteins. N-terminale Domänen (blau): MORN, Domäne bestehend aus Wiederholungen des MORN (*membrane occupation and recognition nexus*)-Motivs; Lin, Linker-Domäne. C-terminale Domänen: Dim, Dimerisierungsdomäne (dunkelgrau); kat, katalytische Domäne mit variablen Insert (hellgrau). (B) Modell der Tertiärstruktur von PIP5K2, erstellt von Iris Thondorf (MLU Halle). Das aktuelle Modell umfasst die Dimerisierungsdomäne (dunkelgrau) und die katalytische Domäne (hellgrau). Die N-terminalen Domänen sind nicht modelliert und würden sich am N-Terminus der gezeigten Struktur anschließen (blau). In der Cartoon-Darstellung sind zusätzlich die Aminosäuren des LxCxE-Motivs (grün) und die des aktiven Zentrums (gelb) gezeigt. Der gelbe Pfeil zeigt die Öffnung zum aktiven Zentrum für die Substrate Mg-ATP und PtdIns(4)P. (C) Die Oberflächen-Darstellung zeigt die Zugänglichkeit des LxCxE-Motivs. Die Farbcodierung ist analog zu (B). Im Ausschnitt ist die Anordnung der Seitenketten L524, C526 und E528 gezeigt. Die Abbildung wurde in PyMol erstellt.

2.11 RBR1 bindet Phosphatidylinositol-Monophosphate

Neben der Interaktion von RBR1 mit PIP5K2 wurde untersucht, ob RBR1 Phosphoinositide bindet (Abschnitt 5.17). Zur Untersuchung der Phosphoinositid-Bindung von RBR1 wurden Lipidstreifen (PIP-Strips, Echelon Biosciences) mit GST- bzw. GST-RBR1-Totalextrakt (Abbildung 2.26C und Abbildung 7.8A im Anhang) inkubiert. Eine mögliche Bindung von GST bzw. GST-RBR1 an die aufgetragenen Lipide wurde über Immundetektion nachgewiesen (Abbildung 2.28; Abschnitt 5.15.9). Die GST Kontrolle zeigte keine Lipidbindung im Lipidblot, wohingegen GST-RBR1 an Phosphatidylinositol-Monophosphate, PtdIns(3)P, PtdIns(4)P, PtdIns(5)P aber auch an Phosphatidylserin gebunden hatte (Abbildung 2.28).

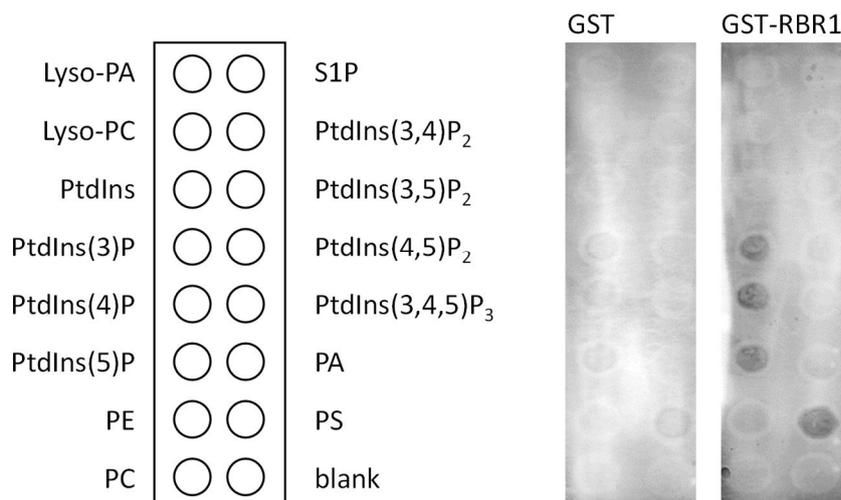


Abbildung 2.28 **Untersuchungen zur Lipidbindung von RBR1.** Lipidstreifen (PIP-Strips, Echelon) wurden mit GST- bzw. GST-RBR1-Totalextrakt inkubiert. Die Detektion des gebundenen Proteins erfolgte über einen primären anti-GST Antikörper und einen sekundären AP-konjugierten Antikörper. Lyso-PA, Lyso-Phosphatidsäure; Lyso-PC, Lyso-Phosphatidylcholin; PtdIns, Phosphatidylinositol; PtdIns(3)P, Phosphatidylinositol-3-phosphat; PtdIns(4)P, Phosphatidylinositol-4-phosphat; PtdIns(5)P, Phosphatidylinositol-5-phosphat; PE, Phosphatidylethanolamin; PC, Phosphatidylcholin; S1P, Sphingosin-1-Phosphat; PtdIns(3,4)P₂, Phosphatidylinositol-(3,4)-bisphosphat; PtdIns(3,5)P₂, Phosphatidylinositol-(3,5)-bisphosphat; PtdIns(4,5)P₂, Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat; PtdIns(3,4,5)P₃, Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat; PA, Phosphatidsäure; PS, Phosphatidylserin. Das gezeigte Experiment ist repräsentativ für zwei (GST) bzw. drei (GST-RBR1) Experimente.

2.12 Untersuchungen zur Funktionalität der PIP5K2-RBR1-Interaktion

2.12.1 Es gibt keine Hinweise auf einen Einfluss von RBR1 auf die PI4P 5-Kinaseaktivität von PIP5K2

Die PI-Bindung von RBR1 und die Interaktion von PIP5K2 und RBR1 stärkten die Hinweise auf eine Verknüpfung des PI-Systems mit RBR1-Funktionen. Im tierischen System führte die Interaktion von *HsPIP5K1α* mit *HsRb* zu einer erhöhten PI4P 5-Kinaseaktivität von *HsPIP5K1α* (Divecha et al., 2002). Um zu untersuchen, in wieweit dieser Bezug im pflanzlichen System gegeben ist, wurde die Enzymaktivität von PIP5K2 in Anwesenheit von RBR1 *in vitro* gemessen. MBP-PIP5K2 (vgl. Abbildung 2.12) wurde mit PtdIns(4)P und γ [³³P]-ATP in Anwesenheit von GST- bzw. GST-RBR1 inkubiert und die PI4P 5-Kinaseaktivität über die Menge des gebildeten [³³P]-PtdIns(4,5)P₂ quantifiziert (Abschnitt 5.16). Dies ergab widersprüchliche Ergebnisse (Abbildung 2.29A). Bei Inkubation mit RBR1 erhöhte sich die PI4P 5-Kinaseaktivität von PIP5K2 in drei von sechs Experimenten im Vergleich zur Kontrolle, in einem Experiment war die PI4P 5-Kinaseaktivität reduziert und in zwei Experimenten war die PI4P 5-Kinaseaktivität von PIP5K2 bei Koinkubation mit RBR1 nicht beeinflusst (Abbildung 2.29A). Ähnliche Ergebnisse werden auch bei Inkubation mit MBP-RBR1 erzielt (nicht gezeigt). Dabei spielt es keine Rolle ob *E. coli*-Totalextrakte oder angereichertes RBR1 eingesetzt wird (nicht gezeigt).

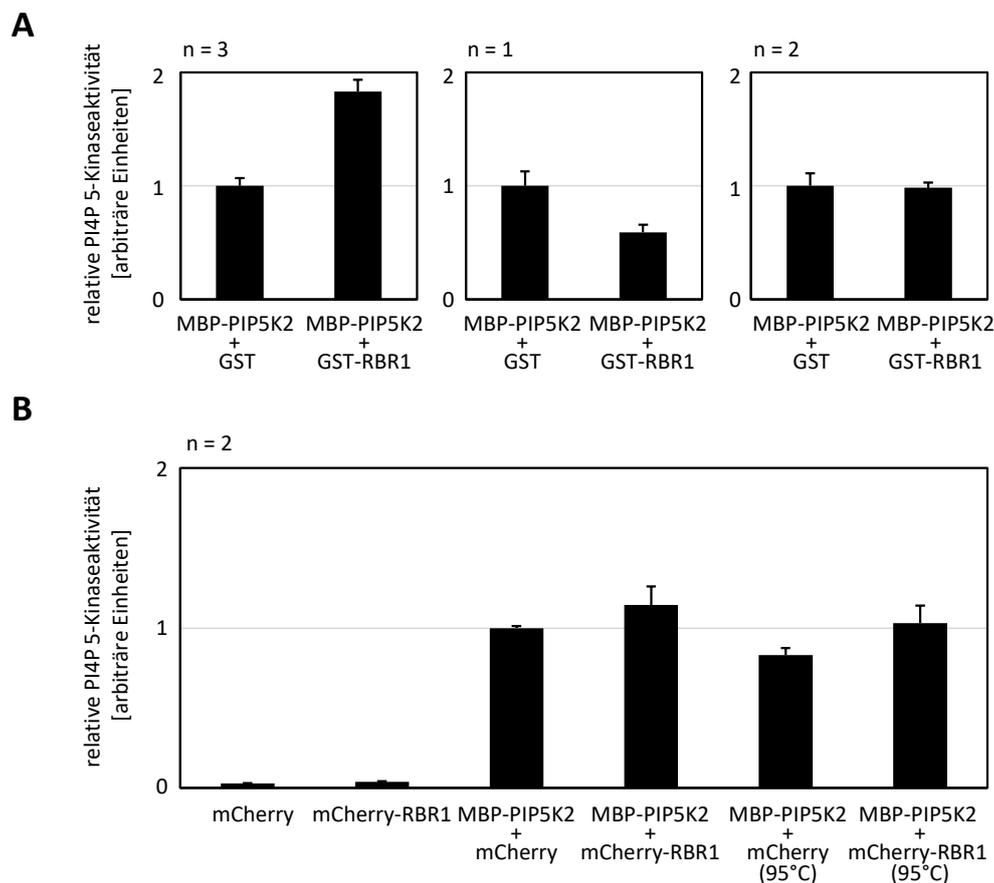


Abbildung 2.29 **Der Einfluss von RBR1 auf die PI4P 5-Kinase-Aktivität von PIP5K2.** MBP-PIP5K2 wurde mit **(A)** GST bzw. GST-RBR1 oder **(B)** mCherry und mCherry-RBR1 bzw. hitzeinaktivierten Proteinproben inkubiert. Die PI4P 5-Kinaseaktivität wurde durch Zugabe von PtdIns(4)P und γ - ^{33}P -ATP gemessen. Das radioaktiv markierte PtdIns(4,5) P_2 wurde mittels Phosphorimager detektiert. Die Daten wurden auf die Aktivität von MBP-PIP5K2 mit GST oder mCherry normalisiert und zeigen den Mittelwert mit Standardabweichung aus zwei bis drei Replikaten. In (A) zeigt der jeweilige Graph repräsentativ das Ergebnis aus der angegebenen Anzahl von Experimenten. Das in (B) gezeigten Experiment ist repräsentativ für mind. zwei unabhängig durchgeführte Experimente.

Die bakterielle Proteinexpression in *E. coli* führt zu einem nicht posttranslational modifizierten Protein. Durch die zentrale Funktionen von Phosphorylierungen in der Kontrolle der RBR1-Funktionalität spielt möglicherweise der RBR1-Phosphorylierungsgrad bei der Beeinflussung der Kinaseaktivität von PIP5K2 eine Rolle. Daher wurde in Tabakzellenepidermiszellen exprimiertes mCherry und mCherry-RBR1 (Abbildung 7.8A im Anhang) für Aktivitätstests mit PIP5K2 eingesetzt (Abbildung 2.29B). Die mCherry- bzw. mCherry-RBR1-Zellextrakte selbst zeigten eine geringe Hintergrund-PI4P 5-Kinaseaktivität (Abbildung 2.29B), die aber nach Zugabe von heterolog exprimiertem MBP-PIP5K2 vernachlässigbar war. Im Vergleich zur Inkubation mit mCherry-Extrakt war bei Inkubation mit mCherry-RBR1-Extrakt eine leichte Aktivitätssteigerung von MBP-PIP5K2 zu beobachten, die jedoch auch nach Hitzeinaktivierung der jeweiligen Pflanzenextrakte zu messen gewesen ist. Somit konnte durch diese *in vitro*-Experimente bisher kein Einfluss von RBR1 auf die PI4P 5-Kinaseaktivität festgestellt werden (Abbildung 2.29B).

2.12.2 Die RBR1-Homöostase der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante könnte verändert sein

Dieck et al. (2012) zeigten, dass die Überexpression von *HsPIP5K1α* zur Reduktion der RBR1-Phosphorylierung in Tabakzellkultur führte. Daher könnte durch die Interaktion von PIP5K2 mit RBR1 die RBR1-Funktion beeinflusst werden. Möglich ist, dass die reduzierte Zellteilungsaktivität der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante (Abbildung 2.2) auf eine reduzierte RBR1-Funktionalität zurückzuführen ist. Zur Untersuchung der RBR1-Funktionalität im Zellzyklus wurde ein Antikörper eingesetzt, der spezifisch die Phosphorylierung an Ser807/811 durch Cdk4-CyclinD in *HsRb* detektiert. Durch diese Phosphorylierung wird in Säugern die Phosphorylierung anderer Aminosäuren in *HsRb* durch Cdk2-CyclinE stimuliert, was zu einer Hyperphosphorylierung von *HsRb* führt und so den Eintritt in die S-Phase ermöglicht (Rubin, 2013). Abrahám et al. (2011) zeigten, dass dieser Antikörper auch in Pflanzenzellen phosphoryliertes RBR1 detektieren kann. Der Einfluss von PIP5K2 auf die zellzyklusabhängige Phosphorylierung von RBR1 wurde *in vivo* im Vergleich zwischen *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante und Wildtyp Col-0 untersucht (Abbildung 2.30). Dazu wurden Proteinextrakte aus sieben Tage alten Keimlingen hergestellt und über Westernblot die Proteingehalte von phosphoryliertem RBR1 und der RBR1-Gesamtproteinmenge bestimmt (Abbildung 2.30). Zur Kontrolle wurde das Einsetzen gleicher Proteinmengen in einem CBB-gefärbten SDS-PAGE-Gel verifiziert (Abbildung 2.30A). Bei annähernd gleicher Gesamtproteinmenge beträgt die RBR1-Proteinmenge in *pip5k1 pip5k2* 31 % des Wildtyps (Abbildung 2.30B). Die zellzyklusabhängige RBR1-Phosphorylierung ist in *pip5k1 pip5k2* im Vergleich zum Wildtyp auf 61 % reduziert (Abbildung 2.30C). Demnach wäre der RBR1-Proteingehalt stärker reduziert als die zellzyklusabhängige Phosphorylierung von RBR1. Bereits der Transkriptgehalt von RBR1 ist in *pip5k1 pip5k2* im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert (69 % des Wildtyp-Transkriptgehalts; Abbildung 2.30D). Durch das Fehlen von PIP5K1 und PIP5K2 in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante scheint die RBR1-Homöostase im Allgemeinen stark beeinflusst zu sein. Experimente von Franziska Daamen und Dr. Mareike Heilmann zeigten, dass auch der Proteingehalt des Kernproteins Histon 3 in Proteinextrakten von Keimlingen der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante sehr stark reduziert ist. Eine allgemeine Verschiebung des Verhältnisses von Kernprotein- zu Gesamtproteinmenge kann aufgrund des starken Phänotyps der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante nicht ausgeschlossen werden.

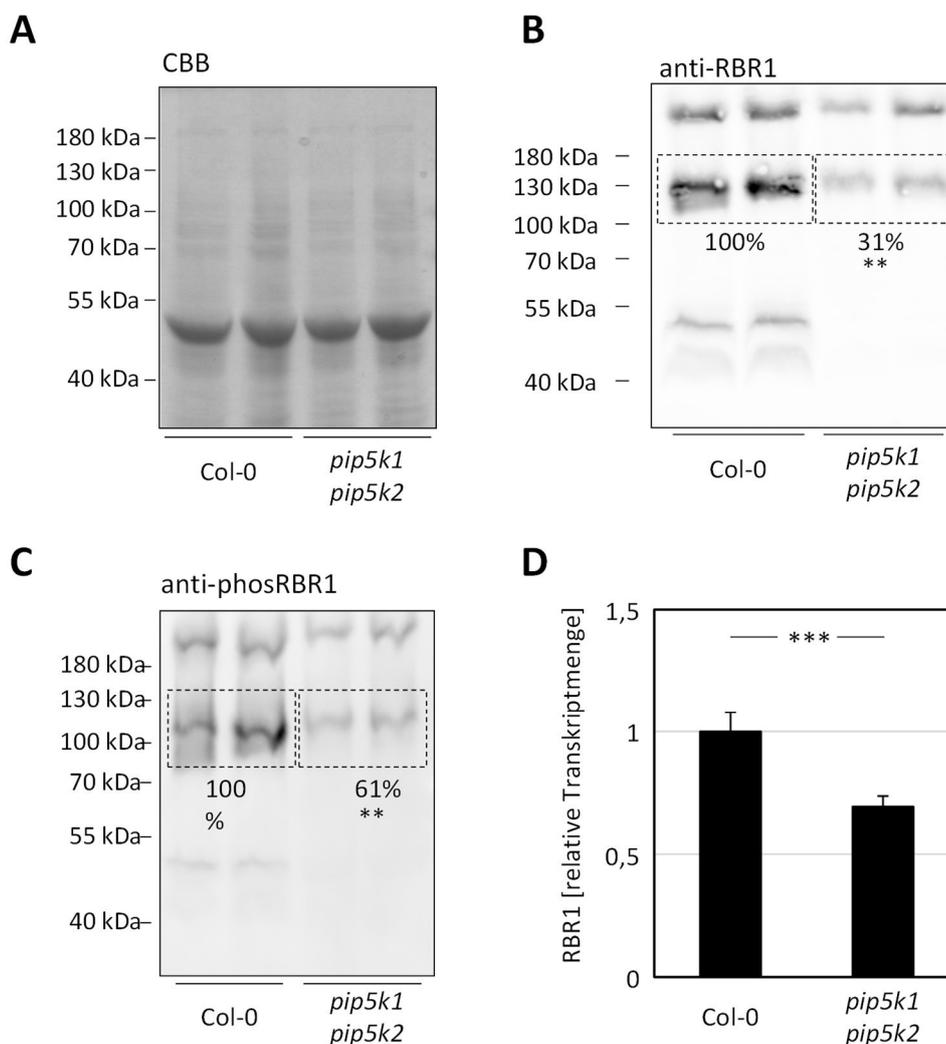


Abbildung 2.30 Immundetektion von RBR1 und phosphoryliertem RBR1 in *pip5k1 pip5k2*- und Col-0-Extrakten. **(A)** Proteinextrakte sieben Tage alter Keimlinge wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und zur Ladekontrolle mit Coomassie (CBB) angefärbt. **(B, C)** Mit spezifischen Antikörpern wurde die zellzyklusabhängige Phosphorylierung (B, anti-PhosRBR1) und die Gesamtproteinmenge von RBR1 bestimmt (C, anti-RBR1), RBR1: 112 kDa. Repräsentativ sind zwei von vier biologischen Replikaten gezeigt. Die Intensität der umrahmten Banden wurde für jedes Replikat mit ImageJ bestimmt. Die Proteinmenge, auf den Wildtyp normalisiert und in Prozent angegeben, entspricht dem Mittelwert aller vier Replikate. **(D)** RBR1-Transkriptmengen in sieben Tage alten Keimlingen. Die qPCR-Daten sind auf den Transkriptgehalt des Wildtyps normalisiert und zeigen den Mittelwert mit Standardabweichung von zwei bis drei biologischen Replikaten. Die statistische Analyse wurde mit einem ungepaarten, zweiseitigen t-Test durchgeführt: ***: $p \leq 0,001$.

Aufgrund des Fehlens einer möglichen Referenzgröße, ist es im Moment nicht möglich eine detaillierte Aussage über den Effekt von fehlender PIP5K1 und PIP5K2 auf die RBR1-Homöostase zu treffen. Da sich bei gleicher eingesetzter Gesamtproteinmenge die Reduktion des RBR1-Proteingehalts und Reduktion des phosphorylierten RBR1-Proteins in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante deutlich unterscheiden, wäre es sehr interessant dieses Experiment mit einer passenden Referenzgröße zu wiederholen.

2.12.3 Das Gewebemuster des Wurzelmeristems der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante scheint nicht verändert

Neben der prominenten Funktion von RBR1 in der Zellzyklus-Regulation wurde gezeigt, dass RBR1 auch während der asymmetrischen Teilung von Initialzellen des Wurzelmeristems und bei der Erhaltung des ruhenden Zentrums (engl. *quiescent center*, QC) eine Rolle spielt (Weimer et al., 2012; Cruz-Ramírez et al., 2013). Um herauszufinden, ob das Fehlen von PIP5K1 und PIP5K2 zu einer Fehlfunktion des Wurzelmeristems in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante führt und somit womöglich zum Phänotyp der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante beiträgt, wurde die Arabidopsis Markerlinie pWOX::ER-GFP für das QC (Sarkar et al., 2007) in die *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante gekreuzt (Abbildung 2.31). Die daraus resultierende *pip5k1 pip5k2* pWOX::ER-GFP-Linie wurde auf ½ MS-Medium angezogen. Die Zellwände der Wurzelzellen sechs Tage alter Keimlinge wurden mit Propidiumiodid gefärbt (Abschnitt 5.22.2) und die Wurzelmeristeme wurden mikroskopisch auf die Fluoreszenz des eingekreuzten Marker pWOX-ER-GFP untersucht. Es zeigte sich, dass im Vergleich zum Wildtyp das QC in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante weder in der Größe, noch in der Position verschoben ist. Auch die Gewebestruktur des Wurzelmeristems der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante erschien nicht auffällig verändert (Abbildung 2.31). Die starke Verkürzung des Wurzelmeristems (Abbildung 2.16C; Tejos et al., 2014), scheint demnach nicht aufgrund eines veränderten, nicht funktionalen Wurzelmeristems der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante begründet.

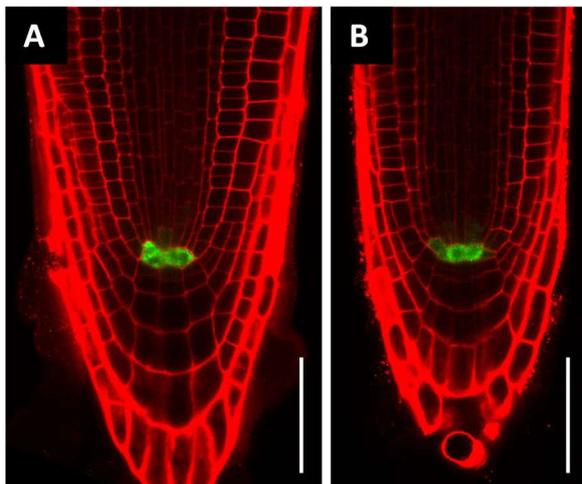


Abbildung 2.31 **Die Meristemstruktur des apikalen Wurzelmeristems in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante.** Fünf Tage alte Arabidopsis-Keimlinge exprimieren pWOX::ER-GFP (grün). **(A)** Col-0, **(B)** und *pip5k1 pip5k2*. Die Zellwand wurde mit Propidiumiodid gefärbt (rot) und die Fluoreszenz mittels konfokale Laser-Raster-Mikroskopie detektiert. Die gezeigten Aufnahmen sind repräsentativ für neun bis zehn Keimlinge in drei unabhängigen Experimenten. Der Maßstab entspricht 50 µm.

Im Zuge dieser Arbeit konnten noch keine Funktion der RBR1-PIP5K2-Bindung gefunden werden. Der Nachweis der RBR1-PIP5K2-Interaktion und der PI-Monophosphatbindung von RBR1 ist aber ein wichtiger erster Schritt in der funktionalen Charakterisierung der Interaktion von PI-System und RBR1 und ein idealer Ausgangspunkt für weiterführende Studien.

3 Diskussion

Phosphoinositide sind regulatorische Phospholipide mit vielfältigen zellulären Funktionen. In Pflanzen wurden bisher vor allem plasmamembranassoziierte Funktionen untersucht: Dabei definieren PI4P 5-Kinasen und das Reaktionsprodukt $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ Membrandomänen, welche u. a. die subzelluläre Lokalisierung von Auxin-Efflux-Carriern, den PIN-FORMED (PIN)-Proteinen (Ischebeck et al., 2013; Tejos et al., 2014) und die korrekte Organisation des Aktinzytoskeletts ermöglichen (Ischebeck et al., 2011; Stenzel et al., 2012). Im Zellkern tierischer Zellen sind Phosphoinositide an einer Vielzahl essentieller Kernfunktionen wie der mRNA-Prozessierung, der Chromatinregulation, der Regulation des nukleären Aktinzytoskeletts und der Zellteilung beteiligt (Clarke et al., 2001; Divecha et al., 2002; Rando et al., 2002; Mellman & Anderson, 2009; Toska et al., 2014; Chakrabarti et al., 2015; Hamann & Blind, 2017). Biochemische Untersuchungen konnten Phosphoinositide (PIs) und PI-modifizierende Enzyme auch in pflanzlichen Zellkernen nachweisen (Hendrix et al., 1989; Bunney et al., 2000; König et al., 2008; Dieck et al., 2012). In zellbiologischen Studien wurde für einige Arabidopsis PI4P 5-Kinasen Kernlokalisierung beobachtet (Lou et al., 2007; Ischebeck et al., 2011, 2013; Tejos et al., 2014). Zusätzliche Hinweise auf mögliche Kernfunktionen insbesondere der ubiquitär exprimierten PIP5K1 und PIP5K2 ergeben sich durch den starken Entwicklungsphänotyp der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante (Ischebeck et al., 2013; Tejos et al., 2014) und die reduzierte Zellzyklusaktivität im Wurzelmeristem dieser Mutante (Abbildung 2.2). Aufgrund der höheren *in vitro* PI4P 5-Kinaseaktivität von PIP5K2 (Stenzel et al., 2008) wurde PIP5K2 für die Studien dieser Arbeit ausgewählt.

Hauptziel der Arbeit war es, herauszufinden, inwiefern die beobachtete Kernlokalisierung von Arabidopsis PIP5K2 biologisch relevant ist. Im Rahmen dessen wurden mögliche Kernlokalisierungssignale (NLS) charakterisiert. Dazu wurde initial sowohl die PI4P 5-Kinaseaktivität als auch die Kernlokalisierung von $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ und $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, Substrat und Reaktionsprodukt von PIP5K2, nachgewiesen. In einem weiteren Teil der Arbeit wurden Hinweise auf mögliche PIP5K2-Funktionen im pflanzlichen Zellkern untersucht.

3.1 Nachweis nukleärer Phosphoinositide in Arabidopsis

Zum zellbiologischen Nachweis von kernlokalisiertem $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ wurden Arabidopsis-Keimlinge untersucht, die den $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -bindenden Reporter $\text{PH}_{\text{PLC}\delta}$ -EYFP exprimierten (Abbildung 2.3A). Die Lokalisierung von $\text{PH}_{\text{PLC}\delta}$ -EYFP wurde bisher als cytosolisch und Plasmamembran-assoziiert beschrieben (van Leeuwen et al., 2007). Die Daten dieser Arbeit zeigen zusätzlich eine Lokalisierung von $\text{PH}_{\text{PLC}\delta}$ -EYFP im Zellkern (Abbildung 2.3A); eine Beobachtung, die in anderen Arbeiten bereits vereinzelt dokumentiert, aber nicht weiter beschrieben wurde (Mishkind et al., 2009; Ischebeck et al., 2011; Tejos et al., 2014).

Weitere Hinweise auf die Existenz von nukleärem PtdIns(4,5)P₂ in Arabidopsiswurzelzellen liefert die Kernlokalisierung von Citrine-TUBBY-C, ebenfalls ein PtdIns(4,5)P₂-Reporter (Simon et al., 2014). Zusätzlich zum Nachweis durch den PtdIns(4,5)P₂-Reporter PH_{PLC6}-EYFP wurde die Kernlokalisierung von PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P₂ in Arabidopsis-Wurzelzellen immunhistochemisch bestätigt (Abbildung 2.3B). Dies ergänzt die Daten von Tejos et al., die PtdIns(4,5)P₂ in Antikörperstudien bisher nur an der Plasmamembran detektierten (Tejos et al., 2014). In deren Arbeit blieb die Struktur der Plasmamembran durch den Einsatz sehr milder Detergenzien erhalten und verhinderte vermutlich den Zugang zu weiter im Zellinneren liegenden Epitopen (Tejos et al., 2014). In Folge dessen konnten wahrscheinlich keine Phosphoinositide im Zellkern detektiert werden (Hammond et al., 2009). In dieser Arbeit wurde ein Standardprotokoll zur immunhistochemischen Detektion von Proteinen eingesetzt (Zhang et al., 2012). Der Einsatz stärkerer Detergenzien in diesem Protokoll machte PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P₂ im Zellkern für die Antikörperbindung zugänglich. Die Detektion der Plasmamembran-lokalisierten H⁺-ATPase bestätigte den Erhalt einer intakten Zellstruktur während der Probenvorbereitung (Abbildung 2.3C). In immunhistochemischen Untersuchungen konnte kein deutlicher Unterschied in der Menge der untersuchten PIs in Arabidopsis-Wildtyp und *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante festgestellt werden (Abbildung 2.3B), obwohl zumindest im PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P₂-Gesamtgehalt in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante die PtdIns(4)P-Gehalt leicht erhöht und der PtdIns(4,5)P₂-Gehalt reduziert war (Ischebeck et al., 2013). Jedoch wurde auch gezeigt, dass *pip5k1*-Keimlinge einen erhöhten *PIP5K2*-Transkriptgehalt und *pip5k2*-Keimlinge einen erhöhten *PIP5K1*-Transkriptgehalt besitzen (Ischebeck et al., 2013). Zusätzlich ändert sich die Gesamt-PI4P 5-Kinaseaktivität in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante kaum, obwohl zwei der ubiquitär exprimierenden PI4P 5-Kinasen, PIP5K1 und PIP5K2, stark reduziert vorliegen (Ischebeck et al., 2013). Es wäre daher möglich, dass sich die nukleären PtdIns(4)P- und PtdIns(4,5)P₂-Gehalte der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante nicht von denen des Wildtyps unterscheiden, aber die Anwesenheit von PIP5K1- und PIP5K2-generiertem PtdIns(4,5)P₂ fehlt. Methoden zur spezifischen Detektion unterschiedlicher PI-Spezies, wie lipidbindende Proteindomänen und Antikörper, unterscheiden PIs anhand ihrer Inositol-Kopfgruppen. Daher können nur PIs detektiert werden, deren Kopfgruppe nicht bereits durch die Bindung anderer Proteine maskiert ist. Der Nachweis des vollständigen Pools an PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P₂ ist somit nicht möglich (Balla, 2007; Heilmann, 2016b). Die Ergebnisse von lipidbindenden Reportern und immunhistochemischen Untersuchungen dennoch übereinstimmend die Existenz von PtdIns(4)P bzw. PtdIns(4,5)P₂ in pflanzlichen Zellkernen.

Um Hinweise darauf zu finden, ob PtdIns(4,5)P₂ im Zellkern synthetisiert wird, wurde die PI4P 5-Kinaseaktivität in angereicherten Zellkernfraktionen von Arabidopsis untersucht. Übereinstimmend mit vorhergehenden Studien in Karottenprotoplasten und Zellkernen von Tabakblättern (Hendrix et al., 1989; Dieck et al., 2012) konnte in dieser Arbeit kernassoziierte PI4P 5-Kinaseaktivität im Kernextrakt von Arabidopsis-Rosettenblättern detektiert werden (Abbildung 2.4D). Wie in anderen Arbeiten war eine leichte ER-Verunreinigung nicht zu verhindern (Abbildung 2.4C; Dieck et al., 2012), da perinukleärer Raum

und ER-Lumen ineinander übergehen. Das Kernisolationsprotokoll könnte in dieser Hinsicht weiter optimiert werden. Als Hauptkontaminationsquelle wären Bruchstücke der Plasmamembran, dem beschriebenen Lokalisierungsort von PI4P 5-Kinasen (u. a. Furt et al., 2010), zu betrachten. Durch den Einsatz von 1 % Triton und geringe Zentrifugationsgeschwindigkeiten bei der Kernisolation ist es unwahrscheinlich, dass Plasmamembran-Bruchstücke angereichert wurden (Furt et al., 2010). Die Immundetektion des Markerproteins der Plasmamembran, die H⁺-ATPase, zeigte aber weder in den Totalextrakten noch in den Kernextrakten ein Signal (Abbildung 2.4C). Da der genutzte Antikörper in immunhistochemischen Experimenten funktional war (Abbildung 2.3C), konnte eine Kontamination mit Plasmamembranfragmenten nicht ausgeschlossen werden. Ein Nachweis der H⁺-ATPase im Westernblot ist notwendig, um Plasmamembrankontaminationen und damit kontaminierende PI4P 5-Kinaseaktivität in den Kernextrakten ausschließen zu können und die gemessene PI4P 5-Kinaseaktivität (Abbildung 2.4D) den angereicherten Zellkernen zuzuschreiben.

Die in dieser Arbeit erworbenen Erkenntnisse zur Kernlokalisierung von PtdIns(4)P, PtdIns(4,5)P₂ und evtl. PI4P 5-Kinaseaktivität im Zellkern von Arabidopsis bestätigen die bereits erfolgte biochemische Charakterisierung von Komponenten des PI-Systems in Kernfraktionen (Hendrix et al., 1989; Bunney et al., 2000; König et al., 2008; Dieck et al., 2012) und geben starke Hinweise auf die Existenz eines kernlokalisierten PI-Systems in Arabidopsis.

3.2 Hinweise auf aktiven Kerntransport von PIP5K2

Die untersuchte PI4P 5-Kinaseaktivität in Arabidopsis-Zellkernen und der zellbiologische Nachweis von PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P₂ mit lipidbindenden Domänen und Antikörpern stärken die Hinweise auf eine mögliche Funktion von PIs im pflanzlichen Zellkern (Abschnitt 3.1). Weiterführende Experimente sollten klären, ob Arabidopsis PIP5K2 durch aktiven Kerntransport oder aufgrund starker Überexpression im Zellkern lokalisiert. Die stabile Expression von PIP5K2-EYFP unter endogenem Promotor in Arabidopsis zeigte keine bzw. nur sehr schwach detektierbare Fluoreszenz (Ischebeck et al., 2013; Tejos et al., 2014). Daher wurde die systematische Charakterisierung der Kernlokalisierung von PIP5K2 heterolog in Zwiebelepidermiszellen durchgeführt. Dieses Expressionssystem ermöglicht eine verlässliche Detektion der PIP5K2-EYFP-Fluoreszenz und lässt sich schnell und einfach transformieren. Die Expression von PIP5K2 in Zwiebelepidermiszellen zeigte übereinstimmend mit bisherigen Studien eine PIP5K2-Lokalisierung im Cytosol und im Zellkern (Abbildung 2.11A; Ischebeck et al., 2013; Tejos et al., 2014). Typisch für Zwiebelzellen sind die zu beobachtenden cytosolischen Einstülpungen in den Zellkern (z.B. Abbildung 2.9B und 2.11C). Diese durchziehen den Zellkern zum Teil vollständig und ermöglichen die Aufrechterhaltung des Verhältnisses zwischen Nucleoplasma- und Kernhüllen-assoziierten Funktionen des ausgesprochen großen Zellkerns von Zwiebelepidermiszellen (Collings et al., 2000). Bei deutlich kleineren Arabidopsis-Zellkernen, sind die cytosolischen Einstülpungen weniger bis gar nicht zu beobachten (Abbildung 2.3A; Komaki et al., 2009; Launholt et al., 2006).

Um zu untersuchen inwiefern die Kernlokalisierung von PIP5K2 biologisch relevant ist, wurde zunächst die große Untereinheit von RubisCO (RbcL) an das Fluoreszenzprotein EYFP fusioniert. *RbcL*, welches in der Regel in Chloroplasten codiert und exprimiert wird, lokalisiert bei cytosolischer Expression in Zwiebelepidermiszellen diffus im Cytosol (Abbildung 2.5A). Die Fusion von PIP5K2 an das cytosolische RbcL-EYFP vermittelte den Kerntransport des 166 kDa großen Fusionsproteins in Zwiebelepidermiszellen (Abbildung 2.5B). Mit einem Ausschlussvolumen der Kernporen von ca. 40-50 kDa (Meier & Brkljacic, 2010; Raices & D'Angelo, 2012; Guo & Fang, 2014) ist ein passiver Kerntransport durch starke Überexpression unwahrscheinlich und PIP5K2 wird somit vermutlich aktiv in den Zellkern transportiert.

3.3 PIP5K2 interagiert mit α -Importinen

Der bekannteste Erkennungs- und Importmechanismus für kernlokalisierte Proteine ist der α -Importin-vermittelte Kerntransport (Wirthmueller et al., 2013). Lange et al. (2007) haben, wie in der Einleitung bereits beschrieben, Kriterien für einen aktiven Proteinimport in den Zellkern aufgestellt. Nach diesem Kriterienkatalog sollte PIP5K2 auf vorhandene NLS, die Interaktion mit α -Importinen und die Fähigkeit der möglichen NLS die Kernlokalisierung eines großen, nicht kernlokalisierten Cargos zu vermitteln, untersucht werden. Die Kernlokalisierung eines cytosolischen Cargos dürfte nicht mehr stattfinden, wenn funktionale Aminosäuren der putativen NLS von PIP5K2 substituiert wären (Lange et al., 2007).

Eine Protein-Protein-Interaktion von PIP5K2 konnte spezifisch für die α -Importine IMP α 3, IMP α 4 und IMP α 6 gezeigt werden, jedoch nicht für IMP α 1 und IMP α 2 (Abbildung 2.6A). Die Interaktion wurde am Beispiel von IMP α 6 im Dotblot verifiziert (Abbildung 2.6B). Hinweise auf einen Einfluss der Stärke der α -Importin-Expression auf die Kernlokalisierung bestimmter Cargo-Proteine, gab die Komplementierung der α -Importin-Mutante *impa-4*, durch die Überexpression anderer α -Importine (Bhattacharjee et al., 2008). Eine spezifische Interaktion einzelner α -Importin-Isoformen mit einem Cargoprotein wurde als möglicher Regulationsmechanismus einer gewebsspezifischen Kernlokalisierung des Cargos vorgeschlagen (Wirthmueller et al., 2013). Alle getesteten α -Importin-Isoformen sind ubiquitär exprimiert sind, jedoch exprimiert IMP α 4 etwas stärker in der Wurzelspitze und die Expression von IMP α 3 ist im Sprossapex erhöht (Wirthmueller et al., 2013). IMP α 6, welches am stärksten mit PIP5K2 interagiert, exprimiert deutlich verstärkt im Sprossapex (Wirthmueller et al., 2013). PIP5K2 ist ubiquitär exprimiert und zeigt verstärkte Expression in Meristemen (Ischebeck et al., 2013). Die spezifische Interaktion von PIP5K2 mit den α -Importin-Isoformen IMP α 3, IMP α 4 und IMP α 6 könnte demnach Hinweise auf eine verstärkte Kernlokalisierung von PIP5K2 in Wurzel- und Sprossapex geben.

Eine systematische Untersuchung der Kernlokalisierung von PIP5K2 in unterschiedlichen Geweben, könnte ein Hinweis darauf geben, inwieweit eine Kernlokalisierung von PIP5K2 von der lokalen Expression verschiedener α -Importine abhängt. Durch die schwache Expression von PIP5K2 bei homologer Expression unter Kontrolle des endogenen Promotors (vgl. Ischebeck et al., 2013) gestalten sich diese Experimente als herausfordernd.

3.4 Identifizierung einer funktionalen NLS in PIP5K2

Zur Eingrenzung möglicher kernlokalisierender Sequenzen in PIP5K2 wurde PIP5K2 in N- und C-terminale Domänen geteilt. Lokalisierungsstudien zeigten, dass die Kernlokalisierung von PIP5K2 durch deren N-terminale Domänen vermittelt wird (Abbildung 2.7). Dieses Ergebnis entspricht der Lokalisierung von PIP5K1-Hälften in *Physcomitrella patens*-Protoplasten, in denen ebenfalls nur die N-terminalen Domänen von PIP5K1 Kernlokalisierung vermitteln (Mikami et al., 2010). PIP5K2 wurde dann entsprechend dem Kriterienkatalog von Lange et al. (2007) systematisch auf α -Importin-Bindestellen also Lysin- und Argininreichen Kernlokalisierungssignale (NLS), und die Funktionalität dieser putativen NLS untersucht. Die bioinformatische Vorhersage für NLS in PIP5K2 ist durch Sequenzabgleiche relativ einfach möglich (Brameier et al., 2007; Kosugi et al., 2009b; Nguyen Ba et al., 2009; Lin et al., 2013). Im Rahmen dieser Analyse wurden sechs kurze Sequenzbereiche der PIP5K2 als mögliche NLS identifiziert (NLS I – NLS VI, Abbildung 2.8). NLS IV und NLS VI waren in der Lage die Kernlokalisierung des cytosolischen mCherry-Rbcl-Reporterkonstrukts zu vermitteln (Abbildung 2.9).

Zur Identifizierung der funktionalen Aminosäuren von NLS IV wurden die basischen Aminosäuren R271, K272, R273 mit Alanin substituiert. Die so modifizierte NLS_{IVAAA} war nicht mehr in der Lage das Reporterkonstrukt in den Zellkern zu transportieren (Abbildung 2.9B) und kann somit als funktional beschrieben werden. In Zwiebelepidermiszellen konnten die Reporterkonstrukte zuverlässig exprimiert werden, jedoch war die Transformationseffizienz und Expression zu gering, um in Westernblot-Analysen die Integrität der Fluoreszenzproteine zu überprüfen. Es wurden Kontrollen mitgeführt, die die Westernblot-Kontrolle nicht ersetzen, aber zeigen, dass es unwahrscheinlich ist, dass ein relevanter Anteil an mCherry-Abbruchfragmenten vorhanden ist, der zwischen Cytosol und Kern diffundiert und dadurch fälschlicherweise eine Kernlokalisierung des Reporterkonstrukts suggeriert. So führt die Fusion einer starken NLS_{SV40} an das mCherry-Rbcl-Reporterkonstrukt zu einer nahezu vollständigen Kernlokalisierung des Reporters. Eine nahezu vollständige Kernexklusion kann bei der Fusion einer nicht funktionalen Aminosäuresequenz (Negativkontrolle) an Reporterkonstrukt beobachtet werden (Abbildung 2.9). Bei der als funktional charakterisierten NLS IV aus PIP5K2 handelt es sich vermutlich um eine verkürzte monopartite NLS der Klasse 1, der auch die NLS_{SV40} angehört und die in der großen Furche von α -Importinen gebunden werden (Kosugi et al., 2009a; Wirthmueller et al., 2013). Im Gegensatz zu NLS_{SV40} vermittelt die NLS IV von PIP5K2 in 82 % der transformierten Zellen eine Kernlokalisierung des Reporterkonstrukts und lokalisiert zusätzlich im Cytosol (Abbildung 2.9). Eine anteilmäßige Kernlokalisierung wurde auch in Kernlokalisierungsstudien für die NLS der humanen Polo-like Kinase 1, des humanen Transkriptionsfaktor ETS-Variant 6 und Arabidopsis Constitutive Photomorphogenesis 1, einem Bestandteil des kernlokalisierten E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes, beobachtet: In Zellen, die sich weder oft teilen noch externem Stress ausgesetzt sind, kann der prozentuale Anteil der Zellen mit Kernlokalisierung als Maß für die Stärke einer NLS genutzt werden (Subramanian et al., 2004; Lee et al.,

2009a; Wang et al., 2009; Zhang et al., 2015). NLS IV von PIP5K2 ist demnach schwächer als NLS_{SV40}, was durch die noch verbliebenden cytosolische Lokalisierung des NLS IV-Reporterkonstrukt unterstrichen wird (Abbildung 2.9). Dies stimmt damit überein, dass PIP5K2 neben kernlokalisierten Funktionen auch Funktionen an der Plasmamembran besitzt und daher nicht ausschließlich im Zellkern lokalisieren kann, wie es für Proteine mit sehr starken NLS wie z.B. SV40 beobachtet wurde (Kalderon et al., 1984). NLS IV aus PIP5K2 befindet sich in der Linkerdomäne und damit wie die klassische Arginin/Lysin-reiche NLS der PI4P 5-Kinase Mss4 aus Hefe N-terminal der konservierten katalytischen Domäne (Audhya & Emr, 2003). Die Linkerdomäne verbindet in Pflanzen die N-terminalen MORN-Domänen mit den auch in Hefe und humanen PI4P 5-Kinasen konservierten Domänen (Mueller-Roeber & Pical, 2002). Dabei zeigt die Linkerdomäne eine sehr hohe Sequenzvariabilität innerhalb der Arabidopsis PI4P 5-Kinasen und keine Homologie zu bekannten Proteindomänen (Mueller-Roeber & Pical, 2002). Es gibt Hinweise darauf, dass die Linkerdomänen von PIP5K2 und PIP5K6 unterschiedliche Proteininteraktionen vermitteln (Stenzel et al., 2012). Durch die Positionierung der charakterisierten NLS IV in der Linkerdomäne könnte auch eine PI4P 5-Kinase-spezifische α -Importin-Bindung über die Linkerdomäne vermittelt werden. Hinweise auf die Funktionalität von NLS IV aus PIP5K2 zeigt die Konservierung von NLS IV in PIP5K1 und PIP5K2-Orthologen anderer Spezies höherer Pflanzen (Abbildung 7.2 im Anhang). Ein Hinweis auf eine spezifische Kernlokalisierung von PIP5K1 und PIP5K2 über NLS IV ergibt sich daraus, dass diese NLS in keiner anderen Arabidopsis PI4P 5-Kinase konserviert ist (Abbildung 7.2A im Anhang). Für andere PI4P 5-Kinase-Isoformen aus Arabidopsis werden in bioinformatischen Untersuchungen andere, ebenfalls isoformspezifische Sequenzbereiche als putative NLS vorgeschlagen, welches einen isoformspezifischen Kernimport von PI4P 5-Kinasen ermöglichen könnte.

Wie NLS IV vermittelt auch NLS VI eine Kernlokalisierung des mCherry-Rbcl-Reporters (Abbildung 2.9). Diese Fähigkeit zur Kernlokalisierung des Reporters konnte durch Substitution basischer Aminosäuren in NLS VI reduziert werden (Abbildung 2.10). NLS VI liegt in der katalytischen Domäne von PIP5K2, welche im C-Terminus von PIP5K2 liegt. Da nur die N-terminalen Domänen von PIP5K2 eine Kernlokalisierung vermitteln (Abbildung 2.7), und die Klonierung einer PIP5K2_{NLSVI_AAAA}-Substitutionsvariante nicht erfolgreich war, wurde die biologische Relevanz von NLS VI nicht weiter untersucht.

Die Identifizierung funktionaler Aminosäuren in NLS IV mit Hilfe des mCherry-Reporterkonstrukts ermöglichte die Substitution dieser Aminosäuren in PIP5K2 (PIP5K2_{NLSIV_AAA}, im Weiteren PIP5K2_{AAA}). Es wurde sichergestellt, dass die katalytische Aktivität von PIP5K2 weder durch C-terminale Fusionen (Ischebeck et al., 2008, 2011, 2013, Stenzel et al., 2008, 2012) noch durch Aminosäuresubstitutionen in NLS IV reduziert wird (Abbildung 2.12). PIP5K2_{AAA} zeigt in Zwiebelepidermiszellen eine um 30 % reduzierte Kernlokalisierung im Vergleich PIP5K2-EYFP (Abbildung 2.11), NLS IV scheint daher für die Kernlokalisierung von PIP5K2 notwendig zu sein. Die Beobachtung, dass bei Substitution basischer Aminosäuren der NLS IV in PIP5K2 die Kernlokalisierung nicht im gleichen Ausmaß reduziert wird, wie es bei Substitution im Rbcl-mCherry-Reporter beobachtet wurde (Abbildung 2.10), gibt Hinweise darauf, dass

neben NLS IV noch weitere Signale an der Regulation des Kerntransports beteiligt sind. Nicht auszuschließen ist, dass getestete NLS, die individuell zu keiner Kernlokalisierung führen, in Kombination Kerntransport vermitteln können. Um weitere kernlokalisierende Signale in PIP5K2 zu identifizieren, könnten verkürzte PIP5K2-Varianten, oder PIP5K2-Varianten denen einzelne Domänen fehlen, auf Kernlokalisierung getestet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch die systematische Analyse der Kernlokalisierung von PIP5K2 eine funktionale NLS identifiziert werden. Sequenzanalysen der Arabidopsis PI4P 5-Kinasen aus Arabidopsis und PIP5K2-Orthologe anderen Pflanzenspezies ergaben, dass diese NLS für PIP5K1 und PIP5K2 spezifisch ist. Die Identifikation funktionaler Aminosäuren dieser NLS ermöglichte die Generierung einer PIP5K2-Variante mit reduzierter Kernlokalisierung.

3.5 Mögliche Regulation der Kernlokalisierung von PIP5K2

Die strenge Regulation der dynamischen Lokalisierung von PI4P 5-Kinasen aus Hefe (Mss4) und Mensch (*HsPIP5K1 α*) wird durch posttranslationale Modifikationen realisiert (Audhya & Emr, 2003; Chakrabarti et al., 2015). Die Plasmamembranassoziation der PI4P 5-Kinase Mss4 aus Hefe erhöht sich nach Phosphorylierung und Mss4 steht nicht mehr für den Kernimport zur Verfügung (Audhya & Emr, 2003). Die charakterisierte NLS IV in PIP5K2 besitzt in direkter Folge der funktionalen Aminosäuren (R271, K272, R273) zwei Serine (S274 und S275), die potentiell phosphoryliert werden könnten und auch in PIP5K1 und PIP5K2-Orthologen anderer Spezies höherer Pflanzen konserviert sind (Abbildung 7.2 im Anhang). Dr. Jennifer Lerche (ehemals AG Heilmann) konnte in bisher unveröffentlichten Experimenten zeigen, dass die Proteinkinase PINOID (PID) PIP5K2 an S274 und / oder S275 phosphoryliert. Eine Phosphorylierung einer oder beider dieser Serine könnte die positive Ladung der NLS neutralisieren und eine α -Importin-Bindung erschweren. Interessant wäre zu untersuchen, in wieweit Alanin- oder Aspartataustauschvarianten dieser Serine, die den dephosphorylierten bzw. phosphorylierten Zustand mimikrieren, die Kernlokalisierung von PIP5K2 beeinflussen. Die PIP5K2-phosphorylierende Proteinkinase PID phosphoryliert auch PIN-Proteine, reguliert darüber deren polare Membranlokalisierung und ermöglicht so einen gerichteten Auxintransport (Huang et al., 2010). Zusätzlich wird die PIP5K2-Expression über auxinresponsive Elemente in der PIP5K2-Promotorregion reguliert (Tejos et al., 2014). Es wäre daher möglich, dass die PIP5K2-Kernlokalisierung ebenfalls auxinabhängig vermittelt werden könnte. Da die apikale PIN-Lokalisierung auch wiederum durch PtdIns(4,5)P₂ reguliert wird (Ischebeck et al., 2013), könnte auch die Kernlokalisierung von PIP5K2 den Auxingradient beeinflussen. Diese Hypothese ist gerade aufgrund der zentralen Rolle von Auxin in der Entwicklung und Stressantwort in Arabidopsis sehr interessant und sollte weiter untersucht werden.

Zur Analyse des Einflusses von Auxin und anderer Effektoren auf die Kernlokalisierung von PIP5K2 ist die Expression in Zwiebelepidermiszellen eher ungeeignet. Da PIP5K2-EYFP in Arabidiosiskeimlingen eher schwach exprimiert (Abbildung 2.14; Ischebeck et al., 2013), könnten diese Experimente in Protoplasten

durchgeführt werden. In weiterführende Experimente zur Regulation des Kernimports von PIP5K2 könnten auch andere posttranslationale Modifikationen wie z. B. Sumoylierung untersucht werden, da über diesen Mechanismus die Kernlokalisierung der humanen HsPIP5K1 α reguliert wird (Chakrabarti et al., 2015). Auch die Existenz von Kernexportsignalen (NES) und eine Proteininteraktion mit cytosolischen bzw. kernlokalisierten Proteinen könnten die Kernlokalisierung von PIP5K2 beeinflussen (Ciruela et al., 2000; Hinchliffe et al., 2002; Meier & Somers, 2011).

Ob die Kernlokalisierung von Arabidopsis PIP5K2 dazu dient wie die humane HsPIP5K1 α im Zellkern funktional aktiv zu sein (Chakrabarti et al., 2015) oder wie das Hefeenzym Mss4 primär als Speicherort plasmamembranassoziierter PI4P 5-Kinase dient (Audhya & Emr, 2003) ist bisher nicht bekannt. Um Hinweise auf eine mögliche Kernfunktion von PIP5K2 zu erhalten wurden im folgenden Komplementationsstudien mit PIP5K2_{AAA}-EYFP in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante durchgeführt.

3.6 Komplementationsstudien der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante mit PIP5K2-Varianten mit reduzierter Kernlokalisierung

Der Phänotyp der beschriebenen *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante ist durch starken Zwergwuchs, fehlende Apikaldominanz und Sterilität gekennzeichnet (Abbildung 1.8E; Ischebeck et al., 2013). Es ist reduziertes Wurzelwachstum und ein verkürztes Wurzelmeristem zu beobachten (Abbildung 1.7F-I; Ischebeck et al., 2013; Tejos et al., 2014). Der starke Wachstumsphänotyp ermöglichte es Komplementationsstudien mit PIP5K2-Varianten durchzuführen. Die Expression von PIP5K2-Varianten, für die reduzierte Kernlokalisierung in Zwiebelzellen beobachtet wurde, sollte Aufschluss über mögliche Kernfunktionen von PIP5K2 geben. Dazu wurden PIP5K2 und PIP5K2-Varianten mit reduzierter Kernlokalisierung, PIP5K2-NES_{PK1 α} und PIP5K2_{AAA} (Abbildung 2.11D und E) unter endogenem PIP5K2-Promotor in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante als EYFP-Fusion exprimiert. Die zugrundeliegende Hypothese dieser Experimente war, dass Phänotypen, die durch PIP5K2 aber nicht durch PIP5K2-NES_{PK1 α} und PIP5K2_{AAA} komplementiert werden können, auf kernlokalisierten Funktionen von PIP5K2 beruhen könnten.

Bei Fusion der starken NES_{PK1 α} an PIP5K2 wird der Kernexport von PIP5K2 verstärkt, nicht aber der Kernimport verhindert. Bei Expression von PIP5K2-NES_{PK1 α} in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante scheint die temporäre Kernlokalisierung auszureichen, um den Phänotyp im gleichen Ausmaß wie PIP5K2-EYFP zu komplementieren (Abbildung 2.15). Bei Expression von PIP5K2_{AAA}-EYFP, deren Kernimport durch die Modifizierung der endogenen NLS verhindert wird, konnte der Phänotyp der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante zum Teil komplementiert werden, jedoch nicht im gleichen Ausmaß wie bei Expression von PIP5K2-EYFP (Abbildung 2.16 bis Abbildung 2.23). Zu den noch am stärksten ausgeprägten Phänotypen gehört das verzögerte Wachstum der oberirdischen und unterirdischen Organe (Abbildung 2.16 bis 2.18, besonders in Linie L1, L7 und L23), welches in der Wurzel vermutlich durch eine andauernde Verkürzung des Meristems begründet ist (Abbildung 2.16C). Zudem ist der Blühzeitpunkt noch stark verzögert (Abbildung 2.19, in L1 und L7), die Blütenanlagen werden weniger häufig und weniger

symmetrisch angelegt (Abbildung 2.20, 2.21 und 2.23 in L1, L7, L15, L23 und L30) und die Schoten besitzen weniger Embryonen (Abbildung 2.20J-L, 2.22 und 2.23 vor allem in L1, L7 und L23). Außerdem ist die Blattsymmetrie verändert und die Anthocyaneinlagerungen in der Blattunterseite sind reduziert (Abbildung 2.18, insbesondere in L1, L7, L23 und L30). In einzelnen Fällen werden nicht alle Blütenorgane in der richtigen Anzahl gebildet (Abbildung 2.20F-H, tritt in allen Linien auf, verstärkt in L1 und L7) es kommt zur Verwachsungen einzelner Organe (Abbildung 2.22H, K und L, verstärkt in L1 und L7). Im Vergleich der fünf untersuchten Linien fällt auf, dass zum Teil große Unterschiede im Ausmaß der Komplementierung des *pip5k1 pip5k2*-Phänotyps zu beobachten sind und Linie L1 und L7 Phänotypen in besonders starker Ausprägung zeigen. In L15, L23 und L30 sind einzelne Phänotypen ausgeprägt. Da alle Phänotypen in mehreren Linien in unterschiedlicher Ausprägung auftreten, wurde angenommen, dass die Aminosäuresubstitution in PIP5K2_{AAA}-EYFP für den Phänotyp verantwortlich ist. Besonders in L1 und L7 auftretende Unterschiede zwischen einzelnen Pflanzen sind auffällig. Dabei ist die Ausprägung des Phänotyps nicht mit der PIP5K2_{AAA}-Transkriptmenge korrelierbar (Abbildung 2.24). Die Proteinmengen wurde nicht gemessen, da die Fluoreszenz von EYFP und PIP5K2-EYFP im Vergleich zu PIP5K2_{AAA}-EYFP und PIP5K2-NES_{PK1α}-EYFP nicht mikroskopisch detektiert werden konnte (Abbildung 2.14). Die verstärkte Fluoreszenzintensität an der Plasmamembran könnte jedoch auf eine erhöhte Proteinmenge der PIP5K2-Varianten mit reduzierter Kernlokalisierung hinweisen. In weiterführenden Experimenten sollten daher trotzdem die Proteingehalte einzelner *pip5k1 pip5k2* PIP5K2_{AAA}-EYFP-Pflanzen verglichen werden, um eine Korrelation von Phänotyp und Proteingehalt zu überprüfen. Auch könnten für PIP5K2_{AAA} homozygote Einzelinsertionsmutanten selektiert werden und getestet werden, ob die Unterschiede in der Phänotypausprägung innerhalb einer Linie reduziert werden können. Während bei Lokalisierungsstudien in Zwiebelepidermiszellen PIP5K2_{AAA}-EYFP noch zu 70 % im Zellkern zu beobachten war (Abbildung 2.11), kann in Arabidopsis-Wurzelzellen keine Kernlokalisierung mehr beobachtet werden (Abbildung 2.14). Jedoch wäre es möglich, dass individuelle Unterschiede in der verbleibenden Kernlokalisierung von PIP5K2_{AAA} in den einzelnen Pflanzen könnte ebenfalls zu dem variablen Phänotyp beitragen. Könnten in weiterführenden Studien PIP5K2-Varianten generiert werden, welche in Zwiebelepidermiszellen keine verbleibende Kernlokalisierung mehr zeigten, wäre es möglich, dass die Ergebnisse der Komplementierungsstudien durch gleichmäßigere Phänotypen eindeutiger würden. Neben Hinweisen auf verstärkte Expression und Lokalisierung an der Plasmamembran konnte für PIP5K2_{AAA}-EYFP zudem *in vitro* eine nicht signifikante aber tendenziell erhöhte PI4P 5-Kinaseaktivität gemessen werden (Abbildung 2.12). Camacho et al. (2009) zeigten für die starke Überexpression von YFP-PIP5K2 unter Kontrolle des *pCaMV35S*-Promotors in Arabidopsis einen ähnlichen Phänotyp wie der hier beobachtete Phänotyp der *pip5k1 pip5k2* PIP5K2_{AAA}-Linien. Bei Überexpression von YFP-PIP5K2 korrelierten hohe Proteinmengen mit stark verzögertem Wachstum der Rosette und der Infloreszenzen und sterilen Blüten (Camacho et al., 2009). Ob der Phänotyp der in dieser Arbeit untersuchten *pip5k1 pip5k2* PIP5K2_{AAA}-EYFP-Linien durch einen erhöhte PIP5K2-Proteinmenge an der Plasmamembran zurückzuführen ist, muss in weiteren

Experimenten untersucht werden. Jedoch führt die Expression von PIP5K2-NES_{PKI α} -EYFP (Abbildung 2.15) in *pip5k1 pip5k2* trotz erhöhter Plasmamembranlokalisierung zu einer ähnlichen Komplementation wie Wildtyp-PIP5K2-EYFP (Abbildung 2.17) und in *pip5k2* PIP5K2_{AAA}-EYFP L14* wird der Phänotyp der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante nicht verstärkt sondern zu großem Ausmaß komplementiert (Abbildung 2.16 bis 2.22). Ähnliche Phänotypen der YFP-PIP5K2-Überexpression in Wildtyp-Pflanzen (Camacho et al., 2009) und den in dieser Arbeit gezeigten *pip5k1 pip5k2* PIP5K2_{AAA}-EYFP-Linien (Abbildung 2.17) könnten daher auch durch eine allgemeine Fehlregulation zu Stande kommen, welche sowohl durch zu hohe als auch zu geringe nukleäre PtdIns(4,5)P₂-Gehalte vermittelt werden könnte (Saavedra et al., 2015).

Wegen des starken Einflusses von Auxin auf die Balance von Zellteilung und Zelldifferenzierung (Okada et al., 1991; Inzé & De Veylder, 2006; Carland & Nelson, 2009; Ischebeck et al., 2013; Tejos et al., 2014) und die PtdIns(4,5)P₂-abhängige Plasmamembran-Lokalisierung der Auxin-Efflux-Transporter PIN (Ischebeck et al., 2013) ist es wichtig, die Möglichkeit eingeschränkter cytosolischer Funktionen von PIP5K2_{AAA} nicht außer Acht zu lassen. PIP5K1 und PIP5K2 scheinen jedoch neben der Lokalisierung von PIN-Proteinen weitere Funktionen zu besitzen, da der pleiotrope Phänotyp der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante kein klassischer Phänotyp der PIN-Mutanten ist (Okada et al., 1991; Cheng et al., 2007; Ischebeck et al., 2013).

3.7 Hinweise auf kernlokalisierte Funktionen von PIP5K2 in der Kontrolle der Organentwicklung

Die Expression von PIP5K2_{AAA}, eine PIP5K2-Variante mit reduzierter Kernlokalisierung, komplementierte den Phänotyp der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante nicht vollständig (vgl. Abschnitt 3.6). Die verbliebenen Phänotypen könnten Hinweise auf mögliche kernlokalisierte Funktionen von PIP5K2 geben. *pip5k1 pip5k2* PIP5K2_{AAA}-EYFP-Pflanzen mit starkem Phänotyp bildeten wie *pin*- und *pid*-Mutanten mit schwacher phänotypischen Ausprägung weniger Blüten, die in nicht regelmäßiger Phyllotaxis angelegt waren; die resultierenden Blüten besaßen in *pip5k1 pip5k2* PIP5K2_{AAA} vereinzelt, in *pin*- und *pid*-Mutanten regelmäßig mehr als vier Blütenblätter (Abbildung 2.20B-D und Abbildung 2.21; Bennett et al., 1995; Benjamins et al., 2001; Trembl et al., 2005; Cheng et al., 2007; Kim et al., 2007; Lampugnani et al., 2013). Wie es vereinzelt für *pip5k1 pip5k2* PIP5K2_{AAA}-EYFP-Linien beobachtet wurde (Abbildung 2.18, weiße Sterne), besitzen auch *pin*- und *pid*-Mutanten verwachsene Blätter (Okada et al., 1991; Bennett et al., 1995; Benjamins et al., 2001; Lampugnani et al., 2013). Tejos et al. (2014) beschrieben, dass *pip5k1 pip5k2* vereinzelt Verwachsungen in sehr jungen Keimlingen zeigt, die zur Arretierung der Keimlingsentwicklung führen (Tejos et al., 2014). Möglicherweise sind die in *pip5k1 pip5k2* PIP5K2_{AAA}-EYFP-Pflanzen beobachtete Verwachsungen eine teilweise Komplementation des frühen Phänotyps der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante. Das verkürzte Wurzelmeristem der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante konnte durch die Expression von PIP5K2_{AAA}-EYFP im Vergleich zu PIP5K2-EYFP nur teilweise komplementiert werden (Abbildung 2.16). Meristematische Zellen beginnen sich bei Absenkung der Auxinkonzentration durch Reduktion der PIN-Expression im Leitgewebe zu differenzieren (Moubayidin et al., 2010). Demnach wäre

es möglich, dass die Verkürzung des Wurzelmeristems *pip5k1 pip5k2 PIP5K2_{AAA}-EYFP* auch auxinbedingt ist. Daher wäre es sehr wichtig in weiteren Experimenten die PIN-Lokalisierung in *pip5k1 pip5k2 PIP5K2_{AAA}-EYFP*-Pflanzen zu überprüfen. Entsprechend den Hinweisen auf auxinsensitive Elemente im Promotor von *PIP5K2* (Tejos et al., 2014) sind kernlokalisierte Funktionen von in der Verarbeitung von Auxinsignalen möglich. Die reduzierte Embryonenanzahl je Schote in *pip5k1 pip5k2 PIP5K2_{AAA}-EYFP* (Abbildung 2.23) wurde auch für den sukzessiven Verlust einzelner Allele von *PIP5K1* und *PIP5K2* gezeigt (Ugalde et al., 2016). Ugalde et al. (2016) diskutierten, dass dieser Phänotyp das Ergebnis auxinregulierter Prozesse sei und $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ Funktionen in der auxinabhängigen Genexpression besitzen könnte (Ugalde et al., 2016).

Um die auxinsensitive Genexpression in *pip5k1 pip5k2 PIP5K2_{AAA}-EYFP*-Pflanzen zu untersuchen, könnte die *pCycB1;1::CDB-GUS*-Markerlinie zur Detektion der Zellzyklusaktivität (vgl. Abbildung 2.2) und ein Reporterkonstrukt mit auxinsensitivem Promotor (*DR5*; Ischebeck et al., 2013) in diese Pflanzenlinien eingekreuzt werden, um deren Expression zu untersuchen. Spannend wäre es auch, zu untersuchen wie lokale temporäre Veränderungen der Auxinkonzentration in *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutanten die Expression auxinsensitiver Gene beeinflussen. Zur Erhöhung der Auxinbiosynthese könnten in der Wurzelspitze Auxinsynthesegene (Chandler, 2009) überexprimiert werden. Zur Reduktion der Auxinkonzentration könnte das bakterielle *iaaL*-Gen exprimiert werden, welches die Konjugation von Auxin mit Lysin zu nicht aktiven Verbindungen katalysiert (Zhao et al., 2001).

Weitere Hinweise auf kernlokalisierte Funktionen von *PIP5K2* in der Regulation der Genexpression ergeben sich aus der Verzögerung des Blühzeitpunkt der *pip5k1 pip5k2 PIP5K2_{AAA}-EYFP*-Pflanzen (Abbildung 2.19). Die Regulation des Übergangs von vegetativer zu reproduktiver Entwicklung (engl. *flower transition*) wird durch komplexe auxinunabhängige Veränderungen der Chromatinstruktur realisiert (Srikanth & Schmid, 2011). Mögliche Hinweise auf eine Beteiligung von PIs an der Regulation des Blühzeitpunkts und eine Verknüpfung epigenetischer Regulation mit dem PI-Stoffwechsel gibt die Regulation der Histonmethyltransferase *ARABIDOPSIS TRITHORAX1* (*ATX1*). *ATX1* katalysiert die Trimethylierung von Lysin 4 in Histon H3 (H3K4me3), welches die Expression von *FLOWERING LOCUS C* in der vegetativen Phase der pflanzlichen Entwicklung ermöglicht (Pien et al., 2008). Der PHD-Finger von *ATX1* bindet $\text{PtdIns}(5)\text{P}$, welches bei Erhöhung der $\text{PtdIns}(5)\text{P}$ -Menge an der Plasmamembran durch Salzstress zu einer reduzierten Kernlokalisierung von *ATX1* führt (Alvarez-Venegas et al., 2006a; Ndamukong et al., 2010). Auch die PHD-Finger von Arabidopsis *INHIBITOR OF GROWTH1* bindet H3K4me2 und H3K4me3 (Lee et al., 2009b) und PI-Monophosphate und $\text{PtdIns}(3,5)\text{P}_2$ (Alvarez-Venegas et al., 2006a). PHD-Finger wären demnach wahrscheinliche Kandidaten, um ein putatives nukläres PI-System mit epigenetischer Regulation zu verknüpfen.

In Kombination mit der Beobachtung, dass die *PI4P* 5-Kinaseaktivität der *HsPIP5K1 α* in Tabakzellkultur zu einer reduzierten Acetylierung von Lysin 9 in Histon H3 (H3K9Ac) führt (Dieck et al., 2012), scheint es das verschiedene Elemente der epigenetischen Regulation in pflanzlichen Zellen durch PIs beeinflusst werden

könnten. Durch ein evtl. nicht vollständig funktionsfähiges PI-System im Zellkern von *pip5k1 pip5k2* PIP5K2_{AAA}-EYFP-Pflanzen wäre es möglich, dass Funktionen PI-bindender Proteine gestört sind. Um zu untersuchen, ob PIs und PIP5K2 auch chromatinassoziiert vorliegen, könnten Chromatinfractionen bzw. durch Chromatin-Immünpräzipitation (ChIP) untersucht werden. Es könnte die PI-Bindung von PHD-Finger-enthaltender Proteine, die z. B. am Übergang von vegetativer zu reproduktiver Phase beteiligt sind, weiter untersucht werden und die Histonmodifikationen in *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante und Wildtyp verglichen werden. In ChIP-on-chip oder ChIP-Seq-Experimenten könnte die Position möglicher PI-bindender Proteinen mit DNA-Bindung lokalisiert werden, um zu erfahren, welche möglichen Zielgene durch PIs reguliert sein könnten.

Durch die partielle Komplementation der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante bei Expression von PIP5K2_{AAA}-EYFP gelang die Aufschlüsselung des pleiotropen Phänotyps der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante und erlaubte Spekulationen über mögliche kernlokalisierte Funktionen von PIP5K2. Die in *pip5k1 pip5k2* PIP5K2_{AAA}-EYFP verbliebenen auxinabhängigen Phänotypen, eröffnen in Kombination mit der Information, dass der Promotor von PIP5K2 auxinsensitive Elemente besitzt (Tejos et al., 2014) Möglichkeiten auf eine PIP5K2- bzw. PtdIns(4,5)P₂-regulierte auxinsensitive Genexpression. Hinweise auf Funktionen von PtdIns(4,5)P₂ und PIP5K2 in der epigenetischen Regulation ergaben sich durch den verzögerte Blühzeitpunkt der *pip5k1 pip5k2* PIP5K2_{AAA}-EYFP-Pflanzen.

3.8 PIP5K2 interagiert mit RBR1, ein Hinweis auf mögliche Funktionen von PIP5K2 im Zellkern

In Homologie zum tierischen System (Divecha et al., 2002) konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Arabidopsis PIP5K2 mit dem Zellzyklusregulator RBR1 in Hefe-Zwei-Hybrid-Studien interagiert (Abbildung 2.25). Durch Alaninsubstitutionen konnte die Interaktionsfläche auf das LxCxE-Motiv in PIP5K2 eingegrenzt werden (Abbildung 2.26), welches an der Proteinoberfläche liegt und somit für Proteininteraktionspartner zugänglich ist (Abbildung 2.27). Das LxCxE-Motiv ist ein klassisches RBR1-bindendes Motiv, welches auch die Bindung von Cyclinen, Transkriptionsfaktoren, Proteinkinasen und viralen Proteinen an RBR1 vermittelt (Arguello-Astorga et al., 2004; Henriques et al., 2010; Cruz-Ramírez et al., 2012; Matos et al., 2014). Sequenzanalysen zeigten, dass das LxCxE-Motiv von PIP5K2 auch in der ebenfalls ubiquitär exprimierten PIP5K1, und in der wurzelspezifisch exprimierten PIP5K3 bzw. pollenspezifisch exprimierten PIP5K4 konserviert ist (Abbildung 7.7A im Anhang). Dies ermöglicht eine Interaktion von RBR1 mit PI4P 5-Kinasen in jedem Gewebetyp. Da die humane HsPIP5K1 α an der Interaktionsfläche mit HsRb kein LxCxE-Motiv besitzt (Divecha et al., 2002), scheint die Interaktion von RBR1 an das LxCxE-Motiv von PI4P 5-Kinasen pflanzenspezifisch zu sein. Während im tierischen System der Einfluss der Interaktion von HsRb mit HsPIP5K1 α zu einer Steigerung der PI4P 5-Kinaseaktivität führt (Divecha et al., 2002), konnten in *in vitro*-Aktivitätstests dieser Arbeit keine Hinweis darauf gefunden werden, dass die PIP5K2-Aktivität bei Koinkubation mit RBR1 moduliert wird (Abbildung 2.29).

Die in früheren, bisher unveröffentlichten Studien gezeigte Reduktion der Zellteilung im Wurzelmeristem der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante (Abbildung 2.2) führt zu der Frage in wieweit sich reduzierte PI-Gehalte auf bekannte Funktionen von pflanzlichem RBR1 auswirken. Um die Funktionalität von RBR1 in der Zellzykluskontrolle zu bestimmen, wurde der Phosphorylierungsstatus von RBR1 untersucht. Die beobachtete Reduktion des RBR1-Proteingehalt und der RBR1-Phosphorylierung in *pip5k1 pip5k2*-Keimlingen kann aufgrund einer evtl. weniger optimalen Referenzgröße nur als Hinweis angesehen werden, dass die RBR1-Homöostase bei fehlender PIP5K1 und PIP5K2 verändert sein könnte (Abbildung 2.30). Durch den starken Phänotyp der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante ist eine passende Referenzgröße nicht ohne weiteres zu bestimmen. Ist eine passende Referenz gefunden, sollte der Hinweis auf veränderte RBR1-Regulation weiter untersucht werden. Im Gegensatz zu den hier gewonnenen Daten, zeigten Dieck et al. (2012), dass die Überexpression der humanen *HsPIP5K1α* in Tabakzellkultur zu einem erhöhten $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -Gehalt führt, und dies mit einer reduzierten RBR1-Phosphorylierung korreliert (Dieck et al., 2012). Diese Ergebnisse schließen sich nicht zwingend aus, da es auch möglich sein könnte, dass die humane PI4P 5-Kinase mit den endogenen Arabidopsis PI4P 5-Kinasen konkurriert und es so zu einer Verknappung von $\text{PtdIns}(4)\text{P}$ kommt. RBR1-Funktionen in der Meristemorganisation scheinen nicht durch das Fehlen von PIP5K1 und PIP5K2 beeinflusst zu sein, da die Gewebestruktur des Wurzelmeristems in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp keine Veränderungen zeigte (Abbildung 2.31).

In vielen der für RBR1 beschriebenen Funktionen bildet RBR1 ein *scaffold* für Chromatin-bindende und Chromatin-modifizierende Enzyme und trägt damit zur zielgerichteten Veränderung der Chromatinstruktur bei (Matos et al., 2014; Kuwabara & Grissem, 2014). Die in dieser Arbeit gezeigten Hinweise für eine Bindung von RBR1 an PI-Monophosphate (Abbildung 2.28) ermöglicht es daher, die in Abschnitt 3.7 bereits diskutierte Verknüpfung von PI-System und pflanzlicher Chromatinregulation aufzugreifen (Alvarez-Venegas et al., 2006a; Lee et al., 2009b; Ndamukong et al., 2010). Für RBR1 wurde z. B. eine Interaktion mit MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1, einem Protein, das WD40-Wiederholungen enthält, gezeigt (Jullien et al., 2008). MSI1 ist Bestandteil des *Polycomb Repressive Complex 2*, einem Multiproteinkomplex, der Histon H3 Lysin 27 trimethyliert und bei Interaktion mit RBR1 am Ende der weiblichen Gametogenese zur Repression der Expression von METHYLTRANSFERASE 1 führt (Jullien et al., 2008). Auch für MSI4 wurde eine Interaktion mit RBR1 gezeigt (Ausín et al., 2004). Sowohl *msi1*- als auch *msi4*-Mutanten zeigen einen verspäteten Blühzeitpunkt (Ausín et al., 2004), wobei gezeigt wurde, dass MSI1 und MSI4 in unterschiedlichen Signalwegen der epigenetischen Regulation des Blühzeitpunkts eine Rolle spielen (Ausín et al., 2004; Bouveret et al., 2006). In Kombination mit dem Auftreten der Blühzeitpunktverzögerung in Pflanzen mit (temporär) reduzierten RBR1-Gehalten (Borghi et al., 2010) und bei Expression einer PIP5K2-Variante mit reduzierter Kernlokalisation in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante (*pip5k1 pip5k2 PIP5K2_{AAA}-EYFP*) (Abbildung 2.19), wäre es möglich, dass auch die Interaktion von PIP5K2 mit RBR1 und die PI-Bindung von RBR1 in der epigenetischen Regulation der

Gexpression eine Rolle spielen könnte. Neben den in Abschnitt 3.7 vorgeschlagenen Experimenten zur Untersuchung der Chromatinassoziation von PIs und PIP5K2, könnte man die Histonmodifikationen bei fehlender PIP5K2 und RBR1 vergleichen und evtl. weitere Modifikationen des PI-Systems ebenfalls in dieser Hinsicht untersuchen. Die Chromatinstruktur wird, wie bereits erwähnt, durch Multiproteinkomplexe reguliert (Kuwabara & Grussem, 2014). Durch *in vivo* Immunoprecipitationsstudien mit PIP5K2 und anschließender massenspektrometrischen Detektion wäre es vielleicht möglich, über die Identifizierung weiterer interagierender Proteine die Interaktion von PIP5K2 und RBR1 im Kontext der epigenetischer Regulation einzuordnen.

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente zeigen, dass PIP5K2 mit RBR1 interagiert und deren Interaktion vermutlich isoformspezifisch über ein LxCxE-Motiv in der katalytischen Domäne von PI4P 5-Kinasen vermittelt wird. RBR1 bindet wahrscheinlich nicht nur PI4P 5-Kinasen, sondern auch PI-Monophosphate. Durch die Funktion von RBR1 als *scaffold* in der Regulation der Chromatinregulation könnten die Ergebnisse dieser Arbeit Hinweise auf eine mögliche Vernüpfung eines nuklären PI-Systems mit der RBR1-anhängigen Genexpression geben.

4 Zusammenfassung

Phosphoinositide (PIs) sind Phosphoglycerolipide mit Signalfunktion, die in geringen Mengen in eukaryotischen Membranen vorkommen. Durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung unterschiedlicher Hydroxylgruppen der Inositolkopfgruppe können eine Vielzahl unterschiedlicher PIs synthetisiert und ineinander umgewandelt werden. Funktional am besten untersucht ist PtdIns(4,5)P₂, welches von PI4P 5-Kinasen gebildet wird. Die PI4P 5-Kinase PIP5K2 aus Arabidopsis und das von ihr gebildete PtdIns(4,5)P₂ haben beschriebene Funktionen beim gerichteten intrazellulären Vesikeltransport, der für die Entwicklung und das Wachstum von Arabidopsis eine Rolle spielt. Neben den gut charakterisierten cytosolischen Funktionen von PIs, wird auch ein kernlokalisiertes PI-System bei Pflanzen angenommen, allerdings sind die Hinweise darauf limitiert. Fluoreszenzmarkierte PIP5K2 wurde wiederholt neben der bekannten Plasmamembran-assoziierten und cytosolischen Lokalisierung in Zellkernen meristematischer Wurzelzellen beobachtet. In dieser Arbeit wurden unter Verwendung von *in vivo*-Fluoreszenzreportern und durch Immundetektion die PIs PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P₂ in Zellkernen von Arabidopsis detektiert. Weiterhin wurden Kernlokalisierungssequenzen (NLS I bis NLS VI) von PIP5K2 identifiziert und charakterisiert, und eine Interaktion von PIP5K2 mit α -Importinen untersucht. Von den sechs bioinformatisch vorhergesagten NLS waren NLS IV und NLS VI notwendig und hinreichend, um den Transport eines großen Cargoproteins, bestehend aus zwei mCherry-Fluoreszenzproteinen fusioniert an die große Untereinheit von RubisCO, in den Zellkern zu vermitteln. Die Substitution der basischen Aminosäurereste von NLS IV resultierte in einer reduzierten Kernlokalisierung des mCherry-RubisCO-Cargoproteins und einer PIP5K2_{AAA}-Variante in Zwiebelepidermiszellen. In Hefe-Zwei-Hybridstudien interagierte PIP5K2 mit den α -Importinen IMP α 3, IMP α 4 und IMP α 6. Die Interaktion wurde am Beispiel von IMP α 6 im Dotblot bestätigt. Die Daten legen den Schluss nahe, dass PIP5K2 über einen aktiven, α -Importin-abhängigen Import in den Zellkern transportiert wird, und dass PIP5K2 neben cytoplasmatischen auch kernlokalisierte Funktionen besitzt. Um die funktionale Relevanz der Kernlokalisierung von PIP5K2 zu untersuchen, wurde die NLS-Substitutionsvariante PIP5K2_{AAA} in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante exprimiert. Die Komplementationsstudie mit der vermindert kernlokalisierten PIP5K2-Variante zeigte, dass der ausgeprägte Entwicklungsphänotyp der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante durch die Expression von PIP5K2_{AAA} nur teilweise komplementiert werden kann. Zukünftige Studien werden zeigen, ob die verbleibenden Phänotypen der mit PIP5K2_{AAA} transformierten Doppelmutante, wie z.B. verzögerte und gestörte Blütenentwicklung und reduziertes Wurzelwachstum, mit der reduzierten Kernlokalisierung von PIP5K2_{AAA} zusammenhängen. Um Hinweise auf die Natur möglicher Kernfunktionen von PIP5K2 zu erhalten, wurde in dieser Arbeit ein möglicher Zusammenhang zwischen kernlokalisierter PIP5K2 und der Zellteilungsmaschinerie untersucht. Vorangegangene Studien unserer Gruppe wiesen darauf hin, dass

Arabidopsis *pip5k1 pip5k2*-Keimlinge eine reduzierte Zellteilung aufweisen. Der Hauptregulator der Zellteilung ist bei Eukaryoten das Protein Retinoblastoma 1, dem in Arabidopsis das Protein Retinoblastoma-related 1 (RBR1) entspricht. Die Ergebnisse von Hefe-Zwei-Hybridstudien und Dotblots zeigen eine physische Interaktion von PIP5K2 mit RBR1. Viele Proteine, z. B. CyclinD, interagieren mit RBR1 über ein LxCxE-Aminosäuremotiv. Ein entsprechendes Sequenzmotiv konnte auch bei PIP5K2 identifiziert werden. Aminosäuresubstitution des LxCxE-Motivs zu AxAxA in PIP5K2 führte zu einer reduzierten Interaktion zwischen PIP5K2 und RBR1, was die Vermutung zulässt, dass PIP5K2 über dieses Motiv an RBR1 bindet. Ein Modell der Tertiärstruktur von PIP5K2 weist darauf hin, dass das LxCxE-Motiv an der Proteinoberfläche liegt, und somit tatsächlich für Protein-Protein-Interaktionen zugänglich ist. Die beobachtete Interaktion von PIP5K2 mit RBR1 und die Bindung von RBR1 an PI-Monophosphate weist auf eine Verknüpfung von nukleärem PI-System und der RBR1 hin. Anschließende Studien werden im Detail klären müssen, welche Funktion die Interaktion zwischen PIP5K2 und RBR1 im Detail auf Zellteilung, Chromatinstruktur oder die Entwicklung hat.

5 Material und Methoden

Für alle Experimente wurden sterilisierte Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße genutzt. Alle Lösungen wurden mit MilliQ-Wasser angesetzt.

5.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle Chemikalien wurden, soweit deren Bezugsquelle im Text nicht spezifiziert wird, von den Firmen Sigma-Aldrich (München, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder AppliChem (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Organische Lösungsmittel wie Chloroform, Methanol, Ethanol und Isopropanol wurden bei Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder VWR (Darmstadt, Deutschland) erworben.

5.2 Geräte

Die in dieser Arbeit genutzten Zentrifugen sind die Zentrifuge 5424, 5417R und 5810R, hergestellt von der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland). Für große Volumen bzw. höhere Drehzahlen wurden die Kühlzentrifuge Avanti J-25 mit den Rotoren JA 10 oder JA 25-50 (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) benutzt. Weitere genutzte Geräte sind in der Beschreibung der jeweiligen Methode erwähnt.

5.3 Enzyme und Größenstandards

Die Restriktionsenzyme Ascl, BamHI, BsrGI, ClaI, EcoRI-HF[®], NotI-HF[®], Sall-HF[®], SfiI und XhoI wurden von New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland) erworben und nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

Die Bezugsquellen weiterer Enzyme und Kits werden im Text der jeweiligen Methode angeführt.

Die Größenstandards GeneRuler 1 kb DNA Ladder, PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Katalognummer: 26614) und PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10 bis 180 kDa, Katalognummer: 26616) wurden von Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) bezogen.

5.4 Mikroorganismen

Die in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen sind in Tabelle 5.1 aufgelistet.

Tabelle 5.1 Eigenschaften der verwendeten Mikroorganismen

Organismus	Stamm	Genotyp	erhalten von	Verwendung
<i>Escherichia coli</i>	NEB5α	<i>fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland	Plasmid-Vermehrung
<i>E. coli</i>	DE3.1	<i>F- gyrA462 endA1 glnV44 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) ara14 galk2 lacY1 proA2 rpsL20(Smr) xyl5 Δleu mtl1</i>	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland	Vermehrung ccdB-exprimierender Gateway-Plasmide
<i>E. coli</i>	BL21-AI	<i>F ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm araB::T7RNAP-tetA</i>	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland	Proteinexpression
<i>E. coli</i>	Rosetta 2 (DE3)	<i>F ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pRARE2 (Cam^R)</i>	Novagene, Merck, Darmstadt, Deutschland	Proteinexpression
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	AGL-0	C58 <i>pTiBo542; recA::bla</i> , T-Region deletiert <i>Mop(+)</i> <i>Cb(R)</i>	Lazo et al., 1991	Transformation von Pflanzenzellen
<i>A. tumefaciens</i>	GV3101	C58 <i>Rif(R)</i> mit Expressionskassette für p19 zur Stabilisierung von mRNA	Dr. Katharina Bürstenbinder, IPB Halle	Infiltration von Pflanzen-Epidermiszellen
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NMY51	<i>MATa, his3Δ200, trp1-901, leu2-3,112, ade2, LYS2::(lexAop)4-HIS3, ura3::(lexAop)8-lacZ (lexAop)8-ADE2 GAL4</i>	Dualsystems Biotech, Zürich, Schweiz	Durchführung der Hefe-Zwei-Hybrid-Tests

5.5 Pflanzen

Die in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen sind in Tabelle 5.2 aufgelistet.

Tabelle 5.2 Eigenschaften der verwendeten Pflanzen

Name	Art	Transgen	erhalten von
Arabidopsis Wildtyp	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh. Ökotyp Columbia-0	-	Prof. Dr. Ingo Heilmann
PH _{PLC6} -EYFP	<i>A. thaliana</i> Col-0	exprimieren die PtdIns(4,5)P ₂ -bindende PH-Domäne der humanen PLC6 als EYFP-Fusion unter Kontrolle des <i>pCaMV35S</i> -Promotors	Dr. Irene Stenzel
<i>pip5k1</i>	<i>A. thaliana</i> Col-0	T-DNA-Insertion in <i>PIP5K1</i> (SALK_146728)	Ischebeck et al., 2013
<i>pip5k2</i>	<i>A. thaliana</i> Col-0	T-DNA-Insertion in <i>PIP5K2</i> (SALK_012487)	Ischebeck et al., 2013
<i>pip5k1 pip5k2</i>	<i>A. thaliana</i> Col-0	aus Kreuzung der Einzelmutanten hervorgegangene Doppelmutante mit T-DNA-Insertionen in <i>PIP5K1</i> und <i>PIP5K2</i> (SALK_146728 und SALK_012487)	Ischebeck et al., 2013

<i>pip5k1 pip5k2</i> <i>pPIP5K2::EYFP</i>	<i>A. thaliana</i> Col-0	exprimiert EYFP unter Kontrolle des endogenen <i>PIP5K2</i> -Promotors (<i>pPIP5K2</i>)	in dieser Arbeit erstellt
<i>pip5k1 pip5k2</i> <i>pPIP5K2::PIP5K2-EYFP</i>	<i>A. thaliana</i> Col-0	exprimiert EYFP-markierte <i>PIP5K2</i> unter Kontrolle des endogenen <i>PIP5K2</i> -Promotors (<i>pPIP5K2</i>).	Ischebeck et al., 2013
<i>pip5k1 pip5k2</i> <i>pPIP5K2::PIP5K2-NES_{PKIα}-EYFP</i>	<i>A. thaliana</i> Col-0	exprimiert eine EYFP-markierte <i>PIP5K2</i> -NES _{PKIα} -Fusion unter Kontrolle des endogenen <i>PIP5K2</i> -Promotors (<i>pPIP5K2</i>)	in dieser Arbeit erstellt
<i>pip5k1 pip5k2</i> <i>pPIP5K2::PIP5K2_{AAA}-EYFP</i>	<i>A. thaliana</i> Col-0	exprimiert eine EYFP-markierte <i>PIP5K2</i> -Variante, in der funktionale Aminosäuren der NLS IV zu Alanin ausgetauscht sind, unter Kontrolle des endogenen <i>PIP5K2</i> -Promotors (<i>pPIP5K2</i>)	in dieser Arbeit erstellt
<i>pWOX5::ER-GFP</i>	<i>A. thaliana</i> Col-0	exprimiert ein, am ER-fixiertes GFP unter Kontrolle des Dexamethason-induzierbaren <i>WOX5(GVG/UAS)</i> -Promotors (<i>pWOX5</i>) und wird als Marker für das ruhende Zentrum des Wurzelmeristems verwendet. Basta ^R	Sarkar et al., 2007, erhalten von Prof. Dr. Thomas Laux
<i>pip5k1 pip5k2</i> <i>pWOX5::ER-GFP</i>	<i>A. thaliana</i> Col-0	Kreuzung von <i>pip5k1 pip5k2</i> mit <i>pWOX5::ER-GFP</i>	in dieser Arbeit erstellt
Tabak	<i>Nicotiana benthamiana</i> Domin	-	erhalten von Dr. Marco Trujillo, IPB Halle

5.6 Kulturmedien

Medien wurden bei 121°C für 20 min autoklaviert. Ausnahmen sind mit einem Stern (*) markiert und wurden für 15 min autoklaviert. Die unterstrichenen Komponenten wurden erst nach dem Autoklavieren hinzugefügt.

5.6.1 Bakterienmedien

Die Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Medien zur Anzucht von Bakterien sind in Tabelle 5.3 beschrieben. Zur Herstellung von Festmedien wurde vor dem Autoklavieren 1,5 % Micro-Agar (w/v) hinzugefügt.

Tabelle 5.3 Bakterienmedien

Chemikalie	LB-Medium	SOC-Medium	2-YT-Medium*	YEB-Medium*
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)	0,5 % (w/v)	1 % (w/v)	0,1 % (w/v)
BD Bacto™ Trypton	1 % (w/v)	2 % (w/v)	1,6 % (w/v)	-
NaCl	0,5 % (w/v)	10 mM	0,5 % (w/v)	-
KCl	-	2,5 mM	-	-
MgCl ₂	-	10 mM	-	-
MgSO ₄	-	10 mM	-	5 mM
Glukose	-	20 mM	-	-
Fleischextrakt	-	-	-	0,5 % (w/v)
Saccharose	-	-	-	0,5 % (w/v)

5.6.2 Hefemedien

Die Zusammensetzung des Hefe-Vollmediums (YPAD-Medium) und des Selektionsmediums (SD-Medium), und die für das Selektionsmedium benötigte Aminosäurestammlösung ist in Tabelle 5.4 beschrieben. Für die Herstellung von Festmedium wurde vor dem Autoklavieren 2 % (w/v) Micro-Agar hinzugefügt.

Tabelle 5.4 Hefemedien

YPAD-Medium* (Vollmedium)		SD-Medium* (Selektionsmedium)	
Hefeextrakt	1 % (w/v)	Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren und ohne Ammoniumsulfat (Difco, Detroit, USA)	0,17 % (w/v)
BD Bacto™ Trypton	2 % (w/v)	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 % (w/v)
NaCl	0,5 % (w/v)	Glukose	2 % (w/v)
Adenin-Hemisulfat	40 mg/l	Aminosäure-Stammlösung (ohne LW, LWH bzw. LWHA)	1x
Glukose	2 % (w/v)		

10x Aminosäure-Stammlösung ohne Leucin und Tryptophan (-LW, zur Selektion auf Transformaten)

Chemikalie	Konzentration	Chemikalie	Konzentration
L-Adenin-Hemisulfat	200 mg/l	L-Phenylalanin	500 mg/l
L-Arginin HCl	200 mg/l	L-Threonin	2000 mg/l
L-Histidin HCl Monohydrat	200 mg/l	L-Tyrosin	300 mg/l
L-Isoleucin	300 mg/l	L-Uracil	200 mg/l
L-Lysin HCl	300 mg/l	L-Valin	1500 mg/l
L-Methionin	200 mg/l	L-Serin	200 mg/l

Eine 10x Aminosäure-Stammlösung ohne Leucin, Tryptophan und Histidin (-LWH) bzw. ohne Leucin, Tryptophan, Histidin und Adenin (-LWHA) wurde für den Test auf Interaktion hergestellt.

5.6.3 Pflanzenmedium

Die Zusammensetzung des Pflanzenmediums Murashige & Skoog-Medium (½ MS-Medium) ist in Tabelle 5.5 beschrieben. Der pH-Wert wurde mit KOH auf 5,6 eingestellt. Für die Herstellung von Festmedium wurde vor dem Autoklavieren 0,8 % (w/v) Micro-Agar hinzugefügt.

Tabelle 5.5 ½ MS-Medium*

MS-Medium inkl. modifizierter Vitamine (Duchefa, Haarlem, Niederlande)	2,2 g/l
Saccharose	1 % (w/v)

5.6.4 Medienzusätze

Von den verwendeten Medienzusätzen (Tabelle 5.6) wurden Stammlösungen hergestellt und bei -20 °C gelagert. DL-Phosphinotricin wurde bei 4°C gelagert.

Tabelle 5.6 **Eingesetzte Konzentrationen verschiedener Medienzusätze**

Substanz	bezogen von	Stammlösung	Endkonzentration zu Selektion von:	
			Bakterien	Pflanzen
Carbenicillin (Carb)	Duchefa, Haarlem, Niederlande	100-500 mg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml
Kanamycin (Kan)	Duchefa, Haarlem, Niederlande	50 mg/ml	50 µg/ml	-
Rifampicin (Rif)	Duchefa, Haarlem, Niederlande	100 mg/ml in Methanol	100 µg/ml	-
DL-Phosphinotricin (Basta)	PESTANAL®, Sigma-Aldrich, München, Deutschland	10 mg/ml	-	10 µg/ml
Dexamethason (Dex)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	2 mg/ml (ca. 5 mM)	-	1 µM

5.7 Vektoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren sind in Tabelle 5.7 beschrieben.

Tabelle 5.7 **Eigenschaften der zur Klonierung und Proteinexpression verwendeten Vektoren**

Vektor	Selektionsmarker	Bezugsquelle	Eigenschaften
pEntryA	<i>Amp^R</i>	Dr. Mareike Heilmann, MLU Halle-Wittenberg	Basiert auf pUC18. Enthält zwei SfiI-Schnittstellen (SfiIA und SfiIB) für die gerichtete Klonierung von Promotoren. Abwärts der Promotor-Schnittstelle befindet sich eine Mehrfachklonierungsstelle (mcs). Abwärts der mcs die Sequenz des PolyA-Terminators der Octopin-Synthase vom Ti-Plasmid aus <i>A. tumefaciens</i> (ocs, MacDonald et al., 1991). Flankiert wird diese Klonierungskassette von <i>attL1</i> (5'-Ende) und <i>attL4</i> (3'-Ende) zur dualen Gateway-Reaktion mit pEntryD in Gateway-Zielvektoren.
pEntryD	<i>Amp^R</i>	Dr. Mareike Heilmann, MLU Halle-Wittenberg	Basiert auf pUC18. Enthält zwei SfiI-Schnittstellen (SfiIA und SfiIB) für die gerichtete Klonierung von Promotoren. Abwärts der Promotor-Schnittstelle befindet sich eine mcs. Abwärts der mcs die Sequenz des PolyA-Terminators der Octopin-Synthase vom Ti-Plasmid aus <i>A. tumefaciens</i> (ocs, MacDonald et al., 1991). Flankiert wird diese Klonierungskassette von <i>attR4</i> (5'-Ende) und <i>attL2</i> (3'-Ende) zur dualen Gateway-Reaktion mit pEntryA in Gateway-Zielvektoren.
pEntryA- <i>pCaMV35S</i>	<i>Amp^R</i>	Dr. Mareike Heilmann, MLU Halle-Wittenberg	Basiert auf pEntryA. Die mcs befindet sich unter Kontrolle des <i>CaMV35S</i> -Promotors.

pEntryA- <i>pCaMV35S::EYFP</i>	<i>Amp^R</i>	Dr. Mareike Heilmann, MLU Halle-Wittenberg	Basiert auf pEntryA. Unter Kontrolle des <i>CaMV35S</i> -Promotors befindet sich die mcs mit <i>EYFP</i> , das über die Schnittstellen XhoI und BamHI eingebracht wurde.
pEntryA- <i>pCaMV35S::PIP5K2-EYFP</i>	<i>Amp^R</i>	Dr. Mareike Heilmann, MLU Halle-Wittenberg	Basiert auf pEntryA. Unter Kontrolle des <i>CaMV35S</i> -Promotors befindet sich die mcs mit den cDNAs von <i>PIP5K2</i> und <i>EYFP</i> , die über die Schnittstellen AscI und XhoI bzw. XhoI und BamHI eingebracht wurden.
pEntryD- <i>pCaMV35S::mC</i>	<i>Amp^R</i>	Dr. Mareike Heilmann, MLU Halle-Wittenberg	Basiert auf pEntryA. Unter Kontrolle des <i>CaMV35S</i> -Promotors sich die mcs mit <i>mCherry</i> , das über die Schnittstellen Sall und XhoI eingebracht wurde.
pMDC123	<i>Kan^R</i> ; In Pflanzen: <i>Basta^R</i>	Curtis und Grossniklaus, 2003	Gateway-Zielvektor zur Pflanzentransformation mit <i>attR1</i> und <i>attR2</i> zum Einbringen von Expressionskassetten Gateway-kompatibler EntryA- und EntryD-Vektoren. Zwischen <i>attR1</i> und <i>attR2</i> befinden sich die cDNA für <i>Cm^R</i> und <i>ccdB</i> . Die Klonierungskassette und die cDNA für <i>Basta^R</i> unter Kontrolle des <i>pCaMV35S</i> sind von linker und rechter Begrenzungssequenz (<i>left border</i> , LB und <i>right border</i> , RB) umschlossen, welche die Agrobakterienvermittelte Transformation in das pflanzliche Genom ermöglichen.
pMAL-c5g	<i>Amp^R</i>	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor. Unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren T7-Promotorsystems befindet sich <i>malE</i> (codiert für MBP), abwärts folgt eine mcs in die cDNAs eingefügt werden können.
pGEX-4T-1	<i>Amp^R</i>	GE Healthcare, München, Deutschland	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor. Unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren tac-Promotors befindet sich <i>GST</i> , abwärts folgt eine mcs in die cDNAs eingefügt werden können.
pGEX-6P-1	<i>Amp^R</i>	GE Healthcare, München, Deutschland	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor. Unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren tac-Promotors befindet sich <i>GST</i> , abwärts folgt eine mcs in die cDNAs eingefügt werden können.
pBT3-C- <i>OST4</i>	<i>Kan^R</i> ; in Hefe: <i>LEU2</i>	Dualsystems Biotech, Zürich, Schweiz Modifiziert von Dr. Mareike Heilmann, MLU Halle-Wittenberg	Basierend auf pBT3-C. Aufwärts der mcs wurde <i>OST4</i> über eine XbaI-Schnittstelle eingebracht. <i>OST4</i> codiert für die Oligosaccharyl-Transferase 4, ein ER-Membran-Protein (4 kDa). Abwärts folgt der mcs die cDNA des C-terminalen Teils von Ubiquitin (<i>Cub</i> , Aminosäuren 34-76), und der des Transkriptionsfaktors LexA-VP16. Die Expressionskassette wird durch den CYC1-Promotor und -Terminator reguliert.

5.8 Wachstumsbedingungen zur Anzucht von Arabidopsis

Zur Vorkultivierung wurden Arabidopsis-Pflanzen steril auf ½ MS-Medium (Abschnitt 5.6.3) angezogen. Dazu wurden die Samen in 6 % Natrium-Hypochlorid mit 0,1 % Triton X-100 für 8 bis 10 min sterilisiert, dreimal mit sterilem Wasser gewaschen, in 0,1 % Agarose aufgenommen und auf ½ MS-Medium ausgelegt. Zur Stratifizierung der Samen wurden die Platten zunächst für drei Tage bei 4 °C inkubiert. Die Pflanzen wurden dann in Conviron A1000 bzw. Percival AR-66L2-Anzuchtsschränken unter Langtagbedingungen (7000 Lux, 16h Licht/8h Dunkelheit, 21°C/18°C) vertikal angezogen. Die fünf bis

sieben Tage alten Keimlinge wurden dann entweder für Experimente genutzt oder auf Erde umgesetzt. Die Erde wurde aus Substrat 1 (Klasmann-Deilmann GmbH, Geeste, Deutschland), Perlite und Vermiculit in den Anteilen 8:1:1 gemischt, mit Wasser befeuchtet und vor Verwendung 8 h bei 80 °C gedämpft. Auf Erde wuchsen die Pflanzen für weitere drei Wochen in Conviron A1000 bzw. Percival AR-66L2-Anzuchtsschränken angezogen, bevor sie ins Gewächshaus oder die Pflanzenkammer umgestellt wurden. Dort wuchsen die Pflanzen immer unter Langtag-Lichtverhältnissen. Tabak-Pflanzen wurden in gedämpftem Substrat 1 ohne Zusätze unter Langtag-Lichtverhältnissen in der Pflanzenkammer angezogen.

5.9 Präparation von RNA, DNA und cDNA aus biologischen Proben

5.9.1 Isolierung von RNA aus Arabidopsis

100 - 200 mg Pflanzenmaterial wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert. Das entstandene Pulver wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 1 ml Trizol (38 % Phenol, gesättigt mit 0,1 M Citrat-Puffer [pH 4,3] (Sigma-Aldrich, München, Deutschland); 0,8 M Guanidiniumthiocyanat, 0,4 M Ammoniumthiocyanat, 133,6 mM Na-Acetat [pH 5,0] und 5 % Glycerin) auf Eis aufgetaut und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer bei 20000 g und 4 °C für 10 min sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 200 µl Chloroform versetzt und 15 s mit der Hand ausgeschüttelt. Die Proben wurden 2 - 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut für 15 min zentrifugiert. Die wässrige Oberphase wurde abgenommen, mit jeweils einem halben Probenvolumen Isopropanol und *high salt precipitation buffer* (0,8 M Na-Citrat, 1,2 M NaCl) versetzt, durch Invertieren gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Niederschlag wurde zweimal mit je 900 µl 75 % Ethanol gewaschen. Die RNA im Niederschlag wurde für kurz bei 65°C getrocknet und in 30 µl H₂O resuspendiert.

5.9.2 Isolierung von genomischer DNA aus Arabidopsis

Pflanzenmaterial wurde in 2 ml Reaktionsgefäßen mit je drei Glaskugeln (Ø 3mm) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in der Schwingmühle TissueLyserII (Qiagen, Hilden, Deutschland) fein gemörsert (3 min, 30 Hz). Das entstandene Pulver wurde in 250 µl CTAB-Extraktionspuffer (2 % (w/v) Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB), 100 mM Tris-HCl [pH 8,0], 20 mM EDTA [pH 8,0], 1,4 M NaCl) mit 2 % (v/v) β-Mercaptoethanol aufgetaut. Die Proben wurden für 20 min bei 65 °C inkubiert, anschließend mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) versetzt und gründlich gemischt. Zur Phasentrennung wurde das Gemisch für 3 min bei 7500 g zentrifugiert. Die wässrige, obere Phase wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 1/20 Probenvolumen CTAB/NaCl-Lösung (10 % (w/v) CTAB, 0,7 % (w/v) NaCl, auf 65°C vorgewärmt) versetzt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA

wurde durch Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol gefällt. Die Proben wurden bei 20000 *g* für 10 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die sedimentierte DNA mit 100 µl 75 %-igem (v/v) Ethanol gewaschen. Nach Abnehmen des Ethanols wurde die DNA bei Raumtemperatur getrocknet und in 30 µl H₂O gelöst.

5.9.3 Auftrennung von DNA und RNA in Agarosegelen

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden 1 %-ige oder 2 %-ige Agarosegele für die horizontale Agarosegelelektrophorese in Agarosegel-Kammern Mini (cti, Idstein, Deutschland) verwendet. Als Gel- und Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA) genutzt. Den DNA-Proben wurden vor dem Auftragen 1/5 Probenvolumen Probenpuffer (60 % (v/v) Glycerin, 0,4 % (w/v) Orange G, 0,03 % (w/v) Bromphenolblau, 0,03 % (w/v) Xylen Cyanol PP) zugesetzt. Zur Kontrolle von RNA wurde 1 µl RNA mit 3 µl Probenpuffer versetzt. Als Größenstandard wurden stets 0,5 µg GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 120 bis 150 V durchgeführt. Zur Detektion der DNA-Banden wurden die Gele mit Ethidiumbromid (10 µg/ml in H₂O) gefärbt und im Gel-Detektionssystem Gel iX Imager (INTAS, Göttingen, Deutschland) detektiert und dokumentiert.

5.9.4 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentrationen von DNA und RNA wurden entweder in gefärbten Agarosegelen anhand des eingesetzten Größen- und Mengenstandards abgeschätzt oder mit Hilfe eines Spektrophotometers (Ultrospec 3000 UV/Vis-Spektrophotometer, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) gemessen.

5.9.5 cDNA-Synthese

Zur cDNA-Synthese wurden die RNA-Konzentration aller verwendeten Proben auf die der geringsten Konzentration angeglichen und zur cDNA-Synthese mit dem RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Wurde in Vorbereitung eines qPCR-Experiments die cDNA von Pflanzen hergestellt, die bereits mit einem cDNA-Konstrukt transformiert wurden (z.B. komplementierte Mutanten), wurde der Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit mit dsDNase (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) verwendet.

5.10 Quantifizierung von Transkriptmengen mittels *real-time* PCR (qPCR)

Real-time PCR (qPCR) ist eine Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren, die auf der Methode der Polymerase-Kettenreaktion beruht (PCR, Abschnitt 5.11.1) und durch Anwesenheit eines dsDNA-bindenden Farbstoffs die Quantifizierung des gebildeten Produkts während der Vervielfältigung ermöglicht. Die Primer für die qPCR wurden über die online-Software Primer-BLAST (National Center of

Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, MD, USA, Ye et al., 2012) unter den Vorgaben erstellt, dass die Primer eine Exon-Exon-Grenze überspannen und ein Fragment von 70 - 150 bp amplifizieren sollen (Anhang Tabelle 7.2). Als Referenz dienten die Transkriptmengen von UBC10. In jeder qPCR-Reaktion wurden ca. 100 ng cDNA (je 2 µl, Abschnitt 5.9.5) und je 1 µM Primer in 1x Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) in einem Gesamtvolumen von 15 µl eingesetzt. Die Reaktion wurde im qPCR-Thermocycler Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Das PCR-Programm war wie folgt: Initiale Denaturierung bei 95 °C für 10 min, gefolgt von 45 Zyklen bei 95 °C für 10 s, Anlagerung der Primer (*annealing*) bei 60 °C für 15 s, Elongation 72 °C für 20 s. Im Anschluss an das eigentliche qPCR-Programm wurde eine Schmelzkurve der Primer erstellt. Dazu stieg die Temperatur von 72 °C auf 99 °C (1 °C/s). Die Daten wurden exportiert, mit dem Programm LinRegPCR (Ramakers et al., 2003) analysiert und die Transkriptmenge der einzelnen Transkripte auf den Transkriptgehalt von UBC10 normalisiert.

5.11 Molekularbiologische Methoden

5.11.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die selektive Amplifikation von Sequenzen genomischer DNA oder cDNA wurde mit Hilfe spezifischer Primer durch Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) erreicht.

Klonierungs-PCR

Zur Amplifikation von DNA, die für Klonierungszwecke genutzt werden sollte, wurde die Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) nach Herstellerangaben genutzt. Der 50 µl Reaktionsansatz durchlief im Thermocycler TProfessional (Biometra, Göttingen, Deutschland) vorprogrammierte Temperaturzyklen. Nach einer initialen Denaturierung bei 98 °C für 30 s folgten 35 Zyklen: Denaturierung bei 98 °C für 30 s, Anlagerung der Primer (*annealing*) zwischen 55 °C und 65 °C für 30 s, Elongation 72 °C für 1 min/kb. Es folgte eine finale Elongation bei 72°C für 2 min.

Genotypisierungs-PCR

Zum Nachweis bestimmter DNA-Sequenzen in pflanzlicher genomischer DNA wurden Genotypisierungs-PCRs durchgeführt. Durch spezifische Primer können unterschiedliche T-DNA-Insertionen nachgewiesen werden. Für diese PCR wurde die Hot *Taq*-DNA-Polymerase (Peqlab, VWR, Dresden, Deutschland) genutzt. Das verwendete PCR-Programm war: Initiale Denaturierung bei 96 °C für 3 min, gefolgt von 36 Zyklen bei jeweils 96 °C für 15 s, Anlagerung der Primer (*annealing*) bei 58 °C für 30 s, Elongation 72 °C für 4 min mit einer finalen Elongation bei 72°C für 4 min. Der 20 µl Reaktionsansatz wurde nach Herstellerangaben angesetzt, wobei die Primerkonzentration, mit Ausnahme für den Nachweis des PIP5K1-Wildtypallels, verzehnfacht wurde. Verschiedene Primerkombinationen wurden zur Identifikation der Wildtyp-Allele

(*PIP5K1*: Primerkombination a; *PIP5K2*: Primerkombination c) und T-DNA-Insertionen (*pip5k1*: Primerkombination b; *pip5k2*: Primerkombination d) eingesetzt. Zur Identifikation der T-DNA-Insertionen *pPIP5K2::EYFP* wurde auf die cDNA von EYFP und den ocs-Terminator genotypisiert (Primerkombination e). Zur Identifikation der T-DNA-Insertionen *pPIP5K2::PIP5K2-EYFP*, *pPIP5K2::PIP5K2_{AAA}-EYFP*, und *pPIP5K2::PIP5K2-NES_{PK1α}-EYFP* wurde die cDNA-Fusion von PIP5K2 und EYFP genotypisiert (Primerkombinationen f). Die PCR für Primerkombinationen e und f wurde wie beschrieben durchgeführt, wobei die Elongationszeit auf 2 min reduziert wurde. Die verwendeten Primer sind im Anhang zu finden (Tabelle 7.1).

5.11.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) aus *E. coli*-Zellen isoliert. Die DNA, die für den Teilchenbeschluss von Zwiebelzellen genutzt wurde, wurde mit dem NucleoSpin® Plasmid (NoLid) Kit (Macherey-Nagel, Berlin, Deutschland) isoliert. Eluiert wurde die DNA mit 50 µl H₂O.

5.11.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Restrigierte Vektoren und PCR-Produkte, die zur Ligation (Abschnitt 5.11.5 und 5.14) oder Fusions-PCR (Abschnitt 5.14) eingesetzt werden sollten, wurden aus Agarose-Gelen ausgeschnitten und mit Hilfe des GeneJET Gel-Extraktionskits (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) nach Herstellerangaben aus dem Gelstück isoliert. Die Elution erfolgte mit 22 µl H₂O.

5.11.4 Restriktion von DNA

Plasmid-DNA und PCR-Produkte wurden mit verschiedenen Restriktionsenzymen (Abschnitt 5.3) in den entsprechenden Puffern bei der enzymabhängigen optimalen Reaktionstemperatur enzymatisch verdaut. Zur Kontrolle von Plasmiden, wurden 1 - 1,5 µg Plasmid-DNA in 20 µl Reaktionsvolumen für 1 h inkubiert. Zur Klonierung wurden aufgereinigte PCR-Produkte in 30 µl bzw. 2 - 3 µg Plasmid-DNA in 50 µl Reaktionsvolumen für 3 h - 15 h verdaut.

5.11.5 Ligation

Zur Ligation von verdauten DNA-Fragmenten in Vektoren wurde die T4-DNA-Ligase (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) nach Herstellerangaben eingesetzt.

5.11.6 Präparation chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen (modifiziert nach Inoue et al., 1990) wurden 50 ml SOC-Medium mit dem entsprechenden *E. coli*-Stamm angeimpft und über Nacht bei 30 °C geschüttelt. Mit dieser 50 ml Übernachtskultur wurden 500 ml SOC-Medium (OD₆₀₀ ≈ 0,05) angeimpft und bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,6 angezogen. Die Zellsuspension wurde auf 50 ml Reaktionsgefäße

verteilt und bei 3320 *g* und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellsediment in jeweils 15 ml vorgekühltem Transformationspuffer (10 mM PIPES [pH 6,7], 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, nach dem Autoklavieren Zugabe von 55 mM MnCl₂) resuspendiert. Die Suspension wurde für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Gesamtheit der Zellen in insgesamt 40 ml Transformationspuffer resuspendiert und nach Zugabe von 7 % DMSO für weitere 5 - 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde aliquotiert (300 - 500 µl), sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

5.11.7 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* wurden kompetente Zellen (Abschnitt 5.11.6) auf Eis aufgetaut. Transformiert wurden entweder Ligationsansätze (Abschnitt 5.11.5) oder 0,1 - 1 µl isolierte Plasmid-DNA (Abschnitt 5.11.2). Nach Zugabe von 100 µl kompetenter Zellen zu dem entsprechenden Plasmid wurde der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Nach 45 s Hitzeschock bei 42 °C wurden die Zellen auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 900 µl LB-Medium zur Expression der Antibiotikaresistenz für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Transformationsansätze von Ligationen vollständig bzw. von isolierter Plasmid-DNA nur 50 µl des jeweiligen Ansatzes auf LB-Platten mit entsprechender Antibiotikaselektion (Abschnitt 0) plattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

5.11.8 Überprüfung der erstellten Plasmide durch Sequenzierung

Die erstellten Plasmide wurden zur Überprüfung der eingebrachten Sequenzen bei GATC-biotech (Konstanz, Deutschland) sequenziert.

5.11.9 Gateway®-Klonierung

Gateway®-kompatible pEntryA- und pEntryD-Vektoren wurden mittels Gateway-Reaktion den Gateway-Zielvektor pMDC123 überführt (Abschnitt 5.7). Dazu wurden in einem Gesamtvolumen von 10 µl jeweils 1 µl Plasmid-DNA (Abschnitt 5.11.2) eines pEntryA-Konstrukts, eines pEntryD-Konstrukts und des Zielvektors pMDC123 gemischt. Durch Zugabe von 6 µl 1xTE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) und 1 µl Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) wurde die Reaktion gestartet und für ca. 16 h bei Raumtemperatur inkubiert.

5.11.10 Herstellung und Transformation chemisch-kompetenter *A. tumefaciens*

Zur Transformation chemisch-kompetenter *A. tumefaciens* nach Lazo et al. (1991) wurden 12 ml YEB-Medium mit *A. tumefaciens*-Zellen inokuliert und am folgenden Tag mit dieser Kultur 300 ml YEB-Medium angeimpft. Nach ca. 4 h bei 30 °C und 180 rpm war eine Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,5 erreicht und die Zellen wurden in 50 ml Reaktionsgefäßen für 20 min bei 3300 *g* und 4 °C zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in jeweils 10 ml 0,15 M NaCl gewaschen. Das Zellsediment wurde dann in je 1 ml eiskaltem 75 mM

CaCl₂ resuspendiert und zu 200 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden 200 µl kompetenter *A. tumefaciens*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, 5 µl von isolierter Plasmid-DNA (Abschnitt 5.11.2) dazugeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz für 5 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei 37 °C wieder aufgetaut. Nach Zugabe von 1 ml YEB-Medium wurden die Ansätze für 3 h bei 30 °C inkubiert. Die Transformationsansätze wurden anschließend vollständig auf YEB-Medium ausplattiert, welches zur Selektion Rifampicin (Selektion der Agrobakterien) und Kanamycin (Selektion des Vektors) enthielt, und für zwei bis drei Tage bei 28 °C inkubiert.

5.11.11 Transformation von Arabidopsispflanzen durch *A. tumefaciens*

Ausgewählte Pflanzen (Transformationsgeneration 0, T₀) wurden durch das Eintauchen von Blüten in Agrobakterien-Suspension transformiert (*floral dip*-Methode nach Clough & Bent, 1998). Dazu wurden mit frisch transformierten *A. tumefaciens*-Zellen (Stamm AGL-0, Abschnitt 5.11.10) 50 ml YEB-Medium mit Rifampicin (Selektion der Agrobakterien) und Kanamycin (Selektion des Vektors) angeimpft und über Nacht bei 30 °C angezogen. Mit dieser Vorkultur wurde am folgenden Tag eine 300 ml YEB-Kultur auf eine Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,1 bis 0,2 inokuliert. Diese wuchs bei 30 °C bis zu einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,8 bis 1,0. Die Zellen wurden bei 4000 g und 4 °C für 30 min geerntet, der Überstand entfernt und die Zellen mit 7 % Saccharose gewaschen. Die Zellen wurden in frischer 7 % Saccharose-Lösung aufgenommen und auf eine OD₆₀₀ = 0,8 bis 1,0 eingestellt. Die Zellsuspension (ca. 300 ml) wurde für 20 min auf Eis gekühlt und 30 µl Silwet-L77 (OSI Specialties, Danbury, CT, USA) hinzugefügt. In diese Transformationslösung wurden die Blütenstände, der zu transformierenden Arabidopsispflanzen für ca. 5 s eingetaucht. Nach dem Tauchen wurden die Blütenstände ganz leicht zusammengedrückt, um die Transformationseffizienz der Agrobakterien durch leichte Verletzungen an den Blüten zu erhöhen. Die transformierten Pflanzen wurden am nächsten Tag zurück in die Pflanzenkammer gebracht.

5.11.12 Selektion transformierter Arabidopsispflanzen

Die Transformationseffizienz der „Flower-Dip“-Methode liegt bei ca. 1 % (Clough & Bent, 1998). Zur Selektion transformierter *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutanten wurden die Samen der T₁-Generation sterilisiert und auf ½ MS-Medium ausgelegt, das sowohl Carbenicillin (zum Abtöten der vorhandenen Agrobakterien) als auch DL-Phosphinothricin (Selektion des transformierten Vektors) enthielt. Überlebende Keimlinge wurden auf Erde transferiert (Abschnitt 5.8) und im Alter von drei Wochen genotypisiert (Abschnitt 5.11.1).

5.12 Bioinformatische Datenbankvergleiche und Sequenzanalysen

Sequenzen wurden über die Gen- und Proteindatenbanken von NCBI (National Center of Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA) abgerufen. Die Sequenzvergleiche von DNA- und Proteinsequenzen erfolgten durch das Programm MultAlin (Corpet, 1988; <http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>) und wurden durch Boxshade 3.21 visualisiert (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). Die bioinformatischen Analysen nach α -Importin-abhängigen Kernlokalisierungssignalen in der Aminosäuresequenz von PIP5K2 wurden mit folgenden Programmen durchgeführt:

cNLSmapper (http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi; Kosugi et al., 2009b),

NLStradamus (<http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus/>; Nguyen Ba et al., 2009),

SeqNLS (<http://mleg.cse.sc.edu/seqNLS/>; Lin et al., 2013),

NucPred (<https://www.sbc.su.se/~maccallr/nucpred/cgi-bin/single.cgi>; Brameier et al., 2007).

Die Identifikation der PIP5K2-Orthologen erfolgte durch Protein-BLAST der Arabidopsis von NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>, National Center of Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA; Altschul et al., 1990).

5.13 3D-Strukturmodell von PIP5K2

Das 3D-Strukturmodell der PIP5K2 wurde von Katharina Jungnickel und PD Dr. Iris Thondorf (AG Molecular Modelling, MLU Halle-Wittenberg) auf Grundlage der Röntgenkristallstruktur der humanen PIP4KII β (PDB: 1BO1) erstellt. Aus diesem Grund konnten nur die Teile der PIP5K2 modelliert werden, die evolutionär zwischen pflanzlichen PI4P 5-Kinasen und der humanen PIP4KII β konserviert sind. Das vorhandene PIP5K2-Modell enthält die Aminosäuren 353-605 und 674-754. Im Modell nicht enthalten sind die N-terminalen Domänen (AS 1-352) und Teile des variablen Inserts der katalytischen Domäne (AS 606-673). Die grafische Darstellung wurde in PyMol erstellt (PyMOL™ 0.99rc6, DeLano Scientific LLC, Palo Alto, CA, USA).

5.14 Klonierungsstrategie für verwendete cDNA-Klone

Die Primer, die zu Erstellung der folgenden Plasmide genutzt wurden sind im Anhang in Tabelle 7.3 aufgelistet.

5.14.1 PIP5K2-Fusionskonstrukte

Zur Erstellung von RubisCO-PIP5K2-EYFP-Fusionskonstrukten wurde die cDNA-Sequenz der großen Untereinheit von RubisCO (*RbcL*, AtCg00490) über PCR mit der Primerkombination RbcL.Sall.for und RbcL.+1.Ascl.rev von cDNA amplifiziert. Dabei wurden durch die verwendeten Primer Sall- bzw. Ascl-Restriktionsschnittstellen an das 5'- bzw. 3'-Ende der DNA-Sequenzen eingebracht. Nach Verdau der

Vektoren pEntryA-*pCaMV35S::EYFP* (Abschnitt 5.7) und pEntryA-*pCaMV35S::PIP5K2-EYFP* und des PCR-Produkts mit Sall und Ascl wurde die *Rbcl*-cDNA in die Vektoren ligiert. Die entstehenden Plasmide sind pEntryA-*pCaMV35S::Rbcl-EYFP* und pEntryA-*pCaMV35S::Rbcl-PIP5K2-EYFP* (Tabelle 5.8).

Zur Erstellung von verkürzten PIP5K2-Varianten wurde die cDNA der N-terminalen Domänen von PIP5K2 (Aminosäuren 1-343, *PIP5K2₁₋₃₄₃*) mit den Primern PIP5K2.Ascl.for und PIP5K2_343.XhoI.rev amplifiziert. Die cDNA der C-terminalen Domänen (Dimerisierungs- und katalytische Domäne, Aminosäuren 344-754, *PIP5K2₃₄₄₋₇₅₄*) wurden mit den Primern PIP5K2_344.Ascl.for und PIP5K2.XhoI.rev amplifiziert. Die PCR-Produkte und der Vektor *pCaMV35S::Rbcl-EYFP* wurden mit den Restriktionssenzymen Ascl und XhoI enzymatisch verdaut und die PCR-Produkte jeweils in den Vektor ligiert. Entstanden sind die Konstrukte pEntryA-*pCaMV35S::Rbcl-PIP5K2₁₋₃₄₃-EYFP* und pEntryA-*pCaMV35S::Rbcl-PIP5K2₃₄₄₋₇₅₄-EYFP* (Tabelle 5.8).

Zur Erstellung des PIP5K2-NES_{PKI α} -EYFP- und des PIP5K2-NLS_{SV40}-EYFP-Fusionskonstrukts, wurden Fusionsprimer erstellt, die die Sequenz der NES aus PKI α (Hauer et al., 1999) bzw. der NLS aus SV40 (Kalderon et al., 1984) enthielten und zusätzlich abwärts dieser Signalsequenzen komplementär zu *EYFP* waren. Mit diesen Primern (PKI α -NES-EYFP.XhoI.for bzw. SV40NLS-EYFP.XhoI.for) wurde jeweils in Kombination mit dem Primer EYFP.BamHI.rev *NES_{PKI α} -EYFP* bzw. *NLS_{SV40}-EYFP* amplifiziert. Der Vektor pEntryA-*pCaMV35S* und die PCR-Produkte wurden mit den Restriktionssenzymen XhoI und BamHI verdaut und durch Ligation von *NES_{PKI α} -EYFP* bzw. *NLS_{SV40}-EYFP* in den linearisierten Vektor entstanden die Vektoren pEntryA-*pCaMV35S::NES_{PKI α} -EYFP* und pEntryA-*pCaMV35S::NLS_{SV40}-EYFP* (Tabelle 5.8). Die cDNA von PIP5K2 wurde mit Hilfe der Primer PIP5K2.Ascl.for und PIP5K2.XhoI.rev von vorhandenen Vektoren mittels PCR amplifiziert und nach Restriktionsverdau mit Ascl und XhoI in die ebenfalls geschnittenen Vektoren pEntryA-*pCaMV35S::NES_{PKI α} -EYFP* und pEntryA-*pCaMV35S::NLS_{SV40}-EYFP* ligiert um die Vektoren pEntryA-*pCaMV35S::PIP5K2-NES_{PKI α} -EYFP* und pEntryA-*pCaMV35S::PIP5K2-NLS_{SV40}-EYFP* zu erhalten (Tabelle 5.8).

Tabelle 5.8 **Erstellte Plasmide zur Untersuchung der subzellulären Lokalisierung von PIP5K2-Fusionskonstrukten**

Name	Bemerkung
pEntryA- <i>pCaMV35S::Rbcl-EYFP</i>	zur transienten Expression in Zwiebelepidermiszellen
pEntryA- <i>pCaMV35S::Rbcl-PIP5K2-EYFP</i>	zur transienten Expression in Zwiebelepidermiszellen
pEntryA- <i>pCaMV35S::Rbcl-PIP5K2₁₋₃₄₃-EYFP</i>	zur transienten Expression in Zwiebelepidermiszellen
pEntryA- <i>pCaMV35S::Rbcl-PIP5K2₃₄₄₋₇₅₄-EYFP</i>	zur transienten Expression in Zwiebelepidermiszellen
pEntryA- <i>pCaMV35S::PIP5K2-NES_{PKIα}-EYFP</i>	zur transienten Expression in Zwiebelepidermiszellen
pEntryA- <i>pCaMV35S::PIP5K2-NLS_{SV40}-EYFP</i>	zur transienten Expression in Zwiebelepidermiszellen

5.14.2 RubisCO-mCherry-NLS-mCherry-Reporter

Zur Untersuchung der bioinformatisch vorhergesagten NLS (Abschnitt 5.12) wurde ein RubisCO-mCherry-NLS-mCherry-Reportersystem erstellt, dass auf dem Vektor pEntryA-*pCaMV35S* (Abschnitt 5.7) basiert. Die cDNA der großen Untereinheit von RubisCO (*Rbcl*) wurde mit Hilfe der Primer Rbcl.Sall.for und

RbcL.+1.AscI.rev von vorhandenen Vektoren mittels PCR amplifiziert und nach Restriktionsverdau mit Sall und AscI in den ebenfalls geschnittenen Vektor pEntryA-pCaMV35S ligiert. Die cDNA-Sequenz von mCherry wurde mit den Primern mCherry.AscI.for und mCherry.XhoI.rev mittels PCR amplifiziert und über die Restriktionsstellen AscI und XhoI in den Vektor eingefügt, sodass der Vektor pEntryA-pCaMV35S::RbcL-mCherry entstand. Die cDNA-Sequenzen der untersuchten Kernlokalisierungssignale von PIP5K2 wurden individuell durch PCR über Fusionsprimer an das 5'-Ende einer weiteren mCherry-cDNA angefügt (NLSI-mCherry.XhoI.for, NLSII-mCherry.XhoI.for, NLSIII-mCherry.XhoI.for, NLSIV-mCherry.XhoI.for, NLSV-mCherry.XhoI.for, NLSVI-mCherry.XhoI.for jeweils in Kombination mit dem Primer mCherry.BamHI.rev). Der 5'-Fusionsprimer fügte eine XhoI-Schnittstelle an das 5'-Ende der PCR-Produkte ein, der 3'-Primer eine XhoI-Schnittstelle an das 3'-Ende des PCR-Produkts, sodass das PCR-Produkt nach Restriktionsverdau als XhoI/BamHI-Fragment in den Vektor pEntryA-pCaMV35S::RbcL-mCherry eingefügt werden konnte. In gleicher Weise wurden die Sequenzen der mutierten NLSIV und NLSVI mit den Fusionsprimern NLS IV AAA-mCherry.XhoI.for und NLS VI AAAA-mCherry.XhoI.for in Kombination mit dem Primer mCherry.BamHI.rev an mCherry angefügt und in den Vektor eingefügt. Die daraus resultierenden Vektoren pEntryA-pCaMV35S::RbcL-mCherry-NLS_{PIP5K2}-mCherry sind in Tabelle 5.9 beschrieben.

Zur Positivkontrolle wurde die NLS von SV40 genutzt. Als Negativkontrolle diente die Aminosäuresequenz EGREAEA, die auf einer Sequenz basiert, die keine subzelluläre Lokalisierung vermittelt (McCartney et al., 2004). Die für diese Sequenzen codierenden cDNA-Sequenzen wurden in einer PCR mit Hilfe der Fusionsprimer NLS SV40-mCherry.XhoI.for bzw. Kontrollsequenz-mCherry.XhoI.for und dem Primer mCherry.BamHI.rev an mCherry angefügt. Nach XhoI/BamHI-Restriktion wurden das NLS_{SV40}-mCherry- bzw. Kontrollsequenz-mCherry-Fragment in den Vektor pEntryA-pCaMV35S::RbcL-mCherry eingefügt, um die Plasmide pEntryA-pCaMV35S::RbcL-mCherry-NLS_{SV40}-mCherry und pEntryA-pCaMV35S::RbcL-mCherry-Kontrollsequenz-mCherry zu erstellen (Tabelle 5.9).

Tabelle 5.9 Erstellte Plasmide zur Untersuchung der subzellulären Lokalisierung von bioinformatisch vorhergesagten NLS

Name	Bemerkung
pEntryA-pCaMV35S:: RbcL-mCherry-NLS I-mCherry	zur transienten Expression in Zwiebelepidermiszellen
pEntryA-pCaMV35S:: RbcL-mCherry-NLS II-mCherry	zur transienten Expression in Zwiebelepidermiszellen
pEntryA-pCaMV35S:: RbcL-mCherry-NLS III-mCherry	zur transienten Expression in Zwiebelepidermiszellen
pEntryA-pCaMV35S:: RbcL-mCherry-NLS IV-mCherry	zur transienten Expression in Zwiebelepidermiszellen
pEntryA-pCaMV35S:: RbcL-mCherry-NLS V-mCherry	zur transienten Expression in Zwiebelepidermiszellen
pEntryA-pCaMV35S:: RbcL-mCherry-NLS VI-mCherry	zur transienten Expression in Zwiebelepidermiszellen
pEntryA-pCaMV35S:: RbcL-mCherry- NLS IV _{AAA} -mCherry	zur transienten Expression in Zwiebelepidermiszellen
pEntryA-pCaMV35S:: RbcL-mCherry- NLS VI _{AAAA} -mCherry	zur transienten Expression in Zwiebelepidermiszellen
pEntryA-pCaMV35S:: RbcL-mCherry-SV40NLS-mCherry	zur transienten Expression in Zwiebelepidermiszellen
pEntryA-pCaMV35S:: RbcL-mCherry-Kontrollsequenz-mCherry	zur transienten Expression in Zwiebelepidermiszellen

5.14.3 Erstellung von mutierten PIP5K2-Varianten

Zur Erstellung der Aminosäuresubstitutionsvariante PIP5K2_{AAA} wurde die cDNA-Sequenz von PIP5K2 so mutiert, dass die Substitutionen R271A, K272A und R273A codiert sind und die Vektoren pEntryA-*pCaMV35S::PIP5K2_{AAA}-EYFP* und pEntryA-*pCaMV35S::PIP5K2_{AAA}-NES_{PK1α}-EYFP* erhalten wurden. Mutagenisiert wurde die PIP5K2-Sequenz durch Mutageneseprimer und Fusions-PCR. Dazu wurden Primer erstellt, die für die mutierte DNA-Sequenz codieren und am 5'- und 3'-Ende der ersten, respektive letzten Mutation jeweils 20 bp angefügt, die vollständig der PIP5K2-Sequenz entsprechen: PIP5K2_NLS IV AAA.for und PIP5K2_NLS IV AAA.rev. Diese Mutagenese-Primer wurden in zwei unabhängigen PCRs eingesetzt. Mit Hilfe der Primer PIP5K2.AscI.for und PIP5K2_NLS IV AAA.rev wurde der 5'-Teil der PIP5K2-cDNA durch PCR von einem bereits vorhandener PIP5K2-cDNA amplifiziert. PIP5K2_NLS IV AAA.for und PIP5K2.XhoI.rev wurde der 3'-Teil der PIP5K2-cDNA durch PCR von einem bereits vorhandener PIP5K2-cDNA amplifiziert. Daraus ergaben sich zwei Fragmente von PIP5K2, deren Sequenzen sich um die Länge der Mutageneseprimer überlappen. Eine Kombination beider PIP5K2-Fragmente in einer Fusions-PCR führte zu einer Anlagerung der sich überlappenden Regionen beider PIP5K2-Fragmente. Die DNA-Polymerase erkannte diese Überlagerung als Primer und Matrize und füllte die PIP5K2-cDNA vollständig auf. Diese cDNA dienen im weiteren Verlauf der Reaktion die Matrize zur Amplifikation mit den Primern PIP5K2.AscI.for und PIP5K2.XhoI.rev. Das resultierende PCR-Produkt *PIP5K2_{AAA}* wurden wie die Plasmide pEntryA-*pCaMV35S::PIP5K2-EYFP* und pEntryA-*pCaMV35S::PIP5K2-NES_{PK1α}-EYFP* (beide Abschnitt 5.14.1) mit AscI und XhoI enzymatisch verdaut, wobei aus den Plasmiden *PIP5K2* entfernt wurden, sodass in der folgenden Ligation *PIP5K2_{AAA}* eingefügt werden konnte um die Konstrukte pEntryA-*pCaMV35S::PIP5K2_{AAA}-EYFP* und pEntryA-*pCaMV35S::PIP5K2_{AAA}-NES_{PK1α}-EYFP* zu erhalten (Tabelle 5.10).

Tabelle 5.10 **Erstellte Plasmide zur Untersuchung der subzellulären Lokalisierung von PIP5K2-Varianten mit Aminosäuresubstitutionen in der funktionalen NLS**

Name	Bemerkung
pEntryA- <i>pCaMV35S::PIP5K2_{AAA}-EYFP</i>	zur transienten Expression in Zwiebelepidermiszellen
pEntryA- <i>pCaMV35S::PIP5K2_{AAA}-NES_{PK1α}-EYFP</i>	zur transienten Expression in Zwiebelepidermiszellen

5.14.4 Erstellte Konstrukte für Hefe-Zwei-Hybrid-Studien

Zur Klonierung von Köder-Konstrukten wurde der Vektor pBT3-C-*OST4* genutzt (Abschnitt 5.7). Als Köder dienten *PIP5K2* und *RBR1*. Um die cDNAs der Köder sowohl 5' im Leserahmen mit *OST4* als auch 3' im Leserahmen mit der C-terminalen Hälfte des Ubiquitin und dem Transkriptionsfaktor LexA-VP16 zu klonieren, wurden durch die Primerwahl die Schnittstellen SfiIA (5') und SfiIB (3') und zwischen Schnittstelle und cDNA am 5'-Ende eine und am 3'-Ende zwei Basen eingefügt. *PIP5K2* und *RBR1* wurden mit der Primerkombination PIP5K2.OST4.SfiIA.for und PIP5K2.OST4.SfiIB.rev für *PIP5K2* und RBR1.OST4.SfiIA.for und RBR1.OST4.SfiIB.rev für *RBR1* amplifiziert, mit SfiI geschnitten und in pBT3-C-*OST4* ligiert, um die Konstrukte pBT3C-*OST4-PIP5K2* und pBT3C-*OST4-RBR1* zu erhalten (Tabelle 5.11).

Zur Klonierung der Beute-Konstrukte wurde der Vektor pPR3N genutzt (Abschnitt 5.7). Als Beute dienten zum einen *IMPα1*, *IMPα2*, *IMPα3*, *IMPα4* und *IMPα6* zum anderen *PIP5K2* und *PIP5K2_{AxAxA}*. *IMPα1*, *IMPα2*, *IMPα3*, *IMPα4* und *IMPα6* wurden mit den Primern IMPA1.SfiIA.for und IMPA1.+2.SfiIB.rev IMPA2.SfiIA.for und IMPA2.+2.SfiIB.rev, IMPA3.SfiIA.for und IMPA3.+2.SfiIB.rev, IMPA4.SfiIA.for und IMPA4.+2.SfiIB.rev bzw. IMPA6.SfiIA.for und IMPA6.+2.SfiIB.rev amplifiziert, mit SfiI geschnitten und jeweils in den Vektor pPR3N ligiert. Dadurch wurden die Konstrukte pPR3N-*IMPα1*, pPR3N-*IMPα2*, pPR3N-*IMPα3*, pPR3N-*IMPα4* und pPR3N-*IMPα6* erhalten. *PIP5K2* wurde mit der Primerkombination PIP5K2.SfiIA.for und PIP5K2.SfiIB.rev amplifiziert, mit SfiI geschnitten und ebenfalls in pPR3N ligiert, um das Konstrukt pPR3N-*PIP5K2* zu erhalten (Tabelle 5.11).

Die Substitution des LxCxE-Motivs von *PIP5K2* (*PIP5K2_{AxAxA}*) wurde analog zur Klonierung von *PIP5K2_{AAA}* (Abschnitt 0) durchgeführt: mit Hilfe der Primerkombinationen PIP5K2.SfiIA.for und PIP5K2_AxAxA.rev bzw. PIP5K2_AxAxA.for und PIP5K2.SfiIB.rev wurden jeweils der 5'-Teil bzw. 3'-Teil der *PIP5K2*-cDNA amplifiziert, wobei die Mutageneseprimer PIP5K2_AxAxA.for und PIP5K2_AxAxA.rev die Mutationen einbrachten, die die Aminosäuresubstitution L524A, C526A und E528A codierten. Beide Amplifikate wurden zur Fusions-PCR mit den Primern PIP5K2.SfiIA.for und PIP5K2.SfiIB.rev eingesetzt. Nach Restriktion des entstandenen PCR-Produkts mit SfiI wurde das Fragment in den Vektor pPR3N ligiert um das Konstrukt pPR3N-*PIP5K2_{AxAxA}* zu erhalten (Tabelle 5.11).

Tabelle 5.11 **Verwendete Plasmide zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen im Hefe-Zwei-Hybrid-System**

Name	Bemerkung
pAl- <i>Alg5</i>	Beute-Positiv-Kontrolle im Split-Ubiquitin-basierten Hefe-zwei-Hybrid-System, Dualsystems Biotech, Zürich, Schweiz
pDL2- <i>Alg5</i>	Beute-Negativ-Kontrolle in im Split-Ubiquitin-basierten Hefe-zwei-Hybrid-System, Dualsystems Biotech, Zürich, Schweiz
pBT3C- <i>OST4-PIP5K2</i>	Köder im Split-Ubiquitin-basierten Hefe-Zwei-Hybrid-System
pBT3C- <i>OST4-RBR1</i>	Köder im Split-Ubiquitin-basierten Hefe-Zwei-Hybrid-System
pPR3N- <i>IMPα1</i>	Beute im Split-Ubiquitin-basierten Hefe-Zwei-Hybrid-System
pPR3N- <i>IMPα2</i>	Beute im Split-Ubiquitin-basierten Hefe-Zwei-Hybrid-System
pPR3N- <i>IMPα3</i>	Beute im Split-Ubiquitin-basierten Hefe-Zwei-Hybrid-System
pPR3N- <i>IMPα4</i>	Beute im Split-Ubiquitin-basierten Hefe-Zwei-Hybrid-System
pPR3N- <i>IMPα6</i>	Beute im Split-Ubiquitin-basierten Hefe-Zwei-Hybrid-System
pPR3N- <i>PIP5K2</i>	Beute im Split-Ubiquitin-basierten Hefe-Zwei-Hybrid-System
pPR3N- <i>PIP5K2_{AxAxA}</i>	Beute im Split-Ubiquitin-basierten Hefe-Zwei-Hybrid-System

5.14.5 Konstrukte zur Proteinexpression in *E. coli*

MBP-PIP5K2-Varianten

Zur Expression von PIP5K2-Varianten wurde der Vektor pMAL-c5g verwendet (Abschnitt 5.7). pMAL-c5g-*PIP5K2* war bereits vorhanden. *PIP5K2_{AAA}* und *PIP5K2_{AxAxA}* wurden jeweils mit Hilfe der Primer *PIP5K2.NotI.for* und *PIP5K2.EcoRI.rev* von den in Abschnitt 0 und 0 generierten Plasmiden amplifiziert und nach Restriktionsverdau im Leserahmen mit *malE* in den Vektor pMAL-c5g eingebracht. Die entstehenden Plasmide waren pMAL-c5g-*PIP5K2_{AAA}* und pMAL-c5g-*PIP5K2_{AxAxA}* (Tabelle 5.12).

GST-RBR1

Zur Expression von GST-RBR1 in *E. coli* wurde der Vektor pGEX 4T1 verwendet (Abschnitt 5.7). *RBR1* wurde mit den Primern *RBR1.EcoRI.for* und *RBR1.NotI.rev* amplifiziert, mit EcoRI und NotI geschnitten und im Leserahmen in die, der cDNA von *GST* folgende mcs ligiert, sodass das Konstrukt pGEX-4T-1-*RBR1* erstellt wurde (Tabelle 5.12).

GST-IMP α 6

Zur Expression von GST-IMP α 6 in *E. coli* wurde der Vektor pGEX-6p-1 genutzt (Abschnitt 5.7). Amplifikation von *IMP α 6* wurde die Primerkombination *IMPA6.BamHI.for* und *IMPA6.NotI.rev* genutzt. Nach Restriktionsverdau mit BamHI und NotI wurde das Amplifikat im Leserahmen in die, der cDNA von *GST* folgende mcs ligiert, sodass das Konstrukt pGEX-6p-1-*IMP α 6* erstellt wurde (Tabelle 5.12).

Tabelle 5.12 Zur Proteinexpression in *E. coli* genutzte Plasmide

Name	Bemerkungen
pMAL-c5g- <i>PIP5K2</i>	zur Expression in <i>E. coli</i> , zur Verfügung gestellt von Jennifer Lerche
pMAL-c5g- <i>PIP5K2_{AAA}</i>	zur Expression in <i>E. coli</i>
pMAL-c5g- <i>PIP5K2_{AxAxA}</i>	zur Expression in <i>E. coli</i>
pGEX-4T-1- <i>RBR1</i>	zur Expression in <i>E. coli</i>
pGEX-6p-1- <i>IMPα6</i>	zur Expression in <i>E. coli</i>

5.14.6 Konstrukte zur transienten Expression in Tabakepidermiszellen

Zur Expression mCherry-RBR1 in Tabakepidermiszellen wurde *RBR1* mit den Primern *RBR1.XhoI.for* und *RBR1.NotI.rev* amplifiziert und nach Restriktionsverdau mit XhoI und NotI im Leserahmen abwärts des *mCherry* des Vektors pEntryD-*pCaMV35S::mCherry* (Abschnitt 5.7) eingefügt. pEntryD-*pCaMV35S::mCherry* und pEntryD-*pCaMV35S::mCherry-RBR1* wurde dann in einer Gateway®-Reaktion in den Zielvektor pMDC123 eingebracht (Tabelle 5.13).

Tabelle 5.13 Zur Proteinexpression in Tabakepidermiszellen genutzte Plasmide

Name	Bemerkungen
pEntryD- <i>pCaMV35S::mCherry</i>	in Kombination mit einem leeren pEntryA eingesetzt zur Gateway-Reaktion in pMDC123
pEntryD- <i>pCaMV35S::mCherry-RBR1</i>	in Kombination mit einem leeren pEntryA eingesetzt zur Gateway-Reaktion in pMDC123
pMDC123- <i>pCaMV35S::mCherry-RBR1</i>	zur transienten Expression in Tabakepidermiszellen
pMDC123- <i>pCaMV35S::mCherry</i>	zur transienten Expression in Tabakepidermiszellen

5.14.7 Konstrukte zur stabilen Transformation von Arabidopsis

Für Komplementationsversuche der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante wurden in den zur Lokalisierung hergestellten Vektoren pEntryA-*pCaMV35S::EYFP* (Abschnitt 5.7), pEntryA-*pCaMV35S::PIP5K2-NES_{PK1α}-EYFP* und EntryA-*pCaMV35S::PIP5K2_{AAA}-EYFP* (Abschnitt 0) der *CaMV35S*-Promotor gegen den endogenen *PIP5K2*-Promotor (*pPIP5K2*, 1500 bp) ausgetauscht. Die Amplifikation von *pPIP5K2* erfolgte mit den Primern pPIP5K2.Sfil.for und pPIP5K2.Sfil.rev. *pPIP5K2* und die Vektoren wurde mit Sfil geschnitten, sodass der *pCaMV35S*-Promotor aus den Vektoren herausgeschnitten wurde. In diese Vektoren wurde *pPIP5K2* ligiert. Zur Herstellung von Pflanzentransformationsvektoren wurden die so erstellten Expressionskassetten in Kombination mit einer leeren Expressionskassette in pEntryD über Gateway-Klonierung (Abschnitt 5.11.9) in den Vektor pMDC123 transferiert (Tabelle 5.14).

Tabelle 5.14 Für Komplementationsversuche der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante erstellte Plasmide

Name	Bemerkung
pEntryA- <i>pPIP5K2::EYFP</i>	in Kombination mit einem leeren pEntry D eingesetzt zur Gateway-Reaktion in pMDC123
pEntryA- <i>pPIP5K2::PIP5K2-NES_{PK1α}-EYFP</i>	in Kombination mit einem leeren pEntry D eingesetzt zur Gateway-Reaktion in pMDC123
EntryA- <i>pPIP5K2::PIP5K2_{AAA}-EYFP</i>	in Kombination mit einem leeren pEntry D eingesetzt zur Gateway-Reaktion in pMDC123
pMDC123- <i>pPIP5K2::EYFP</i>	zur Transformation in <i>pip5k1 pip5k2</i>
pMDC123- <i>pPIP5K2::PIP5K2-NES_{PK1α}-EYFP</i>	zur Transformation in <i>pip5k1 pip5k2</i>
pMDC123- <i>pPIP5K2::PIP5K2_{AAA}-EYFP</i>	zur Transformation in <i>pip5k1 pip5k2</i>

5.15 Proteinexpression, Zellaufschluss und Proteinanreicherung

5.15.1 Rekombinante Proteinexpression in *E. coli*

MBP-PIP5K2 und Varianten

MBP-PIP5K2, MBP-PIP5K2_{AAA} und MBP-PIP5K2_{AxAxA} wurden nach dem Protokoll von Jennifer Lerche in *E. coli* Rosetta 2-Zellen exprimiert. Dazu wurden die Plasmide pMAL-c5g, pMAL-c5g-*PIP5K2*, pMAL-c5g-*PIP5K2_{AAA}* und pMAL-c5g-*PIP5K2_{AxAxA}* in *E. coli* Rosetta 2-Zellen transformiert (Abschnitt 5.11.6). Mit frisch transformierten Zellen wurden 50 ml 2 YT-Medium inokuliert und bei 30 °C über Nacht angezogen. Am nächsten Tag wurde damit 1000 ml 2 YT-Medium auf zwei je 2000 ml Schikanekolben zu einer OD₆₀₀ = 0,1

angeimpft und bei 30 °C und 90 rpm angezogen. Bei einer $OD_{600} = 0,6 - 0,8$ wurde die Expression mit 1 mM Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) induziert. Nach vier Stunden Expression wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (4 °C, 4000 g, 20 min). Das Zellsediment wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

GST-RBR1

GST und GST-RBR1 wurden in *E. coli* BL21-AI-Zellen exprimiert. Dazu wurden die Plasmide pGEX-4T-1 und pGEX-4T-1-RBR1 in *E. coli* BL21-AI-Zellen transformiert (Abschnitt 5.11.6). Mit frisch transformierten Zellen wurden 50 ml LB-Medium inokuliert und bei 30 °C über Nacht angezogen. Am nächsten Tag wurden damit 300 ml LB-Medium zu einer $OD_{600} = 0,05$ angeimpft und bei 30°C und 180 rpm angezogen. Bei einer $OD_{600} = 0,6$ wurden die Kulturen auf Eis abgekühlt und die Expression mit 0,3 mM IPTG induziert. Nach 22 h Expression bei 18 °C wurden die Zellen durch Zentrifugation von 50 ml Aliquots geerntet (4 °C, 4000 g, 20 min). Das Zellsediment wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

GST-IMP α 6

GST-IMP α 6 wurde in *E. coli* BL 21-AI-Zellen exprimiert. Dazu wurde das Plasmid pGEX-6T1-IMP α 6 in *E. coli* BL 21-AI-Zellen transformiert (Abschnitt 5.11.6). Mit frisch transformierten Zellen wurden 50 ml LB-Medium inokuliert und bei 30°C über Nacht angezogen. Am nächsten Tag wurden damit 300 ml LB-Medium zu einer $OD_{600} = 0,05$ angeimpft und bei 30 °C und 180 rpm angezogen. Bei einer $OD_{600} = 0,6$ wurden die Kulturen auf Eis abgekühlt, die Expression mit 0,3 mM IPTG induziert. Nach 22 Stunden Expression bei 18 °C wurden je 50 ml Aliquots bei 4000 g und für 20 min zentrifugiert. Das Zellsediment wurde zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

5.15.2 Rekombinante Proteinexpression in Tabakepidermiszellen

mCherry und mCherry-RBR1 wurden in Tabakepidermiszellen exprimiert. Dafür wurden *A. tumefaciens* AGL-0 mit pMDC123-pCaMV35S::mCherry und pMDC123-pCaMV35S::mCherry-RBR1 nach Lazo et al. (1991) transformiert (Abschnitt 5.11.10). Mit frisch transformierten Klonen wurden jeweils 30 ml YEB-Medium angeimpft und schüttelnd über Nacht bei 30°C angezogen. Parallel dazu wurden auch Zellen des *A. tumefaciens*-Stamms GV3101 angezogen, die eine Expressionskassette für p19 trugen (erhalten von Dr. Katharina Bürstenbinder, IPB Halle). p19 ist ein Protein des Pflanzenvirus *tomato bushy stunt virus*, das das posttranskriptionelle Gen-Silencing, ein Mechanismus des mRNA-Abbaus unterdrückt. Dadurch werden mRNAs, die Tabak-fremde Sequenzen codieren, nicht sofort abgebaut (Voinnet et al., 2003). Mit den Vorkulturen wurden jeweils 50 ml YEB-Medium mit einer $OD_{600} = 0,2$ angeimpft. Diese Kulturen wurden bei 180 rpm bei 30 °C bis zu einer OD_{600} von 0,8 - 1 angezogen und anschließend durch Zentrifugation bei 3220 g, 4 °C für 20 min zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in Infiltrationspuffer (5 mM MES-KOH, 10 mM MgCl₂, 200 μ M Acetosyringon [pH 5,3]) zu einer $OD_{600} = 1$ resuspendiert und für

3 Stunden im Dunkeln inkubiert. Dann wurden die Kulturen mit Bakterien mit pMDC123-*pCaMV35S::mCherry*- bzw. pMDC123-*pCaMV35S::mCherry-RBR1*-Plasmiden im Verhältnis 2:1 (v/v) mit Bakterienkulturen, die das p19-Plasmid trugen gemischt und mit einem gleichen Volumen Infiltrationspuffer verdünnt. Diese Zellsuspension wurde unter Verwendung einer Spritze in die Blattunterseiten von vier bis sechs Wochen alten Tabak-Pflanzen infiltriert. Nach 24 h Expression wurden die Blätter geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

5.15.3 Zellaufschluss von *E. coli*-Zellen durch Ultraschall

Zellen, die GST, GST-RBR1 und GST-IMP α 6 exprimierten wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen. Dafür wurde das Zellsediment von 50 ml Kultur auf Eis in 2 ml Aufschlusspuffer resuspendiert und in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Für Zellen, die GST oder GST-RBR1 exprimierten wurden PBS (137 mM NaCl, 10 mM Phosphat, 2,7 mM KCl, [pH 7,4]; supplementiert mit 1 mM Dithiothreitol (DTT), 1 mM EDTA [pH 8,0] und 1x Protease-Inhibitor (S8830, Sigma-Aldrich, München, Deutschland)) als Aufschlusspuffer genutzt. Der Aufschlusspuffer für Zellen, die GST-IMP α 6 exprimierten, war GST-Ausschlusspuffer (50mM Tris-HCl [pH 8,0], 150mM NaCl mit 1x Protease-Inhibitor (S8830, Sigma-Aldrich, München, Deutschland)) resuspendiert. Durch Zugabe von 100 μ g/ml Lysozym (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland) wurden die Zellhülle der *E. coli*-Zellen für 30 min auf Eis angedaut. Der Ultraschallaufschluss fand in Eiswasser bei einer Gesamtenergiezufuhr von dreimal 1000 Joules/W*s mit einer Ultraschallsonde (bei 10-12 W für zwei Zeitintervall gefolgt von zwei Zeitintervallen Pause) statt. Anschließend wurden verbliebene Zelltrümmer bei 20000 g und 4 °C für 20 min abgetrennt.

5.15.4 Zellaufschluss von *E. coli*-Zellen im Hochdruck-Homogenisierer

Für den Zellaufschluss von MBP-PIP5K2 und Aminosäuresubstitutionsvarianten von MBP-PIP5K2 wurden die Zellsedimente von 1000 ml-Kulturen in jeweils 40 ml Aufschlusspuffer (50 mM Tris-HCl [pH 7,5], 1 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1x Protease-Inhibitor (S8830, Sigma-Aldrich, München, Deutschland), 1 mM DTT und 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)) resuspendiert. Nach Zugabe einer Spatelspitze Lysozym (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland) wurde die Zellhülle der *E. coli*-Zellen für 30 min rührend im Eisbad angedaut. Zum weiteren Aufschluss der Zellen wurde die FRENCHTM-PRESS (Gaulin, APV Homogeniser GmbH, Gatwick, UK) bei 1200 bar genutzt. Nach drei Durchläufen wurden verbliebene Zelltrümmer bei 20000 g und 4 °C für 20 min abgetrennt. Bis zur Reinigung von MBP-PIP5K2 wurde der Überstand auf Eis aufbewahrt. Das Protokoll zur Expression, zum Aufschluss und zur Reinigung von MBP-PIP5K2 wurde von Dr. Jennifer Lerche etabliert.

5.15.5 Aufschluss von Pflanzenzellen zur Herstellung von Proteinextrakten

Infiltrierte Tabakblätter, deren Epidermiszellen mCherry oder mCherry-RBR1 exprimierten (Abschnitt 5.15.2), wurden in flüssigem Stickstoff sehr fein gemörsert. Je 1 mg Pflanzenmaterial wurde in 1 µl Aufschlusspuffer (50 mM Tris-HCl [pH 7,5], 50 mM NaCl, 1x Protease-Inhibitor-Mix P (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland)) aufgetaut und Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 20000 g und 4 °C für 5 min abgetrennt.

Proteinextrakte aus sieben Tage alten Keimlingen wurden in flüssigem Stickstoff sehr fein gemörsert. Je 1 mg Pflanzenmaterial wurde in 1 µl PhosStop-Aufschlusspuffer (25 mM Tris-HCl [pH 7,6], 15 mM MgCl₂, 15 mM EGTA, 75 mM NaCl, 60 mM β-Glycerophosphat, 1 mM NaF, 1 mM DTT, 0,1 mM aktiviertes NaVO₄, 1 mM PMSF und 1x PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)) aufgetaut und ebenfalls für 5 min bei 4 °C und 20000 g zentrifugiert.

5.15.6 Anreicherung von Proteinen mittels Affinitätschromatografie

MBP, MBP-PIP5K2 und Aminosäuresubstitutionsvarianten

Zur Reinigung von MBP-PIP5K2 und den Substitutionsvarianten MBP-PIP5K2_{AAA} und MBP-PIP5K2_{AXAXA} wurde das Äkta FPLC-System (GE Healthcare, München, Deutschland) genutzt. Zum Equilibrieren und Waschen der Säule wurde Bindepuffer genutzt (50mM Tris-HCl [pH 7,5], 1 mM EDTA, 150 mM NaCl). Der Überstand des Zellaufschlusses (vgl. Abschnitt 5.15.4) wurde unverdünnt und vollständig mit einem Fluss von 0,5 ml/min auf eine MBPTrap HP-Säule (5 ml, GE Healthcare, München, Deutschland) aufgetragen. Eluiert wurde mit 10 mM Maltose-supplementierten Bindepuffer in 2 ml Fraktionen.

GST und GST-IMPα6

Zur Anreicherung von GST-IMPα6 wurde Pierce™ Glutathion Agarose (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) genutzt. Dazu wurde der Überstand des Zellaufschlusses (vgl. Abschnitt 5.15.3) in Zentrifugationröhrchen an Glutathion-Agarose gebunden. Zum Equilibrieren und Waschen der Agarose wurde GST-Puffer genutzt (50mM Tris-HCl [pH 8,0], 150mM NaCl). Eluiert wurde mit 10 mM reduzierten Glutathion in GST-Puffer.

5.15.7 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen der hergestellten Proteinextrakte wurden nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976). Dazu wurden 10 µl des Proteinextrakts mit 990 µl Bradfordreagenz (Roti®-Quant, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gemischt und nach 3 min die Absorption bei 595 nm bestimmt. Als Referenz wurde der jeweilige Puffer eingesetzt. Kalibriert wurden die gemessenen Proteinkonzentrationen mit BSA. Für Aktivitätstests (Abschnitt 0) und die Experimente zur Kernanreicherung (Abschnitt 5.20) wurde die Proteinkonzentration zusätzlich in einem SDS-PAGE-Gel (Abschnitt 5.15.8) überprüft und wenn erforderlich angeglichen.

5.15.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse von Proteingemischen wurden diese nach molekularer Größe in 10 %-ige bis 15 %-ige SDS-Gelen aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die chemische Zusammensetzung der 10 %- und 15 %-igen Trenngele und des 5 %-igen Sammelgels ist in Tabelle 5.15 gezeigt. Die Zugabe von 0,5 % (w/v) Ammonium-Persulfat (APS) startete die Quervernetzung des Acrylamids. Gegossen wurden die Gele im *multiple gel caster* (SE 200 series, Hoefer scientific instruments, Holliston, MA, USA). Zu trennende Proteingemische wurden vor dem Beladen des Gels mit 1x SDS-Ladepuffer versetzt (5x SDS-Ladepuffer: 225 mM Tris-HCl, 5 % (w/v) Glycerin, 5 % SDS (w/v), 0,05 % (w/v) Coomassie-Brilliantblau G250, [pH 6,8]). Je nach Verwendung des Gels wurde 5 µl PageRuler™ Unstained Protein Ladder oder PageRuler™ Prestained Protein Ladder als Größenstandard mit aufgetragen. Die Proteine migrierten bei 25 mA/Gel für ca. 30 min (Laufkammer SE250 Mighty Small II, Hoefer scientific instruments, Holliston, MA, USA) in SDS-Laufpuffer (25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,3 mM SDS) und wurden entweder mit Coomassie-Färbelösung (40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 50 % (v/v) H₂O und 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant-Blau G250) gefärbt oder die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen.

Tabelle 5.15 Zusammensetzung von SDS-PAGE-Gelen für jeweils fünf Gele

Chemikalie	Trenngel (10 %)	Trenngel (15 %)	Sammelgel (5 %)
Acrylamid / Bis-Acrylamid 30%/0,8 % (w/v) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)	2 ml	3 ml	0,66 ml
1,8 M Tris-HCl [pH 8,8]	2,2 ml	2,2 ml	-
0,6 M Tris-HCl [pH 6,8]	-	-	0,8 ml,
H ₂ O	2,75 ml	1,75 ml	2,5 ml
10 % (w/v) SDS	60 µl	60 µl	40 µl
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	6 µl	6 µl	2,5 µl

5.15.9 Immundetektion auf Nitrocellulose-Membranen (Westernblot)

Die spezifische Detektion bestimmter Proteine in komplexen Proteingemischen erfolgte mittels Immundetektion. Dafür wurden Proteingemische über SDS-PAGE getrennt und in einer Nassblot-Apparatur Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, München, Deutschland) auf eine Nitrocellulosemembran (Amersham Protran 0,45 NC, GE Healthcare, München, Deutschland) übertragen. Dies geschah bei 60 V für eine Stunde oder bei 20 V über Nacht in Transferpuffer (0,6 % (w/v) Tris, 0,3 % (w/v) Glycin, 0,04 % (w/v) SDS und 20 % (v/v) Methanol). Noch freie Bindungsstellen auf der Membran wurden abhängig vom verwendeten primären Antikörper entweder mit 5 % BSA oder 5 % Milchpulver in TBST (50 mM Tris-HCl [pH7,5], 150 mM NaCl, 0,1 % Tween) für 30 min blockiert. Die Membran wurde anschließend mit einem primären Antikörper (verdünnt in 5 % BSA oder Milch in TBST, Tabelle 5.16) für eine Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBST gewaschen und dann mit dem sekundären Antikörper bei Raumtemperatur

inkubiert. Der sekundäre Antikörper wurde entsprechend des genutzten primären Antikörpers in 5 % BSA oder Milch in TBST verdünnt (Tabelle 5.16) Nach ein bis drei Stunden wurde die Membran erneut dreimal für 10 min mit TBST gewaschen. Dann erfolgte die Detektion entsprechend des konjugierten Enzyms am sekundären Antikörper. Westernblots, deren sekundärer Antikörper mit alkalischer Phosphatase konjugiert war, wurden zum Nachweis der alkalischen Phosphatase (AP)-Aktivität zweimal in AP-Puffer gewaschen (100 mM Tris-HCl [pH 9,5], 100 mM NaCl und 5 mM MgCl₂) und dann in 10 ml AP-Puffer mit 35 µl 50 mg/ml X-Phosphat (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-p-Toluidinsalz) und 45 µl 75 mg/ml NBT (p-Nitrotetrazoliumblauschwarz) bis zur gewünschten Intensität gefärbt. Abgestoppt wurde die Reaktion durch Waschen der Membran mit Wasser. Westernblots, deren sekundärer Antikörper mit Meerrettichperoxidase konjugiert war, wurden zum Nachweis der Peroxidase-Aktivität zweimal in TBST gewaschen und für 5 min in AceGlow™ Chemilumineszenzsubstrat (PeproLab, VWR, Dresden, Deutschland) inkubiert. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte über das FUSION SOLO 7S-Detektionssystem (Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland).

Tabelle 5.16 Zur Immundetektion auf Nitrocellulose-Membranen verwendete Antikörper

Epitop	Wirt	konjugiert mit	Verwendung	Bezugsquelle
primäre Antikörper				
anti BiP2	Kaninchen	-	1:1000 in 5 % Milchpulver	Agrisera AS09 481
anti GST	Ziege	-	1:2000 in 5 % Milchpulver	GE Healthcare 27457701V
anti Histon 3	Kaninchen	-	1:2000 in 5 % Milchpulver	Agrisera AS10 710
anti MBP	Maus	-	1:1000 in 5 % BSA	NEB E8032S
anti mCherry	Kaninchen	-	1:1000 in 5 % Milchpulver	Abcam ab167453
anti RBR1	Huhn	-	1:6000 in 5 % Milchpulver	Agrisera AS11 1627
anti Phospho-Rb (Ser807/811)	Kaninchen	-	1:1000 in 5 % BSA	CST #9308
sekundäre Antikörper				
anti Kaninchen	Ziege	alkalische Phosphatase	1:30000	Sigma A3687
anti Kaninchen	Ziege	Meerrettichperoxidase	1:6000	Sigma A6154
anti Huhn	Kaninchen	Meerrettichperoxidase	1:2000	Sigma A9046
anti Maus	Ziege	alkalische Phosphatase	1:30000	Sigma A3562
anti Ziege	Kaninchen	alkalische Phosphatase	1:30000	Sigma A4187
anti Ziege	Kaninchen	Meerrettichperoxidase	1:80000	Sigma A5420

Agrisera: Agrisera, Vännäs, Schweden; **CST:** Cell Signaling Technology, vertrieben über NEB; **GE Healthcare:** GE Healthcare, München, Deutschland; **NEB:** New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland; **Sigma:** Sigma-Aldrich, München, Deutschland.

5.16 Bestimmung der PI4P 5-Kinaseaktivität *in vitro*

Für Aktivitätstests von MBP-PIP5K2 und den entsprechenden Aminosäuresubstitutionsvarianten wurde jeweils 1 µg gereinigter PI4P 5-Kinase eingesetzt (Abschnitt 5.15.5). Für Aktivitätstests, bei denen der Einfluss von RBR1 auf die PIP5K2-Aktivität untersucht wurde, wurden 5 µl MBP-PIP5K2-*E. coli*-Extrakt bzw. 1 µg gereinigte MBP-PIP5K2 mit 10 µl GST-RBR1- oder mCherry-RBR1-Extrakt (Abschnitt 5.15.2 und 5.15.5) eingesetzt. Als Kontrolle diente in diesen Experimenten jeweils die Zugabe äquimolarer Proteinmengen von GST- bzw. mCherry-Extrakten. In Experimenten mit mCherry-RBR1 wurde ausschließlich gereinigte MBP-PIP5K2 genutzt. Zur Kontrolle wurden in diesem Experiment zusätzlich denaturierte Proben (5 min bei 90 °C) von mCherry und mCherry-RBR1 mit PIP5K2 inkubiert, und deren Einfluss auf die PI4P 5-Kinaseaktivität von PIP5K2 untersucht. Für Aktivitätstests von angereicherten Kernfraktionen und pflanzlichen Gesamtproteinextrakten wurde die Proteinkonzentration der Proben angeglichen und davon jeweils 30 µl im Aktivitätstest eingesetzt.

Die Bestimmung der katalytischen Aktivität von PI4P 5-Kinasen erfolgte nach Cho & Boss, 1995. Dazu wurde die Phosphorylierung von PtdIns(4)P zu PtdIns(4,5)P₂ unter Nutzung von γ -[³³P]ATP quantifiziert. In jeder Reaktion wurden 6,4 nmol PtdIns(4)P (840045X; Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA) eingesetzt. Der Ansatz wurde im Luftstrom eingengt und der entstehende Lipidfilm in 5 µl 2 % Triton X-100 solubilisiert. Zur Herstellung von Vesikeln wurde die Lipidsuspension für 10 min in Eiswasser sonifiziert (Ultraschallbad Branson 12, Branson Ultraschall, Dietzenbach, Deutschland). Die Lipidkinase-Aktivität von gereinigtem Protein oder Proteingemischen wurde mit den vorbereiteten PtdIns(4)P-Vesikeln, 15 mM MgCl₂, 1 mM Na₂MoO₄, 1 mM ATP, 5 - 10 µCi γ -[³³P]-ATP (SRF-301; Hartmann Analytic, Braunschweig, Deutschland) nach Zugabe von 2 µl 30 mM Tris-HCl [pH 7,2] in einem Volumen von 50 µl in Glasreaktionsgefäßen gemischt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Extraktion der Lipide (1,5 ml Chloroform:Methanol (1:2 (v/v)), 500 µl 2,4 M HCl, 250 µl 0,5 M EDTA [pH 8], 500 µl Chloroform) abgestoppt. Die untere, organische Phase wurde abgenommen und die obere wässrige Phase erneut mit 500 µl Chloroform extrahiert. Das vereinigte Lipidextrakt wurde mit 750 µl 0,5 M HCl in H₂O:MeOH (1:1 (v/v)) gewaschen, die organische Phase in ein frisches Glasreaktionsgefäß überführt und im Luftstrom getrocknet. Zur chromatographischen Auftrennung der extrahierten Lipide wurde der Lipidfilm in Chloroform gelöst und auf Kieselgel-Dünnschichtplatten Si-60 (20 x 20 cm, Merck, Darmstadt, Deutschland) getrennt. Als Laufmittel diente Chloroform:Methanol:Ammoniumhydroxid:H₂O (45:45:4:11 (v/v/v/v), Perera et al., 2005). Die Detektion erfolgte durch Exposition sensitiver Imager-Platten (BAS-MP 2040s, Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland) und dem anschließenden Auslesen dieser Platten mittels Phosphorimager (BAS-1500, Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland). Quantifiziert wurden die Signale mit der Software TINA (Raytest, Straubenhardt, Germany).

5.17 Untersuchungen zur Protein-Lipid-Interaktion

Die Protein-Lipid-Interaktion wurde mit Hilfe von PIP Strips (P-6001, Echelon Biosciences, Salt Lake City, UT, USA) untersucht. Dazu wurden die Streifen zunächst in 3 % Fettsäure-freiem BSA (A4612, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) in PBS (137 mM NaCl, 10 mM Phosphat, 2,7 mM KCl, [pH 7,4]) für 1 h inkubiert. Anschließend wurde die Membran in GST- bzw. GST-RBR1-*E. coli*-Totalextrakten (3 mg/ml in 5 ml PBS mit 3 % fettsäure-freiem BSA) für 1 h bei Raumtemperatur geschwenkt. Zur Detektion des gebundenen GST bzw. GST-RBR1 wurde die Membran nach dreimaligem Waschen mit PBST (PBS mit 0,1 % Tween-20) für 1 h mit primärem Antikörper anti-GST (Abschnitt 0) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für 1 h bei Raumtemperatur mit sekundärem Antikörper (anti-Ziege, AP-konjugiert, Abschnitt 0) inkubiert und die AP-Aktivität detektiert (Abschnitt 0).

5.18 Untersuchungen zur Protein-Protein-Interaktion

Zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen wurden Hefe-Zwei-Hybrid-Studien durchgeführt. Die gefundenen Interaktionen wurden in Dotblot-Experimenten verifiziert werden.

5.18.1 Split-Ubiquitin-basiertes Hefe-Zwei-Hybridssystem

Zur Bestimmung von Protein-Protein-Interaktionen im Split-Ubiquitin basierten Hefe-Zwei-Hybridssystem wurde das DUALmembrane Kit 3 (Dualsystems Biotech, Zürich, Schweiz, nach Johnsson & Varshavsky (1994)) genutzt. In eukaryotischen Zellen können Proteine durch Ubiquitinylierung posttranslational modifiziert werden und durch Polyubiquitinylierung zum proteosomalen Abbau markiert werden. Sind Proteine einfach ubiquitinyliert können Ubiquitin-spezifische Proteasen diese Markierung wieder entfernen. Diesen Mechanismus macht man sich im Split-Ubiquitin-basierten Hefe-Zwei-Hybrid-Test zu Nutze. Nach der Teilung des Ubiquitins in einen N-terminalen (Nubl, Aminosäuren 1-38, Beute) und einen C-terminalen (Cub, Aminosäuren 34-76, Köder) Teil führt erst die Rekonstitution des gespaltenen Ubiquitins zu einer Erkennung des Ubiquitins durch Ubiquitin-spezifische Proteasen und ein fusionierter Transkriptionsfaktor wird abgespalten. Dieser Transkriptionsfaktor induziert im Zellkern die Expression verschiedener Reportergene. Da der Transkriptionsfaktor abgespalten und in den Zellkern transportiert wird, kann mit diesem System auch eine Interaktion im Cytosol detektiert werden. Im verwendeten Hefestamm NMY51 wird durch den Transkriptionsfaktor LexA-VP16 die Expression der Reportergene *HIS3*, *ADE2* und *lacZ* initiiert. Durch *HIS3* (Imidazolglycerolphosphat-Dehydratase) wird in NMY51 die Auxotrophie für Histidin wiederhergestellt. Analog dazu stellt *ADE2* (Phosphoribosylaminoimidazol-Carboxylase) die Auxotrophie für Adenin wieder her. Die von *lacZ* codierte β -Galaktosidase kann in kolorimetrischen Nachweisen genutzt werden.

Die Affinität beider im Test eingesetzter Ubiquitin-Hälften zueinander ist durch eine Mutation in der N-terminalen Hälfte des Ubiquitins (I3G, NubG) gesenkt. Dadurch ist zur Reassoziaton des Ubiquitins eine

räumliche Nähe beider Ubiquitin-Hälften notwendig. Diese wird nur erreicht, wenn die, an die jeweiligen Ubiquitinhälften fusionierten Proteine miteinander interagieren. Als Kontrolle dient die Fusion des Proteins Alg5, welches mit keinem bekannten Protein interagiert. Die Fusion von Alg5 an nicht modifiziertes Nubl wird als Positivkontrolle eingesetzt (pAI-*Alg5*), die Fusion an NubG ist die Negativkontrolle (pDL2-*Alg5*).

Herstellung und Transformation chemisch-kompetenter Hefezellen (PEG-Methode)

Für die Herstellung chemisch kompetenter Hefezellen nach Ito et al. (1983) wurden 10 ml YPAD-Medium (Abschnitt 5.6.2) mit Zellen des Hefestamms NMY51 angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurde eine frische Kultur mit einer $OD_{600} = 0,15$ angeimpft und bei 30 °C und 200 rpm bis zu einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,5 - 0,6$ angezogen. Die Zellen wurden bei 2500 g für 5 min geerntet und in 20 ml TE-Puffer (100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA [pH 7,5]) gewaschen. Das Zellsediment wurde in 1 ml 0,1 M LiOAc in TE-Puffer resuspendiert, erneut zentrifugiert und in 600 µl 0,1 M LiOAc in TE-Puffer aufgenommen.

Für jede Transformation wurden je 1 - 3 µg der zu transformierenden Köder- und Beute-Plasmide (Abschnitt 0) mit 100 µl chemisch-kompetenten Hefezellen und 700 µl Transformationsmix (560 µl 50 % PEG-4000 (w/v), 70 µl 1 M LiOAc, 70 µl 10x TE-Puffer [pH 7,5]) gemischt. Die Transformationsansätze wurden zunächst für 30 min schüttelnd bei 30 °C inkubiert und nach Zugabe von 80 µl DMSO für 15 min bei 42 °C inkubiert. Die transformierten Hefezellen wurden bei 700 g für 5 min sedimentiert und der Überstand verworfen. Der Zellniederschlag wurde mit 500 µl TE-Puffer gewaschen und das Zellsediment in 500 µl 0,9 % NaCl resuspendiert. Die Zellen wurden auf SD-Selektionsmedium ohne Leucin und Tryptophan (SD-LW, siehe Abschnitt 5.6.2) ausgestrichen und für 2 bis 4 Tage bei 30 °C angezogen. Nur Hefezellen, die sowohl mit Köder- (pBT3C-OST4, vermittelt Leucin-Auxotrophie), als auch mit Beute-Plasmid (pPR3N, vermittelt Tryptophan-Auxotrophie) transformiert waren, konnten auf SD-LW-Medium wachsen. Von auf SD-LW gewachsenen Kolonien wurden SD-LW-Masterplatten hergestellt.

Test auf Protein-Protein-Interaktion

Zum Testen der Interaktion von PIP5K2 mit α -Importinen wurde OST4-PIP5K2 als Köder und die verschiedenen α -Importine als Beute eingesetzt (Abschnitt 0). In Untersuchungen zur Interaktion von PIP5K2 mit RBR1 diente OST4-RBR1 als Köder und PIP5K2 als Beute (Abschnitt 0). Nach Kotransformation der jeweiligen Plasmide in den Hefestamm NMY51 (früher in diesem Abschnitt beschrieben) wurden für den Interaktionstest Zellen von jeweils fünf Transformationsereignissen je Köder-Beute-Kombination in 1x TE-Puffer resuspendiert und eine Zelldichte von $OD_{600} = 0,5$ eingestellt. Je 3 µl der Zellsuspensionen wurden auf Selektionsplatten SD-LW und SD-LWH bzw. SD-LWHA getropft. Die Selektionsplatten wurden für zwei bis sieben Tage bei 30 °C inkubiert. Das Wachstum auf SD-LW diente als Wachstumsvergleich (Kontrolle). Das Wachstum auf SD-LWH und SD-LWHA selektierte auf eine Interaktion zwischen den koexprimierten Proteinen.

5.18.2 Dotblot

Zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen *in vitro* wurden Dotblots durchgeführt. Zur Untersuchung der Interaktion von PIP5K2 und α -Importinen wurde rekombinant exprimierte und angereicherte MBP-PIP5K2 (Abschnitt 5.15.5, jeweils 5 μ g, 1 μ g und 0,2 μ g) auf zwei Nitrocellulose-Membranen (Amersham Protran 0,45 NC, GE Healthcare, München, Deutschland) getropft. Als Kontrolle wurde MBP in äquimolaren Mengen auf die gleichen Membranen aufgebracht. Zur Färbung der getropften Proteine wurde eine Membran mit Amidoblack (0,5 % Amidoblack in 25% Isopropanol (v/v) und 10% Essigsäure (v/v)) für wenige Minuten inkubiert und ungebundener Farbstoff mit Wasser entfernt. Zur Untersuchung auf Protein-Protein-Interaktion wurde die Membran zunächst mit 5 % Milch in TBS (50 mM Tris-HCl [pH 7,5], 150 mM NaCl) für 30 min blockiert und dann mit rekombinant exprimiertem und angereichertem GST-IMP α 6 (Abschnitt 5.15.5, 2 μ g/ml GST-IMP α 6 und 5 % Milch in TBS) für 1h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Weitere Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBS wurde diese mit primärem anti-GST-Antikörper (Abschnitt 0, 1:2000 in 5 % Milch in TBS) 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBS wurde der sekundäre Antikörper (anti-Ziege, AP- oder HRP-konjugiert, Abschnitt 0, 1:30000 in 5 % Milch in TBS) für 1h mit der Membran inkubiert und wiederholtem Waschen der Membran die Antikörperbindung über das konjugierte Enzym detektiert (Abschnitt 0).

Zur Untersuchung der Interaktion von PIP5K2 und RBR1 wurde rekombinant exprimierte und angereicherte MBP-PIP5K2, MBP-PIP5K2_{AxAxA} und MBP (Abschnitt 5.15.5, jeweils 5 μ g und 1 μ g) auf eine Nitrocellulose-Membran getropft. Nach Blockierung der Membran in 5 % BSA in PBS (137 mM NaCl, 10 mM Phosphat, 2,7 mM KCl, [pH 7,4]) für 30 min wurde die Membran mit GST-RBR1-*E. coli*-Totalextrakten (3 mg/ml *E. coli*-Extrakt in 5 % BSA in PBS) für 1h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Weitere Inkubations-, Wasch- und Detektionsschritte wurden wie für den Dotblot mit PIP5K2 und GST-IMP α 6 beschrieben durchgeführt. Abweichend davon, wurde mit PBS gewaschen und die Antikörper-Inkubation in 5 % BSA in PBS durchgeführt.

5.19 Immunhistochemischer Nachweis von Lipiden und Proteinen

Fünf Tage alte Arabidopsis-Keimlinge wurden in 4% Paraformaldehyd in PEMT-Puffer (50 mM PIPES, 1 mM EGTA, 0,5 mM MgCl₂, [pH 6,9], 0,05 % Triton X-100) für 1 h bei Raumtemperatur durch Infiltration fixiert. Die folgenden Wasch- und Inkubationsschritte wurden alle bei leichtem Schwenken durchgeführt. Nach der Infiltration wurden die Keimlinge dreimal in PEMT gewaschen und in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Zellwand der Keimlinge wurde mit 2 % Macerozyme R-10 (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland) gelöst in PEM-Puffer (50 mM PIPES, 1 mM EGTA, 0,5 mM MgCl₂, [pH 6,9]) mit 0,4 M Mannitol für 1 h bei Raumtemperatur angedaut. Die Keimlinge wurden dreimal für 10 min mit PEM gewaschen, vorgekühltes Methanol dazugegeben und bei -20 °C für 20 min inkubiert. Nach 10-minütiger

Rehydrierung in PBS (137 mM NaCl, 10 mM Phosphat, 2,7 mM KCl, [pH 7,4]) wurden die Keimlinge mit 2 % IGEPAL CA-630 und 10 % DMSO in PBS für 1 h behandelt. Nach dreimaligem Waschen für 10 min in PBS erfolgte der Nachweis von Lipiden und Proteinen durch Antikörper. Zum Blockieren freier Bindestellen wurden die vorbereiteten Keimlinge für 30 min in 3 % BSA in PBS inkubiert. Die Inkubation mit den entsprechenden primären Antikörpern (Tabelle 5.17) erfolgte in 3 % BSA in PBS über Nacht bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen für 10 min mit PBS wurden die Keimlinge für 2 - 3 h mit den entsprechenden Alexa Fluor®-konjugierten sekundären Antikörpern inkubiert (Tabelle 5.17). Nach einem weiteren Waschschrift für 10 min in PBS wurden die Keimlinge zum Anfärben der Zellkerne für 30 min mit 1 µg/ml 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) in PBS inkubiert. Nach den folgenden drei Waschschriften (10 min mit PBS) wurden die Keimlinge auf Objektträger in PBS transferiert. Die Lokalisierung der markierten Proteine wurde mikroskopisch am konfokalen Laser Scanning Mikroskop LSM 780 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) untersucht (Abschnitt 5.22).

Tabelle 5.17 **Verwendete Antikörper zum immunhistochemischen Nachweis von Lipiden und Proteinen**

Epitop	Wirt	konjugiert mit	Verwendung	Bezugsquelle
primäre Antikörper				
anti PtdIns(4)P	Maus	-	1 µg/ml (1:500)	Echelon Z-P004
anti PtdIns(4,5)P ₂	Maus	-	1 µg/ml (1:5000)	Echelon Z-A045
anti H ⁺ -ATPase	Kaninchen	-	1:500	Agrisera AS07 260
sekundäre Antikörper				
anti Kaninchen	Esel	Alexa Fluor® 488	1:1000	Invitrogen A-21206
anti Maus	Ziege	Alexa Fluor® 555	1:1000	Invitrogen A-21422

Agrisera: Agrisera, Vännäs, Schweden; **Echelon:** Echelon Biosciences, Salt Lake City, UT, USA; **Invitrogen:** Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland

5.20 Kernanreicherung

Aus Rosettenblättern von Arabidopsis-Wildtyp-Pflanzen wurden nach Folta & Kaufman (2006) Zellkerne isoliert. Die verwendeten Pflanzen waren sechs Wochen alt und wurden unter Kurztag-Bedingungen (8 h Licht, 16 h Dunkel) angezogen. 2 g Rosettenblätter wurden mit einer Rasierklinge in feine Streifen geschnitten und in 30 ml eiskaltem Extraktionspuffer (1 M Hexylenglycol, 20 mM PIPES-KOH [pH 7,0], 10 mM MgCl₂ mit 5 mM β-Mercaptoethanol) für 8 min auf Eis homogenisiert. Dazu wurde ein Ultra-Turrax T25 mit Dispergierwerkzeug S 25 N - 18 G (IKA, Staufen, Deutschland) bei einer Leerlaufdrehzahl von 8000/min genutzt. Das Homogenisat wurde zweimal durch je 5 Lagen Miracloth (Merck, Darmstadt, Deutschland) gefiltert und das Filtrat in einem 50 ml Becherglas aufgefangen. Unter Rühren wurde langsam 10 % Triton X-100 zugegeben bis eine Endkonzentration von 1 % erreicht war. Das Gemisch wurde für 20 min auf Eis inkubiert und dann auf einen Stufengradienten aus 80 % und 35 % Percoll in 1x Gradientenpuffer gegeben (1x Gradientenpuffer: 0,5 M Hexylenglycol, 5 mM PIPES-KOH [pH 7,0], 10 mM MgCl₂, 1 % Triton X-100 mit 5 mM β-Mercaptoethanol (hergestellt als 5x-Puffer)). Der Gradient wurde bei 2000 g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Die grau-grüne Interphase wurde vorsichtig abgenommen und

mit 1x Gradientenpuffer auf 10 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von 6 ml 35 % Percoll wurde für 10 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 1 ml 1x Gradientenpuffer resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Kerne bei 900 g sedimentiert. Dieses Sediment wurde in 150 µl Kernpuffer (0,5 M Saccharose, 50 mM Tris-HCl [pH 7,2], 5 mM MgCl₂, 5 mM KCl₂, mit 5 mM β-Mercaptoethanol und 1x Protease-Inhibitor) resuspendiert.

Parallel dazu wurden Totalextrakte aus Rosettenblättern der gleichen Pflanzen hergestellt. Dafür wurde Rosettenblätter in flüssigem Stickstoff gemörsert und im Kernpuffer aufgenommen. Die Proteinkonzentrationen von Kern- und Totalextrakten wurden über ein SDS-PAGE-Gel (Abschnitt 5.15.8) abgeschätzt und angeglichen. Die Extrakte wurden entweder direkt weiterverwendet oder bei -80 °C eingefroren.

Um die Integrität der Zellkerne zu überprüfen, wurden je 20 µl der Kernfraktionen und Totalextrakte mit Ethidiumbromid (2 µg/ml für 10 min) gefärbt und mikroskopisch am konfokalen Laser Scanning Mikroskop LSM 780 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) untersucht. Um den Erfolg der Anreicherung nachzuweisen, wurde in Westernblot-Analysen das Plasmamembranprotein H⁺-ATPase, das ER-Protein BiP2 (*Binding immunoglobulin protein*) und das Kernprotein Histon 3 nachgewiesen (Abschnitt 0).

5.21 Transiente Expression in Zwiebelepidermiszellen

Zur Untersuchung der Lokalisierung Fluoreszenz-markierter Proteine in Zwiebelepidermiszellen wurden Zwiebelepidermiszellen biolistisch mittels Teilchenbeschuss transient transformiert. Dazu wurde das PDS1000/He *biolistic particle delivery system* (Genkanone; Bio-Rad, München, Deutschland) genutzt. Die benötigten Verbrauchsmaterialien wurden ebenfalls von Bio-Rad bezogen.

Es wurden 50 µg Goldmikroträger ($\varnothing = 1,0 \mu\text{m}$) in 1 ml Ethanol resuspendiert, für 60-120 s gründlich gemischt. Nach Sedimentation der Goldpartikel bei 10000 g für 10 s wurden diese zweimal mit je 1 ml Ethanol und zweimal mit je 1 ml H₂O gewaschen, und anschließend in 1 ml H₂O aufgenommen. 25 µl der Gold-Suspension wurden mit 10 µl (ca. 4 µg) Plasmid-DNA (Abschnitt 5.11.2) versetzt und gründlich gemischt. Zur Fällung der DNA an die Goldpartikel wurde 50 µl 2,5 M CaCl₂ und 20 µl 0,1 M Spermidin dazugegeben und für 90 s gründlich gemischt. Die Goldpartikel wurden bei 10000 g für 10 s sedimentiert, einmal in 75 % Ethanol und zweimal in 100 % Ethanol gewaschen und anschließend in 30 µl 100% Ethanol aufgenommen. 15 µl Goldpartikel wurden auf einen Makroträger pipettiert und in die Genkanone eingelegt. Handelsübliche Zwiebel wurden geviertelt und intakte Zwiebelepidermis freigelegt. In der Probenkammer wurde Vakuum angelegt, und im Heliumzulauf Druck aufgebaut. Bei 1350 psi brach die verwendete Berstscheibe und der freiwerdende Druck beschleunigte den goldbeladenen Makroträger. Durch das Rückhaltegitter wird der Makroträger, aber nicht die Goldpartikel zurückgehalten. Diese treffen die Zwiebelepidermiszellen und dringen in diese ein.

Zur Expression transformierter Fluoreszenzkonstrukte wurden die Zwiebeln über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert. Zur mikroskopischen Untersuchung der transformierten

Zwiebelzellen wurde die Epidermis abgezogen, auf einen Objektträger transferiert und am konfokalen Laser Scanning Mikroskop LSM 780 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) mikroskopiert.

5.22 Mikroskopische Untersuchung stabil transformierter Arabidopsis-Wurzelzellen

Es wurden für alle mikroskopischen Untersuchungen fünf Tage alte Arabidopsis-Keimlinge verwendet und diese am konfokalen Laser Scanning Mikroskop LSM 780 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) untersucht.

5.22.1 Induktion der pWOX::ER-GFP-Expression durch Dexamethason

Zur Induktion des Dexamethason-induzierbaren *WOX5(GVG/UAS)*-Promotors (*pWOX5*) wurden Arabidopsis-Keimlinge auf ½ MS-Medium angezogen, dass 1 µM Dexamethason enthielt.

5.22.2 Propidiumiodid-Färbung der Zellwand

Zur Darstellung der Organisation des Wurzelmeristems wurden Arabidopsis-Keimlinge für 2 min mit 10 µg/ml Propidiumiodid gefärbt, in H₂O gewaschen und die Keimlinge auf Objektträger transferiert.

5.22.3 Subzelluläre Lokalisierung des PtdIns(4,5)P₂-Reporters PH_{PLC6}-EYFP

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisierung von PH_{PLC6}-EYFP wurden der Stress, den Keimlinge während der Vorbereitung und des Mikroskopierens erfahren, möglichst reduziert, in dem zur mikroskopischen Untersuchung wurde ein Metallträger genutzt wurde, der eine runde Aussparung in der Mitte aufwies. Unter den Metallträger wurde ein Deckgläschen befestigt, dass als Objektträger diente. Die Arabidopsis-Keimlinge wurden auf diesem Objektträger platziert und mit einem runden, mit Agarose-beschichteten Deckgläschen fixiert.

5.23 Mikroskopie

Alle mikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop LSM 780 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) gemacht. Die jeweiligen Fluoreszenzproteine (EYFP, DsRed, mCherry, GFP) und Farbstoffe (Alexa Fluor® 555, Alexa Fluor 488, Ethidiumbromid, Propidiumiodid und DAPI) wurden jeweils mit spezifischer Wellenlänge angeregt und entsprechend detektiert. In einem Experiment mit mehr als einem Fluoreszenzprotein und/oder -Farbstoff wurden die einzelnen Wellenlängen jeweils separat angeregt und einzeln aufgenommen. Um ein Überstrahlen in andere Wellenlängen zu vermeiden, wurden die Anregungs- und Detektions-Wellenlängenbereiche zunächst mit Hilfestellung des „Smart Setup“ in der Zen Software (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) so eingestellt, dass eine Überstrahlung in andere Detektionsbereiche vermieden wurde. Die Aufnahmen wurden mit den Objektiven 20x, 40x, 63x, und um einen Durchschnitt durch den Zellkern zu erreichen, mit der einer Schichtdicke von max. 2,5 µm aufgenommen. Nachträgliche Überlagerungen, Falschfarbendarstellungen und Intensitätsmessungen wurden mit der Software Fiji (Fiji is just ImageJ, Schindelin et al. (2012)) erstellt.

6 Literaturverzeichnis

- Abrahám E., Miskolczi P., Ayaydin F., Yu P., Kotogány E., et al.** (2011). Immunodetection of retinoblastoma-related protein and its phosphorylated form in interphase and mitotic alfalfa cells. *J. Exp. Bot.* 62, 2155–2168.
- Ach R. A., Durfee T., Miller A. B., Taranto P., Hanley-Bowdoin L., et al.** (1997). RRB1 and RRB2 encode maize retinoblastoma-related proteins that interact with a plant D-type cyclin and geminivirus replication protein. *Mol. Cell. Biol.* 17, 5077–5086.
- Aichinger E., Kornet N., Friedrich T., & Laux T.** (2012). Plant stem cell niches. *Annu Rev Plant Biol* 63, 615–636.
- Aida M., Beis D., Heidstra R., Willemsen V., Blilou I., et al.** (2004). The PLETHORA genes mediate patterning of the Arabidopsis root stem cell niche. *Cell* 119, 119–120.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., et al.** (2014). *Molecular Biology of the Cell* (New York: Garland Science).
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., & Lipman D. J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- Alvarez-Venegas R., Sadler M., Hlavacka A., Baluska F., Xia Y., et al.** (2006a). The Arabidopsis homolog of trithorax, ATX1, binds phosphatidylinositol 5-phosphate, and the two regulate a common set of target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 6049–6054.
- Alvarez-Venegas R., Xia Y., Lu G., & Avramova Z.** (2006b). Phosphoinositide 5-phosphate and phosphoinositide 4-phosphate trigger distinct specific responses of Arabidopsis genes: Genome-wide expression analyses. *Plant Signal. Behav.* 1, 140–151.
- Arguello-Astorga G., Lopez-Ochoa L., Kong L. J., Orozco B. M., Settlage S. B., et al.** (2004). A novel motif in geminivirus replication proteins interacts with the plant retinoblastoma-related protein. *J. Virol.* 78, 4817–4826.
- Audhya A., & Emr S. D.** (2003). Regulation of PI4,5P2 synthesis by nuclear-cytoplasmic shuttling of the Mss4 lipid kinase. *EMBO J.* 22, 4223–4236.
- Ausín I., Alonso-Blanco C., Jarillo J. A., Ruiz-García L., & Martínez-Zapater J. M.** (2004). Regulation of flowering time by FVE, a retinoblastoma-associated protein. *Nat. Genet.* 36, 162–166.
- Bak G., Lee E.-J., Lee Y., Kato M., Segami S., et al.** (2013). Rapid structural changes and acidification of guard cell vacuoles during stomatal closure require phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate. *Plant Cell* 25, 2202–2216.
- Balla T.** (2007). Imaging and manipulating phosphoinositides in living cells. *J. Physiol.* 582, 927–937.
- Benjamins R., Quint A., Weijers D., Hooykaas P., & Offringa R.** (2001). The PINOID protein kinase regulates organ development in Arabidopsis by enhancing polar auxin transport. *Development* 128, 4057–4067.
- Benková E., & Hejátko J.** (2009). Hormone interactions at the root apical meristem. *Plant Mol. Biol.* 69, 383–396.
- Bennett S. R. M., Alvarez J., Bossinger G., & Smyth D. R.** (1995). Morphogenesis in pinoid mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 8, 505–520.
- van den Berg C., Willemsen V., Hendriks G., Weisbeek P., & Scheres B.** (1997). Short-range control of cell differentiation in the Arabidopsis root meristem. *Nature* 390, 287–289.
- Bhattacharjee S., Lee L. Y., Oltmanns H., Cao H., Veena, et al.** (2008). IMPa-4, an Arabidopsis importin alpha isoform, is preferentially involved in agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Cell* 20, 2661–2680.
- Bischoff F. R., & Görlich D.** (1997). RanBP1 is crucial for the release of RanGTP from importin β -related nuclear transport factors. *FEBS Lett.* 419, 249–254.
- Bischoff F. R., & Ponstingl H.** (1991). Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature* 354, 80–82.

- Bischoff F. R., Krebber H., Smirnova E., Dong W., & Ponstingl H.** (1995). Co-activation of RanGTPase and inhibition of GTP dissociation by Ran-GTP binding protein RanBP1. *EMBO J.* 14, 705–715.
- Blanvillain R., Boavida L. C., McCormick S., & Ow D. W.** (2008). Exportin1 genes are essential for development and function of the gametophytes in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 180, 1493–1500.
- Blilou I., Xu J., Wildwater M., Willemsen V., Paponov I., et al.** (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 433, 39–44.
- den Boer B. G. W., & Murray J. A. H.** (2000). Triggering the cell cycle in plants. *Trends Cell Biol.* 10, 245–250.
- Borghgi L., Gutzat R., Futterer J., Laizet Y., Hennig L., et al.** (2010). *Arabidopsis* RETINOBLASTOMA-RELATED is required for stem cell maintenance, cell differentiation, and lateral organ production. *Plant Cell* 22, 1792–1811.
- Boronenkov I. V., Loijens J. C., Umeda M., & Anderson R. A.** (1998). Phosphoinositide signaling pathways in nuclei are associated with nuclear speckles containing pre-mRNA processing factors. *Mol. Biol. Cell* 9, 3547–3560.
- Bouveret R., Schönrock N., Grisse W., & Hennig L.** (2006). Regulation of flowering time by *Arabidopsis* MSI1. *Dev.* 133, 1693–1702.
- Brameier M., Krings A., & MacCallum R. M.** (2007). NucPred - predicting nuclear localization of proteins. *Bioinformatics* 23, 1159–1160.
- Bunney T. D., Watkins P. A. C., Beven A. F., Shaw P. J., Hernandez L. E., et al.** (2000). Association of phosphatidylinositol 3-kinase with nuclear transcription sites in higher plants. *Plant Cell* 12, 1679–1688.
- Van Buskirk E. K., Decker P. V., & Chen M.** (2012). Photobodies in light signaling. *Plant Physiol.* 158, 52–60.
- Byrne R. D., Barona T. M., Garnier M., Koster G., Katan M., et al.** (2005). Nuclear envelope assembly is promoted by phosphoinositide-specific phospholipase C with selective recruitment of phosphatidylinositol-enriched membranes. *Biochem. J.* 387, 393–400.
- Camacho L., Smertenko A. P., Pérez-Gómez J., Hussey P. J., & Moore I.** (2009). *Arabidopsis* Rab-E GTPases exhibit a novel interaction with a plasma-membrane phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *J. Cell Sci.* 122, 4383–4392.
- Carland F., & Nelson T.** (2009). CVP2- and CVL1-mediated phosphoinositide signaling as a regulator of the ARF GAP SFC/VAN3 in establishment of foliar vein patterns. *Plant J.* 59, 895–907.
- Carlton J. G., & Cullen P. J.** (2005). Coincidence detection in phosphoinositide signaling. *Trends Cell Biol.* 15, 540–547.
- Chakrabarti R., Sanyal S., Ghosh A., Bhar K., Das C., et al.** (2015). Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase 1 α modulates ribosomal RNA gene silencing through its interaction with Histone H3 lysine 9 trimethylation and heterochromatin protein HP1- α . *J. Biol. Chem.* 290, 20893–20903.
- Chandler J. W.** (2009). Local auxin production: A small contribution to a big field. *BioEssays* 31, 60–70.
- Chang C., & Williams S. J.** (2012). Crystal structure of rice importin- α and structural basis of its interaction with plant-specific nuclear localization signals. *Plant Cell* 24, 5074–5088.
- Chang C.-W., Couñago R. M., Williams S. J., Bodén M., & Kobe B.** (2013). Distinctive conformation of minor site-specific nuclear localization signals bound to importin- α . *Traffic* 14, 1144–1154.
- Chang C.-W., Couñago R. M., Williams S. J., Boden M., & Kobe B.** (2014). The distribution of different classes of nuclear localization signals (NLSs) in diverse organisms and the utilization of the minor NLS-binding site in plant nuclear import factor importin- α . *Plant Signal. Behav.* 8, e25976.
- Cheng Y., Dai X., & Zhao Y.** (2007). Auxin synthesized by the YUCCA flavin monooxygenases is essential for embryogenesis and leaf formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 2430–2439.
- Cho M. H., & Boss W. F.** (1995). Transmembrane signaling and phosphoinositides. *Methods Cell Biol.* 49, 543–554.
- Ciruela A., Hinchliffe K. A., Divecha N., & Irvine R. F.** (2000). Nuclear targeting of the β isoform of type II phosphatidylinositol phosphate kinase (phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase) by its α -helix 7. *Biochem. J.* 346, 587–591.
- Ciska M., & Moreno Díaz de la Espina S.** (2014). The intriguing plant nuclear lamina. *Front. Plant Sci.* 5, 166.

- Clarke J. H., Letcher A. J., D'Santos C. S., Halstead J. R., Irvine R. F., et al.** (2001). Inositol lipids are regulated during cell cycle progression in the nuclei of murine erythroleukaemia cells. *Biochem. J.* 357, 905–910.
- Clough S. J., & Bent A. F.** (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735–743.
- Cobrinik D.** (2005). Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* 24, 2796–2809.
- Cocco L., Gilmour R. S., Ognibene A., Letcher A. J., Manzoli F. A., et al.** (1987). Synthesis of polyphosphoinositides in nuclei of Friend cells. Evidence for polyphosphoinositide metabolism inside the nucleus which changes with cell differentiation. *Biochem J.* 248, 765–770.
- Collier S., Pendle A., Boudonck K., van Rij T., Dolan L., et al.** (2006). A distant coilin homologue is required for the formation of cajal bodies in *Arabidopsis*. *Mol. Biol. Celliol. Cell* 17, 2942–2951.
- Collin S., Justin A.-M., Cantrel C., Arondel V., & Kader J.-C.** (1999). Identification of AtPIS, a phosphatidylinositol synthase from *Arabidopsis*. *Eur. J. Biochem.* 262, 652–658.
- Collings D. A., Carter C. N., Rink J. C., Scott A. C., Wyatt S. E., et al.** (2000). Plant nuclei can contain extensive grooves and invaginations. *Plant Cell* 12, 2425–2440.
- Cremer T., & Cremer M.** (2010). Chromosome territories. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a003889.
- Crowder M. K., Seacrist C. D., & Blind R. D.** (2017). Phospholipid regulation of the nuclear receptor superfamily. *Adv. Biol. Regul.* 63, 6–14.
- Cruz-Ramírez A., Díaz-Triviño S., Blilou I., Grieneisen V. A., Sozzani R., et al.** (2012). A bistable circuit involving scarecrow-retinoblastoma integrates cues to inform asymmetric stem cell division. *Cell* 150, 1002–1015.
- Cruz-Ramírez A., Díaz-Triviño S., Wachsman G., Du Y., Arteága-Vázquez M., et al.** (2013). A SCARECROW-RETINOBLASTOMA protein network controls protective quiescence in the *Arabidopsis* root stem cell organizer. *PLoS Biol.* 11, e1001724.
- Cui H., Levesque M. P., Vernoux T., Jung J. W., Paquette A. J., et al.** (2007). An evolutionarily conserved mechanism delimiting SHR movement defines a single layer of endodermis in plants. *Science* 316, 421–425.
- Delage E., Puyaubert J., Zachowski A., & Ruelland E.** (2013). Signal transduction pathways involving phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: Convergences and divergences among eukaryotic kingdoms. *Prog. Lipid Res.* 52, 1–14.
- Dewitte W., & Murray J. A. H.** (2003). The plant cell cycle. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 235–264.
- Dieck C. B., Wood A., Brglez I., Rojas-Pierce M., & Boss W. F.** (2012). Increasing phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate biosynthesis affects plant nuclear lipids and nuclear functions. *Plant Physiol. Biochem.* 57, 32–44.
- Ding Y., Ndamukong I., Zhao Y., Xia Y., Riethoven J.-J., et al.** (2012). Divergent functions of the myotubularin (MTM) homologs AtMTM1 and AtMTM2 in *Arabidopsis thaliana*: Evolution of the plant MTM family. *Plant J.* 70, 866–878.
- Divecha N., Roefs M., Los A., Halstead J., Bannister A., et al.** (2002). Type I PIPkinases interact with and are regulated by the retinoblastoma susceptibility gene product - pRB. *Curr. Biol.* 12, 582–587.
- Engelman D. M.** (2005). Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* 438, 578–580.
- Ercetin M. E., & Gillaspay G. E.** (2004). Molecular characterization of an *Arabidopsis* gene encoding a phospholipid-specific inositol polyphosphate 5-phosphatase. *Plant Physiol.* 135, 938–946.
- Faenza I., Matteucci A., Manzoli L., Billi A. M., Aluigi M., et al.** (2000). A role for nuclear phospholipase Cbeta 1 in cell cycle control. *J. Biol. Chem.* 275, 30520–30524.
- Folta K. M., & Kaufman L. S.** (2006). Isolation of *Arabidopsis* nuclei and measurement of gene transcription rates using nuclear run-on assays. *Nat. Protoc.* 1, 3094–3100.
- Forzani C., Aichinger E., Sornay E., Willemsen V., Laux T., et al.** (2014). WOX5 suppresses CYCLIN D activity to establish quiescence at the center of the root stem cell niche. *Curr. Biol.* 24, 1939–1944.
- Furt F., Konig S., Bessoule J. J., Sargueil F., Zallot R., et al.** (2010). Polyphosphoinositides are enriched in plant membrane rafts and form microdomains in the plasma membrane. *Plant Physiol.* 152, 2173–2187.
- Furt F., Simon-Plas F., & Mongrand S.** (2011). Lipids of the plant plasma membrane. *Plant Cell Monogr.* 19, 3–30.

- Gagne J. M., & Clark S. E.** (2010). The Arabidopsis stem cell factor POLTERGEIST is membrane localized and phospholipid stimulated. *Plant Cell* 22, 729–743.
- Gaillochot C., & Lohmann J. U.** (2015). The never-ending story: From pluripotency to plant developmental plasticity. *Development* 142, 2237–2249.
- Galinha C., Hofhuis H., Luijten M., Willemsen V., Blilou I., et al.** (2007). PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development. *Nature* 449, 1053–1057.
- Genschik P., Criqui M. C., Parmentier Y., Derevier A., & Fleck J.** (1998). Cell cycle dependent proteolysis in plants: Identification of the destruction box pathway and metaphase arrest produced by the proteasome inhibitor MG132. *Plant Cell* 10, 2063–2076.
- Gerth K., Lin F., Menzel W., Krishnamoorthy P., Stenzel I., et al.** (2017). Guilt by association: A phenotype-based view of the plant phosphoinositide network. *Annu. Rev. Plant Biol.* 68, 349–374.
- González-García M.-P., Vilarrasa-Blasi J., Zhiponova M., Divol F., Mora-García S., et al.** (2011). Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in Arabidopsis roots. *Development* 138, 849–859.
- Gorkin D. U., Leung D., & Ren B.** (2014). The 3D genome in transcriptional regulation and pluripotency. *Cell Stem Cell* 14, 762–775.
- Görlich D., Prehn S., Laskey R. A., & Hartmann E.** (1994). Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. *Cell* 79, 767–778.
- Görlich D., Kostka S., Kraft R., Dingwall C., Laskey R. A., et al.** (1995). Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. *Curr. Biol.* 5, 383–392.
- Görlich D., Panté N., Kutay U., Aebi U., & Bischoff F. R.** (1996). Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *EMBO J.* 15, 5584–5594.
- Gozani O., Karuman P., Jones D. R., Ivanov D., Cha J., et al.** (2003). The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell* 114, 99–111.
- Gunesefera B., Torabinejad J., Robinson J., & Gillaspay G. E.** (2007). Inositol polyphosphate 5-phosphatases 1 and 2 are required for regulating seedling growth. *Plant Physiol.* 143, 1408–1417.
- Guo T., & Fang Y.** (2014). Functional organization and dynamics of the cell nucleus. *Front. Plant Sci.* 5, 378.
- Gutierrez C.** (2016). 25 years of cell cycle research: What's ahead? *Trends Plant Sci.* 21, 823–833.
- Gutzat R., Borghi L., Gruissem W., Knudson A. G., Friend S. H., et al.** (2012). Emerging roles of RETINOBLASTOMA-RELATED proteins in evolution and plant development. *Trends Plant Sci.* 17, 139–148.
- Haasen D., & Merkle T.** (2002). Characterization of an *Arabidopsis thaliana* homologue of the nuclear export receptor CAS by its interaction with importin α . *Plant Biol.* 4, 432–439.
- Haasen D., Köhler C., Neuhaus G., & Merkle T.** (1999). Nuclear export of proteins in plants: AtXPO1 is the export receptor for leucine-rich nuclear export signals in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 20, 695–705.
- Hamann B. L., & Blind R. D.** (2017). Nuclear phosphoinositide regulation of chromatin. *J. Cell. Physiol.* im Druck.
- Hammond G. R. V., Schiavo G., & Irvine R. F.** (2009). Immunocytochemical techniques reveal multiple, distinct cellular pools of PtdIns4P and PtdIns(4,5)P₂. *Biochem. J.* 422, 23–35.
- Harashima H., & Schnittger A.** (2012). Robust reconstitution of active cell-cycle control complexes from co-expressed proteins in bacteria. *Plant Methods* 8, 23.
- Hauer J. A., Barthe P., Taylor S. S., Parello J., & Padilla A.** (1999). Two well-defined motifs in the cAMP-dependent protein kinase inhibitor (PKI α) correlate with inhibitory and nuclear export function. *Protein Sci.* 8, 545–553.
- Heilmann I.** (2016a). Plant phosphoinositide signaling - dynamics on demand. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1861, 1345–1351.
- Heilmann I.** (2016b). Phosphoinositide signaling in plant development. *Development* 143, 2044–2055.
- Heilmann M., & Heilmann I.** (2015). Plant phosphoinositides—complex networks controlling growth and adaptation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1851, 759–769.
- Hendrix K. W., Assefa H., & Boss W. F.** (1989). The polyphosphoinositides, phosphatidylinositol monophosphate and phosphatidylinositol bisphosphate, are present in nuclei isolated from carrot protoplast. *Protoplasma* 151, 62–72.
- Henriques R., Magyar Z., Monardes A., Khan S., Zalejski C., et al.** (2010). Arabidopsis S6 kinase mutants display chromosome instability and altered RBR1-E2F pathway activity. *EMBO J.* 29, 2979–2993.

- Hinchliffe K. A., Giudici M. L., Letcher A. J., & Irvine R. F.** (2002). Type II α phosphatidylinositol phosphate kinase associates with the plasma membrane via interaction with type I isoforms. *Biochem. J.* 570, 563–570.
- Hirano T., Munnik T., & Sato M. H.** (2015). Phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase, FAB1/PIKfyve mediates endosome maturation to establish endosome-cortical microtubule interaction in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 169, 1961–1974.
- Hirayama T., Imajuku Y., Anai T., Matsui M., & Oka A.** (1991). Identification of two cell-cycle-controlling cdc2 gene homologs in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 105, 159–165.
- Hodel A. E., Harreman M. T., Pulliam K. F., Harben M. E., Holmes J. S., et al.** (2006). Nuclear localization signal receptor affinity correlates with *in vivo* localization in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 281, 23545–23556.
- Hofhuis H., Laskowski M., Du Y., Prasad K., Grigg S., et al.** (2013). Phyllotaxis and rhizotaxis in Arabidopsis are modified by three plethora transcription factors. *Curr. Biol.* 23, 956–962.
- Hu Y., Bao F., & Li J.** (2000). Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in Arabidopsis. *Plant J.* 24, 693–701.
- Huang F., Zago M. K., Abas L., Marion A. Van, Galván-ampudia C. S., et al.** (2010). Phosphorylation of conserved PIN motifs directs Arabidopsis PIN1 polarity and auxin transport. *Plant Cell* 22, 1129–1142.
- Inzé D., & De Veylder L.** (2006). Cell cycle regulation in plant development. *Annu. Rev. Genet.* 40, 77–105.
- Dello Ioio R., Linhares F. S., Scacchi E., Casamitjana-Martinez E., Heidstra R., et al.** (2007). Cytokinins determine Arabidopsis root-meristem size by controlling cell differentiation. *Curr. Biol.* 17, 678–682.
- Dello Ioio R., Nakamura K., Moubayidin L., Perilli S., Taniguchi M., et al.** (2008). A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science* 322, 1380–1384.
- Ischebeck T., Stenzel I., & Heilmann I.** (2008). Type B phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases mediate Arabidopsis and *Nicotiana tabacum* pollen tube growth by regulating apical pectin secretion. *Plant Cell* 20, 3312–3330.
- Ischebeck T., Seiler S., & Heilmann I.** (2010). At the poles across kingdoms: Phosphoinositides and polar tip growth. *Protoplasma* 240, 13–31.
- Ischebeck T., Stenzel I., Hempel F., Jin X., Mosblech A., et al.** (2011). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate influences Nt-Rac5-mediated cell expansion in pollen tubes of *Nicotiana tabacum*. *Plant J.* 65, 453–468.
- Ischebeck T., Werner S., Krishnamoorthy P., Lerche J., Meijon M., et al.** (2013). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate influences PIN polarization by controlling clathrin-mediated membrane trafficking in Arabidopsis. *Plant Cell* 25, 4894–4911.
- Ito H., Fukuda Y., Murata K., & Kimura A.** (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153, 163–168.
- Johnsson N., & Varshavsky A.** (1994). Split ubiquitin as a sensor of protein interactions *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 10340–10344.
- Jones D. R., Bultsma Y., Keune W. J., Halstead J. R., Elouarrat D., et al.** (2006). Nuclear PtdIns5P as a transducer of stress signaling: An *in vivo* role for PIP4K β . *Mol. Cell* 23, 685–695.
- Jullien P. E., Mosquana A., Ingouff M., Sakata T., Ohad N., et al.** (2008). Retinoblastoma and its binding partner MSI1 control imprinting in Arabidopsis. *PLoS Biol.* 6, e194.
- Jürgens G.** (2005). Plant cytokinesis: Fission by fusion. *Trends Cell Biol.* 15, 277–283.
- Kalderon D., Roberts B. L., Richardson W. D., & Smith A. E.** (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39, 499–509.
- Kalmárová M., Smirnov E., Mašata M., Koberna K., Ligasová A., et al.** (2007). Positioning of NORs and NOR-bearing chromosomes in relation to nucleoli. *J. Struct. Biol.* 160, 49–56.
- Kang B. H., Nielsen E., Preuss M. L., Mastronarde D., & Staehelin L. A.** (2011). Electron tomography of RabA4b- and PI-4 β K1-labeled trans-golgi network compartments in Arabidopsis. *Traffic* 12, 313–329.
- Katoh K., & Toh H.** (2010). Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program. *Bioinformatics* 26, 1899–1900.
- Kauffmann-Zeh A., Thomas G. M. H., Ball A., Prosser S., Cunningham E., et al.** (1995). Requirement for phosphatidylinositol transfer protein in epidermal growth factor signaling. *Science* 268, 1188–1190.
- Kim J. I., Sharkhuu A., Jin J. B., Li P., Jeong J. C., et al.** (2007). *yucca6*, a dominant mutation in Arabidopsis, affects auxin accumulation and auxin-related phenotypes. *Plant Physiol.* 145, 722–735.

- Komaki S., & Schnittger A.** (2016). The spindle checkpoint in plants - a green variation over a conserved theme? *Curr. Opin. Plant Biol.* 34, 84–91.
- Komaki S., Abe T., Coutuer S., Inzé D., Russinova E., et al.** (2009). Nuclear-localized subtype of end-binding 1 protein regulates spindle organization in Arabidopsis. *J. Cell Sci.* 123, 451–459.
- Kong L. J., Orozco B. M., Roe J. L., Nagar S., Ou S., et al.** (2000). A geminivirus replication protein interacts with the retinoblastoma protein through a novel domain to determine symptoms and tissue specificity of infection in plants. *EMBO J.* 19, 3485–3495.
- König S., Ischebeck T., Lerche J., Stenzel I., & Heilmann I.** (2008). Salt-stress-induced association of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate with clathrin-coated vesicles in plants. *Biochem. J.* 415, 387–399.
- Kosugi S., Hasebe M., Matsumura N., Takashima H., Miyamoto-Sato E., et al.** (2009a). Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha. *J. Biol. Chem.* 284, 478–485.
- Kosugi S., Hasebe M., Tomita M., & Yanagawa H.** (2009b). Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 10171–10176.
- Krinke O., Ruelland E., Valentová O., Vergnolle C., Renou J.-P., et al.** (2007). Phosphatidylinositol 4-kinase activation is an early response to salicylic acid in Arabidopsis suspension cells. *Plant Physiol.* 144, 1347–1359.
- Kusano H., Testerink C., Vermeer J. E. M., Tsuge T., Shimada H., et al.** (2008). The Arabidopsis Phosphatidylinositol phosphate 5-kinase PIP5K3 Is a key regulator of root hair tip growth. *Plant Cell* 20, 367–380.
- Kutay U., & Güttinger S.** (2005). Leucine-rich nuclear-export signals: Born to be weak. *Trends Cell Biol.* 15, 121–124.
- Kuwabara A., & Gruissem W.** (2014). Arabidopsis Retinoblastoma-related and Polycomb group proteins: Cooperation during plant cell differentiation and development. *J. Exp. Bot.* 65, 2667–2676.
- Laemmli U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lai A., Lee J. M., Yang W. M., DeCaprio J. A., Kaelin W. G., et al.** (1999). RBP1 recruits both histone deacetylase-dependent and -independent repression activities to retinoblastoma family proteins. *Mol. Cell. Biol.* 19, 6632–6641.
- Lampugnani E. R., Kilinc A., & Smyth D. R.** (2013). Auxin controls petal initiation in Arabidopsis. *Development* 140, 185–194.
- Lange A., Mills R. E., Lange C. J., Stewart M., Devine S. E., et al.** (2007). Classical nuclear localization signals: Definition, function, and interaction with importin alpha. *J. Biol. Chem.* 282, 5101–5105.
- Launholt D., Merkle T., Houben A., Schulz A., & Grasser K. D.** (2006). Arabidopsis chromatin-associated HMGA and HMGB use different nuclear targeting signals and display highly dynamic localization within the nucleus. *Plant Cell* 18, 2904–2918.
- Lazo G. R., Stein P. A., & Ludwig R. A.** (1991). A DNA transformation-competent Arabidopsis genomic library in Agrobacterium. *Nature Bio/Technology* 9, 963–967.
- Lee M. S., Huang Y. H., Huang S. P., Lin R. I., Wu S. F., et al.** (2009a). Identification of a nuclear localization signal in the polo box domain of Plk1. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 1571–1578.
- Lee W. Y., Lee D., Chung W. II, & Kwon C. S.** (2009b). Arabidopsis ING and Alfin1-like protein families localize to the nucleus and bind to H3K4me3/2 via plant homeodomain fingers. *Plant J.* 58, 511–524.
- Lee Y., Bak G., Choi Y., Chuang W.-I., Cho H.-T., et al.** (2008). Roles of phosphatidylinositol 3-kinase in root hair growth. *PLANT Physiol.* 147, 624–635.
- van Leeuwen W., Vermeer J. E. M., Gadella T. W. J., & Munnik T.** (2007). Visualization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the plasma membrane of suspension-cultured tobacco BY-2 cells and whole Arabidopsis seedlings. *Plant J.* 52, 1014–1026.
- Lev S.** (2010). Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 739–750.
- Li J., Kinoshita T., Pandey S., Ng C. K.-Y., Gygi S. P., et al.** (2002). Modulation of an RNA-binding protein by abscisic-acid-activated protein kinase. *Nature* 418, 793–797.
- Lin J., Hu J., Nakai K., Horton P., Cokol M., et al.** (2013). SeqNLS: Nuclear localization signal prediction based on frequent pattern mining and linear motif scoring. *PLoS One* 8, e76864.

- Liu Q., Yan Q., Liu Y., Hong F., Sun Z., et al.** (2013). Complementation of HYPONASTIC LEAVES1 by double-strand RNA-binding domains of DICER-LIKE1 in nuclear dicing bodies. *Plant Physiol.* 163, 108–117.
- Lodish H., Berk A., Kaiser C. A., Krieger M., Bretscher A., et al.** (2012). *Molecular Cell Biology* (Palgrave Macmillan).
- Löfke C., Ischebeck T., König S., Freitag S., & Heilmann I.** (2008). Alternative metabolic fates of phosphatidylinositol produced by phosphatidylinositol synthase isoforms in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. J.* 413, 115–124.
- Lorkovic Z. J., Hilscher J., & Barta A.** (2008). Co-localisation studies of Arabidopsis SR splicing factors reveal different types of speckles in plant cell nuclei. *Exp. Cell Res.* 314, 3175–3186.
- Lorković Z. J., & Barta A.** (2004). Compartmentalization of the splicing machinery in plant cell nuclei. *Trends Plant Sci.* 9, 565–568.
- Lou Y., Gou J.-Y., & Xue H.-W.** (2007). PIP5K9, an Arabidopsis phosphatidylinositol monophosphate kinase, interacts with a cytosolic invertase to negatively regulate sugar-mediated root growth. *Plant Cell* 19, 163–181.
- Luo Y., Wang Z., Tian L., & Li X.** (2013). The function of importin β 1 is conserved in eukaryotes but the substrates may vary in organisms. *Plant Signal. Behav.* 8, 8–10.
- Marfori M., Mynott A., Ellis J. J., Mehdi A. M., Saunders N. F. W., et al.** (2011). Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1813, 1562–1577.
- Marfori M., Lonhienne T. G., Forwood J. K., & Kobe B.** (2012). Structural basis of high-affinity nuclear localization signal interactions with importin- α . *Traffic* 13, 532–548.
- Matos J. L., Lau O. S., Hachez C., Cruz-Ramírez A., Scheres B., et al.** (2014). Irreversible fate commitment in the Arabidopsis stomatal lineage requires a FAMA and RETINOBLASTOMA-RELATED module. *Elife* 3, 1792–1811.
- McCartney A. W., Dyer J. M., Dhanoa P. K., Kim P. K., Andrews D. W., et al.** (2004). Membrane-bound fatty acid desaturases are inserted co-translationally into the ER and contain different ER retrieval motifs at their carboxy termini. *Plant J.* 37, 156–173.
- Meier I., & Brkljacic J.** (2010). The Arabidopsis nuclear pore and nuclear envelope. *Arabidopsis Book* 8, e0139.
- Meier I., & Somers D. E.** (2011). Regulation of nucleocytoplasmic trafficking in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 538–546.
- Meijer H. J. G., & Munnik T.** (2003). Phospholipid-based signalling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 265–306.
- Meijer H. J. G., Berrie C. P., Iurisci C., Divecha N., Musgrave A., et al.** (2001). Identification of a new polyphosphoinositide in plants, phosphatidylinositol 5-monophosphate (PtdIns5P), and its accumulation upon osmotic stress. *Biochem. J.* 360, 491–498.
- Mellman D. L., & Anderson R. A.** (2009). A novel gene expression pathway regulated by nuclear phosphoinositides. *Adv. Enzyme Regul.* 49, 11–28.
- Mellman D. L., Gonzales M. L., Song C., Barlow C. A., Wang P., et al.** (2008). A PtdIns4,5P2-regulated nuclear poly(A) polymerase controls expression of select mRNAs. *Nature* 451, 1013–1017.
- Merkle T.** (2011). Nucleo-cytoplasmic transport of proteins and RNA in plants. *Plant Cell Rep.* 30, 153–176.
- Meyerowitz E. M.** (1997). Genetic control of cell division patterns in developing plants. *Cell* 88, 299–308.
- Mikami K., Saavedra L., Hiwatashi Y., Uji T., Hasebe M., et al.** (2010). A dibasic amino acid pair conserved in the activation loop directs plasma membrane localization and is necessary for activity of plant type I/II phosphatidylinositol phosphate kinase. *Plant Physiol.* 153, 1004–1015.
- Minasbekyan L. A., Yavroyan Z. V., Darbinyan M. R., & Vardevanyan P. O.** (2004). The phospholipid composition of nuclear subfractions from germinating wheat embryos. *Russ. J. Plant Physiol.* 51, 708–712.
- Mishkind M., Vermeer J. E. M., Darwish E., & Munnik T.** (2009). Heat stress activates phospholipase D and triggers PIP2 accumulation at the plasma membrane and nucleus. *Plant J.* 60, 10–21.
- Mohan N., Sudheesh A. P., Francis N., Anderson R., & Laishram R. S.** (2015). Phosphorylation regulates the Star-PAP-PIP1 α interaction and directs specificity toward mRNA targets. *Nucleic Acids Res.* 43, 7005–7020.

- Mosblech A., König S., Stenzel I., Grzeganeck P., Feussner I., et al.** (2008). Phosphoinositide and inositolpolyphosphate signalling in defense responses of *Arabidopsis thaliana* challenged by mechanical wounding. *Mol. Plant* 1, 249–261.
- Moubayidin L., Perilli S., Dello Iorio R., Di Mambro R., Costantino P., et al.** (2010). The rate of cell differentiation controls the arabidopsis root meristem growth phase. *Curr. Biol.* 20, 1138–1143.
- Moubayidin L., Di Mambro R., Sozzani R., Pacifici E., Salvi E., et al.** (2013). Spatial coordination between stem cell activity and cell differentiation in the root meristem. *Dev. Cell* 26, 405–415.
- Mueller-Roeber B., & Pical C.** (2002). Inositol phospholipid metabolism in Arabidopsis. Characterized and putative isoforms of inositol phospholipid kinase and phosphoinositide-specific phospholipase C. *Plant Physiol.* 130, 22–46.
- Nakajima K., & Benfey P. N.** (2002). Signaling in and out: Control of cell division and differentiation in the shoot and root. *Plant Cell* 14 Suppl, S265–S276.
- Nakajima K., Sena G., Nawy T., & Benfey P. N.** (2001). Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* 413, 307–311.
- Narula K., Datta A., Chakraborty N., & Chakraborty S.** (2013). Comparative analyses of nuclear proteome: Extending its function. *Front. Plant Sci.* 4, 100.
- Nawy T., Lee J.-Y., Colinas J., Wang J. Y., Thongrod S. C., et al.** (2005). Transcriptional profile of the Arabidopsis root quiescent center. *Plant Cell* 17, 1908–1925.
- Ndamukong I., Jones D. R., Lapko H., Divecha N., Avramova Z., et al.** (2010). Phosphatidylinositol 5-phosphate links dehydration stress to the activity of ARABIDOPSIS TRITHORAX-LIKE factor ATX1. *PLoS One* 5, e13396.
- Nguyen Ba A. N., Pogoutse A., Provart N., Moses A. M., Lange A., et al.** (2009). NLStradamus: A simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics* 10, 202.
- Nicolson G. L.** (2014). The fluid-mosaic model of membrane structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1838, 1451–1466.
- Nováková P., Hirsch S., Feraru E., Tejos R., van Wijk R., et al.** (2014). SAC phosphoinositide phosphatases at the tonoplast mediate vacuolar function in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 2818–2823.
- Okada K., Ueda J., Komaki M. K., Bell C. J., & Shimura Y.** (1991). Requirement of the auxin polar transport system in early stages of Arabidopsis floral bud formation. *Plant Cell* 3, 677–684.
- Ortega-Martinez O., Pernas M., Carol R. J., & Dolan L.** (2007). Ethylene modulates stem cell division in the *Arabidopsis thaliana* root. *Science* 317, 507–510.
- Osborne S. L., Thomas C. L., Gschmeissner S., & Schiavo G.** (2001). Nuclear PtdIns(4,5)P₂ assembles in a mitotically regulated particle involved in pre-mRNA splicing. *J. Cell Sci.* 114, 2501–2511.
- Pacifici E., Polverari L., & Sabatini S.** (2015). Plant hormone cross-talk: The pivot of root growth. *J. Exp. Bot.* 66, 1113–1121.
- Payraastre B., Nievers M., Boonstra J., Breton M., Verkleij A. J., et al.** (1992). A differential location of phosphoinositide kinases, diacylglycerol kinase, and phospholipase C in the nuclear matrix. *J. Biol. Chem.* 267, 5078–5084.
- Peña P. V., Davrazou F., Shi X., Walter K. L., Verkhusha V. V., et al.** (2006). Molecular mechanism of histone H3K4me₃ recognition by plant homeodomain of ING2. *Nature* 442, 100–103.
- Perales M., & Reddy G. V.** (2012). Stem cell maintenance in shoot apical meristems. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 10–16.
- Perera I. Y., Davis A. J., Galanopoulou D., Im Y. J., & Boss W. F.** (2005). Characterization and comparative analysis of Arabidopsis phosphatidylinositol phosphate 5-kinase 10 reveals differences in Arabidopsis and human phosphatidylinositol phosphate kinases. *FEBS Lett.* 579, 3417–3432.
- Perilli S., & Sabatini S.** (2010). Plant Developmental Biology - Chapter 12, Analysis of Root Meristem Development. *Methods Mol. Biol.* 655, 177–187.
- Perilli S., Di Mambro R., & Sabatini S.** (2012). Growth and development of the root apical meristem. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 17–23.
- Petrovská B., Šebela M., & Doležel J.** (2015). Inside a plant nucleus: Discovering the proteins. *J. Exp. Bot.* 66, 1627–1640.

- Pical C., Westergren T., Dove S. K., Larsson C., & Sommarin M.** (1999). Salinity and hyperosmotic stress induce rapid increases in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, diacylglycerol pyrophosphate, and phosphatidylcholine in *Arabidopsis thaliana* cells. *J. Biol. Chem.* 274, 38232–38240.
- Pien S., Fleury D., Mylne J. S., Crevillen P., Inzé D., et al.** (2008). ARABIDOPSIS TRITHORAX1 dynamically regulates FLOWERING LOCUS C activation via histone 3 lysine 4 trimethylation. *Plant Cell* 20, 580–588.
- Pokotylo I., Kolesnikov Y., Kravets V., Zachowski A., & Ruelland E.** (2014). Plant phosphoinositide-dependent phospholipases C: Variations around a canonical theme. *Biochimie* 96, 144–157.
- Porceddu A., Stals H., Reichheld J.-P., Segers G., De Veylder L., et al.** (2001). A plant-specific cyclin-dependent kinase is involved in the control of G2/M progression in plants. *J. Biol. Chem.* 276, 36354–36360.
- Pribat A., Sormani R., Rousseau-Gueutin M., Julkowska M. M., Testerink C., et al.** (2012). A novel class of PTEN protein in *Arabidopsis* displays unusual phosphoinositide phosphatase activity and efficiently binds phosphatidic acid. *Biochem. J.* 441, 161–171.
- Raices M., & D'Angelo M. A.** (2012). Nuclear pore complex composition: A new regulator of tissue-specific and developmental functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 687–699.
- Ramakers C., Ruijter J. M., Deprez R. H. L., & Moorman A. F.** (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.* 339, 62–66.
- Ramirez-Parra E., Xie Q., Boniotti M. B., & Gutierrez C.** (1999). The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G1/S regulators. *Nucleic Acids Res.* 27, 3527–3533.
- Rando O. J., Zhao K., Janmey P., & Crabtree G. R.** (2002). Phosphatidylinositol-dependent actin filament binding by the SWI/SNF-like BAF chromatin remodeling complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 2824–2829.
- Reddy A. S. N., Day I. S., Göhring J., & Barta A.** (2012). Localization and dynamics of nuclear speckles in plants. *Plant Physiol.* 158, 67–77.
- Reeves P. H., Murtas G., Dash S., Coupland G., Centre J. I., et al.** (2002). early in short days 4, a mutation in *Arabidopsis* that causes early flowering and reduces the mRNA abundance of the floral repressor FLC. *Development* 129, 5349–5361.
- Ribbeck K., Lipowsky G., Kent H. M., Stewart M., Görlich D., et al.** (1998). NTF2 mediates nuclear import of Ran. *EMBO J.* 17, 6587–6598.
- Riou-Khamlichi C., Huntley R., Jacqmar A., & Murray J. A. H.** (1999). Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* 283, 1541–1544.
- Riou-Khamlichi C., Menges M., Healy J. M. S., & Murray J. A. H.** (2000). Sugar control of the plant cell cycle: Differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene Expression. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4513–4521.
- Robbins J., Dilworth S. M., Laskey R. A., & Dingwall C.** (1991). Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: Identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* 64, 615–623.
- Rubin S. M.** (2013). Deciphering the retinoblastoma protein phosphorylation code. *Trends Biochem. Sci.* 38, 12–19.
- Saavedra L., Catarino R., Heinz T., Heilmann I., Bezanilla M., et al.** (2015). Phosphatase and tensin homolog is a growth repressor of both rhizoid and gametophore development in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Physiol.* 169, 2572–2586.
- Sarkar A. K., Luijten M., Miyashima S., Lenhard M., Hashimoto T., et al.** (2007). Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* 446, 811–814.
- Scheres B.** (2001). Plant cell identity. The role of position and lineage. *Plant Physiol.* 125, 112–114.
- Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., et al.** (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682.
- Schoof H., Lenhard M., Haecker A., Mayer K. F., Jürgens G., et al.** (2000). The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell* 100, 635–644.
- Sekine M., Ito M., Uemukai K., Maeda Y., Nakagami H., et al.** (1999). Isolation and characterization of the E2F-like gene in plants. *FEBS Lett.* 460, 117–122.
- Shi X., Hong T., Walter K. L., Ewalt M., Michishita E., et al.** (2006). ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* 442, 96–99.
- Simon M. L. A., Platre M. P., Assil S., Van Wijk R., Chen W. Y., et al.** (2014). A multi-colour/multi-affinity

- marker set to visualize phosphoinositide dynamics in *Arabidopsis*. *Plant J.* 77, 322–337.
- Sindić A., Aleksandrova A., Fields A. P., Volinia S., & Banfić H.** (2001). Presence and activation of nuclear phosphoinositide 3-kinase C2 β during compensatory liver growth. *J. Biol. Chem.* 276, 17754–17761.
- Singer S. J., & Nicolson G. L.** (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720–731.
- Smith C. D., & Wells W. W.** (1983). Phosphorylation of rat liver nuclear envelopes II. Characterization of in vitro lipid phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 258, 9368–9373.
- Smith A., Brownawell A., & Macara I. G.** (1998). Nuclear import of Ran is mediated by the transport factor NTF2. *Curr. Biol.* 8, 1403–S1.
- Smith H. M. S., Hicks G. R., & Raikhel N. V.** (1997). Importin alpha from *Arabidopsis thaliana* is a nuclear import receptor that recognizes three classes of import signals. *Plant Physiol.* 114, 411–407.
- Sozzani R., & Iyer-Pascuzzi A.** (2014). Postembryonic control of root meristem growth and development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 17, 7–12.
- Sozzani R., Cui H., Moreno-Risueno M. A., Busch W., Van Norman J. M., et al.** (2010). Spatiotemporal regulation of cell-cycle genes by SHORTROOT links patterning and growth. *Nature* 466, 128–132.
- Srikanth A., & Schmid M.** (2011). Regulation of flowering time: All roads lead to Rome. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 2013–2037.
- Stahl Y., Grabowski S., Bleckmann A., Kühnemuth R., Weidtkamp-Peters S., et al.** (2013). Moderation of *Arabidopsis* root stemness by CLAVATA1 and ARABIDOPSIS CRINKLY4 receptor kinase complexes. *Curr. Biol.* 23, 362–371.
- Stamatakis A., Hoover P., & Rougemont J.** (2008). A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. *Syst. Biol.* 57, 758–771.
- Stauffer T. P., Ahn S., & Meyer T.** (1998). Receptor-induced transient reduction in plasma membrane PtdIns(4,5)P₂ concentration monitored in living cells. *Curr. Biol.* 8, 343–346.
- Steeves T. A., & Sussex I. M.** (1989). Patterns in plant development (Cambridge University Press).
- Stenzel I., Ischebeck T., König S., Hotubowska A., Sporysz M., et al.** (2008). The type B phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase 3 is essential for root hair formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 20, 124–141.
- Stenzel I., Ischebeck T., Quint M., & Heilmann I.** (2012). Variable regions of PI4P 5-kinases direct PtdIns(4,5)P₂ toward alternative regulatory functions in tobacco pollen tubes. *Front. Plant Sci.* 2, 114.
- Stępiński D.** (2014). Functional ultrastructure of the plant nucleolus. *Protoplasma* 251, 1285–1306.
- Stevenson J. M., Perera I. Y., & Boss W. F.** (1998). A phosphatidylinositol 4-kinase pleckstrin homology domain that binds phosphatidylinositol 4-monophosphate. *J. Biol. Chem.* 273, 22761–22767.
- Strambio-De-Castillia C., Niepel M., & Rout M. P.** (2010). The nuclear pore complex: Bridging nuclear transport and gene regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 490–501.
- Subramanian C., Kim B.-H., Lyssenko N. N., Xu X., Johnson C. H., et al.** (2004). The *Arabidopsis* repressor of light signaling, COP1, is regulated by nuclear exclusion: Mutational analysis by bioluminescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 6798–6802.
- Sugimoto K., Gordon S. P., & Meyerowitz E. M.** (2011). Regeneration in plants and animals: Dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? *Trends Cell Biol.* 21, 212–218.
- Tamura K., & Hara-Nishimura I.** (2013). The molecular architecture of the plant nuclear pore complex. *J. Exp. Bot.* 64, 823–832.
- Tamura K., & Hara-Nishimura I.** (2014). Functional insights of nucleocytoplasmic transport in plants. *Front. Plant Sci.* 5, 1–10.
- Tamura K., Fukao Y., Iwamoto M., Haraguchi T., & Hara-Nishimura I.** (2010). Identification and characterization of nuclear pore complex components in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 22, 4084–4097.
- Tejos R., Sauer M., Vanneste S., Palacios-Gomez M., Li H., et al.** (2014). Bipolar plasma membrane distribution of phosphoinositides and their requirement for auxin-mediated cell polarity and patterning in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 26, 2114–2128.
- Thole J. M., Vermeer J. E. M., Zhang Y., Gadella T. W. J., & Nielsen E.** (2008). Root hair defective4 encodes a phosphatidylinositol-4-phosphate phosphatase required for proper root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 20, 381–395.
- Toska E., Campbell H. A., Shandilya J., Goodfellow S. J., Shore P., et al.** (2012). Repression of transcription by WT1-BASP1 requires the myristoylation of BASP1 and the PIP₂-dependent recruitment of histone

deacetylase. *Cell Reports* 2, 462–469.

Toska E., Shandilya J., Goodfellow S. J., Medler K. F., & Roberts S. G. E. (2014). Prohibitin is required for transcriptional repression by the WT1-BASP1 complex. *Oncogene* 33, 5100–5108.

Trembl B. S., Winderl S., Radykewicz R., Herz M., Schweizer G., et al. (2005). The gene ENHANCER OF PINOID controls cotyledon development in the Arabidopsis embryo. *Development* 132, 4063–4074.

Ubeda-Tomás S., Federici F., Casimiro I., Beemster G. T. S., Bhalerao R., et al. (2009). Gibberellin signaling in the endodermis controls Arabidopsis root meristem size. *Curr. Biol.* 19, 1194–1199.

Ugalde J.-M., Rodriguez-Furlán C., Rycke R. De, Norambuena L., Friml J., et al. (2016). Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinases 1 and 2 are involved in the regulation of vacuole morphology during *Arabidopsis thaliana* pollen development. *Plant Sci.* 250, 10–19.

Vann R. L., Wooding P. F. B., Irvine F. R., & Divecha N. (1997). Metabolism and possible compartmentalization of inositol lipids in isolated rat-liver nuclei. *Biochem. J.* 327, 569–576.

Vermeer J. E. M., Thole J. M., Goedhart J., Nielsen E., Munnik T., et al. (2009). Imaging phosphatidylinositol 4-phosphate dynamics in living plant cells. *Plant J.* 57, 356–372.

Vermeer J. E. M., van Leeuwen W., Tobeña-Santamaria R., Laxalt A. M., Jones D. R., et al. (2006). Visualization of PtdIns3P dynamics in living plant cells. *Plant J.* 47, 687–700.

De Veylder L., De Almeida Engler J., Burssens S., Manevski A., Lescure B., et al. (1999). A new D-type cyclin of *Arabidopsis thaliana* expressed during lateral root primordia formation. *Planta* 208, 453–462.

De Veylder L., Beeckman T., & Inzé D. (2007). The ins and outs of the plant cell cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 655–665.

Voinnet O., Rivas S., Mestre P., & Baulcombe D. (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 33, 949–956.

Wachsman G., Heidstra R., & Scheres B. (2011). Distinct cell-autonomous functions of RETINOBLASTOMA-RELATED in Arabidopsis stem cells revealed by the Brother of Rainbow clonal analysis system. *Plant Cell* 23, 2581–2591.

Wang C., Liu C., Roqueiro D., Grimm D., Schwab R., et al. (2015). Genome-wide analysis of local chromatin packing in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res.* 25, 246–256.

Wang X., Li W., Piqueras R., Cao K., Deng X. W., et al. (2009). Regulation of COP1 nuclear localization by the COP9 signalosome via direct interaction with CSN1. *Plant J.* 58, 655–667.

Watt S. A., Kular G., Fleming I. N., Downes C. P., & Lucocq J. M. (2002). Subcellular localization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate using the pleckstrin homology domain of phospholipase C delta1. *Biochem. J.* 363, 657–666.

Weigel D., & Jürgens G. (2002). Stem cells that make stems. *Nature* 415, 751–754.

Welters P., Takegawa K., Emr S. D., & Chrispeels M. J. (1994). AtVPS34, a phosphatidylinositol 3-kinase of *Arabidopsis thaliana*, is an essential protein with homology to a calcium-dependent lipid binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 11398–11402.

Wildwater M., Campilho A., Perez-Perez J. M., Heidstra R., Blilou I., et al. (2005). The RETINOBLASTOMA-RELATED gene regulates stem cell maintenance in Arabidopsis roots. *Cell* 123, 1337–1349.

Williams M. E., Torabinejad J., Cohick E., Parker K., Drake E. J., et al. (2005). Mutations in the Arabidopsis phosphoinositide phosphatase gene SAC9 lead to overaccumulation of PtdIns(4,5)P₂ and constitutive expression of the stress-response pathway. *Plant Physiol.* 138, 686–700.

Wirthmueller L., Roth C., Banfield M. J., & Wiermer M. (2013). Hop-on hop-off: Importin- α -guided tours to the nucleus in innate immune signaling. *Front. Plant Sci.* 4, 149.

Xue H. W., Pical C., Brearley C., Elge S., & Müller-Röber B. (1999). A plant 126-kDa phosphatidylinositol 4-kinase with a novel repeat structure. Cloning and functional expression in baculovirus-infected insect cells. *J. Biol. Chem.* 274, 5738–5745.

Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., et al. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13, 134.

York J. D., & Majerus P. W. (1994). Nuclear phosphatidylinositols decrease during S-phase of the cell cycle in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 269, 7847–7850.

Yruela I. (2015). Plant development regulation: Overview and perspectives. *J. Plant Physiol.* 182, 62–78.

Yu H., Fukami K., Watanabe Y., Ozaki C., & Takenawa T. (1998). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate reverses the inhibition of RNA transcription caused by histone H1. *Eur. J. Biochem.* 251, 281–287.

- Zhang M. Y., Churpek J. E., Keel S. B., Walsh T., Lee M. K., et al.** (2015). Germline ETV6 mutations in familial thrombocytopenia and hematologic malignancy. *Nat. Genet.* 47, 180–185.
- Zhang Q., Lin F., Mao T., Nie J., Yan M., et al.** (2012). Phosphatidic acid regulates microtubule organization by interacting with MAP65-1 in response to salt stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24, 4555–4576.
- Zhao Y., Christensen S. K., Fankhauser C., Cashman J. R., Cohen J. D., et al.** (2001). A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science* 291, 306–309.
- Zhong R., & Ye Z.-H.** (2004). Molecular and biochemical characterization of three WD-repeat-domain-containing inositol polyphosphate 5-phosphatases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 45, 1720–1728.
- Zhong R., Burk D. H., Morrison W. H., & Ye Z.-H.** (2004). FRAGILE FIBER3, an *Arabidopsis* gene encoding a type II inositol polyphosphate 5-phosphatase, is required for secondary wall synthesis and actin organization in fiber cells. *Plant Cell* 16, 3242–3259.
- Zhong R., Burk D. H., Nairn C. J., Wood-Jones A., Morrison W. H., et al.** (2005). Mutation of SAC1, an *Arabidopsis* SAC domain phosphoinositide phosphatase, causes alterations in cell morphogenesis, cell wall synthesis, and actin organization. *Plant Cell* 17, 1449–1466.

7 Anhang

7.1 Zusätzliche Abbildungen zu den dargestellten Ergebnissen

PIP5K2 (At1g77740)

MMREPLVSEEEEEATEVLLVEKTKLCKRRGDEEKTEERRDLLLLLALTPMVRSKSQGTTRR
 VTPTPPPVDVEKPLPNGDLYMGTFSSGGFPNGSGKYLWKDGCMEYEGEWKRGKASGKGKFSWPS
 GATYEGEFKSGRMEGSGTFVGVGDYRGSWVADRKQGHGQKRYANGDYEGTWRRNLQDGR
 GRYVWMNGNQYTGEWRNGVICGKGVLAWPNGNRYEGQWENGVPKGSVFTWADGSSWIGSWN
 ESSNLMRNFFDGIKNEELIVATRKRSVDSGAGSLTGEKIFPRICIWESDGEAGDITCDIVD
 NVEASVIYRDRISIDKDGFRQFRKNPCCFSGEAKKPGETISKGHKKYDLMLNLQHGIRYSVG
 KHASVVRDLKQSDFDPSSEKFWTRFPPEGSKTTPPHLSVDFRWKDYCPLVFRRLRELFVDP
 DYMLAICGNDALRELSSPGKSGSFFYLTDQDDRFMIKTVKKSEVKVLLRMLPSYYKHVCQYEN
 TLVTRFYGVHCIPVGGQKTRFIVMGNLFCSEYRIQRRFDLKGSSHGRYTSKPEGEIDETTT
 LKDLNLNFAFRLQRNWDYELMTQIKRDCEFLAERIMDYSLLVGVHFRDDNTGDKMGLSPFV
 LRSGKIESYQSEKFMRGCRFLEAELQDMDRILAGRKPLIRLGANMPARAERMARRSDYDQYS
 SGGTNYQSHGEVYEVVLYFGIIDILQDYDISKKIEHAYKSLQADPASI SAVDPKLYSRRFRD
 FISRI FIEDG

Abbildung 7.1 **Bioinformatisch vorhergesagte NLS von PIP5K2**. Die vorhergesagten NLS (vgl. Abbildung 2.8) sind in der Aminosäuresequenz von Arabidopsis PIP5K2 (At1g77740) grau hervorgehoben. Aminosäuren, die im Zuge dieser Arbeit auf ihre Funktionalität in der Kernlokalisierung von PIP5K2 betrachtet wurden sind fett geschrieben.

A

```

          ---NLS IV-----
AtPIP5K1  261 -KNDLIVGNRKRSSVDSG--AGSLGGEKVFPRICIWESDGG---
AtPIP5K2  263 -KNEELIVATRKRSSVDSG--AGSLTGEKIFPRICIWESDGG---
AtPIP5K3  230 -KDEEIVQNHKLSVET-----LSANTNFPRICISELEDTGV
AtPIP5K4  266 -PKDVF-TNLSEYKTCSEGERVPLPSQKKLSVWNSSKRVEKPR
AtPIP5K5  264 -PKDLF-NNLSEYTTCSGERVPTLPSQKKLSVWNSSKRIEKPR
AtPIP5K6  221 -PQQVFYVDLSECVVCTCQRIPVLPSPQKMPVWYGASEQSSSGN
AtPIP5K7  207 RSLFYDDTGK FVLSRSASVNV EELRSLNVTVTQSLV-VKTSAGE
AtPIP5K8  207 RHFGYDDTG NFLLSHNS TINLDDLRTSKAVSRSLSELTTSGL
AtPIP5K9  253 RKRGVLPDMRRQNQVASSVNMENLRVGVNRNKLSKGS LINLEQ

```

B

```

          ---NLS IV-----
A. thaliana  263 -KNEELIVATRKRSSVD---SGAGSLTGEKIFPRICIWESDGEA
S. lycopersicum  325 CGLLVMMNMGKKRSSVD---GS RGSMTERNFPRICIWESDGEA
P. trichocarpa  297 LVLTA-TTTRKRSSVD---GGRGS---GMNFPRICIWESDGEA
V. vinifera  276 MDQNLMTVATRKRSSVD---GARGSLA-EKSFPRICIWESDGEA
G. max  235 --DNLTVSMRKRSSVD---SARGSGV-KSFPRICIWESGEA
M. truncatula  226 -----VMMRKRSSVDTTVSGRGS LN-EKNFPRICIWESGEA
O. sativa  226 --AGGGGAVRKRSSVE-----GVGDKASAVPRICIWESGEA
Z. mays  213 --AGAPAAVRKRSSVE-----GVGEKAT--PRICIWESGEA
S. moellendorffii  213 ----FPPRP RRWSLEGGDLTHSKDSSQKKSATDT-----
P. patens  239 KGGDFSNSIQRRSMDGPLERGFGLGNGSVRTTDTILEGVER
O. tauri  243 ---AFMPPMQEKDTGGFLRSISNIGGLKRLQPKTSFEEVEQA
C. reinhardtii  95 --KESKARQLIKTSSGRLMGS GTERGGGCDPRSGCVWDGWLPD

```

Abbildung 7.2 Aminosäure-Sequenzvergleich von PIP5K2 NLSIV mit Aminosäuresequenzen ausgewählter pflanzlicher PI4P 5-Kinasen. (A) Sequenzvergleich des Aminosäuresequenzbereichs, der bei PIP5K2 die NLSIV enthält mit den Arabidopsis PI4P 5-Kinase-Isoformen PIP5K1 (At1g21980), PIP5K2 (At1g77740) PIP5K3 (At2g26420), PIP5K4 (At3g56960), PIP5K5 (At2g41210), PIP5K6 (At3g07960), PIP5K7 (At1g10900), PIP5K8 (At1g60890) und PIP5K9 (At3g09920). PIP5K10 (At4g01190), PIP5K11 (At1g01460) besitzen keine N-terminalen Domänen und deshalb nicht im Alignment gezeigt. (B) Sequenzvergleich pflanzlicher Orthologen von PIP5K2 (AT1G77740) aus Arabidopsis. Ausgewählt wurden mögliche PIP5K2-Sequenzen aus Tomate (*Solanum lycopersicum*, XP_004250336.1), Pappel (*Populus trichocarpa*, XP_002307416.1), Wein (*Vitis vinifera*, XP_002284379.1), Soja (*Glycine max*, XP_003526609.1), Schneckenklee (*Medicago truncatula*, XP_013453994.1), Reis (*Oryza sativa*, XP_015633005.1), Mais (*Zea mays*, NP_001136793.1), so wie die Moosfarne Sellaginella moellendorffii (XP_002988736.1), das Moos Physcomitrella patens (XP_001781776.1) und die einzelligen Grünalgen *Ostreococcus tauri* (XP_003080505.1) und *Chlamydomonas reinhardtii* (XP_001697577.1). Grün, funktionale Aminosäuren von NLSIV; gelb, Aminosäuren mit ähnlicher Eigenschaft der Aminosäuren von NLSIV.

A

---NLS VI---

AtPIP5K1	649	ILAGRKPSIRLGNMPAKAERMARRSDFDQ-----
AtPIP5K2	651	ILAGRKPLIRLGNMPARAERMARRSDYDQ-----
AtPIP5K3	603	----NGPLMRLGESTPAKAEQVSRFEETW-----
AtPIP5K4	680	SDPTRWASIRLGNMPARAERTMRRSDCEF-----
AtPIP5K5	673	SDPSRWASIRLGTNMPARAERTMRKNDSEL-----
AtPIP5K6	616	LDASKLASIKLGINMPARVERTARRSDCEN-----
AtPIP5K7	624	THEPNSVNTAPGPHIRGSTLRAF SVGEQEVLDLILPGTARLRVQLGV
AtPIP5K8	639	THEPNSVNTAPGPHIRGSTLRAF SVGEKEVLDLILPGTARLRVQLGV
AtPIP5K9	687	PR--GSENTVTGPHIRGSRLRASAVGDEEVDLLLPGTARLQIQQGV
AtPIP5K10	267	SCSPDRDSVENEMSMTIQSVTSNSASS-----ETNILATTL
AtPIP5K11	275	SCTPSRNSVDSENSVNIQSVASISPSPAQTNASDSPYESLVSKTNL

B

---NLS VI---

<i>A. thaliana</i>	649	DRILAG-RKPLIRLGNMPARAERMARRSDYDQYSSGGTNYQSH--
<i>S. lycopersicum</i>	771	DRILAG-RKPLIQLGANMPARAERVARRSDFDQYTPGGFCNVPPSR
<i>P. trichocarpa</i>	681	DRVLSG-RKSLIRLGNMPATAERMVRRSDFDQYTPGGFSLTTPSR
<i>V. vinifera</i>	662	DRILAG-RKPLIRLGNMPARAERMARRSDFDQYTPGGSSLTTPSR
<i>G. max</i>	617	DRVKSG-RKSLIRLGNMPARAERMARRSDFDQYT-----PCC
<i>M. truncatula</i>	625	DRVKSG-RKSLIRLGNMPARAERLARRSDFDQYTNGGISHLNPYS
<i>O. sativa</i>	623	DRIPDC-RKPLIRLGAHMPARAEQASRRSEFDPLLLNGGGFLAPNQ
<i>Z. mays</i>	609	DMVPDCHRKPLIRLGAHMPARAEQASRRSEFDPLLLTGGGFLFPNQ
<i>S. moellendorffii</i>	576	CSLPKTTT-RLQIRLGVNMPARADRS HCDDGTSS-----
<i>P. patens</i>	676	LLIPGTARRLRIQLGVNMPARAERVHKKDDESKTSEGQF-----
<i>O. tauri</i>	679	DELLARSAGAETRLGVAMSAVAHVHGRVIKKQHQLPKGKSAL---EE
<i>C. reinhardtii</i>	489	DRALHA-PKHQKNEGDNEQARVEEAAGASDEEEDLVGGAA--ASAS

Abbildung 7.3 Aminosäure-Sequenzvergleich von PIP5K2 NLSVI mit Aminosäuresequenzen ausgewählter pflanzlicher PI4P 5-Kinasen. (A) Sequenzvergleich des Aminosäuresequenzbereichs, der bei PIP5K2 das LxCxE-Motiv enthält mit den Arabidopsis PI4P 5-Kinase-Isoformen PIP5K1 (At1g21980), PIP5K2 (At1g77740) PIP5K3 (At2g26420), PIP5K4 (At3g56960), PIP5K5 (At2g41210), PIP5K6 (At3g07960), PIP5K7 (At1g10900), PIP5K8 (At1g60890), PIP5K9 (At3g09920), PIP5K10 (At4g01190) und PIP5K11 (At1g01460). (B) Sequenzvergleich pflanzlicher Orthologen von PIP5K2 (AT1G77740) aus Arabidopsis. Ausgewählt wurden mögliche PIP5K2-Sequenzen aus Tomate (*Solanum lycopersicum*, XP_004250336.1), Pappel (*Populus trichocarpa*, XP_002307416.1), Wein (*Vitis vinifera*, XP_002284379.1), Soja (*Glycine max*, XP_003526609.1), Schneckenklee (*Medicago truncatula*, XP_013453994.1), Reis (*Oryza sativa*, XP_015633005.1), Mais (*Zea mays*, NP_001136793.1), so wie die Moosfarnpflanze *Sellaginella moellendorffii* (XP_002988736.1), das Moos *Physcomitrella patens* (XP_001781776.1) und die einzelligen Grünalgen *Ostreococcus tauri* (XP_003080505.1) und *Chlamydomonas reinhardtii* (XP_001697577.1). Grün, funktionale Aminosäuren von NLSVI; gelb, Aminosäuren mit ähnlicher Eigenschaft der Aminosäuren von NLSVI.

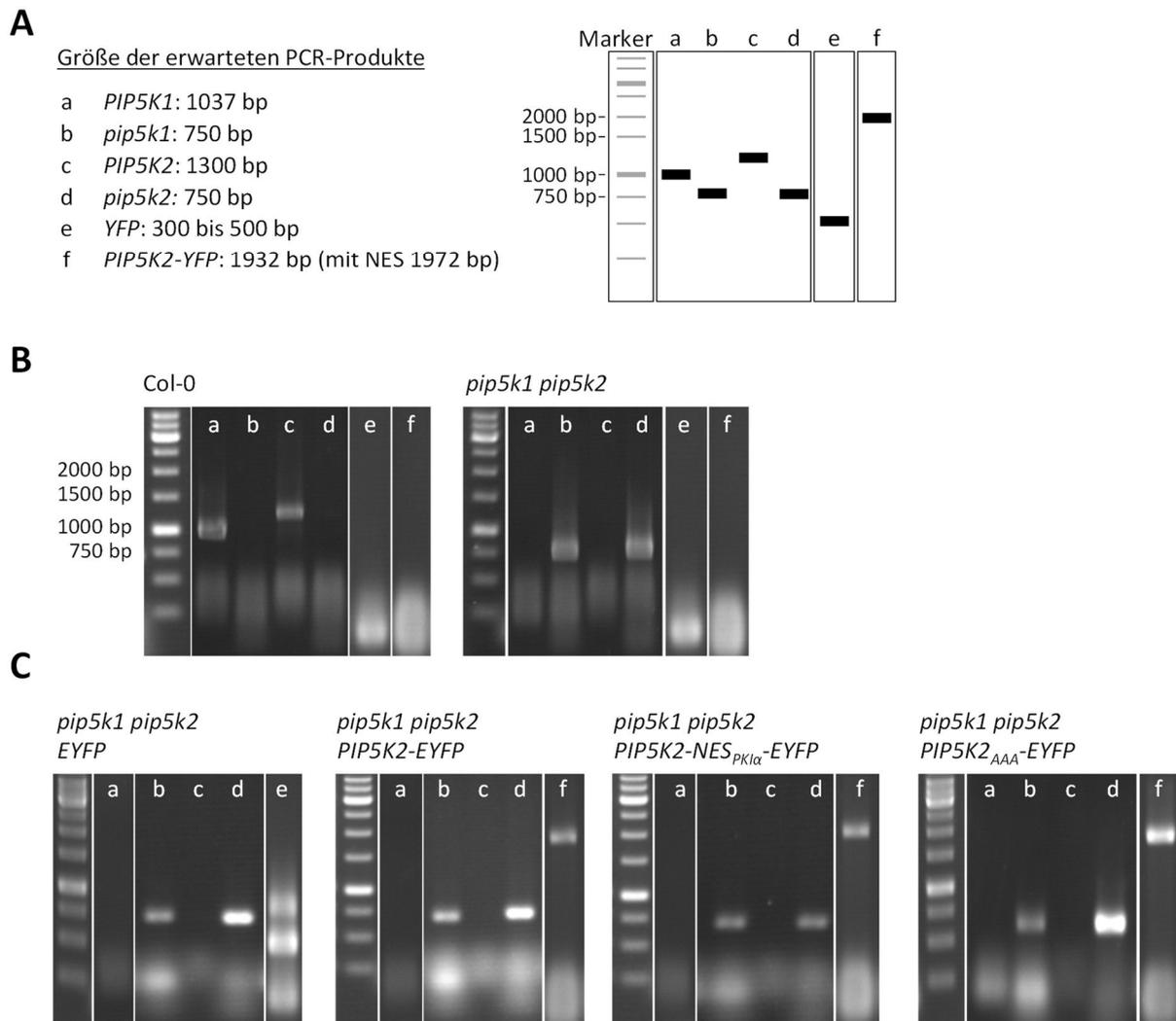


Abbildung 7.4 **Genotypische Charakterisierung der transformierten *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante durch PCR mit spezifischen Primern.** (A) Die Größe der zu erwartenden PCR-Produkte ist für jede genutzte Primerkombination links aufgeschlüsselt und rechts schematisch dargestellt. Die genutzten Primer sind in Tabelle 7.1 aufgelistet (B) Zur Kontrolle der Bindungsspezifität der verwendeten Oligonukleotide wurden auch die Genotypen von Col-0 und nicht transformierter *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante nachgewiesen. (C) Der Genotyp der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante, transformiert mit Expressionskassetten für PIP5K2-EYFP-Varianten unter Kontrolle des endogenen PIP5K2-Promotors. Der Größenstandard ist in allen gezeigten Fällen identisch.

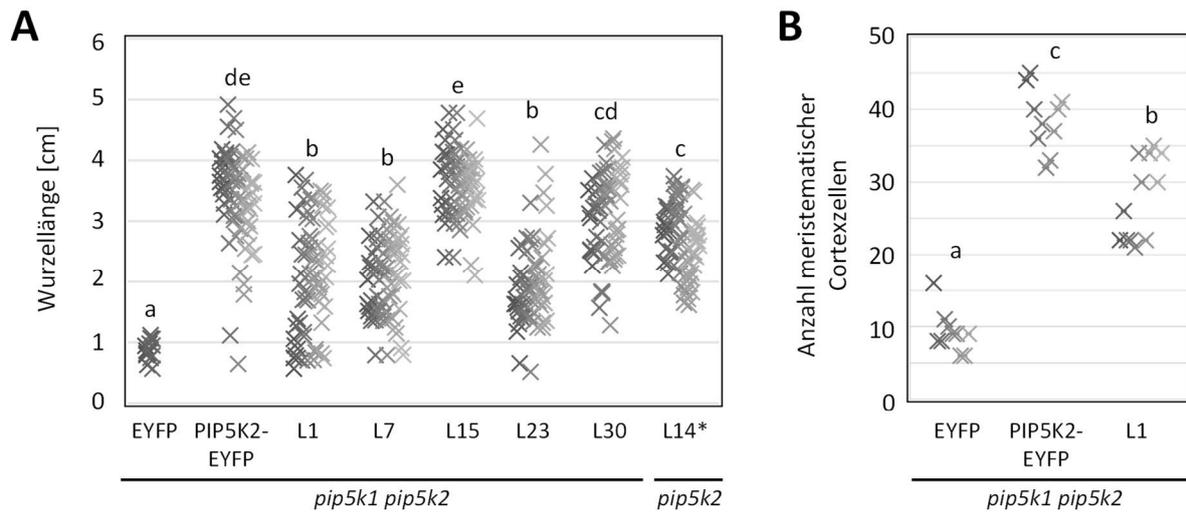


Abbildung 7.5 **Wurzellänge sieben Tage alter *pip5k1 pip5k2-PIP5K2^{AAA}-EYFP*-Linien**. Alternative Darstellung der Daten aus Abbildung 2.16B und C. EYFP, PIP5K2-EYFP oder PIP5K2^{AAA}-EYFP wurden unter Kontrolle des endogenen *PIP5K2*-Promotors in *pip5k1 pip5k2* exprimiert. Selektierte Pflanzen wurden auf vertikalen ½MS-Agarplatten unter Langtagbedingungen (16h Licht) angezogen. **(A)** Grafische Darstellung der Wurzellängen. Mit Hilfe des Programms ImageJ wurde die Wurzellänge von 16 EYFP-exprimierenden Keimlinge und 65-73 PIP5K2-EYFP- oder PIP5K2^{AAA}-EYFP-exprimierenden Keimlingen ausgewertet. Zur statistischen Analyse wurde eine zweiseitige ANOVA durchgeführt. Unterschiedliche Buchstaben repräsentieren statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$; Tukey Post-Hoc-Test). Die Abbildung ist repräsentativ für zwei Experimente. **(B)** Die Größe des Wurzelmeristems sechs Tage alter Keimlinge wurde über die Anzahl meristematischer Cortezellen bestimmt. Ausgewertet wurde die Zellzahl von 10 Keimlingen je Linie. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe eines generalisierten linearen Modells mit angenommener Poisson-Verteilung beschrieben und mit einer zweiseitigen ANOVA auf Unterschiede überprüft. Unterschiedliche Buchstaben repräsentieren statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$; Tukey Post-Hoc-Test). L14*, Linie 14 besitzt Genotyp *pip5k2 PIP5K2^{AAA}-EYFP*.

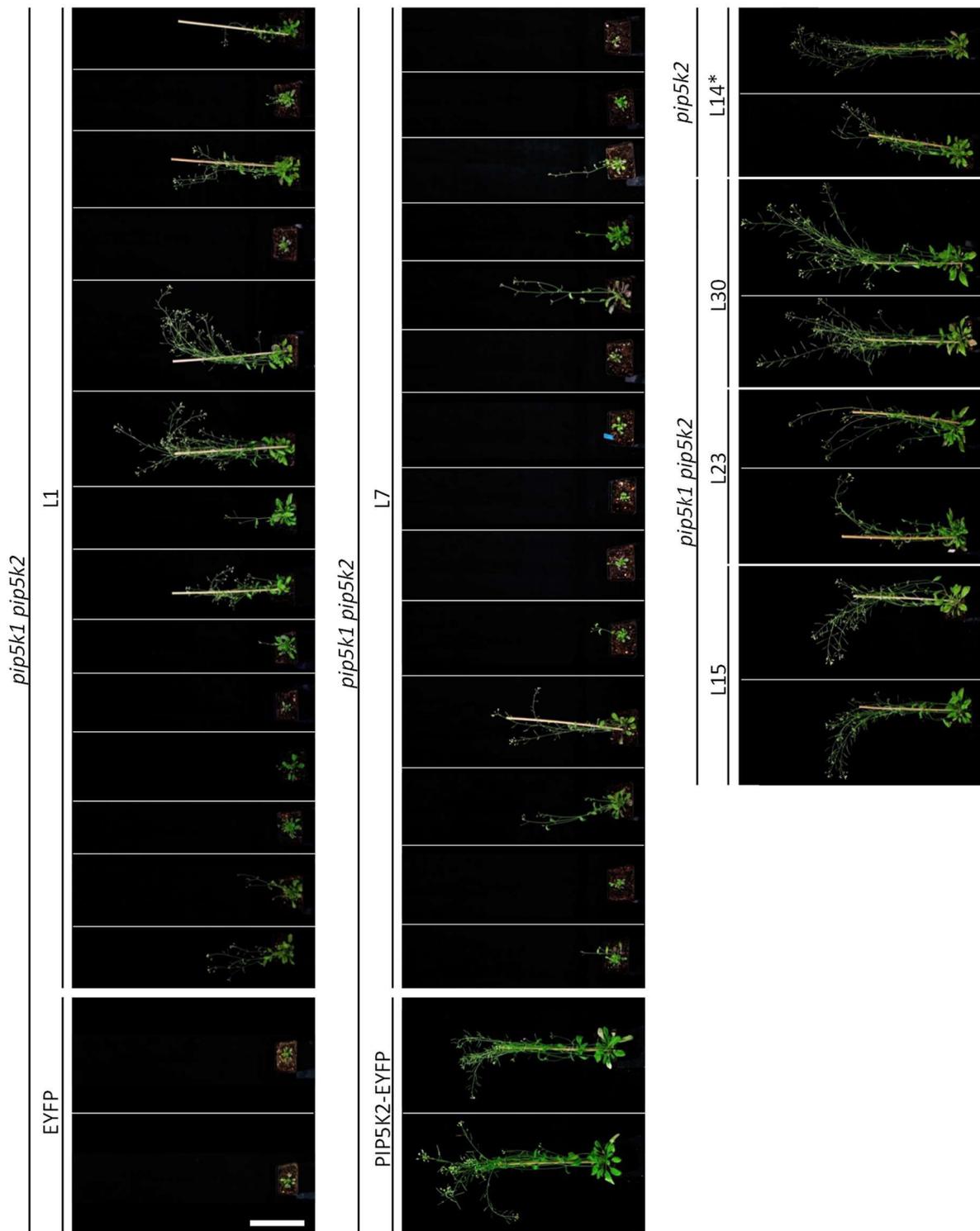


Abbildung 7.6 **Wachstumspheänotyp sechs Wochen alter *pip5k1 pip5k2* PIP5K2^{AAA}-EYFP Pflanzen.** Abbildung ergänzend zu Abbildung 3.17. EYFP, PIP5K2-EYFP bzw. PIP5K2^{AAA}-EYFP wurden unter Kontrolle des endogenen PIP5K2-Promotors in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante exprimiert. Gezeigt sind Aufnahmen sechs Wochen alter Pflanzen. Die gezeigten Pflanzen sind repräsentativ für 14 Pflanzen je Linie. Ausführliche Darstellung von 14 untersuchten Individuen von *pip5k1 pip5k2* PIP5K2^{AAA}-EYFP Linie 1 und Linie 7. Das Wachstum der anderen Linien ist deutlich gleichmäßiger, daher sind jeweils zwei Individuen dokumentiert. L14*, Linie 14 besitzt Genotyp *pip5k2* PIP5K2^{AAA}-EYFP. Maßstab 10 cm.

A

		LxCxE																																						
AtPIP5K1	513	G	--	G	Q	K	T	R	F	I	V	M	G	N	L	F	C	S	E	Y	R	I	Q	R	R	F	D	L	K	G	S	S	H	G	R	S	T	A	K	
AtPIP5K2	515	G	--	G	Q	K	T	R	F	I	V	M	G	N	L	F	C	S	E	Y	R	I	Q	R	R	F	D	L	K	G	S	S	H	G	R	Y	T	S	K	
AtPIP5K3	487	G	--	G	Q	K	T	R	F	I	V	M	G	N	L	F	C	S	E	Y	R	I	H	K	R	F	D	L	K	G	S	S	H	G	R	T	I	D	K	
AtPIP5K4	549	G	P	I	Q	K	K	V	R	F	V	I	M	G	N	L	F	C	S	E	Y	S	I	H	R	R	F	D	L	K	G	S	S	L	G	R	T	T	D	K
AtPIP5K5	542	G	P	T	Q	K	K	V	R	F	V	I	M	G	N	L	F	C	S	K	Y	S	V	H	R	R	F	D	L	K	G	S	S	L	G	R	T	T	D	K
AtPIP5K6	488	G	T	A	Q	K	K	V	R	F	V	I	M	G	N	L	F	C	T	G	H	S	I	H	R	R	F	D	L	K	G	S	S	H	G	R	L	T	T	K
AtPIP5K7	492	W	--	G	K	K	V	R	F	V	M	G	N	M	F	C	T	E	L	K	I	H	R	R	Y	D	L	K	G	S	T	Q	G	R	F	T	E	K		
AtPIP5K8	505	W	--	G	K	K	V	R	F	V	M	G	N	M	F	C	T	E	L	K	I	H	R	R	Y	D	L	K	G	S	T	Q	G	R	Y	T	E	K		
AtPIP5K9	554	S	--	G	Q	K	T	R	F	V	M	G	N	M	F	F	T	D	L	R	I	H	R	R	F	D	L	K	G	S	S	L	G	R	S	A	D	K		
AtPIP5K10	131	G	--	G	V	K	T	Y	E	A	V	M	S	N	M	L	H	S	T	I	F	V	N	K	L	Y	D	L	K	G	S	P	K	G	R	S	N	K	K	
AtPIP5K11	139	G	--	G	V	K	T	Y	E	V	V	M	S	N	I	L	Q	S	D	V	E	M	N	K	V	Y	D	L	K	G	S	Q	G	R	T	N	K	K		

B

		LxCxE																																						
<i>A. thaliana</i>	511	V	G	G	Q	--	K	T	R	F	I	V	M	G	N	L	F	C	S	E	Y	R	I	Q	R	R	F	D	L	K	G	S	S	H	G	R	Y	T	S	K
<i>S. lycopersicum</i>	573	V	G	G	V	--	K	T	R	F	I	V	M	G	N	M	F	C	S	E	Y	R	I	H	R	R	F	D	L	K	G	S	S	H	G	R	T	T	D	K
<i>P. trichocarpa</i>	534	I	G	G	P	--	K	T	R	F	I	V	M	G	N	L	F	C	S	E	Y	R	I	H	R	R	F	D	L	K	G	S	S	H	G	R	T	A	D	K
<i>V. vinifera</i>	524	V	G	G	Q	--	K	T	R	F	I	V	M	G	N	L	F	C	S	E	Y	R	I	H	R	R	F	D	L	K	G	S	S	H	G	R	T	T	D	K
<i>G. max</i>	480	I	G	G	Q	--	K	T	R	F	I	V	M	G	N	L	F	C	S	E	Y	Q	I	H	R	R	F	D	L	K	G	S	S	H	G	R	T	T	D	K
<i>M. truncatula</i>	487	I	G	G	Q	--	K	I	R	F	I	V	M	G	N	L	F	C	S	E	Y	P	I	H	R	R	F	D	L	K	G	S	S	H	G	R	A	T	D	K
<i>O. sativa</i>	485	L	N	G	Q	--	K	V	R	F	I	V	M	G	N	L	F	C	S	E	Y	R	I	H	R	R	F	D	L	K	G	S	S	Y	G	R	T	A	D	K
<i>Z. mays</i>	472	L	N	G	Q	--	K	V	R	F	I	V	M	G	N	L	F	C	S	E	Y	Q	I	H	R	R	F	D	L	K	G	S	S	Y	G	R	T	A	D	K
<i>S. moellendorffii</i>	446	---	---	---	---	---	V	R	F	V	M	G	N	V	F	C	T	D	L	H	I	H	R	R	F	D	L	K	G	S	S	Q	G	R	S	T	D	K		
<i>P. patens</i>	503	Y	G	G	Q	--	K	V	R	F	V	M	G	N	M	F	C	T	E	L	R	I	H	R	R	F	D	L	K	G	S	S	Q	G	R	S	A	D	K	
<i>O. tauri</i>	502	L	G	S	A	T	K	V	R	V	V	M	A	N	L	F	P	S	K	Y	P	I	H	R	T	E	D	L	K	G	S	R	H	G	R	F	T	K	P	
<i>C. reinhardtii</i>	351	V	H	G	R	--	T	V	R	F	V	M	H	N	M	F	N	T	D	L	Q	I	H	K	K	F	D	L	K	G	S	T	D	G	R	T	T	G	P	

Abbildung 7.7 Aminosäure-Sequenzvergleich von PIP5K2 NLSVI mit Aminosäuresequenzen ausgewählter pflanzlicher PI4P 5-Kinasen. (A) Sequenzvergleich des Aminosäuresequenzbereichs, der bei PIP5K2 das LxCxE-Motiv enthält mit den Arabidopsis PI4P 5-Kinase-Isoformen PIP5K1 (At1g21980), PIP5K2 (At1g77740) PIP5K3 (At2g26420), PIP5K4 (At3g56960), PIP5K5 (At2g41210), PIP5K6 (At3g07960), PIP5K7 (At1g10900), PIP5K8 (At1g60890), PIP5K9 (At3g09920), PIP5K10 (At4g01190) und PIP5K11 (At1g01460). (B) Sequenzvergleich pflanzlicher Orthologen von PIP5K2 (AT1G77740) aus Arabidopsis. Ausgewählt wurden mögliche PIP5K2-Sequenzen aus Tomate (*Solanum lycopersicum*, XP_004250336.1), Pappel (*Populus trichocarpa*, XP_002307416.1), Wein (*Vitis vinifera*, XP_002284379.1), Soja (*Glycine max*, XP_003526609.1), Schneckenklee (*Medicago truncatula*, XP_013453994.1), Reis (*Oryza sativa*, XP_015633005.1), Mais (*Zea mays*, NP_001136793.1), so wie die Moosfarnpflanze *Sellaginella moellendorffii* (XP_002988736.1), das Moos *Physcomitrella patens* (XP_001781776.1) und die einzelligen Grünalgen *Ostreococcus tauri* (XP_003080505.1) und *Chlamydomonas reinhardtii* (XP_001697577.1). Grün, Aminosäuren des LxCxE-Motivs; gelb, Aminosäuren mit ähnlicher Eigenschaft der Aminosäuren des LxCxE Motivs

7.2.2 In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in den folgenden Tabellen aufgelistet. Tabelle 7.1 enthält die Oligonukleotide die zur Genotypisierung von Arabidopsis genutzt wurden. In Tabelle 7.2 sind die Oligonukleotide für qPCR-Experimente aufgeführt. Tabelle 7.3 enthält alle zur Klonierung genutzten Oligonukleotide.

Tabelle 7.1 verwendete Oligonukleotide zur Genotypisierung von Arabidopsis

Primerkombination	Primername	Sequenz in 5'-3'-Richtung
a	SALK_146728 PIP5K1 forward	ACTAAAGGGCAATAATCCTTCCACC
	SALK_146728 PIP5K1 reverse	GCAAATTCTCATGGCCAAGTGA
b	SALK_146728 PIP5K1 reverse	GCAAATTCTCATGGCCAAGTGA
	LBa1 SALK forward	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG
c	SALK_012487 PIP5K2 Intron forward	ACTAGATGGAATTTGGCAGCTTAC
	SALK_012487 PIP5K2 reverse	TGGGAGTCTGATGGAGAAGCTG
d	SALK_012487 PIP5K2 reverse	TGGGAGTCTGATGGAGAAGCTG
	LBa1 SALK forward	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG
e	HEYFP forward	TACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGA
	ocs reverse	TCGCATATCTCATTAAAGCAGG
f	PIP5K2 m2 forward	AAGAGATATGCCAACGGAGA
	VEYFP reverse	CTTGCCGGTGGTGCAGATGAACTTCAG

Tabelle 7.2 verwendete Oligonukleotide zur Bestimmung von Transkriptmengen in qPCR-Experimenten

Primername	Sequenz in 5'-3'-Richtung	zur Amplifikation von
qUBC10 forward	ACATCATGTAGCGCAGGTCC	At5g53300, NM_001203599.1
qUBC10 reverse	CCGGAGGGAAATGGATGGTT	
qPIP5K2 forward	CGGTGAGGCTAAGAAACCTGGAG	At1g77740, NM_001334792.1
qPIP5K2 reverse	CTTGTCCAGAACTTTTCACTTGGG	
qRBR1 forward	TTGAACAACAGCAGCAGCAACC	At3g12280, NM_112064.5
qRBR1 reverse	AATCGCTGACCATCCCTGCT	

Tabelle 7.3 verwendete Oligonukleotide zur Klonierung

Name	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Bemerkungen
zur Erstellung von PIP5K2-Fusionskonstrukten		
RbcL.Sall.for	ATGCGTTCGACATGTCACCACAAACAGAGACTAAA	RbcL (AtCg00490)
RbcL.+1.Ascl.rev	GCATGGCGCGCCTCTCTTGGCCATCTAATTTATCGAT	
PIP5K2.Ascl.for	ATGCGGCGCGCCATGATGCGTGAACCGCTTGT	PIP5K2 (At1g77740)
PIP5K2.XhoI.rev	ATGCCTCGAGGCCGCTCTTCGATGAAGATTCTG	
PIP5K2_343.XhoI.rev	ATGCCTCGAGAGCCTCACCCTGAAACAACAA	N-terminale Domänen von PIP5K2
PIP5K2_344.Ascl.for	ATGCGGCGCGCCATGAAGAAACCTGGAGAGACGATA	Dimerisierungs- und katalytische Domäne PIP5K2
PKI α NES-EYFP.XhoI.for	CTCGAGATGAATGAACTTGTCTTTAAGCTTGCTGGACTTGA TATTAATAAGATGGTGGAGCAAGGGCGAGGAGC	Fusion von NES ^{PKIα} an EYFP

SV40NLS-EYFP.XhoI.for	AGTCCTCGAGATGGCTCCACCAAAGAAAAAGAGAAAGGTTG GAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC	Fusion von NLS _{SV40} an EYFP
EYFP.BamHI.rev	ATGCGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCAT	
zur Erstellung von RubisCO-mCherry-NLS-mCherry-Reporter		
mCherry.AsclI.for	ATGCGGGCGGCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	mCherry
mCherry.XhoI.rev	ATGCCTCGAGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAA	
NLS SV40-mCherry.XhoI.for	ATGCCTCGAGCCACCAAAGAAAAAGAGAAAGGTTGGAGTGA GCAAGGGCGAGGAG	Fusion von NLS _{SV40} an mCherry
Kontrollsequenz-mCherry.XhoI.for	ATGCCTCGAGGAAGGTAGAGAAGCAGAAGCTGTGAGCAAGG GCGAGGAGGA	Fusion der Kontrollsequenz an mCherry
NLS I-mCherry.XhoI.for	ATGCCTCGAGAAGTTGTGTAAGAGACGAGGAGACGAAGAAA AAACGGAAGAGGTGAGCAAGGGCGAGGAG	Fusion von NLS I an mCherry
NLS II-mCherry.XhoI.for	ATGCCTCGAGGGCGAGTGGAAACGTGGTAAAGCGAGTGGTA AAGGCAAGTTTTCGTGGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGAT	Fusion von NLS II an mCherry
NLS III-mCherry.XhoI.for	ATGCCTCGAGGATCGGAAACAAGGTCATGGTCAGAAGAGAT ATGTGAGCAAGGGCGAGGAG	Fusion von NLS III an mCherry
NLS IV-mCherry.XhoI.for	ATGCCTCGAGGCGACTAGGAAGAGATCTTCGGTTGATAGTG GCGCTGGAAGTTTGACTGGGGAGAAGATTTTCCCTAGGATA TGTATTTGGGTGAGCAAGGGCGAGGAG	Fusion von NLS IV an mCherry
NLS V-mCherry.XhoI.for	ATGCCTCGAGAAAGATGGGTTTTCGTCAGTTTAGGAAGAATC CTTGTGTTTTAGCGGTGAGGCTAAGAAACCTGGAGAGACG AT	Fusion von NLS V an mCherry
NLS VI-mCherry.XhoI.for	ATGCCTCGAGATGCCAGCAAAGCTGAACGAATGGCCCGGA GAAGCGTGAGCAAGGGCGAGGA	Fusion von NLS VI an mCherry. Die cDNA-Sequenz entspricht der auf Proteinebene identischen NLS von PIP5K1.
NLS IV_AAA-mCherry.XhoI.for	ATGCCTCGAGGCGACTGCTGCTGCTTCTTCGGTTGATAGTG GCGCTGGAAGTTTGACTGGGGAGAAGATTTTCCCTAGGATA TGTATTTGGGTGAGCAAGGGCGAGGAG	Fusion von NLS IV _{AAA} an mCherry
NLS VI_AAAA-mCherry.XhoI.for	ATGCCTCGAGATGCCAGCAGCTGCTGAAGCTATGGCCGCTG CTAGCGTGAGCAAGGGCGAGGA	Fusion von NLS VI _{AAAA} an mCherry
mCherry.BamHI.rev	ATGCGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCAT	
zur Erstellung von mutierten PIP5K2-Varianten		
PIP5K2_NLS IV AAA.for	GTTGATTGTTGCGACTGCTGCTGCTTCTTCGGTT	Mutation der NLS IV in PIP5K2
PIP5K2_NLS IV AAA.rev	AACCGAAGAAGCAGCAGCAGTCGCAACAATCAAC	
für Hefe-zwei-Hybrid-Tests		
PIP5K2.OST4.SfiIA.for	ATGCGGCCATTACGGCCAATGATGCGTGAACCGCTT	PIP5K2 (At1g77740)
PIP5K2.OST4.SfiIB.rev	ATGCGGCCGAGGCGCCAAGCCGCTTTCGATGAAGATT	Klonierung für pBT3C-OST4
RBR1.OST4.SfiIA.for	ATGCGGCCATTACGGCCAATGGAAGAAGTTCAGCCTCCA	RBR1 (At3g12280)
RBR1.OST4.SfiIB.rev	ATGCGGCCGAGGCGGCCGCTGAATCTGTTGGCTCGGT	Klonierung für pBT3C-OST4
IMPA1.SfiIA.for	ATGCGGCCATTACGGCCATGTCTACTGAGACCCAACGCTAA	IMPα1 (At3g06720)
IMPA1.+2.SfiIB.rev	ATGCGGCCGAGGCGGCCTTGCTGAAGTTGAATCCTCCGGA	Klonierung für pPR3N
IMPA2.SfiIA.for	ATGCGGCCATTACGGCCATGTCTTTGAGACCTAACGCTAA	IMPα2 (At4g16143)
IMPA2.+2.SfiIB.rev	ATGCGGCCGAGGCGGCCTTCTGGAAGTTGAATCCACCT	Klonierung für pPR3N
IMPA3.SfiIA.for	ATGCGGCCATTACGGCCATGTCTCTCAGACCTAGCGCGAA	IMPα3 (At4g02150)

IMPA3.+2.SfilB.rev	ATGCGGCCGAGGCGGCCTTAATAAAGTTGAATTGACCAGGA	Klonierung für pPR3N
IMPA4.SfilA.for	ATGCGGCCATTACGGCCATGTTCGTGAGGCCGAGCACA	IMPα4 (At1g09270)
IMPA4.+2.SfilB.rev	ATGCGGCCGAGGCGGCCTTGCCAAATTTGAATCCACCAAC	Klonierung für pPR3N
IMPA6.SfilA.for	ATGCGGCCATTACGGCCATGTCTTACAAACCAAGCGCGAA	IMPα6 (At1g02690)
IMPA6.+2.SfilB.rev	ATGCGGCCGAGGCGGCCTTACCAAAGTTGAATCCACCCGTA	Klonierung für pPR3N
PIP5K2.SfilA.for	ATGCGGCCATTACGGCCATGATGCGTGAACCGCTTGTT	Klonierung für pPR3N
PIP5K2.SfilB.rev	ATGCGGCCGAGGCGGCCTTAGCCGTCTTCGATGAAGATTC	
PIP5K2 AxAxA.for	CGGTTTATCGTTATGGGGAACGCGTTCGCCTCCGCATATAG AATCCAGAGAAG	Mutation des LxCxE- Motivs in PIP5K2
PIP5K2 AxAxA.rev	CTTCTCTGGATTCTATATGCGGAGGCGAACGCGTTCCCCAT AACGATAAACCG	
zur Proteinexpression in <i>E. coli</i>		
PIP5K2.NotI.for	ATGCGCGGCCGCATGATGCGTGAACCGCTTGTT	PIP5K2 (At1g77740)
PIP5K2.EcoRI.rev	ATGCGAATTCTTAGCCGTCTTCGATGAAGATTC	
RBR1.EcoRI.for	ATGCGAATTCATGGAAGAAGTTCAGCCTCCA	RBR1 (At3g12280)
RBR1.NotI.rev	ATGCGCGGCCGCCTATGAATCTGTTGGCTCGGTT	
IMPA6.BamHI.for	ATGCGGATCCATGTCTTACAAACCAAGCGCG	IMPα6 (At1g02690)
IMPA6.NotI.rev	ATGCGCGGCCGCTCAACCAAAGTTGAATCCA	
zur Proteinexpression in Tabakepidermiszellen		
RBR1.XhoI.for	ATGCCTCGAGATGGAAGAAGTTCAGCCTCCA	RBR1 (At3g12280)
RBR1.NotI.rev	ATGCGCGGCCGCCTATGAATCTGTTGGCTCGGTT	
zur stabilen Transformation von <i>Arabidopsis</i>		
pPIP5K2.Sfil.for	ATGCGGCCATTACGGCCAGAAGGAGATAAACATAACTAAT	Promotor- Amplifikation +1500 bis +1 bp von PIP5K2 (At1g77740)
pPIP5K2.Sfil.rev	ATGCGGCCGAGGCGGCCCTACTCATCAGAGAAACCCTA	

Danksagung

Die Jahre der Doktorarbeit habe ich nicht alleine absolviert. Im Gegenteil, ich hatte viel wertvolle Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Dabei gibt es viele Menschen, die mich auf diesem Weg begleitet haben und denen ich danken möchte.

Mein erster und größter Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Mareike Heilmann. Vielen Dank für die Bereitstellung des Themas und unzähliger Klone. Vielen, vielen Dank für deine Betreuung! Danke, dass du mir mit deinem unerschöpflichen Wissen und mit Rat und Tat zur Seite standest, dass ich so viel von dir lernen durfte, dass ich gar nicht erst anfangen muss es aufzuzählen und du mich auch im Schreiben von Anträgen und Berichten aller Art unterstützt hast. Vielen Dank für unzählbare Momente an die ich mich gerne erinnere!

Prof. Dr. Ingo Heilmann danke ich für die Aufnahme in sein Labor und unseren Platz in seiner Arbeitsgruppe. Vielen Dank für die fachliche und moralische Unterstützung sowie die Finanzierung, die ich im Laufe der letzten Jahre erhalten habe. Danke, dass man immer bei dir vorbeikommen kann! Vielen Dank für die Begutachtung dieser Arbeit.

Prof. Dr. Bettina Hause und Prof. Dr. Markus Grebe danke ich ebenfalls für die Begutachtung dieser Arbeit.

Großer Dank gilt auch der Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt für das mir gewährte Stipendium.

Vielen lieben Dank für alle Hilfe und Unterstützung, die ich auch außerhalb der Gruppe erfahren durfte. Vielen Dank, dass ich das konfokale Mikroskop am Institut für Biologie so häufig in Beschlag nehmen durfte. Bei PD Dr. Magret Köck und Karin Klar möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, das Isotopenlabor mit so großartigem Service zu nutzen dürfen. Prof. Dr. Ulla Bonas und dem Gärtner-Team gebührt Dank für Platz, Material und praktischer Hilfe bei der Arabidopsis-Anzucht im Gewächshaus. Ebenso danke ich Prof. Dr. Bettina Hause und Ulrike Huth für Asyl und liebevolle Pflege meiner Arabidopsis-Pflanzen in den Pflanzenkammern des IPB. Vielen Dank an Prof. Dr. Sacha Baginsky und Dr. Anja Rödiger für viel Geduld mit der ECL-Detektion. Prof. Dr. Thomas Laux, Dr. Katharina Bürstenbinder und Dr. Marco Trujillo danke ich für die bereitgestellten Samen und den p19-Agrobakterienstamm. Vielen Dank an PD Dr. Iris Thondorf für die Berechnung des PIP5K2-Strukturmodells.

Dr. Till Ischebeck und Wilhelm Menzel danke ich für die zur Verfügung gestellten, noch nicht publizierten Ergebnisse. Euch und Dr. Irene Stenzel möchte ich auch für das Bereitstellen weiterer Klone und Pflanzen danken. Marion Sonntag, ein großer Dank für deine nicht enden wollende Geduld mit all den Nährmedien, vielen Pflanzen und Genotypisierungen. Vielen Dank auch meinen Mitdokoranden. Dr. Stefanie Werner, danke, dass du mich Geduld beim Genotypisieren gelehrt hast. Vielen Dank an Dr. Jennifer Lerche und Dr. Franziska Hempel für die Einführung in die Geheimnisse der Expression und Aufreinigung von PI4P 5-Kinasen und Aktivitätstests. Vielen Dank auch an Feng Lin, für viele Gespräche über Phänotypen und einen Einblick ins Immunostaining. Wilhelm Menzel, dem Meister der Protoplasten sei natürlich auch gedankt. Vielen Dank, für das Teilen guter und schlechter Erfahrungen und viele gute Diskussionen!

Julia Lohmann, Kevin Scherr, Johann Jablonka und Franziska Heinrich danke ich für ihre Mithilfe im Projekt im Rahmen von Bachelorarbeiten, Forschungsgruppenpraktika und Masterarbeiten.

Ob schon einmal erwähnt oder nicht: Ohne meine Kollegen und guten Freunde Feng, Franzi, Franzi, Franzi, Ingo, Jenny, Mareike, Praveen, Steffi, Veronika und Willi hätte mir viel gefehlt. Vielen Dank, dass Ihr immer ein offenes Ohr für mich hattet, mir zur Seite standet und mich begleitet habt. Vielen Dank für Unmengen Spaß, viele gute Gespräche, gutes Essen, internationale Erfahrungen und so viele gute auch chalk-behaftete Erinnerungen.

Danke an Gudrun, Marie-Claire, Armin, Christian und Mike für meine Mainzer Zeit.

Meinen ehemaligen Kommilitonen Christoph, Philip und Lars; Angela, Ben, Nicole und Becca und meinen treuen Mainzer Freunden Max, Lucas, Rowena, Flo, Johannes und Fabian möchte ich danken für Mensa-Dates, gemütliche Abende, Besuchsziele und Einblicke in ganz andere wissenschaftliche und nicht-wissenschaftliche Welten. Vielen, vielen Dank, dass ihr es schafft mir immer wieder einen anderen Blick auf viele Dinge zu geben und dass es sich trotz unserer Fernbeziehungen immer so anfühlt nach Hause zu kommen.

Max, vielen Dank! Mit deiner ständigen Begeisterung gibt es kaum eine Situation, in der man nicht ein klein wenig Lachen kann. Vielen Dank für etwas Leichtigkeit.

Vielen Dank auch an meine Eltern Barbara und Uli und meine Geschwister Maria und Matthias. Dank für Alles! Danke, dass ihr mir das hier ermöglicht habt, mich unterstützt und wir so viel schöne Zeit miteinander verbringen. Danke!

Lebenslauf

Name: Katharina Gerth
 Nationalität: Deutsch
 Geburtsdatum: 9. Januar 1988
 Geburtsort: Mainz

Bildungsweg

Seit 11/2012	<p>Promotion am Institut für Biochemie und Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Abteilung Zelluläre Biochemie betreut durch Dr. Mareike Heilmann zum Thema „Phosphoinositide im Kern pflanzlicher Zellen: Kernlokalisierung der ubiquitären PI4P 5-Kinase PIP5K2 und ihr Einfluss auf die Entwicklung von <i>Arabidopsis thaliana</i>“</p>
10/2010 - 8/2012	<p>Master of Science der Biochemie Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (sehr gut 1,2)</p>
10/2007 - 08/2010	<p>Bachelor of Science der Biochemie Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (gut 1,8)</p>
2007	<p>Abitur Integrierte Gesamtschule Mainz-Bretzenheim in Mainz</p>

Publikationen und Konferenzteilnahmen

Katharina Gerth, Feng Lin, Franziska Daamen, Wilhelm Menzel, Franziska Heinrich, Mareike Heilmann. *Arabidopsis* phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase 2 contains a functional nuclear localization sequence and interacts with alpha-importins. *Plant J.* (Revision eingereicht)

Katharina Gerth, Feng Lin, Wilhelm Menzel, Praveen Krishnamoorthy, Irene Stenzel, Mareike Heilmann, Ingo Heilmann: Guilt by association – A phenotype-based view of the plant phosphoinositide network, *Annu. Rev. Plant Biol.* 68, 349-374

Katharina Gerth, Mareike Heilmann: Evidences for nuclear roles of phosphoinositide-modifying enzymes in plants, Internationales SFB-Meeting, Halle, Deutschland, Mai 2015 (Poster).

Katharina Gerth, Mareike Heilmann: Evidence for a nuclear role of phosphoinositide-modifying enzymes in plants, 28. Tagung der Molekularbiologie der Pflanzen in Dabringhausen, Deutschland, Februar 2015 (Vortrag).

Katharina Gerth, Mareike Heilmann, Ingo Heilmann: The protein-protein interaction network of plant PI4P 5-kinases controlling polar tip growth, Abschlusspräsentation des EFRE-Projekts „Proteine und deren Funktion in der Kontrolle zellulärer Prozesse“, März 2014 (Poster).

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt und alle wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Des Weiteren versichere ich, dass ich vor diesem Promotionsverfahren noch keine vergeblichen Promotionsversuche unternommen habe und die Dissertation nur dieser und keiner anderen Fakultät vorgelegen hat.

Halle (Saale), _____

Katharina Gerth