

„Proteine mit VQ-Motiv - Substrate  
pflanzlicher MAP-Kinasen und  
potentielle Regulatoren der Immunabwehr“

Dissertation

zur Erlangung des

Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I –Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Pascal Pecher

geboren am 24. Dezember 1980 in Marburg (Lahn)

Gutachter:

1. Prof. Dierk Scheel, Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie- MLU Halle Wittenberg
2. Prof. Gunter Reuter, MLU Halle Wittenberg
3. Dr. Imre Somssich, Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung, Köln

Verteidigungsdatum: 19. 04. 2017

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>1</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>4</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>6</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>9</b>
1.1. Die pflanzliche Immunabwehr .....	9
1.2. Pathogene Eindringlinge und die PAMP-induzierte Immunantwort .....	9
1.3. Effektor- und Resistenzproteine – ein evolutionäres Kräftemessen zwischen Pathogenen und Pflanzen .....	10
1.4. MAPKs als Signaltransmitter .....	12
1.5. Die Flagellin-induzierte MAPK-Kaskade in <i>Arabidopsis thaliana</i> ...	13
1.5.1. Substrate der durch Flg22 aktivierten MAPKs .....	16
1.5.2. Die Familie der VQs–Potentielle MAPK-Substrate in der Flg22-induzierten Immunantwort von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	18
1.5.3. WRKY-Proteine – Transkriptionsfaktoren mit vielfältigen Aufgaben .....	24
1.5.3.1. WRKYs als Regulatoren der Pflanzenentwicklung .....	25
1.5.3.2. WRKY-Transkriptionsfaktoren in der pflanzlichen Stress- und Immunantwort .....	25
1.6. Ziel der Arbeit .....	27
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>28</b>
2.1. Materialien .....	28
2.1.1. Bakterienstämme und Anzucht der Bakterienkulturen .....	28
2.1.2. Pflanzenmaterial .....	28
2.2. Sequenzanalysen .....	29
2.3. Molekularbiologische Methoden .....	29
2.3.1. Herstellung und Transformation chemisch kompetenter Zellen .....	29
2.3.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen .....	29
2.3.3. Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzenmaterial .....	30
2.3.4. Extraktion von RNA aus Pflanzenmaterial .....	30
2.3.5. Reverse Transkription .....	30
2.3.6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	30
2.3.7. Klonierungen .....	31
2.3.8. Mutagenesereaktionen .....	32
2.3.9. Generierung der Alaninaustausch-Varianten und VQ-Chimären und MVQ8-Varianten .....	32
2.3.10. Restriktionsverdau .....	32
2.3.11. Elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten .....	32
2.3.12. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	33
2.3.13. DNA-Sequenzierungen .....	33
2.3.14. <i>Agrobacterium</i> -vermittelte Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	33
2.3.15. Northern Blot-Analysen .....	33
2.3.16. Y2H-Analyse .....	34

2.4.	Proteinchemische Methoden.....	35
2.4.1.	Herstellung rekombinanter Proteine.....	35
2.4.2.	Proteinreinigung.....	35
2.4.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	36
2.4.4.	Western Blot-Analysen.....	36
2.4.5.	<i>In vitro</i> Phosphorylierungsassay.....	37
2.4.6.	Identifizierung der Phosphorylierungsstellen mittels Flüssigkeits- chromatographie-Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS).....	37
2.5.	Protoplasten-Experimente.....	38
2.5.1.	Isolierung und Transformation von Mesophyllprotoplasten aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	38
2.5.2.	Protoplastenbasierte Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungs-Assays.....	39
2.5.3.	Promotoraktivitätstests.....	40
2.6.	Pathogenexperimente mit <i>Pseudomonas syringae</i> .....	40
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>41</b>
3.1.	VQs als potentielle Substrate Flg22-aktivierter MAPKs.....	41
3.1.1.	Sequenzanalyse der VQ-Genfamilie in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	41
3.1.2.	Interaktionen der VQs mit MAPK-Enzymen aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	45
3.1.3.	<i>In vitro</i> Phosphorylierung der VQs durch MPK3 und MPK6.....	47
3.1.4.	Einfluss des VQ-Motivs der MVQs auf die Interaktion mit MAPKs und die Phosphorylierung durch MPK3 und MPK6.....	50
3.2.	Interaktionen der MVQs mit Transkriptionsfaktoren aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	52
3.2.1.	Interaktion mit WRKY-Proteinen.....	52
3.2.2.	Chimäre VQ-Proteine zur Sondierung des Einflusses des VQ-Motivs auf die Interaktion mit WRKYs – Austausch der VQ-Regionen von MVQ1 und MVQ8.....	55
3.2.3.	Alaninaustausch-Experimente zur Identifizierung interaktionsvermittelnder Aminosäuren in der VQ-Region von MVQ1.....	56
3.2.4.	Variation der VQ-Region von MVQ8.....	58
3.2.5.	Übertragung der Fähigkeit zur Interaktion mit WRKYs auf GAL4-AD durch Transfer der VQ-Region von MVQ1.....	60
3.3.	<i>In vivo</i> Phosphorylierung der MVQ-Proteine.....	61
3.3.1.	Modifizierung der MVQs in Flg22-behandelten Protoplasten.....	62
3.3.2.	LC-MS/MS-basierte Detektion der Phosphorylierungsstellen von MVQ1 - MVQ10.....	64
3.3.3.	Einfluss der Phosphorylierung von MVQ1 auf die Regulation der Immunantwort von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	69
3.3.3.1.	Identifizierung von MPK6 als für die <i>in vivo</i> Phosphorylierung hauptverantwortliche MAPK.....	69
3.3.3.2.	Generierung von MVQ1-Phosphorylierungsmutanten.....	70
3.3.3.3.	Einfluss der Flg22-abhängigen Phosphorylierung durch MPK6 auf die Stabilität von MVQ1.....	72
3.4.	Einfluss von MVQ1 auf die Aktivität des <i>NHL10</i> -Promotors.....	73

3.4.1.	Einfluss der W-Boxen auf die PAMP-induzierte Aktivität des <i>NHL10</i> -Promotors .....	76
3.4.2.	Einfluss des Austausches der VQ-Regionen von MVQ1 und MVQ8 auf die <i>NHL10</i> -Promotoraktivität .....	78
3.5.	Einfluss von MVQ1 auf die PAMP-induzierte Resistenz von <i>Arabidopsis thaliana</i> gegenüber <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 .....	80
<b>4</b>	<b>Diskussion und Ausblick</b> .....	<b>82</b>
4.1.	Zwei Gruppen von VQ-Proteinen werden durch stressaktivierte MAPKs phosphoryliert .....	82
4.2.	Das VQ-Motiv vermittelt die Interaktion von MVQ-Proteinen mit WRKY-Transkriptionsfaktoren .....	85
4.3.	Die <i>in vivo</i> Phosphorylierung von MVQ-Proteinen induziert deren Abbau .....	87
4.4.	Hypothesen zur Funktion der MVQs in der PAMP-induzierten Immunantwort .....	90
4.4.1.	MVQs als Regulatoren der WRKY-vermittelten Expression von Abwehrgenen .....	90
4.4.2.	Die Aktivierung von Abwehrgenen im komplexen Dialog von MVQs, WRKYs und MAPKs.....	93
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>98</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>100</b>
<b>Anhang</b>	.....	<b>110</b>
	Oligonukleotide und Sequenzen.....	110
	Eidesstattliche Erklärung .....	116
	Curriculum vitae .....	117
	Publikationsliste.....	118
<b>Danksagung</b>	.....	<b>119</b>

## Abbildungsverzeichnis

### Abbildungen

Abb. 1-1: Das Zick-Zack-Model der pflanzlichen Pathogenabwehr .....	11
Abb. 1-2: Die durch Flg22 induzierbaren MAPK-Kaskaden .....	15
Abb. 1-3: VQs als Regulatoren der WRKY-abhängigen Genexpression in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	22
Abb. 3-1: Darstellung der Homologiebeziehungen der 34 VQs von <i>Arabidopsis thaliana</i> in Form eines Cladogramms .....	42
Abb. 3-2: Im Y2H detektierte Interaktionen der VQs mit den zwanzig im Genom von <i>Arabidopsis thaliana</i> codierten MAPKs .....	46
Abb. 3-3: <i>In vitro</i> Phosphorylierung der VQs durch MPK3 und MPK6 .....	49
Abb. 3-4: Einfluss des VQ-Motivs von MVQ1 - 10 auf die Interaktion mit den im Genom von <i>Arabidopsis thaliana</i> codierten MAPKs und auf die <i>in vitro</i> Phosphorylierung durch MPK3 und MPK6 .....	51
Abb. 3-5: Y2H-Interaktionen der MVQs und deren MVQ <sub>DL</sub> -Varianten mit verschiedenen WRKYs aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	53
Abb. 3-6: Interaktionen der MVQs und der MVQ <sub>DL</sub> -Varianten mit ausgewählten Transkriptionsfaktoren aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	54
Abb. 3-7: Y2H-Interaktionsanalyse der Chimären MVQ1/VQ8 und MVQ8/VQ1 mit WRKYs und MAPKs aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	56
Abb. 3-8: Y2H-Interaktionsanalyse der Alaninaustausch-Varianten von MVQ1 mit selektierten WRKYs aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	57
Abb. 3-9: Y2H-Interaktionsanalyse der MVQ8-Varianten mit WRKYs aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	59
Abb.3-10: Direkte Fusion der VQ-Regionen von MVQ1 und MVQ8 an GAL4-AD und Y2H-Interaktionsanalyse mit WRKYs aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	61
Abb.3-11: <i>In vivo</i> Einfluss von Flg22 auf das Proteinlevel und die elektro- phoretische Mobilität der MVQs .....	62
Abb.3-12: Entfernung der Flg22-abhängigen MVQ-Modifizierung durch Phosphatasebehandlung .....	63
Abb.3-13: Darstellung der durch LC-MS/MS-Analysen identifizierten Phosphorylierungsstellen der MVQs MVQ1 - MVQ10 .....	65
Abb.3-14: Flg22-abhängige Phosphorylierung in <i>mpk3</i> - und <i>mpk6</i> - <i>Knockout</i> -Pflanzen 70	
Abb.3-15: Analyse der MVQ1-Phosphorylierungsmutanten .....	71
Abb.3-16: Einfluss der MVQ1-Phosphorylierung auf die Proteinstabilität .....	73

Abb.3-17: Einfluss der Phosphorylierung von MKS1 bzw. dessen Interaktion mit WRKY-Transkriptionsfaktoren auf die Aktivität des <i>NHL10</i> -Promotors.....	74
Abb.3-18: Einfluss der W-Boxen auf die Aktivität des <i>NHL10</i> -Promotors.....	77
Abb.3-19: Einfluss des Austausches der VQ-Regionen von MVQ1 und MVQ8 auf die Aktivität des <i>NHL10</i> -Promotors.....	79
Abb.3-20: Einfluss von MVQ1 auf die PAMP-induzierte Resistenz von <i>Arabidopsis thaliana</i> gegenüber <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 .....	81
Abb.4-1: Modell zur Rolle von MVQs als Inhibitoren der WRKY-vermittelten Expression von Abwehrgenen .....	92
Abb.4-2: Modell zur Regulation der Abwehr durch dimere Komplexe aus transkriptionsaktivierenden MVQs und WRKYs.....	95

## Tabellen

Tab. 3-1: Vergleich der Aminosäuresequenzidentitäten der <i>Arabidopsis</i> VQs .....	43
Tab. 3-2: Nomenklatur und Auflistung wichtiger Eigenschaften der VQs .....	44
Tab. A1: Oligonukleotide (Primer) für die Klonierung der VQs aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	110
Tab. A2: Oligonukleotide (Primer) für Mutagenesereaktionen.....	111
Tab. A3: Oligonukleotide (Primer) zur Generierung Golden Gate-kompatibler MVQ1- und MVQ8-Entry-Vektoren zum Austausch der VQ-Regionen ...	112
Tab. A4: Oligonukleotide (Primer) zur Generierung der Alaninaustausch-Varianten .....	112
Tab. A5: Oligonukleotide (Primer) zur Generierung der VQ-Chimären MVQ1/VQ8und MVQ8/VQ1 .....	113
Tab. A6: Oligonukleotide (Primer) zur Generierung der MVQ8-Varianten .....	114

## Sequenzen

Sequenz A1: Nukleotidsequenz der durch Gensynthese erzeugten Phosphorylierungsstellen-Variante MVQ1mutP1 .....	115
--	-----

## Abkürzungsverzeichnis

ACS6	1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE 6
ASR3	ARABIDOPSIS SH4-RELATED 3
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Avr	Avirulenz
BAK1	BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1
bHLH	<i>basic helix-loop-helix protein</i>
BiFC	bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
CaM	Calmodulin
CamBP25	CALMODULIN BINDING PROTEIN 25
CDS	kodierende DNA-Sequenz ( <i>coding DNA sequence</i> )
cfu	koloniebildende Einheit ( <i>colony forming unit</i> )
CFP	CYAN FLUORESCENT PROTEIN
CHX	Cycloheximid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF-Tu	bakterieller Elongationsfaktor Tu
EIN	ETHYLENE INSENSITIVE
Elf18	N-terminales Peptid des bakteriellen Elongationsfaktors Tu
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
ERF	ETHYLENE-RESPONSE FACTOR
ERK	EXTRACELLULAR SIGNAL RELATED KINASE
ETI	<i>effector-triggered immunity</i>
ETS	<i>effector-triggered susceptibility</i>
Flg22	konservierte Peptidsequenz des bakteriellen Flagellins
FLS2	FLAGELLIN-SENSING 2
FRK1	FLG22-INDUCED RECEPTOR-LIKE KINASE 1
GUS	Glucuronidase
HA	Hämagglutinin
HR	<i>hypersensitive response</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid

## Abkürzungsverzeichnis

---

ITC	<i>isothermal titration calorimetry</i>
JA	Jasmonsäure
JAV1	JASMONATE-ASSOCIATED VQ-MOTIF GENE 1
LB	Luria-Bertani-Medium
LC	Flüssigkeitschromatographie
LPS	Lipopolysaccharid
LUC	Luziferase
MAPK	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE
MAPKK	MAPK-KINASE
MAPKK	MAPK-KINASE-KINASE
MEKK	MAPK/EXTRACELLULAR SIGNAL-REGULATED KINASE-KINASE
MKS1	MPK4 SUBSTRATE 1
MS	Massenspektrometrie
MVQ	MPK3/6-TARGETED VQ PROTEIN
NHL10	NDR1-HIN1-LIKE 10
NLS	Kernlokalisierungssignal ( <i>nuclear localization signal</i> )
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEG	Polyethylenglykol
PhosSt	Phosphorylierungsstelle
PIF1	PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR1
PR1	PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 1
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
Pst	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
PTI	<i>PAMP-triggered immunity</i>
pv.	Pathovar
R	Resistenz
ROS	reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
RuBisCO	RIBULOSE-1,5-BISPHOSPHAT-CARBOXYLASE/OXYGENASE
SA	Salicylsäure
SAR	<i>systemic acquired resistance</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

SDS	Natriumdodecylsulfat
SIB	SIGMA FACTOR BINDING PROTEIN
SIG	SIGMA FACTOR
TAIR	<i>The Arabidopsis Information Resource</i>
TGA4	TGACG-MOTIF BINDING FACTOR 4
TZF9	TANDEM ZINC FINGER 9
UBQ10	UBIQUITIN 10
VIP1	VIRE2-INTERACTING PROTEIN 1
VQ	VQ-MOTIF CONTAINING PROTEIN
WRKY	WRKY-Transkriptionsfaktor
XTR7	XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE7
Y2H	Hefe-Dihybrid ( <i>yeast two hybrid</i> )
3AT	3-Amino-1,2,4-triazol

# 1. Einleitung

## 1.1. Die pflanzliche Immunabwehr

Pflanzen sind ebenso wie andere Organismen einer ständigen Bedrohung durch unterschiedlichste Umwelteinflüsse ausgesetzt. Neben abiotischen Faktoren wie Trockenheit und chemischen Belastungen in Atmosphäre, Boden und Wasser befinden sie sich in einem fortwährenden Kampf gegen herbivore Angriffe und Attacken durch pathogene Mikroorganismen wie Pilze, Bakterien und Viren. Die Tatsache, dass Pflanzen selten an einem dieser Pathogene erkranken ist ihrer außergewöhnlichen Widerstandsfähigkeit gegenüber den genannten Bedrohungen zu verdanken. Dies beruht zum einen auf dem Vorhandensein evolutionär entstandener präformierter Barrieren, die physikalischer (Abschlussgewebe wie zum Beispiel die Cuticula, pathogen-induzierte Schließung der Stomata) oder chemischer Natur (Synthese antimikrobieller Sekundärmetaboliten) sein können (Göhre und Robatzek 2008, Schopfer und Brennicke 1999). Andererseits können Resistenzen auf der Entwicklung eines effektiven Immunsystems beruhen. Im Gegensatz zu tierischen Lebensformen lassen Pflanzen ein adaptives Immunsystem, welches eine spezifische Markierung körperfremder Strukturen (Bakterien, Viren, Parasiten uvm.) durch Antikörper und deren lymphozyten-vermittelte Bekämpfung zulässt, vermissen. Stattdessen verlassen sich Pflanzen auf ein komplexes angeborenes Immunsystem, das genetisch determiniert ist (Spoel et al. 2012). Grundlage der erfolgreichen Abwehr eines pathogenen Angriffs ist dabei – ähnlich wie beim adaptiven System der Vertebraten – die Erkennung des Eindringlings innerhalb des Organismus.

## 1.2. Pathogene Eindringlinge und die PAMP-induzierte Immunantwort

Im Laufe der Koevolution von Pathogenen und Pflanzen haben Pflanzenzellen spezifische membrandurchspannende Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) entwickelt, die in der Lage sind, extrazelluläre Mikroorganismen anhand so genannter Pathogen-assoziiierter molekularer Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) zu erkennen. Bei diesen PAMPs handelt es sich meist um hoch konservierte Strukturen eines Pathogens, die in den Pathogenen lebensnotwendige Funktionen einnehmen aber im pflanzlichen Wirtsorganismus nicht vorhanden sind. Hierzu zählen zum Beispiel Chitin (Wan et al. 2004) oder Lipopolysaccharide (LPS)

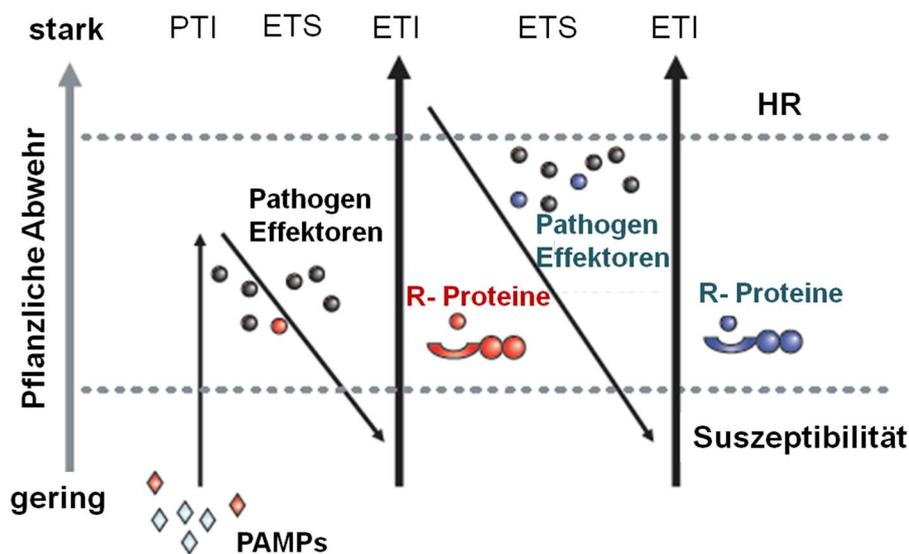
(Silipo et al. 2010), die den Hauptbestandteil pilzlicher Zellwände bzw. bakterieller Zellmembranen bilden, oder Flagellin (Felix et al. 1999), welches als molekularer Baustein bakterieller Flagellen essentiell für deren Fortbewegung ist. Neben diesen oberflächenlokalisierten Zielmolekülen sind auch intrazelluläre PAMPs bekannt, wie der Translations-Elongationsfaktor Tu (EF-Tu) (Kunze et al. 2004).

Die spezifische Erkennung von PAMPs durch PRRs bildet die erste Abwehrbarriere in der pflanzlichen Immunabwehr und wird als PAMP-induzierte Immunität (*PAMP-triggered immunity*, PTI) bezeichnet, in deren Folge die Aktivierung spezifischer Abwehrmechanismen stattfindet (Zhang und Zhou 2010). Beispiele für derartige Immunantworten sind die Ablagerung des Polysaccharids Kallose am Angriffsort oder die Produktion von Abwehrmetaboliten (reaktive Sauerstoffspezies, Phytoalexine), die letztendlich eine Etablierung des Pathogens im pflanzlichen Organismus unterbinden. Eine Vielzahl von Pathogenen hat jedoch im Gegenzug Mechanismen entwickelt, die zur Unterdrückung der PTI führen können.

### **1.3. Effektor- und Resistenzproteine - ein evolutionäres Kräftemessen zwischen Pathogenen und Pflanzen**

Um PAMP-induzierte Abwehrreaktionen zu unterdrücken sind verschiedene Pathogene in der Lage, spezialisierte Proteine in die Zellen der Wirtspflanzen einzuschleusen. Diese werden als Effektoren oder Avirulenz (Avr)-Proteine bezeichnet. Die Translokation solcher Effektoren ist in vielen Fällen noch nicht ausreichend verstanden. Am besten ist sie wohl im Fall bakterieller Pathogene beschrieben, die Effektoren über ihr Typ-III-Sekretionssystem in die Wirtszellen "injizieren". Dort interferieren sie mit den PTI-Signalwegen, um die pflanzlichen Abwehrmechanismen zu unterdrücken. Diese Prozesse werden allgemein als Effektorvermittelte Suszeptibilität (*effector-triggered susceptibility*, ETS) bezeichnet. Viele Pflanzen antworteten auf diese Manipulation co-evolutiv mit der Entwicklung von Resistenz (R)-Proteinen, die in der Lage sind Effektoren direkt oder indirekt (*guard-Hypothese*) zu detektieren. In Folge der Detektion pathogener Effektoren werden in den Pflanzenzellen meist drastische Abwehrmechanismen induziert, die als hypersensitive Immunantwort (*hypersensitive response*, HR) bezeichnet werden. Dabei wird ein programmierter Zelltod in den infizierten Geweben eingeleitet, mit dem Ziel dem Pathogen seine Nahrungsgrundlage zu entziehen und dessen Ausbreitung

zu verhindern. Diese R-Protein-vermittelte Erkennung von Avr-Proteinen wird auch als *gene for gene*-Hypothese oder Effektor-vermittelte Immunität (*effector-triggered immunity*, ETI) bezeichnet (Flor 1942, Chisholm et al. 2006). In einem evolutionären “Kräftemessen“ können Pathogene fortwährend neue Effektoren hervorbringen, auf die die Pflanze mit wiederum neuen R-Proteinen reagieren muss um ihre Immunität gegenüber dem Pathogen gewährleisten zu können. Dieser Prozess, der am Ende über den Erfolg oder Misserfolg eines Pathogens oder über den Bestand ganzer



**Abbildung 1-1: Das Zick-Zack-Modell der pflanzlichen Pathogenabwehr.** Die Koevolution von Pathogenen und Pflanzen kann durch das Zick-Zack-Modell veranschaulicht werden. Potentielle Pathogene können von Pflanzen durch die Rezeptor-vermittelte Erkennung von PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) detektiert werden. Die PAMP-Erkennung induziert Abwehrmechanismen, die zur Immunität der Pflanze gegenüber dem Pathogen führen können (PTI, *PAMP-triggered immunity*). Im Laufe der Koevolution haben Pathogene jedoch eine Vielzahl von Effektor-Proteinen entwickelt, die sie in die Pflanzenzelle einschleusen. Manche dieser Effektoren (in rot dargestellt) sind in der Lage, die pflanzliche Immunabwehr zu unterbinden, wodurch die Pflanzen suszeptibel gegenüber dem Pathogen werden (ETS, *effector-triggered susceptibility*). Pflanzen wiederum antworten hierauf mit der Entwicklung von Rezeptor (R)-Proteinen (rot). Diese können in der Lage sein, die Effektoren zu detektieren (ETI, *effector-triggered immunity*), was oft zur Einleitung einer hypersensitiven Immunantwort (HR, *hypersensitive response*) und damit zum kontrollierten Zelltod pathogen-befallener Gewebe führt. Einige Pathogene wiederum haben weitere Effektoren (blau) entwickelt, die die ETI-Mechanismen inhibieren können und somit die pflanzliche Suszeptibilität aufrechterhalten (ETS). Im Gegenzug versuchen Pflanzen ihre Resistenz gegenüber solchen Pathogenen durch Entwicklung neuer R-Proteine (blau) zu sichern (ETI). Dieses co-evolutionäre “Armdrücken“ kann zur Entwicklung immer neuer Effektoren und pflanzlicher R-Proteine führen (Jones und Dangl 2006).

Pflanzenspezies entscheiden kann, lässt sich durch das von Jones und Dangl (2006) postulierte Zick-Zack-Modell veranschaulichen (Abb. 1-1).

Grundlage einer effektiven PAMP-induzierten Immunantwort ist die Integration extrazellulärer Signale in zelluläre Antworten. Eine bedeutende Rolle spielen in diesem Prozess evolutionär konservierte MAPK (MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE)-Kaskaden, die im nächsten Abschnitt eingehender behandelt werden.

#### **1.4. MAPKs als Signaltransmitter**

MAPKs sind evolutionär hoch konservierte Signaltransmitter, die in allen eukaryotischen Organismen zu finden sind und die Weiterleitung von extra- und intrazellulären Signalen über Transphosphorylierungsreaktionen ermöglichen (Rasmussen et al. 2012, Meng und Zhang 2013, Bigeard et al. 2015). Pflanzliche MAPKs zeigen hohe Ähnlichkeit zu einer Untergruppe von MAPKs in Säugetieren, die durch extrazelluläre Signale reguliert sind und als ERKs (EXTRACELLULAR SIGNAL REGULATED KINASE) bezeichnet werden. Sie sind neben ihrer Rolle in der Abwehr von Pathogenen wichtige Signaltransmitter in Zelldifferenzierungsmechanismen und beeinflussen damit ebenso die pflanzliche Entwicklung und Wachstumsprozesse (Xu und Zhang 2015).

Das Grundmodul einer MAPK-Kaskade besteht aus drei sequentiell angeordneten Kinasen, beginnend mit einer spezifischen MAPK-KINASE-KINASE (MAPKKK). Diese heterogene Klasse von Serin/Threonin-Kinasen lässt sich generell in zwei Untergruppen einteilen, die MEKK (MAPK/ERK-KINASE-KINASE)-ähnlichen und die Raf-ähnlichen MAPKKKs. Bekannte Vertreter ersterer Untergruppe sind MEKK1 und YODA (Colcombet und Hirt 2008). Durch Ligand-Rezeptor-Bindung werden MAPKKK-Enzyme im ersten Schritt der Signalkaskade in den katalytisch aktiven Zustand überführt.

Im Folgeschritt wird eine MAPK-KINASE (MAPKK) durch Phosphorylierung von zwei Serin/Threonin-Resten innerhalb des spezifischen Sequenzmotivs Serin/Threonin-X3-5-Serin/Threonin aktiviert. Aktive MAPKKs wiederum aktivieren die finale MAPK durch Phosphorylierung eines Threoninrestes und eines Tyrosinrestes innerhalb eines Threonin-X-Tyrosin-Motivs. In Position X findet man entweder die Aminosäure Asparaginsäure oder Glutaminsäure, wonach die MAPKs in TDY (Threonin-Asparaginsäure-Tyrosin)-Kinasen oder TEY (Threonin-Glutaminsäure-Tyrosin)-

Kinasen unterteilt werden (Ichimura et al. 2002). Die nun durch Phosphorylierung von MAPK-Substratproteinen ausgelöste Vielzahl von zellulären Reaktionen umfasst u.a. die Synthese von Abwehrhormonen (siehe Kapitel 1.5), die Schließung der Stomata und die Einleitung der HR (Meng und Zhang 2013). Dabei wird nach dem zeitlichen Ablauf grundsätzlich zwischen schnellen Reaktionen (Einleitung nach < 1 Stunde, u.a. Aktivierung der Transkription von Abwehrgenen und Ethylensynthese) und Reaktionen mit Langzeitwirkung (Aktivierung nach bis zu 36 Stunden, u.a. Camalexin-Produktion und Wachstumsinhibierung) unterschieden (Tena et al. 2011). Unter letzteren Reaktionen ist hierbei die durch Akkumulation von MAPK-Proteinen verursachte Beschleunigung der Immunantwort bei Zweitinfektion (das sogenannte *priming*) herauszustellen (Conrath 2011). Ein finales Abklingen der durch aktivierte MAPKs vermittelten Signaltransduktion beruht im Wesentlichen auf der Dephosphorylierung der Enzyme durch endogene Phosphatasen (Meng und Zhang 2013).

Ein wesentliches Merkmal der MAPK-Signalwege ist, dass durch Rezeptoraktivierung gebildete Metabolite (z.B. Stickstoffmonoxid) eine Verstärkung der Kaskade induzieren können. Diese Metaboliten fungieren einerseits als Botenstoff, andererseits aber auch als Induktor ihrer eigenen Biosynthese durch die Aktivierung der MAPK-Kaskade (Frederickson Matika und Loake 2014).

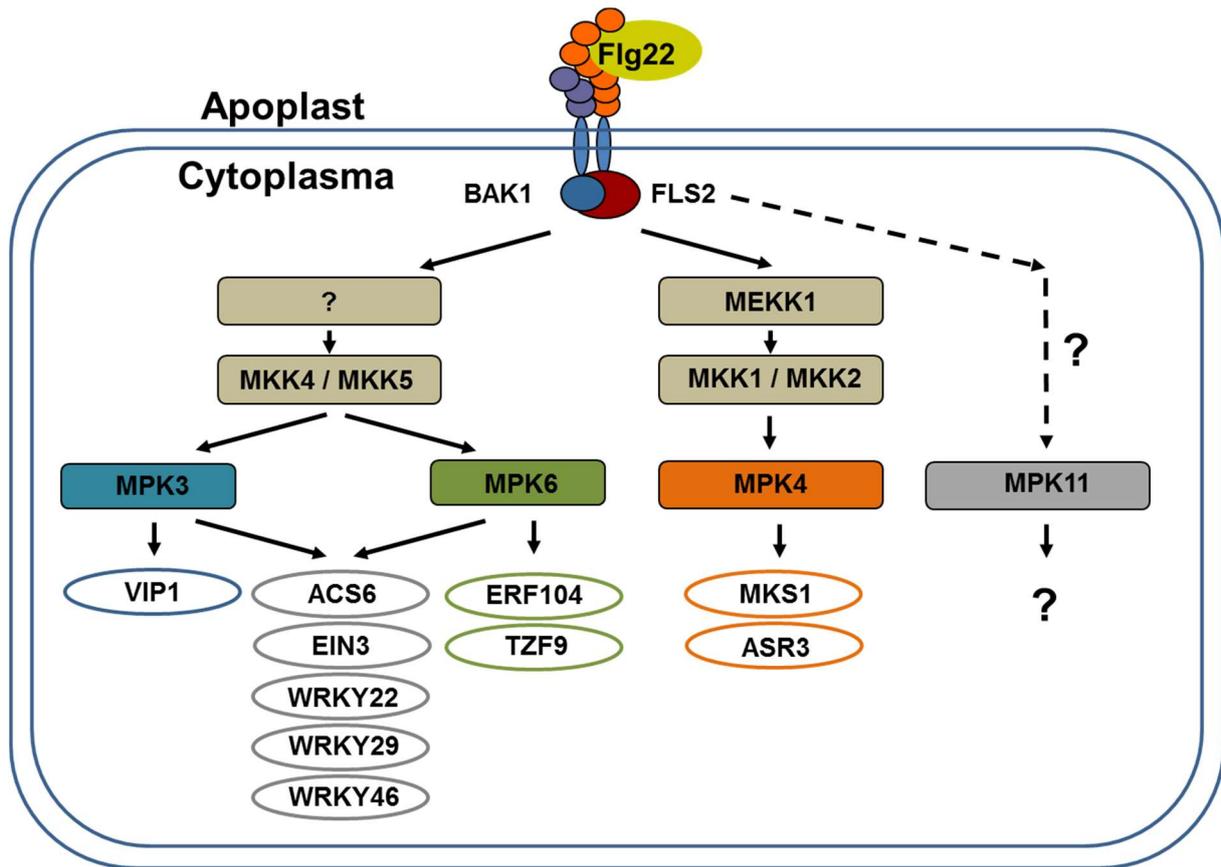
Das Genom von *Arabidopsis thaliana* codiert für ein umfangreiches Arsenal von 60 MAPKKs, 10 MAPKKs und 20 MAPKs. Bei der Invasion von pflanzlichem Gewebe durch Pathogene gehört die Aktivierung von MAPK-Kaskaden zu den frühen Antworten der Zelle auf die PRR-vermittelte Detektion von PAMPs. Zum grundlegenden Verständnis der PAMP-induzierten MAPK-Kaskaden in *Arabidopsis* haben umfassende Untersuchungen der durch Flagellin induzierten Kaskade beigetragen, die im Folgenden näher erläutert werden soll.

### **1.5. Die Flagellin-induzierte MAPK-Kaskade in *Arabidopsis thaliana***

Die eigentliche Einheit des Flagellins mit PAMP-Aktivität ist eine Peptidsequenz von 22 Aminosäuren Länge, die hoch konserviert in der N-terminalen Region des Proteins zu finden ist und als Flg22 bezeichnet wird. Flg22 wird in *Arabidopsis* durch den membranständigen PRR FLS2 (FLAGELLIN SENSING 2) detektiert. FLS2 bildet daraufhin einen Rezeptorkomplex mit BAK1 (BRI1-ASSOCIATED KINASE 1), der die Induktion einer MAPK-Kaskade induziert. Diese ist in der Lage, diverse

Immunantworten auszulösen, zu der als erste Antwort die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) zählt (Felix et al. 1999, Gomez-Gomez und Boller 2000, Chinchilla et al. 2007). Aktiviertes FLS2 kann dabei zwei unterschiedliche MAPK-Kaskaden ansteuern, deren Komponenten weitestgehend aufgeklärt wurden (Abb. 1-2): Zum einen konnte eine Aktivierung zweier redundanter MAPKKs (MKK4 und MKK5) gezeigt werden, wobei die für deren Aktivierung verantwortliche MAPKKK bisher nicht eindeutig identifiziert werden konnte. MKK4 und MKK5 aktivieren anschließend die MAPKs MPK3 und MPK6. Als MAPKKK der zweiten durch Flg22-induzierten Kaskade wurde MEKK1 identifiziert, die subsequentiell die MAPKKs MKK1 und MKK2 aktiviert. Endglied dieser MAPK-Kaskade bildet die MAPK MPK4 (Abb. 1-2). Neuere Untersuchungen zeigen, dass auch MPK11, eine zu MPK4 homologe MAPK nach Flg22-Behandlung in *Arabidopsis* aktiviert wird. Bisher konnten jedoch weder MPK11-Substrate noch die MAPK-Kaskade identifiziert werden, die die MPK11-Aktivierung steuert (Bethke et al. 2012, Eschen-Lippold et al. 2012). Neben der Induktion der ROS-Akkumulation reguliert die Flg22-induzierte Immunantwort die Expression von Abwehrgenen, wie zum Beispiel *PR1* (*PATHOGENESIS-RELATED 1*), *PR5* oder *FRK1* (*FLG22-INDUCED RECEPTOR-LIKE KINASE 1*) (Gomez-Gomez et al. 1999, Asai et al. 2002). Zusätzlich löst die Perzeption von Flg22 den Verschluss der Stomata aus, was ein weiteres Eindringen der Pathogene in das Pflanzengewebe verhindern soll. Dieser Mechanismus wird durch das Phytohormon Salicylsäure (SA) gesteuert (Zeng und He 2010). SA steht in enger antagonistischer Wechselwirkung mit dem Phytohormon Jasmonsäure (JA) (Caarls et al. 2015). Interessanterweise sind verschiedene *Pseudomonas*-Stämme in der Lage, das Toxin Coronatin zu produzieren, welches die biologisch aktive Form der JA imitiert. Dies führt zu einer Verschiebung des endogenen Phytohormon-gleichgewichts zugunsten von JA und zum Nachteil von SA, wodurch die Stomataschließung unterbunden wird (Melotto et al. 2008). Hierbei handelt es sich somit um ein Beispiel von ETS, wobei Coronatin gewissermaßen einen nicht proteinogenen Effektor darstellt.

Die oben angedeutete Multifunktionalität und Spezifität der durch Flg22-induzierten Abwehrmechanismen wird dabei unter anderem durch die Phosphorylierung verschiedener MAPK-Substrate gewährleistet, von denen bisher nur wenige beschrieben sind.



**Abbildung 1-2: Die durch Flg22 induzierbaren MAPK-Kaskaden.** Bakteriell Flg22 wird durch den membranständigen PRR (PATTERN RECOGNITION RECEPTOR) FLS2 (FIAGELLIN SENSING2) detektiert, der daraufhin einen Rezeptorkomplex mit BAK1 (BRI1-ASSOCIATED KINASE 1) bildet und zwei verschiedene MAPK (MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE)-Kaskaden aktiviert. Die links abgebildete Kaskade besteht aus einer bisher unbekannt MAPKKK, den MAPKKs MKK4 und MKK5 sowie den MAPKs MPK3 und MPK6. Die zweite rechts abgebildete Kaskade baut sich aus der MAPKKK MEKK1 (MAPK/ERK KINASE KINASE 1) den MAPKKs MKK1 und MKK2 sowie der MAPK MPK4 auf. Die einzelnen Komponenten einer Kaskade werden durch sequentielle Phosphorylierungen aktiviert. Welche MAPK-Kaskade die Aktivierung von MPK11 nach Flg22-Erkennung reguliert ist bisher ungeklärt. Über die Phosphorylierung von MAPK-Substraten kann die Spezifität der Immunantwort vermittelt werden. Unterhalb der MAPKs sind bisher beschriebene Substrate dargestellt, die Flg22 abhängig durch diese MAPKs phosphoryliert werden können. Substrate, die spezifisch durch MPK3, MPK6 bzw. MPK4 phosphoryliert werden, sind in blau, grün bzw. orange hervorgehoben. Substrate, die durch MPK3 und MPK6 phosphoryliert werden, sind grau dargestellt. (VIP1: VIRE2-INTERACTING PROTEIN 1, ACS6: 1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE 6, EIN3: ETHYLENE INSENSITIVE 3, ERF104: ETHYLENE RESPONSE FACTOR 104, TZF9: TANDEM ZINC FINGER 9, MKS1: MAP-KINASE SUBSTRATE 1, ASR3: ARABIDOPSIS SH4-RELATED 3, WRKY: WRKY Transkriptionsfaktor).

### 1.5.1. Substrate der durch Flg22 aktivierten MAPKs

Die in der Flg22-induzierten Signalkaskade eingebundenen MAPKs MPK3, MPK4, MPK6 und MPK11 spielen auch wichtige Rollen in Flg22-unabhängigen Signalwegen in denen sie verschiedene Substrate phosphorylieren. Einige dieser Substrate konnten bereits in der Literatur beschrieben werden, wie z.B. WRKY33, das direkt durch MPK3 und MPK6 nach Infektion mit *Botrytis Cinerea* phosphoryliert wird und die Camalexin-Biosynthese reguliert (Guan et al. 2014, Mao et al. 2011). Ein anderes Beispiel stellt der Transkriptionsfaktor SPEECHLESS dar, der eine Rolle in der Stomataentwicklung spielt. Er gehört der Familie der bHLH (*basic helix loop helix*)-Transkriptionsfaktoren an, und wird in einem Flg22-unabhängigen Signalweg durch MPK3 und MPK6 phosphoryliert (Lampard et al. 2008). Auf Grund der Relevanz für die vorliegende Arbeit wollen wir uns hier jedoch auf die bisher bekannten Substrate konzentrieren, die in der Flg22 abhängigen Signaltransduktion involviert sind (Abb1-2). Hierzu gehört unter anderem VIP1 (VIRE2-INTERACTING PROTEIN 1), welches nach Flg22-Perzeption spezifisch durch die MAPK MPK3 phosphoryliert wird. VIP1 spielt eine tragende Rolle beim Import von T-DNA in den Zellkern während der Agrobakterien-vermittelten Transformation. Hierbei translokalisiert VIP1 nach Phosphorylierung durch MPK3 aus dem Cytoplasma in den Zellkern (Pitzschke et al. 2009).

ACS6 (1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATESYNTASE 6) ist eines der ersten MAPK-Substrate der Flg22-induzierten MAPK-Kaskade, das durch Liu und Zhang als Substrat von MPK6 identifiziert werden konnte (Liu und Zhang 2004). Hierbei handelt es sich um ein limitierendes Enzym der Ethylenbiosynthese, das durch eine MPK3- oder MPK6-abhängige Phosphorylierung stabilisiert wird. Die dadurch hervorgerufene Akkumulation des Enzyms führt zu einer erhöhten Produktion des Phytohormons Ethylen (Li et al. 2012). Weitere MPK6-Substrate, die mit ethylenabhängigen Regulationsvorgängen in *Arabidopsis* in Verbindung stehen, sind ERF104 (ETHYLENE RESPONSE FACTOR 104) und EIN3 (ETHYLENE INSENSITIVE 3). ERF104 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression GCC-reicher ethylenresponsiver Promotoren steuert, von denen einige in der stressinduzierten Immunantwort involviert sind. ERF104 und MPK6 sind als MAPK-Substrat-Komplex im Zellkern lokalisiert. In Abhängigkeit von Ethylen und nach MPK6-abhängiger Phosphorylierung (nach Behandlung mit Flg22) wird diese Interaktion aufgehoben

(Bethke et al. 2009). EIN3 wird neben MPK6 auch durch MPK3 *in vitro* phosphoryliert, wodurch vermutlich ebenfalls dessen Stabilität beeinflusst wird (Guo und Ecker 2003). Die WRKYs WRKY22, WRKY29 und WRKY46 werden ebenfalls Flg22-abhängig durch MPK3 und MPK6 reguliert (Asai et al. 2002, Sheikh et al. 2016). WRKY22 wurde als Modulator SA- und JA-abhängiger Signalwege in der Abwehr von Blattläusen in *Arabidopsis* beschrieben (Kloth et al. 2016). WRKY46 spielt eine bereits gut untersuchte Rolle in der pathogen-induzierten Immunantwort (van Verk et al. 2011, Hu et al. 2012, Moreau et al. 2012, Ding et al. 2013). Dieser Transkriptionsfaktor wurde in einer 74 WRKYs umfassenden Phosphorylierungs-analyse, bei der 46WRKYs als *in vitro* Substrate von MPK3 und MPK6 gefunden wurden, als ein Substrat beider MAPKs identifiziert. Die Phosphorylierung von WRKY46 durch MPK3 und MPK6 führt zu einer *in vivo* Destabilisierung des Proteins, wodurch vermutlich dessen Transkriptionsaktivität reguliert wird (Sheikh et al. 2016). Ein weiteres Substrat, das spezifisch durch MPK6 phosphoryliert wird, ist TZF9 (TANDEM ZINC FINGER 9) – ein Protein, das in so genannten Prozessierungskörpern (*processing bodies*, *P-bodies*) lokalisiert ist und die PAMP-induzierte Immunantwort vermutlich über posttranskriptionale Prozesse reguliert (Maldonado-Bonilla et al. 2014).

Zwei bisher beschriebene MPK4-Substrate sind MKS1 (MAP KINASE 4 SUBSTRATE 1) und ASR3 (ARABIDOPSIS SH4-RELATED 3). Letzteres ist ein Transkriptionsfaktor, der der Familie der Trihelix-Transkriptionsfaktoren angehört, und die durch biotischen Stress induzierte Immunantwort in *Arabidopsis* negativ reguliert (Li et al. 2015a). Die Aminosäuresequenz von MKS1 enthält eine als VQ-Motiv bezeichnete Sequenz. Dessen biologische Funktion wird im nachfolgenden Kapitel näher erläutert, in dem insbesondere auf die Identifizierung und Charakterisierung weiterer solcher VQ-Motiv-tragenden Proteine (VQs) als potentielle neuartige MAPK-Substrate in der Flg22-induzierten Immunantwort in *Arabidopsis thaliana* eingegangen werden soll.

### **1.5.2. Die Familie der VQs – Potentielle MAPK-Substrate in der Flg22-induzierten Immunantwort von *Arabidopsis thaliana***

Im Vorfeld zu der vorliegenden Arbeit wurde eine HefediHybrid (*yeast two hybrid*, Y2H)-Analyse durchgeführt, bei der eine Genbibliothek von *Arabidopsis thaliana* auf Interaktoren der MAPKs MPK3 und MPK6 untersucht wurden (unveröffentlichte Daten, Justin Lee und Dierk Scheel, IPB Halle und Joachim Uhrig, Georg-August Universität Göttingen). Unter einer Vielzahl interagierender Proteine konnten drei Proteine identifiziert werden, die der Familie der VQs angehören. In den Fokus unserer Analysen rückten diese Proteine auf Grund der Erkenntnis, dass das bereits beschriebene MPK4-Substrat MKS1 ebenfalls dieser Proteinklasse angehört sowie die Tatsache, dass zu diesem Zeitpunkt für kein weiteres der im Genom von *Arabidopsis thaliana* codierten VQs eine biologische Funktion beschrieben war. Diese neue Proteinklasse schien jedoch zeitgleich das Interesse verschiedener anderer Arbeitsgruppen auf sich gezogen zu haben. Somit konnte in den letzten Jahren eine rege Publikationstätigkeit beobachtet werden, die eine zunehmende Vielfalt von biologischen Funktionen für verschiedene VQs aufdeckte. Diese sind im folgenden Abschnitt zusammengefasst.

Die VQs sind eine pflanzenspezifische Proteinfamilie, die durch ein einziges kurzes Aminosäuresequenz-Motiv (FxxhVQxhTG, "x" kennzeichnet hierbei eine beliebige Aminosäure, während "h" eine hydrophobe Aminosäure markiert) gekennzeichnet ist. Ihr Name leitet sich von den beiden hoch konservierten Aminosäuren Valin (V) und Glutamin (Q) im Zentrum dieses Motivs ab. Die Gesamtlänge der Sequenzen der VQs variiert von 99 Aminosäuren bis zu 402 Aminosäuren. Introns sind innerhalb der codierenden DNA-Sequenzen (CDS) nur selten zu finden (Cheng et al. 2012).

Das bereits in vorangegangenen Kapitel erwähnte MPK4-Substrat MKS1 – eines der ersten beschriebenen Vertreter der Familie (Petersen et al. 2010, Andreasson et al. 2005) – konnte in *Arabidopsis thaliana* in einem nuklearen Komplex mit MPK4 und dem WRKY-Transkriptionsfaktor (WRKY) WRKY33 nachgewiesen werden (Abb. 1-3A). Diese Interaktion mit WRKY33 lässt sich durch die Mutation der zentralen Aminosäuren Valin und Glutamin im VQ-Motiv inhibieren. Eine Behandlung mit Flg22 oder *Pseudomonas syringae* führt zur Aktivierung von MPK4, welches anschließend MKS1 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung ruft eine Komplexauflösung und Freisetzung von WRKY33 hervor, dass in Folge die Aktivierung des Promotors von

*PAD3* hervorruft. *PAD3* codiert für ein Protein, das die Camalexin-Biosynthese positiv beeinflusst (Qiu et al. 2008a). Camalexin (3-(1,3-Thiazol-2-yl)-indol) ist ein einfaches Alkaloid, das der Gruppe der Phytoalexine zugeordnet wird. Unter dieser Gruppe werden antimikrobiell wirkende Substanzen zusammengefasst, die von Pflanzen nach Pathogenbefall gebildet werden um die Ausbreitung des Pathogens in den betroffenen Geweben zu verhindern. In Übereinstimmung mit der MKS1-vermittelten Aktivierung des *PAD3*-Promotors zeigen konstitutiv überexprimierende *35S::MKS1*-Arabidopsislinien eine erhöhte Resistenz gegenüber dem bakteriellen Pathogen *Pseudomonas syringae* sowie dem Oomyceten *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Fiil und Petersen 2011). Neben MKS1 codiert das Genom von *Arabidopsis thaliana* jedoch für 33 weitere VQs, von denen bisher wenige in der Literatur beschrieben sind. In einer durch Chen et al. durchgeführten Analyse wurden die 34 in *Arabidopsis thaliana* codierten VQs entsprechend der numerischen Abfolge ihrer AGI-Codes von VQ1 bis VQ34 benannt (Chen et al. 2012). Diese Benennung findet sich in nachfolgenden Publikationen wieder und soll auch in dieser Arbeit Verwendung finden. Auf Basis bioinformatischer Vorhersage-Methoden wurde für die Mehrheit der 34 *Arabidopsis*-VQs eine Lokalisation im Zellkern vorhergesagt. Interessanter Weise tragen einige VQs neben einem nuklearen Lokalisationssignal (NLS) auch Signalpeptide, die eine mitochondriale oder plastidäre Lokalisation und damit eine duale Funktion dieser VQs in unterschiedlichen Zellorganellen vermuten lässt.

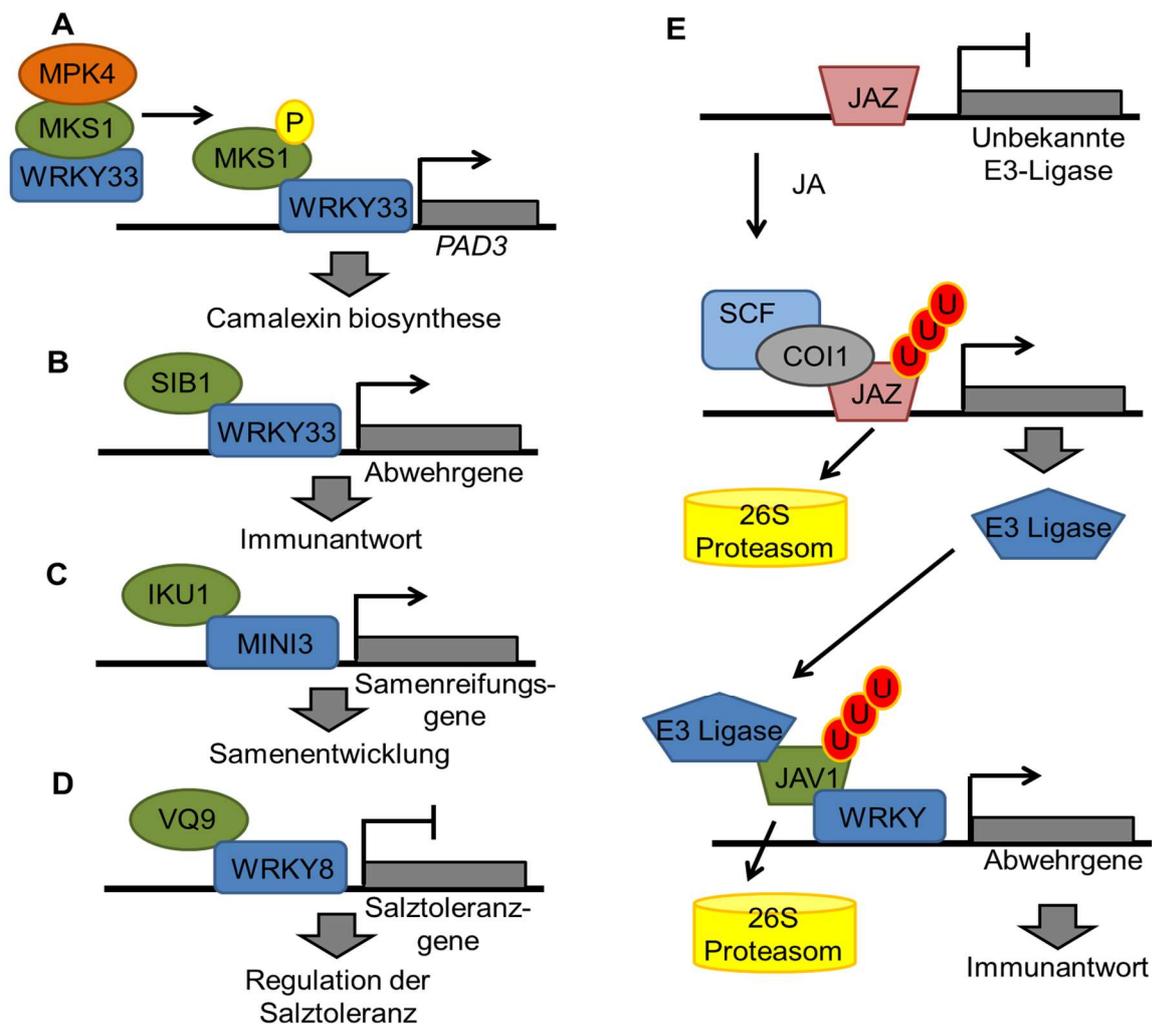
Neben MKS1 gehören die SIGMA FACTOR BINDING PROTEINS 1 und 2 (SIB1 und SIB2) zu den ersten hinsichtlich ihrer Funktion untersuchten VQs (Abb. 1-3B). SIB1 und SIB2 sind sowohl im Zellkern als auch in den Plastiden nachweisbar (Xie et al. 2010). Pathogenstudien zeigen, dass SIB1 und SIB2 Komponenten der pathogeninduzierten Immunantwort in *Arabidopsis* darstellen, deren Expressionsniveau nach Infektion der Pflanzen mit dem nekrotrophen Pathogen *Botrytis cinerea* erhöht ist. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigen *sib1*- und *sib2*-Linien eine verringerte Resistenz gegenüber dem Pathogen, wohingegen deren Überexpression die Resistenz gegenüber dem Pilz erhöht (Lai et al. 2011). Für die *sib1*-Mutante wurden vergleichbare Effekte nach Behandlung mit *Pseudomonas syringae* gezeigt, die durch die Behandlung mit SA oder JA verstärkt werden und zu einer Hyperaktivierung abwehrrelevanter Gene führen (Xie et al. 2010). Diese Ergebnisse lassen eine Dualfunktion von SIB1 in der Abwehr nekrotropher Pathogene

(wie *Botrytis cinerea*) sowie in der Abwehr hemibiotropher Pathogene (wie *Pseudomonas syringae*) vermuten. Ebenso wie MKS1 interagieren SIB1 und SIB2 in Abhängigkeit von den zentralen Aminosäuren Valin und Glutamin mit WRKY33. Die Interaktion erfolgt über die C-terminale WRKY-Domäne von WRKY33, wodurch dessen Transkriptionsaktivität induziert wird (Lai et al. 2011). Vor der Aufklärung der nuklearen SIB1/SIB2-WRKY33-Interaktion wurden SIB1 und SIB2 als Interaktoren mit dem Protein SIGMA FACTOR1 (SIG1) in Plastiden von *Arabidopsis* beschrieben, wonach sich deren Name ableitet (Xie et al. 2010). SIG1 ist eine Komponente der in den Plastiden codierten RNA-Polymerase, die die Transkription in Plastiden reguliert. Eine Verbindung von SIG1 zu pathogen-induzierten Abwehrprozessen konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

Auch die VQs IKU1 und VQ9 (Abb. 1-3C, D) interagieren mit Mitgliedern der WRKY-Familie. IKU1 wird im frühen Endosperm exprimiert, wo es das Wachstum und die Samenentwicklung von *Arabidopsis thaliana* über die Interaktion mit dem WRKY MINI3 reguliert (Luo et al. 2005, Wang et al. 2010). VQ9 interagiert mit WRKY8, welches eine positive Rolle in der salzabhängigen Stressantwort und der basalen Abwehr in *Arabidopsis* spielt (Chen et al. 2010, Chen et al. 2013, Hu et al. 2013a). Die Überexpression von VQ9, welches ausschließlich im Zellkern nachweisbar ist, führt zu einer reduzierten Salztoleranz, so dass dementsprechend eine antagonistische Funktion zu WRKY8 diskutiert wird (Hu et al. 2013a).

JAV1 (JASMONATE-ASSOCIATED VQ MOTIF GENE1, auch als VQ22 bekannt) ist ein weiteres VQ, das eine Rolle in der biotischen Stressantwort spielt. Hu et al. (2013b) konnten zeigen, dass JAV1 in die Abwehr von Herbivoren als auch vom Phloem lebenden Insekten sowie gegen nekrotroph lebende pilzliche Pathogene involviert ist. Hierbei wird eine negative Rolle in der Abwehrregulation diskutiert, da *JAV1*-RNAi-Linien eine erhöhte Resistenz gegenüber diesen Pathogenen aufweisen. Die molekularen Regulationsmechanismen von JAV1 sind bisher nicht vollständig geklärt, stehen aber im engen Zusammenhang mit der JA-vermittelten Immunantwort in *Arabidopsis*. Nach Verwundung induziert JA die Expression abwehrregulierter Gene wie *PDF1.2*, *PR4*, *PR5* oder *VSP1*. Diese Gene zeigen eine verstärkte Induktion nach Verwundung von *JAV1*-RNAi Pflanzen, wohingegen die Expression SA-induzierter Gene unverändert bleibt (Hu et al. 2013b). JA-Behandlung von *Arabidopsis*-Pflanzen ruft einen 26S-Proteasom-abhängigen Abbau von JAV1 hervor, der sich interessanterweise nicht in Pflanzen beobachten lässt, in denen das Gen der F-box

E3-Ligase COI1 ausgeschaltet ist. Hierdurch wird eine funktionale Ähnlichkeit zu der Gruppe der JAZ-Proteine hergestellt. JAZ-Proteine sind Hauptkomponenten der JA-vermittelten Genregulation, die die Genexpression reprimieren indem sie an die Promotorregionen ihrer Zielgene binden. Pathogenbefall oder Verwundung resultieren in einer Erhöhung des JA-Ile-Niveaus in den Zellen. JA-Ile ist die Isoleucin konjugierte aktive Form von JA, welche die COI1-Untereinheit des SCF-Ubiquitin E3-Ligase-Komplexes bindet. Dies stimuliert die Interaktion von COI1 mit JAZ-Proteinen, was eine Polyubiquitinierung und den anschließenden Abbau durch das 26S-Proteasom hervorruft. In Folge dieses Ereignisses werden die JAZ-reprimierten Gene zur Expression freigegeben (Durand et al. 2016). Für JAV1 wird ein ähnlicher Mechanismus vermutet, nach dem JAV1 die Expression seiner Zielgene auf ähnliche Weise durch Promotorbindung supprimiert. Eine direkte Interaktion zwischen COI1 und JAV1 konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Wie eine COI1-abhängige Regulation von JAV1 ohne direkte Interaktion beider Proteine vorstellbar wäre zeigt ein Modell von Zhu und Zhu (2013; Abb. 1-3E). Hierbei werden durch Pathogenbefall oder Verwundung zunächst die bekannten Prozesse der JA-abhängigen Genregulation über den COI1-vermittelten JAZ-Abbau eingeleitet. Der Brückenschlag erfolgt über die Hypothese, dass es hierdurch zur Expression einer noch unbekanntem Ubiquitin E3-Ligase kommt, die mit JAV1 interagiert, und dessen Abbau durch das 26S-Proteasom hervorruft. Welche Gene durch JAV1 reguliert werden konnte bisher nicht geklärt werden. Y2H-Analysen, in denen WRKY28 und WRKY51 als Interaktoren von JAV1 gefunden wurden, lassen aber einen WRKY abhängigen Mechanismus vermuten (Zhu und Zhu 2013). Zusammenfassend konnte für den Großteil der bisher beschriebenen VQs eine WRKY-abhängige Funktion in der stressabhängigen Genregulation in *Arabidopsis* beschrieben werden.



**Abbildung 1-3: VQs als Regulatoren der WRKY-abhängigen Genexpression in *Arabidopsis thaliana*.** WRKY33 induziert die Expression von PAD3, wodurch die Produktion des Phytoalexins Camalexin erhöht wird (Mao et al. 2011). WRKY33 liegt in einem transkriptionsinaktiven Komplex mit MPK4 und MKS1 vor. Nach pathogenvermittelter Phosphorylierung von MKS1 durch MPK4 wird der WRKY33-MKS1-Subkomplex freigegeben. Daraufhin induziert WRKY33 die Expression von PAD3 (A). SIB1 (VQ23) interagiert mit WRKY33, wodurch dessen Bindung an Promotoren, die Gene der pflanzlichen Immunantwort regulieren, stimuliert wird (B). Durch die Interaktion von IKU1 (VQ14) mit MINI3 (einem Mitglied der WRKY-Familie) wird die Transkription von Genen induziert, die die Samenentwicklung steuern VQ9 ist ein negativer Transkriptionsregulator. Seine Interaktion mit WRKY8, einem positiven Regulator von Genen die in die Salztoleranz involviert sind, inhibiert dessen Transkriptionsaktivität. (C) VQ9 ist ein negativer Transkriptionsregulator. Seine Interaktion mit WRKY8, einem positiven Regulator von Genen die in die Salztoleranz involviert sind, inhibiert dessen Transkriptionsaktivität. (D) (A-D Abbildung abgewandelt nach Jing und Lin 2015).

Erhöhte JA Level heben die JAZ vermittelte Repression einer hypothetischen, unbekanntem Ubiquitin E3-Ligase über den COI1-vermittelten 26S-Proteasom-abhängigen Abbauweg auf. JAV1 verhindert vermutlich durch dessen Interaktion mit WRKYs deren Transkriptionsaktivität. Die zuvor exprimierte unbekannte E3-Ligase ubiquitiniert JAV1, wodurch es Proteasom-vermittelt abgebaut wird und die von JAV1 reprimierten Gene nun exprimiert werden (Hypothese von Zhu und Zhu, 2013) (E).

Neben der oben erläuterten Interaktion von SIB1 und SIB2 mit SIG1 in Plastiden konnten für weitere VQs WRKY-unabhängige Funktionen in der Stressantwort von *Arabidopsis* beschrieben werden. CALMODULIN BINDING PROTEIN 25 (CAMBP25) ist ein Zellkern lokalisiertes VQ, das eine Calcium-abhängige Interaktion mit Calmodulin (CaM) zeigt. Die Überexpression von CAMBP25 resultiert in einer erniedrigten Toleranz gegenüber NaCl- und Mannitolbehandlung, was eine Rolle als negativen Regulator in der osmotischen Stressantwort vermuten lässt (Perruc et al. 2004). Ein weiteres VQ mit einer WRKY-unabhängigen Funktion ist VQ29. Es interagiert mit dem PHYTOCHROM-INTERAKTIONSFAKTOR1 (PIF1) einem Transkriptionsfaktor der Familie der bHLH-Transkriptionsfaktoren angehört. PIF1 und VQ29 koaktivieren unter Lichteinfluss das Gen *XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE 7 (XTR7)* welches wichtige regulatorische Funktionen in der Zellelongation einnimmt (Li et al. 2014). Außerdem wurde VQ29 zusammen mit VQ12 als negativer Regulator der Immunantwort gegenüber *Botrytis Cinerea* beschrieben. Darüber hinaus konnte in diesen Untersuchungen eine Formation von Homo- und Heterodimeren aus beiden VQs nachgewiesen werden (Wang et al. 2015a).

Zeitgleich zu der Durchführung der hier vorliegenden Arbeit wurde von Chen und Koautoren eine Y2H-Analyse veröffentlicht, in dessen Rahmen die Interaktion von verschiedenen VQs mit WRKYs untersucht wurde. Hierbei wurden anstatt der kompletten CDS der WRKYs die WRKY-Domänen repräsentativer WRKYs verwendet, die den unterschiedlichen Gruppierungen angehören. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die getesteten VQs spezifisch mit WRKYs der Gruppe I und IIc interagieren, was durch ein Y2H-Experiment im Rahmen dieser Arbeit unter Verwendung der entsprechenden Vollängenproteine bestätigt werden konnte. Interessanterweise zeigten auch die genannten VQs CAMBP25 und VQ29 eine Interaktion mit diesen WRKY-Domänen (Chen et al. 2012). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass sich VQs primär als Kofaktoren der WRKYs entwickelt haben, die das komplexe WRKY-Signalnetzwerk koregulieren und somit zur Spezifität innerhalb der damit vermittelten Genregulation beitragen, die eine Vielzahl pflanzlicher Prozesse steuert.

### 1.5.3. WRKY-Proteine – Transkriptionsfaktoren mit vielfältigen Aufgaben

Die Familie der WRKYs ist eine pflanzenspezifische Proteinfamilie, die eine etwa 60 Aminosäuren umfassende WRKY-Domäne tragen und als Transkriptionsfaktoren wichtige regulatorische Aufgaben in der Genexpression übernehmen. In Übereinstimmung dazu findet man die meisten Mitglieder dieser Familie im Zellkern lokalisiert (Eulgem et al. 2000, Yamasaki et al. 2005, Ciolkowski et al. 2008). Anhand des Aufbaus der WRKY-Domäne, die durch eine N-terminale WRKYG-Sequenz und ein Zink-Finger-Motiv definiert wird, werden die WRKYs in drei Gruppen unterteilt. Die Gruppe I unterscheidet sich von den Gruppen II und III durch das Vorhandensein einer zweiten C-terminalen WRKYGQK-Sequenz. Die weitere Unterteilung erfolgt über die Zink-Finger-Domänen. Während die Mitglieder der Gruppe I und II das gleiche Zink-Finger-Motiv (CX4-5CX22-23HXH) tragen, also nur basierend auf der Anzahl vorhandener WRKYGQK-Sequenzen unterschieden werden, tragen die Mitglieder der Gruppe III in ihrer Sequenz ein unterschiedliches Zink-Finger-Motiv (CX7CX23HXC) (Eulgem et al. 2000). WRKY-Proteine der Gruppe II werden darüber hinaus – basierend auf Aminosäure-Sequenzhomologien – in fünf weitere Untergruppen (IIa - IIe) unterteilt (Zhang und Wang 2005). In höheren Pflanzen gehören die WRKYs oft zu den umfangreichsten Familien von Transkriptionsfaktoren – mit 74 Mitgliedern in *Arabidopsis thaliana* bis hin zu 200 Vertretern in der Sojabohne. Stammesgeschichtliche Studien lassen vermuten, dass diese Familien durch Genduplikationen im Verlauf der Evolution der Pflanzen entstanden sind. Das Genom der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* codiert nur für ein einziges WRKY, das der Gruppe I zuzuordnen ist. Diese wird somit als ursprünglichste WRKY-Gruppe diskutiert (Ulker und Somssich 2004).

Die WRKYGQK-Domäne ist essentiell für die Bindung der WRKYs an DNA-Sequenzen in den Promotorregionen der über WRKYs regulierten Gene, die als W-Boxen bezeichnet werden und durch das Sequenzmotiv TTGACC/T gekennzeichnet sind (Rushton et al. 1996). Die hohe Relevanz von WRKYs als Komponenten der pflanzlichen Immunabwehr wird dadurch unterstrichen, dass W-Boxen in den Promotorregionen einer Vielzahl pathogenaktivierter Abwehrgene zu finden sind (Rushton und Somssich 1998). Nicht selten tragen solche Promotorregionen mehrere W-Boxen, die die Genexpression fördern können (Eulgem et al. 1999). Seit den ersten Beschreibungen von WRKY-Transkriptionsfaktoren vor rund zwei Jahrzehnten (Rushton et al. 1995, Rushton et al. 1996, Ishiguro et al. 1994, de Pater et al. 1996)

wurden eine Vielzahl dieser Proteine erfasst, die unterschiedlichste biologische Funktionen – von der Pflanzenentwicklung und der Regulation wichtiger Pflanzenhormone bis hin zur Regulation von abiotischen und pathogenen Stressantworten – einnehmen. Im folgenden Kapitel soll eine Auswahl von WRKYs näher behandelt werden, die in die Genregulation in *Arabidopsis* involviert sind.

#### **1.5.3.1. WRKYs als Regulatoren der Pflanzenentwicklung**

WRKY-Transkriptionsfaktoren, die mit der Pflanzenentwicklung in *Arabidopsis* in Verbindung gebracht werden, sind zum Beispiel WRKY71 und WRKY23. Beide Proteine stellen positive Regulatoren für die Verzweigung der Sprossachse dar und verhalten sich responsiv hinsichtlich verschiedener biotischer und abiotischer Einflüsse (Guo et al. 2015, Guo und Qin 2016). WRKY71 ist darüber hinaus ein wichtiger Regulator in der Blütenentwicklung, der die Expression wichtiger Blühregulationsgene wie *LEAFY* und *FLOWERING LOCUS T* positiv reguliert (Yu et al. 2016). WRKY44 wurde unter der Bezeichnung TRANSPARENT TESTA GLABRA2 als Regulator für die Samenhüllen- und Trichomentwicklung beschrieben. Dessen Expression wird durch Transkriptionsfaktoren reguliert, die der Familie der MYB- und bHLH-Proteine angehören (Johnson et al. 2002, Ishida et al. 2007).

#### **1.5.3.2. WRKY-Transkriptionsfaktoren in der pflanzlichen Stress- und Immunantwort**

Manche WRKYs nehmen vielfältige Rollen in der Genregulation in *Arabidopsis* ein. WRKY6 zum Beispiel wird einerseits mit Seneszenzmechanismen in Verbindung gebracht, ist aber zudem in der Pathogenabwehr als Aktivator von *PR1* sowie in abiotischen Stressreaktionen wie zum Beispiel Bor- oder Phosphatmangel involviert (Robatzek und Somssich 2001, Robatzek und Somssich 2002, Kasajima et al. 2010, Chen et al. 2009).

Auch in anderen abiotischen Stressreaktionen haben WRKYs wichtige Funktionen inne. Darunter finden sich Schlüsselrollen in pflanzlichen Reaktionen auf osmotischen Stress (WRKY54, Li et al. 2013), Trockenstress (WRKY63 (Shaik und Ramakrishan 2013), WRKY39 (Ren et al. 2010) und WRKY57 (Jiang et al. 2012)), Hitzestress (WRKY39, Li et al. 2010), Kältestress (WRKY34, Zou et al. 2010) und Hypoxie

(WRKY22, Hsu et al. 2013). WRKY75 hat Bedeutung in der Phosphataufnahme und der Wurzelentwicklung (Devaiah et al. 2007).

Neben abiotischen Einflüssen sind WRKYs auch für die Regulation der Immunantwort auf biotischen Stress von Bedeutung. Eine Vielzahl von WRKYs sind in lokale Stressantworten und Abwehrreaktionen gegen nekrotrophe Pathogene involviert (Birkenbihl und Somssich 2011, Hahn et al. 2013). Ausgiebig untersucht wurde unter anderem die Rolle von WRKY33, einem positiven Regulator der Calalexin-Biosynthese nach Infektion mit *Botrytis cinerea* (Abb. 1-3D) (Zheng et al. 2006, Birkenbihl et al. 2012). Expressionsanalysen nach Infektion mit dem biotrophen Pathogen *Pseudomonas syringae* zeigen differentielle Expressionsmuster für die Mehrheit der *Arabidopsis* WRKY-Gene (Dong et al. 2003). In weiterführenden Studien konnten beispielsweise WRKY48, WRKY11 und WRKY17 als negative Regulatoren in der Immunantwort gegenüber Pseudomonaden beschrieben werden (Journot-Catalino et al. 2006, Muhktar et al. 2008, Xing et al. 2008). Manche WRKYs weisen sogar duale Funktionen in der Regulation der Immunantwort auf biotrophe und nekrotrophe Pathogene auf. Die *Arabidopsis*-Linien *wrky60* sowie *wrky18 x wrky40* zeigen beispielsweise eine erhöhte Resistenz gegenüber *Pseudomonas syringae*, während ihre Resistenz gegenüber *Botrytis cinerea* deutlich reduziert ist (Xu et al. 2006). Generell ist die pflanzliche Abwehr von biotrophen und nekrotrophen Pathogenen grundlegend durch die Phytohormone SA und JA reguliert. Dabei ist der SA-Signalweg hauptsächlich in der Abwehr biotropher Krankheitserreger involviert, während die Aktivierung des JA-Signalwegs in der Abwehr nekrotropher Pathogene beobachtet wird. Tatsächlich sind vielfache Beispiele beschrieben, in denen WRKY-Transkriptionsfaktoren das JA/SA-Verhältnis in Pflanzen regulieren. WRKY33 zum Beispiel begünstigt den SA-Signalweg nach Behandlung mit *Botrytis cinerea* durch die Suppression der JA-Synthese (Zheng et al. 2006, Birkenbihl et al. 2012). Weitere WRKY-Proteine wurden als negative Regulatoren von *NPR1* beschrieben, einem Abwehrgen welches in der systemischen Immunantwort (*systemic acquired resistance*, SAR) involviert ist und eine Schlüsselkomponente in der Regulation des SA/JA-Gleichgewichts darstellt (Yu et al. 2001, Mao et al. 2007). Zusammenfassend bestätigt der derzeitige Wissensstand, dass WRKY-Transkriptionsfaktoren eine tragende Rolle in vielen Aspekten der pflanzlichen Stressregulation spielen. Insbesondere molekulare Interaktionsstudien sind dabei ein wichtiges Hilfsmittel, um das komplexe durch WRKYs regulierte Signalnetzwerk zu entschlüsseln.

## 1.6. Ziel der Arbeit

Seit vielen Jahren bemüht sich die moderne Wissenschaft die Prozesse zu verstehen, durch die Pflanzen mit ihrer Umwelt interagieren. Ein besonderer Fokus liegt hierbei auf der Interaktion von Pflanzen mit Pathogenen, da diese unser Leben direkt und auf drastische Weise beeinflussen können – insbesondere wenn sie als Krankheitserreger wichtiger Nutzpflanzen verheerende Ernteeinbußen auslösen.

Um derartigen Problemen entgegenwirken zu können ist ein Verständnis der molekularen Mechanismen der pflanzlichen Immunabwehr unabdingbar. *Arabidopsis thaliana* eignet sich auf Grund ihrer einfachen Handhabung und Transformierbarkeit, kurzen Regenerationszeiten und eines vergleichsweise einfach strukturierten und vollständig sequenzierten Genoms hervorragend für solche Studien.

Die durch die Erkennung bakteriellen Flagellins durch den Pflanzenrezeptor FLS2 ausgelösten Abwehrreaktionen gehören wohl zu den am ausführlichsten erforschten Mechanismen des Immunsystems in *Arabidopsis*. Wie bereits erläutert sind die hierdurch ausgelösten Abwehrreaktionen in der Pflanze sowie die initialen Signaltransduktionsprozesse nach Flagellin-Detektion (zum Beispiel Calcium-Signalprozesse oder induzierte MAPK-Kaskaden) recht gut verstanden. Die Fragestellung wie eine relativ einfach aufgebaute MAPK-Kaskade eine solche Vielfalt von pflanzlichen Abwehrreaktionen einleitet und genau reguliert lässt bisher allerdings noch viel Raum für Spekulationen offen. Eine zentrale Rolle nehmen hierbei MAPK-Substrate ein, von denen bisher nur wenige beschrieben werden konnten.

In dieser Arbeit sollte die relativ neue Familie der VQ-Motiv tragenden Proteine (VQs) als potentielle Substrate der durch Flagellin induzierten MAPKs analysiert werden. Vorangegangene Y2H-Analysen, die einige VQs als MPK6-interaktoren identifizierten, die Beschreibung des VQs MKS1 als MPK4-Substrat und zunehmende Hinweise in der Literatur, die VQs mit der Regulation stressinduzierter Abwehrreaktionen in Verbindung bringen, rückten diese Proteinfamilie in den Fokus unserer Forschung. VQs, die im Laufe der vorliegenden Arbeit als neue MAPK-Substrate identifiziert werden konnten, sollten im Anschluss eingehender im Hinblick auf deren biologische Funktion beleuchtet werden.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Materialien

Natriumfluorid, Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid (IPTG) und 4-Nitrophenylphosphat (Dinatriumsalz) wurden von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen. Der Protease-Inhibitor-Mix HP war ein Produkt von Serva (Heidelberg, Deutschland), und die Enzyme Cellulase R10 und Mazerozym R10 wurden von Yakult Pharmaceutical Ind. Co. (Tokio, Japan) bezogen. Die Elicitorpeptide Flg22 und Elf18 wurden am IPB Halle mit Hilfe des EPS221-Peptidsynthesizers der Firma Abimed (Langenfeld, Deutschland) synthetisiert. Alle anderen Chemikalien, Lösungsmittel, Puffersubstanzen, Medienbestandteile und Antibiotika besaßen den höchsten käuflichen Reinheitsgrad.

#### 2.1.1. Bakterienstämme und Anzucht der Bakterienkulturen

Die *Escherichia coli*-Stämme DH5 $\alpha$ , BL21 und BL21(DE3) (Invitrogen, Carlsbad, USA) und *Pseudomonas syringae* (pv. *tomato*, DC3000) wurden in Luria-Bertani (LB)-Flüssigmedium (10 g l<sup>-1</sup> Trypton, 5 g l<sup>-1</sup> Hefeextrakt, 10 g l<sup>-1</sup> NaCl, pH 7.0) bei 37 °C kultiviert. Kulturen von *Agrobacterium tumefaciens* zur Pflanzentransformation (Kapitel 2.3.13) wurden in LB-Medium mit Zusatz der benötigten Antibiotika bei 28 °C angezogen. Festmedien zum Ausplattieren der entsprechenden Bakterienstämme enthielten 1 % (w/v) Agar-Agar.

#### 2.1.2. Pflanzenmaterial

Für alle verwendeten *Arabidopsis thaliana*-Linien wurden der Ökotyp Columbia (Col-0) als genetischer Hintergrund verwendet. Die *mpk3*- und *mpk6*-Mutanten wurden bereits in früheren Arbeiten beschrieben (Wang et al. 2008, Bethke et al. 2009). Die *mvq1*-Mutante (SALK\_107266) wurde vom *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* bezogen und durch Frau Dr. Gerit Bethke (IPB, Halle) unter Verwendung der durch die SALK T-DNA Primer Design Software (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>) (Alonso et al. 2003) vorgegebenen Primer über PCR (Kapitel 2.3.6) verifiziert. Die verwendete MVQ1-Überexpressionslinie wurde durch Agrobakterien-vermittelte Transformation (Kapitel 2.3.13) generiert. Hierzu wurde die CDS in den binären Vektor pEARLYGATE203 (Early et al. 2006) kloniert, der die Expression von *MVQ1* als N-terminale c-myc-Fusion unter der Kontrolle des CaMV (*cauliflower mosaic virus*) 35S-

Promotors ermöglicht. Die Überexpression des Gens wurde mittels Northern Blot (Kapitel 2.3.14)- und Western Blot-Analysen (Kapitel 2.4.4) bestätigt. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte unter Kurztagbedingungen (8 Stunden Licht- und 16 Stunden Dunkelphase) bei 22°C.

## **2.2. Sequenzanalysen**

Im Genom von *Arabidopsis thaliana* gefundene Gene mit VQ-Motiv wurden mit Hilfe der Programme ClustalW (<http://www.clustal.org/>) und MEGA4 (<http://www.megasoftware.net/mega4/mega.html>) einem Sequenzvergleich unterzogen. Zur Visualisierung wurde die Software BOXSHADE ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)) genutzt. Die Darstellung der VQ-Konsensussequenz erfolgte mit WEBLOGO (Schneider und Stephens 1990, Crooks et al. 2004).

## **2.3. Molekularbiologische Methoden**

### **2.3.1. Herstellung und Transformation chemisch kompetenter Zellen**

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach Sambrook et al. (1989). Nach Zugabe des Plasmids zur Zellsuspension (50 ng) erfolgte die Transformation mittels Hitzeschock (45 s bei 42 °C). Die Zellen wurden nach kurzer Inkubation auf Eis mit 500 µl LB-Medium versetzt und nach Inkubation (1 h bei 37 °C) auf Selektionsmedien mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Kompetente Zellen der verwendeten *Agrobacterium*-Stämme wurden nach der Vorschrift von Shaw (1995) hergestellt und transformiert.

### **2.3.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen**

Die Aufarbeitung von Bakterienkulturen zur Plasmidgewinnung erfolgte – je nach der Menge an benötigter DNA – aus Flüssigkulturen (100 oder 500 ml LB-Medium) mittels kommerzieller Kits (Plasmid Mini oder Maxi Kit, Qiagen, Venlo, Niederlande) nach Angaben des Herstellers.

### **2.3.3. Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzenmaterial**

In einem Schraubdeckelgefäß mit Keramikkügelchen (ERMIL, Durchmesser: 1,6mm) wurden 100- 200 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit Hilfe einer Kugelmühle(Precellys24, Peqlab, Erlangen, Deutschland) fein gemörsert. Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte anschließend nach dem Protokoll „*Quick DNA prep for PCR*“ von Weigel und Glazebrook (2002).

### **2.3.4. Extraktion von RNA aus Pflanzenmaterial**

RNA wurde nach der von Weigel und Glazebrook (2002) beschriebenen Methode aus fein gemahlenem Pflanzengewebe (siehe Kapitel 2.2.3) gewonnen. Die Aufarbeitung der Proben (100 mg) erfolgte mit Hilfe von käuflichem Trizol-Reagenz (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Angaben des Herstellers. Die erhaltene RNA wurde in destilliertem Wasser gelöst und über die Absorption der Probe bei 260 nm mit Hilfe eines Photometers quantifiziert.

### **2.3.5. Reverse Transkription**

Die Umwandlung der RNA in komplementäre DNA erfolgte unter Verwendung des Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kits (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Angaben des Herstellers. Für die Reaktionen wurden 5 µg Gesamt-RNA verwendet, die zuvor durch Verdau mit DNase I (RNA-free DNase Set von Qiagen, Venlo, Niederlande) von verbliebener genomischer DNA befreit wurden.

### **2.3.6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) nach Sambrook et al. (1989) unter Verwendung der Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) genutzt. Das Thermocycling nach dem Touchdown-Verfahren wurde nach Angaben des Polymerase-Anbieters durchgeführt und umfasste einen initialen Denaturierungsschritt (98 °C, 30 s), eine Amplifizierungsphase mit schrittweise reduzierter Annealingtemperatur (10 Zyklen bestehend aus Denaturierung (98 °C, 10 s), Annealing (63 – 53 °C, 10 s) und Elongation (72 °C, 30 s für ein Fragment mit einer Größe von 1 kb)), eine Amplifizierungsphase mit konstanter Annealingtemperatur (35 Zyklen bestehend aus Denaturierung (98 °C, 10 s), Annealing (53 °C, 10 s) und Elongation (72 °C, 30 s für ein Fragment mit einer Größe von 1 kb)) und eine finale

Elongation (72 °C, 5 – 10 min). Die Aufreinigung der DNA-Fragmente für Klonierungsreaktionen (Kapitel 2.3.7) erfolgte über Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.3.10) und nachfolgende Extraktion der DNA-Banden mittels des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Venlo, Niederlande).

### 2.3.7. Klonierungen

Alle Klonierungen wurden mit Hilfe des Gateway™-Klonierungssystems (Invitrogen, Carlsbad, USA) durchgeführt. Die codierenden DNA-Sequenzen von *MVQ4 (VQ19)*, *MVQ5 (VQ11)*, *MVQ6 (VQ31)*, *MVQ8 (VQ6)*, *MVQ9 (VQ14/IKU1)*, *MVQ10 (VQ9)*, *VQ8*, *VQ10*, *VQ12*, *VQ16 (SIB2)*, *VQ20*, *VQ21 (MKS1)*, *VQ23 (SIB1)*, *VQ24*, *VQ27*, *VQ28*, *VQ29*, *VQ30* und *VQ34* wurden durch das *Arabidopsis biological resource centre* (<https://abrc.osu.edu/>) als *pENTR*-Klone (*pENTR223.1-sfi-ORF* oder *pENTR™/SD/D-TOPO®*) zur Verfügung gestellt. Die codierenden Gensequenzen der übrigen VQs wurden über PCR (Kapitel 2.3.6) mit Hilfe genspezifischer Primer (Tabelle A1 im Anhang) aus cDNA (Kapitel 2.3.5) amplifiziert und nach Herstellerangaben in die Vektoren *pENTR™/SD/D-TOPO®* oder *pDONR221* (Invitrogen, Carlsbad, USA) kloniert. Mit Ausnahme von *MVQ3* enthielten alle Klone ein Stopcodon zur anschließenden Generierung N-terminaler Fusionskonstrukte. *MVQ3* wurde ohne Stopcodon kloniert, um im Anschluss C-terminale Fusionskonstrukte zu erzeugen, da Versuche zur Expression von mit einem N-terminalen Hexahistidin-Tag markiertem *MVQ3* vermuten ließen, dass dieser im Zuge einer posttranslationalen Modifizierung entfernt wird. Die Mutante *MVQ1mutP1* wurde - mit den entsprechenden mit dem Gateway-Klonierungssystemkompatiblen *attB*-Sequenzen versehen - von der Firma Life Technologies (Carlsbad, USA) synthetisiert (Sequenz A1 im Anhang) und nach Herstellerangaben in den Vektor *pDONR221* (Invitrogen, Carlsbad, USA) kloniert. Die codierenden DNA-Sequenzen der WRKYs wurden freundlicher Weise von Dr. Imre Somssich (Max Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung, Köln, Deutschland) in Form von Gateway-kompatiblen *pENTR*-Plasmiden zur Verfügung gestellt.

Für die Subklonierung des genetischen Materials (VQ-, MAPK-, und Transkriptionsfaktor-Gene) in entsprechende Expressionsplasmide (*pDEST22/32* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), *pUGW14/15* (Nakagawa et al. 2007) oder *pDEST-N110* (Dyson et al. 2004)) wurde der Gateway LR Clonase Enzyme Mix nach Angaben des Herstellers (Thermo Fisher Scientific) verwendet.

### 2.3.8. Mutagenesereaktionen

Die Mutanten *MVQ1-10<sub>DL</sub>*, und *MVQ1mutP2* wurden entweder unter Verwendung des QuikChange II XL site directed mutagenesis-Kits (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) nach Herstellerangaben oder durch die von Palm-Forster et al. (2012) beschriebene, auf TypII-Restriktionsenzymen basierende Mutagenesereaktion generiert. Die verwendeten Primer sind in Tabelle A2 (Anhang) aufgeführt. Für die Amplifizierung wurden die *pENTR*-Plasmide mit den entsprechenden Wildtypsequenzen eingesetzt.

### 2.3.9. Generierung der Alaninaustausch-Varianten, VQ-Chimären und MVQ8-Varianten

Zur Generierung der VQ-Chimären (*MVQ1/VQ8* und *MVQ8/VQ1* (Abb. 3-7)), der Alaninaustausch-Varianten (Abb. 3-8) und der MVQ8-Varianten (*MVQ8-1* – *MVQ8-8* (Abb. 3-9)) wurden die entsprechenden Entry-Plasmide von *MVQ1* bzw. *MVQ8* mit den in Tabelle A3 angegebenen Oligonukleotiden mittels PCR (Kapitel 2.3.6) amplifiziert und anschließend ligiert (*Blunt end*-Ligation nach Herstellerangaben (T4-Ligase, Velos, Thermo Scientific)), um das jeweilige VQ-Motiv durch eine Sequenz aus Restriktionsschnittstellen (NdeI-Schnittstelle flankiert von zwei BsaI-Spaltstellen) zu ersetzen. Ausgehend von den erhaltenen Konstrukten (*pDONR221-MVQ1ΔVQ* und *pENTR/SD/D/TOPO-MVQ8ΔVQ*) wurde das gewünschte chimäre VQ-Motiv durch Ersatz der eingeführten *cloning site* gegen eine doppelsträngige Oligonukleotidsequenz (hergestellt durch Hybridisierung von Primern (Tabellen A4 - A6) mittels Erhitzen auf 95 °C und langsames Abkühlen) rekonstituiert. Der Austausch erfolgte mit Hilfe einer GoldenGate-basierten Methode (Engler et al. 2008)) mit nachfolgender Selektion durch Nde-Restriktionsverdau (Kapitel 2.3.10).

### 2.3.10. Restriktionsverdau

Alle Restriktionsreaktionen wurden mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen (Fermentas, Waltham, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt und mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.3.10) analysiert.

### 2.3.11. Elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde eine horizontale Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Hierbei wurden die Proben mit DNA-

Probenpuffer (1mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA), 3% (v/v) Glycerol, 0,01% (w/v) Bromphenolblau) versetzt und in einem Agarosegel (1 % (w/v) Sea Kem LE Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland) in TAE-Puffer (40 mM Tris/Essigsäure, 2mM EDTA, pH8,5)) bei 1 - 10 V cm<sup>-1</sup> aufgetrennt. Die Visualisierung der Fragmente erfolgte mit Hilfe eines Transilluminators (UVT 2020, Herolab, Wiesloch, Deutschland) oder der Geldokumentationsanlage Gene Genius (Syngene, Cambridge, Vereinigtes Königreich) nach Inkubation der Gele in 0,5 µgml<sup>-1</sup> Ethidiumbromid-Lösung.

### **2.3.12. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte nach Auftrennung im Agarosegel (Kapitel 2.3.10) mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande) nach Herstellerangaben.

### **2.3.13. DNA-Sequenzierungen**

Sämtliche Sequenzierungen wurden durch die Firmen LGC Genomics (Berlin, Deutschland) oder Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt.

### **2.3.14. *Agrobacterium*-vermittelte Transformation von *Arabidopsis thaliana***

Zur Herstellung stabiler *Arabidopsis*-Transformanten wurde die Tauch-Methode (Logemann et al. 2006) an blühenden Pflanzen angewandt. Selektion auf transformierte Pflanzen erfolgte etwa zwei Wochen nach Aussaat der erhaltenen transgenen Samen durch mehrmaliges Sprühen mit käuflicher Basta-Herbizidlösung (Bayer, Deutschland) mit einer Endkonzentration von 0.02 % (w/v) Ammoniumglufosinat.

### **2.3.15. Northern Blot-Analysen**

Vor der experimentellen Verwendung wurde das Transkriptlevel der verwendeten *mvq1*-Pflanzen bzw. der *MVQ1*-Überexpressionslinien durch Northern Blot-Analysen verifiziert. Da sich das endogene *MVQ1*-Transkript bereits im Wildtyp Col-0 schwer detektieren ließ wurden die verwendeten Blätter der 2 bis 3 Wochen alten Pflanzen für 3 Stunden mit 100µM Cycloheximid (CHX) inkubiert, um eine Akkumulation des Transkripts durch Translationsinhibierung zu bewirken. Zur Northern Blot-Analyse wurden 15 - 20 µg RNA (Kapitel 2.3.4) in einem denaturierenden Agarosegel (1 % (w/v) Agarose in 20 mM Morpholinopropan-sulfonsäure/NaOH, 5 mM Natriumacetat,

1 mM EDTA, 1,85 % (w/v) Formaldehyd, pH 7,0) aufgetrennt. Der Transfer der RNA aus dem Agarosegel auf eine Nylonmembran (Roche, Basel, Schweiz) erfolgte über einen Diffusionsblot mit 20 x SSC (3M NaCl, 0,33 M Trinatriumcitrat, pH 7,0). Nach der Fixierung der RNA durch die Einwirkung von UV-Licht erfolgte die Vorhybridisierung der Membran im Hybridisierungspuffer (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,9 M NaCl, 5 mM EDTA, 50% (v/v) Formamid, 0,1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS), 0,2 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon-40, 0,2 % (w/v) Ficoll-400, 0,2 % (w/v) Rinderserumalbumin, 100 µg ml<sup>-1</sup> hitzedenaturierte Lachssperma-DNA, pH 7,2) durch Inkubation für 2 Stunden bei 42°C. Nach Zugabe der radioaktiv markierten Sonde, die zuvor mit Hilfe des Random Priming Kits (GE Healthcare, Chicago, USA) unter Verwendung der ebenfalls zur Klonierung verwendeten Primer (MVQ1, Tabelle A1 im Anhang) hergestellt wurden, erfolgte die Hybridisierung durch weitere Inkubation (16 h) bei der oben angegebenen Temperatur. Die Nylonmembran wurde anschließend jedreimal mit 1 x SSC und 1% (w/v) SDS gewaschen. Die Visualisierung des Autoradiogramms (Anregung bei 532 nm, Emission bei 580 nm, Spannung des Photomultipliers: 400–500 V) erfolgte mit Hilfe eines Phosphoimagers (Typhoon TM9400, GE Healthcare, München, Deutschland).

### **2.3.16. Y2H-Analyse**

Die Interaktionen der VQs mit MAPKs und den Transkriptionsfaktoren wurden mit Hilfe des Gal-4 Reporter-based ProQuest™ Two-hybrid-Systems (Invitrogen, Carlsbad, USA) detektiert. Die Transformation der Expressionsplasmide in den Hefestamm PJ69-4α (James et al. 1996) erfolgte in 96 well-Mikrotiterplatten. Pro Transformation wurden 20 µl Hefesuspension mit 0,4 µg der jeweiligen Plasmide und 20 µg einzelsträngiger DNA aus Lachssperma (Sigma-Aldrich, St. Lois, USA) gemischt. Die Transformation erfolgte nach einer Adaption der Methode des Hoskins/Hahn-Labors („*High efficiency yeast transformation*“, [http://labs.fhcrc.org/hahn/Methods/genetic\\_meth/dmso\\_yeast\\_transform.html](http://labs.fhcrc.org/hahn/Methods/genetic_meth/dmso_yeast_transform.html)).

Die Selektion positiver Transformanten erfolgte auf SD-Festmedium (Clontech, Mountain View, USA) ohne Zusatz der Aminosäuren Leucin und Tryptophan (SD-LW). Positive Kolonien wurden in 150 µl SD-LW-Flüssigmedium überführt. Nach Kultivierung für 16 Stunden bei 28°C erfolgte die Analyse der Interaktionen auf SD-LWAH-Platten (SD-Festmedium ohne Zusatz von, Leucin, Tryptophan, Adenin und Histidin). Bei beobachteter Autoaktivierung der Reportergene wurde die Stringenz

durch Zugabe von 3-Amino-1,2,4-triazol (Konzentration in den jeweiligen Abbildungen in Kapitel 3 spezifiziert) erhöht.

## **2.4. Proteinchemische Methoden**

### **2.4.1. Herstellung rekombinanter Proteine**

Für die rekombinante Überexpression der VQ-Gene im Plasmid *pDEST-N110* in KRX-Zellen (Promega, Fitchburg, USA) wurde Terrific Broth-Medium (12 g l<sup>-1</sup> Trypton, 24 g l<sup>-1</sup> Hefeextrakt, 0,4 % (v/v) Glycerol, 17 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 72 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) mit entsprechendem Antibiotikum verwendet. Die Zellen wurden bei 37°C unter Schütteln (140rpm) angezogen, bis eine optische Dichte von OD<sub>600 nm</sub> = 2.0 erreicht war. Nach Induktion mit 0,1% (w/v) L-Rhamnose erfolgte die Expression für 16 Stunden bei 20°C. Die Expression der Vektoren pGEX4T-1-MPK3 und -MPK6 (Feilner et al. 2005) in *E. coli* BL21 und von pDEST-N110-MKK5-DD (Lee et al. 2004) in *E. coli* BL21(DE3) erfolgte analog in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum und unter Verwendung von 1 mM IPTG als Induktor.

### **2.4.2. Proteinreinigung**

Zur denaturierenden Reinigung der mit einem Hexahistidin-Tag fusionierten VQs wurden die Zellen nach Expression (Kapitel 2.4.1) zentrifugiert (5000 x g, 15 min) und das Pellet in denaturierendem Lysispuffer (100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/HCl, 10 mM Tris/HCl, 6 M Guanidinhydrochlorid, pH 8,0) aufgenommen. Nach Inkubation zum Aufschluss der Zellen (30min bei 25°C) erfolgte die Reinigung unter Verwendung von Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Venlo, Niederlande) nach einem abgewandeltem Protokoll von Feilner et al. (2005). Hierbei wurden die an das Affinitätsmaterial gekoppelten Proteine nach der Rückfaltung in nativem Puffer (10mM Tris/HCl, 1x Protease-Inhibitor-Mix HP, pH 7,5) entweder direkt für anschließende *in vitro* Kinasereaktionen (Kapitel 2.4.5) verwendet oder bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Eine Abschätzung der Menge an gebundenem Protein erfolgte mittels SDS-PAGE mit nachfolgender Silberfärbung (Kapitel 2.4.3).

Die Reinigung der konstitutiv aktiven Kinase MKK5-DD (mit Hexahistidin-Tag versehenes Fusionsprotein, Lee et al. 2004) erfolgte in nativem Zustand über Ni-NTA-Agarose nach Angaben des Herstellers. Das Protein wurde mit 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/HCl, 250 mM Imidazol, 1x Protease Inhibitor Mix HP, pH 8,0 eluiert.

Die mit Glutathion-S-Transferase fusionierten Proteine MPK3 und MPK6 wurden ebenfalls nativ durch Bindung an Glutathion-Sepharose (4 Fast Flow, GE Healthcare, Chicago, USA) und Elution mit 50 mM Tris/HCl, 10 mM L-Glutathion, 1x Protease Inhibitor Mix HP, pH 8,0 gereinigt. Die Konzentration der in löslicher Form gereinigten Enzyme wurde mit Bradford-Reagenz (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) bestimmt.

#### **2.4.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

In Vorbereitung der Elektrophorese wurden die Proteinproben (lösliche Proteine oder an Ni-NTA immobilisierte Proteine) durch Erhitzen (95 °C, 4 min) in SDS-Probenpuffer (50 mM Tris/HCl, 10 % (v/v) Glycerol, 2 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 200 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 6,8) solubilisiert. Die Auftrennung der Proben mittels SDS-PAGE (Lämmli 1970) erfolgte in Gelen mit 10 – 15 % (w/v) Acrylamid-Gehalt. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte entweder durch Färbung mit Coomassie-Brilliantblau (Protokoll unter [http://www.biotech.cornell.edu/sites/default/files/uploads/Documents/Proteomics\\_protocols/Protocol%2005\\_Coomassie.pdf](http://www.biotech.cornell.edu/sites/default/files/uploads/Documents/Proteomics_protocols/Protocol%2005_Coomassie.pdf)) oder durch Silberfärbung (Blum et al. 1987).

#### **2.4.4. Western Blot-Analysen**

Zum Transfer der Proteine aus SDS-PAGE-Gelen (Kapitel 2.4.3) auf eine Nitrocellulose-Membran (Porablot-NCL, Machery-Nagel, Düren, Deutschland) wurde das *semi-dry*-Verfahren angewandt. Nach Blockierung der Membran in TBST-Puffer (20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20, 5 % (w/v) Magermilchpulver, pH 7,2) wurde diese anschließend zur Bindung des Primärantikörpers (anti-Hämagglutinin (HA) Klon 16B12 (Covance, Princeton, USA) oder anti-c-myc Klon 9E10 (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)), der in einer Verdünnung von 1:1000 (anti-HA) oder 1:5000 (anti-c-myc) in TBST-Puffer eingesetzt wurde, für 16 h inkubiert. Nach Inkubation mit dem sekundären Antikörper (anti-Maus-IgG-Konjugat mit Meerrettich-Peroxidase in einer Verdünnung von 1:10000, Sigma, St. Louis, USA) wurde dreifach mit TBST gewaschen. Die Entwicklung des Blots erfolgte mit Hilfe des Chemolumineszenz-Kits von Amersham Biosciences (Amersham, Vereinigtes Königreich).

#### **2.4.5. *In vitro* Phosphorylierungsassay**

Die an Ni-NTA rückgefalteten Proteine (Kapitel 2.4.2) wurden mit der entsprechenden Kinase (lösliche gereinigte MPK3 oder MPK6) und  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-Adenosin-5'-triphosphat (ATP) entsprechend Feilner et al. (2005) inkubiert. Zugesezte lösliche MKK5-DD diente zur Aktivierung der Kinase-Enzyme und wurde ebenfalls als Negativkontrolle für eine unspezifische Phosphorylierung der Substrate herangezogen. Die Phosphorylierung wurde mittels Färbung mit Pro-Q Diamond (Invitrogen, Carlsbad, USA) verifiziert. Die Visualisierung der Phosphoprotein-Banden über ein Autoradiogramm erfolgte wie in Kapitel 2.3.14 beschrieben.

#### **2.4.6. Identifizierung der Phosphorylierungsstellen mittels Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS)**

Zur Bestimmung der Phosphorylierungsstellen innerhalb der VQ-Proteine wurden *in vitro* Kinasereaktionen (Kapitel 2.4.5) mit nicht radioaktivem ATP durchgeführt und die Proben per SDS-PAGE mit nachfolgender Coomassie-Färbung (Kapitel 2.4.3) aufgetrennt. Die dem Gel entnommenen VQ-Proteinbanden wurden durch Behandlung mit 30 % (v/v) Acetonitril in Bicarbonat-Puffer (100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) entfärbt. Nach Äquilibrierung in Wasser wurden die Proteine reduziert (Inkubation der Gelstreifen (50 °C, 30 min) in 10 mM Dithiothreitol in Bicarbonat-Puffer) und nach Waschen in Wasser für 15 min im Dunkeln mit Alkylierungsreagenz (54 mM Jodacetamid in Bicarbonat-Puffer) behandelt. Nach wiederholtem Waschen mit 30 % (v/v) Acetonitril in Bicarbonat-Puffer wurden die Gelstücke mittels Vakuumzentrifugation getrocknet.

Die proteolytische Spaltung der Proteine erfolgte durch Inkubation (37 °C, 15 h) mit Trypsin (3 ng  $\mu$ l<sup>-1</sup> in 5 % (v/v) Acetonitril, 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>). Die mit Extraktionslösung (0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure in 35 % (v/v) Acetonitril) aus dem Gel eluierten Peptide wurden nach Entfernung des Lösungsmittels durch Vakuumzentrifugation in 25  $\mu$ l 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure gelöst. Die Proben wurden mittels Chromatographie an einem Easy-nLC II-System der Firma Thermo Scientific (Bremen, Deutschland) aufgetrennt, das mit einer *reversed phase*-Säule (Easy column, 10 cm, ID 75  $\mu$  m, 3  $\mu$  m C18) ausgestattet war. Die Trennung erfolgte über einen linearen Gradienten (2 – 40 % B innerhalb von 30 min, A: 0,1 % Ameisensäure in Wasser, B: 0,1 % 0,1 % Ameisensäure in Acetonitril) bei einer Flußrate von 300 nl min<sup>-1</sup>. Die Elutionsfraktionen wurden mit Hilfe eines Hybrid-FT-Massenspektrometers (LTQ Orbitrap Velos, Thermo

Scientific) analysiert (Spannung der Ionenquelle (Nanospray Flex, Thermo Scientific): +1.90 kV, Kapillartemperatur: 275 °C). Die Analyse im selektierten Bereich (m/z 400 – 1850, Auflösung: 30000) erfolgte unter Ausschluss einfach geladener Ionen. Eine anschließende kollisionsinduzierte Fragmentierung der Ionen erfolgte in einer linearen Ionenfalle (m/z 50–2000, normale Scangeschwindigkeit). Phosphopeptide mit niedrigem oder sehr hohem Score wurden durch zusätzliche gezielte LC-MS-Experimente identifiziert, bei denen eine Fragmentierung mittels Tandem-Massenspektrometrie erzielt wurde.

Die erhaltenen Daten wurden mit der Proteome Discoverer Software (V1.3, Thermo Fisher Scientific) ausgewertet und mit Hilfe von Mascot (V2.3.02, Matrix Science, London, Vereinigtes Königreich) mit der *Arabidopsis thaliana*-Proteindatenbank TAIR 10 ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) abgeglichen. Die Toleranzbereiche für MS und MS/MS betragen dabei 10 ppm und 0.8 Da. Das Vorhandensein von oxidierten Methionin-, alkylierten Cystein- und phosphorylierten Serin- und Threoninresten wurden als mögliche Aminosäuremodifikationen in die Analyse einbezogen. Eine weiterführende Datenanalyse erfolgte mittels der Scaffold Q+ und Scaffold PTM Software (V3.4.9 und V1.1.3, Proteome Software Inc., Portland, USA).

## **2.5. Protoplasten-Experimente**

### **2.5.1. Isolierung und Transformation von Mesophyllprotoplasten aus *Arabidopsis thaliana***

Die Isolierung und Transformation von Mesophyllprotoplasten erfolgte in Anlehnung zum Protokoll von Yoo et al. (2007). Blätter von je 3 bis 4 Pflanzen (5 bis 6 Wochen alt) wurden mit einem Skalpell in 1 bis 2mm breite Streifen geschnitten. Die Blattstreifen wurden anschließend für 2,5 Stunden in 20 ml Enzymlösung (20mM MES/KOH, 0,4M Mannitol; 20mM KCl; 1,5% (w/v) Cellulase R10, 0,4% (w/v) Mazerozym R10, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1% (w/v) Rinderserumalbumin, pH 5,7) bei 25°C im Dunkeln inkubiert. Durch sanftes Schütteln wurden die Protoplasten in die Enzymlösung entlassen. Das verbleibende Blattmaterial wurden durch ein Nygonsieb (Maschenweite 75 µM) abgetrennt und die Protoplasten durch Zentrifugation (200 x g, 1min) geerntet. Während der folgenden Schritte wurden die Protoplasten auf Eis gehalten. Nach zweimaligem Waschen der Protoplasten mit je 2ml Waschlösung (2mM MES/KOH, 154mM NaCl, 125mM CaCl<sub>2</sub>, 5mM KCl, pH 5,7) wurden die Protoplasten in 4 mM MES/KOH, 0,4M Mannitol, 15mM MgCl<sub>2</sub>, pH 5,7 aufgenommen

(Endkonzentration:  $2 \cdot 10^4$  Protoplasten  $\text{ml}^{-1}$ ). Zur Transformation wurden 100  $\mu\text{l}$  Protoplastensuspension vorsichtig mit 10  $\mu\text{l}$  Plasmidlösung ( $1\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ ) gemischt. Bei einer Kotransformation wurden je 5  $\mu\text{g}$  der Plasmide verwendet. Zur Suspension wurden anschließend 110  $\mu\text{l}$  Polyethylenglycol (PEG)-Lösung (0,2 M Mannitol, 0,1 M  $\text{CaCl}_2$ , 30 % (w/v) PEG4000) gegeben und nach vorsichtigem Mischen für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Protoplasten in 100  $\mu\text{l}$  4 mM MES, 0,5M Mannitol, 20 mM KCl, pH 5,7 resuspendiert. Nach einer Expressionsphase (16h Inkubation bei Raumtemperatur) konnten die Protoplasten für Promotoraktivitätstests (Kapitel 2.5.3) oder für Phosphorylierungsexperimente (Kapitel 2.5.2) genutzt werden.

### **2.5.2. Protoplastenbasierte Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungs-Assays**

Zur Detektion einer *in vivo* Phosphorylierung der VQ-Proteine wurde eine Protoplastensuspension (100  $\mu\text{l}$ ) mit den entsprechenden Expressionsvektoren transformiert (Kapitel 2.5.1) und nach Inkubation durch Zentrifugation geerntet. Der Aufschluss der Zellen für die SDS-PAGE und nachfolgendes Western Blotting (Kapitel 2.4.4) erfolgte durch Erhitzen in SDS-Probenpuffer (Kapitel 2.4.3).

Zur Dephosphorylierung der Proteine wurde das Zellpellet mit je 25  $\mu\text{l}$  Kinase-Extraktionspuffer (25 mM Tris/HCl, 75 mM NaCl, 15 mM Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraessigsäure, 15 mM  $\beta$ -Glycerophosphat, 15 mM 4-Nitrophenylphosphat, 1 mM Dithiothreitol, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,5 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 5 mM NaF, 0,5 mM P, 10  $\mu\text{g } \text{ml}^{-1}$  Leupeptin, 10  $\mu\text{g } \text{ml}^{-1}$  Aprotinin, 0,1% (v/v) Tween 20, pH 7.8) extrahiert und 2,5  $\mu\text{l}$  10 x Phosphatasepuffer (Thermo Scientific, Waltham, USA), 2,5  $\mu\text{l}$  100 x Protease-Inhibitor-Mix (Serva, Heidelberg, Deutschland) und 5  $\mu\text{l}$  alkalische Phosphatase (Fast alkaline phosphatase, Thermo Scientific, Waltham, USA) oder Wasser (Kontrollreaktion) zugesetzt. Nach Inkubation (37 °C, 60 min) wurden die Proben wie oben beschrieben für die Verwendung in der Western Blot-Analyse aufbereitet.

### 2.5.3. Promoteraktivitätstests

Für die Durchführung der Promoteraktivitätstests wurden die VQ-Gene entweder in die Gateway-Vektoren *pUGW14* (MVQ3-Gen) oder *pUGW15* (alle anderen VQ-Gene und deren Varianten) subkloniert (Kapitel 2.2.7) und in Mesophyllprotoplasten (Kapitel 2.5) als am N- (*pUGW15*-Konstrukte) oder C-Terminus (*pUGW14*-MVQ3) mit einer HA-Sequenz versehene Proteine exprimiert. Die Plasmide wurden dazu mit einem *pNHL10-Luc*-Reporterkonstrukt (zur Expression von Luziferase unter der Kontrolle des *NHL10*-Promoters), einem *p35S-VQ*-Konstrukt (zur Überexpression der VQ-Proteine und deren Varianten unter der Kontrolle des 35S-Promoters) sowie mit einem *pUBQ10-GUS*-Konstrukt (zur Expression von  $\beta$ -Glucuronidase unter der Kontrolle des Ubiquitin 10 (UBQ10)-Promoters) kotransformiert. 16 Stunden nach Transformation wurden die Protoplasten mit 100nM Flg22 oder 100nM Eif18 bzw. mit destilliertem Wasser als Kontrolle elicitiert und die Promotoraktivität nach der Methode von Ranf et al. (2011) detektiert. Die Expression der VQ-Proteine in den verwendeten Protoplasten wurde mittels Western Blot (Kapitel 2.4.4) unter Nutzung eines anti-HA-Antikörpers kontrolliert.

### 2.6. Pathogenexperimente mit *Pseudomonas syringae*

Zur Untersuchung der PAMP-induzierten Immunabwehr wurden *Arabidopsis thaliana*-Blätter von 5 bis 6 Wochen alten Pflanzen mit 1 $\mu$ M Flg22 oder als Kontrolle mit destilliertem Wasser infiltriert. Die Infiltration erfolgte mit Hilfe einer Spritze über die Stomata an der Blattunterseite. Nach 24 Stunden wurden diese Blätter mit *Pseudomonas syringae* Pst-DC3000 (Suspension in 10 mM MgCl<sub>2</sub>, welche eine Zelldichte von 10<sup>5</sup> colony forming units (cfu) ml<sup>-1</sup> aufwies) infiltriert. Zur Ermittlung des bakteriellen Wachstums wurden Blattscheiben, welche nach 0 und 2 Tagen aus den infizierten Blättern entnommen wurden, in 10mM MgCl<sub>2</sub> homogenisiert und Verdünnungsreihen dieser Homogenisate auf LB-Festmedium (mit 80 $\mu$ gml<sup>-1</sup> Rifampicin und 20 $\mu$ gml<sup>-1</sup> CHX versetzt) ausplattiert. Aus der ausgezählten Bakterienanzahl, dem Verdünnungsfaktor und der Größe der Blattscheiben wurden die Anzahl an teilungsfähigen Bakterienzellen im Blattmaterial (angegeben in cfu cm<sup>2</sup>) ermittelt. Für die statistische Analyse (Student's *t*-Test) wurden Messwerte aus zwei unabhängigen Experimenten genutzt.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. VQs als potentielle Substrate Flg22-aktivierter MAPKs

#### 3.1.1. Sequenzanalyse der VQ-Genfamilie in *Arabidopsis thaliana*

Das Genom von *Arabidopsis* codiert für 34 VQs, die sich basierend auf den Homologien ihrer Aminosäuresequenzen in das in Abb. 3-1 dargestellte Cladogramm einordnen lassen. Abgesehen von der dargestellten VQ-Motiv-tragenden Region weisen VQs aus unterschiedlichen Ästen des Stammbaums nur geringe Homologien zueinander auf. Die Sequenzidentitäten (Tabelle 3-1) überschreiten dabei nur selten einen Wert von 25%. Höhere Identitäten die diesen Schwellenwert überschreiten sind nach ansteigenden Werten farbvertieft (hellblau > dunkelblau > grau > schwarz) hervorgehoben. Gruppen derartig hoher Sequenzidentitäten finden sich bis auf wenige Ausnahmen (VQ4/VQ1, VQ4/VQ10, VQ13/VQ1, VQ13/VQ10, VQ19/VQ10, sowie VQ11/VQ1) entlang der 100%-Diagonalen (Tabelle 3-1). Anhand dieser separierten Bereiche wurden die VQs in die Gruppen I - X untergliedert.

Die Länge der VQ-Sequenzen variiert zwischen 98 und 412 Aminosäuren, entsprechend einem Molekulargewicht von 10,9 - 46,2 kDa (Tabelle 3-2). Dabei überschreitet die Mehrzahl der Proteine (insgesamt 26 Vertreter) eine Größe von 250 Aminosäuren nicht (Tabelle 3-2). Für einige VQs (VQ2, VQ4, VQ6, VQ14 (IKU1), VQ31 und VQ32) sind in der *Arabidopsis*-Datenbank (*The Arabidopsis Information Resource*, TAIR) mehrere Spleißvarianten annotiert. Während ein alternatives Spleißen keinen Einfluss auf die codierenden DNA-Sequenzen (CDS) der VQs VQ6 und VQ32 hat, führt es bei einigen Transkripten (VQ2, VQ4, VQ14 (IKU1) und VQ31) zu einer Veränderung der resultierenden CDS und im Fall von VQ14 (IKU1) sogar zur Entfernung des VQ-Motivs (Tabelle 3-2).

Abgesehen von den VQs VQ1, VQ17, VQ25 und VQ26 konnten verschiedene putative MAPK-Phosphorylierungsstellen (Sequenzmotiv S/TP) in den Aminosäure-sequenzen der VQs detektiert werden, welche ebenfalls einer Variation durch eventuelle Spleiß-Ereignisse unterliegen. Die Präsenz solcher putativen Phosphorylierungsstellen weist diese VQs als potentielle MAPK-Substrate aus, von denen einige auch eine Rolle in der Flg22-abhängigen Immunantwort spielen könnten. Um innerhalb der VQs neue potentielle Substrate speziell der in der Flg22-induzierten Immunantwort hauptverantwortlichen MAPKs MPK3, MPK4 oder MPK6 zu identifizieren, sollte

zunächst das Interaktionsverhalten mit diesen Enzymen untersucht werden. Einen weiteren wichtigen Aspekt der folgenden Studien stellt die potentielle Phosphorylierbarkeit durch die genannten Flg22-abhängigen MAPKs dar.

Cladogramm	AGI code	Alternative Bezeichnungen	Aminosäuresequenzhomologie der VQ-Region	Gruppe	MVQ
	At1g28280	VQ4	54 PYPTTFVQADTSSFFKQVVQMLTGS AERPKHGSSLK	I	1
	At2g33780	VQ13	33 MYETTFIRTPSSFFKQVVOLLTGIPKNPTHOPDPR		2
	At5g53830	VQ33	46 PYPTTFVQADTSTFKQVVQMLTGSSTDTTTGKHHE		3
	At3g15300	VQ19	34 HYPPTTFVQADSSFFKQVVQMLTGSSSPRSPDSP--	4	
	At1g80450	VQ11	12 EPNTMFVQADPSNFRNIVOKLTGAPPDISSSSFSA	5	
	At5g08480	VQ31	14 KPVTTFVQDTNTFREIVQRLTGPTENNAATAAPE	6	
	At5g46780	VQ32	43 NPOALVYNINKTDFRSIVQQLTGLGSTSSVNPQ-	7	
	At1g32610	VQ6	25 LPOPOGYSMSNNDFTSIVQQLTSPSRESLPDPLP	8	
	At2g35230	VQ14/IKU1	42 QTQPQVYNISKNDFRSIVQQLTGPSRESLPRPPQ	9	
	At1g78310	VQ9	77 QHQPVYNINKNDFRDVVQKLTGSPAHERISAPPO	10	
	At1g32585	VQ5	36 OPRVQVYIIDKNDKFSLVQQLTSPPOCDRLPONIP	III	
	At1g32585	VQ12	36 RMHPKYYRVEPVNFKELVQRLTGAEDVEQEVHVE	IV	
	At4g37710	VQ29	53 PMHPHYRVPEPVNFKVLVQRLTGAPEHETVQAK--		
	At3g18690	VQ21/MKS1	70 AVSPKVVHATASEFMNVVORLTGISSGVFLESGGG	V	
	At1g68450	VQ8	49 AHSPKVIHTRAEDEFMALVQRLTGLDEIIRNTSES		
	At1g21320	VQ2	65 TVTPRIIHTHPNNFMTLVQRLTGOTSTSTSSSSS		
	At1g21326	VQ3	65 TVSPRIIHTHPNNFMTLVQRLTGKTSTSTSSSYS	VI	
	At3g18360	VQ20	78 THTPRIIHTNPKDFMALVQKLTGMTSHDEDLGGGN		
	At3g56710	VQ23/SIB1	45 ISNPMRVQTCASKFRELVOELTGQDAVDLQPEPI-	VII	
	At2g41180	VQ16/SIB2	42 ISNPMRVETCPKSKFRELVOELTGQDAADLPPSPT-		
	At2g42140	VQ17	38 IFAPEIIKTDVANFREIVQNLTKQDHHHDLPHQ	VIII	
	At3g58000	VQ25	37 IFAPEIIKTDVANFRELVSQSLTGKPDORTSK---		
	At2g44340	VQ18	38 IFAPEVIKTDVKNFRSLVQSLTGKPPAGEAKTGKK		
	At3g60090	VQ26	50 IFAPEIINTDVKNFRTLVSQSLTGKPEITKTGSKKK	IX	
	At1g17147	VQ1	14 FINTQYVQTDARSFKTIQVELTGKNAVADGPYEF		
	At1g78410	VQ10	16 FINTQYVETDARSFKTVQVELTGKNAI VAAGPFDS	X	
	At3g22160	VQ22/JAV1	63 RTPPTLLNTDTSNFRAMVQOYTGGPSAMAFSGSNT		
	At4g15120	VQ27	59 RTPPTLLFNTDANFRAMVQOFTGGPSAVAFSGSSP		
	At4g39720	VQ30	123 RAPTTVLTDTSNFRAMVQOFTGIPAPPLFNNSI	IX	
	At5g65170	VQ34	148 RAPTTVLTDTSNFRAMVQOFTGNPSTPFTGLSSS		
	At4g20000	VQ28	59 AIPPTLLNANPSNFRALVQKFTGRSAGGESNRRKG	X	
	At3g56880	VQ24	119 KSOTTFITADANFROMVQOVTGAKFLGSSNSI--		
	At2g41010	VQ15/CAMP25	112 KSQTFITADPSNFROMVQOVTGAKYIDSSSFGI		
	At1g35830	VQ7	108 RAPTTVLTDTSNFRAMVQOFTGVPASPFSHPFSS		
Hohe bis geringe Homologie			* . ** *		

**Abbildung 3-1: Darstellung der Homologiebeziehungen der 34 VQs von *Arabidopsis thaliana* in Form eines Cladogramms.** Das Cladogramm basiert auf einem Homologievergleich der Gesamtaminosäuresequenzen der VQs. Die Homologie innerhalb der das VQ-Motiv tragenden Region ist ausschnittsweise als „Box Shade“-Darstellung (erstellt mit dem Analyseprogramm T-Coffee) angegeben. Abnehmende Sequenzhomologien werden durch einen Farbcode (rot > gelb > grün) dargestellt. Die hochkonservierten Aminosäuren des VQ-Motivs sind durch Sterne markiert. Desweiteren können die entsprechenden *Arabidopsis genome initiative* (AGI) codes sowie alternative Bezeichnungen der bisher charakterisierten VQs entnommen werden (MKS1: MPK4 SUBSTRATE 1, IKU1: HAIKU1, SIB1 / SIB2: SIGMA FACTOR BINDING PROTEIN 1 / 2, CamBP25: CALMODULIN BINDING PROTEIN 25, JAV1: JASMONATE-ASSOCIATED VQ-MOTIF GENE1). Die Unterteilung der VQs in die Gruppen I - X ist durch Hinterlegung in grau hervorgehoben. Die VQs der Gruppen I und II werden im späteren Verlauf dieser Arbeit auch als MPK3/6-TARGETED VQs(MVQs) (entsprechend MVQ1 bis MVQ10) benannt.



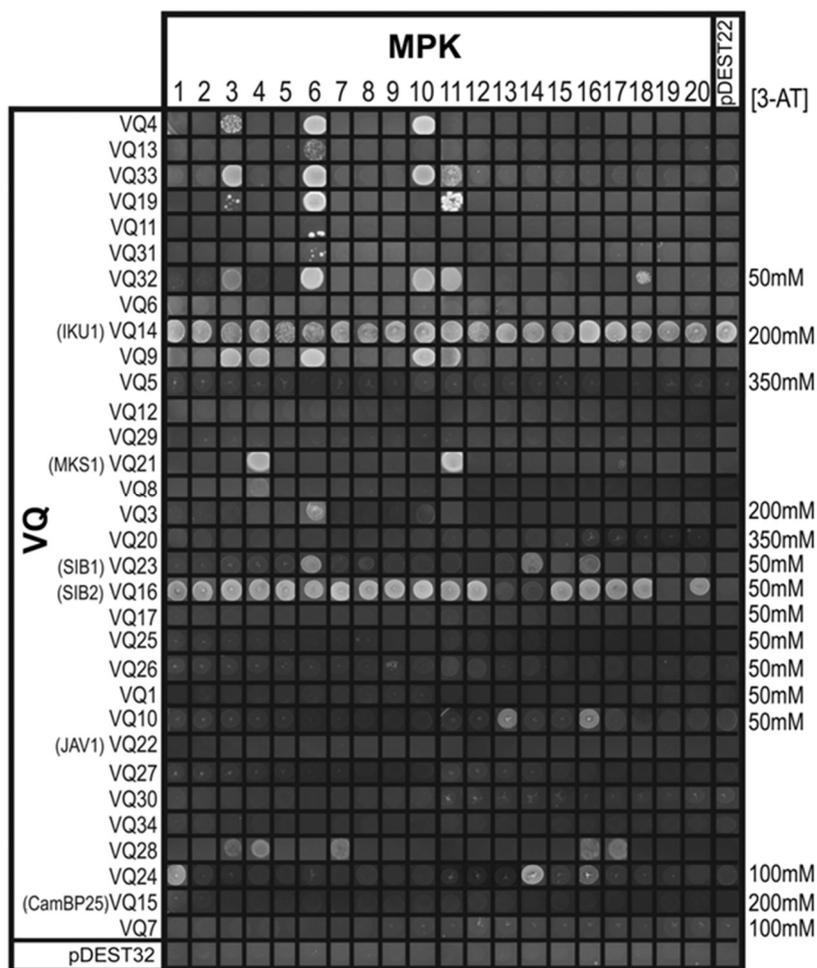
VQs	AGI code	Länge CDS (A.S.)	relatives Molekulargewicht (Da)	Spleiß-Varianten	putative MAPK-PhosSt	MVQ
VQ4	At1g28280	247/243	26862,8/26695,8	2 Varianten	12/12	1
VQ13	At2g33780	204	23114,8		12	2
VQ33	At5g53830	243	26918,8		12	3
VQ19	At3g15300	219	23661,3		14	4
VQ11	At1g80450	177	19925,1		5	5
VQ31	At5g08480	142/173	15838,9/18899,2	2 Varianten	3/6	6
VQ32	At5g46780	237	26110,0	2 Varianten mit identischer CDS	9	7
VQ6	At1g32610	291	32361,2	2 Varianten mit identischer CDS	13	8
VQ14 / IKU1	At2g35230	402/295	44686,0/32694,6	2 Varianten, eine ohne VQ-Motiv	18/15	9
VQ9	At1g78310	311	33576,5		11	10
VQ5	At1g32585	220	25136,4		2	
VQ12	At2g22880	114	12972,6		2	
VQ29	At4g37710	123	13809,3		1	
VQ21 / MKS1	At3g18690	222	23581,4		12	
VQ8	At1g68450	152	16912,0		5	
VQ2	At1g21320	421/253	46158,1/28212,3	2 Varianten, eine ohne VQ-Motiv	7/1	
VQ3	At1g21326	239	26289,0		7	
VQ20	At3g18360	285	31112,2		6	
VQ23 / SIB1	At3g56710	151	16861,6		4	
VQ16 / SIB2	At2g41180	141	15569,4		3	
VQ17	At2g42140	172	19496,7		0	
VQ25	At3g58000	175	19515,6		0	
VQ18	At2g44340	188	20898,8		1	
VQ26	At3g60090	157	17954,0		0	
VQ1	At1g17147	98	10895,1		0	
VQ10	At1g78410	108	11875,3		1	
VQ22 / JAV1	At3g22160	192	20390,0		2	
VQ27	At4g15120	193	20737,1		5	
VQ30	At4g39720	290	31482,9		5	
VQ34	At5g65170	362	39234,5		5	
VQ28	At4g20000	208	23251,9		2	
VQ24	At3g56880	245	25962,4		3	
VQ15 / CAMBP25	At2g41010	238	25376,9		1	
VQ7	At1g35830	302	33214,0		2	

**Tabelle 3-2: Nomenklatur und Auflistung wichtiger Eigenschaften der VQs.** Das relative Molekulargewicht (Mr) in Dalton, die Länge der codierenden DNA-Sequenzen (CDS) und Informationen über verschiedene Spleiß-Varianten wurden der Datenbank TAIR entnommen. Die VQs der Gruppe I und II werden im späteren Verlauf dieser Arbeit auch als MPK3/6-TARGETED VQs(MVQs) von MVQ1-MVQ10 benannt. MAPK-PhosSt: Anzahl putativer MAPK-Phosphorylierungsstellen (Motiv S/TP). (MKS1: MPK4 SUBSTRATE 1, IKU1: HAIKU1, SIB1 / SIB2: SIGMA FACTOR BINDING PROTEIN 1 / 2, CamBP25: CALMODULIN BINDING PROTEIN 25, JAV1: JASMONATE-ASSOCIATED VQ-MOTIF GENE1).

### 3.1.2. Interaktionen der VQs mit MAPK-Enzymen aus *Arabidopsis thaliana*

Eine Y2H-Analyse sollte das Interaktionsverhalten der 34 VQs mit den 20 im Genom von *Arabidopsis thaliana* codierten MAPKs aufklären. Mit Ausnahme von VQ2 und VQ18 konnten die codierenden DNA-Sequenzen aller VQs erfolgreich in den Expressionsvektor pDEST22 kloniert werden. Im Fall von VQ2 und VQ18 blieb die Amplifizierung der codierenden DNA-Sequenzen aus *Arabidopsis*-cDNA erfolglos. Scheinbar werden diese Gene unter den gewählten Bedingungen nicht exprimiert oder es handelt sich möglicherweise um Pseudogene. Im Fall von VQ2, VQ4, VQ14 und VQ31, für die mehrere alternative Spleißvarianten annotiert sind (Tabelle 3-2), wurden jeweils die CDS kloniert, die für das Protein mit der jeweils längeren Sequenz kodiert. Das Ergebnis der Y2H-Analyse ist in Abb. 3-2 dargestellt. Einige VQs sind in der Lage die Expression der Reportergene zu induzieren, obwohl keine Interaktionen und somit keine Rekonstitution des GAL4-Transkriptionsfaktors erfolgt ist. Dieser Prozess wird als Autoaktivierung bezeichnet und kann durch auftretendes Hefewachstum der Kontrolltransformanten (mit je einem der entsprechenden Leer-plasmide transformiert) identifiziert werden. Durch das starke Hintergrundwachstum der Hefezellen können in diesen Fällen keine Rückschlüsse auf mögliche Interaktionen gezogen werden. Die Autoaktivierung der Reportergene lässt sich in den meisten Fällen durch Zugabe des Histidin-Biosyntheseinhibitors 3-Amino-1,2,4-triazol (3AT) unterdrücken. Lediglich im Fall von VQ14 (IKU19) konnte diese Autoaktivierung auch durch erhöhte Zugabe von 3AT nicht verhindert werden (Abb. 3-2), wodurch für dieses VQ-Protein keine Aussage über mögliche Interaktionspartner getroffen werden kann. Während für manche VQs (VQ1, VQ5, VQ6, VQ12, VQ15 (CAMPB25), VQ17, VQ20, VQ25, VQ26, VQ29) – u.a. für die meisten Mitglieder der Gruppe IX (VQ7, VQ22 (JAV1), VQ27, VQ30 und VQ34) – keine Interaktionen mit den MAPKs detektiert werden konnten scheint SIB2 (VQ16) mit fast allen MAPKs interagieren zu können. Die MAPKs MPK3, MPK4, MPK6 und MPK11, die eine Rolle in der Flg22-induzierten Immunantwort spielen sowie MPK10, welche eine hohe Sequenzhomologie zu MPK6 aufweist, interagieren hauptsächlich mit VQs der Gruppe I (VQ4, VQ11, VQ13, VQ19, VQ31, und VQ33) und der Gruppe II (VQ32 und VQ9). Interaktionen mit den Flg22 induzierten MAPKs lassen sich außerhalb der Gruppen I und II nur vereinzelt finden. Hierzu gehört beispielsweise die Interaktion von MKS1 (Gruppe V) mit MPK4, die bereits in der Literatur beschrieben werden konnte. Darüber hinaus konnte in dieser Analyse eine weitere Interaktion von MKS1 mit MPK11 gezeigt werden. VQ8 und VQ3 (Gruppe V) interagieren außerdem

mit MPK4 und MPK6. Neben dem Gruppe V-Mitglied SIB2, dass wie bereits erwähnt mit einer Vielzahl von MAPKs (darunter MPK3, MPK4, MPK6, MPK10 und MPK11)wechselwirkt, interagiert SIB1 mit MPK6. VQ28 (Gruppe IX) interagiert mit MPK3 und MPK4. Zusätzlich zu den Interaktionen mit den durch Flg22 aktivierbaren MAPKs interagieren manche VQs auch mit anderen MAPKs. Neben den bereits erwähnten multiplen Interaktionen von SIB2 mit den MAPKs zählen dazu die Interaktionen von VQ32 mit MPK18, von SIB1 mit MPK14 und



**Abbildung 3-2: Im Y2H detektierte Interaktionen der VQs mit den zwanzig im Genom von *Arabidopsis thaliana* codierten MAPKs.** Die Abbildung zeigt die Interaktionen, die durch das Wachstum der Hefezellen auf dem Interaktions-Selektionsmedium (SD-Medium ohne Zusatz von Leucin, Tryptophan, Histidin und Adenin) detektiert wurden. Eine Vorselektion positiver Kotransformanten wurde auf SD-Medium ohne Leucin und Tryptophan durchgeführt (nicht gezeigt). Die Konzentration des Histidin-Biosyntheseinhibitors 3AT (rechter Rand), die ausreichend war um eine in manchen Fällen zu beobachtende Autoaktivierung zu unterdrücken, ist am rechten Rand angegeben. Mit den Leervektoren pDEST22 und pDEST32 transformierte Zellen dienten als Kontrolle.(MKS1: MPK4 SUBSTRATE 1, IKU1: HAIKU1, SIB1 / SIB2: SIGMA FACTOR BINDING PROTEIN 1 / 2, CamBP25:

CALMODULIN BINDING PROTEIN 25, JAV1: JASMONATE-ASSOCIATED VQ-MOTIF GENE1).

MPK16 sowie die Interaktion von VQ28 mit MPK15 und MPK16. Die beiden VQs VQ10 und VQ24 hingegen interagieren lediglich mit Vertretern außerhalb der Gruppe der Flg22-aktivierbaren MAPKs.

Der Nachweis der Expression der in der Y2H-Analyse verwendeten Konstrukte auf Proteinebene mittels Western Blot (Verwendung eines GAL4-spezifischen Antikörpers) war nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Dies ist vermutlich auf ein geringes Expressionslevel der entsprechenden Gene zurückzuführen.

### **3.1.3. *In vitro* Phosphorylierung der VQs durch MPK3 und MPK6**

Die in Abb. 3-2 dargestellte Y2H-Analyse legt die Vermutung nahe, dass einige der VQs durch die in der Flg22-induzierten Immunantwort involvierten MAPKs MPK3 und MPK6 phosphoryliert werden können. Diese Vermutung sollte in einem anschließenden *in vitro* Phosphorylierungsexperiment untersucht werden. Hierzu wurden die VQ-Proteine rekombinant hergestellt. Anschließend wurden die Proteine unter denaturierenden Bedingungen an eine entsprechende Affinitätsmatrix (Ni<sup>2+</sup>-beladene NTA-Agarose) gebunden, durch Waschen von Fremdproteinen befreit und anschließend durch einen Pufferwechsel (Entfernung des chaotropen Reagenzes) rückgefaltet. Da die VQs in derart immobilisierter Form für nachfolgende Phosphorylierungsexperimente eingesetzt wurden war eine Bestimmung der Proteinkonzentration auf spektroskopischem Wege (d.h. mit Hilfe gängiger Proteinbestimmungsmethoden wie des Bradford- oder Bicinchinonsäure-Assays) nicht möglich. Stattdessen wurde die am Träger befindliche Proteinmenge aus einer separat durchgeführten SDS-PAGE-Analyse mit anschließender Silberfärbung abgeschätzt. Die *in vitro* Phosphorylierung der immobilisierten VQs erfolgte durch Inkubation mit rekombinant hergestellter, gereinigter MPK3 bzw. MPK6, die zuvor durch rekombinant gereinigte MKK5-DD aktiviert worden war. Letztere MAPK-Kinase ist eine Variante der MKK5, die durch den Austausch von zwei phosphorylierbaren Serinresten gegen negativ geladene Asparaginsäuregruppen (sogenannte *phosphoserine mimics*) konstitutiv aktiv ist (Asai et al. 2000). Die Verwendung von radioaktiv markiertem ATP lässt dabei die Visualisierung der Phosphorylierungen durch Aufnahme eines Autoradiogramms zu. In Abb. 3-3A sind die gereinigten VQs und die im Radiogramm

detektierten Phosphorylierungen exemplarisch dargestellt. Da Versuche zur Aktivierung rekombinanter MPK4 durch rekombinante MKK2-DD erfolglos blieben, blieb die Durchführung des *in vitro* Phosphorylierungsassays auf die Nutzung von MPK3 und MPK6 beschränkt. Eine Übersicht der drei mit unabhängigen Proteinpräparationen durchgeführten *in vitro* Phosphorylierungs-Analysen ist in Abb. 3-3B tabellarisch dargestellt. Die farbliche Markierung von rot über orange nach gelb entspricht einem abnehmenden Phosphorylierungsgrad und beruht auf einem visuellen Vergleich der Signalstärken der VQ-Banden in den Autoradiogrammen unter Berücksichtigung etwaiger Abweichungen der verwendeten Proteinmengen.

Die deutlichste Präferenz zur Phosphorylierung durch MPK3 und MPK6 zeigen die VQs der Gruppen I und II. Dies bestätigt die Ergebnisse der vorangegangenen Y2H-Analyse, die diese VQs mit Ausnahme von VQ6 und VQ19 (IKU1) als Interaktoren von MPK3 und / oder MPK6 identifiziert hat. Neben gelegentlich auftretenden starken Phosphorylierungen von VQ3 und VQ8 werden die übrigen VQs entweder sehr schwach oder gar nicht durch MPK3 bzw. MPK6 phosphoryliert.

Auch wenn VQ6 im Y2H-System scheinbar weder mit MPK3 noch mit MPK6 bzw. VQ13, VQ11 und VQ31 nicht mit MPK3 interagieren, kann man anhand der eindeutigen Phosphorylierung dieser VQs durch die entsprechenden MAPK-Enzyme von einer physikalischen Interaktion ausgehen. Dies ist ebenfalls für VQ19 anzunehmen, dessen Interaktionen auf Grund starker Autoaktivierung nicht im Y2H-System analysiert werden konnten. Zusammenfassend konnten unter den 34 analysierten VQs, die im Genom von *Arabidopsis thaliana* codiert werden, die VQs der Gruppe I und II als Interaktoren und *in vitro* Substrate der Kinasen MPK3 und MPK6 identifiziert werden. Die folgenden Untersuchungen sind daher auf diese VQs beschränkt, die im Weiteren als MPK3/6-TARGETED VQs (MVQ) bezeichnet werden. Entsprechend ihrer Reihenfolge im Cladogramm (Abb. 3-1) erhielten sie die Bezeichnungen MVQ1 bis MVQ10 (siehe Tabellen 3-1 und 3-2).



### 3.1.4. Einfluss des VQ-Motivs der MVQs auf die Interaktion mit MAPKs und die Phosphorylierung durch MPK3 und MPK6

Die vorangegangenen Ergebnisse belegen, dass MVQ1 - MVQ10 mit den drei in der Flg22-induzierten Immunantwort involvierten MAPKs interagieren können und *in vitro* Substrate der Enzyme MPK3 und MPK6 darstellen. In weiterführenden Y2H-Analysen und *in vitro* Phosphorylierungsexperimenten sollte untersucht werden, ob das VQ-Motiv für die Interaktion mit diesen MAPKs bzw. für die *in vitro* Phosphorylierung essentiell ist. Hierzu wurden sogenannte MVQ<sub>DL</sub>-Mutanten generiert, bei denen die hochkonservierten, zentralen Aminosäuren des VQ-Motivs Valin und Glutamin zu Aspartat und Leucin mutiert wurden. Diese Auswahl folgte dem Prinzip gegensätzlicher Aminosäurefunktionen. So wurde Valin – eine unpolare aliphatische Aminosäure – durch die saure hydrophile Aminosäure Aspartat ausgetauscht, und umgekehrt wurde die polare Seitenkette in Glutamin durch das unpolare aliphatische Leucin ersetzt. In Abb. 3-4 sind die Ergebnisse der Y2H-Analyse und des *in vitro* Phosphorylierungsexperiments dargestellt.

Der Vergleich der Y2H-Analyse der MVQ<sub>DL</sub>-Varianten (Abb. 3-3A) mit dem Ergebnis der vorangegangenen Analyse für die Wildtyp-VQs (Abb. 3-2) verdeutlicht, dass das VQ-Motiv keinen essentiellen Einfluss auf die Interaktionen mit den im Genom von *Arabidopsis thaliana* codierten MPKs hat. Einige Interaktionen, die für die entsprechenden Wildtyp-Proteine schwach ausgeprägt sind, können für die entsprechenden MVQ<sub>DL</sub>-Varianten nur noch schwer oder nicht detektiert werden (zum Beispiel im Fall von MVQ4, MVQ5 und MVQ6 mit MPK3, MPK6 bzw. MPK11). Jedoch belegt die deutlich erkennbare Phosphorylierung dieser Mutanten im *in vitro* Phosphorylierungsexperiment (Abb. 3-4B) deren physische Interaktion mit MPK3 bzw. MPK6. Der Vergleich der in diesen Radiogrammen dargestellten Signalintensitäten nach Phosphorylierung mit MPK3 bzw. MPK6 bestätigt den geringen Einfluss des VQ-Motivs auf die Interaktion mit diesen MAPKs, da hier keine signifikanten Unterschiede feststellbar sind. Die vergleichsweise geringe Signalintensität im Falle von MPK3 (Abb. 3-4B) weist möglicherweise darauf hin, dass die schwächeren Signale einer geringeren Effizienz der Aktivierung von MPK3 durch die Kinase MKK5-DD oder einer Verwendung einer Charge von  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP mit verminderter Radioaktivität geschuldet sind.



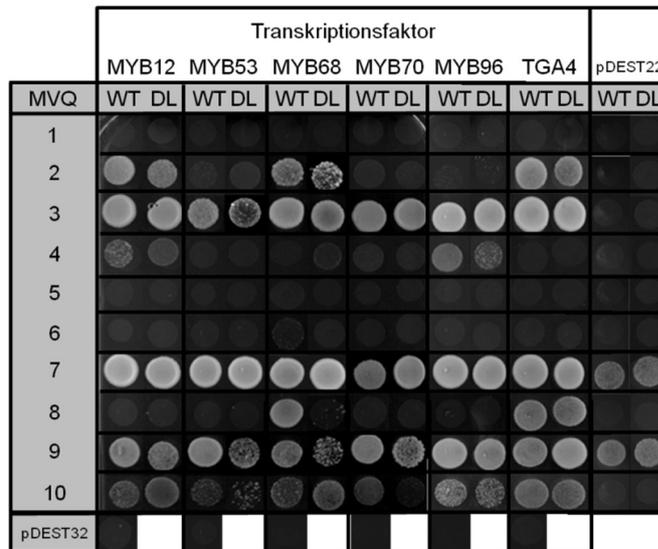
der Bestätigung der Spezifität des Assays. Die Verwendung äquivalenter Proteinmengen wurde durch Silberfärbung bestätigt. Schwarze bzw. weiße Pfeile in den SDS-PAGE-Gelen / Radiogrammen zeigen die Positionen der Proteine / radioaktiven Signale, die den errechneten Molekulargewichten der MVQs entsprechen.

### **3.2. Interaktionen der MVQs mit Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis thaliana***

#### **3.2.1. Interaktion mit WRKY-Proteinen**

Wie in Kapitel 1.5.2 bereits erwähnt wurde verdeutlichte eine wegweisende Y2H-Analyse, dass verschiedene MVQs (MVQ1 (VQ4), MVQ3 (VQ33) und MVQ7 (VQ32)) in der Lage sind mit diversen Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis thaliana* zu interagieren. Darunter finden sich neben Proteinen aus der Klasse der MYB-Faktoren auch eine Vielzahl von WRKYs. Für MKS1 (VQ21) konnte bereits gezeigt werden, dass es seine Funktion zur Regulation der pflanzlichen Immunabwehr durch Interaktion mit WRKY33 ausübt und dass das VQ-Motiv essentiell für diese Interaktion ist (Petersen et al. 2010). Auch für die Funktion anderer VQ-Proteine hat sich eine Interaktion mit WRKY33 als notwendig erwiesen, wie z.B. für SIB1 oder SIB2 (VQ23 bzw. VQ16) (Lai et al. 2011). Als Grundlage weiterer Untersuchungen der durch MPK3 und MPK6 phosphorylierbaren MVQs sollte deren Interaktionsmuster mit den im Genom von *Arabidopsis thaliana* codierten WRKYs aufgedeckt werden. Für die entsprechende Y2H-Analyse wurden 59 der 70 in *Arabidopsis* gefundenen WRKYs freundlicherweise von Dr. Imre Somssich (Max-Planck Institut für Pflanzenzüchtungsforschung, Köln, Deutschland) als mit dem Gateway-Klonierungssystem kompatible *Entry*-Vektoren zur Verfügung gestellt. Als potentielle Interaktionspartner wurden neben den Wildtyp-VQs (MVQ1 - 10) und deren MVQ<sub>DL</sub>-Varianten auch MKS1 (VQ21) und das MKS1-homologe VQ8 untersucht. Die Ergebnisse des Experiments sind in Abb. 3-5 dargestellt. Die WRKYs sind entsprechend ihrer Zugehörigkeit zu den drei WRKY-Hauptgruppen (Kapitel 1.5.3) dargestellt, die sich auf die Anzahl und Struktur der vorhandenen WRKY-Domänen bezieht (Rushton et al. 2010).





**Abbildung 3-6: Interaktionen der MVQs und MVQ<sub>DL</sub>-Varianten mit ausgewählten Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis thaliana*.** Die Abbildung zeigt die Interaktionen, die durch das Wachstum der Hefezellen auf dem Interaktions-Selektionsmedium (SD-Medium ohne Zusatz von Leucin, Tryptophan, Histidin und Adenin) detektiert wurden. Eine Vorselektion positiver Kotransformanten wurde auf SD-Medium ohne Leucin und Tryptophan durchgeführt (nicht gezeigt). Mit den Leervektoren pDEST22 und pDEST32 transformierte Zellen dienten als Kontrolle. (MYB: MYB-TRANSCRIPTION FACTOR, TGA4: TGACG MOTIF-BINDING FACTOR 4)

WRKYs essentiell zu sein. Eine weitere Y2H-Analyse sollte beleuchten, ob das VQ-Motiv spezifisch für VQ- WRKY-Interaktionen ist. Hierzu wurden die Interaktionen von MVQ1 - 10 und deren inaktiven Doppelvarianten mit einer Auswahl weiterer Transkriptionsfaktoren untersucht (Abb. 3-6).

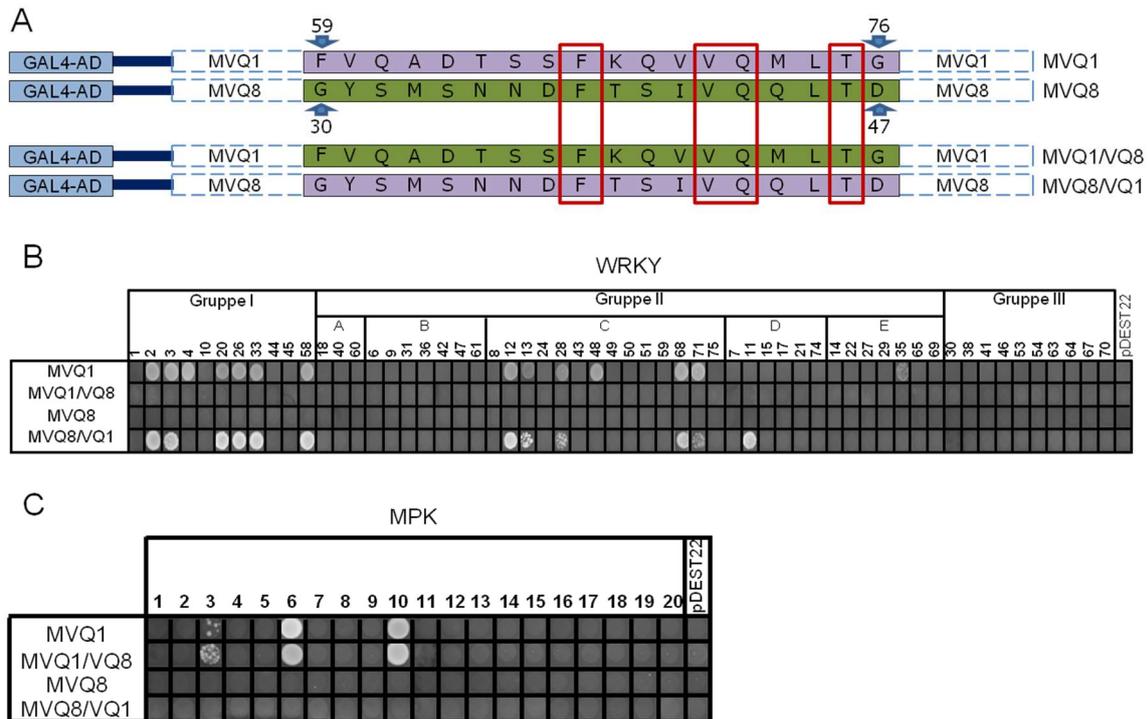
Neben dem Transkriptionsfaktor TGACG MOTIF-BINDING FACTOR 4 (TGA4), einem Mitglied der bZIP-Proteinfamilie (Rhonda et al. 2004) wurden die MYB-Transkriptionsfaktoren MYB12, MYB53, MYB68, MYB70 und MYB96 für die Y2H-Analyse ausgewählt. Es ist zu beachten, dass diese Analyse nicht auf 3AT-haltigen Medien durchgeführt wurden, so dass das Interaktionsverhalten von MVQ7 und MVQ9 nicht beurteilt werden kann (in beiden Fällen ist eine Autoaktivierung der Reportergene zu beobachten). Für die VQs MVQ2, MVQ3, MVQ4, MVQ8 und MVQ10 konnten Interaktionen mit MYBs oder TGA4 nachgewiesen werden. Abgesehen von MVQ8, welches nach der Mutation des VQ-Motivs nur noch schwach mit MYB68 interagiert, scheint die Mutation des VQ-Motivs auf die Interaktion der MVQs mit den MYB-Proteinen oder mit TGA4 keinen Einfluss zu haben. Somit konnte die Vermutung untermauert werden, dass das VQ-Motiv spezifisch in die Interaktion mit WRKY-Faktoren involviert ist.

### **3.2.2. Chimäre VQ-Proteine zur Sondierung des Einflusses des VQ-Motivs auf die Interaktion mit WRKYs - Austausch der VQ-Regionen von MVQ1 und MVQ8**

Wie zuvor gezeigt konnte für MVQ8 im Y2H-System keine Interaktion mit den für die Studie verwendeten WRKYs festgestellt werden. Beim Vergleich des VQ-Motivs bzw. der gesamten das VQ-Motiv tragenden Proteinregion (VQ-Region) von MVQ8 mit den entsprechenden Sequenzabschnitten der übrigen VQs (Abb. 3-1) fällt auf, dass die VQ-Region von MVQ8 abgesehen von den hochkonservierten Aminosäuren des VQ-Motivs nur geringe Homologie zu denen der restlichen VQs aufweist. Ob diese Abweichungen verantwortlich dafür sind, dass MVQ8 nicht mit den WRKYs interagieren kann sollte unter meiner Betreuung von Frau Siska Herklotz im Rahmen einer Bachelorarbeit aufgeklärt werden.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung sollte die VQ-Region von MVQ8, die durch den Sequenzabschnitt G30 - D47 repräsentiert wird, gegen die VQ-Region eines anderen VQs ausgetauscht werden, welches zur Interaktion mit den WRKYs befähigt ist. Hierzu wurde die VQ-Region von MVQ8 gegen die homologe Region von MVQ1, die auf den Sequenzabschnitt F59 - G76 festgelegt wurde (Abb. 3-1), ausgetauscht. Die daraus resultierenden chimären Proteine MVQ1/VQ8 (MVQ1, welches die VQ-Region von MVQ8 trägt) und MVQ8/VQ1 (MVQ8, welches die VQ-Region von MVQ1 trägt) sind in Abb. 3-7A schematisch dargestellt. In einer nachfolgenden Y2H-Analyse (Abb. 3-7B, C) wurde das Interaktionsverhalten dieser Chimären mit den WRKYs und den MAPKs analysiert.

Tatsächlich führt der Austausch der VQ-Region von MVQ1 gegen die VQ-Region von MVQ8 (Chimäre MVQ1/VQ8) zu einem völligen Verlust der Interaktionsfähigkeit mit den untersuchten WRKYs. Im Gegensatz dazu resultiert der Einbau der VQ-Region von MVQ8 in MVQ1 (Chimäre MVQ8/VQ1) in einer Übertragung der Fähigkeit zur Interaktion mit den WRKYs. Dies bestätigt die Hypothese, dass die Homologieabweichungen in der VQ-Region von MVQ8 den Verlust zur Interaktionsfähigkeit mit den WRKYs zur Folge haben. Desweiteren weist die Variante MVQ8/VQ1 ein tendenziell ähnliches Interaktionsmuster mit den WRKYs auf wie MVQ1 selbst. Die Spezifität der Interaktion mit den WRKYs scheint somit in der VQ-Region determiniert zu sein. Das Interaktionsvermögen der Chimäre mit den MAPKs hingegen wurde – wie basierend auf den Ergebnissen in Abschnitt 3.2.1 zu erwarten ist – durch den Austausch der VQ-Regionen nicht beeinflusst.

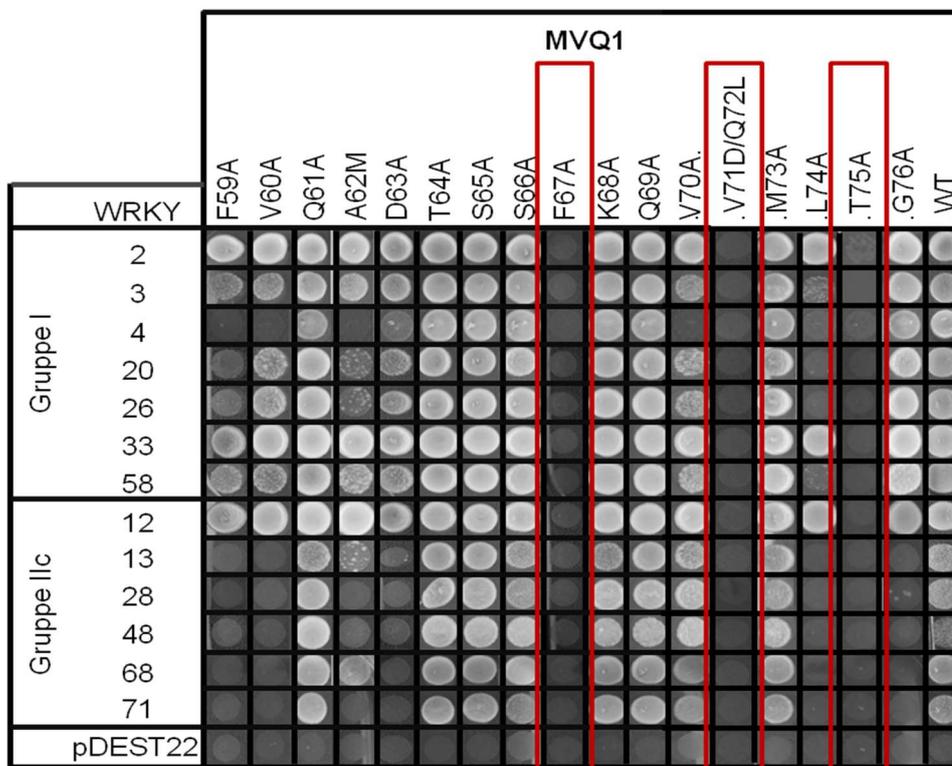


**Abbildung 3-7: Y2H-Interaktionsanalyse der Chimären MVQ1/VQ8 und MVQ8/VQ1 mit WRKYs und MAPKs aus *Arabidopsis thaliana*.** A) Schematische Darstellung der im Y2H verwendeten Mutanten MVQ1/VQ8 und MVQ8/VQ1. Die VQ-Regionen der verwendeten GAL4-AD-Fusionsproteine MVQ1 bzw. MVQ8 (Nummerierung der terminalen Aminosäurereste durch Pfeile verdeutlicht) und der Chimären MVQ1/VQ8 und MVQ8/VQ1 sind grün bzw. violett hinterlegt. Die hochkonservierten Aminosäuren des VQ-Motivs sind rot markiert. B / C) Y2H-Interaktionen von MVQ1/VQ8 und MVQ8/VQ1 mit im Genom von *Arabidopsis thaliana* codierten WRKYs (B) und MAPKs (C). Die Abbildung zeigt die Interaktionen, die durch das Wachstum der Hefezellen auf dem Interaktions-Selektionsmedium (SD-Medium ohne Zusatz von Leucin, Tryptophan, Histidin und Adenin) detektiert wurden. Eine Vorselektion positiver Kotransformanten wurde auf SD-Medium ohne Leucin und Tryptophan durchgeführt (nicht gezeigt). Mit dem Leervektor pDEST22 transformierte Zellen dienten als Kontrolle.

### 3.2.3. Alaninaustausch-Experimente zur Identifizierung interaktionsvermittelnder Aminosäuren in der VQ-Region von MVQ1

Das obige Experiment (Abb. 3-7) legt die Vermutung nahe, dass zusätzlich zu den hochkonservierten, zentralen Aminosäuren Valin und Glutamin (Aminosäurepositionen 71 und 72 / 42 und 43 der MVQ1 / MVQ8-Proteinsequenz) weitere Aminosäuren der VQ-Region einen maßgeblichen Einfluss auf die Interaktion mit den WRKYs haben. Um solche Aminosäuren zu identifizieren wurde eine auf der VQ-Region von MVQ1 basierende Y2H-Mutationsanalyse durchgeführt. In dieser Studie wurde das Interaktionsverhalten verschiedener Mutanten mit den WRKYs untersucht,

bei denen die einzelnen Aminosäuren der VQ-Region jeweils gegen die Aminosäure Alanin ausgetauscht wurden. Ein solcher *alanine scan* ermöglicht Rückschlüsse auf die Bedeutung einzelner Aminosäure-Seitenketten für Protein-Protein-Interaktionen, da die entsprechenden Reste durch die Mutagenese gegen sterisch wenig anspruchsvolle Methylgruppen ersetzt werden. In die Position 62, in der sich in der MVQ1-Sequenz bereits ein Alanin befindet, wurde im Gegenzug ein Methionin eingeführt. Diese Aminosäure findet sich in der homologen Position in MVQ8, das wie bereits erwähnt nicht mit WRKYs wechselwirkt. Die anschließende Y2H-Analyse (Abbildung 3-8) wurde auf WRKYs der Gruppen I und IIc beschränkt, die in den vorangegangenen Experimenten eine Interaktion mit MVQ1 zeigten (siehe Kapitel 3.2.1).



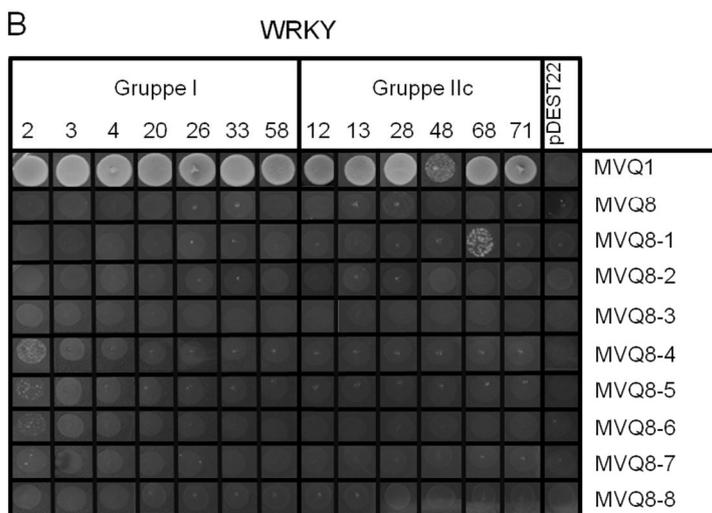
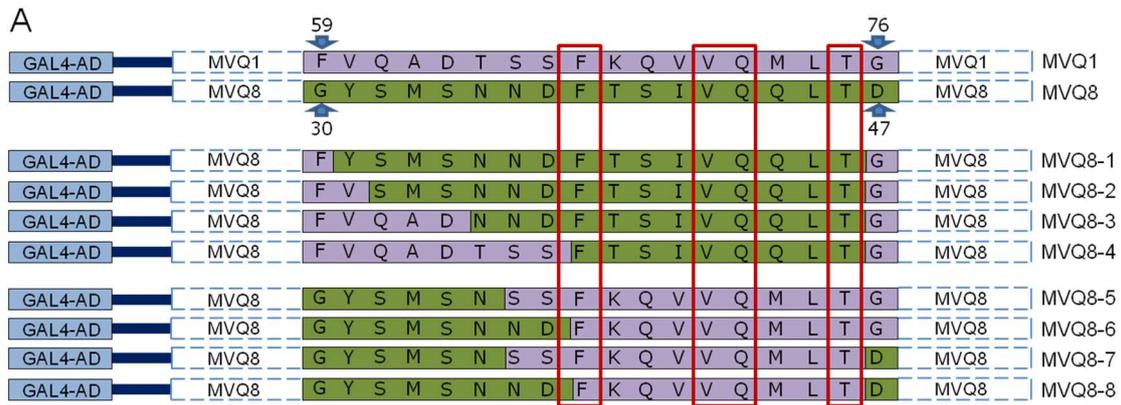
**Abbildung 3-8: Y2H-Interaktionsanalyse der Alaninaustausch-Varianten von MVQ1 mit selektierten WRKYs aus *Arabidopsis thaliana*.** Die Abbildung zeigt die Interaktionen, die durch das Wachstum der Hefezellen auf dem Interaktions-Selektionsmedium (SD-Medium ohne Zusatz von Leucin, Tryptophan, Histidin und Adenin) detektiert wurden. Eine Vorselektion positiver Kotransformanten wurde auf SD-Medium ohne Leucin und Tryptophan durchgeführt (nicht gezeigt). Zur Vollständigkeit wurde die Doppelvariante MVQ1<sub>DL</sub> (Austausch der hochkonservierten Aminosäuren V71 und Q72 gegen Asparaginsäure und Leucin) in das Experiment integriert. Mit dem Leervektor pDEST22 transformierte Zellen dienten als Kontrolle.

Wie bereits für die hochkonservierten Aminosäuren Valin 71 und Glutamin 72 gezeigt werden konnte (Abb. 3-6) sind auch die Aminosäuren Phenylalanin 67 und Threonin

75 essentiell für die Interaktion von MVQ1 mit den WRKYs (Abb. 3-8). Neben diesen hoch konservierten Aminosäuren der VQ-Region scheinen auch die Aminosäuren Phenylalanin, Valin, Leucin bzw. Glycin in den Positionen 59, 60, 74 bzw. 76 einen starken Einfluss auf die Interaktion mit den WRKYs der Gruppe IIC zu haben, da die Mutation dieser Reste außer im Fall von WRKY12 zum Verlust der Interaktion mit den entsprechenden WRKYs führt. Einen geringeren Einfluss, der sich in einem deutlich verringerten Hefewachstum äußert, üben scheinbar die Aminosäuren Alanin, Aspartat bzw. Methionin in den Positionen 62, 63 bzw. 73 aus (Abb. 3-8). Zusammenfassend konnten neben den hochkonservierten Aminosäuren des VQ-Motivs weitere Aminosäuren identifiziert werden, die einen maßgeblichen Einfluss auf die Interaktion von MVQ1 mit den WRKYs besitzen. Dies trifft besonders auf die randständigen Aminosäuren der VQ-Region zu. Bei genauer Betrachtung der Sequenzhomologie der VQ-Regionen der VQs (Abb. 3-1) wird deutlich, dass MVQ8 an diesen scheinbar kritischen Aminosäurepositionen Reste aufweist, die bei den anderen VQs oft nicht oder nur selten vorkommen (unter anderem das durch die Variante A62M repräsentierte Methionin). Diese Abweichungen in der Aminosäuresequenz der VQ-Region von MVQ8 könnten die Ursache für das Unvermögen zur Interaktion mit den WRKYs darstellen (siehe Kapitel 3.2.1).

#### **3.2.4. Variation der VQ-Region von MVQ8**

Um herauszufinden welche Unterschiede in der VQ-Region von MVQ8 die Unfähigkeit des Proteins zur Interaktion mit den WRKYs hervorrufen oder begünstigen, wurden verschiedene MVQ8-Varianten generiert, die in Abb. 3-9 schematisch dargestellt sind. Die Varianten MVQ8-1 bis MVQ8-4 wurden auf Grundlage obiger Ergebnisse generiert, wonach die randständigen Aminosäuren der VQ-Region von MVQ1 einen maßgeblichen Einfluss auf die Interaktionsfähigkeit mit den WRKYs haben. Die entsprechenden Aminosäuren der VQ-Region wurden schrittweise gegen die in homologen Positionen der MVQ1-Sequenz vorhandenen Reste ausgetauscht. Auch in direkter Umgebung der hochkonservierten Aminosäuren (Abb. 3-9A) weist MVQ8 Abweichungen zu den Aminosäuren der VQ-Region von MVQ1 auf. Beispielsweise findet sich in Position 39 mit der Aminosäure



**Abbildung 3-9: Y2H-Interaktionsanalyse der MVQ8-Varianten mit WRKYs aus *Arabidopsis thaliana*.** **A) Schematische Darstellung der im Y2H verwendeten Mutanten.** Die VQ-Regionen der verwendeten GAL4-AD-Fusionsproteine MVQ1, MVQ8 (Nummerierung der terminalen Aminosäurereste durch Pfeile verdeutlicht) und der MVQ8-Varianten sind grün bzw. violett hinterlegt. Die hochkonservierten Aminosäuren des VQ-Motivs sind rot markiert. **B) Y2H-Interaktionen der MVQ8-Varianten mit selektierten WRKYs.** Die Abbildung zeigt die Interaktionen, die durch das Wachstum der Hefezellen auf dem Interaktions-Selektionsmedium (SD-Medium ohne Zusatz von Leucin, Tryptophan, Histidin und Adenin) detektiert wurden. Eine Vorselektion positiver Kotransformanten wurde auf SD-Medium ohne Leucin und Tryptophan durchgeführt (nicht gezeigt). Mit dem Leervektor pDEST22 transformierte Zellen diente als Kontrolle.

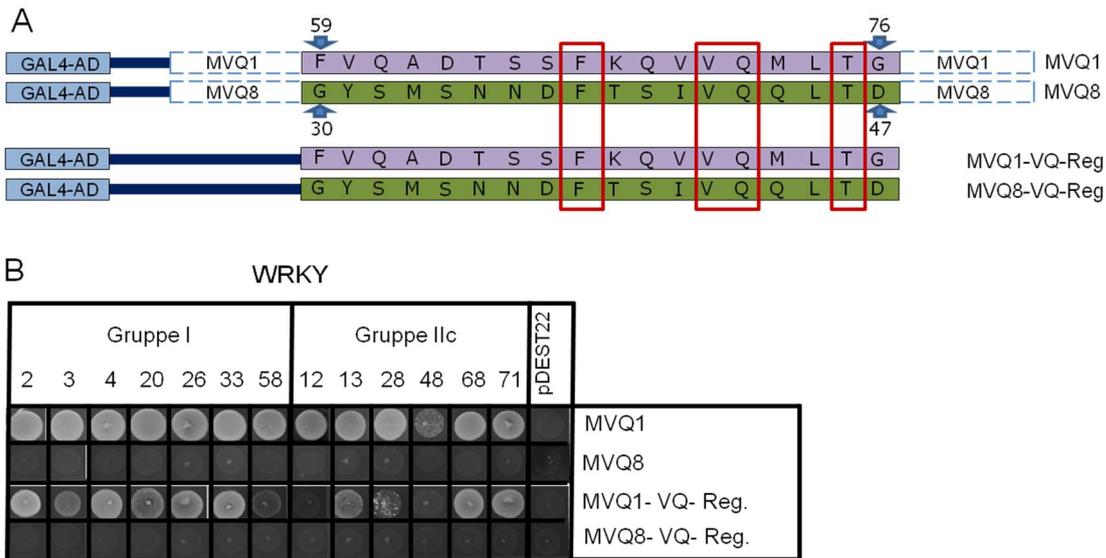
Threonin sogar ein Rest, der bei keinem anderen VQ in dieser Position vertreten ist. Daher basiert ein zweites Set von MVQ8-Varianten (MVQ8-5 bis MVQ8-6) auf der Analogie zu den Aminosäuren in der direkten Umgebung des VQ-Motivs von MVQ1.

Die Variationen in der VQ-Region von MVQ8 führte nur im Fall der Mutante MVQ8-1 zu einer Interaktion mit WRKY68 (Abb. 3-9B). Diese Interaktion ist jedoch nicht sehr vertrauenswürdig, da die Varianten MVQ8-2, MVQ8-3 und MVQ8-4 prinzipiell die

gleiche Mutation in dieser Position tragen aber im Gegensatz keine Interaktion mit WRKY68 aufweisen. Für keine der getesteten MVQ8-Varianten konnte ein Interaktionsmuster erzielt werden, das vergleichbar ist mit der Übertragung der gesamten VQ-Region von MVQ1 auf MVQ8 (siehe MVQ8/VQ1 in Abb. 3-7). Somit kann die Fähigkeit zur Interaktion mit WRKYs nur durch den Transfer der vollständigen VQ-Region erreicht werden. Dies legte die Frage nahe, ob sich die Fähigkeit zur Interaktion mit WRKY-Transkriptionsfaktoren durch den Transfer der VQ-Region von MVQ1 auch auf andere Proteine übertragen lässt.

### **3.2.5. Übertragung der Fähigkeit zur Interaktion mit WRKYs auf GAL4-AD durch Transfer der VQ-Region von MVQ1**

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden Fusionskonstrukte generiert, bei denen zum einen die VQ-Region von MVQ1 und als Kontrolle die VQ-Region von MVQ8 mit einem Protein fusioniert wurden, das selbst nicht zur Interaktion mit WRKYs fähig ist. Hierbei bot sich eine direkte Fusion an die entsprechende GAL4-AD an. Die Leervektor-Kontrollen der vorangegangenen Y2H-Analysen (Abb. 3-2) zeigen, dass GAL4-AD selbst nicht zur Interaktion mit den entsprechenden WRKYs fähig ist. Die verwendeten Konstrukte und das Ergebnis des durchgeführten Y2H-Experiments sind in Abb. 3-10 dargestellt. Abgesehen von den fehlenden Interaktionen mit WRKY12, WRKY48 und WRKY58 konnten durch die Fusion der VQ-Region von MVQ1 an GAL4-AD die gleichen Interaktionen erzielt werden wie sie für eine Fusion mit dem Volllängen-MVQ1-Protein zu beobachten sind. Somit konnte mit der VQ-Region von MVQ1 eine eigenständige Interaktionsdomäne identifiziert werden, mit der sich die Fähigkeit der Interaktion mit WRKYs auf andere Proteine zu übertragen lassen scheint.



**Abbildung 3-10: Direkte Fusion der VQ-Regionen von MVQ1 und MVQ8 an GAL4-AD und Y2H-Interaktionsanalyse mit WRKYs aus *Arabidopsis thaliana*. A) Schematische Darstellung der im Y2H verwendeten GAL4-AD-Fusionen. Die VQ-Regionen von MVQ1 und MVQ8 (terminale Aminosäurereste innerhalb der Sequenz der Vollängen-Proteine durch Pfeile repräsentiert) sind grün bzw. violett hinterlegt. Die Proteine MVQ1-VQ-Reg. und MVQ8-VQ-Reg. stellen direkte Fusionen der jeweiligen Motive mit GAL4-AD dar. Die hochkonservierten Aminosäuren des VQ-Motivs sind rot markiert. B) Y2H-Interaktionen von MVQ1/VQ8 und MVQ8/VQ1 mit selektierten WRKYs. Die Abbildung zeigt die Interaktionen, die durch das Wachstum der Hefezellen auf dem Interaktions-Selektionsmedium (SD-Medium ohne Zusatz von Leucin, Tryptophan, Histidin und Adenin) detektiert wurden. Eine Vorselektion positiver Kotransformanten wurde auf SD-Medium ohne Leucin und Tryptophan durchgeführt (nicht gezeigt). Mit dem Leervektor pDEST22 transformierte Zellen dienten als Kontrolle.**

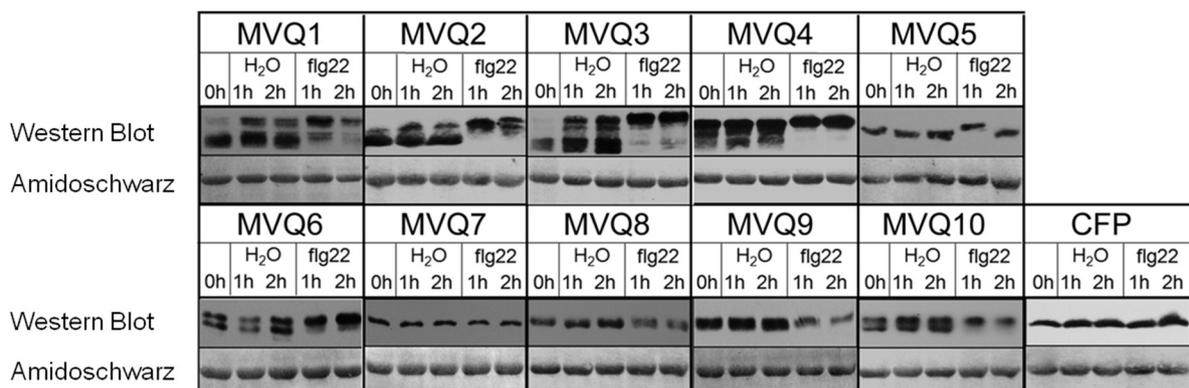
### 3.3. *In vivo* Phosphorylierung der MVQ-Proteine

Unter den 34 im Genom von *Arabidopsis thaliana* codierten VQs konnten zehn Vertreter identifiziert werden, die *in vitro* Substrate der Flg22-abhängigen MAPKs MPK3 und MPK6 darstellen (Kapitel 3.1.3). Eingehende und detaillierte Interaktionsstudien konnten eine an das VQ-Motiv gebundene Spezifität der Interaktion mit WRKYs belegen (Kapitel 3.2) und lassen vermuten, dass die MVQs einen Beitrag zur Regulation der PAMP-induzierten Immunantwort über die Interaktion mit diesen Transkriptionsfaktoren leisten. Die biologische Funktion der MVQs bleibt bisher ungeklärt und sollte durch eingehende *in vivo* Studien, die auf den nächsten Seiten näher beschrieben sind, untersucht werden.

### 3.3.1. Modifizierung der MVQs in Flg22-behandelten Protoplasten

Die oben gezeigten Beobachtungen, dass MVQ1-7 und MVQ9-10 mit WRKYs interagieren können (Kapitel 3.2.1) und dass MVQ1-MVQ10 *in vitro* durch die stressinduzierbaren MAPKs MPK3 und MPK6 phosphoryliert werden können (Kapitel 3.1.3) lassen vermuten, dass diese MVQs tatsächlich eine Rolle in der Flg22-induzierten pflanzlichen Immunabwehr spielen. Um diese Hypothese zu untermauern sollte der Einfluss einer Flg22-Behandlung auf die zelluläre Konzentration der MVQs MVQ1 - MVQ10 *in vivo* untersucht werden. Hierzu wurde eine Suspension von Mesophyllprotoplasten aus *Arabidopsis thaliana*, welche das Gen des zu untersuchenden MVQs als HA-fusioniertes Konstrukt (HA-MVQ) unter der Kontrolle des starken Überexpressionspromotors 35S exprimierten, mit Flg22 bzw. mit Wasser als Kontrolle versetzt. Der Einfluss der Flg22-Behandlung auf die MVQs wurde mit Hilfe eines spezifischen Anti-HA-Antikörpers in Western Blot-Experimenten untersucht (Abb. 3-11).

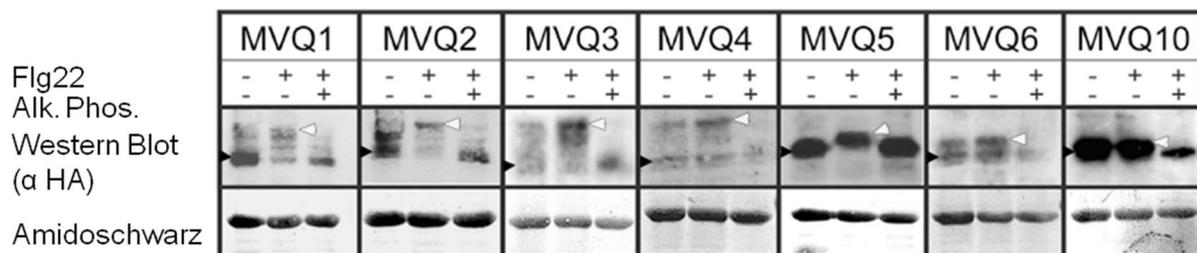
In einigen Fällen (MVQ1, MVQ2 und MVQ8 - MVQ10) scheint die Behandlung der Protoplasten mit Flg22 zu einer Destabilisierung des Proteins zu führen, die sich in einem reduzierten Proteinlevel äußert (Abb. 3-11). Augenscheinlicher ist allerdings, dass die Inkubation mit Flg22 bei einigen der untersuchten MVQs (MVQ1 - MVQ4,



**Abbildung 3-11: *In vivo* Einfluss von Flg22 auf das Proteinlevel und die elektrophoretische Mobilität der MVQs.** *Arabidopsis*-Mesophyllprotoplasten, die die HA-MVQs transient überexprimierten, wurden mit 100 nM Flg22 elicitiert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Proteinextrakte im Western Blot analysiert. Als Kontrolle dienten CYAN FLUORESCENT PROTEIN (CFP)-exprimierende Protoplasten. Die große Untereinheit der RuBisCO dient als Ladekontrolle (Amidoschwarz-Färbung). Die Protoplasten-transformation, PAMP-Behandlung und Western Blot-Analyse mit Hilfe eines spezifischen Anti-HA-Antikörpers erfolgte durch Dr. Lennart Eschen-Lippold (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle).

MVQ6, MVQ10 und transient für MVQ5) zu einer Modifikation zu führen scheint, die die elektrophoretische Mobilität des Proteins in der SDS-PAGE beeinflusst, was sich in einem Übergang der Proteinbanden in Richtung eines höheren Molekulargewichts äußert (Abb. 3-11). In Anbetracht der Tatsache, dass die entsprechenden Proteine *in vitro* als Substrate der in der Flg22-induzierten Immunantwort involvierten MAPKs fungieren (Kapitel 3.1.4), könnte es sich bei diesen Modifikationen um Phosphorylierungen handeln.

Wenn es sich bei den gezeigten Modifikationen tatsächlich um Phosphorylierungen handelt, sollte es möglich sein diese Phosphorylierungen durch Phosphatasebehandlung wieder zu entfernen. Hierzu wurde ein entsprechendes Dephosphorylierungsexperiment durchgeführt, dass in Abb. 3-12 dargestellt ist. Um die Modifizierung der MVQs hervorzurufen wurden MVQ-überexprimierende Mesophyllprotoplasten mit Flg22 bzw. als Kontrolle mit Wasser behandelt. Inkubiert man anschließend die Proteinextrakte mit alkalischer Phosphatase wird die Flg22-abhängige Proteinmodifizierung aller MVQs wieder rückgängig gemacht, womit diese eindeutig als Phosphorylierung identifiziert werden konnte.



**Abbildung 3-12: Entfernung der Flg22-abhängigen MVQ-Modifizierung durch Phosphatasebehandlung.** Transient HA-MVQ überexprimierende Mesophyllprotoplasten wurden zwei Stunden mit 100 nM Flg22 elicitiert bzw. als Kontrolle mit Wasser behandelt. Proteinextrakte wurden anschließend für eine Stunde bei 37°C mit alkalischer Phosphatase bzw. Wasser als Kontrolle versetzt und anschließend im Western Blot mit Hilfe eines spezifischen Anti-HA-Antikörpers analysiert. Schwarze bzw. weiße Pfeile markieren die Positionen der unmodifizierten bzw. modifizierten Proteine. Die große Untereinheit der RuBisCO dient als Ladekontrolle (Amidoschwarz-Färbung).

### 3.3.2. LC-MS/MS-basierte Detektion der Phosphorylierungsstellen von MVQ1 - MVQ10

Die vorangegangenen Analysen belegen, dass die VQs MVQ1 - MVQ10 *in vitro* Substrate von MPK3 und MPK6 darstellen (Kapitel 3.1.3). Für einige dieser MVQs konnte zudem eine Flg22-abhängige *in vivo* Phosphorylierung nachgewiesen werden, die sich in einer veränderten elektrophoretischen Mobilität der Proteine äußert (Kapitel 3.3.1). Durch LC-MS/MS Analysen sollten die Phosphorylierungsstellen der MVQs detektiert werden, um auf Basis dieser Informationen Phosphorylierungsmutanten generieren zu können. Diese sollten zur Aufklärung der biologischen Funktion der MVQ-Phosphorylierungen genutzt werden.

Zur Detektion der Phosphorylierungsstellen wurden die rekombinant hergestellten MVQs durch MPK6 *in vitro* phosphoryliert. Nach anschließender proteolytischer Spaltung der Proteine in Peptide wurden diese mittels LC-MS/MS-basierter Phosphoproteomik auf Modifizierung untersucht. Die identifizierten Phosphorylierungsstellen von MVQ1 - MVQ10 sind in Abb. 3-13 dargestellt. Zur graphischen Veranschaulichung sind die Aminosäuresequenzen der MVQs abgebildet, deren gelb eingefärbte Teilbereiche den experimentell ermittelten Peptiden entsprechen. Detaillierte MS-Daten und die Sequenz der detektierten Peptide können den Tabellen unterhalb der Aminosäuresequenzen entnommen werden. Die identifizierten Phosphorylierungsstellen sind grün markiert. Eindeutige Phosphorylierungen weisen einen *Ascore* oberhalb 19 auf (Beausoleil et al. 2006) und sind in den tabellarisch gelisteten Peptidsequenzen rot und in der Aminosäuresequenz des Volllängenproteins grün markiert. Phosphorylierungen mit einem *Ascore* unterhalb 19 wurden als nicht eindeutig gewertet und sind in den Peptidsequenzen in violett hervorgehoben bzw. in der Sequenz des Volllängenproteins durch ein violettes Fragezeichen markiert.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass durch die LC-MS/MS-Analysen für alle untersuchten MVQs mehrere durch MPK6 modifizierte Phosphorylierungsstellen detektiert werden konnten. Im Anschluss sollte untersucht werden, wie die MVQs die Immunantwort in *Arabidopsis thaliana* regulieren und welche Rolle diese Proteinphosphorylierungen spielen. Diese Fragestellung sollte stellvertretend anhand von MVQ1 untersucht werden, da dieses MVQ *in vivo* durch Flg22-Behandlung phosphoryliert wird und dadurch scheinbar eine Destabilisierung erfährt.

## MVQ1

M E N <b>S</b> P R Y R E A	T N L I P <b>S</b> P R C H	N S N N S C G M S S	S S E S N K P P T <b>T</b>	40
P T R H V T T R S E	S G N P Y P T T F V	Q A D T S S F K Q V	V Q M L T G S A E R	80
P K H G S S L K P N	P T H H Q P D P R S	<b>T</b> P S S F S I P P I	K A V P N K K Q S S	120
S S A S G F R L Y E	R R N S M K N L K I	N P L N P V F N P V	N S A F <b>S</b> P R K P E	160
I L <b>S</b> P S I L D F P	S L V L <b>S</b> P V T P L	I P D P F D R S G S	S N Q <b>S</b> P N E L A A	200
E E K A M K E R G F	Y L H P <b>S</b> P A T <b>T</b> P	M D P E P R L L P L	F P V T <b>S</b> P R V S G	240
S S S A S T S				247

	Peptidsequenz	Position	Modifizierung	Ascore	Wahrscheinlichkeit	Anzahl Phosphorylierungen	Mascot Ion Score
P1	EATNLP <sub>p</sub> SPR	S16	Phos.	94,55	100%	1	66
P2	CHNSNNSCGMSSSESNKPP T <sub>p</sub> TPTR	M28 / T40	Ox. / Phos.	1000,00 / <19	100% / 20%	1	49
P3a	S <sub>p</sub> TPSSFSIPPIK	T101	Phos.	<19	20%	1	34
P3b	STPSSF <sub>p</sub> SIPPIK	S106	Phos.	35,03	99%	1	41
P4	INPLNPVFNPNVNSAF <sub>p</sub> SPR	S155	Phos.	71,63	100%	1	100
P5	KPEILSPSILDFPSLVLSPTPLI	S163 / S175 / T178	3x n.m.	3x n.m.	3x n.m.	0	47
P6	SGSSN <sub>p</sub> SPNELAAEEK	S194	Phos.	34,49	100%	1	79
P7a	GFYLHP <sub>p</sub> SPATTPMDPERR	S215 / M221	Phos. / Ox.	25,69 / 1000,00	99% / 100%	1	30
P7b	GFYLHP <sub>p</sub> SPAT <sub>p</sub> TPMDPEPR	T219 / M221	Phos. / Ox.	40,71 / 1000,00	100% / 100%	1	51
P8	LLPLFPVTS <sub>p</sub> SPR	S235	n.m.	n.m.	n.m.	0	57

## MVQ2

M E K <b>S</b> P R Y R D K	A K N L L P <b>S</b> P S S	C T T T <b>T</b> P T R Y V K	D D M Y E T T F I R	40
T D P S S F K Q V V	Q L L T G I P K N P	T H Q P D P R F P P	F H S I P P I K A V	80
T N K K Q S S S F R	L S E R R N S M K H	Y L N I N P T H S G	P P E I L <b>T</b> P T I L	120
N F P A L D L <b>S</b> P D	<b>T</b> P L M S D P F Y R	P G S F S Q <b>S</b> P S D	S K P S F D D D Q E	160
R S I K E K G F Y L	R P <b>S</b> P S T <b>T</b> P R D	T E P R L L S L F P	M <b>T</b> P I H <b>S</b> P A P <b>S</b>	200
P H D H				204

	Peptidsequenz	Position	Modifizierung	Ascore	Wahrscheinlichkeit	Anzahl Phosphorylierungen	Mascot Ion Score
P1	NLLP <sub>p</sub> SPSSCTTTPTR	S17 / T24	Phos. / n.m.	28,23 / n.m.	100% / n.m.	1	76
P2a	GFYLRP <sub>p</sub> SPSTTPR	S173	Phos.	<19	53%	1	27
P2b	GFYLRP <sub>p</sub> SPST <sub>p</sub> TPR	T177	Phos.	21,94	100%	1	30
P3a	LLSLFPM <sub>p</sub> TIHSPAPSPHDH	M191 / T192	Ox. / Phos.	1000,00 / 27,49	100% / 100%	1	51
P3b	LLSLFPM <sub>p</sub> TIH <sub>p</sub> SPAPSPHDH	M191 / S196	Ox. / Phos.	1000,00 / 27,07	100% / 100%	1	56
P3c	LLSLFPM <sub>p</sub> TIHSPAP <sub>p</sub> SPHDH	M191 / S200	Ox. / Phos.	1000,00 / 24,62	100% / 100%	0	49

### MVQ3

<b>M</b> EVSTSSMSS	KPEQMQNPPP	MIS(S)P <sup>o</sup> RFQPQ	IIS(P)HHHDQH	40
QHLNPNYPTT	FVQADTSTFK	QVVQMLT <sup>o</sup> GSS	TDTTTGKHHE	80
A <sup>p</sup> SPVNNNNK	GSSFSIPPIK	KTNSFKLYER	RQNNNNMFAK	120
N <sup>o</sup> DL <sup>o</sup> MINTLR	QNSQRLMFTG	GNSSSHQ(S)PR	F(S)PRNSSSSE	160
NILL(S)PSMLD	FPKLG <sup>o</sup> LNS <sup>p</sup> SPV	T <sup>p</sup> PLRSND <sup>p</sup> DPF	NK(S)SPLSLGN	200
SSEEDKAIAD	KGFYLH <sup>p</sup> SPV	S <sup>p</sup> T <sup>p</sup> PRDSQPLL	LPLFPVA(S)PA	240
<b>R</b> NS				243

	Peptidsequenz	Position	Modifizierung	Ascore	Wahrscheinlichkeit	Anzahl Phosphorylierungen	Mascot Ion Score
P1	HHEAP <sub>p</sub> SPVNNNNK	S83	Phos.	1000,00	100%	1	57
P2a	LMF <sub>p</sub> TGGNSSHHQSPR	T139	Phos.	20,63	97%	1	19
P2b	LMFTGGNSSHHQ <sub>p</sub> SPRF <sub>p</sub> SPR	S148 / S152	Phos. / Phos.	53,61 / 44,39	100% / 100%	2	33
P3	NSSSENILL <sub>p</sub> SPSMLDFPK	S165	Phos.	38,40	100%	1	87
P4	LGLN <sub>p</sub> SPV <sub>p</sub> TPLR	S178 / T181	Phos. / Phos.	1000,00/1000,00	100% / 100%	2	29
P5	SSP <sub>p</sub> LSLGNSSSEEDKAIADK	S194	n.m.	n.m.	n.m.	0	114
P6a	GFYLHP <sub>p</sub> SPV <sub>p</sub> TPR	S218 / T222	Phos. / Phos.	37,26 / 33,32	100% / 100%	2	35
P6b	GFYLHPSPV <sub>p</sub> S <sub>p</sub> TPR	S221 / T222	Phos. / Phos.	26,21 / 33,32	99% / 100%	2	23
P7	DSQPLLLPLFPVA <sub>p</sub> SPAR	S238	Phos.	153,94	100%	1	75

### MVQ4

<b>M</b> EISTNPPSS	SSSSVSSSI	NGSLHHHIT	RSDHYPTTFV	40
QADSSSFKQV	VQMLT <sup>o</sup> GSS(S)P	R(S)P <sup>o</sup> D(S)PRPPT	T <sup>o</sup> PSGKGNFVI	80
PPIKTAQPKK	HSGNKLYERR	SHGGFN <sup>p</sup> NNLK	NSLMINTLMI	120
GGGGAG(S)PRF	(S)PRNQEIL(S)P	SCLDFPKLAL	N(S)PVT <sup>p</sup> PLKQG	160
TNGNEGDPFD	KMS <sup>o</sup> PLSEER	GIADKGYLH	R(S)PIS <sup>p</sup> T <sup>p</sup> PRDS	200
EPQLLLPLFPV	T(S)PRLSPEM			219

	Peptidsequenz	Position	Modifizierung	Ascore	Wahrscheinlichkeit	Anzahl Phosphorylierungen	Mascot Ion Score
P1	QVVQMLT <sub>p</sub> GSS <sub>p</sub> SPR	M53 / S59	Ox. / Phos.	100,00 / 21,94	100% / 100%	1	66
P2a	<sub>p</sub> SPD <sub>p</sub> SPRPPTTPSGK	S62	Phos.	<19	70%	1	52
P2b	SPD <sub>p</sub> SPRPPTTPSGK	S65	Phos.	54,57	100%	1	53
P2c	SPD <sub>p</sub> SPRPPT <sub>p</sub> TPSGK	T71	Phos.	<19	15%	1	52
P3	NSLMINTLMIGGGGAG <sub>p</sub> SPR	M114 / M119 / S127	Ox. / Ox. / Phos.	2X1000,00/200,67	2x100% / 100%	1	131
P4	NQEIL <sub>p</sub> S <sub>p</sub> SCLDFPK	S139 / S141	n.m. / Phos.	n.m. / 26,22	n.m. / 100%	1	68
P5a	LALN <sub>p</sub> SPVTPLK	S152	Phos.	50,5	100%	1	70
P5b	LALNSP <sub>p</sub> V <sub>p</sub> TPLK	T155	Phos.	52,15	100%	1	62
P6	MSP <sub>p</sub> LSEER	M172 / S173	Ox. / n.m.	1000,00 / n.m.	100% / n.m.	0	62
P7	SPIS <sub>p</sub> TPR	S192 / T196	n.m. / Phos.	n.m. / 23,88	n.m. / 100%	1	54
P8	DSEQLLLPLFPV <sub>p</sub> TPR	S212	Phos.	26,38	100%	1	79

### MVQ5

**M**SHQQPPSYA TEPNTMFVQA **DPSNFR**NIIVQ K**LTGAPPDIS** 40  
**SSSFS**AVSAA **HQKLPLTPKK** **PAFKLHER**RQ SSKK**MELKVN** 80  
**NITNP**NDAFS **HFHR**GFLV(SP) VSHLD**PFWAR** **VSPHSAREEH** 120  
**HAQPD**KEEQK AIAEK**GFYFL** **PSPR**SGSEPA **PELLPLFPLR** 160  
(SP)NGT**NHR**I**H** EDNHRDS 177

	Peptidsequenz	Position	Modifizierung	Ascore	Wahrscheinlichkeit	Anzahl Phosphorylierungen	Mascot Ion Score
P1	LPL <b>TP</b> KKPAFK	T57	n.m.	n.m.	n.m.	0	33
P2	VSPH <b>p</b> SAREEHHAQPDKEEQK	S112 / S115	n.m. / Phos.	n.m. / 19,46	n.m. / 99%	1	39
P3	GFYFL <b>p</b> SPR	S142	Phos.	1000,00	100%	1	60

### MVQ6

**M**NSK**GSQ**NVA **TTCKP**V**TTFV** **QTD**TNTFREI VQR**LTGPTEN** 40  
**NAAAA**T**PEAT** **VIKTA**I**QKRP** **TSKLHER**RQC MRPK**LEIVKP** 80  
**PLSFK**PT**GT**T **PSSK**SGNTNL L**TSP**V**GT**PS**S** LFSNLSLIEG 120  
EPDSC**TTN**IE EEEKAIKER**R** **FYLHP****S**PR**SK** **PGYTEPELLT** 160  
**LFPLT**(SP)N**SS** **GKP** 173

	Peptidsequenz	Position	Modifizierung	Ascore	Wahrscheinlichkeit	Anzahl Phosphorylierungen	Mascot Ion Score
P1	LTGPENNA <b>AAAA</b> T <b>PEAT</b> VIK	T46	Phos.	74,79	100%	1	94
P2	LEIVK <b>PP</b> LSFKPT <b>GT</b> <b>p</b> TPSSK	T90	Phos.	<19	70%	1	52
P3	FYLHP <b>p</b> SPR	S146	Phos.	1000,00	100%	1	48
P4	SKPGYTEPELLT <b>LFPLT</b> SPN <b>SS</b> GKP	S166	n.m.	n.m.	n.m.	0	60

### MVQ7

**M**DDQSNR**GND** **NHNND**HHHHH **LG**VNKMGK**NI** **RKD**PP**NQ**Q**NQ** 40  
**QQN**PQALVYN **INK**TDFRSIV **QQL**TGLG**STS** **SVN**PP**QT**N**HP** 80  
**KPP**NSRLVKV RPAPL**TQL**NH P**PP**PPPPPPPP VQSVPIASEP 120  
VQPVNQFSSN PAE**(S)**PISAYM **RYL**IES**(S)**P**VG** **NRV**QPQ**NQ**NP 160  
**VQP**STGLFQS **HQT**GN**PMS**F **Q****(S)**P**(A)**SQF**(A)**L**(S)** **P****(Q)**PR**(S)**P**(F)**PLF 200  
**(S)**PN**(F)**AF**(S)**PRF LGGSNESLPP P**(S)**P**(G)**FFFF**PL**L **(S)**PLWKNQ 237

	Peptidsequenz	Position	Modifizierung	Ascore	Wahrscheinlichkeit	Anzahl Phosphorylierungen	Mascot Ion Score
P1	SIVQQLTGLG <b>ST</b> SSVN <b>PPQ</b> <b>p</b> TNHPKPPNSR	T77	Phos.	35,14	100%	1	52
P2	YLIE <b>SP</b> VGNR	S147	n.m.	n.m.	n.m.	0	66
P3	VQPQ <b>NQ</b> NPVQPSTGLGQ <b>SH</b> QTGPN <b>PMS</b> FQ <b>SP</b> ASQFAL <b>p</b> SPQPR	M178 / S182 / S190	Ox. / n.m. / Phos.	1000,00 / n.m. / <19	100% / n.m. / 90%	1	27
P4a	<b>p</b> SP <b>F</b> PL <b>F</b> SPN <b>F</b> AF <b>S</b> PR	S195	Phos.	64,06	100%	1	68
P4b	<b>SP</b> F <b>PL</b> <b>p</b> SPN <b>F</b> AF <b>S</b> PR	S201	Phos.	96,64	100%	1	92
P4c	<b>SP</b> F <b>PL</b> <b>S</b> PN <b>F</b> AF <b>p</b> SPR	S207	Phos.	108,21	100%	1	100

## MVQ8

<b>M</b> DR <b>T</b> <b>C</b> W <b>Y</b> Y <b>D</b> Q	<b>L</b> G <b>V</b> N <b>K</b> I G K N I	<b>K</b> ( <b>S</b> ) <b>P</b> L <b>P</b> Q <b>P</b> Q <b>G</b>	<b>Y</b> S <b>M</b> S <b>N</b> N <b>D</b> F <b>T</b> S	40
<b>I</b> V <b>Q</b> Q <b>L</b> T <b>D</b> ( <b>S</b> ) <b>P</b> S	<b>R</b> E <b>S</b> L <b>P</b> Q <b>P</b> L <b>P</b> R	<b>N</b> L <b>L</b> K <b>P</b> Q <b>Q</b> K I R	P V G Q I Q I N R P	80
C V P P P V M A Q P	T H E F V A R P P M	H P L P H G S Q P I	I S H G D Q F G S N	120
<b>T</b> A <b>E</b> S <b>S</b> V <b>S</b> V <b>Y</b> M	<b>R</b> Y <b>R</b> Q <b>S</b> S <b>L</b> G <b>D</b> S	<b>G</b> P <b>N</b> E <b>N</b> Q <b>M</b> Q <b>P</b> S	<b>H</b> D <b>N</b> Q <b>Q</b> Q <b>P</b> Q <b>V</b> E	160
<b>G</b> Q <b>A</b> Q <b>S</b> H <b>N</b> H <b>H</b> S	<b>P</b> R <b>F</b> N <b>D</b> S <b>A</b> R <b>N</b> T	<b>P</b> I <b>L</b> P <b>T</b> P <b>K</b> F <b>D</b> G	<b>P</b> P <b>Q</b> Q <b>M</b> H <b>N</b> N <b>S</b> L	200
<b>F</b> ( <b>S</b> ) <b>P</b> R <b>F</b> N <b>G</b> R <b>G</b> I	<b>L</b> P <b>T</b> P <b>T</b> S <b>Q</b> Y <b>R</b> P	<b>Q</b> S <b>P</b> T <b>A</b> Y <b>R</b> N <b>L</b> L	( <b>S</b> ) <b>P</b> R( <b>S</b> ) <b>P</b> S( <b>S</b> ) <b>P</b> L <b>L</b> S	240
<b>T</b> G <b>V</b> Q <b>Y</b> P <b>P</b> L <b>T</b> I	<b>P</b> R <b>N</b> Y <b>T</b> F <b>S</b> S <b>M</b> D	<b>Q</b> P <b>G</b> I <b>L</b> G <b>P</b> G <b>T</b> I	P L P H A S ( <b>S</b> ) <b>P</b> F <b>G</b> V	280
<b>I</b> P <b>I</b> S <b>S</b> Q <b>R</b> W <b>R</b> G Y				291

	Peptidsequenz	Position	Modifizierung	Ascore	Wahrscheinlichkeit	Anzahl Phosphorylierungen	Mascot Ion Score
P1	K <b>S</b> P <b>L</b> P <b>Q</b> P <b>Q</b> G <b>Y</b> S <b>M</b> S <b>N</b> N <b>D</b> F <b>T</b> S <b>I</b> V <b>Q</b> Q <b>L</b> T <b>D</b> S <b>P</b> S <b>R</b>	S23 / M33 / S48	n.m. / Ox. / n.m.	n.m. / 1000,00 / n.m.	n.m. / 100% / n.m.	0	71
P2	Q <b>S</b> S <b>L</b> G <b>D</b> S <b>G</b> P <b>N</b> E <b>N</b> Q <b>M</b> Q <b>P</b> S <b>H</b> D <b>N</b> Q <b>Q</b> Q <b>P</b> Q <b>V</b> E <b>G</b> Q <b>A</b> Q <b>S</b> H <b>N</b> H <b>H</b> S <b>P</b> R	M147 / S170	Ox. / n.m.	1000,00 / n.m.	100% / n.m.	0	61
P3	N <b>T</b> P <b>I</b> L <b>P</b> <b>T</b> P <b>K</b>	T180 / T185	n.m. / Phos.	n.m. / 60,37	n.m. / 100%	1	32
P4	F <b>D</b> G <b>P</b> P <b>Q</b> Q <b>M</b> H <b>N</b> N <b>S</b> L <b>P</b> <b>S</b> P <b>R</b>	M195 / S202	Ox. / Phos.	1000,00 / 82,18	100% / 100%	1	55
P5a	G <b>I</b> L <b>P</b> <b>T</b> P <b>T</b> S <b>Q</b> Y <b>R</b> P <b>Q</b> S <b>P</b> T <b>A</b> Y <b>R</b>	T213	Phos.	36,66	100%	1	33
P5b	G <b>I</b> L <b>P</b> <b>T</b> P <b>T</b> S <b>Q</b> Y <b>R</b> P <b>Q</b> <b>S</b> P <b>T</b> A <b>Y</b> R	S222	Phos.	23,67	100%	1	70
P6a	<b>p</b> S <b>P</b> S <b>P</b> L <b>L</b> S <b>T</b> G <b>V</b> Q <b>Y</b> P <b>P</b> L <b>T</b> P <b>R</b>	S234	Phos.	23,17	89%	1	41
P6b	<b>SP</b> <b>p</b> S <b>P</b> L <b>L</b> S <b>T</b> G <b>V</b> Q <b>Y</b> P <b>P</b> L <b>T</b> P <b>R</b>	S236	Phos.	22,87	32%	1	31
P6c	<b>SP</b> S <b>P</b> L <b>L</b> S <b>T</b> G <b>V</b> Q <b>Y</b> P <b>P</b> L <b>P</b> <b>T</b> P <b>R</b>	T250	Phos.	109,69	100%	1	107

## MVQ9

<b>M</b> DR <b>P</b> R <b>Q</b> N <b>D</b> H <b>L</b>	<b>G</b> V <b>N</b> R I G K N I R	<b>K</b> ( <b>S</b> ) <b>P</b> L <b>H</b> Q <b>S</b> T <b>F</b> A	<b>A</b> S <b>T</b> S <b>N</b> G <b>A</b> A <b>P</b> R	40
<b>L</b> Q <b>T</b> Q <b>P</b> Q <b>V</b> Y <b>N</b> I	<b>S</b> K <b>N</b> D <b>F</b> R <b>S</b> I <b>V</b> Q	<b>Q</b> L <b>T</b> G <b>S</b> ( <b>S</b> ) <b>P</b> S <b>R</b> E <b>S</b>	<b>L</b> P <b>R</b> P <b>P</b> Q <b>N</b> N <b>S</b> L	80
<b>R</b> P <b>Q</b> N <b>T</b> R <b>L</b> Q <b>R</b> I	<b>R</b> P( <b>S</b> ) <b>P</b> L <b>T</b> Q <b>L</b> N <b>R</b>	<b>P</b> A <b>V</b> P <b>L</b> P <b>S</b> M <b>A</b> P	<b>P</b> Q <b>S</b> H <b>P</b> Q <b>F</b> A <b>R</b> Q	120
<b>P</b> P <b>H</b> Q <b>P</b> P <b>F</b> P <b>Q</b> T	<b>T</b> Q <b>Q</b> P <b>M</b> M <b>G</b> H <b>R</b> D	<b>Q</b> F <b>W</b> S <b>N</b> T <b>A</b> E( <b>S</b> ) <b>P</b>	<b>V</b> S <b>E</b> Y <b>M</b> R <b>Y</b> L <b>Q</b> S	160
S L G D S G P N A N	Q M Q P G H E Q R P	Y I P G H E Q R P Y	V P G N E Q Q P Y M	200
P G N E Q R P Y I P	G H E Q R S Y M P A	Q S Q S Q S Q P Q P	Q P Q P Q Q H M M P	240
<b>G</b> P <b>Q</b> P <b>R</b> M <b>N</b> M <b>Q</b> G	<b>P</b> L <b>Q</b> P <b>N</b> Q <b>Y</b> L <b>P</b> P	<b>P</b> G <b>L</b> V <b>P</b> ( <b>S</b> ) <b>P</b> V <b>P</b> H	<b>N</b> L <b>P</b> ( <b>S</b> ) <b>P</b> R <b>F</b> N <b>A</b> P	280
<b>V</b> P <b>V</b> ( <b>T</b> ) <b>P</b> ( <b>T</b> ) <b>Q</b> ( <b>S</b> ) <b>P</b>	<b>M</b> F <b>S</b> Q <b>M</b> Y <b>G</b> G <b>F</b> P	<b>S</b> ( <b>P</b> ) <b>R</b> Y <b>N</b> G <b>F</b> G <b>P</b> L	<b>Q</b> ( <b>S</b> ) <b>P</b> T <b>S</b> Q <b>F</b> L <b>Q</b> P	320
( <b>S</b> ) <b>P</b> T <b>G</b> Y <b>P</b> N <b>M</b> F <b>S</b>	<b>P</b> R( <b>S</b> ) <b>P</b> Y <b>P</b> L <b>L</b> ( <b>S</b> )	G V Q Y P Q P L T P	N F S F S Q I A Q Q	360
G S L G P G A G P S	Q G P P Q P P (S)	G L M F P L (S) P S G	F F P M P (S) P R W N	400
D Y				402

	Peptidsequenz	Position	Modifizierung	Ascore	Wahrscheinlichkeit	Anzahl Phosphorylierungen	Mascot Ion Score
P1	<b>S</b> P <b>L</b> H <b>Q</b> S <b>T</b> F <b>A</b> A <b>S</b> T <b>S</b> N <b>G</b> A <b>A</b> P <b>R</b>	S22	n.m.	n.m.	n.m.	0	108
P2a	S <b>I</b> V <b>Q</b> Q <b>L</b> T <b>G</b> S <b>P</b> S <b>R</b>	T63	Phos.	30,01	100%	1	30
P2b	S <b>I</b> V <b>Q</b> Q <b>L</b> T <b>G</b> <b>p</b> S <b>P</b> S <b>R</b>	S65	Phos.	24,84	100%	1	52
P3	I <b>R</b> P <b>S</b> P <b>L</b> T <b>Q</b> L <b>N</b> R <b>P</b> A <b>V</b> P <b>L</b> P <b>S</b> M <b>A</b> P <b>P</b> Q <b>S</b> H <b>P</b> Q <b>F</b> A <b>R</b>	S93 / M108	n.m. / Ox.	n.m. / 1000,00	n.m. / 100%	0	51
P4	D <b>Q</b> F <b>W</b> S <b>N</b> T <b>A</b> E <b>p</b> S <b>P</b> V <b>S</b> E <b>Y</b> M <b>R</b>	S149 / M155	Phos. / Ox.	41,02 / 1000,00	100% / 100%	1	78
P5a	M <b>N</b> M <b>Q</b> G <b>P</b> L <b>Q</b> P <b>N</b> Q <b>Y</b> L <b>P</b> P <b>P</b> G <b>L</b> V P <b>p</b> S <b>P</b> V <b>P</b> H <b>N</b> L <b>P</b> S <b>P</b> R	M246 / M248 / S266	2x Ox. / Phos.	2x 1000,00 / <19	2x 100% / 1%	1	62
P5b	M <b>N</b> M <b>Q</b> G <b>P</b> L <b>Q</b> P <b>N</b> Q <b>Y</b> L <b>P</b> P <b>P</b> G <b>L</b> V P <b>S</b> P <b>V</b> P <b>H</b> N <b>L</b> P <b>p</b> S <b>P</b> R	M246 / M248 / S274	2x Ox. / Phos.	2x 1000,00 / 35,94	2x 100% / 100%	1	107
P6	F <b>N</b> A <b>P</b> V <b>P</b> V <b>T</b> P <b>Q</b> P <b>S</b> P <b>M</b> F <b>S</b> Q <b>M</b> Y <b>G</b> G <b>F</b> P <b>p</b> S <b>P</b> R	T284 / S289 / M291 / M295 / S301	2x n.p. / 2x Ox. / Phos.	2x n.p. / 2x 1000,00 / 39,18	2x n.p. / 2x 100% / 100%	1	58
P7	Y <b>N</b> G <b>F</b> G <b>P</b> L <b>Q</b> <b>S</b> P <b>T</b> S <b>Q</b> F <b>L</b> Q <b>P</b> <b>S</b> P <b>T</b> G <b>Y</b> P <b>N</b> M <b>F</b> S <b>P</b> R	S312 / S321 / M328 / S330	2x n.p. / Ox. / n.p.	2x n.p. / 1000,00 / n.p.	2x n.p. / 100% / n.p.	0	35

## MVQ10

<b>M</b> D <b>K</b> <b>S</b> C <b>N</b> S <b>S</b> <b>S</b> G <b>D</b>	<b>S</b> <b>S</b> A <b>V</b> S <b>A</b> S <b>A</b> T <b>S</b>	<b>S</b> T <b>G</b> N <b>N</b> T <b>T</b> N <b>R</b> D	<b>H</b> Y <b>L</b> R <b>Q</b> L <b>N</b> K <b>L</b> <b>S</b>	40
<b>H</b> K <b>I</b> <b>S</b> K <b>P</b> T <b>N</b> S <b>S</b>	<b>S</b> <b>S</b> V <b>S</b> V <b>A</b> N <b>R</b> E <b>I</b>	<b>D</b> L <b>P</b> P <b>P</b> P <b>L</b> Q <b>I</b>	<b>N</b> Q <b>G</b> N <b>L</b> H <b>Q</b> H <b>Q</b> P	80
<b>P</b> V <b>Y</b> N <b>I</b> N <b>K</b> N <b>D</b> F	<b>R</b> D <b>V</b> V <b>Q</b> K <b>L</b> T <b>G</b> <b>S</b>	<b>P</b> A <b>H</b> E <b>R</b> I <b>S</b> A <b>P</b> P	<b>Q</b> Q <b>P</b> I <b>H</b> H <b>P</b> K <b>P</b> Q	120
<b>Q</b> <b>S</b> <b>S</b> R <b>L</b> H <b>R</b> I <b>R</b> P	<b>P</b> P <b>L</b> V <b>H</b> V <b>I</b> N <b>R</b> P	<b>P</b> G <b>L</b> L <b>N</b> D <b>A</b> L <b>I</b> P	<b>Q</b> G <b>S</b> H <b>H</b> M <b>N</b> Q <b>N</b> W	160
<b>T</b> G <b>V</b> G <b>F</b> N <b>L</b> R <b>P</b> T	<b>A</b> P <b>L</b> <b>S</b> <b>P</b> L <b>P</b> P <b>L</b> P	<b>P</b> V <b>H</b> A <b>A</b> A <b>E</b> <b>S</b> <b>P</b> V	<b>S</b> S <b>Y</b> M <b>R</b> <b>Y</b> L <b>Q</b> N <b>S</b>	200
<b>M</b> <b>F</b> A <b>I</b> D <b>S</b> <b>N</b> R <b>K</b> E	<b>F</b> S <b>G</b> L <b>S</b> <b>P</b> L <b>A</b> P <b>L</b>	<b>V</b> <b>S</b> <b>P</b> R <b>W</b> Y <b>Q</b> Q <b>Q</b> E	<b>N</b> A <b>P</b> P <b>S</b> Q <b>H</b> N <b>S</b> F	240
<b>P</b> P <b>P</b> H <b>P</b> P <b>P</b> P <b>S</b> S	<b>A</b> V <b>S</b> Q <b>T</b> V <b>P</b> T <b>S</b> I	<b>P</b> A <b>P</b> P <b>L</b> F <b>G</b> C <b>S</b> S	<b>S</b> <b>P</b> K <b>S</b> <b>P</b> Y <b>G</b> L <b>L</b> <b>S</b>	280
<b>P</b> S <b>I</b> L <b>L</b> <b>S</b> <b>P</b> <b>S</b> S <b>G</b>	<b>Q</b> L <b>G</b> F <b>P</b> V <b>S</b> <b>P</b> T <b>T</b>	<b>V</b> P <b>L</b> P <b>S</b> <b>P</b> K <b>Y</b> K <b>G</b>	<b>H</b>	311

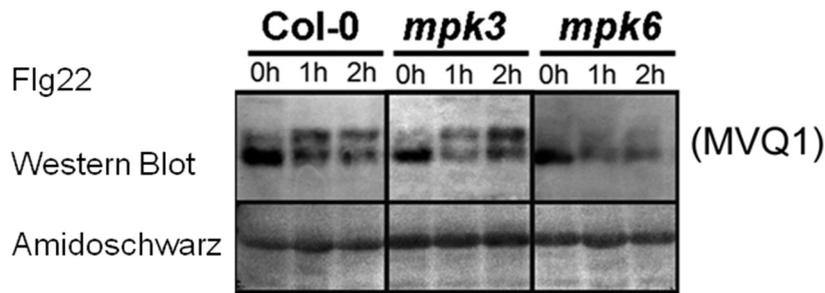
	Peptidsequenz	Position	Modifizierung	Ascore	Wahrscheinlichkeit	Anzahl Phosphorylierungen	Mascot Ion Score
P1	LTG <sup>p</sup> SPAHER	S100	Phos.	33,70	100%	1	39
P2	YLQNSMFAID <sup>p</sup> SNR	M201 / S206	Ox. / Phos.	1000,00 / 103,82	100% / 100%	1	70
P3	KEFSGL <sup>p</sup> SPLAPLV <sup>p</sup> SPR	S215 / S222	Phos. / Phos.	52,15 / 186,25	100% / 100%	2	58

**Abbildung 3-13: Darstellung der durch LC-MS/MS-Analysen identifizierten Phosphorylierungsstellen der MVQs MVQ1 - MVQ10.** Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen der MVQs, in denen die potentiellen Phosphorylierungsstellen (S/TP) durch einen Kreis markiert sind. Die in den LC-MS/MS-Experimenten erreichte Peptidabdeckung ist durch gelb eingefärbte Teilbereiche dargestellt. Eindeutige Phosphorylierungen (*Ascore* > 19) und andere Modifizierungen sind grün hervorgehoben. Violette Fragezeichen markieren nicht eindeutige Phosphorylierungen (*Ascore* < 19). Weitere Details der Messungen (d.h. Sequenzen gefundener Peptide mit Position der N-terminalen Aminosäure, ermittelte Modifizierung und statistische Angaben) können den Tabellen entnommen werden, in denen eindeutige Phosphorylierungen (Phos.)(*Ascore* > 19) rot hervorgehoben sind. Nicht eindeutige Phosphorylierungen (Phos.)(*Ascore* < 19) sind violett unterlegt und zusätzlich durch ein tief gestelltes „P“ in der Peptidsequenz indiziert. Nicht phosphorylierte potentielle MAPK-Phosphorylierungsstellen (n.p., nicht phosphoryliert) erhalten keine *Ascore*-Wertung und sind blau markiert. Detektierte oxidierte Methioninreste (Ox.) sind grau hervorgehoben.

### 3.3.3. Einfluss der Phosphorylierung von MVQ1 auf die Regulation der Immunantwort von *Arabidopsis thaliana*

#### 3.3.3.1. Identifizierung von MPK6 als für die *in vivo* Phosphorylierung hauptverantwortliche MAPK

Zunächst sollte untersucht werden, ob die Flg22-abhängigen MAPKs MPK3 und MPK6 auch *in vivo* für die Phosphorylierung von MVQ1 verantwortlich sind. Dazu wurde MVQ1 transient in Mesophyllprotoplasten aus *mpk3*- und *mpk6*-Linien überexprimiert und die Flg22-abhängige Phosphorylierung im Western Blot analysiert

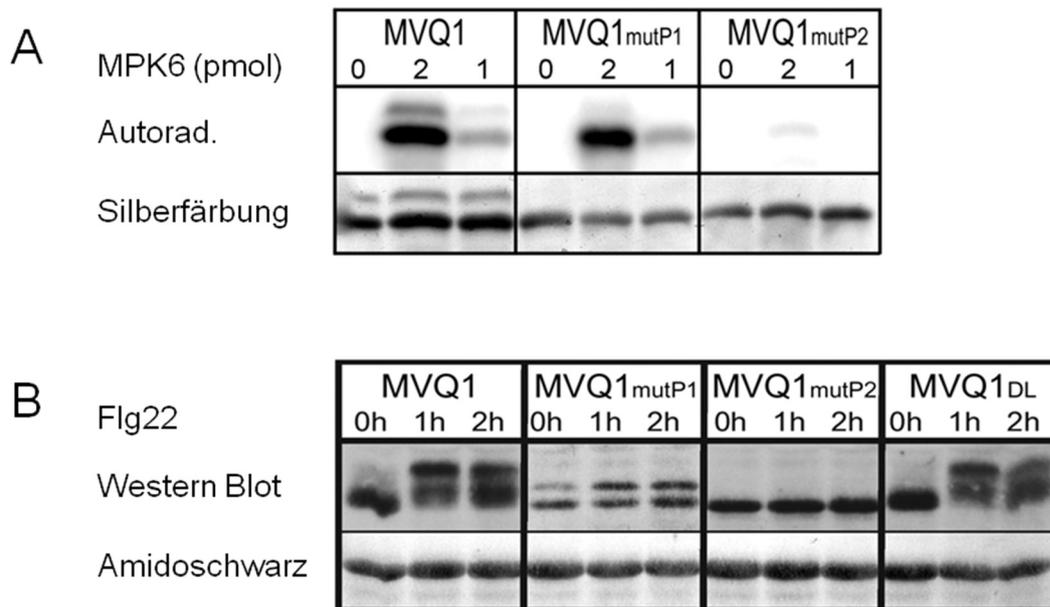


**Abbildung 3-14: Flg22-abhängige Phosphorylierung in *mpk3*- und *mpk6*-Knockout-Pflanzen.** HA-MVQ1 wurde transient in Mesophyllprotoplasten von Wildtyp-Pflanzen (Col-0) und in *mpk3*- und *mpk6*-Linien überexprimiert. Die Phosphorylierung von MVQ1 wurde nach Elicitierung der Protoplasten mit 100 nM Flg22 im Western-Blot analysiert. Die große Untereinheit der RuBisCO dient als Ladekontrolle (Amidoschwarz-Färbung). Die Protoplastentransformation, PAMP-Behandlung und Western Blot-Analyse mit Hilfe eines spezifischen Anti-HA-Antikörpers erfolgte durch Dr. Lennart Eschen-Lippold (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle).

(Abb. 3-14). Als Kontrolle dienten Mesophyllprotoplasten, die aus Blättern des Wildtyps Col-0 gewonnen wurden. Während die Flg22-abhängige Phosphorylierung in *mpk3*-Mesophyllprotoplasten nicht beeinträchtigt ist, ist die Phosphorylierung von MVQ1 in den *mpk6*-Zellen deutlich reduziert. Dadurch kann MPK6 eindeutig als hauptverantwortlich für die Flg22-abhängige *in vivo* Phosphorylierung von MVQ1 ausgewiesen werden. Auf Grundlage dieses Ergebnisses wurden die folgenden Untersuchungen zur Phosphorylierung von MVQ1 auf MPK6 beschränkt.

### 3.3.3.2. Generierung von MVQ1-Phosphorylierungsmutanten

Basierend auf den durch die LC-MS/MS Analyse detektierten Phosphorylierungsstellen (Kapitel 3.3.2) wurde die Neunfachvariante MVQ1mutP1 generiert, die folgende Aminosäureaustausche aufweist: S4A/S15A/T40A/T101A/S155A/S194A/S115A/T219A/S235A. In dieser Variante sind alle Serin- oder Threoninreste innerhalb der MAPK-Phosphorylierungsmotive, die einen Ascore > 19 zeigen, sowie die nicht abgedeckte potentielle Phosphorylierungsstelle S4 und die in der PhosPhat-Datenbank (Arsova und Schulze 2012) als phosphoryliert aufgeführte Phosphorylierungsstelle S235 gegen nicht modifizierbare Alaninreste ausgetauscht.



**Abbildung 3-15: Analyse der MVQ1-Phosphorylierungsmutanten****A) *In vitro* Phosphorylierungs-Experiment der MVQ-Varianten durch MPK6.** Umsatz von rekombinant hergestelltem und gereinigtem MVQ1 und dessen Phosphorylierungsvarianten MVQ1mutP1 und MVQ1mutP2 durch rekombinante MPK6. Die Kinase wurde zuvor durch rekombinante MKK5-DD aktiviert und in den angegebenen Konzentrationen für die *in vitro* Phosphorylierung eingesetzt. Die Verwendung äquivalenter Proteinmengen wurde durch Silberfärbung bestätigt. **B) Flg22-abhängige *in vivo* Phosphorylierung der MVQ-Phosphorylierungs-Varianten.** HA-MVQ1, HA-MVQ1mutP1, HA-MVQ1mutP2 und HA-MVQ1<sub>DL</sub> wurden transient in Mesophyllprotoplasten überexprimiert, die für die angegebenen Zeitpunkte mit 100 nM Flg22 eliciert wurden. Die große Untereinheit der RuBisCO dient als Ladekontrolle (Amidoschwarz-Färbung). Die Protoplastentransformation, PAMP-Behandlung und Western Blot-Analyse mit Hilfe eines spezifischen Anti-HA-Antikörpers erfolgte durch Dr. Lennart Eschen-Lippold (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle).

Um diese Phosphorylierungsstellen zu bestätigen, wurde zum einen die *in vitro* Phosphorylierung durch MPK6 sowie andererseits die *in vivo* Flg22-abhängige Phosphorylierung in Mesophyllprotoplasten analysiert (Abb. 3-15). Überraschenderweise konnte in beiden Experimenten eine Phosphorylierung der Mutante MVQ1mutP1 nachgewiesen werden, wenn auch die Phosphorylierungsstärke *in vitro* tendenziell verringert scheint (Abb. 3-15A). Zudem erscheint der durch die Flg22-abhängige Phosphorylierung hervorgerufene elektrophoretische Mobilitätsunterschied reduziert zu sein (Abb. 3-15B). Dies legte die Vermutung nahe, dass MPK6 in der Lage ist die verbliebenen drei Phosphorylierungsstellen der Mutante MVQ1mutP1 (S163, S175 und T178) zu phosphorylieren. Diese Vermutung wurde durch das Resultat untermauert, dass die Phosphorylierung von MVQ1 durch MPK6 nur durch die Mutation aller 12 Phosphorylierungsstellen in der Variante MVQ1mutP2

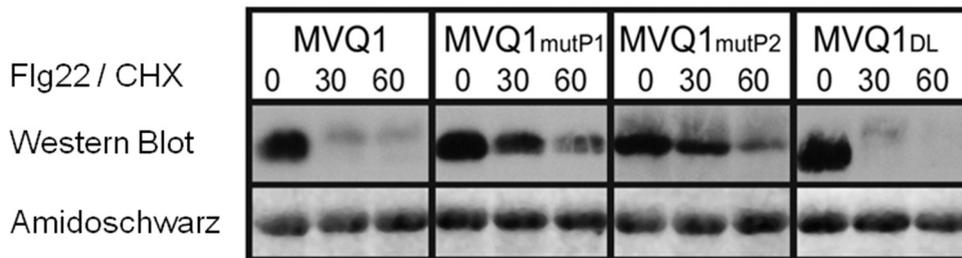
(zusätzliche Austausche gegen Alanin in den oben genannten Positionen) unterbunden werden konnte (Abb. 3-15A, B). Die Einbeziehung der VQ-Motiv-Variante MVQ1<sub>DL</sub> in das hier beschriebene Protoplastenexperiment diente der Bestätigung, dass das VQ-Motiv für die Proteinphosphorylierung nicht von Bedeutung ist.

Bemerkenswert ist, dass die Mutante MVQ1mutP2 eine besonders starke Überexpression zeigte. Verglichen mit dem Wildtyp-Protein MVQ1 war die Transformation von 30 % der Plasmid-DNA ausreichend, um eine vergleichbare Proteinmenge im Western-Blot zu detektieren (Abb. 3-15A).

### **3.3.3.3. Einfluss der Flg22-abhängigen Phosphorylierung durch MPK6 auf die Stabilität von MVQ1**

Wie bereits in Kapitel 3.3.1 erwähnt scheint die Flg22-abhängige Phosphorylierung von MVQ1 zur Destabilisierung des Proteins zu führen. Zur Bestätigung dieser Vermutung wurde die Stabilität von MVQ1, der Phosphorylierungsmutanten MVQ1mutP1 und MVQ1mutP2 sowie der WRKY-Interaktionsmutante MVQ1<sub>DL</sub> in Mesophyllprotoplasten analysiert. Zur verbesserten Visualisierung wurden die Protoplasten zusätzlich zu Flg22 mit CHX, einem Inhibitor der Proteinbiosynthese, behandelt (Abb. 3-16).

Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass die Phosphorylierungsstellen-Varianten MVQ1mutP1 und MVQ1mutP2 eine erhöhte Stabilität im Vergleich zu MVQ1 und MVQ1<sub>DL</sub> aufweisen, deren Proteinlevel schon nach 30 Minuten Inkubation mit Flg22 drastisch reduziert ist. Daraus folgt, dass die Flg22-abhängige Phosphorylierung die Stabilität von MVQ1 negativ beeinflusst. Diese Flg22-abhängige *in vivo* Proteinstabilisierung von MVQ1 durch MPK6-vermittelte Phosphorylierung und die spezifische Interaktion mit WRKYs (Kapitel 3.2.1) deuten darauf hin, dass MVQ1 in der Regulation der PAMP-induzierten, durch WRKYs regulierten Immunantwort eine Rolle spielt, die über die phosphorylierungsabhängige Stabilität von MVQ1 gesteuert wird. Durch die folgenden Analysen sollen diese Zusammenhänge vertiefend untersucht werden.



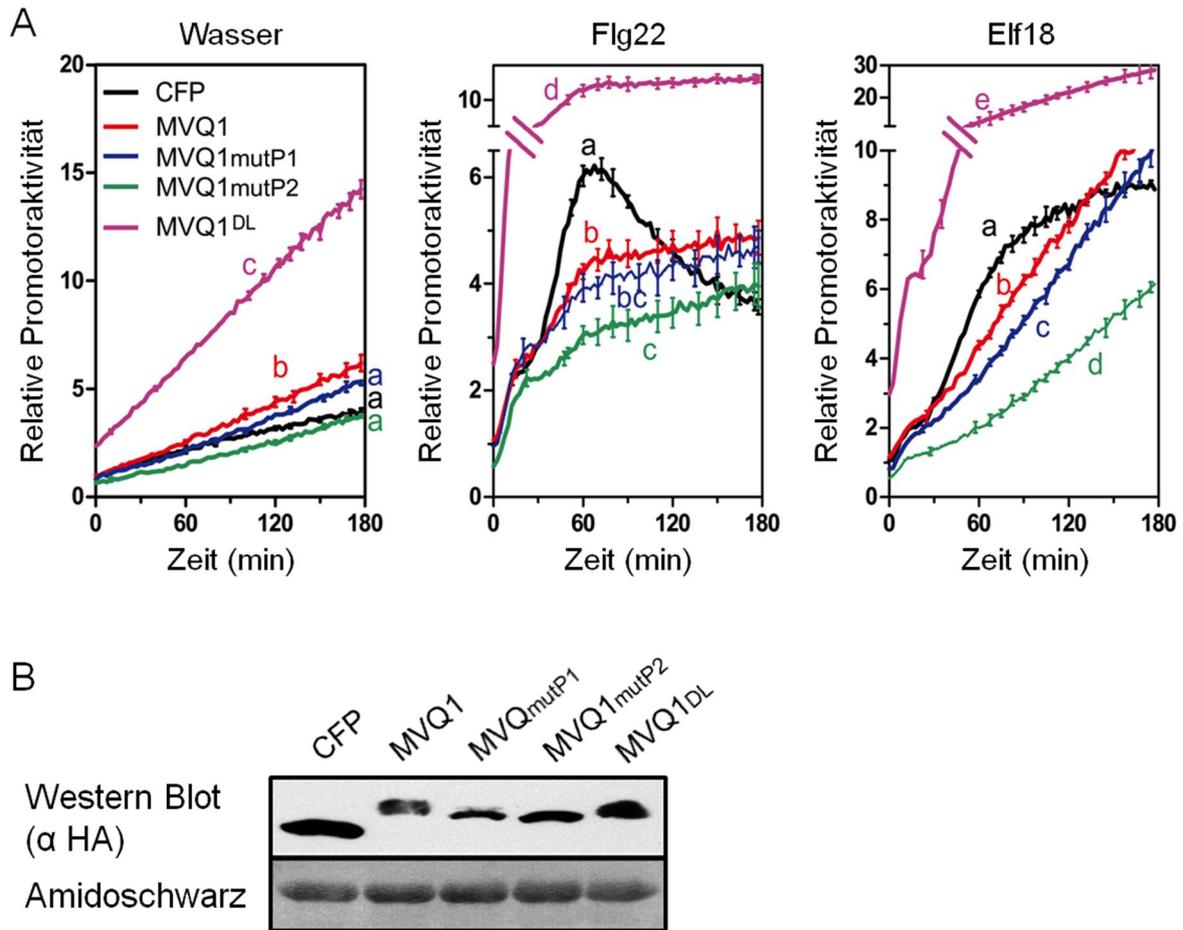
**Abbildung 3-16: Einfluss der MVQ1-Phosphorylierung auf die Proteinstabilität.**

*Arabidopsis*-Mesophyllprotoplasten, die HA-MVQ1 bzw. die Mutanten HA-MVQ1<sub>mutP1</sub>, HA-MVQ1<sub>mutP2</sub> bzw. HA-MVQ1<sub>DL</sub> transient überexprimierten, wurden für die angegebene Zeitspanne (Angaben in Minuten) mit 100 nM Flg22 behandelt. Die zeitgleiche Behandlung mit 1 µM Cycloheximid (CHX), einem Inhibitor der Proteinbiosynthese, ermöglicht eine gezielte Untersuchung der Proteinstabilität durch die anschließende Western Blot-Analyse mit Hilfe eines spezifischen Anti-HA-Antikörpers. Die große Untereinheit der RuBisCO dient als Ladekontrolle (Amidoschwarz-Färbung). Die experimentelle Durchführung erfolgte durch Dr. Lennart Eschen-Lippold (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle).

**3.4. Einfluss von MVQ1 auf die Aktivität des *NHL10*-Promotors**

WRKYs sind als Transkriptionsfaktoren für die Regulation der Aktivitäten verschiedenster Abwehrgene verantwortlich (Kapitel 1.5.3.2). Bisher konnte für MVQ1 kein konkreter Hinweis auf eine WRKY-abhängige Regulation der Genexpression gezeigt werden. In einem protoplastenbasierten Assay sollte der Einfluss von MVQ1 auf die Aktivität des PAMP-induzierbaren Promotors des Gens *NDR1/HIN1-LIKE 10* (*NHL10*) untersucht werden, da bekannt ist dass die Aktivität dieses Promotors partiell durch MAPK-Kaskaden reguliert wird (Boudsocq et al. 2010).

Zur Untersuchung des Einflusses von MVQ1 auf den *NHL10*-Promotor wurden *Arabidopsis*-Mesophyllprotoplasten mit zwei verschiedenen Elicitoren (Flg22, Elf18) oder als Kontrolle mit Wasser behandelt, welche zum einen MVQ1 als HA-fusioniertes Konstrukt (HA-MVQ1) unter der Kontrolle des starken Überexpressions-promotors 35S und zum anderen Luziferase (LUC) unter der Kontrolle des *NHL10*-Promotors exprimierten. Sollte die Überexpression von MVQ1 die Aktivität des *NHL10*-Promotors beeinflussen, lässt sich dieser Effekt anhand der spektroskopischen Detektion der Luziferaseaktivität, d.h. anhand des Umsatzes des Substrates Luziferin verfolgen (Abb. 3-17A). Als Kontrolle wurde CFP verwendet, welches anstelle von MVQ1 überexprimiert wurde. CFP beeinflusst dabei die Aktivität



**Abbildung 3-17: Einfluss der Phosphorylierung von MVQ1 bzw. dessen Interaktion mit WRKY-Transkriptionsfaktoren auf die Aktivität des *NHL10*-Promotors.** **A) Promotoraktivitäten nach PAMP-Behandlung.** *Arabidopsis*-Mesophyllprotoplasten wurden mit einem *pNHL10::LUC*-Reporterkonstrukt zur Expression des Luziferasegens (LUC) unter der Kontrolle des *NHL10*-Promotors transformiert. Zur Untersuchung des Einflusses der MVQ1-Varianten auf die Aktivität des *NHL10*-Promotors wurden diese als *p35S::HA-MVQ1*-Konstrukte kotransformiert, die der Expression des Proteins und dessen Varianten unter der Kontrolle des starken 35S-Promotors dienen. Als Kontrolle wurde statt des *p35S::HA-MVQ1*-Konstruktes ein *p35S::CFP*-Konstrukt kotransformiert, da CFP die Aktivität des *NHL10*-Promotors nicht beeinflusst. Der Einfluss der Überexpression der MVQ1-Proteine auf die *NHL10*-Promotoraktivität konnte anschließend in Abhängigkeit von der Behandlung mit den PAMPs Flg22 und Elf18 (je 100 nM) über die Luziferaseaktivität ermittelt werden. Als Kontrolle erfolgte die Behandlung mit Wasser. Um verschiedene Protoplastentransformationen vergleichen zu können, erfolgte eine Kotransformation eines *pUBQ10::Glucuronidase (GUS)*-Konstruktes zur Normalisierung über die Bestimmung der GUS-Aktivität. Fehlerbalken geben den Standardfehler an (n = 3). Die Promotoraktivität der CFP-überexprimierenden Protoplasten zum Zeitpunkt t = 0 wurde als Referenzwert (entspricht einer relativen Promotoraktivität von 1) zur Darstellung der relativen Promotoraktivitäten genutzt. Farbige Buchstaben geben die statistischen Signifikanzklassen an, die über eine Zweifache-ANOVA mit anschließender multipler Vergleichsanalyse nach Bonferroni bestimmt wurden. In drei unabhängigen Experimenten konnten gleiche Ergebnisse erzielt werden. Auf Grund starker Überlappung der Fehlerbalken der relativen *NHL10*-Promotoraktivitäten bei

Überexpression der Phosphorylierungsmutanten wurden zur besseren Visualisierung die Fehlerbalken einiger Messwerte herausgenommen. **B) Western Blot-Analyse der Protoplasten nach Messung der Promotoraktivität.** Die Expression der transformierten Konstrukte wurde durch eine Western Blot-Analyse mit Hilfe eines spezifischen Anti-HA-Antikörpers bestätigt. Die große Untereinheit der RuBisCO dient als Ladekontrolle (Amidoschwarz-Färbung). Die experimentelle Durchführung erfolgte durch Dr. Lennart Eschen-Lippold (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle).

des *NHL10*-Promotors nicht. In Abb. 3-17A ist zudem die Aktivität des *NHL10*-Promotors nach Elicitorbehandlung in Abhängigkeit von der Überexpression von MVQ1, der Phosphorylierungsmutanten MVQ1mutP1 und MVQ1mutP2 sowie der WRKY-Interaktionsvariante MVQ1<sub>DL</sub> graphisch dargestellt.

In CFP-exprimierenden Protoplasten lässt sich der nicht beeinflusste Verlauf der *NHL10*-Promotoraktivität nach Behandlung mit Flg22 bzw. Elf18 beobachten. Die Promotoraktivität steigt in beiden Fällen nach Behandlung mit den entsprechenden PAMPs stark an. Im Fall von Flg22 zeigt sie nach ca. 60 Minuten einen Höhepunkt und fällt anschließend wieder ab. Auch die Behandlung mit Elf18 führt zu einem rasanten Anstieg der Promotoraktivität, die nach etwa 150 Minuten in ein Plateau übergeht und im weiteren Verlauf wieder abfällt (Daten nicht gezeigt). Diese Elicitor-induzierte Aktivierung des Promotors wird supprimiert, wenn MVQ1 in den Protoplasten überexprimiert wird (Abb. 3-17A). Die Überexpression der Phosphorylierungsmotiv-Variante MVQ1mutP1 bewirkt eine leichte Verstärkung dieses Supprimierungseffekts. Am deutlichsten wird der *NHL10*-Promotor durch die Überexpression der zweiten Phosphorylierungs-Mutante MVQ1mutP2 supprimiert. Im Gegensatz hierzu zeigt die Überexpression von MVQ1<sub>DL</sub> einen stimulierenden Effekt auf die basale Promotor-Aktivität (vergleiche Wasserkontrolle in Abb. 3-17A), der nach PAMP-Behandlung noch deutlicher ausgeprägt ist. Zusammenfassend zeigt MVQ1 eine deutliche Supprimierung der Aktivität des PAMP-induzierbaren *NHL10*-Promotors, die durch dessen Phosphorylierung bzw. Stabilität und Interaktionsfähigkeit mit WRKYs beeinflusst wird. In der *NHL10*-Promotorsequenz können zwei WRKY-Bindedomänen (W-Boxen) identifiziert werden, was auf eine Regulation der Aktivität des Promotors über WRKYs hindeutet. Ob das Vorhandensein dieser W-Boxen und somit eine WRKY-abhängige Regulierung für die PAMP-induzierte Aktivität des *NHL10*-Promotors essentiell sind, sollte in einem weiteren Experiment geklärt werden.

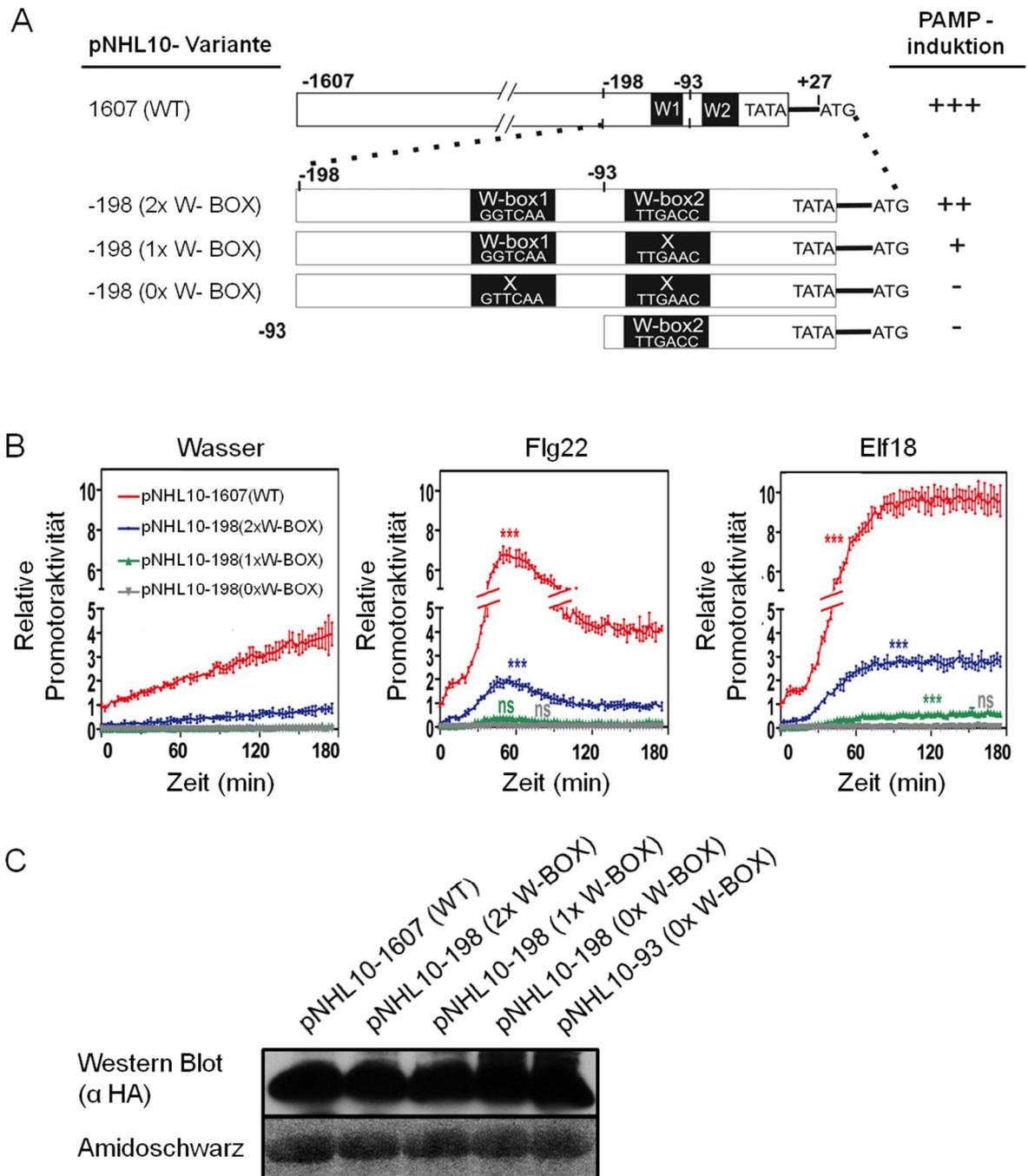
### 3.4.1. Einfluss der W-Boxen auf die PAMP-induzierte Aktivität des *NHL10*-Promotors

Die W-Boxen des *NHL10*-Promotors bestehen aus zwei kurzen Nukleotidsequenzen, die 198 Nukleotide vom Transkriptionsursprung entfernt sind. Um den Einfluss der W-Boxen auf die Promotoraktivität zu untersuchen wurden Mesophyllprotoplasten mit verschiedenen *NHL10*-Promotorkonstrukten transformiert, welche die Expression des LUC-Reportergens kontrollieren. Die verwendeten Konstrukte sind in Abb. 3-18A schematisch dargestellt. Neben dem Konstrukt mit der Sequenz des Wildtyp-Promotors wurden verkürzte Konstrukte generiert, in denen die W-Boxen wie angegeben mutiert wurden.

Verkürzt man den *NHL10*-Promotor bis auf 198 Nukleotide stromaufwärts des Startcodons des Luziferasegens und lässt die beiden W-Boxen intakt (Konstrukt *pNHL10-198* [2x W-Box] in Abb. 3-18A) kann noch ein Viertel der Promotoraktivität des Wildtyp-Promotors (Konstrukt *pNHL10-1607* [WT]) erzielt werden (Abb. 3-18B). Die Mutation einer der W-Boxen (Konstrukt *pNHL10-198* [1x W-Box] in Abb. 3-18A) führt zu einer weiteren Reduktion der Promotoraktivität. Werden beide W-Boxen mutiert (Konstrukt *pNHL10-198* [0x W-Box] in Abb. 3-18A) kann keine Promotoraktivität mehr verzeichnet werden. Dies ist auch der Fall, wenn W-Box 1 deletiert wird (*pNHL10-93* [1x W-Box], in Abb. 3-18A) (relative Luziferaseaktivität nicht gezeigt). Die Aktivität des *NHL10*-Promotors ist demnach abhängig von den beiden W-Boxen und speziell von W-Box 1. Die verringerte Induzierbarkeit der verkürzten Promotorvariante *pNHL10-198* (2x W-Box) (Abb. 3-18B) lässt vermuten, dass sich in dem Bereich stromaufwärts der Nukleotidposition -198 *Enhancer*-Elemente befinden, die zu einer Verstärkung der Promotoraktivität beitragen.

Zusammenfassend untermauern diese Ergebnisse die Hypothese, dass MVQ1 die *NHL10*-Promotoraktivität über die Interaktion mit WRKYs beeinflusst. Wie im vorangegangenen Abschnitt (Kapitel 3.4) gezeigt, wird die *NHL10*-Promotoraktivität drastisch erhöht, wenn die WRKY-Interaktionsmutante MVQ1<sub>DL</sub> in den Protoplasten überexprimiert wird.

Da auch der Austausch der VQ-Region von MVQ1 gegen die VQ-Region von MVQ8 zum Verlust der Fähigkeit zur Interaktion mit den WRKYs führt (Kapitel 3.2.2), sollte in einer weiteren Aktivitätsstudie untersucht werden ob diese Mutante einen ähnlichen Einfluss auf den *NHL10*-Promotor hat.



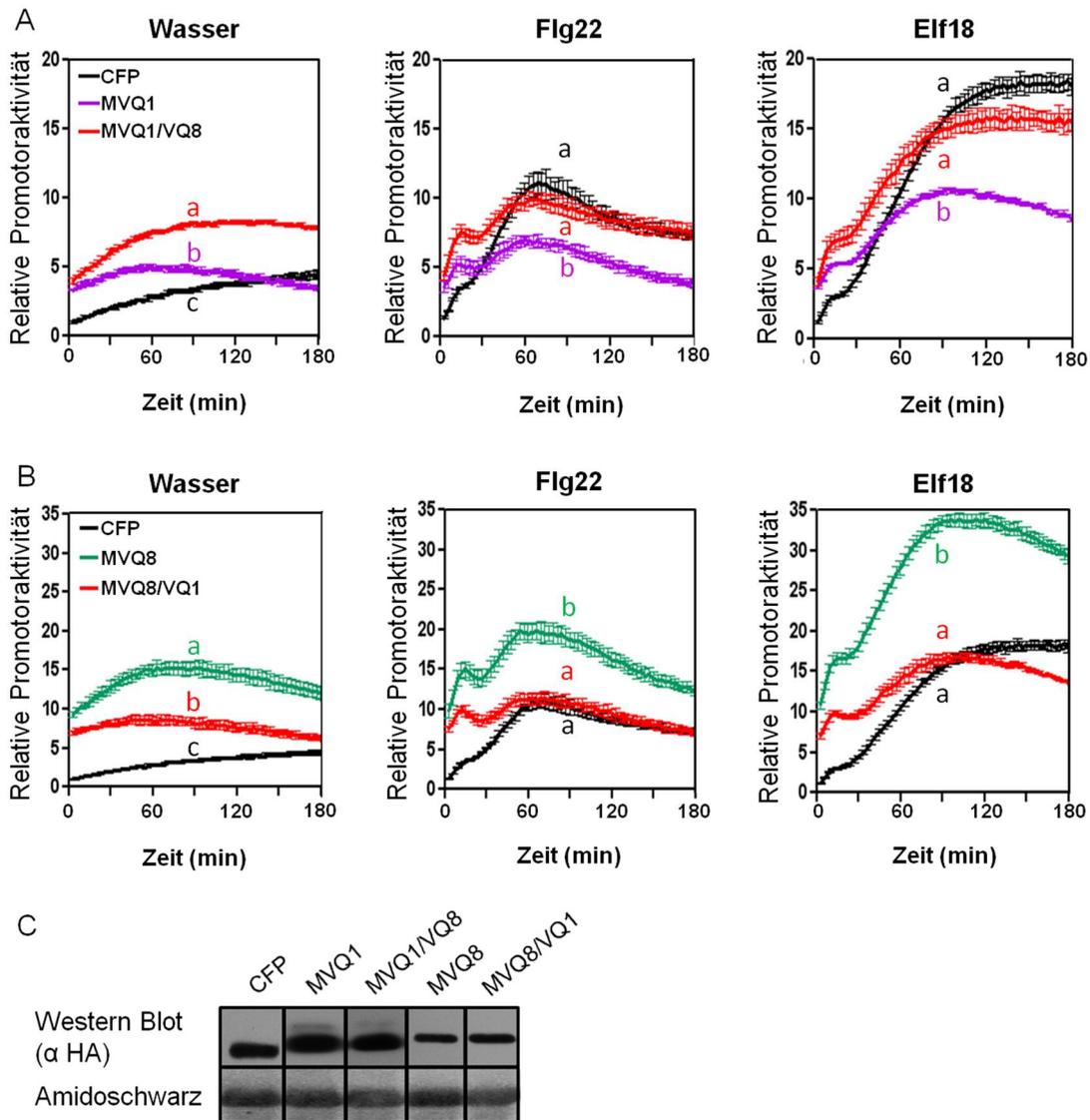
**Abbildung 3-18: Einfluss der W-Boxen auf die Aktivität des *NHL10*-Promotors.**  
**A) Schematische Darstellung der verwendeten *NHL10*-Promotorvarianten.** Dargestellt ist der native *NHL10*-Promotor mit einer Länge von 1607 Nukleotiden, der sich stromabwärts des Startcodons des Luziferasegens befindet. Bei den verwendeten verkürzten Promotoren sind die W-Boxen entweder durch Mutation inaktiviert bzw. entfernt worden. Die Induzierbarkeit der *NHL10*-Promotorvarianten durch die PAMPs Elf18 und Flg22 ist durch “+/-“ Symbole gekennzeichnet (“+++“ = stark induzierbar, “++“ = mäßig induzierbar, “+“ = schwach induzierbar, “-“ = nicht induzierbar). **B) Promotoraktivitäten der *NHL10*-Promotorvarianten nach PAMP-Behandlung.** *Arabidopsis*-Mesophyllprotoplasten wurden mit einem *pNHL10::LUC*-Reporterkonstrukt zur Expression des Luziferasegens (LUC) unter der Kontrolle der unter 3-18 A dargestellten *NHL10*-Promotorvarianten transformiert. Der Einfluss der

Mutation oder Entfernung der W-Boxen in den *NHL10*-Promotorvarianten auf die *NHL10*-Promotoraktivität konnte anschließend in Abhängigkeit der Behandlung mit den PAMPs Flg22 und Eif18 (je 100 nM) über die Luziferaseaktivität ermittelt werden. Als Kontrolle erfolgte die Behandlung mit Wasser. Um verschiedene Protoplastentransformationen vergleichen zu können erfolgte eine Koprotransformation eines *pUBQ10::GUS* Konstruktes zur Normalisierung über die Bestimmung der GUS-Aktivität. Fehlerbalken geben den Standardfehler an (n=3). Die Promotoraktivität der CFP-überexprimierenden Protoplasten zum Zeitpunkt t=0 wurde als Referenzwert (entspricht einer relativen Promotoraktivität von 1) zur Darstellung der relativen Promotoraktivitäten genutzt. Die Signifikanzanalyse erfolgte über eine Einwegs-ANOVA-Berechnung durch Vergleich der Messwerte nach PAMP-Induktion mit denen der Wasserkontrolle (\*=p≤0,05; \*\*=p≤0,01; \*\*\*=p≤0,001). **C) Western Blot-Analyse der Protoplasten nach Messung der Promotoraktivität.** Die Expression der transformierten Konstrukte wurde durch Western Blot-Analyse mit Hilfe eines spezifischen Anti-HA-Antikörpers bestätigt. Die große Untereinheit der RuBisCO dient als Ladekontrolle (Amidoschwarz-Färbung). Die experimentelle Durchführung erfolgte durch Dr. Lennart Eschen-Lippold (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle).

### 3.4.2. Einfluss des Austausches der VQ-Regionen von MVQ1 und MVQ8 auf die *NHL10*-Promotoraktivität

In Abb. 3-19 sind die Einflüsse der Überexpression von MVQ1 und MVQ8 bzw. deren VQ-Regionen-Austauschvarianten MVQ1/VQ8 und MVQ8/VQ1 (siehe Kapitel 3.2.2) auf die Aktivität des *NHL10*-Promotors dargestellt. Die Überexpression von MVQ8 führt zu einer ähnlich starken Erhöhung der *NHL10*-Promotoraktivität, ebenso wie die Überexpression von MVQ1<sub>DL</sub> (Abb. 3-17A). Die Variante MVQ1/VQ8 hingegen, die ebenso wie MVQ<sub>DL</sub> nicht zur Interaktion mit WRKY-Transkriptionsfaktoren fähig ist, übt einen schwächeren Aktivierungseffekt auf den *NHL10*-Promotor aus (Abb. 3-19A). Schließlich ist die relative *NHL10*-Promotoraktivität bei Überexpression von MVQ1/VQ8 nicht mehr signifikant unterschiedlich zur CFP-Kontrolle. Der Austausch der VQ-Region von MVQ1 gegen die VQ-Region von MVQ8 (Variante MVQ1/VQ8) scheint somit zu einem Verlust des Suppressionseffektes zu führen, der bei Überexpression von MVQ1 zu beobachten war (Abb. 3-17A). Das gegensätzliche Phänomen lässt sich bei Austausch der VQ-Region von MVQ8 gegen die VQ-Region von MVQ1 (MVQ8/VQ1) beobachten, wodurch der starke Aktivierungseffekt von MVQ8 auf den *NHL10*-Promotor aufgehoben wird (Abb. 3-19B).

Die Gesamtheit der *NHL10*-Promotorstudien deutet letztendlich darauf hin, dass MVQ1 in der Lage ist, die durch die Detektion bakterieller PAMPs ausgelöste pflanzliche Immunantwort zu modulieren.

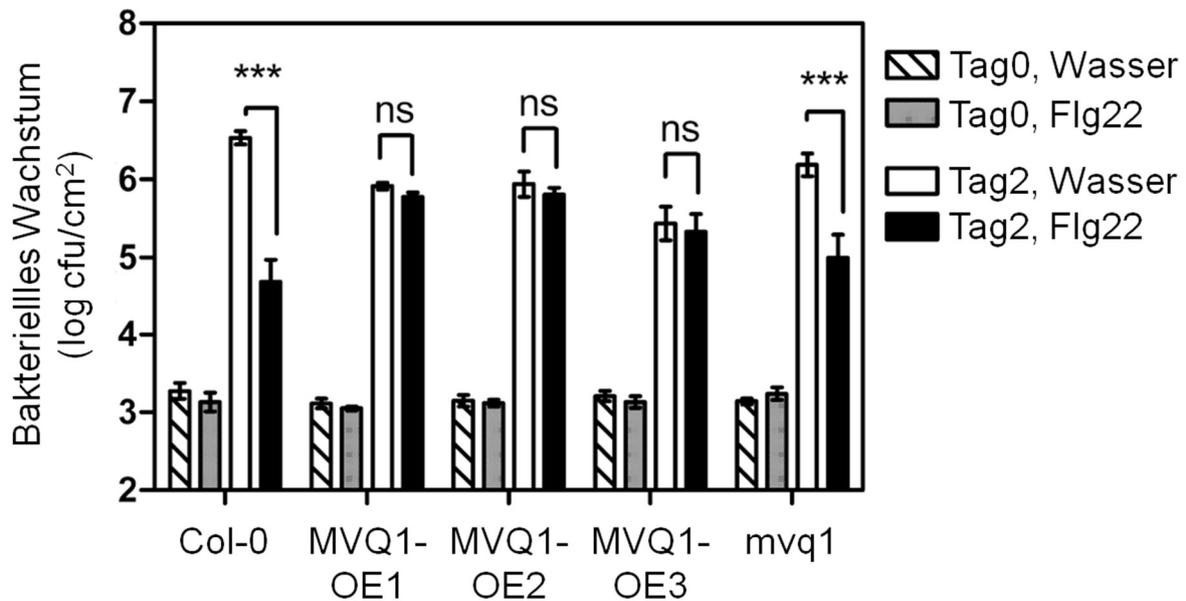


**Abbildung 3-19: Einfluss des Austausches der VQ-Regionen von MVQ1 und MVQ8 auf die Aktivität des *NHL10*-Promotors. A / B) Promotoraktivitäten nach PAMP-Behandlung.** *Arabidopsis*-Mesophyllprotoplasten wurden mit einem *pNHL10::LUC*-Reporterkonstrukt zur Expression der Luziferase (LUC) unter der Kontrolle des *NHL10*-Promotors transformiert. Um den Einfluss der HA-MVQ-Proteine oder deren Varianten HA-MVQ1/VQ8 (A) und HA-MVQ8/VQ1 (B) auf die Aktivität des *NHL10*-Promotors zu untersuchen wurden *p35S::MVQ1*-Konstrukte kotransformiert, die der Expression der *MVQ1*-Varianten unter der Kontrolle des starken *35S*-Promotors dienen. Als Kontrolle wurde statt des *p35S::HA-MVQ1*-Konstruktes ein *p35S::CFP*-Konstrukt kotransformiert, da CFP die Aktivität des *NHL10*-Promotors nicht beeinflusst. Der Einfluss der Überexpression auf die *NHL10*-Promotoraktivität konnte anschließend in Abhängigkeit der Behandlung mit den PAMPs Flg22 und Elf18 (je 100 nM) über die Luziferaseaktivität ermittelt werden. Als Kontrolle erfolgte die Behandlung mit Wasser. Um verschiedene Protoplastentransformationen vergleichen zu können wurde ein *pUBQ10::GUS*-Konstrukt kotransformiert. Dies dient der Normalisierung auf Basis der GUS-Aktivitäten. Fehlerbalken geben den Standardfehler an (n = 3). Die Promotoraktivität der CFP-überexprimierenden Protoplasten zum Zeitpunkt t = 0 wurde als Referenzwert (entspricht einer relativen Promotoraktivität von 1) zur Darstellung der relativen Promotoraktivitäten genutzt.

Farbige Buchstaben geben die statistischen Signifikanzklassen an, die über eine Zweiwege-ANOVA mit anschließender multipler Vergleichsanalyse nach Bonferroni bestimmt wurden. In drei unabhängigen Experimenten konnten gleiche Ergebnisse erzielt werden. **C) Western Blot-Analyse der Protoplasten nach Messung der Promotoraktivität.** Die Expression der transformierten Konstrukte wurde durch Western Blot-Analyse mit Hilfe eines spezifischen Anti-HA-Antikörpers bestätigt. Die große Untereinheit der RuBisCO dient als Ladekontrolle (Amidoschwarz-Färbung). Die experimentelle Durchführung erfolgte durch Dr. Lennart Eschen-Lippold (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle).

### **3.5. Einfluss von MVQ1 auf die PAMP-induzierte Resistenz von *Arabidopsis thaliana* gegenüber *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000**

Um den Verdacht zu konkretisieren dass MVQ1 in die pflanzliche Pathogenabwehr involviert ist wurde ein Pathogenitätsassay durchgeführt, bei dem der Einfluss des VQ-Proteins auf die PAMP-induzierte Resistenz gegenüber dem hemibiotrophen Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Pst DC3000) untersucht wurde. Das Resultat des Experiments ist in Abb. 3-20 dargestellt. Analysiert man das bakterielle Wachstum von Pst DC3000 in *Arabidopsis*-Blättern, die 12 Stunden zuvor mit Flg22 infiltriert wurden, lässt sich beobachten, dass die Bakterienzahl im Vergleich zur Wasserkontrolle deutlich reduziert ist. (Abb. 3-20, Col-0-Proben). Dieser Effekt wird als PAMP-induzierte Resistenz bezeichnet. In das Experiment wurden auch transgene Pflanzenlinien einbezogen, in denen MVQ1 überexprimiert wurde (Linien MVQ1-OE1 - MVQ1-OE3) oder durch T-DNA-Insertion deletiert wurde (*mvq1*-Linie). Während die Deletion von MVQ1 keinen signifikanten Einfluss auf die PAMP-induzierte Resistenz gegenüber Pst DC3000 hat zeigen die drei unabhängigen Überexpressionslinien einen vollständigen Verlust der PAMP-induzierten Resistenz gegenüber dem Pathogen (Abb. 3-20). Dieser Befund zeigt deutlich, dass mit MVQ1 ein weiteres VQ identifiziert werden konnte, dass in die PAMP-induzierte pflanzliche Immunabwehr von *Arabidopsis thaliana* involviert ist.



**Abbildung 3-20: Einfluss von MVQ1 auf die PAMP-induzierte Resistenz von *Arabidopsis thaliana* gegenüber *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Pst DC3000).** Voll ausgebildete Blätter von 5 Wochen alten Pflanzen (unabhängige Linien von MVQ1-Überexpressionslinien, einer *mvq1*-Linie und Wildtyp (Col-0)-Pflanzen als Kontrolle) wurden mit 1  $\mu$ M Flg22 bzw. als Kontrolle mit Wasser vorinfiltriert. Nach 24 Stunden erfolgte die Infiltration dieser Blätter mit Pst DC3000 ( $1 \cdot 10^5$  colony forming units (cfu) ml<sup>-1</sup>). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die koloniebildenden Einheiten durch Ausplattieren von Extraktverdünnungen aus Blattscheiben einheitlicher Größe bestimmt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an (n = 6). Das dargestellte Experiment wurde durch Dr. Justin Lee (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle) durchgeführt. Die Signifikanzanalyse erfolgte mittels Student's t-Test (\* = p  $\leq$  0,05; \*\* = p  $\leq$  0,01; \*\*\* = p  $\leq$  0,001). In zwei unabhängigen Experimenten konnten gleiche Ergebnisse erzielt werden.

## 4. Diskussion und Ausblick

### 4.1. Zwei Gruppen von VQ-Proteinen werden durch stressaktivierte MAPKs phosphoryliert

Im Vorfeld dieser Arbeit wiesen Vorarbeiten aus dem Arbeitskreis Lee (IPB Halle) auf eine Involvierung gewisser VQ-Proteine in der Signaltransduktion von *Arabidopsis thaliana* hin. Diese Studien beinhalteten ein initiales Y2H-Screening nach MAPK-Interaktoren (Zusammenarbeit mit Dr. Joachim Uhrig, Universität Köln) und die Charakterisierung von drei der gefundenen potentiellen Substrate (VQ4, VQ32 und VQ33) hinsichtlich ihrer zellulären Lokalisation (bimolekulare Fluoreszenzkomplementations (BiFC)-Studie von Katja Kuhle und Gerit Bethke, IPB Halle) (Pecher et al. 2014).

Durch weiterführende Experimente, die umfassende Y2H-Interaktionssudien (Kapitel 3.1.2) und *in vitro* Phosphorylierungsexperimente (Kapitel 3.1.3) beinhalteten, konnten weitere neue Substrate von zwei stressaktivierten MAPKs in *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden, die ebenfalls der Familie der VQ-Motiv tragenden Proteine angehören. Anhand der Sequenzhomologie, die bei verwandten Proteinen häufig auf eine ähnliche biologische Funktion hindeutet, wurden die 34 im *Arabidopsis*-Genom codierten VQs in zehn Gruppen unterteilt (Kapitel 3.1.1). Tatsächlich konnten speziell die den Gruppen I und II angehörenden VQs als Interaktionspartner und *in vitro* Substrate von MPK3 und MPK6 nachgewiesen werden (Kapitel 3.1.2 und 3.1.3), womit zugleich die Sinnmäßigkeit dieser Unterteilung bestätigt wird. Dabei weist die spezifische Phosphorylierung durch MPK3 und MPK6 – zwei von insgesamt vier MAPKs mit nachgewiesener Funktion innerhalb der PAMP-induzierten Immunantwort (Bethke et al. 2012, Eschen-Lippold et al. 2012) – auf eine potentielle Rolle in der Pathogenabwehr in *Arabidopsis thaliana* hin.

Die Ergebnisse der Y2H-Analysen für die VQ-Proteine der Gruppen I und II (zur Abgrenzung von den nicht durch MPK3/6 phosphorylierbaren VQs nachfolgend als MVQs bezeichnet) scheinen in einigen Fällen nicht mit den Ergebnissen der *in vitro* Phosphorylierungen zu korrelieren. So konnten für MVQ2, MVQ5 und MVQ6 keine Interaktionen mit MPK3 bzw. darüber hinaus für MVQ8 keine Interaktion mit MPK6 nachgewiesen werden (Kapitel 3.1.2), obwohl diese VQs *in vitro* durch MPK3 und MPK6 phosphoryliert werden (Kapitel 3.1.3). Solche Abweichungen werden vermutlich durch bekannte Schwachpunkte der verwendeten Assays hervorgerufen. Es ist

beispielsweise möglich, dass manche Interaktionen in einer Y2H-Analyse nicht detektiert werden können. Es handelt sich hierbei zwar um eine *in vivo* Methode, bei der jedoch Hefe als Expressionswirt verwendet wird. Manche Interaktionen, die in Pflanzenzellen stattfinden, können in den Hefezellen eventuell nicht realisiert werden. Zum Beispiel ist die Detektion von indirekten Protein-Protein-Interaktionen (bei denen ein drittes Protein die Interaktion zweier Proteine vermittelt) in einem solchen Assay naturgemäß unmöglich, wenn dieses dritte „Adapterprotein“ - beispielsweise in Unkenntnis seiner Bedeutung für die entsprechende Interaktion - nicht in den Hefezellen koexprimiert wird. Ebenso können transiente Interaktionen oft nur schwer oder überhaupt nicht detektiert werden. Desweiteren könnte die Interaktion zwischen zwei Proteinen bestimmte physiologische Bedingungen erfordern, die in den Hefezellen nicht gegeben sind. Zum Beispiel kann ein stark erhöhtes Expressionsniveau innerhalb der Hefezellen oder Proteinfehlfaltung Einfluss auf Proteinwechselwirkungen haben und eine Interaktion vortäuschen oder unterdrücken. Im Gegensatz dazu kann auch die Durchführung des *in vivo* Phosphorylierungsassays zu falsch positiven Ergebnissen führen, welche durch unphysiologische Bedingungen begünstigt werden, wie der Einsatz unnatürlich hoher Konzentrationen an Substraten und Kinasen. Die Glaubwürdigkeit der im Y2H und durch *in vitro* Phosphorylierung erhaltenen Ergebnisse für MVQ2, MVQ5 und MVQ6 kann durch eine Kombination der unterschiedlichen Methoden abgeschätzt werden. Im Fall nicht detektierbarer Interaktionen zwischen MVQs und MPK3 bzw. MPK6 lassen die Ergebnisse des *in vitro* Phosphorylierungsassays eine Interaktion der Proteine zumindest *in vitro* vermuten. Zur endgültigen Klärung der Interaktionsfrage *in vivo* bedarf es jedoch der Nutzung alternativer Methoden, wobei sich insbesondere der Nachweis mittels Koimmunopräzipitation oder mit Hilfe von BiFC anbieten.

Für die Durchführung des *in vitro* Phosphorylierungsassays wurde eine vorherige Reinigung der VQs unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt, welche eine effektive Reinigung der Proteine unter Vermeidung von Abbau- und Denaturierungsprozessen (wie Proteolyse während der Extraktion und Reinigung, unzureichende Stabilität der nativen Proteine) ermöglicht (Kapitel 3.1.3). Diese Strategie umgeht die Reinigung der Proteine in nativer Form, die sich oft als schwierig herausstellt und meist langwierige Etablierungsprozesse erfordert, ehe gereinigtes Protein in einer nutzbaren Menge vorliegt. Im Anschluss wurden die VQs rückgefaltet, während diese über den Hexahistidin-Tag an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose immobilisiert waren.

Solche Rückfaltungsprozesse können häufig durch eine Bindung an eine Trägermatrix unterstützt werden (Herabsetzung der Aggregationsneigung). Die Kinasereaktion konnte direkt mit den immobilisierten Substraten durchgeführt werden. Diese Methode erwies sich als effektiv, um eine schnelle Analyse der *in vitro* Phosphorylierung der Vielzahl an bearbeiteten VQs zu ermöglichen, weist allerdings das potentielle Risiko fehlerhafter Ergebnisse durch im Einzelfall falsch rückgefalteter Proteine auf. Allerdings unterstützt die im Protoplastensystem gefundene Phosphorylierung der VQs (siehe Kapitel 4.3) die These, dass es sich bei den Ergebnissen des *in vitro* Assays nicht um Artefakte handelt und dass eine derartige Modifizierung zudem auch *in planta* auftritt.

Unter den VQ-Proteinen mit einer überdurchschnittlich hohen Anzahl putativer Phosphorylierungsstellen werden die Vertreter der Gruppe I und II (MVQ1 bis MVQ10), die auch in der Y2H-Analyse mit MPK3 oder/und MPK6 interagieren und eine erhöhte Homologie aufweisen, welche auf ähnliche biologische Funktionen hinweist, spezifisch im *in vitro* Phosphorylierungsassay modifiziert. Die Spezifität der Kinase-Enzyme wird durch den Befund untermauert, dass z.B. VQ21 (12 putative Phosphorylierungsstellen) nicht umgesetzt wird. Im Fall von MVQ1 korrelieren die dargestellten Ergebnisse mit Ergebnissen aus zwei Phosphoproteom-Experimenten, in deren Rahmen dieses VQ-Protein als potentielles *in vivo* MAPK-Substrat identifiziert werden konnte (Höhenwarter et al. 2012, Lassowskat et al. 2014). Auch die in der PhosPhat-Datenbank annotierten Phosphorylierungsstellen für MVQ1 konnten in der massenspektrometrischen Analyse bestätigt werden (Kapitel 3.3.2). Darüber hinaus konnten zwei weitere Threonin-Reste (T40 und T101) als putative Phosphorylierungsstellen detektiert werden, so dass MVQ1 eine Tendenz zur multiplen Phosphorylierung durch MPK6 an bis zu neun seiner zwölf potentiellen Phosphorylierungsstellen zeigt. Ähnliche Ergebnisse wurden für die übrigen MVQs (MVQ2 - MVQ10) erhalten. Auch bei MVQ8, welches im Y2H-Assay nicht mit MAPKs interagiert (Kapitel 3.1.2), lassen die gefundenen Phosphorylierungen auf eine dennoch vorhandene physische Interaktion schließen. Eine möglicherweise fehlende Funktionalität des für erstere Analyse verwendeten MVQ8-Y2H-Konstrukts scheint dabei durch dessen mit MYB-Transkriptionsfaktoren gezeigtes Interaktionsvermögen (Kapitel 3.1.2) ausgeschlossen. Mit Hilfe von Mutationsstudien, in denen hochkonservierte Aminosäuren des VQ-Motivs gegen Reste mit gegensätzlichen Eigenschaften ausgetauscht wurden (MVQ<sub>DL</sub>-Varianten, Kapitel 3.1.4) konnte

anschließend gezeigt werden, dass die Integrität des Motivs nicht notwendig für eine funktionelle Interaktion mit den entsprechenden MAPKs zu sein scheint.

Zusammenfassend konnten zehn neue putative Substrate (MVQ1 bis MVQ10) der stressaktivierten MAPKs MPK3 und MPK6 identifiziert und deren Phosphorylierung im *in vitro* System durch LC-MS/MS-Analysen nachgewiesen werden.

#### **4.2. Das VQ-Motiv vermittelt die Interaktion von MVQ-Proteinen mit WRKY-Transkriptionsfaktoren**

Zusätzlich zu den im vorangegangenen Abschnitt diskutierten Ergebnissen zur MAPK-vermittelten Phosphorylierung der VQs (Kapitel 4.1) deutete eine zunehmende Anzahl von Literaturquellen darauf hin, dass die VQ-Genfamilie mit der Signaltransduktion in der Pathogenabwehr in Verbindung steht (Jing und Lin 2015). Insbesondere die Interaktion mit WRKY-Transkriptionsfaktoren – einer Superfamilie von pflanzlichen Regulatorproteinen (Kapitel 1.5.3) – scheint dabei eine übergeordnete Rolle zu spielen (siehe Abb. 3-1, Kapitel 1.5.2). Eine aus diesem Grund durchgeführte Y2H-Analyse, die einen Großteil der im Genom von *Arabidopsis thaliana* kodierten WRKY-Proteine umfasste, indizierte eine Vielzahl von Interaktionen speziell mit Vertretern zweier Untergruppen (I und IIC) der Transkriptionsfaktoren mit den oben beschriebenen MVQs (Kapitel 3.2.1). Eine gleichzeitig mit dieser Arbeit durchgeführte Studie (Cheng et al. 2012) zum Interaktionsverhalten von WRKY-Transkriptionsfaktoren mit VQs zeigt sich im Einklang mit diesen Ergebnissen. An Stelle der Vollängen-Proteine wurden in dieser Studie allerdings nur die isolierten WRKY-Domänen ausgewählter repräsentativer Vertreter der Untergruppen I und IIC verwendet. Im Gegensatz zur Bindung an andere Interaktoren – wie der zur Phosphorylierung notwendigen Bindung der MVQs an MPK3 bzw. MPK6 – ist die Interaktion mit den WRKY-Transkriptionsfaktoren an das Vorhandensein eines intakten VQ-Motivs gebunden. Diese Tatsache wurde anhand von drei komplementären experimentellen Strategien unter Beweis gestellt:

(I) Die Substitution der hochkonservierten Reste Valin und Glutamin gegen Aminosäuren mit gegensätzlichen Eigenschaften (Asparaginsäure und Leucin in den beschriebenen MVQ<sub>DL</sub>-Varianten) führt zum Verlust der WRKY-Bindung.

(II) Eine weiterführende Analyse des VQ-Motivs basierte auf dem unterschiedlichen Interaktionsverhalten von MVQ1 und MVQ8. Letzteres besitzt ein VQ-Motiv, das nur

eine geringe Sequenzidentität zu den homologen Regionen der übrigen MVQs aufweist (Kapitel 3.1.1). Eine Bindung an WRKY-Transkriptionsfaktoren wird für MVQ8 nicht beobachtet (Kapitel 3.2.1). Der Austausch des VQ-Motivs gegen die homologe Region von MVQ1 (welches ein prototypisches VQ-Motiv aufweist) überträgt dessen Fähigkeit zur Interaktion mit WRKYs (Kapitel 3.2.2), und *vice versa*. Eine nachfolgende Mutations-Analyse der VQ-Region von MVQ1, bei der die Aminosäuren des VQ-Motivs sequentiell gegen Alanin (Kapitel 3.2.3) substituiert wurden, identifizierte die für die Interaktion essentiellen Positionen. Neben dem zentralen Dipeptid Valin-Glutamin tragen weitere vorwiegend hydrophobe Reste in unmittelbarer Nähe und in den terminalen Bereichen des Motivs wesentlich zur Interaktion bei. Interessanterweise resultierten Mutationen dieser Bereiche des VQ-Motivs in MVQ8 (in Analogie zu dem VQ-Motiv von MVQ1) nicht in einer interaktionsfähigen MVQ8-Variante (Kapitel 3.2.4). Möglicherweise ist eine komplexere "Komposition" des VQ-Motivs notwendig, um eine Interaktion mit WRKYs zu gewährleisten.

(III) Eine Fusion des VQ-Motivs von MVQ1 an einen entsprechenden Proteinpartner (experimentell für GAL4-AD gezeigt) führt im Y2H-Assay zur *de novo* Interaktion mit WRKY-Proteinen (Kapitel 3.2.5).

Die Bedeutung des VQ-Motivs für die Interaktion mit WRKYs wurde inzwischen auch *in planta* anhand einer BiFC-Studie zur Kollokalisierung von MVQ1 und WRKY33/68 unter Beweis gestellt (Weyhe et al. 2014).

Interessanterweise können MVQ-Proteine auch mit anderen Klassen von Transkriptionsfaktoren interagieren, was an dieser Stelle für ausgewählte Proteine (MYB-Faktoren, TGA4) gezeigt wurde. Für diese Interaktion scheint ein funktionales VQ-Motiv jedoch nicht zwingend erforderlich zu sein (Kapitel 3.2.1). Zusammenfassend konnten bekannte Interaktionen zwischen WRKY-Faktoren und VQ-Proteinen (siehe Abb. 1-3 und Kapitel 3.2.1) bestätigt und weitere gruppenselektive Wechselwirkungen aufgedeckt werden. Die Fähigkeit zur Interaktion wurde dabei detailliert auf sequenzspezifische Charakteristika des VQ-Motivs zurückgeführt. Durch den größeren Umfang der vorliegenden Studie im Vergleich zu den Interaktionsstudien von Cheng et al. (2012) konnten demgegenüber Unterschiede im Bindungsverhalten nachgewiesen werden. Fast alle WRKY-Proteine der Untergruppen I und IIC können mit mehr als einem MVQ interagieren, wobei aber unterschiedliche Selektivitäten zu beobachten sind (Abb. 3-5). Aus diesen häufig

überlappenden Bindungsspezifitäten lässt sich im zellulären Kontext auf eine Konkurrenz um eine Bindung an WRKY-Interaktionspartner schließen, sobald eine Koexpression mehrerer interaktionsfähiger VQ-Proteine vorliegt. Beispielsweise könnten bis zu zehn VQs (MVQ1-5, MVQ10, VQ8, VQ16, VQ21 und VQ23) im Wettbewerb um die Interaktion mit WRKY33 treten – einem Transkriptionsfaktor, der vielfach als Regulator der Expression von Abwehrgenen beschrieben wurde (Kapitel 1.5.3.2). Denkbar ist zudem, dass die in Kapitel 4.1 diskutierte Phosphorylierung durch MPK3/6 und das Auftreten von Spleißvarianten ohne VQ-Motiv (möglich im Fall von MVQ1, MVQ6, MVQ9 und VQ2, siehe Kapitel 3.1.1) potentielle Regulationsmechanismen dieses „Konkurrenzkampfes“ darstellen.

Das VQ-Motiv stellt einen relativ kleinen funktionalen Bereich der VQ-Proteine dar, das spezifisch in pflanzlichen Proteinen vorkommt (Jing und Lin 2015). Im Zusammenhang mit den hier präsentierten Ergebnissen ergeben sich für nachfolgende Arbeiten zwei interessante Fragestellungen: Aus dem Vorhandensein des Motivs in Proteinen mit ansonsten geringer Homologie (Kapitel 3.1.1) ergibt sich die Fragestellung, ob sich dieses Sequenzmotiv während der Evolution aus einem gemeinsamen Vorläufer entwickelt hat oder mehrfach unabhängig in nicht näher verwandten Proteinen entstanden ist. Andererseits stellt sich die Frage nach den strukturellen Hintergründen, die das VQ-Motiv befähigen mit verschiedenen Klassen von Transkriptionsfaktoren zu interagieren oder zu dessen Funktionsverlust (im Fall von MVQ8) führen. Einen Einblick in diese Sachverhalte könnten eine Co-Kristallisation der rekombinant hergestellten MVQs mit einem ausgewählten WRKY-Faktor oder die Untersuchung isolierter VQ-Peptide mittels Kernresonanz-Spektroskopie geben.

#### **4.3. Die *in vivo* Phosphorylierung von MVQ-Proteinen induziert deren Abbau**

Proteinphosphorylierungen spielen eine herausragende Rolle in der Regulierung von Prozessen innerhalb einer Zelle. Neben der weit verbreiteten Funktion in der Signaltransduktion beeinflussen sie zelluläre Vorgänge in vielfältiger Weise. Ein direkter Effekt besteht oft in der durch Phosphorylierung vermittelten Verminderung oder Erhöhung der Aktivität, worauf zum Beispiel die erhöhte Produktion von Stickstoffmonoxid nach Modifizierung der Nitratreduktase beruht (Wang et al. 2011). Oftmals basieren diese Veränderungen auf einer Veränderung der Tertiärstruktur des

Proteins. Dies kann häufig auch die Stabilität der Proteine beeinträchtigen, da Änderungen in der Faltung das Protein thermodynamisch destabilisieren können oder für Proteasen leichter zugänglicher machen. Ein bekanntes Beispiel für letzteren Effekt stellt die Regulation der Synthese des Hormons Ethylen dar: Durch Phosphorylierung wird die Stabilität diverser Transkriptionsfaktoren sowie die Stabilität der für die Biosynthese des Hormons hauptverantwortlichen Enzyme reguliert (Liu und Zhang 2004, Bethke et al. 2009, Yoo et al. 2008). Spezifische Phosphorylierungen können Proteine auch direkt für die Degradation durch komplexe proteolytische Abbauege markieren (Meng und Zhang 2013, Lee et al. 2015).

Interessanterweise scheint das Expressionsniveau der MVQ-Proteine in *Arabidopsis* genau auf diese Weise reguliert zu werden. Eine Modifizierung der Proteine MVQ1-6 und von MVQ10 im Protoplastensystem kann in Western Blot-Analysen anhand einer charakteristischen Mobilitätsveränderung nachgewiesen werden (Kapitel 3.3.1). Die Reversibilität des Effekts bei nachfolgender Inkubation mit Phosphatase weist die Modifizierung als Proteinphosphorylierung aus. Bei diesen *in vivo* Experimenten ist der Anteil an phosphoryliertem MVQ-Protein speziell bei Behandlung mit Flg22 stark erhöht. Die geringere Phosphorylierung der Proteine in mit Wasser behandelten Kontrollen lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass (I) während der Isolierung der Protoplasten freigesetzte DAMPs eine geringe Induktion der MAPK-Signalwegs bewirken (ersichtlich an den zum Zeitpunkt  $t = 0$  h genommenen Proben in Abb. 3-11), und (II) mechanischer Stress (bzw. osmotischer Effekt durch Wasser Zugabe) während der nachfolgenden Behandlung der „schutzlosen“ zellwandfreien Protoplasten sich in gleicher Weise auswirkt. Die Phosphorylierung der MVQ-Proteine im Protoplastensystem scheint dabei hauptsächlich durch die in die Pathogenabwehr involvierte Kinase MPK6 katalysiert zu werden (Kapitel 3.3.3.1).

In *in vitro* Kinasereaktionen mit MPK6 werden in den MVQ-Proteinen stets mehrere der putativen Phosphorylierungsstellen modifiziert (Kapitel 3.3.2). Diese Tatsache wird dabei durch den Befund komplementiert, dass eine Variante von MVQ1 (MVQ1mutP2), in der die Gesamtheit der potentiell phosphorylierbaren Reste nicht funktional sind (Austausch aller in S/TP-Motiven lokalisierten Serin- oder Threoninreste gegen Alanin) im Protoplastensystem keine Modifizierung zeigt. Im Gegensatz ist die Phosphorylierung bei der Variante MVQ1mutP1 (Austausch von 9 der 12 potentiell modifizierbaren Reste) zwar stark reduziert aber nicht vollständig unterdrückt (Kapitel 3.3.3.2). Die Phosphorylierung von MVQ1 geht dabei mit einer

Destabilisierung des Proteins in den Protoplasten einher (Kapitel 3.3.3.3), d.h. dieses wird nach Elicitierung der Zellen mit Flg22 innerhalb einer kurzen Zeit (30 min) fast vollständig abgebaut. Dieser Abbau ist andererseits für beide Phosphorylierungsstellen-Varianten deutlich verlangsamt (Kapitel 3.3.3.3). Die Schlussfolgerung, dass die zelluläre Konzentration von MVQ1 durch seine Phosphorylierung reguliert wird, wird zusätzlich durch die Beobachtung gestützt, dass für die Mutante MVQ1mutP1 eine bemerkenswert effiziente Überexpression des transformierten Gens (d.h. eine vergleichbare zelluläre Proteinmenge trotz stark verringerter Plasmidkonzentration während der Transfektion) beobachtet werden konnte (siehe Abb. 3-15A).

Zusammengenommen weisen die hier gezeigten Daten auf eine durch MPK6 vermittelte Phosphorylierung von MVQ1 in *Arabidopsis* hin, welche eine Antwort auf die Stimulation durch PAMPs darstellt und zu einem schnellen Abbau des Proteins beiträgt. Die ebenfalls für MVQ2-6 und MVQ10 beobachtete Verringerung der Proteinkonzentration nach Flg22-Behandlung (Kapitel 3.3.1) weist auf eine gleichartige Regulation hin, die in weiterführenden Experimenten durch Generierung von entsprechenden Phosphorylierungsstellen-Varianten bestätigt werden sollte. In Bezug auf eine Beteiligung der Proteine an der pflanzlichen Pathogenabwehr stellt dieser Mechanismus einen Weg zur Freisetzung von WRKY-Transkriptionsfaktoren dar. Wahrscheinlich liegen diese im nicht elicierten Zustand als bi- oder höhermolekulare Komplexe mit MVQs vor. Nach Erkennung von PAMPs wird das MVQ abgebaut und die dadurch frei werdenden WRKYs können nachfolgend ihre Funktion als Transkriptionsmodulatoren wahrnehmen – ein Mechanismus, der an die durch JAZ-Proteine regulierte Expression von JA-abhängigen Genen erinnert (Abb. 1-3E) und der auch als Grundlage des darauf folgenden Abbaus von VQ22 (JAV1) vermutet wird (Zhu und Zhu 2013). Denkbar ist auch, dass weitere in der Zelle vorhandene Bindungspartner nun die Stelle des MVQ-Proteins einnehmen und dieser Austausch zu einer entsprechenden Abwehrreaktion führt. Durch eine potentielle gewebe- und/oder entwicklungspezifische Expression verschiedener Kombinationen an WRKY-Transkriptionsfaktoren und MVQs ergeben sich daraus vielfältige Möglichkeiten zur differentiellen Regulation von Abwehrprozessen. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die Steuerung der Expression des *PAD3*-Promotors in der Camalexin-Biosynthese durch WRKY33 (Abb. 1-3D) vollkommen verschiedenartig verläuft: Hier ist der Komplex aus dem Transkriptionsfaktor und dem VQ-Protein (hier MKS1) die eigentliche transkriptionsaktivierende Komponente, die sich durch

Phosphorylierung aus dem ternären Komplex mit der Kinase MPK4 löst. Eine Destabilisierung von MKS1 wird in diesem Fall nur in untergeordnetem Maße beobachtet (Qiu et al. 2008a).

Weiterführende Experimente zu dieser Problematik könnten sich der Frage widmen, durch welche Mechanismen die beobachtete Destabilisierung der phosphorylierten MVQ-Proteine erfolgt. An dieser Stelle wäre ein durch generelle Mechanismen vermittelter Abbau – speziell die Spaltung durch das Proteasom – oder eine Proteolyse durch spezifische Proteasen denkbar, wobei die erstgenannte Alternative experimentell beispielsweise durch den Einsatz selektiver Inhibitoren nachweisbar ist (Kolodziejek und van der Hoorn 2010).

#### **4.4 Hypothesen zur Funktion der MVQs in der PAMP-induzierten Immunantwort**

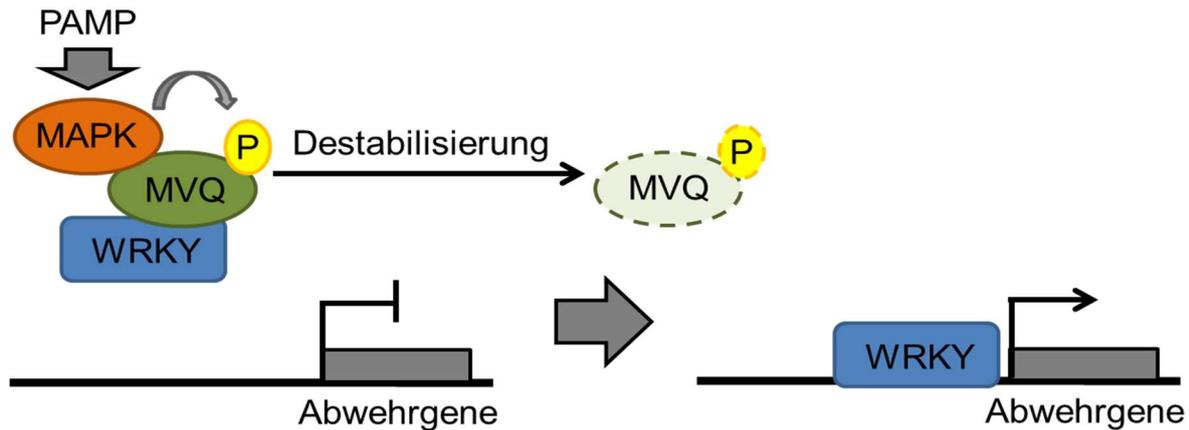
Die bis hierhin diskutierten biochemischen Analysen ließen vermuten, dass MVQs eine wichtige Rolle in der PAMP-induzierten Immunantwort einnehmen. Diese Vermutung konnte durch einen Pathogenassay (Kapitel 3.5.) untermauert werden, in dem *Arabidopsis* MVQ1-Überexpressionslinien nicht mehr zum Aufbau einer Flg22-induzierten Resistenzhöhung gegen das bakterielle Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 fähig waren. Wie MVQs die pflanzliche Immunantwort beeinflussen könnten soll abschließend auf Grundlage der in Kapitel 3.4 durchgeführten *NHL10*-Promotor-Aktivitätsstudien näher beleuchtet werden.

##### **4.4.1 MVQs als Regulatoren der WRKY-vermittelten Expression von Abwehrgenen**

In umfangreichen Promotor-Aktivitätsstudien konnte der Einfluss verschiedener MVQs (MVQ1, MVQ8 sowie diverse Mutanten mit verändertem VQ-Motiv) auf die PAMP-abhängige Induktion des *NHL10*-Promotors untersucht werden (Kapitel 3.4). Dieser enthält zwei für eine maximale Induzierbarkeit notwendige W-Boxen, wodurch eine massgebliche Regulation durch WRKY-Bindung angenommen werden kann. Wird MVQ1 in *Arabidopsis*-Protoplasten überexprimiert, die mit dem *NHL10*-Reporter-Konstrukt kotransformiert wurden, lässt sich erkennen, dass die PAMP induzierte Aktivierung des *NHL10*-Promotors signifikant supprimiert wird (Kapitel 3.4, Abb. 3.17)). Dieser Effekt tritt verstärkt auf, wenn anstelle des Wildtyp-Proteins die

Phosphorylierungsmutanten MVQ1mutP1 oder MVQ1mutP2 überexprimiert werden. Auf Grundlage dieser Ergebnisse konnte ein einfaches Modell aufgestellt werden, das die Regulation von Abwehrgenen in einem Dialog aus MVQs, MAPKs und WRKYs erklären könnte (Abb. 4-1). Dieses Modell geht davon aus, dass verschiedene Abwehrgene positiv durch WRKYs (speziell durch Proteine der Gruppen I und IIc wie z.B. WRKY33) reguliert werden. MVQs sind in der Lage mit den WRKYs dieser Gruppen zu interagieren und verhindern dadurch deren Promotoraktivierung oder Promotorbindung, wodurch die beobachtete Suppression des *NHL10*-Promotors durch MVQ1 erklärt werden kann. Dieser Einfluss wird reguliert durch PAMP-abhängige MAPKs, die eine Destabilisierung der MVQs nach Phosphorylierung hervorrufen (wie zuvor für den PAMP Flg22 gezeigt (Kapitel 3.3.3.3)). Daher kann eine verstärkte Suppression des *NHL10*-Promotors beobachtet werden, wenn man die Phosphorylierungsmutanten MVQ1mutP1 oder MVQ1mutP2 überexprimiert. Diese werden weniger (MVQ1mutP1) bzw. überhaupt nicht (MVQ1mutP2) phosphoryliert, woraus ein nach PAMP-Erkennung stark verringerter Abbau resultiert. Durch den Abbau der MVQs werden die WRKYs aus dem WRKY-MVQ-Inhibierungskomplex entlassen und können anschließend die Transkription ihrer Ziel-Abwehrgene induzieren.

An dieser Stelle soll noch einmal auf die unterschiedlichen Supprimierungseffekte der beiden MVQ1-Phosphorylierungsmutanten eingegangen werden. Die Tatsache, dass MVQ1mutP2 (bei dem alle Phosphorylierungsmotive mutiert vorliegen) eine stärkere Supprimierung des Promotors hervorruft als MVQ1mutP1 (bei dem nur die Phosphorylierungsstellen mutiert wurden, die zuvor durch massenspektrometrische Analysen als MPK6-Zielmotive identifiziert wurden) deutet darauf hin, dass auch *in vivo* alle potentiellen Phosphorylierungsstellen von MVQ1 durch MAPKs phosphoryliert werden können. Dies bestätigt die Ergebnisse zur *in vitro* Phosphorylierung der Proteine (Kapitel 3.3.3.2) und spricht gegen eine unspezifische Phosphorylierung durch einen Überschuss an MPK6 im verwendeten *in vitro* Phosphorylierungsassay.



**Abbildung 4-1: Modell zur Rolle von MVQs als Inhibitoren der WRKY-vermittelten Expression von Abwehrgenen.** MVQ1 interagiert mit WRKYs, die die Expression von Abwehrgenen positiv regulieren, und inhibiert somit deren Aktivität. Die rezeptorvermittelte PAMP-erkennung aktiviert MAPK-Kaskaden, die zur Phosphorylierung von MVQ1 und damit zu dessen Destabilisierung (proteolytischer Abbau, angedeutet durch unterbrochene Konturlinien und schwächere Farbgebung) führen. Frei werdende WRKYs können in Folge die Transkription von Abwehrgenen induzieren.

Das vorgestellte Modell vermag jedoch einige Effekte, die im *NHL10*-Promotorassay beobachtet werden nicht zu erklären. Die Überexpression von MVQ1 führt zu einer in der Kontrollbehandlung der Protoplasten mit Wasser zu einer leichten aber signifikanten Erhöhung der Promotoraktivität. Nach dem obigen Modell wäre auch hier eine Supprimierung des Promotors zu erwarten, der durch die Interaktion mit WRKYs hervorgerufen wird. Einen weitaus stärkeren Effekt zeigt die Überexpression der MVQ1<sub>DL</sub>-Variante, die nicht mehr zur Interaktion mit WRKYs fähig ist. Nach dem Modell sollte diese Mutante nicht zu einer WRKY-vermittelten Aktivierung des *NHL10*-Promotors fähig sein und die Messwerte sollten denen der Kontrolle (Überexpression von CFP) ähneln. Stattdessen ruft die Expression von MVQ1<sub>DL</sub> eine signifikante Hyperaktivierung des Promotors hervor. Hierbei könnte es sich um ein Artefakt handeln, das durch eine Mißregulation hervorgerufen wird und durch die unphysiologisch hohe Konzentration des stark überproduzierten MVQ1<sub>DL</sub>-Proteins verstärkt wird.

Interessanterweise führt auch die Überexpression von MVQ8 zu einer Verstärkung der *NHL10*-Promotoraktivität. MVQ8 kann nicht mit WRKYs interagieren und sollte nach diesem Modell die *NHL10*-Promotoraktivität nicht beeinflussen. Ebenso ruft die interaktionsunfähige MVQ1/VQ8-Variante, bei der das VQ-Motiv von MVQ1 gegen das VQ-Motiv von MVQ8 ausgetauscht ist, eine Aktivierung des Promotors hervor. Diese

Ergebnisse lassen eine weitaus komplexere Regulation von Abwehrgenen durch die MVQs und WRKYs vermuten.

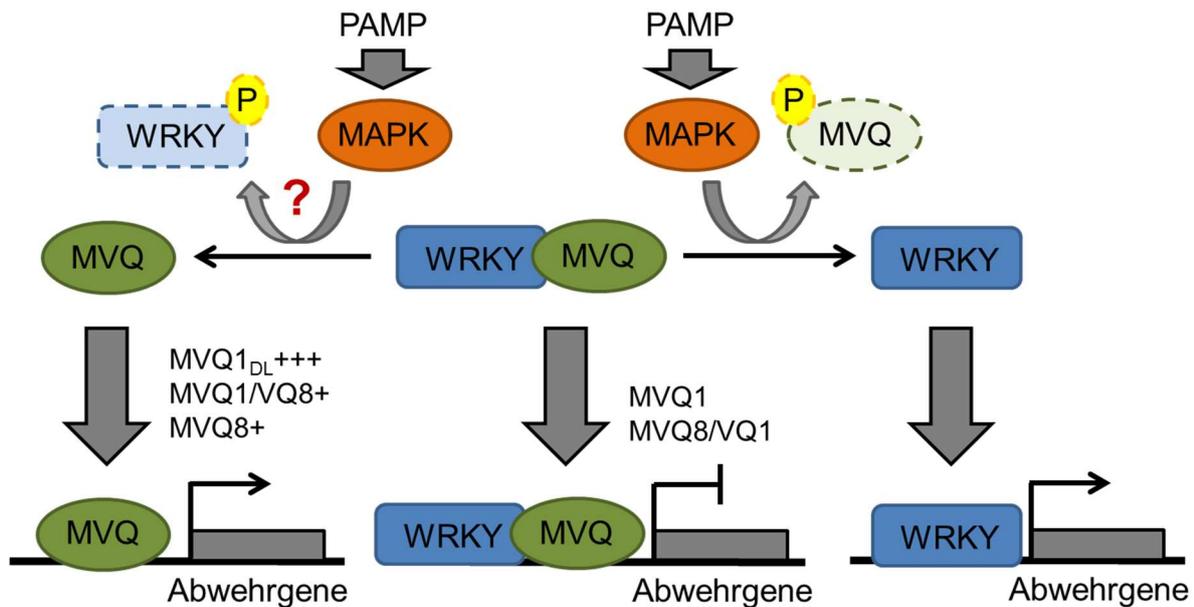
#### **4.4.2 Die Aktivierung von Abwehrgenen im komplexen Dialog von MVQs, WRKYs und MAPKs**

In der folgenden Hypothese gehen wir davon aus, dass MVQs selbst die Expression von Abwehrgenen aktivieren können und demzufolge selbst Transkriptionsaktivität besitzen. Basis dieser Annahme ist die oben geschilderte Beobachtung, dass eine MVQ-vermittelte Aktivierung von Abwehrgenen nur auftritt, wenn keine Interaktion mit WRKYs stattfindet. Im verwendeten Promotorassay lässt sich eine solche MVQ1-vermittelte Promotoraktivierung daher nur beobachten, wenn die Interaktionsfähigkeit von MVQ1 mit WRKYs unterbunden wird. Dabei scheint die Stärke der Aktivierung durch das VQ-Motiv selbst determiniert zu sein. Das VQ-Motiv von MVQ1 ruft eine Hyperaktivierung des *NHL10*-Promotors hervor, während das VQ-Motiv von MVQ8 zu einer weitaus geringeren Aktivierung nach Wasserbehandlung führt.

Im Einklang mit dieser Theorie führt die Überexpression der VQ-Motiv-Austauschvarianten von MVQ1 und MVQ8 im nicht-elicitierten Zustand (Wasser-Kontrolle) zur Aktivierung des *NHL10*-Promotors. Dabei zeigt der Austausch des VQ-Motivs von MVQ1 gegen das VQ-Motiv von MVQ8 eine mit MVQ8 vergleichbare Aktivierung. Umgekehrt führt der Austausch des VQ-Motivs von MVQ8 gegen das VQ-Motiv von MVQ1 zu einer geringeren Aktivierung, wie sie nach Überexpression von MVQ1 selbst zu beobachten ist (Kapitel 3.4.2). Nach PAMP-Behandlung ist der für MVQ1 beobachtbare supprimierende Effekt aufgehoben, wenn man das VQ-Motiv von MVQ8 in das Protein einführt (Variante MVQ1/VQ8). Der reziproke Ansatz zeigt einen gegenteiligen Effekt: die Aktivierung des Promotors durch MVQ8 wird durch Austausch dessen VQ-Motivs gegen das VQ-Motiv von MVQ1 aufgehoben. Um die hier vorgestellte Theorie weiter zu untermauern wäre es interessant zu untersuchen, ob eine MVQ8/VQ1<sub>DL</sub>-Variante (d.h. ein MVQ8-Protein, welches das interaktionsunfähige VQ-Motiv von MVQ1 trägt) ebenfalls eine Hyperaktivierung des *NHL10*-Promotors induziert.

Ein auf den oben beschriebenen Effekten basierendes zweites Modell (Abb. 4-2) soll verdeutlichen, wie die Regulation von Abwehrgenen in einem Dialog aus WRKYs und MVQs unter Einfluss MAPK-abhängiger Phosphorylierung reguliert sein könnte. Wie bereits erwähnt, vermögen MVQs die Expression von Abwehrgenen zu induzieren (die starke Induktion im Fall von MVQ1<sub>DL</sub> und die schwächere Induktion im Fall von MVQ8 und MVQ1/VQ8 sind in der Abb. 4-2 durch (+++) und (+) symbolisiert). Für solche MVQs die mit WRKYs interagieren können (MVQ1-MVQ7, MVQ9 und MVQ10) wird deren Transkriptionsaktivität jedoch in Anwesenheit der WRKYs durch Interaktion supprimiert. Gleiches gilt für die WRKY-Proteine selbst, da deren Wirkung als Transkriptionsaktivatoren im Komplex mit MVQs ebenfalls inhibiert ist. Eine durch PAMP-Erkennung ausgelöste MAPK-Kaskade resultiert in der Phosphorylierung der MVQs, die in Folge destabilisiert werden. Dadurch werden die interagierenden WRKYs aus ihrem Inhibierungskomplex entlassen und können die Transkription von Abwehrgenen induzieren.

Neueste Untersuchungen der Arbeitsgruppe Dierk Scheel und Justin Lee konnten zeigen, dass auch eine Vielzahl von WRKYs durch MPK6 und MPK3 *in vitro* phosphoryliert werden können. Speziell für WRKY46 – einem Regulator der osmotischen Stressantwort und der Stomatabewegung (Ding et al. 2014, Ding et al. 2015) – konnte eine phosphorylierungsabhängige Destabilisierung im *in vivo* System gezeigt werden (Sheikh et al. 2015). Unter den durch MPK3/6 phosphorylierten WRKYs finden sich auch einige Mitglieder der Gruppe I und IIc, welche mit MVQs interagieren können. Für diese Proteine liegt die Vermutung nahe, dass auch sie nach Phosphorylierung einem Abbau unterliegen können. Unter der Annahme, dass die entsprechenden MVQ-Interaktionspartner nach PAMP-Behandlung nur langsam oder nicht destabilisiert werden, würden die Dissoziation des WRKY/MVQ-Komplexes zur Entfaltung der vollen Transkriptionsaktivität des MVQ-Partners und damit zur einer Verstärkung der Expression von Abwehrgenen führen. Um diese Hypothese zu untermauern sind jedoch detaillierte Studien zur Stabilität der WRKYs nach PAMP-Behandlung notwendig. Nicht nur durch phosphorylierungsabhängige Degradation interagierender WRKYs wären freie MVQs vorstellbar, die transkriptionsaktivierend wirken könnten. Es wäre z.B. auch möglich, dass die WRKY-MVQ-Interaktionspartner nur unter bestimmten Einflüssen (Stress oder Pathogenbefall) zeitgleich exprimiert werden (oder *vice versa*) oder sie unter Normalbedingungen in unterschiedlichen Zellkompartimenten lokalisiert sind.



**Abbildung 4-2: Modell zur Regulation der Abwehr durch dimere Komplexe aus transkriptionsaktivierenden MVQs und WRKYs.** Beide Proteinklassen induzieren die Expression von Abwehrgenen und werden durch Interaktion untereinander sowie durch MAPK-vermittelte Phosphorylierung reguliert. Links: Freie MVQs, die nicht zur Interaktion mit WRKYs fähig sind (z. B. MVQ8, MVQ1<sub>DL</sub>, MVQ1/VQ8) können die Induktion von Abwehrgenen hervorrufen. Die Transkriptionsaktivität hängt dabei von der Aminosäurekomposition des VQ-Motivs ab. Die interaktionsunfähige Mutante MVQ1<sub>DL</sub> führt dabei zu einer Hyperaktivierung (+++) der Transkription, während MVQ8 die Transkription in geringerem Maße steigert (+). Da die Transkriptionsaktivität durch das VQ-Motiv determiniert ist, kann die Mutante MVQ1/VQ8 die Induktion lediglich in einem zu MVQ8 vergleichbaren Maße erhöhen. Rechts: Ebenso können freie WRKYs die Expression von Abwehrgenen induzieren. Mitte: Die Transkriptionsaktivierung durch MVQs bzw. WRKYs wird durch deren Interaktion miteinander inhibiert. Auf Grundlage der hier dargestellten Untersuchungen werden MVQ1 und MVQ8/VQ1 in der Abbildung als Beispiele angeführt. Ein gleichartiges Verhalten ist jedoch auch für andere MVQs anzunehmen, insofern sie nicht mit WRKYs interagieren können. Das Gleichgewicht zwischen den freien Proteinen und dem heterodimeren Komplex wird durch PAMP-abhängige MAPKs reguliert, die durch spezifische Phosphorylierungen die Stabilität der MVQs oder der WRKYs (das Fragezeichen soll auf schwache experimentelle Grundlagen hinweisen) beeinflussen und die Aktivität zugunsten des jeweils stabileren Interaktionspartners verschieben. Eine verringerte Stabilität wird durch unterbrochene Konturlinien und schwächere Farbgebung angedeutet.

Das hier dargestellte Modell berücksichtigt lediglich eine positive Regulation der Abwehrgene durch freie WRKYs bzw. MVQs. Es ist jedoch davon auszugehen, dass bestimmte WRKYs oder MVQs die Genexpression auch negativ regulieren können, was unweigerlich zu einer erhöhten Komplexität des Modells führen würde. Um dieses Modell weiter zu untermauern sollte die Transkriptionsaktivierung des *NHL10*-Promotors durch spezifische MVQs noch detaillierter untersucht werden. Hier stellt

sich beispielsweise die Frage, ob neben den hier verwendeten nicht mit WRKYs interagierenden MVQs (MVQ<sub>1DL</sub> und MVQ<sub>8</sub>) auch andere MVQs und speziell deren MVQ<sub>DL</sub>-Varianten den *NHL10*-Promotor induzieren können. Desweiteren sollte analysiert werden, ob es sich hierbei um eine direkte Induzierung handelt oder ob weitere Komponenten die Induktion vermitteln. Eine direkte Interaktion von MVQs mit dem *NHL10*-Promotor sollte sich über die Durchführung von gängigen Interaktionsassays wie EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) oder ITC (*isothermal titration calorimetry*) nachweisen lassen. Die Durchführung von Chromatin-Immunpräzipitationsassays könnte zur Identifizierung weiterer an der Interaktion beteiligter Komponenten dienen, die für die Aktivierung des Promotors nach PAMP-Induktion notwendig sein könnten.

Zusammenfassend lassen die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen ein faszinierendes und komplexes Netzwerk aus MVQs, WRKYs und MAPKs vermuten, dass eine effektive und schnelle Regulation der pflanzlichen Immunantwort zulässt. MAPKs scheinen über die Destabilisierung spezifischer Komponenten maßgeblich zur Regulation dieses Netzwerks beizutragen. Es ist denkbar, dass sich die pflanzliche Immunantwort über das MVQ-WRKY-MAPK-Netzwerk rasch und spezifisch auf verändernde Umwelteinflüsse einstellen kann und fein reguliert wird. Nicht zuletzt wäre vorstellbar, dass solche Netzwerke die eine hohe Komplexität aufweisen auch einen erhöhten Schutz vor Pathogenen bieten, da sie negative Einflüsse durch pathogene Effektoren auf Grund vielfältiger "Ausweichrouten" einfacher umgehen können.

In den letzten Jahren häufen sich Publikationen, in denen VQs in wichtigen Kulturpflanzen identifiziert und analysiert wurden. Im Reisgenom konnten bisher 39 VQs identifiziert werden, von denen einige wichtige Rollen in der Abwehr bekannter Reispathogene (z.B. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* oder *Magnaporthe oryzae*) zu spielen scheinen (Kim et al. 2013, Li et al. 2015b). Von den 61 im Maisgenom identifizierten VQs zeigten 41 Gene eine differentielle Expression nach Trockenstress bzw. nach Salzstress (Song et al. 2016). Ergebnisse aus VQ-Genanalysen in der Sojabohne bringen einige der 78 identifizierten Proteine mit der Regulation der Pflanzenentwicklung und des Pflanzenwachstums, aber auch mit der Regulation der Stickstofffixierung in Verbindung. Weiterhin wird für mehrere dieser VQs vermutet, dass sie im Verlauf der Züchtung der modernen Sojabohne einer künstlichen Selektion unterlagen (Wang et al. 2014).

Auch im Genom des Chinakohls und von Weinpflanzen konnten VQs gefunden werden, wobei in letzterem Fall auch eine Korrelation der Expression von VQs mit *WRKYs* beobachtet werden konnte (Wang et al. 2015, Zhang et al. 2015). Diese neuen Erkenntnisse zeigen, welche wichtige Rollen VQs in der Regulation vielfältiger Prozesse in verschiedenen Pflanzen einnehmen. VQs werden in der Erforschung regulatorischer Prozesse nicht nur in *Arabidopsis thaliana* sondern ebenso in wichtigen Nutzpflanzen auch in Zukunft ein wichtiges Thema sein.

## 5. Zusammenfassung

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die Fragestellung, ob die in Pflanzen vorkommenden VQ-Proteine potentielle Substrate von MAPK-Enzymen darstellen könnten und eine Funktion in der pflanzlichen Immunabwehr besitzen.

Y2H-Studien zur Interaktion der in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* vorkommenden VQs mit MAPKs zeigten tatsächlich eine differentiell ausgeprägte Fähigkeit zur Bildung von Proteinkomplexen. Die spezifische Interaktion einer Untergruppe von VQ-Proteinen (hier als MVQs bezeichnet) mit MPK3 und MPK6 – zwei in die Perzeption von PAMPs involvierten MAPKs – konnte durch eine nachfolgende *in vitro* Phosphorylierung bestätigt werden. Eine anschließende umfassende mutagenetische Charakterisierung des in den VQ-Proteinen enthaltenen VQ-Motivs zeigte, dass das Vorhandensein dieses Sequenzmotivs nicht zwingend notwendig für eine Interaktion mit den genannten Kinasen ist. Andererseits ist die Wechselwirkung mit WRKY-Transkriptionsfaktoren strikt an die Integrität des VQ-Motivs gebunden und kann durch Fusion des Motivs an andere Proteinpartner (GAL4-AD) auf diese übertragen werden.

Im Hinblick auf eine potentielle *in vivo* Funktionalität der VQ-Proteine konnte im Protoplastensystem gezeigt werden, dass insbesondere MPK6 zur Phosphorylierung der MVQ-Proteine in *Arabidopsis* beiträgt. Massenspektrometrische Daten zur *in vitro* Phosphorylierung der Proteine und eine Analyse von Phosphorylierungsstellen-Varianten im Protoplastensystem weisen diese Modifizierung als Mehrfachphosphorylierung der MVQs aus. Diese trägt zur raschen Destabilisierung der Proteine nach Behandlung der Protoplasten mit dem bakteriellen Elicitor Flg22 bei. Ein weiteres Indiz für eine Beteiligung der MVQs in der pflanzlichen Abwehr stellt die Tatsache dar, dass die Überexpression von MVQ1 in einer verringerten Resistenz gegenüber dem bakteriellen Pathogen *Pseudomonas syringae* resultiert.

In Zusammenhang mit Promotoraktivitätsstudien, in denen eine Supprimierung des *NHL10*-Promotors durch MVQ1 beobachtet wurde, stellt die MAPK-abhängige Destabilisierung der MVQ-Proteine eine neuartige Möglichkeit zur WRKY-vermittelten Regulation von pathogen-responsiven Genen dar. Demnach könnte die Phosphorylierung des MVQ-Proteins und dessen nachfolgender Abbau zur

Freisetzung des (nun transkriptionsaktivierenden) WRKYs aus einem WRKY-MVQ-Komplex führen. Andererseits deutet eine für manche MVQs (u.a. MVQ8) beobachtete Verstärkung der Promotoraktivität auf einen komplexeren Mechanismus hin, der eine potentielle Transkriptionsfaktor-Aktivität der MVQs vermuten lässt.

## 6. Literaturverzeichnis

- Alonso JM**, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*. 301, 653 – 657.
- Andreasson E**, Jenkins T, Brodersen P, Thorgrimsen S, Petersen NH, Zhu S, Qiu JL, Micheelsen P, Rocher A, Petersen M, Newman MA, Bjørn Nielsen H, Hirt H, Somssich I, Mattsson O, Mundy J (2005). The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *EMBO J*. 24, 2579 – 2589.
- Arsova B**, Schulze WX (2012). Current status of the plant phosphorylation site database PhosPhAt and its use as a resource for molecular plant physiology. *Front Plant Sci*. 3, 132.
- Asai T**, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J (2002). MAP kinase signaling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*. 415, 977 – 983.
- Beausoleil SA**, Villén J, Gerber SA, Rush J, Gygi SP (2006). A probability-based approach for high-throughput protein phosphorylation analysis and site localization. *Nat Biotechnol*. 24, 1285 – 1292.
- Bethke G**, Unthan T, Uhrig JF, Pöschl Y, Gust AA, Scheel D, Lee J (2009). Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in *Arabidopsis thaliana* via ethylene signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106, 8067 – 8072.
- Bethke G**, Pecher P, Eschen-Lippold L, Tsuda K, Katagiri F, Glazebrook J, Scheel D, Lee J (2012). Activation of the *Arabidopsis thaliana* mitogen-activated protein kinase MPK11 by the flagellin-derived elicitor peptide, flg22. *Mol. Plant Microbe Interact*. 25, 471 – 480.
- Bigeard J**, Colcombet J, Hirt H (2015). Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Mol Plant*. 8, 521 – 539.
- Birkenbihl RP**, Somssich IE (2011). Transcriptional plant responses critical for resistance towards necrotrophic pathogens. *Front Plant Sci*. 8, 2:76.
- Birkenbihl RP**, Diezel C, Somssich IE (2012). *Arabidopsis* WRKY33 is a key transcriptional regulator of hormonal and metabolic responses toward *Botrytis cinerea* infection. *Plant Physiol*. 159, 266 – 285.
- Blum H**, Beier H, Gross HJ (1987). Improved silver staining of proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. 8, 93 – 99.
- Boudsocq M**, Willmann MR, McCormack M, Lee H, Shan L, He P, Bush J, Cheng SH, Sheen J (2010). Differential innate immune signaling via Ca<sup>2+</sup> sensor protein kinases. *Nature*. 464, 418 – 422.

- Caarls** L, Pieterse CM, Van Wees SC (2015). How salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling. *Front Plant Sci.* 6:170.
- Chen** YF, Li LQ, Xu Q, Kong YH, Wang H, Wu WH (2009). The WRKY6 transcription factor modulates PHOSPHATE1 expression in response to low Pi stress in Arabidopsis. *Plant Cell.* 21, 3554 – 3566.
- Chen** L, Zhang L, Yu D (2010). Wounding-induced WRKY8 is involved in basal defense in Arabidopsis. *Mol Plant Microbe Interact.* 23, 558 – 565.
- Chen** L, Zhang L, Li D, Wang F, Yu D (2013). WRKY8 transcription factor functions in the TMV-cg defense response by mediating both abscisic acid and ethylene signaling in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110, E1963-71.
- Cheng** Y, Zhou Y, Yang Y, Chi YJ, Zhou J, Chen JY, Wang F, Fan B, Shi K, Zhou YH, Yu JQ, Chen Z (2012). Structural and functional analysis of VQ motif-containing proteins in Arabidopsis as interacting proteins of WRKY transcription factors. *Plant Physiol.* 159, 810 – 825.
- Chinchilla** D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nürnberger T, Jones JD, Felix G, Boller T (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature.* 448, 497 – 500.
- Chisholm** ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell.* 124, 803 – 814.
- Ciolkowski** I, Wanke D, Birkenbihl RP, Somssich IE (2008). Studies on DNA-binding selectivity of WRKY transcription factors lend structural clues into WRKY-domain function. *Plant Mol Biol.* 68, 81 – 92.
- Colcombet** J, Hirt H (2008). Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochem J.* 413, 217 – 226.
- Conrath** U (2011). Molecular aspects of defence priming. *Trends Plant Sci.* 16, 524 – 531.
- Crooks** GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* 14, 1188 – 1190.
- de Pater** S, Greco V, Pham K, Memelink J, Kijne J (1996). Characterization of a zinc-dependent transcriptional activator from Arabidopsis. *Nucleic Acids Res.* 24, 4624 – 4631.
- Devaiah** BN, Karthikeyan AS, Raghothama KG (2007). WRKY75 transcription factor is a modulator of phosphate acquisition and root development in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 143, 1789 – 1801.
- Ding** ZJ, Yan JY, Xu XY, Li GX, Zheng SJ (2013). WRKY46 functions as a transcriptional repressor of ALMT1, regulating aluminum-induced malate secretion in Arabidopsis. *Plant J.* 76, 825 – 835
- Ding** ZJ, Yan JY, Xu XY, Yu DQ, Li GX, Zhang SQ, Zheng SJ (2014). Transcription factor WRKY46 regulates osmotic stress responses and stomatal movement independently in Arabidopsis. *Plant J.* 79, 13 – 27.

- Ding** ZJ, Yan JY, Li CX, Li GX, Wu YR, Zheng SJ (2015). Transcription factor WRKY46 modulates the development of Arabidopsis lateral roots in osmotic/salt stress conditions via regulation of ABA signaling and auxin homeostasis. *Plant J.* **84**, 56 – 69.
- Dong** J, Chen C, Chen Z (2003). Expression profiles of the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Mol Biol.* **51**, 21 – 37.
- Dyson** MR, Shadbolt SP, Vincent KJ, Perera RL, McCafferty J (2004). Production of soluble mammalian proteins in *Escherichia coli*: identification of protein features that correlate with successful expression. *BMC Biotechnol.* **14**, 4:32.
- Earley** KW, Haag JR, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K, Pikaard CS (2006). Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J.* **45**, 616 – 629.
- Engler** C, Kandzia R, Marillonnet S (2008). A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One.* **3**, e3647.
- Eschen-Lippold** L, Bethke G, Palm-Forster MA, Pecher P, Bauer N, Glazebrook J, Scheel D, Lee J (2012). MPK11-a fourth elicitor-responsive mitogen-activated protein kinase in Arabidopsis thaliana. *Plant Signal Behav.* **7**, 1203 – 1205.
- Eulgem** T, Rushton PJ, Schmelzer E, Hahlbrock K, Somssich IE (1999). Early nuclear events in plant defense: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *EMBO J.* **18**, 4689 – 4699.
- Eulgem** T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* **5**, 199 – 206.
- Feilner** T, Hultschig C, Lee J, Meyer S, Immink RGH, Koenig A, Possling A, Seitz H, Beveridge A, Scheel D, Cahill DJ, Lehrach H, Kreutzberger J, Kersten B (2005). High throughput identification of potential Arabidopsis mitogen-activated protein kinases substrates. *Mol Cell Proteomics.* **4**, 1558 – 1568.
- Felix** G, Duran JD, Volko S, Boller T (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* **18**, 265– 276.
- Fiil** BK, Petersen M (2011). Constitutive expression of MKS1 confers susceptibility to *Botrytis cinerea* infection independent of PAD3 expression. *Plant Signal Behav.* **6**, 1425 – 1427.
- Flor** HH (1942). Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology.* **32**, 653 – 669.
- Foley** RC, Singh KB (2004). TGA5 acts as a positive and TGA4 acts as a negative regulator of ocs element activity in Arabidopsis roots in response to defence signals. *FEBS Lett.* **563**, 141 – 145.
- Frederickson Matika** DE, Loake GJ (2014). Redox regulation in plant immune function. *Antioxid Redox Signal.* **21**, 1373 – 1388.
- Göhre** V, Robatzek S (2008). Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu Rev Phytopathol.* **46**, 189 – 215.

- Gómez-Gómez** L<sup>1</sup>, Felix G, Boller T (1999). A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 18, 277 – 284.
- Gómez-Gómez** L, Boller T (2000). FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell.* 5, 1003 – 1011.
- Guan** Y, Meng X, Khanna R, LaMontagne E, Liu Y, Zhang S (2014). Phosphorylation of a WRKY transcription factor by MAPKs is required for pollen development and function in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* 10, e1004384.
- Guo** H, and Ecker JR (2003). Plant responses to ethylene gas are mediated by SCFEBF1/EBF2-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell.* 115, 667 – 677.
- Guo** D, Zhang J, Wang X, Han X, Wei B, Wang J, Li B, Yu H, Huang Q, Gu H, Qu LJ, Qin G (2015). The WRKY Transcription Factor WRKY71/EXB1 controls shoot branching by transcriptionally regulating RAX genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 27, 3112 – 3127.
- Guo** D, Qin G (2016). EXB1/WRKY71 transcription factor regulates both shoot branching and responses to abiotic stresses. *Plant Signal Behav.* 11, e1150404.
- Hahn** A, Kilian J, Mohrholz A, Ladwig F, Peschke F, Dautel R, Harter K, Berendzen KW, Wanke D (2013). Plant core environmental stress response genes are systemically coordinated during abiotic stresses. *Int J Mol Sci.* 14, 7617 – 7641.
- Hoehenwarter** W, Thomas M, Nukarinen E, Egelhofer V, Röhrig H, Weckwerth W, Conrath U, Beckers GJ (2013). Identification of novel in vivo MAP kinase substrates in *Arabidopsis thaliana* through use of tandem metal oxide affinity chromatography. *Mol Cell Proteomics.* 12, 369 – 380.
- Hsu** FC, Chou MY, Chou SJ, Li YR, Peng HP, Shih MC (2013). Submergence confers immunity mediated by the WRKY22 transcription factor in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 25, 2699 – 2713.
- Hu** Y, Dong Q, Yu D (2012). *Arabidopsis* WRKY46 coordinates with WRKY70 and WRKY53 in basal resistance against pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Sci.* 185-186, 288 – 297.
- Hu** Y, Chen L, Wang H, Zhang L, Wang F, Yu D (2013a). *Arabidopsis* transcription factor WRKY8 functions antagonistically with its interacting partner VQ9 to modulate salinity stress tolerance. *Plant J.* 74, 730 – 745.
- Hu** P, Zhou W, Cheng Z, Fan M, Wang L, Xie D (2013b). JAV1 controls jasmonate-regulated plant defense. *Mol Cell.* 50, 504 – 515.
- Hückelhoven** R (2007). Cellwall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu Rev Phytopathol.* 45, 101 – 127.
- Ichimura** K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A, Kreis M, Zhang S, Hirt H, Wilson C, Heberle-Bors E, Ellis BE, Morris PC, Innes RW, Ecker JR, Scheel D, Klessig DF, Machida Y, Mundy J, Ohashi Y, Walker JC (2002). Mitogen-activated

- protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci.* 7, 301 – 308.
- Ishida** T, Hattori S, Sano R, Inoue K, Shirano Y, Hayashi H, Shibata D, Sato S, Kato T, Tabata S, Okada K, Wada T (2007). Arabidopsis TRANSPARENT TESTA GLABRA2 is directly regulated by R2R3 MYB transcription factors and is involved in regulation of GLABRA2 transcription in epidermal differentiation. *Plant Cell.* 19, 2531 – 2543.
- Ishiguro** S, Nakamura K (1994). Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 59 upstream regions of genes coding for sporamin and  $\beta$ -amylase from sweet potato. *Mol Gen Genet.* 244, 563 – 571.
- James** P, Halladay J, Craig EA (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics.* 144, 1425 – 1436.
- Jiang** Y, Liang G, Yu D (2012). Activated expression of WRKY57 confers drought tolerance in Arabidopsis. *Mol Plant.* 5, 1375 – 1388.
- Jing** Y, Lin R (2015). The VQ motif-containing protein family of plant-specific transcriptional regulators. *Plant Physiol.* 169, 371 – 378.
- Johnson** CS, Kolevski B, Smyth DR (2002). TRANSPARENT TESTA GLABRA2, a trichome and seed coat development gene of Arabidopsis, encodes a WRKY transcription factor. *Plant Cell.* 14, 1359 – 1375.
- Jones** JD, Dangl JL (2006). The plant immune system. *Nature.* 444, 323 – 329.
- Journot-Catalino** N, Somssich IE, Roby D, Kroj T (2006). The transcription factors WRKY11 and WRKY17 act as negative regulators of basal resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* 18, 3289 – 3302.
- Kasajima** I, Ide Y, Yokota Hirai M, Fujiwara T (2010). WRKY6 is involved in the response to boron deficiency in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant.* 139, 80 – 92.
- Kim** DY, Kwon SI, Choi C, Lee H, Ahn I, Park SR, Bae SC, Lee SC, Hwang DJ (2013). Expression analysis of rice VQ genes in response to biotic and abiotic stresses. *Gene.* 529, 208 – 214.
- Kloth** KJ, Wieggers GL, Busscher-Lange J, van Haarst JC, Kruijer W, Bouwmeester HJ, Dicke M, Jongsma MA (2016). AtWRKY22 promotes susceptibility to aphids and modulates salicylic acid and jasmonic acid signalling. *J Exp Bot.* 67, 3383 – 3396.
- Kołodziejek** I, van der Hoorn RA (2010). Mining the active proteome in plant science and biotechnology. *Curr Opin Biotechnol.* 21, 225 – 233.
- Kunze** G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T, Felix G (2004). The N-terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. *Plant Cell.* 16, 3496 – 3507.
- Lämmli** UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680 – 685.

- Lai Z**, Li Y, Wang F, Cheng Y, Fan B, Yu JQ, Chen Z (2011). Arabidopsis sigma factor binding proteins are activators of the WRKY33 transcription factor in plant defense. *Plant Cell*. 23, 3824 – 3841.
- Lampard GR**, Macalister CA, Bergmann DC(2008). Arabidopsis stomatal initiation is controlled by MAPK-mediated regulation of the bHLH SPEECHLESS. *Science*.322, 1113 – 1116.
- Lassowskat I**, Böttcher C, Eschen-Lippold L, Scheel D, Lee J (2014). Sustained mitogen-activated protein kinase activation reprograms defense metabolism and phosphoprotein profile in Arabidopsis thaliana. *Front Plant Sci*. 5, 554.
- Lee J**, Rudd JJ, Macioszek VK, Scheel D (2004). Dynamic changes in the localization of MAPK cascade components controlling pathogenesis-related (PR) gene expression during innate immunity in parsley. *J Biol Chem*. 279, 22440 – 22448.
- Li S**, Zhou X, Chen L, Huang W, Yu D (2010). Functional characterization of *Arabidopsis thaliana* WRKY39 in heat stress. *Mol Cells*. 29, 475 – 483.
- Li G**, Meng X, Wang R, Mao G, Han L, Liu Y, Zhang S (2012). Dual-level regulation of ACC synthase activity by MPK3/MPK6 cascade and its downstream WRKY transcription factor during ethylene induction in Arabidopsis. *PLoS Genet*. 8, e1002767.
- Li J**, Besseau S, Törönen P, Sipari N, Kollist H, Holm L, Palva ET (2013). Defense-related transcription factors WRKY70 and WRKY54 modulate osmotic stress tolerance by regulating stomatal aperture in Arabidopsis. *New Phytol*. 200, 457 – 472.
- Li Y**, Jing Y, Li J, Xu G, Lin R (2014). Arabidopsis VQ MOTIF-CONTAINING PROTEIN29 represses seedling deetiolation by interacting with PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR1. *Plant Physiol*. 164, 2068 – 2080.
- Li B**, Jiang S, Yu X, Cheng C, Chen S, Cheng Y, Yuan JS, Jiang D, He P, Shan L (2015a). Phosphorylation of trihelixtranscriptionalrepressorASR3 by MAPKINASE4negativelyregulatesArabidopsisimmunity. *Plant Cell*. 27, 839 – 56.
- Li N**, Li X, Xiao J, Wang S (2015b). Comprehensive analysis of VQ motif-containing gene expression in rice defense responses to three pathogens. *Plant Cell Rep*. 33, 1493 – 1505.
- Liu Y**, Zhang S (2004). Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell*. 16, 3386 – 3399.
- Logemann E**, Birkenbihl RP, Ulker B, Somssich IE (2006). An improved method for preparing *Agrobacterium* cells that simplifies the Arabidopsis transformation protocol. *Plant Methods*. 2:16.
- Luo M**, Dennis ES, Berger F, Peacock WJ, Chaudhury A (2005). MINISEED3 (MINI3), a WRKY family gene, and HAIKU2 (IKU2), a leucine-rich repeat (LRR) KINASE gene, are regulators of seed size in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102, 17531– 17536.
- Maldonado-Bonilla LD**, Eschen-Lippold L, Gago-Zachert S, Tabassum N, Bauer N, Scheel D, Lee J (2014). The Arabidopsis tandem zinc finger 9 protein binds RNA and mediates pathogen-associated molecular pattern-triggered immune responses. *Plant Cell Physiol*. 55, 412– 25.

- Mao P**, Duan M, Wei C, Li Y (2007). WRKY62 transcription factor acts downstream of cytosolic NPR1 and negatively regulates jasmonate-responsive gene expression. *Plant Cell Physiol.* 48, 833– 842.
- Mao G**, Meng X, Liu Y, Zheng Z, Chen Z, Zhang S (2011). Phosphorylation of a WRKY transcription factor by two pathogen-responsive MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell.* 23, 1639 – 1653.
- Melotto M**, Underwood W, He SY (2008). Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annu Rev Phytopathol.* 46, 101 – 122.
- Meng X**, Zhang S (2013). MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annu Rev Phytopathol.* 51, 245 – 266.
- Moreau M**, Degrave A, Vedel R, Bitton F, Patrit O, Renou JP, Barny MA, Fagard M (2012). EDS1 contributes to nonhost resistance of Arabidopsis thaliana against Erwinia amylovora. *Mol Plant Microbe Interact.* 25, 421 – 430.
- Mukhtar MS**, Deslandes L, Auriac MC, Marco Y, Somssich IE (2008). The Arabidopsis transcription factor WRKY27 influences wilt disease symptom development caused by *Ralstonia solanacearum*. *Plant J.* 56, 935– 947.
- Nagels Durand A**, Pauwels L, Goossens A (2016). The Ubiquitin System and Jasmonate Signaling. *Plants (Basel).* 5.
- Nakagawa T**, Kurose T, Hino T, Tanaka K, Kawamukai M, Niwa Y, Toyooka K, Matsuoka K, Jinbo T, Kimura T (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng.* 104, 34 – 41.
- Palm-Forster MA**, Eschen-Lippold L, Lee J (2012). A mutagenesis-based screen to rapidly identify phosphorylation sites in mitogen-activated protein kinase substrates. *Anal Biochem.* 427, 127 – 129.
- Pecher P**, Eschen-Lippold L, Herklotz S, Kuhle K, Naumann K, Bethke G, Uhrig J, Weyhe M, Scheel D, Lee J (2014). The Arabidopsis thaliana mitogen-activated protein kinases MPK3 and MPK6 target a subclass of 'VQ-motif'-containing proteins to regulate immune responses. *New Phytol.* 203, 592 – 606
- Perruc E**, Charpentreau M, Ramirez BC, Jauneau A, Galaud JP, Ranjeva R, Ranty B (2004). A novel calmodulin-binding protein functions as a negative regulator of osmotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant J.* 38, 410 – 420.
- Petersen K**, Qiu JL, Lütje J, Fiil BK, Hansen S, Mundy J, Petersen M (2010). Arabidopsis MKS1 is involved in basal immunity and requires an intact N-terminal domain for proper function. *PLoS One.* 5, e14364.
- Pitzschke A**, Djamei A, Teige M, Hirt H (2009). VIP1 response elements mediate mitogen-activated protein kinase 3-induced stress gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 18414 – 18419.
- Qiu JL**, Fiil BK, Petersen K, Nielsen HB, Botanga CJ, Thorgrimsen S, Palma K, Suarez-Rodriguez MC, Sandbech-Clausen S, Lichota J, Brodersen P, Grasser KD, Mattsson O, Glazebrook J, Mundy J, Petersen M (2008b). Arabidopsis MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. *EMBO J.* 27, 2214 – 2221.

- Ranf** S, Eschen-Lippold L, Pecher P, Lee J, Scheel D (2011). Interplay between calcium signalling and early signalling elements during defence responses to microbe- or damage-associated molecular patterns. *Plant J.* 68, 100 – 113.
- Rasmussen** MW, Roux M, Petersen M, Mundy J (2012). MAP Kinase Cascades in Arabidopsis Innate Immunity. *Front Plant Sci.* 3, 169.
- Ren** X, Chen Z, Liu Y, Zhang H, Zhang M, Liu Q, Hong X, Zhu JK, Gong Z (2010). ABO3, a WRKY transcription factor, mediates plant responses to abscisic acid and drought tolerance in Arabidopsis. *Plant J.* 63, 417– 429.
- Robatzek** S, Somssich IE (2001). A new member of the Arabidopsis WRKY transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence- and defence-related processes. *Plant J.* 28, 123– 133.
- Robatzek** S, Somssich IE (2002). Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes Dev.* 16, 1139– 1149.
- Rushton** PJ, Macdonald H, Huttly AK, Lazarus CM, Hooley R (1995). Members of a new family of DNA-binding proteins bind to a conserved cis-element in the promoters of alpha-Amy2 genes. *Plant Mol Biol.* 29, 691– 702.
- Rushton** PJ, Torres JT, Parniske M, Wernert P, Hahlbrock K, Somssich IE. (1996). Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *EMBO J.* 15, 5690 – 5700.
- Rushton** PJ, Somssich IE (1998). Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Curr Opin Plant Biol.* 1, 311 – 315.
- Rushton** PJ, Somssich IE, Ringler P, Shen QJ (2010). WRKY transcription factors. *Trends Plant Sci.* 15, 247 – 258.
- Sambrook** J, Russell DW (1989). Molecular cloning. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.*
- Schneider** TD, Stephens RM (1990). Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res.* 18, 6097 – 6100.
- Shaik** R, Ramakrishna W (2013). Genes and co-expression modules common to drought and bacterial stress responses in Arabidopsis and rice. *PLoS One.* 8, e77261.
- Shaw** CH (1995). Introduction of cloning plasmids into *Agrobacterium tumefaciens*. in: H. Jones. Plant gene transfer and expression protocols. *Humana Press, Totowa, USA.*
- Sheikh** AH, Eschen-Lippold L, Pecher P, Hoehenwarter W, Sinha AK, Scheel D, Lee J (2016). Regulation of WRKY46 Transcription Factor Function by Mitogen-Activated Protein Kinases in Arabidopsis thaliana.
- Silipo** A, Erbs G, Shinya T, Dow JM, Parrilli M, Lanzetta R, Shibuya N, Newman MA, Molinaro A (2010). Glyco-conjugates as elicitors or suppressors of plant innate immunity. *Glycobiology.* 20, 406 – 419.

- Song W**, Zhao H, Zhang X, Lei L, Lai J (2016). Genome-wide identification of VQ motif-containing proteins and their expression profiles under abiotic stresses in maize. *Front Plant Sci.* 6:1177.
- Spoel SH**, Dong X (2012). How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nat Rev Immunol.* 12, 89 – 100.
- Tena G**, Boudsocq M, Sheen J (2011). Protein kinase signaling networks in plant innate immunity. *Curr Opin Plant Biol.* 14, 519 – 529.
- Ulker B**, Somssich IE (2004). WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Curr Opin Plant Biol.* 7, 491 – 498.
- van Verk MC**, Bol JF, Linthorst HJ (2011). WRKY transcription factors involved in activation of SA biosynthesis genes. *BMC Plant Biol.* 19; 11:89.
- Wan J**, Zhang S, Stacey G (2004). Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway in Arabidopsis by chitin. *Mol Plant Pathol.* 5, 125 – 35.
- Wang H**, Liu Y, Bruffett K, Lee J, Hause G, Walker JC, Zhang S (2008). Haplo-insufficiency of MPK3 in MPK6 mutant background uncovers a novel function of these two MAPKs in Arabidopsis ovule development. *Plant Cell.* 20, 602 – 613.
- Wang A**, Garcia D, Zhang H, Feng K, Chaudhury A, Berger F, Peacock WJ, Dennis ES, Luo M (2010). The VQ motif protein IKU1 regulates endosperm growth and seed size in Arabidopsis. *Plant J.* 63, 670 – 679.
- Wang P**, Du Y, Song CP (2011). Phosphorylation by MPK6: a conserved transcriptional modification mediates nitrate reductase activation and NO production? *Plant Signal Behav.* 6:889– 891.
- Wang X**, Zhang H, Sun G, Jin Y, Qiu L (2014). Identification of active VQ motif-containing genes and the expression patterns under low nitrogen treatment in soybean. *Gene.* 543, 237 – 243.
- Wang H**, Hu Y, Pan J, Yu D (2015a). Arabidopsis VQ motif-containing proteins VQ12 and VQ29 negatively modulate basal defense against *Botrytis cinerea*. *Sci Rep.* 5:14185.
- Wang M**, Vannozzi A, Wang G, Zhong Y, Corso M, Cavallini E, Cheng ZM (2015b). A comprehensive survey of the grapevine VQ gene family and its transcriptional correlation with WRKY proteins. *Front Plant Sci.* 6:417.
- Weigel D**, Glazebrook J. (2002). Arabidopsis: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.*
- Weyhe M**, Eschen-Lippold L, Pecher P, Scheel D, Lee J (2014). Ménage à trois: the complex relationships between mitogen-activated protein kinases, WRKY transcription factors, and VQ-motif-containing proteins. *Plant Signal Behav.* 9, e29519.
- Xie YD**, Li W, Guo D, Dong J, Zhang Q, Fu Y, Ren D, Peng M, Xia Y (2010). The Arabidopsis gene SIGMA FACTOR-BINDING PROTEIN 1 plays a role in the salicylate- and jasmonate-mediated defence responses. *Plant Cell Environ.* 33, 828 – 839.

- Xing** DH, Lai ZB, Zheng ZY, Vinod KM, Fan BF, Chen ZX (2008). Stress- and pathogen-induced Arabidopsis WRKY48 is a transcriptional activator that represses plant basal defense. *Mol Plant*. 1, 459– 470.
- Xu** X, Chen C, Fan B, Chen Z (2006). Physical and functional interactions between pathogen-induced Arabidopsis WRKY18, WRKY40, and WRKY60 transcription factors. *Plant Cell*. 18, 1310– 1326.
- Xu** J, Zhang S (2015). Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends Plant Sci*. 20, 56– 64.
- Yamasaki** K, Kigawa T, Inoue M, Tateno M, Yamasaki T, Yabuki T, Aoki M, Seki E, Matsuda T, Tomo Y, Hayami N, Terada T, Shirouzu M, Tanaka A, Seki M, Shinozaki K, Yokoyama S (2005). Solution structure of an Arabidopsis WRKY DNA binding domain. *Plant Cell*. 17, 944– 956.
- Yoo** SD, Cho YH, Sheen J (2007). Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc*. 2, 1565 – 1572.
- Yoo** SD, Cho YH, Tena G, Xiong Y, Sheen J (2008). Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C2H4 signalling. *Nature*. 451, 789– 795.
- Yu** D, Chen C, Chen Z (2001). Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. *Plant Cell*. 13, 1527– 1540.
- Yu** Y, Liu Z, Wang L, Kim SG, Seo PJ, Qiao M, Wang N, Li S, Cao X, Park CM, Xiang F (2016). WRKY71 accelerates flowering via the direct activation of FLOWERING LOCUS T and LEAFY in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 85, 96 – 106.
- Zhang** Y, Wang L (2005). The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants. *BMC Evol Biol*. 3, 5:1.
- Zhang** G, Wang F, Li J, Ding Q, Zhang Y, Li H, Zhang J, Gao J (2015). Genome-wide identification and analysis of the VQ motif-containing protein family in Chinese Cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Int J Mol Sci*. 16, 28683 – 28704.
- Zhang** J, Zhou JM (2010). Plant immunity triggered by microbial molecular signatures. *Mol Plant*. 3, 783– 793.
- Zheng** Z, Qamar SA, Chen Z, Mengiste T (2006). Arabidopsis WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. *Plant J*. 48, 592– 605.
- Zeng** W, He SY (2010). A prominent role of the flagellin receptor FLAGELLIN-SENSING2 in mediating stomatal response to *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000 in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 153, 1188– 1198.
- Zhu** X und Zhu JK (2013). Double repression in jasmonate-mediated plant defense. *Mol Cell*. 50, 459– 460.
- Zou** C, Jiang W, Yu D (2010). Male gametophyte-specific WRKY34 transcription factor mediates cold sensitivity of mature pollen in Arabidopsis. *J Exp Bot*. 61, 3901– 3914.

## Oligonukleotide und Sequenzen

**Tabelle A1. Oligonukleotide (Primer) für die Klonierung der VQs aus *Arabidopsis thaliana*.** Die Primer dienen zur Klonierung der Gene mit Hilfe des pENTR™/SD/D-TOPO® Cloning Kits (Kapitel 2.3.7) und für die Generierung der radioaktiv markierten Sonde in der Northern Blot-Analyse (Kapitel 2.3.14) für das MVQ1-Transkript. Die Sequenzen sind beginnend mit der 5'-terminalen Nukleobase angegeben.

Gen	<i>forward</i> -Primer	<i>reverse</i> -Primer
MVQ1	AAAAAGCAGGCTTCATGGAGAATTCAC CGAGATAC	AGAAAGCTGGGTCTCAAGAAGTAGAAG CTGATGA
MVQ2	CACCATGGAGAAATCACCAAGATAC	CACCATGGAGAAATCACCAAGATAC
MVQ3	CACCATGGAAGTTTCAACATCATCCAT G	AGAGTTCCTCGCCGGAG (ohne Stopcodon)
MVQ7	AAAAAGCAGGCTTCATGGATGATCAGA GTAATCGTGG	AGAAAGCTGGGTCTTATTGATTTTTCCA TAATGGACT
VQ1	CACCATGTCTGCAGGAGTGAGATC	TCAATGGTCTGACCAAAGATTATAC
VQ2	CACCATGGATAATAGATCGCCAAG	TCACCTTCTTCTCCAC
VQ3	CACCATGGATAATAGATCGCCAAG	TCAAGAATCAAAGAAATTGTTG
VQ5	CACCATGTATCAGCGACCACAAAATG	TCAATTTATTTCTGATGAGAATTCTAAAT C
VQ7	CACCATGGATTCTTGTAACAGTGG	TTAATTATTGGAATCTGTAGGG
VQ15	CACCATGGTGACTTCGGAGGG	TCACATAACCTTCCACGATTC
VQ17	CACCATGGAAATTGAAGCTACTACTG	TTAGGCGTAATGGTGAGG
VQ18	CACCATGGAGATTACTCAATATCAAAG	TTAAGACGAATTATGAGCCTTTG
VQ22	CACCATGGCTAACCCCAACGAGTG	TCATTGCAACCTCGAAGAAGAAG
VQ25	CACCATGGAAGCCACGATCTTCG	TTAAGCGAATTGATCTGAGAAAATG
VQ26	CACCATGGTGAGAAATTCTATG	TTATTGTTGTTGAAGATC

**Tabelle A2. Oligonukleotide (Primer) für Mutagenesereaktionen**(Kapitel 2.3.8). Die Sequenzen sind beginnend mit der 5'-terminalen Nukleobase angegeben.

Mutagenese-Methode	Konstrukt	Primer	
		<i>forward</i>	<i>reverse</i>
"Golden Gate-cloning"-basierte Mutagenese (Palm-Forster et al. 2012)	MVQ1 V71D/Q72L	AAAGGTCTCGACCTGA TGCTAACCGGATC	AAAGGTCTCCAGGTCGA CTTGTTTGAAGGAAG
	MVQ2 V50D/Q51L	AAAGGTCTCGACCTAC TGCTCACCGGAATC	AAAGGTCTCTAGGTCGA CTTGCTTGAAGGAAG
	MVQ3 V63D/Q64L	AAAGGTCTCGATCTGAT GCTTACCGGCTC	AAAGGTCTCCAGATCGA CTTGTTTAAAAGTAG
	MVQ5 V29D/Q30L	AAAGGTCTCGACCTAA AGCTCACTGGAGCAC	AAAGGTCTCTAGGTCGA TGTTACGGAAATTAGAG G
	MVQ6 V31D/Q32L	AAAGGTCTCGATCTGC GCTTGACAGGTCC	AAAGGTCTCCAGATCAA TTTCTCTGAAAGTGT
	MVQ7 V60D/Q61L	AAAGGTCTCGATCTGC AGCTAACCGGACTCG	AAAGGTCTCCAGATCAA TGGATCTGAAATCGG TTTTG
	MVQ8 V42D/Q43L	AAAGGTCTCGATCTACA GCTTACGGATTCTCC	AAAGGTCTCTAGATCAA TACTTGTAATAATCAT TGTTGC
	MVQ9 V59D/Q60L	AAAGGTCTCGATCTGC AGCTAACGGGTTCTC	AAAGGTCTCCAGATCAA TACTTCTAAAGTCGTTT
	MVQ10 V94D/Q95L	AAAGGTCTCGATCTGA AACTAACCGGTTCCACC	AAAGGTCTCCAGATCAA CATCTCTGAAATCGTTT
	MVQ1mutP2	AAAGGTCTCTCCCATCT CTCGTTCTCGCCCCGG TTGCGCCTCTTATAC	AAAGGTCTCATGGGAAA TCTAAGATGCTTGGAGC GAGGATCTCCGG
Mutagenese mittels "QuikChange II XL site-directed mutagenesis-Kit" (Agilent, Santa Clara, USA)	MVQ4 V51D/Q52L	CTTCTTTCAAACAAGTC GATCTGATGCTCACCG GAAGCTC	GAGCTTCCGGTGAGCAT CAGATCGACTTGTGTTGA AAGAAG
	MVQ17 V82D/Q83L	CTAATAACTTCATGACA TTGGACCTACGTCTCA CAGGTAAAACC	GGTTTTACCTGTGAGAC GTAGGTCCAATGTCATG AAGTTATTAG

**Tabelle A3. Oligonukleotide (Primer) zur Generierung Golden Gate-kompatibler MVQ1- und MVQ8-ENTRY-Vektoren zum Austausch der VQ-Regionen**(Kapitel 2.3.9). Die Nde1-Schnittstellen sind unterstrichen und die Bsa1-Schnittstellen sind fett dargestellt. Die Sequenzen sind beginnend mit der 5'-terminalen Nukleobase angegeben.

Konstrukt	Primer	
	<i>forward</i>	<i>reverse</i>
pDONR221-MVQ1 $\Delta$ VQ	AAC <u>CATATGGG</u> TCTCATCCGCCGA GAGACC	AAGG <b>TCTCAT</b> GTTGTCCGGTACG
pENTR/SD/D/TOPO-MVQ8 $\Delta$ VQ	AAC <u>CATATGGG</u> TCTCTTCTCCGTCG CGTGAG	AAGG <b>TCTC</b> CTTGTGGTTGTGGTAAAG G

**Tabelle A4. Oligonukleotide (Primer) zur Generierung der Alaninaustausch-Varianten**(Kapitel 2.3.9). Die Codons zum Austausch gegen Alanin bzw. in Position 126 gegen Methionin sind Unterstrichen und die Überhänge zur Rekombination sind kursiv hervorgehoben. Die Sequenzen sind beginnend mit der 5'-terminalen Nukleobase angegeben.

Konstrukt	Primer	
	<i>forward</i>	<i>reverse</i>
MVQ1/F123A	<b>AACAGCG</b> GTCCAAGCAGATACTT CTTCCTTCAAACAAGTCGTCCAGA TGCTAACCGGA	<b>CGGATCCGGTTAGCATCTGGACGACT</b> TGTTTGAAGGAAGAAGTATCTGCTTG GAC <b>CGC</b>
MVQ1/V124A	<b>AACATTCGCG</b> CAAGCAGATACTT CTTCCTTCAAACAAGTCGTCCAGA TGCTAACCGGA	<b>CGGATCCGGTTAGCATCTGGACGACT</b> TGTTTGAAGGAAGAAGTATCTGCTTG <b>GCGAA</b>
MVQ1/Q125A	<b>AACATTCGTCCGCG</b> GCAGATACTT CTTCCTTCAAACAAGTCGTCCAGA TGCTAACCGGA	<b>CGGATCCGGTTAGCATCTGGACGACT</b> TGTTTGAAGGAAGAAGTATCTG <b>CCGC</b> GACGAA
MVQ1/A126M	<b>AACATTCGTCCAAATG</b> GATACTTC TTCTTCAAACAAGTCGTCCAGAT GCTAACCGGA	<b>CGGATCCGGTTAGCATCTGGACGACT</b> TGTTTGAAGGAAGAAGTAT <b>CCAT</b> TTGG ACGAA
MVQ1/D127A	<b>AACATTCGTCCAAGCAGCG</b> ACTT CTTCCTTCAAACAAGTCGTCCAGA TGCTAACCGGA	<b>CGGATCCGGTTAGCATCTGGACGACT</b> TGTTTGAAGGAAGAAGT <b>CGCT</b> GTCTTG GACGAA
MVQ1/T128A	<b>AACATTCGTCCAAGCAGATCGG</b> T CTTCCTTCAAACAAGTCGTCCAGA TGCTAACCGGA	<b>CGGATCCGGTTAGCATCTGGACGACT</b> TGTTTGAAGGAAG <b>ACGC</b> ATCTGCTTG GACGAA

Konstrukt	Primer	
	<i>forward</i>	<i>reverse</i>
MVQ1/S129A	<b>AACATTCGTCCAAGCAGATACTG</b> <b>CGT</b> CCCTTCAAACAAGTCGTCCAGA TGCTAACCGGA	<b>CGGATCCGGTTAGCATCTGGACGACT</b> TGTTTGAAGG <b>AGCAG</b> ATATCTGCTTG GACGAA
MVQ1/S130A	<b>AACATTCGTCCAAGCAGATACTTC</b> <b>TGCG</b> TTCAAACAAGTCGTCCAGAT GCTAACCGGA	<b>CGGATCCGGTTAGCATCTGGACGACT</b> TGTTTGA <b>AGCAG</b> AGAAGTATCTGCTTG GACGAA
MVQ1/F131A	<b>AACATTCGTCCAAGCAGATACTTC</b> TTCC <b>GCG</b> AAACAAGTCGTCCAGA TGCTAACCGGA	<b>CGGATCCGGTTAGCATCTGGACGACT</b> TGTTT <b>GCG</b> GGAAGAAGTATCTGCTTG GACGAA
MVQ1/K132A	<b>AACATTCGTCCAAGCAGATACTTC</b> TTCCTT <b>GCG</b> CAAGTCGTCCAGAT GCTAACCGGA	<b>CGGATCCGGTTAGCATCTGGACGACT</b> TGCGCGAAGGAAGAAGTATCTGCTTG GACGAA
MVQ1/Q133A	<b>AACATTCGTCCAAGCAGATACTTC</b> TTCCTTCAA <b>AGCG</b> GTCGTCCAGAT GCTAACCGGA	<b>CGGATCCGGTTAGCATCTGGACGACC</b> <b>GC</b> TTTGAAGGAAGAAGTATCTGCTTG GACGAA
MVQ1/V134A	<b>AACATTCGTCCAAGCAGATACTTC</b> TTCCTTCAAACA <b>AGCG</b> GTCCAGAT GCTAACCGGA	<b>CGGATCCGGTTAGCATCTGGACCGCT</b> TGTTTGAAGGAAGAAGTATCTGCTTG GACGAA
MVQ1/M137A	<b>AACATTCGTCCAAGCAGATACTTC</b> TTCCTTCAAACAAGTCGTCC <b>AGGC</b> GCTAACCGGA	<b>CGGATCCGGTTAGCGC</b> CTGGACGACT TGTTTGAAGGAAGAAGTATCTGCTTG GACGAA
MVQ1/L138A	<b>AACATTCGTCCAAGCAGATACTTC</b> TTCCTTCAAACAAGTCGTCCAGAT <b>GGCG</b> ACCGGA	<b>CGGATCCGGTCCGC</b> CATCTGGACGACT TGTTTGAAGGAAGAAGTATCTGCTTG GACGAA
MVQ1/T139A	<b>AACATTCGTCCAAGCAGATACTTC</b> TTCCTTCAAACAAGTCGTCCAGAT GCT <b>AGCGG</b> GA	<b>CGGATCCCGC</b> TAGCATCTGGACGACT TGTTTGAAGGAAGAAGTATCTGCTTG GACGAA
MVQ1/G140A	<b>AACATTCGTCCAAGCAGATACTTC</b> TTCCTTCAAACAAGTCGTCCAGAT GCTAAC <b>CGCG</b>	<b>CGGACGCG</b> GTTAGCATCTGGACGACT TGTTTGAAGGAAGAAGTATCTGCTTG GACGAA

**Tabelle A5. Oligonukleotide (Primer) zur Generierung der VQ-Chimären MVQ1/VQ8 und MVQ8/VQ1.** (Kapitel 2.3.9). Die Überhänge zur Rekombination sind kursiv hervorgehoben. Die Sequenzen sind beginnend mit der 5'-terminalen Nukleobase angegeben.

Konstrukt	Primer	
	<i>forward</i>	<i>reverse</i>
MVQ1/VQ8	<b>AACAGGTTATAGCATGAGCAACA</b> ATGATTTTACAAGTATTGTTCAACA GCTTACGGAT (=MVQ8 VQ-Motiv)	<b>CGGAATCCGTAAGCTGTTGAACAATA</b> CTTGAAAATCATTGTTGCTCATGCTA TAACC(=MVQ8 VQ-Motiv)
MVQ8/VQ1	<b>ACAATTCGTCCAAGCAGATACTTC</b> TTCCTTCAAACAAGTCGTCCAGAT GCTAACCGGA(=MVQ1 VQ-Motiv)	<b>GAGATCCGGTTAGCATCTGGACGACT</b> TGTTTGAAGGAAGAAGTATCTGCTTG GACGAA(=MVQ1 VQ-Motiv)

**Tabelle A6. Oligonukleotide (Primer) zur Generierung der MVQ8-Varianten** (Kapitel 2.3.9). Die Überhänge zur Rekombination sind kursiv hervorgehoben. Die Sequenzen sind beginnend mit der 5'-terminalen Nukleobase.

Konstrukt	Primer	
	<i>forward</i>	<i>reverse</i>
MVQ8-1	<b>ACA</b> ATTCTATAGCATGAGCAACAA TGATTTTACAAGTATTGTTCAACA GCTTACGGGA	<b>GAGAT</b> CCCGTAAGCTGTTGAACAATA CTTGTA AAAATCATTGTTGCTCATGCTA TAGAA
MVQ8-2	<b>ACA</b> ATTCGT CAGCATGAGCAACA ATGATTTTACAAGTATTGTTCAACA GCTTACGGGA	<b>GAGAT</b> CCCGTAAGCTGTTGAACAATA CTTGTA AAAATCATTGTTGCTCATGCTG ACGAA
MVQ8-3	<b>ACA</b> ATTCGTCCAAGCAGATAACAA TGATTTTACAAGTATTGTTCAACA GCTTACGGGA	<b>GAGAT</b> CCCGTAAGCTGTTGAACAATA CTTGTA AAAATCATTGTTATCTGCTTGG ACGAA
MVQ8-4	<b>ACA</b> ATTCGTCCAAGCAGATACTTC TTCCTTTACAAGTATTGTTCAACA GCTTACGGGA	<b>GAGAT</b> CCCGTAAGCTGTTGAACAATA CTTGTA AAGGAAGAAGTATCTGCTTG GACGAA
MVQ8-5	<b>ACA</b> AGGTTATAGCATGAGCAACT CTTCCTTCAAACAAGTCGTCCAGA TGCTAACCGGA	<b>GAGAT</b> CCGGTTAGCATCTGGACGACT TGTTTGAAGGAAGAGTTGCTCATGCTA TAACC
MVQ8-6	<b>ACA</b> AGGTTATAGCATGAGCAACA ATGATTTTAAACAAGTCGTCCAGA TGCTAACCGGA	<b>GAGAT</b> CCGGTTAGCATCTGGACGACT TGTTTAAAATCATTGTTGCTCATGCTA TAACC
MVQ8-7	<b>ACA</b> AGGTTATAGCATGAGCAACT CTTCCTTCAAACAAGTCGTCCAGA TGCTAACCGAT	<b>GAGA</b> ATCGGTTAGCATCTGGACGACT TGTTTGAAGGAAGAGTTGCTCATGCTA TAACC
MVQ8-8	<b>ACA</b> AGGTTATAGCATGAGCAACA ATGATTTTAAACAAGTCGTCCAGA TGCTAACCGAT	<b>GAGA</b> ATCGGTTAGCATCTGGACGACT TGTTTAAAATCATTGTTGCTCATGCTA TAACC

**Sequenz A1. Nukleotidsequenz der durch Gensynthese erzeugten Phosphorylierungsstellen-Mutante MVQ1mutP1.** Die zu Alanin umgewandelten Codons (GCT) sind unterstrichen dargestellt.

ATGGAGAATGCTCCGAGATACAGAGAAGCGACGAATCTGATTCCGGCTCCGAGATGTC  
ACAACAGCAACAACAGTTGCGGTATGAGCAGTAGCAGTGAAAGTAACAAACCACCAAC  
AGCTCCGACCCGACACGTAACCACAAGATCCGAATCCGGTAACCCGTACCCGACAACA  
TTCGTCCAAGCAGATACTTCTTCTTCAAACAAGTCGTCCAGATGCTAACCGGATCCG  
CCGAGAGACCCAAACACGGTTCATCTCTCAAACCAAACCCGACCCATCATCAACCCGA  
CCCAAGATCCGCTCCTTCTTCTTTCTCAATCCCACCAATCAAAGCCGTACCTAACAAG  
AAACAGTCTTCTTCTTTCAGCATCAGGGTTTCGTCTCTACGAGCGTCGTAATTCAATGA  
AGAATCTCAAAATCAATCCTTTAAACCCGGTTTTTAACCCGGTTAATTCAGCTTTCGC  
TCCCCGTAAACCGGAGATCCTCTCTCCAAGCATCTTAGATTTCCCATCTCTCGTTCTC  
AGCCCGGTTACGCCTCTTATACCCGACCCGTTTGATCGATCCGGGTCATCAAACCAAG  
CTCCCAACGAGCTTGCTGCGGAGGAGAAAGCAATGAAAGAGAGAGGCTTTTATTTGCA  
TCCAGGCTCCGGCAACAGGCTCCGATGGATCCAGAGCCTCGACTTCTTCTCTATTCCCG  
GTGACTGCTCCTAGAGTCTCAGGTTCTTCATCAGCTTCTACTTCTTGA

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Ich bewerbe mich mit dieser Dissertationsschrift erstmalig um die Erlangung eines Doktorgrades.

Halle/Saale, den 20.Oktober 2016

---

Pascal Pecher

## Curriculum vitae

### Persönliche Angaben

Name: Pascal Pecher  
Geburtstag und –ort: 24. Dezember 1980 in Marburg (Hessen)  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig  
Anschrift: Puschkinstraße 24  
06108 Halle (Saale)

### Ausbildung

ab 2016 wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ludger Wessjohann am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (Halle)

2014 – 2016 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Saskia Hogenhout am John Innes Centre (Norwich, Vereinigtes Königreich)  
*Thema der Arbeit: Untersuchung der biologischen Funktion von Effektor-Proteinen aus Phytoplasma*

2009 – 2014 Doktorand in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dierk Scheel am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (Halle)  
*Thema der Arbeit: Proteine mit VQ-Motiv - Substrate pflanzlicher MAP-Kinasen und potentielle Regulatoren der Immunabwehr*

2008 – 2009 wissenschaftliche Hilfskraft  
10/2007 Diplom in Biochemie  
*Thema der Arbeit: Einfluss der Position von Disulfidbrücken auf die Stabilität und Faltung von Ribonuclease A*

2001 – 2007 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

2000 – 2001 Grundwehrdienst

1992 – 2000 Max-Eyth-Gymnasium Alsfeld

## Publikationsliste

1. **Pecher P**, Arnold U (2009). The effect of additional disulfide bonds on the stability and folding of ribonuclease A. *Biophys Chem.* **141**, 21 – 28.
2. Ranf S, Eschen-Lippold L, **Pecher P**, Lee J, Scheel D (2011). Interplay between calcium signalling and early signalling elements during defence response to microbe- or damage-associated molecular patterns. *Plant J.* **68**, 100 – 113.
3. Ranf S, Grimmer J, Pöschl Y, **Pecher P**, Chinchilla D, Scheel D, Lee J (2012). Defense-related calcium signaling mutants uncovered via quantitative high-throughput screen in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant.* **5**, 115 – 130.
4. Bethke G, **Pecher P**, Eschen-Lippold L, Tsuda K, Katagiri F, Glazebrook J, Scheel D, Lee J (2012). Activation of the *Arabidopsis thaliana* mitogen-activated protein kinase MPK11 by the flagellin-derived elicitor peptide, flg22. *Mol Plant Microbe Interact.* **25**, 471 – 480.
5. Eschen-Lippold L, Bethke G, Palm-Forster M, **Pecher P**, Bauer N, Glazebrook J, Scheel D, Lee J (2012). MPK11 – a forth elicitor-responsive mitogen-activated protein kinase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav.* **7**, 1203 – 1205.
6. Vogel MO, Moore M, König K, **Pecher P**, Alsharafa K, Lee J, Dietz KJ (2014). Fast retrograde signaling in response to high light involves metabolite export, MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 6 and AP2/ERF transcription factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **26**, 1151 – 1165.
7. **Pecher P**, Eschen-Lippold L, Herklotz S, Kuhle K, Naumann K, Bethke G, Uhlig J, Weyhe M, Scheel D, Lee J (2014). The *Arabidopsis thaliana* mitogen-activated protein kinases MPK3 and MPK6 target a subclass of ‘VQ-motif’-containing proteins to regulate immune responses. *New Phytol.* **203**, 592 – 606.
8. Weyhe M, Eschen-Lippold L, **Pecher P**, Scheel D, Lee J (2014). Ménage à trois: the complex relationships between mitogen-activated protein kinases, WRKY transcription factors and VQ-motif-containing proteins. *Plant Signal Behav.* **9**, e29519.
9. Sheikh AH, Eschen-Lippold L, **Pecher P**, Höhenwarter W, Sinha AK, Scheel D, Lee J (2016). Regulation of WRKY46 transcription factor function by mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci.* **7**:61.

## Danksagung

Ich möchte mich hiermit herzlich bei Prof. Dr. Dierk Scheel für die Möglichkeit diese Arbeit in der von ihm geleiteten Abteilung durchführen zu dürfen und für die Übernahme des Gutachtens bedanken. Darüber hinaus bedanke ich mich für sein stetes Interesse am Voranschreiten meiner Arbeit, vor allem in der Schreibphase.

Mein besonderer Dank gilt auch Dr. Justin Lee, der zusammen mit Prof. Dr. Dierk Scheel die Arbeitsgruppe molekulare Signalverarbeitung leitet und mich grundlegend in der experimentellen Durchführung meiner Arbeit unterstützt und beraten hat. Ebenso danke ich ihm für sein Vertrauen in meine Laborbetreuung für verschiedene Studenten und Bachelorarbeiten, die mir viel Freude bereitete.

Prof. Dierk Scheel und Dr. Justin Lee haben mir das nötige „Werkzeug“ mit auf den Weg gegeben, um mich auf wissenschaftlichen Pfaden sicher bewegen zu können. Dafür bin ich sehr dankbar.

Des Weiteren möchte ich nicht versäumen, dem Sonderforschungsbereich 648 (Molekulare Mechanismen der Informationsverarbeitung in Pflanzen) für die Finanzierung meiner Promotionsarbeit sowie für die wertvolle Möglichkeiten zum fachlichen Austausch zu danken.

Herrn Professor Dr. Imre Somssich danke ich für die Bereitstellung der verwendeten *WRKY*-Gene.

Ich danke außerdem allen Gutachtern für die Begutachtung der vorliegenden Dissertation.

Bei der gesamten Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie aber vor allem bei der Arbeitsgruppe Zelluläre Signaltransduktion des IPB möchte ich mich für ein angenehmes Arbeitsklima und die gegenseitige Rücksichtnahme und Unterstützung bedanken. In diesem Zusammenhang möchte ich vor allem Dr. Lennart Eschen-Lippold hervorheben, der die Durchführung der gezeigten Protoplasten-Assays übernommen hat und mir bei der schriftlichen Abfassung behilflich war, sowie Frau Dr. Steffanie Ranf, die mir immer mit viel Rat und "*know how*" aber auch als moralische Stütze zur Seite stand, wenn mal etwas nicht ganz rund lief.

Für die massenspektrometrischen Analysen möchte ich Herrn Dr. Wolfgang Höhenwarter und Frau Dr. Petra Majovsky danken. Außerdem danke ich Frau Siska Herklotz für ihre unermüdliche Arbeitsbereitschaft - vor allem während der umfangreichen Y2H-Analysen.

Ich habe am IPB viele nette Menschen kennengelernt, die ein tolles Arbeitsumfeld geschaffen haben. Dabei haben sich einige sehr gute Freundschaften entwickelt, die mir während der Promotion zusätzliche Kraft gegeben und Freude bereitet haben. Hierbei möchte ich vor allem Kati, Michaela und Ramona hervorheben, sowie Steffi und Lennart, die ich schon zuvor erwähnt habe.

Aber auch meinen altbewährten Freunden und Mitbewohnerinnen Carolin und Julia möchte ich vielmals danken, dass sie mich immer aufgebaut haben - wenn die Tage im Labor mal wieder länger wurden und ich bei ihnen immer Zuflucht finden konnte, wenn ich mal aus dem Wissenschaftsalltag ausbrechen wollte. Vielen Dank für eure Freundschaft.

Um zwischendurch mal "abschalten" zu können hat mich mein treuer Hund Mandy (zu diesem Zeitpunkt ist sie stolze 15 Jahre alt) zu täglichen Spaziergängen animiert. Dafür bin ich ihr dankbar und entschuldige mich, dass die Gassirunden ab und zu etwas kürzer ausfielen als es ihr lieb gewesen wäre.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie für all ihre Unterstützung. Nicht nur während der Promotion, sondern auch während des gesamten Studiums waren diese stets geduldig, auch wenn wir uns oft über längere Zeiträume nicht gesehen haben. Hierzu zähle ich nicht nur meine Mum und meine Geschwister und deren Familie, sondern auch meine "neue" Familie, die ich durch meinen geliebten Schatz dazugewonnen habe. Diesem gilt zum Abschluss mein größter Dank, dafür, dass er zu jeder Zeit immer an meiner Seite gestanden und all meine Launen tapfer ertragen hat. Er hat mein Leben bereichert und dafür bin ich unendlich dankbar.

*Vielen Dank*