

Untersuchungen des cytoplasmatischen Phytochrom-
Signalwegs in *Physcomitrella patens* durch Charakterisierung
von Phytochrom 4 Interaktionspartnern

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium

Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Eingereicht von Dipl. Biologin Anna Lena Ermert (geb. Lichtenthäler)

Geb. 08.06.1984 in Siegen

Juli 2016

Erstgutachter: Prof. Jon Hughes (Justus-Liebig-Universität Gießen)

Zweitgutachter: PD Dr. Mathias Zeidler (Justus-Liebig-Universität Gießen)

Inhalt

1. Einleitung.....	1
1.1 Licht und Photorezeptoren.....	1
1.2 Phytochrome.....	1
1.2.1 Phytochrom Struktur und Funktion	3
1.2.2 Phytochrom <i>Signalling</i>	4
1.3 Phototropine.....	7
1.3.1 Phototropin Struktur und Funktion.....	7
1.3.2 Phototropin <i>Signalling</i>	8
1.4 Hinweise für Phytochrom-Phototropin Ko-Aktion in höheren Pflanzen.....	11
1.5 <i>Physcomitrella patens</i> als Modellorganismus.....	12
1.5.1 Rotlichteffekte in Moosen	13
1.5.2 <i>Physcomitrella</i> und Phytochrom	14
1.6 Phytochrom-Phototropin Ko-Aktion in niederen Pflanzen.....	15
1.7 Das Paradox der Lichtrichtungswahrnehmung durch Phytochrom	17
1.8 Ziele und Fragestellungen	20
2. Material	22
2.1 Organismen	22
2.1.1 Bakterien.....	22
2.1.2 Hefen	22
2.1.3 Pflanzen	22
2.2 Puffer, Lösungen, Medien	22
2.2.1 Wasser.....	22
2.2.2 Für Arbeiten mit DNA.....	22
2.2.3 Für Arbeiten mit Bakterien	24
2.2.4 Für Arbeiten mit Hefe.....	24
2.2.5 Enzyme und Enzympuffer	25
2.2.6 Für Arbeiten mit Proteinen.....	26
2.2.7 Extraktion von PCB aus <i>Spirulina</i>	27
2.2.8 Pflanzenanzucht	28
2.2.9 Transformation von <i>Physcomitrella</i> -Protoplasten mittels <i>Particle Inflow Gun</i> ...	28
2.2.10 <i>Agrobacterium</i> -vermittelte Transformation von Tabak (<i>Nicotiana benthamiana</i>)	29
2.3 Antikörper	29
2.4 Plasmide und Vektoren.....	29
2.5 Oligonukleotide	32
2.6 Feinchemikalien	36
2.7 Pflanzenanzucht.....	37
2.8 LED-Belichtungsanlagen.....	37
2.9 Spektralphotometer	38
2.10 Lumi- <i>Imager</i>	38
2.11 Makroskop und Mikroskope	38
3. Methoden.....	40
3.1 DNA-Methoden	40
3.1.1 Agarose-Gelelektrophorese und Färbung von DNA	40
3.1.2 Restriktions-Endonuklease-basierte Klonierung von <i>Y2H</i> - und <i>Y3H</i> - Konstrukten.....	40

3.1.2.1	Klonierung der <i>Physcomitrella</i> Phytochrom CDS in pBAC	40
3.1.2.2	Klonierung aller anderen <i>Y2H/Y3H</i> -Konstrukte	41
3.1.3	<i>Gateway</i> Klonierungen.....	41
3.1.3.1	Herstellung von <i>Entry</i> -Klonen.....	42
3.1.3.2	Herstellung von Expressionsklonen für <i>Y2H</i>	44
3.1.3.3	Herstellung von Expressionsklonen für Lokalisationsstudien	45
3.1.3.4	Herstellung von Expressionsklonen für <i>Split-YFP</i>	45
3.1.3.5	Herstellung von Expressionsklonen für Co-IP	46
3.1.4	DNA-Präparation aus <i>E. coli</i>	46
3.1.5	DNA-Präparation aus Hefe.....	46
3.2	Bakterien-Methoden.....	47
3.2.1	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	47
3.2.2	Bakterientransformation.....	47
3.3	Hefe-Methoden	47
3.3.1	Das <i>MatchMaker</i> Hefe-Zwei-Hybrid-System.....	47
3.3.2	Arbeiten mit dem <i>MatchMaker</i> Hefe-Zwei-Hybrid-System	48
3.3.3	Hefe-Einzeltransformation.....	50
3.3.4	Hefe-Doppeltransformation	50
3.3.5	Untersuchung der Reporter-Autoaktivierung durch <i>Bait</i> -Expression	51
3.3.6	<i>Y2H</i> Positivkontrollen	51
3.3.7	Einfaches <i>Mating</i> -Protokoll zum Interaktionstest	52
3.3.8	Quantitatives Hefe- <i>Mating</i> zur Effizienzbestimmung	52
3.3.9	Bestimmung der <i>Mating</i> -Effizienz bei verschiedenen <i>Bait-Prey</i> -Verhältnissen..	53
3.3.10	Herstellung von Holophytochrom in Hefe durch Zusatz von PCB	53
	ins Selektionsmedium	53
3.3.11	Semiquantitatives <i>Y2H</i> -Wachstums- <i>Assay</i> in Rc und Rp.....	54
3.3.12	<i>Y3H</i> -Experimente	54
3.3.13	Lichtabhängiges ONPG- <i>Y2H</i> - <i>Assay</i>	54
3.4	<i>Y2H</i> -Oligo dT- <i>Library-Screens</i>	55
3.4.1	Apo-BD:PHY4 Oligo dT- <i>Library-Screen</i> mittels Doppel-Transformation	55
3.4.2	Holo-phy4:BD <i>Y2H</i> -Oligo dT-cDNA <i>Library-Mating-Screen</i>	56
3.4.3	Selektion putativer phy4:BD-Interaktoren.....	57
3.4.4	<i>In silico</i> Analyse putativer phy4-Interaktoren	57
3.4.5	Experimentelle Untersuchung ausgewählter phy4-Interaktoren	59
3.5	Proteinbiochemische-Methoden.....	59
3.5.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	59
3.5.2	Färbemethode.....	59
3.5.3	<i>Western Blots</i>	59
3.5.4	Hefe-Probenaufbereitung für SDS-PAGE.....	60
3.5.5	Proteinextraktionen aus <i>Nicotiana benthamiana</i>	60
3.5.5.1	Für Expressionstest.....	60
3.5.5.2	Für Co-IP.....	61
3.5.6	Co-Immunopräzipitation (Co-IP)	61
3.6	Extraktion von PCB aus <i>Spirulina</i> -Tabletten.....	61
3.7	Pflanzen-Methoden.....	62
3.7.1	<i>Physcomitrella</i> -Anzucht und Kulturpflege.....	62
3.7.2	<i>Nicotiana benthamiana</i> Anzucht für <i>Agrobacterium</i> -Transfektion.....	62

3.7.3	Transformation von <i>Nicotiana benthamiana</i> mit <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ...	62
3.7.4	Biolistische Transformation von <i>Physcomitrella patens</i> und <i>Allium cepa</i> mittels <i>Particle-Inflow-Gun (PIG)</i>	63
3.7.4.1	Herstellung von <i>Physcomitrella</i> Protonema-Platten für die <i>PIG</i> -..... vermittelte Transformation.....	63
3.7.4.2	Vorbereitung von Zwiebeln für die <i>PIG</i> -vermittelte Transformation	63
3.7.4.3	Präzipitation von DNA an Gold- und Wolframpartikel.....	63
3.7.4.4	Beschuss der Präparate mittels <i>PIG</i>	64
3.7.5	Lokalisationsstudien mittels Fluoreszenzmikroskopie	64
3.7.6	<i>In vivo</i> Interaktionsstudien mittels <i>Split-YFP</i> und Konfokalmikroskopie	64
3.8	Messung von Bestrahlungsstärken:.....	65
4.	Ergebnisse	66
4.1	Herstellung und Charakterisierung von phy4- <i>Baits</i>	66
4.1.1	Untersuchung der Expression der <i>Bait</i> -DNA-BD-Fusionsproteine in Hefe <i>via Western Blot</i>	66
4.1.2	Einstellung der 3-AT Konzentration für phy4:BD- <i>Bait</i> Hefen nach Doppeltransformation oder <i>Mating</i>	67
4.2	Etablierung von lichtabhängigem Hefe- <i>Mating</i> und semiquantitativen <i>Y2H</i> -Interaktions- <i>Assays</i>	68
4.2.1	Etablierung von Hefe- <i>Mating</i>	68
4.2.2	Semiquantitatives <i>Y2H</i> -Wachstums- <i>Assay</i> in Rc und Rp.....	70
4.2.3	Etablierung von quantitativem Hefe- <i>Mating</i>	73
4.3	Untersuchung der Phytochrom-Phototropin-Interaktion.....	74
4.3.1	Charakterisierung der Interaktion von phy4 mit <i>Physcomitrella</i> Phototropinen.....	74
4.3.1.1	Semiquantitatives <i>Y2H</i> -Wachstums- <i>Assay</i> zur Untersuchung der Interaktion von phy4:BD mit AD:phot	74
4.3.1.2	<i>Split-YFP</i> - <i>Assay</i> zur Untersuchung der Interaktion von phy4:YFP _C mit YFP _N :phot	74
4.3.1.3	Quantifizierung der BD:phy4-AD:phot-Interaktionsstärke mit einem lichtabhängigen enzymatischen <i>Y2H</i> - <i>Assay</i>	75
4.3.1.4	Etablierung von Co-IP zum <i>ex-vivo</i> Interaktionsnachweis von HA:phy4 mit myc:phot.....	77
4.3.1.5	Co-IP von HA:phy4 mit myc:phot	86
4.3.2	Charakterisierung der Interaktion von phyA mit <i>Arabidopsis</i> Phototropinen.....	87
4.3.2.1	<i>Y2H</i> - und <i>Y3H</i> -Experimente.....	88
4.3.2.2	Co-IP von HA:phyA und myc:phot1	92
4.3.2.3	<i>Split-YFP</i> -Analyse der Interaktion von phyA oder phot1 mit PKS1 in Zwiebel	93
4.4	Holo-phy4:BD <i>Y2H</i> -Oligo dT- <i>Library-Screen</i> mittels <i>Mating</i>	94
4.4.1	Bestimmung der <i>Mating</i> -Effizienz bei verschiedenen <i>Bait-Prey</i> Verhältnissen....	94
4.4.2	Untersuchungen der cDNA-Bibliothek und Abschätzung des <i>Screening</i> -..... Maßstabs.....	95
4.4.3	Holo-phy4:BD- <i>Y2H</i> Oligo dT-cDNA- <i>Library-Screen</i> und Sortierung putativer Interaktoren	96
4.4.4	Sequenzanalyse putativer Phytochrom 4 Interaktions-partner.....	98
4.5	<i>In silico</i> und experimentelle Untersuchung ausgewählter Phytochrom-Interaktions- partner aus Apo-BD:PHY4- und Holo-phy4:BD- <i>Library-Screens</i>	103

4.5.1	Verifizierung der Interaktion ausgewählter Partner mit phy4 im semiquantitativen <i>Y2H</i> Wachstums- <i>Assay</i>	103
4.5.2	Charakterisierung ausgewählter phy4-Interaktionspartner mittels <i>in vivo</i> Lokalisations- und <i>Split-YFP</i> -Interaktionsstudien	107
4.5.2.1	Pirin / HIP1 (Pp3c2_10320V1.1) und Pirin- <i>like</i> Protein / (HIP2) (Pp3c19_20830V1.1).....	109
4.5.2.2	Zink-Finger (ZF)-Protein / HIP3 (Pp3c10_4820V1.1).....	111
4.5.2.3	PLEIOTROPIC REGULATORY LOCUS 1 (PRL1) / HIP4 (Pp3c16_8560E1.1).....	113
4.5.2.4	F-Box- <i>interacting</i> /Kelch-Protein (Pp1s271_60V6.1) und Kelch- <i>Repeat</i> -Protein / HIP5 (Pp3c7_3040V1.1)	115
4.5.2.5	P- <i>Loop</i> -Protein (PLP) / HIP6 (Pp3c6_4480V1.1)	119
4.5.2.6	Ser/Thr-Proteinkinase/ HIP7 (Pp3c17_9390V1.1).....	121
4.5.2.7	TP53-regulierende Kinase (Pp3c15_20330J1.1)	123
4.5.2.8	Ca ²⁺ -abhängige Proteinkinase / HIP8 (Pp3c11_25550V1.1)	124
4.5.2.9	Rhomboid Intramembran-Serinprotease / HIP9 (Pp1s254_10 V6.2).....	127
4.5.2.10	Unbekanntes Protein / HIP11 (Pp3c20_16210V1.1)	129
4.5.2.11	Eukaryotischer Translations-Initiationsfaktor 5A (eIF-5A) / HIP12 (Pp3c13_15620V1.1).....	131
4.5.2.12	EF1 α / HIP13 (Pp3c1_23670V1.1)	133
4.5.2.13	14-3-3 Protein / HIP14 (Pp3c3_8540C1.1)	135
4.5.3	Vergleich der phy4 und HIP Expressionsdaten.....	137
5.	Diskussion:.....	138
5.1	Etablierung von <i>Y2H</i> -Experimenten.....	138
5.2	Interaktion von Phytochrom mit Phototropin.....	139
5.2.1	Interaktion von phy4 mit vier <i>Physcomitrella</i> Phototropinen.....	139
5.2.2	Charakterisierung der Interaktion von <i>Arabidopsis</i> phyA mit phot1 und phot2	143
5.3	Holo-phy4:BD <i>Y2H</i> -Oligo dT-cDNA <i>Library-Mating-Screen</i>	146
5.4	Untersuchung ausgewählter Partner aus Apo-BD:PHY4 und Holo-phy4:BD- <i>Y2H</i> -cDNA-Library- <i>Screens</i>	147
5.4.1	Pirin / HIP1 und Pirin-ähnliches Protein / (HIP2)	148
5.4.2	ZF-Protein / HIP3	150
5.4.3	PLEIOTROPIC REGULATORY LOCUS 1 / HIP4.....	151
5.4.4	F-Box- <i>interacting</i> /Kelch-Protein und Kelch- <i>Repeat</i> -Protein / HIP5.....	153
5.4.5	P- <i>Loop</i> -Protein (PLP) / HIP6	155
5.4.6	Ser/Thr-Proteinkinase / HIP7	157
5.4.7	TP53-regulierende Kinase.....	158
5.4.8	Ca ²⁺ -abhängige Proteinkinase (CDPK) / HIP8.....	160
5.4.9	Rhomboid Intramembran-Serinprotease / (HIP9)	163
5.4.10	Rhodopsin- <i>Tail</i> -Protein.....	165
5.4.11	Ankyrin- & BTB/POZ-Protein / (HIP10).....	166
5.4.12	Autophagie-Protein	168
5.4.13	Protein mit unbekannter Funktion / HIP11	170
5.4.14	eIF-5A / HIP12	171
5.4.15	EF1 α / HIP13.....	173
5.4.16	14-3-3-Protein / HIP14	175
6.	Zusammenfassung / Schlussfolgerungen.....	178

7. <i>Summary</i>	185
8. Ausblick:.....	189
9. Literatur.....	191
10. Abbildungsverzeichnis.....	225
11. Tabellenverzeichnis.....	228
12. Abkürzungen.....	229

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Ermert, A.L., Mailliet, K., and Hughes, J. (2016). Holophytochrome-interacting proteins in *Physcomitrella*: putative actors in phytochrome cytoplasmic signaling. *Frontiers in Plant Science* 7.

Jaedicke, K., Lichtenthäler, A.L., Meyberg, R., Zeidler, M., and Hughes, J. (2012). A phytochrome-phototropin light signaling complex at the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 12231-12236.

1. Einleitung

1.1 Licht und Photorezeptoren

Licht spielt für Pflanzen eine fundamentale Rolle, und zwar nicht nur als Energiequelle für photoautotrophes Wachstum, sondern auch als essentielle Informationsquelle bezüglich Lichtqualität (Wellenlänge), -quantität (Intensität), -periodizität (Tageslänge), -richtung und in manchen Fällen sogar der -polarisation (Smith, 2000). So haben im Dunkeln (D) gewachsene Keimlinge einen deutlich von in Licht gewachsenen Pflanzen abweichenden Phänotyp: lange Hypokotyle, ausbleibende Chlorophyll-Biosynthese und geschlossene Keimblätter. In Licht hingegen findet ein völlig anderes Entwicklungsmuster statt: Keimlinge wachsen mit kurzem Hypokotyl da Licht für die Pflanze bedeutet, dass die Erdoberfläche erreicht wurde, es findet De-Etiolierung statt und die Blätter entfalten sich, um von heterotrophem zu photoautotrophem Wachstum überzugehen. Licht hat folglich einen direkten wenn nicht sogar den wichtigsten Einfluss auf Wachstum und Entwicklung von Pflanzen. Es reguliert z.B. Keimung, Photomorphogenese, Blühinduktion (Flint & McAlister, 1937; Searle & Coupland, 2004; Schäfer & Nagy, 2006) aber auch die Anpassung an eine sich ständig ändernde Lichtumgebung wie z.B. Blattmorphologie oder Phototropismus (Holland *et al.*, 2009). Um sich der (Licht-) Umgebung optimal anpassen zu können, haben Pflanzen eine Vielzahl verschiedener Photorezeptoren evolviert. Unterschieden werden hier mindestens zwei Klassen an Photorezeptoren, zum einen die Blau- und UV-Licht absorbierenden Rezeptoren, darunter Cryptochrome (crys, Ahmad (1999)), Phototropine (phot, Briggs and Huala (1999)) Zeitlupe-Proteine (ZTL, FKF1, LKP2, Möglich *et al.* (2010)) und Rotlicht- (RL) absorbierende Phytochrome (phys), die hauptsächlich das rote und dunkelrote Licht des Spektrums perzipieren. Beide Photorezeptor-Familien sind in höheren und niederen Pflanzen (Briggs & Olney, 2001), wie auch in Pilzen (Chen & Loros, 2009) und photosynthetischen (Hughes *et al.*, 1997; Yeh *et al.*, 1997) sowie in nicht-photosynthetischen Bakterien (Davis *et al.*, 1999) vorhanden. In Algen, Farnen und Hornmoosen ist darüber hinaus ein weiterer Photorezeptor bekannt: Neochrom (Nozue *et al.*, 1998; Kawai *et al.*, 2003; Suetsugu *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2014). Diese Photorezeptor-Chimäre besteht aus dem N-terminalen photosensorischen Modul von Phytochrom und einem nahezu kompletten Phototropin-Segment (Suetsugu *et al.*, 2005) und weist folglich sowohl Rotlicht- als auch Blaulicht- (BL) absorbierende Eigenschaften auf. Interessanterweise scheint die Photorezeptor-Fusion zwei Mal unabhängig voneinander evolviert zu sein, jedoch gibt es keine Hinweise darauf, dass sie auch in höheren Pflanzen oder *Physcomitrella* vorkommt (Nozue *et al.*, 1998; Kawai *et al.*, 2003; Suetsugu *et al.*, 2005)

1.2 Phytochrome

Phytochrome sind Rotlicht- (R) und Dunkelrotlicht- (FR, *Far Red*) Rezeptoren, die in höheren Pflanzen fundamentale entwicklungsbiologische und physiologische Vorgänge auslösen und regulieren, wie z.B. Samenkeimung (Flint & McAlister, 1935; Borthwick *et al.*, 1952), Photomorphogenese (Chen & Chory, 2011) bzw. Pigmentakkumulation (Godnev *et al.*, 1966), Hypokotyl-Streckung (Nagatani *et al.*, 1991), circadiane Rhythmik (Somers *et al.*, 1998; Millar, 2004) und Blühinduktion (Searle & Coupland, 2004). Pflanzliche Phytochrome sind lösliche ca. 124 kDa große Biliproteine, die als Dimere funktionieren (Vierstra & Quail, 1982; Furuya & Song, 1994). Um Licht zu perzipieren, benötigen sie einen Chromophor – bei cyanobakteriellen Phytochromen ist dies Phycocyanobilin (PCB), bei pflanzlichen

Phytochromen Phytochromobilin: (PΦB) – ein lineares Tetrapyrrol, welches sich von Häm durch eine Oxidation (mittels Hämoxygenase 1, HO1) und Reduktion (durch die PΦB-Synthase) ableitet (Lagarias & Rapoport, 1980; Rüdiger *et al.*, 1980; Elich *et al.*, 1989). Der Chromophor wird aus den Chloroplasten exportiert und assembliert im Cytoplasma autokatalytisch mit dem Apophytochrom. Dabei wird der PΦB-Chromophor an einen konservierten Cysteinrest an die GAF-Domäne des N-Terminus kovalent gebunden (Lagarias & Lagarias, 1989; Lamparter *et al.*, 2001). Typischerweise liegen Phytochrome in zwei unterschiedlichen Zuständen vor (Borthwick *et al.*, 1952): dem mutmaßlich physiologisch aktiven Dunkelrot- (~730 nm) absorbierenden Pfr-Zustand und dem vermutlich physiologisch-inaktiven Rotlicht- (~666 nm) absorbierenden Pr-Zustand. Beide Zustände wandeln sich durch Lichtabsorption der jeweiligen Wellenlänge über mehrere sehr kurzlebige Intermediate in den jeweils anderen Zustand um, wobei der Chromophor eine cis-trans-Isomerisierung um die C15-C16-Bindung erfährt, was in einer Rotation des D-Rings resultiert (Rüdiger *et al.*, 1983; Kneip *et al.*, 1999). Dieser Vorgang wird als R/FR-Photochromizität bezeichnet. Während der Pr-Zustand nicht in Wellenlängen oberhalb 710 nm absorbiert, überlappt das Absorptionsspektrum des Pfr-Zustands hingegen in allen Bereichen mit dem des Pr-Zustands (Litts *et al.*, 1983). Bei konstanter Rotlichtbestrahlung absorbiert der Pfr-Zustand auch zu einem geringen Anteil Rotlicht, so dass stets ein Teil des Pfr unmittelbar zurück in den Pr-Zustand konvertiert. Dieser Zustand wird als photostationäres Gleichgewicht oder Photoäquilibrium bezeichnet. Dieses Absorptionsverhalten führt dazu, dass unter keinen Lichtbedingungen 100% des Pfr-Zustands vorliegen kann. Es ist daher das Verhältnis von Pr zu Pfr, das eine Aussage über die tages- und jahreszeitlich wechselnde Lichtumgebung der Pflanze trifft (Smith, 1982). Dies ist von immenser Bedeutung für Lichtmengen- und Lichtqualitäts-abhängige physiologische Reaktionen, wie zum Beispiel der Schattenflucht-Reaktion von Pflanzen, die in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander wachsen (Smith & Whitelam, 1997; Franklin, 2008). Eine Beschattung durch andere Pflanzen resultiert in einem höheren FR-Anteil im Licht, welches zu einem veränderten Pfr zu gesamt Phytochrom-Verhältnis und zur Ausbildung längerer Hypokotyle führt.

Nicht nur durch FR-Bestrahlung kann die Abundanz des Pfr-Zustands des Phytochroms verringert werden, sondern auch durch einen thermodynamischen Prozess der sogenannten *Dark-Reversion* (Hsiao & Vidaver, 1984) und zusätzlich auch mittels COP9-Signalosom-vermitteltem proteolytischem Abbau (Schwechheimer & Deng, 2000). Beide Prozesse tragen somit zu einer Verringerung des physiologisch aktiven Pfr-Zustands bei und sorgen dafür, dass das Signaltransduktionssystem aktivierbar bleibt.

Arabidopsis thaliana besitzt fünf Phytochrome: phyA-phyE, welche bezüglich ihrer Licht-Labilität und ihrer Funktionen in TypI und TypII-Phytochrome eingeteilt werden (Furuya, 1989): phyA ist das Einzige Licht-labile TypI-Phytochrom, welches nach Lichtaktivierung in den Zellkern transportiert und rapide abgebaut wird, nachdem es durch die E3-Ubiquitin-Ligase CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1) zum Abbau durch das 26S-Proteasom markiert wurde (Deng *et al.*, 1991; Seo *et al.*, 2004; Saijo *et al.*, 2008). Daher ist phyA in Dunkel-gewachsenen Keimlingen am abundantesten, was auch mit seiner prädominanten Funktion in früher Keimlings-Entwicklung korreliert. Die anderen *Arabidopsis* Phytochrome gehören Typ II an, werden im Licht stabil exprimiert und übernehmen daher Funktionen in späteren Entwicklungsstadien grüner Pflanzen.

1.2.1 Phytochrom Struktur und Funktion

Phytochrome setzen sich strukturell aus verschiedenen Domänen zusammen: Das N-terminale photosensorische Modul besteht aus einer PAS- (PER/ARNT/SIM), der bereits erwähnten Chromophor-bindenden GAF- (cGMP/Phosphodiesterase/Adenylcyclase/FhIA) und einer PHY- (Phytochrom-spezifischen) Domäne. PAS- und GAF-Domänen sind strukturell sehr ähnlich und beide der PAS-Superfamilie zugehörig. Es konnte durch Kristallisation und Röntgenstrukturanalysen des Sensormoduls des cyanobakteriellen Phytochroms cph1 gezeigt werden, dass die bis dahin strukturell unbekannte PHY-Domäne, obwohl auf Aminosäure-Ebene keiner bisher bekannten Domäne zuweisbar, in der Tat strukturelle Eigenschaften der PAS/GAF Domänen aufweist (Essen *et al.*, 2008). Phytochrome könnten daher in die kleine Gruppe der Tandem-GAF Proteine eingegliedert werden und zeigen damit Ähnlichkeiten zu Phosphodiesterasen und Adenyl-Cyclasen (Essen *et al.*, 2008). Eine einzigartige Eigenschaft der Phytochromstruktur ist eine zungenförmige Ausstülpung der PHY-Domäne, welche zusammen mit dem alpha-helikalen N-Terminus die Chromophortasche verschließt und so vermutlich den Pfr-Zustand stabilisiert (Essen *et al.*, 2008; Yoon *et al.*, 2008). Auf diese Weise kann eine abgegrenzte Umgebung für den Chromophor geschaffen werden, die eine De- und Re-Protonierung während der Pr-Pfr-Photokonversion ermöglicht (Kneip *et al.*, 1999). Wenigstens im Falle von *Synechocystis* cph1 durchläuft der N-Terminus signifikante Strukturänderungen infolge von Assemblierung und Photokonversion (Strauss *et al.*, 2005). Yang *et al.* (2009) konnten darüber hinaus für das photosensorische Kernmodul von *Pseudomonas aeruginosa* Bakteriophytochrom zeigen, dass bei Photokonversion nicht nur der Chromophor isomerisiert, sondern auch, dass in dem Pr bzw. Pfr-Zustand unterschiedliche Aminosäurereste mit dem Biliverdin-Chromophor interagieren und so das entsprechende Isomer stabilisieren. Die Folge ist eine lokale Konformationsänderung im N-Terminus. Darüber hinaus weisen neuere Erkenntnisse darauf hin, dass es bei der Pr-Pfr-Photokonversion u. A. zu einer strukturellen Umfaltung von zwei β -Faltblättern zu einer α -Helix in der PHY-Zungenstruktur kommen könnte, was wahrscheinlich eine Rolle in der intramolekularen Signaltransduktion spielt (Inomata *et al.*, 2005; Takala *et al.*, 2014; Nagano, 2016). Abgesehen davon wurde zuerst für *Deinococcus radiodurans* ein sogenannter *light-sensing knot* beschrieben – eine komplizierte dreifach verknotete Struktur aus 35 N-terminalen Aminosäuren N-terminal der PAS-Domäne und der GAF-Domäne mit einem hydrophoben Zentrum (Wagner *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2008). Obwohl strukturelle Unterschiede zwischen (Cyano-)bakteriellen und pflanzlichen Phytochromen existieren, ist zumindest die Domänenstruktur des photosensorischen Moduls konserviert und man geht man davon aus, dass auch pflanzliche Phytochrome den Knoten am N-Terminus besitzen und dass er Signalfunktion hat. Die Konformer-spezifische Bindung von PIF3 durch phyB z.B. scheint durch Mutationen in der Knotenregion beeinträchtigt zu werden (Kikis *et al.*, 2009). Das N-terminale Sensormodul ist neben der Lichtwahrnehmung wahrscheinlich auch an Signalübertragung beteiligt, denn konservierte Motive der PAS-Domänen kommen außer in Phytochromen auch in anderen Proteinen mit Funktionen in Signaltransduktionskaskaden vor. In der Tat wurden Phytochrom-Interaktionspartner in *Arabidopsis thaliana* beschrieben, die sich durch PAS-Domänen auszeichnen oder mit PAS-Domänen von Phytochromen interagieren (Choi *et al.*, 1999). Obwohl Analysen von Mutanten (Quail *et al.*, 1995) und auch ein Zusammenhang mit Zwei-Komponenten-Signalübertragung (Hughes *et al.*, 1997; Hughes & Lamparter, 1999) zunächst darauf hinwiesen, dass die Phytochrom-Signaltransduktion vom C-Terminus vermittelt wird, konnten Matsushita und Mitarbeiter demonstrieren, dass der Phytochrom B C-Terminus für Signalfunktion abkömmlich ist und eine Fusion vom N-

Terminus an eine Dimerisierungs-Domäne (und ein nukleäres Lokalisationssignal, NLS) ausreicht, um den *phyB*-Phänotyp zu retten (Matsushita *et al.*, 2003; Mateos *et al.*, 2006). Des Weiteren konnten Wagner *et al.* (1996) durch *Domain-Swapping*-Experimente ebenfalls belegen, dass der N-Terminus pflanzlicher Phytochrome Lichtwahrnehmungs-, Transport- und Signaltransduktionsfunktionen ausübt. Es scheint daher, als sei das C-terminale Modul dabei lediglich für die Dimerisierung und nukleäre Lokalisation zuständig.

Die N- und C-terminale Hälfte des Moleküls werden durch eine flexible sogenannte *Hinge*-Region getrennt, die möglicherweise bei der Autophosphorylierung und der Interaktion mit putativen Signalüberträgern eine wichtige Rolle spielt (Kim *et al.*, 2004). Das C-terminale Transmittermodul besteht aus einem PAS-*Repeat* und einer Histidinkinase-verwandten Domäne (HKRD). Letztere weist auf Aminosäureebene Homologie zu bakteriellen Zwei-Komponenten-Systemen auf, bei der allerdings das in Prokaryoten konservierte, lichtabhängig autophosphorylierte Histidin fehlt (Yeh *et al.*, 1997). Nichtsdestoweniger werden auch pflanzliche Phytochrome lichtabhängig (auto-)phosphoryliert (Yeh & Lagarias, 1998). Dies geschieht an konservierten Serin-Resten, womit pflanzlichen Phytochromen eher Eigenschaften von Serin / Threonin Kinasen zukommen. Phytochrom-Phosphorylierung kann die Interaktion mit anderen Signalproteinen modulieren (z.B. von phyA mit COP1). Zusätzlich wurden auch mögliche Phytochrom Kinase Substrate identifiziert, darunter PKS1, PIF3, CRY1/CRY2 und Aux/IAA-Proteine (Ahmad, M *et al.*, 1998; Fankhauser *et al.*, 1999; Colon-Carmona *et al.*, 2000; Al Sady *et al.*, 2006). Die Phytochrom-abhängige Phosphorylierung kann anschließend zu Polyubiquitinierung und Proteindegradation führen (z.B. von PIF3, (Bauer *et al.*, 2004; Al Sady *et al.*, 2006; Al Sady *et al.*, 2008).

1.2.2 Phytochrom Signalling

In höheren Pflanzen basiert die Wirkung von Phytochrom vorwiegend auf einem Mechanismus der Transkriptions-Regulation (Quail, 2010), wobei Pfr durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren wie PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 3 (PIF3) oder ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5) die Transkription lichtregulierter Gene induziert oder reprimiert (Ma *et al.*, 2001; Tepperman *et al.*, 2001; Monte *et al.*, 2004; Tepperman *et al.*, 2006). Schätzungsweise werden 10% der *Arabidopsis*-Gene Phytochrom-abhängig reguliert, darunter bHLH-Transkriptionsfaktoren (z.B. PIF3), Zink finger- (ZF, CONSTANS-LIKE 1 und 2), bZIP-Transkriptionsfaktoren (HY5), MYB-*related* Faktor CCA1 und Andere. Während R-abhängige Genregulation von phyA und phyB vermittelt wird, hat lediglich phyA Einfluss auf FR-abhängige Genregulation.

Ein essentieller Bestandteil der Phytochrom-Signaltransduktion ist dabei die lichtabhängige Kompartimentierung des Photorezeptor-Moleküls: nach Belichtung mit Rotlicht migriert der physiologisch aktive Pfr-Zustand des Moleküls in den Zellkern (Sakamoto & Nagatani, 1996; Nagy *et al.*, 2000; Kircher *et al.*, 2002). Der phyA-Kernimport kann durch kurze R-, FR- oder B-Pulse induziert werden (Desnos *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2005). Im Fall von phyA sind zwei essentielle *Shuttle*-Moleküle dafür zuständig, nämlich FHY1 (FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL 1) und sein Paralog FHL (FHY1 LIKE), die an phyA Pfr binden und in einem Importin-abhängigen Mechanismus phyA innerhalb weniger Minuten nahezu quantitativ in den Kern transportieren (Kircher *et al.* (1999); Hiltbrunner *et al.* (2005); Zhou *et al.* (2005); Hiltbrunner *et al.* (2006); Rösler *et al.* (2007); Helizon *et al.*, unpublizierte Ergebnisse). FHY1 und FHL können den Kern wieder verlassen und erneut phyA-Moleküle aus dem Cytoplasma in den Kern transportieren. Die FHY1/FHL-Expression wird zudem durch die Transkriptionsfaktoren FHY3 und FAR1 reguliert (Lin *et al.*, 2007). phyB wird indes wesentlich

langsamer transportiert und die Lokalisation ist nicht so stringent lichtabhängig, wie bei phyA (auch in D ist ggf. ein geringer Anteil im Zellkern lokalisiert, Kircher *et al.* (1999), Kircher *et al.* (2002), Gil *et al.* (2000), Yamaguchi *et al.* (1999), Sakamoto and Nagatani (1996)). phyB wird lediglich infolge von kontinuierlicher R-Bestrahlung in den Kern transportiert (Gil *et al.*, 2000; Kircher *et al.*, 2002). Der phyB-Import ist FHY1/FHL-unabhängig, jedoch geht man davon aus, dass infolge der Pr-Pfr-Photokonversion ein kryptisches NLS im C-terminalen PAS-Repeat demaskiert und für die Erkennung der Importmaschinerie zugänglich gemacht wird (Hisada *et al.*, 2000; Nagy & Schäfer, 2002; Matsushita *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005). Möglicherweise übernehmen PIFs eine regulatorische Rolle im phyB-Kernimport (Pfeiffer *et al.*, 2012).

Im Zellkern reprimieren Phytochrome den photomorphogenetischen Repressor-COP1/SPA1-Komplex, was (im Licht) in einer Akkumulation von Photomorphogenese-fördernden Transkriptionsfaktoren wie HY5, HYH (HY5-Homolog), LAF1 (LONG AFTER FAR RED LIGHT) und HFR (LONG HYPOCOTYL IN FAR RED 1) resultiert (Osterlund *et al.*, 2000; Saijo *et al.*, 2003; Laubinger *et al.*, 2004). Im Dunklen werden diese positiven Regulatoren jedoch mittels des COP1/SPA-E3-Ubiquitin-Ligasekomplexes zur Degradation im 26S Proteasom markiert. COP1 scheint in dieser Weise die Photomorphogenese in Abwesenheit von Licht zu reprimieren. Demnach ist die COP1-abhängige Proteindegradation ein integraler Teil des Phytochrom-Signalmechanismus, der sich im Licht in einem Abbau von phyA und in geringem Maße auch der andern Phytochrome äußert (s.o., Seo *et al.* (2004), Sharrock and Clack (2002)).

Der als phyB-Interaktionspartner identifizierte bHLH-Transkriptionsfaktor PIF3 bindet Pfr-spezifisch an phyB aber auch phyA (Ni *et al.*, 1999; Shimizu-Sato *et al.*, 2002; Huq *et al.*, 2004; Khanna *et al.*, 2004; Oh *et al.*, 2004; Leivar *et al.*, 2008) und reguliert dadurch Licht-responsive Gene im Zellkern (Monte *et al.*, 2004). Möglicherweise sind AS-Reste im N-terminalen Knoten an der Bindung von PIF3 beteiligt (s. 1.2.1, Kikis *et al.* (2009)). Die Licht-induzierte PIF-Pfr-Interaktion führt zur Phosphorylierung von PIF3 und anschließend zu dessen proteolytischen Abbau im 26S-Proteasom (Bauer *et al.*, 2004; Al Sady *et al.*, 2006), sodass eine PIF3-vermittelte Repression von Photomorphogenese-Genen aufgehoben werden kann.

Interessanterweise verbleibt ein gewisser Anteil sowohl von phyA als auch von phyB konstitutiv im Cytoplasma (Hisada *et al.*, 2000; Nagy & Schäfer, 2002; Rösler *et al.*, 2010), was die Frage aufwirft, was die physiologische Funktion dieser Phytochrom-Subpopulation ist (s.u.). Ein konstitutiv cytosolischer phyA- und phyB- Interaktionspartner ist PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 1 (PKS1), das lichtabhängig von Phytochrom phosphoryliert werden kann (Fankhauser *et al.*, 1999). Zur Identifikation dieses putativ negativen phyB-Regulators war ein C-terminales phyA-Fragment bestehend aus den letzten 160 Aminosäuren als *Bait* eingesetzt worden, aber PKS1 kann ebenfalls in Hefe mit der entsprechenden Region von phyB interagieren. Mittels *in vitro* Pull-down-Assays konnte für beide Vollängen-Phytochrome unabhängig von der Konformation und Chomophor-Assemblierung eine Interaktion mit Vollängen-PKS1 nachgewiesen werden (Fankhauser *et al.*, 1999). Die genaue Funktion von PKS1 in der Phytochrom-Signaltransduktion ist allerdings bislang weitgehend unbekannt. Möglicherweise wird durch die PKS1-Phosphorylierung eine Kinase-Kaskade in Cytoplasma und/oder Zellkern induziert, oder alternativ könnte eine Interaktion mit Phytochrom auch dessen nukleäre Translokation verhindern und resultierend daraus phy-Signalling negativ regulieren (Fankhauser & Chory, 1999; Schepens *et al.*, 2004). Scheinbar ist PKS1 u. A. eine wichtige Komponente im positiven R-induzierten Wurzelphototropismus (Kiss *et al.*, 2001; Kiss *et al.*, 2003; Molas & Kiss, 2008), wobei vorwiegend phyA zwar zu einer RL-induzierten PKS1-Expression führt, der RL-Phototropismus Defekt von *phyA* bzw *phyB* jedoch nicht

durch eine zusätzliche PKS1-Mutation verstärkt wird (Molas & Kiss, 2008). Hier scheinen phyA bzw. phyB unabhängig von PKS1 für den RL-Wurzelphototropismus verantwortlich zu sein (und umgekehrt). Umgekehrt haben PKS1-Überexpressoren sogar einen negativen RL-Phototropismus-Phänotyp sodass PKS1 entweder negativen Phototropismus fördert, oder positiven Phototropismus inhibiert oder die Balance zwischen beiden Prozessen beeinflusst (Molas & Kiss, 2008). Viele weitere PKS(1)-Funktionen sind offenbar eher mit BL-Antworten assoziiert und werden daher in den Abschnitten 1.3.2 und 1.4 betrachtet.

Abgesehen von Signalübertragung auf Transkriptionsregulations-Ebene gibt es auch Hinweise auf eine cytoplasmatische Wirkung von phyA in *Arabidopsis* (Rösler *et al.*, 2007). In der *fhy1/fhl*-Doppelmutante ist der nukleäre Import von phyA aufgrund des Fehlens von FHY1 und FHL ausgeschaltet, sodass phyA konstitutiv im Cytoplasma vorliegt. Dennoch waren bestimmte phyA-abhängige Antworten (Rotlicht-verstärkter Phototropismus, Außerkraftsetzung des Gravitropismus, Inhibition der Hypokotylstreckung) in Blaulicht in dieser Mutante noch intakt – ganz im Gegensatz zur *phyA*-Mutante (Rösler *et al.*, 2007). Dies lässt den Schluss auf eine zusätzliche cytoplasmatische Funktion von phyA in *Arabidopsis* zu. Abgesehen davon konnte gezeigt werden, dass phyB die Translation der Protochlorophyllid-Oxidoreduktase A (PORA) mRNA durch Interaktion mit PENTA1 im Cytoplasma reguliert (Paik *et al.*, 2012). Es sind außerdem einige Phytochrom (B)-Antworten bekannt, deren Auftreten nur schwer durch Genregulation zu erklären sind, da sie wesentlich schneller auftreten, als dass ein Kernimport von Phytochrom in dieser Zeit möglich wäre (Quail, 1983; Kim *et al.*, 2000): dazu gehören z.B. Veränderungen von Ionenflüssen (Newman & Briggs, 1972; Racusen & Satter, 1975) bzw. Membranpotentialen (Tanada, 1968), die im Zeitraum von Sekunden bis Minuten auftreten (Quail, 1983). Die schnellste bislang bekannte Phytochromantwort ist die Induktion von Cytoplasmaströmungen in *Vallisneria* innerhalb von 2,5 Sekunden nach Bestrahlung mit einem Rotlichtpuls (Takagi *et al.*, 2003). Die Vorbehandlung mit Aktin-Inhibitoren inhibiert diese Antwort, was darauf hindeutet, dass das Aktin-Cytoskelett maßgeblich an der Phytochrom-abhängigen Induktion der Cytoplasmaströmung beteiligt ist. Bislang ist über ein cytoplasmatisches Phytochrom-Signalsystem in höheren Pflanzen relativ wenig bekannt (Rösler *et al.*, 2010). Die meisten Komponenten, die direkt oder indirekt an Phytochromantworten beteiligt sind, sind sowohl im Cytoplasma, als auch im Kern zu finden. Einige wenige (z.B. PKS1, FIN219 und PAT1) sind konstitutiv cytoplasmatisch lokalisiert (Fankhauser *et al.*, 1999; Bolle *et al.*, 2000; Hsieh *et al.*, 2000). Letztere könnten eine Rolle in der Phytochrom-Kerntranslokationsmaschinerie spielen oder ausschließlich in einem cytoplasmatischen Signalweg wirken.

Bevor der lichtabhängige Kernimport und die prominente Rolle von Phytochrom in Genregulation bekannt war, hat man vor Allem Ca^{2+} eine entscheidende Funktion in der Phytochrom-Signaltransduktion zugeschrieben (Roux, 1983; Shacklock *et al.*, 1992; Millar *et al.*, 1994; Tretyn, 1999). Mikroinjektionsexperimente mit der Tomaten-Chromophor-Synthesemutante *aurea* wiesen darauf hin, dass sowohl Hafer-phyA, als auch durch GTP γ S, Ca^{2+} und aktiviertes Calmodulin in der Lagen waren, *aurea*-Phänotypen zu retten und damit CAB- und CHS-Expression bzw. Anthocyanin-Synthese und Chloroplastenentwicklung zu initiieren (Parks *et al.*, 1987; Sharrock *et al.*, 1988; Neuhaus *et al.*, 1993; Bowler *et al.*, 1994). Darüber hinaus wird eine Beteiligung von Ca^{2+} durch die Identifikation eines cytoplasmatisch lokalisierten Calcium-Bindeproteins bestärkt, welches die Phytochrom A Signaltransduktion moduliert (SUB1, Guo *et al.* (2001)). Auch heterotrimere G-Proteine wurden als Phytochrom A-Effektoren diskutiert, denn die Applikation von cGMP (nicht cAMP!) führte ebenfalls zur CHS-Expression (Neuhaus *et al.*, 1993). Überexpressionsstudien der α -

Untereinheit GPA1 führten darüber hinaus zu R- und FR-Hypersensitivität (Okamoto *et al.*, 2001). Bis heute wird allerdings die Involvierung von heterotrimeren G-Proteinen kontrovers diskutiert, denn Deletionen von Einzelkopie-Genen für die G-Protein α - und β -Untereinheiten (*GPA1* und *AGB1*) erzeugten keinen vom Wildtyp abweichenden Hypokotyl-Phänotyp (Jones *et al.*, 2003). Andererseits deuten neuere Experimente mit *gpa1*, *agb1* und *gpa1agp1* darauf hin, dass heterotrimere G-Proteine die Phytochrom-abhängige Keimungs-Induktion modulieren (Botto *et al.*, 2009). Abgesehen davon wurde auch ein kleines cytosolisches GTPase-Aktivator-Protein als Phytochrom-Interaktionspartner identifiziert. Dabei handelt es sich um PIRF1 (PHYTOCHROME-INTERACTING ROP GUANINE-NUCLEOTIDE-EXCHANGE FACTOR 1 (RopGEF 1)), welches durch die Aktivierung von ROPs (RHO-LIKE GTPase OF PLANTS) Licht- und Phytochrom-abhängig Wurzelentwicklung reguliert (Shin *et al.*, 2010).

1.3 Phototropine

Phototropine (phot) sind Blaulicht- und UV-Rezeptoren und erhielten ihren Namen durch ihre Funktion im Phototropismus höherer Pflanzen (Short & Briggs, 1990; Christie *et al.*, 1999). Die Absorptionseigenschaften der Photorezeptoren korrelieren dabei stark mit dem Wirkungsspektrum der Antwort. Phototropine sind Licht-aktivierte Ser/Thr Proteinkinasen, die eine BL-abhängige Autophosphorylierung erfahren. In *Arabidopsis* existieren zwei Phototropine (phot1 und phot2), die eine Vielzahl physiologischer Antworten regulieren, die vorrangig dazu dienen, die photosynthetische Effizienz zu optimieren. Abgesehen von Hypokotyl- und Wurzel-Phototropismus regulieren Phototropine auch Chloroplastenakkumulation (Kagawa *et al.*, 2001), die Starklicht-induzierte Chloroplasten-Vermeidungsreaktion (phot2, Kagawa *et al.* (2001)), Öffnung von Stomata (Kinoshita *et al.*, 2001) und Blattpositionierung, -wachstum und -abflachung (Sakamoto & Briggs, 2002; Takemiya *et al.*, 2005; Inoue, S *et al.*, 2008b; de Carbonnel *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2013). Was Phototropismus anbetrifft, ist phot2 vor Allem bei hohen Fluenzraten aktiv, während phot1 über ein breites Spektrum an Fluenzraten wirksam ist (Liscum & Briggs, 1995; Sakai *et al.*, 2001). Unter schwachen BL-Bedingungen stimulieren phot1 und 2 redundant die Chloroplastenpositionierung entlang der rechtwinklig zu der Lichtrichtung liegenden Zellflanken (Akkumulationsantwort, Sakai *et al.* (2001)), während in höheren BL-Intensitäten vorwiegend die phot2-Aktivierung zu einer Chloroplastenbewegung weg von den belichteten Flanken führt, um Beschädigungen durch Licht zu verhindern (Chloroplasten-Vermeidungsreaktion, Jarillo *et al.* (2001), Kagawa *et al.* (2001), Sakai *et al.* (2001), Kasahara *et al.* (2002)).

1.3.1 Phototropin Struktur und Funktion

Phototropine besitzen eine C-terminale Ser/Thr-Kinasedomäne für den Signal-*Output* und zwei spezialisierte N-terminale Chromophor-bindende LOV- (*Light, Oxygen and Voltage*) Domänen, die durch eine *Linker*-Sequenz getrennt werden (Huala *et al.*, 1997; Christie *et al.*, 1998; Christie, 2007; Nakasako *et al.*, 2008). LOV-Domänen gehören ebenfalls zur PAS-Superfamilie (s. 1.2.1). Die Blaulichtperzeption wird durch die beiden LOV-Domänen vermittelt, die im inaktiven Grundzustand je einen oxidierten Flavin Mononukleotid- (FMN) Chromophor nicht-kovalent gebunden haben (Christie, 2007). Lichtabsorption führt zu einem reversiblen Photozyklus: zur Ausbildung einer kovalenten Bindung des FMN an einen konservierten Cysteinrest (Salomon *et al.*, 2000; Swartz *et al.*, 2001). Das FMN-Cysteinyll-Addukt repräsentiert den aktiven Signalzustand, der zu Photorezeptor-Aktivierung führt, es ist jedoch nicht in der Lage, Blaulicht zu absorbieren. In Dunkelheit findet eine

vergleichsweise langsame Reversion zum inaktiven Zustand statt (Christie *et al.*, 2012). Analysen von Mutanten der konservierten FMN-bindenden Cysteine und andere Struktur-Funktions-Analysen gaben Aufschluss über LOV1- und LOV2-spezifische Funktionen in der Regulation der phot-Aktivität: LOV2 ist demnach für Lichtperzeption und die essentielle lichtabhängige Autophosphorylierung zuständig (Cho, HY *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2007) und wirkt in Dunkelheit reprimierend auf die phot-Aktivität (Kaiserli *et al.*, 2009). Die Funktion der LOV1-Domäne ist weniger klar, aber es wird ihr eine modulierende Rolle für die LOV2-Photoreaktivität und in der Rezeptor-Di-/Multimerisierung zugeschrieben (Christie *et al.*, 2002; Salomon *et al.*, 2004; Nakasako *et al.*, 2008; Sullivan *et al.*, 2008; Okajima *et al.*, 2014). LOV2 und die Kinasedomäne werden als Haupt-Regulatoren der Phototropin-Aktivität betrachtet (Christie, 2007; Nakasako *et al.*, 2008). In Dunkelheit nimmt die N-terminale photosensorische Domäne (LOV1+2) möglicherweise eine geschlossene/inaktive Konformation in Relation zur Kinasedomäne ein, sodass LOV2 und benachbarte regulatorische Sequenzen die Phototropin-Kinaseaktivität sterisch reprimieren können. BL-Absorption durch LOV2 führt nach der Cysteinyl-Addukt-Bildung zu einer Konformationsänderung vor Allem einer LOV2-*Core*-flankierenden α -Helix (α), die die Repression der Kinaseaktivität aufhebt (Harper *et al.*, 2004; Freddolino *et al.*, 2013). Die Kinasedomäne kann anschließend ATP binden und eine Autophosphorylierung vermitteln (Pfeifer *et al.*, 2010). Phosphoryliertes Phototropin wird gemeinhin als die aktivierte Version des Photorezeptors betrachtet (Christie, 2007), was auch Mutationsanalysen von Autophosphorylierungs-Stellen nahelegen (Salomon *et al.*, 2003; Inoue, S *et al.*, 2008a; Sullivan *et al.*, 2008).

1.3.2 Phototropin Signalling

Die Photoaktivierung des Rezeptors resultiert zunächst in Autophosphorylierung von multiplen Serinresten (Christie *et al.*, 2015), wobei je zwei Serinreste im Kinasedomänen-*Activation-Loop/T-Loop* die wichtigste Rolle für phot-*Signalling* spielen könnten (Inoue, S *et al.*, 2008a; Inoue *et al.*, 2011). Manche der verbleibenden Serinreste werden scheinbar Fluenzratenabhängig autophosphoryliert (Salomon *et al.*, 2003), was ggf. unterschiedliche Signale und damit verschiedene physiologische Antworten ermöglichen könnte.

Wie Phytochrom wird auch Phototropin lichtabhängig kompartimentiert: während phot in Dunkelheit Plasmamembran- (PM) assoziiert (aber kein integrales Membranprotein) ist (Sakamoto & Briggs, 2002; Kong *et al.*, 2006), führt die Bestrahlung mit BL zu einer Internalisierung von phot1 ins Cytoplasma (Wan *et al.*, 2008; Kaiserli *et al.*, 2009) bzw. von phot2 in den Golgi-Apparat (Kong *et al.*, 2006; Kong *et al.*, 2007; Aihara *et al.*, 2008; Aggarwal *et al.*, 2014). Scheinbar findet die phot1-Internalisierung über einem Clathrin-vermittelten Endocytose-Mechanismus statt (Kaiserli *et al.*, 2009; Roberts *et al.*, 2011). Die Ablösung beider Phototropine von der PM kann RL- / phyA-abhängig und durch die Hemmung der Kinaseaktivität inhibiert werden (Kong *et al.*, 2006; Kong *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2008; Kaiserli *et al.*, 2009; Aggarwal *et al.*, 2014). Wie genau die PM-Lokalisation vermittelt wird und welche physiologische Relevanz die Internalisierung hat, ist bis dato unbekannt. Vermutlich kommt die PM-Assoziation durch eine Interaktion mit einem oder mehreren Ankerproteinen bzw. einer Membran-assoziierten Signalkomponente zustande (Sakamoto & Briggs, 2002), wobei wahrscheinlich das C-terminale Ende des Phototropins für die PM-Assoziation verantwortlich ist (Kong *et al.*, 2013a). Das Licht-induzierte Phototropin-*Trafficking* könnte evtl. Signalfunktionen übernehmen (möglicherweise wird zumindest der phot1-vermittelte Phototropismus durch die Internalisierung moduliert (Wan *et al.*, 2008)), oder an anderen

Prozessen, wie Desensibilisierung oder Adaption beteiligt sein. Zusätzlich zur PM-Lokalisation sind beide *Arabidopsis*-Phototropine (v.A. phot2) auch (mittels ihres C-Terminus) auf der Außenseite der Chloroplasten lokalisiert, was in Einklang mit ihrer Funktion in Chloroplasten-Photorelokation steht (Kong *et al.*, 2013a; Kong *et al.*, 2013b).

Sowohl für Phototropismus als auch Chloroplasten-Photorelokalisierung scheinen die entsprechenden Membranassoziationen der beiden Phototropine von Bedeutung zu sein. Die Chloroplastenbewegung benötigt verschiedene Komponenten, die an Lichtwahrnehmung durch Phototropine und an Chloroplasten-(cp)-Aktin-abhängigen Bewegungen beteiligt sind (Kong & Wada, 2011), darunter WEAK CHLOROPLAST MOVEMENT UNDER BLUE LIGHT / PLASTID MOVEMENT IMPAIRED 2 (WEB1/PMI2, Kodama *et al.* (2010)), KINESIN-LIKE PROTEINS FOR ACTIN-BASED CHLOROPLAST MOVEMENT (KACs, Suetsugu *et al.* (2010)), das Aktin-bündelnde PM-Protein THRUMIN1 (Whippo *et al.*, 2011; Suetsugu *et al.*, 2016) und CHLOROPLAST UNUSUAL POSITIONING 1 (CHUP1, Schmidt von Braun and Schleiff (2008)). Das in der äußeren Chloroplastenmembran-lokalisierte Aktin- und Profilin-bindende CHUP1 vermittelt die Verankerung von Chloroplasten an der PM (Oikawa *et al.*, 2003; Oikawa *et al.*, 2008; Schmidt von Braun & Schleiff, 2008) und reguliert zusammen mit WEB1/PMI2 die schnelle Reorganisation von cp-Aktin-Filamenten in der Chloroplasten-Peripherie in PM-Nähe (Kadota *et al.*, 2009; Kodama *et al.*, 2010).

Unilaterale B-Bestrahlung resultiert in einem Lichtgradienten entlang des Pflanzenkörpers. Für die BL-abhängige phototrope Umorientierung der Wuchsrichtung wird das Phytohormon Auxin von der belichteten Seite lateral zur beschatteten Seite transportiert und führt zu einer differentiellen Auxin-stimulierten Zell-Elongation auf der beschatteten Organseite und somit zur Krümmung von Coleoptilen bzw. Sprossachsen in Richtung des Lichts (positiver Phototropismus, Went and Thimann (1937)). Dabei muss zumindest der zelluläre Auxin-Export durch Transporter vermittelt werden (Goldsmith, 1977). Dafür sind zum einen PIN-FORMED- (PIN) und zum anderen *ATP-Binding Cassette B* (ABCB)-Proteine verantwortlich. Von den acht *Arabidopsis* PINs können die kanonischen meist asymmetrisch PM-lokalisierten Auxin-Efflux-Carrier PIN 1-4 und 7 zu phototropen Antworten (unter spezifischen Bedingungen) beitragen (Christie 2011, Ding 2011 (Ding *et al.*, 2011; Haga & Sakai, 2012; Willige *et al.*, 2013). In D-gewachsenen *Arabidopsis*-Keimlingen ist PIN3 beispielsweise apolar in Hypokotyl- bzw. Wurzelzellen lokalisiert, erfährt jedoch infolge einer phototropen Stimulation eine polare Relokalisierung zu den lateralen Flanken spezifischer Zellen, was sich ebenfalls graduell von einer auf die andere Seite des Keimlings unterscheidet (Friml *et al.*, 2002; Ding *et al.*, 2011; Kleine-Vehn *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013). Die asymmetrische PIN3-Verteilung sowohl innerhalb einzelner Endodermzellen, als auch zwischen belichteten und beschatteten Seiten des Keimlings resultiert in einem Trans-Hypokotyl-Auxin-Gradient, der in *phot1*⁻ komplett aufgehoben werden kann (Ding *et al.*, 2011). Lediglich drei der 21 Mitglieder der ABCB-Familie können Auxin transportieren (1,4 & 19, Peer *et al.* (2011)), wobei diese scheinbar nicht polar lokalisiert sind (Cho, M *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007). ABCB1 und 4 sind im Gegensatz zu ABCB19 nicht an Phototropismus beteiligt. Im Gegensatz zu *pin*⁻-Loss-Of-Function-Mutanten zeigen *abcb19* Mutanten interessanterweise einen verstärkten Phototropismus (Noh *et al.*, 2003; Nagashima *et al.*, 2008). Möglicherweise fungiert ABCB19 zusammen mit PIN1 in longitudinalem Auxintransport, indem es die PIN-Membranlokalisierung stabilisiert (Blakeslee *et al.*, 2007). Verlust oder Inhibition der ABCB19-Funktion könnte in diesem Modell zu einer erhöhten Auxinkonzentration infolge des inhibierten basipetalen Auxintransportes führen (Christie *et al.*, 2011). Dies resultiert in einem steileren Trans-Hypokotyl-Auxingradient und damit in einer stärkeren phototropen Antwort.

1. Einleitung

Leider können durch dieses Modell nicht alle phototropen Antworten erklärt werden, was die Involvierung weiterer Komponenten nahelegt (Christie *et al.*, 2011). Auxin-*Sensing* und die Initiierung von Phototropismus wird von dem Auxinrezeptor TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1/AUXIN SIGNALING F-BOX (TIR1/AFB) und ggf. auch von AUXIN-BINDING PROTEIN1 (ABP1) vermittelt. Transkription Auxin-responsiver Gene wird mittels Degradation von AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID- (Aux/IAA)-Proteinen reguliert (Chapman & Estelle, 2009; Moller *et al.*, 2010).

Für Phototropine wurden darüber hinaus diverse mögliche Signalkomponenten und Interaktionspartner identifiziert, deren Bindung z.T. vom Phosphorylierungsstatus der Serinreste im Phototropin abhängt, wie im Fall von regulatorischen 14-3-3-Proteinen (Inoue, S *et al.*, 2008a; Sullivan *et al.*, 2009). Mutation einer 14-3-3-Bindestelle im phot2-C-Terminus beispielsweise führt zu Defekten in phot2-vermittelter Stomataöffnung (Tseng *et al.*, 2012) und deutet somit auf eine Signalfunktion von 14-3-3 Proteinen in der phot-Signaltransduktion hin. Phot1-*Signalling* beinhaltet auch die BL-abhängige Mono-/Multi- und Polyubiquitinierung einer α -Helix in der LOV2-Domäne und somit ggf. die proteasomale Degradation in Starklicht-Bedingungen (Roberts *et al.*, 2011; Deng *et al.*, 2014). Die Ubiquitinierung benötigt den konstitutiv PM-lokalisierten phot1-Interaktionspartner NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTYL3 (NPH3), welcher wahrscheinlich als Teil eines Cullin-3-basierten E3-Ubiquitin-Ligasekomplex fungiert (Motchoulski & Liscum, 1999; Roberts *et al.*, 2011; Wan *et al.*, 2012). NPH3 ist eine essentielle Signalkomponente sowohl für phot1-abhängigen Schwachlicht- als auch für phot1/phot2-abhängigen Starklicht-Phototropismus (Motchoulski & Liscum, 1999; Roberts *et al.*, 2011). Die Signalwirkung von NPH3 scheint dabei vom Phosphorylierungsstatus abzuhängen, denn NPH3 liegt in D phosphoryliert vor, während in BL eine dephosphorylierte Isoform dominiert. Die Konversion von Dunkel- zu Licht-Isoform ist phot1-abhängig, aber (De)phosphorylierung von NPH3 wird von weiteren Phosphatasen/Kinasen vermittelt (Pedmale & Liscum, 2007; Hoehenwarter *et al.*, 2013). Der putative phototrope Repressor ENHANCED BINDING1 (EHB1) wurde als NPH3-interagierendes Protein identifiziert und besitzt Ca^{2+} -bindende GTPase-aktivierende Eigenschaften (Knauer *et al.*, 2011), was möglicherweise mit Erkenntnissen von Zhao und Mitarbeitern (2013) korreliert. In *Arabidopsis* Hypokotylen konnte ein transients Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration unter *High-Intensity*-Blaulicht beobachtet werden, was scheinbar mit phot2-abhängigem Phototropismus verknüpft ist (Zhao *et al.*, 2013).

Bei ROOT-PHOTOTROPISM2 (RPT2) handelt es sich vermutlich um eine phot(2)-Signalkomponente im Starklicht-BL-Phototropismus (Sakai *et al.*, 2000). RPT2 ist ebenfalls PM-lokalisiert und kann sowohl mit phot, als auch mit NPH3 interagieren, wobei die letztgenannte Dimerisierung über die BTB (Broad Complex, Tamtrack, Bric-à-Brac)-Domänen von RPT2 und NPH3 vermittelt wird (Inada *et al.*, 2004). Evtl. bindet das RPT2/NPH3-Dimer (wie andere BTB-Proteine auch) in Starklicht an ihren Cullin-RING-Ubiquitin-Ligasekomplex, während NPH3 in schwachem Blaulicht ggf. alleine bindet (Hohm *et al.*, 2013).

Abgesehen davon werden sowohl der oben bereits erwähnte Auxin Efflux-*Carrier* ABCB19, als auch PKS-Familienmitglieder phot-abhängig phosphoryliert. ABCB19 wird durch die phot1-abhängige Phosphorylierung inhibiert (Christie *et al.*, 2011), was zu einer verstärkten phototropen Antwort führt (s.o.). In *Arabidopsis* existieren vier PKS-Proteine (de Carbonnel *et al.*, 2010). PKS1, 2 und 4 wurden alle mit phot1-vermittelten BL-Prozessen in Verbindung gebracht, inklusive Hypokotyl- und Wurzelphototropismus, Blattabflachung, und -positionierung (Lariguet *et al.*, 2006; Boccalandro *et al.*, 2008; de Carbonnel *et al.*, 2010). PKS1 interagiert mit phot1 und NPH3 *in planta* (Lariguet *et al.*, 2006) mit Auxin-Efflux-*Carrier*

PIN1 und dem Ca^{2+} -bindenden Protein CALMODULIN4, was möglicherweise eine Rolle in Starklicht-BL-Phototropismus spielt (Zhao *et al.*, 2013). Der phot1-Interaktionspartner PKS4 wird BL- und phot1-abhängig phosphoryliert und beeinflusst Phototropismus abhängig vom Phosphorylierungsstatus positiv oder negativ (Demarsy *et al.*, 2012; Kami *et al.*, 2014), möglicherweise indem Auxin *Signalling* oder lateraler Transport differentiell reguliert werden. (Kami *et al.*, 2014).

1.4 Hinweise für Phytochrom-Phototropin Ko-Aktion in höheren Pflanzen

Die phototrope Umorientierung der Wuchsrichtung wird nicht alleine durch BL / Phototropine vermittelt. Auch den BL-perzipierenden Cryptochromen und interessanterweise sogar den Phytochrom-R/FR-Rezeptoren kommt eine modulierende Rolle zu (Goyal *et al.*, 2013; Liscum *et al.*, 2014). Phys und crys beeinflussen Phototropismus indirekt, indem sie den negativen Gravitropismus im Licht inhibieren (Iino, 2006). Obwohl der Phytochrom-Effekt nicht essentiell für Phototropismus ist (vgl. Studien mit einer phy-*Quintuple*-Mutante, Strasser *et al.* (2010)), scheint phyA der Hauptakteur in der R-abhängigen Modulation des BL-Phototropismus zu sein, was u. A. Analysen einer *phyB/phyC/phyD/phyE-Quadruple*-Mutante nahelegen (Strasser *et al.*, 2010). Zudem zeigt *phyA* alleine schon einen phototropen Defekt in BL (Parks *et al.*, 1996; Lariguet & Fankhauser, 2004), was darauf hinweist, dass auch für den BL-Phototropismus Phytochrom (Pfr induziert durch BL) notwendig ist. Dies ergänzt vorherige Beobachtungen, denen zufolge der BL-vermittelte Phototropismus durch Rotlichtpulse, die vor einer Blaulichtbehandlung gegeben werden, phyA-abhängig verstärkt werden kann (Parks *et al.*, 1996; Janoudi *et al.*, 1997; Stowe-Evans *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2008). Rösler *et al.* (2007) waren die Ersten, die in diesem Zusammenhang eine cytoplasmatische Funktion von phyA bei der RL-abhängigen Modulation des BL-Phototropismus vorschlugen, da diese und andere phyA-abhängige BL-Antworten (Inhibition der Hypokotyl-Elongation, Aufhebung des negativen Gravitropismus) in der *fhyl/fhl*-phyA-Kernimportmutante noch intakt waren (s. 1.2.2). Dies ist vermutlich korreliert mit der ebenfalls phyA-abhängigen, FR-reversiblen Retention von Phototropin an der Plasmamembran infolge einer R-Vorbehandlung vor einem BL-Puls (Stowe-Evans *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2008). Dies erhöht die Sensitivität für einen phototropen unilateralen BL-Stimulus und resultiert in einer stärkeren phototropen Antwort. Möglicherweise stellt auch die Regulation des PKS4-Phosphorylierungsstatus eine Rolle von cytoplasmatischen Phytochromen dar, denn die phot1/BL-abhängige Phosphorylierung kann durch Typ 2 Phosphatasen revertiert werden, was durch Phytochrome verstärkt werden kann (Demarsy *et al.*, 2012). Die PKS4-Dephosphorylierung könnte somit ebenfalls zu einer Verstärkung der phototropen Antwort führen. Auch andere BL- / Phototropin-abhängige Antworten, werden durch Phytochrom moduliert: so beeinflusst phyB zum Beispiel die phot1- und phot2-vermittelte Inhibition der Chloroplasten-Vermeidungsreaktion in starkem Blaulicht (Luesse *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2013). Des Weiteren werden auch die BL-induzierte Stomataöffnung und Blattaflachung durch Phytochrome moduliert (Inoue, Si *et al.*, 2008; de Carbonnel *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Harada *et al.*, 2013).

Ein interessanter Hinweis auf eine phy-phot-Ko-Aktion ist zudem, dass manche phy- bzw. phot-Interaktionspartner/Signalkomponenten in der Lage sind, mit dem jeweils anderen Photorezeptor zu interagieren: dies ist mindestens der Fall für PKS1 (s. 1.2.2, Fankhauser *et al.* (1999), Lariguet *et al.* (2006), de Carbonnel *et al.* (2010); Zhao *et al.* (2013)) und NPH3 (s. 1.3.2, Lariguet *et al.* (2006), de Carbonnel *et al.* (2010), Roberts *et al.* (2011)). Beide Proteine sind essentiell für BL-abhängigen Hypokotyl-Phototropismus, können zusätzlich miteinander

interagieren (s.o.) und sind wahrscheinlich wie Phototropin Membran-assoziierte Proteine (Lariguet *et al.*, 2006). Möglicherweise könnten diese Proteine somit auch eine teilweise/temporäre PM-Lokalisation von phyA vermitteln. PKS1 ist darüber hinaus auch essentiell für BL-abhängigen negativen Wurzelphototropismus in *Arabidopsis* – eine Antwort die ebenfalls von phyA abhängt (Boccalandro *et al.*, 2008).

Möglicherweise übernimmt Phytochrom auch nukleäre Funktionen bei der Modulation des BL-Phototropismus. Detailliertere Untersuchung des R-verstärkten BL-Phototropismus der *fhyl/fhl*-Mutante wiesen darauf hin, dass er zwar robust jedoch verlangsamt abläuft, woraus die Autoren schlussfolgerten, dass der Effekt ggf. aus dem Verlust nukleärer phyA-Funktionen resultiert (Kami *et al.*, 2012). Umgekehrt zeigte konstitutiv nukleäres phyA einen verstärkten und schnelleren phot1-abhängigen Phototropismus. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die Expression transkriptioneller Regulatoren der phyA-Signaltransduktion/früher Phototropin-Signalkomponenten, die für normalen Phototropismus benötigt werden durch phyA reguliert wird. Dazu gehören PIF4, PIF5, RPT2, PKS1 und ABCB19 (Lariguet *et al.*, 2006; Nagashima *et al.*, 2008; Stone *et al.*, 2008; Tsuchida-Mayama *et al.*, 2010; Kami *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2013). Die BL-induzierte Expression von PKS1, die ggf. dem BL-Wurzel-Phototropismus vorhergeht ist darüber hinaus ebenfalls phyA-abhängig (Lariguet *et al.*, 2006; Boccalandro *et al.*, 2008). Ein RPT2-Überexpressor ist interessanterweise in der Lage, phototrope Defekte einer *phyA/phyB*-Doppelmutante (und einer *phyA/cry1/cry2*-Triple-Mutante) auszugleichen, was darauf hindeutet, dass die phy- (und cry-) abhängige Modulation über die BL-induzierte RPT2-Expressionsregulation vermittelt wird (Sakai *et al.*, 2000; Tsuchida-Mayama *et al.*, 2010). ABCB19-Akkumulation scheint indes Phytochrom- und Licht-abhängig inhibiert zu werden (Nagashima *et al.*, 2008). Zusätzlich zu der phot1-vermittelnden inhibierenden Phosphorylierung von ABCB19 (s. 1.3.2) resultiert dies in einer stärkeren phototropen Antwort (Christie *et al.*, 2011). Dennoch zeigt *fhyl/fhl* eine stärkere phototrope Antwort, als *phyA*, wofür es mindestens zwei mögliche Erklärungen gibt: erstens die phyA-abhängige Genregulation ist trotz der Mutation z.T. noch intakt (Kami) oder phyA hat eine zusätzliche Signalfunktion im Cytoplasma (Rösler). Zusammenfassend ist es wahrscheinlich, dass Phytochrome auf diversen Ebenen Einfluss auf Phototropismus nehmen und dabei sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma wirksam sind.

1.5 *Physcomitrella patens* als Modellorganismus

Moose werden aufgrund ihrer vergleichsweise einfachen Morphologie, ihres relativ simplen Entwicklungsmusters und ihrer evolutionären Stellung als niedere Pflanzen bezeichnet (Wada & Kadota, 1989). Diese Simplizität bei gleichzeitiger verwandtschaftlicher Nähe zu höheren Pflanzen (Nishiyama *et al.*, 2003) machen Moose als Modellorganismen zur Erforschung entwicklungsbiologischer Prozesse besonders interessant (Cove *et al.*, 2006). Das Laubmoos *Physcomitrella patens* hat sich während der letzten Jahrzehnte als Moos-Modellorganismus verdient gemacht: zur Erforschung von Evolution der Landpflanzen, Entwicklung (Zellpolarität Cove (2000)), Spitzenzellwachstum, lichtabhängige Regeneration (Jenkins & Cove, 1983a) Phytohormonen (Ashton *et al.*, 1985) und Physiologie (Photo-, Polaro- und Gravitropismus (Jenkins & Cove, 1983b; Jenkins & Cove, 1983c; Jenkins *et al.*, 1986)) wurde dieses Moos vielfach eingesetzt. Eine besonders vorteilhafte Eigenschaft für die Analyse von Genfunktionen mittels reverser Genetik ergibt sich aus der Tatsache, dass in *Physcomitrella* das gezielte Ausschalten von Genen (*Gene Targeting*) durch effiziente homologe Rekombination möglich ist (Schaefer & Zryd, 1997). Dies ist in *Physcomitrella* etabliert und bislang in keiner anderen Landpflanze mit vergleichbarer Effizienz möglich (Hanin *et al.*,

2001). Das Laubmoos *Physcomitrella patens* hat in diesem Zusammenhang in jüngerer Vergangenheit deutlich an Popularität gewonnen so dass detaillierte Informationen über Stoffwechsel- und Hormonphysiologie (z.B. Repp *et al.* (2004)) sowie über Photorezeptoren und lichtabhängige Prozesse in *Physcomitrella* erhalten werden konnten (Hofmann *et al.*, 1999; Mittmann *et al.*, 2004). Moosprotonemata sind aus photobiologischer Sicht besonders interessant, da die phototrope Steuerung der Wuchsrichtung von Protonema-Spitzenzellen in Moosen rotlichtabhängig erfolgt und durch Phytochrom gesteuert wird (Mittmann *et al.*, 2004). Die Eigenschaft aus einfach strukturierten Geweben (z.B. zweidimensionalen Zellschichten) oder gar wie im Falle der Protonemata aus linearen Zellreihen (ohne Lichtstreuungseffekte durch benachbarte Zellen im Gewebe) zu bestehen macht Moose besonders geeignet für Untersuchungen der Auswirkungen von Licht auf die Morphogenese und Tropismen der Pflanzen (Wada & Kadota, 1989).

Die dominante Phase im kurzen Lebenszyklus (ca. 3 Monate) stellt die haploide Generation des Gametophyten dar. Dies macht Moose und damit auch *Physcomitrella* zu exzellenten Modellorganismen für die moderne molekulare Physiologie, da durch die Dominanz der haploiden Generation eine Einführung von Mutationen bereits nach der Mutagenese innerhalb der ersten Tochtergeneration unmittelbar als Phänotyp sichtbar wird (Cove, 2005). Dies ist bei höheren Pflanzen durch deren dominante diploide Generation nicht möglich. Hier sind Rückkreuzungen zur Erzeugung eines homozygoten Genotyps notwendig. Zuträglich ist sicherlich auch die Tatsache, dass die Pflanzen einfach protoplastiert, mittels PEG oder *Particle Inflow Gun (PIG)* transformiert und aus Protoplasten regeneriert werden können (Grimsley *et al.*, 1977; Schaefer *et al.*, 1991; Sawahel *et al.*, 1992).

Die haploide Phase wird nur kurz durch eine diploide Sporophytengeneration unterbrochen, aus deren Sporen die ebenfalls haploiden filamentösen Protonemata hervorgehen. Bei Protonemata werden anhand der Morphologie grundsätzlich zwei Zelltypen unterschieden: die eher kurzen, Chloroplasten-reichen Chloronemata und die Chloroplasten-armen longitudinal verlängerten Caulonemata mit schrägen Wänden zwischen den filamentösen Zellen. Der Übergang von Chloro- zu Caulonemata wird dabei durch Licht, Versorgung mit Kohlenhydraten und Phytohormone reguliert. Durch Cytokinine wird die Differenzierung von Knospen induziert, aus denen sich anschließend der blättrige Gametophor entwickeln kann.

Ein weiterer Vorteil ergibt sich aus der geringen Größe des Genoms (ca. 28000 Gene auf 27 Chromosomen) und insbesondere aus dem komplett sequenzierten Genom (Rensing *et al.*, 2008). Dies macht den Einsatz bestimmter molekularbiologischer Methoden, wie sie auch in dieser Arbeit angewendet werden, erst möglich. Mit Hilfe bioinformatischer Methoden können so Gene auch *in silico* identifiziert und untersucht werden.

1.5.1 Rotlichteffekte in Moosen

RL hat Einfluss auf Wachstum und Entwicklung in allen Stadien im Moos- Lebenszyklus, wobei weniger über Gametophoren und nichts über Sporophyten bekannt ist (Schäfer & Nagy, 2006). So ist die Sporenkeimung induzierbar durch RL und BL und revertierbar durch FR (Cove *et al.*, 1978; Schild, 1981). Die Regeneration und die Richtung des Auswuchses von Protoplasten zu Protonemata ist in *Ceratodon purpureus* und *Physcomitrella patens* ebenfalls lichtabhängig: sowohl RL als auch BL tragen dazu bei (Jenkins & Cove, 1983a; Cove *et al.*, 1996). Zudem sind RL und BL an Zelldifferenzierungsprozessen beteiligt: u. A. fördert RL Chloronemadifferenzierung (während in D nur Caulonemata wachsen können), die Verzweigung von Filamenten und auch die Differenzierung von Knospen an Protonemata (Jenkins & Cove, 1983a; Imaizumi *et al.*, 2002; Uenaka *et al.*, 2005; Uenaka & Kadota, 2008).

Chloroplastenbewegung ist fast in allen Spezies lichtabhängig, wird in *Funaria* und *Ceratodon* durch BL (nicht durch RL, (Voerkel, 1933; Kagawa, 2003)) und in *Physcomitrella*, den Algen *Mesotaenium caldariorum* & *Mougeotia scalaris* und dem Farn *Adiantum* durch RL und BL hervorgerufen (Kraml, 1994; Herrmann & Kraml, 1997; Kadota *et al.*, 2000). In Dunkelheit wachsen Moose negativ gravitrop (Jenkins *et al.*, 1986; Schwuchow *et al.*, 1995; Schwuchow *et al.*, 2002), während die Wuchsrichtung in Licht abhängig von der Wellenlänge und Lichtrichtung ist. In BL findet eine Inversion des Gravitropismus statt (Lamparter *et al.*, 1998), während Gravitropismus in RL inhibiert wird (Lamparter *et al.*, 1996). Meist (je nach Spezies, Wachstum und Lichtbedingung) findet positiver in manchen Fällen auch negativer Phototropismus in Folge eines unilateralen Lichtreizes statt. In vielen (Farn- und Moos-) Spezies ist Phototropismus RL-/phy-reguliert, wie z.B. in *Adiantum*, *Physcomitrium turbinatum*, *Ceratodon purpureus*, und auch in *Physcomitrella patens* (Bünning & Etzold, 1958; Nebel, 1968; Kadota *et al.*, 1982; Hartmann *et al.*, 1983; Jenkins & Cove, 1983c; Demkiv *et al.*, 1998; Esch *et al.*, 1999). Die Vermittlung von Phototropismus durch RL/Phytochrom ist im Vergleich zu höheren Pflanzen eine Besonderheit: während Phototropismus in höheren Pflanzen durch Blaulicht/Phototropin induziert/reguliert wird (s. 1.3), wird dieser Effekt in Moosen von Rotlicht hervorgerufen und von Phytochromen vermittelt (Jenkins & Cove, 1983b; Jenkins & Cove, 1983c) was die FR-Revertierbarkeit der Antwort nahelegt (Mittmann *et al.*, 2004). Sowohl in primären *Physcomitrella* Chloronemata, als auch in D-adaptierten Caulonemata ist der RL-Phototropismus Fluenzraten-abhängig (Jenkins & Cove, 1983c; Mittmann *et al.*, 2004). Phototropismus ist in *Physcomitrella* jedoch nicht durch BL induzierbar (Mittmann *et al.* (2004) und eigene Beobachtungen). Der RL-Polarotropismus (Wachstum in Abhängigkeit vom elektrischen Vektor von linear polarisiertem Licht) findet entweder parallel oder rechtwinklig zur Polarisationssebene statt (rechtwinklig z.B. in *Dryopteris* (Etzold, 1965)), *Sphaerocarpos* (Steiner, 1969), *Adiantum* (Wada & Staehelin, 1981) und *Ceratodon* (Mittmann *et al.*, 2009)). In *Physcomitrella* ist auch der Polarotropismus Fluenzraten-abhängig und führt entweder zu paralleler oder rechtwinkliger Orientierung der Protonemata (Jenkins & Cove, 1983c; Mittmann *et al.*, 2004).

1.5.2 *Physcomitrella* und Phytochrom

Phytochromeffekte in Moosen sind ebenso vielfältig und komplex wie in höheren Pflanzen. In Moosen ist gravitropes Wachstum (Jenkins *et al.*, 1986), Phototropismus von Protonemata und Gametophoren (Jenkins & Cove, 1983c; Cove & Knight, 1987), Polarotropismus (Jenkins & Cove, 1983b; Jenkins & Cove, 1983c; Mittmann *et al.*, 2004), Sporenkeimung (Cove *et al.*, 1978), die Vermeidungsreaktion der Chloroplasten (Kadota *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2001; Uenaka & Kadota, 2007) und die Regeneration neuer Protonemata aus Moos-Protoplasten (Jenkins & Cove, 1983a) RL-abhängig durch Phytochrom reguliert (s. auch 1.5.1). Eine Phytochrom-Chromophor-Biosynthese-Doppelmutante konnte darüber hinaus eine ganze Reihe an Phytochrom-Effekten in Wachstum und Entwicklung aufzeigen (Chen *et al.*, 2012). So wiesen Protonemata der Doppelmutante eine Wachstums-Hemmung in R (und schwächer in WL) und geringere Chlorophyllgehalte auf (wahrscheinlich durch negative *Feedback*-Regulation durch erhöhte Häm-Level). Gametophoren wachsen in WL vergleichsweise lang, zeigen in R aber einen verkürzten Stamm und reduzierte Phyllid-Entwicklung im Vergleich zum Wildtyp (und Einzel-KOs, Chen *et al.* (2012)). In der Tat war die Mutante komplett aphototrop in Bezug auf RL (zw. 0,15 und 15 $\mu\text{mol} / \text{m}^2 \text{ s}$).

In *Physcomitrella patens* existieren sieben Phytochromsequenzen und eine Phytochrom-ähnliche Sequenz; vier davon (PHY1-4) waren bereits vor Veröffentlichung des sequenzierten

Genoms im Jahr 2007 bekannt und physiologisch untersucht (Mittmann *et al.*, 2004), vier weitere (PHY5a-c und PHY-like) wurden erst danach durch *in silico*-Analyse identifiziert. Dies entspricht der doppelten Anzahl an Phytochromgenen von *Ceratodon*, was wahrscheinlich in einer Genomduplikation seinen Ursprung findet (Rensing *et al.*, 2007; Rensing *et al.*, 2008; Mittmann *et al.*, 2009). *Physcomitrella* Phytochrome besitzen eine konservierte Domänenstruktur im Vergleich zu Phytochromen höherer Pflanzen (Kolukisaoglu *et al.*, 1993). Auch sie binden Phytochromobilin als Chromophor, was ihnen ähnliche spektrale Eigenschaften wie Angiosperm-Phytochromen verleiht (Mittmann *et al.*, 2004). Andererseits bilden die PHY-Gene zusammen mit anderen Moosphytochromen eine eigene Klade im phylogenetischen Stammbaum (Mittmann *et al.*, 2009). Innerhalb dieser Klade gruppieren die *Ceratodon purpureus* (Cp) Gene CpPHY1, CpPHY2, PpPHY1 und PpPHY3 bzw. PpPHY2 und PpPHY4 zusammen. Die verbleibenden *Physcomitrella* PHY-Gene bilden eine Subgruppe mit CpPHY3 und CpPHY4 (Mittmann *et al.*, 2009). Entsprechend dieser Gruppierung weisen die ersten vier *Physcomitrella* PHY-Gene unterschiedliche Licht-abhängige Expressionsverhalten auf: während PHY2 und -4 scheinbar durch Licht induziert werden können (also wie TypII-Phytochrome lichtstabil sind), sind PHY1 und 3 mRNAs abundanter in D (Mittmann *et al.*, 2004). Eine neuere Studie konnte zeigen, dass auch PHY5a exprimiert wird (Possart & Hiltbrunner, 2013), allerdings ist bisher unbekannt, welche physiologische Funktion die Phytochrome 5a-c erfüllen. PHY1-4 hingegen wurden mittels *Gene Targeting* ausgeschaltet und anschließend die resultierenden *Knockout*- (KO) Mutanten physiologisch untersucht (Mittmann *et al.*, 2004). Dabei fiel besonders der Phänotyp der Phytochrom 4-Mutante auf. Deren Protonemata-Spitzenzellen waren nicht in der Lage, Richtung und Polarisation des eingestrahlten Rotlichtes wahrzunehmen und darauf mit einer gerichteten Krümmung der dunkeladaptierten Protonemata-Spitzenzellen zu reagieren. Abhängig von der Fluenzrate des eingestrahlten Rotlichtes zeigten dunkeladaptierte *Physcomitrella* Wildtyp-Protonemata entweder einen negativen Phototropismus (bei weniger, als $0,15 \mu\text{mol} / \text{m}^2 \text{s}$ und oberhalb von $15 \mu\text{mol} / \text{m}^2 \text{s}$) oder einen positiven Phototropismus bei intermediären Bestrahlungsstärken. Linear polarisiertes Rotlicht resultierte in senkrechtem Wachstum der dunkeladaptierten *Physcomitrella* Wildtyp-Protonemata bezogen auf den E-Vektor des eingestrahlten Lichtes. Insbesondere der *phy4*-KO zeigte im Gegensatz zum Wildtyp allerdings keinen positiven Phototropismus bei Bestrahlungsstärken zwischen $1,5 \mu\text{mol} / \text{m}^2 \text{s}$ und $15 \mu\text{mol} / \text{m}^2 \text{s}$ und auch kein Wachstum senkrecht zum E-Vektor des polarisierten Rotlichtes (Mittmann *et al.*, 2004). Zudem zeigte *phy4* einen Phänotyp bezüglich der Chloroplastenbewegung in linear polarisiertem Rotlicht: der KO war nicht in der Lage, bei parallel zur Wuchsrichtung orientiertem E-Vektor seine Chloroplasten zu reorganisieren. Der Wildtyp zeigt indes bei polarisierter Bestrahlung mit dem E-Vektor parallel bzw. rechtwinklig zur Wachstumsachse eine Chloroplastenakkumulation entlang der Seitenwände in der Mitte von Filamentzellen bzw. an den Kreuzwänden (Kadota *et al.*, 2000). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlussfolgert, dass hauptsächlich *Physcomitrella* Phytochrom 4 für die RL-abhängigen gerichteten/vektoriellen Antworten Phototropismus und Polarotropismus verantwortlich ist.

1.6 Phytochrom-Phototropin Ko-Aktion in niederen Pflanzen

Auch in niederen Pflanzen gibt es Hinweise auf ein Zusammenspiel von RL- und BL-Signalwegen bzw. von Phytochrom und Phototropin. Nicht nur in *Physcomitrella patens* sondern auch in anderen Moosen wie *Ceratodon purpureus* und *Funaria hygrometrica* werden Phototropismus und Polarotropismus sowohl durch RL als auch BL hervorgerufen

(Cove *et al.*, 1978; Hartmann *et al.*, 1983; Jenkins & Cove, 1983c; Bittisnich & Williamson, 1985). Auch in anderen Cryptogamen kann Phototropismus und sogar Chloroplastenbewegung sowohl von RL, als auch von BL induziert werden (Kadota *et al.*, 2000; Kasahara *et al.*, 2004; Suetsugu & Wada, 2007). Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine Adaption an suboptimale/schwache Lichtbedingungen (z.B. unter einer Pflanzendecke, Suetsugu and Wada (2007)). Wenig überraschend zeichnen bei der *Physcomitrella*-Protoplastenbewegung Phytochrome für den RL-Effekt (FR-Reversibilität) und Phototropine für den BL-Effekt verantwortlich. Die wohl wichtigste Arbeit im Zusammenhang eines Zusammenspiels von RL- und BL-Rezeptoren stammt wohl von Kasahara und Mitarbeitern, die zeigen konnten, dass die Rotlicht-induzierte Chloroplasten-Vermeidungsreaktion insbesondere in *Physcomitrella photA2/photB1/photB2*-KO gestört war (Kasahara *et al.*, 2004). Dies ist insofern überraschend, als dass ein Blaulichtrezeptor (v.A. photA2) essentiell für eine Rotlicht-Antwort ist, obgleich Phototropin kein rotes Licht absorbieren kann. Somit müssen die beiden Photorezeptoren in irgendeiner Weise kooperieren. Die Autoren schlussfolgerten, dass Phytochrom das RL-Signal an Phototropin und schließlich an das Aktin- und Myosin-Cytoskelett weiterleitet, was die Licht-induzierte Chloroplastenbewegung vermittelt. Die Frage war nur, ob es sich um eine direkte Photorezeptor-Interaktion handelt, oder ob sich die Signalwege zu einem späteren Zeitpunkt in der Signalkaskade treffen. Die Kasahara-Arbeitsgruppe untersuchte lediglich BL- und RL-abhängige Chloroplastenbewegung, nicht jedoch durch (polarisiertes) RL-induzierten Photo- bzw. Polarotropismus der verschiedenen Phototropin Doppel- und *Triple*-KOs. Dies wurde von Dr. Mailliet aus unserer Arbeitsgruppe nachgeholt. In der Tat waren beide Rotlichtantworten in Einklang mit den Kasahara-Daten insbesondere im *Triple*-KO gestört (Jaedicke *et al.*, 2012).

Von Farnen wie *Adiantum* (und anderen) und der Grünalge *Mougeotia* weiß man, dass dort ein ganz spezieller Photorezeptor RL-Richtungs- und Polarisations-abhängige/vektorielle Antworten (Phototropismus bzw. Chloroplastenbewegung) vermittelt: NEOchrom - eine Chimäre aus dem photosensorischen Modul eines Phytochroms am N-Terminus und einem nahezu Volllängen-Phototropin am C-Terminus (Nozue *et al.*, 1998; Kawai *et al.*, 2003; Suetsugu *et al.*, 2005). In *Adiantum* wird das RL-Signal durch den Phytochrom-Teil perzipiert und intramolekular an die Kinasedomäne weitergeleitet (Kawai *et al.*, 2003). Zwar ähneln sich *Mougeotia*- und Farn-Neochrome bezüglich ihrer Domänenstruktur, auf AS-Ebene sind aber die PHY, LOV1, LOV2 und Kinasedomänen des AcNEO1 der entsprechenden Domänen im phy bzw. phot höherer Pflanzen ähnlicher (als zu MsNEO-Sequenzen, Suetsugu and Wada (2007)). Scheinbar haben sich die Neochrome der beiden Gruppen unabhängig voneinander entwickelt (Suetsugu *et al.*, 2005). Die heterologe Expression von *Adiantum* neo1 in einer *Arabidopsis phot1/phot2*-Mutante konnte den BL-Phänotyp retten und verlieh der Pflanze sogar die Eigenschaft, phototrop auf RL zu reagieren (Kanegae *et al.*, 2006). Damit ist bewiesen, dass *Adiantum* Neochrom sowohl Richtungs-abhängige RL-, als auch BL-Antworten vermitteln kann. Neuere Erkenntnisse derselben Arbeitsgruppe demonstrierten darüber hinaus, dass obwohl neo potentiell als Phototropin agieren kann, jedoch R/FR- und B/FR-abhängige Phototropismus-Steuerung durch den Phytochromteil vermittelt werden und Neochrom somit wohl eher als Phytochrom wirkt (Kanegae & Kimura, 2015). Auch für den BL-Phototropismus scheint das phy-Modul (und die LOV2-Domäne im phot-Modul) nötig zu sein (Kanegae & Kimura, 2015). Dies korreliert auch mit dem synergistischen Effekt von gleichzeitiger RL und BL-Bestrahlung auf die neo-Aktivität (Kanegae *et al.*, 2006).

1.7 Das Paradox der Lichtrichtungswahrnehmung durch Phytochrom

Aus der Vermittlung von Lichtrichtungs- und Polarisations-abhängigen Wachstumsantworten durch Phytochrome ergibt sich zwangsläufig die Frage, wie die Signalperzeption und -weiterleitung zu ausführenden Organen vonstattengehen kann. In 1.2.2 wurde bereits beschrieben, dass Phytochrome hauptsächlich genregulatorische Funktionen nach Kernimport der aktivierten Photorezeptoren ausüben. Für *Physcomitrella* Phytochrome ist diese Rolle der Transkriptionskontrolle für Phytochrome noch nicht in diesem Maße untersucht worden. Möglicherweise erfordert die Regulation der Ausbildung von Filamentverzweigungen nukleäres Phytochrom (Uenaka *et al.*, 2005), oder auch der Chloronema-Caulonema-Übergang, Induktion von Knospen-Initialzellen und Gametophor-Differenzierung (in Kollaboration mit nukleärem Cryptochrom, Imaizumi *et al.* (2002)). Zudem konnten auch Homologe mancher *Arabidopsis*-phy-Interaktionspartner in *Physcomitrella* identifiziert werden, darunter PIF1 und HY5 (Nordmeier *et al.*, 2011; Yamawaki *et al.*, 2011a). Da allerdings *hy5a⁻/hy5b⁻*-Doppel-KOs einen Caulonema-Wachstumsphänotyp unabhängig von Licht (D vs. WL) zeigen, ist fraglich, ob *Physcomitrella* HY5 in einen Lichtsignalweg integriert wird (Yamawaki *et al.*, 2011b). RL-Expressionsanalysen einer *Physcomitrella*-PΦB-Biosynthese-Doppelmutante (*hy2/pubs⁻*, s.o.) konnten erstmals zweifelsfrei belegen, dass *Physcomitrella*-Gene Phytochrom-abhängig reguliert werden (ca. 80% der RL-regulierten Gene sind in der Doppelmutante misreguliert, Chen *et al.* (2012)). Unter den misregulierten Genen bestand ein geringerer Anteil aus Transkriptionsfaktoren, als bei *Arabidopsis*. Dies legt nahe, dass die Transkriptionskaskade keine dominante Rolle in frühen RL-antworten spielt (Chen *et al.*, 2012).

Es ist jedoch sicher, dass ein Transkriptions-/Translations-basierter Mechanismus keine gerichtete Antwort hervorrufen kann. Nach der Perzeption gerichteter Lichtreize würden Richtungsinformationen zwangsläufig verloren gehen – sei es während des Transportes der cytosolisch gebildeten Pfr-Moleküle in den Kern, bei Interaktion mit Komponenten der Transkriptionsmaschinerie, oder bei der Translation einer aus dem Kern exportierten mRNA zur Herstellung eines möglichen Zielproteins im Cytoplasma. Wahrscheinlich ist demnach, dass zusätzlich zu der allgemein akzeptierten genregulatorischen Phytochromwirkung im Zellkern, wie sie für *Arabidopsis* beschrieben wurde, ein cytoplasmatischer Signalweg von phy4 existiert. Dieser cytoplasmatische Signalweg ist wohl mit dem Aktin-Cytoskelett assoziiert, welches höchstwahrscheinlich im letzten Schritt der Signalkaskade die Krümmungsreaktion des Moosfilamentes organisiert. In *Ceratodon* konnte gezeigt werden, dass das Aktin-Cytoskelett essentiell für die Ausführung der phototropen Krümmungsreaktion ist und dass dabei wohl Umorientierung und lokale Neusynthese der Aktinfilamente stattfindet (Meske & Hartmann, 1995; Meske *et al.*, 1996). Mikrotubuli scheinen dabei nicht direkt involviert zu sein. Vermutlich wird die Umorientierung über einen Ca^{2+} -Gradient und verschiedene Aktin-organisierende Proteine reguliert. Beispielsweise zeigten *Physcomitrella* Mutanten von ARP2/3-Komplex-Untereinheiten Defekte in Protoplastenregeneration, polarem Spitzenwachstum und der Antwort auf polarisiertes Licht (Perroud & Quatrano, 2006).

Paradox im Zusammenhang mit der vektoriellen Signalübertragung ist zudem, dass Phytochrom ein lösliches Chromoprotein ist (Kidd & Lagarias, 1990; Lamparter *et al.*, 1995). Es ist schwer vorstellbar, wie ein Molekül, welches selbst keine gerichtete Orientierung in der Zelle hat, Richtungs- und insbesondere Polarisationsinformationen wahrnehmen, weiterleiten

und letztlich gerichtete physiologische Antworten, wie z.B. eine Wuchsrichtung im rechten Winkel zur Polarisationssebene des eingestrahnten linear polarisierten Lichts bewirken kann. Dieses Problem ergäbe sich nicht, wenn der Photorezeptor in der Zelle verankert wäre und in dieser Weise über seine Orientierung und Position in der Zelle Signale bezüglich der Lichtrichtung und -polarisation übermitteln könnte, so wie es auch bei Phototropinen der Fall ist.

In den 50er Jahren – noch bevor eine genregulatorische Aktion von Phytochrom bewiesen war – haben verschiedene Arbeitsgruppen bereits Überlegungen angestellt, wie der Phytochrom Signalweg aussehen könnte. Insbesondere vektorielle Effekte wie z.B. Polarotropismus erfordern spezielle Eigenschaften eines Photorezeptors (für Aktions-Dichroismus, Kraml (1994)). Aus physiologischen Experimenten solcher Effekte wie Chloroplastendrehung in der Alge *Mougeotia scalaris* und Photo- und Polarotropismus im Farn *Dryopteris filix-mas* oder im Moos *Funaria hygrometrica* ergab sich ein elegantes Modell von Jaffe/Etzheld/Haupt (J/E/H), welches die genannten Phänomene durch einen in der Zellperipherie (z.B. an der Plasmamembran) fixierten Photorezeptor, dessen Dipolmoment in den beiden Phytochrom-Konformationen Pr bzw. Pfr eine distinkte Orientierung in Bezug auf die Zelloberfläche hat, erklärt (Etzold, 1965; Jaffe & Etzold, 1965; Haupt *et al.*, 1969; Haupt & Übel, 1975). Nach diesem Modell liegen Phytochrom-Moleküle in ihrem Pr-Zustand anisotrop mit ihrem Dipolmoment parallel zur Zelloberfläche vor. Ein unilateraler bzw. polarisierter R-Lichtreiz würde nun lediglich die Phytochrom-Moleküle mit geeigneter Orientierung in den Pfr-Zustand überführen. Beim Phototropismus wären das diejenigen auf der Lichtzugewandten (und weniger stark der Licht-abgewandten) Flanke und beim Polarotropismus diejenigen, deren Dipolmoment parallel zum E-Vektor des linear polarisierten Lichts angeordnet ist. Das Dipolmoment dreht sich infolge von Bestrahlung mit R und Photokonversion um 90° und liegt folglich rechtwinklig zur Plasmamembran in Form von Pfr vor. Man geht beim Phototropismus davon aus, dass Lichtstreuung und -brechung innerhalb der Filamentzelle zu einem Trans-Membran-Pfr-Gradienten mit einem Maximum auf der lichtzugewandten Seite führen (Esch *et al.*, 1999). Ebenso führt linear polarisiertes Licht mit einer Polarisationssebene in einem spitzen Winkel in Bezug auf die bisherige Wachstumsachse zu einem lokalen Pfr-Maximum in der Nähe der Filamentspitze (aber zur Seite versetzt), so dass dort lokale Signale initiiert werden und letztendlich die phototrope bzw. polarotrope Krümmungsreaktion ausgelöst werden kann.

Aufgereinigte Samenpflanzenphytochrome zeigen scheinbar eine vektorielle Veränderung des Dipolmoments infolge der Photokonversion (Sundqvist & Björn, 1983; Ekelund *et al.*, 1985; Tokutomi *et al.*, 1992) und *Ceratodon* Phytochrom weist Pr- und Pfr- spezifisch unterschiedliche dichroitische Orientierungen auf (Hartmann *et al.*, 1983). Für Neochrome wurde aufgrund der Vermittlung vektorieller Antworten (Polarotropismus und Chloroplastenbewegung) eine PM-Lokalisation postuliert (und ist auch wahrscheinlich), aber nicht mikroskopisch nachgewiesen. Die Hiltbrunner-Arbeitsgruppe war bislang die Einzige, die die Lokalisation von *Adiantum* P35S::PHY3/NEO:YFP in *Adiantum* Gametophyten untersucht haben. Dunkeladaptierte Zellen wiesen nach 15-30 min Mikroskoplicht-Bestrahlung kein distinktes (möglicherweise sehr schwaches) PM-Signal auf, sondern zeigten eher eine NEO:YFP-Lokalisation in Cytoplasma und Zellkern (Possart & Hiltbrunner, 2013). Dennoch wäre eine „genetische Kooperationen“ zwischen Phytochrom und Phototropin in Form von Neochrom eine schlüssige Erklärung für die Vermittlung vektorieller Antworten und Aktions-Dichroismus sowohl durch Rot-, als auch durch Blaulicht. In *Physcomitrella* gibt es jedoch kein Neochrom (Kasahara *et al.*, 2004; Mittmann *et al.*, 2004; Suetsugu *et al.*, 2005), so

dass eine genetische Kooperation als Erklärung für die beschriebenen Beobachtungen auszuschließen ist.

Eine Plasmamembran-Lokalisation von Moosphytochromen konnte jedoch ebenfalls nicht zweifelsfrei belegt werden. Ein Fluoreszenz-Korrelations-spektroskopischer Versuch mit einem phy-Phycocerythrin-Addukt in *Ceratodon purpureus* blieb (abgesehen von unseren Daten, s.u.) der einzige Hinweis für ein Plasmamembran-gebundenes Phytochrom (Böse *et al.*, 2004). Analysen der intrazellulären Lokalisation von *Physcomitrella* Phytochromen ergaben verschiedene Lokalisationsmuster – keines davon wies auf eine distinkte PM-Lokalisation hin. Während Uenaka und Kadota (2007) eine ausschließlich cytoplasmatische Lokalisation der Phytochrome 1-4 in D und auch von phy1 und phy2 nach *Microbeam*-R-Bestrahlung beobachteten (Uenaka & Kadota, 2007), zeigen Daten der Hiltbrunner-Arbeitsgruppe, dass phy2-5 und 5a (in stabil transformierten PHY:YFP-*Gene Replacement*-Linien) in WL zusätzlich im Zellkern lokalisieren und dass phy1:YFP in Gametophoren und Protonemata in WL, R und FR in den Kern transportiert wird (Possart & Hiltbrunner, 2013). Resultierend daraus wurde ein phyA-ähnlicher Importmechanismus für phy1 (und phy3) postuliert und in der Tat konnten Lokalisationsexperimente mit einer Mutante eines putativen (kryptischen) FHY-Homologs in *Physcomitrella* dies bestätigen. Dies korreliert mit Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe, denen zufolge *Arabidopsis* phyA in *Physcomitrella* Protonemata R- und FR-abhängig in den Zellkern importiert werden kann (Jaedicke *et al.*, 2012). Unsere eigenen Lokalisationsanalysen ergaben jedoch, dass zumindest im Fall von phy4 kein Licht-induzierter Kernimport stattfindet, aber dass sich phy4 abhängig von der Position des FP-*Tags* unterschiedlich verhält: phy4:CFP ist konstitutiv (in D, R, FR und B) vor Allem in Cytoplasma und schwächer im Zellkern und GFP:phy4 rein cytoplasmatisch lokalisiert (Jaedicke *et al.*, 2012). In Zwiebelzellen verhält sich zumindest phy4:CFP anders, denn dort findet kein vergleichbarer Kernimport statt (sondern phy4 ist rein cytoplasmatisch lokalisiert), was auf einen *Physcomitrella*-spezifischen Importmechanismus von phy4 hinweist. Dennoch ist eine Plasmamembran-Lokalisation einer Subpopulation des Phytochrom-*Pools* nicht ausgeschlossen, kann jedoch bei den angewendeten mikroskopischen Untersuchungen optisch nicht vom cytoplasmatischen Phytochrom-*Pool* getrennt werden. Ein vorhergehendes Dissertationsprojekt von Dr. Mailliet konnte in diesem Zusammenhang den entscheidenden Hinweis liefern: es konnte mittels *Bimolecular Fluorescence Complementation* (BiFC) eine direkte Interaktion von phy4 mit allen vier *Physcomitrella* Phytochromen an der Protonema-Plasmamembran demonstriert werden (Jaedicke *et al.*, 2012). Analoge Experimente mit phyA und phot1 in Zwiebelzellen konnten dies auch für *Arabidopsis* bestätigen. Da das *Split-YFP*-Signal jedoch im Vergleich zu den FP-Signalen der Lokalisationsstudien recht schwach war, kann man davon ausgehen, dass lediglich eine Subpopulation des Phytochroms mit Phototropin interagiert (Jaedicke *et al.*, 2012). Diese Fixierung erfüllt alle Kriterien für die Perzeption und Transduktion vektorieller Lichtsignale nach dem J/E/H-Modell.

Die offensichtlich unterschiedlichen Lokalisationsverhalten verschiedener *Physcomitrella* Phytochrome könnten darauf hindeuten, dass zwei unterschiedliche Phytochrom-*Pools* in *Physcomitrella* existieren die entsprechend unterschiedliche Funktionen übernehmen – einer im Cytoplasma/an der PM und ein in den Zellkern translozierender *Pool* (Possart & Hiltbrunner, 2013).

1.8 Ziele und Fragestellungen

Um herauszufinden, wie Phytochrom 4 vektorielle Rotlichtsignale perzipieren, an das Aktin-Cytoskelett weiterleiten und gerichtete Rotlichtantworten ausführen kann, sollte untersucht werden, welche molekularen phy4-Interaktionspartner an dem postulierten cytoplasmatischen Signalsystem beteiligt sind. Ein erster Schritt zur Klärung dieser Frage sollte die Identifikation direkter Interaktionspartner von *Physcomitrella patens* Phytochrom 4 sein, die entweder daran beteiligt sind, den Photorezeptor in der Zellperipherie zu fixieren, oder die in anderer Weise im Cytoplasma – z.B. bei der Cytoskelett-Umorganisation fungieren könnten. Für die Identifikation von Interaktionspartnern sollte ein cDNA *Library Screen* unter Anwendung eines Hefe-Zwei-Hybrid- (*Y2H*) Systems durchgeführt werden. Um mögliche Interaktionspartner des Phytochrom 4 zu identifizieren, ist es nötig, den Photorezeptor rekombinant in Hefe zu exprimieren. Hierzu wurde ein Expressionsplasmid kloniert, welches die cDNA des Volllängen-Phytochroms (1126 Aminosäuren) *in Frame* mit einer DNA-Bindedomäne-kodierenden Sequenz beinhaltet. Nach Transformation in Hefe wird dadurch die Expression eines Fusionsproteins erreicht, das aus Phytochrom und einer DNA-Bindedomäne besteht. Da der Phytochrom N-Terminus den mutmaßlich komplex gefalteten Licht-perzipierenden Teil des Photorezeptors enthält, wurde das Phytochrom-*Bait*-Konstrukt anders als im konventionellen *MatchMaker-Y2H*-Ansatz (Clontech) nicht als N-terminale, sondern als C-terminale Fusion mit einer DNA-Bindedomäne konstruiert, um die Funktionalität des Fusionsproteins bestmöglich zu gewährleisten. Falls *Physcomitrella* Phytochrome ebenfalls über einen Knoten verfügen sollten, ist unklar, wie sich eine solche Struktur mit einer N-terminal fusionierten GAL4-DNA-Bindedomäne ausbilden soll. Ein N-terminal fusionierter Anhang jeglicher Art könnte somit die mutmaßlich essentielle Flexibilität, native Faltung und Protein-Protein-Interaktionen des N-Terminus erheblich stören. Da das so in Hefe hergestellte PHY4-Apoprotein aufgrund des fehlenden Chromophors nicht in der Lage sein kann, die als Signalform fungierende Pfr-Konformation des Phytochroms einzunehmen, sollte mit Hilfe von Phycocyanobilin (PCB) Holophytochrom in Hefe hergestellt werden. Dies sollte mittels Zugabe des Chromophors in das Selektionsmedium geschehen. Um die Autoaktivierung des Reporters durch die phy4:BD-Expression so gering wie möglich zu halten, sollte quantitatives Hefe-*Mating* etabliert und in einem *Y2H-cDNA-Library Screen* in Rotlicht eingesetzt werden. Auf diese Weise sollten diejenigen Interaktionspartner identifiziert werden, die bevorzugt mit dem Pfr-Zustand von phy4 interagieren. Anschließend wurden putative Interaktionspartner selektiert, sortiert und *in silico* analysiert. Auf Basis dieser Analysen sollten mögliche für cytoplasmatisches Phytochrom-*Signalling* interessante Partner für die Charakterisierung der möglicherweise lichtabhängigen Interaktionseigenschaften in Kombination mit phy4:BD und BD:phy4 ausgewählt werden. Verifizierte Partner sollten anschließend bezüglich ihrer intrazellulären *in planta* Lokalisation in D und R untersucht werden. Letztlich sollte versucht werden, die gefundenen (ggf. Licht-abhängigen) *Y2H*-Interaktionen auch *in planta* mittels *Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC)* zu bestätigen.

Der zweite Teil der Arbeit sollte ein vorhergehendes Dissertationsprojekt von Dr. Katharina Mailliet fortführen. Darin konnte bereits gezeigt werden, dass (i) BD:phy4 in der Lage ist, mit allen *Physcomitrella* Phototropinen zu interagieren, (ii) dass diese Interaktion an der Plasmamembran stattfindet, (iii) dass dies ebenfalls zutrifft für *Arabidopsis* phyA und phot1 in Zwiebelzellen und (iiii) dass letztgenannte Interaktion nicht mit *Y2H* nachgewiesen werden kann (Jaedicke, 2012). Zusätzlich wurden auch (wie in 1.7 beschrieben) diverse *Physcomitrella*

Phototropin-Mutanten (von Kasahara *et al.* (2004)) bezüglich ihres Krümmungsverhaltens in unilateralem und polarisiertem Rotlicht analysiert und wiesen in der Tat einen RL-abhängigen Phänotyp auf. Diese Resultate implizierten, dass eine phy-phot-Interaktion im Moos direkt stattfindet, während in *Arabidopsis* (bzw. in Zwiebel) wohl ein oder mehrere zusätzliche Proteine an der Interaktion beteiligt ist/sind, die im Hefe-*Assay* *nicht* vorhanden waren und somit zu einem negativen Ergebnis führten. Für die Publikation dieser Erkenntnisse waren einige weitere Analysen der phy-phot-Interaktion vonnöten, die Teil der vorliegenden Arbeit sind. Es sollte eine Möglichkeit gefunden werden, mit der man die Lichtabhängigkeit und Stärke der Holo-phy4-phot-Interaktionen quantitativer untersuchen kann, als mit einem *Y2H*-Wachstums-*Assay*. Daher sollte es meine Aufgabe sein, ein Holophytochrom-Flüssig-ONPG-*Y2H*-*Assay* nach verschiedenen Lichtbehandlungen zu etablieren und anzuwenden.

Des Weiteren sollte zusätzlich zu *Y2H* und *BiFC* eine weitere Evidenz für die Protein-Protein-Interaktion erbracht werden. Hierzu entwickelte und optimierte ich in Zusammenarbeit mit Dr. Mathias Zeidler und Prof. Jon Hughes ein Protokoll, bei dem HA:phy4- und Myc:phot-Fusionsproteine durch *Agrobacterium*-vermittelte Transfektion in *Nicotiana benthamiana* co-exprimiert, extrahiert und für Co-Immunopräzipitation (Co-IP) zunächst mit Anti-Myc- und später mit Anti-HA-Antikörpern eingesetzt wurden. Anhand von Kontrollexperimenten ohne Antikörper (bzw. ohne HA:phy4) sollte die Bindungsspezifität co-immunopräzipitierter myc:phot-Fusionsproteine demonstriert werden. In Anlehnung an die angesprochene Publikation in *PNAS* (Jaedicke *et al.*, 2012), sollte weiterhin versucht werden, die *Y2H*- und Co-IP-Analysen auf *Arabidopsis* phyA und phot1 auszudehnen. Erstens sollte untersucht werden, ob N- oder C-terminale Domänen von phot1 in der Lage sind, direkt mit phyA zu interagieren (um sterische Behinderungen durch die jeweils andere Hälfte des Phototropin-Moleküls auszuschließen). Zweitens sollte mittels Hefe-3-Hybrid (*Y3H*) und Co-IP die Beteiligung möglicher weiterer am beschriebenen postulierten PM-lokalisierten phy-phot-Signalkomplex beteiligten Interaktionspartner untersucht werden. Dazu sollte zumindest PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 1 (PKS1), welches in der Lage ist, sowohl mit Phytochrom, als auch mit Phototropin zu interagieren, untersucht werden. In *Physcomitrella* hingegen gibt es kein PKS1-Homolog und PKS1 könnte somit evtl. in höheren Pflanzen evolviert sein, um die Rekrutierung von Phytochrom und Phototropin zu einem Plasmamembran-lokalisierten Signalkomplex zu regulieren, wozu in *Physcomitrella* kein Brückenprotein notwendig zu sein scheint. Falls es sich bei PKS1 um das postulierte Brückenprotein handeln sollte, würde dies eine Interaktion mit phot1 und phyA an der Plasmamembran implizieren, was ebenfalls untersucht werden sollte.

2. Material

2.1 Organismen

2.1.1 Bakterien

E. coli: Chemisch kompetente TOP10
Elektrokompetente TOP10
Elektrokompetente XL1Blue

Alle von Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA, jetzt Thermo Fisher Scientific

Agrobacterium tumefaciens:

ABI
GV3101

Koncz *et al.* (1984)

2.1.2 Hefen

Sacharomyces cerevisiae Stamm AH109

MAT_a, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200,; gal4Δ, gal80Δ, LYS2 : : GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-
HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3 : : MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ
(Clontech Laboratories Inc., Kalifornien, USA)

Sacharomyces cerevisiae Stamm Y187

MAT_a, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901,
leu2-3, 112, gal4Δ, met⁻, gal80Δ, URA3 : : GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ
(Clontech Laboratories Inc., Kalifornien, USA)

Sacharomyces cerevisiae Stamm AH109 vortransformiert mit einer *Physcomitrella patens*-
cDNA-Bibliothek (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Hans Sommer, Max
Planck Institut für Pflanzenzüchtungsforschung, Köln)

2.1.3 Pflanzen

Physcomitrella patens (Hedw.)

Wildtyp WTDC (Gransden Wood, Huntingdonshire, UK; Ashton & Cove 1977)

Nicotiana benthamiana

Allium cepa

2.2 Puffer, Lösungen, Medien

2.2.1 Wasser

Für alle Arbeiten wurde Membrapore-gereinigtes Wasser verwendet.

2.2.2 Für Arbeiten mit DNA

Plasmid-DNA Maxi-Präparationen aus *E. coli*

Die Isolation größerer Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach Sambrook and Russel (2001).

2. Material

STE

0,1 M NaCl
10 mM Tris/HCl (pH 8,0)
1 mM EDTA
5 % (v/v) Triton X100

Sol I

50 mM Glukose Monohydrat
25 mM Tris/HCl (pH 8,0)
10 mM EDTA (pH 8,0)

Sol II (frisch)

200 mM NaOH
1 % (w/v) SDS

Sol III

3 M $C_2H_3KO_2$
11,5 % (v/v) $C_2H_4O_2$

PEG/NaCl

13 % (w/v) PEG 8000
1,6 M NaCl

Natriumacetat

3 M $C_2H_3NaO_2$
pH 5,2 -5,8 mit Essigsäure
einzustellen

Lysozymlösung (frisch)

1 mg/ml Lysozym
10 mM Tris (pH 8,0)

Proteinase K-Lösung

20 mg/ml in H_2O

DNase freie RNase Lösung

2 μ g/ μ l RNase A in TE-Puffer

TE

20 mM Tris/HCl (pH 8,0)
1 mM EDTA

70% (v/v) Ethanol

Isopropanol, rein

DNA-Extraktion aus Hefe

Lysepuffer

100mM Tris HCl pH 8,0
50 mM EDTA
1% SDS

5 M NaCl

Phenol

Phenol:Chlorophorm (4:1)

95% Ethanol (kalt)

70% Ethanol

PCR

10x PCR-Puffer

0,5 M KCl
15 mM $MgCl_2$
100 mM Tris/HCl, pH 9,0
0,1% (v/v) Triton X-100

10x dNTP-Mix

2 mM jeweils dATP, dTTP, dGTP, dCTP

Gelelektrophorese

0,5x TBE-Puffer

100 mM Tris
83 mM H_3BO_3
10 mM EDTA (pH 8,0)

Agarosegel

z.B. 1% (w/v) Agarose + 0,5x TBE

6x Agarose-Ladepuffer

60% (v/v) Glycerol
0.03% (w/v) Xylencyanol
0.03% (w/v) Bromophenolblau
60 mM EDTA
10 mM Tris/HCl

Ethidiumbromid-Stock-Lösung:

20 mg/ml Ethidiumbromid in H_2O

Ethidiumbromid-Bad

0,5 μ g/ml Ethidiumbromid in 0,5x TBE

2. Material

Kits

QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Venlo, Niederlande)
Qiagen MinElute Gel Extraction-Kit (QIAGEN, Venlo, Niederlande)
Pure Link Quick Gel Extraction Kit (Applichem)

pCR-Blunt II-TOPO Cloning Kit
Zero Blunt PCR Cloning Kit
TA Cloning Kit with pCR2.1 vector
pCR8/GW/TOPO TA-cloning Kit
Gateway LR und BP Clonase Mix II
Wenn nicht anders angegeben: Invitrogen Corp., Carlsbad, Kalifornien, USA

2.2.3 Für Arbeiten mit Bakterien

SOC-Medium

2 % (w/w) Trypton
0,5 % (w/w) Hefeextrakt
10 mM NaCl
2,5 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
20 mM Glucose
steril filtriert

LB Medium

1% (w/w) Trypton
0,5 % (w/w) Hefeextrakt
10 mM NaCl
autoklaviert

LB-Flüssigmedium mit MgSO₄

LB-Medium
10 mM MgSO₄

Selektionsplatten für *E. coli*

LB-Medium
1,5 % (w/v) Agar autoklaviert

7 % DMSO-Lösung

Antibiotika

Kanamycin 100 µg/ml
Ampicilin 100 µg/ml
Chloramphenicol 25 µg/ml
Spectinomycin 100 µg/ml
(*Agrobacterium*)
Rifampicin 50 µg/ml (*Agrobacterium*)
Gentamycin 10 bzw. 15 µg/ml
(*Agrobacterium* bzw. *E. coli*)

Zur Elektroporation wurde ein IBI *Gene Zapper* eingesetzt (450/ 2500 Apparat mit Reaktionsmodul 100; International Biotech, Inc., New Haven, USA).

TB flüssig Medium

1,2 % (w/v) Trypton
2,4 % (w/v) Hefeextrakt
0,4 % (v/v) Glycerin, autoklaviert
+ 10% (v/v) Kaliumphosphatpuffer
(0,17M KH₂PO₄, 0,72 M K₂HPO₄; separat autoklaviert)
+Antibiotikum (Kanamycin / Ampicilin 100 ng/µl)

2.2.4 Für Arbeiten mit Hefe

Medien

YPDA (Yeast Peptone Dextrose Adenine)

20 g/l Trypton
10 g/l Hefeextrakt
5 g/l NaCl
15 g/l Agar
pH 5,8; Autoklaviert
100ml 20 % Glucose (steril filtriert)
15 ml 0,2 % Adeninlösung (steril filtriert)

2x YPDA

Synthetic Dropout-Medium:

6,7 g/l Difco *Nitrogen Base*
x g/l *Dropout Supplement*
15 g/l Agar
pH 5,8; autoklaviert
2 % sterile Glucose (10 % (v/v) einer 20 % (w/v) *Stock-Lösung*)

2. Material

ggf. 80 µg/ml X-α-Gal (20 mg/ml *Stock* in DMF; sterilfiltriert)

ggf. 3-AT (aus 1M *Stock-Lösung* in H₂O, sterilfiltriert)

DO-Supplement

-Trp 0,74 g/l

-Leu 0,69 g/l

-His 0,77 g/l

-Trp/-Leu 0,64 g/l

-Trp/-Leu/-His 0,62 g/l

-Trp/-Leu/-His/-Ade 0,60 g/l

-Trp/-Leu/-Met 0,62 g/l

-Trp/-Leu/-His/-Met 0,6 g/l

-Trp/-Leu/-His/+Met s.o.+0,3g/l extra Met

Für -Trp/-His-*SD*-Medium und -Leu/-His-*SD*-Medium wurde -Trp/-Leu/-His *DO-Supplement* eingesetzt und die jeweilige Aminosäure (10x-*Stock-Lösung*) L-Leucin bzw. L-Tryptophan nach Autoklavieren hinzugegeben (0,1 mg/ml L-Leucin; 20 µg/ml Tryptophan Endkonzentration)

TSD Medium für Screening-Platten

6,7 g/l *Difco Nitrogen Base*

0,62 g/l -Trp/-Leu/-His *DO Supplement*

15 g/l Agar

pH 5,8 (mit 1M NaOH-Lsg.); autoklaviert

2% (v/v) sterile Glukose-Lösung

0,25 mM 3-AT

665 mg/l Lysozym (*Stock* 50 mg/ml in H₂O)

20 mg/l Tetrazyklin (*Stock* 5 mg/ml in Ethanol)

200 mg/l Cefotaxim (*Stock* 100 mg/ml in H₂O)

27 µM PCB in Methanol

Platten zum Überimpfen putativ positiver Klone:

Wie *TSD* für *Screening*-Platten

+X-α-Gal (80 µg / ml)

+ / - 27 µM PCB

Hefetransformation

100 mM LiAc-Lösung in H₂O, steril

2 mg/ml salmon sperm carrier DNA

50% (w/v) PEG 3350 in H₂O, steril

Transformationsmix für eine Reaktion

240 µl PEG 3500 50% w/v

36 µl 1 M Lithiumacetat (LiAc)

50 µl Einzelsträngige *Salmon*

Sperm Carrier DNA [2mg/ml]

34 µl Plasmid-DNA (500 ng) +
Wasser

Langfristige Aufbewahrung (-80°C)

SD-Medium + 25% (v/v) Glycerol

ONPG-Assay

Z-Puffer

16,1 g/L Na₂HPO₄ • 7H₂O

5,50 g/L NaH₂PO₄ • H₂O

0,75 g/L KCl

0,246 g/L MgSO₄ • 7H₂O

pH7,0, autoklaviert.

Z-Puffer + β-Mercaptoethanol

0,27 % (v/v) β-Mercaptoethanol

ONPG (frisch)

4mg/ml in Z-Puffer

pH7,0 gut mischen durch Vortexen

1M Na₂CO₃

Flüssiger Stickstoff

2.2.5 Enzyme und Enzympuffer

Applichem, Darmstadt, Deutschland

Proteinase K

Invitrogen Corp., Carlsbad, Kalifornien, USA:

BP-Clonase-Mix (*Gateway*-Klonierung)

LR-Clonase-Mix (*Gateway*-Klonierung)

Superscript II Reverse Transkriptase

2. Material

NEB, New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts

Antarctic Phosphatase

T4 DNA-Ligase

T4 DNA-Ligase Puffer

Restriktionsenzyme

(ApaI, BamHI, EcoRI, NdeI, NotI, PacI, SalI, XhoI & XmaI)

NEB-Puffer 1 - 4, EcoRI- & CutSmart-Puffer

Phusion™ high fidelity Polymerase (auch: Finnzymes)

Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Lysozym aus Hühnereiweiß

Driselase

TAKARA BIO INC.

TaKaRa Ex Taq

Taq Polymerase (*home made*)

2.2.6 Für Arbeiten mit Proteinen

TES-β

50mM Tris-HCL pH 7,8

5 mM EDTA

300 mM NaCl

1,4 mM β-Mercaptoethanol

Proteinextraktion aus Hefe

0,2 M NaOH

2x SDS-Ladepuffer (s.u.)

Proteinextraktion aus Tabak

2x SDS-Ladepuffer (s.u.)

Extraktionspuffer für Co-IP

100 mM Tris/HCl pH 8,3

5 mM EDTA

0,1% (v/v) β-Mercaptoethanol

+ *Complete* Proteaseinhibitor-Mix (Roche)
(mit und ohne 0,3 % (v/v) Triton-X-100)

SDS-PAGE

6x SDS-Ladepuffer

7 ml Sammelgelpuffer

38 % (w/v) Glycerol

1% (w/v) SDS

0,5 M DTT

1 Spatelspitze Bromphenolblau

1% (v/v) β-Mercaptoethanol

2x SDS-Ladepuffer

120 mM Tris HCL pH 6,8

20% (v/v) Glycerol

4 % (w/v) SDS

250 mM DTT

0,05 % (v/v) β-Mercaptoethanol

1 Spatelspitze Bromphenolblau

10 % APS

10 % Ammoniumpersulfat in H₂O

Acrylamid Lösung

Acrylamid 4K Lösung (30 %)

37,5:1 (Acrylamid:Bisacrylamid)

Trenngelpuffer

1,5 M Tris/HCl pH 8,8

0,6 % SDS

Sammelgelpuffer

0,5 M Tris/HCl pH 6,8

0,6 % SDS

10 % Trenngel

5 ml Acrylamid

3,75 ml Trenngelpuffer

6,25 ml H₂O

90 µl 10 % APS

15 µl TEMED

4 % Sammelgel

650 µl Acrylamid

1,25 ml Sammelgelpuffer

3,1 ml H₂O

25 µl 10 % APS

5 µl TEMED

2. Material

SDS-PAGE Laufpuffer

25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1 % SDS

Coomassie Lösung

0,5 % (w/v) Coomassie R250
25 % (v/v) Isopropanol
10 % (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung

10 % Essigsäure

Western Blot

Tankblot Puffer

2,5 mM Tris pH 8,3
150 mM Glycin
20 % Methanol

100% Methanol (techn.)

Western Blot Waschpuffer

10 mM Tris/HCl pH 7,4
0,9 % (w/v) NaCl
0,05 % (v/v) Tween 20

Western Blot Blockierungspuffer

5% (w/v) Magermilchpulver in Waschpuffer

Waschpuffer für DNA-BD-Antikörper

20 mM Tris/HCl pH 7,4
137mM NaCl
0,1 % (v/v) Tween 20

Blockpuffer für DNA-BD-Antikörper

5 % (w/v) Magermilchpulver in
Waschpuffer für DNA-BD-Antikörper
1% (w/v) BSA

Detektionspuffer NBT/BCIP

100mM Tris pH 9,5
50 mM NaCl

BCIP 50 mg/ml in DMF

NBT 43,5 mg/ml in DMF/H₂O

Detektionspuffer für CDP-Star (NEB)

1:25 Verdünnung aus *Stock*-Lösung

CDP-Star-Lösung (NEB)

1:100 verdünnt in Detektionspuffer

Protein-Größenmarker

High Range Marker (home made)

205 kDa Myosin
116 kDa β -Galaktosidase
94,4 kDa Phosphorylase
66 kDa Serum Albumin
45 kDa Ei Albumin
36 kDa Glyceraldehyd-3-Phosphat
29 kDa Carboanhydrase
20,1 kDa Trypsin Inhibitor
2x SLB
H₂O

Applichem Marker IV (für SDS-PAGE)

Pre Stained Marker (für WB)

Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Applichem Marker VI

Co-IP

Protein G *magnetic Beads* (NEB)

EZview Red Protein G Affinity Gel-Agarose-Beads (Sigma E3403)

2.2.7 Extraktion von PCB aus *Spirulina*

Spirulina-Tabletten

greenValley Naturprodukte GmbH,
Berlin, Deutschland

Cyanopuffer

100mM KPO₄-Puffer pH 7,0
5 mM EDTA

2. Material

Ammoniumsulfat, Methanol techn. & Methanol für *high pressure liquid chromatography*

2.2.8 Pflanzenanzucht

Für *Physcomitrella* Kulturen wurden Standardmedien basierend auf Ashton and Cove (1977) verwendet. Zur wöchentlichen Homogenisierung der Flüssigkulturen wurde ein Ultra-Turrax Gerät (T18 basic Ultra-Turrax, IKA, Staufen, Deutschland) verwendet.

Lösung B (100x)

0,1 M MgSO_4

ggf. +0,8 % (w/v) Agar

Autoklaviert

+5 mM $\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$ (= Lsg. N)

+2 mM CaCl_2 (= Lsg. Ca)

Lösung C (100x)

180 mM KH_2PO_4

Lösung E (100x)

1 M KNO_3

1,4 mM $\text{Fe(III)C}_6\text{H}_5\text{O}_7$

BCE 225 Medium

BCE 205 Flüssigmedium

+ 0,2 % (w/v) Glukose

Ggf. + 0,8% (w/v) Agar

Spurenelement (TES)-Lösung, 1000x

9,93 mM H_3BO_3

0,23 mM $\text{AlK(SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$

0,22 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

0,24 mM KBr

0,66 mM LiCl

0,10 mM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

1,97 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$

0,23 mM $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

0,19 mM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

0,17 mM KI

0,12 mM $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

0,25 mM $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

Ca Lösung (100x)

200 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in H_2O

sterilfiltriert

N Lösung (100x)

500 mM Diammoniumtartrat ($\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$)

in H_2O

sterilfiltriert

3er Medium

1m M KNO_3

0,1 mM CaCl_2

1 mM KH_2HPO_4

40 μM MgSO_4

10 μM $\text{Fe(III)C}_6\text{H}_5\text{O}_7$

1x Spurenelementlsg.

27 mM Glucose

0,3% (W/V) Hefeextrakt

1,2% Agar

autoklaviert

BCE 205 Medium

1 mM MgSO_4 (=Lsg. B)

1,8 mM KH_2PO_4 (= Lsg. C)

10 mM KNO_3 (= Lsg. E)

14 μM $\text{Fe(III)C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (= Lsg. E)

1x TES (s.o.)

2.2.9 Transformation von *Physcomitrella*-Protoplasten mittels Particle Inflow Gun (PIG)

BCE225-Medium + 0,2 mM Mannitol

Gold- (1,6 μm InBio Gold, Eltham, Australien) und Wolfram- (M17 1,1 μm , BioRad) Partikel durch Waschen in 96%igem Ethanol sterilisiert und in H_2O resuspendiert

50% (v/v) Glycerin in H_2O , autoklaviert

2,5 M CaCl_2 in H_2O , sterilfiltriert

100 nM Spermidin (aus 10x Stocklösung), sterilfiltriert

2. Material

Ethanol

2.2.10 *Agrobacterium*-vermittelte Transformation von Tabak (*Nicotiana benthamiana*)

Infiltrationsmedium

10 mM MES, pH 5,6

10 mM MgCl₂

100 µM Acetosyringon

2.3 Antikörper

Clontech, Mountain View, Kalifornien, USA

Anti-DNA-BD-Antikörper, 1:15000 in Waschpuffer

Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz

Anti-GFP aus Maus, 1:1000 in Blockierungspuffer

Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA

Anti-c-Myc, monoklonal aus Maus, 1:5000 in Waschpuffer

Anti-HA, polyklonal aus Hase, 1:1000 in Waschpuffer

Anti-HA, monoklonal aus Maus, 1:3000 in Waschpuffer

Anti-FLAG aus Maus, 1:1000 in Blockierungspuffer mit 3% (w/v) Magermilchpulver

Anti-Hase-Antikörper aus Ziege, Alkaline-Phosphatase-Konjugat, 1:30000 in Blockierungspuffer

Anti-Maus-Antikörper: (RαmIgG) aus Ziege, Alkaline-Phosphatase-Konjugat, 1:30000 in Blockierungspuffer

Anti-phyA zur Verfügung gestellt von A. Nagatani (Kyoto Universität, Kyoto, Japan)

2.4 Plasmide und Vektoren

Tabelle 2-1: Verwendete Vektoren und Plasmide sortiert nach Anwendung. Es sind jeweils Name, Verwendungszweck und Herkunft der DNAs angegeben.

	Vektor oder Plasmid	Zweck	Quelle
Sub- klonierung	pCR2.1	Subklonierungs-Vektor; TA-Klonierung	Invitrogen
	pCR-Blunt	Subklonierungs-Vektor, Klonierung von <i>Blunt</i> -DNA-Fragmenten	Invitrogen
	pCR-BluntII-TOPO	Subklonierungs-Vektor, TOPO-Klonierung von <i>Blunt</i> -DNA-Fragmenten	Invitrogen
Y2H Baits	pGBKT7	<i>Y2H-Bait</i> -Vektor, N-terminale BD-Fusion	Clontech
	PHY4 pGBKT7	BD:phy4-Expressionsvektor für <i>Y2H</i> Interaktionsstudien	Jaedicke <i>et al.</i> 2012
	PHY4 N/C pGBKT7	Expressionsplasmide von N-terminalen BD-Fusionen an phy4 Hälften	Jaedicke <i>et al.</i> 2012
	pBRIDGE	<i>Y3H-Bait</i> -Vektor, N-terminale BD-Fusion	Clontech
	pBAC	<i>Y3H-Bait</i> -Vektor für C-terminale BD-Fusionen; 1,5x ADH1-Promoter (zusätzlich FL-ADH1-eingefügt)	Jutta Rösler-Dalton
	PHYA pBAC	phyA:BD-Expressionsplasmid als lichtabh. Positivkontrolle für Holo-phy- <i>Y2H</i> -Assays, phyA-phot Interaktionsnachweis	Jutta Rösler-Dalton / Jaedicke <i>et al.</i> 2012
	PHY4 C pBC	phy4 C:BD-Expressionsplasmid (ohne zusätzliche ADH1-Kopie)	Katharina Mailliet

2. Material

Y2H Preys	pGADT7	Y2H-Prey-Vektor, N-terminale AD-Fusion	Clontech
	PHY4 pGADT7	AD:phy4-Expressionsplasmid, phy4-Dimerisierungskontrolle	Jaedicke <i>et al.</i> 2012
	PHY4 N/C pGADT7	Expressionsplasmide von N-terminalen AD-Fusionen an phy4 Hälften	Katharina Mailliet
	PHOTA1 / A2 / B1 / B2 pGADT7	AD:phot-Expressionsplasmide, Interaktionsnachweis mit phy4-Baits	Jaedicke <i>et al.</i> 2012
	PRL1 pGADT7	AD:PRL1-Expressionsplasmid, Interaktionsnachweis mit phy4-Baits	Ermer <i>et al.</i> 2016
	PLP pGADT7	AD:PRL1-Expressionsplasmid, Interaktionsnachweis mit phy4-Baits	Ermer <i>et al.</i> 2016
	PHYA pGADT7	AD:phyA-Expressionsplasmid, phyA Dimerisierungskontrolle	Jutta Rösler-Dalton / Jaedicke <i>et al.</i> 2012
	FHY1 pGADT7	AD:FHY1-Expressionsplasmid für lichtabhängige Y2H-Positivkontrolle	Zeidler <i>et al.</i> 2001
Gateway Donor	pDONR 207	GW Donor-Vektor für phy4-Interaktionspartner <i>Entry</i> -Herstellung <i>etc.</i>	Invitrogen
	pDONR 221	GW Donor-Vektor für Co-IP- <i>Entry</i> -Herstellung <i>etc.</i>	Invitrogen
Gateway Entry	pENTRD TOPO	GW <i>Entry</i> -Vektor (z.B. für Herstellung von PKS1- <i>Split</i> -YFP-Expressionsklonen)	Invitrogen
	pCR8 GW TOPO	GW <i>Entry</i> -Vektor	Invitrogen
	pKJ117 <i>PHY4FL</i> (ohne Stopp) pCR8 GW TOPO	GW Phy4- <i>Entry</i> -Klon, Klonierung von PHY4:GFP	Katharina Mailliet
	<i>PHOTB1</i> (ohne und mit Stopp) pCR8 GW TOPO	GW <i>PHOTB1-Entry</i> -Klon zur Herstellung von ADg: <i>PHOTB1</i> und <i>PHOTB1:ADg</i>	Ermer <i>et al.</i> 2016
	<i>PRL1</i> (ohne Stopp) pCR8 GW TOPO	<i>PRL1-Entry</i> -Klon für Klonierung C-terminaler Fusionen für Y2H, Lokalisation und <i>Split</i> -YFP	Ermer <i>et al.</i> 2016
	<i>MYC</i> pENTR	GW <i>myc-Tag Entry</i> -Klon; Klonierung von Kontrollvektoren für C-terminale Fusionen	Jutta Rösler-Dalton
Gateway Destination	pGADT7g	GW-Y2H-Prey-Vektor, N-terminale AD-Fusion	Uetz <i>et al.</i> 2005
	pGADCg	GW Y2H-Prey-Vektor, C-terminale AD-Fusion	Stellberger <i>et al.</i> 2010
	p2CGW7,0-CFP +2x35S	GW Destinationsvektor, N-terminale CFP-Fusion	Karimi <i>et al.</i> 2002 (modifiziert), Jaedicke <i>et al.</i> 2012
	p2FGW7,0-GFP +2x35S	GW Destinationsvektor, N-terminale GFP-Fusion	s.o.
	p2GWC7,0-CFP +2x35S	GW Destinationsvektor, C-terminale CFP-Fusion	s.o.
	p2GWF7,0-GFP +2x35S	GW Destinationsvektor, C-terminale GFP-Fusion	s.o.
	pSAT4(A)-DEST-n(1-174)eYFP-N1	GW <i>Split</i> -YFP Destinationsvektor, YFP-N-Terminus, C-terminal fusioniert	Citovsky <i>et al.</i> 2006
	pSAT4-DEST-n(1-174)eYFP-CI	GW <i>Split</i> -YFP Destinationsvektor, YFP-N-Terminus, N-terminal fusioniert	Citovsky <i>et al.</i> 2006
	pSAT5(A)-DEST-c(175-end)eYFP-N1	GW <i>Split</i> -YFP Destinationsvektor, YFP-C-Terminus, C-terminal fusioniert	Citovsky <i>et al.</i> 2006
	pSAT5-DEST-C(175-end)eYFP-C1(B)	GW <i>Split</i> -YFP Destinationsvektor, YFP-C-Terminus, N-terminal fusioniert	Citovsky <i>et al.</i> 2006
	pGWB415	N-terminale 3x HA-Fusion für Co-IP	Nakagawa <i>et al.</i> 2007
	pGWB421	N-terminale 10x myc-Fusion für Co-IP	Nakagawa <i>et al.</i> 2007
Gateway Expression	pSAT6_mCherry_VIR D2_NLS	Kernmarker, RFP	Citovsky <i>et al.</i> 2006
	2x35S::GFP:PHY4	GFP:phy4-Expressionsklon zur Herstellung von <i>Entry</i> -Klonen für Co-IP	Jaedicke <i>et al.</i> 2012
	2x35S::CFP:PHOTA1	CFP:photA1-Expressionsklon zur Herstellung von <i>Entry</i> -Klonen für Co-IP	Jaedicke <i>et al.</i> 2012
	2x35S::CFP:PHOTA2	CFP:photA2-Expressionsklon zur Herstellung von <i>Entry</i> -Klonen für Co-IP	Jaedicke <i>et al.</i>

2. Material

			2012
	2x35S::CFP:PHOTB1	CFP:photB1-Expressionsklon zur Herstellung von <i>Entry</i> -Klonen für Co-IP	Jaedicke <i>et al.</i> 2012
	2x35S::CFP:PHOTB2	CFP:photB2-Expressionsklon zur Herstellung von <i>Entry</i> -Klonen für Co-IP	Jaedicke <i>et al.</i> 2012
	PHYA pGWB415	HA:phyA-Expressionsklon für Co-IP	Mathias Zeidler
	PHOT1 pGWB421	myc:phot1-Expressionsklon für Co-IP	Mathias Zeidler
	PRL1 p2CGW7,0-CFP +2x35S	CFP:PRL1-Expressionsklon für Lokalisationsstudien	Ermer <i>et al.</i> 2016
	PRL1 p2GWF7,0-GFP +2x35S	PRL1:GFP-Expressionsklon für Lokalisationsstudien	Ermer <i>et al.</i> 2016
	PLP p2CGW7,0-CFP +2x35S	CFP:PLP-Expressionsklon für Lokalisationsstudien	Ermer <i>et al.</i> 2016
	PHY4 pSAT4	YFP _N :phy4-Expressionsklon für <i>in vivo</i> -Interaktionsstudien	Jaedicke <i>et al.</i> 2012
	PHY4 pSAT4a	phy4:YFP _N -Expressionsklon für <i>in vivo</i> -Interaktionsstudien	Katharina Mailliet
	PHY4 pSAT5	YFP _C :phy4-Expressionsklon für <i>in vivo</i> -Interaktionsstudien	Jaedicke <i>et al.</i> 2012
	PHY4 pSAT5a	phy4:YFP _C -Expressionsklon für <i>in vivo</i> -Interaktionsstudien	Katharina Mailliet
	PHOTA1 pSAT4	YFP _N :photA1-Expressionsklon für <i>in vivo</i> -Interaktionsstudien	Jaedicke <i>et al.</i> 2012
	PHOTB1 pSAT4	YFP _N :photB1-Expressionsklon für <i>in vivo</i> -Interaktionsstudien	Jaedicke <i>et al.</i> 2012
	PHYA pSAT4	YFP _N :phyA-Expressionsklon für <i>in vivo</i> -Interaktionsstudien	Jaedicke <i>et al.</i> 2012
	PHYA pSAT5	YFP _C :phyA-Expressionsklon für <i>in vivo</i> -Interaktionsstudien	Jaedicke <i>et al.</i> 2012
	PHOT1 pSAT4	YFP _N :phot1-Expressionsklon für <i>in vivo</i> -Interaktionsstudien	Katharina Mailliet
	PHOT1 pSAT5	YFP _C :phot1-Expressionsklon für <i>in vivo</i> -Interaktionsstudien	Jaedicke <i>et al.</i> 2012
	PLP pSAT4	YFP _N :PLP-Expressionsklon für <i>in vivo</i> phy4-Interaktionsstudien	Ermer <i>et al.</i> 2016
	PRL1 pSAT4	YFP _N :PRL1-Expressionsklon für <i>in vivo</i> phy4-Interaktionsstudien	Ermer <i>et al.</i> 2016
Sonstige	pUC19	Kontrollplasmid zum Transformationseffizienztest kompetenter Bakterien	Invitrogen
	pWEN18_YFP	35S::YFP, Transfektions- und Lokalisationskontrolle	Kost <i>et al.</i> 1998
	pBIN61 P19	P19-Expressionsplasmid zur Unterdrückung v. post-transkriptionellem Gen-Silencing	Sir David Baulcombe
	pSPYNE PHOT1	Template für PHOT1 pGAD-Klonierung	John Christie
	pGBT9 PHOT2	Template für PHOT2 pGAD-Klonierung	John Christie
	pKJ27 PHY4 FL	Template für phy4 (N):BD-Klonierung	Katharina Mailliet

Der *Y2H-Bait*-Vektor pBAC (s.o., freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Jutta Rösler-Dalton (Rösler, 2010)) ist ein Derivat des pBRIDGE-Vektors des Hefe-3-Hybrid-Systems von Clontech. Um pBAC herzustellen, wurde das ADH1-Promoter Fragment des pBRIDGE um eine Vollängensequenz des ADH1 Promoter erweitert, um das Expressionslevel des finalen Fusionskonstruktes zu erhöhen. Der so modifizierte Vektor wurde anstelle des im *MatchMaker-Y2H*-System enthaltenen pGBKT7-Vektors als *Bait*-Vektor verwendet. Der pBAC-Vektor bietet die Möglichkeit, eine cDNA zwischen die zweite Kopie des ADH1 Promotors und die DNA-Bindedomäne zu klonieren und damit eine C-terminale Fusion der GAL4-DNA-Bindedomäne an die CDS eines Proteins von Interesse zu erhalten.

Um eine Vielzahl an Klonierungen von *Prey*-Konstrukten gleichzeitig durchführen zu können, wurden *Gateway*-kompatible *Y2H*-Vektoren für N- und C-terminale BD- und AD-Fusionen von Jürgen Haas und Peter Uetz (Karlsruhe Institute of Technology) angefragt. Entsprechende Vektorkarten der beiden *Prey*-Vektoren pGADT7g und pGADCg sind in Abbildung 2-1 dargestellt.

2. Material

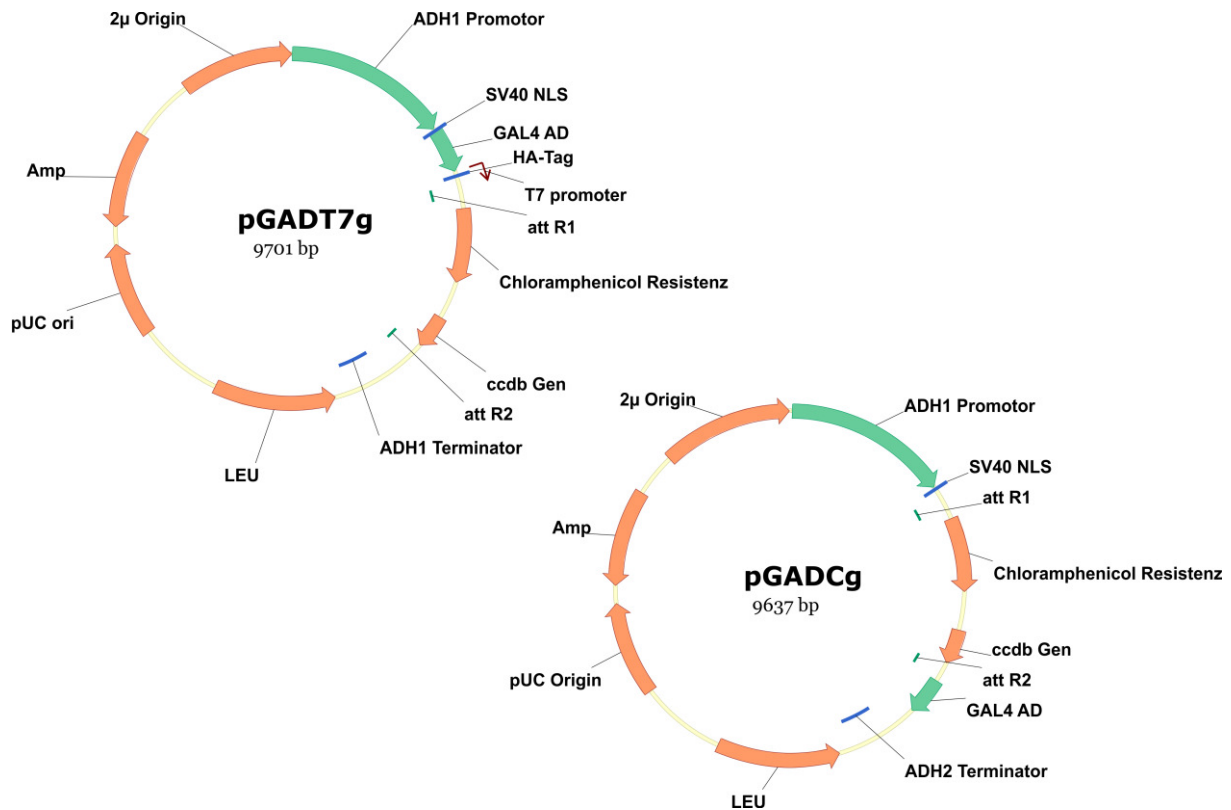


Abbildung 2-1: Karten der *Gateway Y2H-Destinationsvektoren* pGADT7g (Uetz & Grigoriev, 2005) und pGADCg (Stellberger *et al.*, 2010) für die Herstellung von N- bzw. C-terminalen ADg-Fusionen

2.5 Oligonukleotide

Tabelle 2-2: Oligonukleotide für Klonierungs- und *Y2H-Screening-Zwecke*

Name	Sequenz	Zweck
ALL7-->	TTAATTAAATGTCGACCACCAAGTTGGC	FW <i>Primer</i> für Klonierung C-terminale PHY4-BD-Fusion PacI <i>Header</i>
ALL34 -->	CATATGATGGAGAGGCCAAGAGCC	FW <i>Primer</i> für Klonierung phot2 in pGADT7 NdeI <i>Header</i>
ALL35 <--	CTCGAGTTAGAAGAGGTCAATGTCCAAGTCC	RV <i>Primer</i> für Klonierung phot2 in pGADT7 XhoI <i>Header</i>
ALL36 -->	GAATTCATGGAACCAACAGAAAAACCATCGAC	FW <i>Primer</i> für Klonierung phot1 in pGAD 2.Versuch EcoRI <i>Header</i>
ALL37 <--	GGATCCCTAAAAACATTGTGTTGCAGATCTTCTAG	RV <i>Primer</i> für Klonierung von phot1 in pGAD 2.Versuch BamHI <i>Header</i>
ALL41 -->	CACCATGGTGACACTAACACCATCT	<i>Blunt</i> PKS1 FW <i>Primer</i> für Klonierung von <i>Entry</i> -Klonen in pENTRD TOPO
ALL42 <--	CTACTGACTATAAGAAGAGATGATT	<i>Blunt</i> PKS1 RV <i>Primer</i> für Klonierung von <i>Entry</i> -Klonen in pENTRD TOPO
ALL51 -->	AAAAAGCAGGCTTGATGTGTGCATTCTTCTCC	(HIP2) GW FW <i>Primer</i> mit Teil der attB <i>Site</i> für BP-Klonierung in pDONR Vektoren
ALL52 <-- ohne Stopp	AGAAAGCTGGGTTCCGAGAGCCATCTC	(HIP2) GW RV <i>Primer</i> mit Teil der attB <i>Site</i> für BP-Klonierung in pDONR Vektoren
ALL52 <-- mit Stopp	AGAAAGCTGGGTTTACGCCAGAGCCATCTC	(HIP2) GW RV <i>Primer</i> mit Teil der attB <i>Site</i> für BP-Klonierung in pDONR Vektoren

2. Material

ALL75-->	AAAAAGCAGGCTTGATGGTTAACCCAGGGTATTC	Cyclophilin GW FW <i>Primer</i> mit attB1-Adapter für 2-Schritt PCR
ALL76 <-- mit Stopp	AGAAAGCTGGGTTCTACAACTGTCCGCAGTCAG	Cyclophilin GW RV <i>Primer</i> mit attB2-Adapter für 2-Schritt PCR
ALL76 <-- ohne Stopp	AGAAAGCTGGGTTCAACTGTCCGCAGTCAGC	Cyclophilin GW RV <i>Primer</i> mit attB2-Adapter für 2-Schritt PCR
ALL86-->	AAAAAGCAGGCTTGATGGAACCAACAGAAAAACC	phot1 GW FW <i>Primer</i> mit attB1-Adapter für 2-Schritt PCR
ALL87 <-- mit Stopp	AGAAAGCTGGGTTCTATGCAAAAATAATGGGATTATCG	phot1 N-Terminus GW RV <i>Primer</i> mit attB2-Adapter für 2-Schritt PCR
ALL87 <-- ohne Stopp	AGAAAGCTGGGTTTGCAAAAATAATGGGATTATCG	phot1 N-Terminus GW RV <i>Primer</i> mit attB2-Adapter für 2-Schritt PCR
ALL88 -->	AAAAAGCAGGCTTGCTGATAGTTCTTGAGCTCAC	phot1 C-Terminus GW FW <i>Primer</i> mit attB1-Adapter für 2-Schritt PCR
ALL89 <-- mit Stopp	AGAAAGCTGGGTTCTAAAAACATTTGTTGCAGATC	phot1 C-Terminus GW RV <i>Primer</i> mit attB2-Adapter für 2-Schritt PCR
ALL89 <-- ohne Stopp	AGAAAGCTGGGTTAAAAACATTTGTTGCAGATCTTC	phot1 C-Terminus GW RV <i>Primer</i> mit attB2-Adapter für 2-Schritt PCR
ALL93 -->	AAAAAGCAGGCTTGATGTCTGACGACGAGCAC	eIF-5A GW FW <i>Primer</i> mit attB1-Adapter für 2-Schritt PCR
ALL94 <-- mit Stopp	AGAAAGCTGGGTTTAGTTGTTCTGCCGC	eIF-5A GW RV <i>Primer</i> mit attB2-Adapter für 2-Schritt PCR
ALL94 <-- ohne Stopp	AGAAAGCTGGGTTGTTGTTCTGCCGCC	eIF-5A GW RV <i>Primer</i> mit attB2-Adapter für 2-Schritt PCR
ALL95 -->	AAAAAGCAGGCTTGATGGAAGGGCAGTCTGAAG	Kelch-Repeat Protein GW FW <i>Primer</i> mit attB1-Adapter für 2-Schritt PCR für längeres Genmodell am 5' Ende
ALL96 -->	ATGGCAGACGGCGACAACAAT	TP53- <i>regulating</i> Kinase GW FW <i>Primer</i> mit attB1-Adapter für 2-Schritt PCR
ALL97 <-- mit Stopp	TTAGCCAACCATGACTCGCTTTC	TP53- <i>regulating</i> Kinase GW RV <i>Primer</i> mit attB2-Adapter für 2-Schritt PCR
ALL97 <-- ohne Stopp	GCCAACCATGACTCGCTTCTTC	TP53- <i>regulating</i> Kinase GW RV <i>Primer</i> mit attB2-Adapter für 2-Schritt PCR
ALL98 -->	ATGACGGAGCTACGAGAGG	14-3-3-Protein GW FW <i>Primer</i> mit attB1-Adapter für 2-Schritt PCR
ALL99 <-- mit Stopp	CTAGTGGTCATCAGCATCTTC	14-3-3-Protein GW RV <i>Primer</i> mit attB2-Adapter für 2-Schritt PCR
ALL99 <-- ohne Stopp	GTGGTCATCAGCATCTTCGAC	14-3-3-Protein GW RV <i>Primer</i> mit attB2-Adapter für 2-Schritt PCR
ALL102 -->	ATGAAGAAGACTACGTGTTCAAG	unbekanntes Protein/HIP11 GW FW <i>Primer</i> mit attB1-Adapter für 2-Schritt PCR
ALL103 <-- mit Stopp	TTAGACGTATTCAATTGTGTCGCTC	unbekanntes Protein/HIP11 GW RV <i>Primer</i> mit attB2-Adapter für 2-Schritt PCR
ALL103 <-- ohne Stopp	GACGTATTCAATTGTGTCGCTC	unbekanntes Protein/HIP11 GW RV <i>Primer</i> mit attB2-Adapter für 2-Schritt PCR
ALL105 -->	ATGGAGCCGACTCTCCCTG	F-Box- <i>interacting</i> /Kelch-Protein GW FW <i>Primer</i> mit attB1-Adapter für 2-Schritt PCR

2. Material

ALL106 <-- mit Stopp	CTACACCGAGATCAGCAAACCTG	F-Box- <i>interacting</i> /Kelch-Protein GW RV <i>Primer</i> mit attB2-Adapter für 2-Schritt PCR
ALL106 <-- ohne Stopp	CACCGAGATCAGCAAACCTGG	F-Box- <i>interacting</i> /Kelch-Protein GW RV <i>Primer</i> mit attB2-Adapter für 2-Schritt PCR
KJ 062 -->	CTATTCGATGATGAAGATACCCAC	3'AD <i>Insert Screening</i> FW <i>Primer</i>
KJ 063 <--	GTGAACCTGCGGGGTTTTTCAGTAT	pGAD <i>Insert Screening</i> RV <i>Primer</i>
KJ 068 <--	TTAATTAATCTCACACTGCCTGCATCATCT	Volllängen PHY4 RV-Primer PacI- <i>Header</i> für Klonierung in pBAC
KJ 069 <--	TTAATTAAGCCCTGGAGCTTTAAGTCGTT	PHY4-N-Terminus RV- <i>Primer</i> PacI- <i>Header</i> für Klonierung in pBAC
KJ 076 -->	TAATACGACTCACTATAGGG	<i>Y2H</i> -pGADT7 FW Sequenzier- <i>Primer</i> (T7 Promotor)
KJ 077 <--	AGATGGTGCACGATGCACAG	<i>Y2H</i> -pGADT7 RV Sequenzier- <i>Primer</i> (ADH1 Terminator)
KJ 080 <--	AATGCTTTTATATCCTGTAAAG	GAL4 BD Sequenzier- <i>Primer</i>
KJ 144 -->	ATGGGTAAGGAGAAGGTGCAC	EF1 α GW FW <i>Primer</i> für Klonierung in pCR8/GW/TOPO
KJ 145 <-- mit Stopp	CTACCACTTCTTCTTCGCAGC	EF1 α GW RV <i>Primer</i> für Klonierung in pCR8/GW/TOPO
KJ 146 <-- ohne Stopp	CCACTTCTTCTTCGCAGCGG	EF1 α GW RV <i>Primer</i> für Klonierung in pCR8/GW/TOPO
KJ 148 <--	TTATGGTGTGGACTGGGCCTTG	Pirin GW RV <i>Primer</i> für Klonierung in pCR8/GW/TOPO
KJ 149 <-- ohne Stopp	TGGTGTGGACTGGGCCTTG	Pirin GW RV <i>Primer</i> für Klonierung in pCR8/GW/TOPO
KJ 153 -->	ATGGTGGAAAAGAATGCATCTAGG	PLP GW FW <i>Primer</i> für Klonierung in pCR8/GW/TOPO
KJ 155 <-- ohne Stopp	GGAGCTCCACGGGTATCC	PLP GW RV <i>Primer</i> für Klonierung in pCR8/GW/TOPO
KJ 193b-->	ATGTTTTCCGCTTGCTCT	Pirin GW FW <i>Primer</i> für Klonierung in pCR8/GW/TOPO für neues Genmodell
KJ 195 -->	GCGGCCGCTATGGTGACACTAACACCA	PKS1 FW <i>Primer</i> mit NotI <i>Header</i> für Klonierung in phyA pBRIDGE
KJ 196 <--	GCGGCCGCTACTGACTATAAAGAAGAGAT	PKS1 RV <i>Primer</i> mit NotI <i>Header</i> für Klonierung in phyA pBRIDGE
KJ 197 -->	GCGGCCGCTATGTGGAATCTGAGAGC	NPH3 FW <i>Primer</i> mit NotI <i>Header</i> für Klonierung in phyA pBRIDGE
KJ 198 <--	GCGGCCGCTATGAAATTGAGTTCCTCCAT	NPH3 RV <i>Primer</i> mit NotI <i>Header</i> für Klonierung in phyA pBRIDGE
EG41	TATGATTGCATTAAATAGTGCA	ALPHY4 FW <i>Primer</i>
JR 58 <-- mit Stopp	AAGTCGACCTACTTGTGTGCTGCAGCGAGTCCG	phyA RV <i>Primer</i> mit SalI <i>Header</i> für Klonierung in pGBKT7
MZ199 -->	CATATGTCAGGCTCTAGCCGACTCAG	phyA FW <i>Primer</i> mit NdeI <i>Header</i> für Klonierung in pGBKT7
MZ 450 -->	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT	Adapter- <i>Primer</i> für GW attB1- <i>Site</i> PCR-Produkte
MZ 451 <--	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT	Adapter- <i>Primer</i> für GW attB2- <i>Site</i> PCR-Produkte

2.6 Feinchemikalien

Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Acrylamid 4K Lsg., 30%

Agar Kobe

Ammoniumsulfat

Ammoniumacetat

Ammoniumpersulfat

Ampicillin

BCIP

Borsäure

Bromphenolblau

BSA

Calciumchlorid

Calciumnitrat

Cefotaxim

Chlorophorm

Coomassie R250

Dinatriumhydrogenphosphat

DTT

EDTA

Essigsäure

Ethanol

Formaldehyd

Formamid

Glukose Monohydrat

Glycerol

Glycin

Hefeextrakt

Isoamylalkohol

Isopropanol

Kaliumacetat

Kaliumdihydrogenphosphat

Kaliumhydroxid

Kanamycinsulfat

L-Leucin

L-Tryptophan

Lithiumacetat (LiAc)

Lithiumchlorid

Magnesiumchlorid

Magnesiumsulfat

β-Mercaptoethanol

MES

Methanol techn.

Natriumchlorid

Natriumhydroxid

NBT

Nickelchloridhexahydrat

PEG 6000

PEG 8000

Phenol

TEMED

Tetrazyklin

Tris

Trypton

X-β-Gal

BD-Biosciences; New Jersey, USA

Difco-Nitrogen Base without Aminoacids

BIO 101, Inc., Vista, Kalifornien, USA

LB

Biosynth AG, Staad, Schweiz

X-α-Gal

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,

Deutschland

BCIP

Kaliumchlorid

Magnesiumsulfat

D-Mannitol

Natrimacetat

Natriumhydroxyd

SDS

Triton X100

Clontech Laboratories Inc., Kalifornien, USA

DO-Supplements

Fisher Scientific Chemicals UK limited,

Loughborough, Leics., UK

Diammoniumtartrat

Dikaliumhydrogenphosphat

Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz

Aluminium Kalium Sulfat Dodekahydrat

PEG 8000

2. Material

Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA

Salmon sperm-carrier DNA
Oligonukleotide

Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, New Jersey, USA (J.T. Baker)

Ethanol
Methanol für die HPLC

Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Adenin-Hemisulfat
Agar
Ammoniumacetat
Ammoniumnitrat
Ammoniumsulfat
Borsäure
Cobaltchlorid Hexahydrat
DMSO
Eisensulfat
EDTA
Isoamylalkohol
Kaliumbromid
Kaliumchlorid
Kaliumdihydrogenphosphat
Kaliumhydroxyd
Kaliumiodid
Kaliumnitrat
Kupfersulfat Pentahydrat
Natriumchlorid
Natriummolybdat Dihydrat
Salzsäure
Zinnchloriddihydrat

MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
LB Medium

New England Biolabs Inc., Beverly, USA

1 kb DNA-Marker
100 bp DNA *Ladder*
Restriktionsenzyme und -puffer

PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland jetzt VWR

Agarose
Nukleotide (dNTPs)
PEG 3550

SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelbergg Deutschland

Dimethylformamid
Tween 20

Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

3-AT (3-Amino-1,2,4-triazol)
Agar
Agarose
Eisencitrat
Ethidiumbromid
Manganchloridtetrahydrat
ONPG (o-nitrophenyl β -D-galactopyranoside; Sigma Cat No. N-1127)
PEG 3350
Spermidin
Zinksulfat

Ultrapure & Industrial Services, LLC, Dallas, Texas, USA

Ammoniumpersulfat

2.7 Pflanzenanzucht

Langtag-Bedingungen: 16 h Licht / 8 h Dunkelheit (Licht: Osram Typ L58 W / 77, 50 $\mu\text{mol} / \text{m}^2 \text{ s}$). 21 °C Lufttemperatur, 23 % rel. Luftfeuchte

2.8 LED-Belichtungsanlagen

Kingbright Cluster/52 mm LED-Scheinwerfer Rot (660 nm), Conrad Elektronik SE, Hirschau, Deutschland

High Power LED Array LED660-66-60 Rot (660 nm) TO-66, Roithner Lasertechnik, Wien, Österreich

High Power LED Array LED740-66-60 Dunkelrot (740 nm) Roithner LaserTechnik GmbH Wien, Österreich

465 nm *LED array*, Luxeon Blue LXHL, Philips Lumileds Lighting, San Jose, CA

2. Material

Labor Netzgerät PS 152 A "Voltcraft", Conrad Elektronik SE, Hirschau, Deutschland, modifiziert.

Labor Netzgerät Voltcraft PS-2403 D, Conrad Elektronik SE, Hirschau, Deutschland

2.9 Spektralphotometer

Agilent 8453 UV-Visible Spektralphotometer inkl. *Photodiode Array* (PDA)-Detektor und Agilent ChemStation-Software (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, Kalifornien, USA) zur Konzentrationsbestimmung von PCB.

Shimadzu UVmini 1240 UV-Vis Spektralphotometer (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)

Bio Spectrometer Basic (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

Nano-Drop zur Quantifizierung von DNA-Lösungen (NanoVue Plus Spectrophotometer von GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK)

2.10 Lumi-Imager

Fusion-SL4 (damals von Peqlab, gehört jetzt zu VWR, Radnor, Pennsylvania, USA)

myECL *Imager* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham MA, USA)

2.11 Makroskop und Mikroskope

Für Licht- und Fluoreszenz-mikroskopische Beobachtungen wurde das automatisierte Epifluoreszenzmikroskop Leica DM6000b sowie das Makroskop Leica Macro Fluo (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) eingesetzt. Digitale Bilder wurden mit beiden Geräten unter Verwendung einer DFX 500 CCD Kamera (Leica) aufgenommen. Folgende Filter wurden im Mikroskop und Makroskop verwendet:

<u>I3-Filterwürfel</u>	(Anregungsfilter: BP 450 - 490; dichromatischer Spiegel: 510; Suppressionsfilter: LP 515)
<u>N3-Filterwürfel</u>	(Anregungsfilter: BP 546/12; dichromatischer Spiegel: 565; Suppressionsfilter: BP 600/40)
<u>YFP-Filterwürfel</u>	(Anregungsfilter: BP 500 / 20; dichromatischer Spiegel: 515; Suppressionsfilter: BP 535 / 30)
<u>GFP-Filterwürfel</u>	(Anregungsfilter: BP 470/40; dichromatischer Spiegel: 500; Suppressionsfilter: BP 525/50)
<u>CFP-Filterwürfel</u>	(Anregungsfilter: BP 436 / 20; dichromatischer Spiegel: 455; Suppressionsfilter: BP 480 / 40)

Für *Split-YFP*-Analysen wurde das konfokale Laser Scanning Mikroskop Leica TCS SP2-AOBS mit folgenden Anregungs- und Detektionsparametern verwendet:

Tabelle 2-3: Anregungs- und Detektionsparameter für die konfokale LASER-*Scanning*-Mikroskopie am Leica TCS SP2-AOBS

Fluorophor	Anregung [nm]	Detektion [nm]	<i>Look Up Table</i>
CFP	458	468-478	Cyan
Chlorophyll	496	675-700	Rot
GFP	488	500-535	Grün
mCherry	543	605-675	Rot
YFP	514	530-560	Gelb
Transmission	488	500-535 555-620 650-750	Grauskala Grauskala Grauskala

3. Methoden

3.1 DNA-Methoden

3.1.1 Agarose-Gelelektrophorese und Färbung von DNA

Standardmäßig wurden 1% (w/v)-Agarosegele durch Suspension von Agarosepulver in 0,5x-TBE-Puffer und Aufkochen in der Mikrowelle hergestellt. Agaroselösungen wurden in Flachbettkammern (Eigenbau) gegossen und mit Proben-Kämmen versehen. Abgekühlte Gele wurden mit 0,5x-TBE-puffer überschichtet. DNA-Proben wurden mit 6x Agarosegel-Ladepuffer versetzt und auf das Gel geladen. Die Elektrophorese fand bei 200 V für ca. 40 min statt. Anschließend wurden die Gele in einem Ethidiumbromidbad für ca. 10 min gefärbt. Nach kurzem Abspülen mit dest. H₂O wurden die Gele auf einem UV-Transilluminator (Fluoreszenzlampe, 312 nm, TCP20M) angeschaut und mit einer Nikon-CCD-Kamera dokumentiert.

3.1.2 Restriktions-Endonuklease-basierte Klonierung von *Y2H*- und *Y3H*-Konstrukten

3.1.2.1 Klonierung der *Physcomitrella* Phytochrom CDS in pBAC

Zur Klonierung der *PHY4*-Volllängen-CDS und der des N-terminalen photosensorischen Moduls in den pBAC *Bait*-Vektor wurden *Primer* mit *PacI* Schnittstellen hergestellt. Hier wurde zur Bestimmung der Länge der N- (und C-) terminalen *phy4*-Hälfte ein *phyB*-Fragment aus Arbeiten von Ni *et al.* (1998) zu Grunde gelegt. Die homologen Aminosäuren innerhalb der *Hinge*-Region zwischen *Arabidopsis phyB* und *Physcomitrella* Phytochrom 4 wurden bestimmt. Daraus ergab sich die N-terminale *PHY4* Hälfte mit einer Länge von 606 Aminosäuren. Als Matrize für die PCRs diente *Physcomitrella* Erststrang-cDNA, die mittels SuperscriptII Reverse Transkriptase und einem Oligo dT *Lock-Docking Primer* von Dr. Katharina Mailliet aus gesamt-RNA hergestellt wurde. PCR-Reaktionen wurden wie unten angegeben angesetzt und durchgeführt.

Reagentien	Menge [Endkonzentration]
H ₂ O	34 µl [ad 50 µl]
5x <i>Phusion</i> Puffer	10 µl [1x]
2,5 mM dNTPs	4 µl [10 nmol]
<i>Template</i> : pKJ27-PHY4#5 fl. [1ng/µl]	1 µl [1 ng]
<i>FW-Primer</i> ALL7	0,25 µl [0,025nmol]
<i>RV-Primer</i> KJ68 (FL) bzw. KJ69 (N)	0,25 µl [0,025nmol]
<i>Phusion</i> Polymerase	0,5 µl [1 <i>Unit</i>]

	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	98	30 sek	
Denaturierung	98	10 sek	
Hybridisierung	66	1 min	
Elongation	72	1 min	30
Finale Elongation	72	10 min	

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mittels eines 1%igen präparativen Agarose-Gels gereinigt und mittels Topoisomerase-Reaktion in den pCR-BluntII-TOPO-Vektor (Invitrogen) ligiert. Die Transformation erfolgte in chemisch kompetente *E. coli* TOP10-Zellen durch Hitzeschock (Hanahan, 1985). Selektion der Transformanten erfolgte auf Kanamycin-haltigen LB-Platten. Putativ positive Klone wurden mittels Kolonie-PCR identifiziert und in 3 ml flüssigem LB+Kanamycin-Medium als Übernachtskultur angeimpft. Die Plasmid-DNA wurde mit dem Qiagen Minipräparations-Kit extrahiert und anschließend durch Restriktionsverdau mit PacI und XmaI analysiert. Die Integrität der Subklone wurde durch Sequenzierung mit M13 FW und M13 RV verifiziert.

Zur Klonierung in pBAC (ein Derivat des pBRIDGE Vektors, Doktorarbeit Jutta Rösler-Dalton) erfolgte die Freisetzung des *Inserts* durch doppelten Restriktionsverdau mit PacI und XmaI. Der pBAC-Vektor wurde durch Restriktionsverdau mit PacI geöffnet und mittels Phosphatase-Reaktion dephosphoryliert, um Selbstligation des geöffneten Vektors zu vermeiden. Vektor und *Inserts* wurden gelgereinigt und im Agarosegel quantifiziert. Die anschließende Ligation erfolgte im Vektor:*Insert*-Verhältnis 1:3 für 7 Stunden bei 14°C. Der gesamte Ligationsansatz wurde mittels Elektroporation in elektrokompetente *E. coli* XL1Blue-Zellen transformiert. Die Selektion erfolgte auf LB-Medium mit Ampicillin. Putativ positive Klone wurden mittels Kolonie-PCR identifiziert. Zur Kontrolle der korrekten Orientierung der *Inserts* wurde nach DNA-Minipräparation ein Restriktionsverdau mit ApaLI durchgeführt. Die Übereinstimmung des Leserasters von Insert und Vektor wurde mittels Sequenzierung verifiziert. Je ein Klon beider Konstrukte wurde für eine DNA-Maxipräparation zunächst in 3 ml LB+Ampicillin und nach Übernachtskultur in 250 ml TB+Ampicillin angeimpft. Die Extraktion erfolgte nach Maniatis mittels alkalischer Lyse und Plasmidreinigung durch PEG. Schließlich wurde die DNA-Konzentration spektralphotometrisch bestimmt und ein ApaLI Testverdau durchgeführt. Die so aufgereinigte DNA wurde für die Transformation in Hefe eingesetzt. Für den *oligo dT-Library Screen* wurde das Vollängenkonstrukt eingesetzt.

3.1.2.2 Klonierung aller anderen *Y2H/Y3H*-Konstrukte

Alle weiteren *Y2H-Bait*-Plasmide wurden ebenfalls durch Subklonierung in pCR-BluntII-TOPO hergestellt. Die *phyA* CDS wurde aus *phyApGAD* amplifiziert und NdeI/SalI in pGBK kloniert, um eine N-terminale BD-Fusion zu erhalten. Die ebenfalls N-terminale BD-Fusion von *phyA* in pBRIDGE wurde hergestellt, indem *phyA* pBRIDGE + FHY1 (von Dr. Jutta Rösler-Dalton) NotI verdaut und das pBRIDGE *phyA*-Fragment gelgereinigt und religiert wurde. *Y3H-Baits* wurden hergestellt, indem die PKS1 und NPH3 CDS aus *Arabidopsis* Columbia- (Nov. 2003 von Andrea Weisert) bzw. aus HY1-cDNA (von Dr. Joel Mailliet für das M-PP-MPP-Praktikum 2011) amplifiziert und in pCR-Blunt kloniert wurde. Die PKS1 und NPH3 CDS wurde mittels NotI-Verdau aus den Subklonen herausgeschnitten und in die zweite *Multiple Cloning Site* von *phyA* pBRIDGE#2 eingefügt. *Prey*-Vektoren mit *Arabidopsis* Phototropinen wurden hergestellt, indem die PHOT1 CDS aus PHOT1pSPYNE und die PHOT2 CDS aus PHOT2pGBT9 (von John Cristie) amplifiziert, subkloniert und EcoRI/BamHI bzw. NdeI/XhoI in pGADT7 kloniert wurden. AD:PKS1 wurde kloniert, indem die PKS1 CDS mit EcoRI aus dem PKS1 pCR-Blunt-Klon#12 (s.o.) herausgeschnitten und in pGADT7 ligiert wurde.

3.1.3 Gateway Klonierungen

Wo es möglich war, wurden Klonierungsarbeiten mit dem *Gateway*-System (Walhout *et al.*, 2000) durchgeführt. Das System basiert auf einem sequenzspezifischen Enzym-katalysierten Rekombinationsmechanismus aus dem Phagen λ (Landy, 1989), wobei die Rekombination

zwischen den sogenannten *attachment (att) Sites* stattfindet: zwischen *attB* und *attP Sites* bzw. zwischen *attL* und *attR Sites*. Der erste Schritt einer solchen Klonierung ist die Herstellung eines *Entry* Klons, wobei die CDS von Interesse von den *attL Sites* flankiert wird. Dabei gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten: entweder man kloniert das DNA Fragment mittels Ligation direkt in einen *Entry* Vektor mit *attL Sites* (z.B. in pENTR von Invitrogen), oder man flankiert das PCR-Produkt mit *attB Sites* (z.B. über eine 2-Schritt-PCR) und führt eine BP-Reaktion mit einem Donor-Vektor (trägt *attP Sites*) durch. Im zweiten Schritt führt man eine LR-Reaktion mit dem *Entry*-Klon und einem beliebigen Destinations-Vektor (trägt *attR Sites*) durch um verschiedene Expressionsklone (mit *attB Sites*) zu erhalten.

3.1.3.1 Herstellung von *Entry*-Klonen

Um Interaktionen von *phy4-Baits* mit putativen **Interaktionspartnern aus dem Holo-phy4:BD- Y2H-Screen** zu verifizieren, mussten alle codierenden DNA-Sequenzen in Volllänge aus *Physcomitrella* cDNA amplifiziert, und in AD-Vektoren kloniert werden. Dazu wurde das wahrscheinlichste Cosmos-Genmodell auf Basis von EST-Daten und der eigenen Sequenzdaten ausgewählt.

Zur Herstellung der *Entry*-Klone wurden die FL CDS aus *Physcomitrella* cDNA aus 6 d alten Filamenten aus Langtags-Bedingungen (von Dr. Daniela Liebsch damals am MPI Köln) amplifiziert und mittels einer Zweischritt-PCR mit *attB Sites* versehen. Hierzu wurden genspezifische *Primer* mit folgenden *Headern* versehen:

attB1 Primerheader mit zwei extra Nukleotiden für Erhaltung des Leserasters in N-terminalen Fusionen: AAAAAGCAGGCTTG

attB2 Primerheader mit einem extra Nukleotid für Erhaltung des Leserasters in C-terminalen Fusionen: AGAAAGCTGGGT

In der Regel wurden *Reverse-Primer* mit Stoppcodon für N-Terminale Fusionen und ohne Stoppcodon für C-terminale Fusionen hergestellt. Mit 10 pmol dieser *Primer* und 2 µl (ca. 50 ng) cDNA-*Template* wurde im ersten Schritt eine 50 µl PCR Reaktion mit Phusion Polymerase angesetzt.

	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	2 min	
Denaturierung	94	15 sek	
Hybridisierung	58-62	30 sek	
Elongation	72	30 sek / kb	10
Finale Elongation	72	2 min	

Im zweiten Schritt der PCR wurden die *attB Sites* mittels Adapter-*Primern* komplettiert.

MZ450: *attB1 Primer* G GGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC T

MZ451: *attB2 Primer* GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT

10 µl der PCR-Produkte aus Schritt 1 wurde als *Template* einer weiteren 50 µl Reaktion mit 40 pmol jedes Adapter-*Primers* eingesetzt.

3. Methoden

	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	1 min	
Denaturierung	94	15 sek	
Hybridisierung	45	30 sek	
Elongation	72	30 sek / kb	5
Denaturierung	94	15 sek	
Hybridisierung	55	30 sek	
Elongation	72	30 sek / kb	
Finale Elongation	72	2 min	17

Die so entstandenen PCR-Produkte tragen somit die folgenden *Header* mit den kompletten attB *Sites*:

5' attB1 *Header*: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTG

3' attB2 *Header*: AACCCAGCTTCTTGACAAAGTGGTCCCC

Die PCR-Produkte wurden anschließend gelgereinigt und mittels BP Reaktion in pDONR207 (Invitrogen) rekombiniert. Die BP Reaktionen ergaben jeweils einen *Entry*-Klon mit Stopp Codon und je einen ohne.

Entry-Klone mit und ohne Stoppcodon für die TP53-regulierende Kinase, das F-box/kelch-, das 14-3-3- und das Protein mit unbekannter Funktion wurden mittels TaKaRa-Taq-Amplifikation aus *Physcomitrella* cDNA (ebenfalls von Dr. Daniela Liebsch) und TA-Ligation in pCR8 GW TOPO nach Herstellerangaben hergestellt. Dies geschah im Rahmen der BSc-Arbeiten von Fabian Sahl bzw. Natalie Kempel unter meiner Aufsicht. Leider war es in diesem Rahmen nicht möglich, einen fehlerfreien *Entry*-Klon der TP53-regulierenden Kinase ohne Stoppcodon herzustellen. Auch wenn später noch zwei fehlerfreie *Entry*-Klone hergestellt wurden, wurden *Y2H*- und Lokalisationsanalysen mit Expressionsklonen durchgeführt, die aus dem fehlerhaften *Entry* resultierten. Dieser (#4) trägt eine *Missense*-Mutation (V77A).

Analog zu dieser Klonierung wurden auch neue *Entry*-Klone für **putative Partner aus dem Apo-BD:phy4- Y2H-Screen** (s. 3.4.1, Doktorarbeit Mailliet 2012) hergestellt. Im Fall vom Pirin legten neue EST-Daten in der Cosmoss-Datenbank einen alternativen Beginn der CDS nahe (53 Aminosäuren mehr). Bei den ursprünglichen EF1 α -*Entry*-Klonen lagen sehr viele Abweichungen zum Genmodell vor, wobei es sich vermutlich um ein enges Homolog des eigentlich vorgesehenen EF1 α handelte. Somit wurden neue *Entry*-Klone mit und ohne Stoppcodon in pCR8 GW TOPO hergestellt. Auch der PLP *Entry*-Klon ohne Stoppcodon wurde erneut angefertigt, da der vorherige Punktmutationen enthielt.

Entry-Klone des **phot1-N-Terminus** (AS1-492) **und C-Terminus** (493-996, s. Endo *et al.* (2013)) wurden hergestellt, indem entsprechende Bereiche jeweils mit oder ohne Stoppcodon aus pAL28 phot1pGAD amplifiziert und, wie oben beschrieben, mit attB-*Headern* versehen wurden. Resultierende attB-flankierte PCR-Produkte wurden anschließend mittels BP-Reaktion in pDONR207 rekombiniert. Für die BP-Reaktionen wurde der Invitrogen BP-Clonase II-Mix als halber Ansatz nach Herstellerangaben angewendet. *Entry*-Klone wurden verwendet, um N- bzw. C-terminale ADg-Fusionen an phot1 N und phot1 C (in pGADg bzw. pGADCg) per LR-Reaktion herzustellen.

PKS1-*Entry*-Klone mit und ohne Stoppcodon wurden hergestellt, indem die CDS aus PKS1 pCR-Blunt-Klon#12 amplifiziert wurde und PCR-Produkte nach Herstellerangaben in pENTRD TOPO kloniert wurden.

Für die Herstellung der ***Entry*-Klone für Co-IP-Experimente** infolge von *Agrobacterium*-Transfektion und Expression von HA:phy4 und myc:phot-Fusionen in Tabak wurden zunächst phot -Expressionsklone von Dr. Mailliet herangezogen. Der Grund dafür war, dass die von ihr hergestellten *Entry*-Klone in pCR8 GW TOPO den gleichen Selektionsmarker tragen, wie die binären pGWB Destinations-Vektoren (Nakagawa *et al.*, 2007). Eine LR-Reaktion kann zwar in normalem Umfang stattfinden, aber die Selektion auf Spectinomycinplatten favorisiert sowohl die gewünschten Expressionsklone, als auch nicht-rekombinierte *Entry*-Klone. Die Aussicht auf Erfolg bei dieser Herangehensweise ist eher gering. Daher wurden neue phot-*Entry*-Klone hergestellt, indem die pKJ148 2x35S::CFP:photA1-, photA2- photB1 und photB2-Expressionsklone mit NaeI+SacI (phot A1 und B1) bzw. NaeI (photA2 und B2) geschnitten und in einer BP-Reaktion mit dem pDONR221 Donor-Vektor kombiniert wurden. Für die BP-Reaktionen wurde der Invitrogen BP-Clonase II-Mix als halber Ansatz nach Herstellerangaben angewendet.

3.1.3.2 Herstellung von Expressionsklonen für Y2H

Aufgrund der großen Anzahl putativer Partner wurde nach einer Möglichkeit gesucht, die Klone möglichst gleichzeitig in größerer Menge zu bearbeiten. Hierzu wurden *Gateway*-kompatible Y2H-Destinations-Vektoren von Uetz and Grigoriev (2005) und von Stellberger und Mitarbeitern herangezogen (Stellberger *et al.*, 2010). Diese Arbeitsgruppen haben die konventionellen Clontech pGADT7 und pGBKT7 Vektoren zunächst durch Einfügen der Invitrogen *Conversion System Cassette B* (für Leseraster 2) in die SmaI-Schnittstellen beider Vektoren modifiziert. Zudem enthält der pGBKT7g eine verkürzte Version des ADH1 Promoters. Diese Vektoren wurden dann umklont, indem die *Gateway*-RfB Kasette (für Leseraster 2) so eingefügt wurde, dass C-terminale Fusionen mit BD und AD ermöglicht werden (*Genebank Accession Numbers* FJ696409 bzw. FJ696408). Der HA-Tag in pGADCG wurde dabei auf 7 AS verkürzt und ist somit womöglich für eine Expressionsanalyse nicht verwendbar. Zudem ist in diesen Vektoren der T7 Promoter dem AD-Konstrukt nachgeschaltet, so dass dieser nicht für *in vitro* Transkription/Translation verwendet werden kann. Alle Vektoren wurden freundlicherweise von Peter Uetz (Forschungszentrum Karlsruhe) und Jürgen Haas (Ludwigs-Universität München) zur Verfügung gestellt.

Um die Funktionalität der *Gateway-Prey*-Vektoren zu verifizieren, wurden zunächst LR-Reaktionen von PHOTB1 pCR8 GW TOPO-*Entry*-Klonen (Dr. Mailliet) mit pGADg- bzw. pGADCG-Destinationsvektoren durchgeführt.

Zur Herstellung von Y2HAD:- bzw. :AD-Expressionsklonen putativer phy4-Interaktionspartner wurden LR Reaktionen mit den hergestellten *Entry*-Klonen und den pGADg- bzw. pGADCG-Destinationsvektoren durchgeführt. Dazu wurde der LR Clonase II Mix von Invitrogen nach Hersteller-Angaben angewendet. In der Regel wurden die Reaktionsansätze und somit auch die einzusetzende Menge des Destinationsvektors auf 75 ng halbiert. Diese Menge wurde in fmol umgerechnet, um die äquimolare Menge des jeweiligen *Entry*-Klons für den jeweiligen Destinationsvektor zu erhalten. Diese Stoffmenge wurde anschließend in Nanogramm *Entry*

umgerechnet und für die LR Reaktion eingesetzt. Für die Rechnung wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Stoffmenge Destination [fmol]} = \frac{\text{Masse Destination [75 ng]}}{\text{Länge Destination [bp]}} \cdot \frac{\text{fmol}}{660\text{fg}} \cdot \frac{10^6\text{fg}}{1\text{ng}}$$

$$\text{Masse Entry [ng]} = \text{Stoffmenge Destination [fmol]} \cdot \text{Länge Entry [bp]} \cdot \frac{660\text{fg}}{\text{fmol}} \cdot \frac{1\text{ng}}{10^6\text{fg}}$$

Die Integrität der Expressionsklone wurde per Restriktionsverdau und ggf. Sequenzierung bestätigt. So wurden auch alle ADg; und :ADg-Fusionen wie zum Beispiel auch C-terminale ADg-Fusionen von putativen phy4-Interaktionspartnern aus dem Apo-BD:phy4- *Y2H-Screen* oder von C- und N-terminalen ADg-Fusionen an phot1-Hälften hergestellt.

Als Negativkontrolle für die Interaktionsuntersuchung mit C-terminal fusionierten *Preys* sollte ein leerer :AD-Fusionsvektor mit Phy4- *Baits* kombiniert werden. Der unveränderte pGADCg-Destinationsvektor eignet sich nicht dafür, da das Leseraster durch die *Gateway*-Kassette unterbrochen und somit keine AD exprimiert wird. Somit musste die *Gateway*-Kassette (mit Chloramphenicol-Resistenz und dem ccdB Gen *etc.*) durch Rekombination entfernt werden. Es wurde ein myc-*Entry* Klon von Dr. Jutta Rösler-Dalton herangezogen und durch LR Reaktion in pGADCg kloniert. Damit wurde die *Gateway*-Kassette durch den kurzen myc *Tag* ersetzt, so dass die AD mit dem SV40 NLS im gleichen Leseraster vorlag und somit in Hefe exprimiert werden konnte.

3.1.3.3 Herstellung von Expressionsklonen für Lokalisationsstudien

Zur Herstellung von Fluoreszenzprotein-Fusionen wurden von Dr. Katharina Mailliet modifizierte Destinationsvektoren von Karimi *et al.* (2002) verwendet (s. 2.4). Sie ermöglichen *in planta* Expression von N- und C-terminalen GFP- bzw. CFP-Fusionen zur Untersuchung von intrazellulären Lokalisationen. Die Original-Vektoren wurden so umklont, dass sie einen doppelten 35S-Promoter und einen TL-Enhancer aus dem pSAT6-mCherry-VirD2-NLS-Konstrukt (Citovsky *et al.*, 2006) tragen, um die Expressionsstärke in *Physcomitrella* zu erhöhen. Codierende Sequenzen aller ausgewählten putativen phy4-Interaktionspartner wurden mittels LR-Reaktion, wie oben beschrieben, in diese umklonten Destinationsvektoren hinein rekombiniert. Meist wurden N- und C-terminale CFP-Fusionen (Partner aus Holo-phy4:BD-*Screen*) oder GFP-Fusionen (EF1 α , Pirin und PLP aus dem Apo-BD:phy4-*Screen*) hergestellt. Zusätzlich zu Partner-FP-Fusionen wurde auch ein phy4:GFP-Konstrukt für eventuelle Kolokalisationsstudien hergestellt. Dazu wurde eine LR-Reaktion eines *PHY4* pCR8GWTOPO-*Entry*-Vektors von Dr. Katharina Mailliet mit p2x35S 2GWF 7,0 durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden zum einen die Destinationsvektoren für N-terminale Fusionen verwendet, da eine Expression des Fluoreszenz-Proteins stattfinden kann. Für C-terminale Fusionen wurde zum anderen die *Gateway*-Kassette im Destinationsvektor analog zu 3.1.3.2 mittels LR-Reaktion durch einen myc-*Tag* ersetzt, so dass myc:GFP bzw. myc:CFP-Fusionen exprimiert werden konnten.

3.1.3.4 Herstellung von Expressionsklonen für *Split-YFP*

Split-YFP-Expressionsklone für die Untersuchung von *in vivo* Interaktionen von phy4 mit putativen Interaktionspartnern wurden per LR Reaktion von *Entry*-Klonen mit Destinationsvektoren der pSAT-Serie hergestellt. Vier Destinationsvektoren ermöglichen N- bzw. C-terminale Fusionen von YFP N- (pSAT4-DEST, pSAT4a-DEST) oder C-Termini (pSAT5-DEST, pSAT5a-DEST) an codierende Sequenzen (Citovsky *et al.*, 2006). Diese Vektoren tragen

einen doppelten 35S-Promoter und *Enhancer*. In *Split-YFP*-Experimenten mit putativen Partnern aus dem Holo-BD:phy4-*Screen* sollte zumeist phy4:YFP_N (pSAT4a) bzw. YFP_N:phy4 (pSAT4) mit verschiedenen YFP_C: und :YFP_C (pSAT5 / pSAT5a)-Expressionsklonen kombiniert werden. Bei putativen Partnern aus dem Apo-BD:phy4-*Screen* waren die YFP-*Tags* meist umgekehrt (YFP_C am phy4 und YFP_N an putativen Partnern). Bei der Auswahl der Fusionsreihenfolge von YFP-Hälften an die codierende Sequenz von putativen Phytochrom 4-Interaktionspartnern wurde diejenige Konformation bevorzugt, die im *Y2H-Assay* positiv war. Als Negativkontrollen dienten die entsprechenden Fusionskonstrukte von putativen Interaktionspartnern in Kombination mit YFP_C: bzw. myc:YFP_C (also ohne phy4). Myc:YFP_N und myc:YFP_C wurden hergestellt, indem LR-Reaktionen von MYC pENTR (s.o.) mit pSAT4a bzw. pSAT5a durchgeführt wurden.

Auf diese Weise wurden auch LR-Reaktionen von PKS1(ohne Stopp)pENTR D TOPO mit pSAT4a bzw. 5a und von PKS1(mit Stopp)pENTR D TOPO mit pSAT4 bzw. pSAT5 durchgeführt, um PKS1:YFP_N/ PKS1:YFP_C bzw. YFP_N:PKS1 / YFP_C:PKS1 zu erhalten.

3.1.3.5 Herstellung von Expressionsklonen für Co-IP

HA:phy4 wurde hergestellt, indem der PHY4 pCR8 GW TOPO-*Entry*-Klon von Dr. Mailliet mit BglI+NheI verdaut, und das gelgereinigte Fragment in einer LR-Reaktion mit dem binären pGWB415-Destinations-Vektor kombiniert wurde (Nakagawa *et al.*, 2007). Für die Anfertigung der myc:photA1,A2, B1 und -B2 Expressionsklone wurden die in 3.1.3.1 hergestellten phot-*Entry*-Klone in einer LR-Reaktion mit pGWB421 kombiniert (Nakagawa *et al.*, 2007). Resultat dieser LR-Reaktionen waren Expressionsklone mit 3x HA- bzw. 10x myc-*Tag* am N-Terminus von phy4 bzw. der vier *Physcomitrella* Phototropine.

3.1.4 DNA-Präparation aus *E. coli*

Plasmid-DNA Minipräparationen wurden der Anleitung des QIAprep Spin Miniprep Kits (QIAGEN) folgend durchgeführt. Die Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA wurde entsprechend der Anleitung nach Sambrook and Russel (2001) durchgeführt. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde spektralphotometrisch über die optische Dichte bei 260 nm (OD₂₆₀) bestimmt. Integrität der Plasmid-DNA-Konstrukte wurde mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung verifiziert.

3.1.5 DNA-Präparation aus Hefe

Gesamt-DNA aus Hefe beispielsweise zur Identifikation putativer Interaktionspartner nach *Y2H*-Analysen folgendermaßen durchgeführt: 5ml üN-Kulturen in (*D*)SD Medium angezogen, durch Zentrifugation geerntet, mit Wasser gewaschen und in 500 µl Lysepuffer durch Vortexen resuspendiert. Zum Aufbrechen der Zellen wurden Glasperlen (0,45 – 0,5 mm) bis ca. 2 mm unterhalb des Flüssigkeitsmeniskus hinzugegeben und mit einer *Mixermill* bei Maximalgeschwindigkeit für 30 s homogenisiert. Es wurden 25 µl 5 M NaCl hinzugegeben und die Homogenisation wiederholt. Durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 2 min wurde Schaum reduziert und anschließend die Flüssigkeit vom Eppiboden beginnend abgesaugt. Es folgt eine Phenolaufreinigung durch Mischen mit 400 µl Phenol, Mischen durch Vortexen und Zentrifugation bei 13000 rpm für 4 min. Die Oberphase wurde anschließend mit 400 µl Phenol:Chlorophorm (4:1) versetzt und wie oben zentrifugiert. DNA wird durch Zugabe von eiskaltem 95 %igen Ethanol gefällt, 6 min zentrifugiert und das Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wird das Pellet auf einem Heizblock getrocknet und in 30 µl H₂O gelöst.

3.2 Bakterien-Methoden

3.2.1 Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen

XL1blue wurde aus dem Glycerol-*Stock* auf LB + Tetracyclin ausgestrichen und bei 37°C ü.N. inkubiert. 3 ml LB Tetracyclin (5 mg/ml) wurden als Über-Nacht-Kultur mit einer einzelnen Kolonie beimpft. 1 ml der Kultur wurden in 500 ml TB + Tetracyclin überführt und ü.N. bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde die Kultur weiter bei 18°C und 160 rpm inkubiert, bis eine OD600 von 0,4 erreicht war. Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5000 *g* geerntet, zwei Mal mit eiskaltem sterilem Wasser gewaschen und in 800 µl steriler, eiskalter 7 % DMSO-Lösung resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden 100 µl-Aliquots angefertigt, die in flüssigem Stickstoff Schock-gefroren und bei -80°C bis zum Gebrauch aufbewahrt wurden. Die Kompetenz der Zellen wurde mittels Transformation mit 1 ng pUC19-DNA bestimmt und ergab i.d.R. 1×10^8 bis 1×10^9 Kolonien / µg DNA.

3.2.2 Bakterientransformation

Bakterientransformationen erfolgten zum einen mit chemisch kompetenten Zellen TOP10-Zellen nach Hanahan *et al.* (1985), zum anderen mittels Elektroporation in elektrokompente XL1Blue oder TOP10 Zellen. *E. coli*-Aliquots wurden bei -80°C gelagert und unmittelbar vor Transformationsbeginn auf Eis aufgetaut. Die zu transfizierende Plasmid-DNA wurde in beiden Protokollen vorsichtig mit der Bakteriensuspension vermischt. Chemisch kompetente Zellen wurden nach Inkubation auf Eis (30 min) durch Hitzeschock (45 sec bei 42°C) transformiert. Nach Abkühlen auf Eis erfolgte eine Inkubation in 500 µl SOC-Medium bei 37°C und 190 rpm für eine Stunde. Elektrisch kompetente Zellen wurden in eine vorgekühlte Elektroporations-Küvette überführt und mit 1550 V (21 µF, 400 Ω) transformiert. Anschließend wurden die Zellen in 500 µl LB+MgSO₄-Medium inkubiert. Transformierte Zellen wurden mittels Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten selektiert. Positive Klone wurden zur DNA-Minipreparation ü.N. in 3 ml LB mit Antibiotikum angezogen.

Agrobacterium wurde analog zur *E. coli* Transfektion nach einem Elektroporationsprotokoll transfiziert. Binäre phy- phot- und PKS1-Expressions-Pasmide wurden einzeln in ABI eingebracht, während pBIN P19 (Voinnet *et al.*, 2003) – ein Plasmid das die Tomatenzwergbuschvirus-Protein P19-CDS trägt – in GV3101 transfiziert wurde. Dies sollte bei Co-Expression mit den anderen Konstrukten der Unterdrückung von post-transkriptionellem *Gene-Silencing* dienen. *Agrobacterium*-Zellen wurden analog zur *E-coli*-Transfektion mit DNA gemischt und in Küvetten überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 1550 V / 21 µF / 200 Ω. Anschließend wurden die Zellen mit 450 µl LB MgSO₄ versetzt und eine Stunde bei 30 °C geschüttelt. Die Selektion der transformierten ABI-Zellen erfolgte auf LB Kanamycin + Chloramphenicol + Spectinomycin und die der GV3101 Zellen auf LB Kanamycin + Rifampicin + Gentamycin bei 30°C für 2-3 Tage.

3.3 Hefe-Methoden

3.3.1 Das MatchMaker Hefe-Zwei-Hybrid-System

Das Hefe-Zwei-Hybrid System (englisch: *yeast-2-hybrid*, *Y2H*) ist eine Methode zur Identifikation und Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen (Fields & Song, 1989). Durch rekombinante Expression eines Proteins von Interesse können unbekannte Interaktionspartner aus einer cDNA-Bibliothek identifiziert, mutmaßliche Interaktionspartner

bestätigt oder andere Aspekte einer bereits bekannten Wechselwirkung untersucht werden. Das Prinzip des *Y2H* beruht auf der molekularen Rekonstitution eines Transkriptionsfaktors. Ein Transkriptionsfaktor setzt sich aus zwei verschiedenen Strukturmotiven zusammen: aus einer DNA-Bindedomäne (DNA-BD) und einer Transkriptions-Aktivierungsdomäne (AD). Beide Domänen können auf Sequenzebene voneinander getrennt und als translationale Fusionen mit anderen Proteinen in Hefezellen exprimiert werden. Im Falle einer Interaktion zweier Proteine werden Binde- und Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors in räumliche Nähe gebracht. Diese räumliche Annäherung ist ausreichend, um den funktionalen Transkriptionsfaktor wieder herzustellen. Der aktive Transkriptionsfaktor führt zur Expression eines Reportergens, welches zur Synthese einer Aminosäure (AS) führt, die es den Hefezellen ermöglicht, auf Selektionsmedium zu wachsen, welches diese Aminosäure nicht enthält. Der hierfür verwendete Hefestamm ist auxotroph für diese Aminosäure und ist somit selbst nicht in der Lage, die Aminosäure zu synthetisieren. Darüber hinaus besitzt der Stamm den zu rekonstituierenden Transkriptionsfaktor nicht, damit es ohne Interaktion nicht zur Reportergen-Expression kommen kann.

In dem hier verwendeten *MatchMaker*-System von Clontech handelt es sich konkret um den GAL4-Transkriptionsfaktor. Dieser bindet an die Gal1 *Upstream Activating Sequence* (UAS, ein Bestandteil des Promotors) und initiiert als Folge einer Interaktion die Transkription des *HIS3*-Gens. Im Falle einer Protein-Interaktion erlangen transformierte Hefezellen damit die Kompetenz zurück, selbst Histidin synthetisieren zu können und damit auf Histidin-freiem Selektionsmedium zu wachsen. Das *MatchMaker*-System enthält verschiedene Expressionsvektoren: pGBKT7 (im Folgenden pGBK) für das Köderprotein (*Bait*) und pGADT7 (im Folgenden pGAD) für das Beuteprotein (*Prey*) bzw. eine cDNA-Bibliothek. Der pBRIDGE Vektor (Clontech) ist zusätzlicher Vektor für *Y3H*-Analysen, da er nicht nur eine N-terminale Fusion der BD an eine CDS codiert, sondern auch die Expression eines *Bridge*-Proteins unter der Kontrolle eines Methionin-responsiven Promoters ermöglicht. Dr. Jutta Rösler-Dalton hat diesen Vektor so modifiziert, dass auch C-terminale Fusionen der BD möglich sind (s. 2.4). All diese Vektoren kodieren nach Klonierung der cDNAs die translationalen Fusionsproteine. Alle Vektoren tragen je einen Marker zur Selektion in *Escherichia coli* (*E. coli*; Trp für pGBK; alle Anderen Amp) und zusätzlich je einen Marker (Leucin für *Prey*-Vektoren bzw. Tryptophan für *Bait*-Vektoren) zur Selektion transformierter Hefezellen auf Aminosäure-defizienten Medien (s. Tabelle 3-1).

3.3.2 Arbeiten mit dem *MatchMaker* Hefe-Zwei-Hybrid-System

Selektion nach Transformation der *Bait*- bzw. *Prey*-Vektoren in Hefe erfolgt auf *Synthetic Dropout* (SD)-Medien, die Glukose, eine Stickstoffstoffquelle und ein *Dropout* (DO) *Supplement* (= Aminosäuren und Nukleoside) enthalten. Bestimmte Aminosäuren sind je nach Selektion in dem *DO-Supplement* nicht enthalten. Für die Selektion einer einfachen Transformation für das *Bait*- bzw. das *Prey*-Plasmid -Tryptophan (Trp) bzw. -Leucin (Leu) *Single-Synthetic-Dropout* (SSD) verwendet. Die Selektion für das Vorhandensein beider Plasmide in doppelt transformierten Hefezellen erfolgt auf -Trp/-Leu *Double-Synthetic-Dropout* (DSD). Auf dem -Trp/-Leu/-Histidin (His) *Triple-Synthetic-Dropout*-Medium (TSD) kann schließlich für doppelte Transformanden selektiert werden, die durch Protein-Interaktion den Transkriptionsfaktor GAL4 wieder herstellen und so die Möglichkeit zur Histidin- Synthese wiedererlangen. Ein weiteres GAL4-responsives Reportergen unter der Kontrolle des GAL2-Promotors ist das *ADE2*-Gen, welches Enzyme zur Adeninsynthese kodiert. Zur Erhöhung der Selektionsstringenz kann daher -Trp/-Leu/-His/-Ade *Quadruple-*

3. Methoden

Synthetic-Dropout (QSD) eingesetzt werden. Abwesenheit des GAL4-Transkriptionsfaktors führt auf Adenin-Mangel-Medium dazu, dass ein rotes Stoffwechsel-Intermediat akkumuliert und sich Kolonien ohne Protein-Interaktion rot färben. Tritt eine Interaktion auf, komplementiert der *ADE2*-Marker den *ade2-101* Phänotyp und die Kolonien bleiben weiß.

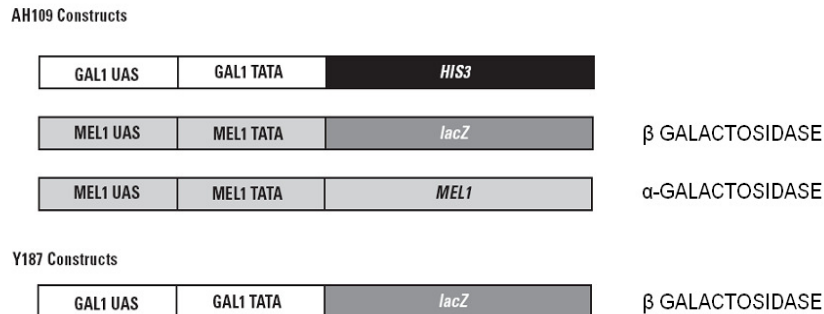


Abbildung 3-1: Reportergene in AH109 und Y187 werden durch verschiedene GAL4-responsive Promotoren kontrolliert (aus: *MatchMaker Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manual*)

Im Falle einer Interaktion werden im Hefe-Reporterstamm AH109 zusätzlich zu *HIS3* und *ADE2* auch *lacZ* und *MEL1* exprimiert. Deren Genprodukte (α- und β-Galaktosidase) können die Substrate X-β-Gal bzw. X-α-Gal umsetzen was zur Bildung eines blauen Indigofarbstoffs führt. Beide Gene befinden sich unter der Kontrolle des *MEL1*-Promotors (vgl. Abbildung 3-1), welcher ebenfalls von GAL4 gebunden wird. Durch Zugabe von X-α-Gal im *SD*-Medium kann daher Blaufärbung der Hefekolonien und des umgebenden Mediums als weiterer Selektionsmarker eingesetzt werden, da die α-Galaktosidase im Gegensatz zur β-Galaktosidase in den periplasmatischen Raum und das Medium sekretiert wird. Der Reporterstamm Y187 kann für Hefe*Mating* in Kombination mit AH109 eingesetzt werden (s. 3.3.7) und eignet sich zudem für die Analyse der Interaktionsstärke zweier Proteine mittels Flüssig-ONPG-*Assay*, welches auf spektralphotometrischer Messung der *lacZ*-Expressionsstärke basiert.

Für den Hefestamm AH109 ist bekannt, dass er gehäuft zur Ausbildung falsch positiver Klone neigt. Der dazugehörige Phänotyp wird als „*His-leaky*“ bezeichnet, da auch ohne Protein-Protein-Interaktion die Expression des *HIS3*-Gens initiiert wird. Dies kann durch bestimmte Eigenschaften von DNA-Bindedomäne-Fusionsproteinen ausgelöst werden, so dass diese allein transkriptionsaktivierend wirken können. In diesem Fall wäre es Hefezellen auch ohne eine spezifische Protein-Interaktion möglich, auf Histidin-freiem Medium zu wachsen. Dies manifestiert sich als Hintergrund-Wachstum auf -Trp/-His-*SD*- bzw. in Kombination mit dem leeren *Prey*-Vektor auf -Trp/-Leu/-His-*TSD*-Platten. Mögliche Autoaktivierung der Reportergene kann mit Hilfe eines kompetitiven Inhibitors des *HIS3*-Proteins gelöst werden. Der Inhibitor 3-AT (3-Amino-1,2,4-triazol) blockiert das *HIS3*-Genprodukt und Histidin kann letztlich nicht synthetisiert werden. Um auf der einen Seite das Wachstum falsch positiver Klone zu vermeiden, die Sensitivität des Systems jedoch nicht zu stark einzuschränken, ist es notwendig, die Konzentration des Inhibitors so gering wie möglich einzustellen. Tabelle 3-1 stellt eine Übersicht über in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Medien mit den im Folgenden verwendeten Abkürzungen und die durch das jeweilige Medium erzielte Selektion dar.

Tabelle 3-1: Übersicht über eingesetzte Medien, Zusätze und die daraus resultierende Selektion

Abkürzung	Bedeutung	Selektion
<i>DSD</i>	-Trp/-Leu <i>DSD</i>	Aufnahme von <i>Bait</i> - und <i>Prey</i> -Plasmid
<i>TSD</i>	-Trp/-Leu/-His <i>TSD</i>	Plasmidaufnahme, <i>HIS3</i> -Expression
<i>QSD</i>	-Trp/-Leu/-His/-Ade <i>QSD</i>	Plasmidaufnahme, <i>HIS3</i> - und <i>ADE2</i> -Expression
+ 3-AT	mit 3-Amino-Triazol	Kompetitive Inhibition des <i>HIS3</i> -Genprodukts
+ X- α -Gal	mit 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-galatopyranosid	<i>MEL1</i> -Expression

3.3.3 Hefe-Einzeltransformation

Einzeltransformationen beispielsweise vom *Bait*-Konstrukt PHY4 FL pBAC (PHY4:BD) sowohl in AH109 als auch in Y187 wurde nach Gietz and Woods (2002) durchgeführt. Das angewendete Protokoll basiert auf einer Lithiumacetat/*single-stranded carrier* DNA/Polyethylenglycol- (LiAc/ss-DNA/PEG) Transformation mit anschließendem Hitzeschock. Bei einer einfachen Transformation wurden zunächst 25 ml YPDA-Medium in einem Schikanekolben mit frischem Zellmaterial (nicht älter als 6 Wochen) beimpft und über Nacht bei 30°C und 200 rpm angezogen. Die Zellzahl wurde mittels einer Zählkammer bestimmt. Aus der ü.N.-Kultur wurden $2,5 \cdot 10^8$ Zellen zur Inokulation der 50 ml Expansions-Kultur entnommen. Die Expansionskultur wurde in YPDA wie oben inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,8 - 1,0 erreicht war (ca. 3-5 h nach Inokulation). Dies entspricht der mittleren bis späten Log-Phase der Subkultur. 50 ml Transformations-Kultur sind ausreichend für 10 Transformations-Ansätze und enthalten mehr als $2 \cdot 10^7$ Zellen/ml. Die Zellen wurden bei 3000 g für 5 Minuten und RT pelletiert und anschließend mit 25 ml sterilem Wasser gewaschen. Hiernach wurden die Zellen in 1 ml sterilem Wasser aufgenommen, in ein Eppendorf-Gefäß überführt, nochmals sedimentiert und das Volumen mit Wasser auf einen Milliliter aufgefüllt. 100 μ l Aliquots (ca. $1 \cdot 10^8$ Zellen) der Zellsuspension wurden pro Transformation eingesetzt. Nach erneuter Zentrifugation wurden 360 μ l Transformationsmix gemäß Abschnitt 2.2.4 hinzugegeben. Pro Reaktion wurde 500 ng - 1 μ g Plasmid-DNA transformiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 30 Minuten unter mehrfachem Invertieren ca. alle 5 bis 7 min. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet zuletzt in 1 ml H₂O aufgenommen. Verschiedene Verdünnungen der Zellen wurden auf den entsprechenden SSD-Medien ausplattiert und 4 Tage bei 30°C inkubiert. Mit einzeln transformierten Hefeklonen erfolgten Analysen hinsichtlich *HIS3*-Reporter-gen-Autoaktivierung und im Fall von *Bait*-Vektoren möglicherweise notwendige Einstellung der 3-AT Konzentration auf -Trp/-His-*Synthetic Dropout*-Medium.

3.3.4 Hefe-Doppeltransformation

Die sequentielle Doppeltransformation basiert prinzipiell auf derselben Methode wie Einzeltransformationen. Diese Methode ist besonders angepasst, um eine hohe Transformations-Effizienz bei einer Doppeltransformation zu erreichen (Agatep *et al.*, 1998). Das Protokoll wurde sowohl bei einer sequenziellen, als auch bei einer simultanen Transformation mit zwei Plasmiden angewendet. Die in unterschiedlichen Maßstäben durchgeführten sequentiellen Doppeltransformationen unterschieden sich hinsichtlich der Volumina der ü.N.-Kultur und der Transformationskultur, des Volumens an eingesetztem 100 mM LiAc, der Hitzeschockdauer und des finalen Resuspensionsvolumens in sterilem H₂O. Eine Übersicht über die für einen zehnfachen Ansatz eingesetzten Volumina sind in Tabelle 3-2 dargestellt.

Tabelle 3-2: Übersicht über Transformationsansätze einer sequenziellen Doppeltransformation

	10x
Volumen an SSD-Medium für ü.N.-Kultur	25 ml
Zellzahl für 50 ml YPDA-Transformationskultur	$2,5 \cdot 10^8$
Volumen an 100 mM LiAc	3 ml
Hitzeschock-Dauer	30 min
Resuspensionsvolumen H ₂ O	1 ml

Um den Selektionsdruck auf dem zuvor transformierten Plasmid zu erhalten, wurden die zu transformierenden Hefezellen in dem entsprechenden SSD-Medium ü.N. angezogen. Eine simultane Transformation wurde untransformierte Hefe ü.N. in YPDA angezogen. Zur Herstellung der Transformations-Kultur wurden anschließend $2,5 \cdot 10^8$ Zellen zur Herstellung einer 50 ml Transformations-Kultur entnommen, bei 3000 *g* 5 min in einem 50 ml Reaktionsgefäß pelletiert, in einem finalen Volumen von 50 ml YPDA resuspendiert und in einen Schikanekolben überführt. Die Kultur wurde anschließend, wie oben beschrieben inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,8 erreicht wurde. Die Zellen wurden dann mit dem halben Volumen an sterilem Wasser gewaschen und 15 min in 100 mM sterilem LiAc bei 30°C inkubiert (3 ml für 10x-Ansatz). Nach Entfernung des LiAc durch Zentrifugation wurden die Zellpellets mit 360 µl Transformationsmix versetzt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation im Transformationsansatz bei 30°C. Anschließend wurde der Hitzeschock bei 42°C wie oben beschrieben durchgeführt. Das Ausplattieren erfolgte wie beschrieben auf geeigneten Selektionsmedien. In den meisten Fällen wurden je 100µl auf -Trp/-Leu *DSD* und auf -Trp/-Leu/-His *TSD* ausgestrichen. Von allen einzeln und doppelt transformierten Hefen wurden Glycerol-*Stocks* im entsprechenden SD-Medium zur dauerhaften Aufbewahrung bei -80°C angefertigt.

3.3.5 Untersuchung der Reporter-Autoaktivierung durch *Bait*-Expression

Um mögliche Autoaktivierungen zu untersuchen, wurden zum einen *Bait*-Konstrukte einzeln transformiert und auf -Trp/-His-SD-Platten ausgestrichen. Zum anderen wurden *Bait*-Konstrukte und der leere *Prey*-Vektor pGADT7 sequenziell oder simultan in AH109 transformiert oder durch *Mating* in Hefe eingebracht und auf -Trp/-Leu/-His-*TSD*-Medium ausgestrichen. Wenn trotz eines fehlenden Interaktionspartners Wachstum auftritt, bedeutet dies, dass die Expression des BD-Fusionsproteins alleine oder in Kombination mit AD: zu Reportergenexpression führt. In einem solchen Fall kann man entweder BD- und AD-*Tags* tauschen, Hefe*Mating* (s. 3.3.7) versuchen, oder man muss 3-AT als kompetitiven Inhibitor des *HIS3*-Genproduktes einsetzen (s. 3.3.2). Hierzu stellt man *TSD*-Platten mit 3-AT-Konzentrationen z.B. zwischen 0 mM und 5 mM in 0,25- oder 0,5-mM-Schritten her und plattiert darauf in einem quantitativen Ansatz je 8×10^6 doppelt transformierte/diploide Zellen aus. Für alle weiteren *Y2H* Experimente wählt man diejenige 3-AT-Konzentration aus, auf der gerade keine Kolonien mehr wachsen. Somit stellen *Bait*-Konstrukte in Kombination mit leeren *Prey*-Vektoren (pGADT7) oder myc:AD (pGADCg; s.o.) Negativkontrollen für Enzym- und Wachstums-*Assays* dar.

3.3.6 Y2H Positivkontrollen

Um die Funktionalität des *MatchMaker* Systems zu bestätigen, wurden zum einen die System-internen Kontrollen durchgeführt (Interaktion von dem Tumorsuppressor-

Genprodukt p53 mit dem SV40 großem T-Antigen). Zum anderen wurde nach einer internen Positivkontrolle in Kombination mit den verschiedenen phy4-*Baits* gesucht. Da zuvor keine Interaktionspartner von phy4 beschrieben wurden, wurde die Dimerisierungs-Eigenschaft von Phytochrom selbst herangezogen. Hierzu wurde phy4:BD bzw. BD:phy4 mit AD:phy4 kombiniert und als starke konstitutive Positivkontrolle in Enzym- und Wachstums-*Assays* eingesetzt. Als externe Positivkontrolle wurde AH109 phyA:BD/BD:phyA + AD:FHY1 (mit 0,5 - 1 mM 3-AT) eingesetzt. Hiltbrunner *et al.* (2005) konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass die Aufnahme von PCB aus dem Medium und autokatalytische Assemblierung in Hefe prinzipiell funktionieren muss, denn nur so ist eine Rotlicht-abhängige Interaktion zwischen *Arabidopsis thaliana* phyA:DNA-BD und AD:FHY1 überhaupt möglich. Ohne den PCB-Chromophor hingegen kann die phyA-FHY1-Interaktion nicht stattfinden und keine Reporter-gen-Expression initiiert werden, so dass die Hefen nicht auf einem entsprechenden Selektionsmedium wachsen können. Die Lichtabhängigkeit der Interaktion konnte dadurch belegt werden, dass PCB-komplementierte Hefe in Dunkelheit ebenfalls nicht in der Lage war, zu wachsen (Hiltbrunner *et al.*, 2005). Eine Interaktion zwischen phyA und FHY1 findet demnach nur statt, wenn der Chromophor an phyA gebunden ist (also Holophytochrom vorliegt), und das Phytochrom durch R-Bestrahlung die Pfr-Konformation eingenommen hat (s. Einleitung). Somit kann gezeigt werden, dass die Aufnahme des PCB-Chromophors aus dem Medium in Hefe erfolgreich war.

3.3.7 Einfaches *Mating*-Protokoll zum Interaktionstest

Als Alternative zu einer Doppeltransformation kann auch Hefe-*Mating* eingesetzt werden. Bei Y187 handelt es sich um einen im Vergleich zu AH109 genotypisch ähnlichen Stamm, mit dem Unterschied des *Mating*-Typs so dass Y187 (mat α) gemeinsam mit AH109 (mat a) eingesetzt werden kann, um zwei Vektoren mittels *Mating* in eine Hefezelle einzubringen (s.u.). Hierzu benötigt man einzeln transformierte Hefe beider Hefestämme auf frischen Selektionsplatten, von denen man Zellmaterial von etwa der Größe eines halben Pfefferkorns abnimmt und in 50 μ l YPDA durch Vortexen resuspendiert. Diese sehr dichte Zellsuspension wurde anschließend in 10 μ l-Tropfen auf kleine YPDA-Platten aufgebracht und für 3-6 h bei 30°C inkubiert. Dabei können die haploiden Hefezellen durch zelluläre und nukleäre Fusion diploide Zellen bilden. Nach dem *Mating* wurden die Zellen in drei Mal mit je 2 ml sterilem Wasser mittels eines Glas-Drigalski-Spatels von den Platten herunter gewaschen und in einem 15 ml Falcon gesammelt. Anschließend wurden die Zellen pelletiert, der Überstand entfernt und das Pellet in 500 μ l sterilem Wasser resuspendiert. Von dieser Suspension wurden je 100 μ l auf *DSD* und *TSD* plattiert.

3.3.8 Quantitatives Hefe-*Mating* zur Effizienzbestimmung

Für einen quantitativen *Mating*-Ansatz wurde einzeln transformierte Hefe beider *Mating*-Typen ü.N. in *SSD* angezogen, quantifiziert und dann in einem definierten Verhältnis gemischt. Das *Pretransformed MatchMaker Libraries User Manual* würde für einen 50 ml Ansatz insgesamt $5,05 \cdot 10^9$ Zellen vorsehen (*Screening*-Maßstab). Nach Herunterskalierung für paarweise *Matings* wurden in einem 7,5 ml Ansatz insgesamt etwa $7,6 \times 10^8$ Zellen eingesetzt. Nach Bestimmung der Zellzahl / ml wurden die Zellen beider *Mating*-Typen in definierten Verhältnissen in einem kleinen Volumen (z.B. 7,5 ml) 2x YPDA angeimpft und in einem großen Kolben ohne Schikane bei 30°C und 40 rpm für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und der Kolben zweifach mit dem Volumen des *Mating*-Ansatzes an 2x YPDA gespült. Die Zellen wurden in einem sterilen 50 ml Reaktionsgefäß gesammelt

und pelletiert (10 min bei 1000g) und anschließend mit 0,5x YPDA auf ein Endvolumen von 20% des Volumens des *Mating*-Ansatzes (z.B. hier 1,5 ml) gebracht. Von dieser sehr dichten Zellsuspension wurden serielle Verdünnungen angefertigt und plattiert: eine 1:100- und 1:1000-Verdünnung wurde auf *DSD* und *TSD* (ggf. +PCB; s.u.) plattiert, um die Anzahl an Diploiden bzw. die Anzahl der Interaktoren bestimmen zu können. Eine 1:10000 Verdünnung wurde jeweils auf –Trp *SSD* und –Leu *SSD* plattiert, um zu bestimmen, ob *Bait*- oder *Prey*-Stamm limitierender Partner im *Mating*-Gemisch war. Die *Mating*-Effizienz berechnet sich wie folgt: $(\text{Anzahl Diploide} / \text{Anzahl limitierender Partner}) \cdot 100 \text{ [\%]}$.

3.3.9 Bestimmung der *Mating*-Effizienz bei verschiedenen *Bait*-*Prey*-Verhältnissen

Um die optimalen *Screening*-Bedingungen für den *Y2H Oligo dT-Library-Mating-Screen* zu bestimmen, wurden Vorexperimente mit unterschiedlichen Mischungs-Verhältnissen von mat a- und mat α -Stamm durchgeführt. Das Clontech Benutzerhandbuch schlägt einen 100fachen Überschuss des mit dem *Bait*-Vektor vortransformierten mat a-Stammes gegenüber des mit der cDNA Bibliothek vortransformierten mat α -Stammes vor. Darüber hinaus weist die Hefeliteratur darauf hin, dass es nicht unerheblich für die *Mating*-Effizienz ist, welcher der beiden *Mating*-Typen im Überschuss eingesetzt wird und ob *Bait*- oder *Prey*-Konstrukte in der jeweiligen Hefe vorliegen. Soellick and Uhrig (2001) beispielsweise konnten zeigen, dass eine maximale Effizienz erreicht wird, wenn das *Bait*-Konstrukt im mat a-Stamm vorliegt und im Überschuss mit dem mat α -Stamm (mit *Prey*-Konstrukt) gemischt wird. Aufgrund der Tatsache, dass die cDNA Bibliothek in der hier vorliegenden Arbeit im mat a Stamm vortransformiert vorlag (s.u.) und nicht sinnvoll ist, die Bibliothek im Überschuss einzusetzen, blieb nur die Möglichkeit, verschiedene Überschüsse des mat α -*Bait*-Stamms zu untersuchen. Dazu wurden AH109 AD:PHY4 Zellen 1:1 und 1:3 mit Y187 PHY4:BD Zellen gemischt und wie in Abschnitt 3.3.7 beschrieben inkubiert, geerntet und plattiert.

3.3.10 Herstellung von Holophytochrom in Hefe durch Zusatz von PCB ins Selektionsmedium

Für die Bereitstellung des Chromophors zur autokatalytischen Assemblierung mit dem in Hefe exprimierten Apophytochrom zu Holophytochrom gibt es prinzipiell verschiedene Möglichkeiten. Die Herstellung von PCB aus Häm in Hefe durch Ko-Expression von Biosyntheseenzymen (Hämoxxygenase und P Φ B-Synthase) ist aufgrund von vermutlich fehlenden Ferredoxin-ähnlichen Elektronendonatoren für die Reduktionsschritte schwierig. Dazu wäre vermutlich eine zusätzliche Lokalisation beider Enzyme innerhalb der Mitochondrien nötig. Dies bedeutet eine zusätzliche Verkomplizierung der Expression. Daher wurde stattdessen PCB dem Medium zugegeben, so dass es von Hefe aufgenommen werden konnte. PCB unterscheidet sich von dem natürlichen Pflanzenphytochrom-Chromophor P Φ B lediglich durch einen Substituent an Ring D (C-18 Ethyl anstatt Vinyl). Hierzu wurden Flüssigmedien mit 20 μ M (Hiltbrunner *et al.*, 2005) und Agar-basierte Medien mit 30 μ M PCB versehen. Aufgrund der Hitze- und Lichtlabilität von PCB in wässrigem Medium, wurden die PCB-Medien stets im Halbdunkel und frisch hergestellt. PCB lag in Methanol gelöst vor und wurde dem Medium nach Autoklavieren und Abkühlen des Mediums in der entsprechenden Menge beigemischt. Die erfolgreiche Aufnahme von PCB aus dem Medium wurde mittels einer genetischen Positivkontrolle überprüft (s. 3.3.6).

3.3.11 Semiquantitatives *Y2H*-Wachstums-Assay in Rc und Rp

Um Protein-Protein-Interaktionen bezüglich ihrer Stärke und Abhängigkeit von verschiedenen Lichtbedingungen zu untersuchen, wurde ein semiquantitatives WachstumsAssay herangezogen. Dazu wurde doppelt transformierte Hefe ü.N. flüssig in -Trp/-Leu-*DSD*-Medium bei 220 rpm und 30 °C angezogen. Nach Ernten der Zellen wurden jeweils $2 \cdot 10^5$ Zellen auf verschiedene Selektionsmedien mit und ohne Chromophor aufgetropft. Selektionsplatten mit 30 µM PCB wurden meist für 5d in verschiedenen Lichtbedingungen oder Dunkelheit (D) inkubiert (s. Tabelle 3-3). Eine technische Weiterentwicklung des Hefe-Wachstums-Assays wurde etabliert, indem PCB-haltige Selektionsplatten mit Lichtpulsen anstelle von kontinuierlichem Licht bestrahlt wurden. Hierdurch kann nachgewiesen werden, ob eine durch einen Rotlichtpuls initiierte Interaktion durch einen Dunkelrotlichtpuls verhindert werden kann. Somit kann eine *Y2H*-Interaktion mit Holophytochrom hinsichtlich ihrer Lichtabhängigkeit untersucht werden. Dieses Assay kann somit eine höhere Aussagekraft bzgl. einer physiologisch relevanten Phytochrom-Wechselwirkung haben, als der Vergleich von Hefewachstum in Rc und FRc.

Tabelle 3-3: Belichtungsregimes in semiquantitativen Hefewachstums-Assays mit Holophytochrom

Bedingung	Wellenlänge [nm]	Fluenzrate [µmol / m ² s]	Dauer [min]	Frequenz
Rc	660	0,8	kontinuierlich	
Rp	660	4	12	1 / h
FRc	740	5	kontinuierlich	
Rp + FRp	660 / 740	4 / 5	12 / 13	1 / h
Bc	465	0,7	kontinuierlich	

3.3.12 *Y3H*-Experimente

Um herauszufinden, ob es sich bei PKS1 oder NPH3 um ein Brückenprotein zwischen phyA und PHOT1 in *Arabidopsis* handelt, wurde ein *Y3H* Ansatz herangezogen. Dafür wurde At.phyA in den ersten ORF und PKS1 in den 2. ORF des Clontech pBRIDGE-Vektors kloniert, wobei die Expression des *Bridge*-Proteins (2. ORF) über die Methionin-Konzentration im Medium reguliert wird. Der Promoter ist Methionin-reprimierbar und eine Repression der Expression kann erreicht werden, indem man dem normalen *SD* Medium 300 mg/l Methionin zufügt. Durch eine Verringerung der Methionin-Konzentration im *DO* Medium ist die Brückenprotein-Expression induzierbar, wofür Clontech *SD*-Mischungen ohne Methionin anbietet. Für die Durchführung eines *Y3H* Experiments unter Methionin-Mangelbedingungen ist es unabdingbar, Hefen für Transformation oder WachstumsAssay durch zwei bis drei Vorselektionsrunden an die Methionin-Mangelbedingungen zu gewöhnen. Wachstums-Assays wurden wie in Absatz 3.3.11 beschrieben durchgeführt. Belichtungen der Platten erfolgte in D, Rc, FRc und Bc. Expression der BD-, AD-Fusionen und Brückenproteine in Hefe wurde per SDS PAGE und WB nach Anzucht in -Trp/-Leu *DSD* mit normaler Methioninkonzentration, ohne Methionin bzw. mit erhöhter Methionin-Konzentration nachgewiesen.

3.3.13 Lichtabhängiges ONPG-*Y2H*-Assay

Um die Interaktionsstärke von *Physcomitrella* Phytochrom 4 und den vier Phototropinen quantitativ zu erfassen, sollte für die Publikation ein ONPG-Assay mit Holophytochrom in

verschiedenen Lichtbedingungen etabliert werden. Das *Assay* beruht auf der GAL4-regulierten Expression von β -Galaktosidase, die durch Protein-Protein-Interaktion der BD- und AD-Fusionsproteine initiiert wird. Zellen, die sich in der mittleren logarithmischen Phase befinden, werden geerntet, aufgeschlossen und mit einem chromogenen Substrat – in diesem Fall ONPG (*o*-nitrophenyl β -D-Galaktopyranosid) versetzt. Die β -Galaktosidase-vermittelte Farbreaktion zu *o*-nitrophenol und D-Galaktose wird nach einer gewissen Zeit spektralphotometrisch quantifiziert und die Miller Einheiten (Miller, 1972; Miller, 1992) berechnet. Eine Miller-Einheit ist definiert als diejenige β -Galaktosidase, die 1 μ mol ONPG pro Minute pro Zelle hydrolysiert. Die Miller-Einheiten berechnen sich wie folgt:

$$\beta\text{-Galaktosidase-Einheiten} = 1000 \times A_{420} / (t \times V \times OD_{600})$$

t = Reaktionszeit [min]

V = 0,1 ml x Konzentrationsfaktor (=5)

OD₆₀₀ = optische Dichte der Expansionskultur vor dem Ernten

Für das Holophytochrom-*Assay* wurde doppelt transformierte Y187-Hefe wurde ü.N. in *DSD*-Medium mit 20 μ M PCB im Dunkeln angezogen. Die OD₆₀₀ der ü.N.-Kulturen wurde nach Vortexen gemessen und mit *DSD* + PCB auf eine OD von 1 verdünnt. Von der Verdünnung wurden je 1,4 ml mit 5,6 ml 2xYPDA + PCB in einem Falcon gemischt und mit folgenden Lichtpulsen bestrahlt: R (660 nm) 5 min bei 20 μ mol / m² s; FR (740 nm) 10 min bei 20 μ mol / m² s; R + FR, B (465 nm) 5 min bei 12 μ mol / m² s und B + FR. Eine Kultur pro Konfiguration wurde in D belassen. Anschließend wurden die Expansionskulturen 3 h in D bei 220 rpm und 30°C inkubiert. Anschließend wurde das ONPG-*Assay* nach den Angaben im *Yeast Protocols Handbook* in grünem Sicherheitslicht durchgeführt: OD₆₀₀ jeder Expansionskultur wurde (nach kräftigem Vortexen) gemessen, je 1,5 ml wurden in je drei Eppis aliquotiert (= technisches Triplikat) und die Zellen anschließend mittels Zentrifugation geerntet (14000 rpm, 30"). Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellen in 1,5 ml Z-Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Pellets in 300 μ l Z-Puffer resuspendiert (= 5-fache Aufkonzentrierung) und je 100 μ l in ein frisches Eppi überführt. Die Zellen wurden durch dreimaliges Schockfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen im 37°C-Wasserbad aufgebrochen. Zu den Suspensionen und zu 100 μ l Z-puffer als Referenz wurden daraufhin 700 μ l Z-Puffer mit β -Mercaptoethanol und dann 160 μ l ONPG-Lösung pipettiert. Die Farbreaktion erfolgte bei 30°C ü.N., wobei die genaue Reaktionsdauer notiert wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 400 μ l 1M Na₂CO₃-Lösung gestoppt, mittels Zentrifugation (14000 rpm, 10 min) klarifiziert und letztlich wurde die Absorption bei 420 nm bestimmt. Pro Kombination wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die Aktivität der Kombination BD: (pGBK) / :AD (pGAD) in der jeweiligen Lichtbedingung wurde als Hintergrundaktivität eingestuft und die dafür berechneten Miller-Einheiten wurden von allen anderen berechneten Werten subtrahiert.

3.4 Y2H-Oligo dT-Library-Screens

3.4.1 Apo-BD:PHY4 Oligo dT-Library-Screen mittels Doppel-Transformation

Der Apo-BD:phy4 *Y2H-Screen* wurde von Dr. Mailliet wie in ihrer Doktorarbeit beschrieben mittels Hefe Doppeltransformation in einem 40x-Maßstab durchgeführt (Jaedicke, 2012). Als *Prey* diente die ebenfalls in dieser Arbeit verwendete in AH109 vortransformierte

Physcomitrella Oligo dT-cDNA Bibliothek von Hans Sommer (MPI Köln). Selektion erfolgte auf *TSD* + 2,5 mM 3-AT für 2 Wochen in D. Positive Klone wurden auf *DSD*, *TSD*+3-AT und *QSD*-Masterplatten überführt. Diese zweite Selektionsrunde überlebten 75 Klone. Nach einem Zymolase-Protokoll wurde DNA aus ü.N-Kulturen extrahiert und für PCR-Analysen mit flankierenden *Primern* eingesetzt. Klone mit unterschiedlich langen PCR-Produkten wurden selektiert und in *E. coli* transformiert und die daraus resultierenden DNA-Minipräparationen wurden mit flankierenden *Primern* sequenziert. Nach Ausmerzen von mehrfach in Hefe vorhandenen Sequenzen blieben 23 Hefeklone mit unterschiedlichen Sequenzen (s. Ermert *et al.* (2016), SI). Diese wurden analog zu 3.4.4 untersucht. Dr. Mailliet hat auf Basis von Datenbank- und Literaturrecherchen vier Kandidaten für weitere Analysen ausgewählt: ein Pirin, ein *P-Loop*-Protein (PLP), PRL1 und den Translations-Elongationsfaktor 1 α (EF1 α). Für die Publikation wurden Experimente zu diesen Kandidaten wieder aufgenommen und nach der Vorgehensweise dieser Arbeit vervollständigt. Dies beinhaltete einige Klonierungsarbeiten beispielsweise, da zuvor ohne die GW-*Y2H*-Vektoren keine C-terminalen AD-Fusionen möglich waren und da sich in der Zwischenzeit Genmodelle geändert hatten (s. 3.1.3.1). Aus neuen Pirin- und EF1 α -*Entry*-Klonen mussten alle nötigen Expressionsklone für *Y2H*-, Lokalisations- und *Split-YFP*-Analysen mittels LR Reaktion angefertigt werden. Dem schloss sich die Untersuchung des *Y2H*-Interaktionsverhaltens mit *phy4-Baits* in gepulstem Licht an (s. 3.3.11). In dieser Arbeit wurden im Vergleich zu Dr. Mailliet's Doktorarbeit auch Lokalisationen und *Split-YFP*-Interaktionen mit C-terminalen FP-Fusionen untersucht (wie in 3.7.5 und 3.7.6 beschrieben), die abgesehen von Pirin und EF1 α auch für PLP (Fluoreszenzfusionen und *Split-YFP*-Konstrukte) und PRL1 (*Split-YFP*-Konstrukte) kloniert werden mussten (s. 3.1.3.3. und 3.1.3.4). *In vivo* Interaktionen von *phy4* mit den vier putativen Partnern wurden sowohl in D, als auch nach R-Vorbehandlung beobachtet und dokumentiert. Ergebnisse dieser Analysen sind in 4.5.1, 4.5.2.1, 4.5.2.3, 4.5.2.5, und 4.5.2.12 dargestellt.

3.4.2 Holo-*phy4*:BD *Y2H*-Oligo dT-cDNA Library-Mating-Screen

Für den *Y2H-Screen* wurde eine 50 ml Y187 *phy4*:BD Kultur in –Trp *SSD* ü.N. angezogen und die Zellzahl bestimmt. Parallel wurde eine AH109 AD:-Kultur in –Leu *SSD* für ein Negativ-Kontroll-*Mating* (s. Ergebnisse Y187 *PHY4*:BD / AH109 AD:) angezogen und in kleinerem Maßstab ebenfalls unter *Screening*-Bedingungen untersucht. Die ü.N. Kulturen wurden geerntet und mit 2xYPDA im Verhältnis 1x *Prey*: 2,3 x *Bait* mit definierter Gesamtzellzahl und Gesamtvolumen in einen Erlenmeyerkolben ohne Schikane gemischt (s. Tabelle 4-2). Dieses Mischungsverhältnis weicht von dem geplanten ab, da die hier angegebene Zahl auf den auf den Selektionsmedien überlebensfähigen Hefekolonien basiert und nicht auf der Anzahl der mikroskopisch quantifizierten Hefezellen vor Ansatz des *Matings*. Die Ansätze wurden 24 h bei 40 rpm und 30°C inkubiert und anschließend durch Zentrifugation geerntet. Der Kolben wurde 2 mal mit 2xYPDA gespült, die Zellen ebenfalls pelletiert und mit den übrigen Zellen vereint. Der *Mating*-Ansatz wurde in 5 ml 0,5xYPDA aufgenommen, gründlich resuspendiert und auf 23 große *TSD* + 0,25 mM 3-AT + PCB + Antibiotika + Lysozym plattiert. Es wurde ein Selektionsmedium mittlerer Stringenz (*HIS3* aber nicht *ADE2* Reporter) gewählt, um auch schwächere oder temporäre Interaktionen identifizieren zu können. Von 100 μ l des *Mating*-Ansatzes wurde eine serielle Verdünnungsreihe hergestellt und auf –Trp bzw. –Leu *SSD*, *DSD* und *TSD* (+/- 0,25 mM 3-AT) zur Bestimmung des limitierenden Partners, der Anzahl an Diploiden und der *Mating*-Effizienz ausgestrichen.

3.4.3 Selektion putativer phy4:BD-Interaktoren

Inkubation der *Screening*-Platten erfolgte für zwei Wochen bei 30°C und 0,7 µmol / m² s R (LED-Scheinwerfer; 660 nm). Nach 1 Woche wurde aufgrund der Temperaturlabilität von PCB mit der PCB-Nachfütterung begonnen. Dazu wurden mit einem sterilen kreisförmigen Bohrer je 2 Löcher in den Agar gestochen und mit insgesamt 1 µmol einer 50%igen PCB-Methanollösung befüllt. Die Prozedur wurde an Tag 11 und 13 wiederholt. *TSD*-Platten wurden nach 15 d aus dem Brutraum entnommen. Anschließend wurden alle putativ positiven Kolonien auf folgende Masterplatten überführt: *DSD* und *TSD* + 3AT + / - PCB. Zusätzlich wurde x-α-Gal zur Selektion auf *MEL1*-Expression hinzugefügt. Inkubation erfolgte 7 d bei 30 °C und im Fall der PCB Platten in R (wie o.A.).

Nach der 2. Selektionsrunde der Diploiden, wurden überlebende putativ positive Klone ü.N. in *DSD* Medium angeimpft, um zum einen Glycerol-*Stocks* und zum anderen DNA-Präparationen aus den Hefekulturen herzustellen. Anschließend erfolgte ein Versuch, der Identifikation von möglichen Duplikaten, indem Klone anhand ihrer PCR-Produktgrößen (unter Verwendung flankierender *Primer* KJ62 / KJ63) sortiert und diese anschließend *MspI* verdaut wurden. *MspI* verfügt über eine kurze Erkennungssequenz (4 Basen) und schneidet somit mit höherer Wahrscheinlichkeit. Da die Verdauemuster nahezu alle unterschiedlich aussahen, wurden alle Hefe-DNAs in *E.coli* transformiert, um die entsprechenden Plasmide zur anschließenden Sequenzierung (bei GATC-Biotech) vervielfältigen zu können. Ein weiterer wichtiger Grund für diese Herangehensweise war, dass ggf. mehrere *Prey*-Plasmide, die in einer Hefe vorlagen, voneinander getrennt werden müssen, denn wenn zwei Plasmide denselben Replikationsursprung besitzen, kann *E. coli* nur eines der Plasmide propagieren. Sowohl der PHY4 pBAC BD-Vektor, als auch der pGAD AD-Vektor enthalten den Ampicillin-Selektionsmarker. Durch Kolonie-PCRs nach *E. coli*-Transformation konnte mittels BD- und AD-Vektor-spezifischen *Primern* (KJ62/KJ63 bzw. EG41/KJ80) gezeigt werden, dass in einem gegebenen *E. coli*-Klon entweder nur der BD- oder der AD-Vektor vorliegen konnte. Sequenzierungen der AD-Vektor-Insertionen erfolgte zumeist aus beiden Richtungen: mit KJ76 als *Forward-Primer* und mit KJ77 als *Reverse-Primer*. Problematische Sequenzierungen wurden z.T. wiederholt, ggf. unter Einsatz eines alternativen Klons, der aus der Transformation mit der gleichen Hefe-DNA stammte. Für diese Sequenzierungen wurde lediglich der *Forward-Primer* verwendet.

3.4.4 *In silico* Analyse putativer phy4-Interaktoren

Die von GATC erhaltenen Sequenzdaten wurden zunächst bereinigt: Sequenzen des Vektorrückgrats und *Poly A-Tails* wurden entfernt und die verbliebenen Sequenzen wurden, wenn möglich, zu *Contigs* zusammengeführt. Bereinigte Sequenzdaten wurden nun *in silico* analysiert, indem sie mit verschiedenen Datenbanken abgeglichen wurden. Zum einen wurden *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST)-Suchen in der *Physcomitrella* Nukleotidsammlung auf NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) und zum anderen in der *Physcomitrella* Datenbank auf Cosmoss (<http://www.cosmoss.org/>) durchgeführt. Suchparameter bei NCBI entsprachen den automatischen Einstellungen zur Suche höchst ähnlicher Sequenzen (*megablast*). Bei Cosmoss wurden DNA-Sequenzen zumeist gegen „*P. patens.all_models_transcripts (435298 mRNAs from all available gene models as of 13.09.2010*“ oder gegen „*V3 models_transcripts*“ abgeglichen. NCBI-Modelle entsprechen bislang Version 1.2 der Annotation und sind nicht auf dem neuesten Stand, wohingegen Cosmoss immer die neuere Annotation bereitstellt (V1.6 zur Zeit der Sequenzanalyse bzw. mittlerweile Version 3 nach kompletter Neu-Zusammenstellung aller *Scaffolds* zu den 27

3. Methoden

Physcomitrella-Chromosomen). Allen Sequenzen konnte ein *Physcomitrella* Gen auf Cosmoss zugeordnet werden. Im häufigen Fall nicht annotierter *Physcomitrella* Gene wurde deren Identität durch Vorhersagen von Proteindomänen (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan> und NCBI CDD (*Conserved-Domains-Database*)) in den entsprechenden Aminosäuresequenzen näher bestimmt. Zusätzlich wurden für alle *Physcomitrella*-Proteine intrazelluläre Lokalisationen vorhergesagt. Dazu wurden 2-3 unterschiedliche Vorhersage-Algorithmen angewendet:

WolfPSORT (<http://www.wolfpsort.org>)

Plant-mPLOC (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/cgi-bin/PlantmPLOC.cgi>)

TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>).

Weitere *Physcomitrella*-Homologe wurden identifiziert, indem Kandidaten AS-Sequenzen auf Cosmoss mit V1.6 und V3.1 Proteinen abgeglichen wurden. Homologe Proteine in *Arabidopsis* oder Viridiplantae wurden mittels BLASTP der *Physcomitrella* AS-Sequenz auf NCBI identifiziert. Der Abgleich erfolgte mit nicht redundanten Proteinsequenzen von *Arabidopsis thaliana* (taxid:3702) oder Viridiplantae (taxid:33090) mit NCBI-BLASTP-Voreinstellungen. *Physcomitrella* und *Arabidopsis* AS-Sequenzen wurden von Cosmoss bzw. NCBI heruntergeladen und mit Vector NTI align (für HIP1-14 s. Ermert *et al.* (2016), für alle Anderen s. Anhang). Anschließend wurden alle putativen Interaktionspartner anhand ihrer möglichen Funktionen / *Gene Ontology* (GO) gruppiert, indem entweder mögliche Funktionen identifizierter Domänen und / oder von Homologen betrachtet wurden. Auf Basis dieser Analysen wurden putative Interaktionspartner für weitere Untersuchungen ausgewählt. Gegebenenfalls wurden diverse *Online*-Vorhersage-Tools zur Identifizierung möglicher NLS (*Nuclear Localization Signal*) oder NES- (*Nuclear Export Signal*) Sequenzen herangezogen:

NLS NucPred (www.sbc.su.se/~maccallr/nucpred/)

SecNLS (mleg.cse.sc.edu/seqNLS)

NLS Mapper (nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi)

NES NetNES server (www.cbs.dtu.dk/services/NetNES)

Darüber hinaus wurden *Microarray*- und RNAseq-Expressionsdaten putativer phy4-Partner von JGI/Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/jbrowse/index.html?data=genomes%2FPpatens&loc>), vom eFP-Browser (http://bar.utoronto.ca/efp_Physcomitrella/cgi-bin/efpWeb.cgi) und von Genevestigator (www.genevestigator.com) heruntergeladen, um auf eventuelle Synexpression und Ko-Regulation mit phy4 schließen zu können. Dazu wurden Expressionsdaten aller Datensätze zum einen paarweise mit denen von phy4 verglichen, indem linear skalierte Daten nach jeweiliger phy4-Expressionsstärke sortiert abgebildet wurden (s. Anhang; Diagramme für HIP1-14 aus Ermert *et al.* (2016)). Von negativen Genevestigator-Perturbationswerten wurde zuvor der negative Reziprokwert berechnet (um die von Genevestigator ausgeführte Operation rückgängig zu machen und die relativen „Originaldaten“ zu erhalten). Zum anderen wurden alle Datensätze für sich mittels *Hierarchical Clustering* unter Verwendung von *ClustVis* (biit.cs.ut.ee/clustvis/) nach Genen und Bedingungen sortiert (mit Manhattan Distanzmaß; s. Anhang Abb.6).

3.4.5 Experimentelle Untersuchung ausgewählter phy4-Interaktoren

Die Sequenzdaten wurden mit dem auf Basis von EST-Daten wahrscheinlichsten Genmodell im *Cosmos Genome Browser* verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass 61 % der untersuchten Klone zwar Vollängen-CDS aber i.d.R. zusätzlich auch Teile von UTRs enthielten. Daher mussten die CDS aller ausgewählten Interaktionspartner in Volllänge aus *Physcomitrella* cDNA (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Daniela Liebsch) amplifiziert werden. PCR-Produkte wurden mit *attB-Sites* versehen und mittels BP-Reaktion in *Gateway Entry*-Vektoren kloniert (s. 3.1.3.1). Nach LR Reaktion mit den Destinations-Vektoren pGADg und pGADCg ergaben sich AD:- bzw. :AD-Expressionsklone (s. 3.1.3), die in Kombination mit *PHY4:BD* oder *BD:PHY4* erneut in Hefe eingebracht wurden (s. 3.3.4), woraus sich für jeden putativen phy4-Interaktionspartner vier zu untersuchende Konformationen ergeben:

BD:phy4 + AD:Partner

BD:phy4 + Partner:AD

phy4: BD + AD:Partner

phy4: BD + Partner:AD

Diese Interaktionen wurden mittels eines quantitativen *Y2H-WachstumsAssays* in verschiedenen Lichtbedingungen - vorzugsweise mit Rotlicht- (Rp) und Dunkelrotlichtpulsen (FRp) (s. 3.3.11) analysiert. Im nächsten Schritt wurde die *in vivo* Lokalisation der Interaktionspartner in unterschiedlichen Lichtbedingungen mittels transienter Expression von Fluoreszenzprotein (FP)-Fusionen mikroskopisch untersucht. Dazu wurden N- und C-terminale FP-Fusionen mit CFP oder GFP mittels *Gateway*-Klonierung (s. 3.1.3.2) hergestellt und mittels PIG (s. 3.7.4.4) in *Physcomitrella* Filamentzellen eingebracht. Letztlich wurde die *in vivo* Interaktion mit phy4 mittels *Split-YFP* und Mikroskopie am Konfokalen Laser-*Scanning*-Mikroskop (KLSM) nachgewiesen (s. 3.7.6).

3.5 Proteinbiochemische-Methoden

3.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

10 % SDS-PAGE Gele wurden gemäß Sambrook and Russel (2001) vorbereitet. Es wurden Mini-PROTEAN 3 Gelkammern (BioRad) verwendet. Für eine Coomassie-Färbung wurden in der Regel 5 µl und für einen *Western Blot* wurden 10 µl einer wie in 3.5.4 vorbereiteten Probe geladen. Die Trennung der Proteine erfolgte bei 100 V für etwa 1,5 h. Im Anschluss erfolgte entweder Coomassie-Färbung der Proteine (s. 3.5.2) oder weitere Analyse der Proteine im *Western Blot* (s.u.).

3.5.2 Färbemethode

Färbung von Proteinen im SDS-PAGE-Gel erfolgte durch kurzes Aufkochen in *Hot Coomassie* Lösung (Mikrowelle, 600 W, 1 min). Nach kurzem Abkühlen wurde das Gel dreifach mittels einer 10% Essigsäurelösung durch Aufkochen und Abkühlen entfärbt, bis die Hintergrundfärbung ausreichend entfernt war. Zugabe eines geknoteten Einweg-Tuches beschleunigt die Entfärbung.

3.5.3 Western Blots

Eine PvDF-Membran (GE) wurde zur Aktivierung in 100 % Methanol überführt. Das SDS-Gel wurde auf einer Schichtung aus (von unten nach oben) aufeinander gelegten jeweils mit

Tankblot-Puffer durchtränkten Lagen bestehend aus einem Schaumstoffschwamm, einem dicken und einem dünnen Filterpapier (Whatman Ltd., UK) platziert. Die aktivierte Membran wurde luftblasenfrei deckungsgleich auf das SDS-Gel gelegt. Die Membran wurde mit derselben Schichtung Filterpapiere und Schaumstoff abgedeckt, ggf. Luftblasen herausgestrichen und die *Tankblot*-Halter-Kassette geschlossen. Der *Tankblot*-Halter wurde anschließend zusammen mit einem Kühlaggregat in die *Tankblot*-Kammer (BioRad) gestellt. Die Kammer wurde komplett mit Tankblot-Puffer aufgefüllt. Der Proteintransfer erfolgte unter permanentem Rühren bei 40 V, 100 mA und 4°C für zwei Stunden oder bei 30V ü.N. Hiernach wurde die Membran für 1 h bei RT in 10 ml Blockierungspuffer abgesättigt, drei mal in 10 ml Waschpuffer gewaschen und anschließend 1h mit dem primären Antikörper (je nach AK mit oder ohne Milchpulver) bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde die Membran 1 h bei RT im sekundären Antikörper (meist Alkaline-Phosphatase-gekoppelter Anti-Maus-Antikörper in Blockierungspuffer) inkubiert. Alle Blockierungs- und Antikörperinkubationsschritte können alternativ auch bei 4°C ü.N. durchgeführt werden. Anschließend wurde die Membran nochmals 3x mit Waschpuffer gewaschen und dann in Detektionspuffer bzw. CDP-Star-Waschpuffer aufgenommen. Die Detektion erfolgte entweder durch NBT/BCIP-Lösung für etwa 10 min (je nach Signalstärke) und Stopp der Reaktion durch Spülen mit dest. H₂O oder alternativ durch Inkubation mit einem chemiluminogenen Substrat (z.B. CDP-Star 1:100) und *Lumi-Imager*. Hierzu wurde eine 1:100-Verdünnung des CDP-Star-Reagenz in zugehörigem Puffer verwendet. Der *Blot* wurde in eine Folientasche gelegt (transparente Autoklavierbeutel, Roth) und ca 600 µl/Blot aufgetropft. Nach 5 min Inkubation wurde die Flüssigkeit herausgestrichen und mit dem Imaging begonnen. Die Detektion schwacher Signale (z.B. in Co-IPs) erforderte i.d.R. Expositionszeiten von ca. 7,5 min.

3.5.4 Hefe-Probenaufbereitung für SDS-PAGE

Die Expression der *Bait*-Fusionsproteine phy4:BD und phy4 N:BD in AH109 und Y187 wurde mittels SDS-PAGE und *Western Blot* untersucht. Dazu wurde etwas Zellmaterial von Transformations-Platten und zusätzlich auch von *YPDA*-Platten mit untransformierter Hefe von beider Reporterstämmen abgenommen, in 25 ml -Trp-*SSD*-Medium (einzeln transformierte Hefe) bzw. *YPDA* (untransformierte Hefe) angeimpft und ü.N. bei 220 rpm und 30°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen bei 3000 *g* (5 min, 4°C) pelletiert, der ÜS entfernt und das Pellet in 50 ml *YPDA* zur Subkultivierung resuspendiert. Die Expansionskulturen wurden wie beschrieben inkubiert, bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5. Anschließend wurde ein geeignetes Kulturvolumen zu einem etwa erbsengroßen Pellet in einer Tischzentrifuge sedimentiert (13000 rpm, 1 min) und in 1 ml kaltem H₂O durch Vortexen resuspendiert. Hiernach wurden die Zellsuspensionen mit 1 ml 0,2 M NaOH versetzt, durch Invertieren gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 13000 rpm wurde das Pellet in 50 µl 2x SLB aufgenommen und 5 min gekocht. Nach nochmaliger Zentrifugation konnte der Überstand zur Proteinauftrennung in einer SDS-PAGE eingesetzt werden.

3.5.5 Proteinextraktionen aus *Nicotiana benthamiana*

3.5.5.1 Für Expressionstest

Zur Überprüfung der Expressionsstärke der HA-, myc-, FLAG-, oder GFP-Fusionsproteine in Tabak wurden Scheiben von etwa 1 cm Durchmesser (~ 50 mg) aus transient transformierten

Tabakblättern mit einem sauberen Korkbohrer herausgetrennt und in ein Eppendorf-Gefäß mit 100 µl 2x SDS-Ladepuffer und einer Metallkugel überführt. Das Blattgewebe wurde mechanisch mit einer *Mixer Mill* (MM300 von Retsch) mit -20°C kalten Halterungen für 3' bei voller Geschwindigkeit aufgebrochen. Proben wurden anschließend sofort im kochenden Wasserbad für 5' inkubiert, kurz abgekühlt und bei 13000 rpm zentrifugiert. 5 µl der Überstände wurden auf ein 10%iges SDS-Gel geladen und Proteine nach SDS-PAGE per *Western Blot* auf eine Membran übertragen. Fusionsproteine wurden mit Antikörpern, die gegen den entsprechenden *Tag* gerichtet sind, detektiert und das Blatt mit der stärksten Expression der gewünschten Fusionsproteine wurde für die Co-IP ausgewählt.

3.5.5.2 Für Co-IP

Proteine wurden aus 2 g Frischgewicht an Blattmaterial extrahiert, indem es in 4 ml eiskaltem Extraktionspuffer gemörsert und das erhaltene Homogenat in 3 kalte Eppendorf-Gefäße überführt wurde. Extrakte wurden für 15' bei 30000g bei 4°C zentrifugiert und resultierende Pellets wurden anschließend in je 800 µl kaltem Extraktionspuffer mit 0,3% Triton-X-100 resuspendiert, um Membranproteine zu solubilisieren. Nach Klarifizierung (50000g, 25') wurden die drei Überstände vereint und je 1 ml als *Input* für eine Immunopräzipitation eingesetzt.

3.5.6 Co-Immunopräzipitation (Co-IP)

Für die Co-Immunopräzipitation von Phytochrom- und Phototropin-Fusionsproteinen wurde je 1 ml des Proteinextraktes aus 3.5.5.2 mit 2 µg an monoklonalem anti-HA-Antikörper (Sigma) versetzt, während eine entsprechende Vergleichsprobe ohne Antikörper belassen wurde. Die Extrakte wurden für 40' in Rc (660 nm, 0,75 µmol/m² s) bei 4°C auf einem Orbitalschüttler mit hoher Inklination inkubiert. Je 40 µl an in Triton-haltigem Extraktionspuffer gewaschenen Protein G-gekoppelten magnetischen *Beads* (NEB) wurden hinzugefügt und der Inkubationsschritt wiederholt. Anschließend wurden die *Beads* vier Mal mit Extraktionspuffer +0,3% Triton-X gewaschen und in 20 µl 2xSDS-Ladepuffer aufgenommen und sofort für 5' gekocht. Ein Drittel bzw. zwei Drittel der IP-Extrakte wurde für einen *Western Blot* für die Detektion der HA:phy- bzw. der myc:phot-Fusionsproteine eingesetzt.

3.6 Extraktion von PCB aus *Spirulina*-Tabletten

Phycocyanobilin (PCB) wurde aus Tabletten getrockneter *Spirulina*-Cyanobakterien (Green Valley) gewonnen. Hierzu wurden 50 g Tabletten in einem Mörser zerkleinert, in 500 ml Cyanopuffer bei RT etwa 5 h lichtdicht unter Rühren gelöst und anschließend mittels Zentrifugation (5000 rpm, 15 min, 4°C) von nicht aufgelösten Zellen und Zelltrümmern befreit. Der dunkelgrüne Überstand wurde mit 70% (w/v) festem Ammoniumsulfat ü.N. bei 4°C lichtdicht gefällt. Gefällte Proteine wurden abzentrifugiert (8000 rpm, 30 min, 4°C), der farblose Überstand verworfen und das erhaltene Pellet mit Hilfe eines Ultrathurrax-Gerätes in je 100 ml kaltem technischen Methanol resuspendiert. Daran schloss sich eine erneute Zentrifugation bei 6000 rpm, 20 min und 4°C an. Der Überstand wurde erneut verworfen (bzw. zum Recycling durch Destillation gesammelt). Dieser Waschschrift wurde im Dunkeln weitere 4 bis 5 Male wiederholt, bis der Überstand sich ausgehend von tief dunkelgrün deutlich ins Gelbliche aufgehellt hatte. Anschließend wurde das Pellet in insgesamt 200 ml für HPLC geeigneten Methanol mittels Ultrathurrax wie oben resuspendiert und ü.N. bei 54°C unter kontinuierlichem Rühren inkubiert (Methanolyse I). Am darauf folgenden Tag wurde die

Methanolyse abzentrifugiert (wie oben) und der tief-blaue Überstand mit Hilfe eines Rotationsverdampfers mit angeschlossener Vakuumpumpe im Dunkeln auf ca. 5 bis 10 ml eingengt. Mit dem Pellet wurde ü.N. eine zweite Methanolyse entsprechend der Methanolyse I gestartet und anschließend ebenfalls auf eine Konzentration von etwa 2 $\mu\text{mol} / \text{m}^2$ s einrotiert. Die Reinheit des Extraktes und die PCB-Konzentration der eingedampften Überstände aus beiden Methanolysen wurde spektralphotometrisch über ein Absorptionsspektrum bzw. die Absorption bei 690 nm bestimmt. Der Absorptionskoeffizient von PCB bei 690 nm beträgt 37,9 $1 / \text{mol} \times \text{cm}$. PCB wurde in Methanol gelöst bei -80°C aufbewahrt und vor Gebrauch sonifiziert.

3.7 Pflanzen-Methoden

3.7.1 *Physcomitrella*-Anzucht und Kulturpflege

Anzucht und Pflege von *Physcomitrella* Protonema-Kulturen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Als Stammkulturen dienten Protonemata auf Agar-basiertem BCE 205 Medium. Zur Produktion größerer Mengen an Filamenten wurden ausgehend hiervon zunächst Filamente auf BCE225-Platten überführt und kultiviert. Davon wurden Flüssigkulturen in ca. 20 ml BCE225-Flüssigmedium in einem 50 ml-Kolben angeimpft. War eine ausreichende Dichte erreicht, wurde die Kultur in einen 500 ml-Kolben mit ca. 150 ml Medium überführt. Insgesamt wurde eine Flüssigkultur über einen Zeitraum von etwa 2 bis maximal 3 Wochen unter permanenter Belüftung unter Langtags-Bedingungen kultiviert. Zwei mal wöchentlich wurde eine Homogenisation mit einem Ultra-Thurax durchgeführt, ggf. Pflanzenmaterial entfernt und durch frisches Medium ersetzt, um das Ausbilden von Gametophoren zu verhindern.

3.7.2 *Nicotiana benthamiana* Anzucht für *Agrobacterium*-Transfektion

Nicotiana benthamiana Samen wurden in ein Vermiculit-Erde-Gemisch ausgesät und unter Langtags-Bedingungen angezogen. Nach ca. 2 Wochen wurden Keimlinge pikiert und für weitere 5-7 Wochen in Einzeltöpfen unter gleichen Bedingungen angezogen.

3.7.3 Transformation von *Nicotiana benthamiana* mit *Agrobacterium tumefaciens*

HA-, myc- und FLAG- / GFP-Fusionskonstrukte mit Phytochrom-, Phototropin- bzw. PKS1-CDS wurden wie in 3.1.3.5 bzw. 3.2.2 hergestellt und in *Agrobacterium* transfiziert. Geeignete ABI-Klone und GV3101 pBIN P19 wurden für >16h in Antibiotika-haltigem Selektionsmedium bei 30 °C angezogen. Kulturen für gewünschte Konformationen (inkl. GV3101 pBIN P19) wurden zu gleichen Zellzahlen in Infiltrationsmedium gemischt, so dass die End-OD 0,3 entsprach. Die Bakteriengemische wurden mit einer 1 ml-Einwegspritze ohne Kanüle durch Andrücken durch die Stomata in die Blattunterseite eingebracht, so dass (wenn möglich) die gesamte Blattspreite durchtränkt war. 3-5 Tage nach Infiltration wurde die Expression der Fusionsproteine mittels Proteinextraktion und *Western Blot* überprüft (s.3.5.5.1) und das beste Blatt für die Co-IP ausgewählt. 5-7 Tage nach Infiltration wurde die Co-IP, wie in 3.5.5.2 und 3.5.6 beschrieben, durchgeführt.

3.7.4 Biolistische Transformation von *Physcomitrella patens* und *Allium cepa* mittels *Particle-Inflow-Gun* (PIG)

3.7.4.1 Herstellung von *Physcomitrella* Protonema-Platten für die PIG-vermittelte Transformation

Nach dem Homogenisieren einer weniger als drei Wochen alten Protonema-Flüssigkultur wurde die Kultur in Falcon *Tubes* gefüllt und zum Sedimentieren unter der Sterilbank stehen gelassen. Medium-Überstände wurden dekantiert und die verbliebene Suspension mit einer sterilen Einweg-3ml-Pipette (Sarstedt) auf Cellophan- (A.A. Packaging Ltd. Liverpool, UK) überschichtete BCE225 Platten gegeben. Protonemata wurden durch horizontale kreisförmige Bewegungen in der Mitte der Platten gesammelt und überschüssige Flüssigkeit mit der Pipette abgesaugt. Diese Platten wurden 3-5 d in der Klimakammer inkubiert. Am Tag des Beschusses wurden die Filamente mit der Cellophanfolie auf eine BCE225 Platte mit 0,2 M Mannitol überführt, um den Turgordruck der Zellen zu senken und bis zum Beschuss der Klimakammer inkubiert.

3.7.4.2 Vorbereitung von Zwiebeln für die PIG-vermittelte Transformation

Frische handelsübliche Gemüse- oder Küchenzwiebeln vom Markt oder aus dem Supermarkt wurden 4-10 d vor Beschuss in Leitungswasser gestellt, um Wurzelwachstum zu induzieren. Die äußeren trockenen und die erste innere Blattschicht wurden entfernt und die Zwiebel längs in 2 Hälften geschnitten. Blattansatzstellen und Wurzeln unten und der obere Teil wurden weggeschnitten und die einzelnen Zwiebelschichten vorsichtig voneinander getrennt. Mit einem scharfen Küchenmesser wurden von den Zwiebelhalbschalen alle Ränder entfernt, so dass nur eine flache Schale übrig blieb. Diese wurde dann in einer mit feuchtem Filterpapier ausgelegte Petrischale platziert.

3.7.4.3 Präzipitation von DNA an Gold- und Wolframpartikel

Für den Beschuss von Protonemata wurden 1,6 µm Inbio-Goldpartikel und für den Beschuss von Zwiebeln 1,0 µm Wolframpartikel von BioRad vorbereitet. Dazu wurden die Partikel zunächst sterilisiert, indem 25 mg Gold- bzw. Wolframpuder in 1 ml 96%igem Ethanol suspendiert und 1 min durch Vortexen gewaschen wurden. Nach Zentrifugation (1 min 5000 rpm) wurde das Pellet in 500 µl sterilem Wasser aufgenommen.

10 µl dieser Suspension wurden pro Ansatz in ein Eppi gegeben und 2 min bei 9000 rpm sedimentiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden 16,5 µl 50% Glycerol zugegeben und durch Vortexen gemischt. Anschließend wurden 1 µg Cherry:NLS-DNA, ggf. 1 µg pBIN P19-DNA und 2 µg der Konstrukte von Interesse hinzugegeben und gemischt. Vorteilhaft ist es, hierzu DNA-Maxi-Präparationen zu verwenden, um das Ansatz-Volumen gering zu halten (Arbeitslösungen waren i.d.R. auf 1 µg / µl verdünnt). Nach Zugabe von je 10 µl 2.5 M CaCl₂ und 4 µl 0,1 M Spermidin wurden die Proben 5 min durch kräftiges Vortexen gemischt. Die Partikel wurden durch eine kurze Zentrifugation für 10 s bei 5000 rpm sedimentiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Partikel mit etwa 100 µl 96% Ethanol gewaschen, indem Partikel-Aggregate mittels Klopfen mit der Pipettenspitze auf den Eppiboden zerkleinert wurden. Nach erneuter Sedimentation wurden die Partikel in 12 µl 96%igem Ethanol aufgenommen.

3.7.4.4 Beschuss der Präparate mittels *PIG*

Nach 4,5 h Inkubation der Protonema auf BCE225 mit 0,2 M Mannitol bzw. nach Zuschneiden der Zwiebelhalbschalen wurden die Pflanzenmaterialien mit den DNA-beschichteten Partikeln beschossen. Dazu wurde eine selbst gebaute Genkanone verwendet. 12 µl Ethanol-Partikelsuspension wurden pro Schuss auf einen mit 70% Ethanol sterilisierten Plastikprobenhalter (Swinney Filterhalter 13 mm, Acetal Kopolymer, VWR) pipettiert und in die Kammer eingeschraubt, die Gewebeproben unter einem sterilen Teflonnetz platziert und in einem Halbvakuum von -0,8 mPa mit einem Heliumdruck von 9 bar (0.9 mPa) beschossen. Anschließend wurde das Halbvakuum sofort entlassen und die Moosfilamente zurück auf BCE225 ohne Mannitol zurückgesetzt. Teflonnetze und Probenhalter werden ggf. durch Sonifizierung aber immer mit 1M HCl gereinigt, mit dest. H₂O gespült und in 70% Ethanol bzw. getrocknet aufbewahrt. Lokalisationsproben wurden 1-2d, *Split-YFP* Proben mindestens 3d bis zur Beobachtung in Dunkelheit inkubiert.

3.7.5 Lokalisationsstudien mittels Fluoreszenzmikroskopie

Transient transformierte *Physcomitrella* Protonemata wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet, um transformierte Zellen zu identifizieren. In der Regel wurden Transformanten anhand des co-transformierten mCherry:NLS-Kernmarkers mittels N3-Filter (für Rot-fluoreszierende Proteine) selektiert und unter Verwendung von schwachem grünen Sicherheitslicht auf einen Objektträger mit Wasser oder BCE225-Medium überführt. Mittige Zwiebelepidermen-Ausschnitte wurden zumeist ohne vorherige Betrachtung in grünem Sicherheitslicht auf einen Objektträger mit Wasser überführt. Intrazelluläre Lokalisationen von GFP- oder CFP-Fusionsproteinen, Cherry-Kernmarker und ggf. Chlorophyll-Autofluoreszenz wurden nebst eines *Differential-Interference-Contrast* (DIC)-Bildes mit einem Epifluoreszenzmikroskop und CCD-Kamera dokumentiert. Anschließend wurden die Proben ggf. etwa eine Stunde mit Rc (660 nm; 3 µmol / m² s) bestrahlt und die Dokumentation der intrazellulären Lokalisation wiederholt.

3.7.6 *In vivo* Interaktionsstudien mittels *Split-YFP* und Konfokalmikroskopie

Um die *in vivo* Interaktion von phy4 mit putativen Interaktionspartnern in *Physcomitrella*-Filamentzellen nachzuweisen, wurde *Split-YFP* angewendet, welches darauf beruht, dass ein fluoreszierendes Protein (in diesem Fall *Yellow Fluorescent Protein*, YFP) auf DNA-Sequenzebene in zwei Teile getrennt und einzeln an zwei CDS von Interesse fusioniert wird. Die zwei resultierenden Plasmide werden wie in 3.7.4 beschrieben in (Pflanzen-)zellen eingebracht und die Fusionsproteine so ko-exprimiert. Im Falle einer Protein-Protein-Interaktion, werden die zwei FP-Teile – ähnlich wie im *Y2H* – in räumliche Nähe gebracht und zu einem funktionalen FP rekonstituiert. Daher wird diese Methode auch BiFC = *Bimolecular-Fluorescence-Complementation* genannt und es kommt nur nach einer Interaktion zu einem Fluoreszenz-Signal. Analog zu den *Y2H*-Studien ergeben sich prinzipiell 4 Kombinationsmöglichkeiten (bzw. die gleichen Kombinationen mit getauschten Tags):

YFP_N:phy4 + YFP_C:Partner

YFP_N:phy4 + Partner:YFP_C

phy4:YFP_N + YFP_C:Partner

phy4:YFP_N + Partner:YFP_C

In der Regel wurden diejenigen Konformationen ausgewählt, die auch im *Y2H-Assay* Wachstumsreaktionen hervorgerufen haben. 3-4 d nach Transfektion der pSAT-Konstrukte (s.

3.1.3.4), des mCherry-Kernmarkers und ggf. von pBIN P19 wurden Objektträger in grünem Sicherheitslicht vorbereitet und anschließend mittels Konfokalmikroskopie zunächst ohne eine Licht-Vorbehandlung beobachtet. Einzel-*Scans* der YFP-Fluoreszenz wurden mit 4-fachem *Line*- und 6-fachem *Frame-Average* aufgenommen. Um YFP-Signale von möglichen Cherry-*Bleedthroughs* zu unterscheiden, wurde die YFP-Emissionsdetektion ggf. auf 525-535 nm eingengt. Nach Auswertung eines Objektträgers wurde dieser ca. 1 h mit R ($3 \mu\text{mol} / \text{m}^2 \text{ s}$) bestrahlt. Die rote mCherry- und Chlorophyll-Autofluoreszenz und die Transmissionsbilder wurden mit 4-fachem *Line*- und 2-fachem *Frame-Average* aufgenommen. Adobe Photoshop CS5 wurde zur Bildbearbeitung (Verstärkung von Helligkeit und Kontrast) verwendet.

3.8 Messung von Bestrahlungsstärken:

Bestrahlungsstärken des verwendeten Rot- oder Blaulichtes wurden mit einer PAR- (*photosynthetic active radiation*) Messzelle (PAR quantum sensor, Skye Instruments Ltd, GB) inklusive Mikrovoltmeter (Votcraft M-4660-A) eingestellt. Von der angezeigten Spannung [mV] wurde die Dunkelspannung (0,12 mV) subtrahiert und der erhaltene Wert mit dem Faktor 3 multipliziert, um die Fluenzrate in $\mu\text{mol} / \text{m}^2 \text{ s}$ zu erhalten. Die Messung von sehr schwachen R- oder von FR-Bestrahlungsstärken erfolgte mittels eines Spektralradiometers (Ocean Optics SD 2000 mit $8,9 \times 10^{-4} \text{ m}^2$ Sensor, Dunedin, USA) und zugehöriger Spectrasuite-Software. Das Ergebnis der Messung wird in Anzahl Photonen pro cm^2 und sec angegeben. Daraus wird die Fluenzrate mittels Umrechnung in Photonen pro m^2 und Division durch die Avogadrozahl berechnet.

4. Ergebnisse

4.1 Herstellung und Charakterisierung von phy4-Baits

4.1.1 Untersuchung der Expression der *Bait*-DNA-BD-Fusionsproteine in Hefe *via Western Blot*

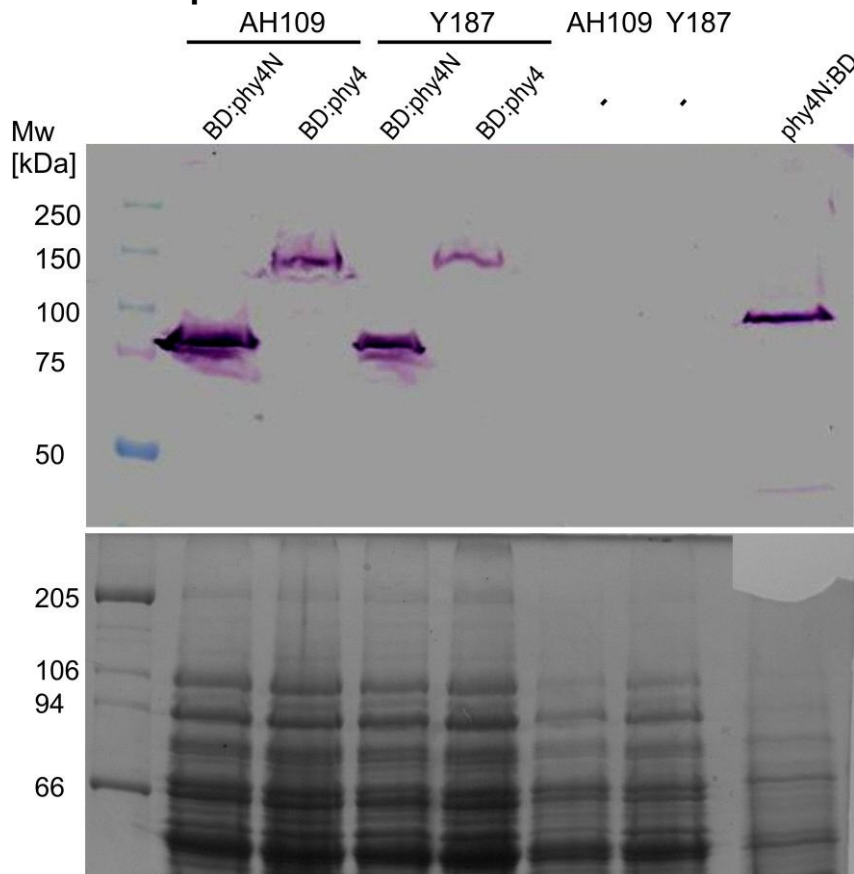


Abbildung 4-1: Anti-DNA-BD- *Western Blot* (oben) und 10%iges SDS Gel (unten) mit je 10 μ l (WB) bzw. 5 μ l (SDS-Gel) Gesamtproteinextrakten aus PHY4:BD- und PHY4 N:BD-exprimierenden AH109 u Y187 Hefen. Als Negativkontrolle dienten untransformierte AH109 und Y187 Hefezellen.

Abbildung 4-1 zeigt ein SDS-PAGE-Gel (unten) und einen *Western Blot* (oben) von Gesamt-Proteinextrakten aus einzeln transformierter Hefe der Stämme AH109 und Y187 zum Nachweis der Synthese von phy4:BD-Fusionproteinen (s. 3.5). Zur Detektion von PHY4:BD und PHY4 N:BD wurde eine Immunodetektion mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen die DNA-Bindedomäne durchgeführt (Clontech). Die Detektion des sekundären Antikörpers erfolgte mit BCIP/NBT. Als Negativkontrollen dienten untransformierte Hefen beider Stämme. Als Positivkontrolle für den *Western Blot* diente ein Extrakt aus AH109-Zellen, die ein BD:phy4 N-Fusionsprotein (*PHY4 N* pGBK) exprimieren.

Das errechnete Molekulargewicht des Volllängen-PHY4:BD-Proteins beträgt 142,1 kDa (124,9 kDa + 16,6 kDa *Tag*), das der kürzeren PHY4 N:BD-Fusion beläuft sich auf ca. 83,8 kDa (66,6 kDa + *Tag*). Das SDS-Gel zeigte keine distinkten Proteinbanden bei den errechneten Größen, da die Fusionsproteine nicht in großer Menge in Hefe exprimiert werden, was für die Funktionalität des *Y2H*-Systems nicht notwendig ist. Die Gesamt-Proteinkonzentration in den Extrakten aus transformierten Hefen war untereinander in etwa vergleichbar, wohingegen

diejenige in Extrakten aus untransformierter Hefe etwas geringer war. Im *Western Blot* jedoch konnten beide BD-Fusionsproteine eindeutig nachgewiesen werden: PHY4:BD und PHY4 N:BD erzeugten sowohl in AH109 als auch in Y187 je ein spezifisches Signal bei ca. 140 bzw. 80 kDa. Die untransformierten Hefen beider Stämme hingegen weisen keinerlei Signale auf. Das N-terminal fusionierte BD:PHY4 N-Fusionsprotein (*PHY4N* pGBK) erzeugte eine Bande bei ca. 90 kDa – entsprechend des vorhergesagten Molekulargewichtes von 86,7 kDa – und liegt somit etwas höher, als die der C-terminal fusionierten BD-Fusionen. Der *Western Blot* demonstriert somit eine erfolgreiche Expression der beiden *Bait* Konstrukte in beiden Hefestämmen. Der phy4:BD-exprimierende Y187 Stamm wurde für den *Y2H-Oligo dT-Library-Mating-Screen* in Kombination mit einer cDNA-Bibliothek in AH109 eingesetzt.

4.1.2 Einstellung der 3-AT Konzentration für phy4:BD-*Bait* Hefen nach Doppeltransformation oder *Mating*

Die Transformation des *PHY4* pBAC *Bait*-Vektors in AH109 ergab Transformanden, die allerdings Autoaktivierung und damit *HIS3*-Transkription (s. Methoden) aufwiesen. Letzteres zeigte sich bereits bei einzeln transformierter Hefe auf -Trp/-His-*DSD*-Medium, welches auf die Expression des *HIS3* -Gens ohne Anwesenheit des AD-Vektors selektiert. Aufgrund der deutlichen Autoaktivierung musste für das phy4-*Bait*-Konstrukt die angemessene Konzentration des kompetitiven Inhibitors des *HIS3*-Proteins insbesondere für doppelt transformierte Hefe eingestellt werden. Wachstum von AH109 phy4:BD (*PHY4* pBAC) + AD: (pGAD) auf -Trp/-Leu/-His konnte mit 1 mM 3-AT zufrieden stellend eingeschränkt werden (s. Abbildung 4-2 oben) Für phy4 N:BD + AD: waren 0,5 mM 3-AT zur Unterdrückung von Hintergrundwachstum ausreichend (Abb. 4-2 unten). Diese 3-AT-Konzentrationen wurden im Folgenden für alle weiteren Experimente verwendet.

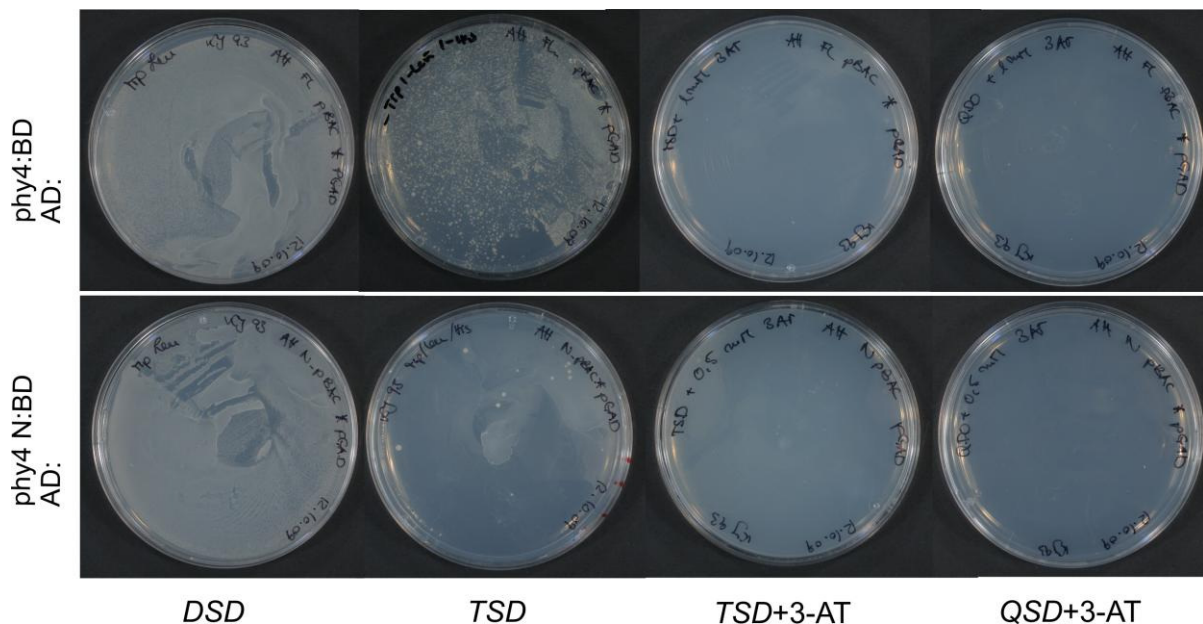


Abbildung 4-2: Selektion von AH109 phy4:BD (*PHY4* pBAC) + AD: (pGAD) und AH109 phy4 N:BD (*PHY4 N* pBAC) + AD: (pGAD) auf -Trp/-Leu *DSD*, -Trp/-Leu/-His *TSD* ohne und mit 3-AT und auf -Trp/-Leu-His/-Ade *QSD* + 3-AT

Infolge von Hefe-*Mating* von AH109 AD: (pGAD) + Y187 phy4:BD (phy4 pBAC) und Selektion auf Medien ohne PCB war kein 3-AT vonnöten, so dass die Reporter-Autoaktivierung durch *Mating* im Vergleich zur Doppeltransformation maßgeblich verringert werden konnte. Bei

4. Ergebnisse

Selektion auf PCB-haltigem *TSD*-Medium, welches in R inkubiert wurde (*Screening*-Bedingungen), wurde ein leichtes Hintergrundwachstum beobachtet (s. Abbildung 4-3 rechts). Aus diesem Grund wurde für den *Y2H-Screen* eine minimale Konzentration von 0,25 mM 3-AT eingesetzt, um das leichte Hintergrundwachstum zu unterdrücken (s. Abbildung 4-7).

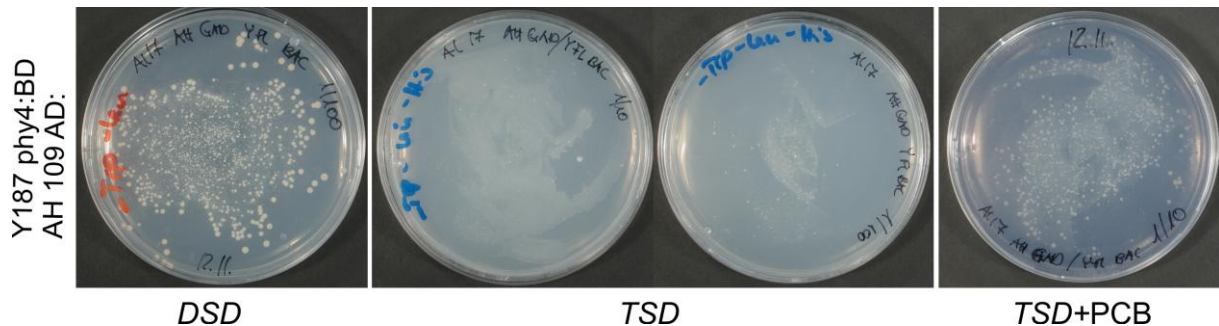


Abbildung 4-3: Mating von Y187 phy4:BD mit AH109 AD: und Selektion auf *DSD* (links), *TSD* (Mitte, eine 1:10 und eine 1:100-Verdünnung) und *TSD* + 30 µM PCB

4.2 Etablierung von lichtabhängigem Hefe-Mating und semiquantitativen *Y2H*-Interaktions-Assays

4.2.1 Etablierung von Hefe-Mating

Die Funktionalität des *Mating*-Protokolls wurde anhand der phy4-Dimerisierung demonstriert (s. Abbildung 4-4). Dazu wurden beide Vollängen-, phy4 N- und phy4 C-BD-Fusionen in Y187 transformiert und mit Vollängen-phy4-, phy4 N- und phy4 C-AD-Fusionen in AH109 kombiniert und damit *Matings* nach dem nicht-quantitativen Protokoll durchgeführt (s. 3.3.7).

4. Ergebnisse

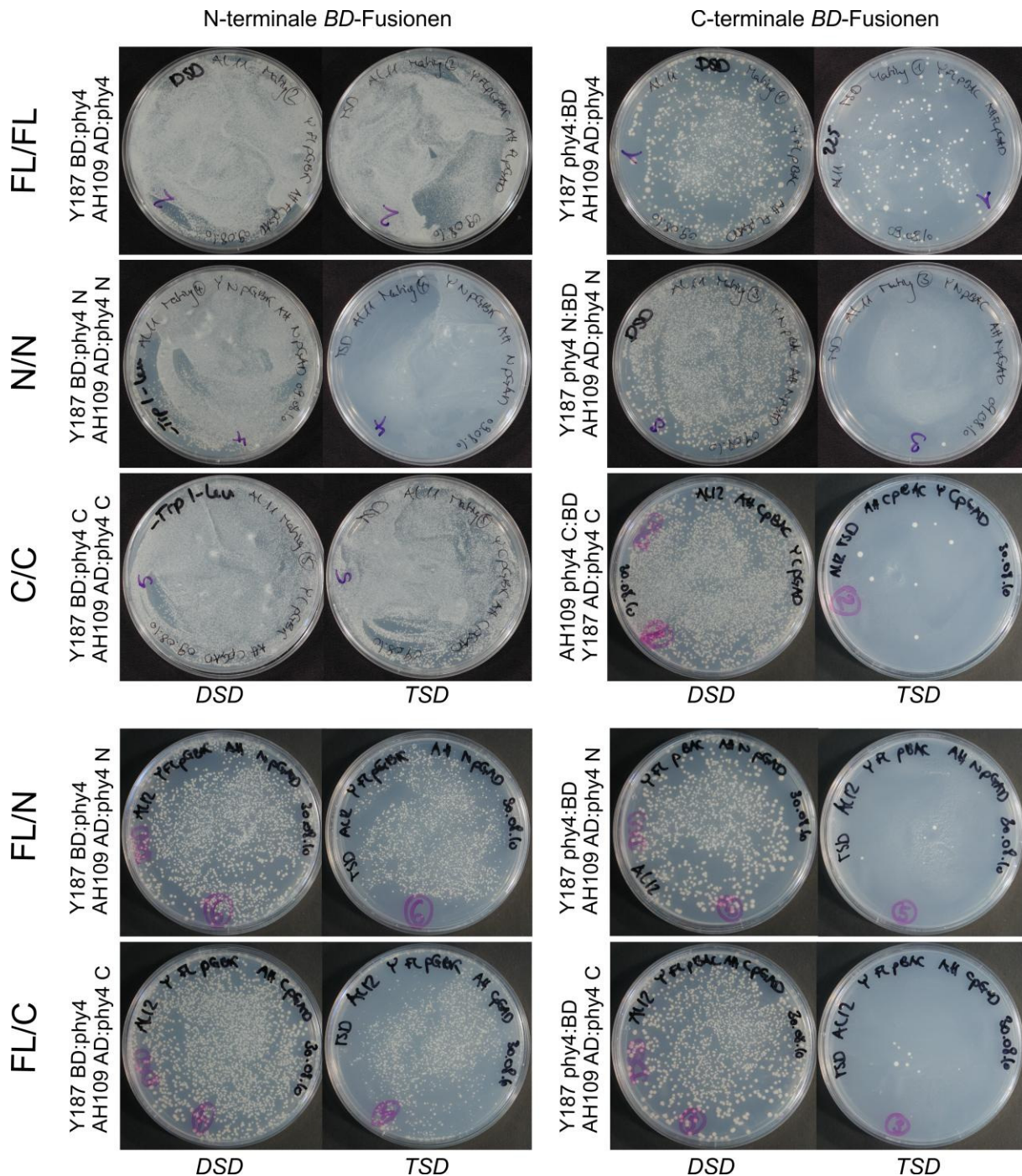


Abbildung 4-4: Matings von phy4 N-, phy4 C- und Volllängen-phy4-BD-Fusionen (N- (links) und C-terminal fusioniert (rechts)) i.d.R. in Y187 mit phy4 N-, phy4 C- und Volllängen-phy4-AD-Fusionen (immer N-terminal fusioniert) i.d.R. in AH109. Die Kombination der phy4-Konstrukte ist in Kurzform ganz links benannt: z.B. steht FL/N für eine Kombination von einer Volllängen-BD-Fusion mit einer AD:phy4 N-Fusion.

Sowohl BD:phy4, als auch phy4:BD interagieren/dimerisieren zuverlässig mit AD:phy4, während dies bei BD:phy4 N / phy4 N:BD + AD:phy4 N nicht der Fall ist. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Dimerisierung von phy4 im C-terminalen und nicht im photosensorischen Modul stattfindet. Dies konnte durch Kombination von beiden phy4 C-BD-Fusionen mit AD:phy4 C bestätigt werden. In der Kombination BD:phy4 C + AD:phy4 C fällt die Wachstumsantwort allerdings deutlich stärker aus, als bei phy4 C:BD + AD:phy4 C.

4.2.2 Semiquantitatives *Y2H*-Wachstums-Assay in Rc und Rp

Die Aufnahme des Chromophors aus dem Medium verlief erfolgreich, was sich auch in der grünlichen Farbe von auf/in PCB Medium gewachsenen Hefen widerspiegelt. Zum Nachweis von Aufnahme und erfolgreicher Assemblierung wurde das Wachstumsverhalten von Holo-phyA:BD bzw. Holo-BD:phyA in Kombination mit AD:FHY1 in Rotlicht als externe Positivkontrolle herangezogen.

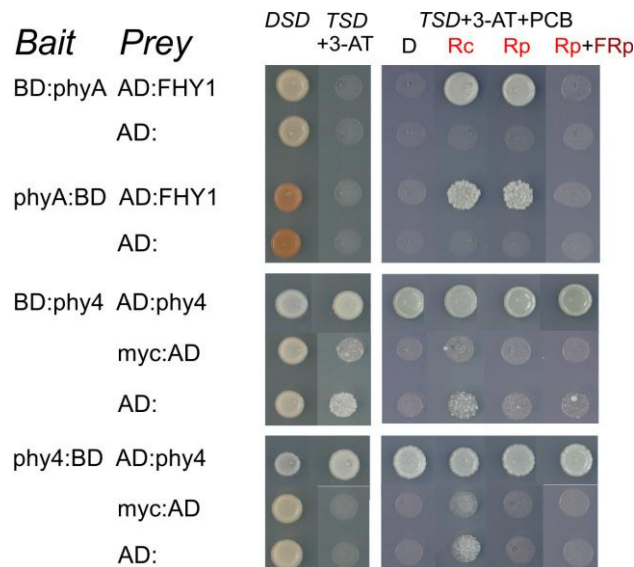


Abbildung 4-5: Semiquantitatives *Y2H*-Wachstums-Assay von phyA:BD bzw. BD:phyA mit AD:FHY1 als genetische Positivkontrolle und von BD:phy4 bzw. phy4:BD mit myc:AD / leerem AD:-Vektor als Negativkontrollen und mit AD:phy4 als Dimerisierungskontrolle.

Abbildung 4-5 zeigt ein semiquantitatives Wachstums-Assay von *Y2H* Positiv- und Negativkontrollen auf nicht-selektivem *DSD* Medium und auf $-Trp/-Leu/-His$ -*TSD*-Selektionsmedium mit der für die entsprechenden *Bait*-Konstrukte eingestellten 3-AT-Konzentration (2,5 mM für BD:phy4, für alle Anderen 1 mM). *TSD*+3-AT Medium wurde ggf. mit 30 μ M PCB ergänzt, um das Wachstumsverhalten in unterschiedlichen Lichtbedingungen zu untersuchen. Es wurden je $2 \cdot 10^5$ Zellen aufgetropft. PCB Platten wurden 5 d in D, Rc, Rp oder in Rp+FRp inkubiert (s. 3.3.11).

Alle Hefen tragen *Bait*- und *Prey*-Vektor, da sie starkes Wachstum auf *DSD* aufweisen. Meist wachsen die hier untersuchten Hefen nicht auf *TSD* mit 3-AT ohne PCB: Apo-PHYA ist nicht in der Lage, mit AD:FHY1 zu interagieren. Die Autoaktivierung von Apo-PHY4:BD + AD-Konstrukte kann durch 1 mM 3-AT ausreichend unterdrückt werden. In diesem Experiment war das nicht ganz der Fall für Apo-BD:PHY4 + AD-Konstrukte. Bei myc:AD handelt es sich um ein Kontrollkonstrukt im *Gateway-Y2H*-Vektor pGADCg, der es ermöglicht, C-terminale AD-Fusionen herzustellen (s. 3.1.3.2). Der myc-Tag wurde dort eingefügt, um die *Gateway*-Kassette heraus zu rekombinieren. AD: bezeichnet den leeren konventionellen pGADT7 Vektor, in dem *Preys* N-terminal mit der Aktivierungsdomäne fusioniert werden. Beide Phytochrom-Dimerisierungskontrollen zeigen eine starke Wachstumsantwort auch in der Apo-Konformation.

Sowohl BD:phyA (hier in pGBK), als auch phyA:BD (in pBAC) interagieren lichtabhängig mit AD:FHY1, so dass in Rc und Rp nicht jedoch in D, Hefen wachsen konnten. Die Induktion der Interaktion durch einen Rotlichtpuls konnte durch einen Dunkelrotlichtpuls revertiert werden, so dass in dieser Lichtbedingung genau so wenig Wachstum auftritt, wie in Dunkelheit. Dies

4. Ergebnisse

zeigt, dass sowohl die Aufnahme des Chromophors in Hefe als auch die autokatalytische Assemblierung mit dem Apoprotein zum Holoprotein stattgefunden haben muss. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die gewählten Lichtpulse geeignet sind, um Interaktionen mit Phytochrom (A) zu induzieren, bzw. zu revertieren. *PhyA-Baits* in Kombination mit leerem AD:-Vektor zeigen an, dass die gewählte 3-AT Konzentration (1 mM) ausreichend ist, um Hintergrundwachstum zu unterdrücken. Analog wurden die *phy4-Baits* mit unterschiedlichen AD-Konstrukten kombiniert, um Hintergrundwachstum zu überprüfen. In den meisten Fällen konnte Autoaktivierung hinreichend unterdrückt werden. Schwaches Wachstum zeigte sich in Rc bei *phy4 Baits* mit leerem AD-Vektor. Bei Untersuchung von Interaktionen putativer Interaktionspartner (mit N-terminalen AD-Fusionen) mit *phy4* wurde das jeweilige Ausmaß des Wachstums mit demjenigen der Negativkontrollen in Relation gesetzt. Die Dimerisierung von Phy4 findet sowohl als N-terminale, als auch als C-terminale BD-Fusion konstitutiv und in starkem Ausmaß statt. Selbst eine Erhöhung der 3-AT-Konzentration auf 10 mM kann diese starke Reporterageninduktion nicht unterdrücken (nicht gezeigt). Das so etablierte Wachstums-*Assay* wurde angewendet, um Interaktionen von BD:*phy4* und *phy4*:BD mit putativen Interaktionspartnern zu charakterisieren.

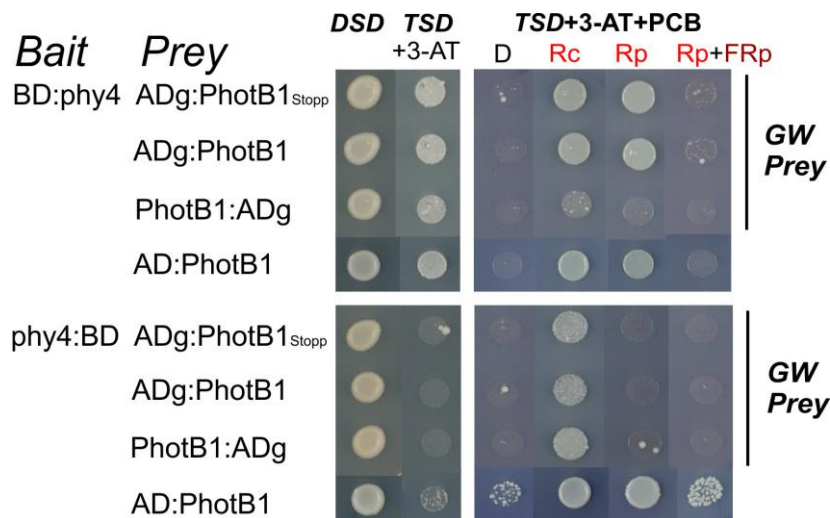


Abbildung 4-6: Funktionstest der *Gateway Prey*-Vektoren pGADg und pGADCg (mit der PhotB1 CDS) und Vergleich mit AD:PhotB1 im konventionellen *Prey*-Vektor pGADT7 in Kombination mit N- und C-terminal fusionierten *phy4-Baits*.

Abbildung 4-6 zeigt ein semiquantitatives Wachstums-*Assay* zur Untersuchung der Funktionalität der *Gateway Prey*-Vektoren pGADg und pGADCg. Hierzu wurde *Physcomitrella* Phototropin B1, wie in 3.1.3 beschrieben, die beiden Destinations-Vektoren kloniert, woraus ADg(*Gateway*):PHOTB1 bzw. PHOTB1:ADg resultierten. Die AD-Expressionsklone wurden mit den konventionellen *phy4-Baits* BD:*phy4* (in pGBKT7) und *phy4*:BD (in pBAC) kombiniert. Zum Vergleich mit dem konventionellen *Prey*-Vektor wurde die analoge Kombination von AD:photB1 mit *phy4-Baits* herangezogen. Das *Assay* wurde analog zum obigen Experiment (Abbildung 4-5) durchgeführt.

Bei Kombination verschiedener phot-AD-Konstrukte mit BD:*phy4* ist zu erkennen, dass Wachstum sowohl auf *TSD* + 3-AT ohne PCB (= mit Apo-PHY4), als auch mit PCB (= Holo-*phy4*) auftritt, dann allerdings lichtabhängig in Rc und Rp. Die Interaktion ist durch einen FR-Puls revertierbar, was mit den Ergebnissen von Dr. Mailliet konsistent ist. Dabei macht es keinen Unterschied, ob PhotB1 in pGADg oder im konventionellen pGADT7 vorliegt und auch nicht, ob PhotB1 ein Stoppcodon enthält, oder nicht. Sehr wohl hat die Reihenfolge der

Fusion mit der AD an die *PHOTB1*-CDS einen Einfluss auf die Interaktion, denn PhotB1:ADg ist nicht in der Lage, mit Holo-BD:phy4 zu interagieren. Somit scheint eine Holo-BD:phy4-photB1-Interaktion nur möglich zu sein, wenn die AD N-terminal an die CDS fusioniert ist. Da für eine C-terminale AD Fusion kein konventioneller *Prey*-Vektor existiert, kann dieses Wachstumsverhalten nicht verglichen werden.

Wenn die photB1-*Prey* Konstrukte mit phy4:BD kombiniert werden, findet auf PCB-Mangelmedium kein Wachstum statt. Bei PCB-vervollständigtem Medium ist bei der Kombination mit dem konventionellen *Prey*-Vektor eine starke Interaktion in Rc und Rp zu erkennen, die in D und nach Rc + FRc wesentlich schwächer ausfällt. In Kombination von phy4:BD mit den verschiedenen *Gateway Prey*-Konstrukten ist ebenfalls lichtabhängiges Wachstum, allerdings nur in Rc zu erkennen. Die Interaktionsstärke scheint somit hier wesentlich schwächer zu sein. Die Behandlung mit Rp scheint nicht auszureichen, in dieser Konformation eine Wachstumsantwort hervorzurufen – vermutlich, da eine putative Initiierung der Interaktion durch den R-Puls durch Dunkelreversion von phy4 Pfr wieder revertiert wird. Zudem macht es bei der Interaktion mit phy4:BD scheinbar keinen Unterschied, an welchem Terminus von photB1 die AD fusioniert ist. Ebenso scheint das Vorhandensein eines Stoppcodons in der ADg:photB1-Fusion das Interaktionsverhalten nicht zu beeinflussen. Dennoch scheint es möglich zu sein, Licht-abhängige Interaktionen mit den beiden GW-*Prey* Vektoren zu zeigen. Eine generelle Funktionalität der *Gateway Prey* Vektoren scheint demnach vorhanden zu sein, so dass diese verwendet wurden, um putative Partner aus dem *Y2H-Screen* in Volllänge zu klonieren, um die Interaktion mit phy4 zu verifizieren.

4.2.3 Etablierung von quantitativem Hefe-Mating

Zur Erprobung des quantitativen Hefe-Mating-Protokolls für den *Y2H Screen* wurden die Kombinationen Y187 phyA:BD / AH109 AD:FHY1 als Positivkontrolle und Y187 phy4:BD / AH109 AD: als Negativkontrolle herangezogen.

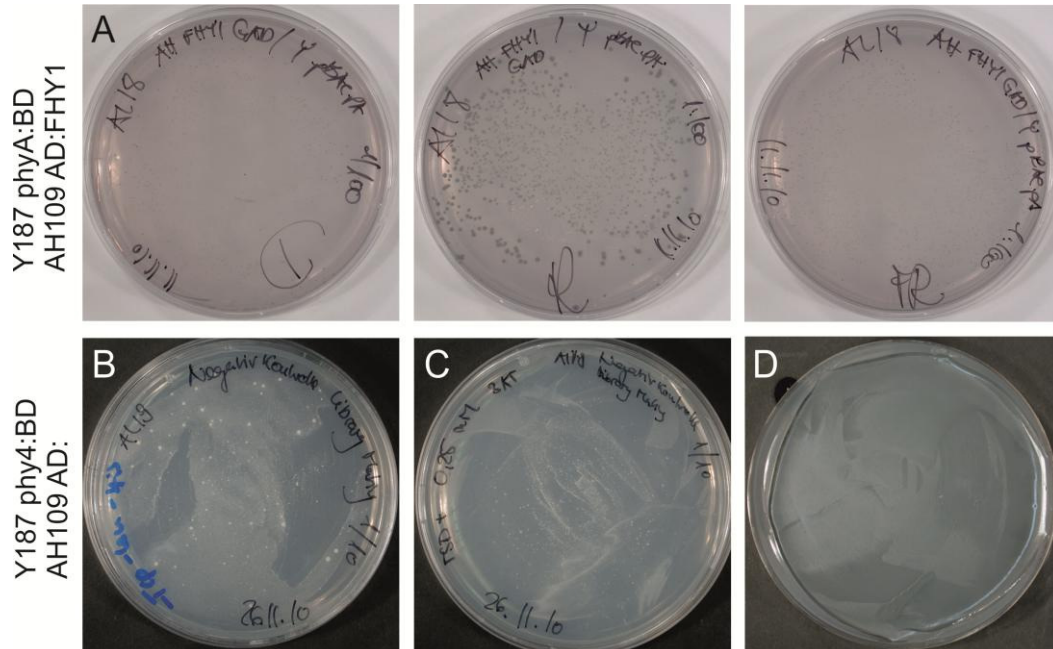


Abbildung 4-7: Mating von Y187 Holo-phyA:BD mit AH109 AD:FHY1 auf *TSD*+PCB in D (links), Rc (Mitte) und FRc (rechts) (A) und Mating von Y187 phy4:BD mit AH109 AD: auf *TSD* (B), *TSD* + 3-AT (C) und auf *TSD* + 3-AT + PCB in R (D)

In Abbildung 4-7: sind *Mating* Positiv- und Negativkontrollen dargestellt. Panel A zeigt eine 1:100 Verdünnung des *Mating*-Ansatzes der Y187 phyA:BD + AH109 AD:FHY1 Positivkontrolle auf *TSD* mit 30µM PCB in D, Rc und FRc. Wachstum ist lediglich in Rc zu erkennen, so dass die Diploiden erfolgreich PCB aus dem Medium aufgenommen und autokatalytisch zu Holophytochrom A assembliert haben müssen. Nur so ist eine Rotlicht-abhängige Interaktion zwischen *Arabidopsis thaliana* phyA: BD und AD:FHY1 möglich. Somit können auch Diploide PCB aus dem Medium aufnehmen und Holophytochrom bilden. Panels B C und D zeigen die Negativkontrolle Y187 phy4:BD + AH109 AD: auf *TSD* ohne 3-AT (B), mit 0,25 mM 3-AT (C) und mit PCB und 3-AT nach Rotlicht-Inkubation (D). In B und C wurde eine 1:10 Verdünnung und in D 100 µl der unverdünnten *Mating*-Zellsuspension plattiert. Das Hintergrundwachstum auf PCB-Platten unter *Screening*-Bedingungen (D) ist vernachlässigbar gering und somit wurde *TSD* Medium mit 0,25 mM 3-AT als Medium für den *Y2H-Oligo dT-Library-Mating-Screen* gewählt.

4.3 Untersuchung der Phytochrom-Phototropin-Interaktion

4.3.1 Charakterisierung der Interaktion von phy4 mit *Physcomitrella* Phototropinen

4.3.1.1 Semiquantitatives Y2H-Wachstums-Assay zur Untersuchung der Interaktion von phy4:BD mit AD:photos

Von Dr. Mailliet war im Vorfeld bereits demonstriert worden, dass alle vier *Physcomitrella* Phototropine (photA1, A2, B1 und sehr schwach auch photB2) in der Lage sind, R-verstärkt (bzw. konstitutiv im Fall von photA1) mit BD:phy4 im Y2H-Assay zu interagieren (Jaedicke *et al.*, 2012). In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion der *Physcomitrella* Phototropine mit C-terminal fusioniertem phy4 untersucht (Abbildung 4-8).

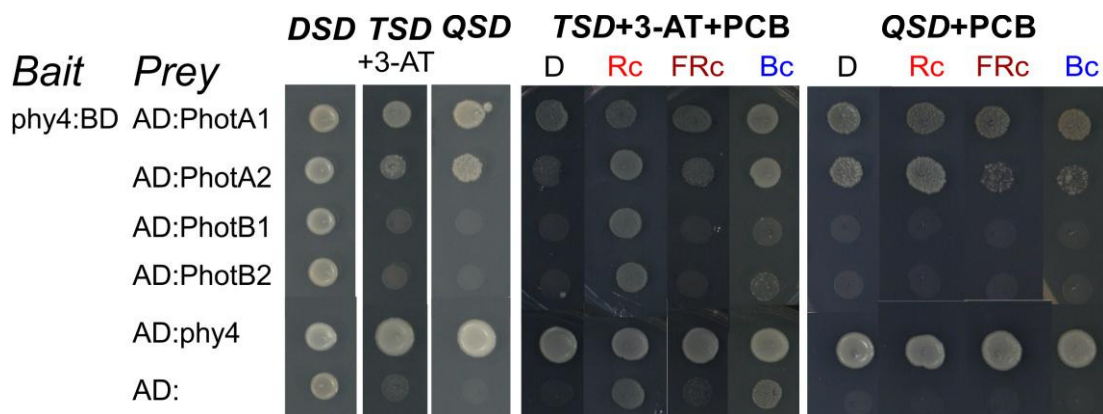


Abbildung 4-8: Semiquantitatives Y2H-Wachstums-Assay zur Untersuchung der Interaktion von (Holo-) phy4:BD mit den vier *Physcomitrella* Phototropinen auf DSD, TSD mit 1mM 3-AT, QSD und auf PCB-haltigen Medien (TSD+3-AT bzw. QSD) in D, Rc, FRc und Bc.

Für AD:photA1 bzw. für AD:photA2, B1 und B2 in Kombination mit phy4:BD konnte mehr oder weniger konstitutives bzw. R-verstärktes Wachstum auf TSD+PCB beobachtet werden. In diesem Experiment trat jedoch auch in der Negativkontrolle eine gewisse Wachstumsantwort in Rc (und Bc) auf, sodass hier zumindest für photB1 und B2 keine eindeutige Aussage getroffen werden kann. Allerdings konnte wenigstens für phy4:BD+AD:photB1 auf diesem Medium in weiteren Experimenten zuverlässig eine R-verstärkte phy4-Interaktion demonstriert werden (vgl. Abbildung 4-6). Zudem wurde auch das Verhalten bei erhöhter Selektionsstringenz auf QSD betrachtet. Hier ist keine Interaktion mit den Phototropinen B1 und B2 mehr, jedoch eine deutliche konstitutive bzw. R-verstärkte Interaktion mit den Phototropinen A1 bzw. A2 zu erkennen (ohne Wachstum der Negativkontrolle). Daher kann geschlussfolgert werden, dass photA1, A2 und B1 stark / konstitutiv bzw. stark / lichtabhängig bzw. schwächer / lichtabhängig mit phy4:BD interagieren.

4.3.1.2 Split-YFP-Assay zur Untersuchung der Interaktion von phy4:YFP_C mit YFP_N:photos

Um die Interaktion von C-terminal fusioniertem Phytochrom 4 mit *Physcomitrella* Phototropinen *in vivo* bestätigen zu können, wurde ein Split-YFP-Experiment von phy4:YFP_C in Kombination mit YFP_N:photA1 bzw. YFP_N:photB1 durchgeführt (Abbildung 4-9). Die phy4-phot-Interaktionen konnte in beiden Fällen demonstriert werden, wobei das YFP-Signal vorwiegend in der Zellperipherie zu beobachten war. In Einzelfällen, waren auch schwächere

4. Ergebnisse

Signale in der perinukleären Region bzw. Cytoplasmasträngen (Abbildung 4-9 unten) zu sehen.

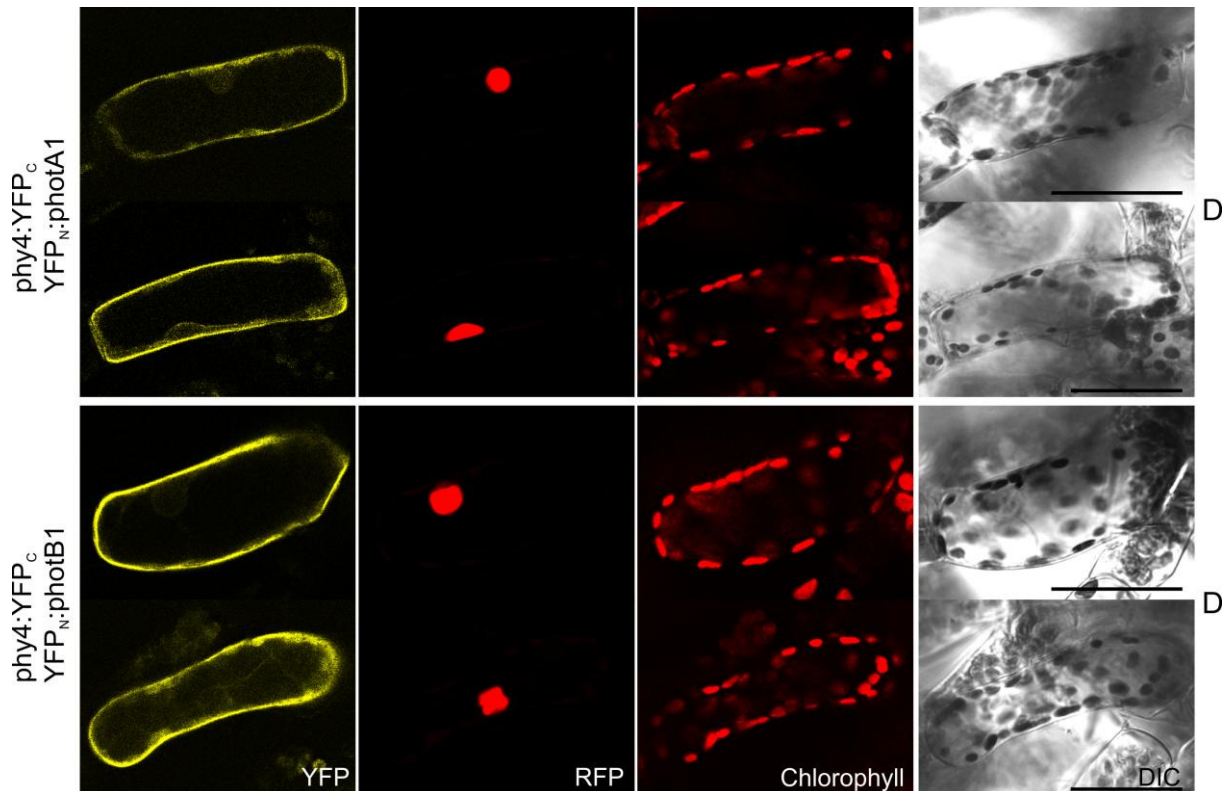


Abbildung 4-9: Split-YFP von phy4:YFP_c mit YFP_N:photA1 und A2 in *Physcomitrella* Protonemata ohne Licht-Vorbehandlung. Je zwei Lokalisationsmuster pro Konformation sind dargestellt. Maßstab 30 µm.

4.3.1.3 Quantifizierung der BD:phy4-AD:phot-Interaktionsstärke mit einem lichtabhängigen enzymatischen Y2H-Assay

Nachdem die physische Interaktion von phy4 mit den vier *Physcomitrella* Phototropinen (photA1-B2) im Y2H-Wachstums-Assay gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, wie stark die Interaktionen jeweils sind und ob die beobachtete R-Induktion der Interaktion durch FR revertiert werden kann. Zur Quantifizierung und Charakterisierung von Stärke und Lichtabhängigkeit der Interaktion wurde ein enzymatisches Y2H-Assay mit ONPG als Substrat angewendet (s. *Yeast Protocols Handbook*, Clontech) und so modifiziert, dass Hefen in der ü.N- Kultur und während der Expansionskulturphase mit PCB versorgt und mit verschiedenen Lichtpulsen behandelt wurden (s. 3.3.13). Das Assay basiert auf der GAL4-regulierten Aktivierung des *lacZ*-Reporters und somit der Expression der β -Galaktosidase, deren Expressionsstärke durch den Umsatz des chromogenen ONPG-Substrates spektralphotometrisch bestimmt werden kann.

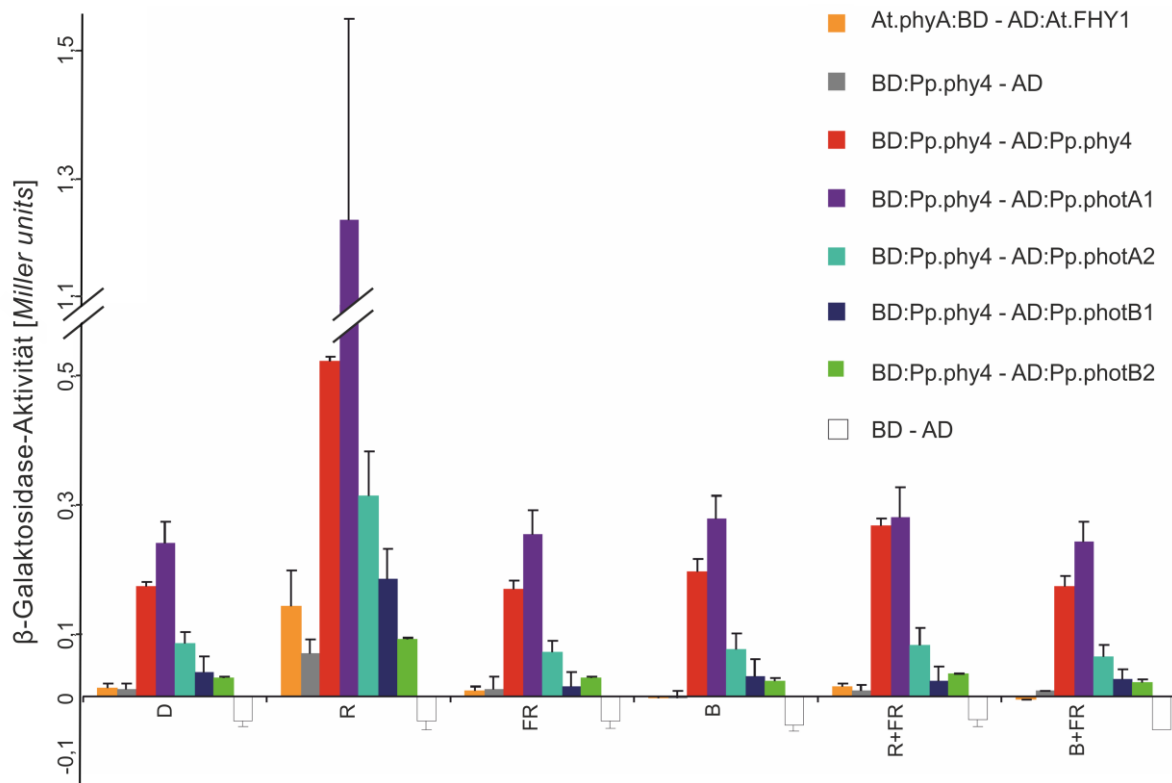


Abbildung 4-10: Quantitatives ONPG- *Y2H*-Assay in D, R, FR, B, R+FR und B+FR zur Charakterisierung der Interaktion von phy4 mit den *Physcomitrella* Phototropinen photA1, photA2, photB1 und photB2. Angabe in Miller Units. Es wurden je 3 unabhängige Experimente pro untersuchter Interaktion durchgeführt. Fehlerindikatoren geben den Standardfehler an.

Abbildung 4-10 zeigt die Ergebnisse der quantitativen ONPG- *Y2H*-Assays von BD:phy4 mit AD:photA1-B2. Der erhaltene Miller-Wert von BD:+AD: für jede Lichtbedingung wurde als Hintergrund-Reporteraktivierung definiert und von allen anderen Werten subtrahiert. Als genetische Positivkontrolle für die Aufnahme von PCB aus dem Flüssigmedium und der autokatalytischen Assemblierung mit dem Phytochrom-Apoprotein diente die lichtabhängige Interaktion von *Arabidopsis* phyA:BD mit AD:FHY1. Es ist erkennbar, dass in D und FR kaum Interaktion stattfindet, während sie durch Bestrahlung mit Rotlicht initiiert werden kann. Zusätzlich ist es möglich, die R-Initiierung der Antwort mit einem anschließenden FR-Puls zu revertieren. Dieses Interaktionsverhalten ist nur möglich, wenn der Photorezeptor als photochromes Holoprotein in Hefe vorliegt. Als phy4-Positivkontrolle wurde die Dimerisierung von BD:phy4 mit AD:phy4 gewählt, die in allen Lichtbedingungen recht stark ist, aber dennoch durch einen R-Puls noch verstärkt wird. Bei der BD:phy4+AD:-Negativkontrolle tritt zumeist kaum eine *lacZ*-Reporteraktivierung auf mit Ausnahme der R-Bestrahlung, die zu einer leichten Autoaktivierung führt.

Entsprechend des semiquantitativen *Y2H*-Wachstums-Assays von Dr. Mailliet findet auch im ONPG-Assay eine direkte und in allen Fällen R-verstärkte Interaktion von phy4 mit den *Physcomitrella* Phototropinen auf mindestens das Dreifache des D- oder FR-Wertes statt (Ausnahme phy4-photA1: auf etwa das Fünffache). Alle anderen Interaktionsstärken sind mit denjenigen in D vergleichbar. Die Interaktion von phy4 mit photA1 ist dabei am Stärksten (sogar stärker, als die phy4-Dimerisierung), während von phy4+PhotA2 bis zu phy4+photB2 eine graduelle Verminderung der Interaktion zu beobachten ist. Auch im quantitativen Interaktions-Assay ist die Interaktion von phy4 mit photB1 und -B2 nahezu nur in R zu detektieren.

4. Ergebnisse

Da Phytochrom prinzipiell auch im blauen Bereich des sichtbaren Spektrums absorbiert, wurden auch Effekte von Blaulicht (und eines anschließenden FR-Pulses) auf die jeweiligen Interaktionen untersucht. In keiner der untersuchten Konformationen ist ein solcher Effekt zu beobachten. Stattdessen sind in allen Fällen die Interaktionsstärken mit FR-Behandlung bzw. dem D-Wert vergleichbar.

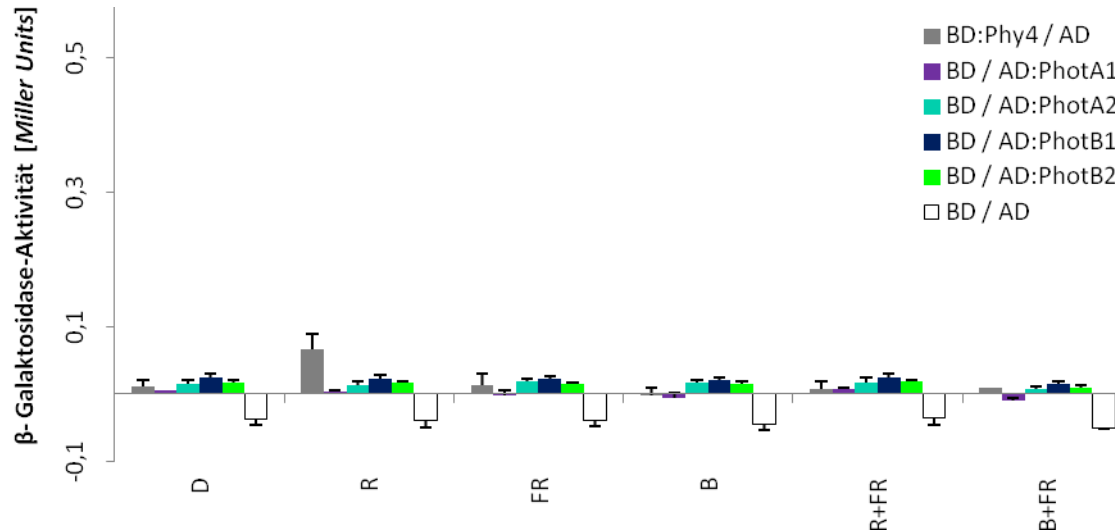


Abbildung 4-11: BD: + AD:phot-Negativkontrollen zum quantitativen ONPG- *Y2H*-Assay. Die Struktur und weitere Kontrollen entsprechen Abbildung 4-10.

In Abbildung 4-11 sind die zu Abbildung 4-10 gehörigen Negativkontrollen des ONPG- *Y2H*-Assays dargestellt, wofür Y187 BD: (pGBK T7) in Kombination mit den vier AD:phot-Konstrukten (in pGAD T7) verwendet wurde. Assays wurden analog zu Abbildung 4-10 durchgeführt. Es ist erkennbar, dass die Kombination von *Prey*-Konstrukten mit leerem *Bait*-Vektor (wie im Wachstums-Assay auch) zu einer sehr geringen Autoaktivierung des jeweiligen Reporters führt. Auch verschiedene Lichtbedingungen haben aufgrund der Abwesenheit von Phytochrom keinen Einfluss auf die Autoaktivierung des *lacZ*-Reporters. Somit kann das quantitativ erfasste lichtabhängige phy-phot-Interaktionsverhalten als aussagekräftig gewertet werden.

4.3.1.4 Etablierung von Co-IP zum *ex-vivo* Interaktionsnachweis von HA:phy4 mit myc:photos

Da *Y2H* aufgrund der heterologen Proteinexpression ein recht artifizielles System ist und als alleiniger Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion nicht ausreicht, sollte eine weitere Evidenz für die direkte phy-phot-Interaktion erbracht werden. Prinzipiell bieten sich dafür verschiedene Möglichkeiten an, wie z.B. *Förster-Resonance-Energy-Transfer* (FRET) oder Co-Immunoprecipitation (Co-IP). Letzteres ist eine anspruchsvolle Aufgabe, da es sich zumindest bei Phototropinen sowohl in höheren Pflanzen, als auch in *Physcomitrella* nachweislich um Membran-assoziierte Proteine handelt ((Sakamoto & Briggs, 2002; Kong *et al.*, 2006; Jaedicke *et al.*, 2012). Die Herausforderung besteht darin, die Proteine mit einem Detergenz aus der Membran zu solubilisieren, ohne dabei die Interaktion mit assoziierten Proteinen zu trennen. Da Co-IP eine neue Methode für unser Labor war, musste ein geeignetes Protokoll zuerst etabliert werden. Zunächst wurden Expressionsklone von N-terminalen HA- und myc-Fusionen an die CDS von phy4 bzw. photA1 und photB1 hergestellt (s. 3.1.3.5), diese wurden in *Agrobacterium* transfiziert (s. 3.2.2) und mit resultierenden Klonen wurden *Nicotiana*

4. Ergebnisse

Nicotiana benthamiana Blätter zusammen mit GV3101 pBIN P19 co-infiltriert (s. 3.7.3). Anschließend wurde die Expression der Fusionsproteine mittels *Western Blot* überprüft (s. 3.5.5.1). Die Analyse zeigte, dass alle Fusionsproteine im Gesamtextrakt vorliegen und sowohl einzeln als auch in Kombination zufriedenstellend überexprimiert wurden (nicht gezeigt). Nun musste ein geeignetes Protokoll zur Extraktion der Fusionsproteine gefunden werden. Vorhergehende Experimente mit HA:phyA und myc:phot1 hatten ergeben, dass eine Extraktion angelehnt an die Mikrosomenextraktion nach de Carbonnel *et al.* (2010) zwar erfolgreich für die Extraktion von phot1 angewendet werden kann, jedoch das HA:phyA-Fusionsprotein recht schnell degradiert und somit nicht in ausreichender Menge im *Input* der Co-IP zur Verfügung steht. Daher wurde ein Extraktionspuffer der Nagatani-Arbeitsgruppe angewendet (s. 2.2.6), um die Stabilität des Phytochroms zu gewährleisten. Zunächst wurden Fusionsproteine wie in 3.5.5.2 beschrieben extrahiert und 950 µl der Extrakte für Co-IP-Prozeduren ohne bzw. mit 20 µg Anti-myc-Antikörper eingesetzt, wie in 3.5.6 inkubiert und anschließend wurden 80 µl gewaschene Protein G *magnetic Beads* hinzugefügt. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abbildung 4-12 dargestellt.

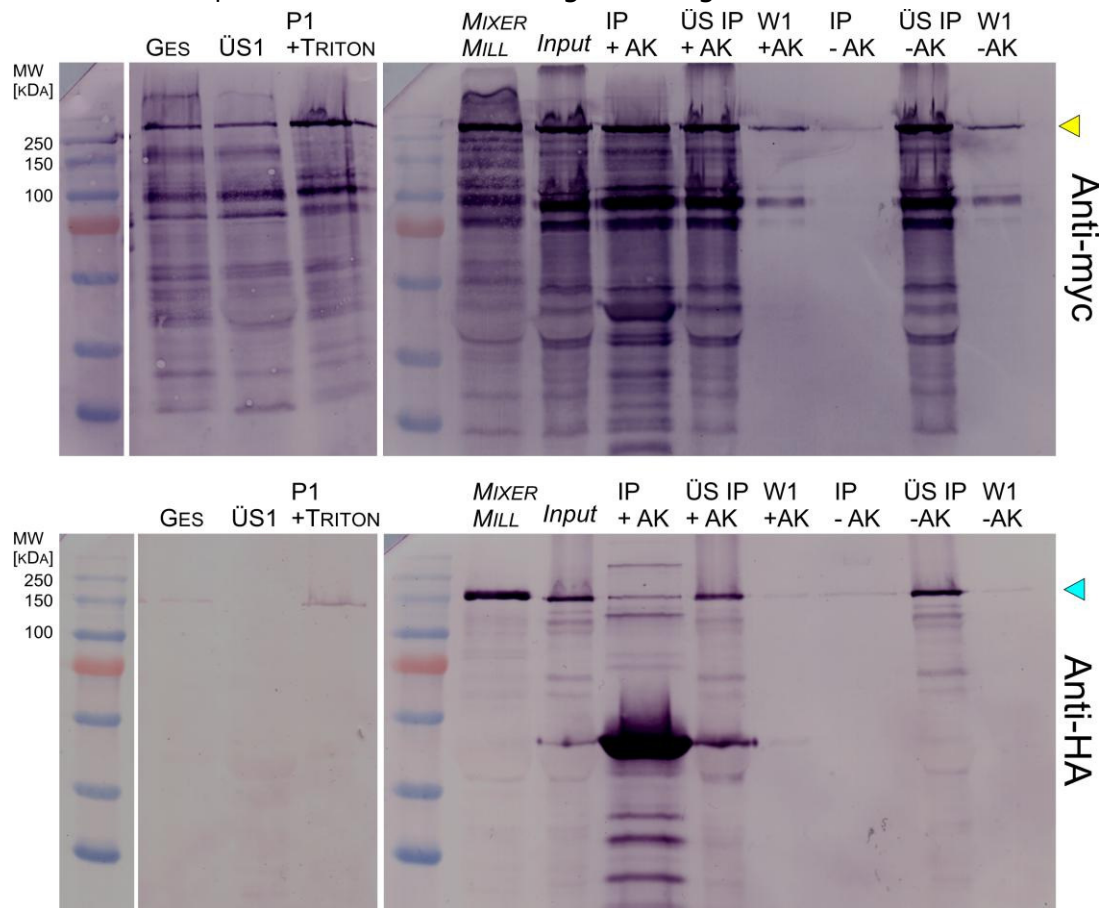


Abbildung 4-12: *Western Blots* der Extraktion von myc:photB1- und HA:phy4-Fusionsproteinen aus *Nicotiana benthamiana*, Immunopräzipitation von myc:photB1 mit 20 µg Anti-myc-Antikörpern mit 80 µl Protein G *magnetic Beads* und Detektion von (co-)immunopräzipitierten phot- bzw. phy4-Fusionsproteinen mit Anti-myc- (oben) bzw. Anti-HA-Antikörpern (unten).

Detektion der Alkaline Phosphatase-gekoppelten sekundären Antikörper mittels NBT/BCIP. Myc:photB1 und HA:phy4-Banden sind mit einem gelben bzw. blauen Pfeil markiert. Für Abkürzungen siehe Text unten.

In Abbildung 4-12 sind die *Western Blots* von Extraktions- und Immunopräzipitationsproben eines IP-Experimentes mit Anti-myc-Antikörpern dargestellt. Nach jedem Schritt wurden

4. Ergebnisse

100 µl-Proben für die SDS-Gele entnommen und mit 20 µl 6x SDS-Ladepuffer versetzt. Von links nach rechts sind folgende Extraktionsproben aufgetragen: Gesamtextrakt nach Mörsern in Extraktionspuffer (Ges), Überstand nach erster Zentrifugation (ÜS1, wird verworfen), Pellet nach Solubilisierung mit Triton-Puffer vor zweiter Zentrifugation (P1+Triton), (*Pre-Stained*-Marker), Gesamtproteinextrakt mittels *Mixer Mill*, Überstand nach zweiter Zentrifugation (*Input*). Dem schließen sich die Immunopräzipitationsproben an: 33% bzw. 66% der IP-Proben mit Antikörper auf Anti-myc- bzw. Anti-HA-Blot (IP+AK), Überstand nach der IP (ÜS IP+AK), der erste Waschschrift mit Triton-Puffer nach der IP (W1 +AK) und dieselben Proben für die „IP“ ohne Anti-myc-Antikörper als Negativkontrolle.

In den Anti-myc-*Blots* ist zu erkennen, dass das myc:photB1-Fusionsprotein mehr oder weniger abundant aber in allen Extraktionsproben vorliegt. Dabei scheinen die Proben P1+Triton und *Input* (der aus P1+Triton hervorgeht) besonders viel myc:photB1 zu enthalten, was dafür spricht, dass es sich auch bei myc:photB1 um ein Membran-assoziiertes Protein handelt. Im *Mixer-Mill*-Extrakt ist ebenfalls viel myc:photB1 vorhanden, obwohl etwa vergleichbare Mengen an Proteinextrakt aufgetragen wurden (~ca 4% des Extrakts aus 2 mg FG im Gegensatz zu ~0,08% des Extrakts aus ca. 1,6 mg FG in Ges). Die *Input*-Probe stellt ca. 1% des gesamten *Inputs* (einer IP-Reaktion) dar. Im Vergleich dazu zeigt die IP+AK-Probe zwar, dass die myc:PhotB1-Proteine an die Protein G *magnetic Beads* gebunden werden, jedoch findet keine der Aufkonzentration der Probe (33x) entsprechende Aufkonzentration der myc:photB1-Proteine statt. Dies wird auch deutlich, wenn man den Überstand nach der IP+AK betrachtet, denn hier ist (optisch) noch genauso viel myc:photB1 vorhanden, wie im *Input* und im Waschschrift wird sogar noch einmal eine kleine Menge der bereits gebundenen Proteine wieder von der *Beads* herunter gewaschen. Positiv jedoch ist, dass in der „IP“ ohne Antikörper nahezu kein myc:photB1 an die *Beads* bindet. Seltsamerweise wird in der Waschprobe dennoch etwas Protein detektiert (möglicherweise ist etwas Protein aus der benachbarten Tasche in diese Tasche übergelaufen).

Die HA:phy4-Proteine scheinen im Gegensatz zu den myc:photB1-Proteinen nicht sehr abundant/stabil in Ges, P1+Triton und insbesondere in ÜS1 zu sein. HA:phyA war zuvor immer auch in Ü1 detektierbar (nicht gezeigt), was dafür spricht, dass evtl. ein größerer Anteil des phy4-*Pools* Membran-assoziiert ist, als von phyA. Im *Mixer-Mill*-Extrakt hingegen ist eine mit myc:photB1 vergleichbare Menge an Fusionsprotein im Blattmaterial vorhanden. Auch hier scheint die Extraktion quantitativer zu sein. Die Aufkonzentrierung durch Solubilisierung des Pellets führt zu einer stärkeren Bande von HA:phy4 im *Input* im Vergleich zu P1+Triton, so dass ausreichend Fusionsprotein für die Co-IP zur Verfügung steht. In der Co-IP mit Antikörper ist zu erkennen, dass tatsächlich HA:phy4 an die *Beads* (evtl. an myc:photB1) gebunden hat, jedoch werden die phy4-Fusionsproteine auch hier nicht quantitativ gebunden (s. ÜS IP +AK). In der IP-AK ist allerdings auch eine schwache Bande zu erkennen, was auch in weiteren Experimenten zu beobachten war.

Dieses Experiment war demnach vielversprechend aber bedurfte einer Optimierung, da sich die zwei folgenden Probleme ergeben hatten:

- 1) Sowohl myc:photB1 als auch HA:phy4 werden nicht quantitativ an die *Beads* / aneinander gebunden
- 2) Auch in der Negativkontrolle (IP-AK) treten schwache HA:phy4-Banden auf.

Problem 1 kann entgegengewirkt werden, indem das Verhältnis der anti-myc-Antikörper zu *Beads* zu myc-*getaggetem* Protein zu optimieren. Der Einsatz von zu viel Antikörper hätte zur

Folge, dass (laut Massenwirkungsgesetz) viele für die IP-eingesetzten Antikörper (ob frei oder an *Beads* gebunden) unbesetzt bleiben. Eine Möglichkeit wäre, die anti-myc-Antikörper an die *Beads* zu koppeln und überschüssige Antikörper durch Waschen zu entfernen. Dies hätte den Vorteil, dass keine freien anti-myc-Antikörper für eine HA:phy4-Bindung zur Verfügung stehen (die aber mit dem ÜS der IP verloren gehen würden). Ein zu großer *Bead*-Überschuss (=zu wenig Antikörper) hingegen würde dazu führen, dass viele Protein G-Bindestellen der *Beads* unbesetzt bleiben, an denen unspezifische Bindungen stattfinden können. Zudem kann auch in dieser Konstellation das myc:phot-Fusionsprotein nicht quantitativ präzipitiert werden. Auch die Reihenfolge der Inkubation von Proteinextrakt, Antikörper und *Beads* wird vermutlich eine Rolle spielen – daher könnte man auch die *Beads* zunächst mit Antikörper sättigen, was einen ähnlichen Effekt haben könnte, wie die Anwendung AK-gekoppelter *Beads*. Zunächst wurde aber der Extrakt zuerst mit Antikörpern versetzt und erst nach erfolgter Inkubation durch *Beads* ergänzt (da die Anleitung der Protein G *magnetic Beads* diese Reihenfolge vorschlug).

Auch der Lösung von Problem 2 sollte eine Anpassung von Antikörper-*Bead*-Verhältnis zuträglich sein. Darüber hinaus können mehrere Strategien angewendet werden, um unspezifische Bindung von Proteinen/HA:phy4 an *Beads* zu verringern: (a) mehr/längere Waschschrte der *Beads* nach der IP (ggf. mit höherer Salzkonzentration/Detergenz; es wurde im Folgenden von drei auf vier Waschschrte mit Detergenz erhöht), (b) Anwendung anderer *Beads* (z.B. Agarose *etc.*), (c) (Aus)tausch der *Tags*, (d) *Pulldown* mit einem Antikörper, der gegen den anderen Partner gerichtet ist (hier: Anti-HA), (e) ein sogenannter *Preclearing*-Schritt vor der IP beinhaltet die Inkubation des Proteinlysates mit *Beads* alleine und könnte somit unspezifisch bindende Proteine wegfangen (wurde hier aber nicht angewendet, da HA:phy4 offensichtlich auch unspezifisch an *Beads* bindet aber nicht entfernt werden soll) oder (f) unbesetzte Protein G-Bindestellen der *Beads* könnten mit einem von Anti-myc-AK verschiedenen Antikörper oder auch mit z.B. BSA abgesättigt werden (setzt aber eine andere Inkubationsreihenfolge voraus (s.o.)).

Unabhängig davon wurden Alkaline-Phosphatase-gekoppelte sekundäre WB-Antikörper ab dem obigen Experiment mittels eines luminogenen Substrates (CDP-Star, NEB) und Lumi-*Imager* detektiert. Vergleichende Experimente offenbarten zwar keine Erhöhung der Sensitivität, aber die Detektionsmethode bietet zumindest die Möglichkeit, denselben *Blot* mit unterschiedlichen Expositionszeiten zu dokumentieren.

Zunächst wurde ein Titrationsexperiment mit konstanter Antikörpermenge und variierenden *Bead*-Mengen durchgeführt, dessen Ergebnis in Abbildung 4-13 dargestellt ist.

4. Ergebnisse

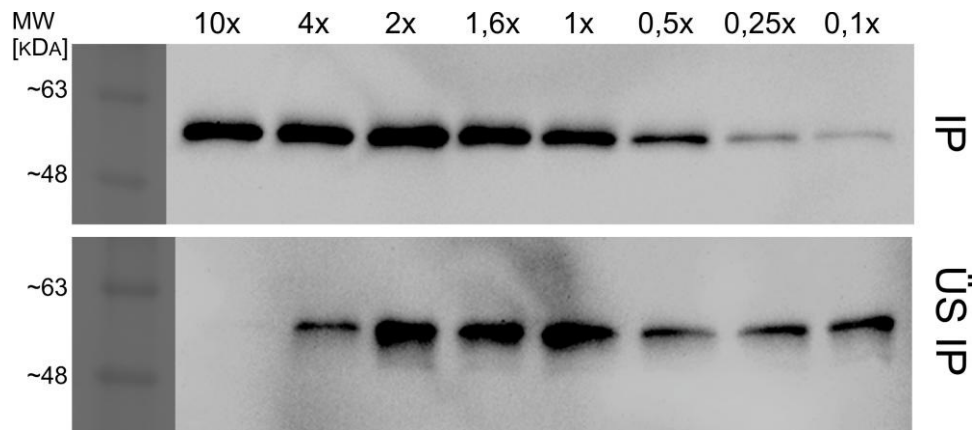


Abbildung 4-13: Anti-myc- Western Blots von Immunopräzipitations-Experimenten mit konstanter Anti-myc-Antikörpermenge (2 µg) und variierender Menge an Protein G *magnetic Beads* im Bereich zwischen 10-fachem *Bead*-Überschuss (10x = 50 µl, bezogen auf die maximale Antikörper- Protein G-Bindekapazität der *Beads*) über die (theoretisch) der Bindekapazität entsprechende *Bead*-Menge (1x) bis hin zu 10-fachem Antikörperüberschuss (0,1x). 50 % der IP-Reaktionen (oben) bzw. ca. 12 % der Überstände nach der IP (unten) wurden aufgetragen.

Die 2-fach gewaschenen Protein G *magnetic Beads* wurden in einem Gesamtvolumen von 100 µl Extraktionspuffer mit je 2 µg Anti-myc-Antikörper gemischt, ca. 35 min im 4 °C-Kühlraum auf Eis inkubiert, der ÜS entfernt und die *Beads* drei mal mit 300µl Puffer gewaschen. Es sieht so aus, als sei ab einem *Bead*-Überschuss von 2x immer die gleiche Menge an Anti-myc-Antikörper an die *Beads* gebunden worden, während unterhalb von 2x die Menge an gebundenem Antikörper der Abnahme der *Beads* entsprechend graduell abnimmt. Bei der Betrachtung der Überstände der IP-Reaktionen wird deutlich, dass bei dem bisher verwendeten *Bead*-Überschuss von 1,6x und auch bei 2x bzw. 1x sehr viel Antikörper nicht an die *Beads* bindet, sondern im Überstand verbleibt. Bei Antikörper-*Bead*-Verhältnissen <1 wäre im ÜS eine der abnehmenden Menge an gebundenen AK entsprechende höhere Antikörpermenge zu erwarten gewesen. Möglicherweise wird ein gewisser Anteil der gebundenen Antikörper (insbesondere bei hohem Antikörper-Überschuss) durch die Waschschrte wieder entfernt. Es konnte beobachtet werden, dass die Durchmischung von *Beads* in dem geringen Flüssigkeitsvolumen (100 µl) nicht sehr effizient war (eine gewisse Menge an *Beads* setzte sich an der Gefäßwand ab), was möglicherweise bei sehr geringen *Bead*-Mengen einen gravierenderen Einfluss auf die Präzipitation des Antikörpers haben kann. Bei *Bead*-Mengen >2x ist zu erkennen, dass immer weniger Antikörper im ÜS verbleibt und dass bei einem *Bead*-Überschuss zwischen 4x und 10x alle Antikörper präzipitiert werden.

Dieses Experiment sagt aus, dass das bisher verwendete Antikörper-*Bead*-Verhältnis suboptimal war, nicht jedoch welche absolute Menge an *Beads* bzw. Antikörpern im Verhältnis zu myc-Fusionsproteinen im Lysat eingesetzt werden sollte. Dazu wurden verschiedene IP-Experimente durchgeführt: zunächst wurde die *Bead*-Menge und das eingesetzte Lysatvolumen konstant gehalten und die Antikörpermenge variiert: 4,8-facher AK-Überschuss (60 µg), 1,6-facher AK-Überschuss (wie bislang, 20 µg), ca. 2-facher *Bead*-Überschuss (7 µg) und ca. 6,5-facher *Bead*-Überschuss (2 µg, s. Abbildung 4-14). Zusätzlich wurde auch überprüft, ob nach der IP noch myc:photB1 im ÜS vorhanden war, indem nochmals *Beads* zugegeben und die IP wiederholt wurde. Exemplarisch ist dies für eine Anti-myc-IP mit 20 µg AK in Abbildung 4-14 dargestellt. Abgesehen davon wurden auch *EZview Red Protein G Affinity Gel-Agarose-Beads* (Sigma E3403) in einem Anti-myc-Pulldown mit

4. Ergebnisse

20µg AK u. einem theoretischen *Bead*-Überschuss von 1,6 ausprobiert. Myc:photB1 bindet allerdings auch in AK-Abwesenheit sehr stark an die *Beads* (nicht gezeigt) und auch HA:phyA zeigt in dieser Konformation eine leichte Bande, weshalb diese Herangehensweise wieder verworfen wurde.

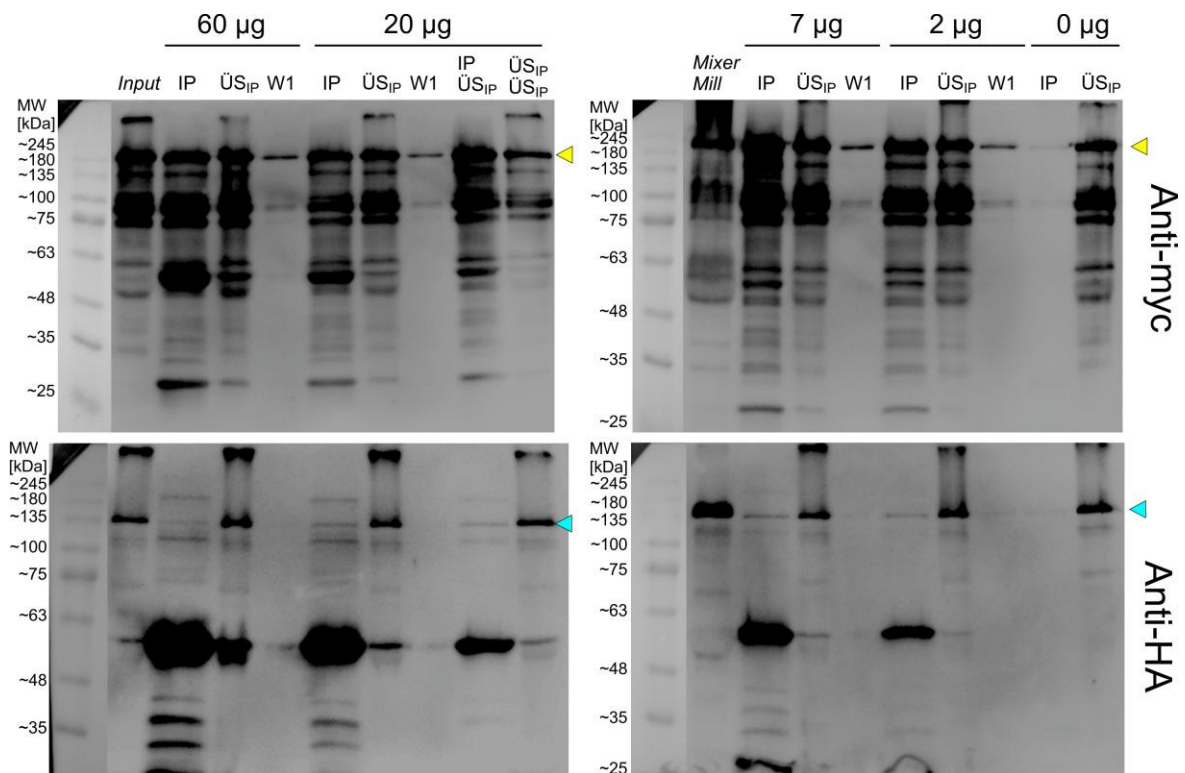


Abbildung 4-14: Western Blots der Immunopräzipitationen von myc:photB1 mit 60 µg, 20 µg, 7 µg, 2 µg und ohne Anti-myc-Antikörper mit 80µl Protein G *magnetic Beads* und Detektion von (co-)immunopräzipitierten phot- bzw. phy4-Fusionsproteinen mit Anti-myc- (oben) bzw. Anti-HA-Antikörpern (unten). Detektion der Alkaline-Phosphatase-gekoppelten sekundären Antikörper mittels CDP-Star und Lumi-Imager. Myc:photB1 und HA:phy4-Banden sind mit einem gelben bzw. blauen Pfeil markiert.

Bei den Immunopräzipitationen der myc:photB1-Fusionsproteine mit unterschiedlichen Antikörpermengen ist keine sehr deutliche Änderung der an die magnetischen *Beads* gebundenen Proteinmengen erkennbar (obere *Blots*). Im Vergleich zur *Input*-Bande scheint die IP mit 7 µg AK am ehesten zu einer Aufkonzentrierung von myc:photB1 in der *Bead*-Fraktion zu führen, aber auch hier verbleibt noch sehr viel Protein im Überstand. Dass ungebundene Antikörper/myc:photB1-Fusionsproteine im Überstand der IPs noch in großer Menge vorhanden sind und durch nochmalige *Bead*-Zugabe präzipitiert werden können wird deutlich, wenn man die letzten beiden Spuren der *Blots* auf der linken Seite betrachtet (IP des Überstandes der IP mit 20 µg AK): die IP-Bande des Überstandes ist sogar stärker ausgeprägt, als die der eigentlichen IP, was (nochmals) dafür spricht, dass dieses AK-*Bead*-Extrakt-Verhältnis suboptimal ist. Nach der zweiten IP sieht es aber zumindest so aus, als sei die myc:photB1-Konzentration im Überstand deutlich reduziert worden. Auch in der IP ohne AK ist eine schwache myc:photB1-Bande erkennbar.

Die unterschiedlichen Mengen an Anti-myc-Antikörper sind auf den HA-*Blots* (unten) besonders deutlich (~60 kDa), da hier 66 % der IP-Lysate aufgetragen wurden und der sekundäre Anti-Maus-Antikörper an die Anti-myc-Antikörper (aus Maus) bindet und somit zu einem *Western Blot*-Signal führt. Betrachtet man die HA:phy4-Protein-Co-IPs, wird deutlich,

4. Ergebnisse

dass die höchste Anti-myc-AK-Menge (~4,8-facher AK-Überschuss) am ungünstigsten für die Präzipitation ist, denn hier ist die IP-Bande am schwächsten. Die IP-Banden in allen anderen Konformationen (auch in der IP des Überstandes der 20 µg-Anti-myc-IP) scheinen in etwa vergleichbar zu sein. In allen Ansätzen ist die Bande im Überstand der IPs stärker, als in der IP selbst und in etwa mit dem *Input* vergleichbar. Dies deutet entweder darauf hin, dass die AK-*Bead*-Extrakt-Verhältnisse weiter optimiert werden sollten, oder dass nur eine Subpopulation der HA:phy4-Proteine mit myc:photB1 assoziiert ist (was den *Split-YFP*-Beobachtungen von Dr. Mailliet entsprechen würde). Auch in der Negativkontrolle ist (wie zuvor) eine schwache Bande erkennbar.

Im nächsten Schritt wurde versucht, die HA:phy4-Fusionsproteine mit (nun vorhandenen) monoklonalen Anti-HA-Antikörpern zu präzipitieren, deren Konzentration und auch die Menge an *Beads* zu variieren.

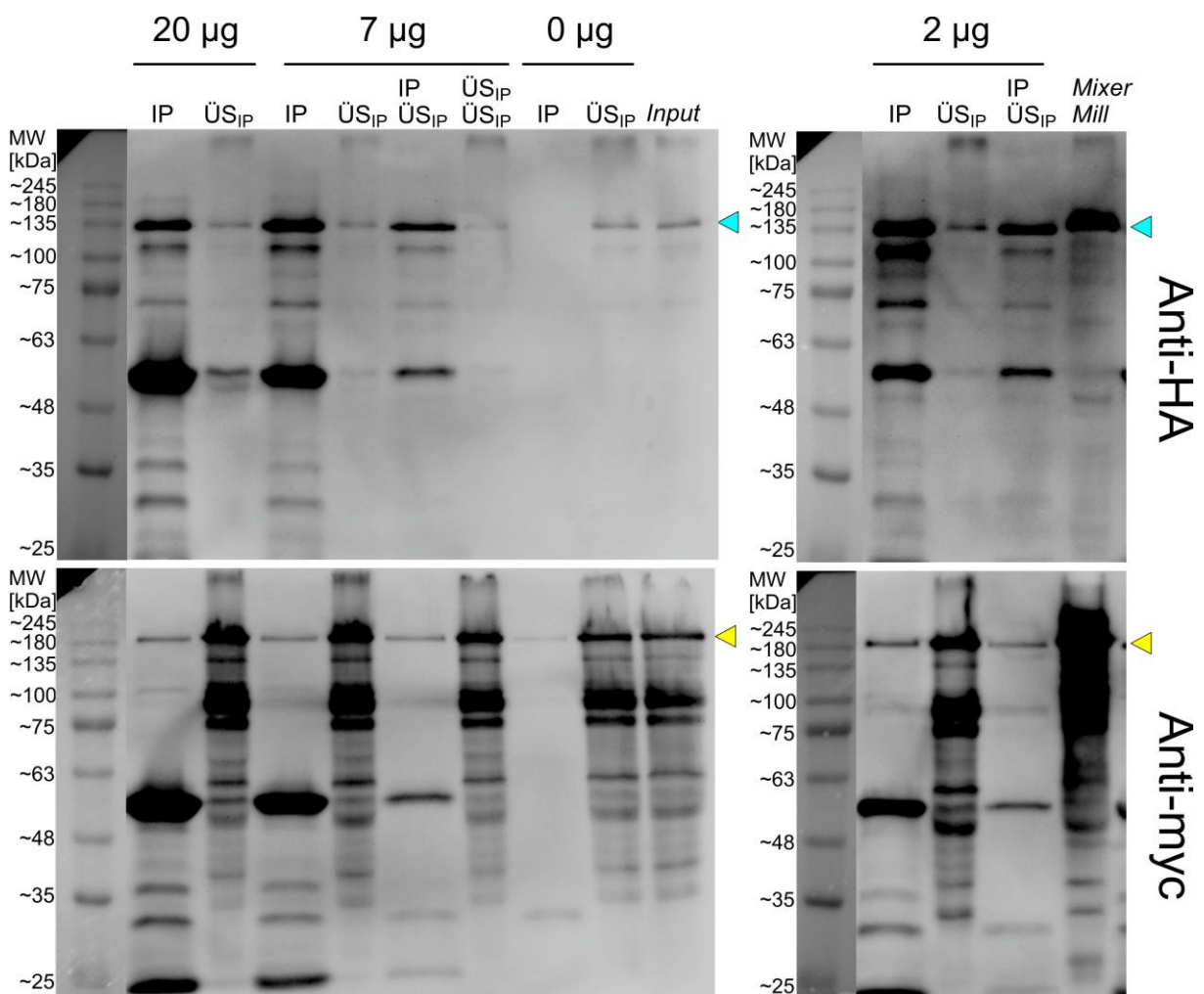


Abbildung 4-15: Western Blots der Immunopräzipitationen von HA:phy4 mit 20 µg, 7 µg, 2 µg und ohne Anti-HA-Antikörper mit 80 µl Protein G *magnetic Beads* und Detektion von (co-)immunopräzipitierten phy4- bzw. photB1-Fusionsproteinen mit Anti-HA- (oben) bzw. Anti-myc-Antikörpern (unten). Detektionsmethode und Markierung der Banden entspricht Abbildung 4-14.

Bei der IP von HA:phy4 mit 20 µg (~1,6-facher AK-Überschuss), 7 µg (~2-facher *Bead*-Überschuss), 2 µg (~6,5-facher *Bead*-Überschuss) und ohne Anti-HA-Antikörper ist zu erkennen, dass in allen Ansätzen außer der Negativkontrolle eine Aufkonzentrierung in der

IP-Fraktion im Vergleich zum *Input* stattfindet (obere *Blots*). Dies scheint bei den IPs mit 7 und 2 µg am stärksten ausgeprägt zu sein und führt evtl. sogar zu einer sichtbaren Verringerung an detektierbarem HA:phy4 in den Überständen nach der IP (was zuvor bei IPs von myc:photB1 nicht der Fall war). Dennoch kann durch erneute *Bead*-Zugabe zu den Überständen der 7 µg und 2 µg-IPs noch einmal eine beträchtliche Menge an HA:phy4 präzipitiert werden, aber es war nicht so viel des Fusionsproteins im ÜS vorhanden, wie es noch bei den myc-IPs der Fall war. In der IP ohne Antikörper ist keine Bande zu sehen.

Die Detektion von Co-immunopräzipitierten HA-Fusionsproteinen (*Blots* unten) zeigt, dass auch in dieser Konstellation eine Bindung des zweiten Partners an die *Beads* erfolgt ist. Vergleicht man die Bandenintensitäten der HA:phy4-Banden in den IP-Fraktionen, ist zu erkennen, dass zwischen der Verwendung von 20 µg und 7 µg Anti-HA-Antikörper (und der zugehörigen IP mit dem resultierenden Überstand) kein deutlicher Unterschied besteht. Eine Erhöhung der *Bead*-Menge auf 100 µl bei einer IP mit 7 µg AK (~2,5-facher *Bead*-Überschuss) verstärkt zwar die IP-Bande, aber auch diejenige in der Negativkontrolle ohne AK (nicht gezeigt). Evtl. ergibt der Einsatz von 2 µg AK die stärkste Bande (nicht zu 100 % vergleichbar, da diese Proben auf einem anderen *Blot* sind). Auch in diesem Fall präzipitiert die nochmalige *Bead*-Zugabe zuvor ungebundene Anti-HA-Antikörper mit assoziierten HA:phy4-myc:phot1-Komplexen, allerdings in geringerem Ausmaß, wie bei der IP mit 7 µg AK. Daher sprach nichts dagegen, diese Antikörpermenge beizubehalten. In der Negativkontrolle ohne AK ist auch eine schwache Bande zu erkennen.

Um die nach wie vor vorhandene unspezifische Bindung von (Fusions)proteinen an die *Beads* in der -AK-Negativkontrolle zu unterdrücken, wurde zum einen ein GFP-Antikörper ausgewählt, der zwar die Bindestellen besetzen sollte, aber nicht mit den Fusionsproteinen interferieren sollte. Zum anderen wurde die *Bead*-Menge um die Hälfte verringert (~3-facher *Bead*-Überschuss, s. Abbildung 4-16).

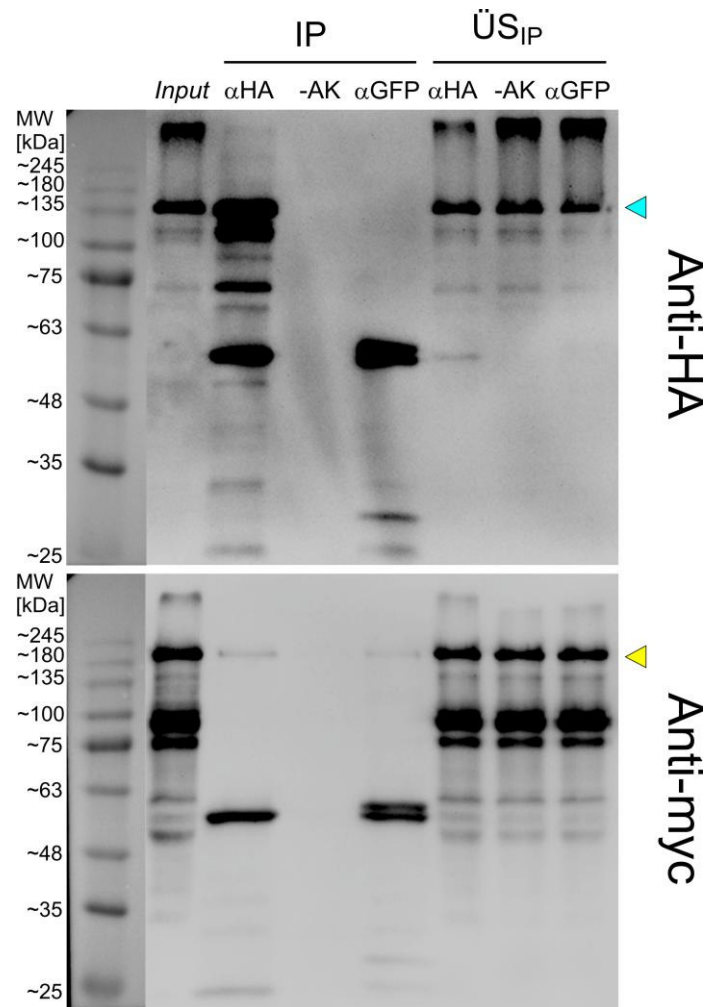


Abbildung 4-16: Western Blots der Immunopräzipitationen von HA:phy4 mit 2 µg und ohne Anti-HA-Antikörper bzw. mit 2 µg Anti-GFP-Antikörper mit 40 µl Protein G *magnetic Beads* und Detektion von (co-)immunopräzipitierten phy4- bzw. photB1-Fusionsproteinen mit Anti-HA- (oben) bzw. Anti-myc-Antikörpern (unten). Detektionsmethode und Markierung der Banden entspricht Abbildung 4-14.

In Abbildung 4-16 ist zu erkennen, dass die Anti-GFP-Antikörperzugabe nicht dazu führt, unspezifische Bindung der myc:photB1-Proteine an die *Beads* zu verringern (eher im Gegenteil, s.u.), weshalb dieser Ansatz wieder verworfen wurde. Die Halbierung der *Bead*-Menge hingegen hat einen positiven Einfluss auf die Negativkontrolle, in der nun kein myc:photB1-Signal mehr aber gleichzeitig eine distinkte Bande in der IP zu erkennen ist. Dass im IP-Überstand noch beide Fusionsproteine vorhanden waren, wurde billigend in Kauf genommen (auch wenn das Protokoll noch hätte weiter optimiert werden können, denn in den Überständen ist auch noch AK vorhanden). Es ist zudem nicht ausgeschlossen, dass nur eine Subpopulation von HA:phy4 an (eine Subpopulation) von myc:photB1 bindet. Für die entsprechenden IP-Experimente mit myc:photA1 und für Negativkontrollen wurden folglich 2 µg Anti-HA-Antikörper und 40 µl *Beads* eingesetzt.

Da in der Anti-GFP-IP auch eine (schwache) myc:photB1-Bande evident war, stellte sich die Frage, wie zuverlässig die zuvor erhaltenen IP-Ergebnisse waren. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass myc:photB1 an (einen beliebigen) Antikörper bindet anstatt an HA:phy4, wurden IP-Experimente mit Extrakten aus einzeln infiltrierten Blättern mit myc:phot / ohne HA:phy4 durchgeführt.

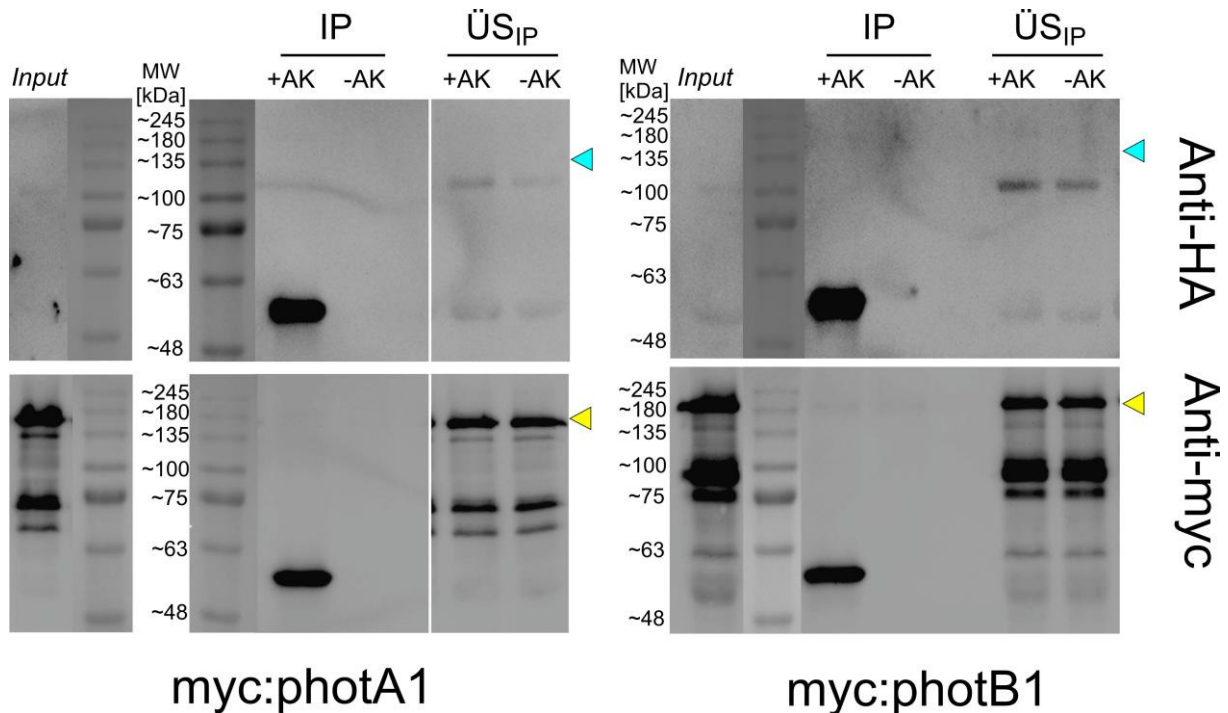


Abbildung 4-17: Western Blots der myc:photA1- und myc:phot-B1-IP-Negativkontrollen.

Myc:phot-Fusionsproteine wurden aus P19-co-exprimierenden Blättern extrahiert und IP-Reaktionen wurden mit (+AK) und ohne 2 µg Anti-HA-AK (-AK) mit 40 µl Protein G *magnetic Beads* durchgeführt. Anti-HA-Blots (oben) und Detektion von photB1-Fusionsproteinen mit Anti-myc-Antikörpern (unten). Detektionsmethode und Markierung der Banden entspricht Abbildung 4-14.

Die IP-Negativkontrollen zeigen, dass in Abwesenheit von HA:phy4 (Blots oben: keine Banden bei ca.140 kDa) keine IP von myc:phot-Fusionsproteinen stattfindet. Lediglich in *Input* und in den Überständen der IPs sind Banden erkennbar. Dies bedeutet, dass die myc:phot-Banden in den IPs nur zustande kommen können, wenn HA:phy4 anwesend ist und zeigt somit (indirekt), dass myc:phot an HA:phy4 und nicht an die Antikörper bindet.

4.3.1.5 Co-IP von HA:phy4 mit myc:phots

Mit dem in 4.3.1.4 etablierten Protokoll wurden nun HA:phy4-Fusionsproteine aus dem Proteinextrakt aus den transient transformierten Tabakblättern mit Anti-HA-Antikörpern und Protein G *magnetic Beads* in Rc immunopräzipitiert (s. Abbildung 4-18 oben). Dies führte reproduzierbar zu einer starken Aufkonzentrierung von HA:phy4 aus dem Extrakt (*Input*) in der IP-Fraktion, während die Menge an HA:phy4 im IP-Überstand in Relation zum *Input* sichtlich verringert wurde. Eventuell co-immunopräzipitierte myc:phot-Fusionsproteine wurden auf *Western Blots* mittels Anti-myc-Antikörpern detektiert (s. Abbildung 4-18 unten). Sowohl für myc:photB1 als auch myc:photA1 war es möglich, eine distinkte Bande in der HA:phy4-IP (in R) nachzuweisen, während in der entsprechenden -AK-Negativkontrolle keine Bande zu detektieren war (Abbildung 4-18 B). In den WT-Extrakten war ebenfalls kein Signal erkennbar. Analog wurden auch Co-IPs mit HA:phy4 und myc:photA2 bzw. myc:photB2 durchgeführt. Myc:photA2 co-immunopräzipitierte in ähnlicher Art und Weise mit HA:phy4 (mit einer sehr schwachen Bande in der -AK-Negativkontrolle), während bei der myc:photB2-Co-IP eine sehr distinkte Bande zu beobachten war, allerdings auch bei der Negativkontrolle (Abbildung 4-18 B unten).

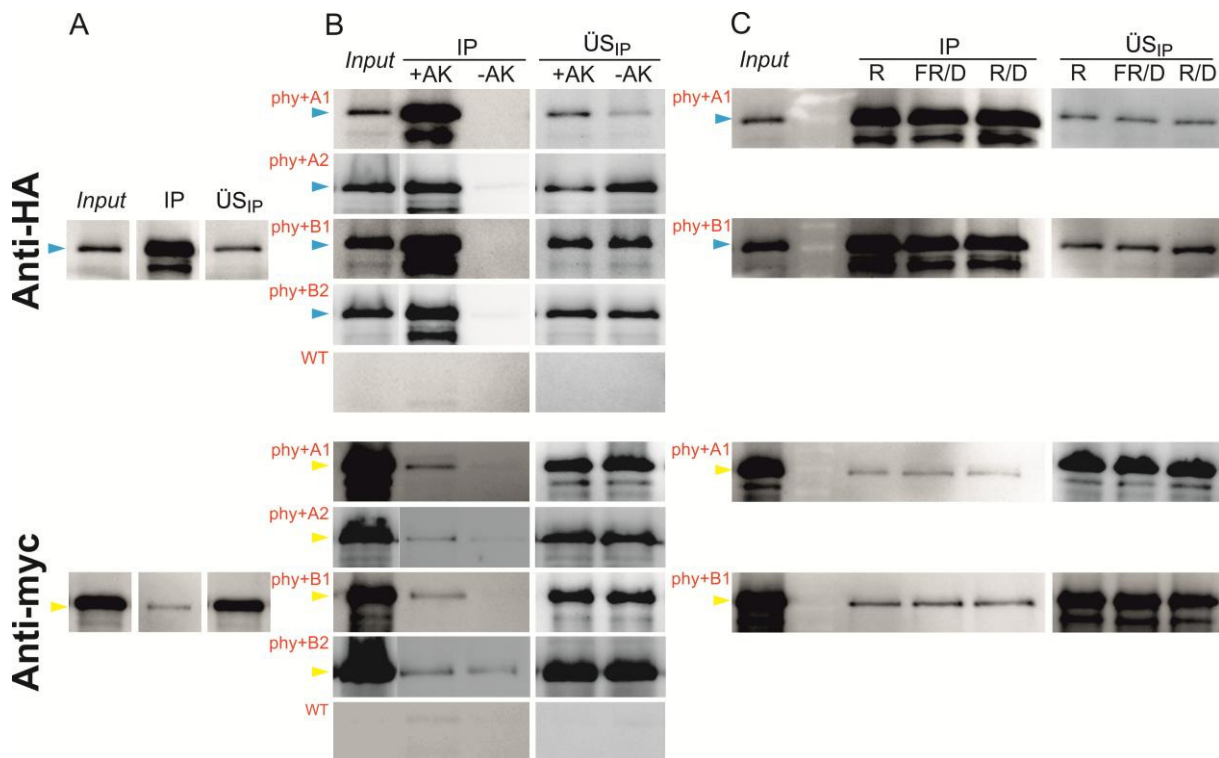


Abbildung 4-18: Co-IPs von HA:phy4 und myc:photA1, -A2, -B1 & -B2 in verschiedenen (*in vivo* und *in vitro*) Lichtbedingungen und mit Proteinextrakten aus untransformierten Blättern (WT) als Negativkontrolle. Co-IPs wurden mit 2 µg Anti-HA-Antikörper und 40 µl *magnetic Beads* in Rc (B) oder in D (A & C) durchgeführt. In (A) wurden lichtgewachsene infiltrierte Tabakpflanzen 10' mit FR bestrahlt und anschließend 18h in D inkubiert. Die Extraktion fand ebenfalls in D statt. In (C) wurde die Extraktion in WL durchgeführt und Proben vor der IP in D mit FR- oder R-Pulsen bestrahlt und mit einer IP in Rc (wie in B) verglichen. *Input*, IPs und Überstände der IPs wurden mit Anti-HA- (oben, HA:phy4 mit blauen Pfeilen markiert) bzw. Anti-myc-Antikörpern (unten, gelbe Pfeile = myc:phot) detektiert. 33% bzw. 66% der IPs wurden für HA- bzw. myc-*Blots* eingesetzt. *Input* und ÜSe entsprechen ca. 1 % der Extrakte. Abbildung aus Jaedicke *et al.* (2012) ergänzt.

Zudem sollten mögliche Lichteffekte auf die *in vivo* und/oder *in vitro* phy4-phot-Interaktion untersucht werden. Dazu wurden zum einen ganze Tabakpflanzen am Abend vor dem Experiment mit einem FR-Puls bestrahlt und Pflanzen bzw. Extrakte bis zur IP in D belassen (Abbildung 4-18 A). Die Vorbehandlung von HA:phy4/myc:photB1/P19-transient transformierten Blättern mit einem FR-Puls führt scheinbar nicht zum Verlust des IP-Signals, denn in der IP ist eine Bande mit vergleichbarer Intensität wie in B zu erkennen. Es scheint somit auch eine Interaktion von HA:phy4-Pr mit myc:photB1 stattzufinden. Zum anderen wurden Proteinextrakte wie gewöhnlich in WL angefertigt und Proben vor der IP in D (*in vitro*) mit einem R- oder FR-Puls bestrahlt. Zum Vergleich wurde mit einem weiteren Aliquot des Extrakts eine IP in Rc durchgeführt (Abbildung 4-18 C). Die Intensitäten der myc:phot-Co-IP-Banden nach FR- bzw. R-Vorbehandlung und IPs in D sind vergleichbar mit der IP in Rc. Auch hier ist keine Lichtabhängigkeit der phy-phot-Interaktion evident.

4.3.2 Charakterisierung der Interaktion von phyA mit *Arabidopsis* Phototropinen

Nachdem die phy4-Interaktion mit allen *Physcomitrella*-Phototropinen sowohl in *Y2H*, *Split-YFP* und Co-IP demonstriert werden konnte, stellte sich die Frage, ob eine solche Interaktion auch für *Arabidopsis* phyA mit phot1 und/oder phot2 nachgewiesen werden kann. Für die

PNAS-Publikation war bereits von Dr. Mailliet demonstriert worden, dass keine direkte *Y2H*-Interaktion von BD:phyA (in pGBK) mit AD:phot1 bzw. AD:phot2 stattfindet (s. Doktorarbeit Mailliet), wohingegen eine deutliche Interaktion von phyA mit phot1 an der Zwiebel-Plasmamembran im *Split-YFP* zu beobachten war (Jaedicke *et al.*, 2012).

4.3.2.1 *Y2H*- und *Y3H*-Experimente

Eine Möglichkeit für eine ausbleibende *Y2H*-Interaktion zwischen phyA und phot1 könnte sein, dass mögliche Bindestellen durch die Faltung des Volllängen-Fusionsproteins maskiert werden. Dies konnte zum Beispiel bei dem *Y2H*-Interaktionsnachweis von *Arabidopsis* phot1 mit PHYTOCHROME-DEPENDENT LATE FLOWERING (PHL) beobachtet werden, denn lediglich der phot1-C-Terminus, nicht jedoch (der N-Terminus und) das Volllängenprotein war in der Lage, mit PHL zu interagieren (Endo *et al.*, 2013). Daher wurde versucht, ein analoges Experiment mit Volllängen-phyA-*Baits* und der genannten Publikation entsprechenden phot-Hälften als *Preys* zu gestalten. N- bzw. C-terminale ADg-Fusionen an phot-Hälften wurden, wie in 3.1.3.1 und 3.1.3.2 beschrieben, hergestellt und in Hefe mit BD:phyA oder phyA:BD kombiniert. Mit doppelt transformierten Hefen wurde ein semiquantitatives Wachstums-*Assay* auf *TSD*+PCB in verschiedenen Lichtbedingungen durchgeführt.

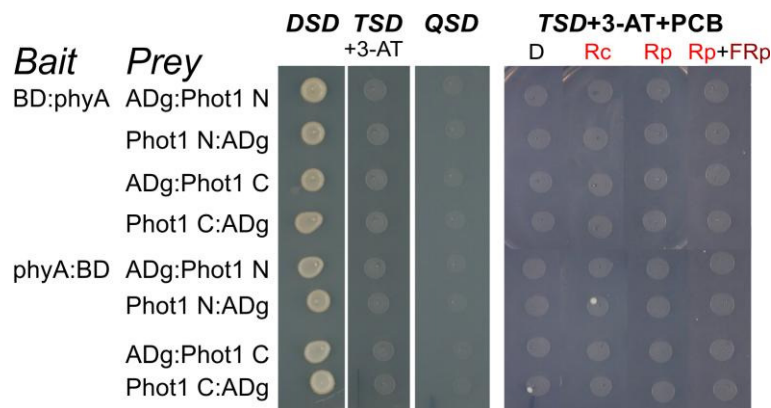


Abbildung 4-19: Semiquantitatives *Y2H*-Wachstums-*Assay* zur Untersuchung der Interaktion von (Holo-) BD:phyA (phyA pGBK) und phyA:BD (phyA pBAC) mit ADg:phot1 N, phot1 N:ADg, ADg:phot1 C und phot1 C:ADg auf *DSD*, *TSD* mit 0,5 mM 3-AT, *QSD* und auf *TSD*+3-AT + PCB in D, Rc, Rp und Rp+FRp.

Keines der partiellen ADg-phot-Konstrukte führte zu einer Wachstumsantwort mit phyA – weder in Apo- noch in Holo-phy-Kombination (Abbildung 4-19). Daher scheint zumindest keine Maskierung einer putativen phyA-Bindestelle im Phototropin N- bzw. C-Terminus vorzuliegen. Interaktion von phot1 FL/N/C mit phyA-Hälften wurden nicht untersucht.

Aus dem negativen *Y2H*-Ergebnis aber dem positiven *Split-YFP*-Interaktionsnachweis wurde geschlussfolgert, dass zwar eine Interaktion zwischen phyA und phot1 möglich ist, jedoch wahrscheinlich weitere Komponenten als Vermittler der Interaktion in einem Plasmamembran-Signalkomplex nötig sind, die *in planta*, jedoch nicht in Hefe vorhanden sind. Aus der *Arabidopsis* Phytochrom- und Phototropin-Literatur ist bekannt, dass PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 1 (PKS1) und NON PHOTOTROPIC HYPOCOTYL 3 (NPH3) sowohl mit Phytochrom, als auch mit Phototropin interagieren können (Lariguet *et al.*, 2006; de Carbonnel *et al.*, 2010). Die NPH3-phot1-Interaktion findet dabei sogar an der Plasmamembran statt (Zhao *et al.*, 2013). Daher wurde versucht, ein *Y3H*-System anzuwenden, in dem nicht nur ein *Bait*- und ein *Prey*-Fusionsprotein, sondern zusätzlich ein *Bridge*-Protein in Hefe exprimiert wird (s. 3.3.12). Die *Bridge*-Protein-Expression ist dabei über

4. Ergebnisse

die Methionin-Konzentration im Selektionsmedium steuer-/reprimierbar. So kann ggf. eine BD:phyA-AD:phot-Interaktion in Anwesenheit von PKS1 oder NPH3 nachgewiesen werden (Abbildung 4-20 B).

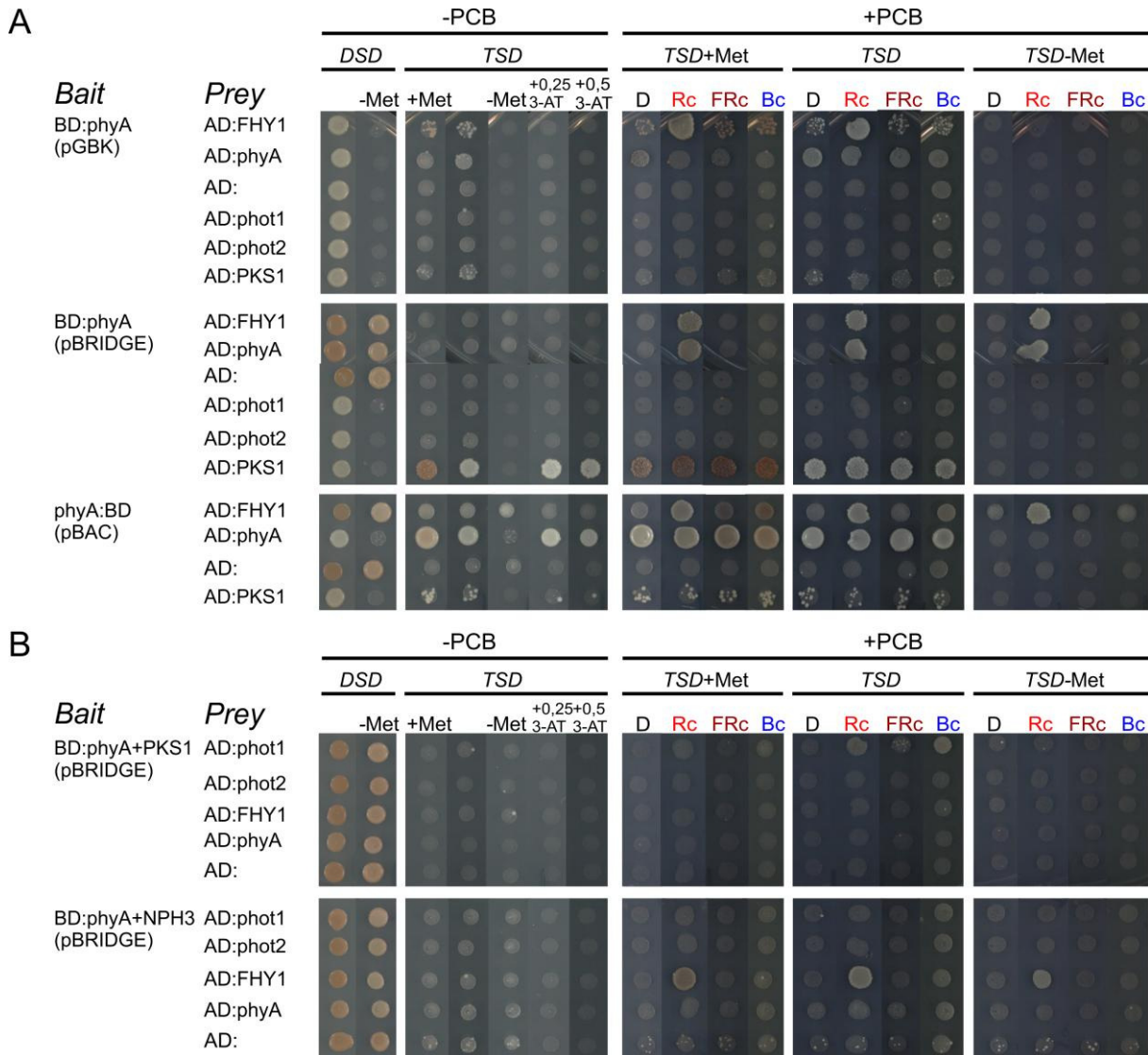


Abbildung 4-20: *Y2H*- (A) und *Y3H*- (B) Untersuchungen der phyA-phot-Interaktion in Abwesenheit (A) und in Anwesenheit von NPH3 oder PKS1 (B) mit einem semiquantitativen Wachstums-Assay in D, Rc, FRc und Bc. Als Kontrollen dienen Interaktionen von phyA mit sich selbst (Dimerisierungskontrolle), FHY1, PKS1 und der AD alleine. 2×10^5 Hefen/*Spot* wurden auf *TSD*-Medien mit erhöhter Methioninkonzentration (+Met), mit normaler Met-Konzentration des *TSD*-Mediums und ohne Methionin (-Met) aufgetropft, um die Expression des *Bridge*-Proteins zu unterdrücken bzw. zu induzieren.

Abbildung 4-20 A zeigt Interaktionen mit BD:phyA (in pGBK bzw. pBRIDGE) und phyA:BD (in pBAC) ohne *Bridge*-Proteine. Es ist erkennbar, dass Hefen auf Methionin-Mangelmedium schlechter wachsen, da die meisten im Vorfeld nicht dahingehend selektiert wurden. Umgekehrt scheint die höhere Methionin-Konzentration nahezu keinen Einfluss auf das Hefewachstum im *Y2H*-Experiment zu haben. Es wird hier vorwiegend das Wachstumsverhalten auf *TSD* betrachtet. Die phyA-FHY1-Interaktion findet in allen Konformationen R-abhängig statt, sodass die Autoassemblierung und Pfr-Ausbildung stattgefunden haben muss. Die phyA-Dimerisierung ist besonders im Fall phyA:BD+AD:phyA

konstitutiv und sehr deutlich ausgeprägt, während BD:phyA (pGBK)+AD:phyA auch konstitutiv aber schwächer interagieren. BD:phyA (in pBRIDGE) dimerisiert hingegen R-verstärkt (was auch für phy4 im ONPG-*Assay* beobachtet werden konnte, jedoch nicht in solch starkem Ausmaß weshalb dies nicht im Wachstums-*Assay* detektierbar war). Obwohl in diesem Experiment auf 3-AT verzichtet wurde, ist auf den PCB-Platten (mit Ausnahme der B-Bestrahlung) nahezu keine Autoaktivierung erkennbar (vgl. Kombinationen mit AD: alleine). Mit keiner der N-terminal fusionierten BD-phyA-Fusionen konnte eine Interaktion mit AD:phot1 oder AD:phot2 nachgewiesen werden, was die Beobachtungen von Dr. Mailliet bestätigt. Als Kontrolle wurde zusätzlich die Interaktion von phyA mit AD:PKS1 herangezogen, welche für alle drei phyA-*Baits* jedoch in unterschiedlicher Intensität in konstitutiver Art und Weise gezeigt werden konnte.

Panel B von Abbildung 4-20 stellt die Ergebnisse der *Y3H*-Experimente von BD:phyA+PKS1/NPH3 mit AD:phot1/phot2 dar. Wachstum auf *DSD*-Met-Medium zeigt an, ob Hefen im Vorfeld an Methionin-Mangelbedingungen gewöhnt wurden, was überall der Fall war. Es fällt auf, dass lediglich AD:phyA+NPH3 in der Lage ist (schwach) zu dimerisieren und eine starke lichtabhängige Interaktion mit FHY1 einzugehen. Bei BD:phyA+PKS1 ist dies nicht der Fall, was entweder bedeutet, dass PKS1 mit der Dimerisierung/FHY1-Interaktion interferiert, was aber auf dem +Met-Medium durch die Unterdrückung der PKS1-Expression ausgeglichen werden sollte. Alternativ könnte es sein, dass in diesen doppelt transformierten Hefen eines der *Bait*-oder *Prey*-Fusionsproteine nicht in ausreichender Menge exprimiert wird. Auch die Expression von NPH3 führt nicht zu einer Interaktion von BD:phyA mit AD:phot1 oder AD:Phot2, sodass dieses als *Bridge*-Protein ausgeschlossen werden kann. Bei der Co-Expression von PKS1 ist die Situation weniger klar, denn hier findet auf +Met- und auf -Met-Medium keinerlei Wachstum statt, während auf *TSD* (mit normaler Met-Konzentration) reproduzierbar ein R-verstärktes Wachstum in der Kombination mit BD:phyA+AD:phot1 zu beobachten ist (die Wachstumsantwort in B wurde mit dem Autoaktivierungslevel gleichgesetzt). Folglich stellte sich die Frage, ob es auf normalem *SD*-Medium auch zu einer Expression des *Bridge*-Proteins kommt, oder nicht. Daher wurden Hefen in -Trp/-Leu-*DSD*-Medium mit normaler bzw. erhöhter Methionin-Konzentration bzw. ohne Methionin angezogen, Proteine extrahiert und die Expression mittels *Western Blot* analysiert, wie in 3.3.12 und 3.5 beschrieben (s. Abbildung 4-21).

4. Ergebnisse

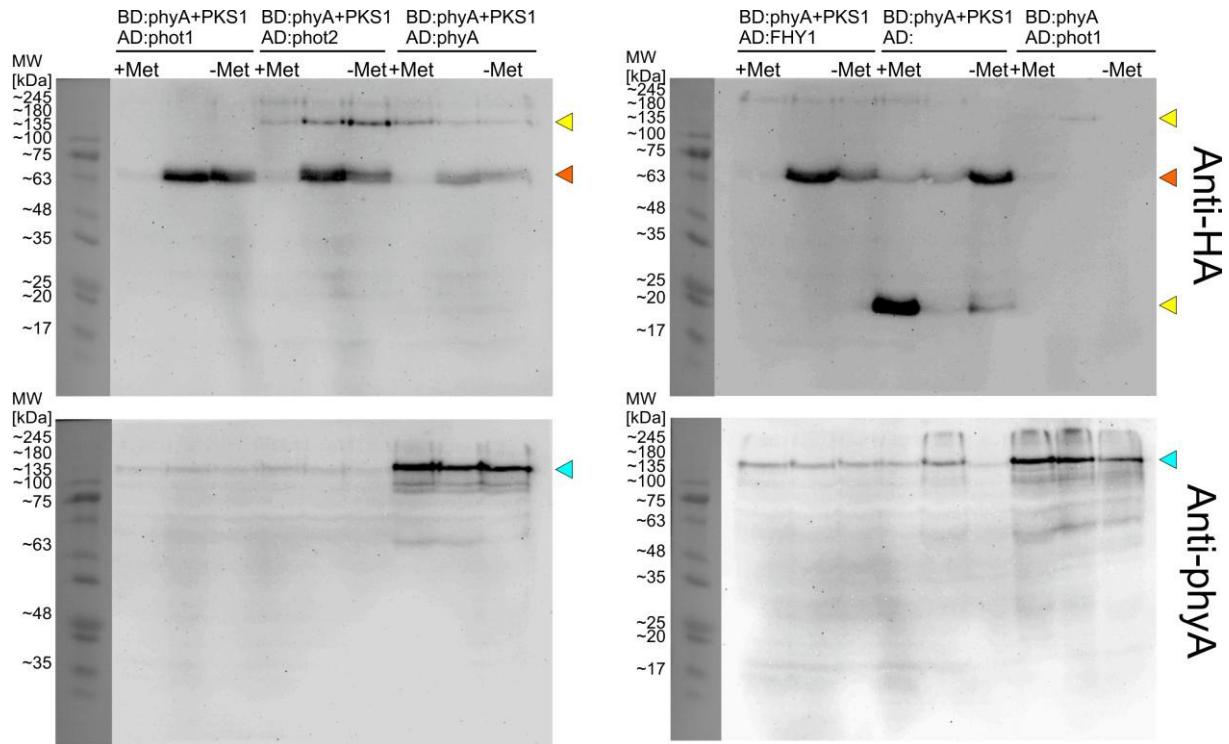


Abbildung 4-21: Expressionsnachweis von *Bait*-, *Prey*- und *Bridge*-Proteinen im *Y3H*-Experiment. Proteine wurden aus etwa gleich großen Hefe-*Pellets* extrahiert. Je 15 µl der Hefe-Proteinextrakte wurden aufgetragen. Anti-HA-Antikörper (*Blots* oben) detektieren AD:-Fusionsproteine (gelbe Pfeile), bzw. das PKS1-*Bridge*-Protein (orangefarbener Pfeil), während Anti-phyA-*Blots* (unten) BD:phyA bzw. AD:phyA (blauer Pfeil) detektieren.

Der Hefe-Expressionstest ergab, dass BD:phyA in allen Konformationen exprimiert wird (s. Banden bei ca. 140 kDa, wobei der Anti-phyA-*Blot* im Fall von BD:phyA+PKS1 – AD:phyA keine Diskriminierung zwischen BD:phyA und AD:phyA zulässt). Bei den AD:Fusionsproteinen fällt die Expression sehr unterschiedlich aus, wobei erwartungsgemäß kein Zusammenhang mit der Methionin-Konzentration zu bestehen scheint. AD:phot2 und AD:phyA (linke Seite) sind bei etwa 140 kDa zu erkennen, während bei AD:phot1 (zwischen 135 und 180 kDa) kein deutliches Signal sichtbar ist (allerdings spricht das Wachstumsverhalten im *Y3H*-Assay dafür, dass zumindest auf *TSD* eine Expression von AD:phot1 stattfindet, s. Abbildung 4-20B). In Kombination mit BD:phyA (rechter *Blot*) ist zumindest in normalem *SD*-Medium eine AD:phot1-Bande detektierbar.

AD:FHY1-Banden (bei ca. bei 50-60 kDa) sind leider nicht evident (in der Kombination mit BD:phyA+PKS1, rechter *Blot*), was die ausbleibende lichtabhängige phyA-FHY1-Interaktion im *Y3H*-Assay erklären könnte. Die AD ohne fusioniertes Protein (mit HA-Tag) erzeugt eine Bande bei ca. 20 kDa, was mit dem vorhergesagten Molekulargewicht von 20,5 kDa übereinstimmt. Es konnte in der Tat gezeigt werden, dass in allen Konformationen (außer BD:phyA+AD:phot1) eine beträchtliche Expression des PKS1-*Bridge*-Proteins stattfindet. Auch wenn die Expressionsanalyse nicht strikt quantitativ durchgeführt wurde, ist sichtbar, dass tendenziell ein Zusammenhang zwischen Methionin-Konzentration im Medium und PKS1-Expression besteht (ob vergleichbare Proteinmengen aufgetragen wurden, kann man anhand von unspezifischen Signalen abschätzen). In der Regel ist bei +Met kein HA:PKS1-Signal zu erkennen, während sowohl bei normaler, als auch reduzierter Methionin-Konzentration Expression nachgewiesen werden kann. Das bedeutet, dass im *Y3H*-Assay von BD:phyA+PKS1

mit AD:phot1 auf normalem *TSD*-Medium höchstwahrscheinlich ebenfalls PKS1 exprimiert wurde und für eine Interaktion zur Verfügung stand. Dass es sich bei PKS1 um ein oder das postulierte(s) Brückenprotein zwischen phyA und phot1 handelt, kann daher nicht ausgeschlossen (aber aufgrund der ausbleibenden Wachstumsantwort auf *TSD*-Met auch nicht eindeutig bestätigt) werden.

4.3.2.2 Co-IP von HA:phyA und myc:phot1

Um die in *Split-YFP* gezeigte phyA-phot1-Interaktion mit einer unabhängigen Methode zu bestätigen, wurden analog zu den Experimenten mit *Physcomitrella* phy4 und Phototropinen Co-IP-Experimente durchgeführt. Auch hier wurden HA:phyA und myc:phot1-Konstrukte in *Agrobacterium* transfiziert und zusammen mit einem P19-Plasmid tragenden *Agrobacterium* in *Nicotiana benthamiana* eingebracht. Um einen möglichen Einfluss von PKS1 auf die Interaktion untersuchen zu können, wurden N- und C-terminale FLAG- und GFP-PKS1-Fusionen in Expressionsvektoren von Nakagawa *et al.* (2007) hergestellt und Co-exprimiert. Leider war es nicht möglich, PKS1 während der Proteinextraktion (auch nicht nach der Mikrosomenextraktions-Methode von de Carbonnel *et al.* (2010)) stabil zu halten, weshalb PKS1 zumeist in / nach der Co-IP nicht mehr in nachweisbarer Menge vorhanden war. Daher zeigt Abbildung 4-22 ein Anti-HA-Co-IP-Experiment mit HA:phyA und myc:phot1 (und P19) alleine und die entsprechende Kontrolle ohne HA:phyA.

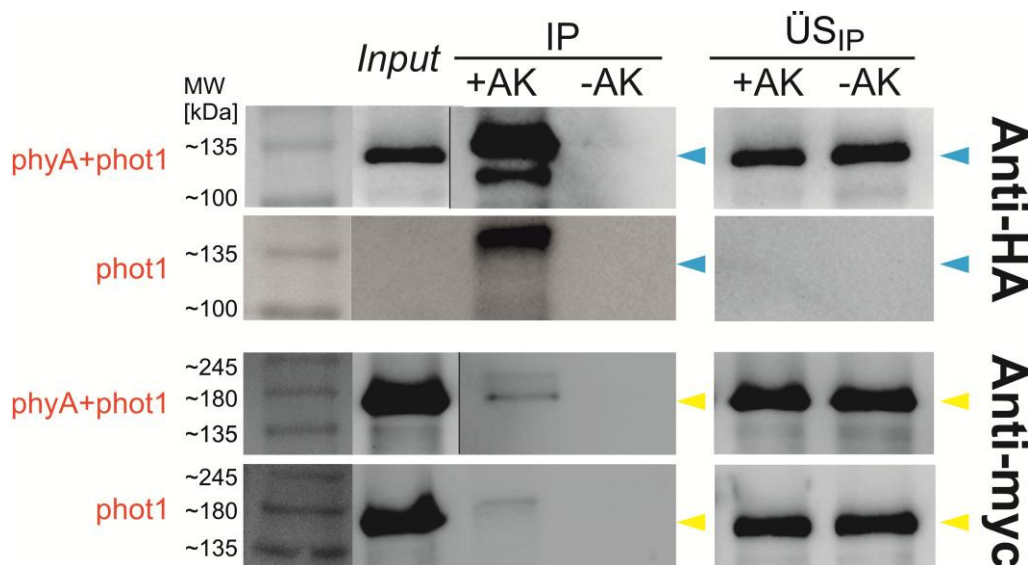


Abbildung 4-22: Co-IP von HA:phyA und myc:phot1 mit monoklonalen Anti-HA-Antikörpern.

Immunopräzipitierte Proteine werden per *Western Blot* mit Anti-HA-Antikörpern nachgewiesen (oben, HA:phyA mit blauen Pfeilen markiert), während co-immunopräzipitierte myc:phot1-Fusionsproteine mit Anti-myc-Antikörpern (unten, gelbe Pfeile = myc:phot1) detektiert werden. 33% bzw. 66% der IPs wurden für HA- bzw. myc-Blots eingesetzt.

Analog zu dem *in vivo Split-YFP*-Experiment von Dr. Mailliet ist auch in der *ex vivo* Co-IP-Methode eine Interaktion von phyA mit phot1 detektierbar (s. Abbildung 4-22, allerdings konnte die Bande nicht in dieser jedoch des Öffnen in schwächerer Intensität reproduziert werden). Sowohl die Negativkontrolle ohne Antikörper, als auch die Negativkontrolle von myc:phot in Abwesenheit von HA:phyA weisen indes keine Signale an den entsprechenden Stellen auf. In IP-Experimenten, in denen PKS1-Fusionsproteine auch in der IP vorhanden

waren, konnte keine entsprechende myc:phot1-Bande und auch keine Präzipitation von PKS1 an die magnetischen *Beads* beobachtet werden (nicht gezeigt).

4.3.2.3 *Split-YFP-Analyse der Interaktion von phyA oder phot1 mit PKS1 in Zwiebel*

Um zu untersuchen, ob PKS1 sich theoretisch als Brückenprotein zwischen phyA und phot1 eignen würde, wurde die *in vivo*-Interaktion von PKS1 mit phyA bzw. phot1 in Zwiebelzellen untersucht. Kontrollen für Zwiebel-*Split-YFP*-Experimente sind im Anhang (Abbildung 3) dargestellt und belegen die Funktionalität des *Assays* mit N-terminalen YFP_N- bzw. YFP_C-Fusionen: phy4 und phyA dimerisieren im Cytoplasma/der perinukleären Region und sowohl die phot1-Dimerisierung als auch phyA-phot1-Interaktion sind in der Zellperipherie zu beobachten. Die Untersuchung von YFP_N:PKS1+YFP_C:phyA konnte belegen, dass eine *in vivo*-Interaktion von YFP_C:phyA mit YFP_N:PKS1 stattfindet, wobei das rekonstituierte YFP-Signal im Cytoplasma und um den Zellkern, jedoch nicht im Zellkern zu beobachten war (Abbildung 4-23 A oben). Bei genauerer Betrachtung war erkennbar, dass das Cytoplasma-Signal Cytoskelett-ähnliche Strukturen aufweist (Abbildung 4-23 A unten). Die Kombination von PKS1:YFP_N mit YFP_C:phyA führte nicht zu einem YFP-Signal und somit zu keiner Rekonstitution von YFP-Hälften (nicht gezeigt). Sowohl N- als auch C-terminal fusioniertes PKS1 war in der Lage, mit YFP_N:phot1 zu interagieren. Diese Interaktionen fanden vorwiegend in der Zellperipherie/in Plasmamembran-Nähe statt (Abbildung 4-23 B), wobei im Fall von YFP_N:phot1 + PKS1:YFP_C gelegentlich auch ein schwaches Signal in der perinukleären Region beobachtet werden konnte (Abbildung 4-23 B unten).

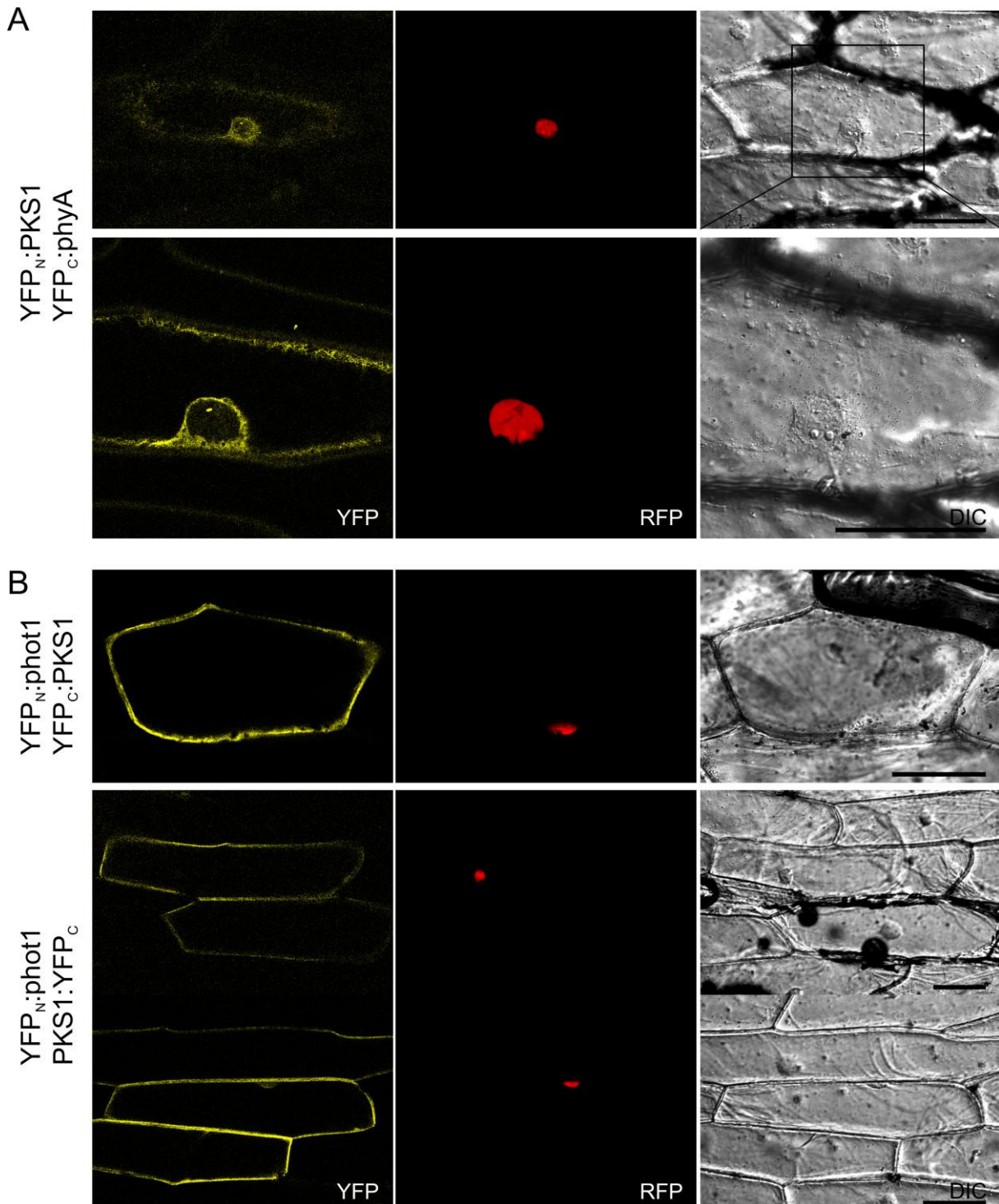


Abbildung 4-23: *Split-YFP-Assay* von phyA (A) bzw. phot1 (B) mit PKS1 in Zwiebel-Epidermiszellen ohne Licht-Vorbehandlung. Maßstab 100 μ m.

4.4 Holo-phy4:BD Y2H-Oligo dT-Library-Screen mittels *Mating*

4.4.1 Bestimmung der *Mating*-Effizienz bei verschiedenen *Bait-Prey* Verhältnissen

Die quantitativen *Mating*-Vorexperimente (s. 3.3.8) ergaben, dass sowohl bei dem 1:1 Verhältnis, als auch bei dem 1:3-Verhältnis von AH109 AD:phy4 + Y187 phy4:BD eine *Mating*-Effizienz von 1% erreicht wird (s. Tabelle 4-1). Dies bedeutet, dass auf Basis der Zellzahl des

limitierenden Partners im *Mating*-Gemisch, die Anzahl der Diploiden 1% der maximal möglichen Anzahl an Diploiden betrug.

Tabelle 4-1: *Mating*-Daten von AH109 AD:phy4 + Y187 phy4:BD auf Basis der erhaltenen Koloniezahlen

Verhältnis <i>Prey:Bait</i>	1:1,1	1:3,3
<i>Prey</i>	6,27E+07	4,5E+07
<i>Bait</i>	6,59E+07	1,5E+08
Diploide	9,94E+04	4,9E+05
Effizienz	1,0	1,09

Da die beiden Verhältnisse in zwei verschiedenen Experimenten mit leicht abweichenden Gesamtzellzahlen untersucht wurden, sind die erhaltenen Daten nicht ganz vergleichbar. Da Experiment 2 mit dem Verhältnis 1:3 entsprechend des *Pretransformed MatchMaker Libraries User Manual* (herunterskaliert) durchgeführt wurde, wurde dieses Mischungsverhältnis für den *Y2H Screen* ausgewählt und zur Abschätzung des *Screening*-Maßstabs von 1% *Mating*-Effizienz ausgegangen.

4.4.2 Untersuchungen der cDNA-Bibliothek und Abschätzung des *Screening*-Maßstabs

Für das *Y2H*-Experiment wurde eine in AH109 (Mat a) vortransformierte *Physcomitrella patens* Oligo dT-cDNA-Bibliothek von Hans Sommer (MPI-Köln) verwendet. Im Vorfeld wurde die Qualität der cDNA-Bibliothek hinsichtlich seltener Transkripte untersucht. Hierzu wurde PHY4 erfolgreich aus der cDNA-Bibliothek mittels PCR amplifiziert. Das Vorhandensein des seltenen PHY4-Konstrukts kann einen Hinweis darauf geben, mit welcher Häufigkeit seltene Transkripte in der Bibliothek vorhanden sind und ob auch putative Phytochrom-Interaktionspartner in der cDNA-Bibliothek enthalten sein könnten. Zudem wurde der Titer der eingefrorenen Hefe-Aliquots durch Ausstrich verschiedener Verdünnungen auf –Leu *SSD* auf $1,5 - 1,8 \times 10^8$ Zellen / ml bestimmt.

In vorhergehenden *Y2H-Screens* von mir und Dr. Mailliet zeigten sich unglücklicherweise verschiedene Kontaminationen in der cDNA-Bibliothek, zum einen eine bakterielle und zum anderen eine Kontamination mit rötlichen Hefen. Die Kontaminationen konnten mit Hilfe von Lysozym (Abbau der prokaryotischen Zellwand), Tetracyclin und Cefotaxim im *SD*-Selektionsmedium unterdrückt bzw. eingeschränkt werden, ohne das Wachstum von AH109 maßgeblich zu beeinträchtigen. Ohne Antibiotika etc. in den Selektionsplatten würde es in den 14 d Selektion zu einer Überwucherung der Diploiden kommen, da die Kontaminationen schneller wachsen würden.

Für die Abschätzung des nötigen *Mating*-Ansatzes, um die cDNA-Bibliothek abzudecken, wurden folgende Überlegungen angestellt: das *Physcomitrella patens* Genom enthält ca. 32000 Gene, die meisten allerdings als kleine Genfamilien, so dass vielleicht 10^4 Gene erfasst werden sollten, um die Bibliothek ansatzweise abzudecken. Berücksichtigt man, dass drei mögliche cDNA-Leseraster kloniert werden müssen, erhöht sich diese Zahl auf 3×10^4 . Nach Schätzung der Relevanz von ca. einem Zehntel aller Gene für die Licht-Signaltransduktion, erhöht sich diese Zahl nochmals um das 10fache auf 3×10^5 .

Allerdings könnte diese Schätzung immer noch optimistisch sein, denn die hier gesuchten Transkripte von Steuerungsgenen gehören zu einer Gruppe von sehr seltenen Transkripten, während andere z.B. konstitutiv exprimierte Gene zu einer Fülle von Transkripten führen.

Bezüglich dieses Verhältnisses zwischen häufigen und seltenen Transkripten in der vorliegenden cDNA-Bibliothek kann leider keine exakte Aussage getroffen werden. Dies könnte bedeuten, dass die Erfolgchancen bei einem konventionellen *Screening* bescheiden sind. Gegebenenfalls wären die gesuchten Partner bei der erreichten *Mating*-Effizienz nur mit Hilfe von Normalisierungsverfahren und/oder *High-Throughput* Methoden mit gewisser Sicherheit zu erfassen. Aus Ermangelung dieser und aufgrund der begrenzten Vorräte der cDNA-Bibliothek-Aliquots wurde aus pragmatischen Gründen entschieden, insgesamt 1 ml (ca. $1,8 \cdot 10^8$ Zellen; s. Abschnitt 3.4.2) der aufgetauten AH109 AD:Oligo dT cDNA Bibliothek mit $5,4 \cdot 10^8$ Zellen des Y187 PHY4:BD *Baits* (d.h.) im Verhältnis 1:3 zu *maten*. Bei 1% *Mating*-Effizienz (s. 4.4.1) könnten somit etwa $1,8 \times 10^6$ cDNA-Klone erfasst werden.

4.4.3 Holo-phy4:BD-Y2H Oligo dT-cDNA-Library-Screen und Sortierung putativer Interaktoren

Tabelle 4-2 zeigt eine Übersicht über Kennziffern des *Library-Mating*-Ansatzes Y187 phy4:BD + AH109 AD:Oligo dT-cDNA-Bibliothek und der parallel dazu durchgeführten Negativkontrolle Y187 phy4:BD + AH109 AD: mit eingesetzten *Bait*- und *Prey*- und mit erhaltenen Diploid-Zahlen die allesamt nach Ausstrich des *Mating*-Ansatzes auf diversen Medien ermittelt wurden (s. 3.4.2).

Tabelle 4-2: Vergleich von eingesetzten und erhaltenen Zellzahlen und *Mating*-Effizienzen von *Library-Mating* und Negativkontroll-*Mating*

	<i>Library-Mating</i>	Negativkontrolle
Volumen <i>Mating</i> -Ansatz [ml]	12	7,5
<i>Bait</i> (Mat α)	Y187 phy4:BD	Y187 phy4:BD
Gesamtzahl <i>Bait</i> -Zellen	$4,3 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$
<i>Prey</i> (Mat α)	AH109 AD:cDNA-Bibliothek	AH109 AD:
Gesamtzahl <i>Prey</i> -Zellen	$1,9 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$
Verhältnis <i>Prey</i> : <i>Bait</i>	1:2,3	1:2,3
Diploide ges.	$4,2 \times 10^5$	$4,7 \times 10^5$
Effizienz [%]	0,10	0,16

In beiden Ansätzen war der Mat α Stamm AH109 (*Prey*) limitierender Partner. Der Überschuss an *Bait*-Zellen im *Mating*-Ansatz war mit einem Faktor von 2,3 etwas geringer als vorgesehen. Ursache hierfür ist, dass die Anzahl lebensfähiger Zellen v. A. im *Library*-Aliquot vor Ansatz des *Matings* und somit das Verhältnis von *Bait* und *Prey* nur ungefähr abschätzt werden kann. Die tatsächlich erhaltenen Zellzahlen, die sogenannten Viabilitäten weichen somit von den geplanten Zellzahlen ab. Somit weicht auch die erzielte *Mating*-Effizienz von der zuvor bestimmten ab. Diese war mit 0,1% allerdings noch (10fach) geringer, als man bei einer Abweichung des *Bait*-Überschusses vom geplanten Überschuss (23%) erwarten würde. Vermutlich liegt dies daran, dass im *Library-Mating*-Ansatz bereits 25% der Antibiotika und Lysozym-Menge der unter 2.2.4 beschriebenen Selektionsmedien eingesetzt wurde, um eine ü.N.-Vermehrung der Bibliothek-Kontamination zu vermeiden (vgl. 4.4.2). Insgesamt wurde im *Library-Mating* dennoch die beachtliche Anzahl von $4,2 \times 10^5$ Klonen erfasst. Die Diploidenzahl entspricht etwa einer 4-fachen Abdeckung des *Physcomitrella* Genoms, wenn man von 3 Leserastern und 32000 Genen ausgeht.

Nach 2 Wochen Selektion des *Library-Matings* auf TSD + 3-AT + PCB Medium ergaben sich (abgesehen von der rötlichen Hefekontamination) hell beigefarbene Kolonien

4. Ergebnisse

unterschiedlicher Größe. Alle größere Kolonien (>3mm) wurden bevorzugt für eine zweite Selektionsrunde ausgewählt (67) und darüber hinaus noch eine Auswahl kleinerer Kolonien (<2mm; 142). Abbildung 4-24 zeigt exemplarisch die Masterplattenserie der großen Kolonien, wobei eine zusätzliche Blaufärbung eine Aktivierung des *MEL1*-Reporters und somit, über die Wachstumsantwort hinaus, eine stärkere Interaktion der beiden Fusionsproteine anzeigt. Nahezu alle überführten Klone überlebten auf *DSD* und zeigten im Falle der großen Kolonien meist zusätzlich *MEL1*-Reporteraktivierung. Die Minderheit putativer Interaktoren war in der Lage, lediglich auf *TSD* ohne PCB zu wachsen (4 Stück; s. Tabelle 4-3), d.h. die wenigsten Klone interagieren mit Apophytochrom alleine. Klone, die entweder nur auf PCB-haltigem *TSD*-Medium in Rotlicht (30), oder auf *TSD* unabhängig von PCB-Zugabe und Rotlichtbestrahlung wuchsen (38 bzw. 35 ohne Kontamination), hielten sich in etwa die Waage. In nahezu allen Fällen fiel das Wachstum und die *MEL1*-Aktivierung auf *TSD* mit PCB in Rc stärker aus, als auf Medium ohne PCB. Die drei rötlichen Klone in Abbildung 4-24 sind die Kontamination der cDNA-Bibliothek.

Tabelle 4-3: Wachstumsverhalten von 207 putativ positiven Hefeklonen nach zwei Selektionsrunden auf *TSD* + 3-AT + / - PCB

Wachstumsverhalten	Anzahl an Klonen
nur <i>TSD</i> + PCB	30
nur <i>TSD</i> - PCB	4
<i>TSD</i> + und - PCB	38 (inkl. 3 Kontamination)
kein Wachstum	137

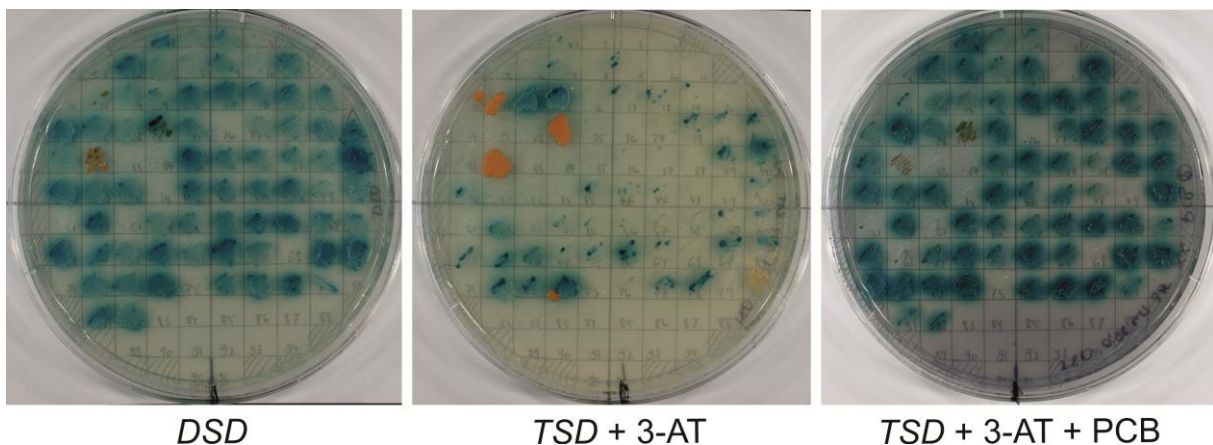


Abbildung 4-24: Masterplatten großer putativ positiver Kolonien nach 7d Inkubation in D (*DSD* u *TSD* + 3-AT) bzw. in 0,7 $\mu\text{mol} / \text{m}^2 \text{ s}$ Rc (*TSD* + 3-AT + PCB)

Tabelle 4-3 zeigt eine Übersicht über das Wachstumsverhalten der insgesamt 207 auf Masterplatten überführten Klone. Bei den 137 Klonen, die die 2. Selektionsrunde nicht überlebt haben, handelte es sich zumeist um kleine Kolonien. Wachstum auf *TSD* + PCB alleine spricht für eine starke Lichtabhängigkeit der entsprechenden Interaktionen. Wachstum von Klonen auf *TSD* + / - PCB lässt auf konstitutive oder lediglich RL-verstärkte Interaktionen mit phy4:BD schließen.

Aus den 69 verbliebenen Hefeklonen (72 Klone - 3 Kontaminanten) wurde für die Identifikation der putativen Interaktoren DNA extrahiert. PCR Analyse der AD-Vektor-Insertionen zur Gruppierung putativer Partner anhand der PCR-Produktgrößen ergab 47 bzw. 16 Klone mit Einzel- bzw. multiplen PCR-Produkten. Letzteres weist auf das Vorhandensein

mehrerer pGAD *Prey*-Plasmide mit unterschiedlichen cDNA-*Inserts* in den ursprünglichen Hefeklonen hin. Bei sechs Klonen konnte kein *Insert* amplifiziert werden. Verdau von Einzel-PCR-Produkten mit MspI ergab, dass nahezu alle unterschiedliche Schnittmuster aufwiesen und somit vermutlich unterschiedliche cDNAs repräsentieren. Daher wurden alle Hefe-DNA-Extrakte in *E. coli* transformiert, um die resultierenden DNA-Minipräparationen zu sequenzieren. 67 von 69 Transformationen ergaben *E. coli*-Transformanden, teilweise mit Kolonie-PCR-Produkten gleicher Größe (bei 36 Transformationen) oder mit verschiedenen Kolonie-PCR-Produkten unterschiedlicher Größen (bei 31 Transformationen). Kolonie-PCR-Banden unterschiedlicher Größen entstanden insbesondere, wenn die entsprechenden Hefeklon-DNAs auch schon multiple PCR Banden ergeben hatten (in 12/16 Fällen, s.o.). Somit konnte mittels *E. coli*-Transformation eine Trennung von verschiedenen in den entsprechenden Hefeklonen enthaltenen AD-Vektoren erreicht werden. Aus den Transformationen ergaben sich nach diesem Schritt mehr als 100 DNA-Minipräparationen, die mittels Sequenzierung untersucht wurden.

4.4.4 Sequenzanalyse putativer Phytochrom 4 Interaktionspartner

Inserts mindestens eines AD-Plasmids pro Hefeklon wurden mit flankierenden *Primern* meist aus beiden Richtungen sequenziert. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden zunächst durch Entfernung von polyA-Sequenzen und des pGAD-Vektorrückgrats bereinigt. In 22 Fällen war es möglich, FW und RV Sequenzen zu *Contigs* zusammenzuführen. Bereinigte Sequenzen wurden mit *Physcomitrella patens* Transkriptom-Datenbanken bei NCBI und Cosmoss abgeglichen (s. 3.4.4). Alle Sequenzen konnten einem Lokus im *Physcomitrella* Genom und meistens auch eindeutig einem Cosmoss mRNA-Modell zugeordnet werden. Zum Zeitpunkt der Datenbankanalyse waren lediglich fünf der identifizierten *Physcomitrella* Gene annotiert: ein Histon H4 (Hefeklon 2.61), ein Photosystem I Apoprotein (Hefeklon 2.1), ein Gen für die kleine Kette der RubisCO (Hefeklon 2.74), ein ribosomales Protein (Hefeklon 2.69) und eine Calcium-abhängige Proteinkinase cpk17 (Hefeklon 2.39#181). Die Identität aller anderen Gene musste mittels Domänen-Vorhersage (InterProScan oder NCBI *CDD*) und Vergleich mit *Arabidopsis thaliana*- oder Viridiplantae-Protein-Datenbanken bestimmt werden. Im Folgenden sind alle anderen Benennungen von Proteinen und Genen von Domänenvorhersagen oder Ähnlichkeiten mit *Arabidopsis* oder Viridiplantae-Proteinen abgeleitet.

Die zunächst große Anzahl an erhaltenen Sequenzen konnte aus folgenden Gründen reduziert werden:

- Im Fall von sieben Hefe-DNAs schienen ein oder zwei von mehreren *E.coli*-Klonen nicht das *Prey*-, sondern das *Bait*-Plasmid PHY4 pBAC zu enthalten (bei 2.27; 2.31; 2.37; 2.38; 2.41; 2.62; 2.64). Ursache hierfür ist vermutlich, dass in den Hefe-DNA-Extrakten auch das Phy4:BD *Bait*-Plasmid vorlag, welches ebenfalls in *E. coli* transformiert wurde und aufgrund identischer Selektionsmarker von *Bait* und *Prey*-Plasmiden, Kolonien nach *E.coli*-Transformation ergaben. In diesen Fällen scheinen *Prey*-Vektor-spezifische Kolonie-PCRs fälschlicherweise Produkte ergeben zu haben.
- Bei Hefeklon 2.28 handelte es sich um den leeren pGAD-Vektor.
- Alle Sequenzen wurden gegeneinander abgeglichen, um identische Sequenzen zu identifizieren. Der Abgleich ergab fünf Sequenzgruppen, deren DNAs aus unterschiedlichen Hefeklonen stammten: fünf enthielten vermutlich die CDS einer

4. Ergebnisse

Kohlenhydrat-Kinase (2.18#12; 2.22#38; 2.23#47; 2.35#97 & 2.79#2), vier eine Phosphoribosylanthranilat-Isomerase (2.14#3 u #67; 2.15#6; 1.34#8 & 1.69#8), sieben ein Dehydrin (2.8#4; 2.16#27; 2.25#40 u. #45; 2.31#17; 2.35#101; 2.41#203 & 2.64#2), zwei eine *Complex I* Untereinheit eines Proteinkomplexes in der mitochondrialen Respirationskette (2.62#5 & 2.73#1) und zwei ein hypothetisches Protein ohne identifizierte Domänen oder Homologe (2.19#24 & 2.62#5). Unterstrichene Klone wurden zur detaillierten Sequenzanalyse ausgewählt.

Nach dieser Komprimierung blieben 49 Hefeklone mit einmaligen cDNAs, und fünf cDNAs, die in mehreren Hefeklonen vorlagen (s.o.). Sechs Hefeklone enthielten mehr als ein interessantes AD-Plasmid. Zusammengenommen ergab sich daraus eine Liste von 60 zu untersuchenden Sequenzen. Tabelle 1 im Anhang fasst die Ergebnisse der Datenbankanalyse zusammen. Dort werden für jeden putativen Interaktionspartner (wenn möglich) die NCBI mRNA- und Protein-*Accessions*, die *Cosmos-Accessions*, vorhergesagte Domänen, Homologe in *Arabidopsis thaliana* und Viridiplantae, mögliche Funktionen und Lokalisationsvorhersagen angegeben. Die Analyse von Sequenzierdaten von 51 Klonen konnte zeigen, dass 31 (= 61%) eine komplette CDS und (z.T.) UTRs enthielten, bei 39 % war selbst die CDS nicht komplett. Bei neun putativen Interaktoren konnte aufgrund unzureichender Sequenzdatenqualität oder Leselänge oder nicht eindeutiger Genmodelle keine Aussage über die Vollständigkeit des Inserts im *Prey*-Vektor getroffen werden. Die Oligo dT-cDNA-Bibliothek ist somit von ausreichender, aber nicht überragender Qualität. Zur Auswahl von für die Phytochrom 4-Signaltransduktion eventuell interessanten Klonen, wurden die Interaktionspartner ihren putativen Funktionen zugeordnet.

Tabelle 4-4: Kategorisierung putativer phy4-Interaktionspartner anhand ihrer möglichen Funktionen

Funktion	Anzahl	Hefeklone
Metabolismus	18	2.1#1, 2.6#5, 2.16#7, 2.21#32, 2.27#55, 2.36#109, 2.38#23, 2.38#174, 2.39#186, 2.40#128, 2.47#228, 2.48#238, 2.72#6, 2.73#1, 2.74#3, 2.77#8, 2.82#2, 1.34#8
Signalling / posttranslationale Modifikation	11	2.2#2, 2.3#13, 2.16#32, 2.35#97, 2.39#181, 2.43#142, 2.50#243, 2.50#11, 2.55#5, 2.78#6, K12#7
Transkription / Translation	12	2.7#1, 2.8#5, 2.20#13, 2.30#93, 2.42#130, 2.45#151, 2.60#7, 2.63#1, 2.65#7, 2.69#3, 2.81#8, 1.79#1
Stress	5	2.25#45, 2.37#114, 2.52#264, 2.60#3, 2.70#7
Membranprotein / Transport	5	2.29#57, 2.46#220, 2.54#273, 2.59#6, 2.66#3
Cytoskelett	2	2.17#4, 2.67#2
Phytohormone	1	2.11#1
Unbekannt	6	2.19#24, 2.52#260, 2.56#284, 2.58#5, 2.61#1, K6#8
Summe	60	

Tabelle 4-4 zeigt die Zuordnung der putativen Phytochrom 4 Interaktionspartner zu Funktionen und Prozessen, an denen sie beteiligt sein könnten. Jedes Protein wurde lediglich einer Funktion zugeordnet. Die vorne stehende Zahl bezeichnet den Hefeklon, aus dem die

DNA extrahiert wurde, die Zahl nach dem „#“ den *E. coli*-Klon nach der Transformation der Hefe-DNA. Grün markierte Klone wurden als interessant eingestuft und näher betrachtet.

Folgende (in Tabelle 4-4 schwarz geschriebene) putative Interaktionspartner wurden als eher unbedeutend hinsichtlich ihrer Relevanz für Phytochrom-Signaltransduktion eingestuft:

- Proteine mit **Funktionen in metabolischen Prozessen**: Knapp ein Drittel aller identifizierten Phytochrom 4-Interaktionspartner spielt vermutlich eine Rolle in Metabolismus, vermutlich da diese Gene konstitutiv exprimiert werden und die entsprechenden cDNAs somit in der Bibliothek vergleichsweise häufig vorkommen. In dieser Gruppe sind z.B. RuBisCO, Chlorophyll-Bindeproteine, eine ATPase, eine Photosystem I-Reaktionszentrum-Untereinheit, eine Carboanhydrase und andere Photosynthese-relevante Proteine enthalten (vgl. auch Tabelle 1 im Anhang).
- Proteine mit **direkten Funktionen in Transkription / Translation**: Proteine, die vermutlich direkt an der Translation von mRNAs (nicht jedoch der Translationsregulation) beteiligt sind, wurden ausgeschlossen, da die Übermittlung eines Lichtrichtungssignals nicht über Genregulation funktionieren kann (s. 1.7). Zu diesen Proteinen gehören z.B. RNA-Prozessierungsenzyme und ein Protein, welches an *Splicing* beteiligt ist. Ebenso wurden diverse ribosomale Untereinheiten und ein Chaperon aussortiert, da diese Proteine direkt mit dem Translationsprozess an sich assoziiert sind. Eine Ausnahme in dieser Gruppe stellt ein eher regulatorisches Protein, der eukaryotische Translationinitiationsfaktor 5A dar, auf den unten näher eingegangen wird.
- Proteine, die an verschiedenen **Stressantworten** beteiligt sind: z.B. Pathogenese-verwandte Proteine, ein Metall-Detoxifikations-Protein, *Late Embryogenesis Abundant* (LEA)-Proteine und Dehydrine.
- Bei den „**unbekannten**“ Proteinen konnten keine Domänen vorhergesagt und zumeist keine *Arabidopsis*-Homologe zugeordnet werden. Solche Proteine sind demzufolge eher Moos-spezifisch und eher nicht relevant für die generelle Funktionsweise cytoplasmatischer Phytochrom-Signaltransduktion.
- **Phytohormon-assoziierte Proteine**: dabei handelt es sich um ein Protein, welches womöglich an Jasmonat-Biosynthese beteiligt ist.
- **Membranproteine / Transporter** wurden nur aussortiert, wenn es sich um Aquaporine (2.66#3), putative ER-Proteine (2.59#6) oder um Proteine handelte, die laut Domänencharakterisierung vermutlich auf der Außenseite der Plasmamembran verankert sind (2.29#57).

Putative Phytochrom 4-Interaktionspartner folgender Gruppen wurden für eine nähere Untersuchung ausgewählt (s. grüne Markierung in Tabelle 4-4):

- Proteine mit Funktionen in **Signaltransduktion oder posttranslationaler Modifikation**: 12 von 60 Proteinen sind womöglich an Signaltransduktion beteiligt. Diese Gruppe ist sehr divers und enthält Proteine mit Domänen für Protein-Protein-Interaktionen, wie beispielsweise Zinkfinger- (2.43#142) oder (F-box-) und Kelch-Domänen (2.50#243 & 2.2#2). Außerdem gehören eine Ser/Thr (2.50#11)- und eine Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase (2.39#181) dieser Gruppe an, die mittels Phosphorylierung andere Proteine posttranslational modifizieren und ggf. deren Aktivität oder Lokalisation *etc.* regulieren können. Insbesondere die Calcium-

abhängige Proteinkinase wurde als höchst interessant eingestuft, da Calcium als *2nd Messenger* in cytoplasmatischer Signaltransduktion bekannt ist und auch mit Phytochrom-*Signalling* in Verbindung gebracht wurde. Darüber hinaus enthält die Signaltransduktion-Gruppe ein Cyclophilin (2.55#5) und ein Pirin-ähnliches Protein (K12#7). Für beide gibt es in der Literatur Hinweise auf einen Zusammenhang mit Phytochrom-Signaltransduktion in *Arabidopsis*. Für das *Arabidopsis* Cyclophilin ROC1 konnte gezeigt werden, dass es eine Rolle in der phyA- phyB- und cry1-vermittelten Deetiolierung und in der Brassinosteroid-Signaltransduktion spielt (Trupkin *et al.*, 2012). Für ein *Arabidopsis* Pirin konnte gezeigt werden, dass dessen Expression Rotlicht-abhängig ist, dass es mit der α -UE des heterotrimeren G-Proteins interagiert und möglicherweise eine physiologische Rolle in der Samenkeimung spielt (Lapik & Kaufman, 2003). Aufgrund der Tatsache, dass Dr. Mailliet in ihrem Apo-BD:PHY4- *Y2H-Screen* ein ähnliches Protein aus der gleichen cDNA-Bibliothek identifiziert hat, wurde auch das in dieser Arbeit identifizierte Pirin-ähnliche Protein zur näheren Analyse herangezogen. Proteine der 14-3-3- Familie hingegen sind in der Lage, an phosphorylierte Zielproteine zu binden und stellen somit Signalproteine in der Transduktion von Phosphorylierungssignalen dar. Eine Vielzahl an 14-3-3 *Targets* konnte in *Arabidopsis* bereits identifiziert werden, u. A. Phototropine und phyB.

- **Membranproteine:** zwei Membranproteine wurden als interessant eingestuft, nicht zuletzt, weil nicht bekannt ist, wie der Phytochrom-Phototropin-Komplex an der Plasmamembran verankert ist (Jaedicke *et al.*, 2012). Bei den beiden identifizierten Proteinen handelt es sich um ein Rhodopsin-*Tail*-Protein (2.46#220) und eine Rhomboid Intramembran-Serinprotease (2.54#273).
- **Cytoskelett-assoziierte Proteine:** Alle Proteine, die möglicherweise eine Rolle in der Cytoskelett-Organisation spielen, wurden zur Analyse ausgewählt, da bekannt ist, dass vorwiegend das Aktin-Cytoskelett an der phototropen Beugungsreaktion von Moosfilamenten beteiligt ist (Meske & Hartmann, 1995; Meske *et al.*, 1996). Dieser Gruppe wurden z.B. ein Ankyrin-&BTB/POZ – Protein (2.17#4) und ein Autophagie-Protein (2.67#2) zugeordnet.
- **Translationsregulatoren:** der eukaryotische Translations-Initiationsfaktor 5A (eIF-5A; 2.65#7) wurde ausgewählt, weil jüngst eine Rolle von cytoplasmatischem Pfr in der Regulation der Translation von PORA mittels Interaktion mit PENTA1 (PNT1) im Cytoplasma gezeigt werden konnte (Paik *et al.*, 2012).

Tabelle 4-5 gibt eine Übersicht über die 15 zur näheren Untersuchung ausgewählten putativen Phytochrom-Interaktionspartner aus dem Holo-phy4:BD- *Y2H-Library Screen*.

4. Ergebnisse

Tabelle 4-5: *In silico* Charakterisierung der 15 ausgewählten putativen phy4- Interaktionspartner aus dem Holo-phy4:BD-*Screen*: Wachstumsverhalten auf *TSD*-Masterplatten mit / ohne PCB in R (- kein, + schwaches, ++ starkes, +++ sehr starkes Wachstum), Homologe in *Arabidopsis thaliana*, mögliche Funktionen, *Gene Ontology* (GO) und Lokalisationsvorhersagen.

Hefe- # <i>E.coli</i> - Klon	Bezeichnung	+PCB	-PCB	Homologe in <i>Arabidopsis thaliana</i>	mögliche Funktionen und Prozesse	<i>Gene Ontology</i> - Zuordnung	Lokalisations vorhersagen
2.2#2	F-box- interacting / Kelch-Protein	+	-	ein F-box/Kelch- <i>Repeat</i> Protein	Proteinbindung; evtl. Aktin- Vernetzung, Komponente eines E3- Ubiquitin Ligase-Komplexes, Proteindegradation	Signaltrans- duktion	Chloroplast oder Cytoplasma
2.3#13	TP53- regulierende Kinase	+	-	TP53- <i>regulating</i> Kinase	Proteinkinase-Aktivität, ATP-Bindung; Metalloprotease-Aktivität,	Signaltrans- duktion	Kern oder Cytoplasma
2.16#3 2	14-3-3 Protein	++	-	14-3-3- <i>like</i> Protein GF14 psi, omega <i>etc.</i>	Protein-Protein-Interaktion (u.A. mit Phototropinen), Signaltransduktion	Signaltrans- duktion	Kern
2.17 #4	Ankyrin, BTB/POZ - Protein	++	+	BTB TAZ <i>Domain</i> <i>Protein</i> 1; BTB/POZ <i>Domain-containing</i> Protein	Protein-Protein-Interaktion; Transkriptionsregulation, Cytoskelettdynamik, Ionentransport <i>etc.</i>	Cytoskelett / Signaltrans- duktion	Cytoplasma evtl. Kern
2.35#9 7	Protein mit unbekannter Funktion	++	-	geringere Ähnlichkeit mit <i>PfkB-like</i> Karbohyratkinase	Regulatorische und / oder katalytische Funktion	Signaltrans- duktion	Zellmembran, sekretorischer Weg
2.39 #181	Ca²⁺- abhängige Proteinkinase	+++	++	Calcium-abhängige Proteinkinase	Proteinbindung, Calmodulin- abhängige Proteinkinase-Aktivität, Posttranslationale Modifikation	Signaltrans- duktion	Cytoplasma
2.43 #142	Zinkfinger- Protein	++	-	RING-Finger und CHY Zinkfinger <i>Domain- containing</i> Protein 1	Protein-Protein-Interaktion, Zinkionenbindung	Signaltrans- duktion	Cytoplasma
2. 46 #220	Rhodopsin- Tail-Protein	++	+	evtl. Adhäsive / prolinreiche Proteine	Immobilisierung von Proteinen an der Membran	Membran- protein	Membran
2.50 #243	Kelch-Repeat Protein	+++	+	diverse F-box/Kelch- <i>Repeat</i> -Proteine	Proteinbindung	Signaltrans- duktion	Kern
2.50 #11	Ser / Thr- Proteinkinase	+++	+	Serin / Threonin- Proteinkinase HT1	Protein-Phosphorylierung, ATP- Bindung, posttranslationale Modifikation	Signaltrans- duktion	Kern
2.54 #273	Rhomboid- Protein	+++	+	<i>Rhomboid-related</i> Intramembran Serinprotease- <i>like</i> Protein	evtl. Endopeptidase-Aktivität; Schnitt von Transmembrandomänen	Membran- protein	Zellmembran
2.55 #5	Cyclophilin	++	-	verschiedene Cyclophiline	Protein- <i>Trafficking</i> / Maturation; Rezeptor-Komplex Stabilisierung, Apoptose, Rezeptor- Signaltransduktion, RNA- Prozessierung und Spleißosom- Assemblierung	Signaltrans- duktion	Cytoplasma
2.65 #7	eIF-5A	++	+	<i>Eucaryotic</i> <i>Translation Initiation</i> <i>Factor</i> eIF-5A	Translationale Elongations- und Initiationsfaktor-Aktivität, Translationsregulation	Translation	Cytoplasma
2.67 #2	Autophagie- Protein	++	+	Putative <i>Microtubule- associated</i> / <i>Autophagy-related</i> Proteine	Evl. Regulator von MT- Bindungsaktivität; evtl. Funktion in intrazellulärem Membran- <i>Trafficking</i> und / oder -fusion	Cytoskelett / Signaltrans- duktion	Cytoplasma
K12 #7	Pirin- ähnliches Protein	+++	++	Pirin- <i>like</i> Protein	Interaktion mit At.GPA1; G-Protein- Signaltransduktion	Signaltrans- duktion	uneindeutig

Die 15 Interaktionspartner (aus 14 Hefen) zeigten in der zweiten Selektionsrunde des *Y2H-Screens* (s. Abbildung 4-24) alle entweder streng Rotlicht-induziertes (Kelch-*Repeat*-Protein, TP53-regulierende Kinase, 14-3-3-, unbekanntes, ZF-Protein & Cyclophilin) oder zumindest Rotlicht-verstärktes Hefewachstum (alle Anderen). Verschiedene Blautöne weisen auf unterschiedlich starke *ADE2*-Reporteraktivierung (von Helltürkis: schwach bis Tiefblau: stark)

hin. *ADE2*-Aktivierung und somit starke Interaktion schien insbesondere bei der Calcium-abhängigen Proteinkinase, dem Kelch-*Repeat*-Protein, der Ser/Thr Proteinkinase und dem Pirin-ähnlichen Protein stark ausgeprägt zu sein. Abgesehen von den Membranproteinen wurde für fast alle ausgewählten Partner eine cytoplasmatische Lokalisation vorhergesagt. Somit wären diese Partner zumindest prinzipiell in der Lage an cytoplasmatischer Phytochrom-Signaltransduktion beteiligt zu sein.

Aufgrund unvollständiger CDS oder dem Vorhandensein von UTRs mussten cDNAs aller ausgewählten Klone in Volllänge für alle weiteren Analysen aus *Physcomitrella* cDNA kloniert werden. Hierzu wurde in allen Fällen im Cosmoss *Genome Browser* das auf Basis eigener Sequenz- und von EST-Daten wahrscheinlichste mRNA-Modell ausgewählt. Anhand der Modelle wurden anschließend, wie in 3.1.3 beschrieben, *Primer* für die *Gateway*-Klonierung von *Entry*-Klonen entworfen. Mittels LR Reaktionen wurden die codierenden Sequenzen in *Y2H Prey*-Vektoren für Interaktionsverifikation in Hefe, in Fluoreszenzfusionsvektoren für Lokalisationsstudien und in *Split-YFP* Vektoren für *in vivo* Interaktionsstudien kloniert.

4.5 *In silico* und experimentelle Untersuchung ausgewählter Phytochrom-Interaktionspartner aus Apo-BD:PHY4- und Holo-phy4:BD-Library-Screens

4.5.1 Verifizierung der Interaktion ausgewählter Partner mit phy4 im semiquantitativen Y2H Wachstums-Assay

Volllängen-CDS ausgewählter Interaktionspartner wurden in *Gateway-Prey*-Plasmide so hinein rekombiniert, dass sowohl N-terminale, als auch C-terminale ADg-Fusionen entstanden (s. 3.1.3.1). Diese wurden mittels simultaner Hefetransformation nach dem Doppeltransformationsprotokoll (s. 3.3.4) zusammen mit *PHY4:BD* oder *BD:PHY4* in Hefe eingebracht. Anschließend wurde mit den erhaltenen Doppeltransformanten ein semiquantitatives Wachstums-Assay in D, Rc, Rp und Rp+FRp (s. 3.3.11) durchgeführt. An dieser Stelle wurden auch vier putative Interaktionspartner aus dem Apo-BD:PHY4- *Y2H Library-Screen* von Dr. Mailliet (s. 3.4.1) betrachtet, zum einen, da EF1 α und Pirin ganz neu kloniert wurden (s. 3.1.3.1) und zum anderen da Wachstums-Assays zuvor lediglich mit N-terminalen AD-Fusionen in kontinuierlichen Lichtbedingungen aber nicht in Lichtpulsen untersucht wurden. Abbildung 4-25 zeigt die Ergebnisse des semiquantitativen Wachstums-Assays mit allen ausgewählten putativen phy4-Interaktionspartnern auf Selektionsmedien ohne und mit PCB in unterschiedlichen Lichtbedingungen (s. 3.3.11). Die Funktionalität des Assays und der *Gateway Prey*-Vektoren wurden bereits in 4.2.2 demonstriert. Abbildung 5 im Anhang stellt darüberhinausgehend das Wachstumsverhalten aller putativen Interaktoren sowohl auf *TSD*+PCB mit 1 mM als auch mit 2,5 mM 3-AT dar. Dies wurde ggf. bei schwachen Interaktionen mit phy4:BD (auf *TSD* + PCB + 1 mM 3-AT) in Rp herangezogen, denn manchmal trat dennoch Wachstum einer solchen Kombination auf *TSD* + PCB + 2,5 mM 3-AT in Rc auf (eigentlich zu viel 3-AT für dieses *Bait*; die entsprechende Negativkontrolle war hier immer negativ) und kann somit als Wachstum bei einer höheren Stringenz betrachtet werden.

4. Ergebnisse

Bait	Prey	TSD		TSD+3-AT+PCB				Bait	Prey	TSD		TSD+3-AT+PCB			
		DSD	+3-AT	D	Rc	Rp	Rp+FRp			DSD	+3-AT	D	Rc	Rp	Rp+FRp
BD:phy4	ADg:Pirin							BD:phy4	ADg:CDPK						
	Pirin:ADg								CDPK:ADg						
phy4:BD	ADg:Pirin							phy4:BD	ADg:CDPK						
	Pirin:ADg								CDPK:ADg						
BD:phy4	ADg:Pirin-like							BD:phy4	ADg:Rhomboid						
	Pirin-like:ADg								Rhomboid:ADg						
phy4:BD	ADg:Pirin-like							phy4:BD	ADg:Rhomboid						
	Pirin-like:ADg								Rhomboid:ADg						
BD:phy4	ADg:ZF-Protein							BD:phy4	ADg:Rhodopsin-Tail						
	ZF-Protein:ADg								Rhodopsin-Tail:ADg						
phy4:BD	ADg:ZF-Protein							phy4:BD	ADg:Rhodopsin-Tail						
	ZF-Protein:ADg								Rhodopsin-Tail:ADg						
BD:phy4	AD:PRL1							BD:phy4	ADg:BTB/POZ						
	PRL1:ADg								BTB/POZ:ADg						
phy4:BD	AD:PRL1							phy4:BD	ADg:BTB/POZ						
	PRL1:ADg								BTB/POZ:ADg						
BD:phy4	ADg:F-box-interacting/ Kelch							BD:phy4	ADg:Autophagie						
	F-box-interacting/ Kelch:ADg								Autophagie:ADg						
phy4:BD	ADg:F-box-interacting / Kelch							phy4:BD	ADg:Autophagie						
	F-box-interacting/ Kelch:ADg								Autophagie:ADg						
BD:phy4	ADg:Kelch-Repeat							BD:phy4	ADg:Protein						
	Kelch-Repeat:ADg								Protein:ADg						
phy4:BD	ADg:Kelch-Repeat							phy4:BD	ADg:Protein						
	Kelch-Repeat:ADg								Protein:ADg						
BD:phy4	ADg:Cyclophilin							BD:phy4	ADg:eIF-5A						
	Cyclophilin:ADg								eIF-5A:ADg						
phy4:BD	ADg:Cyclophilin							phy4:BD	ADg:eIF-5A						
	Cyclophilin:ADg								eIF-5A:ADg						
BD:phy4	AD:PLP							BD:phy4	ADg:EF1α						
	PLP:ADg								EF1α:ADg						
phy4:BD	AD:PLP							phy4:BD	ADg:EF1α						

Abbildung 4-25: Semiquantitatives *Y2H*-Wachstums-*Assay* zur Untersuchung von Interaktionen von N- und C-terminalen phy4-BD-Fusionen mit allen ausgewählten Interaktionspartner-AD-Fusionen in D, Rc und Rp und in Rp + FRp.

Abbildung 4-25 zeigt das semiquantitative Wachstums-*Assay*, um mögliche Interaktionen der in den beiden *Y2H-Library-Screens* identifizierten Interaktionspartner zusammen mit BD:phy4 (jeweils obere 2 Reihen) und phy4:BD (jeweils untere 2 Reihen) zu untersuchen. Beide phy4-BD-Fusionen wurden jeweils mit N- (Reihen 1 und 3) und C-terminalen (Reihen 2 u 4) AD(g)-Fusionen putativer Interaktionspartner kombiniert. Dargestellt ist das Hefewachstum auf *DSD*, um zu demonstrieren, dass alle doppelt transformierten Hefen beide Plasmide tragen und zu gleichen Zellzahlen (2×10^5 Zellen/Spot) aufgetragen wurden. Dies scheint überall der Fall zu sein. Die zweite Spalte zeigt die Interaktion der Partner-AD-Fusionen mit dem PHY4-Apoprotein auf *TSD* mit der für dieses *Bait* eingestellten 3-AT-Konzentration (2,5 mM für BD:PHY4 und 1mM für PHY4:BD). Vor allem Interaktionen mit BD:PHY4 rufen Wachstumsantworten hervor, während diese bei PHY4:BD in der Regel schwächer ausfallen (Ausnahmen: Pirin-*like*, Ser/Thr-Proteinkinase, CDPK, Rhomboid und EF1 α). Alle restlichen Spalten bilden das Hefewachstum auf *TSD* mit 30 μ M PCB und 2,5 bzw. 1 mM 3-AT in verschiedenen Lichtbedingungen (D, Rc, Rp, Rp+FRp) ab. Fett markierte Kombinationen von *Bait* und *Prey* zeigen die zugehörige *Screening*-Konformation an. „AD“ bezeichnet dabei die Aktivierungsdomäne im konventionellen pGAD-Vektor, während „ADg“ für die AD im *Gateway*-AD-Vektor steht.

Interaktionen in Rp scheinen generell schwächer zu sein, als in Rc. Die Lichtdosis war bei Rc und Rp mit 2880 μ mol / m² in etwa die gleiche, aber die Dunkelphasen zwischen zwei Lichtpulsen bei der Rp-Behandlung führen scheinbar zu Pfr-Dunkelreversion, daher weniger Pfr-Partner-Interaktionen und somit zu einer geringeren Reportergen-Aktivierung. Da allerdings die Autoaktivierung bei BD:phy4 / phy4:BD mit leerem AD-Vektor in Rc zwar nicht sehr stark, aber deutlich sichtbar war (s. Abbildung 4-5), wurden nur sehr distinkte Spots in dieser Lichtbedingung als positives Ergebnis gewertet. Jegliches Wachstum in Rp hingegen wurde als positiv gewertet.

Die meisten der ausgewählten Kandidaten scheinen auch nach Klonierung der Volllängen-CDS im Leseraster mit der AD(g) mit BD:phy4 und/oder phy4:BD zu interagieren und sind somit im *Y2H*-verifizierte Interaktoren und können somit vorläufig als Holophytochrom-Interaktionspartner (HIP) bezeichnet werden (Ermert *et al.*, 2016). Die Interaktion mit dem Cyclophilin ist sehr schwach v. A. mit dem phy4:BD (= *Screening*)-*Bait* und das Wachstum in Rc ist kaum stärker, als bei der Negativkontrolle, weshalb dieses von weiteren Analysen ausgeschlossen wurde. Das Rhodopsin-*Tail*- und das Autophagie-Protein interagierten eher mit BD:phy4 statt phy4:BD und wurden zunächst nicht untersucht. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden zumindest *Split-YFP*-Analysen nachgeholt (s.u.).

Alle anderen Partner weisen mindestens in einer Konformation stärkere *HIS3*-Reporteraktivierung und Wachstum auf. Meistens interagierten die verbliebenen Kandidaten RL-abhängig / RL-verstärkt (in Rc und Rp) mit schwächerem oder keinem Wachstum in D oder in Rp+FRp – im Einklang mit dem Wachstumsverhalten auf den Masterplatten (s. Tabelle 4-5). Dies spricht für eine bevorzugte Interaktion mit dem Pfr- im Vergleich zum Pr-Zustand des Phytochroms. Obwohl man davon ausgeht, dass N-terminale *Tags* am Phytochrom die korrekte Faltung und Ausbildung des Knotens am N-Terminus stören (Wagner *et al.*, 2005; Essen *et al.*, 2008), scheint BD:phy4 lichtabhängig interagieren und somit erfolgreich photokonvertieren zu können (s. z.B. Kelch-*Repeat*, CDPK, Rhodopsin-*Tail*-Protein, das Autophagie-Protein, EF1 α oder eIF-5A). Dennoch wurden mit dem C-terminal fusionierten

4. Ergebnisse

phy4:BD-*Bait* häufiger lichtabhängige Interaktionen beobachtet, als mit dem BD:phy4-*Bait* (welches dafür häufiger konstitutive Interaktionen hervorbrachte). Die Fusionsreihenfolge der AD an die Partner-CDS scheint insgesamt einen geringeren Einfluss auf das Interaktionsverhalten mit phy4 zu haben, während die Position der BD am phy4 eine entscheidende Rolle zu spielen scheint. Dabei ruft die *Screening*-Konformation nicht immer die stärkste Wachstumsantwort hervor. Konstitutive Interaktion mit BD:phy4 traten bei ADg:Pirin, Pirin:ADg, PRL1:ADg, AD:PLP (alles Partner aus dem Apo-BD:phy4-*Screen*), ADg:BTB/POZ und den beiden EF1 α -AD-Fusionen auf. Konstitutive Interaktionen mit phy4:BD traten lediglich bei Kombination mit AD:PLP und eIF-5A:ADg auf.

Tabelle 4-6: Kategorisierung der Interaktionseigenschaften ausgewählter putativer phy4-BD-Interaktoren in Rp. Zahlen von 0-5 beschreiben die Interaktionsstärke in Rp von „keine“ (=0) über „sehr schwache“, „schwache“, „deutliche“ und „starke“ bis zu „sehr starker Interaktion“ (=5). Grüne Felder zeigen die jeweilige *Screening*-Konformation an.

		Bait	
Prey	X	BD:phy4	phy4:BD
AD:X	Pirin	4	3
	Pirin- <i>like</i>	1	1
	ZF-Protein	1	1
	PRL1	0	2
	F-box/Kelch-Protein	0	3
	Kelch- <i>Repeat</i> -Protein	3	4
	Cyclophilin	0	0
	P-Loop-Protein	2	4
	Ser/Thr-Proteinkinase	0	2
	TP53-regulierende Kinase	1	3
	CDPK	0	2
	Rhomboid-Protease	1	2
	Rhodopsin- <i>Tail</i> -Protein	0	0
	BTB/POZ-Protein	5	4
	Autophagie-Protein	0	0
	Protein mit unbekannter Funktion	0	2
	eIF-5A	0	4
	EF1 α	1	0
	14-3-3-Protein	0	4
X:AD	Pirin	5	5
	Pirin- <i>like</i>	1	2
	ZF-Protein	0	2
	PRL1	2	2
	F-box/Kelch-Protein	0	3
	Kelch- <i>Repeat</i> -Protein	0	4
	Cyclophilin	1	0
	P-Loop-Protein	0	4
	Ser/Thr-Proteinkinase	0	0
	TP53-regulierende Kinase	0	3
	CDPK	1	2
	Rhomboid-Protease	1	2
	Rhodopsin- <i>Tail</i> -Protein	2	0
	BTB/POZ-Protein	1	0
	Autophagie-Protein	3	0
	Protein mit unbekannter Funktion	0	4
	eIF-5A	2	5
	EF1 α	1	1
	14-3-3-Protein	0	4

Tabelle 4-6 fasst die Rp-Interaktionseigenschaften der Holo-BD:phy4 und -phy4:BD Interaktionspartner aus Abbildung 4-25 zusammen und weist der Stärke der Wachstumsantwort eine Zahl zwischen 0 (keine Interaktion) und 5 (sehr starke Interaktion, s.o.) zu. Interaktionen der ausgewählten Partner scheinen mit phy4:BD stärker ausgeprägt zu sein (rechte Spalte), als mit BD:phy4, während es nur einen geringfügigen Unterschied macht, ob die AD am N- oder C-Terminus der Kandidat-CDS fusioniert ist. Abgesehen davon, scheint es kein generelles Interaktionsmuster zu geben, sondern dieses scheint vom jeweiligen putativen phy4-Interaktionspartner anzuhängen. Rot markierte Partner wurden aus den oben genannten Gründen nicht näher betrachtet, während alle lichtabhängig oder konstitutiv mit phy4 interagierenden und somit verifizierten Partner bezüglich ihrer *in vivo* Lokalisations- und/oder Interaktions-Eigenschaften untersucht wurden.

4.5.2 Charakterisierung ausgewählter phy4-Interaktionspartner mittels *in vivo* Lokalisations- und *Split-YFP*-Interaktionsstudien

Die Exprimierbarkeit und **intrazelluläre Lokalisation** von *Y2H*-verifizierten phy4-Interaktionspartnern wurde in *Physcomitrella* Protonemata, die mit N- und C-terminalen FP-Fusionen transfiziert wurden, in D und R mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht (3.7.4 und 3.7.5). In der Regel wurde dieselbe Zelle vor und nach Belichtung beobachtet. Kandidaten, die in Cytoplasma und/oder im Zellkern lokalisiert sind, wären theoretisch in der Lage, mit phy4:(FP) zu interagieren, denn als C-terminale FP-Fusion ist phy4 ebenfalls in diesen Zellkompartimenten zu finden (s. Abb. 2B im Anhang). Ein Unterschied des Fluoreszenzsignalmusters eines putativen phy4-Interaktionspartners in D und R würde auf einen R-induzierten und ggf. Phytochrom-vermittelten Einfluss auf das Protein-*Trafficking* des entsprechenden Proteins hindeuten. Kontrollexperimente zu Lokalisationsstudien mit den verwendeten Destinations-Vektoren sind in Abb. 2A im Anhang dargestellt und wiesen cytoplasmatische und nukleäre Lokalisation auf, was auch vorhergehenden Beobachtungen entspricht (Haseloff *et al.*, 1997).

***In planta* Interaktion** eines jeden Partners mit phy4 wurde ebenfalls in D und nach R-Belichtung mittels *Split-YFP*-Hybridproteinen (entsprechend der Konformationen verifizierter *Y2H*-Interaktionen) untersucht. Die Lokalisation des ggf. rekonstituierten YFP-Signals zeigt, in welchem zellulären Kompartiment die Interaktion stattfindet. In der Regel wurden mehrere mögliche Kombinationen untersucht, indem YFP-Hälften entweder an den N- oder den C-Terminus des jeweiligen Partners und des Phytochroms fusioniert wurden. Dadurch können ggf. funktionelle Artefakte oder topologische Unterschiede durch die Fusion berücksichtigt werden. Zugehörige *Split-YFP* Positiv- und Negativkontrollen sind in Abbildung 3 bzw. 4 im Anhang dargestellt: phy4 zeigte zuverlässige Dimerisierung sowohl als N- als auch als C-terminale Fusion an YFP-Hälften (Anhang Abb. 3A) und YFP_N:photB1+YFP_C:phy4 zeigte dasselbe Interaktionsmuster, wie es auch von Dr. Mailliet beobachtet wurde: ein distinktes YFP-Signal an der Protonema Plasmamembran (mit Chloroplasten-*Bleedthrough*). Negativkontrollen bestehend aus N- bzw. C-terminalen Fusionen von YFP-Hälften an CDS ausgewählter Partner in Kombination mit YFP_N: bzw. YFP_C: oder mit myc:YFP_N bzw. myc:YFP_C wiesen indes keine YFP-Signale auf (Anhang Abb. 4).

16 von 18 putativen phy4-Interaktionspartnern wurden mittels *Split-YFP* analysiert, wovon 12 Kandidaten als *in planta* phy4-Interaktoren verifiziert werden konnten. Das **Pirin-like** und das **Ankyrin&BTB/POZ-Protein** konnten indes *in planta* nicht als phy4-Interaktoren bestätigt werden (s. Anhang Abbildungen 7B u 8B). Möglicherweise handelt es sich bei diesen

beiden Kandidaten um falsch positive *Y2H*-Interaktoren (trotz teilweise lichtabhängiger *Y2H*-Interaktion), oder sie interagieren zu schwach / temporär, um ein sichtbares YFP-Signal zu erzeugen. Das Pirin-*like* Protein/(HIP2) (Pp3c19_20830V1.1) wird in Abschnitt 4.5.2.1 zusammen mit dem im Apo-BD:PHY4-*Screen* identifizierten Pirin beschrieben (s. Anhang 1.7.2 und Abbildung 7). Das Ankyrin&BTB/POZ-Protein/(HIP10) (Pp3c1_11190C1.1; 41 kDa) besitzt eine N-terminale Ankyrin- und eine C-terminale BTB/POZ (*Boad-complex*, *Tamtrac*, *Bric à brac* / *POx virus and zinc finger*)-Domäne. Das Protein könnte mittels der Ankyrin-Domäne Protein-Protein-Interaktionen eingehen und potentiell Funktionen in Signaltransduktion, Cytoskelett-Organisation oder Membran-Assoziation übernehmen. Vergleich mit *Arabidopsis*- und Viridiplantae Proteinen ergab geringere Ähnlichkeiten zu einem BTB/TAZ Domänen Protein (AT2G30600, AS 340-480), bzw. bestmögliche Ähnlichkeiten zu den *Selaginella moellendorffii* hypothetischen Proteinen Selmo1_441307 & Selmo1_440857 (96-98% Abdeckung, 54-60% Identität). In *Physcomitrella* konnte ein näheres Homolog identifiziert werden (Pp3c7_8840V1.1). *Y2H*-Analysen verifizierten das Protein als konstitutiven (BD:phy4 / ADg:Ankyrin&BTB/POZ) bzw. R-induzierten (BD:phy4 / Ankyrin&BTB/POZ:ADg und phy4:BD / ADg:Ankyrin&BTB/POZ) phy4-Interaktionspartner (Abbildung 4-25). CFP-Fusionen lokalisierten entweder in distinkten cytosolischen Bereichen (CFP:Ankyrin&BTB/POZ) oder in Cytoplasma und Zellkern (Ankyrin&BTB/POZ:CFP, Anhang Abbildung 8 A), obwohl für das Protein keine NLS- oder NES-Sequenzen vorhergesagt wurden. Das Ankyrin&BTB/POZ-Protein scheint in allen Entwicklungsstadien und Bedingungen exprimiert zu sein, wobei in Blättchen (*Genevestigator*) und unter De- / Rehydrierungs-Bedingungen (*Phytozome*) eine vergleichsweise schwache Expression stattfindet (s. Anhang 1.7.13). Eine Synexpression mit phy4 scheint nicht vorzuliegen.

Zwei weitere Kandidaten aus dem Holo-phy4:BD-*Screen* Pp3c14_6380V1.1 (8,4 kDa) und Pp3c14_15110V1.1 (14 kDa) konnten mittels Domänen- und BLAST-Analysen als putatives **Rhodopsin-*Tail***- bzw. **Autophagie-Protein** identifiziert werden. Beide konnten in *Y2H* zumindest in einer Konformation als lichtabhängiger phy4-Interaktionspartner verifiziert werden (BD:phy4+Rhodopsin-*Tail*:ADg, bzw. BD:phy4+Autophagie:ADg, s. Abbildung 4-25). Das sehr kleine Rhodopsin-*Tail*-Protein besitzt eine gleichnamige Domäne im N-terminalen Bereich und ist somit möglicherweise ein Membranprotein. AS-Sequenzabgleich mit Viridiplantae Proteinen ergab Ähnlichkeiten zu einem hypothetischen *Medicago truncatula* Protein (82% *Query Coverage* und 71% Identität) und weniger Ähnlichkeit zu verschiedenen anderen hypothetischen / uncharakterisierten Proteinen in *Prunus*, *Capsella*, *Glycine*, *Medicago*, *Ricinus* etc.. Unter den besten Treffern befanden sich auch (adhäsive) Prolin-reiche Proteine aus *Arabidopsis* wie zum Beispiel AT2G41420 (50% Abdeckung von AS 9-46, 79% Identität) oder AAM67217.1 (96% Abdeckung, 49% Identität). In *Physcomitrella* konnte mit Pp3c17_11870V1.1 ein weiteres Homolog identifiziert werden (vgl. Anhang 1.7.12). Betrachtung von Expressionsdaten ergab, dass das Rhodopsin-*Tail*-Protein in allen Entwicklungsstadien und Bedingungen exprimiert wird mit Ausnahme von Sporen und bei ABA-Behandlung (s. Anhang 1.7.12 *Genevestigator* Entwicklungs- und *Phytozome*-Behandlungsdaten). Es gibt keine Hinweise auf Synexpression mit phy4.

Das Autophagie-Protein wurde nach seiner *Autophagy Protein Atg8 Ubiquitin-like* Domäne benannt und könnte eine Funktion in Signaltransduktion, intrazellulärem Membran-*Trafficking* oder in der Bindung von Mikrotubuli übernehmen. Abgleich der Autophagie-AS-Sequenz mit Viridiplantae und *Arabidopsis*-Proteinen enthüllte eine erstaunliche Konservierung des Proteins in höheren Pflanzen, denn die *Query*-Abdeckung und Identität (bezogen auf *Arabidopsis* Proteine) betrugen mindestens 86 bzw. 79%. In *Arabidopsis* scheint

es neun Autophagie-*related* Protein 8-Homologe zu geben (8a bis 8i), während in *Physcomitrella* insgesamt 6 Homologe identifiziert werden konnten (s. Tabelle 6-1 und Anhang 1.7.14). Expressionsdaten weisen darauf hin, dass das Autophagie-Protein in allen Entwicklungsstadien und Bedingungen exprimiert wird, mit vergleichsweise schwacher Expression in Sporen (*Genevestigator*), Chloronemata (eFP) und in kontinuierlichem Licht mit GA-Behandlung (*Phytozome*, s. Anhang 1.7.14). Lediglich die *Genevestigator* Perturbationsdaten zeigen tendenziell eine Synexpression mit phy4. Sowohl das Rhodopsin-*Tail*-, als auch das Autophagie-Protein wurde nicht bezüglich ihrer intrazellulären Lokalisation analysiert. *Split-YFP*-Experimente mit C-terminalen YFP_C-Fusionen in Kombination mit YFP_N:phy4 (entsprechend der positiven *Y2H*-Interaktionen) ergaben kein rekonstituiertes YFP-Signal (nicht gezeigt). Da die *Y2H*-Interaktionen jedoch lichtabhängig waren, die Interaktion möglicherweise zu schwach für eine YFP-Rekonstitution ist und die *Split-YFP*-Experimente nur ein Mal durchgeführt wurde, werden interessante Aspekte in der Diskussion behandelt (5.4.10 & 5.4.12).

Das **F-Box-interacting/Kelch-Protein** und die **TP53-regulating Kinase** wurden lediglich bezüglich ihres *Y2H*-Verhaltens und ihrer Lokalisation in D und R untersucht (BSc-Arbeit Fabian Stahl). Die Ergebnisse zu den beiden Proteinen werden in den Abschnitten 4.5.2.4 und 4.5.2.7 behandelt. *Split-YFP*-Analysen stehen indes noch aus. Die Ergebnisse der *in silico* und *in planta*-Analysen (Lokalisation u. *Split-YFP*) für alle übrigen putativen phy4-Interaktionspartner (mit Ausnahme der *in planta* nicht bestätigten Interaktoren Pirin-*like*/(HIP2) und Ankyrin&BTB/POZ/(HIP10), s.o.) sind im Folgenden dargestellt.

4.5.2.1 Pirin / HIP1 (Pp3c2_10320V1.1) und Pirin-like Protein / (HIP2) (Pp3c19_20830V1.1)

Sowohl im Apo-BD:PHY4- als auch im Holo-phy4:BD-*Screen* konnte je ein Mitglied aus der Eisen-bindenden Cupin-Superfamilie identifiziert werden: ein Pirin (Pp3c2_10320V1.1; 38,7 kDa) bzw. ein Pirin-ähnliches Protein (Pp3c19_20830V1.1; 33,9 kDa). Im *Physcomitrella*- und im *Arabidopsis*-Genom sind drei (HIP1+ Pp3c19_20830V1.1 Pp3c21_16130) bzw. vier Pirin-ähnliche Gene (AT3G59220 Pirin 1, AT2G43120 Pirin-*like* Protein, AT1G50590 Pirin-*like* Protein, AT3G59260 Pirin, putative) enthalten. Das *Physcomitrella* Pirin und das Pirin-*like* Protein verfügen über eine N-terminale Cupin-Domäne während lediglich das Pirin die typische C-terminale Domäne besitzt. Beide Proteine interagierten im *Y2H-Assay* zumeist R-verstärkt mit Holo-phy4. Eine Ausnahme vom lichtabhängigen Wachstumsverhalten stellt BD:phy4+ADg:Pirin dar, welches eine sehr starke und konstitutive Wachstumsantwort zeigte (s. Abbildung 4-25; entspricht auch der *Screening*-Konformation). Die Interaktionsstärke bei Pirin war zumeist stärker, als bei dem Pirin-ähnlichen Protein (Abbildung 4-25). Dies spiegelt sich auch in den *Split-YFP*-Ergebnissen wider, denn das Pirin-*like*-Protein war im Gegensatz zum Pirin nicht in der Lage, *in planta* mit phy4 zu interagieren und das YFP-Protein zu rekonstituieren (Abbildung 4-26 B bzw. Anhang Abbildung 7 B). Eine *in planta* Pirin-phy4-Interaktion konnte nur für die phy4:YFP_C+YFP_N:Pirin Konformation nachgewiesen werden und wies zwei unterschiedliche Signalmuster auf: zum einen waren YFP-Signale (analog zu den Lokalisationsdaten, s.u.) in Cytoplasma und Zellkern zu sehen, zum anderen vorwiegend in cytoplasmatischen Foci und im Kern (Abbildung 4-26 B). Alle übrigen Konfigurationen erzeugten lediglich Hintergrund-Signale und Signal-*Bleedthroughs* aus dem RFP- in den YFP-Kanal. Unabhängig von der Vorbehandlung scheinen beide Pirin-Konfigurationen in Cytoplasma und Zellkern lokalisiert zu sein (Abbildung 4-26 A). Im Gegensatz dazu zeigte das Pirin-*like* Protein zumindest als N-terminale CFP-Fusion eine ausschließlich cytoplasmatische

4. Ergebnisse

Lokalisation in beiden Bedingungen (s. Abbildung 7 A im Anhang). Pirin/HIP1 scheint in allen Geweben und unter allen untersuchten Bedingungen exprimiert zu sein, allerdings vergleichsweise schwach in Blättchen. Sowohl Pirin/HIP1 als auch Pirin-*like*/(HIP2) weisen eine Co-Expression mit phy4 auf (s. Anhang 1.7.1 bzw. 1.7.2).

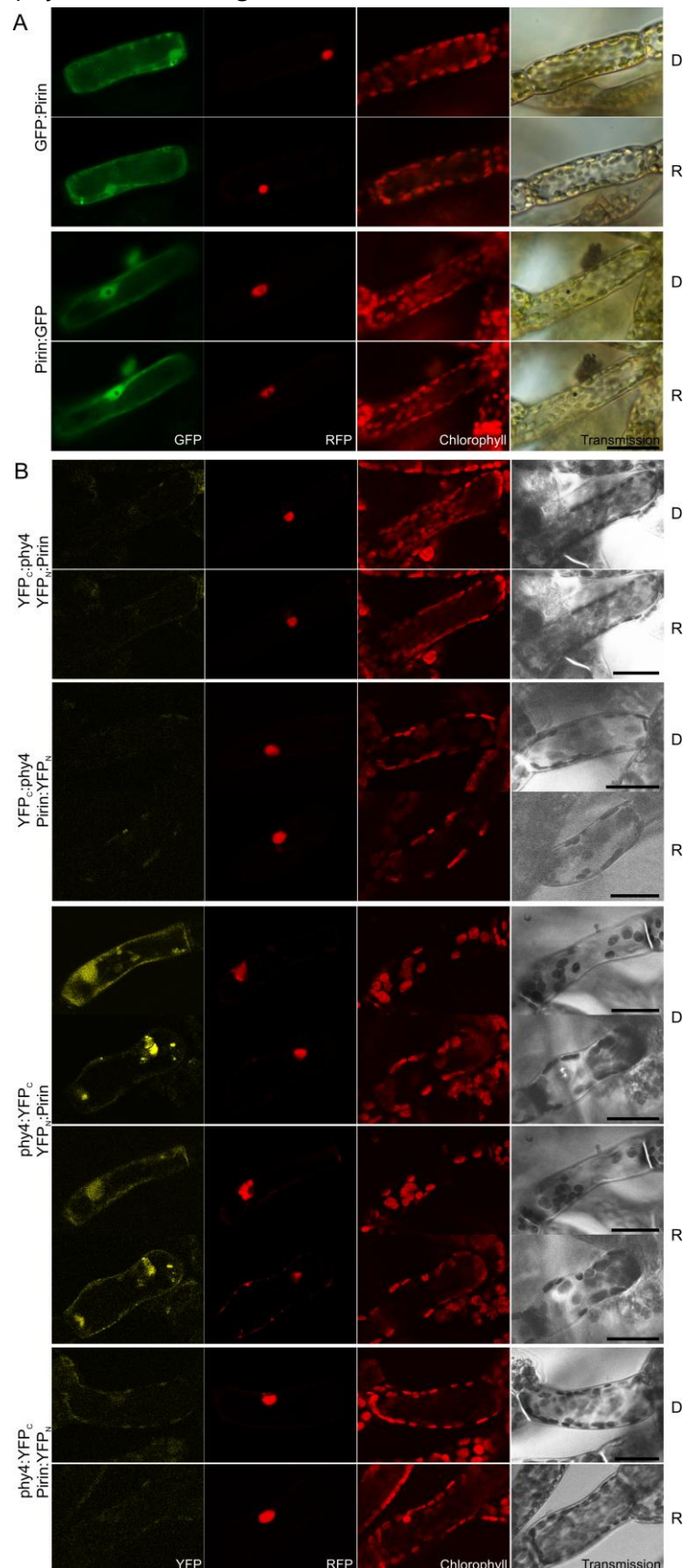


Abbildung 4-26: Pirin / HIP1 (Pp3c2_10320V1.1) intrazelluläre Lokalisations- (A) und *Split-YFP* Studien der Pirin-phy4 Interaktion (B) beide ohne (D) und mit R-Vorbehandlung (R) mittels Fluoreszenz- bzw. Konfokalmikroskopie. Maßstab 30 µm.

Panel A von Abbildung 4-26 zeigt die grüne Fluoreszenz von N- und C-terminalen Pirin-GFP-Fusionen (GFP, Spalte 1), rote Fluoreszenz des co-transfizierten mCherry:NLS-Kernmarkers (RFP, 2. Spalte), Chlorophyll-Autofluoreszenz (Chlorophyll, 3. Spalte) und ein Transmissions-Bild in Differenz-Interferenz-Kontrast-Einstellungen (DIC, 4. Spalte). Jede FP-Konfiguration wurde vor (D) und nach R-Belichtung (R) mittels Fluoreszenzmikroskopie dokumentiert. Das „Loch“ des Kern-Signal bei Pirin:GFP repräsentiert einen großen Goldpartikel (s. auch DIC-Bild). In Panel B sind alle möglichen *Split-YFP*-Konfigurationen ohne (D) und mit R-Belichtung (R) nach Dokumentation mittels Konfokalmikroskopie dargestellt. Spalte 1 zeigt ggf. die YFP-Signale infolge einer YFP-Rekonstitution durch Interaktion (YFP): YFP_C:phy4+YFP_N:Pirin (Reihen 1+2), YFP_C:phy4+Pirin:YFP_N (Reihen 3+4), phy4:YFP_C+YFP_N:Pirin (Reihen 5-8; 2 distinkte Signalmuster in D und R) und phy4:YFP_C+Pirin:YFP_N (Reihen 9+10). Analog zu Panel A sind in Spalten 2-4 die rote Fluoreszenz des mCherry:NLS-Kernmarkers (RFP), Chlorophyll-Autofluoreszenz (Chlorophyll) bzw. ein Transmissionsbild (Transmission) dargestellt.

4.5.2.2 Zink-Finger (ZF)-Protein / HIP3 (Pp3c10_4820V1.1)

Das im Holo-phy4:BD-*Screen* identifizierte ZF-Protein (37.4 kDa) enthält CHY-, CTCHY- und C3HC4 (beschreibt jeweils spezielle Cystein-Histidin-Strukturen)-RING-Typ Zinkfinger (ZF)-Domänen. BLAST-Suchen nach Homologen in *Arabidopsis* ergaben starke Ähnlichkeiten des ZF-Proteins zu dem RING-Finger und CHY Zinkfinger-Domänen enthaltenden Protein 1 (AT5G22920, 63% Identität in der 250-AS langen ähnlichen Region), zu *CHY and CTCHY and RING-type zinc finger protein* (AT5G25560) und zu MYB30-*interacting* E3 Ligase 1 (AT5G18650, mit 59% Identität, die fast die gesamte *Query*-Länge abdeckt, abgesehen von den ersten 64 AS). In *Physcomitrella* konnten inklusive HIP3 5-7 Homologe identifiziert werden (s. Tabelle 6-1). *Y2H*-Analysen mit der Vollängen-CDS zeigten schwache aber R-verstärkte Interaktionen mit phy4 in allen Konformationen (s. Abbildung 4-25). phy4:BD+ADg:ZF zeigte Interaktion in Rc aber nicht in Rp, was ebenfalls für eine schwache Interaktion spricht. Bei Lokalisationsstudien waren zwar keine Änderungen nach R-Vorbehandlungen evident, jedoch war die Lokalisation von CFP:ZF sowohl in Kern und Cytoplasma als auch im Cytoplasma alleine (in etwa der Hälfte der Zellen) und bei ZF:CFP in Kern und Cytoplasma zu beobachten (Abbildung 4-27 A). Da das Molekulargewicht der ZF-CFP-Fusionen (37 kDa + 27 kDa *Tag*) knapp unterhalb der Kernporen-Ausschlussgröße liegt, sollte es zumindest als Monomer in der Lage sein, passiv in den Zellkern zu diffundieren. Insofern ist eine ausschließlich cytoplasmatische Lokalisation interessant, denn dies würde ggf. eine Verhinderung des Kernimports (oder aktiven Kernexport) implizieren. Daraus würde sich eine eher cytoplasmatische Funktion des ZF-Proteins ableiten. Allerdings ergaben Vorhersagen klassischer NLS und NES-Motive keine Treffer in der Aminosäure-Sequenz. *In planta* Interaktion war lediglich für phy4:YFP_N+ZF:YFP_C im Kern und im Cytoplasma erkennbar (Abbildung 4-27 B) – entsprechend der Lokalisationsdaten. Alle anderen Konformationen ergaben nur Hintergrundsignale und Kanal-*Bleedthroughs*. Interessanterweise waren die *Split-YFP*-Signale nur nach R-Belichtung zu erkennen, was eine Pfr-abhängige Interaktion *in planta* wie in *Y2H* impliziert. Das ZF-Protein scheint in allen Entwicklungsstadien und allen Bedingungen außer Dehydrierung exprimiert zu sein (s. Anhang 1.7.3), jedoch gibt es keine Anzeichen für eine Synexpression mit phy4.

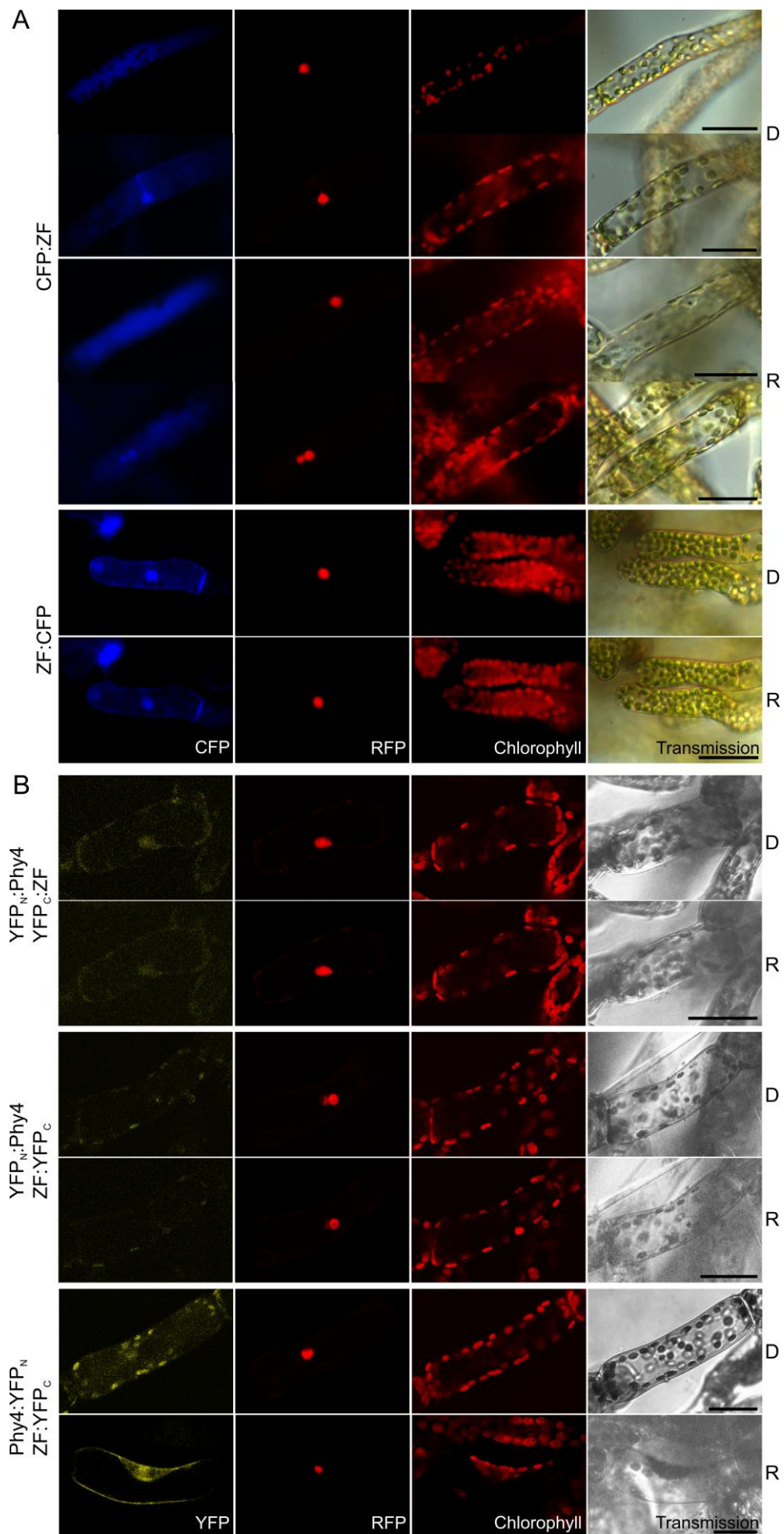


Abbildung 4-27: ZF-Protein / HIP3 (Pp3c10_4820V1.1) intrazelluläre Lokalisations- (A) und *Split-YFP* Studien der ZF-Protein-phy4 Interaktion (B) beide ohne (D) und mit R-Vorbehandlung (R) mittels Fluoreszenz- bzw. Konfokalmikroskopie. Die Abbildungsstruktur entspricht Abbildung 4-26. Maßstab 30 µm.

Abbildung 4-27 zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen von Lokalisation (A) und *in planta* Interaktion (B) für das ZF-Protein. (A) CFP:ZF (Reihen 1-4) und ZF:CFP (Reihen 5+6; Spalte 1, CFP). Die CFP:ZF-Lokalisation war nicht eindeutig (s.o.), denn sie war zum einen in Kern und Cytoplasma (Reihen 2+4) oder nur im Cytoplasma (Reihen 1+3) in beiden Bedingungen zu beobachten. (B) *Split-YFP*-Analyse von YFP_N:phy4+YFP_C:ZF (Reihen 1+2), YFP_N:phy4+ZF:YFP_C (Reihen 3+4) und phy4:YFP_N+ZF:YFP_C (Reihen 5+6) Konfigurationen. Signifikante Signale waren nur bei phy4:YFP_N+ZF:YFP_C nach R-Bestrahlung zu erkennen (hier wurden D- und R-Behandlungen in zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt).

4.5.2.3 PLEIOTROPIC REGULATORY LOCUS 1 (PRL1) / HIP4 (Pp3c16_8560E1.1)

Im Apo-BD:PHY4-*Screen* konnte PLEIOTROPIC REGULATORY LOCUS1 (PRL1) (53.9 kDa) identifiziert werden, welches 65% Identität mit seinem *Arabidopsis*-Homolog (AT4G15900) und 62% Identität mit PRL2 teilt. In *Physcomitrella* konnte mit Pp3c5_15520V1.1 ein weiteres Homolog identifiziert werden, während viele weitere Proteine lediglich Ähnlichkeiten im Bereich der sieben PRL1-WD40 Domänen aufwiesen. Im *Y2H*-Wachstums-*Assay* interagierte PRL1 mit Holo-phy4 in allen getesteten *Bait-Prey*-Kombinationen. Alle bis auf eine Interaktion waren R-verstärkt und z.T. FR-reversibel, während BD:phy4+PRL1:ADg konstitutiv interagierten (Abbildung 4-25). Unabhängig von der Belichtung lokalisierte PRL1:GFP im Zellkern und Cytoplasma, während CFP:PRL1 vorwiegend im Zellkern zu beobachten war (Abbildung 4-28 A). Eine konstitutive *in planta* Interaktion konnte für alle Konfigurationen außer phy4:YFP_C+PRL1:YFP_N verifiziert werden (Abbildung 4-28 B). Rekonstituierte YFP-Signale waren bei phy4:YFP_C+YFP_N:PRL1 und weniger deutlich bei YFP_C:phy4+PRL1:YFP_N in Cytoplasma und Kern zu erkennen, während YFP_C:phy4+YFP_N:PRL1 eher im Cytoplasma alleine interagierten. Die Lokalisationen der PRL1-phy4-Komplexe entsprechen weitgehend den entsprechenden Lokalisationsdaten (Ausnahme: phy4:YFP_C + YFP_N:PRL1; vgl. Abbildung 4-28 A und B). PRL1/HIP4 scheint in allen Entwicklungsstadien und unter allen getesteten Bedingungen exprimiert zu werden, wobei *Genevestigator* Anatomie-, Entwicklungs- und Perturbations-Daten (Bedingungen im Vergleich zu einer Kontrolle) ein phy4-ähnliches Muster aufwiesen (s. Anhang 1.7.4).

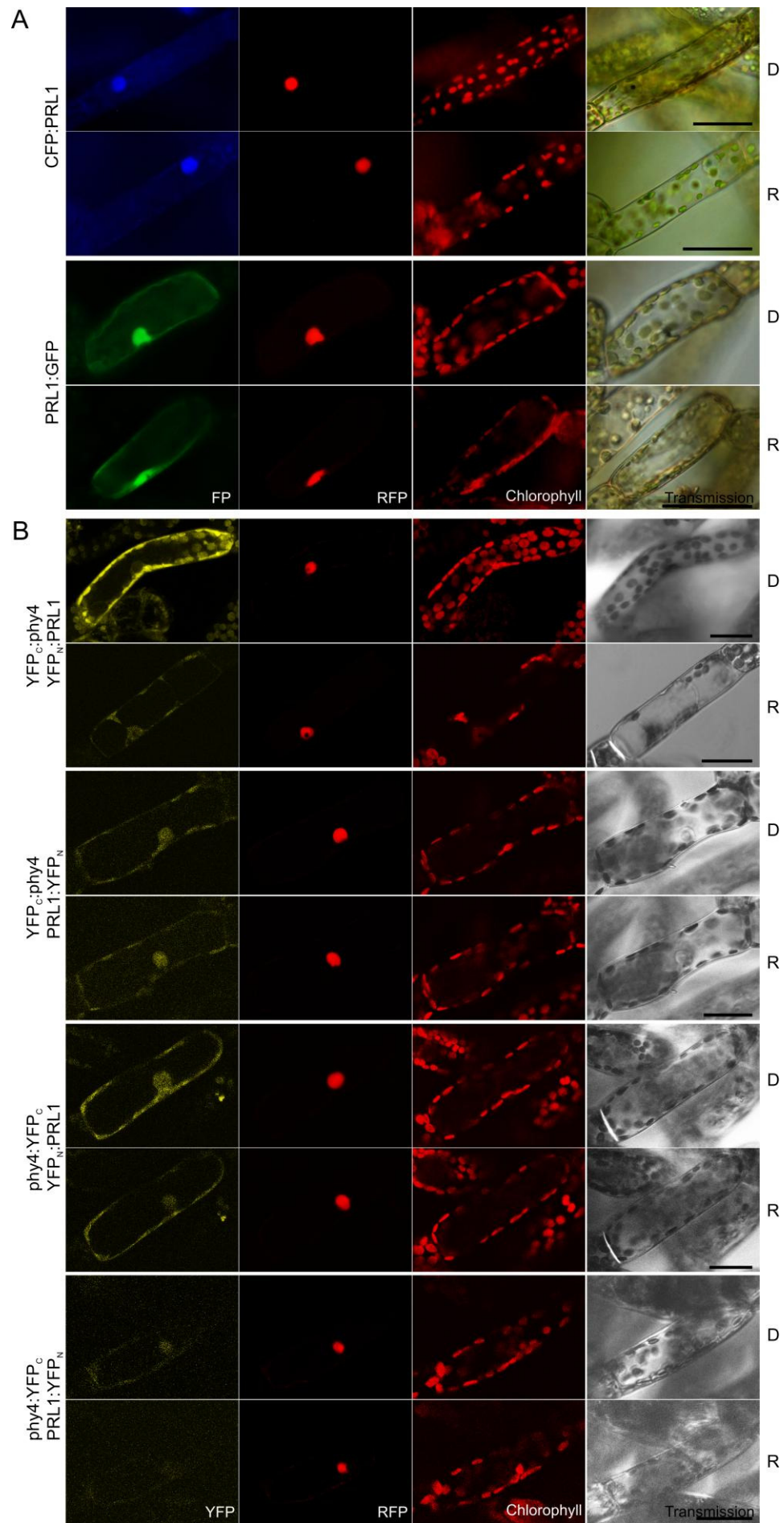


Abbildung 4-28: PRL1 / HIP4 (Pp3c16_8560E1.1) intrazelluläre Lokalisations- (A) und *Split-YFP* Studien der PRL1-phy4 Interaktion (B) beide ohne (D) und mit R-Vorbehandlung (R) mittels Fluoreszenz- bzw. Konfokalmikroskopie. Der Aufbau der Abbildung entspricht Abbildung 4-26. Maßstab 30 µm. Panel A Reihen 1+2 und Panel B Reihe 1 Daten von Dr. Katharina Mailliet bzw. Rabea Meyberg.

Abbildung 4-28 stellt die Ergebnisse der PRL1-Lokalisations- (A) und *Split-YFP*-Untersuchungen der PRL1-phy4-Interaktion (B) dar. Panel A zeigt CFP:PRL1- (Reihen 1+2) und PRL1:GFP- Fluoreszenzen (Reihen 3+4; Spalte 1, FP). In Panel B sind alle möglichen *Split-YFP*-Konfigurationen in D bzw. R gezeigt: YFP_C:phy4+YFP_N:PRL1 (Reihen 1+2), YFP_C:phy4+PRL1:YFP_N (Reihen 3+4), phy4:YFP_C+YFP_N:PRL1 (Reihen 5+6) und phy4:YFP_C+PRL1:YFP_N (Reihen 7+8). Deutliche Signale konnten bei YFP_C:phy4+YFP_N:PRL1, phy4:YFP_C+YFP_N:PRL1 und schwächer bei YFP_C:phy4+PRL1:YFP_N sowohl in D als auch in R dokumentiert werden. phy4:YFP_C+PRL1:YFP_N ergab lediglich Hintergrundsignale und Kanal-Bleedthroughs.

4.5.2.4 F-Box-interacting/Kelch-Protein (Pp1s271_60V6.1) und Kelch-Repeat-Protein / HIP5 (Pp3c7_3040V1.1)

Sowohl das F-Box-interagierende/Kelch-, als auch das Kelch-Repeat-Protein wurden im Holo-phy4:BD-Screen identifiziert. Das F-box-interagierende/Kelch-Protein wurde zunächst von experimentellen Analysen ausgeschlossen, da im ursprünglichen cDNA-*Prey*-Plasmid lediglich die 3'-UTR vorhanden war. Die Untersuchung von *Y2H*-Interaktionsverhalten und intrazellulärer Lokalisation wurden im Rahmen der BSc-Arbeit von Fabian Stahl nachgeholt.

Für das **F-Box-interacting/Kelch-Protein** (35 kDa) wird in einem überlappenden Sequenzbereich eine F-Box-interacting (AS 53-241) und eine Galaktose Oxidase/Kelch, β -Propeller-Domäne (46-232) vorhergesagt. In Version 3 der Genomannotierung konnte kein Genmodell zugeordnet werden, obwohl es für das Modell in der Version 1.6 Annotation EST-Evidenzen gibt. BLAST-Suche von homologen Proteinen in *Arabidopsis* ergab lediglich zwei Treffer mit geringeren Ähnlichkeiten (max. 26% *Identity* bei 30 % *Query Coverage*): F-box-only Protein 13 (AT4G33160) und LEAF CURLING RESPONSIVENESS (AT1G27340). Alle Treffer *alignen* im Bereich zwischen AS 20-130, also eher im F-Box-Bereich (vgl. Anhang 1.7.5). In anderen Pflanzen (Viridiplantae) konnten auch Proteine mit Ähnlichkeiten über die volle *Query*-Länge identifiziert werden, wobei es sich meistens um vorhergesagte / hypothetische Proteine in *Physcomitrella* und *Selaginella* handelt. *Picea Unusual Floral Organs-like* Proteine wiesen schwächere Ähnlichkeiten zum *Physcomitrella* Protein auf. In *Physcomitrella* selbst wurde nur ein engeres Homolog identifiziert (Pp1s80_112V6.1). *Y2H*- und Lokalisations-Untersuchungen wurden im Rahmen der BSc-Arbeit von Fabian Stahl unter meiner Aufsicht durchgeführt. R-induzierte und FR-revertierte *Y2H*-Interaktion konnte für phy4:BD in Kombination mit ADg:F-box-interacting/Kelch-Protein und F-box-interacting/Kelch-Protein:ADg demonstriert werden, während BD:phy4 mit keinem der beiden *Preys* zu einer Wachstumsantwort führte (Abbildung 4-25). Unabhängig von der Position des GFP- Tags und der R-Bestrahlung lokalisierten die GFP-Fusionsproteine in Zellkern und Cytoplasma, vermutlich da es aufgrund seiner Größe frei in der Zelle diffundieren kann (Abbildung 4-29). F-Box-interacting/Kelch:GFP scheint darüber hinaus auch in Chloroplasten vorzuliegen. Da die GFP-Signalstärke bei der C-terminalen GFP-Fusion jedoch sehr schwach war, kann ein Chloroplasten-Bleedthrough, der durch die starke Kontrast- und Helligkeitsanpassung evident wird, nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

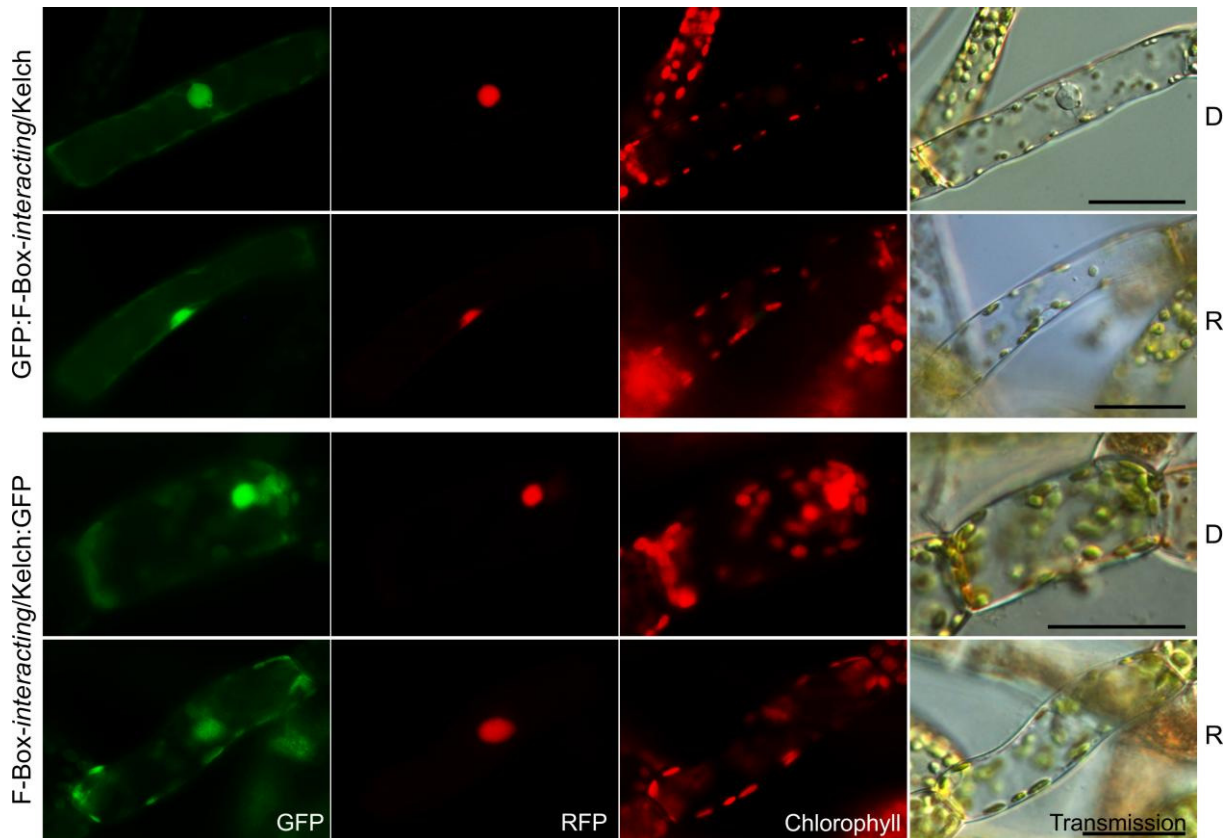


Abbildung 4-29: Intrazelluläre Lokalisation von F-Box-*interacting*/Kelch-Protein (Pp1s271_60V6.1)-GFP-Fusionen ohne (D) und mit R-Vorbehandlung (R) dokumentiert mittels Fluoreszenzmikroskopie. Maßstab 30 µm. Daten von BSc Fabian Stahl.

Abbildung 4-29 zeigt die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Lokalisationsanalyse von GFP:F-Box-*interacting*/Kelch (Reihen 1+2) und F-Box-*interacting*/Kelch:GFP (Reihen 3+4). Die N-terminale Fusion liegt in Cytoplasma und Kern, die C-terminale Fusion liegt in Cytoplasma, Kern und ggf. in Chloroplasten vor.

Das F-box-*interacting*/Kelch-Protein ist vergleichsweise schwach in den meisten Entwicklungsstadien exprimiert, wobei die höchste Expression/Hoch-Regulation in Gametangien-Entwicklung (*Genevestigator*), Sporen (eFP) und unter Dehydrierungsbedingungen (*Genevestigator*) stattfindet (s. Anhang 1.7.5). Eine Synexpression mit *phy4* scheint nicht der Fall zu sein.

Für das **Kelch-Repeat-Protein** (54.4 kDa) wurde im Cosmos-Sequence Viewer eine N-terminale F-Box-Domäne angezeigt, jedoch zeigten eingehendere Domänensuchen auf InterProScan, dass es lediglich vier Kelch-*Repeats* im C-terminalen Bereich aber keine F-Box-Domäne trägt. Das *Physcomitella* Protein weist 32-40 % Sequenzidentität mit *Arabidopsis* F-Box/Kelch-*Repeat* Proteinen, wie z.B. mit Galaktose-Oxidase/Kelch-*Repeat Superfamily* Protein (AT1G14330), MIR2111-5p-*Target* Protein (AT3G27150) und SKIP11 auf (AT2G02870). Diese Proteine ähneln allerdings nur dem C-Terminus des *Physcomitrella* Proteins (= 64-71% der *Query*-Sequenz) – also im Bereich der Kelch-*Repeats*, während die ersten 135-175 Aminosäuren (AS) vom *Physcomitrella* Protein abweichen. In *Physcomitrella* konnte ein weiteres engeres Homolog identifiziert werden (Pp3c11_19970V1.1), während 22 Proteine geringere Ähnlichkeiten ab AS 140 aufwiesen. Das semiquantitative *Y2H*-Interaktions-Assay bestätigte R-verstärkte und weitgehend FR-reversible Interaktion in allen getesteten Konfigurationen mit Ausnahme von BD:*phy4*+Kelch-*Repeat*:ADg (Abbildung 4-25). Das

Kelch-*Repeat*-Protein scheint konstitutiv in Kern und Cytoplasma vorzuliegen unabhängig von der Position des Fluoreszenz-*Tags* (Abbildung 4-30 A). Interessanterweise zeigte eine ältere N-terminal kürzere Version des Genmodells eine ausschließlich cytoplasmatische Lokalisation als N-terminale GFP-Fusion (nicht gezeigt). Dies impliziert, dass ein putatives NLS in den ersten 129 Aminosäuren am N-Terminus vorliegt. Eine *in planta* Interaktion von phy4 und Kelch-*Repeat*-Protein konnte mittels *Split-YFP* verifiziert werden, jedoch war diese im Gegensatz zu den *Y2H*-Daten unabhängig von der Licht-Vorbehandlung (Abbildung 4-30 B). Analog zu den Lokalisationsdaten war das Interaktionssignal von phy4:YFP_C+Kelch-*Repeat*:YFP_N und vielleicht YFP_C:phy4+YFP_N:Kelch-*Repeat* im Zellkern und Cytoplasma zu sehen. Letzteres könnte allerdings auch RFP-*Bleedthrough* in den YFP-Kanal repräsentieren, da das YFP-Signal sehr schwach war. Das YFP-Signal von der rekonstituierten phy4:YFP_C+YFP_N:Kelch-*Repeat*-Kombination hingegen lokalisierte interessanterweise ausschließlich im Cytoplasma, obwohl GFP:Kelch-*Repeat* sowohl in Kern und Cytoplasma anzutreffen war (Abbildung 4-30 B). Das Kelch-*Repeat*-Protein/HIP5 scheint in allen Entwicklungsstadien und Bedingungen exprimiert zu sein. Im Gegensatz zu eFP und *Phytozome*-Daten weisen die Genevestigator-*Microarray*-Daten für Entwicklungsstadien, Anatomie und Perturbationen auf eine Synexpression mit phy4 hin (s. Anhang 1.7.6).

4. Ergebnisse

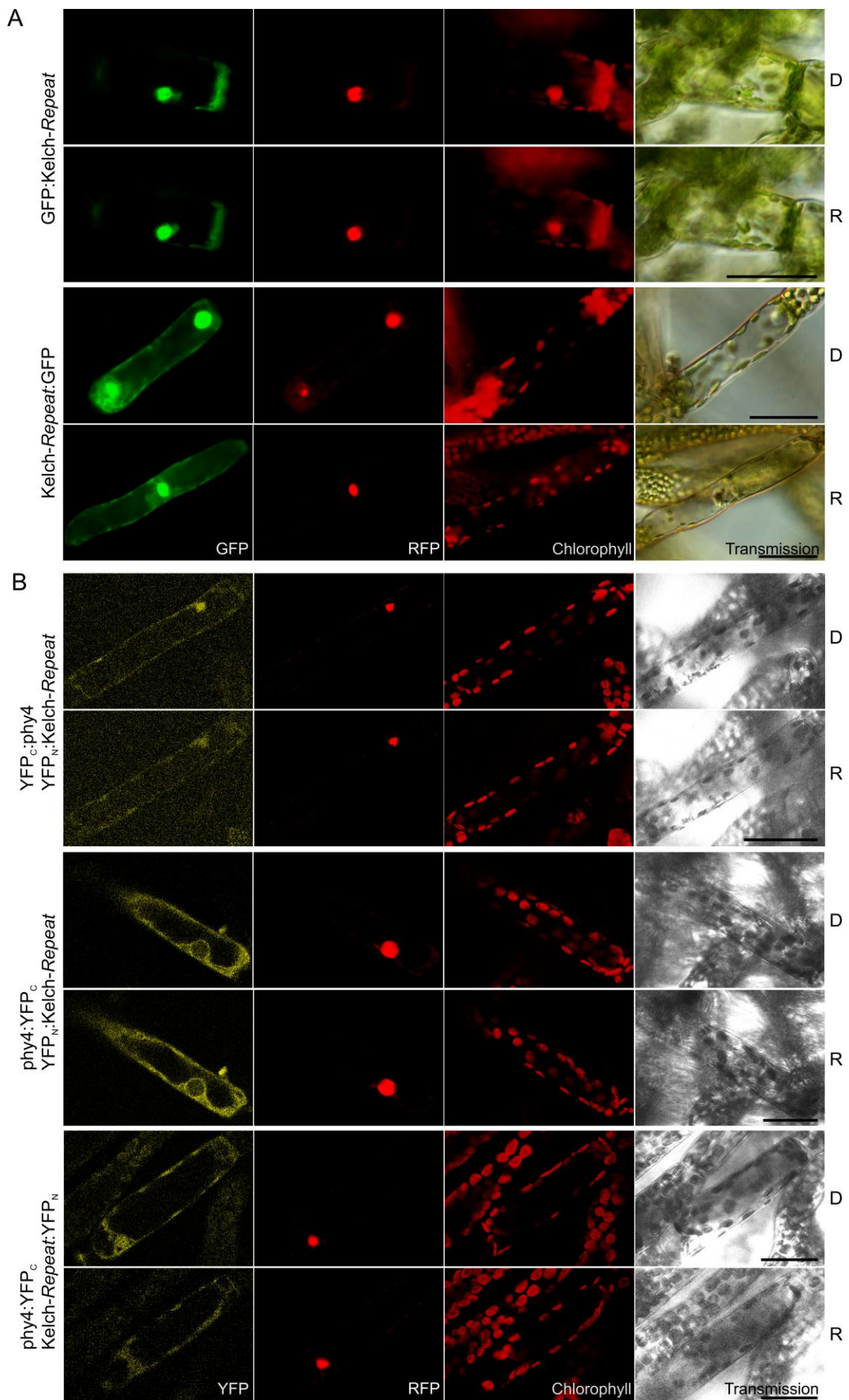


Abbildung 4-30: Kelch-Repeat-Protein / HIP5 (Pp3c7_3040V1.1) intrazelluläre Lokalisations- (A) und *Split-YFP* Studien der Kelch-Repeat-Protein-phy4 Interaktion (B) beide ohne (D) und mit R-Vorbehandlung (R) mittels Fluoreszenz- bzw. Konfokalmikroskopie. Der Aufbau der Abbildung entspricht Abbildung 4-26. Maßstab 30 µm.

Panel A der Abbildung 4-30 zeigt die Lokalisation von GFP:Kelch-Repeat- (Reihen 1+2) und Kelch-Repeat::GFP (Reihen 3+4; Spalte 1, GFP). In Panel B sind die unterschiedlichen *Split-YFP*-Signalmuster von drei Konformationen dargestellt: YFP_C:phy4+YFP_N:Kelch-Repeat (Reihen 1+2), phy4:YFP_C+YFP_N:Kelch-Repeat (Reihen 3+4) und phy4:YFP_C+Kelch-Repeat:YFP_N (Reihen 5+6). Das YFP_C:phy4+YFP_N:Kelch-Repeat-Signal könnte allerdings auch RFP-Bleedthrough in den YFP-Kanal darstellen.

4.5.2.5 P-Loop-Protein (PLP) / HIP6 (Pp3c6_4480V1.1)

Das P-Loop-Protein (PLP; 43,7 kDa) wurde im Apo-BD:PHY4-Screen von Dr. Mailliet identifiziert, zeigte jedoch als C-terminale ADg-Fusion R-induzierte und FR-revertierte phy4:BD-Interaktion, während AD:PLP jeweils stark und konstitutiv mit beiden Holo-phy4-Baits interagiert (Abbildung 4-25). Für PLP wurde eine Transmembran- und eine P-Loop-enthaltende Sulfotransferase-Domäne an N- bzw. C-Terminus vorhergesagt (Tabelle 6-1). In *Physcomitrella* konnten drei weitere Homologe identifiziert werden (Pp3c5_24550V1.1, Pp3c25_12260V1.1 & Pp3c16_22670V1.1), während das *Arabidopsis*-Genom für 22 Sulfotransferasen codiert (Hirschmann 2014). BLASTP-Suche ergab indes drei engere Homologe: *Arabidopsis* Sulfotransferasen 19-21 = *P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase family proteins* (AT3G50620, AT2G15730 & AT4G34420). N- und C-terminale PLP-FP-Fusionen waren ausschließlich im Cytoplasma vorhanden, im Fall von PLP:GFP interessanterweise mit Konzentration in subzellulären Foci (Abbildung 4-31 A). Eine ähnliche Lokalisation konnte auch bei der phy4:YFP_C+YFP_N:PLP-Interaktion beobachtet werden, wohingegen andere *Split-YFP*-Konfigurationen (phy4:YFP_C+PLP:YFP_N und evtl. YFP_C:phy4+YFP_N:PLP) eher cytoplasmatische und schwächere Kernlokalisation zeigten (Abbildung 4-31 B). Im letzteren Fall kann das Kern-YFP-Signal auch von RFP-Bleedthrough des Kernmarkers herrühren, was die Einengung der Fluoreszenzdetektion nahe legte (nicht gezeigt). Die Licht-Vorbehandlung hatte kaum einen Effekt auf das *in planta* Interaktionsverhalten (auch im Fall von phy4:YFP_C+PLP:YFP_N, was dem im *Y2H* lichtabhängigen phy4:BD+PLP:ADg entspricht). Weder in *Y2H*, noch in *Split-YFP* konnte eine signifikante Interaktion zwischen N-terminal fusioniertem phy4 und C-terminal fusioniertem PLP detektiert werden. Der Vergleich von phy4 und PLP-Expressionsdaten ergab zum einen, dass PLP in allen Entwicklungsstadien und Bedingungen exprimiert wird und zum anderen, dass phy4 und PLP laut *Genevestigator Microarray*-Daten (v. A. der Perturbations-Daten) ko-reguliert sein könnten (s. Anhang 1.7.7).

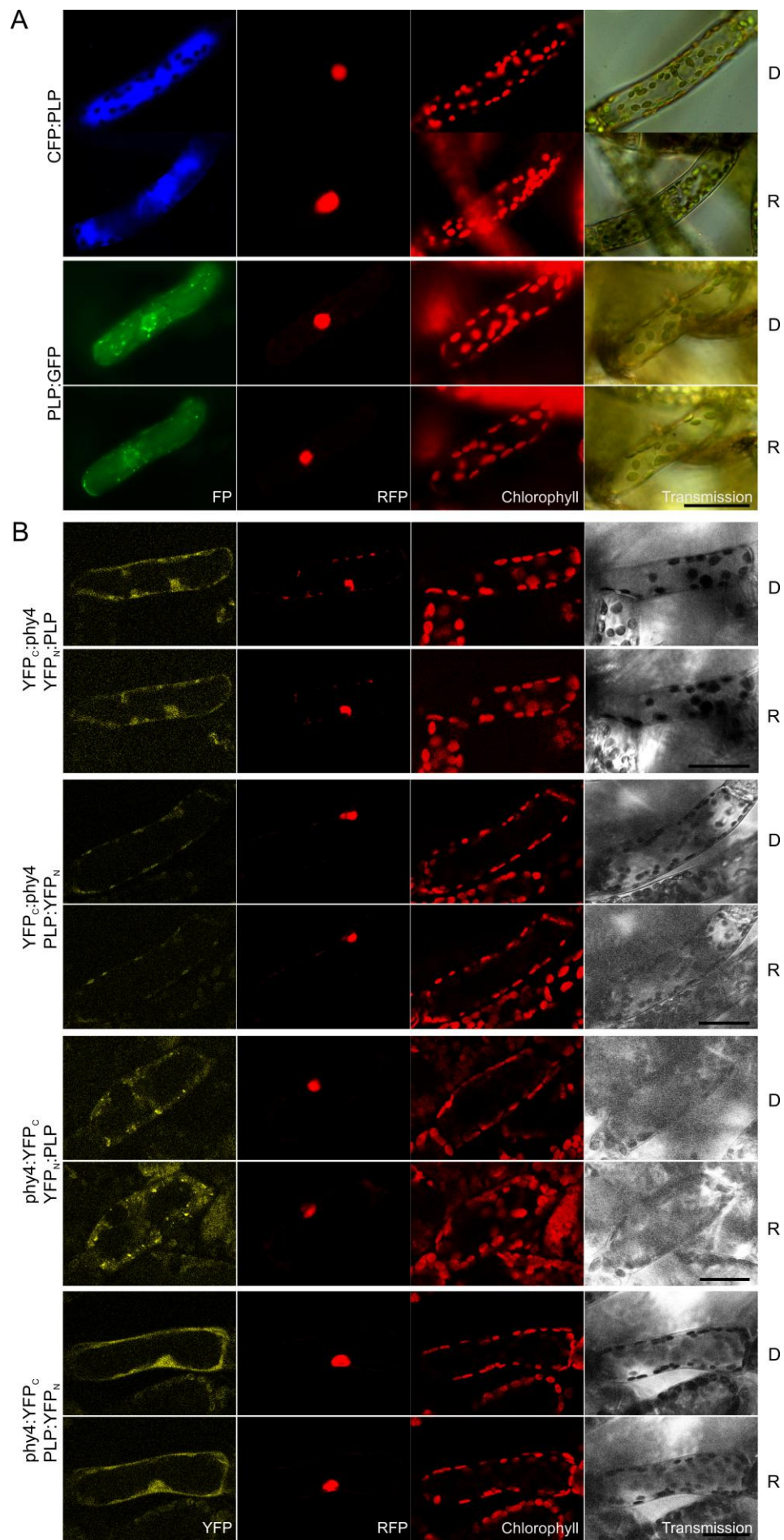


Abbildung 4-31: P-Loop-Protein (PLP) / HIP6 (Pp3c6_4480V1.1) intrazelluläre Lokalisations- (A) und *Split-YFP* Studien der PLP-phy4 Interaktion (B) beide ohne (D) und mit R-Vorbehandlung (R) mittels Fluoreszenz- bzw. Konfokalmikroskopie. Der Aufbau der Abbildung entspricht Abbildung 4-26. Maßstab 30 µm. Panel A Reihen 1+2 Daten von Dr. Katharina Mailliet bzw. Rabea Meyberg.

Panel A von Abbildung 4-31 zeigt die intrazelluläre Lokalisation von CFP:PLP (Reihen 1+2) und PLP:GFP (Reihen 3+4; Spalte 1 FP) In Panel B sind alle vier möglichen *Split-YFP*-Konfigurationen dargestellt: YFP_C:phy4+YFP_N:PLP (Reihen 1+2), YFP_C:phy4+PLP:YFP_N (Reihen 3+4), phy4:YFP_C+YFP_N:PLP (Reihen 5+6) und phy4:YFP_C+PLP:YFP_N (Reihen 7+8). Signifikante YFP-Signale waren nur bei phy4:YFP_C+YFP_N:PLP und phy4:YFP_C+PLP:YFP_N zu beobachten, während die nukleäre Fluoreszenz von YFP_C:phy4+YFP_N:PLP RFP-*Bleedthrough* repräsentieren könnte. YFP_C:phy4+PLP:YFP_N zeigt lediglich Chloroplasten-*Bleedthrough*.

4.5.2.6 Ser/Thr-Proteinkinase/ HIP7 (Pp3c17_9390V1.1)

Bei dem nächsten aus dem Holo-phy4-BD-*Screen* hervorgegangenen putativen Interaktionspartner handelt es sich vermutlich um eine Ser/Thr-Proteinkinase (31.5 kDa). Das Protein weist schwache aber signifikante Ähnlichkeit zu verschiedenen *Arabidopsis* Ser/Thr-Proteinkinasen, wie zum Beispiel HIGH LEAF TEMPERATURE 1 (HT1, AT1G62400), oder einer Kinase mit einer Armadillo-*Repeat*-Domäne (AT5G18700), einer MAP-Kinase (AT1G73660) und einer PAS-Domänen-enhaltenden Protein-Tyrosinkinase (AT3G06620 mit je ~40% *Query Coverage* und ~30% Sequenzidentität) auf (Phytochrom selbst besitzt auch PAS-Domänen). Vergleich mit Viridiplantae-Proteinen ergab viele Treffer mit stärkerer Ähnlichkeit zum *Physcomitrella* Protein, zumeist wiesen diese ebenfalls Ähnlichkeiten zu *Arabidopsis* HT1 auf. In *Physcomitrella* hingegen scheint es sich um ein Einzelgen zu handeln, da keine signifikant ähnlichen Proteine gefunden werden konnten. In *Y2H*-Studien war die phy4-Kinasen-Interaktion vergleichsweise schwach, aber immerhin R-verstärkt und FR-reversibel mit stärkstem Wachstum bei phy4:BD+ADg:Proteinkinase (Abbildung 4-25). Sowohl N- als auch C-terminale Kinase-CFP-Fusionen waren intrazellulär in Kern und Cytoplasma lokalisiert (Kernakkumulation insbesondere bei Kinase:CFP), wobei CFP:Kinase in ca. 40% der beobachteten Zellen cytoplasmatische Lokalisation mit subzellulären Foci aufwies (Abbildung 4-32 A, Reihen 2+4). Diese sahen allerdings anders aus, als beispielsweise bei PLP:GFP (Abbildung 4-31 A), und wurden in ähnlicher Form auch bei eIF-5A-CFP-Fusionen (nicht gezeigt), nicht jedoch bei eIF-5A-GFP-Fusionen beobachtet. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den Foci um Artefakte handelt. Im *Split-YFP* konnten nukleäre und cytoplasmatische Signale bei YFP_C:Kinase in Kombination mit YFP_N:phy4 und phy4:YFP_N beobachtet werden (Abbildung 4-32 B), was weitgehend den Lokalisationsdaten entspricht. Da die *Split-YFP*-Signale wesentlich schwächer waren, als die rote mCherry:NLS-Fluoreszenz, wurde mittels Einengung der Fluoreszenzdetektion auf 10 nm um das YFP-Emissionsmaximum überprüft, ob es sich um RFP-*Bleedthrough* handelt. Das Fluoreszenzmuster änderte sich daraufhin jedoch nicht, weshalb das YFP-Signal als *bona fide* nukleäre Interaktion interpretiert wurde. Interessanterweise war die phy4:YFP_N+YFP_C:Kinase-Interaktion scheinbar R-abhängig, denn das YFP-Signal war hier erst nach R-Vorbehandlung zu beobachten. Dies legt eine Pfr-abhängige Interaktion *in planta* (wie in *Y2H*) nahe. *Phytozome*- und *Genevestigator*-RNASeq- bzw. *Microarray*-Daten deuten auf eine Synexpression von phy4 und HIP7 in Protonemata bzw. unter Dedifferenzierungs- und bestimmten Lichtbedingungen hin. Auch bei den *Genevestigator*-Entwicklungs- und Anatomie-Daten scheinen beide Gene ein vergleichbares Muster aufzuweisen (s. Anhang 1.7.8).

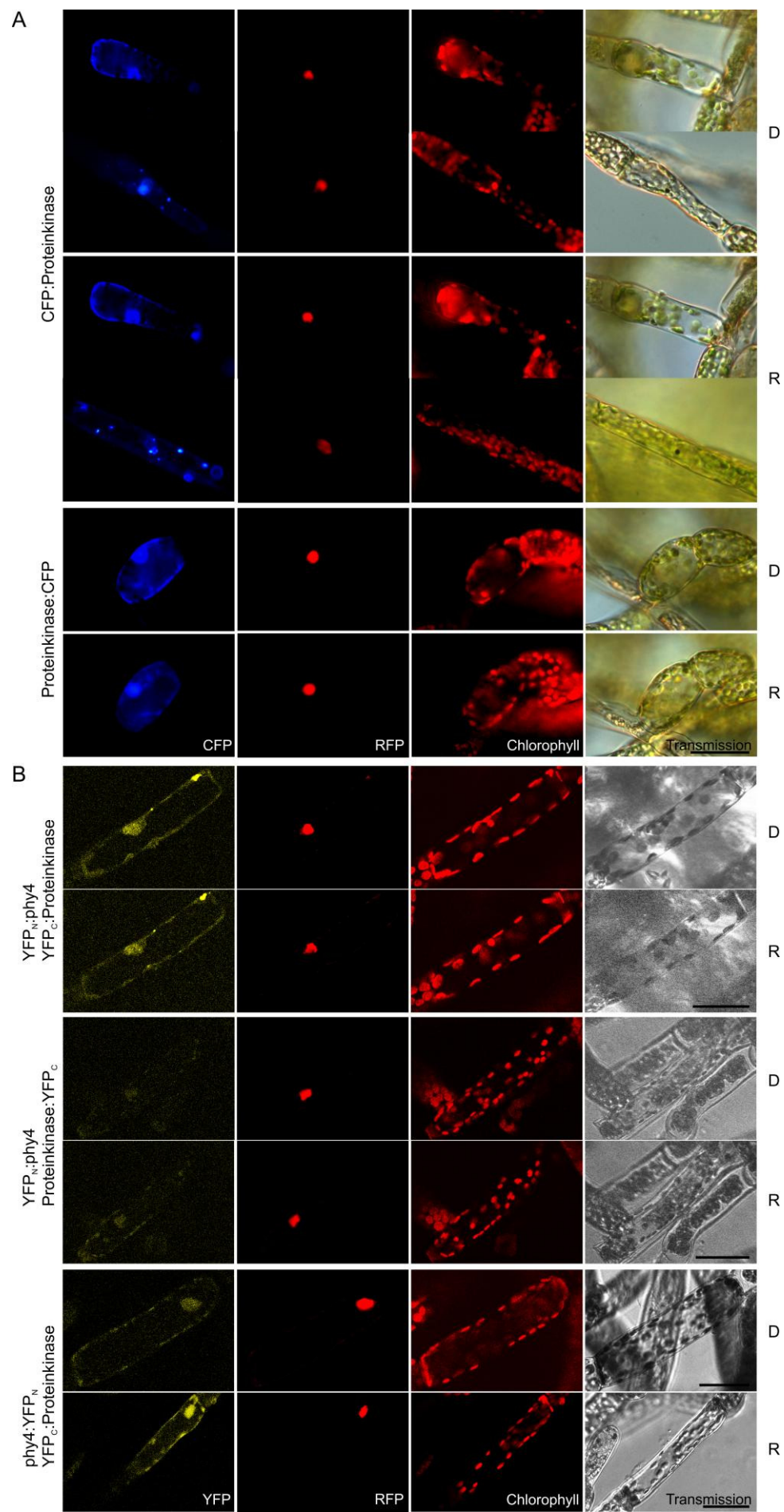


Abbildung 4-32: Ser/Thr-Proteinkinase / HIP7 (Pp3c17_9390V1.1) intrazelluläre Lokalisations- (A) und *Split-YFP* Studien der Kinase-phy4 Interaktion (B) beide ohne (D) und mit R-Vorbehandlung (R) mittels Fluoreszenz- bzw. Konfokalmikroskopie. Der Aufbau der Abbildung entspricht Abbildung 4-26. Maßstab 30 µm.

In Panel A von Abbildung 4-32 ist die intrazelluläre Lokalisation von CFP:Proteinkinase (Reihen 1-4) und Proteinkinase:CFP (Reihen 5+6; CFP Spalte 1) dargestellt. Meist wurde nukleäre und cytoplasmatische CFP-Lokalisation beobachtet (Reihen 1, 3, 5&6). CFP:Proteinkinase zeigte allerdings in ca. 40% der Zellen ausschließlich cytoplasmatische Lokalisation mit cytosolischen Foci (Reihen 2+4). In Panel B sind die Ergebnisse der *Split-YFP*-Analyse von 3 von 4 möglichen Kombinationen gezeigt: YFP_N:phy4+YFP_C:Kinase (Reihen 1+2), YFP_N:phy4+ Kinase:YFP_C (Reihen 3+4) und phy4:YFP_N+YFP_C:Kinase (Reihen 5+6). YFP_N:phy4+YFP_C:Kinase and phy4:YFP_N+YFP_C:Kinase ergaben signifikante *Split-YFP*-Signale – in letzterem Fall nur nach R-Vorbehandlung (D und R-Behandlungen wurden hier in unterschiedlichen Experimenten durchgeführt).

4.5.2.7 TP53-regulierende Kinase (Pp3c15_20330J1.1)

Pp3c15_20330J1.1 (25,5 kDa) wurde im Holo-phy4:BD-*Screen* identifiziert, allerdings lediglich bezüglich des *Y2H*-Interaktionsverhaltens und der intrazellulären Lokalisation untersucht (BSc-Arbeit Fabian Stahl unter meiner Aufsicht). Domänenvorhersagen ergaben diverse Domänen-Treffer (für den gleichen Sequenzbereich): eine Protein-Kinase-*like*- und eine Proteinkinase Domäne. InterPro ordnete das Protein der Familie der Ser/Thr Proteinkinase Bud 32 zu. Somit hat das *Physcomitrella*-Protein vermutlich wie die oben beschriebene Kinase eine Funktion in posttranslationaler Modifikation von Proteinen durch Phosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten. Abgleich der *Physcomitrella*-Proteinsequenz mit der *Arabidopsis*-Proteindatenbank ergab ein Protein mit nahezu voller *Query Coverage* und 64% Identität: AT5G26110 *Protein Kinase Family Protein*, welches zuvor „TP53-regulating Kinase“ hieß, wovon der gewählte Name abgeleitet ist (vgl. Anhang 1.7.9). Auch in anderen Pflanzen scheint das Protein sehr konserviert zu sein, denn der Vergleich mit Viridiplantae-Proteinen ergab viele Treffer mit > 90% *Coverage* und zwischen 56% und 67% Identität. Unter den ähnlichsten Proteinen befanden sich neben der genannten TP53-regulierenden Kinase aus *Arabidopsis* auch solche (vorhergesagten) Proteine aus *Cicer*, *Gossypium*, *Brassica*, *Populus*, *Vigna radiata*, *Camelina sativa* und *Glycine soja*. Auffällig häufig befanden sich unter den Treffern auch verschiedene vorhergesagte Isoformen von EKC/KEOPS-Komplex Bud32-*like*-Untereinheiten aus verschiedenen *Nicotiana*-Arten, *Erythranthe*, *Nelumbo*, *Amborella*, *Sesamum*, *Solanum* und Anderen. In *Physcomitrella* konnten keine weiteren Homologe identifiziert werden. *Y2H*-Analysen konnten Pp3c15_20330J1.1 in fast allen Kombinationen als phy4-Interaktionspartner verifizieren (Ausnahme BD:phy4+TP53-Kinase:ADg), wobei die Interaktion mit phy4:BD am stärksten war. In Kombination mit beiden *Preys* war die Interaktion mit phy4:BD lichtabhängig, allerdings im Fall von ADg:TP53-regulating Kinase nicht FR-revertierbar. In D trat in keiner der Konfigurationen Wachstum auf (Abbildung 4-25). Die Untersuchung der *in planta* Lokalisation bestätigte die Expressierbarkeit des *Physcomitrella*-Proteins. TP53-regulating Kinase lokalisierte sowohl als N- als auch als C-terminale GFP-Fusion konstitutiv in Kern und Cytoplasma (z.T. mit sub-nukleären Foci; Abbildung 4-33). Interessanterweise zeigte GFP:TP53-regulating Kinase in D eine starke subzelluläre Strukturierung des cytoplasmatischen Signals, was auf eine Assoziation mit dem Cytoskelett hinweisen könnte. Nach R-Bestrahlung war diese nicht mehr in dieser Intensität zu beobachten.

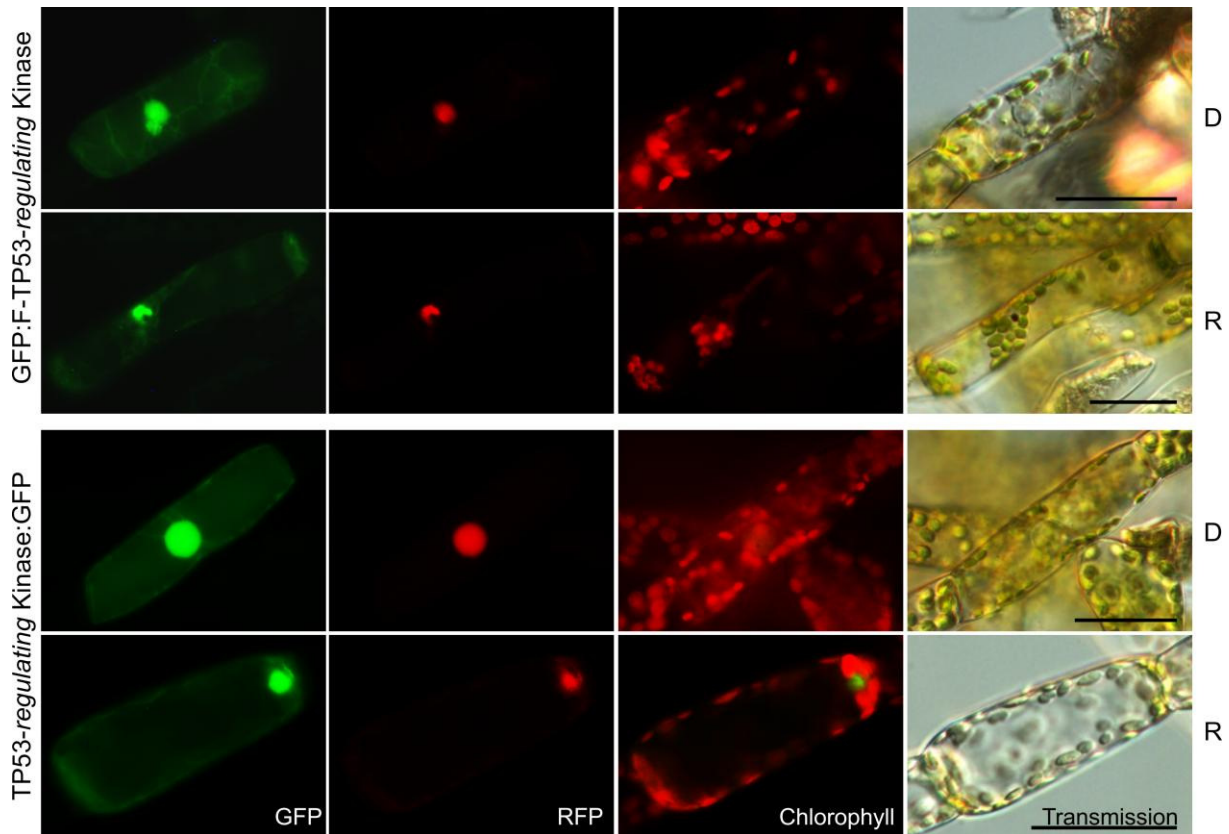


Abbildung 4-33: Intrazelluläre Lokalisation von TP53-*regulating* Kinase (Pp3c15_20330J1.1)-GFP-Fusionen ohne (D) und mit R-Vorbehandlung (R) dokumentiert mittels Fluoreszenzmikroskopie. Maßstab 30 μ m. Daten von BSc Fabian Stahl.

In Abbildung 4-33 ist die intrazelluläre Lokalisation von GFP:TP53-*regulating* Kinase (Reihen 1+2) und TP53-*regulating* Kinase:GFP (Reihen 3+4; Spalte 1 GFP) dargestellt. Unabhängig von der Position des *Tags* und der Lichtbedingung konnten die Fusionsproteine in Cytoplasma und Kern beobachtet werden. GFP:TP53-*regulating* Kinase weist in D eine Cytoskelett-ähnliche Struktur im Cytoplasma auf (Reihe 1). Die Aussparung im Kernsignal in Reihe 2 (R-Bestrahlung) repräsentiert einen Goldpartikel (vgl. auch schwarzer Bereich im DIC-Bild).

Den Expressionsdaten zufolge wird die Kinase scheinbar in allen Entwicklungsstadien und Bedingungen exprimiert mit etwas geringeren Expressions-Leveln in Gametophoren (eFP) und in Gametophoren unter De- und Rehydrierungs-Bedingungen (*Phytozome*, Anhang 1.7.9). Es gibt keine Hinweise auf eine Ko-Regulation mit *phy4*.

4.5.2.8 Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase / HIP8 (Pp3c11_25550V1.1)

Pp3c11_25550V1.1 (55.4 kDa) enthält eine katalytische Ser/Thr-Proteinkinase-Domäne und vier Calcium-bindende EF-Hände und gehört damit zur Familie der Calcium-abhängigen Proteinkinasen (CDPK). Abgleich der CDPK-AS-Sequenz mit Viridiplantae Proteinen ergab viele sehr ähnliche Treffer in diversen Organismen (z.B. *Syntrichia canivervis*, *Ricinus*, *Selaginella*, *Jatropha*, *Gossypium*, *Brassica* und CPK7, 9, 11, 12 in *Physcomitrella* etc.; >90% Sequenzabdeckung, >60% Identität), was für eine starke Konservierung spricht. Das *Arabidopsis*- und das *Physcomitrella*-Genom codieren für je 34 bzw. 25 CDPKs (Hamel *et al.*, 2014), wobei eigene BLAST-Analysen jedoch bis zu 33 ähnliche *Physcomitrella* Proteine ergaben. HIP8 scheint den *Arabidopsis* CPKs 1, 2, 5 und 6 (AT5G04870, AT3G10660, AT4G35310 & AT2G17290) am ähnlichsten zu sein. *Y2H*-Analysen zeigten vergleichsweise schwache Interaktion mit *phy4*, diese waren jedoch stark R(c)-induziert (Abbildung 4-25).

Interaktion mit BD:phy4 war stärker, als mit phy4:BD. Beide *Preys* zeigten darüber hinaus starkes Wachstum in Kombination mit phy4:BD in Rc auf *TSD* + PCB + 2,5 mM 3-AT – einer Konzentration, die für dieses *Bait* 2,5fach zu hoch ist (Anhang Abb. 5). Expression von CDPK-CFP-Fusionen *in planta* war unabhängig von der Licht-Vorbehandlung mit etwa gleicher Signalintensität in Cytoplasma und Kern zu beobachten (Abbildung 4-34 A). *In planta* phy4-CDPK-Interaktionen konnten für alle Konformationen außer YFP_C:phy4+CDPK:YFP_N verifiziert werden (Abbildung 4-34 B). Rekonstituierte YFP-Signale konnten abhängig von Konformation und Lichtbehandlung entweder in Cytoplasma und Kern oder im Cytoplasma alleine dokumentiert werden. Scheinbar führte die R-Vorbehandlung bei phy4:YFP_N+YFP_C:CDPK und evtl. auch bei phy4:YFP_N+CDPK:YFP_C zu einer verstärkten cytoplasmatischen Konzentration des Signals. Dies könnte implizieren, dass der phy4-CDPK-Komplex entweder verstärkt im Cytoplasma vorliegt, oder sich in R dorthin verlagert. Dieses Verhalten war allerdings nur zu sehen, wenn der *Split-YFP-Tag* an den phy4-C-Terminus fusioniert war. Die YFP_C:phy4+YFP_N:CDPK-Interaktion fand ausschließlich im Cytoplasma statt. Die *Physcomitrella* CDPK wird in allen Entwicklungsstadien und Bedingungen exprimiert, insbesondere unter Dedifferenzierungs-Bedingungen (Abtrennung eines Blättchens und Inkubation auf einem Medium im Vergleich zu einem unbehandelten abgetrennten Blättchen). Lediglich die *Genevestigator* Perturbationsdaten lassen auf eine Synexpression mit phy4 schließen (s. Anhang 1.7.10)

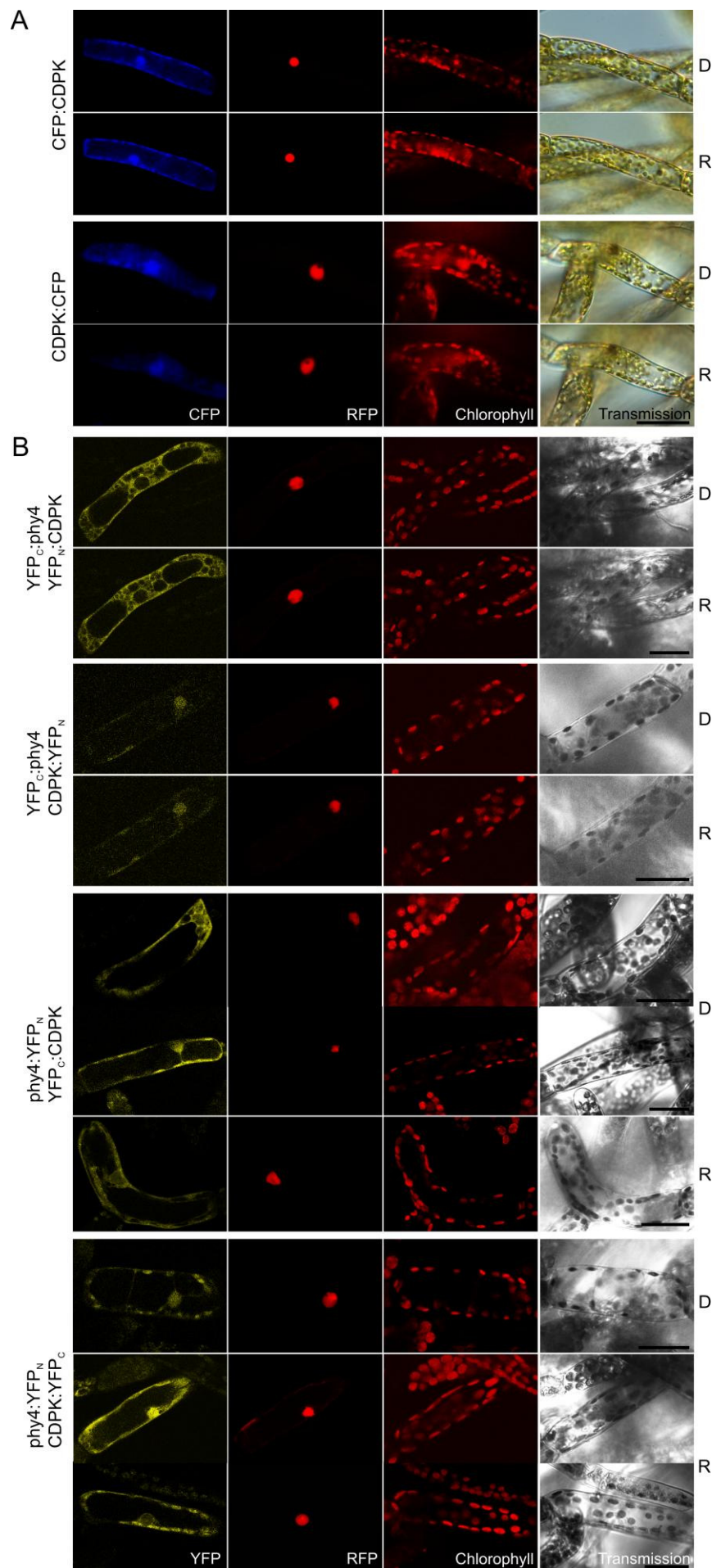


Abbildung 4-34: CDPK / HIP8 (Pp3c11_25550V1.1) intrazelluläre Lokalisations- (A) und *Split-YFP* Studien der CDPK-phy4 Interaktion (B) beide ohne (D) und mit R-Vorbehandlung (R) mittels Fluoreszenz- bzw. Konfokalmikroskopie. Der Aufbau der Abbildung entspricht Abbildung 4-26. Maßstab 30 µm.

Abbildung 4-34 A zeigt die CFP:CDPK- (Reihen 1+2) und CDPK:CFP-Fluoreszenz (Reihen 3+4). Signale konnten in Kern und Cytoplasma (Spalte 1, CFP) beobachtet werden. (B) Alle vier möglichen *Split-YFP*-Konfigurationen wurden untersucht, allerdings wiesen die zu YFP_N:phy4+YFP_C:CDPK und YFP_N:phy4+CDPK:YFP_C gehörigen Negativkontrollen beträchtliche Signale auf, so dass diese Konfigurationen durch YFP_C:phy4+YFP_N:CDPK und YFP_C:phy4+CDPK:YFP_N (*Tag-Swaps*) ersetzt wurden. YFP_C:phy4+YFP_N:CDPK (Reihen 1+2) zeigte cytoplasmatische *in planta* Interaktion. Für YFP_C:phy4+CDPK:YFP_N (Reihen 3+4) konnte keine Interaktion festgestellt werden. phy4:YFP_N+YFP_C:CDPK (Reihen 5-7) wies in D zwei unterschiedliche Signalmuster auf, während dies für phy4:YFP_N+CDPK:YFP_C (Reihen 8-10) in R der Fall war.

4.5.2.9 Rhomboid Intramembran-Serinprotease / HIP9 (Pp1s254_10 V6.2)

Pp1s254_10V6.2 (63.9 kDa) wurde im Holo-phy4:BD-*Screen* identifiziert und trägt eine vorhergesagte C-terminale Rhomboid Peptidase S54 Domäne und innerhalb dessen vorhergesagte Transmembran-Domänen. Abgleich der Pp1s254_10V6.2-AS-Sequenz mit *Arabidopsis*-Proteinen ergab einige Treffer mit mittelstarker (ab 17% *Query Coverage* und 30% Identität) bis sehr starker (80% *Query Coverage* und 34% Identität) Ähnlichkeit im C-terminalen Bereich (der Rhomboid-Domäne). Der Beste Treffer in *Arabidopsis* ist das *Rhomboid-related Intramembrane Serine Protease-like* Protein 9 (RBL9, AT5G38510). Nach Li *et al.* (2015) codiert das *Arabidopsis*-Genom für 17 Rhomboid-*like* Proteine (RBLs), jedoch befanden sich unter den ersten 50 BLAST-Treffern lediglich RBLs 1 bis 10. Die dem *Physcomitrella*-Protein ähnlichsten Viridiplantae Proteine (ab 42% *Query Coverage* und 34% Identität) finden sich in *Physcomitrella* (ein näheres Homolog Pp3c22_8560V1.1) und *Selaginella* (66% *Coverage* u. 38% Identität), in Gymnospermen (*Picea*, 49% *Coverage* u. 47% Identität), verschiedenen Dikotyledonen (*Fragaria*, *Populus*, *Solanum*, *Prunus*, *Ricinus*, *Vitis*, *Cucumis*, *Glycine*, *Capsella*, *Arabidopsis*) und Monokotyledonen (*Oryza*, *Zea*), sind aber mit Ausnahme von *Arabidopsis* und *Solanum* bislang nicht als RBLs annotiert. Eine phy4-Rhomboid-Proteasen-Interaktion trat vor allem in Rc und schwächer auch in Rp in allen getesteten *Y2H*-Konfigurationen auf (Abbildung 4-25). *In planta* Lokalisationsstudien zeigten, dass CFP:Rhomboid-Protease und Rhomboid-Protease:CFP in Cytoplasma (und evtl. an der Plasmamembran) bzw. in Cytoplasma und Kern lokalisiert sind (Abbildung 4-35 A). Eine *in planta* Interaktion von Rhomboid mit phy4 konnte nur für eine Konfiguration nach R-Vorbehandlung gezeigt werden: phy4:YFP_N+Rhomboid-Protease:YFP_C (in Einklang mit den *Y2H*-Daten). Das YFP-Signal konnte hier meist in Kern und Cytoplasma, in Einzelfällen aber auch an der Plasmamembran und im Zellkern beobachtet werden (Abbildung 4-35 B). HIP9 wird in allen untersuchten anatomischen Strukturen und Bedingungen exprimiert, allerdings gibt es keine Hinweise auf eine Synexpression mit phy4 (s. Anhang 1.7.11).

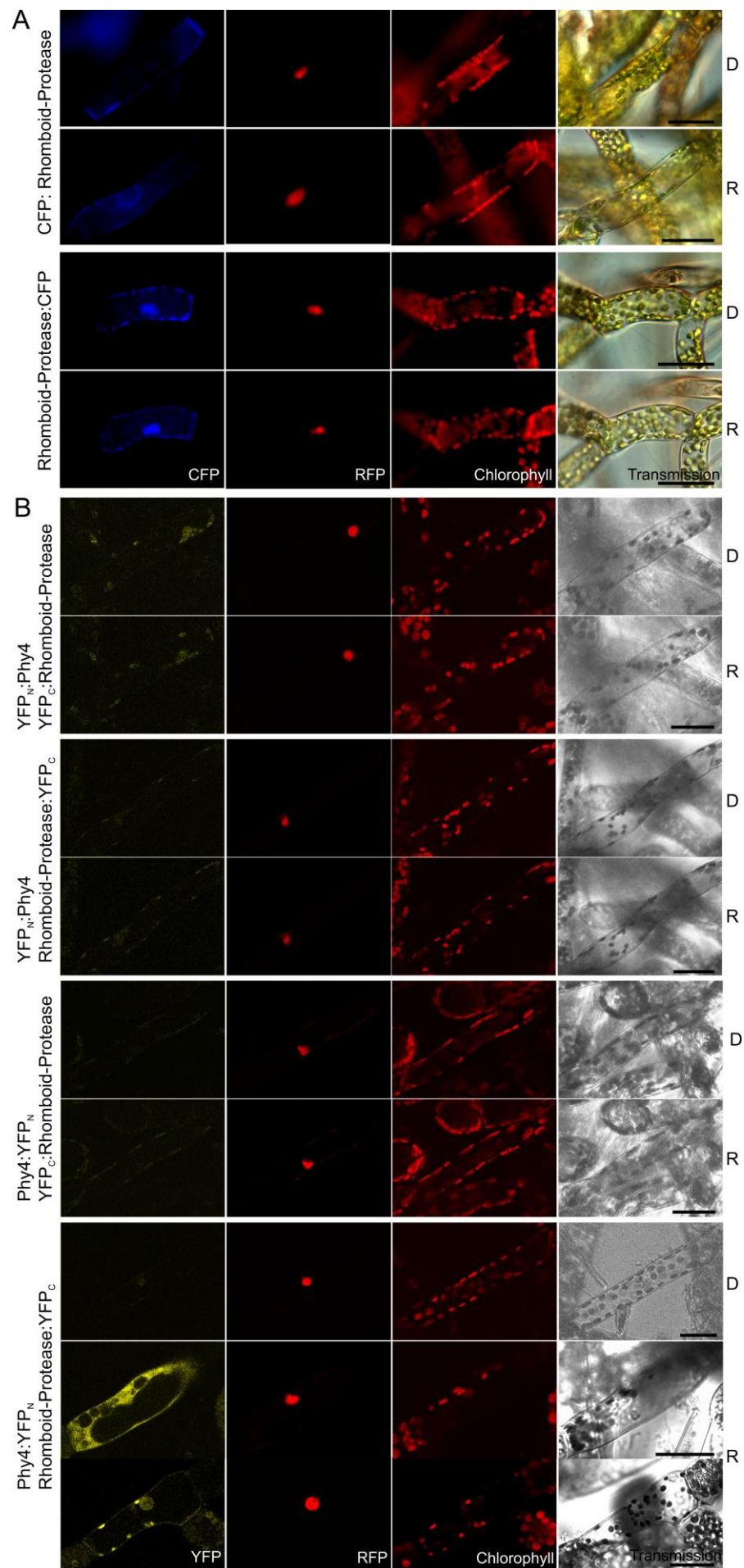


Abbildung 4-35: Rhomboid-Protease / HIP9 (Pp1s254_10V6.2) intrazelluläre Lokalisations- (A) und *Split-YFP* Studien der Rhomboid-phy4 Interaktion (B) beide ohne (D) und mit R-Vorbehandlung (R) mittels Fluoreszenz- bzw. Konfokalmikroskopie. Der Aufbau der Abbildung entspricht Abbildung 4-26. Maßstab 30 µm.

In Panel A von Abbildung 4-35 ist die intrazelluläre Lokalisation von CFP:Rhomboid-Protease (Reihen 1+2) und Rhomboid-Protease:CFP (Reihen 3+4) dargestellt. Die CFP-Fluoreszenz war in Cytoplasma bzw. Cytoplasma und Kern zu sehen (CFP; Spalte 1). Panel B zeigt die Ergebnisse der *Split-YFP*-Analysen aller möglichen Konfigurationen: YFP_N:phy4+YFP_C:Rhomboid-Protease (Reihen 1+2), YFP_N:phy4+ Rhomboid-Protease:YFP_C (Reihen 3+4), phy4:YFP_N+YFP_C:Rhomboid-Protease (Reihen 5+6) und phy4:YFP_N+Rhomboid-Protease:YFP_C (Reihen 7-9). Zwei unterschiedliche Signalmuster (Kern und Cytoplasma, Reihe 8 bzw. Plasmamembran und Kern, Reihe 9) konnten lediglich für phy4:YFP_N+ Rhomboid-Protease:YFP_C nach R-Vorbehandlung beobachtet werden (D und R-Behandlung wurden hier in unterschiedlichen Experimenten durchgeführt).

4.5.2.10 Unbekanntes Protein / HIP11 (Pp3c20_16210V1.1)

Pp3c20_16210V1.1 (20.2 kDa) wurde im Holo-phy4-BD-*Screen* identifiziert und weist abgesehen von einer vorhergesagten Transmembran-Domäne (AS 7-25) keine bekannten funktionellen Domänen und lediglich geringe Ähnlichkeiten zu Proteinen in anderen Pflanzen auf. Der beste Treffer in *Arabidopsis* ist ein pfkB-*like* Kohlenhydratkinase-Familien Protein (AT5G19150; 36% Abdeckung und 31% Identität). Bei den anderen mittels BLASTP gefundenen *Arabidopsis* Proteinen handelte es sich um ein Membran-assoziiertes Salz-induzierbares Protein, ein Pentatricopeptid-Protein, eine Untereinheit des TRANSLOCON AT THE OUTER MEMBRANE OF CHLOROPLSTS (TOC) und das Protein F15H18,6 mit unbekannter Funktion, wobei keines dieser Proteine eine signifikante Ähnlichkeit zu HIP11 aufweist. Bei dem *Physcomitrella*-Gen scheint es sich aber dennoch um ein exprimiertes Gen zu handeln, was sich u. A. aus der extensiven EST-Evidenz aber auch aus *Microarray*- und RNASeq-Daten ableitet. Es konnte ein weiteres *Physcomitrella* Homolog identifiziert werden: Pp3c20_16230V1.1, dessen AS-Sequenz mit der von HIP11 identisch ist. Holo-BD:phy4 interagiert schwach mit ADg:HIP11 und HIP11:ADg in *Y2H*, während Interaktionen mit Holo-phy4:BD R-verstärkt aber nur im Fall von ADg:HIP11 vollständig FR-reversibel waren (Abbildung 4-25). GFP:HIP11 und HIP11:GFP waren beide cytoplasmatisch lokalisiert, wobei ersteres eine sub-cytoplasmatische Strukturierung und perinukleäre Verteilung aufwies. Letzteres hingegen zeigte untypischerweise überhaupt keine subzelluläre Struktur des GFP-Signals – noch nicht einmal Aussparungen an den Stellen, wo sich Chloroplasten befinden (Abbildung 4-36 A). Dies spricht entweder für eine Lokalisation in der Vakuole oder für ein Artefakt. In manchen Zellen beider Konformationen konnten indes auch cytoplasmatische und nukleäre Lokalisationen beobachtet werden (nicht gezeigt). *In planta* Interaktion wurde für die beiden Konformationen mit C-terminal fusioniertem phy4 untersucht und konnte für phy4:YFP_N-YFP_C:unbekanntes Protein im Cytoplasma und der perinukleären Region bestätigt werden (Abbildung 4-36 B). Dies entspricht auch den Lokalisationsdaten. Das *Physcomitrella* Protein scheint sehr unterschiedlich in verschiedenen Bedingungen und Entwicklungsstadien exprimiert zu werden, wobei frühe Entwicklungsstadien, wie Sporen und Protonemata besonders geringe Expressionslevel aufweisen (s. *Genevestigator* und *Phytozome*-Daten im Anhang 1.7.15). Es konnten keine phy4-ähnlichen Expressionsmuster festgestellt werden.

4. Ergebnisse

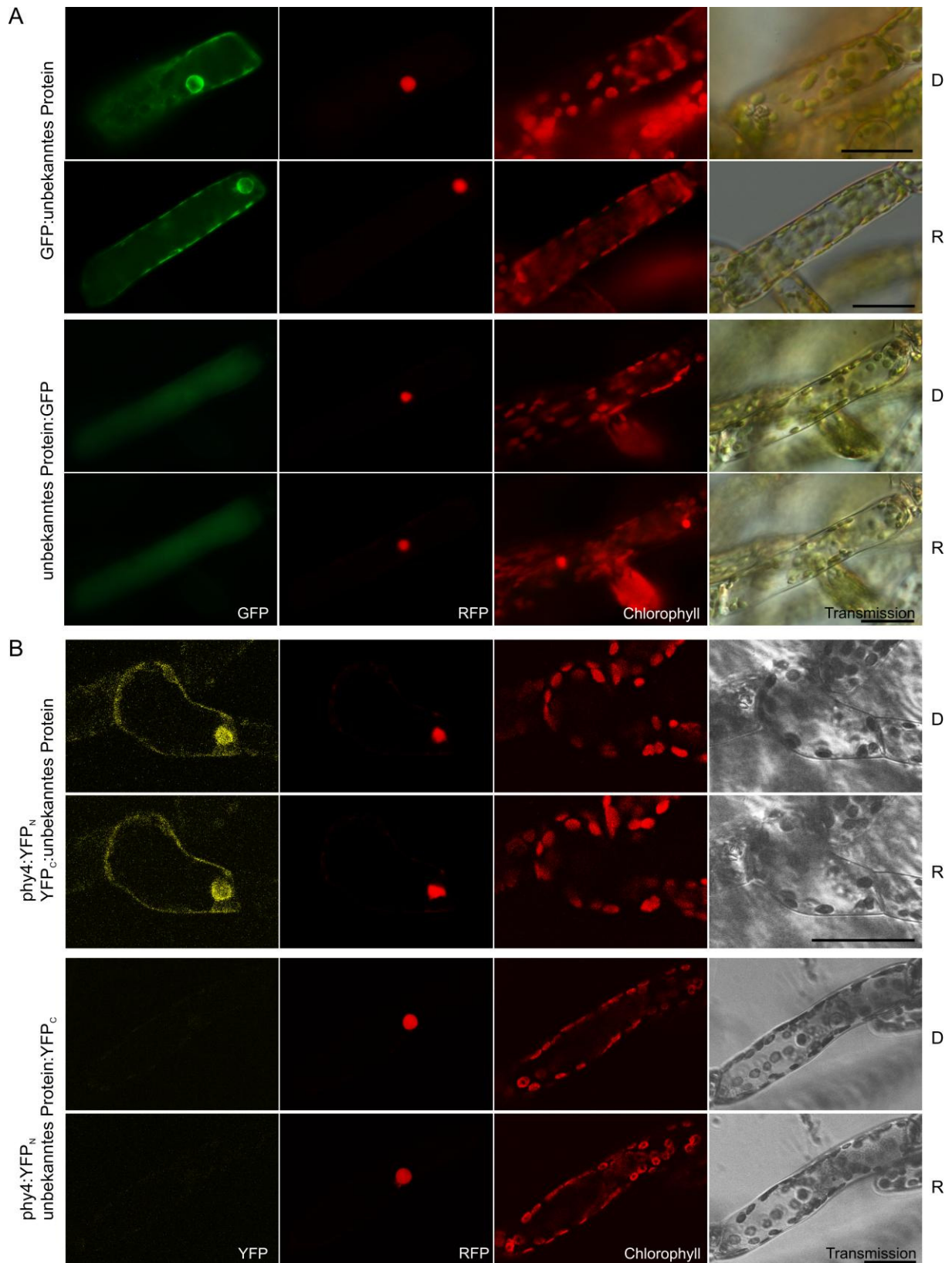


Abbildung 4-36: Intrazelluläre Lokalisations- (A) und *Split-YFP* Studien des unbekannten Proteins / HIP11 (Pp3c20_16210V1.1) bzw. der phy4-Interaktion mit dem unbekannten Protein (B) beide ohne (D) und mit R-Vorbehandlung (R) mittels Fluoreszenz- bzw. Konfokalmikroskopie. Der Aufbau der Abbildung entspricht Abbildung 4-26. Maßstab 30 µm. Lokalisationsdaten von BSc Natalie Kempel.

Abbildung 4-36 A zeigt GFP:unbekanntes Protein- (Reihen 1+2) und unbekanntes Protein:GFP- (Reihen 3+4) Lokalisation. Beide Fusionsproteine weisen weitgehend cytoplasmatische Lokalisation auf, wobei das GFP:unbekanntes Protein-Signal strukturierter zu sein scheint (Spalte 1, GFP). In manchen Fällen waren auch Signale in Cytoplasma und Zellkern zu beobachten (nicht gezeigt). Panel B zeigt die Ergebnisse der *Split-YFP*-Analysen von beiden Konformationen mit C-terminal fusioniertem phy4: phy4:YFP_N+YFP_C:unbekanntes Protein (Reihen 1+2) und phy4:YFP_N+unbekanntes Protein:YFP_C (Reihen 3+4). Lediglich im ersten Fall konnte ein distinktes YFP-Signal im Cytoplasma und eher der perinukleären Region als im Zellkern beobachtet werden (Spalte 1, YFP).

4.5.2.11 Eukaryotischer Translations-Initiationsfaktor 5A (eIF-5A) / HIP12 (Pp3c13_15620V1.1)

Bei dem im Holo-phy4:BD- *Screen* gefundenen Pp3c13_15620V1.1-Protein (17.5 kDa) handelt es sich um den evolutionär und strukturell sehr konservierten eukaryotischen Translations-Initiationsfaktor 5A (eIF-5A). InterPro konnte mehrere Domänen in der AS-Sequenz identifizieren (oft im gleichen Sequenzbereich): darunter eine Ribosomal Protein L2 Domain 2 am N- und eine DNA-Bindedomäne am C-Terminus (s. Tabelle 6-1). AS-Sequenzabgleich mit Proteindatenbanken ergab ein *Physcomitrella*-Homolog (Pp3c12_3540V1.1) bzw. drei eIF-5A-Isoformen in *Arabidopsis* (AT1G13950 eIF-5A, AT1G26630 eIF-5A-2, AT1G69410 eIF-5A-3, s. Tabelle 6-1). Abhängig von der Konformation zeigte eIF-5A sehr unterschiedliches *Y2H*-Interaktionsverhalten: Interaktion von BD:phy4+ADg:eIF-5A / BD:phy4+eIF-5A:ADg interagiert eher schwach aber Licht-induziert, phy4:BD+ADg:eIF-5A interagiert stark und FR-reversibel und phy4:BD+eIF-5A:ADg interagiert konstitutiv. Unabhängig von Licht-Vorbehandlung und FP-Fusionsreihenfolge war eIF-5A in Zellkern und Cytoplasma lokalisiert (Abbildung 4-37 A) während in anderen Fällen die nukleäre Fluoreszenz viel schwächer war, als im Cytoplasma (nicht gezeigt). Die phy4-eIF-5A-Interaktion konnte *in planta* bestätigt werden, obwohl das YFP-Lokalisationsmuster stark von der verwendeten Konformation abhing: während die phy4:YFP_N+eIF-5A:YFP_C-Interaktion in Kern und Cytoplasma oder im Cytoplasma alleine beobachtet werden konnte, war YFP_N:phy4+YFP_C:eIF-5A nur im Cytoplasma zu sehen. YFP_C:phy4+eIF-5A:YFP_N hingegen zeigte keine signifikante Interaktion (Abbildung 4-37 B). phy4:YFP_N+YFP_C:eIF-5A wurde aus der Betrachtung ausgeschlossen, weil die Negativkontrolle :YFP_N+YFP_C:eIF-5A substantielle Signale zeigte, was auf eine artifizielle Interaktion hinweist. eIF-5A / HIP12 wird in allen Entwicklungsstadien und Bedingungen stark exprimiert mit Ausnahme von Blättchen und in Gametophoren unter Dehydrierungs-Bedingungen oder unter Auxin-Einfluss (s. *Genevestigator* Anatomie- und *Phytozome*-Daten). Wie phy4 weist eIF-5A keine starke Hochregulation bei Sonnenlicht-, UV-B, De- und Rehydrierung und im Reute-Hintergrund auf, während unter Dedifferenzierungs-Bedingungen eine stärkere Hochregulation stattfindet aber die Tendenz immer noch mit der von phy4 vergleichbar ist (s. Anhang 1.7.16).

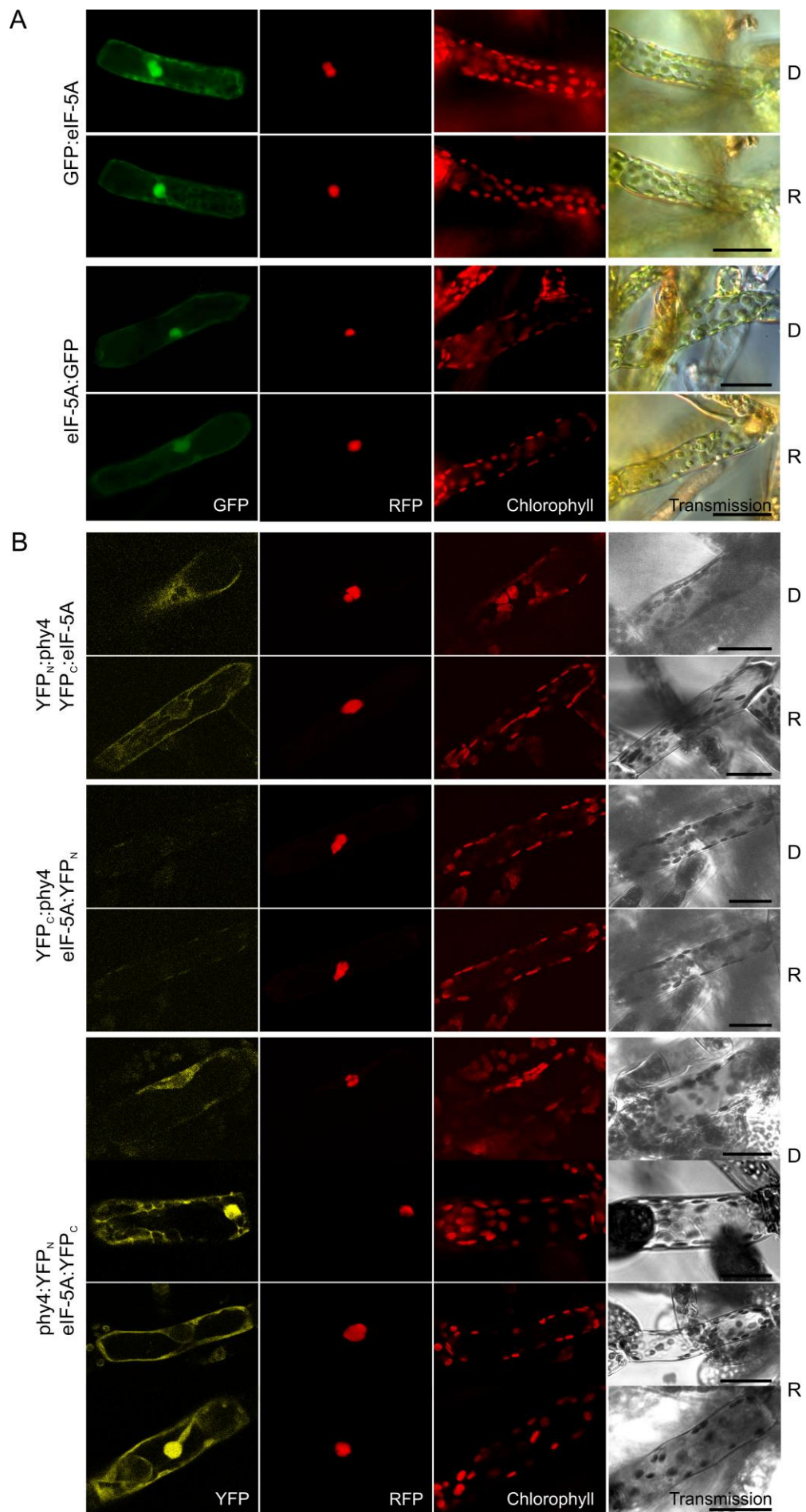


Abbildung 4-37: eIF-5A / HIP12 (Pp3c13_15620V1.1) intrazelluläre Lokalisations- (A) und *Split-YFP* Studien der eIF-5A-phy4 Interaktion (B) beide ohne (D) und mit R-Vorbehandlung (R) mittels Fluoreszenz- bzw. Konfokalmikroskopie. Der Aufbau der Abbildung entspricht Abbildung 4-26. Maßstab 30 μm .

Abbildung 4-37 A zeigt die Lokalisation von N- und C-terminalen GFP-eIF-5A-Fusionen. Beide Konformationen (Reihen 1+2 bzw. 3+4; Spalte 1, GFP) lokalisierten in Kern und Cytoplasma unabhängig von der Licht-Vorbehandlung. In manchen Fällen war das eIF-5A:GFP-Signal auch eher auf das Cytoplasma beschränkt (nicht gezeigt). (B) Alle vier *Split-YFP*-Konformationen wurden analysiert, allerdings wurden YFP_N:phy4+eIF-5A:YFP_C und phy4:YFP_N+YFP_C:eIF-5A ausgeschlossen, weil die entsprechenden Negativkontrollen substantielle Signale zeigten. Daher sind folgende Konformationen dargestellt: YFP_N:phy4+YFP_C:eIF-5A (Reihen 1+2), YFP_C:phy4+eIF-5A:YFP_N (Reihen 3+4) und phy4:YFP_N+eIF-5A:YFP_C (Reihen 5-8; zwei distinkte Signalmuster in beiden Lichtbedingungen). Alle Konfigurationen, außer YFP_C:phy4+eIF-5A:YFP_N ergaben signifikante cytoplasmatische oder nucleo-cytoplasmatische Signale (Spalte 1, YFP).

4.5.2.12 EF1 α / HIP13 (Pp3c1_23670V1.1)

Das im Apo-BD:PHY4-*Screen* identifizierte Pp3c1_23670V1.1 Protein (49,3 kDa) ist die α -Untereinheit des eukaryotischen / archaealen-Translations-Elongationsfaktors EF1. Das Protein besitzt nach InterPro-Vorhersagen eine GTP-bindende *P-Loop-containing* Nukleosid-Triphosphat-Hydrolase Domäne am N- und eine EFTu/EF1 α Domäne 2 und eine EFTu/EF1 α C-terminale Domäne am C-Terminus. AS-Sequenzabgleich mit Proteindatenbanken ergab 10 weitere Homologe in *Physcomitrella* und Elongationsfaktor 1-4 (AT1G07940, AT1G07930, AT1G07920, AT5G60390 *Elongation Factor* 1 α 1-4) und mindestens sechs weitere Proteine derselben Familie in *Arabidopsis* (s. Tabelle 6-1). Holo-phy4 *Y2H*-Interaktions-*Assays* zeigten eher konstitutives bzw. schwaches aber R-verstärktes Wachstumsverhalten in Kombinationen mit BD:phy4 bzw. phy4:BD (s. Abbildung 4-25). Unabhängig von der FP-Fusionsreihenfolge oder Lichtbehandlungen, lag EF1 α im Cytoplasma und der perinukleären Region vor (s. Abbildung 4-38 A). Ebenso waren *Split-YFP* Signale zumeist konstitutiv im Cytoplasma und der perinukleären Region zu beobachten (YFP_C:phy4+YFP_N:EF1 α und phy4:YFP_N+YFP_C:EF1 α ; Abbildung 4-38 B). Insbesondere die cytoplasmatischen YFP_C:phy4+YFP_N:EF1 α -Signale ähnelten Cytoskelett-Strukturen. phy4:YFP_C+EF1 α :YFP_N-Signale traten zusätzlich auch im Zellkern auf. Da die Negativkontrollen YFP_C: oder YFP_N: in Kombination mit EF1 α :YFP_N bzw. EF1 α :YFP_C beträchtliche Signale in Cytoplasma und/oder Kern hervorriefen, wurden diese Kombinationen mit N-terminal fusioniertem phy4 als falsch positive Signale eingestuft und von der weiteren Analyse ausgeschlossen. EF1 α wird unter allen Bedingungen und in allen Entwicklungsstadien mit Ausnahme von Sporen und Blättchen stark exprimiert. Es gibt kaum Anzeichen für eine Synexpression mit phy4, eventuell könnten manche Lichtbedingungen und der Vergleich Reute-WT als Hinweis auf eine Ko-Regulation interpretiert werden (s. *Genevestigator*-Daten im Anhang 1.7.17).

4. Ergebnisse

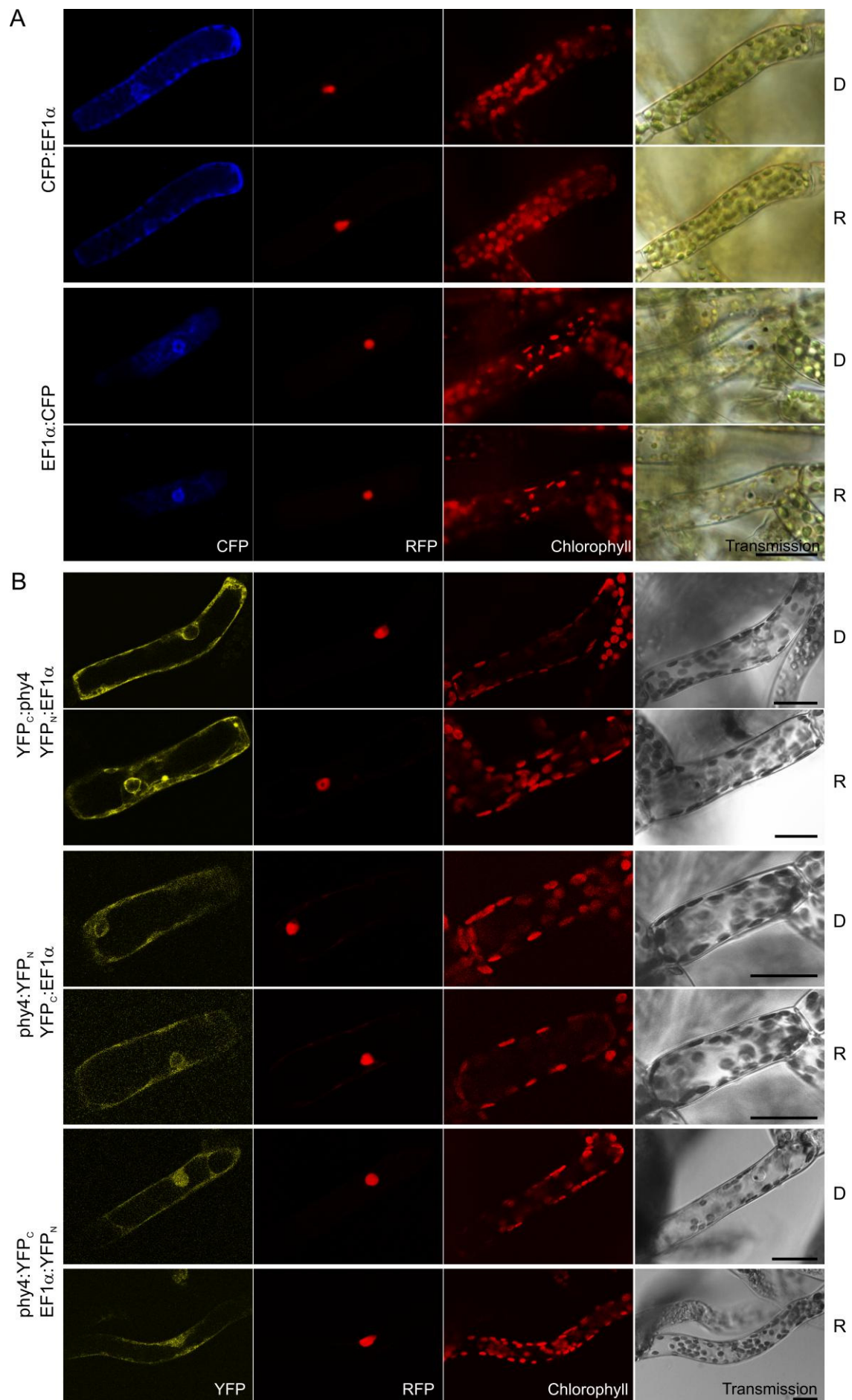


Abbildung 4-38: EF1 α / HIP13 (Pp3c1_23670V1.1) intrazelluläre Lokalisations- (A) und *Split-YFP* Studien der EF1 α -phy4 Interaktion (B) beide ohne (D) und mit R-Vorbehandlung (R) mittels Fluoreszenz- bzw. Konfokalmikroskopie. Der Aufbau der Abbildung entspricht Abbildung 4-26. Maßstab 30 μ m.

Panel A von Abbildung 4-38 zeigt die cytoplasmatische und perinukleäre Lokalisation von CFP:EF1 α (Reihen 1+2) und EF1 α :CFP (Reihen 3+4; Spalte 1, CFP). Panel B stellt die Ergebnisse der *Split-YFP*-Analysen dar: alle vier möglichen Konformationen wurden untersucht, jedoch wurden YFP_C:phy4+EF1 α :YFP_N und phy4:YFP_C+YFP_N:EF1 α ausgeschlossen, weil die entsprechenden Negativkontrollen signifikante Signale aufwiesen. Daher sind folgende Konformationen dargestellt: YFP_C:phy4+YFP_N:EF1 α (Reihen 1 + 2), phy4:YFP_N+YFP_C:EF1 α (Reihen 3 + 4) und phy4:YFP_C+EF1 α :YFP_N (Reihen 5 + 6). Alle Konformationen wiesen signifikante cytoplasmatische und perinukleäre Signale auf, mit Ausnahme von phy4:YFP_C+EF1 α :YFP_N, dessen Signale in Cytoplasma und Kern zu beobachten waren (Spalte 1, YFP). Maßstab 30 μ m.

4.5.2.13 14-3-3 Protein / HIP14 (Pp3c3_8540C1.1)

Pp3c3_8540C1.1 (29.1 kDa) wurde im Holo-phy4:BD-*Screen* gefunden und ist ein Mitglied der 14-3-3-Proteinfamilie. In *Physcomitrella* konnten mittels BLAST-Suche 10 weitere Homologe und insgesamt 13 14-3-3-Proteine in *Arabidopsis* identifiziert werden (s. Tabelle 6-1). *Y2H*-Analyse der phy4-Interaktion bestätigte die Interaktion nur in Kombination mit phy4:BD, nicht jedoch mit BD:phy4 (Abbildung 4-25). In *Physcomitrella* lokalisierte GFP:14-3-3 in Cytoplasma und Kern, während 14-3-3:GFP ausschließlich im Cytoplasma vorlag und ein Cytoskelett- oder evtl. ER-ähnliches Signalmuster aufwies (Abbildung 4-39 A). Dies konnte indes für GFP:14-3-3 nicht beobachtet werden. Die 14-3-3-phy4-Interaktion konnte *in planta* verifiziert werden, allerdings wurden entsprechend des *Y2H*-Interaktionsverhaltens lediglich Kombinationen mit phy4:YFP_N untersucht. phy4:YFP_N+YFP_C:14-3-3 zeigte einerseits ein starkes nukleäres und cytoplasmatisches Signal, was den Lokalisationsdaten von GFP:14-3-3 entspricht, andererseits in manchen Zellen auch ein ausschließlich cytoplasmatisches Signal mit Cytoskelett-ähnlichen Strukturen (Abbildung 4-39 B). Das Signal des rekonstituierten phy4:YFP_N+14-3-3:YFP_C-Komplexes war, wie bei 14-3-3:GFP, ebenfalls rein cytoplasmatisch, obgleich keine Cytoskelett-ähnlichen Strukturen beobachtet werden konnten. Das 14-3-3-Protein scheint in verschiedenen Bedingungen und Entwicklungsstadien sehr unterschiedlich exprimiert zu werden mit vergleichsweise schwacher Expression in Sporen, Protonemata, Blättchen und ausgewachsenen Sporophyten, während Gametophore und Gametangien eine vergleichsweise hohe Expression aufweisen (s. Anhang 1.7.18, *Genevestigator* Anatomie-/Entwicklungs- und eFP-Daten). Insbesondere unter verschiedenen Bedingungen schwankt das Expressionslevel, was mit der 14-3-3-Funktion als Signalprotein korrelieren könnte. Es konnten keine Hinweise auf eine Synexpression mit phy4 abgeleitet werden.

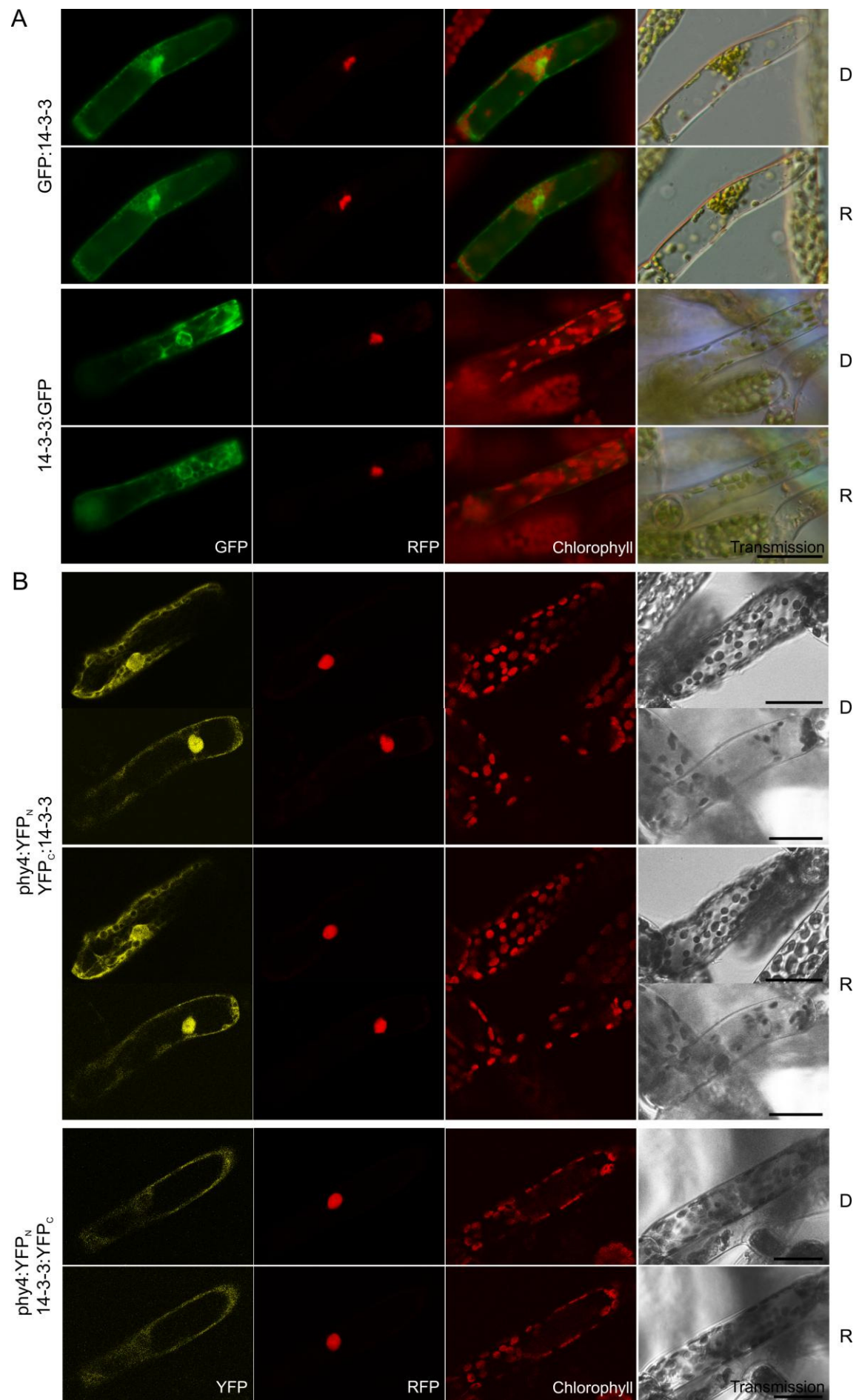


Abbildung 4-39: 14-3-3 / HIP14 (Pp3c3_8540C1.1) intrazelluläre Lokalisations- (A) und *Split-YFP* Studien der 14-3-3-phy4 Interaktion (B) beide ohne (D) und mit R-Vorbehandlung (R) mittels Fluoreszenz- bzw. Konfokalmikroskopie. Der Aufbau der Abbildung entspricht Abbildung 4-26. Maßstab 30 µm. Lokalisationsdaten von BSc Natalie Kempel.

Abbildung 4-39 A stellt die intrazelluläre Lokalisation von GFP:14-3-3 (Reihen 1+2) und 14-3-3:GFP (Reihen 3+4) dar (Spalte 1, GFP). In Panel B sind die Ergebnisse der *Split-YFP*-Analysen mit C-terminal fusioniertem phy4 dargestellt: phy4:YFP_N+YFP_C:14-3-3 wies zwei unterschiedliche Signalmuster auf (Reihen 1-4), während phy4:YFP_N+14-3-3:YFP_C (Reihen 5+6) ausschließlich im Cytoplasma zu beobachten war (Spalte 1, YFP). Maßstab 30 µm.

4.5.3 Vergleich der phy4 und HIP Expressionsdaten

Um eine Funktion in der (cytoplasmatischen) Phytochrom-Signaltransduktion übernehmen zu können, müssen entsprechende Signalproteine in Geweben und Entwicklungsstadien und unter denselben Bedingungen zusammen exprimiert werden (Ko-Expression), es sei denn die Abwesenheit eines Signalproteins entscheidet über die Signalwirkung. Abgesehen davon wäre zu erwarten, dass die Expressionsstärke funktionell korrelierter Gene ähnlichen Mustern folgt (Synexpression). Aus diesem Grund wurden Expressionsdaten von phy4 und HIPs von *Phytozome*, vom *electronic Fluorescent Pictograph-Browser* (eFP) und von Genevestigator heruntergeladen und, wie in 3.4.4 beschrieben, analysiert. phy4 scheint unter allen Bedingungen und in allen Entwicklungsstadien in gewissem Ausmaß exprimiert zu werden, wobei die niedrigste Expression in reifen Sporophyten und die höchste in Blättchen des Gametophor auftritt (s. Anhang 1.7.19). Licht scheint im Gegensatz zu Dedifferenzierung einen vergleichsweise geringen Einfluss auf die phy4 Expression zu haben. Ebenso scheint Expression während des gesamten *Physcomitrella*-Lebenszyklus auch für nahezu alle ausgewählten putativen Partner zuzutreffen (Ausnahmen: F-Box-*interacting*-Kelch (kaum in Sporophyt/Rhizoiden), HIP9 (kaum in Sporophyt S3), HIP11 (fast nicht in Sporen und Protonema) und HIP14 (ebenfalls kaum in Sporen)). Paarweise Vergleiche von phy4 und HIP-Expressionsdaten gab für HIP4-8, das Autophagie-Protein, eIF-5A/HIP12 und evtl. für HIP13/EF1 α zumindest in einzelnen Datensätzen (meist *Genevestigator*-Perturbationsdaten) Hinweise auf Synexpression mit phy4 (s. Anhang 1.7). Zusätzlich wurden alle Datensätze auch nach Ähnlichkeiten der Gene und Bedingungen mittels *hierarchical Clustering*-Analyse unter Verwendung von *ClustVis* geordnet, um HIPs mit phy4-ähnlichen Expressionsmustern zu identifizieren (s. Anhang Abb. 6). Analyse der eFP-Daten legt nahe, dass PRL1/HIP4, gefolgt von PLP/HIP6 und Ser/Thr-Proteinkinase/HIP7 am ähnlichsten zu phy4 in verschiedenen Entwicklungsstadien exprimiert werden (s. Anhang Abb. 6 A). Bei den *Phytozome*-Daten besteht bei PLP/HIP6 gefolgt von ZF/HIP3 die größte Ähnlichkeit zum phy4-Expressionsmuster (s. Anhang Abb. 6 B). Was unterschiedliche Behandlungen anbetrifft, zeigen *Genevestigator*-Perturbationsdaten und *Phytozome*-Daten, dass PRL1/HIP4 und PLP/HIP6, gefolgt von HIP7 und -5 bzw. eIF-5A/HIP12 gefolgt von PRL1/HIP4 und Rhomboid-Peptidase/HIP9 in ähnlicher Art und Weise wie phy4 exprimiert werden (s. Anhang Abb. 6 D & C). Zusammengenommen scheinen vor allem PLP/HIP6, die putative Ser/Thr-Proteinkinase/HIP7, eIF-5A/HIP12 und insbesondere PRL1/HIP4 mit phy4 ko-reguliert zu sein.

5. Diskussion:

5.1 Etablierung von *Y2H*-Experimenten

Für diese Arbeit wurde eine C-terminale BD-Fusion sowohl an die PHY4-Volllängen-CDS (*PHY4:BD*) als auch an das lichtsensorische Modul alleine (*PHY4 N:BD*) kloniert. Als Vorlage für die Herstellung des PHY4 N:BD-Konstrukts diente ein äquivalentes *PHYB-Y2H*-Konstrukt in einer Arbeit von Ni *et al.* (1998). *PHY4:BD* und *PHY4 N:BD* wurden je in zwei *Y2H*-Hefe-Stämme (AH109 und Y187) transformiert und deren erfolgreiche Expression konnte mittels Proteinextraktion, SDS-PAGE und *Western Blot* mit einem monoklonalen Antikörper gegen die BD demonstriert werden (s. Abbildung 4-1). Anschließend wurden beide *Bait*-Konstrukte hinsichtlich ihrer Autoaktivierungs-Eigenschaften untersucht, indem sie mittels Doppeltransformation oder *Mating* mit AD: kombiniert und auf -Trp/-Leu/-His-*TSD* selektiert wurden. Infolge der Doppeltransformation zeigten phy4:BD und phy4 N:BD Aktivierung des *HIS3*-Reporters in Abwesenheit eines Interaktionspartners, die aber durch Zugabe von 1 mM bzw. 0,5 mM des kompetitiven Inhibitors des HIS3-Proteins (3-AT) zufriedenstellend unterdrückt werden konnte (s. Abbildung 4-2). Unter den gleichen Selektionsbedingungen kam es nach *Mating* zu keinerlei Autoaktivierung (s. Abbildung 4-3), so dass sich der genetische Hintergrund bei Bildung von Diploiden positiv auf *Y2H*-Wachstums-*Assays* auszuwirken scheint. Lediglich auf PCB-haltigen Medien in Rc war eine minimale 3-AT-Konzentration von 0,25 mM 3-AT notwendig. Vorzugsweise sollte die 3-AT-Konzentration insbesondere in cDNA-*Screens* so gering wie möglich gehalten werden, damit auch schwache oder temporäre Protein-Protein-Interaktionen detektiert werden können, die bei hoher 3-AT-Konzentration nicht zu einer Wachstumsantwort führen könnten. Aus diesem Grund sollte *Mating* für den cDNA-*Library-Screen* etabliert und eingesetzt werden.

Anhand der Dimerisierung des Phytochroms konnte die Funktionalität des *Mating*-Protokolls gezeigt werden (s. Abbildung 4-4). Sowohl N- als auch C-terminale PHY4-BD-Fusionen zeigten zuverlässige Homodimerisierung mit AD:PHY4, ebenso wie die Kombination von BD:PHY4 C / PHY4 C:BD mit AD:PHY4 C. Die Kombination von PHY4 N-*Baits* mit AD:PHY4 N zeigten jedoch keine Interaktion. Dies ist in Einklang mit der Literatur, denn es konnte gezeigt werden, dass vorwiegend der Phytochrom C-Terminus für die Dimerisierung verantwortlich ist (Matsushita *et al.*, 2003). Eine stärkere Interaktion von N-terminal fusioniertem BD:PHY4 oder BD:PHY4 C mit AD:PHY4 bzw. AD:PHY4 C im Vergleich zur Interaktion mit den entsprechenden C-terminal fusionierten *Baits* deutet darauf hin, dass Phytochrom-Monomere in paralleler Art und Weise miteinander interagieren, was ebenfalls bereits gezeigt werden konnte (Li *et al.*, 2010). Eine sehr schwache Wachstumsantwort von phy4:BD + AD:phy4 C spricht ebenfalls dafür (Abbildung 4-4). Auch nach Doppeltransformation dimerisieren N- und C-terminale Volllängen-phy4-BD-Fusionen stark mit AD:phy4 (s. Abbildung 4-5 und Doktorarbeit Mailliet).

Die erfolgreiche Aufnahme von PCB aus dem Selektionsmedium und Autoassemblierung zu Holophytochrom in Hefe konnte anhand einer genetischen Positivkontrolle demonstriert werden. Sowohl BD:phyA, als auch phyA:BD interagieren im semiquantitativen *Y2H*-Wachstums-*Assay* mit AD:FHY1 R-abhängig auf PCB-Medium (Abbildung 4-5), jedoch nicht auf PCB-Mangelmedium (also als Apoprotein; Hiltbrunner *et al.* (2005)). Anhand dieser Kontrolle konnte auch das Wachstums-*Assay* in gepulstem Licht für die spätere Charakterisierung möglicher phy4-Interaktionspartner etabliert werden. Sowohl kontinuierliches, als auch gepulstes RL induzieren die phyA-FHY1-Interaktion, während ein

FR-Puls nach einem R-Puls die Antwort revertiert. Als phy4-spezifische Positiv- und Negativkontrollen im Wachstums-*Assay* dienten wieder BD:phy4 / phy4:BD in Kombination mit AD:phy4 bzw. mit AD: / myc:ADg. Insbesondere die AD:-Negativkontrollen wiesen in Rc ein gewisses Maß an Autoaktivierung auf, so dass die eingesetzte 3-AT-Konzentration in PCB-Medium in dieser Lichtbedingung nicht ganz zur Unterdrückung ausgereicht hat. Daher wurde später bei der Charakterisierung des Interaktionsverhaltens putativer phy4-Interaktionspartner die Stärke der Wachstumsantwort in Rc mit derjenigen der Negativkontrolle in Relation gesetzt.

Die Funktionalität der für die *Gateway*-Klonierung organisierten GW-*Prey* Vektoren pGADg und pGADCg konnte im semiquantitativen *Y2H*-Wachstums-*Assay* ebenfalls gezeigt werden (s. Abbildung 4-6). Hierzu wurde die PHOTB1-CDS mittels LR-Reaktion aus *Entry*-Klonen in die beiden *Prey*-Destinations-Vektoren rekombiniert und resultierende ADg:PHOTB1- und PHOTB1:ADg-Expressionsklone mit konventionell klonierten phy4-*Baits* durch Hefe-Doppeltransformation kombiniert. Das BD:phy4 + ADg:photB1-Interaktionsverhalten war identisch mit BD:phy4 + konventionellem AD:photB1-*Prey*. Phy4:BD hingegen interagiert schwächer aber immer noch lichtabhängig mit ADg:photB1 im Vergleich zur Interaktion mit AD:photB1. Daher wurden die *Gateway-Prey* Vektoren als adäquat zur Detektion lichtabhängiger Interaktionen eingestuft und für die *Gateway*-Klonierung von Expressionsklonen putativer phy4-Interaktionspartner eingesetzt. Im Fall von ADg:photB1 scheint es keinen Unterschied zu machen, ob die CDS ein Stoppcodon enthält, oder nicht, da das Interaktionsverhalten mit BD:phy4 und phy4:BD jeweils identisch ist. Ohne Stoppcodon ist das Fusionsprotein 23 AS länger und endet erst mit dem nächsten Stoppcodon des Plasmids. Andere Evidenzen zeigten aber, dass der Einfluss des Stoppcodons abhängig von dem jeweils untersuchten phy4-Interaktionspartner ist (s. Abb. 1 im Anhang, CDPK). Aus diesem Grund wurde entschieden, dass in Expressionsklonen alle CDS mit N-terminalen *Tags* ein Stoppcodon aufweisen sollten. Daher mussten für jeden putativen phy4-Interaktionspartner zwei *Entry*-Klone hergestellt werden: einer mit Stoppcodon für N-terminale Fusionen und einer ohne Stoppcodon für C-terminale Fusionen.

Die Funktionalität des (quantitativen) *Mating*-Protokolls für die Holophytochrom-Bildung konnte mittels *Mating* von Y187 phyA:BD mit AH109 AD:FHY1 und Selektion von Diploiden auf *TSD* + PCB in Rc demonstriert werden (s. Abbildung 4-7). Analog zum semiquantitativen *Y2H*-Wachstums-*Assay* kommt es zu einer Rc-induzierten und FRC-unterdrückten Interaktion auf PCB-haltigem Medium. Die erfolgreiche Aufnahme von PCB in diploide Hefe und Autoassemblierung von Apo- zu Holo-phy4 konnte somit demonstriert und das quantitative *Mating*-Protokoll konnte für den *Y2H-Library-Screen* eingesetzt werden.

5.2 Interaktion von Phytochrom mit Phototropin

5.2.1 Interaktion von phy4 mit vier *Physcomitrella* Phototropinen

Hinweise auf eine Photorezeptor-Kooperation zwischen Phytochrom und Phototropin konnte u. A. bereits eine Arbeit von Kasahara *et al.* (2004) liefern, in der demonstriert werden konnte, dass *Physcomitrella* Phototropine eine essentielle Funktion in der RL-abhängigen Chloroplastenbewegung haben (s. 1.6). In einem vorhergehenden Dissertationsprojekt von Dr. Katharina Maillet konnte gezeigt werden, dass dies auch bei RL-Photo- und -Polarotropismus der Fall ist und dass photA2 dabei scheinbar eine dominierende Rolle spielt (Jaedicke, 2012; Jaedicke *et al.*, 2012). Daraus hatte sich die Frage ergeben, ob es sich bei dieser Kooperation um eine direkte oder indirekte Kooperation von Phytochrom und

Phototropin handelt. Daher war mittels *Y2H* untersucht worden, ob bei Kombination von BD:phy4 mit AD:photS eine Wachstumsantwort detektiert werden konnte. In der Tat konnte mittels eines *Y2H*-Wachstums-Assays erstmals nachgewiesen werden, dass *Physcomitrella* phy4 in der Lage ist, physisch und zumeist R-verstärkt mit *Physcomitrella* Phototropinen zu interagieren (mit Ausnahme einer eher konstitutiven Interaktion mit AD:photA1). Dies war der erste Beweis dafür, dass eine direkte Interaktion die physikalische Basis für die Kooperation der beiden Photorezeptoren ist. Darüber hinaus demonstrierten *Split-YFP*-Untersuchungen, dass die Interaktion von phy4 und den vier *Physcomitrella* Phototropinen direkt an der Plasmamembran stattfindet. Interessanterweise zeigten Lokalisationsanalysen von GFP:phy4 kein distinktes PM-Signal, sondern eine konstitutive cytoplasmatische Lokalisation (Jaedicke *et al.*, 2012). Da die Intensität des PM-lokaliserten *Split-YFP*-Signals viel schwächer war, als die von GFP:phy4 ist es wahrscheinlich, dass lediglich eine Subpopulation von phy4 an der PM fixiert wird, während der Rest wahrscheinlich andere Funktionen im Cytoplasma oder auch im Zellkern übernimmt (was die teilweise nukleäre Lokalisation von phy4:CFP/phy4:GFP (Anhang Abb. 2 B) nahelegt). Andererseits könnte es sich aber auch um ein dynamisches Äquilibrium zwischen dem PM- und dem cytoplasmatischen phy4-Pool handeln. Möglicherweise ist der phy-phot-Komplex nicht uniform an der PM, sondern eher in distinkten Bereichen lokalisiert, worauf ein *Split-YFP*-Experiment von YFP_C:phy4+YFP_N:photB2 in Zwiebelzellen und Beobachtung bei maximaler Vergrößerung mit einem Leica TCS-SP5 AOBS-KLSM hinwies (Jaedicke *et al.*, 2012). Es könnte sich bei den beobachteten Strukturen um *Lipid Rafts* – also zusammenhängende Strukturen innerhalb des Lipid-Bilayers – oder auch um Vesikel-ähnliche Strukturen handeln. Ob diese Strukturen physiologisch in frühen Schritten der Signaltransduktion relevant oder doch Artefakte verursacht durch die Überexpression der Fusionsproteine sind, muss noch durch weitere Experimente geklärt werden. Die Fixierung der phy4-Subpopulation an der PM wird dabei wohl durch das auch in *Physcomitrella* PM-lokalisierte Phototropin vermittelt, wobei noch nicht klar ist, wie Phototropin überhaupt an der PM lokalisiert sein kann, da es sich nicht um ein integrales Membranprotein handelt. Durch die Phytochrom-Fixierung in der Zellperipherie kann Phytochrom allen Anforderungen des Jaffe-Etzold-Haupt-Modells zur Vermittlung vektorieller RL-Antworten gerecht werden (s. 1.7). In dieser Weise wird Phytochrom 4 in die Lage versetzt, selbst eine definierte Orientierung in der Zelle zu besitzen und somit Aktionsdichroismus auszuführen, d.h. physiologische Antworten zu vermitteln, die stark von der Polarisationssebene des eingestrahlen RL abhängen, wie z.B. Polarotropismus oder Chloroplastenbewegung (Haupt & Scheuerlein, 1990; Kraml, 1994; Hughes *et al.*, 2005; Hughes, 2013). Die funktionelle phy-phot-Kooperation spiegelt sich in Form einer genetischen Kooperation als phy-phot-Fusionsprotein = Neochrom in diversen anderen Organismen, wie Farnen, Hornmoosen und in der Alge *Mougeotia* wider (Nozue *et al.*, 1998; Kawai *et al.*, 2003; Suetsugu *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2014). Auch in *Adiantum* kann die (Photosensorische Domäne von) Phytochrom durch die phot-Modul-vermittelte PM-Fixierung sowohl R-Polarotropismus, als auch R-abhängige Chloroplastenbewegung vermitteln (vgl. 1.6).

Um die phy4-phot-*Y2H*-Interaktionen bezüglich ihrer Lichtabhängigkeit und Stärke besser charakterisieren zu können, wurde erfolgreich ein lichtabhängiges Enzym-basiertes Interaktions-Assay etabliert. Der wesentliche Vorteil dieser Herangehensweise ist, dass (i) die Reporteraktivierung durch die Rekonstitution des GAL4-Transkriptionsfaktors infolge einer Interaktion über die Expressionsstärke der β -Galaktosidase mittels des Umsatzes eines chromogenen Substrates quantitativ spektralphotometrisch ausgelesen werden kann und (ii),

dass die Hefen zuvor mit unterschiedlichen Lichtpulsen behandelt werden können, um somit beispielsweise eine FR-Reversion einer R-induzierten Antwort nachzuweisen. Daher konnte das phy4-phot-Interaktionsverhalten in D, FR, R+FR mit demjenigen in R verglichen werden. Da Phytochrom auch BL absorbiert, wurden zusätzlich Interaktionsstärken in B bzw. in B+FR untersucht, um eine FR-Revertierbarkeit einer möglichen Induktion durch BL zu untersuchen. Analog zum *Y2H*-Wachstums-Assay konnte in allen vier AD:phot-BD:phy4-Kombinationen eine Verstärkung der Interaktionen durch RL beobachtet werden, während die Interaktionsstärke in FR bzw. in B mit derjenigen in D vergleichbar war (Abbildung 4-10). Interessanterweise traf dies auch für die R+FR-Behandlung zu, woraus geschlossen werden kann, dass die R-Induktion durch FR revertiert werden kann. Somit findet eine stärkere phot-Interaktion mit phy4-Pfr statt, als mit phy4-Pr. Trotz des N-terminalen BD-Tags kann Phytochrom 4 offensichtlich photokonvertieren, woraus man ableiten kann, dass dieser Prozess nicht in dem Maße durch den Tag beeinträchtigt wird, wie angenommen. Entweder kann sich die N-terminale Knotenstruktur dennoch ausbilden, oder der Knoten ist nicht essentiell für die Photokonversion. Da photA1 scheinbar konstitutiv an den phy4 C-Terminus (und nicht an den N-Terminus) binden, wird in der Pr-Konformation möglicherweise die phot-Bindestelle im C-terminalen Transmittermodul maskiert und erst durch die Photokonversion zu Pfr freigelegt (Jaedicke *et al.*, 2012). Die stärkste Interaktion und Interaktionsverstärkung fand dabei bei BD:phy4+AD:photA1 statt (~5-fach). AD:photA2 und AD:photB1 interagierten insgesamt schwächer mit BD:phy4 und auch die R-abhängige Verstärkung war nicht so stark (~3-fach). Die BD:+AD:phot-Negativkontrollen zeigten indes keine nennenswerte Reporteraktivierung (Abbildung 4-11).

Y2H und *Split-YFP* reichten als Nachweis der phy-phot-Interaktion für die Publikation nicht aus, vermutlich da beide Techniken mit einer gewissen Fehlerhaftigkeit behaftet sind und ggf. zu falsch positiven Ergebnissen führen können. Daher musste eine weitere Evidenz erbracht werden, wofür sich prinzipiell *Förster Resonance Energy Transfer* gekoppelt mit *Fluorescence Lifetime Imaging* (FRET-FLIM) oder ähnliche Methoden anbieten. Da diese allerdings ebenfalls auf dem Einsatz von FP-Tags basieren, sollte eine andere Methode eingesetzt werden, wie z.B. Co-IP. Dabei wird ein Protein von Interesse i.d.R. mit einem gegen dieses Protein gerichteten Antikörper und Kugeln mit einer höheren Dichte als der Proteinextrakt (z.B. bestehend aus Agarose oder Metall) aus selbigem präzipitiert. Diese Kugeln sind entweder direkt an die Antikörper gekoppelt, oder verfügen über eine Oberfläche, die Antikörper binden kann (z.B. Protein G). Anschließend werden nicht gebundene Proteine gewaschen und an das immunopräzipitierte Protein gebundene Proteine per SDS-PAGE und *Western Blot etc.* analysiert. Die Anwendung dieser Methode ist im Fall der phy-phot-Interaktion kein leichtes Unterfangen, da es sich, wie oben beschrieben, um Membran-assoziierte Proteine handelt. Diese müssen mit Detergenzien aus der Membran solubilisiert werden, ohne dabei die phy-phot-Interaktion zu beeinträchtigen. Es wurden HA:phy4- und myc:phot-Fusionen in *Nicotiana benthamiana* exprimiert. Die Etablierung eines geeigneten Extraktions- und Co-IP-Protokolls für die HA- und myc-Fusionsproteine bedurfte einiger Optimierung, deren Stadien in 4.3.1.4 beschrieben und daher hier nicht wiederholt werden. Letztlich wurden Proteine mit 0,3% Triton-X-100 extrahiert, HA:phy4-Fusionsproteine mit 2 µg monoklonalem Anti-HA-Antikörper aus dem Proteinextrakt präzipitiert und per *Western Blot* die Co-Immunopräzipitation von myc:phot-Proteinen mittels Anti-myc-Antikörpern nachgewiesen. In der Tat gelang es, die Co-IP von myc:photA1, myc:photA2 und myc:photB1 zusammen mit HA:phy4 (unter R-Bestrahlung) nachzuweisen bei gleichzeitig fehlender IP-Bande in der Negativkontrolle ohne AK (Abbildung 4-18 B). Die Interaktion von HA:phy4 mit myc:photB2

erzeugte zwar auch eine distinkte IP-Bande, allerdings auch eine etwas schwächere in der entsprechenden Negativkontrolle. Zusätzliche Experimente sollten in Anlehnung an die *Y2H*-Ergebnisse eine mögliche Unterdrückung der HA:phy4-myc:photB1- bzw. A2-Interaktion mittels FR untersuchen. Weder die FR-Bestrahlung von Tabakpflanzen vor der Extraktion in D, noch *ex vivo*-FR-Bestrahlung der Proteinextrakte vor der IP in D verringerten die IP-Signalstärke im Vergleich zur IP in R (Abbildung 4-18 A & C). Scheinbar ist die *ex-vivo* (und wahrscheinlich auch *in planta Split-YFP*) phy-phot-Interaktion nicht so strikt lichtabhängig, wie im *Y2H*. Möglicherweise verhelfen weitere an der phy-phot-Interaktion beteiligte und ggf. im PM-Signalkomplex enthaltene Proteine der Stabilisierung der Interaktion unabhängig von der Konformation des Phytochroms. Diese Proteine wären erwartungsgemäß in der intakten Pflanze aber auch im Proteinextrakt vorhanden, ganz im Gegensatz zum vergleichsweise artifiziellen *Y2H*-System. Weitere am phy-phot-Komplex beteiligte Komponenten könnten z.B. mithilfe einer massenspektrometrischen Analyse co-immunopräzipitierter Proteine identifiziert werden.

Da die *Y2H*- und *Split-YFP*-Experimente zum Nachweis der Interaktion zuvor vorwiegend mit N-terminalen Fusionen durchgeführt wurden, wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, diese Analysen auf C-terminal fusioniertes Phytochrom 4 auszudehnen. Es konnte gezeigt werden, dass in *Y2H*-Experimenten mit phy4:BD ebenfalls eine konstitutive bzw. R-verstärkte Interaktion mit AD:photA1 bzw. mit AD:photA2 und -B1 möglich ist (Abbildung 4-6 & Abbildung 4-8). Für AD:photB2 konnte keine eindeutige Aussage getroffen werden, was dem schwachen Interaktionsverhalten von AD:photB2 mit BD:phy4 entspricht. Obwohl GFP:phy4 ausschließlich cytoplasmatisch lokalisiert, während phy4:FP zusätzlich eine nukleäre Lokalisation aufwies und daraus geschlossen wurde, dass der N-terminale *Tag* einen Kernimport inhibiert und ggf. dadurch eine Interaktion mit Phototropin begünstigt (Jaedicke 2012), scheint zumindest die letztgenannte Konsequenz nicht zuzutreffen. Tatsächlich entspricht auch die Stärke und Lichtabhängigkeit der phy4:BD-AD:phot-Interaktionen im Wesentlichen denjenigen mit BD:phy4 im Wachstums-*Assay*.

Daraufhin wurde auch die *in planta* Interaktion von phy4:YFP_N mit YFP_C:photA1 bzw. YFP_C:photB1 mittels *Split-YFP* in D analysiert und demonstriert, dass beide Interaktionen – analog zu den Beobachtungen mit N-terminal fusioniertem phy4 – auch an der PM stattfinden (Abbildung 4-9). Die phy-phot-Interaktion findet demnach auch in D und nicht nur in R statt. Es wäre möglich mittels *Split-YFP* zu untersuchen, ob es zu einer Signalverstärkung in R kommt, jedoch eignet sich die Methode nicht, um dynamische Interaktions- und Disassemblierungs-Prozesse zu untersuchen, da sich die YFP-Hälften, wenn sie einmal rekonstituiert sind, nicht wieder trennen. Co-IP-Experimente (mit N-terminal fusioniertem phy4, s.o.) weisen allerdings auf eine Status-unabhängige Interaktion von phy4 mit *Physcomitrella* Phototropinen *in planta* hin. Resultierend daraus würde ein (polarisiertes) RL-Signal eher weniger zu einer differentiellen phy-phot-Assoziation an der PM, sondern eher zu anderen molekularen Auswirkungen, wie z.B. zu Phosphorylierungen oder Beeinflussungen von Interaktionen mit weiteren Komponenten des PM-Signalkomplex führen. Dieses Signal wird anschließend unter Konservierung der vektoriellen Information intrazellulär an das Aktin-Cytoskelett weitergeleitet, welches die Krümmungsreaktion ausführt.

In *Physcomitrella* scheint es, im Gegensatz zu *Arabidopsis*, nicht zu einer BL-induzierten Internalisierung von Phototropin von der PM ins Cytoplasma zu kommen (obgleich diese Experimente (von Rabea Meyberg) mit CFP:phot anstatt mit den in *Arabidopsis*-Studien üblichen C-terminalen FP-Fusionen durchgeführt wurden). Daher scheint die Kooperation zwischen phy und phot eher nicht in der phy-vermittelten phot-Retention an der PM zu

bestehen. Da *Physcomitrella* darüber hinaus keinen BL-vermittelten Phototropismus aufweist, kann es auch nicht zu einem R-verstärkten BL-Phototropismus wie in *Arabidopsis* kommen. Ob RL-Phototropismus durch vorhergehende oder gleichzeitige BL-Bestrahlung synergistisch verstärkt werden kann (letzteres ist in *Adiantum* Neochrom-vermittelt möglich) konnte bislang noch nicht untersucht werden. Möglicherweise nutzt Phytochrom 4 lediglich die PM-Fixierung durch Phototropin für die Ausbildung eines Trans-Membran Pfr-Gradienten (beim Phototropismus) und für den Polarotropismus notwendige anisotrope Orientierung der Transitions-Dipolmomente des Chromophors aus, um das molekulare Signal anschließend über den phot- oder phy-Signalweg weiterzuleiten (wobei beide bislang nur unzureichend charakterisiert sind).

Da auf Basis der bisherigen Erkenntnisse weder bekannt ist, wie Phototropin (mit Phytochrom) an der PM haftet, noch welche weiteren Komponenten an dem Signalkomplex beteiligt sind, noch welche Signalproteine das Signal ans Cytoskelett weiterleiten, rechtfertigt dies die Suche nach weiteren phy-Interaktionspartnern, z.B. mittels *Y2H*-Methoden, wie sie im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit angewendet wurden.

5.2.2 Charakterisierung der Interaktion von *Arabidopsis* phyA mit phot1 und phot2

Nachdem die Interaktion von phy4 mit den *Physcomitrella*-Phototropinen nachgewiesen wurde, stellte sich die Frage, ob eine solche Interaktion auch zwischen *Arabidopsis* phyA und Phototropin 1 oder 2 stattfindet und auf diese Weise das Zusammenspiel von RL- und BL-*Signalling* erklären könnte (vgl. 1.4). Ein *Y2H*-Experiment mit BD:phyA und AD:phot1 blieb jedoch ergebnislos (Doktorarbeit Mailliet und eigene Ergebnisse: Abbildung 4-20A). Überraschenderweise konnte in *Split-YFP*-Experimenten mit YFP_C:phyA+YFP_N:phot1 in Zwiebel dennoch ein Signal in R detektiert werden, welches ebenfalls an der Plasmamembran lokalisiert war. Da GFP:phyA und auch N-terminal fusionierte phyA-Homodimere erwartungsgemäß eine lichtabhängige Translokation in den Zellkern (in R und FR) zeigten, kann man davon ausgehen, dass auch bei phyA der N-terminale *Tag* nicht in dem Maße die Proteinfaltung und/oder Funktion stört, wie zunächst angenommen. Da auch hier das *Split-YFP*-Signal wesentlich schwächer, als das FP-Fusions-Signal war, wird wahrscheinlich auch in *Arabidopsis* (bzw. Zellen höherer Pflanzen) nur eine Subpopulation von phyA an der PM fixiert, während ein anderer *Pool* die Licht-induzierte Kerntranslokation ausführen und differentielle Genregulation regulieren kann. Der PM-*Pool* hingegen könnte auf der anderen Seite für die postulierten cytoplasmatischen phyA Antworten wie z.B. für den R-verstärkten BL-Phototropismus verantwortlich sein (s. 1.4). Somit könnte es sich um eine evolutionär konservierte Rolle der entsprechenden Interaktion in *Physcomitrella* handeln. Möglicherweise ist die direkte Photorezeptor-Interaktion auch für die phyA-vermittelte Retention von phot an der PM verantwortlich, z.B. indem eine BL-vermittelte/phot-abhängige Umorganisation kortikaler Mikrotubuli verhindert wird (Lindeboom *et al.*, 2013). Alternativ könnte phyA aber auch die Expression einer für die differentielle Regulation der phot-Lokalisation verantwortliche Komponente induzieren. So oder so hätte *Arabidopsis* Phytochrom eine duale Funktion – eine im Cytoplasma/an der PM und eine im Zellkern. Ob andere *Arabidopsis* Phytochrome und/oder phot2 ebenfalls eine solche Interaktion eingehen, ist bislang unklar. Da in *Y2H* im Gegensatz zu *Split-YFP* keine Interaktion detektierbar war, ist davon auszugehen, dass in *Arabidopsis* weitere Proteine die phy-phot-Interaktion vermitteln (was in *Physcomitrella* nicht der Fall zu sein scheint), die *in planta* jedoch nicht im Hefesystem verfügbar sind. Im postulierten PM-Lichtsignalkomplex ist vermutlich mindestens ein weiteres

Protein für die Fixierung des Phototropins an der PM verantwortlich. Alternativ wäre auch denkbar, dass eine phy-Bindungsstelle an phot1 durch seine Volllängen-Tertiärstruktur maskiert wird und erst durch ein RL-Signal (und z.B. Phosphorylierung oder Interaktion mit einem weiteren Signalprotein) freigelegt wird. Auch Phototropin erfährt wie Phytochrom eine Licht-induzierte strukturelle Konformationsänderung (der α -Helix), die in diesem Fall die Hemmung der Kinasedomäne aufheben und das Molekül somit aktivieren kann. Da die phyA-phot1-Interaktion allerdings schon in R (ohne BL) stattfindet, würde es sich bei einer Konformationsänderung, die eine phy-phot-Interaktion begünstigen könnte, nicht um den beschriebenen BL-induzierten Effekt handeln. In einer Publikation von Endo *et al.* (2013) wurde gezeigt, dass lediglich der phot1 C-Terminus und nicht das Volllängenprotein in der Lage ist, mit dem dort untersuchten PHL-Protein zu interagieren. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit entsprechende *Y2H-Prey*-Konstrukte kloniert und mit Volllängen-phyA-*Baits* kombiniert. Leider konnte weder der phot1-N- noch der phot1-C-Terminus (unabhängig von der AD-Fusionsreihenfolge) mit BD:phyA bzw. phyA:BD interagieren (s. Abbildung 4-19). Daher kann zumindest eine Maskierung von N- oder C-Terminus als Ursache für die ausbleibende Interaktion mit phyA ausgeschlossen werden.

Für Phototropin wurde postuliert, dass es zusammen mit seinen frühen Signalkomponenten NPH3, RPT2, PKS- & ABCB-Proteinen und PINs in Membran-Mikrodomänen *clustert* (Titapiwatanakun *et al.*, 2009). Mindestens die Expression von RPT2 und PKS1 wird durch phyA reguliert und zumindest für NPH3 und PKS1 ist bekannt, dass diese Proteine essentiell für BL-Phototropismus sind und auch mit Phytochrom und mit miteinander interagieren (s. 1.4, s. Abbildung 4-20 A: konstitutive phyA-PKS1-*Y2H*-Interaktion, Lariguet *et al.* (2006), de Carbonnel *et al.* (2010)). Daher stellen beide interessante Kandidaten für die Vermittlung der phyA-phot1-Interaktion an der Plasmamembran dar. Um eine mögliche Brückenprotein-Funktion von NPH3, bzw. PKS1 zu untersuchen, wurde der pBRIDGE-Vektor (Clontech) für ein *Y3H-Assay* angewendet, in dem die BD:phyA-AD:phot-Interaktion in An- oder Abwesenheit des entsprechenden *Bridge*-Proteins untersucht werden kann. Die Expression des letztgenannten kann prinzipiell über die Methionin-Konzentration im Selektionsmedium gesteuert werden, da sich die entsprechende CDS (NPH3 oder PKS1) im zweiten ORF des pBRIDGE-Vektors unter der Kontrolle eines Met-reprimierbaren Promotors befindet. Doppelt transformierte Hefen (BD:phyA/*Bridge*-Protein im *Bait*-Vektor und AD:phot1 im *Prey*-Vektor) wurden (zunächst an Met-Mangelbedingungen gewöhnt und anschließend) auf selektive PCB-Medien mit zusätzlichem Methionin (zur *Bridge*-Repression), mit normaler Methionin-Konzentration und ohne Methionin (zur *Bridge*-Induktion) aufgebracht und in unterschiedlichen Lichtbedingungen inkubiert. Die Co-Expression von NPH3 führte in keiner der untersuchten Bedingungen zu Hefewachstum, weshalb für dieses Protein eine Funktion als Vermittler der phyA-phot1-Interaktion ausgeschlossen wurde (Abbildung 4-20 B). Im Fall von PKS1 ist die Situation weniger klar, denn hier findet auf +Met-Medium und auf -Met-Medium keinerlei Wachstum statt, während auf *TSD* (mit normaler Met-Konzentration) reproduzierbar ein R-verstärktes Wachstum in der Kombination von BD:phyA mit AD:phot1 zu beobachten ist (Abbildung 4-20 B). Dies ist einigermaßen überraschend, denn wenn die BD:phyA-AD:phot-Interaktion nur in Anwesenheit von PKS1 stattfinden würde, hätte man lediglich ein Signal auf -Met-Medium erwartet, es sei denn, auch bei der normalen Met-Konzentration findet PKS1-Expression statt. Folglich stellte sich die Frage, ob es auf normalem *SD*-Medium auch zu einer Expression des *Bridge*-Proteins kommt. Daher wurden die entsprechenden doppelt transformierten Hefen in *DSD* mit den unterschiedlichen Methionin-Konzentrationen angezogen und bezüglich der *Bait*-, *Prey*- und *Bridge*-Protein-

Herstellung untersucht. In der Tat konnte nachgewiesen werden, dass die PKS1-Expression von der Methionin-Konzentration abhängt, aber interessanterweise die normale Methionin-Konzentration im *SD*-Medium nicht ausreicht, um die *Bridge*-Protein-Expression zu unterdrücken (Abbildung 4-21). Folglich war wahrscheinlich PKS1 auch im *Y3H-Assay* von BD:phyA+PKS1 mit AD:phot1 auf *TSD* anwesend und wäre somit in der Lage, als Brückenprotein zu fungieren. Möglicherweise sind die gleichen Hefen unter Met-Mangelbedingungen zu gestresst, um unter den offensichtlich schwachen Interaktionsbedingungen zu wachsen und zeigen daher auf -Met-*TSD*-Medium keine Wachstumsantwort.

Um dieses Ergebnis in einem Pflanzensystem zu bestätigen, wurde versucht, das für HA:phy4 und *Physcomitrella* myc:phot1 etablierte Co-IP-Experiment auf HA:phyA und myc:phot1 mit und ohne Co-Expression von PKS1 auszudehnen. Leider stellte sich heraus, dass insbesondere PKS1 unter den angewendeten Bedingungen sehr instabil ist und daher meist am Ende der Proteinextraktion / im *Input* der IP nicht mehr in nachweisbarer Menge vorhanden war (4.3.2.2). Sollte PKS1 doch in Einzelfällen im *Input* nachweisbar gewesen sein, konnte allerdings in keinem Fall eine myc:phot1-IP-Bande nach HA:phyA-IP nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Interessanterweise war es dennoch möglich, eine solche IP-Bande ohne co-exprimiertes PKS1 nachzuweisen (Abbildung 4-22). Dies könnte bedeuten, dass PKS1 die Interaktion von phyA und phot1 *in planta (ex vivo)* nach R-Bestrahlung eher behindern würde, als sie zu fördern (was aber durch weitere Experimente belegt werden sollte). Dies könnte auch eine Erklärung für die ausbleibende Wachstumsantwort auf -Met-Medium im *Y3H-Assay* sein (allerdings hätte man in diesem Fall auch auf normalem *TSD*-Medium kein Wachstum erwartet). Daher handelt es sich bei PKS1 wahrscheinlich auch nicht um das gesuchte Brückenprotein (zumindest nicht in R). Möglicherweise ist PKS1 auch nur in D oder nach BL an den Signalkomplex gebunden (was im *Y3H-Assay* jedoch mutmaßlich ein Signal hervorgerufen hätte). Zumindest die *in vivo* phot1-PKS1-Interaktion wurde bislang nur in D untersucht und fand an der PM statt (Lariguet *et al.* (2006) u. wahrscheinlich auch Zhao *et al.* (2013)). Mittels Co-IP konnte allerdings auch eine *ex vivo* Interaktion in WL nachgewiesen werden (Lariguet *et al.*, 2006). Die *in vivo* phot1-PKS1-Interaktion an der PM konnte auch in eigenen *Split-YFP*-Analysen von YFP_N:phot1 sowohl mit YFP_C:PKS1 als auch mit PKS1:YFP_C bestätigt werden (Abbildung 4-23 B). Bezüglich der zellulären PKS1-Lokalisation existieren widersprüchliche Erkenntnisse: während Fankhauser *et al.* (1999) von einer cytoplasmatischen Lokalisation von PKS1:GFP berichtete (diese jedoch nicht zeigte), war PKS1:GFP in einer späteren Studie von Lariguet *et al.* (2006) mit der PM etiolierter Keimlinge assoziiert, worauf Zellfraktionierungs-Experimente mit etiolierten (und vor Allem von für 4h Licht-behandelten) Keimlingen in derselben Arbeit ebenfalls hinwiesen. Soweit mir bekannt, konnte bislang keine (*State-dependent*) PKS1-phyA-Interaktion *in planta* nachgewiesen werden. Co-IP-Versuche blieben sowohl bei Fankhauser, als auch in eigenen Experimenten ergebnislos (beides nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit mittels *Split-YFP* untersucht, wo die intrazelluläre phyA-PKS1-Interaktion in Zwiebelzellen stattfindet. YFP_C:phyA konnte in Kombination mit PKS1:YFP_N kein rekonstituiertes YFP-Signal erzeugen (nicht gezeigt), wohingegen in Kombination mit YFP_N:PKS1 auch ohne Licht-Vorbehandlung ein deutliches Signal im Cytoplasma und der perinukleären Region beobachtet werden konnte (Abbildung 4-23 A). Daher widersprechen sowohl die *Split-YFP* als auch die Co-IP-Erkenntnisse der Hypothese, dass es sich bei PKS1 um das gesuchte Brückenprotein, sondern stattdessen um eine potentielle Signalkomponente handelt. Interessanterweise ergibt sich noch eine weitere Konsequenz: es scheint nicht nur zwei Phytochrom-*Pools*, sondern auch zwei PKS1-*Pools* zu

geben: einer, der mit phot (und indirekt mit phy) an der PM interagiert, und einer, der mit cytoplasmatischem Pr assoziiert ist. Möglicherweise ist der PM-*PKS1-Pool* eher für (R-modulierte) BL-Antworten (u. ggf. für die R-vermittelte Phot-Retention an der PM in BL) und der cytoplasmatische *PKS1-Pool* eher für RL-abhängige phy-Antworten verantwortlich. Ob sich die D-Lokalisation des phyA-*PKS1*-Komplexes durch RL (oder BL) ändert, ist bislang unklar. Eine R-induzierte Dissoziation des Komplexes ist dabei eher unwahrscheinlich (Fankhauser *et al.*, 1999). Bei stärkerer Vergrößerung wurde deutlich, dass das phyA-*PKS1*-YFP-Signal nicht uniform, sondern insbesondere im Cytoplasma (angrenzend an die PM) strukturiert erschien. Möglicherweise wird dies durch eine Assoziation des phyA-*PKS1*-Komplexes mit weiteren zellulären Komponenten, wie dem Cytoskelett oder dem ER hervorgerufen. Es wäre vorstellbar, dass dies beispielsweise eine Rolle in der postulierten *PKS1*-abhängigen phy-Retention im Cytoplasma und resultierendem negativem phy-*Signalling* spielen könnte (s. 1.2.2).

Die Bestätigung der im *Split-YFP* detektierten phyA-phot1-Interaktion im Co-IP-Experiment (also mit einer weiteren Pflanzen-basierten Methode) bei gleichzeitigem Ausbleiben einer direkten *Y2H*-Interaktion (Abbildung 4-20 A), bestärkt die Hypothese, dass ein Brückenprotein notwendig ist, um die phyA-phot1-Interaktion zu vermitteln. Die molekulare Natur dieses Proteins bleibt jedoch weiterhin unbekannt.

5.3 Holo-phy4:BD *Y2H*-Oligo dT-cDNA *Library-Mating-Screen*

Y2H-Methoden sollten eingesetzt werden, um mögliche phy4-Interaktionspartner, die eine cytoplasmatische Signaltransduktion für gerichtete Lichtantworten vermitteln können, zu identifizieren. Eine in AH109 vortransformierte *Physcomitrella* Oligo dT-cDNA Bibliothek wurde mit Apo-BD:PHY4 (Dr. Mailliet) und Holo-phy4:BD in Rc mittels Hefe-Doppeltransformation bzw. *Mating gescreened*.

Im Holo-phy4:BD-*Screen* wurden $4,2 \times 10^5$ Klone erfasst, was schätzungsweise einer 4-fachen Abdeckung des *Physcomitrella* Transkriptoms entspricht. 69 Hefeklone überlebten die zwei Selektionsrunden, wovon die Meisten Rc-abhängig auf *TSD* + 3-AT+PCB-Masterplatten wuchsen (Abbildung 4-24). Hefe-DNAs wurden in *E. coli* transformiert, wobei im Fall mehrerer *Prey*-Plasmide pro Hefeklon diese erfolgreich getrennt werden konnten. Mehr als 100 DNA-Minipräparationen wurden sequenziert und bereinigte Sequenzen wurden zunächst gegeneinander und anschließend mit NCBI- und Cosmoss- Transkript-Datenbanken abgeglichen um Duplikate bzw. die jeweiligen Loci im *Physcomitrella* Genom zu identifizieren. Nach Sequenzanalyse verblieben 54 Hefeklone mit einmaligen Sequenzen, wovon 6 Klone je zwei *Prey*-Plasmide enthielten (= 60; s. Tabelle 1 im Anhang). Insgesamt war die Anzahl *gescreener* Klone und die der identifizierten einmaligen Sequenzen für den Holo-phy4:BD-*Screen* (*Mating*) wesentlich höher, als für den Apo-BD:PHY4-*Screen* (Doppeltransformation; vgl. 3.4.1), was für die Anwendung des *Mating*-Protokolls und von weniger 3-AT spricht. Die wenigsten der erhaltenen Datenbank-Treffer waren annotiert. Annotation konnte durch Domänenvorhersage und durch Suche nach homologen Proteinen in *Arabidopsis thaliana* und Viridiplantae verbessert werden. Knapp ein Drittel der identifizierten phy4:BD-Interaktionspartner haben wohl Funktionen in Metabolismus, gefolgt von Translations-assoziierten Proteinen und Signaltransduktions-Proteinen (vgl. Tabelle 4-4). Zwischen 2 und 5 Proteine übernehmen wahrscheinlich Rollen in Stress- oder Phytohormon-Antworten, sind womöglich mit dem Cytoskelett oder Membranen / Transport assoziiert. 6 Proteinen konnte auf Basis von Datenbank- oder Literaturrecherchen keine Funktion zugeordnet werden. Kandidaten, die als unwahrscheinliche Akteure in cytoplasmatischem Phytochrom-*Signalling*

erachtet wurden, wurden aus der weiteren experimentellen Untersuchung ausgeschlossen. Bei möglicherweise für Phytochrom-Signaltransduktion interessanten Kandidaten handelte es sich zum einen um klassische Signalproteine und posttranslationale-Modifizierer. Bei der Krümmungsreaktion der Moosfilamente infolge gerichteter Lichtreize organisiert sich vor Allem das Aktin-Cytoskelett um, weshalb dieses wahrscheinlich eine zentrale Rolle als ausführendes Organ *downstream* des Phytochrom-Phototropin-Signalkomplexes an der Plasmamembran spielt (Jaedicke *et al.*, 2012). Daher sind zum anderen Cytoskelett-assoziierte Proteine besonders interessant. Darüber hinaus ist nicht bekannt, wie der phy-phot-Komplex in Plasmamembran-Nähe verankert ist. Sogar für *Arabidopsis*-Phototropine konnte dies bislang nicht zweifelsfrei geklärt werden. Weder bei Phytochrom, noch bei Phototropin handelt es sich um Membranproteine, so dass die Verankerungsfunktion wohl durch ein anderes Protein vermittelt wird. Daher wurden auch Membranproteine für eine nähere Untersuchung ausgewählt. Transkriptions-/Translations-Regulatoren wurden ebenfalls ausgewählt, da jüngst eine Phytochrom-Funktion in der PORA-Translation gezeigt werden konnte (Paik *et al.*, 2012).

5.4 Untersuchung ausgewählter Partner aus Apo-BD:PHY4 und Holo-phy4:BD- *Y2H*-cDNA-Library-Screens

Aus dem Apo-BD:PHY4 und dem Holo-phy4:BD-*Screen* wurden 4 bzw. 15 Klone für experimentelle Analysen ausgewählt (Tabelle 4-5) und in Volllänge meist in *Gateway-Entry*-Vektoren kloniert, um daraus Expressionsklone für *Y2H*-, Lokalisations- und *Split-YFP*-Interaktionsanalysen herzustellen. AD:CDS und CDS:AD-*Prey*-Plasmide aller ausgewählten Partner wurden in Hefe mit photoaktiven Volllängen-BD:phy4- und phy4:BD-*Baits* kombiniert. Das Interaktionsverhalten wurde mittels semiquantitativen *Y2H*-Wachstums-*Assays* in unterschiedlichen Lichtbedingungen charakterisiert (Abbildung 4-25). Die Mehrzahl der untersuchten Kandidaten konnte in *Y2H* verifiziert werden. Meistens zeigten verifizierte Interaktionspartner R-verstärktes und FR-revertierbares, seltener konstitutives Wachstumsverhalten so dass sie vorläufig als *Holophytochrome Interacting Partners* (HIPs) benannt wurden. Lediglich drei von 19 Partnern wurden entweder aufgrund des *Y2H*-*Assays* (Cyclophilin) oder nach *Split-YFP*-Experimenten (Rhodopsin-*Tail*- & Autophagie-Protein) von weiteren Analysen ausgeschlossen (s. 4.5.1). Eine Ursache für eine nicht verifizierte Interaktion im Wachstums-*Assay* im Vergleich zu dem Wachstumsverhalten der ursprünglichen *Screening*-Klone könnte sein, dass evtl. in der Volllängen-Konfiguration eine mögliche phy4-Bindestelle verdeckt wird, die als partielles Konstrukt zugänglich war. Beim Cyclophilin war allerdings die komplette CDS vorhanden, allerdings zusätzlich dazu auch UTR-Teile, so dass vermutlich eine alternative Faltung mit (*Screen*) und ohne UTRs (semiquantitatives Wachstums-*Assay*) die Ursache für eine ausbleibende Interaktion ist. Ebenso können generelle Unterschiede in der Interaktionsstärke in *Screen* und semiquantitativem Wachstums-*Assay* (nach Volllängen-CDS-Klonierung) auftreten. So wachsen z.B. Hefen, die CDPK, das Pirin-*like*-, das ZF-, das Rhomboid- und das Ankyrin&BTB/POZ-Protein exprimieren im semiquantitativen Wachstums-*Assay* (in *Screening*-Konfiguration) ähnlich stark auf *TSD* ohne PCB wie auf *TSD* + PCB in Rc (s. Abbildung 4-25). In der 2. Selektionsrunde der *Screening*-Klone allerdings trat auf dem PCB-haltigen Medium immer stärkeres Wachstum / *MEL1*-Aktivierung auf, als auf *TSD* ohne PCB (s. Tabelle 4-5). Keiner dieser Partner wies in der cDNA-Bibliothek eine komplette CDS auf.

Es ist eher unwahrscheinlich, dass alle *Y2H*-positiven Kandidaten tatsächlich eine Rolle in der (cytoplasmatischen) Phytochrom-Signaltransduktion spielen. *Y2H* ist bekannt dafür, auch eine

beträchtliche Anzahl falsch positiver Resultate zu erzielen. Beispielsweise kommen durch die Expression von cDNAs aus potentiell allen mRNAs ggf. Proteine in der Hefezelle zusammen, die in der Pflanzenzelle durch Kompartimente getrennt wären. Oder Interaktionen finden aufgrund des modularen Aufbaus von Proteinen durch Domänen-Ähnlichkeiten statt. So könnte man sich vorstellen, dass Proteinkinase-Substrate mit Phytochrom beispielsweise über seine HKRD interagieren oder dass auch nicht-physiologische Interaktionen mit dem *PAS-Repeat* stattfinden *etc.* Daher müssen zunächst weitere Evidenzen für eine Protein-Protein-Interaktion erbracht werden und idealerweise auch *Knockouts* hergestellt und deren physiologische Reaktion auf gerichtete/polarisierte Rotlichtreize untersucht werden. Letzteres ist sehr zeitaufwendig und war in dieser Arbeit nicht möglich. Daher wurde entschieden, zunächst die Exprimierbarkeit und Lokalisation von Fluoreszenzproteinfusionen in *Physcomitrella* in D und R zu überprüfen. Anschließend, sollte die *in planta* Interaktion mit phy4 mittels *Split-YFP* verifiziert werden. Mögliche Funktionen putativer Interaktionspartner sollte anhand eingehender Literaturrecherche abgeleitet werden. Die Ergebnisse dieser Analysen sind für jeden untersuchten putativen Partner einzeln im Folgenden dargelegt.

5.4.1 Pirin / HIP1 und Pirin-ähnliches Protein / (HIP2)

Interessanterweise wurde ein Pirin (HIP1) als Apo-BD-PHY4- und ein Pirin-ähnliches Protein (ehemals HIP2) als Holo-phy4:BD-Interaktionspartner identifiziert. Daher wurden beide zur experimentellen Untersuchung ausgewählt. Basierend auf den Lokalisationsdaten (s. Abbildung 4-26 A) kann abgeleitet werden, dass Pirin/HIP1 prinzipiell Signale in Cytoplasma und/oder Zellkern weiterleiten und auch *in planta* mit phy4 interagieren könnte. *Split-YFP*-Experimente ergaben, dass nur das Pirin nicht jedoch das Pirin-ähnliche Protein *in planta* mit phy4 interagiert, weshalb die folgenden Ausführungen auf das Pirin fokussieren. Da dem Pirin-ähnlichen Protein die C-terminale Domäne des Pirins fehlt, könnte es sein, dass eben diese für die Interaktion mit phy4 verantwortlich ist. YFP_N:Pirin+phy4:YFP_C interagierten analog zu den Lokalisationsdaten in Cytoplasma und Kern, aber auch in cytoplasmatischen Foci (Abbildung 4-26 B). Pirin besitzt eine N-terminale Cupin-Domäne mit den potentiellen Metall-koordinierenden Aminosäuren H116, H118, H160 and E162, die H57, H59, H101 und E103 im menschlichen Pirin entsprechen (Pang *et al.*, 2004; Adams & Jia, 2005). Die Pirin-typische C-terminale Domäne ähnelt der Cupin-Domäne, allerdings fehlen ihr die Metall-koordinierenden Reste. Pirine kommen sowohl in Säugetieren, als auch in Pilzen, Pflanzen und Prokaryoten vor. Zuerst wurde ein humanes Pirin identifiziert und als nukleäres Faktor I / CCAAT-Box-Transkriptionsfaktor (NFI / CTF1)-interagierendes Protein charakterisiert (Wendler *et al.*, 1997), welches auch mit dem humanen Onkogen Bcl3 (ein Mitglied der IκappaB-Familie) interagieren kann (Dechend *et al.*, 1999). Da das *Physcomitrella*-Pirin zusätzlich zum Zellkern auch im Cytoplasma vorkommt und mit phy4 interagiert, übernimmt es vermutlich auch dort physiologische Aufgaben.

Im *Physcomitrella*- und im *Arabidopsis*-Genom sind vier bzw. drei Pirin-ähnliche Gene enthalten und die Funktionen der codierten Proteine scheinen sehr divers zu sein. Was pflanzliche Pirin-Funktionen betrifft, konnte gezeigt werden, dass es in diverse physiologische Prozesse, wie zum Beispiel bakterielle Pathogen-Anfälligkeit (At.PRN2, Zhang, B *et al.* (2014)), Apoptose (Le.Pirin, Orzaez *et al.* (2001)), ABA-Regulation der Samenkeimung (At.PRN1, Lapik and Kaufman (2003)) und in die B-induzierte LHC-Expression (Warpeha *et al.*, 2007) involviert ist. Eines der *Arabidopsis*-Pirine (PRN1) wurde in einem *Y2H-Screen* nach Interaktionspartnern der einzigen G-Protein α -Untereinheit (GPA1) im *Arabidopsis*-Genom identifiziert (Lapik & Kaufman, 2003). Durch die direkte PRN1-GPA1-Interaktion wird

möglicherweise die lichtabhängige Samenkeimung und -entwicklung induziert. Die *PRN1*-Expression wird durch Rotlicht und ABA positiv reguliert. Somit könnte Pirin und auch GPA1 eine Rolle in der Lichtsignaltransduktion spielen. Warpeha *et al.* (2007) konnten darüber hinaus zeigen, dass G-Protein-*Signalling* auch die PRN1-vermittelte ABA und B-Regulation des *Light Harvesting* Chlorophyll a/b-Bindeproteins in etiolierten *Arabidopsis* Keimlingen steuern kann. Allerdings wäre – eine analoge Signaltransduktion in *Physcomitrella* vorausgesetzt – unmöglich, dass eine genregulatorische Antwort für gerichtete Lichtantworten verantwortlich zeichnen kann. Wenn Pirin also an der Plasmamembran mit dem Phy-Phot-Komplex interagiert und das Signal über G-Proteine weiterleitet, dann muss ein anderer Effektor im Cytoplasma Ziel des Signals sein, um zu einer lokalen Umorganisation des Cytoskeletts zu führen. Da allerdings sowohl GPA1, als auch der G-Protein gekoppelte Rezeptor GCR1 durch Interaktion mit spezifischen Zielproteinen diverse Antworten auslösen können, ist nicht auszuschließen, dass auch cytoplasmatisches Phytochrom-*Signalling* über GPA1 laufen könnte.

Heterotrimere G-Proteine wurden schon in den 90er Jahren als Phytochrom-Signalweiterleitungsmöglichkeit in Samenkeimung und -entwicklung in Betracht gezogen. So konnten pharmakologische Ansätze zeigen, dass der Phänotyp einer Tomaten-Chromophor-Synthesemutante durch Mikroinjektion von G-Protein-Untereinheits-Stabilisatoren gerettet werden und dass manche Phytochrom-Effekte durch cGMP in D induziert werden konnten (Neuhaus *et al.*, 1993; Bowler *et al.*, 1994). Eine spätere Studie zeigte, dass ein GPA1-Überexpressor erhöhte (Weiß-, R-, FR, B)-Lichtsensitivität und eine stärkere Phytochrom-vermittelte Inhibition der Hypokotyl-Elongation aufwies (Okamoto *et al.*, 2001). Eine Arbeit von Jones und Mitarbeitern stellte aber die Beteiligung von heterotrimeren G-Proteinen in der Phytochrom-Signaltransduktion in Frage, da *gpa1* und *agb1* (eine G-Protein β -Untereinheit) Mutanten und Überexpressoren keinen Phänotyp bezüglich der R- und FR-Sensitivität im Hypokotyl-Wachstum aufwiesen (Jones *et al.*, 2003). Andererseits weisen Evidenzen von Botto *et al.* (2009) darauf hin, dass dieselben Mutanten eine geringere Keimungsrate in gepulstem und kontinuierlichen R-Licht aufweisen. Die Involvierung von G-Proteinen ist demnach nach wie vor umstritten.

Für Mensch-, *E. coli*- und *Arabidopsis*-Pirine konnte gezeigt werden, dass sie Quercetinase-Aktivität besitzen (Adams & Jia, 2005), also das Flavonoid Quercetin degradieren. Dieses spielt u.A. eine Rolle in der UV-Akklimation (Hectors *et al.*, 2014) und inhibiert den polaren Auxin-Transport in Weizen-Embryos (Fischer *et al.*, 1997) und in *Arabidopsis* (Kuhn *et al.*, 2011; Buer *et al.*, 2013), so dass Quercetin eine Rolle in Tropismen spielen könnte (Lewis *et al.*, 2011). Pirin kann scheinbar (abhängig vom GDP/GTP-Bindungsstatus der assoziierten GPA1) Quercetin-Level regulieren und wohl auch das lichtabhängige Hypokotyl-Wachstum steuern. In der Tat zeigen im Weißlicht gewachsene *prn1 Arabidopsis* Keimlinge desorientiertes Hypokotyl-Wachstum während D-gewachsene Keimlinge erhöhte UV-induzierte Quercetin-Level aufweisen (Orozco-Nunnally *et al.*, 2014). In *Arabidopsis* ist Quercetin im und um den Zellkern, im Endomembran-System und an der Plasmamembran lokalisiert (Peer *et al.*, 2001). Somit wäre es theoretisch möglich, dass verschiedene phy4-Pirin-Effekte – inklusive des phy4-Phototropin-Komplexes an der Plasmamembran – mit Quercetin und Auxin-Wirkung assoziiert sind. Vorstellbar wäre evtl., dass die Quercetinase-Aktivität des vermutlich konstitutiv an phy4 gebundenen Pirins (vgl. *Split-YFP*-Daten) entweder durch die phy4-Photokonversion oder ggf. durch Rekrutierung/Aktivierung eines weiteren Partners (GPA1?) moduliert wird. Infolge dessen könnte eine veränderte Quercetin-Konzentration in Plasmamembran-Nähe zu differentieller PIN-Lokalisation / Aktivität und somit zu veränderten

Auxin-Flüssen führen, die sich letztlich auf die Zellstreckung und zusammen mit anderen Regulatoren auf die Zellorientierung auswirken könnten.

Es scheint sich bei Pirin also um ein *bona fide* Signalprotein mit diversen Funktionen zu handeln, allerdings muss die Involvierung in Phytochrom-*Signalling* abgesehen von der direkten konstitutiven *in planta* Interaktion mit phy4 noch durch weitere Experimente belegt werden.

5.4.2 ZF-Protein / HIP3

Das im Holo-phy4:BD-*Screen* identifizierte Zinkfinger-Protein wurde aufgrund seiner möglichen ZF-Protein-Protein-Interaktionsdomänen zur näheren Untersuchung ausgewählt und konnte im *Y2H-Assay* (Abbildung 4-25) und auch in *Split-YFP* (Abbildung 4-27 B) als phy4-Interaktor verifiziert werden. Interessanterweise war die Interaktion sowohl in *Y2H*, als auch in *Split-YFP* nur in R also mit phy4-Pfr zu beobachten. Prinzipiell können Protein-Protein-Interaktionen dazu führen, dass sich die intrazelluläre Lokalisation, die Stabilität, Aktivität oder Interaktion des Zielproteins mit anderen Proteinen ändert. Da das *Split-YFP*-Signal auch nach einer Stunde Belichtung beobachtbar war, ist vermutlich die Stabilität des ZF-Proteins durch die Interaktion mit phy4 nicht beeinträchtigt. Auch die Lokalisation von ZF in D und R (also mit phy4-Interaktion) sowohl in Lokalisations- als auch in *Split-YFP*-Studien ist identisch. Sollte die phy4-ZF-Interaktion eine physiologische Relevanz haben, wirkt sich die lichtabhängige ZF-phy4-Interaktion womöglich entweder auf ein weiteres Signalprotein aus oder hat ggf. einen Effekt auf die Bindeaktivität des ZF-Proteins. Die ZF-phy4-Interaktion scheint dabei im Cytoplasma und im Zellkern stattzufinden, auch wenn CFP:ZF zumindest in der Hälfte der beobachteten Zellen im Cytoplasma alleine anzutreffen war (Abbildung 4-27 A). Somit könnte der ZF-phy4-Komplex seine Funktion in beiden Kompartimenten ausüben. Ob die rein cytoplasmatische Lokalisation in einer Untermenge der CFP:ZF-Zellen physiologische Gegebenheiten widerspiegelt, oder durch die Fusion mit dem FP hervorgerufen wird, kann nicht mit Sicherheit beurteilt werden. Da allerdings keine klassischen NLS und NES-Sequenzen vorliegen, interferiert die FP-Fusion wohl eher nicht mit der Erkennung solcher Motive.

HIP3 weist verschiedene ZF-Motive auf: CHY-Typ (68-156), CTCHY-Typ (146-210), C3HC4 (210-253) und RING-Typ Zinkfinger. ZF-Proteine binden diverse Liganden: von DNA und RNA über Lipide bis zu Proteinen (Laity *et al.*, 2001; Matthews & Sunde, 2002) und können Funktionen in ebenso diversen zellulären Prozessen wie Transkription, Translation, Cytoskelett-Organisation oder Proteinfaltung haben. Die Domänenen-Bezeichnung CHY-ZF leitet sich von seinem konservierten CxHY-Motif ab, dessen Funktion bislang unbekannt ist (Leng *et al.*, 2003). Die 40-60 Aminosäuren umfassenden RING-Typ-ZF hingegen binden zwei Zinkatome und vermitteln wohl Protein-Protein-Interaktionen (Freemont, 1993; Borden & Freemont, 1996; Saurin *et al.*, 1996). RING-Typ-ZF können eine Rolle als E3-Ubiquitin-Ligasen in der Ubiquitin-vermittelten Proteindegradation spielen, sind in Pflanzen somit häufig an Genregulation mittels Repressor-Eliminierung beteiligt und haben demzufolge Funktionen in Signaltransduktionen. Mindestens sieben mögliche *Arabidopsis*-Homologe des *Physcomitrella*-ZF-Proteins konnten mittels BLASTP identifiziert werden (s. 4.5.2.2 & Tabelle 6-1). Das identifizierte RING-Finger und CHY Zinkfinger-Domänen-enthaltende Protein 1 ist in der Tat eine nukleäre E3 Ubiquitin-Ligase, die für die Regulation der Stomata-Öffnung verantwortlich ist. Die Aktivität der Ligase scheint mittels Phosphorylierung durch die *SNF1-related protein kinase 2* (SnRK2.6, Ding *et al.* (2015)) reguliert zu werden. CHY und CTCHY und RING-TYP ZF-Protein ist ein PGPD 14-*like* Protein mit unbekannter Funktion (Kosarev *et*

al., 2002). Ein weiterer Kandidat, die MYB30-*interacting* E3 Ligase 1 degradiert den MYB30 Transkriptionsfaktor, der als negativer Regulator in Abwehrantworten in *Arabidopsis* dient (Marino *et al.*, 2013).

Einige bekannte *Arabidopsis* Phytochrom-Interaktions- oder Signalmoleküle sind dafür bekannt, RING-ZF zu besitzen, wie zum Beispiel RFI2 (RED AND FAR RED INSENSITIVE 2), das eine Rolle in Phytochrom-gesteuerter Keimlings-Deetiolierung hat (Chen & Ni, 2006), oder VOZ1 (VASCULAR PLANT ONE ZF 1), ein phyB-Interaktionspartner, der Blühinduktion kontrolliert (Yasui *et al.*, 2012). Der zentrale Regulator der Photomorphogenese, die E3-Ubiquitin Ligase COP1 (CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC 1), enthält ebenfalls ein C3HC4-Typ RING-ZF-Motif. Darüber hinaus wurde kürzlich Evidenz für eine Phytochrom-gesteuerte cytoplasmatische Funktion eines ZF-Proteins in *Arabidopsis* erbracht: das C3H-Typ-ZF-Protein PENTA1 (PNT1), interagiert mit Pfr im Cytosol und reguliert dadurch die Translation des lichtregulierten Chlorophyll-Biosynthese-Enzyms Protochlorophyllid-Oxidoreduktase A (PORA, Paik *et al.* (2012)). Weitere Analysen des HIP3/ZF-Proteins sollten Aufschluss über eine tatsächliche Funktion in phy4-*Signalling* geben, die insbesondere aufgrund der lichtabhängigen *in planta* Interaktion mit phy4 nicht ausgeschlossen ist.

5.4.3 PLEIOTROPIC REGULATORY LOCUS 1 / HIP4

PRL1 wurde zwar im Apo-BD:phy4-*Screen* identifiziert, zeigte jedoch trotzdem zumeist Licht-induzierte Interaktion mit Holo-phy4-*Baits* (Abbildung 4-25). Im Gegensatz zu β -Galaktosidase-*Assay*-Daten von Dr. Mailliet war auch die *Screening*-Konformation BD:phy4+AD:PRL1 eher lichtabhängig im semiquantitativen Wachstums-*Assay*. Während die intrazelluläre PRL1-Lokalisation vorwiegend im Zellkern und weniger deutlich im Cytoplasma (eher bei PRL1:GFP) gezeigt werden konnte, waren *in planta* Interaktionsmuster zumeist in Cytoplasma und Zellkern zu beobachten, was den Lokalisationsdaten weitgehend entspricht (Abbildung 4-28). Eine Ausnahme bildet hierbei YFP_C:phy4+YFP_N:PRL1, dessen Signal im *Split-YFP* eher cytoplasmatisch lokalisiert, während die N-terminale PRL1-FP-Fusion vorwiegend im Zellkern vorzufinden ist. Scheinbar beeinflusst die Interaktion mit phy4 in diesem Fall das Lokalisationsverhalten dahingehend, dass kein Kernimport oder konstitutiver Kernexport des Komplexes stattfindet. *Genevestigator-Microarray*-Daten für Entwicklungsstadien, Anatomie und Perturbationen weisen auf eine Synexpression von PRL1/HIP4 und phy4 hin (s. Anhang 1.7.4).

PRL1 ist in Landpflanzen, Pilzen und Tieren inkl. Säugetieren stark konserviert. *Arabidopsis* PRL1 ist ein α -Importin-interagierendes Protein, welches im Zellkern lokalisiert und auch mit Kern- und ER-Membranen assoziiert ist (Nemeth *et al.*, 1998). Die PRL1-Aminosäure-Sequenz enthält 7 WD40-Domänen und in der C-terminalen Region eine Variante des SV40-NLS-Typs, die nicht konstitutiv, sondern abhängig von NLS- oder Importin-Phosphorylierung erkannt wird (Nemeth *et al.*, 1998). Die Lokalisationsdaten schließen zumindest einen Rotlichteffekt auf die *Physcomitrella*-PRL1-Lokalisation aus, da sich die Lokalisation nach R-Belichtung nicht ändert (s. Abbildung 4-28 A). Allerdings ist dies eine mögliche Erklärung der cytoplasmatischen Lokalisation von YFP_C:phy4+YFP_N:PRL1, denn falls phy4 an den C-terminalen Bereich von PRL1 bindet, könnte dies eine NLS-Erkennung stören und eine cytoplasmatische Lokalisation des Komplexes bewirken. PRL1:YFP_N hingegen interagiert nur sehr schwach mit YFP_C:phy4, was evtl. durch die C-terminale Fusion des PRL1 verursacht wird. Möglicherweise behindert der C-terminale *Tag* die Interaktion mit YFP_C:phy4.

Die WD40-Domänen bilden vermutlich β -Propeller aus, die zusammen eine Plattform für Protein-Protein-Interaktionen z.B. für Multi-Komplex-Assemblierung bilden. Solche

Plattformen sind oft in Signaltransduktions-Prozesse und Transkriptionsregulation involviert, wie zum Beispiel im Fall von COP1 in der Repression der photomorphogenetischen Entwicklung. *Arabidopsis* PRL1 scheint an einer Vielzahl physiologischer Antworten beteiligt zu sein, wie der Name schon andeutet. Zuerst wurde PRL1 als Regulator von Zellpolarität durch Organisation von Cytoskelett-Assemblierung in *Pichia* beschrieben (Xia *et al.*, 1996). Spätere Arbeiten wiesen PRL1 eine zentrale Rolle in der Integration von Lichtsignalen mit Hormon- (z.B. Cytokinin-) und Zuckerantworten in Pflanzen zu (Nemeth *et al.*, 1998). In der Tat hat die *prl1*-Mutation einen Effekt auf das lichtregulierte Hypokotyl-Wachstum, denn *prl1*-Hypokotyle sind in D kürzer, als beim WT aber nicht in Weiß-, R-, FR- oder B-Licht, was einen schwachen COP-Phänotyp darstellt (Nemeth *et al.*, 1998). Dies stimmt auch mit PRL1's Rolle als positiver Regulator der Brassinosteroid-Synthese überein: das CPD-Gen, welches für eine Steroid-C23-Hydroxylase codiert, wird herunterreguliert und infolgedessen wird durch BR die Skotomorphogenese gefördert (Szekeres *et al.*, 1996). Vermutlich werden BR-Level ebenfalls positiv reguliert, indem PRL1 mit verschiedenen SnRKs (At.KIN10 und 11) in D und Licht interagiert (s. auch ZF-Protein), deren Aktivität beeinflusst und sie möglicherweise zur Degradation markiert (Bhalerao *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2008; Flores-Perez *et al.*, 2010). Auch SnRKs haben diverse Funktionen als zentrale Regulatoren von Stress-, Kohlenstoff- und Energie-Signalling (Baena-Gonzalez & Sheen, 2008), was dem PRL1-Signalweg wohl noch mehr Komplexität verleiht. Andere *prl1*-Phänotypen waren allerdings nur in Licht zu beobachten, so dass die PRL1-Wirkung möglicherweise ebenfalls lichtabhängig ist, was aber leider keinem bestimmten Photorezeptor zugeordnet werden konnte (Nemeth *et al.*, 1998). Abgesehen von den genannten Licht-, Hormon- und Kohlenhydrat-Antworten ist PRL1 auch in Pflanzen-Pathogen-Abwehr beispielsweise als Mitglied des Multi-Protein-Komplexes MOS4 (*Modifier of snc1, 4*; Palma *et al.* (2007)) involviert. Darüber hinaus wurde kürzlich eine PRL1-Funktion in der Kontrolle der Wurzelmeristem-Größe, der Organisation des ruhenden Zentrums, Stammzell-Differenzierung und Zellteilung evtl. durch räumliche Restriktion der Homeobox-Transkriptionsfaktors WOX5-Expression gezeigt (Ji *et al.*, 2015). PRL1 scheint zudem an der Akkumulation bestimmter miRNAs und siRNAs beteiligt zu sein (Zhang, S *et al.*, 2014). Demnach ist PRL1 entweder ein Konvergenzzentrum für die Integration von Licht-, Zucker-, Hormon- und anderen Antworten, oder es ist für spezialisierte Signal-Funktionen in bestimmten Zellen verantwortlich.

Was PRL1-Funktionen in *Physcomitrella* anbelangt, ist bislang nichts bekannt, allerdings wäre die pleiotrope Regulation von Entwicklungsprozessen durch SnRK-Photoregulation eine Möglichkeit, denn SNF1-Homologe sind auch in *Physcomitrella* vorhanden (Thelander *et al.*, 2004; Thelander *et al.*, 2007). Licht, Zucker und Phytohormone (insbesondere Cytokinin und Auxin) sind zentrale Stimuli für die Entwicklung von Chloro- zu Caulonemata und zur Initiierung von Gametophor-Entwicklung (und letztlich sexueller Fortpflanzung (Thelander *et al.*, 2005; Decker *et al.*, 2006; von Schwartzenberg, 2006; Thelander *et al.*, 2007). SNF1-Kinasen könnten dabei evtl. die Funktion von Energiesensoren übernehmen. Die phy4-PRL1-Interaktion könnte somit eine Verbindung zwischen Phytochrom-/Licht- und Zucker-/Phytohormon-Signaltransduktion in *Physcomitrella* darstellen. Die Physiologie von *Physcomitrella prl1*-Mutanten würde somit interessante Einblicke in die Regulierung dieser Prozesse gewähren.

5.4.4 F-Box-interacting/Kelch-Protein und Kelch-Repeat-Protein / HIP5

Beide im Holo-phy4:BD identifizierten Kelch-Proteine konnten mittels *Y2H*-Wachstums-Assays zumeist als lichtabhängige Holo-phy4 Interaktionspartner verifiziert werden (Abbildung 4-25). Beide Proteine lagen unabhängig von der Position des FP-*Tags* konstitutiv in Kern und Cytoplasma (u. ggf. in Chloroplasten) vor, was prinzipiell eine Interaktion mit phy4 möglich macht (s. Abbildung 4-29 A, Abbildung 4-30 A und 2B im Anhang). Das Kelch-Repeat Protein/HIP5 wurde im Gegensatz zum F-Box-interacting/Kelch-Protein bezüglich seines *in planta* Interaktionsverhaltens untersucht und konnte auch hier als phy4-Interaktionspartner verifiziert werden (s. Abbildung 4-30 B). In den meisten Konformationen entsprach das *Split-YFP*-Lokalisationsmuster des phy4-Kelch-Repeat-Protein-Komplexes den Lokalisationsdaten mit einfachen GFP-Fusionen, allerdings zeigte die Kombination phy4:YFP_C+YFP_N:Kelch-Repeat interessanterweise ausschließlich cytoplasmatische *Split-YFP*-Signale. Dies könnte für eine Funktion des phy4-Kelch-Repeat-Protein-Komplexes in diesem Kompartiment sprechen. *Genevestigator-Microarray*-Daten für Entwicklungsstadien, Anatomie und Perturbationen weisen (im Gegensatz zu eFP- und *Phytozome*-Daten) auf eine Ko-Regulation des Kelch-Repeat-Proteins und phy4 hin.

Für das F-Box-interacting/Kelch-Protein wurde neben einer Galaktose-Oxidase-Kelch/ β -Propeller- auch eine F-Box interagierende Domäne mittels NCBI CCD vorhergesagt. Letztere gehört zu einer mehr als 100 Mitglieder zählenden Domänenfamilie in *Arabidopsis*. Oft findet man die Domäne C-terminal von F-Box-Domänen, die zuerst in Cyclin F identifiziert wurden. Scheinbar stellen die meisten Mitglieder der Proteinfamilie untereinander austauschbare Untereinheiten von SCF (SKP1p-Cdc53p (auch Cullin)-RBX1-F-box)-E3-Ligasekomplexen im Protein-degradationsweg dar. SCF-Komplexe sind die häufigsten pflanzlichen E3-Ubiquitin-Ligasen und sind an diversen Signaltransduktionen beispielsweise im Auxin- oder Cytokinin-Signalling beteiligt, oft indem transkriptionelle Repressoren zum proteolytischen Abbau markiert werden. SCF-Komplexe bestehen aus dem S-Phase-assoziierten Protein 1 (SKP1), Cullin 1, RING-Box 1 (RBX1) und einem F-Box-Protein. F-Box-Proteine dienen dabei als *Linker* zwischen E3-Ligase und einem spezifischen Zielprotein. Die Bindung findet über eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne im F-Box-Protein statt (Patton *et al.*, 1998a; Patton *et al.*, 1998b; Cardozo & Pagano, 2004). SKP1 vermittelt die Verbindung zwischen dem F-Box-Protein und dem *Scaffold*-Protein CUL1, während RBX1 an das E2-Ubiquitin-konjugierende Enzym bindet (Hua & Vierstra, 2011). Im *Arabidopsis* Genom wurden mehr als 700 F-Box-Gene identifiziert, was die Kombinationsmöglichkeiten bei der SCF-Assemblierung enorm erhöht (Gagne *et al.*, 2002). Die wenigsten dieser F-Box-Proteine wurden funktionell charakterisiert, allerdings legen bisherige Daten Funktionen in Hormon-Signalling, circadianer Uhr, Photomorphogenese, Blütenentwicklung, Stressantworten, *etc.* nahe (s. Schumann *et al.* (2011)). Viele F-Box-Proteine besitzen C-terminale Protein-Protein-Interaktions-Domänen, wobei F-Box-Proteine mit Kelch-Domänen die größte Unterfamilie darstellt (Gagne *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2009).

Das Kelch-Motiv besteht aus 50 AS und bildet eine β -Faltblatt-Sekundärstruktur. Mehrere davon können eine β -Propeller-Struktur ausbilden, die häufig an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt ist. Kelch-*Repeats* wurden in α - und β -Scruin (s.u.) und auch in der Galaktose-Oxidase des Pilzes *Dactylium dendroides* identifiziert (Ito *et al.*, 1991; Bork & Doolittle, 1994; Way *et al.*, 1995). In der Oxidase formen vier Wiederholungen ein viersträngiges antiparalleles β -Faltblatt, das die *Repeat*-Einheit in einem *Super-Barrel* darstellt (Ito *et al.*, 1994). Kelch-Repeat-Proteine haben sehr unterschiedliche Funktionen und

kommen in diversen Organismen (und Verbreitungseinheiten), wie Viren, Pflanzen, Pilzen und Tieren vor (Adams *et al.*, 2000). Für manche Pilz-Kelch-*Repeat*-Proteine wurde gezeigt, dass sie mit Mikrotubuli und Aktin-Nukleations-Proteinen an Zellenden interagieren und dabei Zellpolarität etablieren (Mata & Nurse, 1997; Feierbach *et al.*, 2004). Andere sind an polarisiertem Wachstum beteiligt (Takeshita *et al.*, 2008). Dies könnte auf eine ähnliche Funktion der beiden *Physcomitrella* Kelch-Proteine in phy4-vermitteltem vektorem Wachstum hindeuten, da auch in Moosen das (Aktin-) Cytoskelett und insbesondere dessen Umorientierung eine zentrale Rolle bei der Krümmungsantwort spielt (Meske & Hartmann, 1995; Meske *et al.*, 1996). Interessanterweise war unter den Pilz- und *Arabidopsis*-BLASTP-Treffern des Kelch-*Repeat*-Proteins jeweils ein Scruin – ein Aktin-*Crosslinker* – was evtl. ebenfalls auf eine Rolle in Aktin-Cytoskelett-Organisation schließen lassen könnte.

Das F-Box-interacting/Kelch-Protein zeigte Ähnlichkeiten zu *Arabidopsis* F-Box-*only* Protein 13 und zu LEAF CURLING RESPONSIVENESS (LCR) auf. F-Box-*only* Protein 13 ist ein nukleäres Protein mit einer Cyklin-*like* und Skp2-*like* F-Box-Domäne mit Funktion in Ubiquitin-Transfer, also in Proteindegradation. Bei LCR hingegen handelt es sich um ein in allen Entwicklungsstadien exprimiertes SKP1-Cullin/CDC53-F-box-Zielprotein von microRNA394. LCR ist für verschiedene Antworten verantwortlich: zum einen für die Blattmorphologie und -Entwicklung (wie der Name impliziert) was scheinbar in engem Zusammenhang mit Auxin-Verteilung, und Expression von Auxin-responsiven Genen (IAA3, AXR3, IAMT1) steht (Song *et al.*, 2012). Zum anderen reguliert miRNA394 als Signal aus dem Protoderm die Stammzellkompetenz im distalen *Arabidopsis* Sprossapikalmeristem, indem sie LCR reprimiert das folglich zusammen mit Transkriptionsfaktoren wie WUSCHEL zur Pluripotenz-Erhaltung von Zellen und somit zur SAM-Organisation beiträgt (Knauer *et al.*, 2013). Darüber hinaus scheint LCR in Salz-, Trockentoleranz- und ABA-Antworten in *Arabidopsis* und in Frucht- und Samenentwicklung in *Brassica napus* involviert zu sein (Song *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2015). miRNA394-Überexpressoren wiesen weiterhin einen *Late-Flowering*-Phänotyp, vergrößerte Pflanzen und Blattspreiten, Schoten und Samen auf (ebenso wie eine *Antisense*-LCR Linie) während LCR-Überexpressoren entgegengesetzte Phänotypen zeigten (Song *et al.*, 2015). LCR ist somit offenbar an diversen Wachstums-, Entwicklungs-, Hormon- und Stressantworten beteiligt.

Das Kelch-*Repeat*-Protein besitzt scheinbar wie das F-Box-*interacting*/Kelch-Protein vier Wiederholungen des Kelch-Motivs, und gehört ebenfalls zur Galaktose-Oxidase/Kelch- β -Propeller-Superfamilie. In *Physcomitrella* konnten zwei, in *Arabidopsis* viele mögliche Homologe identifiziert werden, wobei letztere lediglich Ähnlichkeiten mit dem Kelch-*Repeat* Bereich des *Physcomitrella* Proteins aufwiesen. Alle in 4.5.2.4 genannten *Arabidopsis*-Treffer des Protein-BLAST sind Chloroplasten- und/oder Kern-lokalisierte F-Box/Kelch (FBK)-Proteine, die mit verschiedenen SKP1-*like* Proteinen interagieren. FBKs sind Pflanzen-spezifische Proteine, deren Familie wohl schon früh in der Evolution eine starke Radiation erfuhr (Sun *et al.*, 2009; Schumann *et al.*, 2011). Das *Arabidopsis*- und das *Physcomitrella* Genom codiert für 100 bzw. 71 F-box/Kelch-*Repeat*-Proteine (Schumann *et al.*, 2011), wovon einige dafür bekannt sind, in Licht-Antworten involviert zu sein: die PAS/LOV-enthaltenden ZEITLUPE, FK1 (FLAVIN-BINDING KELCH-*REPEAT* F-BOX 1), LKP2 (LOV-KELCH PROTEIN 2)-FBKs sind selbst Photorezeptoren und übernehmen Funktionen in der circadianen Uhr und Photomorphogenese (Sawa *et al.*, 2007; Demarsy & Fankhauser, 2009; Takase *et al.*, 2011). AFR (ATTENUATED FAR RED RESPONSE) und CFK1 (COP9 INTERACTING F-BOX KELCH 1) hingegen sind positive Regulatoren in phyA- bzw. phyB-*Signalling* (Wei *et al.*, 1994a; Wei *et al.*, 1994b; Harmon & Kay, 2003; Franciosi *et al.*, 2013). CFK ist an der Regulation der

Hypokotyl-Elongation beteiligt, scheinbar indem es mit dem COP9-Signalosom interagiert, welches als Repressor der Photomorphogenese unterhalb von Phytochromen wirksam ist (Wei *et al.*, 1994a). Während weder in *Physcomitrella* noch in *Selaginella* klare CFK-Homologe existieren (Franciosi *et al.*, 2013), wird COP9 hingegen als ubiquitäres Protein in Eukaryoten angesehen (Wei *et al.*, 1998). BLAST-Suche des *Arabidopsis* COP9-Proteins in *Physcomitrella* ergab in der Tat ein putatives COP9-Protein (Pp1s79113V6.1). AFR weist möglicherweise auch homologe Proteine in *Physcomitrella* auf (evtl. Pp3c2_13250, Pp3c1_22300, Pp3c10_4990 und Pp3c14_4360 mit 29-26% Identität in 72-100% der *Query*-Sequenz). Möglicherweise könnten die beiden (F-Box-interagierenden)-Kelch-Proteine an einem ähnlichen regulatorischen System beteiligt sein. Die meisten F-Box/Kelch-Proteine sind im Zellkern oder, wie das 26S-Proteasom auch, zusätzlich im Cytoplasma lokalisiert (Schumann *et al.*, 2011), was weitgehend mit der Lokalisation der beiden identifizierten *Physcomitrella*-Proteine übereinstimmt.

5.4.5 P-Loop-Protein (PLP) / HIP6

Das im Apo-BD:PHY4-Screen identifizierte P-Loop-Protein konnte als phy4-Interaktionspartner in *Y2H* und auch *in planta* bestätigt werden. Im Gegensatz zu Dr. Mailliets Daten fand die *Y2H*-Interaktion in der *Screening*-Konformation und auch mit dem phy4:BD-*Bait* in starkem und konstitutiven Ausmaß statt. Möglicherweise ist eine ggf. abweichende vorherige Kultivierung der Hefe eine Ursache für diesen Unterschied. Lediglich das C-terminal fusionierte PLP:ADg-*Prey* interagierte lichtabhängig mit phy4:BD aber gar nicht mit BD:phy4 (Abbildung 4-25). Demnach scheint PLP mit seinem C-Terminus mit phy4 zu interagieren, denn als N-terminale AD-Fusion / mit freiem C-Terminus findet mit beiden *Baits* stark konstitutive Interaktion statt. Wenn PLP hingegen C-terminal *getagged* ist, kann es lediglich (lichtabhängig) mit C-terminal *getaggetem* phy4-Pfr interagieren, was möglicherweise für eine Interaktion mit dem phy4 N-Terminus spricht. Die *in planta* Interaktion hingegen schien in allen positiven Konformationen eher konstitutiv v.A. im Cytoplasma stattzufinden, wobei parallele Kombinationen (beide *Tags* an N- oder C-Termini) in Cytoplasma (und schwächer im Kern) interagierten (Abbildung 4-31). Die antiparallele Kombination YFP_C:phy4+PLP:YFP_N interagierte analog zu den *Y2H*-Daten gar nicht, während das phy4:YFP_C+YFP_N:PLP-*Split-YFP*-Signal (analog zu den PLP:GFP-Daten) subzelluläre Strukturen im Cytoplasma aufwies. Dies könnte für spezifische Funktionen des PLP-phy4-Komplexes beispielsweise am ER, Cytoskelett oder auch in der Chloroplasten-Peripherie sprechen. Durch eine Fixierung des Komplexes an intrazellulären Strukturen könnte insbesondere die Perzeption und Signalweiterleitung von polarisierten Lichtreizen ermöglicht werden. So könnte der Komplex evtl. an gezielter Vesikel-Anlieferung zur Exocytose / Membran- und Zellwandbildung für eine gerichtete Wachstumsantwort, an der Cytoskelett-Organisation oder der Phytochrom-gesteuerten Chloroplastenbewegung beteiligt sein. Insbesondere *Genevestigator* Perturbationsexpressionsdaten legen eine gewisse Ko-Regulation von phy4 und PLP unter bestimmten Bedingungen nahe, während dies für die eFP- und *Phytozome*-Datensätze nicht der Fall ist.

Die P-Loop-Domäne ist weit verbreitet und definiert sich über die konservierten Motive GXXXXGK(T/S) und ZZZ(D/E) (sogenannte Walker A- und B-Motive), wobei X und Z für eine beliebige bzw. hydrophobe AS stehen. Das Walker A-Motiv nimmt eine β -Faltblatt-Struktur ein gefolgt von einer Glycin-reichen Schleife und einer α -Helix, um die β - γ -Phosphat-Reste von ATP oder GTP zu koordinieren. Daher rührt der Name „P-Loop“ und somit gehört das P-Loop-Protein (PLP) zu der Superfamilie der P-Loop-enthaltenden Nukleosid-Triphosphat-

Hydrolasen (Walker *et al.*, 1982; Saraste *et al.*, 1990; Milner-White *et al.*, 1991; Ramakrishnan *et al.*, 2002). Das P-Loop-Motiv kommt in der Regel in Nukleotid-bindenden Proteinen, aber auch in ATP-Synthasen, Helikasen oder Kinasen vor (Walker *et al.*, 1982). Daher ist diese große Gruppe in Prozesse involviert, wie Replikation, Transkription, DNA-Reparatur, translationale Signaltransduktion, Proteinlokalisierung und -transport, Signalsequenzerkennung, Membran-Transport, Chromosomen-Aufteilung und Aktivierung von Metaboliten (Saraste *et al.*, 1990; Vetter & Wittinghofer, 1999; Koonin *et al.*, 2000). Abgesehen von den konservierten Motiven und der P-Loop-Struktur, sind die übrigen Sequenzen der verschiedenen P-Loop-Proteine (sogar inkl. des Kerns des P-Loops) extrem divers, was eine phylogenetische und funktionelle Charakterisierung der Proteinfamilie erschwert (Pathak *et al.*, 2014). Bislang wurden nur wenige pflanzliche P-Loop-NTPasen funktionell analysiert. Manche sind wohl an Pathogen-Abwehr und andere an Salztoleranz beteiligt (Fenyk *et al.*, 2012; Cheung *et al.*, 2013).

Die Domänenvorhersage ergab, dass das *Physcomitrella*-Protein eine P-Loop-enthaltende Sulfotransferdomäne am C-Terminus beinhaltet. Pflanzliche Sulfotransferasen (SOTs) sind entweder lösliche oder Transmembran-Proteine, die eine Sulfatgruppe von einem 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfatdonor auf Proteine oder kleinere Substrate wie Glycosaminoglycane, Glucosinolate, Brassinosteroide, Jasmonate, Flavonoide oder Salicylsäure übertragen (Klein & Papenbrock, 2004; Hirschmann *et al.*, 2014). Interessanterweise konnte für die erste identifizierte Pflanzen-SOT die Sulfatierung des Flavonols Quercetin demonstriert werden (Varin & Ibrahim, 1992), das schon im Zusammenhang mit Pirinen diskutiert wurde (s. 5.4.1). Quercetin und dessen Sulfate könnten die Wurzelentwicklung beeinflussen, indem sie den basipetalen Auxin-Transport, Elongationswachstum und Gravitropismus verändern (Faulkner & Rubery, 1992; Lewis *et al.*, 2011). Bislang konnten in *Arabidopsis* 22 SOTs mit unterschiedlichen Sulfotransfer-Domärentypen identifiziert werden. Allerdings wurden erst 10 bzw. 1 dieser SOTs enzymatisch bzw. strukturell charakterisiert. Die Expressionsmuster der *Arabidopsis* SOTs scheinen sehr unterschiedlich zu sein, und hängen von abiotischem und biotischem Stress, Organ- oder Gewebespezifischer Regulation, Entwicklungsstadium oder der circadianen Uhr ab. Beispielsweise zeigt SOT17 eine circadian regulierte Expression mit maximalem mRNA-Level am Ende der Lichtphase (Klein *et al.*, 2006). Die SOT15-Expression ist ebenfalls anhängig von der circadianen Uhr und von PIF4/5 (Yamashino *et al.*, 2013): die stärkste Expression findet am Ende der Nacht in Kurztags-Bedingungen statt, was auch der Phase der stärksten Hypokotyl-Elongation entspricht. SOT18 scheint durch den Phytochrom-regulierten Transkriptionsfaktor HY5 kontrolliert zu werden (Huseby *et al.*, 2013). Verschiedene *Arabidopsis* SOTs werden in diversen Prozessen als funktional betrachtet: Abwehr- und Stressantworten, Regulation von Hormonsynthese oder -aktivität, *Signalling* und Entwicklungs-Regulation – allerdings wurden diese Erkenntnisse oft von *in vitro* Studien abgeleitet (Rouleau *et al.*, 1999; Gidda *et al.*, 2003; Marsolais *et al.*, 2007; Hirschmann *et al.*, 2014). Daher sind die genauen Funktionen der SOTs und der entsprechenden Sulfatierungen / sulfatierten Verbindungen weitgehend unbekannt.

Wenn es sich bei Zielmolekülen der Sulfatgruppen-Übertragung um Proteine handelt, könnte eine mögliche Funktion die posttranslationale Modifikation und eine damit assoziierte Signalwirkung sein. Mutation der einzigen in *Arabidopsis* identifizierten Tyrosyl-Protein-Sulfotransferase (TPST) bewirkt offensichtlich pleiotrope Defekte in verschiedenen Entwicklungsstadien, wie in der Wurzelentwicklung und Erhaltung des Wurzelmeristems (Wurzel-Stammzell-Nische) oder in Kotyledon-/Blatt-Größe und -Pigmentierung, Blüten- und

Schotenanzahl *etc.* (Komori *et al.*, 2009). Der Wurzelapikalmeristem-Phänotyp geht (u. A.) mit gestörter Auxin-Verteilung aufgrund von veränderter PIN- und Auxin-Biosynthese-Genexpression einher (Zhou *et al.*, 2010). Allerdings scheint das *Physcomitrella* Protein den kürzlich identifizierten *Arabidopsis* SOTs 19-21 mit bislang unbekannter Funktion und Substratspezifität am ähnlichsten zu sein (Klein & Papenbrock, 2009; Hirschmann *et al.*, 2014). Da bereits minimale Sequenz-Abweichungen zu bedeutenden Veränderungen der Substratspezifität führen können, kann aktuell keine genaue Funktion für das *Physcomitrella*-Protein abgeleitet werden. Aus diesem Grund können nur enzymatische und Mutations-Analysen Aufschluss über die PLP-Funktion geben.

5.4.6 Ser/Thr-Proteinkinase / HIP7

Die im Holo-phy4:BD-*Screen* identifizierte putative Ser/Thr-Proteinkinase konnte mittels *Y2H* und *Split-YFP* als phy4-Interaktionspartner (in Cytoplasma und Zellkern) verifiziert werden, wobei eine der getesteten *in planta* Interaktionen sogar analog zu den *Y2H*-Daten ebenfalls lichtabhängig war (Abbildung 4-32 B). Durch eine Lichtaktivierung des Photorezeptors könnte evtl. die Kinase-Bindung initiiert werden und möglicherweise führt dies zu einer veränderten Aktivität der Kinase. Protein-Phosphorylierung spielt in den meisten zellulären Prozessen eine wichtige Rolle (Manning *et al.*, 2002). Proteinkinasen vermitteln den reversiblen Transfer des γ -Phosphates von Nukleosid-Triphosphaten (meist ATP) auf einen oder mehrere AS-Reste eines Proteins. Dies zieht eine Änderung der Konformation und ggf. der Funktion des Zielproteins nach sich. Dadurch kann sich ggf. die Enzymaktivität, zelluläre Lokalisation oder Bindung des Zielproteins an andere Proteine/Komponenten ändern. Phosphoprotein-Phosphatasen können diesen Prozess umkehren. Proteinkinasen können abhängig von ihrer Substratspezifität in drei Haupt-Klassen eingeteilt werden: Serin/Threonin-, Tyrosin- und Dual-Spezifitäts-Proteinkinasen (Hanks *et al.*, 1988). Eukaryotische Proteinkinasen gehören zu einer sehr großen Proteinfamilie, die einen konservierten katalytischen Kern besitzen. Die katalytische Domäne weist N-terminal einen Glycin-reichen Bereich in der Nähe eines Lysin-Restes, der an der ATP-Bindung beteiligt ist, auf. In der Mitte der katalytischen Domäne befindet sich ein konservierter Asparaginsäure-Rest, der für die katalytische Aktivität des Enzyms essentiell ist (Knighton *et al.*, 1991). Falls die Enzymaktivität der Ser/Thr-Kinase durch die Phytochrom-Pfr-Bindung verändert wird, würde dies folglich zu einer differentiellen Phosphorylierung von Zielproteinen führen, die das Signal somit an ausführende Organe weiterleiten könnten. Bei der Ser/Thr-Kinase könnte es sich damit um ein *bona fide* Signalprotein im (cytoplasmatischen Phytochrom)-Signalweg handeln, was aber noch durch weitere Analysen belegt werden muss.

Die Suche nach Homologen zeigte, dass es sich bei dem *Physcomitrella*-Gen um ein einzelnes Gen im Genom handelt und enthüllte u. A. Ähnlichkeiten zu der *Arabidopsis* Proteinkinase HIGH LEAF TEMPERATURE 1 (4.5.2.6). HT1 wurde in einem CO₂-Mutanten-*Screen* mittels thermalen *Imagings* identifiziert, wobei *ht1* eine verminderte Stomata-Öffnungs-Antwort auf geringe CO₂-Konzentrationen aufwies. HT1 ist somit an der Regulation der CO₂- (aber eher nicht der B- und ABA-) vermittelten Stomata-Öffnung beteiligt, was auch der stärksten HT1-Expression in Stomata-Schließzellen entspricht (Hashimoto *et al.*, 2006). Obwohl die Stomata-Öffnung ein Phototropin-vermittelter B Effekt ist, kann R ebenfalls die Stomata-Öffnung induzieren. Diese spezifische Antwort ist in *ht1* ebenfalls gestört (Matrosova *et al.*, 2015), könnte zwar weitgehend auch durch photosynthetischen CO₂-Aufbrauch erklärt werden, aber ist vermutlich nicht die alleinige Ursache (Matrosova *et al.*, 2015). Photorezeptor-Einflüsse

können in diesem Zusammenhang nicht ausgeschlossen werden. In der Tat beschleunigten *End-of-Day*-FR-Behandlungen den Stomata-Schluss in *Phaseolus* (Holmes & Klein, 1985). In *Physcomitrella* entwickeln sich Stomata lediglich im Sporophyten, der im Moss-Lebenszyklus einen vergleichsweise geringen Stellenwert hat, denn die eigentliche Moospflanze ist der haploide Gametophyt. Die ABA-Regulationsmechanismen der Stomata sind dabei den höheren Pflanzen sehr ähnlich (Chater *et al.*, 2011), wohingegen Lichteffekte bislang nicht untersucht wurden. Daher ist eine Beteiligung der *Physcomitrella* Ser/Thr-Proteinkinase an ähnlichen Stomata-Regulations-Prozessen nicht ausgeschlossen aber momentan auch nicht experimentell belegbar. Möglicherweise ist die Kinase aber auch an anderen posttranslationalen Phosphorylierungs-Prozessen beteiligt – die PCR-Amplifizierbarkeit aus cDNA aus 6d-altem Gewebe legt nahe, dass die Kinase auch in Protonemata exprimiert wird. Die HT1-Expression in *Arabidopsis* ist laut RT-PCR-Analysen ebenfalls nicht auf Schließzellen beschränkt, sondern konnte auch für Spross, Blüte und sogar Wurzelgewebe nachgewiesen werden. Möglicherweise ist die Stomata-Regulation auch nicht die einzige Funktion von HT1.

5.4.7 TP53-regulierende Kinase

Bei dem im Holo-phy4:BD-Screen gefundenen Pp3c15_20330J1.1-Protein handelt es sich womöglich um eine TP53-regulierenden Kinase, also eine Ser/Thr-Proteinkinase (s. auch 5.4.6). Der Name ist von dem Besten Treffer des *Arabidopsis*-Proteindatenbank-Abgleichs abgeleitet (wurde allerdings jüngst umbenannt in *Protein Kinase Family Protein*). Das *Arabidopsis*-Protein wurde vermutlich aufgrund seiner Ähnlichkeit zu Mammalia-Proteinen so bezeichnet (das *Physcomitrella* Protein weist immerhin 93% *Query Coverage* und 44% Identität zu der *Homo sapiens* TP53-regulating Kinase auf). Experimentelle Untersuchungen bestätigten das Protein als *Y2H*-Interaktionspartner von hauptsächlich C-terminal fusioniertem phy4. *In planta* lag das Protein unabhängig von Belichtung und Position des FP-Tags in Cytoplasma und Kern vor (Abbildung 4-33). Eine Ursache für die Verteilung im Kern könnte das geringe Molekulargewicht des GFP-Fusionsproteins (ca. 26 kDa + 27 kDa Tag) sein, da es kleiner als die Kernporenausschlussgröße ist und sich somit frei in der Zelle bewegen kann (Grebek *et al.*, 1997). GFP:TP53-regulating Kinase schien in D mit subzellulären Strukturen – evtl. mit dem Cytoskelett – assoziiert zu sein, was nach R-Bestrahlung nicht mehr zu beobachten war. Möglicherweise führt die Rotlichtbestrahlung (evtl. vermittelt durch R-induzierte Phytochrom-Pfr-Bindung, s. *Y2H*-Daten) zu einer Dissoziation der Kinase von der sub-cytoplasmatischen Struktur. Die *in planta* Interaktionsstudien, die dies bestätigen könnten stehen bis dato noch aus.

Das *Physcomitrella* Protein weist eine starke Ähnlichkeit zu der *Arabidopsis* TP53-regulierenden Kinase auf (4.5.2.7), die bislang allerdings nicht charakterisiert wurde. TP53 ist der bekannte Tumor-Suppressor/das Tumor Protein (TP) p53, welches in Tieren eine kritische Rolle in zellulären Antworten auf Stress oder DNA-Schäden spielt und somit die Mutation und Entstehung von Tumoren verhindert (in menschlichen Tumoren ist dieses Gen am häufigsten mutiert). p53 übt diese Funktionen aus, indem es DNA-Reparatur-Proteine aktiviert und den Zellzyklus verlangsamt, indem es den G1/S-Übergang verhindert (Bargonetti & Manfredi, 2002). Falls Schäden an der DNA zu gravierend sind, kann p53 auch Apoptose initiieren. Diverse Stressoren (abgesehen von DNA-Beschädigung) können eine p53-Aktivierung herbeiführen, seine Halbwertszeit verlängern und mittels einer Konformationsänderung seine Aktivität als transkriptioneller Regulator initiieren. Die Phosphorylierung des p53 N-Terminus scheint dabei eine kritische Rolle zu spielen und dazu

zu führen, dass eine Ubiquitin-Ligase nicht mehr aber dafür transkriptionelle Ko-Aktivatoren an p53 binden können. Die p53-regulierende Kinase ist somit evtl. eine Kinase, die eine Phosphatgruppe auf eine der vielen p53-Phosphorylierungsstellen übertragen kann. Über das Vorhandensein von TP53-*like* Proteinen in Pflanzen ist allerdings bislang nicht sehr viel bekannt. Immunochemische Experimente mit einem monoklonalen Anti-Mensch-p53-Antikörper und *Zea-* oder *Pisum*-Proteinextrakten ergab Banden verschiedener kreuzreagierender Proteine zwischen 70 u 100 kDa, deren Präsenz und Intensität meist mit DNA-Reparatur / Entwicklungsstadium korrelierte (Georgieva *et al.*, 1993; Klosterman *et al.*, 2000; Onelli *et al.*, 2000). Eine spätere Studie identifizierte die zugehörige mRNA und Proteinsequenz in Gerste, allerdings nicht eines TP53-*like* Proteins, sondern der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase (ein Protein des Citratzyklus; Korthout *et al.* (2002)). Dieses Protein wies ein perfektes 5-AS-abdeckendes Epitop für den Antikörper auf und migrierte (u. A.) sogar wie TP53 bei 53 kDa (daher der Name). Die Autoren schlossen die Existenz eines pflanzlichen TP53-*like* Proteins nicht aus, jedoch postulierten sie, dass es sich bei einem pflanzlichen p53-Homolog wohl eher um ein funktionelles anstelle eines strukturellen Homologes handeln würde, da der Abgleich der p53 DNA-Sequenz mit Nukleotid-Datenbanken erfolglos blieb (Korthout *et al.*, 2002). Scheinbar sind sogar tierische p53-Proteine lediglich im Bereich bestimmter Domänen und nicht auf voller Länge konserviert (Korthout *et al.*, 2002), was evtl. eine Ursache für die negativen BLAST-Suchen darstellen könnte. Erst eine spätere Studie war in der Lage, ein funktionelles p53-Äquivalent in Algen (*Volvox carteri* und *Chlamydomonas reinhardtii*) zu identifizieren (Nedelcu & Michod, 2006). Ein synthetischer Inhibitor der p53-Transaktivierung und p53-abhängiger Apoptose (und unter Inhibitor-Mangel-Bedingungen unschädlicher Hitze-Stress) führte in beiden Algen zu DNA-Fragmentierung, erhöhtem ROS-Level und programmiertem Zelltod (Nedelcu & Michod, 2006). Darüber hinaus konnte ein mögliches Homolog eines p53-induzierten Tumor-Suppressor-Gens in beiden Genomen identifiziert werden: p53-INDUCED GENE (PIG) 8 / ETOPSIDE INDUCED (EI) 24. Das *Chlamydomonas*-Protein lokalisiert möglicherweise wie sein menschliches Homolog (Zhao *et al.*, 2005) in der ER-Membran und besitzt putative p53-Bindestellen in der 5'UTR. Außerdem wird die PIG8/EI24-Expression durch den p53-Inhibitor induziert. Zusammengefasst sprechen diese Evidenzen für die Präsenz eines p53-regulierten Apoptose-Signalwegs in Algen. Inwieweit dies auch für Moose oder höhere Pflanzen zutrifft, ist momentan noch unbekannt, aber nicht ausgeschlossen. Für einen Zusammenhang mit Phytochrom-*Signalling* kann für die putative TP53-regulierende Kinase auf Basis der derzeitigen Wissenslage keine Aussage getroffen werden.

In silico-Domänenanalyse ordnete das Pp3c15_20330J1.1-Protein der Serin/Threonin-Proteinkinase-Bud32-Familie zu und Abgleich der Pp3c15_20330J1.1-AS-Sequenz mit Viridiplantae-Proteindatenbanken deckte neben der Ähnlichkeit zu der putativen TP53-regulierenden Kinase auch Ähnlichkeiten zu einer EKC / KEOPS-Komplex Bud32-*like*-Untereinheit auf (s.u.). Die Bud32-Familie ist von Archaea bis Animalia konserviert und in Hefe hat *bud32* einen langsamen Wachstums- und einen verringerten Zellteilungsrate-Phänotyp (Stocchetto *et al.*, 1997), der durch das Mensch-Homolog partiell gerettet werden konnte (Facchin *et al.*, 2003). Des Weiteren konnten saure Proteine und p53 als Ziel der Bud32-Kinaseaktivität gezeigt werden (Facchin *et al.*, 2002; Peggion *et al.*, 2008). Da die Kinase aber auch in Organismen ohne p53-Homolog konserviert ist (z.B. Hefe oder *Drosophila*, ggf. in Pflanzen, s.o.), scheint sie auch andere Funktionen auszuüben (Rojas-Benitez *et al.*, 2013).

BUD32 gehört in Eukaryota zu dem universell konservierten EKC (Endopeptidase-*like* Kinase Chromatin-associated) / KEOPS (Kinase, Endopeptidase and other Proteins of small Size)-

Komplex (in Hefe bestehend aus der Kinase Bud32, der ATPase Kae1, Cgi121, Pcc1 und dem wahrscheinlich Pilz-spezifischen Gon7), für den u. A. eine Funktion, in Transkriptionsregulation und Telomer-Homeostase vorgeschlagen wurde (Downey *et al.*, 2006; Hecker *et al.*, 2008; Hecker *et al.*, 2009). Der Komplex ist wohl an der transkriptionellen Aktivierung von Pheromon- und Galaktose-responsiven Genen durch Rekrutierung von transkriptionellen Co-Aktivatoren beteiligt (Kisseleva-Romanova *et al.*, 2006). Evtl. könnte die Expression einer pflanzlichen Bud32-ähnlichen Kinase in Hefe auch ein falsch positives Signal im *Y2H-Assay* hervorrufen, denn die HIS3- und ADE2-Reportergene sind unter der Kontrolle des zu rekonstituierenden GAL4-Transkriptionsfaktors, der an GAL1 und GAL2 *Upstream Activating Sequences* bindet. Möglicherweise ist auch in Abwesenheit des funktionalen GAL4-Transkriptionsfaktors aber in Anwesenheit des KEOPS-Komplexes (inkl. einer evtl. misregulierten Kinase) eine Reporterogenaktivierung möglich. Da allerdings mit BD:phy4 eine schwächere Interaktion, als mit phy4:BD zu beobachten war (Abbildung 4-25), erscheint dies unwahrscheinlich.

Abgesehen von DNA-assoziierten Funktionen scheint der EKC/KEOPS-Komplex auch eine Rolle in der Translationsregulation und im tRNA-Metabolismus zu spielen, denn er besitzt t6A (Threonyl-Carbamoyladenosen; kommt in allen tRNAs vor die mit allen ANN Codons paaren) tRNA-Modifikations-Aktivität (El Yacoubi *et al.*, 2011; Srinivasan *et al.*, 2011). Die tRNA-Modifikation ist scheinbar notwendig für die Repression eines transkriptionalen Aktivators (Gcn4) für AS-Biosynthesegene (Daugeron *et al.*, 2011). Die De-Repression wird initiiert, wenn es zu Translations-Initiations-Problemen kommt. Eine andere sehr konservierte KEOPS-Komplex-Untereinheit Kinase-associated Endopeptidase 1 (Kael) scheint durch direkte Bud32-Interaktion die Kinaseaktivität von Bud32 zu unterdrücken und diese somit regulieren zu können (Hecker *et al.*, 2008). Strukturelle Untersuchungen von KaeI deckten die Anwesenheit einer Aktin-ähnlichen ATPase-Domäne und einer Eisenbindestelle auf (Hecker *et al.*, 2007; Mao *et al.*, 2008). Die Kinaseaktivität von BUD32 ist in Hefe interessanterweise über die Regulation der polaren Lokalisation der kortikalen BUD9-Landmarke für die bipolare Knospungsstellen-Selektion und damit für Zellpolarität verantwortlich (Kato *et al.*, 2011). Leider konnte durch Protein- oder Nukleotid-BLAST kein BUD9-Homolog in *Physcomitrella* gefunden werden. Dennoch ist eine Funktion der *Physcomitrella*-Kinase in einem ähnlichen KEOPS-assoziierten regulatorischen System nicht ausgeschlossen. Abgesehen davon, scheint der KEOPS-Komplex nicht in allen Organismen Homologe der gleichen Proteine zu enthalten. Pflanzen-spezifische Untereinheiten könnten folglich auch für Pflanzen-spezifische Funktionen des Komplexes verantwortlich sein.

5.4.8 Ca²⁺-abhängige Proteinkinase (CDPK) / HIP8

Die putative Ca²⁺-abhängige Proteinkinase (CDPK, annotiert als CPK17) aus dem Holo-phy4:BD-Screen konnte in *Y2H* als lichtabhängiger phy4-Interaktionspartner verifiziert werden (Abbildung 4-25). In *Split-YFP*-Analysen zeigte die phy4-CDPK-Interaktion infolge von Rotlichtbestrahlung eine leichte Tendenz von nukleärer und cytoplasmatischer zu eher cytoplasmatischer Lokalisation. Eine Konformation war sogar rein cytoplasmatisch (Abbildung 4-34 B). Im Gegensatz dazu waren Fluoreszenzfusionen unabhängig von Lichtbehandlung und *Tagging* in Cytoplasma und Kern lokalisiert (Abbildung 4-34 A). Das vergleichsweise hohe Molekulargewicht von ca 55 kDa plus 27 kDa Fluoreszenz-Tag überschreitet die Kernausschlussgröße, wodurch ein aktiver Kernimportmechanismus für das Fusionsprotein notwendig wird. Zusammengefasst spricht dies zum einen für eine Beschränkung der CDPK-Lokalisation auf das Cytoplasma infolge von phy4-Bindung und zum anderen für eine

R-induzierte Lokalisationsverschiebung des phy4-CDPK-Komplexes. Diese Indizien sprechen für eine Beteiligung der CDPK an cytoplasmatischem Phytochrom-*Signalling*.

Der eukaryotische *Second Messenger* Ca^{2+} ist in diverse Entwicklungsprozesse und physiologische Antworten auf abiotischen und biotischen Stress involviert (Kudla *et al.*, 2010), wobei Calcium-Kanäle und -transporter primäre Ziele darstellen (Wheeler & Brownlee, 2008). Calcium wird i.d.R. aus den Hauptspeichern wie dem Apoplasten oder Vakuole freigesetzt und erhöht die freie Calcium-Konzentration in räumlich (in der Nähe der Plasma- oder von Organellmembranen) und zeitlich streng begrenzter Art und Weise. Dieses Phänomen wird als Calcium-Signatur bezeichnet. Vor der Entdeckung der Pfr-abhängigen Translokation und Interaktion mit der PIF-Familie der Transkriptionsfaktoren im Zellkern, wurde Ca^{2+} (neben Anderen) als zentrale Komponente in der Phytochrom-Signaltransduktion betrachtet. Es konnte gezeigt werden, dass Ca^{2+} essentielle Rollen in Zusammenhang mit Chloroplasten-Entwicklung und LHC-Expression, mit phyA-/Licht-reprimierter Regulation der Asparagin-Synthase, R-induzierter Stängel-Protoplasten-Schwellung und phyA- und PIF3-vermittelter Regulation der Succinat-Dehydrogenase spielt (Neuhaus *et al.*, 1993; Bowler *et al.*, 1994; Neuhaus *et al.*, 1997; Long & Iino, 2001; Eprintsev *et al.*, 2013). In der Tat gibt es Hinweise, dass Phytochrome Ca^{2+} - und Phosphorylierungssignale mittels CDPKs initiieren können (Datta *et al.*, 1985; Li *et al.*, 1991). Darüber hinaus kann Ca^{2+} -Zugabe zu *Cucumis* Kotyledonen-Extrakten den R/FR-Effekt auf Phosphorylierung imitieren. Die Anwesenheit von mindestens zwei CDPKs konnte nachgewiesen werden, deren Aktivität von Phytochromen moduliert wurde (Vidal *et al.*, 2007).

CDPKs besitzen eine N-terminale variable, eine Proteinkinase-, eine autoinhibitorische Domäne und C-terminale Calmodulin-ähnliche Domänen, die typischerweise aber nicht ausschließlich zwei Paare an EF-Hand-Motiven enthalten (Rutschmann *et al.*, 2002; Christodoulou *et al.*, 2004). Calcium wird somit direkt an CDPKs gebunden (ein Ca^{2+} -Molekül pro EF-Hand), jedoch ist die Calcium-stimulierte Kinaseaktivität unabhängig von Calmodulinen (Roberts & Harmon, 1992). Ca^{2+} -Bindung resultiert in einer Konformationsänderung der Sensor-CDPK und der De-Repression der Kinaseaktivität. Dadurch wird das Signal in eine Phosphorylierung von metabolischen Enzymen, Ionenkanälen und Transkriptionsfaktoren übersetzt und führt damit zu diversen zellulären Antworten (vgl. Hamel *et al.* (2014)). Darüber hinaus kann die Kinaseaktivität über (Auto)phosphorylierung/Dephosphorylierung, Phospholipide (Phosphatidyl-Inositol und Lyso-Phosphatidylcholin) und 14-3-3-Proteine reguliert werden (vgl. Cheng *et al.* (2002)). Interessanterweise wurde im Holo-phy4:BD-Screen ebenfalls ein 14-3-3-Protein identifiziert (s.u.). CDPKs existieren in Pflanzen, Algen und auch manchen unizellulären Protisten, aber abgesehen davon in keinen eukaryotischen Genomen. Die generelle Domänenorganisation scheint dabei konserviert zu sein und sowohl Algen- als auch Pflanzen-CDPKs gruppieren in vier distinkte Kladen (Hamel *et al.*, 2014). Wie in 4.5.2.8 beschrieben, ergab der Vergleich der Pp3c11_25550V1.1-AS-Sequenz mit Viridiplantae Proteindatenbanken viele Proteine mit hoher Ähnlichkeit und ist somit sehr konserviert. Auch in *Physcomitrella* scheinen zwischen 25 und 33 Homologe vorzuliegen (Hamel *et al.* (2014) bzw. eigener BLAST). Man geht davon aus, dass Genduplikation sowohl CDPKs mit redundanten als auch spezifischen Funktionen hervorgebracht hat. Darüber hinaus kann Spezialisierung auch über transkriptionelle oder translationale Regulation, subzelluläre Kompartimentierung, Ca^{2+} -und Lipid-Spezifität und Substraterkennung gewährleistet werden (Cheng *et al.*, 2002).

Das *Arabidopsis*- und *Physcomitrella*-Genom codiert für 34 bzw. 25 CDPK-Proteine (Hamel *et al.*, 2014). Manche *Arabidopsis*-CDPKs sind an Hormon- (Gibberellin, ABA *etc.*) *Signalling*,

Regulation der Stomata-Öffnung, Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus und Stressantworten beteiligt (Mori *et al.*, 2006; Ma & Wu, 2007; Zhu *et al.*, 2007; Geiger *et al.*, 2010; Zou *et al.*, 2010; Brandt *et al.*, 2012). Die dem *Physcomitrella*-Protein sehr ähnliche *Arabidopsis* CPK1 ist in der Tat in ABA-Signalling und Stomata-Regulation involviert und phosphoryliert die Phenylalanin-Ammonium-Lyase, ein Schlüssel-Enzym in der Pathogenabwehr (Cheng *et al.*, 2001; Coca & San Segundo, 2010). Darüber hinaus ist CPK1 an Kältestress-Antworten und Pathogen-Elizitor-induzierter ROS-Produktion und programmiertem Zelltod (PCD) beteiligt (Bohmer & Romeis, 2007; Bulgakov *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2013; Weckwerth *et al.*, 2015). Alle in 4.5.2.8 genannten *Arabidopsis* CDPKs sind Membran-assoziiert (mit CPK2 im ER; (Ellard-Ivey *et al.*, 1999; Cheng *et al.*, 2002). Imaging und Zellfraktionierungsexperimente bestätigten Membran-Assoziation für CPK1, allerdings scheint dieses darüber hinaus in Peroxysomen lokalisiert zu sein (FP-Fusionsanalysen; Dammann *et al.* (2003). Eine solche Lokalisation legt eine Funktion in oxidativem Stress und Lipid-Metabolismus nahe (Dammann *et al.*, 2003). Die *Physcomitrella* CDPK wies keine distinkte Peroxysom-, sondern eher Kern und Cytoplasma-Lokalisation auf, ähnlich dem Signalmuster von *Arabidopsis* CPK3:GFP und CPK4:GFP (Dammann *et al.*, 2003). Folglich ist die *Physcomitrella* CDPK vermutlich an anderen physiologischen Antworten beteiligt. CPK1 wird durch drei 14-3-3-Isoformen (vermutlich an einer 14-3-3-Consensus-Bindestelle am N-Terminus) gebunden und *in vitro* und *in vivo* (in Ca^{2+} -Anwesenheit) aktiviert (Camoni *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 2009) und ist scheinbar in der Lage, 14-3-3-Proteine zu phosphorylieren (Swatek *et al.*, 2014). Zudem wird CPK1 mittels Phospholipiden reguliert (Harper *et al.*, 1993; Binder *et al.*, 1994; Farmer & Choi, 1999).

Arabidopsis CPK17 ist an Ca^{2+} -reguliertem Pollenschlauch-Spitzen-Wachstum beteiligt (Myers *et al.*, 2009). *cpk17* / *cpk35* Doppelmутanten weisen ein reduziertes Pollenschlauch-Spitzenwachstum, schlechte Befruchtungseigenschaften und folglich einen nahezu sterilen Phänotyp auf. Dieser Defekt konnte direkt mit einer Störung des CDPK-Aktivierungsmechanismus in Verbindung gebracht werden. Diese Beobachtungen sind interessant, insbesondere da *Physcomitrella* Protonemata sich ebenfalls mittels Spitzenwachstum ausbreiten und somit viele Ähnlichkeiten zu Pollenschläuchen aufweisen – inklusive eines Spitzen-gerichteten Ca^{2+} -Gradienten (Meske & Hartmann, 1995; Meske *et al.*, 1996). Falls *Arabidopsis* CPK17- und die *Physcomitrella* CDPK ähnliche Funktionen besitzen, könnte sie eine Verbindung zwischen dem mittels Phytochrom wahrgenommenen Lichttrichtungssignal und dem Cytoskelett-vermittelten Spitzenellwachstum herstellen. Hamel *et al.* (2014) klassifizierten die 10 *Arabidopsis*-CDPKs (inkl. CPK17) mit starker Expression in Pollen als CDPKs mit speziellen Funktionen in Reproduktion (im Gegensatz zu eher vegetativen Wachstumsfunktionen), allerdings könnten diese CDPKs ebenso mit Spitzen-Zellwachstum assoziiert sein. CPK17 ist mittels N-Myristoylierung und S-Palmitoylierung (der N-terminalen variablen Domäne) Plasmamembran-lokalisiert. Auch für 27 und 29 der 34 *Arabidopsis* Isoformen wurden Myristoylierungs- bzw. Palmitoylierungs-Stellen in der N-terminalen variablen Domäne vorhergesagt (Dammann *et al.*, 2003). Diese Mechanismen zur Vermittlung von Membran-Assoziation sind zwar in *Physcomitrella* prinzipiell vorhanden, allerdings wahrscheinlich nicht im Fall von Pp.CPK17 (Hamel *et al.* (2014) und Abbildung 4-34 A). Die verschiedenen intrazellulären Lokalisationen von CPK17 und der *Physcomitrella* CDPK implizieren somit auch unterschiedliche physiologische Funktionen. Hinzu kommt, dass eine konsistente Nummerierung von CDPKs unterschiedlicher Organismen schwierig/nahezu unmöglich ist, da bioinformatische Vorhersagen nicht in der Lage sind, klare orthologe Verwandtschaften zwischen höheren und niederen Pflanzen offen zu legen (Hamel *et al.*,

2014). Eine solche Benennung würde sich ausschließlich auf vorhergesagte evolutionäre Zusammenhänge stützen, wobei die physiologischen Funktionen einer spezifischen Gruppe weiterhin unbekannt sind. Daher führt zur Klärung der Frage nach der physiologischen Funktion kein Weg an der experimentellen Untersuchung von CDPKs (in den entsprechenden Organismen) vorbei ist.

Die einzige bislang charakterisierte Moos-CDPK scheint mit Nährstoffmangel assoziiert zu sein (*Funaria*; Mitra and Johri (2000)). Im Lebermoos *Conocephalum conicum* ist eine CDPK wohl an der Entwicklung von Sexualorganen beteiligt (Nishiyama *et al.*, 1999). Eine mit dem kortikalen Aktin-Cytoskelett-assoziierte CDPK in der Alge *Nitella* wurde auch mit der Regulation von Cytoplasma-Strömung in Zusammenhang gebracht (McCurdy & Harmon, 1992). Phytochrom kann ebenfalls die Aktin- und Ca^{2+} -abhängige Cytoplasma-Strömung in *Vallisneria* regulieren (Takagi *et al.*, 2003), was eine sehr schnelle (2,5 s) Phytochrom-regulierte Antwort, die somit nicht durch Transkription/Translation erklärt werden kann, darstellt. Auch in höheren Pflanzen existieren CDPKs, die mit F-Aktin assoziiert sind, was für Zwiebel- / Soja-Wurzelzellen und *Tradescantia* Pollenschläuche demonstriert werden konnte aber vermutlich eine indirekte Interaktion über ein Aktin-bindendes (durch CDPK phosphorylierbares?) Protein darstellt (Putnam-Evans *et al.*, 1989). Manche CDPKs könnten somit an der Regulation des Aktin-Cytoskeletts beteiligt sein. Auch die über Neochrom R- (und B-) regulierte Chloroplastendrehung von *Mougeotia* ist Ca^{2+} -abhängig und möglicherweise ist ein Actomyosin-System das intrazelluläre Ziel des Ca^{2+} -Signals (Wagner & Klein, 1978; Suetsugu *et al.*, 2005). Da das Aktin-Cytoskelett als das ausführende Organ bei der phototropen Krümmungsreaktion von *Physcomitrella*-Protonemata angesehen wird, ist diese Beobachtung besonders interessant und könnte die gesuchte Verbindung zwischen Rezeptor und Cytoskelett herstellen.

Zu diesem Zeitpunkt kann für die *Physcomitrella* CDPK lediglich geschlossen werden, dass sie in *planta* mit phy4 interagiert und dass diese Interaktion vermutlich verstärkt im Cytoplasma stattfindet. Inwieweit die nachgewiesene phy4-CDPK-Interaktion eine Rolle in cytoplasmatischen Antworten auf gerichtete Lichtreize spielt, kann derzeit ohne Mutationsanalysen nicht abgeschätzt werden, aber die zahlreichen Evidenzen der möglichen CDPK-Funktionen in anderen Pflanzen/Algen sind zumindest vielversprechend.

5.4.9 Rhomboid Intramembran-Serinprotease / (HIP9)

Die im Holo-phy4:BD-Screen identifizierte putative Rhomboid-Intramembran-Serinprotease konnte mittels Y2H als putativer, lichtabhängiger phy4-Interaktionspartner verifiziert werden (Abbildung 4-25). Auch wenn das vorhergesagte Molekulargewicht des FP-Fusionsproteins (64 kDa + 27 kDa Tag) die Kernausschlussgröße überschreitet (Grebek *et al.*, 1997), ist zumindest die C-terminale CFP-Fusion in der Lage, im Zellkern zu lokalisieren, während die N-terminale Fusion lediglich im Cytoplasma vorliegt (Abbildung 4-35 A). Durch den N-terminalen Fluoreszenz-Tag wird möglicherweise ein Kernlokalisierungssignal maskiert, und das Protein wird am aktiven Kernimport gehindert. In der Tat konnten mittels NucPred (www.sbc.su.se/~maccallr/nucpred/) zwei NLS-Motive im N-terminalen Bereich vorhergesagt werden. Obwohl auch Transmembran-Domänen vorhergesagt waren, konnte keine deutliche Konzentrierung des Signals in (Plasma)membran-Nähe beobachtet werden (auch wenn CFP:Rhomboid-Protease in D evtl. ein zusätzliches Plasmamembran-Signal aufweisen könnte). Da beide Konformationen (u. A.) im Cytoplasma lokalisierten, ist eine zusätzliche Plasmamembran-Lokalisation nicht ausgeschlossen. In *planta*-Interaktionsstudien wiesen in Einzelfällen aber auf eine Lokalisation des phy4-Rhomboid-Protease-Komplexes an der

Plasmamembran (und im Zellkern) hin, allerdings war das YFP-Signal in der Regel (in Einklang mit Lokalisationsdaten) in Cytoplasma und Zellkern zu beobachten (phy4:YFP_N+ Rhomboid-Protease:YFP_C – wobei die Protease auch hier C-terminal fusioniert ist; Abbildung 4-35 B). Beide Signalmuster waren lediglich nach R-Vorbehandlung zu beobachten, was auf eine Pfr-abhängige Interaktion von phy4 mit der Protease hinweist (den *Y2H*-Daten entsprechend).

Rhomboid-Domänen Proteasen sind ubiquitäre Proteine und wurden zuerst in *Drosophila* beschrieben. Dort und im Menschen fördern sie die Spaltung und Freisetzung des aktivierten Membran-verankerten TGF-Alpha-ähnlichen Wachstumsfaktor Spitz und fungieren somit als Intramembran-Serinproteasen (Urban *et al.*, 2001). Dieser Vorgang wird als *Regulated Intramembrane Proteolysis* (RIP) bezeichnet und spielt scheinbar eine wichtige Rolle in Signaltransduktions-Wegen. Die Signalfunktion scheint in Prokaryoten und Eukaryoten konserviert zu sein (Koonin *et al.*, 2003; Urban & Wolfe, 2005). Den Kristallstrukturdaten zufolge, besitzen Rhomboid-ähnliche Proteine (RBL Proteine) sieben Transmembran-Domänen, die eine konische Aussparung bilden und der wässrigen Umgebung einen Zugang ermöglichen. Somit kann eine Peptidbindung innerhalb einer Transmembran-Helix mit Hilfe von Serin- und Histidin-Resten, die eine katalytische Dyade bilden, gespalten werden (Kanaoka *et al.*, 2005; Baker *et al.*, 2007; Ben-Shem *et al.*, 2007). Die Phospholipid-Umgebung könnte einen Einfluss auf die RBL-Aktivität haben und somit einen Regulationsmechanismus darstellen (Urban & Wolfe, 2005).

Das *Arabidopsis* und *Physcomitrella* Genom enthält 17 bzw. 16 RBL-Gene (Li *et al.*, 2015). Von den *Arabidopsis* Proteinen, werden vier aufgrund ihrer schwach konservierten aktiven Zentren als inaktiv angesehen, oder haben andere katalytische Funktionen (Lemberg & Freeman, 2007; Knopf & Adam, 2012). Das dem *Physcomitrella*-Protein ähnlichste *Arabidopsis*-Protein AT5G38510 ist laut TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*, www.Arabidopsis.org) ein integrales Protein in der Chloroplasten- oder Plasmamembran und wird auch zu den vier „inaktiven“ RBLs gezählt (Lemberg & Freeman, 2007). AT5G38510 fehlen beide konservierten AS der katalytischen Dyade, aber dafür weist es immerhin das Glycin im GxSx Rhomboid-Protease-Motiv auf, was evtl. ein alternatives aktives Zentrum darstellt (Lemberg & Freeman, 2007). Die Substrate und Funktionen dieser Gruppe sind bislang unbekannt. *Arabidopsis* RBL1 und 2 sind im Golgi-Apparat lokalisiert, was eine Rolle im sekretorischen Weg nahelegt (Kanaoka *et al.*, 2005). Andere RBL-Proteine liegen in Mitochondrien, Plastiden, evtl. im ER oder an der Plasmamembran vor, sodass verschiedene RBLs wohl unterschiedliche zelluläre Funktionen erfüllen (Kmieć-Wisniewska *et al.*, 2008; Knopf *et al.*, 2012; Thompson *et al.*, 2012). *Arabidopsis* RBL2 kann zwar den *Drosophila* Wachstumsfaktor Spitz spalten, da in *Arabidopsis* und Reis allerdings alle *Epidermal-Growth-Factor*-Komponenten abwesend sind, muss es in Pflanzen andere Zielproteine für Rhomboid-Serinproteasen geben (Kanaoka *et al.*, 2005). Unter Anderen stellen Transkriptionsfaktoren mögliche Kandidaten für Zielproteine dar. Etwa 10% der *Arabidopsis* Transkriptionsfaktoren benötigen Freisetzung von Membranen, um ihre transkriptionsregulatorische Funktion zu entfalten (Kim & Park, 2007; Seo *et al.*, 2008). Es konnte gezeigt werden, dass Pflanzen-RBLs Rollen in Ca²⁺-vermittelten Stressantworten, Fertilität und Blütenentwicklung, struktureller und funktioneller Erhaltung von Chloroplasten- und Mitochondrium-Integrität und in mitochondrialem retrograden *Signalling* spielen (Aguilar-Hernandez *et al.*, 2011; Thompson *et al.*, 2012; Jeyaraju *et al.*, 2013; Ng *et al.*, 2013). Ob das identifizierte *Physcomitrella* Protein wirklich ein integrales Membranprotein mit schaltbarer Protease-Aktivität ist, ist auf Basis der beschriebenen Evidenzen fraglich. Insbesondere weisen die Lokalisationsdaten eher auf eine höchstens schwache Membran-Lokalisation hin. Eine Zelle wies im *Split-YFP* u. A. eine

Membran-Lokalisation des phy4-Rhomboid-Komplexes auf, was mit der Plasmamembran-Lokalisation des phy4-phot-Komplexes (Jaedicke *et al.*, 2012) korrelieren würde. Ohne weitere Untersuchungen bleibt die Involvierung von dem *Physcomitrella* RBL-Protein lediglich eine Möglichkeit.

5.4.10 Rhodopsin-*Tail*-Protein

Das Rhodopsin-*Tail*-Protein aus dem Holo-phy4:BD-*Screen* wurde zumindest in einer *Y2H*-Konformation als lichtabhängiger phy4-Interaktionspartner bestätigt (Abbildung 4-25). Lokalisationsstudien wurden nicht durchgeführt, jedoch sagen Lokalisations-Vorhersage-Tools eine nukleäre (PlantmPLOC), mitochondriale (TargetP) oder extrazelluläre (WoLFPSORT) Lokalisation voraus (s. Tabelle 1 im Anhang). Das sehr kleine *Physcomitrella* Protein weist eher geringfügigere Ähnlichkeiten zu anderen Pflanzenproteinen einschließlich des einen möglichen *Physcomitrella* Homologes auf (s. Anhang 1.7.12), von denen der Löwenanteil bislang nicht charakterisiert wurde. Der beste *Arabidopsis*-Treffer war AT2G41420/WINDHOSE 2 (WIH2; s. 4.5.2). was ein WUSCHEL-reguliertes integrales Membranprotein/-peptid ist, welches in Megasporogenese/Entwicklung der Samenanlage involviert ist (Lieber *et al.* (2011) PMID 21658947). Der Abgleich mit Proteindatenbanken aller Organismen ergab darüber hinaus als besten Treffer (mit 73% Abdeckung und 67% Identität) ein *Pichia pastoris* Protein welches in die positive Regulation der 1,3- β -Glukan-Synthese und den G-Protein-Rho1-assoziierten Pkc1p (ein Homolog der Mensch-Proteinkinase C)-MAPK (*Mitogen-activated Protein Kinase Cascade*)-Signalweg involviert ist. Darüber hinaus wurden aber auch einige Rhodopsine z.B. in *Cranchia scabra* oder *Octopoteuthis nielsenii* (beides Cephalopoden / Mollusken) als ähnliche Proteine identifiziert. Dies spiegelt auch die Vorhersage von zwei Rhodopsin-*Tail*-Domänen (bekannt vom C-Terminus von Mollusken-Rhodopsinen) in der Mitte der AS-Sequenz des *Physcomitrella* Proteins wider. (Vorhergesagte) Transmembran-Domänen am C-Terminus vermitteln womöglich eine Plasmamembran-Lokalisation des Rhodopsin-*Tail*-Proteins. Da die intrazelluläre Lokalisation (noch) nicht untersucht wurde, kann dies nicht experimentell bestätigt werden.

Rhodopsine sind visuelle Pigmente, die aus einem Membran-gebundenen Opsin-Apoprotein mit 7 Transmembran-Helices und einem 11-Cis-Retinal-Chromophor (in der 7. Transmembran-Domäne) bestehen und zu der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören (Fryxell & Meyerowitz, 1991). Licht-Absorption führt zu einer Isomerisierung des Chromophors zu All-Trans-Retinal, zu einer Konformationsänderung des Proteins und zur Bindung eines G-Proteins (welches in Invertebraten/Cephalopoden dann die Phosphatidylinositol-Phospholipase(n) C aktiviert; Mitchell *et al.* (1995). Mollusken-Rhodopsine weisen eine strukturelle Besonderheit, nämlich einen intrazellulären *Tail* mit repetitiven Gln/Pro-reichen Motiven auf. Der untypische C-Terminus kann in 2 Bereiche unterteilt werden: eine negative geladene Region (deren Ladungsverteilung an Ca^{2+} -Bindestellen erinnert) und eine Prolin-reiche Region (Hall *et al.*, 1991). Die geladene Region besteht aus einigen Ser-/Thr-reichen Abschnitten, die zumindest in Vertebraten- und Insekten-Rhodopsinen lichtabhängig von der Rhodopsin-Kinase phosphoryliert werden. Die Prolin-reiche Region besteht aus *Tandem Repeats* mit einer Pro-Pro-Gln-Gly-Tyr-Konsensus-Sequenz, die auch in *Octopus*-Rhodopsin und anderen Membran-assoziierten Proteinen (z.B. in synaptischen Vesikel-Proteinen oder in einem *Dictyostelium* Aktin-Bindeprotein), identifiziert wurde (Hall *et al.*, 1991). Die Funktion des verlängerten C-terminalen Bereiches ist bislang unbekannt aber man vermutet, dass er an der Fixierung des Proteins in der Membran und / oder dem Vermitteln eines hohen Maßes an Ordnung z.B. in Mikrovilli (hexagonale

Membran-Anordnungen in Invertebraten-Retinas) der Rezeptoren beteiligt ist (Goldsmith, 1975; Saibil & Hewat, 1987; Hall *et al.*, 1991). Die Stabilisierung der Rezeptor-Moleküle in der Membran würde die Brownsche Rotation / laterale Diffusion beschränken und eine bevorzugte Orientierung der Photorezeptoren bewirken. Dies ist eine Voraussetzung für die Perzeption von linear polarisiertem Licht – eine interessante Parallele zum phy4-vermittelten Polarotropismus. Es gibt darüber hinaus Hinweise auf eine Licht-abhängige reversible Veränderung (Ablösung von der Membran) des axialen Aktin-Cytoskeletts (Tsukita *et al.*, 1988) in Mollusken-Mikrovilli, was bei der Beugungsreaktion von Moos-Protonemata ebenfalls nachgewiesen werden konnte (Meske & Hartmann, 1995; Meske *et al.*, 1996). Leider konnte das *Physcomitrella* Rhodopsin-*Tail*-Protein nicht *in planta* als phy4-Interaktionspartner bestätigt werden (s. 5.4; nicht gezeigt), allerdings wurde (entsprechend der *Y2H*-Daten) lediglich eine *Split-YFP*-Konformation untersucht. Möglicherweise wäre es lohnenswert, weitere Konformationen zu betrachten, denn die oben beschriebenen putativen Funktionen des Rhodopsin-*Tails* würden die Anforderungen des cytoplasmatischen Phytochrom-*Signallings* zur Perzeption und Transduktion von Lichtrichtung und -polarisation in besonderem Maß erfüllen.

5.4.11 Ankyrin- & BTB/POZ-Protein / (HIP10)

Bei dem im Holo-phy4:BD-*Screen* identifizierten Ankyrin- & BTB/POZ-Protein scheint es sich um ein *Physcomitrella*-spezifisches Protein zu handeln, denn Abgleiche der AS-Sequenz mit Viridiplantae-Proteinen ergab lediglich ein weiteres *Physcomitrella*-Protein, welches (mit Lücken) nahezu auf voller *Query*-Länge *alignte* (Pp3c7_8840V1.1). Andere Viridiplantae-Proteine wiesen entweder Ähnlichkeiten zu der Ankyrin- oder der BTB/POZ-Domäne aber nicht zu beiden auf. *Y2H*-Studien bestätigten das Protein (abhängig von der Konformation) als konstitutiven oder R-induzierten phy4-Interaktionspartner (Abbildung 4-25). *In planta* Lokalisationsuntersuchungen zeigten cytoplasmatische (CFP:Ankyrin- & BTB/POZ) oder cytoplasmatische und nukleäre Lokalisation (Ankyrin- & BTB/POZ:CFP; Abb. 8 A im Anhang). Möglicherweise ist eine Dimerisierung über die C-terminale BTB/POZ-Domäne (s.u.) die Ursache für die cytoplasmatische Lokalisation von CFP:Ankyrin- & BTB/POZ, denn als Dimer würde die Kernporen-Ausschlussgröße definitiv überschritten (Grebekov *et al.*, 1997). Der C-terminale CFP-*Tag* hingegen könnte eine erfolgreiche Dimerisierung verhindern und somit eine passive Diffusion eines Monomers in den Zellkern ermöglichen. Ein Aktiver Transport von Monomeren in den Zellkern erscheint dahingegen unwahrscheinlicher, da keine klassischen NES- und NLS-Sequenzen vorhergesagt werden konnten (s. 4.5.2). Leider konnten *Split-YFP*-Analysen das Ankyrin- & BTB/POZ-Protein nicht als phy4-Interaktionspartner *in planta* bestätigen. Möglicherweise handelt es sich bei dem Ankyrin- & BTB/POZ-Protein um einen falsch positiven *Y2H*-Kandidaten (trotz lichtabhängiger *Y2H*-Interaktion, s.o.), oder es interagiert zu schwach / indirekt mit phy4, um ein sichtbares YFP-Signal zu erzeugen (eine indirekte Interaktion würde allerdings nicht die *Y2H*-Daten erklären). Eine temporäre Interaktion hingegen sollte sich im *Split-YFP* stabilisieren und zu einem akkumulierten YFP-Signal führen, denn sind die YFP einmal assembliert, trennen sie sich nicht wieder, auch wenn die Interaktion der fusionierten Hybrid-Proteine nachlassen sollte. Möglicherweise könnte eine weitere Methode zum Protein-Protein-Interaktionsnachweis, wie zum Beispiel Co-IP eine phy4-Ankyrin&BTB/POZ-Interaktion bestätigen. Daher und aufgrund seiner interessanten cytoplasmatischen Lokalisation (z.T. in distinkten cytoplasmatischen Bereichen) soll das Ankyrin- & BTB/POZ-Protein dennoch in die Diskussion eingeschlossen werden.

Ankyrin-Motive sind verantwortlich für Protein-Protein-Interaktionen und sind generell in Transkriptionsregulation, Cytoskelett-Organisation, Modulation der Zellzyklus-Progression oder Zelldifferenzierung involviert (Mosavi *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006). Interessanterweise können Ankyrin-Proteine auch Verbindung zwischen integralen Membranproteinen und dem Spektrin-basierten Cytoskelett herstellen (im Mensch, Rubtsov and Lopina (2000). Spektrine werden als Plattform für die Stabilisierung und Regulation von Kanälen, Transportern und Rezeptoren betrachtet, indem sie eine Hauptkomponente des Membran-Skeletts bilden (Zusammengefasst in Machnicka *et al.* (2014)). Für ein Spektrin-ähnliches Protein in *Chara* konnte ein dichtes Aktin-Filament-Netz, Spektrin-ähnliche Epitope in der apikalen Kuppe und sogar eine Rolle in (gravitropem) Spitzenzellwachstum von Rhizoiden und Protonemata gezeigt werden (Braun, 2001; Braun *et al.*, 2004; Braun & Limbach, 2006). Eventuell könnte das Ankyrin- & BTB/POZ-Protein die Fixierung des phy-phot-Komplexes an der Plasmamembran vermitteln. Leider konnten *Split-YFP*-Analysen dies nicht bestätigen (Anhang Abbildung 8B). Die Lokalisationsdaten von CFP:Ankyrin-&BTB/POZ in distinkten cytoplasmatischen Bereichen vor Allem in der Zellperipherie (Anhang Abbildung 8A) könnten dennoch auf eine Spektrin-assoziierte Lokalisation und Funktion (möglicherweise unabhängig von einer (direkten) phy4-Interaktion) hinweisen. Da hier allerdings lediglich YFP_C:Ankyrin-&BTB/POZ-Fusionen im *Split-YFP* mit N- und C-terminalen phy4-Fusionen untersucht wurden, könnte der N-terminale *Tag* eine Interaktion mit Phytochrom verhindern, so dass es evtl. lohnenswert sein könnte, C-terminale Ankyrin&BTB/POZ-Fusionen zu betrachten. Darüber hinaus wurde für das nukleäre und cytoplasmatische *Arabidopsis*-Ankyrin-Repeat-Protein PIA2 (*Phytochrome-interacting Ankyrin-Repeat Protein 2*) gezeigt, dass es *ex vivo* mit Hafer-phyA interagiert, phyA-abhängig phosphoryliert wird und somit evtl. die Anthocyanin-Biosynthese in Keimlingen in FR positiv reguliert (Yoo *et al.*, 2011). Da PIA2 keine Präferenz für Pr/Pfr aufwies, kategorisierten die Autoren PIA2 als strukturelle Komponente (möglicherweise zur Stabilisierung) des Phytochrom-Komplexes anstelle einer Signalkomponente. PIA2-Phosphorylierung führt nicht zu dessen Degradation, sondern wirkt sich vermutlich auf das phyA-Interaktionsverhalten mit anderen Proteinen aus (Yoo *et al.*, 2011). Eine aktuelle Arbeit derselben Arbeitsgruppe konnte jüngst zeigen, dass PIA2 mit PIF3 interagiert und dadurch scheinbar in der Tat die phyA-abhängige PIF3-Phosphorylierung unterdrückt (Yoo *et al.*, 2016).

BTB/POZ-Domänen vermitteln i.d.R. Dimerisierung (Bardwell & Treisman, 1994; Zollman *et al.*, 1994; Ahmad, KF *et al.*, 1998; Stogios *et al.*, 2005) und BTB-Proteine können als Adapter-Proteine zwischen Cullin3-basierten Ubiquitin-Ligasen und Ziel-Transkriptionsfaktoren oder EF1 α A1 im Proteindegradationsweg dienen (Ha *et al.*, 2004; Roberts *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2015). Interessanterweise wurde im Apo-BD:PHY4-Screen auch EF1 α identifiziert (s. 5.4.16). Pflanzen-BTB/POZ-Proteine können Funktionen in Metabolismus, Blühinduktions-Kontrolle, Abwehr-Reaktionen, Hormon-Signalling und Blattentwicklung haben (Aulakh *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015). Auch die Phototropismus-assoziierten Proteine ROOT PHOTOTROPISM2 (RPT2) und NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTYL3 (NPH3, auch eine E3-Ubiquitin-Ligase, Roberts *et al.* (2011)) besitzen BTB/POZ-Domänen (Albagli *et al.*, 1995; Aravind & Koonin, 1999; Sakai *et al.*, 2000). Beide Proteine können mit phot1 (und NPH3 auch mit phot2) und miteinander interagieren (Motchoulski & Liscum, 1999; Inada *et al.*, 2004; Lariguet *et al.*, 2006). Daher wäre eine Untersuchung einer putativen Interaktion des Ankyrin-&BTB/POZ-Proteins mit den vier *Physcomitrella*-Phototropinen interessant.

5.4.12 Autophagie-Protein

Das im Holo-phy4:BD-*Screen* identifizierte Autophagie-Protein konnte mittels *Y2H-Interaktions-Assays* zumindest in einer Konformation als lichtabhängiger (BD:)phy4-Interaktionspartner bestätigt werden. Lokalisationsstudien wurden für diesen Kandidaten nicht durchgeführt, jedoch ist er laut verschiedener Lokalisationsvorhersagen im Cytoplasma lokalisiert (s. Tabelle 1 im Anhang). *Split-YFP*-Studien mit einer einzelnen Konformation (entsprechend der *Y2H*-Daten) konnten keine *in planta*-Interaktion mit phy4 nachweisen (nicht gezeigt, s. 4.5.2). Möglicherweise könnte die Betrachtung weiterer Konformationen lohnenswert sein.

Das *Physcomitrella*-Protein weist eine *Autophagy Protein Atg8 Ubiquitin-like*-Domäne auf (woraus sich der gewählte Name ableitet). Autophagie ist die Bezeichnung für den Eukaryoten-spezifischen Prozess der Degradation von einer großen Menge an cytoplasmatischen Komponenten (inkl. Proteine und Organellen), die in ein Autophagosom abgesondert werden. Makroautophagie kann sowohl selektiv unter *Housekeeping*- als auch unter Stressbedingungen stattfinden (Reggiori & Klionsky, 2013). Im Autophagosom werden die Komponenten in Doppelmembran-Vesikel gehüllt und zu Organellen gebracht, wo die Degradation stattfindet (z.B. Lysosom / Vakuole; Boya *et al.* (2013)) um die resultierenden Makromoleküle zu *recyceln* und wieder für den Metabolismus zugänglich zu machen.

Autophagie-*related* 8 Proteine (Atg8s) sind eine der 62 hoch konservierten Eukaryoten-spezifischen Protein-Familien. Hefen und andere Pilze besitzen ein, während mehrzellige Tiere und Pflanzen mehrere Gene besitzen können (Shpilka *et al.*, 2011). Das strukturell dem Ubiquitin ähnliche Hefeprotein Atg8 ist am Autophagosom beteiligt. Atg8 Proteine besitzen zwei N-terminale α -Helices und einen C-terminalen Ubiquitin-Kern. Letzterer besteht aus einem 4-strängigen β -Faltblatt, wobei zwischen $\beta 2$ und $\beta 3$ und zwischen $\beta 3$ und $\beta 4$ jeweils eine α -Helix vorliegt (Noda *et al.*, 2009). Dieser basische Bereich ist vermutlich für Protein-Protein-Interaktionen (ggf. mit Konjugations-Maschinerie Proteinen) verantwortlich. Der N-Terminus ist weniger konserviert und vermittelt somit wahrscheinlich spezifische Interaktionen und Funktionen unterschiedlicher Atg8-Proteine und/oder stellt ein Ziel posttranslationaler Modifikationen dar (Shpilka *et al.*, 2011). Atg8 wird (in Hefe) posttranslational am C-Terminus geschnitten und exponiert einen Glycin-Rest. Diese Modifikation wird von der Atg8-spezifischen Cystein-Protease Atg4 vermittelt (Kirisako *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001) und Atg8 wird infolge dessen durch eine Ubiquitin-ähnliche Konjugations-Maschinerie (Atg7~E1 und Atg3~E2) prozessiert (Schlumpberger *et al.*, 1997; Tanida *et al.*, 1999) und mit dem Glycin-Rest kovalent an ein Phosphatidylethanolamin-Lipid (also an eine Membran) konjugiert (Ichimura *et al.*, 2000). Dieses Glycin ist auch in *Arabidopsis* Atg8 konserviert. Diese Protein-Lipidierung (mittels Atg5/Atg12~E3, Hanada *et al.* (2007)) hat eine essentielle Bedeutung für die Membran-Dynamik während der Autophagie. Atg8 hat eine Schlüsselrolle in Autophagie bestehend aus *Cargo*-Rekrutierung und Cytoplasma-zu-Vakuole-*Targeting* indem es (mit seinem N-Terminus) an die Rezeptoren Atg19 und Atg34 bindet (Lynch-Day & Klionsky, 2010; Suzuki *et al.*, 2010; Weidberg *et al.*, 2011). Außerdem ist Atg8 an der Autophagosom-Biogenese beteiligt und ist essentiell für die Elongation der autophagen Membran (Abeliovich *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2008).

In höheren Pflanzen haben sich Atg8-Gene diversifiziert, insgesamt besitzt *Arabidopsis* neun solcher Gene, die in drei *Cluster* gruppiert werden können. Die Gene unterscheiden sich in ihrer zeitlichen und räumlichen Expression in unterschiedlichen Geweben (Slavikova *et al.*, 168

2005). Das *Physcomitrella*-Protein besitzt scheinbar 5 Homologe in *Physcomitrella* und ist außerdem allen *Arabidopsis* Atg8-Proteinen sehr ähnlich (s. 4.5.2, Tabelle 6-1 und Anhang 1.7.14). *Arabidopsis* ATG8 und ATG4 sind sogar insofern funktionell konserviert als dass sie den Hefephänotyp der entsprechenden Doppelmutante partiell kompensieren können (Ketelaar *et al.*, 2004). Eine Lokalisation in Autophagosom-ähnlichen Strukturen im Cytosol und der Vakuole konnte auch für ein *Arabidopsis* Atg8-Protein sowohl unter günstigen Bedingungen, als auch unter Mangel- / Stressbedingungen nachgewiesen werden (Slavikova *et al.*, 2005). In Pflanzen scheint Autophagie diverse Rollen in AS-Recycling unter Stress- und Mangelbedingungen und dem Entfernen beschädigter Proteine unter oxidativen und osmotischen Stressbedingungen zu übernehmen (Doelling *et al.*, 2002; Xiong *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009). Außerdem werden Stärkepartikel und Organellen wie Chloroplasten, Mitochondrien und Peroxisomen degradiert und Autophagie ist auch an Zelltod / Seneszenz und Immunantworten beteiligt (u. A. Shibata *et al.* (2013), Wang and Liu (2013), Wada *et al.* (2009), Liu *et al.* (2005)). Dies hat Auswirkungen auf Prozesse wie Keimlings-Etablierung, Entwicklung, Metabolismus, Stressresistenz und Reproduktion (rezensiert in Michaeli *et al.* (2016)). In *Physcomitrella* zeigten *atg5*-KO-Pflanzen (wie in *Arabidopsis* und Hefe) einen gestörten Autophagie- / *Early-Senescence*-Phänotyp, so dass dieser Prozess auch im Moos eine physiologische Rolle wenigstens unter Kohlenstoff- oder Stickstoff-Mangelbedingungen oder in Dunkelheit zu spielen scheint (Mukae *et al.*, 2015). Scheinbar führt die *atg5* Mutation (durch gestörte Protein-Lipidierung von Atg8, s.o.) durch die gestörte cytoplasmatische Degradation zu einer vorzeitigen Erschöpfung bestimmter Aminosäuren (aber nicht von Zuckern) *etc.* In anderen Pflanzen zeigen *atg*-Einzel und Doppel-Mutanten ebenfalls Hypersensitivität gegenüber Kohlenstoff- und Stickstoffmangel. Dies manifestiert sich in nächtlicher Stärkeakkumulation, gestörter nächtlicher Versorgung mit Aminosäuren und verändertem Lipid-Metabolismus, was unter ungestörten Autophagie-Bedingungen unter Kohlenstoffmangel eine Erschließung alternativer Energie-/ Kohlenstoffquellen (Proteine bzw. freier Aminosäuren und Lipide) darstellt (zusammengefasst in Michaeli *et al.* (2016)). Autophagie hat somit einen Einfluss auf die Kohlenstoff-Verfügbarkeit. Als mögliche Pflanzen-spezifische Atg8-*Cargo*-Rezeptoren wurden die *Arabidopsis* ATG8 INTERACTING 1 und 2 (ATI1 und ATI2) Proteine identifiziert, die über Transmembran-Domänen und AIMs (*ATG8-interacting Motif*) verfügen (Honig *et al.*, 2012). ATI1 und ATI2 sind in der ER-Membran (und ATI1 auch an/in Plastiden) lokalisiert und relokalisieren infolge von Kohlenstoffmangel vom ER aus in runde Strukturen (*ATI-Bodies*), die möglicherweise eine Rolle in ER-zu-Vakuole-*Trafficking* und evtl. selektiver ABA-Degradation / Degradation von ABA-assoziierten Proteinen spielen (Li & Vierstra, 2012; Michaeli *et al.*, 2014). Seneszenz-induzierte API-Plastid-associated *Bodies* fungieren möglicherweise in selektivem Transport von Plastid-Proteinen zur Vakuole (Ishida & Yoshimoto, 2008; Michaeli *et al.*, 2014). Ein weiterer Kandidat für einen *Cargo*-Rezeptor stellt das Häm-Bindeprotein TSPO (TRYPTOPHAN-RICH SENSORY PROTEIN), dar, welches durch Atg8-Interaktion die Autophagie-vermittelte Degradation von Porphyrinen vermittelt (Vanhee *et al.*, 2011). TSPO interagiert mit dem Aquaporin PIP2;7 (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 2;7) und vermittelt dessen Transport von der Plasmamembran zur Vakuole (und beeinflusst somit die Wasserpermeabilität der Membran; Hachez *et al.* (2014). Rein hypothetisch könnte in ähnlicher Weise auch der Phytochrom-Chromophor degradiert werden und evtl. zur Desensibilisierung des Rezeptors führen, wodurch allerdings nicht die Perzeption von Richtungssignalen und daraus resultierende zelluläre Antworten erklärt werden können.

Ursprünglich wurde Atg8 mit Membran-*Trafficking*-Prozessen und insbesondere der SNARE-Fusionsmaschinerie, welche den Großteil intrazellulärer *Trafficking*-Prozesse vermittelt, in Verbindung gebracht (Elazar *et al.*, 2003). Auch diverse Pflanzenstudien weisen auf eine Verbindung zwischen Autophagie und anderen *Trafficking*-Prozessen in der Zelle hin. Der EXOCYST-Proteinkomplex z.B. vermittelt *Targeting* und Fusion von Golgi-Vesikeln mit der Plasmamembran (Heider & Munson, 2012) aber auch Stickstoffmangel-induzierte Autophagie in *Arabidopsis* (Kulich *et al.*, 2013). Das Vorhandensein von AIMs in allen *Arabidopsis* EXOCYST COMPLEX COMPONENT EXO70-Homologen könnte auf eine Interaktion mit Atg8 hinweisen (Tzfadia & Galili, 2013). *Physcomitrella*-Homologe weisen ebenfalls AIM-Motive auf (Cvrckova & Zarsky, 2013). Falls das identifizierte *Physcomitrella* Protein ähnlich breit gefächerte Funktionen besitzt, und die verifizierte (Y2H)-Interaktion auch physiologisch relevant ist, wäre vorstellbar, dass das Autophagie-Protein eine Rolle in der Phytochrom-vermittelten Reaktion auf gerichtete Lichtreize spielt, indem beispielsweise für die Krümmungsreaktion notwendige Membran-Bausteine gezielt zu bestimmten Plasmamembran-Bereichen transportiert werden.

Eine von drei Atg8-Unterfamilien stellen *Microtubule-associated Protein 1 Light Chain 3* (MAP1LC3 oder LC3) Proteine dar (Shpilka *et al.*, 2011). Unabhängig von einer Autophagie-Assoziation wurde LC3 zuerst als mit den Mikrotubuli-Bindeproteinen 1A und 1B (*Heavy Chains Co-purifying* Proteine) charakterisiert (Kuznetsov & Gelfand, 1987; Mann & Hammarback, 1994) und fungiert vermutlich als Untereinheit der beiden Mikrotubuli-assoziierten Proteine (kann aber auch direkt Mikrotubuli binden). Die LC3-Expression könnte darüber hinaus die Mikrotubuli-Bindeaktivität von MAP1A und MAP1B regulieren (Mann & Hammarback, 1994). *Arabidopsis* weist somit ebenfalls signifikante Homologie zu LC3 von MAP1A und MAP1B auf und es konnte sogar gezeigt werden, dass AtAtg8 Mikrotubuli binden kann. Das *Physcomitrella*-Protein scheint auch Ähnlichkeiten zu der Ubiquitin-Domäne des γ -Aminobuttersäure-Rezeptor-assoziierten Proteins (GABARAP, einer 2. Unterfamilie der Atg8-Proteine) aufzuweisen (NCBI CDD). Auch diese Proteine vermitteln intrazelluläres Membran-*Trafficking* und / oder Fusion und binden nicht nur GABA, sondern u. A. auch an Tubulin (Coyle *et al.*, 2002). Mikrotubuli sind an vielen Prozessen in eukaryotischen Zellen beteiligt inklusive Zellteilung und intrazellulärem Transport. In Lichtrichtungsantworten von Spitzenzellen von *Physcomitrella* sind Aktin-Filamente die Haupt-Akteure, jedoch wird auch Mikrotubuli in *Ceratodon purpureus* eine Rolle darin zugeordnet (Hartmann, 1984). Eine Mikrotubuli-Bindeaktivität eines phy4-Interaktionspartners würde zumindest eine Möglichkeit darstellen, die Rotation des Photorezeptors zu beschränken und somit Aktions-Dichroismus und Polarotropismus zu ermöglichen (s. Einleitung).

5.4.13 Protein mit unbekannter Funktion / HIP11

Da das im Holo-phy4:BD-*Screen* identifizierte unbekannte Protein keine signifikanten Ähnlichkeiten zu Proteinen anderer Pflanzen besitzt, scheint es sich um ein *Physcomitrella*-spezifisches Protein zu handeln. Der beste Treffer unter den *Arabidopsis*-Proteinen war ein pfkB-*like* Kohlenhydratkinase-Familien Protein. Dass das einmalige Gen exprimiert wird, belegt die extensive EST-Evidenz und auch Expressionsdaten (s. Anhang 1.7.15). Y2H und *in planta* Interaktionsanalysen bestätigten das Protein als phy4-Interaktionspartner (4.5.2.10). Da für die AS-Sequenz eine N-terminale Plasmamembran-Domäne (AS 7-25) vorhergesagt war (und es sich bei den meisten *Arabidopsis*-Treffern um Membranproteine handelte), wäre

eigentlich eine entsprechende Lokalisation zu erwarten gewesen, was aber nicht belegt werden konnte (Abbildung 4-36). Stattdessen scheinen N-terminale Fusionen des Proteins sowohl im Lokalisations- als auch im *Split-YFP-Assay* cytoplasmatisch und perinukleär lokalisiert zu sein. Andererseits begünstigen das geringe Molekulargewicht und auch ein vorhergesagtes NLS (RRRR, AS 112-115) die gelegentliche nukleäre Lokalisation. Abgesehen von der vorhergesagten Transmembran-Domäne konnten verschiedene Vorhersage-*Tools* keine weiteren funktionellen Domänen identifizieren, sodass hier keine Aussagen über eine mögliche Funktion des Proteins getroffen werden können. Auch eine mögliche Kinaseaktivität ist aufgrund der sehr schwachen Ähnlichkeit zu der *Arabidopsis* Kohlenhydratkinase eher fraglich. Demnach ist das Protein ein *Physcomitrella*-spezifisches Protein mit unbekannter Funktion. Durch die Bestätigung der (konstitutiven) Interaktion mit phy4 *in planta* könnte es sich bei diesem Protein dennoch um einen interessanten Kandidaten für cytoplasmatisches Phytochrom-Signalling handeln. Auch die Vermittlung von Photo- und Polarotropismus durch Rotlicht und Perzeption und Transduktion des Signals durch Phytochrom scheint ja eine Moos-spezifische Antwort zu sein. Evtl. gibt es auch verwandte Gene in *Ceratodon purpureus* (welches gerichtete Lichtreize ebenfalls mittels Phytochrom wahrnimmt), allerdings ist dessen Genom-Sequenz momentan noch nicht veröffentlicht. Daher müssen weitere Studien die Involvierung des unbekannten Proteins in Phytochrom-Signaltransduktion noch belegen.

5.4.14 eIF-5A / HIP12

Der eukaryotische Translations-Initiationsfaktor-5A aus dem Holo-phy4:BD-*Screen* konnte in mehreren Konformationen als *Y2H*- und als *in planta* Interaktionspartner von phy4 bestätigt werden. Während das *Y2H*-Interaktionsverhalten sowohl Licht-induzierte, als auch konstitutive Charakteristika zeigte, fand die *in planta* Interaktion konstitutiv entweder im Cytoplasma oder in Cytoplasma und Kern statt (Abbildung 4-37). Cytoplasmatische und nukleäre Signalmuster entsprechen weitgehend den Lokalisationsdaten, wobei die nukleäre Verteilung wohl durch das geringe Molekulargewicht des Hybridproteins (ca. 18 kDa + 27 kDa Tag) und folglich freie Diffusion in der Zelle zu begründen ist (Grebek et al., 1997). Zuerst wurde für den eukaryotische Translationsfaktor-5A beschrieben, dass er an der Bildung der ersten Peptidbindung der Translation und somit an dessen Initiation (Name) beteiligt ist (Kemper et al., 1976). Spätere Evidenzen deuteten jedoch eher auf eine Rolle in der translationalen Elongation hin (Greggio et al., 2009; Patel et al., 2009; Saini et al., 2009) oder der Zellproliferation (rezensiert in Park et al. (2010)). Der genaue eIF-5A-Wirkmechanismus am Ribosom ist bis dato unbekannt, jedoch impliziert die Bindung an Translations-Maschinerie-Komponenten (z.B. Translations-Elongationsfaktor 2) und vorwiegend an aktiv translatierende Ribosomen eine direkte Funktion in Translation (Kang & Hershey, 1994; Hanauske-Abel et al., 1995; Zanelli et al., 2006). Die Assoziation von Phytochrom mit eIF-5A und Translation stellt eine interessante mögliche Verbindung zu der beschriebenen Assoziation von *Arabidopsis* phyB Pfr mit dem cytoplasmatischen translationalen Regulator PENTA1 dar (Paik et al., 2012). Paik und Mitarbeiter konnten zeigen, dass R-aktiviertes phyB Pfr an das cytoplasmatischen PENTA1 rekrutiert wird, welches Licht-unabhängig mit der 5'UTR der PORA mRNA assoziiert ist. phyB Pfr ist somit in der Lage, die PORA Translation im Cytoplasma zu inhibieren, was ein prominentes Beispiel für eine cytoplasmatische Phytochrom-Funktion ist.

Für die eIF-5A Aktivität und dessen Regulation ist die einzigartige posttranslationale Modifikation der Hypusinierung nötig (Cooper *et al.*, 1982; Chen, 1983; Park, 1989; Smit-McBride *et al.*, 1989): die beiden hoch konservierten eukaryotischen Enzyme Deoxyhypusinsynthase und Deoxyhypusin-Hydrolase (Park *et al.*, 1993; Park *et al.*, 1994) vermitteln den Transfer des Aminobutyl-Restes des Polyamins Sperimidin auf einen Lysin-Rest des eIF-5A-Vorläufers bzw. die anschließende Hydroxylierung (Chen & Liu, 1997; Park *et al.*, 1997). Die Deoxyhypusin-Hydrolase ist ein Einzelgen in allen Eukaryoten und essenziell für Zellwachstum und -proliferation in multizellulären Organismen (Hanauske-Abel *et al.*, 1994; Patel *et al.*, 2009). Darüber hinaus wurde das Enzym und eIF-5A mit Mikrotubuli-*Assembly* und -Verteilung und mit Aktin-Dynamik und Zellpolarität in Verbindung gebracht (Balasundaram *et al.*, 1991; Park *et al.*, 1997; Weir & Yaffe, 2004; Zanelli & Valentini, 2005; Chatterjee *et al.*, 2006). In Hefe vermittelt eIF-5A polares Wachstum, was für den G1/S-Übergang notwendig ist, was (über einen bislang unbekannten Mechanismus) zu einer räumlich begrenzten Sekretion und Zellwand-Ablagerung für die Entwicklung einer neuen Knospe führt. Dies könnte eine potentielle Verbindung zu der phy4-vermittelten Kontrolle von Spitzenzellwachstum in *Physcomitrella* darstellen (s. auch EF1 α unten). Da die beschriebenen Prozesse Hefe-Knospungs-spezifisch sein könnten, ist jedoch nicht klar, wie übertragbar die Befunde auf andere Organismen ist.

Das komplexe *in planta* Interaktionsverhalten von eIF-5A (s. 4.5.2.11) korreliert mit Beobachtungen in anderen Systemen: menschliches eIF-5A ist in Cytoplasma und perinukleärer Region lokalisiert, wo es mit ER-assoziierten Ribosomen interagiert und eine Netz-ähnliche Struktur ausbildet (Shi *et al.*, 1996). Dies erinnert an das von uns beobachtete Signalmuster (Abbildung 4-37 A & B). Zugabe von Proteinsyntheseinhibitoren führt indes zu einem punktierten/fleckigen Signalmuster (ebenfalls Shi *et al.* (1996)). Die oben beschriebene Hypusinierung reguliert nicht nur die eIF-5A Aktivität, sondern auch dessen Lokalisation: während der Vorläufer sowohl in Cytoplasma, als auch im Zellkern vorliegt, findet man hypusiniertes eIF-5A vorrangig im Cytoplasma (Park *et al.*, 1982; Chen, 1983; Torrelío *et al.*, 1984; Park, 1989; Lee *et al.*, 2009). In Mais führt Phosphorylierung des N-terminalen Ser2 zu einer Akkumulation in Zellkern, während nicht-phosphorylierbare Mutanten zusätzlich auch im Cytoplasma vorliegen (Lebska *et al.*, 2010; Lewandowska-Gnatowska *et al.*, 2011). Tatsächlich wurde vorgeschlagen, dass die phyA-assoziierte Phosphatase PP2A die Dephosphorylierung übernehmen könnte (s. auch 5.4.16), was den nukleären eIF-5A-Export reaktivieren könnte.

Zusätzliche Komplexität kommt dadurch zustande, dass in Eukaryoten zwei oder mehr eIF-5A-Isoformen vorliegen können (Jenkins 2001), die Bedingungs- oder Gewebe-spezifisch exprimiert sein können. Funktionen können dementsprechend sowohl spezifisch, als auch redundant sein (Schwelberger *et al.*, 1993; Hanazawa *et al.*, 2004). In *Arabidopsis* gibt es 3 Isoformen, deren Aktivität gemeinsam herunter-reguliert werden kann, indem die Deoxyhypusinsynthase herunter-reguliert wird. Dies führt (in Tomate oder *Arabidopsis*) zu diversen Entwicklungsstörungen: verstärktem vegetativem und reproduktivem Wachstum, Verzögerung von Stress-induzierter und natürlicher Rosettenblatt-Seneszenz und evtl. auch zu Schossen (Wang *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005; Duguay *et al.*, 2007). Suppression aller Isoformen wurde darüber hinaus mit Hitze-, oxidativem und osmotischem Stress in Verbindung gebracht (Xu *et al.*, 2011). Für distinkte Isoformen wurde impliziert, dass sie entsprechend ihrer Expressionsmuster an i) Xylembildung und abiotischer Stresstoleranz (eIF-5A-1, photosynthetisches oder Leitgewebe) ii) Zellteilung und Wachstum, Protoxylembildung, Resistenz gegenüber Pathogen-induziertem Zelltod & Cytokinin-

Signalling (eIF-5A-2, überall) und iii) vegetativem und reproduktivem Wachstum und osmotischem und Nährstoff-Stress (eIF-5A-3, Phloem, Wurzelspitze, -epidermis & -haube, und befruchteten Eizellen) beteiligt sind (Chamot & Kuhlemeier, 1992; Feng *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012; Ren *et al.*, 2013). Auf Aminosäure-Ebene ähnelt das *Physcomitrella* Protein *Arabidopsis* Isoform eIF-5A-3 und 2 am meisten (noch mehr als dem *Physcomitrella* Homolog; s. SI Ermert *et al.* (2016).), jedoch ist die Funktion in *Physcomitrella* bislang unbekannt. *Genevestigator* *Microarray* Daten (www.genevestigator.com) legen zumindest eine potentielle Ko-Regulation von eIF-5A und phy4 in verschiedenen Bedingungen nahe, so dass eine Involvierung in phy4 *Signalling* nicht ausgeschlossen ist.

5.4.15 EF1 α / HIP13

EF1 α wurde im apo-BD:PHY4 *Y2H-Screen* identifiziert und weist vermutlich daher eher konstitutives Interaktionsverhalten mit dem *Screening-Bait* auf, während die Interaktion mit phy4:BD eher schwach aber dafür lichtabhängig war. Die ausschließlich cytoplasmatische Lokalisation von EF1 α -CFP-Fusionen könnte mit der EF1 α -Funktion in der Translation von mRNAs im Cytoplasma zusammenhängen, wobei die beobachteten Cytoskelett-ähnlichen Strukturen auf eine Assoziation mit Aktin-Filamenten hinweisen könnte (Abbildung 4-38 A). Insbesondere wenn beide Partner N-terminal mit YFP-Hälften versehen wurden, konnten ähnliche Strukturen auch in *Split-YFP* beobachtet werden. Im Fall von C-terminalen Fusionen hingegen, trat Interaktion auch im Zellkern auf, obwohl dies für EF1 α :CFP nicht der Fall war. Dies könnte auf eine Translokation des Komplexes unter phy4-Überexpressionsbedingungen hinweisen. Ob dieses Verhalten von physiologischer Relevanz ist, kann ohne weitere Untersuchungen jedoch nicht abgeschätzt werden.

EF1 α ist ein extrem konserviertes multifunktionelles Protein mit einer N-terminalen RAS-*like* GTPase- (auch P-*Loop* NTPase genannt) und C-terminalen GTP EFTU-D2 und -D3 Domänen. Die RAS-*like* GTPase-Domäne enthält einige Nukleotid-Bindestellen, während die D3-Domäne für Aktin-Bindung verantwortlich ist (Gross & Kinzy, 2005). Wie der Name schon sagt, spielt EF1 α eine essenzielle Rolle in translationaler Elongation (Andersen *et al.*, 2003): die GTP-gebundene Form von EF1 α bindet an eine Aminoacyl-tRNA, um sie zu der A-Stelle des Ribosoms zu bringen. Infolge von Codon-Anticodon-Erkennung wird das GTP hydrolysiert, EF1 α ändert seine Konformation und EF1 α -GDP wird freigesetzt. Ein GDP/GTP-Austauschfaktor recycelt EF1 α dann für den nächsten Elongationsschritt (Krab & Parmeggiani, 1998; Negrutskii & El'skaya, 1998). Daher könnte die EF1 α -Interaktion mit phy4 mit der Phytochrom-regulierten PENTA-1-vermittelten PORA-Translationsregulation in Beziehung stehen (Paik *et al.* (2012); s. auch eIF-5A).

Andererseits konnte für EF1 α gezeigt werden, dass es Aktin-Filamente in diversen Organismen (z.B. *Dictyostelium* oder Mensch) binden und bündeln kann (Demma *et al.*, 1990; Dharmawardhane *et al.*, 1991; Bassell *et al.*, 1994). Auch für *Chara* konnte gezeigt werden, dass EF1 α mit subcortikalen Aktin-Bündeln ko-lokalisiert (Collings *et al.*, 1994). EF1 α macht 1-2% des Gesamtproteins in normal wachsenden Zellen aus (Slobin, 1980; Dharmawardhane *et al.*, 1991), wobei man davon ausgeht, dass die Hälfte davon mit Aktin assoziiert ist (Edmonds *et al.*, 1995). Die Aktin-Interaktion ist sowohl von der EF1 α -GTP-Bindung, als auch von dem Phosphorylierungsstatus abhängig (Dharmawardhane *et al.*, 1991; Yang & Boss, 1994; Izawa *et al.*, 2000). EF1 α aktiviert die Phosphatidylinositol-4-Kinase, wodurch es *Capping* und Abtrennung von Aktin-Filament-Proteinen reguliert (Yang *et al.*, 1993). Phosphorylierung von (*Rattus* oder *Daucus carota*) EF1 α vermindert die F-Aktin-Bindungsaktivität bzw. aktiviert die

PI-4-Kinase an der Plasmamembran (Yang & Boss, 1994; Izawa *et al.*, 2000). Außerdem dient EF1 α als Substrat für Rho-assoziierte und Calcium-abhängige Proteinkinasen (Yang and Boss (1994); Izawa *et al.* (2000), s. auch 4.5.2.8). Darüber hinaus bindet und kappt EF1 α Mikrotubuli in Ca²⁺- und Calmodulin-abhängiger Art und Weise in diversen Organismen (*Daucus*, *Trypanosoma*, *Xenopus*, *Homo*; Durso and Cyr (1994), Kaur and Ruben (1994), Shiina *et al.* (1994)). Cytoskelett-Bindung von EF1 α koppelt die Translationsmaschinerie wahrscheinlich an die räumliche Organisation der Zelle, wodurch EF1 α den Transport und die Verankerung von mRNAs und die Kompartimentierung der Translation in eukaryotischen Zellen reguliert (Gross & Kinzy, 2005). Da auch andere Schlüssel-Komponenten der Translation als Komplex mit Aktin-Filamenten und Mikrotubuli assoziiert sind, könnte die Cytoskelett-assoziierte Translation von mRNA in Multi-Protein-Komplexen einen verbreiteten Mechanismus darstellen (Dharmawardhane *et al.*, 1991; Shestakova *et al.*, 1993; Bassell *et al.*, 1994; Bektas *et al.*, 1994; Durso & Cyr, 1994; Hamill *et al.*, 1994; Shiina *et al.*, 1994; Edmonds *et al.*, 1996). Die räumliche Kontrolle der Translation könnte eine entscheidende Rolle bei der Lokalisation von Entwicklungsdeterminanten, makromolekularen Komplexen, Isoform-Segregation und Zellpolarität spielen (Fulton, 1993; Wilhelm & Vale, 1993; Hamill *et al.*, 1994). Die EF1 α -Cytoskelett-Assoziation könnte somit die Aktivität und/oder Erreichbarkeit der Komplexe für die Proteinsynthese kontrollieren (Bektas *et al.*, 1994; Edmonds *et al.*, 1996). Da auch unsere Beobachtungen auf eine Cytoskelett-Assoziation des phy4-EF1 α -Komplexes hindeuten, wäre vorstellbar, dass EF1 α eine ähnliche Rolle bei der Determinierung der Richtung des polaren Wachstums infolge eines unilateralen oder polarisierten Lichtreizes spielt. Zusätzlich zu den beschriebenen EF1 α -Funktionen gibt es Evidenzen, dass EF1 α mit dem 26S-Proteasom interagiert und an der Degradation von N α -acetylierten Proteinen (wie Aktin oder α -Kristallin) beteiligt ist (Gonen *et al.*, 1994).

In *Arabidopsis* und *Physcomitrella* existieren vier bzw. ~11 Homologe (Ransom-Hodgkins, 2009). Da EF1 α diverse zelluläre Funktionen insbesondere in Zusammenhang mit dem Cytoskelett und potentiell auch mit Ca²⁺-*Signalling* zu besitzen scheint, ist es ein interessanter Kandidat für eine Funktion in phy4-vermitteltem Phototropismus in Filament-Spitzenzellen. In unilateralem R-Licht, erzeugt die Pfr-Verteilung einen Ca²⁺-Gradienten mit höchster Konzentration auf der Licht-zugewandten Seite der Zelle. Dies führt zu einer Umorientierung des kortikalen Aktin-Filament-Netzes von einer longitudinalen Anordnung Richtung Apex hin zur belichteten Flanke (Hartmann & Weber, 1988; Meske & Hartmann, 1995; Meske *et al.*, 1996). Infolgedessen bildet sich eine neue richtungsverschobene Kappe mittels lokaler Neusynthese von Aktin-Filamenten, was auch dem polarisierten Vesikel-Transport entlang der Aktin-Filamente entspricht (Schnepf, 1986; Meske *et al.*, 1996). An dieser durch den Lichtreiz neu definierten Stelle findet schließlich der polare Auswuchs des Filaments statt. Es konnte in *Arabidopsis* Wurzelzellen gezeigt werden, dass Profilin 2 zusammen mit EF1 α in Aktin-Turnover und Aktin-Skelett-vermittelten Vesikel-Transport involviert ist (Takac *et al.*, 2011). In der Tat ist Profilin essentiell für Spitzenzellwachstum in *Physcomitrella* (Vidali *et al.*, 2007). Außerdem ist Profilin zusammen mit Aktin und CHUP1 (CHLOROPLAST UNUSUAL POSITIONING 1) Hauptakteur in Chloroplastenbewegungs-Antworten in *Arabidopsis* (Schmidt von Braun, 2008; Schmidt von Braun & Schleiff, 2008). Die Chloroplasten-Photorelokation stellt neben den Tropismen ebenfalls eine Phytochrom-vermittelte cytoplasmatische Lichtrichtungs-Antwort in *Physcomitrella* dar (Mittmann *et al.*, 2004). Durch das Vorhandensein von CHUP1-Homologen (CHUP1a und CHUP1b) in *Physcomitrella* ist eine Maschinerie bestehend aus Phytochrom, Profilin, EF1 α und dem Aktin-Filament-Netzwerk vorstellbar. In *Arabidopsis* ist die Phytochrom-Beteiligung an der dort

Blaulicht-abhängigen Phototropin-regulierten Antwort weniger klar, jedoch scheint Phytochrom zumindest eine modulierende Rolle zu spielen (DeBlasio *et al.*, 2003; Luesse *et al.*, 2010).

5.4.16 14-3-3-Protein / HIP14

Das im Holo-phy4:BD-*Screen* identifizierte 14-3-3 Protein konnte mittels *Y2H* als phy4(:BD)-Interaktionspartner bestätigt werden. Die Interaktion war zwar R-verstärkt, jedoch nicht in beiden 14-3-3-AD-Kombinationen FR-reversibel (Abbildung 4-25). Die cytoplasmatische und nukleäre Lokalisation des GFP:14-3-3-Fusionsproteins könnte durch das geringe 14-3-3 Molekulargewicht (knapp 30 kDa) begünstigt werden. Ein NLS ist laut NucPred in der AS-Sequenz nicht vorhanden. Dennoch scheint der C-terminale GFP-*Tag* den Kernimport zu behindern, denn 14-3-3:GFP war vorwiegend cytoplasmatisch (Abbildung 4-39 A). Möglicherweise behindert der N-terminale GFP-*Tag* eine Dimerisierung oder eine potentielle Bindung eines anderen Proteins (an den 14-3-3-N-Terminus?). Dies könnte zur Überschreitung der Kernporenausschlussgröße führen und somit die nukleäre Lokalisation verhindern (Grebenok *et al.*, 1997). Möglicherweise könnte auch die phy4-Bindung ein solches Lokalisationsverhalten auslösen, denn auch hier ist C-terminal fusioniertes 14-3-3 in Kombination mit phy4:YFP_N rein cytoplasmatisch. In Kombination von phy4:YFP_N mit YFP_C:14-3-3 hingegen tritt auch nukleäre Lokalisation auf. Sowohl die 14-3-3:GFP-Lokalisationssignale, als auch die cytoplasmatischen phy4:YFP_N+YFP_C:14-3-3 *Split-YFP*-Signale wiesen Ähnlichkeiten zu Cytoskelett-Strukturen auf. Dies könnte das Lokalisationsverhalten von 14-3-3 ω und Φ in *Arabidopsis* Trichomen widerspiegeln (Paul *et al.*, 2005).

14-3-3-Proteine sind ubiquitär in eukaryotischen Zellen (Isobe *et al.*, 1991; Yaffe, 2002) und besitzen eine konservierte zentrale Region, die für Dimerisierung und Interaktion mit *Client*-Proteinen über eine amphipathische Furche verantwortlich ist. 14-3-3-*Targets* sind Phosphothreonin- und Phosphoserin-Proteine mit (R/K)(XX/S)X(S/T)^pXP-Motiven, sodass 14-3-3 Proteine Phosphosensor-Proteine darstellen (de Boer *et al.*, 2013). Die 14-3-3-Bindung kann zur Änderung der katalytischen Aktivität oder der intrazellulären Lokalisation des Zielproteins und/oder zur Bindung weiterer Signalkomponenten führen. Abgesehen davon kann auch die 14-3-3-Aktivität selbst durch Phosphorylierung beeinflusst werden. Die meisten Phosphorylierungsstellen befinden sich innerhalb des flexiblen C-Terminus in einer Region, die als Auto-Inhibitor und als Determinante für die *Target*-Bindungsspezifität fungieren kann (Shen *et al.*, 2003; Sinnige *et al.*, 2005).

Etwa 10 andere 14-3-3-ähnliche Proteine konnten in *Physcomitrella* identifiziert werden. Vergleich mit den 13 Familienmitgliedern in *Arabidopsis* ergab, dass das *Physcomitrella* Protein scheinbar den *General Regulatory Factor* 14 (GRF14) Isoformen ψ und ω am ähnlichsten ist (wobei sich alle 14-3-3 Proteine sehr ähnlich sind (s. Ermert *et al.* (2016) SI). Für die Isoformen κ/λ und ω/Φ konnte gezeigt werden, dass sie vorwiegend im *Arabidopsis* Trichom Zellkern und Cytoplasma mit Cytoskelett-Assoziation lokalisiert sind (Paul *et al.*, 2005), was auch unseren *in planta* bzw. *Split-YFP*-Beobachtungen für 14-3-3:GFP und phy4:YFP_N+YFP_C:14-3-3 entspricht (vgl. Abbildung 4-39 A+B). Andere Isoformen, können auch andere Lokalisationen aufweisen wie zum Beispiel Isoform λ , welche in Stomata-Schließzellen scheinbar Plasmamembran-assoziiert ist. Trotz der Sequenzähnlichkeit und einem gewissen Grad an Redundanz, können pflanzliche 14-3-3-Proteine spezifische Funktionen ausführen, indem sie Zell- oder Stimulus-abhängig exprimiert, differentiell phosphoryliert oder intrazellulär kompartimentiert werden (Paul *et al.*, 2005).

Bislang konnten >750 primäre und sekundäre 14-3-3-Protein-*Targets* in *Arabidopsis* identifiziert werden, daher sind die Funktionen breit gefächert (de Boer *et al.*, 2013): einschließlich Enzymregulation im Primärmetabolismus, Hormon-*Signalling*, Zellteilung, Antworten auf abiotische und biotische Reize *etc.* (Denison *et al.*, 2011). Für manche Isoformen konnte sogar demonstriert werden, dass sie die Stomata-Öffnung mittels Interaktion mit beiden Licht-aktivierten *Arabidopsis* Phototropinen und anschließender Bindung an die phosphorylierte = aktivierte Plasmamembran- H^+ -ATPase vermitteln (Kinoshita *et al.*, 2003; Ueno *et al.*, 2005; Sullivan *et al.*, 2009; Hayashi *et al.*, 2010; Hayashi *et al.*, 2011; Tseng *et al.*, 2012). Auch hier scheinen einzelne Isoformen spezifische Funktionen zu übernehmen: Sullivan und Mitarbeiter (2009) zeigten eine (*ex vivo*) Interaktion von phot1 mit Isoform λ und dass die phot1-Bindung scheinbar auf die (Nicht- ϵ) Isoformen λ , κ und Φ beschränkt ist (Sullivan *et al.*, 2009). Während diese Arbeit eine 14-3-3 λ -phot2-Bindung ausschloss, zeigten spätere Arbeiten, dass eben diese Interaktion zwar für phot2-abhängige Stomata-Öffnung, nicht jedoch für Phototropismus, Chloroplasten-Akkumulations- und -Vermeidungsantworten benötigt wird (Tseng *et al.*, 2012). Da 14-3-3 λ normale phot1-abhängige Stomata-Öffnung zeigte, wurde geschlussfolgert, dass die 14-3-3 λ -Funktion wohl phot2-spezifisch ist. Auf der anderen Seite ist 14-3-3 κ vermutlich nicht an Stomata-Öffnung, sondern an positiver Regulation der Chloroplasten-Vermeidungsreaktion beteiligt.

Zusätzlich sind z.B. die *Arabidopsis* 14-3-3-Isoformen μ und ν in die photoperiodische Kontrolle der Blühinduktion, möglicherweise durch direkte Interaktion mit Schlüsselkomponenten wie CONSTANS und FLOWERING LOCUS T (Florigen) involviert – ähnliche Zusammenhänge konnten auch für Tomate und Reis belegt werden (Pnueli *et al.*, 2001; Mayfield *et al.*, 2007; Purwestri *et al.*, 2009). Damit scheinen 14-3-3-Proteine nicht nur mit Phototropin- sondern zumindest indirekt mit Phytochrom- und Cryptochrom-*Signalling* verknüpft zu sein, denn beide Photorezeptoren sind an der Synchronisierung des Oszillators mit dem Tag-Nacht/Licht-Dunkel-Rhythmus beteiligt, wobei phyB CO-Abundanz und -Lokalisation auch direkt beeinflusst (Valverde *et al.*, 2004).

Eine Affinitätsaufreinigung/LC-MS/MS-Studie identifizierte eine Vielzahl an 14-3-3 κ , χ , und ψ -Interaktionspartnern, von denen einige auch in Licht-Signaltransduktion involviert sind: ROOT PHOTOTROPISM 2 (RPT2, χ , κ , ψ), phot2 (κ), PROTEIN PHOSPHATASE 2A (PP2A, κ), CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1, κ) und -8 (COP8, ψ), CONSTANS-LIKE 1 (COL1, ψ) und PIF3 (χ , ψ), sowie einige andere Gibberellinsäure- / Phytochrom-Signalproteine (RGA1 und RGL2, Shin *et al.* (2011)). Für viele dieser putativen 14-3-3-*Targets* ist eine direkte Interaktion mit Phytochrom bekannt, während z.B. PP2A zusätzlich mit phot interagieren kann (Tseng & Briggs, 2010). 14-3-3 κ und χ Einzel und Doppelmутanten-Phänotypen und 14-3-3 μ und ν T-DNA-Insertionsmutanten erinnern an PIF3-Überexpressoren (langes Hypokotyl in Rc; Mayfield *et al.* (2007), Adams *et al.* (2014)), was eine Rolle bestimmter 14-3-3-Proteine in Phytochrom B-Signalling impliziert, möglicherweise indem sie als Antagonisten/Regulatoren der PIF3-Signaltransduktion wirken. Interessanterweise waren phyB und PRL1 (s.o.) ebenfalls unter den 14-3-3 (κ bzw. ψ)-Interaktionspartnern (Shin *et al.*, 2011), was eine interessante Parallele zur vorliegenden Arbeit darstellt. 14-3-3-Proteine und/oder ihre *Targets* haben somit vermutlich eine Funktion in Phytochrom- bzw. Phototropin-vermittelter R- & B-Licht-Signaltransduktion. Darüber hinaus konnte auch ein Phänotyp im Gravitropismus festgestellt werden: während *Arabidopsis* WT-Keimlinge kaum eine definierte Orientierung aufweisen, zeigten 14-3-3 ν Nullmutanten verstärkten Gravitropismus, eher wie *phyB* oder auch *phyA* (Liscum & Hangarter, 1993; Poppe *et al.*, 1996; Robson & Smith, 1996; Mayfield *et al.*, 2007). Die 14-3-3-

Assoziation mit Phytochrom-, Phototropin- und Cryptochrom-*Signalling* könnte für eine Beteiligung an verschiedenen Photorezeptor-Signalkomplexen sprechen (s. Paul *et al.* (2008)), wie es auch für PKS1, NPH2 und PP2A (s.o.) vorgeschlagen wurde (s. Jaedicke *et al.* (2012)). Möglicherweise ist die 14-3-3-phy4-Interaktion in *Physcomitrella* Bestandteil eines solchen Komplexes.

6. Zusammenfassung / Schlussfolgerungen

Phytochrom 4 ist für die Erkennung von Lichtrichtung und -polarisation und für die intrazelluläre Transduktion des vektoriellen Signals in *Physcomitrella*-Protonema-Spitzenzellen verantwortlich (Mittmann *et al.*, 2004). Durch einen bislang unbekannten Mechanismus führt ein cytoplasmatischer Signaltransduktions-Weg zu einer Umorientierung des (Aktin-) Cytoskeletts und zu einer Krümmungsreaktion des Filaments. Ein Signalweg über Transkriptionsregulation im Zellkern ist dabei ausgeschlossen, weil ein solcher grundsätzlich keine Richtungsinformation weiterleiten kann. Ziel dieser und der vorhergehenden Doktorarbeit von Dr. Katharina Mailliet sollte es sein, Schlüsselkomponenten dieses Signalwegs zu identifizieren und zu charakterisieren.

Eine wichtige Entdeckung zur Charakterisierung des cytoplasmatischen Signalwegs bestand in der Demonstration einer direkten Interaktion von phy4 mit den *Physcomitrella* Phototropinen an der Plasmamembran der Moosprotonemata (Jaedicke *et al.*, 2012). In dieser Weise kann das ansonsten cytoplasmatisch und nukleär lokalisierte Phytochrom zum einen anisotrop in der Zellperipherie fixiert werden, was eine Voraussetzung dafür ist, den für Polarotropismus notwendigen Aktionsdichroismus auszuführen. Zum anderen kann eine direkte Photorezeptor-Interaktion die Beteiligung von Phototropinen an den Phytochrom-regulierten Rotlichtantworten Chloroplastenbewegung, Photo- und Polarotropismus erklären (Kasahara *et al.*, 2004; Jaedicke *et al.*, 2012). Ein lichtabhängiges quantitatives enzymatisches Assay im *Y2H*-System konnte erfolgreich etabliert und angewendet werden, um die Lichtabhängigkeit und Interaktionsstärke der phy4-phot-Interaktion quantitativ zu erfassen. In der Regel fand in *Y2H* eine R-verstärkte und FR-revertierbare Interaktion mit allen vier *Physcomitrella* Phototropinen statt, wobei photA2 die stärkste Interaktion und R-Verstärkung aufwies. Nach Etablierung eines Co-IP-Assays konnten diese Interaktionen auch *ex vivo* nachgewiesen werden (wobei lediglich photB2 auch eine Bande in der Negativkontrolle aufwies). Scheinbar ist die *ex vivo*-Interaktion nicht FR-revertierbar, was auf eine phy-phot-Interaktion unabhängig von der phy-Konformation *in planta* – möglicherweise aufgrund einer Beteiligung weiterer Komponenten am PM-Komplex (die im *Y2H* nicht anwesend sind) – hinweist. *Y2H*- und *Split-YFP*-Interaktionen scheinen nicht nur mit N-terminal fusioniertem, sondern auch mit C-terminal fusioniertem Phytochrom möglich zu sein.

Bei der Photorezeptor-Kooperation in Form einer Interaktion scheint es sich nicht um ein Phänomen zu handeln, welches spezifisch für niedere Pflanzen ist. Eine PM-lokalisierte phyA-phot1-Interaktion konnte in der Tat auch in Zwiebelzellen nachgewiesen werden (Jaedicke *et al.*, 2012) und zeigt, dass auch in diesem System die Interaktion die physiologische Basis für das Zusammenspiel von RL und BL-Signalling in höheren Pflanzen sein könnte. Wahrscheinlich ist diese Interaktion für die phyA-abhängige R-Verstärkung des BL-Phototropismus und auch für die R-induzierte Retention von Phototropin an der PM in BL verantwortlich. Damit hat Phytochrom wahrscheinlich eine duale Funktion: eine im Cytoplasma/der PM und eine im Zellkern in Form von Pfr-vermittelter differentieller Genregulation. Im Gegensatz zu den *Physcomitrella* Proteinen scheinen die *Arabidopsis*-Proteine allerdings mindestens ein weiteres Protein als Vermittler der Interaktion zu benötigen, da in *Y2H-Assays* keine direkte Interaktion zwischen phyA und phot1 bzw. phot2 nachgewiesen werden konnte. Die vorliegende Arbeit sollte sich daher mit der Identifikation dieses Brückenproteins beschäftigen. Ein erster Schritt in diese Richtung sollte die Anwendung eines *Y3H*-Systems sein, in dem die phyA-phot1/2-Interaktion in An- und Abwesenheit eines Brückenproteins untersucht wird. Als interessante Kandidaten hierfür

boten sich NPH3 und PKS1 an, welche beide mit phot und phy interagieren und vermutlich zusammen mit phot (und phy) und weiteren phot-Signalkomponenten an der PM vorliegen. Die Co-Expression von NPH3 konnte aufgrund der ausbleibenden Wachstumsantwort in allen getesteten Bedingungen als Brückenprotein ausgeschlossen werden. PKS1 führte indes zu einer schwachen R-induzierten Wachstumsantwort von BD:phyA+AD:photA1 allerdings unter nicht PKS1-induzierenden Bedingungen (normale Methionin-Konzentration), während unter (vermutlich stressigen) induzierenden Bedingungen (Methionin-Mangel) kein Wachstum zu beobachten war. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl unter induzierenden, als auch unter „normalen“ Bedingungen PKS1-Expression stattfindet, woraus geschlossen wurde, dass PKS1 eventuell tatsächlich Brückenprotein-Funktionen übernehmen könnte. Es wurde versucht, dies mittels Co-IP zu bestätigen, allerdings führte hier die PKS1-Co-Überexpression eher zur Unterdrückung eines in PKS1-Abwesenheit nachweisbaren phyA-phot1-IP-Signals. Demnach handelt es sich bei PKS1 vermutlich (doch) nicht um das gesuchte Brückenprotein. Eine PKS1-Funktion in der R/BL- bzw. phy/phot-Ko-Aktion ist auf Basis dieser Erkenntnisse jedoch nicht ausgeschlossen. Immerhin interagiert PKS1 in D (und wahrscheinlich auch in WL, Lariguet 2006, de Carbonnel 2010) mit Phototropin *in planta* an der PM und somit vermutlich eher indirekt mit phyA. Die *Split-YFP*-Untersuchung der phyA-PKS1-Interaktion zeigte, dass sich der Komplex in D jedoch nicht an der PM, sondern im Cytoplasma und der perinukleären Region aufhält. Dies weist auf die Existenz von zwei zellulären PKS1-*Pools* mit mutmaßlich unterschiedlichen Funktionen in Licht-Signaltransduktion(en) hin.

In dieser Arbeit ist es des Weiteren gelungen, phy4:BD-*Y2H-Bait*-Konstrukte herzustellen und bezüglich ihrer Autoaktivierungs- und Dimerisierungs-Eigenschaften sowohl nach Hefe-Doppeltransformation, als auch nach Hefe-*Mating* zu charakterisieren. Es konnten erfolgreich Protokolle für Holophytochrom-Assemblierung in Hefe, semiquantitative Wachstums-*Assays* in kontinuierlichem und gepulstem Licht, und auch quantitatives Hefe-*Mating* zur Effizienz-Optimierung und Unterdrückung von Reporterautoaktivierung etabliert werden. Letzteres wurde erfolgreich eingesetzt, um eine in den Mat a Stamm AH109 vortransformierte Oligo-dT-cDNA-Bibliothek nach Holo-phy4:BD-Interaktionspartnern in Rc zu *screenen*, um vorwiegend Pfr-spezifische Interaktionspartner zu erhalten. Es wurden $4,2 \times 10^5$ Klone erfasst, was einer 4-fachen Abdeckung des *Physcomitrella* Genoms entspricht. *Mating* hat sich hierbei als gute, effektive und einfache Methode im Vergleich zur Doppeltransformation erwiesen (vgl. Apo-BD:PHY4-*Screen* von Dr. Mailliet). Knapp 70 putative positive Diploide konnten in einer 2. Selektionsrunde selektiert werden und wiesen dabei zumeist R-verstärktes Wachstum auf, was in der Tat für Pfr-spezifische Interaktion spricht. Sequenzierung, BLAST- und weitere *in silico* Analysen (z.B. von Domänenstrukturen) halfen bei der Identifizierung und initialen Charakterisierung putativer phy4-Interaktionspartner (neben sehr spärlicher Annotation der *Physcomitrella* mRNAs/Proteine). Den Kandidaten wurden daraufhin mögliche Funktionen zugeordnet, um für cytoplasmatisches Phytochrom-*Signalling* interessante Proteine zur näheren Untersuchung auszuwählen. Die meisten der im *Screen* identifizierten Kandidaten haben wahrscheinlich Funktionen in Metabolismus, Transkription/Translation (wahrscheinlich konstitutiv exprimierte *Housekeeping*-Gene) und Signaltransduktion, einige wenige aber auch in Stressantworten, als Membranproteine / Transporter oder Cytoskelett-Organisatoren. Insbesondere putative *Signalling*- Membran- und Cytoskelett-assoziierte Proteine sowohl aus dem Holo-phy4:BD- (15 Partner), als auch aus dem Apo-BD:PHY4-*Screen* von Dr. Mailliet (4 Partner) wurden in einem semiquantitativen Wachstums-*Assay* hinsichtlich ihrer lichtabhängigen Interaktion mit N- und C-terminal fusionierten photoaktiven phy4-*Baits* untersucht. Lediglich ein Kandidat konnte in *Y2H* nicht

bestätigt werden, während alle anderen mindestens in einer Konformation zumeist R-verstärktes und FR-reversibles oder in der Minderheit auch konstitutives Wachstum zeigten. Somit konnten insgesamt 18 neue *Holophytochrome-Interacting-Proteins* (HIPs, Ermert *et al.* (2016)) identifiziert werden von denen die meisten in höheren Pflanzen konserviert sind (s. Tabelle 6-1). R-verstärktes/FR-reversibles bzw. Pfr-spezifisches Interaktionsverhalten deutet auf funktionale Phytochrom-Photochromizität im Hefesystem hin, was zumindest im Fall der vier Kandidaten aus dem Apo-BD:PHY4-*Screen* überrascht, denn bislang war man davon ausgegangen, dass sich der Knoten am Phytochrom-N-Terminus durch N-terminale *Tags* nicht richtig ausbilden kann (Wagner *et al.*, 2005; Essen *et al.*, 2008). Vermutlich findet man aus diesem Grund in der gesamten Phytochrom-Literatur keine einzige Arbeit, in der *Tags* an den Phytochrom N-Terminus fusioniert werden. Dennoch sind lichtabhängige Interaktionen und auch Dimerisierung mit BD:phy4 möglich, so dass man schlussfolgern kann, dass die phy4-Fusionsproteine scheinbar funktional sind und sich im *Y2H*-System ähnlich des nativen Photorezeptors falten. Entweder wird die Ausbildung des Knotens nicht in dem Maße beeinträchtigt, wie angenommen, oder der Knoten ist nicht essentiell für Photochromizität (Ermert *et al.*, 2016).

Alle Kandidaten weisen zumindest teilweise eine cytoplasmatische (und ggf. nukleäre) Lokalisation auf und wären somit theoretisch in der Lage, dort mit phy4 zu interagieren und ggf. eine Rolle in cytoplasmatischem Phytochrom-*Signalling* zu spielen. Ein differentielles Lokalisationsmuster nach R-Vorbehandlung konnte in keinem Fall beobachtet werden. 12 von 16 im *Split-YFP* untersuchten HIPs konnten auch *in planta* als phy4-Interaktionspartner verifiziert werden. Diese erstaunlich hohe Verifikationsrate könnte auf den Einsatz von *Mating* anstelle von Doppeltransformation im Holo-phy4-BD-*Screen* zurückzuführen sein, denn dadurch konnte die Hintergrundaktivierung des *HIS3*-Reporters und somit vermutlich auch die Anzahl/Wahrscheinlichkeit falsch Positiver reduziert und gleichzeitig die Sensitivität erhöht werden. Vermutlich hat auch die Verwendung des photoaktiven *Baits* zur Erhöhung der Anzahl verifizierbarer Interaktionspartner beigetragen.

Phy4-HIP-Interaktionen waren – wie HIP-FP-Lokalisationen auch – ebenfalls in der Regel zumindest zum Teil im Cytoplasma zu beobachten. Interessanterweise zeigten HIP-phy4-Komplexe in manchen Fällen ein von einfachen HIP-FP-Fusionen abweichendes Signalmuster, was auf eine Translokation/Kompartimentierung der Komplexe durch phy4-Bindung und ggf. auf eine Signalfunktion hinweisen könnte. In folgenden Fällen konnten möglicherweise R-induzierte Interaktionen *in planta* beobachtet werden: ZF/HIP3, Ser/Thr-Proteinkinase/HIP7 und Rhomboid-Peptidase/HIP9. Eine scheinbar Pfr-spezifische Interaktion könnte auf eine Signalwirkung dieser Kandidaten im Phytochrom-*Signalling* hindeuten. Außerdem konnten insbesondere im Fall von eIF-5A/HIP12, EF1 α /HIP13 und 14-3-3/HIP14 auch Substrukturen des cytoplasmatischen Signals, die an Cytoskelett-Strukturen erinnern, gezeigt werden. Dies könnte auf eine Cytoskelett-Assoziation des jeweiligen HIP-phy4-Komplexes hindeuten. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Untersuchung der putativen phy4-Interaktionspartner zusammengefasst (vgl. Tabelle 6-1):

- Viele der ausgewählten Kandidaten sind wohl **klassische Signalproteine**, wobei Pirin/HIP1 möglicherweise in G-Protein-*Signalling* involviert ist. Andere Kandidaten zeichnen sich i.d.R. durch ihre Protein-Protein-Interaktionsdomänen als **Multikomplex-Assemblierer** aus, wie zum Beispiel das Ankyrin&BTB/POZ-Protein (ehemals HIP10, die *in planta* Interaktion konnte nicht bestätigt werden), PRL1/HIP4 (WD40-Domäne), oder auch F-Box-*interacting*/Kelch und das Kelch-*Repeat* Protein/HIP5. Letztere sind oft Bestandteil von E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexen und

übernehmen somit Funktionen in der **Proteindegradation**. Das ZF-Protein/HIP3 könnte ebenfalls als E3-Ligase fungieren.

- Eine Untergruppe klassischer Signalproteine könnte eine Funktion in **posttranslationaler Modifikation durch Phosphorylierung** übernehmen. HIP7, die putative TP53-regulierende Kinase und CDPK/HIP8 (und evtl. HIP11) stellen wahrscheinlich Ser/Thr-Proteinkinasen dar, wobei die Aktivität der putativen CDPK wahrscheinlich durch Ca^{2+} -Bindung reguliert werden kann. Auch EF1 α /HIP13 könnte mit **Ca^{2+} -Signalling** assoziiert sein.
- Andere Kandidaten könnten von Phosphorylierung abweichende **enzymatische Aktivitäten** aufweisen: Pirin/HIP1 könnte das Flavonol Quercetin spalten, während die putative P-Loop-Sulfotransferase/HIP6 u. A. Quercetin sulfatieren könnte. Dies könnte sich auf PIN-Lokalisationen und somit auf Auxin-Flüsse auswirken. Das Rhomboid-Protein/HIP9 könnte eine Intramembran-Peptidase sein.
- Das Rhomboid-/HIP9, das Rhodopsin-*Tail*- und das Autophagie-Protein sind möglicherweise (u. A., s. HIP9) **Membranproteine** (die letzten beiden wurden noch nicht dahingehend untersucht) und könnten eventuell an der Verankerung des phyphot-Komplexes an der Plasmamembran oder an Membran-*Trafficking* beteiligt sein (zumindest in Einzelzellen konnte ersteres für HIP9 gezeigt werden, *Split-YFP*-Analysen für die anderen beiden müssten ggf. noch vertieft werden).
- eIF-5A/HIP12 und EF1 α /HIP13 sind vermutlich in (räumlich begrenzte, s.u.) **translationale Regulation** involviert. Dies stellt eine interessante Parallele zu der kürzlich entdeckten cytoplasmatischen Funktion von phyB in der Kontrolle der PORA-Translation über PENTA dar (Paik *et al.*, 2012). Wie HIP3 ist PENTA ein cytosolisches ZF-Protein.
- PRL1/HIP4, F-box-*interacting*/Kelch, Kelch-*Repeat*/HIP5, evtl. CDPK/HIP8, evtl. das Autophagie-Protein, eIF-5A/HIP12, EF1 α /HIP13 und das 14-3-3-Protein/HIP14 sind wahrscheinlich in verschiedenster Art und Weise mit dem **Cytoskelett** assoziiert. Das Aktin-Cytoskelett wird als Haupt-Akteur bei der Krümmungsreaktion des Filaments infolge eines gerichteten/polarotropen Lichtreizes angesehen (Meske & Hartmann, 1995; Meske *et al.*, 1996). Proteine, die an der Cytoskelett-Organisation beteiligt sind, stellen interessante Kandidaten dar, um eine molekulare Verbindung zwischen dem Photorezeptor-Komplex an der Plasmamembran und dem Cytoskelett herzustellen.
- 14-3-3-Proteine sind Signalproteine, die als **Phosphosensoren** fungieren, da die phosphorylierte Aminosäure-Reste in Proteinen erkennen. HIP14 ist besonders interessant, da für (die sehr ähnlichen) *Arabidopsis* 14-3-3-Proteine Interaktionen sowohl mit Phototropinen, als auch mit phyB detektiert werden konnten (Sullivan *et al.*, 2009; Shin *et al.*, 2011; Tseng *et al.*, 2012). Möglicherweise ist HIP14 direkt am phyphot-Komplex an der Plasmamembran beteiligt. Eine mögliche Assoziation mit dem Cytoskelett könnte eine molekulare Verbindung des Plasmamembran-Photorezeptor-Komplexes mit dem ausführenden Organ der Krümmungsreaktion herstellen.

Tabelle 6-1: Zusammenfassung der *in silico* und experimentellen Analysen aller ausgewählten putativen phy4-Interaktionspartner aus dem Apo-BD:PHY4- und Holo-phy4:BD-*Screen* (Ermert *et al.* (2016) modifiziert). Enthalten sind die Cosmoss-*Accession*-Nummern, Proteinlänge (Anzahl der AS), Domänen mit zugehörigen Bereichen, *Physcomitrella* und *Arabidopsis*-Homologe, *Y2H*-Interaktions-, Lokalisations- und *Split-YFP*-Interaktionsverhalten. Die letzte Spalte gibt die hypothetische Funktion des jeweiligen Partners an.

6. Zusammenfassung

HIP Nr. / Description	COSMOS accession	Protein length [nr. aa] / domains [spanning region]	<i>Physcomitrella</i> homologs	putative <i>Arabidopsis</i> homologs	Y2H-interacting behavior	Localization (N- / C-terminal FP-fusion)	Split-YFP pattern	R-dependent in <i>planta</i> interaction	Hypothetical function
HIP1/Pirin	Pp3c2_10320V1.1	352 / Pirin (61-350), RmlC-like jelly roll fold (63-308) RmlC-like cupin (65-344) Pirin, N-terminal (83-177) Pirin, C-terminal (230-335)	3 pirin-like proteins: HIP1 Pp3c19_20830V1.1 & Pp3c21_16130	4 pirins / pirin-like proteins: AT3G59220 Pirin 1 AT2G43120 pirin-like protein AT1G50590 pirin-like protein AT3G59260 pirin putative	Constitutive or R/FR-reversible	Cytoplasm + nucleus	Cytoplasm & nucleus (and sometimes cytoplasmic foci)	No	Signal transduction quercetinase-activity G-protein Signalling
(HIP2)/ Pirin-like protein	Pp3c19_20830V1.1	297 / Pirin (17-294) RmlC-like jelly roll fold (59-294) RmlC-like cupin (65-271) Pirin, N-terminal (64-167)	See HIP1	See HIP1	R-enhanced, FR-reversible	Cytoplasm / cytoplasm + nucleus	Not verified	No	See HIP1
HIP3 / ZF-protein	Pp3c10_4820V1.1	329 / CHY-type ZF (68-156) CTCHY ZF (146-210) RING-type ZF (210-254) C3HC4 ZF (210-253) RING/FYVE/PHD-type ZF (206-270) rubredoxin-type fold (282-319)	5-7 (including HIP3) Pp3c14_5600V1.1 Pp3c11_6970V1.1 Pp3c1_6070V1.1, Pp3c2_31820V1.1 (Pp3c25_14500V1.1 Pp3c6_1960V1.1)	AT5G22920 RING finger and CHY zinc finger domain-containing protein 1 AT5G25560 CHY and CTCHY and RING-type zinc finger protein AT5G18650 MYB30-interacting E3 ligase 1 AT3G62970, AT3G18290, AT1G74770, AT1G18910	Weak but R-enhanced, FR-reversible	Cytoplasm or cytoplasm + nucleus / cytoplasm + nucleus	Cytoplasm + nucleus	Yes	Signal transduction protein interaction protein degradation?
HIP4 / PRL1	Pp3c16_8560E1.1	495 / WD40 / YVTN Repeat-like-containing (164-471) WD40-Repeat-containing (169-480) 7x WD40 (173-212, 215-254, 257-296, 299-338, 341-379, 382-421 & 433-471) G-protein beta WD-40 Repeat (199-213, 283-297, 325-339)	2 (including HIP4), Pp3c5_15520V1.1 many further proteins with WD40 domains	AT4G15900 PRL1 AT3G16650 PRL2	Constitutive or R/FR-reversible	Nucleus / cytoplasm + nucleus	Cytoplasm or cytoplasm + nucleus	No	Signal transduction protein binding cytoskeleton?
F-Box-interacting/Kelch	Pp1s271_60V6.1	311 / galactose oxidase/kelch, beta propeller (46-232) F-Box-associated interaction domain (53-241)	2 (including Pp1s271_60V6.1) Pp1s80_112V6.1 + many more dissimilar proteins	Weak similarity to AT4G33160 F-box-only protein 13 & AT1G27340 LEAF CURLING RESPONSIVENESS	R-enhanced, FR-reversible	Nucleus + cytoplasm (maybe chloroplast)	n/a	n/a	Signal transduction protein binding protein degradation? cytoskeleton
HIP5 / Kelch-Repeat protein	Pp3c7_3040V1.1	498 / galactose oxidase / kelch, beta-propeller (163-474) Kelch-type beta propeller (198-483) kelch-related protein (203-373) Kelch Repeat type 1 (248-292, 280-326, 292-339, 327-374 & 339-388) Kelch Repeat type 2 (383-424)	2 (including HIP5); Pp3c11_19970V1.1 22 further proteins with lower similarities from 140 aa's on	Many (highest similarity in kelch-region): AT1G14330 galactose oxidase/kelch Repeat superfamily protein AT1G26930 & AT5G60570 F-box/kelch-Repeat proteins AT3G27150 MIR2111-5p target protein AT2G02870 F-box/kelch-Repeat protein SKIP11 AT1G74510, AT5G40680 etc	R-enhanced, FR-reversible	Cytoplasm + nucleus	Cytoplasm or cytoplasm + nucleus	No	Signal transduction protein binding protein degradation? Cytoskeleton?
HIP6 / P-loop protein	Pp3c6_4480V1.1	379 / P-loop-containing nucleoside triphosphate hydrolase (123-358) sulfotransferase (134-337) TM-helix (56-78)	4 (including HIP6), Pp3c5_24550V1.1 Pp3c25_12260V1.1 Pp3c16_22670V1.1	22 sulfotransferases (Hirschmann <i>et al.</i> 2014), 3 closer homologs via BLAST: AT3G50620 AtSOT19 AT2G15730 AtSOT20 AT4G34420 AtSOT21 + 2 hypothetical proteins / variants (CAB62491.1 & CAB36719.1)	Mostly constitutive	Cytoplasm / cytoplasm + cytoplasmic foci	Cytoplasm + cytoplasmic foci or cytoplasm (+ nucleus)	No	Signal transduction nucleoside triphosphate hydrolase sulfotransferase
HIP7 / Ser/thr protein kinase	Pp3c17_9390V1.1	287 / protein kinase, catalytic domain (1-287 & 221-235) serine / threonine- / dual specificity protein kinase, c. d. (37-273) protein kinase-like domain (122-227)	Single copy many proteins with weaker similarity (residues 100-220)	Similarity to various <i>Arabidopsis</i> / Viridiplantae proteins, e.g. Ser/Thr-protein kinase HIGH LEAF TEMPERATURE 1 (HT1; AT1G62400) etc.	R-enhanced	Cytoplasm + nucleus (+ cytoplasmic foci) / cytoplasm + nucleus	Cytoplasm + nucleus	Partially	Signal transduction, protein phosphorylation
TP53-regulating kinase	Pp3c15_20330U1.1	231 / Ser/Thr protein kinase Bud32 (1-230, 19-224) protein-kinase-like (20-178) protein kinase (13-230, 41-166)	Single copy	AT5G26110 protein kinase family protein (formerly TP53-regulating kinase) AT3G50720 putative protein kinase AT1G08120 uncharacterized protein	R-enhanced, mostly FR-reversible	Cytoplasm (cytoskeleton-like) + nucleus / cytoplasm + nucleus	n/a	n/a	Signal transduction, protein phosphorylation
HIP8 / CDPK	Pp3c11_25550V1.1	497 / protein kinase like (31-302) protein kinase (31-290), Ser/thr /dual specificity protein kinase, catalytic (31-290) 4x calcium-binding EF-hand (333-368, 369-404, 405-440 & 443-474) EF-hand domain pair (330-475)	25 CDPKs (Hamel <i>et al.</i> , 2014) BLASTP yielded up to 33 (including HIP8)	CPK1 and 33 other CDPKs (Hamel <i>et al.</i> , 2014)	weak but R-enhanced, FR-reversible	Cytoplasm + nucleus	Cytoplasm or cytoplasm + nucleus	No, perhaps R-induced cytoplasmic translocation	Ca ²⁺ -signal transduction, protein phosphorylation, cytoskeleton?
HIP9 / Rhomboid peptidase	Pp1s254_10V6.2	580 / Peptidase S54, rhomboid superfamily (4-560), Peptidase S54, rhomboid (369-507 & 323-506)	16 rhomboid-like proteins (RBL's; Li <i>et al.</i> 2015); BLASTP yielded 1 closer homolog: Pp3c22_8560V1.1 & 3 rather dissimilar proteins: Pp3c2_10440V1.1, Pp3c1_43050V1.1 & Pp3c17_14100V1.1	17 RBL's (Li <i>et al.</i> 2015), best: At5g38510 RBL9; BLASTP identified only RBL's 1-10	R-enhanced, FR-reversible	Cytoplasm (maybe plasma membrane) / cytoplasm + nucleus	Cytoplasm + nucleus or plasma membrane + nucleus	Yes	Membrane protein, maybe intramembrane proteolysis or other enzymatic activity

6. Zusammenfassung

HIP Nr. / Description	Cosmos accession	Protein length [nr. aa] / domains [spanning region]	<i>Physcomitrella</i> homologs	putative <i>Arabidopsis</i> homologs	Y2H- inter- acting behavior	Locali- zation (N- / C- terminal FP- fusion)	Split-YFP pattern	R- depend- ent in <i>planta</i> inter- action	Hypo- thetical function
Rhodopsinall-protein	Pp3c14_6380V1.1	76 / rhodopsintail (19-30, 32-44)	2 (including Pp3c14_6380V1.1) Pp3c17_11870V1.1	Many proteins with low similarity: AT2G41420 proline- rich uncharacterized protein AAM67217 adhesive/proline- rich protein homolog CAB66922 putative protein AT2G32190 uncharacterized protein AT4G23470 PLAC8 family protein AT5G17650 glycine/proline- rich protein	R- enhanced, FR- reversible	n/a	1 confor- mation tested, not verified	No	Membrane protein
(HIP10) / Ankyrin- & BTB/POZ-domain protein	Pp3c1_11190C1.1	360 / ankyrin Repeat-containing protein (33-99, 31-101, 36-156 & 36-103) ankyrin-Repeat (31-61, 65-98 & 65-101) SKP1/BTB/POZ (190-296) BTB/POZ (202-268, 205-297 & 202-300)	2 (including Pp3c1_11190) 1 closer homolog: Pp3c7_8840V1.1, 7 rather dissimilar proteins (similarity region: 180-350)	Low similarity to a BTB/TAZ domain protein (AT2G30600, 340-480) best similarity to <i>Selaginella</i> <i>moellendorffii</i> hypothetical proteins Selmo1_441307 & Selmo1_440857	Consti- tutive or R- enhanced	Cyto- plasmic patches / cytoplasm + nucleus	Not verified	No	Signal transduction, cytoskeleton
HIP11 / unknown protein	Pp3c20_16210V1.1	189 / transmembrane region (7-25)	Identical to Pp3c20_16230V1.1 but different locus	Low similarity to pfkB-like carbohydrate kinase AT5G19150	R- enhanced, mostly FR- reversible	Cytoplasm + peri- nuclear region (+ nucleus) / cytoplasm (+ nucleus)	Cytoplasm + peri- nuclear region	No	Maybe signal transduction & phosphory- lation
Autophagy protein	Pp3c14_15110V1.1	123 / autophagy protein Atg8 ubiquitin-like (1-117, 14-117) ubiquitin-related (3-117)	6 (including Pp3c14_15110V1.1) Pp3c14_15040V1.1 Pp3c17_5780V1.1 Pp3c14_15140V1.1 Pp3c1_32170V1.1 Pp3c1_32190V1.1	9 autophagy-related proteins: AT1G62040 8c AT2G05630 8d AT4G16520 8f AT4G21980 8a AT4G04620 8b AT3G60640 8g AT2G45170 8e AT3G15580 8i AT3G06420 8h + CAA18101/AT4g21980 symbiosis-related like protein AC011623_7 hypothetical protein	R- enhanced, FR- reversible	n/a	1 confor- mation tested not verified	No	Signal transduction intracellular membrane trafficking microtubule binding?
HIP12 / eIF-5A	Pp3c13_15620V1.1	162 / translation elongation factor eIF5A (1-159) ribosomal protein L2 domain 2 (15-84) translation protein SH3-like (15- 93) nucleic acid binding, OB fold (86-157) eIF5A C-terminal (85-154)	2 (including HIP12) Pp3c12_3540V1.1	3 isoforms of eIF-5A: AT1G13950 eIF-5A, AT1G26630 eIF-5A-2, AT1G69410 eIF-5A-3	Consti- tutive or R/FR- reversible	Cytoplasm + nucleus	Cytoplasm or cytoplasm + nucleus	No	Translation cytoskeleton ?
HIP13 / EF1α	Pp3c1_23670V1.1	448 / translation elongation factor EF1A, eucaryotic / archaeal (1-433) p-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase (3-234 & 3-249) TF, GTP-binding (5-230) translation protein β-barrel (231-322) EFTu/EF1A, domain 2 (248- 313) EF1A/IFγ, C-terminal (326-429) EFTu/EF1A, C-terminal (322- 429)	11 (including HIP12) Pp3c2_6160V1.1 Pp3c2_6690V1.1 Pp3c1_23750V1.1 Pp3c5_10430V1.1 Pp3c2_10310V1.1 Pp3c2_6650V1.1, Pp3c2_6770V1.1, Pp3c1_23850V1.1 Pp3c1_23900V1.1 Pp3c1_23920V1.1 & 16 (longer) -23 (including shorter) rather dissimilar proteins	AT1G07940, AT1G07930, AT1G07920, AT5G60390 elongation factor 1-alpha 1- 4, some other closer homologs: AT1G18070 translation elongation factor EF1A/initiation factor IF2gamma family protein AT5G10630 putative translation elongation factor 2EF1A / eIF-2-gamma AT1G35550 EF Tu C- terminal domain-containing protein AT4G02930 putative EF Tu AT4G20360 RAB GTPase homolog E1b	Consti- tutive or R/FR- reversible	Cytoplasm + peri- nuclear region	Cytoplasm + peri- nuclear region or cytoplasm + nucleus	No	Translation & cytoskeleton maybe Ca ²⁺ - Signalling
HIP14 / 14-3-3 protein	Pp3c3_8540C1.1	258 / 14-3-3 protein (1-256) 14-3-3 (5-237, 6-239 & 5-248)	11 (including HIP14) Pp3c10_20300V1.1 Pp3c12_18760V1.1 Pp3c4_20750V1.1 Pp3c10_14160V1.1 Pp3c10_14250V1.1 Pp3c3_8510V1.1 Pp3c23_10780V1.1 Pp3c23_11080V1.1 Pp3c24_7310V1.1 Pp3c24_7780V1.1	13 14-3-3-like proteins: AT5G38480 GF14 psi, AT1G78300 GF14 omega, AT4G09000 GF14 chi, AT1G35160 GF14 phi, AT3G02520 GF14 nu, AT5G16050 GF14 upsilon, AT5G10450 GF14 lambda, AT5G65430 GF14 kappa, AT1G26480 GF4 iota, AT1G34760 GF14 omicron, AT2G42590 GF14 mu, AT1G22300 GF14 epsilon, AT1G22290 GF14 xi & AT2G10450 14-3-3 family protein, AT1G78220 general regulatory factor 13	Consti- tutive	Cytoplasm + nucleus / cytoplasm + peri- nuclear region (cyto- skeleton?) or cytoplasm + nucleus	Cytoplasm (cyto- skeleton?) or cytoplasm + nucleus	No	Signal transduction, protein interaction, phospho- sensing

In Anbetracht der hohen Anzahl identifizierter und verifizierter phy4-Interaktionspartner und der noch bestehenden Möglichkeit von falsch positiven *Y2H*-Kandidaten ist es nicht wahrscheinlich, dass alle gleichermaßen eine Rolle in phy4-*Signalling* spielen. Alle genannten Charakteristika und möglichen Funktionen der verschiedenen HIPs sind hypothetisch. Die physiologische Relevanz kann nur mit *Knockout*- und/oder Überexpressionsanalysen und physiologischen Untersuchungen belegt werden. Vergleich von Expressionsdaten von phy4- und putativen Partnern konnte Hinweise auf eine mögliche Co-Regulation von phy4 mit PLP/HIP6, Ser/Thr-Proteinkinase/HIP7, eIF-5A/HIP12 und insbesondere mit PRL1/HIP4 liefern. Zwar konnten in dieser Arbeit keine KO-Analysen durchgeführt werden, jedoch können diese Evidenzen als Indiz für eine mögliche physiologische Relevanz der entsprechenden Partner gewertet werden.

Bekannt ist, dass vektorielle Information durch einen Phytochrom 4 gesteuerten cytoplasmatischen Signalweg vermittelt wird. Die Involvierung von Phototropinen in Rotlicht-Photo- und Polarotropismus konnte in *Physcomitrella* ebenfalls gezeigt werden und vermutlich spielt die direkte phy4-Interaktion mit Phototropinen an der Plasmamembran eine essentielle Rolle in diesen Prozessen (Jaedicke *et al.*, 2012). In höheren Pflanzen konnte zwar ebenfalls eine phyA-phot1-Interaktion an der Plasmamembran beobachtet werden, jedoch ist unklar, ob eine ähnliche Funktion dieses Komplexes auch in *Arabidopsis* existiert. Auch weil die meisten der identifizierten phy4 Partner in *Arabidopsis* konserviert sind, könnte die Aufklärung des Moos-Systems erwartungsgemäß wertvolle Einblicke in die Funktionsweise von Phytochrom-*Signalling* und/oder dessen Evolution liefern.

7. Summary

Physcomitrella phytochrome 4 is the main photoreceptor responsible for red light-inducible (and FR-reversible) direction- and polarization-dependent phototropism and polarotropism responses of the moss protonemata (Mittmann *et al.*, 2004). Since gene regulation – the presumably prevalent phytochrome signal transduction mechanism in higher plants – is not capable of transducing directional light signals, an additional transduction system needs to exist in the cytoplasm at least in mosses. Furthermore, vectorial responses such as polarotropism and chloroplast movement require a fixed photoreceptor in order to perceive and transduce such information and perform action dichroism. Previous studies of Kasahara and coworkers and of our own group could demonstrate a physiological involvement of phototropins in phytochrome signalling regarding chloroplast-photorelocation as well as photo- and polarotropism (Kasahara *et al.*, 2004; Jaedicke *et al.*, 2012). Dr. Katharina Mailliet was able to show *via* Y2H- and split-YFP-methods that a direct phy4-phot interaction could indeed be the physiological basis for the photoreceptor co-action and that this interaction takes place at the plasma membrane. These experiments with N-terminal fusions (of the BD for Y2H / of YFP-halves in split-YFP) to phy4 could for the most part be confirmed with the equivalent C-terminal fusions in the present work. As a result, all four phototropins can mediate the fixation of a subpopulation of the otherwise soluble phy4 molecules in the cell periphery. This enables the photoreceptor to mediate the abovementioned responses even corresponding to a previously proposed signalling model (J/E/H, see 1.7). In the present work the interaction of phy4 with *Physcomitrella* phototropins could be confirmed using *ex vivo* (but still plant-based) co-IP methods in RL. Although Dr. Mailliet's Y2H growth assays and my quantitative light-dependent enzyme-based Y2H assay suggested a RL-enhanced and in the latter case even FR-reversible interaction of phy4 with the phototropins, this could not be confirmed in the co-IP-assay. This (and presumably also the split-YFP experiments) indicate that the phy-phot interaction is state-independent *in planta*. A RL-signal thus probably leads to a different signal instead of Pfr-induced phot-interaction, the nature of which is still to be identified. It is assumed that this signal is finally transduced to the actin cytoskeleton which is the key player executing the bending response (Meske & Hartmann, 1995; Meske *et al.*, 1996).

Since there are evidences that phy-mediated RL- and phot-mediated BL-signalling are intertwined in higher plants (such as *Arabidopsis thaliana*) as well and that phyA is mostly responsible for the RL-part, it has been analyzed, whether phyA can also interact with the two *Arabidopsis* phototropins. A Y2H growth assay did not yield any growth responses whereas split-YFP analyses by contrast showed a PM-localized signal analogous to the one observed in *Physcomitrella* (Jaedicke *et al.*, 2012). Consequently it seems that the interaction of the *Arabidopsis* proteins necessitates at least one further component to mediate the interaction – a component which is absent in the yeast system. Nevertheless it is plausible that the phyA-phot1-interaction is involved in phy-modulated BL-responses such as the R-enhancement of BL-phototropism in contrast to the presumable function of the phy4-phot complex in mediation of R-phototropism (and polarotropism) in *Physcomitrella*. The conservation of the interaction in *Arabidopsis* thus might constitute an evolved role of the lower plant light signalling complex at the plasma membrane. In the present work the question of the identity of the postulated bridge protein was addressed. A first step was the employment of a Y3H-system in which the phyA-phot interaction could be analysed in presence or absence of a bridge protein, the expression of which is controllable via the methionine concentration in

the medium. As plausible candidates NPH3 and PKS1 were selected primarily because both can interact both with phytochrome and with phototropin, with the latter even at the plasma membrane. Y3H-analyses could exclude NPH3 as bridge protein, whereas in case of PKS1 the result was less clear: under (suppositionally) non-inductive PKS1 expression conditions (on normal TSD medium) indeed a growth response of BD:phyA+AD:phot1 could be detected, however not on strongly inductive media (without methionine). Expression analysis indicated that normal SD-medium does not contain enough methionine to suppress PKS1-transcription and thus PKS1 could have mediated the observed Y3H growth response (while methionine deficiency might lead to stressed yeast which might impede weak interaction readouts). This rather ambiguous conclusion had to be verified with a different method. For this, co-IP experiments analogous to the *Physcomitrella* phy4-phot interaction assays were performed – either with or without co-expression of PKS1. Interestingly, PKS1-co-expression rather prevented an in PKS1 absence detectable phyA-phot1-IP band. From this it could be deduced that (i) PKS1 is probably not the bridge protein but that (ii) a yet unidentified mediator is probably still necessary for the *in planta* phyA-phot1 interaction. Although it could be verified that PKS1 interacts with phot1 at the PM, this was not the case for PKS1 and phyA for which an interaction in the cytoplasm and perinuclear region could be observed – the latter signal featuring a cytoskeleton-like substructure. This observation hints at the fact that there might be two different PKS1-pools in the cell: one interacting with phototropin at the PM and one associated with cytoplasmic Pr. Which cellular function the one or the other fulfils has yet to be elucidated.

Since on the basis of the abovementioned findings further components of the *Physcomitrella* light signalling complex at the PM and associated signal transducers were still unknown, a Y2H library screen was performed. For this, C-terminally fused BD-fusions to the phy4 CDS were created and characterized regarding expression in yeast and autoactivation behavior as after yeast transformation as after yeast mating. Quantitative yeast mating was established in order to reduce autocativation so that ideally also temporal and/or weak interactions could be detected (which otherwise would have been suppressed by the competitive inhibitor of the expressed reporter). Furthermore holophytochrome assembly in yeast and semiquantitative growth assays in different continuous and pulsed light conditions were successfully established. Subsequently a pretransformed *Physcomitrella* oligo dT-primed cDNA library was mated to pretransformed bait yeast (of opposite mating type) and diploids were selected on medium stringency -Trp/-Leu/-His TSD medium supplemented with 30 μ M PCB and incubated in Rc so that Pfr-specific interactions could be detected. Thereby $4,2 \times 10^5$ clones could be screened corresponding to a 4-fold coverage of the *Physcomitrella* genome. Putative positive clones were selected in a second selection round which approximately 70 clones survived (mostly showing R-enhanced growth on PCB-medium). From these, yeast DNA was extracted and (after shuttling isolated prey plasmids to *E.coli*) sequenced in order to identify putative phy4 interacting partners based on BLAST- and other *in silico* analyses (such as domain predictions *etc.* which were necessary because at this stage the *Physcomitrella* genome had only sparsely been annotated). Most candidates presumably fulfil functions in metabolism, transcription/translation and signal transduction and a smaller proportion also in stress responses, as membrane proteins/transporters or as cytoskeleton organizers. 15 candidates plus four candidates of a previous apo-BD:phy4 library screen (Dr. Mailliet) which are putatively functional in signal transduction, cytoskeleton organization or membrane-anchoring were selected for further analysis. Appropriate full length CDS constructs for verification of Y2H interaction and for the analysis of intracellular localization and *in planta*

interaction with phy4 were created. The selected partners were characterized regarding light-dependent interactions with N- and C-terminally fused photoactive phy4 baits using a semiquantitative growth assay in pulsed light conditions (see above). Only one candidate failed to interact in all tested conformations leaving 18 putative partners which mostly bound phy4 in an R-enhanced (mostly FR-reversible) manner and were thus termed holophytochrome interacting partners (HIPs, Ermert *et al.* (2016), Tabelle 6-1). R-enhanced interaction hints at Pfr-specific binding to putative interacting partners which is particularly surprising in case of light-induced interactions with BD:phy4 (especially in case of the four candidates identified in the BD:phy4 screen). Therefore it may be deduced that the presumptive knot at the phytochrome N-terminus either folds correctly beside the N-terminal BD tag or is not essential for photoconversion.

In intracellular localization studies all candidates exhibited at least partial cytoplasmic (and as the case may be nuclear) localization enabling them in principle to interact with phy4 and to play roles in cytoplasmic phytochrome signalling. 12 of 16 examined candidates could be confirmed to interact with phy4 *in planta* using split-YFP. This surprisingly high verification rate may be correlated with the application of mating instead of double transformation and maybe also with the employment of the photoactive phy4 bait for the cDNA library screen. Analogous to FP-localizations also phy4-HIP-interactions were mostly observable (at least partly) in the cytoplasm. Interestingly, in some cases a differential split-YFP localization pattern compared to FP-fusions could be observed hinting at a translocation/compartimentalization of the HIP as a consequence of phy4 binding and therefore maybe also at a signalling function of the respective HIP. In the following cases potentially R-induced *in planta* phy4-Pfr interactions could be detected: ZF/HIP3, Ser/Thr-protein kinase/HIP7 and rhomboid peptidase/HIP9 perhaps also indicating a signalling function. YFP-signals of phy4 complexes with eIF-5A/HIP12, EF1 α /HIP13 and 14-3-3/HIP14 showed cytoplasmic substructures which resembled cytoskeleton structures. These complexes could thus putatively be associated with the cytoskeleton or other cellular structures (e.g. the ER).

The following paragraph summarizes the results of *in silico* and experimental analyses of the 18 HIPs (Tabelle 6-1):

- Many of the selected candidates are presumptive **classical signal proteins**. Pirin/HIP1 may be involved in G-protein signalling whereas other partners may be **multicomplex assembly / scaffolding proteins** due to their protein-protein interacting domains such as the ankyrin&BTB/POZ protein (ex HIP10, the *in planta* interaction could not be demonstrated), PRL1/HIP4 (WD40-domain) or the F-box-*interacting*/kelch and the kelch-repeat protein/HIP5. F-box/kelch proteins are often components of E3 ubiquitin ligase complexes and thus fulfil functions in **protein degradation**. ZF/HIP3 could also function as E3-ubiquitin ligase.
- A subgroup of classical signal proteins could be **posttranslational modifiers via phosphorylation**. HIP7, the putative TP53-regulating kinase, CDPK/HIP8 and maybe HIP11 could be Ser/Thr protein kinases, whereby the CDPK kinase activity could be regulated by Ca²⁺-binding. EF1 α /HIP13 could also be associated with **Ca²⁺-signalling**.
- Other candidates could have **enzymatic activities** other than phosphorylation: pirin/HIP1 could cleave the flavonol quercetin, whereas the putative p-loop sulfotransferase/HIP6 may sulfate quercetin amongst others. This potentially affects

PIN-localization and auxin fluxes. The rhomboid protein/HIP9 could be an intramembrane peptidase.

- The rhomboid/HIP9, the rhodopsin-tail and the autophagy protein maybe constitute **membrane proteins** (the latter two could not be verified *in planta* yet, however further conformations could be tested). Maybe HIP9 is involved in anchoring the phy-phot-complex at the PM or it could mediate membrane-trafficking.
- eIF-5A/HIP12 and EF1 α /HIP13 are probably involved in the spatial control of **translational regulation** in the cytoplasm. This constitutes an interesting parallel to the cytoplasmic phyB function in the control of PORA-translation via PENTA1 (Paik *et al.*, 2012). As HIP3, PENTA is a cytosolic ZF-protein.
- PRL1/HIP4, F-box-interacting/kelch, kelch-repeat/HIP5, maybe CDPK/HIP8, maybe the autophagy protein, eIF-5A/HIP12, EF1 α /HIP13 and the 14-3-3-protein/HIP14 possibly are associated in multifaceted ways with the **cytoskeleton**. The actin cytoskeleton is considered as a key player in the bending reaction as a consequence of an unilateral or polarized RL signal (Meske & Hartmann, 1995; Meske *et al.*, 1996). Cytoskeleton organizers thus constitute interesting candidates putatively providing a molecular link between the light signalling complex at the PM and the executing organs.
- At last 14-3-3 proteins are signal proteins which function as **phosphosensors** by recognizing phosphorylated residues in proteins. HIP14 is particularly interesting, because for some (highly similar) *Arabidopsis* 14-3-3 proteins interactions as with different phototropins as with phyB could be detected (the former being characterized in more detail). HIP14 may thus be a component of the the phy-phot light signalling complex at the PM and potentially transduce a light induced phosphorylation signal to downstream members of the signal transduction chain.

If these candidates really serve a signalling function in phytochrome cytoplasmic signalling has now to be proven via KO and physiological analyses. Since most of them are conserved in *Arabidopsis*, the analysis of the moss signalling system could provide valuable insights in the general mode of action of plant phytochromes.

8. Ausblick:

Aus den identifizierten und z.T. charakterisierten Interaktionen von phy4 mit *Physcomitrella* Phototropinen bzw. von phyA mit phot1 ergeben sich einige bislang unbeantwortete Fragen. Zum einen wäre zu klären, ob es sich bei den in Zwiebelzellen beobachteten Vesikel-ähnlichen Strukturen um Überexpressions-Artefakte, oder um physiologisch relevante Strukturen handelt. Es wäre daher sinnvoll diese Beobachtungen mit hochauflösender Konfokalmikroskopie zu verifizieren und ggf. auch unter anderen Lichtbedingungen (D oder BL) zu untersuchen. Wahrscheinlich sind an dem PM-phy4-phot-Signalkomplex auch noch weitere Proteine mindestens zur phot-Verankerung an der PM bzw. Signalüberträger und ggf. Cytoskelett-Organisierer beteiligt. Deren Identität könnte mit einem *Y3H-Screen* oder mit co-IP und anschließender massenspektrometrischer Analyse aufgedeckt werden. Auch könnte untersucht werden, ob es sequenzielle bzw. synergistische physiologische Effekte von RL und BL gibt, beispielsweise in Phototropismus und Chloroplastenbewegung. Die Chloroplastenbewegung in *Physcomitrella* ist BL- und RL-reguliert und die Frage ist, ob es möglicherweise eine R- induzierte Verstärkung des Blaulichteffektes beispielsweise bei der Akkumulationsreaktion gibt. Für letzteres könnte eine Transmissionsmessung von Protonema nach unterschiedlichen Lichtbehandlungen herangezogen werden – ein experimentelles *Setup* dafür wäre bereits zur Hand. Interessant wäre auch zu demonstrieren, ob die physische Interaktion der beiden Photorezeptoren tatsächlich für die beobachtete Beteiligung der Phototropine an RL-Antworten verantwortlich ist. Dazu müssten die genauen Interaktions-*Interfaces* identifiziert und anschließend einzelne AS ausgetauscht werden. Da bereits gezeigt werden konnte, dass die Phototropine im C-terminalen Modul an phy4 binden, würde es ausreichen, unterschiedliche kleinere Stücke des C-Terminus in *Y2H*-Vektoren zu klonieren, und die Interaktion mit Vollängen-Phototropin zu untersuchen. Nach Identifikation von an der Interaktion beteiligten Bereichen würden anschließend mittels *Site-Directed-Mutagenesis* *Missense*-Mutationen in einzelne Fragmente und das Vollängen phy4 eingeführt und anschließend bezüglich einer ausbleibenden Interaktion mit phot1 im *Y2H*-System untersucht. Erweist sich eine Mutation als geeignet, würde ein entsprechendes Konstrukt für die Transformation in *Physcomitrella* hergestellt. Ein geeigneter phy4-KO bzw. der WT würde anschließend stabil transformiert, um den KO zu komplementieren bzw. das WT-phy4 Gen mittels *Gene Replacement* zu ersetzen. Die resultierende(n) *Physcomitrella*-Linie(n) würde(n) anschließend physiologisch bezüglich der bekannten phy4-abhängigen Antworten untersucht.

Im Fall der phyA-phot1-Interaktion ist das postulierte Interaktions-vermittelnde Brückenprotein nach wie vor unbekannt und könnte mit oben genannten Methoden ebenfalls identifiziert werden. PKS1 wurde zwar in diesem Zusammenhang ausgeschlossen, jedoch übernimmt die Kinase dennoch essentielle Funktionen in phy- und phot-*Signalling*. Es wäre interessant herauszufinden, ob PKS1 auch an den durch phy-phot-Ko-Aktion vermittelten Antworten beteiligt ist. Daher wäre es z.B. spannend, die Lokalisation des phot1-PKS1- und des phyA-PKS1-Komplexes in anderen Lichtbedingungen, wie RL, BL und Rp+BL zu betrachten. Dies könnte ggf. auf eine Beteiligung von PKS1 an der Rp-vermittelten Retention von phot an der PM in BL hinweisen bzw. demonstrieren, ob die beobachteten Cytoskelett-ähnlichen Strukturen des phyA-PKS1-Komplexes auch in anderen Lichtbedingungen auftritt. Auch über die erfolgreiche Identifikation von diversen HIPs bleiben noch Fragen offen. Erstens sollte die Untersuchung der *in planta Split-YFP*-Interaktion der putativen TP53-regulierenden Kinase und dem F-Box-*interacting*/Kelch-Protein (u. ggf. auch Analysen des

Rhodopsin-*Tail*- und Autophagie-Proteins) noch nachgeholt werden. Viel wichtiger ist allerdings der Nachweis der physiologischen Relevanz der gefundenen Partner und ob sie tatsächlich eine Rolle im cytoplasmatischen phy4-Signalweg spielen. Daher sind KO- (oder Überexpressions-) Analysen unumgänglich. Zwar ist gezieltes Ausschalten der entsprechenden Gene mittels homologer Rekombination/*Gene Targeting* in *Physcomitrella* mit vergleichsweise hoher Effizienz möglich, jedoch weisen die meisten der Kandidaten z.T. eine beträchtliche Anzahl an Homologen auf, die ggf. mit ausgeschaltet werden sollten, um ggf. redundante Wirkungen ebenfalls zu erfassen. Mit HR ist das simultane Ausschalten mehrerer Gene (auch durch die begrenzte Anzahl pflanzlicher Selektionsmarker *etc.*) nicht möglich bzw. nicht so einfach. In der Zwischenzeit hat sich im Bereich *Genome Editing* jedoch einiges getan und eingehende Forschung hat basierend auf einem bakteriellen Abwehrsystem gegen Fremd-DNA das sehr leistungsstarke, effiziente und vor allem sehr spezifisch arbeitende CRISPR/CAS9-System hervorgebracht (Jinek *et al.*, 2012), welches momentan in aller Munde ist. Das CAS9-Protein bindet im modifizierten System dabei eine im Zielorganismus hergestellte *Guide* RNA auf der zusätzlich eine 20 nt *Target*-Sequenz codiert ist, die damit im Genom identifiziert und von CAS9 geschnitten wird. Im einfachsten Fall wird nur an einer Stelle geschnitten. Das zelleigene DNA-Reparatursystem ligiert die losen Enden anschließend wieder. Da es dabei jedoch relativ häufig zu Nukleotid-Deletionen oder -Insertionen kommt, verschiebt sich ggf. das Leseraster am betreffenden Locus. Es ist auch möglich, durch simultane Anwendung mehrerer *Guide* RNAs an mehreren Stellen eines Locus zu schneiden, und damit größere Stücke aus dem Genom zu entfernen. So lassen sich nicht nur Einzelgene sehr spezifisch ausschalten, man kann auch Gene ersetzen und vor allem auch beliebig viele Stellen im Genom gleichzeitig modifizieren. Eine Arbeitsgruppe in Versailles (INRA) hat das System bereits für *Physcomitrella* etabliert und entsprechende Sequenzdaten und Plasmide zur Verfügung gestellt. Mit den erstellten KO-Linien soll im Anschluss versucht werden, einen Phänotyp bezüglich R-Phototropismus und R-Polarotropismus (und Chloroplasten-Photorelokation?) zu zeigen in Anlehnung an die Arbeiten von Mittmann *et al.* (2004). Sollten phy4-vermittelte RL-Antworten gestört sein, kann man davon ausgehen, dass die entsprechenden Proteine eine Funktion in cytoplasmatischem Phytochrom-Signaltransduktions-Weg besitzen.

9. Literatur

- Abeliovich H, Dunn WA, Jr., Kim J, Klionsky DJ. 2000.** Dissection of autophagosome biogenesis into distinct nucleation and expansion steps. *Journal of Cell Biology* **151**(5): 1025-1034.
- Adams E, Diaz C, Hong JP, Shin R. 2014.** 14-3-3 proteins participate in light signaling through association with PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS. *Int J Mol Sci* **15**(12): 22801-22814.
- Adams J, Kelso R, Cooley L. 2000.** The kelch repeat superfamily of proteins: propellers of cell function. *Trends in Cell Biology* **10**(1): 17-24.
- Adams M, Jia Z. 2005.** Structural and biochemical analysis reveal pirins to possess quercetinase activity. *Journal of Biological Chemistry* **280**(31): 28675-28682.
- Agatep R, Kirkpatrick RD, Parchaliuk DL, Woods RA, Gietz RD. 1998.** Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol protocol. *Technical Tips Online* **3**(1): 133-137.
- Aggarwal C, Banas AK, Kasproicz-Maluski A, Borghetti C, Labuz J, Dobrucki J, Gabrys H. 2014.** Blue-light-activated phototropin2 trafficking from the cytoplasm to Golgi/post-Golgi vesicles. *Journal of Experimental Botany* **65**(12): 3263-3276.
- Aguilar-Hernandez HS, Santos L, Leon-Galvan F, Barrera-Pacheco A, Espitia-Rangel E, De Leon-Rodriguez A, Guevara-Gonzalez RG, Barba de la Rosa AP. 2011.** Identification of calcium stress induced genes in amaranth leaves through suppression subtractive hybridization. *Journal of Plant Physiology* **168**(17): 2102-2109.
- Ahmad KF, Engel CK, Prive GG. 1998.** Crystal structure of the BTB domain from PLZF. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(21): 12123-12128.
- Ahmad M. 1999.** Seeing the world in red and blue: insight into plant vision and photoreceptors. *Curr Opin Plant Biol.* **2**: 230-235.
- Ahmad M, Jarillo JA, Smirnova O, Cashmore AR. 1998.** The CRY1 blue light photoreceptor of *Arabidopsis* interacts with phytochrome A in vitro. *Mol Cell* **1**: 939-948.
- Aihara Y, Tabata R, Suzuki T, Shimazaki K, Nagatani A. 2008.** Molecular basis of the functional specificities of phototropin 1 and 2. *Plant Journal* **56**(3): 364-375.
- Al Sady B, Kikis EA, Monte E, Quail PH. 2008.** Mechanistic duality of transcription factor function in phytochrome signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**(6): 2232-2237.
- Al Sady B, Ni W, Kircher S, Schafer E, Quail PH. 2006.** Photoactivated phytochrome induces rapid PIF3 phosphorylation prior to proteasome-mediated degradation. *Mol Cell* **23**(3): 439-446.
- Albagli O, Dhordain P, Deweindt C, Lecocq G, Leprince D. 1995.** The BTB/POZ domain: a new protein-protein interaction motif common to DNA- and actin-binding proteins. *Cell Growth Differ* **6**(9): 1193-1198.
- Andersen GR, Nissen P, Nyborg J. 2003.** Elongation factors in protein biosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences* **28**(8): 434-441.
- Aravind L, Koonin EV. 1999.** Gleaning non-trivial structural, functional and evolutionary information about proteins by iterative database searches. *Journal of Molecular Biology* **287**(5): 1023-1040.
- Ashton NW, Cove DJ. 1977.** The isolation and preliminary characterisation of auxotrophic and analogue resistant mutants of the moss *Physcomitrella patens*. *Mol.Gen.Genet.* **154**: 87-95.
- Ashton NW, Schulze A, Hall P, Bandurski RS. 1985.** Estimation of indole-3-acetic acid in gametophytes of the moss, *Physcomitrella patens*. *Planta* **164**: 142-144.
- Aulakh SS, Veilleux RE, Dickerman AW, Tang G, Flinn BS. 2014.** Characterization and RNA-seq analysis of underperformer, an activation-tagged potato mutant. *Plant Molecular Biology* **84**(6): 635-658.
- Baena-Gonzalez E, Sheen J. 2008.** Convergent energy and stress signaling. *Trends in Plant Science* **13**(9): 474-482.
- Baker RP, Young K, Feng L, Shi Y, Urban S. 2007.** Enzymatic analysis of a rhomboid intramembrane protease implicates transmembrane helix 5 as the lateral substrate gate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(20): 8257-8262.

- Balasundaram D, Tabor CW, Tabor H. 1991.** Spermidine or spermine is essential for the aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(13): 5872-5876.
- Bardwell VJ, Treisman R. 1994.** The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif. *Genes & Development* **8**(14): 1664-1677.
- Bargonetti J, Manfredi JJ. 2002.** Multiple roles of the tumor suppressor p53. *Curr Opin Oncol* **14**(1): 86-91.
- Bassell GJ, Powers CM, Taneja KL, Singer RH. 1994.** Single mRNAs visualized by ultrastructural in situ hybridization are principally localized at actin filament intersections in fibroblasts. *Journal of Cell Biology* **126**(4): 863-876.
- Bauer D, Viczian A, Kircher S, Nobis T, Nitschke R, Kunkel T, Panigrahi KC, Adam E, Fejes E, Schäfer E, et al. 2004.** Constitutive photomorphogenesis 1 and multiple photoreceptors control degradation of phytochrome interacting factor 3, a transcription factor required for light signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**(6): 1433-1445.
- Bektas M, Nurten R, Gurel Z, Sayers Z, Bermek E. 1994.** Interactions of eukaryotic elongation factor 2 with actin: a possible link between protein synthetic machinery and cytoskeleton. *FEBS Letters* **356**(1): 89-93.
- Ben-Shem A, Fass D, Bibi E. 2007.** Structural basis for intramembrane proteolysis by rhomboid serine proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(2): 462-466.
- Bhalerao RP, Salchert K, Bako L, Okresz L, Szabados L, Muranaka T, Machida Y, Schell J, Koncz C. 1999.** Regulatory interaction of PRL1 WD protein with Arabidopsis SNF1-like protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(9): 5322-5327.
- Binder BM, Harper JF, Sussman MR. 1994.** Characterization of an Arabidopsis calmodulin-like domain protein kinase purified from *Escherichia coli* using an affinity sandwich technique. *Biochemistry* **33**(8): 2033-2041.
- Bittisnich D, Williamson RE. 1985.** Control by phytochrome of extension growth and polarotropism in chloronemata of *Funaria*. *Photochemistry and Photobiology* **42**(4): 429-436.
- Blakeslee JJ, Bandyopadhyay A, Lee OR, Mravec J, Titapiwatanakun B, Sauer M, Makam SN, Cheng Y, Bouchard R, Adamec J, et al. 2007.** Interactions among PIN-FORMED and P-glycoprotein auxin transporters in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**(1): 131-147.
- Boccalandro HE, De Simone SN, Bergmann-Honsberger A, Schepens I, Fankhauser C, Casal JJ. 2008.** PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE1 regulates root phototropism and gravitropism. *Plant Physiology* **146**(1): 108-115.
- Bohmer M, Romeis T. 2007.** A chemical-genetic approach to elucidate protein kinase function in planta. *Plant Molecular Biology* **65**(6): 817-827.
- Bolle C, Koncz C, Chua NH. 2000.** PAT1, a new member of the GRAS family, is involved in phytochrome A signal transduction. *Genes & Development* **14**(10): 1269-1278.
- Borden KL, Freemont PS. 1996.** The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family. *Current Opinion in Structural Biology* **6**(3): 395-401.
- Bork P, Doolittle RF. 1994.** Drosophila kelch motif is derived from a common enzyme fold. *Journal of Molecular Biology* **236**(5): 1277-1282.
- Borthwick HA, Hendricks SB, Parker MW, Toole EH, Toole VK. 1952.** A Reversible photoreaction controlling seed germination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **38**(8): 662-666.
- Böse G, Schwillle P, Lamparter T. 2004.** The mobility of phytochrome within protonemal tip cells of the moss *Ceratodon purpureus*, monitored by fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys.J* **87**(3): 2013-2021.
- Botto JF, Ibarra S, Jones AM. 2009.** The Heterotrimeric G-protein Complex Modulates Light Sensitivity in Arabidopsis thaliana Seed Germination. *Photochemistry and Photobiology* **85**(4): 949-954.
- Bowler C, Neuhaus G, Yamagata H, Chua N-H. 1994.** Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. *Cell* **77**: 73-81.
- Boya P, Reggiori F, Codogno P. 2013.** Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature Cell Biology* **15**(7): 713-720.

- Brandt B, Brodsky DE, Xue S, Negi J, Iba K, Kangasjarvi J, Ghassemian M, Stephan AB, Hu H, Schroeder JI. 2012.** Reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1 anion channel by CPK6 and OST1 kinases and branched ABI1 PP2C phosphatase action. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(26): 10593-10598.
- Braun M. 2001.** Association of spectrin-like proteins with the actin-organized aggregate of endoplasmic reticulum in the Spitzenkörper of gravitropically tip-growing plant cells. *Plant Physiology* **125**(4): 1611-1619.
- Braun M, Hauslage J, Czogalla A, Limbach C. 2004.** Tip-localized actin polymerization and remodeling, reflected by the localization of ADF, profilin and villin, are fundamental for gravity-sensing and polar growth in characean rhizoids. *Planta* **219**(3): 379-388.
- Braun M, Limbach C. 2006.** Rhizoids and protonemata of characean algae: model cells for research on polarized growth and plant gravity sensing. *Protoplasma* **229**(2-4): 133-142.
- Briggs WR, Huala E. 1999.** Blue-light photoreceptors in higher plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **15**: 33-62.
- Briggs WR, Olney MA. 2001.** Photoreceptors in plant photomorphogenesis to date. Five phytochromes, two cryptochromes, one phototropin, and one superchrome. *Plant Physiology* **125**(1): 85-88.
- Buer CS, Kordbacheh F, Truong TT, Hocart CH, Djordjevic MA. 2013.** Alteration of flavonoid accumulation patterns in transparent testa mutants disturbs auxin transport, gravity responses, and imparts long-term effects on root and shoot architecture. *Planta* **238**(1): 171-189.
- Bulgakov VP, Gorpenchenko TY, Shkryl YN, Veremeichik GN, Mischenko NP, Avramenko TV, Fedoreyev SA, Zhuravlev YN. 2011.** CDPK-driven changes in the intracellular ROS level and plant secondary metabolism. *Bioeng Bugs* **2**(6): 327-330.
- Bünning E, Etzold H. 1958.** Über die Wirkung von polarisiertem Licht auf keimende Sporen von Pilzen, Moosen und Farnen. *Ber.dtsch.bot.Ges.* **71**: 304-306.
- Camoni L, Harper JF, Palmgren MG. 1998.** 14-3-3 proteins activate a plant calcium-dependent protein kinase (CDPK). *FEBS Letters* **430**(3): 381-384.
- Cardozo T, Pagano M. 2004.** The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology* **5**(9): 739-751.
- Chamot D, Kuhlemeier C. 1992.** Differential expression of genes encoding the hypusine-containing translation initiation factor, eIF-5A, in tobacco. *Nucleic Acids Research* **20**(4): 665-669.
- Chang WJ, Su HS, Li WJ, Zhang ZL. 2009.** Expression profiling of a novel calcium-dependent protein kinase gene, LeCPK2, from tomato (*Solanum lycopersicum*) under heat and pathogen-related hormones. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**(11): 2427-2431.
- Chapman EJ, Estelle M. 2009.** Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. *Annual Review of Genetics* **43**: 265-285.
- Chater C, Kamisugi Y, Movahedi M, Fleming A, Cuming AC, Gray JE, Beerling DJ. 2011.** Regulatory mechanism controlling stomatal behavior conserved across 400 million years of land plant evolution. *Current Biology* **21**(12): 1025-1029.
- Chatterjee I, Gross SR, Kinzy TG, Chen KY. 2006.** Rapid depletion of mutant eukaryotic initiation factor 5A at restrictive temperature reveals connections to actin cytoskeleton and cell cycle progression. *Molecular Genetics and Genomics* **275**(3): 264-276.
- Chen C-H, Loros JJ. 2009.** Neurospora sees the light: Light signaling components in a model system. *Communicative & Integrative Biology* **2**(5): 448-451.
- Chen KY. 1983.** An 18000-dalton protein metabolically labeled by polyamines in various mammalian cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **756**(3): 395-402.
- Chen KY, Liu AY. 1997.** Biochemistry and function of hypusine formation on eukaryotic initiation factor 5A. *Biol Signals* **6**(3): 105-109.
- Chen L, Bernhardt A, Lee J, Hellmann H. 2015.** Identification of Arabidopsis MYB56 as a novel substrate for CRL3(BPM) E3 ligases. *Mol Plant* **8**(2): 242-250.

- Chen L, Lee JH, Weber H, Tohge T, Witt S, Roje S, Fernie AR, Hellmann H. 2013.** Arabidopsis BPM proteins function as substrate adaptors to a cullin3-based E3 ligase to affect fatty acid metabolism in plants. *Plant Cell* **25**(6): 2253-2264.
- Chen M, Chory J. 2011.** Phytochrome signaling mechanisms and the control of plant development. *Trends in Cell Biology* **21**(11): 664-671.
- Chen M, Ni M. 2006.** RED AND FAR-RED INSENSITIVE 2, a RING-domain zinc finger protein, mediates phytochrome-controlled seedling deetiolation responses. *Plant Physiology* **140**(2): 457-465.
- Chen M, Tao Y, Lim J, Shaw A, Chory J. 2005.** Regulation of phytochrome B nuclear localization through light-dependent unmasking of nuclear-localization signals. *Current Biology* **15**(7): 637-642.
- Chen Y-R, Su Y-s, Tu S-L. 2012.** Distinct phytochrome actions in nonvascular plants revealed by targeted inactivation of phytyl biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**(21): 8310-8315.
- Cheng S-H, Willmann MR, Chen H-C, Sheen J. 2002.** Calcium Signaling through Protein Kinases. The Arabidopsis Calcium-Dependent Protein Kinase Gene Family. *Plant Physiology* **129**(2): 469-485.
- Cheng SH, Sheen J, Gerrish C, Bolwell GP. 2001.** Molecular identification of phenylalanine ammonia-lyase as a substrate of a specific constitutively active Arabidopsis CDPK expressed in maize protoplasts. *FEBS Letters* **503**(2-3): 185-188.
- Cheung MY, Li MW, Yung YL, Wen CQ, Lam HM. 2013.** The unconventional P-loop NTPase OsYchF1 and its regulator OsGAP1 play opposite roles in salinity stress tolerance. *Plant Cell Environ* **36**(11): 2008-2020.
- Cho HY, Tseng TS, Kaiserli E, Sullivan S, Christie JM, Briggs WR. 2007.** Physiological roles of the light, oxygen, or voltage domains of phototropin 1 and phototropin 2 in Arabidopsis. *Plant Physiology* **143**(1): 517-529.
- Cho M, Lee SH, Cho HT. 2007.** P-glycoprotein4 displays auxin efflux transporter-like action in Arabidopsis root hair cells and tobacco cells. *Plant Cell* **19**(12): 3930-3943.
- Choi G, Yi H, Lee J, Kwon YK, Soh MS, Shin B, Luka Z, Hahn TR, Song PS. 1999.** Phytochrome signalling is mediated through nucleoside diphosphate kinase 2. *Nature* **401**(6753): 610-613.
- Christie JM. 2007.** Phototropin blue-light receptors. *Annual Review of Plant Biology* **58**: 21-45.
- Christie JM, Blackwood L, Petersen J, Sullivan S. 2015.** Plant flavoprotein photoreceptors. *Plant & Cell Physiology* **56**(3): 401-413.
- Christie JM, Hitomi K, Arvai AS, Hartfield KA, Mettlen M, Pratt AJ, Tainer JA, Getzoff ED. 2012.** Structural tuning of the fluorescent protein iLOV for improved photostability. *Journal of Biological Chemistry* **287**(26): 22295-22304.
- Christie JM, Reymond P, Powell GK, Bernasconi P, Raibekas AA, Liscum E, Briggs WR. 1998.** Arabidopsis NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science* **282**(5394): 1698-1701.
- Christie JM, Salomon M, Nozue K, Wada M, Briggs WR. 1999.** LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**(15): 8779-8783.
- Christie JM, Swartz TE, Bogomolni RA, Briggs WR. 2002.** Phototropin LOV domains exhibit distinct roles in regulating photoreceptor function. *Plant Journal* **32**(2): 205-219.
- Christie JM, Yang H, Richter GL, Sullivan S, Thomson CE, Lin J, Titapiwatanakun B, Ennis M, Kaiserli E, Lee OR, et al. 2011.** phot1 Inhibition of ABCB19 primes lateral auxin fluxes in the shoot apex required for phototropism. *PLoS.Biol.* **9**(6): e1001076.
- Christodoulou J, Malmendal A, Harper JF, Chazin WJ. 2004.** Evidence for differing roles for each lobe of the calmodulin-like domain in a calcium-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* **279**(28): 29092-29100.
- Citovsky V, Lee LY, Vyas S, Glick E, Chen MH, Vainstein A, Gafni Y, Gelvin SB, Tzfira T. 2006.** Subcellular localization of interacting proteins by bimolecular fluorescence complementation in planta. *Journal of Molecular Biology* **362**(5): 1120-1131.

- Coca M, San Segundo B. 2010.** AtCPK1 calcium-dependent protein kinase mediates pathogen resistance in Arabidopsis. *Plant Journal* **63**(3): 526-540.
- Collings DA, Wasteneys GO, Miyazaki M, Williamson RE. 1994.** Elongation factor 1 alpha is a component of the subcortical actin bundles of characean algae. *Cell Biology International* **18**(11): 1019-1024.
- Colon-Carmona A, Chen DL, Yeh KC, Abel S. 2000.** Aux/IAA proteins are phosphorylated by phytochrome in vitro. *Plant Physiology* **124**(4): 1728-1738.
- Cooper HL, Park MH, Folk J. 1982.** Posttranslational formation of hypusine in a single major protein occurs generally in growing cells and is associated with activation of lymphocyte growth. *Cell* **29**(3): 791-797.
- Cove D. 2005.** The moss *Physcomitrella patens*. *Annu.Rev.Genet.* **39**: 339-358.
- Cove D, Bezanilla M, Harries P, Quatrano R. 2006.** Mosses as model systems for the study of metabolism and development. *Annu.Rev.Plant Biol.* **57**: 497-520.
- Cove D, Schild A, Ashton NW, Hartmann E. 1978.** Genetic and physiological studies of the effect of light on the development of the moss, *Physcomitrella patens*. *Photochem.Photobiol.* **27**: 249-254.
- Cove DJ. 2000.** The generation and modification of cell polarity. *J.Exp.Bot.* **51**(346): 831-838.
- Cove DJ, Knight CD. 1987.** *Gravitropism and phototropism in the moss, Physcomitrella patens*. Cambridge University Press, London.
- Cove DJ, Quatrano RS, Hartmann E. 1996.** The alignment of the axis of asymmetry in regenerating protoplasts of the moss *Ceratodon purpureus* is determined independently of axis polarity. *Development* **122**: 371-379.
- Coyle JE, Qamar S, Rajashankar KR, Nikolov DB. 2002.** Structure of GABARAP in two conformations: implications for GABA(A) receptor localization and tubulin binding. *Neuron* **33**(1): 63-74.
- Cvrckova F, Zarsky V. 2013.** Old AIMs of the exocyst: evidence for an ancestral association of exocyst subunits with autophagy-associated Atg8 proteins. *Plant Signal Behav* **8**(11): e27099.
- Dammann C, Ichida A, Hong B, Romanowsky SM, Hrabak EM, Harmon AC, Pickard BG, Harper JF. 2003.** Subcellular targeting of nine calcium-dependent protein kinase isoforms from Arabidopsis. *Plant Physiology* **132**(4): 1840-1848.
- Datta N, Chen YR, Roux SJ. 1985.** Phytochrome and calcium stimulation of protein phosphorylation in isolated pea nuclei. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **128**(3): 1403-1408.
- Daugeron MC, Lenstra TL, Frizzarin M, El Yacoubi B, Liu X, Baudin-Baillieu A, Lijnzaad P, Decourty L, Saveanu C, Jacquier A, et al. 2011.** Gcn4 misregulation reveals a direct role for the evolutionary conserved EKC/KEOPS in the t6A modification of tRNAs. *Nucleic Acids Research* **39**(14): 6148-6160.
- Davis SJ, Vener AV, Vierstra RD. 1999.** Bacteriophytochromes: phytochrome-like photoreceptors from nonphotosynthetic eubacteria. *Science* **286**(5449): 2517-2520.
- de Boer AH, van Kleeff PJ, Gao J. 2013.** Plant 14-3-3 proteins as spiders in a web of phosphorylation. *Protoplasma* **250**(2): 425-440.
- de Carbonnel M, Davis P, Roelfsema MR, Inoue S, Schepens I, Lariguet P, Geisler M, Shimazaki K, Hangarter R, Fankhauser C. 2010.** The *Arabidopsis* PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE2 protein is a phototropin signaling element that regulates leaf flattening and leaf positioning. *Plant Physiology* **152**(3): 1391-1405.
- DeBlasio SL, Mullen JL, Luesse DR, Hangarter RP. 2003.** Phytochrome modulation of blue light-induced chloroplast movements in Arabidopsis. *Plant Physiology* **133**(4): 1471-1479.
- Dechend R, Hirano F, Lehmann K, Heissmeyer V, Ansieau S, Wulczyn FG, Scheidereit C, Leutz A. 1999.** The Bcl-3 oncoprotein acts as a bridging factor between NF-kappaB/Rel and nuclear co-regulators. *Oncogene* **18**(22): 3316-3323.
- Decker EL, Frank W, Sarnighausen E, Reski R. 2006.** Moss systems biology en route: phytohormones in *Physcomitrella* development. *Plant Biol.(Stuttg)* **8**(3): 397-405.

- Demarsy E, Fankhauser C. 2009.** Higher plants use LOV to perceive blue light. *Current Opinion in Plant Biology* **12**(1): 69-74.
- Demarsy E, Schepens I, Okajima K, Hersch M, Bergmann S, Christie J, Shimazaki K, Tokutomi S, Fankhauser C. 2012.** Phytochrome Kinase Substrate 4 is phosphorylated by the phototropin 1 photoreceptor. *EMBO Journal* **31**(16): 3457-3467.
- Demkiv OT, Kordyum EL, Khorkavtsiv Ya D, Kardash OR, Chaban Ch I. 1998.** Gravi- and photostimuli in moss protonema growth movements. *Adv Space Res* **21**(8-9): 1191-1195.
- Demma M, Warren V, Hock R, Dharmawardhane S, Condeelis J. 1990.** Isolation of an abundant 50,000-dalton actin filament bundling protein from Dictyostelium amoebae. *Journal of Biological Chemistry* **265**(4): 2286-2291.
- Deng XW, Caspar T, Quail PH. 1991.** cop1: a regulatory locus involved in light-controlled development and gene expression in Arabidopsis. *Genes & Development* **5**(7): 1172-1182.
- Deng Z, Osés-Prieto JA, Kutschera U, Tseng TS, Hao L, Burlingame AL, Wang ZY, Briggs WR. 2014.** Blue light-induced proteomic changes in etiolated Arabidopsis seedlings. *J Proteome Res* **13**(5): 2524-2533.
- Denison FC, Paul AL, Zupanska AK, Ferl RJ. 2011.** 14-3-3 proteins in plant physiology. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **22**(7): 720-727.
- Desnos T, Puente P, Whitelam GC, Harberd NP. 2001.** FHY1: a phytochrome A-specific signal transducer. *Genes & Development* **15**(22): 2980-2990.
- Dharmawardhane S, Demma M, Yang F, Condeelis J. 1991.** Compartmentalization and actin binding properties of ABP-50: the elongation factor-1 alpha of Dictyostelium. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **20**(4): 279-288.
- Ding S, Zhang B, Qin F. 2015.** Arabidopsis RZFP34/CHYR1, a Ubiquitin E3 Ligase, Regulates Stomatal Movement and Drought Tolerance via SnRK2.6-Mediated Phosphorylation. *Plant Cell* **27**(11): 3228-3244.
- Ding Z, Galvan-Ampudia CS, Demarsy E, Langowski L, Kleine-Vehn J, Fan Y, Morita MT, Tasaka M, Fankhauser C, Offringa R, et al. 2011.** Light-mediated polarization of the PIN3 auxin transporter for the phototropic response in Arabidopsis. *Nat. Cell Biol.* **13**(4): 447-452.
- Doelling JH, Walker JM, Friedman EM, Thompson AR, Vierstra RD. 2002.** The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in Arabidopsis thaliana. *Journal of Biological Chemistry* **277**(36): 33105-33114.
- Downey M, Houlsworth R, Maringele L, Rollie A, Brehme M, Galicia S, Guillard S, Partington M, Zubko MK, Krogan NJ, et al. 2006.** A genome-wide screen identifies the evolutionarily conserved KEOPS complex as a telomere regulator. *Cell* **124**(6): 1155-1168.
- Duguay J, Jamal S, Liu Z, Wang TW, Thompson JE. 2007.** Leaf-specific suppression of deoxyhypusine synthase in Arabidopsis thaliana enhances growth without negative pleiotropic effects. *Journal of Plant Physiology* **164**(4): 408-420.
- Durso NA, Cyr RJ. 1994.** A calmodulin-sensitive interaction between microtubules and a higher plant homolog of elongation factor-1 alpha. *Plant Cell* **6**(6): 893-905.
- Edmonds BT, Murray J, Condeelis J. 1995.** pH regulation of the F-actin binding properties of Dictyostelium elongation factor 1 alpha. *Journal of Biological Chemistry* **270**(25): 15222-15230.
- Edmonds BT, Wyckoff J, Yeung YG, Wang Y, Stanley ER, Jones J, Segall J, Condeelis J. 1996.** Elongation factor-1 alpha is an overexpressed actin binding protein in metastatic rat mammary adenocarcinoma. *Journal of Cell Science* **109 (Pt 11)**: 2705-2714.
- Ekelund NGA, Sundqvist C, Quail PH, Vierstra RD. 1985.** Chromophore rotation in 124-kdalton Avena phytochrome as measured by light-induced changes in linear dichroism. *Photochemistry and Photobiology* **41**: 221-223.
- El Yacoubi B, Hatin I, Deutsch C, Kahveci T, Rousset JP, Iwata-Reuyl D, Murzin AG, de Crecy-Lagard V. 2011.** A role for the universal Kae1/Qri7/YgjD (COG0533) family in tRNA modification. *EMBO Journal* **30**(5): 882-893.

- Elazar Z, Scherz-Shouval R, Shorer H. 2003.** Involvement of LMA1 and GATE-16 family members in intracellular membrane dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1641**(2-3): 145-156.
- Elich TD, McDonagh AF, Palma LA, Lagarias JC. 1989.** Phytochrome chromophore biosynthesis. Treatment of tetrapyrrole-deficient Avena explants with natural and non-natural bilatrienes leads to formation of spectrally active holoproteins. *J.Biol.Chem.* **264**(1): 183-189.
- Ellard-Ivey M, Hopkins RB, White TJ, Lomax TL. 1999.** Cloning, expression and N-terminal myristoylation of CpCPK1, a calcium-dependent protein kinase from zucchini (Cucurbita pepo L.). *Plant Molecular Biology* **39**(2): 199-208.
- Endo M, Tanigawa Y, Murakami T, Araki T, Nagatani A. 2013.** PHYTOCHROME-DEPENDENT LATE-FLOWERING accelerates flowering through physical interactions with phytochrome B and CONSTANS. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(44): 18017-18022.
- Eprintsev AT, Fedorin DN, Igamberdiev AU. 2013.** Ca(2)(+) is involved in phytochrome A-dependent regulation of the succinate dehydrogenase gene sdh1-2 in Arabidopsis. *Journal of Plant Physiology* **170**(15): 1349-1352.
- Ermer AL, Mailliet K, Hughes J. 2016.** Holophytochrome-interacting proteins in Physcomitrella: putative actors in phytochrome cytoplasmic signaling. *Frontiers in Plant Science* **7**.
- Esch H, Hartmann E, Cove D, Wada M, Lamparter T. 1999.** Phytochrome-controlled phototropism of protonemata of the moss *Ceratodon purpureus*. physiology of the wild type and class 2 ptr-mutants. *Planta* **209**: 290-298.
- Essen L-O, Mailliet J, Hughes J. 2008.** The structure of a complete phytochrome sensory module in the Pr ground state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**(38): 14709-14714.
- Etzold H. 1965.** Der Polarotropismus und Phototropismus der Chloronemen von *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott. *Planta* **64**(3): 254-280.
- Facchin S, Lopreiato R, Ruzzene M, Marin O, Sartori G, Gotz C, Montenarh M, Carignani G, Pinna LA. 2003.** Functional homology between yeast piD261/Bud32 and human PRPK: both phosphorylate p53 and PRPK partially complements piD261/Bud32 deficiency. *FEBS Letters* **549**(1-3): 63-66.
- Facchin S, Sarno S, Marin O, Lopreiato R, Sartori G, Pinna LA. 2002.** Acidophilic character of yeast PID261/BUD32, a putative ancestor of eukaryotic protein kinases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **296**(5): 1366-1371.
- Fankhauser C, Chory J. 1999.** Light receptor kinases in plants! *Curr.Biol.* **9**: R123-126.
- Fankhauser C, Yeh KC, Lagarias JC, Zhang H, Elich TD, Chory J. 1999.** PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in *Arabidopsis*. *Science* **284**(5419): 1539-1541.
- Farmer PK, Choi JH. 1999.** Calcium and phospholipid activation of a recombinant calcium-dependent protein kinase (DcCPK1) from carrot (Daucus carota L.). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1434**(1): 6-17.
- Faulkner IJ, Rubery PH. 1992.** Flavonoids and flavonoid sulphates as probes of auxin-transport regulation in Cucurbita pepo hypocotyl segments and vesicles. *Planta* **186**(4): 618-625.
- Feierbach B, Verde F, Chang F. 2004.** Regulation of a formin complex by the microtubule plus end protein tea1p. *Journal of Cell Biology* **165**(5): 697-707.
- Feng H, Chen Q, Feng J, Zhang J, Yang X, Zuo J. 2007.** Functional characterization of the Arabidopsis eukaryotic translation initiation factor 5A-2 that plays a crucial role in plant growth and development by regulating cell division, cell growth, and cell death. *Plant Physiology* **144**(3): 1531-1545.
- Fenyk S, Campillo Ade S, Pohl E, Hussey PJ, Cann MJ. 2012.** A nucleotide phosphatase activity in the nucleotide binding domain of an orphan resistance protein from rice. *Journal of Biological Chemistry* **287**(6): 4023-4032.
- Fields S, Song O. 1989.** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245-246.

- Fischer C, Speth V, Fleig-Eberenz S, Neuhaus G. 1997.** Induction of Zygotic Polyembryos in Wheat: Influence of Auxin Polar Transport. *Plant Cell* **9**(10): 1767-1780.
- Flint LH, McAlister ED. 1935.** Wavelengths of radiation in the visible spectrum inhibiting the germination of light-sensitive lettuce seed. *Smiths.Misc.Coll.* **94**: 1-11.
- Flint LH, McAlister ED. 1937.** Wavelengths of radiation in the visible spectrum promoting the germination of light-sensitive lettuce seed. *Smiths.Misc.Coll.* **96**: 1-8.
- Flores-Perez U, Perez-Gil J, Closa M, Wright LP, Botella-Pavia P, Phillips MA, Ferrer A, Gershenzon J, Rodriguez-Concepcion M. 2010.** Pleiotropic regulatory locus 1 (PRL1) integrates the regulation of sugar responses with isoprenoid metabolism in Arabidopsis. *Mol Plant* **3**(1): 101-112.
- Franciosini A, Lombardi B, Iafrate S, Pecce V, Mele G, Lupacchini L, Rinaldi G, Kondou Y, Gusmaroli G, Aki S, et al. 2013.** The Arabidopsis COP9 SIGNALOSOME INTERACTING F-BOX KELCH 1 protein forms an SCF ubiquitin ligase and regulates hypocotyl elongation. *Mol Plant* **6**(5): 1616-1629.
- Franklin KA. 2008.** Shade avoidance. *New Phytologist* **179**(4): 930-944.
- Freddolino PL, Gardner KH, Schulten K. 2013.** Signaling mechanisms of LOV domains: new insights from molecular dynamics studies. *Photochem Photobiol Sci* **12**(7): 1158-1170.
- Freemont PS. 1993.** The RING finger. A novel protein sequence motif related to the zinc finger. *Annals of the New York Academy of Sciences* **684**: 174-192.
- Friml J, Wisniewska J, Benkova E, Mendgen K, Palme K. 2002.** Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. *Nature* **415**(6873): 806-809.
- Fryxell KJ, Meyerowitz EM. 1991.** The evolution of rhodopsins and neurotransmitter receptors. *Journal of Molecular Evolution* **33**(4): 367-378.
- Fulton AB. 1993.** Spatial organization of the synthesis of cytoskeletal proteins. *Journal of Cellular Biochemistry* **52**(2): 148-152.
- Furuya M. 1989.** Molecular properties and biogenesis of phytochrome I and II. *Adv.Biophys.* **25**: 133-167.
- Furuya M, Song PS 1994.** Assembly and properties of holophytochrome. In: Kendrick RE, Kronenberg GHM eds. *Photomorphogenesis in Plants*. Dordrecht: Kluwer, 105-140.
- Gagne JM, Downes BP, Shiu SH, Durski AM, Vierstra RD. 2002.** The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(17): 11519-11524.
- Gao X, Chen X, Lin W, Chen S, Lu D, Niu Y, Li L, Cheng C, McCormack M, Sheen J, et al. 2013.** Bifurcation of Arabidopsis NLR immune signaling via Ca(2)(+)-dependent protein kinases. *PLoS Pathog* **9**(1): e1003127.
- Geiger D, Scherzer S, Mumm P, Marten I, Ache P, Matschi S, Liese A, Wellmann C, Al-Rasheid KA, Grill E, et al. 2010.** Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺ affinities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(17): 8023-8028.
- Georgieva EI, López-Rodas G, Loidl P. 1993.** Maize embryo germination. *Planta* **192**(1): 125-129.
- Gidda SK, Miersch O, Levitin A, Schmidt J, Wasternack C, Varin L. 2003.** Biochemical and molecular characterization of a hydroxyjasmonate sulfotransferase from Arabidopsis thaliana. *Journal of Biological Chemistry* **278**(20): 17895-17900.
- Gietz RD, Woods RA. 2002.** Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology* **350**: 87-96.
- Gil P, Kircher S, Adam E, Bury E, Kozma-Bognar L, Schäfer E, Nagy F. 2000.** Photocontrol of subcellular partitioning of phytochrome-B:GFP fusion protein in tobacco seedlings. *Plant Journal* **22**: 135-145.
- Godnev TN, Akulovich NK, Orlovskaja KI, Domash VI. 1966.** [The influence of the phytochrome system on the formation of pigments in carrot tissue culture]. *Dokl.Akad.Nauk.SSSR.* **169**: 692-694.
- Goldsmith MHM. 1977.** The Polar Transport of Auxin. *Annual Review of Plant Physiology* **28**(1): 439-478.

- Goldsmith TH. 1975.** Photoreceptor processes: some problems and perspectives. *J Exp Zool* **194**(1): 89-101.
- Gonen H, Smith CE, Siegel NR, Kahana C, Merrick WC, Chakraborty K, Schwartz AL, Ciechanover A. 1994.** Protein synthesis elongation factor EF-1 alpha is essential for ubiquitin-dependent degradation of certain N alpha-acetylated proteins and may be substituted for by the bacterial elongation factor EF-Tu. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**(16): 7648-7652.
- Goyal A, Szarzynska B, Fankhauser C. 2013.** Phototropism: at the crossroads of light-signaling pathways. *Trends in Plant Science* **18**(7): 393-401.
- Grebenok RJ, Pierson E, Lambert GM, Gong FC, Afonso CL, Haldeman-Cahill R, Carrington JC, Galbraith DW. 1997.** Green-fluorescent protein fusions for efficient characterization of nuclear targeting. *Plant Journal* **11**(3): 573-586.
- Gregio AP, Cano VP, Avaca JS, Valentini SR, Zanelli CF. 2009.** eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **380**(4): 785-790.
- Grimsley JM, Ashton NW, Cove DJ. 1977.** Complementation analysis of auxotrophic mutants of the moss, *Physcomitrella patens*. *Molecular and General Genetics* **155**: 103-107.
- Gross SR, Kinzy TG. 2005.** Translation elongation factor 1A is essential for regulation of the actin cytoskeleton and cell morphology. *Nature Structural & Molecular Biology* **12**(9): 772-778.
- Guo H, Mockler T, Duong H, Lin C. 2001.** SUB1, an Arabidopsis Ca²⁺-binding protein involved in cryptochrome and phytochrome coaction. *Science* **291**(5503): 487-490.
- Ha CM, Jun JH, Nam HG, Fletcher JC. 2004.** BLADE-ON-PETIOLE1 encodes a BTB/POZ domain protein required for leaf morphogenesis in Arabidopsis thaliana. *Plant & Cell Physiology* **45**(10): 1361-1370.
- Hachez C, Laloux T, Reinhardt H, Cavez D, Degand H, Grefen C, De Rycke R, Inze D, Blatt MR, Russinova E, et al. 2014.** Arabidopsis SNAREs SYP61 and SYP121 coordinate the trafficking of plasma membrane aquaporin PIP2;7 to modulate the cell membrane water permeability. *Plant Cell* **26**(7): 3132-3147.
- Haga K, Sakai T. 2012.** PIN auxin efflux carriers are necessary for pulse-induced but not continuous light-induced phototropism in Arabidopsis. *Plant Physiology* **160**(2): 763-776.
- Hall MD, Hoon MA, Ryba NJ, Pottinger JD, Keen JN, Saibil HR, Findlay JB. 1991.** Molecular cloning and primary structure of squid (*Loligo forbesi*) rhodopsin, a phospholipase C-directed G-protein-linked receptor. *Biochemical Journal* **274** (Pt 1): 35-40.
- Hamel LP, Sheen J, Seguin A. 2014.** Ancient signals: comparative genomics of green plant CDPKs. *Trends in Plant Science* **19**(2): 79-89.
- Hamill D, Davis J, Drawbridge J, Suprenant KA. 1994.** Polyribosome targeting to microtubules: enrichment of specific mRNAs in a reconstituted microtubule preparation from sea urchin embryos. *Journal of Cell Biology* **127**(4): 973-984.
- Han IS, Cho HY, Moni A, Lee AY, Briggs WR. 2013.** Investigations on the photoregulation of chloroplast movement and leaf positioning in Arabidopsis. *Plant & Cell Physiology* **54**(1): 48-56.
- Han IS, Tseng TS, Eisinger W, Briggs WR. 2008.** Phytochrome A regulates the intracellular distribution of phototropin 1-green fluorescent protein in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **20**(10): 2835-2847.
- Hanada T, Noda NN, Satomi Y, Ichimura Y, Fujioka Y, Takao T, Inagaki F, Ohsumi Y. 2007.** The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *Journal of Biological Chemistry* **282**(52): 37298-37302.
- Hanahan D 1985.** Techniques for transformation of *E. coli*. In: Glover DM ed. *DNA cloning a practical approach*. Oxford: IRL Press, 109-135.
- Hanauske-Abel HM, Park MH, Hanauske AR, Popowicz AM, Lalande M, Folk JE. 1994.** Inhibition of the G1-S transition of the cell cycle by inhibitors of deoxyhypusine hydroxylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1221**(2): 115-124.

- Hanauske-Abel HM, Slowinska B, Zagulska S, Wilson RC, Staiano-Coico L, Hanauske AR, McCaffrey T, Szabo P. 1995.** Detection of a sub-set of polysomal mRNAs associated with modulation of hypusine formation at the G1-S boundary. Proposal of a role for eIF-5A in onset of DNA replication. *FEBS Letters* **366**(2-3): 92-98.
- Hanazawa M, Kawasaki I, Kunitomo H, Gengyo-Ando K, Bennett KL, Mitani S, Iino Y. 2004.** The *Caenorhabditis elegans* eukaryotic initiation factor 5A homologue, IFF-1, is required for germ cell proliferation, gametogenesis and localization of the P-granule component PGL-1. *Mech Dev* **121**(3): 213-224.
- Hanin M, Volrath S, Bogucki A, Briker M, Ward E, Paszkowski J. 2001.** Gene targeting in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **28**(6): 671-677.
- Hanks SK, Quinn AM, Hunter T. 1988.** The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**(4861): 42-52.
- Harada A, Takemiya A, Inoue S, Sakai T, Shimazaki K. 2013.** Role of RPT2 in leaf positioning and flattening and a possible inhibition of phot2 signaling by phot1. *Plant & Cell Physiology* **54**(1): 36-47.
- Harmon FG, Kay SA. 2003.** The F box protein AFR is a positive regulator of phytochrome A-mediated light signaling. *Current Biology* **13**(23): 2091-2096.
- Harper JF, Binder BM, Sussman MR. 1993.** Calcium and lipid regulation of an *Arabidopsis* protein kinase expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **32**(13): 3282-3290.
- Harper SM, Christie JM, Gardner KH. 2004.** Disruption of the LOV-Jalpha helix interaction activates phototropin kinase activity. *Biochemistry* **43**(51): 16184-16192.
- Hartmann E. 1984.** Influence of light on phototropic bending of moss protonemata of *Ceratodon purpureus*. *Brid.J Hattori Bot Lab.* 87-98.
- Hartmann E, Klingenberg B, Bauer L. 1983.** Phytochrome-mediated phototropism in protonemata of *Ceratodon purpureus*. *Photochem.Photobiol.* **38**: 599-603.
- Hartmann E, Weber M. 1988.** Storage of the phytochrome-mediated phototropic stimulus of moss protonematal cells. *Planta* **175**: 39-49.
- Haseloff J, Siemering KR, Prasher DC, Hodge S. 1997.** Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**(6): 2122-2127.
- Hashimoto M, Negi J, Young J, Israelsson M, Schroeder JI, Iba K. 2006.** *Arabidopsis* HT1 kinase controls stomatal movements in response to CO₂. *Nature Cell Biology* **8**(4): 391-397.
- Haupt W, Mörtel G, Winkelkemper I. 1969.** Demonstration of different dichroic orientation of phytochrome Pr and Pfr. *Planta* **88**(2): 183-186.
- Haupt W, Scheuerlein R. 1990.** Chloroplast movement. *Plant, Cell & Environment* **13**: 595-614.
- Haupt W, Übel H. 1975.** Zum Mechanismus der Phytochromwirkung bei der Chloroplastenbewegung von *Mougeotia*. *Z.Pflanzenphysiol.* **75**(2): 165-171.
- Hayashi M, Inoue S, Takahashi K, Kinoshita T. 2011.** Immunohistochemical detection of blue light-induced phosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase in stomatal guard cells. *Plant & Cell Physiology* **52**(7): 1238-1248.
- Hayashi Y, Nakamura S, Takemiya A, Takahashi Y, Shimazaki K, Kinoshita T. 2010.** Biochemical characterization of in vitro phosphorylation and dephosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant & Cell Physiology* **51**(7): 1186-1196.
- Hecker A, Graille M, Madec E, Gadelle D, Le Cam E, van Tilbergh H, Forterre P. 2009.** The universal Kae1 protein and the associated Bud32 kinase (PRPK), a mysterious protein couple probably essential for genome maintenance in Archaea and Eukarya. *Biochemical Society Transactions* **37**(Pt 1): 29-35.
- Hecker A, Leulliot N, Gadelle D, Graille M, Justome A, Dorlet P, Brochier C, Quevillon-Cheruel S, Le Cam E, van Tilbeurgh H, et al. 2007.** An archaeal orthologue of the universal protein Kae1 is an iron metalloprotein which exhibits atypical DNA-binding properties and apurinic-endonuclease activity in vitro. *Nucleic Acids Research* **35**(18): 6042-6051.

- Hecker A, Lopreiato R, Graille M, Collinet B, Forterre P, Libri D, van Tilbeurgh H. 2008.** Structure of the archaeal Kae1/Bud32 fusion protein MJ1130: a model for the eukaryotic EKC/KEOPS subcomplex. *EMBO Journal* **27**(17): 2340-2351.
- Hectors K, Van Oevelen S, Geuns J, Guisez Y, Jansen MA, Prinsen E. 2014.** Dynamic changes in plant secondary metabolites during UV acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **152**(2): 219-230.
- Heider MR, Munson M. 2012.** Exorcising the exocyst complex. *Traffic* **13**(7): 898-907.
- Herrmann H, Kraml M. 1997.** Time-dependent formation of Pfr-mediated signals for the interaction with blue light in *Mesotaenium* chloroplast orientation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **37**: 60-65.
- Hiltbrunner A, Tscheuschler A, Viczian A, Kunkel T, Kircher S, Schäfer E. 2006.** FHY1 and FHL act together to mediate nuclear accumulation of the phytochrome A photoreceptor. *Plant & Cell Physiology* **47**(8): 1023-1034.
- Hiltbrunner A, Viczian A, Bury E, Tscheuschler A, Kircher S, Toth R, Honsberger A, Nagy F, Fankhauser C, Schäfer E. 2005.** Nuclear accumulation of the phytochrome A photoreceptor requires FHY1. *Current Biology* **15**(23): 2125-2130.
- Hirschmann F, Krause F, Papenbrock J. 2014.** The multi-protein family of sulfotransferases in plants: composition, occurrence, substrate specificity, and functions. *Front Plant Sci* **5**: 556.
- Hisada A, Hanzawa H, Weller JL, Nagatani A, Reid JB, Furuya M. 2000.** Light-induced nuclear translocation of endogenous pea phytochrome A visualized by immunocytochemical procedures. *Plant Cell* **12**: 1063-1078.
- Hoehenwarter W, Thomas M, Nukarinen E, Egelhofer V, Rohrig H, Weckwerth W, Conrath U, Beckers GJ. 2013.** Identification of novel in vivo MAP kinase substrates in *Arabidopsis thaliana* through use of tandem metal oxide affinity chromatography. *Molecular and Cellular Proteomics* **12**(2): 369-380.
- Hofmann AH, Codon AC, Ivascu C, Russo VE, Knight C, Cove D, Schaefer DG, Chakhparonian M, Zryd JP. 1999.** A specific member of the Cab multigene family can be efficiently targeted and disrupted in the moss *Physcomitrella patens*. *Mol.Gen.Genet.* **261**: 92-99.
- Hohm T, Preuten T, Fankhauser C. 2013.** Phototropism: translating light into directional growth. *American Journal of Botany* **100**(1): 47-59.
- Holland JJ, Roberts D, Liscum E. 2009.** Understanding phototropism: from Darwin to today. *Journal of Experimental Botany* **60**(7): 1969-1978.
- Holmes MG, Klein WH. 1985.** Evidence for phytochrome involvement in light-mediated stomatal movement in *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* **166**(3): 348-353.
- Honig A, Avin-Wittenberg T, Ufaz S, Galili G. 2012.** A new type of compartment, defined by plant-specific Atg8-interacting proteins, is induced upon exposure of *Arabidopsis* plants to carbon starvation. *Plant Cell* **24**(1): 288-303.
- Hsiao AI, Vidaver WILL. 1984.** Effects of Temperature and Various Red or Far-red Irradiations on Phytochrome- and Gibberellin A3-mediated Germination Control in Partially Hydrated Lettuce Seeds. *J.Exp.Bot.* **35**: 1771-1781.
- Hsieh HL, Okamoto H, Wang M, Ang LH, Matsui M, Goodman H, Deng XW. 2000.** FIN219, an auxin-regulated gene, defines a link between phytochrome A and the downstream regulator COP1 in light control of *Arabidopsis* development. *Genes & Development* **14**(15): 1958-1970.
- Hua Z, Vierstra RD. 2011.** The cullin-RING ubiquitin-protein ligases. *Annual Review of Plant Biology* **62**: 299-334.
- Huala E, Oeller PW, Liscum E, Han IS, Larsen E, Briggs WR. 1997.** *Arabidopsis* NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* **278**: 2120-2123.
- Hughes J. 2013.** Phytochrome cytoplasmic signaling. *Annual Review of Plant Biology* **64**: 377-402.
- Hughes J, Brückner G, Repp A, Zeidler M, Mittmann F. 2005.** Phytochromes and functions: studies using gene targeting in *Physcomitrella*. In: Wada M, Shimazaki Y, Iino M eds. *Light sensing in plants*. Springer Verlag, Botanical Society of Japan, 103-110.

- Hughes J, Lamparter T. 1999.** Prokaryotes and Phytochrome. The Connection to Chromophores and Signaling. *Plant Physiology* **121**(4): 1059-1068.
- Hughes J, Lamparter T, Mittmann F, Hartmann E, Gärtner W, Wilde A, Börner T. 1997.** A prokaryotic phytochrome. *Nature* **386**: 663-663.
- Huq E, Al Sady B, Hudson M, Kim C, Apel K, Quail PH. 2004.** PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 1 Is a Critical bHLH Regulator of Chlorophyll Biosynthesis. *Science* **305**(5692): 1937-1941.
- Huseby S, Koprivova A, Lee BR, Saha S, Mithen R, Wold AB, Bengtsson GB, Kopriva S. 2013.** Diurnal and light regulation of sulphur assimilation and glucosinolate biosynthesis in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **64**(4): 1039-1048.
- Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, Mizushima N, Tanida I, Kominami E, Ohsumi M, et al. 2000.** A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* **408**(6811): 488-492.
- Iino M. 2006.** Toward understanding the ecological functions of tropisms: interactions among and effects of light on tropisms. *Current Opinion in Plant Biology* **9**(1): 89-93.
- Imaizumi T, Kadota A, Hasebe M, Wada M. 2002.** Cryptochrome light signals control development to suppress auxin sensitivity in the moss *Physcomitrella patens*
1. *Plant Cell* **14**(2): 373-386.
- Inada S, Ohgishi M, Mayama T, Okada K, Sakai T. 2004.** RPT2 Is a signal transducer involved in phototropic response and stomatal opening by association with phototropin 1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **16**(4): 887-896.
- Inomata K, Hammam MA, Kinoshita H, Murata Y, Khawn H, Noack S, Michael N, Lamparter T. 2005.** Sterically locked synthetic bilin derivatives and phytochrome Agp1 from *Agrobacterium tumefaciens* form photoinsensitive Pr- and Pfr-like adducts. *Journal of Biological Chemistry* **280**(26): 24491-24497.
- Inoue S, Kinoshita T, Matsumoto M, Nakayama KI, Doi M, Shimazaki K. 2008a.** Blue light-induced autophosphorylation of phototropin is a primary step for signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**(14): 5626-5631.
- Inoue S, Kinoshita T, Takemiya A, Doi M, Shimazaki K. 2008b.** Leaf positioning of Arabidopsis in response to blue light. *Mol Plant* **1**(1): 15-26.
- Inoue S, Matsushita T, Tomokiyo Y, Matsumoto M, Nakayama KI, Kinoshita T, Shimazaki K. 2011.** Functional analyses of the activation loop of phototropin2 in Arabidopsis. *Plant Physiology* **156**(1): 117-128.
- Inoue Si, Kinoshita T, Takemiya A, Doi M, Shimazaki Ki. 2008.** Leaf positioning of *Arabidopsis* in response to blue light. *Molecular Plant* **1**(1): 15-26.
- Ishida H, Yoshimoto K. 2008.** Chloroplasts are partially mobilized to the vacuole by autophagy. *Autophagy* **4**(7): 961-962.
- Isobe T, Ichimura T, Sunaya T, Okuyama T, Takahashi N, Kuwano R, Takahashi Y. 1991.** Distinct forms of the protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylases. *Journal of Molecular Biology* **217**(1): 125-132.
- Ito N, Phillips SE, Stevens C, Ogel ZB, McPherson MJ, Keen JN, Yadav KD, Knowles PF. 1991.** Novel thioether bond revealed by a 1.7 Å crystal structure of galactose oxidase. *Nature* **350**(6313): 87-90.
- Ito N, Phillips SEV, Yadav KDS, Knowles PF. 1994.** Crystal Structure of a Free Radical Enzyme, Galactose Oxidase. *Journal of Molecular Biology* **238**(5): 704-814.
- Izawa T, Fukata Y, Kimura T, Iwamatsu A, Dohi K, Kaibuchi K. 2000.** Elongation factor-1 alpha is a novel substrate of rho-associated kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **278**(1): 72-78.
- Jaedicke K. 2012.** *Molekulare Charakterisierung der cytoplasmatischen Phytochrom-Funktion in Physcomitrella patens*. PhD, Justus Liebig University, Giessen.

- Jaedicke K, Lichtenthäler AL, Meyberg R, Zeidler M, Hughes J. 2012.** A phytochrome-phototropin light signaling complex at the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**(30): 12231-12236.
- Jaffe L, Etzold H. 1965.** Tropic responses of *Funaria* spores to red light. *Biophys.J.* **5**: 715-742.
- Janoudi AK, Gordon WR, Wagner D, Quail PH, Poff KL. 1997.** Multiple phytochromes are involved in red-light-induced enhancement of first-positive phototropism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **113**(3): 975-979.
- Jarillo JA, Gabrys H, Capel J, Alonso JM, Ecker JR, Cashmore AR. 2001.** Phototropin-related NPL1 controls chloroplast relocation induced by blue light. *Nature* **410**(6831): 952-954.
- Jenkins GI, Courtice GR, Cove DJ. 1986.** Gravitropic responses of wild-type and mutant strains of the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell Environ.* **9**(8): 637-644.
- Jenkins GI, Cove DJ. 1983a.** Light requirements for regeneration of protoplasts of the moss #Physcomitrella patens#. *Planta* **157**: 39-45.
- Jenkins GI, Cove DJ. 1983b.** Phototropism and polarotropism of primary chloronemata of the moss #Physcomitrella patens#: responses of mutant strains. *Planta* **159**: 432-438.
- Jenkins GI, Cove DJ. 1983c.** Phototropism and polarotropism of primary chloronemata of the moss #Physcomitrella patens#: responses of the wild-type. *Planta* **158**: 357-364.
- Jeyaraju DV, Sood A, Laforce-Lavoie A, Pellegrini L. 2013.** Rhomboid proteases in mitochondria and plastids: keeping organelles in shape. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1833**(2): 371-380.
- Ji H, Wang S, Li K, Szakonyi D, Koncz C, Li X. 2015.** PRL1 modulates root stem cell niche activity and meristem size through WOX5 and PLTs in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **81**(3): 399-412.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. 2012.** A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**(6096): 816-821.
- Jones AM, Ecker JR, Chen JG. 2003.** A reevaluation of the role of the heterotrimeric G protein in coupling light responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **131**(4): 1623-1627.
- Jones MA, Feeney KA, Kelly SM, Christie JM. 2007.** Mutational analysis of phototropin 1 provides insights into the mechanism underlying LOV2 signal transmission. *Journal of Biological Chemistry* **282**(9): 6405-6414.
- Kadota A, Sato Y, Wada M. 2000.** Intracellular chloroplast photorelocation in the moss *Physcomitrella patens* is mediated by phytochrome as well as by a blue-light receptor. *Planta* **210**: 932-937.
- Kadota A, Wada M, Furuya M. 1982.** Phytochrome-mediated phototropism and different dichroic orientation of Pr and Pfr in protonemata of the fern *Adiantum capillus-veneris*. *Photochem.Photobiol.* **35**: 533-536.
- Kadota A, Yamada N, Suetsugu N, Hirose M, Saito C, Shoda K, Ichikawa S, Kagawa T, Nakano A, Wada M. 2009.** Short actin-based mechanism for light-directed chloroplast movement in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**(31): 13106-13111.
- Kagawa T. 2003.** The phototropin family as photoreceptors for blue light-induced chloroplast relocation. *J.Plant Res.* **116**(1): 77-82.
- Kagawa T, Sakai T, Suetsugu N, Oikawa K, Ishiguro S, Kato T, Tabata S, Okada K, Wada M. 2001.** *Arabidopsis* NPL1: a phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response. *Science* **291**(5511): 2138-2141.
- Kaiserli E, Sullivan S, Jones MA, Feeney KA, Christie JM. 2009.** Domain swapping to assess the mechanistic basis of *Arabidopsis* phototropin 1 receptor kinase activation and endocytosis by blue light. *Plant Cell* **21**(10): 3226-3244.
- Kami C, Allenbach L, Zourelidou M, Ljung K, Schutz F, Isono E, Watahiki MK, Yamamoto KT, Schwechheimer C, Fankhauser C. 2014.** Reduced phototropism in pks mutants may be due to altered auxin-regulated gene expression or reduced lateral auxin transport. *Plant Journal* **77**(3): 393-403.

- Kami C, Hersch M, Trevisan M, Genoud T, Hiltbrunner A, Bergmann S, Fankhauser C. 2012.** Nuclear phytochrome A signaling promotes phototropism in Arabidopsis. *Plant Cell* **24**(2): 566-576.
- Kanaoka MM, Urban S, Freeman M, Okada K. 2005.** An Arabidopsis Rhomboid homolog is an intramembrane protease in plants. *FEBS Letters* **579**(25): 5723-5728.
- Kanegae T, Hayashida E, Kuramoto C, Wada M. 2006.** A single chromoprotein with triple chromophores acts as both a phytochrome and a phototropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**(47): 17997-18001.
- Kanegae T, Kimura I. 2015.** A phytochrome/phototropin chimeric photoreceptor of fern functions as a blue/far-red light-dependent photoreceptor for phototropism in Arabidopsis. *Plant Journal* **83**(3): 480-488.
- Kang HA, Hershey JW. 1994.** Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **269**(6): 3934-3940.
- Karimi M, Inzé D, Depicker A. 2002.** GATEWAY (TM) vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* **7**(5): 193-195.
- Kasahara M, Kagawa T, Sato Y, Kiyosue T, Wada M. 2004.** Phototropins mediate blue and red light-induced chloroplast movements in *Physcomitrella patens*. *Plant Physiology* **135**(3): 1388-1397.
- Kasahara M, Swartz TE, Olney MA, Onodera A, Mochizuki N, Fukuzawa H, Asamizu E, Tabata S, Kanegae H, Takano M, et al. 2002.** Photochemical properties of the flavin mononucleotide-binding domains of the phototropins from Arabidopsis, rice, and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* **129**(2): 762-773.
- Kato Y, Kawasaki H, Ohyama Y, Morishita T, Iwasaki H, Kokubo T, Hirano H. 2011.** Cell polarity in *Saccharomyces cerevisiae* depends on proper localization of the Bud9 landmark protein by the EKC/KEOPS complex. *Genetics* **188**(4): 871-882.
- Kaur KJ, Ruben L. 1994.** Protein translation elongation factor-1 alpha from *Trypanosoma brucei* binds calmodulin. *Journal of Biological Chemistry* **269**(37): 23045-23050.
- Kawai H, Kanegae T, Christensen S, Kiyosue T, Sato Y, Imaizumi T, Kadota A, Wada M. 2003.** Responses of ferns to red light are mediated by an unconventional photoreceptor. *Nature* **421**(6920): 287-290.
- Kemper WM, Merrick WC, Redfield B, Liu CK, Weissbach H. 1976.** Purification and properties of rabbit reticulocyte elongation factor 1. *Arch Biochem Biophys* **174**(2): 603-612.
- Ketelaar T, Voss C, Dimmock SA, Thumm M, Hussey PJ. 2004.** Arabidopsis homologues of the autophagy protein Atg8 are a novel family of microtubule binding proteins. *FEBS Letters* **567**(2-3): 302-306.
- Khanna R, Huq E, Kikis EA, Al Sady B, Lanzatella C, Quail PH. 2004.** A Novel Molecular Recognition Motif Necessary for Targeting Photoactivated Phytochrome Signaling to Specific Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factors. *Plant Cell* **16**(11): 3033-3044.
- Kidd DG, Lagarias JC. 1990.** Phytochrome from the green alga *Mesotaenium caldariorum*. Purification and preliminary characterization. *J.Biol.Chem.* **265**(12): 7029-7035.
- Kikis EA, Oka Y, Hudson ME, Nagatani A, Quail PH. 2009.** Residues clustered in the light-sensing knot of phytochrome B are necessary for conformer-specific binding to signaling partner PIF3. *PLoS Genetics* **5**(1): e1000352.
- Kim J, Huang WP, Klionsky DJ. 2001.** Membrane recruitment of Aut7p in the autophagy and cytoplasm to vacuole targeting pathways requires Aut1p, Aut2p, and the autophagy conjugation complex. *Journal of Cell Biology* **152**(1): 51-64.
- Kim JI, Shen Y, Han YJ, Park JE, Kirchenbauer D, Soh MS, Nagy F, Schäfer E, Song PS. 2004.** Phytochrome phosphorylation modulates light signaling by influencing the protein-protein interaction. *Plant Cell* **16**(10): 2629-2640.
- Kim L, Kircher S, Toth R, Adam E, Schäfer E, Nagy F. 2000.** Light-induced nuclear import of phytochrome-A:GFP fusion proteins is differentially regulated in transgenic tobacco and Arabidopsis. *Plant Journal* **22**(2): 125-133.

- Kim SG, Park CM. 2007.** Membrane-mediated salt stress signaling in flowering time control. *Plant Signal Behav* **2**(6): 517-518.
- Kinoshita T, Doi M, Suetsugu N, Kagawa T, Wada M, Shimazaki K. 2001.** Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* **414**(6864): 656-660.
- Kinoshita T, Emi T, Tominaga M, Sakamoto K, Shigenaga A, Doi M, Shimazaki K. 2003.** Blue-light- and phosphorylation-dependent binding of a 14-3-3 protein to phototropins in stomatal guard cells of broad bean. *Plant Physiology* **133**(4): 1453-1463.
- Kircher S, Gil P, Kozma-Bognar L, Fejes E, Speth V, Husselstein-Muller T, Bauer D, Adam E, Schäfer A, Nagy F. 2002.** Nucleocytoplasmic partitioning of the plant photoreceptors phytochrome A, B, C, D, and E is regulated differentially by light and exhibits a diurnal rhythm. *Plant Cell* **14**(7): 1541-1555.
- Kircher S, Kozma-Bognar L, Kim L, Adam E, Harter K, Schafer E, Nagy F. 1999.** Light quality dependent nuclear import of the plant photoreceptors phytochrome A and B. *Plant Cell* **11**(8): 1445-1456.
- Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, Kabeya Y, Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi M, Takao T, Noda T, Ohsumi Y. 2000.** The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Journal of Cell Biology* **151**(2): 263-276.
- Kiss JZ, Mullen JL, Correll MJ, Hangarter RP. 2003.** Phytochromes A and B mediate red-light-induced positive phototropism in roots. *Plant Physiology* **131**(3): 1411-1417.
- Kiss JZ, Ruppel NJ, Hangarter RP. 2001.** Phototropism in Arabidopsis roots is mediated by two sensory systems. *Adv.Space Res* **27**(5): 877-885.
- Kisseleva-Romanova E, Lopreiato R, Baudin-Baillieu A, Rousselle JC, Ilan L, Hofmann K, Namane A, Mann C, Libri D. 2006.** Yeast homolog of a cancer-testis antigen defines a new transcription complex. *EMBO Journal* **25**(15): 3576-3585.
- Klein M, Papenbrock J. 2004.** The multi-protein family of Arabidopsis sulphotransferases and their relatives in other plant species. *Journal of Experimental Botany* **55**(404): 1809-1820.
- Klein M, Papenbrock J. 2009.** Kinetics and substrate specificities of desulfo-glucosinolate sulfotransferases in Arabidopsis thaliana. *Physiologia Plantarum* **135**(2): 140-149.
- Klein M, Reichelt M, Gershenzon J, Papenbrock J. 2006.** The three desulfoglucosinolate sulfotransferase proteins in Arabidopsis have different substrate specificities and are differentially expressed. *FEBS Journal* **273**(1): 122-136.
- Kleine-Vehn J, Wabnik K, Martiniere A, Langowski L, Willig K, Naramoto S, Leitner J, Tanaka H, Jakobs S, Robert S, et al. 2011.** Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane. *Molecular Systems Biology* **7**: 540.
- Klosterman S, Choi J, Hadwiger L. 2000.** Programmed cell death is not mediated by a p53 homolog in Pisum sativum. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **56**(5): 197-206.
- Kmiec-Wisniewska B, Krumpe K, Urantowka A, Sakamoto W, Pratje E, Janska H. 2008.** Plant mitochondrial rhomboid, AtRBL12, has different substrate specificity from its yeast counterpart. *Plant Molecular Biology* **68**(1-2): 159-171.
- Knauer S, Holt AL, Rubio-Somoza I, Tucker EJ, Hinze A, Pisch M, Javelle M, Timmermans MC, Tucker MR, Laux T. 2013.** A protodermal miR394 signal defines a region of stem cell competence in the Arabidopsis shoot meristem. *Developmental Cell* **24**(2): 125-132.
- Knauer T, Dummer M, Landgraf F, Forreiter C. 2011.** A negative effector of blue light-induced and gravitropic bending in Arabidopsis. *Plant Physiology* **156**(1): 439-447.
- Kneip C, Hildebrandt P, Schlamann W, Braslavsky SE, Mark F, Schaffner K. 1999.** Protonation state and structural changes of the tetrapyrrole chromophore during the Pr --> Pfr phototransformation of phytochrome: a resonance Raman spectroscopic study. *Biochemistry* **38**: 15185-15192.
- Knighton DR, Zheng JH, Ten Eyck LF, Ashford VA, Xuong NH, Taylor SS, Sowadski JM. 1991.** Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **253**(5018): 407-414.

- Knopf RR, Adam Z. 2012.** Rhomboid proteases in plants - still in square one? *Physiologia Plantarum* **145**(1): 41-51.
- Knopf RR, Feder A, Mayer K, Lin A, Rozenberg M, Schaller A, Adam Z. 2012.** Rhomboid proteins in the chloroplast envelope affect the level of allene oxide synthase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **72**(4): 559-571.
- Kodama Y, Suetsugu N, Kong SG, Wada M. 2010.** Two interacting coiled-coil proteins, WEB1 and PMI2, maintain the chloroplast photorelocation movement velocity in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(45): 19591-19596.
- Kolukisaoglu HÜ, Braun B, Martin WF, Schneider-Poetsch HA. 1993.** Mosses do express conventional, distantly B-type-related phytochromes. Phytochrome of *Physcomitrella patens*. *FEBS* **334**: 95-100.
- Komori R, Amano Y, Ogawa-Ohnishi M, Matsubayashi Y. 2009.** Identification of tyrosylprotein sulfotransferase in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**(35): 15067-15072.
- Koncz C, Kreuzaler F, Kalman Z, Schell J. 1984.** A simple method to transfer, integrate and study expression of foreign genes, such as chicken ovalbumin and alpha-actin in plant tumors. *EMBO Journal* **3**(5): 1029-1037.
- Kong SG, Kagawa T, Wada M, Nagatani A. 2013a.** A C-terminal membrane association domain of phototropin 2 is necessary for chloroplast movement. *Plant & Cell Physiology* **54**(1): 57-68.
- Kong SG, Kinoshita T, Shimazaki K, Mochizuki N, Suzuki T, Nagatani A. 2007.** The C-terminal kinase fragment of *Arabidopsis* phototropin 2 triggers constitutive phototropin responses. *Plant Journal* **51**(5): 862-873.
- Kong SG, Suetsugu N, Kikuchi S, Nakai M, Nagatani A, Wada M. 2013b.** Both phototropin 1 and 2 localize on the chloroplast outer membrane with distinct localization activity. *Plant & Cell Physiology* **54**(1): 80-92.
- Kong SG, Suzuki T, Tamura K, Mochizuki N, Hara-Nishimura I, Nagatani A. 2006.** Blue light-induced association of phototropin 2 with the Golgi apparatus. *Plant Journal* **45**(6): 994-1005.
- Kong SG, Wada M. 2011.** New insights into dynamic actin-based chloroplast photorelocation movement. *Mol Plant* **4**(5): 771-781.
- Koonin EV, Makarova KS, Rogozin IB, Davidovic L, Letellier MC, Pellegrini L. 2003.** The rhomboids: a nearly ubiquitous family of intramembrane serine proteases that probably evolved by multiple ancient horizontal gene transfers. *Genome Biol* **4**(3): R19.
- Koonin EV, Wolf YI, Aravind L. 2000.** Protein fold recognition using sequence profiles and its application in structural genomics. *Adv Protein Chem* **54**: 245-275.
- Korthout HA, Caspers MP, Kottenhagen MJ, Helmer Q, Wang M. 2002.** A tormentor in the quest for plant p53-like proteins. *FEBS Letters* **526**(1-3): 53-57.
- Kosarev P, Mayer KF, Hardtke CS. 2002.** Evaluation and classification of RING-finger domains encoded by the *Arabidopsis* genome. *Genome Biol* **3**(4): RESEARCH0016.
- Krab IM, Parmeggiani A. 1998.** EF-Tu, a GTPase odyssey. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1443**(1-2): 1-22.
- Kraml M. 1994.** Light direction and polarisation. In: Kendrick RE, Kronenberg GHM eds. *Photomorphogenesis in plants*. Dordrecht: Kluwer, 417-446.
- Kudla J, Batistic O, Hashimoto K. 2010.** Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *Plant Cell* **22**(3): 541-563.
- Kuhn BM, Geisler M, Bigler L, Ringli C. 2011.** Flavonols accumulate asymmetrically and affect auxin transport in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **156**(2): 585-595.
- Kulich I, Pecenkova T, Sekeres J, Smetana O, Fendrych M, Foissner I, Hoftberger M, Zarsky V. 2013.** *Arabidopsis* exocyst subcomplex containing subunit EXO70B1 is involved in autophagy-related transport to the vacuole. *Traffic* **14**(11): 1155-1165.
- Kuznetsov SA, Gelfand VI. 1987.** 18 kDa microtubule-associated protein: identification as a new light chain (LC-3) of microtubule-associated protein 1 (MAP-1). *FEBS Letters* **212**(1): 145-148.
- Lagarias JC, Lagarias DM. 1989.** Self-assembly of synthetic phytochrome holoprotein *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 5778-5780.

- Lagarias JC, Rapoport H. 1980.** Chromopeptides from phytochrome. The structure and linkage of the Pr form of the phytochrome chromophore. *Journal of the American Chemical Society* **102**: 4821-4828.
- Laity JH, Lee BM, Wright PE. 2001.** Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Current Opinion in Structural Biology* **11**(1): 39-46.
- Lamparter T, Esch H, Cove D, Hughes J, Hartmann E. 1996.** Aphototropic mutants of the moss *Ceratodon purpureus* with spectrally normal and with spectrally dysfunctional phytochrome. *Pl.Cell & Environ.* **19**: 560-568.
- Lamparter T, Esteban B, Hughes J. 2001.** Phytochrome Cph1 from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. Purification, assembly, and quaternary structure. *European Journal of Biochemistry* **268**(17): 4720-4730.
- Lamparter T, Hughes J, Hartmann E. 1998.** Blue light- and genetically-reversed gravitropic response in protonemata of the moss *Ceratodon purpureus*. *Planta* **206**: 95-102.
- Lamparter T, Podlowski S, Mittmann F, Hartmann E, Schneider-Poetsch HA, Hughes J. 1995.** Phytochrome from protonemal tissue of the moss *Ceratodon purpureus*. *J.Pl.Physiol.* **147**: 426-434.
- Landy A. 1989.** Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annual Review of Biochemistry* **58**: 913-949.
- Lapik YR, Kaufman LS. 2003.** The Arabidopsis cupin domain protein AtPirin1 interacts with the G protein alpha-subunit GPA1 and regulates seed germination and early seedling development. *Plant Cell* **15**(7): 1578-1590.
- Lariguet P, Fankhauser C. 2004.** Hypocotyl growth orientation in blue light is determined by phytochrome A inhibition of gravitropism and phototropin promotion of phototropism. *Plant Journal* **40**(5): 826-834.
- Lariguet P, Schepens I, Hodgson D, Pedmale UV, Trevisan M, Kami C, de Carbonnel M, Alonso JM, Ecker JR, Liscum E, et al. 2006.** PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 1 is a phototropin 1 binding protein required for phototropism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**(26): 10134-10139.
- Laubinger S, Fittinghoff K, Hoecker U. 2004.** The SPA Quartet: A Family of WD-Repeat Proteins with a Central Role in Suppression of Photomorphogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell*: tpc.
- Lebska M, Ciesielski A, Szymona L, Godecka L, Lewandowska-Gnatowska E, Szczegielniak J, Muszynska G. 2010.** Phosphorylation of maize eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) by casein kinase 2: identification of phosphorylated residue and influence on intracellular localization of eIF5A. *Journal of Biological Chemistry* **285**(9): 6217-6226.
- Lee JH, Terzaghi W, Gusmaroli G, Charron JB, Yoon HJ, Chen H, He YJ, Xiong Y, Deng XW. 2008.** Characterization of Arabidopsis and rice DWD proteins and their roles as substrate receptors for CUL4-RING E3 ubiquitin ligases. *Plant Cell* **20**(1): 152-167.
- Lee SB, Park JH, Kaevel J, Sramkova M, Weigert R, Park MH. 2009.** The effect of hypusine modification on the intracellular localization of eIF5A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **383**(4): 497-502.
- Leivar P, Monte E, Al Sady B, Carle C, Storer A, Alonso JM, Ecker JR, Quail PH. 2008.** The Arabidopsis Phytochrome-Interacting Factor PIF7, Together with PIF3 and PIF4, Regulates Responses to Prolonged Red Light by Modulating phyB Levels. *Plant Cell* **20**(2): 337-352.
- Lemberg MK, Freeman M. 2007.** Functional and evolutionary implications of enhanced genomic analysis of rhomboid intramembrane proteases. *Genome Research* **17**(11): 1634-1646.
- Leng RP, Lin Y, Ma W, Wu H, Lemmers B, Chung S, Parant JM, Lozano G, Hakem R, Benchimol S. 2003.** Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation. *Cell* **112**(6): 779-791.
- Lewandowska-Gnatowska E, Szymona L, Lebska M, Szczegielniak J, Muszynska G. 2011.** Phosphorylation of maize eukaryotic translation initiation factor on Ser2 by catalytic subunit CK2. *Molecular and Cellular Biochemistry* **356**(1-2): 241-244.

- Lewis DR, Ramirez MV, Miller ND, Vallabhaneni P, Ray WK, Helm RF, Winkel BS, Muday GK. 2011.** Auxin and ethylene induce flavonol accumulation through distinct transcriptional networks. *Plant Physiology* **156**(1): 144-164.
- Li F, Vierstra RD. 2012.** Autophagy: a multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling. *Trends in Plant Science* **17**(9): 526-537.
- Li FW, Villarreal JC, Kelly S, Rothfels CJ, Melkonian M, Frangedakis E, Ruhsam M, Sigel EM, Der JP, Pittermann J, et al. 2014.** Horizontal transfer of an adaptive chimeric photoreceptor from bryophytes to ferns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(18): 6672-6677.
- Li H, Dauwalder M, Roux SJ. 1991.** Partial purification and characterization of a Ca(2+)-dependent protein kinase from pea nuclei. *Plant Physiology* **96**: 720-727.
- Li H, Zhang J, Vierstra RD, Li H. 2010.** Quaternary organization of a phytochrome dimer as revealed by cryoelectron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**(24): 10872-10877.
- Li J, Mahajan A, Tsai MD. 2006.** Ankyrin repeat: a unique motif mediating protein-protein interactions. *Biochemistry* **45**(51): 15168-15178.
- Li Q, Zhang N, Zhang L, Ma H. 2015.** Differential evolution of members of the rhomboid gene family with conservative and divergent patterns. *New Phytologist* **206**(1): 368-380.
- Lieber D, Lora J, Schrempp S, Lenhard M, Laux T. 2011.** Arabidopsis WIH1 and WIH2 genes act in the transition from somatic to reproductive cell fate. *Current Biology* **21**(12): 1009-1017.
- Lin R, Ding L, Casola C, Ripoll DR, Feschotte C, Wang H. 2007.** Transposase-derived transcription factors regulate light signaling in Arabidopsis. *Science* **318**(5854): 1302-1305.
- Lindeboom JJ, Nakamura M, Hibbel A, Shundyak K, Gutierrez R, Ketelaar T, Emons AM, Mulder BM, Kirik V, Ehrhardt DW. 2013.** A mechanism for reorientation of cortical microtubule arrays driven by microtubule severing. *Science* **342**(6163): 1245533.
- Liscum E, Askinosie SK, Leuchtman DL, Morrow J, Willenburg KT, Coats DR. 2014.** Phototropism: growing towards an understanding of plant movement. *Plant Cell* **26**(1): 38-55.
- Liscum E, Briggs WR. 1995.** Mutations in the NPH1 locus of *Arabidopsis* disrupt the perception of phototropic stimuli. *Plant Cell* **7**: 473-485.
- Liscum E, Hangarter RP. 1993.** Genetic evidence that the red absorbing form of phytochrome B modulates gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **103**: 15-19.
- Litts JC, Kelly JM, Lagarias JC. 1983.** Structure-function studies on phytochrome. Preliminary characterization of highly purified phytochrome from *Avena sativa* enriched in the 124-kilodalton species. *J.Biol.Chem.* **258**(18): 11025-11031.
- Liu Y, Schiff M, Czymmek K, Talloczy Z, Levine B, Dinesh-Kumar SP. 2005.** Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell* **121**(4): 567-577.
- Liu Y, Xiong Y, Bassham DC. 2009.** Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. *Autophagy* **5**(7): 954-963.
- Liu Z, Duguay J, Ma F, Wang TW, Tshin R, Hopkins MT, McNamara L, Thompson JE. 2008.** Modulation of eIF5A1 expression alters xylem abundance in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **59**(4): 939-950.
- Long C, Iino M. 2001.** Light-dependent osmoregulation in pea stem protoplasts. photoreceptors, tissue specificity, ion relationships, and physiological implications. *Plant Physiology* **125**(4): 1854-1869.
- Luesse DR, DeBlasio SL, Hangarter RP. 2010.** Integration of Phot1, Phot2, and PhyB signalling in light-induced chloroplast movements. *Journal of Experimental Botany* **61**(15): 4387-4397.
- Lynch-Day MA, Klionsky DJ. 2010.** The Cvt pathway as a model for selective autophagy. *FEBS Letters* **584**(7): 1359-1366.
- Ma F, Liu Z, Wang TW, Hopkins MT, Peterson CA, Thompson JE. 2010.** Arabidopsis eIF5A3 influences growth and the response to osmotic and nutrient stress. *Plant Cell Environ* **33**(10): 1682-1696.
- Ma L, Li J, Qu L, Hager J, Chen Z, Zhao H, Deng XW. 2001.** Light control of Arabidopsis development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. *Plant Cell* **13**(12): 2589-2607.

- Ma SY, Wu WH. 2007.** AtCPK23 functions in Arabidopsis responses to drought and salt stresses. *Plant Molecular Biology* **65**(4): 511-518.
- Machnicka B, Czogalla A, Hryniewicz-Jankowska A, Boguslawska DM, Grochowalska R, Heger E, Sikorski AF. 2014.** Spectrins: a structural platform for stabilization and activation of membrane channels, receptors and transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1838**(2): 620-634.
- Mann SS, Hammarback JA. 1994.** Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B. *Journal of Biological Chemistry* **269**(15): 11492-11497.
- Manning G, Plowman GD, Hunter T, Sudarsanam S. 2002.** Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends in Biochemical Sciences* **27**(10): 514-520.
- Mao DY, Neculai D, Downey M, Orlicky S, Haffani YZ, Ceccarelli DF, Ho JS, Szilard RK, Zhang W, Ho CS, et al. 2008.** Atomic structure of the KEOPS complex: an ancient protein kinase-containing molecular machine. *Molecular Cell* **32**(2): 259-275.
- Marino D, Froidure S, Canonne J, Ben Khaled S, Khafif M, Pouzet C, Jauneau A, Roby D, Rivas S. 2013.** Arabidopsis ubiquitin ligase MIEL1 mediates degradation of the transcription factor MYB30 weakening plant defence. *Nat Commun* **4**: 1476.
- Marsolais F, Boyd J, Paredes Y, Schinas AM, Garcia M, Elzein S, Varin L. 2007.** Molecular and biochemical characterization of two brassinosteroid sulfotransferases from Arabidopsis, AtST4a (At2g14920) and AtST1 (At2g03760). *Planta* **225**(5): 1233-1244.
- Mata J, Nurse P. 1997.** tea1 and the Microtubular Cytoskeleton Are Important for Generating Global Spatial Order within the Fission Yeast Cell. *Cell* **89**(6): 939-949.
- Mateos JL, Luppi JP, Ogorodnikova OB, Sineshchekov VA, Yanovsky MJ, Braslavsky SE, Gärtner W, Casal JJ. 2006.** Functional and biochemical analysis of the N-terminal domain of phytochrome A. *Journal of Biological Chemistry* **281**(45): 34421-34429.
- Matrosova A, Bogireddi H, Mateo-Penas A, Hashimoto-Sugimoto M, Iba K, Schroeder JI, Israelsson-Nordstrom M. 2015.** The HT1 protein kinase is essential for red light-induced stomatal opening and genetically interacts with OST1 in red light and CO₂-induced stomatal movement responses. *New Phytologist* **208**(4): 1126-1137.
- Matsushita T, Mochizuki N, Nagatani A. 2003.** Dimers of the N-terminal domain of phytochrome B are functional in the nucleus. *Nature* **424**(6948): 571-574.
- Matthews JM, Sunde M. 2002.** Zinc fingers--folds for many occasions. *IUBMB Life* **54**(6): 351-355.
- Mayfield JD, Folta KM, Paul AL, Ferl RJ. 2007.** The 14-3-3 Proteins mu and epsilon influence transition to flowering and early phytochrome response. *Plant Physiology* **145**(4): 1692-1702.
- McCurdy DW, Harmon AC. 1992.** Calcium-dependent protein kinase in the green alga Chara. *Planta* **188**(1): 54-61.
- Meske V, Hartmann E. 1995.** Reorganisation of microfilaments in protonemal tip cells of the moss *Ceratodon purpureus* during the phototropic response. *Protoplasma* **188**: 59-69.
- Meske V, Rupert V, Hartmann E. 1996.** Structural basis for the red light induced repolarisation of tip growth in caulonemal cells of *Ceratodon purpureus*. *Protoplasma* **192**: 189-198.
- Michaeli S, Galili G, Genschik P, Fernie AR, Avin-Wittenberg T. 2016.** Autophagy in Plants--What's New on the Menu? *Trends in Plant Science* **21**(2): 134-144.
- Michaeli S, Honig A, Levanony H, Peled-Zehavi H, Galili G. 2014.** Arabidopsis ATG8-INTERACTING PROTEIN1 is involved in autophagy-dependent vesicular trafficking of plastid proteins to the vacuole. *Plant Cell* **26**(10): 4084-4101.
- Millar AJ. 2004.** Input signals to the plant circadian clock. *Journal of Experimental Botany* **55**(395): 277-283.
- Millar AJ, McGrath RB, Chua N-H. 1994.** Phytochrome phototransduction pathways. *Ann.Rev.Genet.* **28**: 325-349.
- Miller JH. 1972.** *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Miller JH. 1992.** *A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia Coli and Related Bacteria*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Milner-White EJ, Coggins JR, Anton IA. 1991.** Evidence for an ancestral core structure in nucleotide-binding proteins with the type A motif. *Journal of Molecular Biology* **221**(3): 751-754.
- Mitchell J, Gutierrez J, Northup JK. 1995.** Purification, characterization, and partial amino acid sequence of a G protein-activated phospholipase C from squid photoreceptors. *Journal of Biological Chemistry* **270**(2): 854-859.
- Mitra D, Johri MM. 2000.** Enhanced expression of a calcium-dependent protein kinase from the moss *Funaria hygrometrica* under nutritional starvation. *J Biosci* **25**(4): 331-338.
- Mittmann F, Brücker G, Zeidler M, Repp A, Abts T, Hartmann E, Hughes J. 2004.** Targeted knockout in *Physcomitrella* reveals direct actions of phytochrome in the cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**(38): 13939-13944.
- Mittmann F, Dienstbach S, Weisert A, Forreiter C. 2009.** Analysis of the phytochrome gene family in *Ceratodon purpureus* by gene targeting reveals the primary phytochrome responsible for photo- and polarotropism. *Planta* **230**(1): 27-37.
- Möglich A, Yang X, Ayers RA, Moffat K. 2010.** Structure and function of plant photoreceptors. *Annual Review of Plant Biology* **61**: 21-47.
- Molas ML, Kiss JZ. 2008.** PKS1 plays a role in red-light-based positive phototropism in roots. *Plant, Cell & Environment* **31**(6): 842-849.
- Moller B, Schenck D, Luthen H. 2010.** Exploring the link between auxin receptors, rapid cell elongation and organ tropisms. *Plant Signal Behav* **5**(5): 601-603.
- Monte E, Tepperman JM, Al Sady B, Kaczorowski KA, Alonso JM, Ecker JR, Li X, Zhang Y, Quail PH. 2004.** The phytochrome-interacting transcription factor, PIF3, acts early, selectively, and positively in light-induced chloroplast development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**(46): 16091-16098.
- Mori IC, Murata Y, Yang Y, Munemasa S, Wang YF, Andreoli S, Tiriack H, Alonso JM, Harper JF, Ecker JR, et al. 2006.** CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca(2+)-permeable channels and stomatal closure. *PLoS Biology* **4**(10): e327.
- Mosavi LK, Cammett TJ, Desrosiers DC, Peng ZY. 2004.** The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Science* **13**(6): 1435-1448.
- Motchoulski A, Liscum E. 1999.** *Arabidopsis* NPH3: A NPH1 photoreceptor-interacting protein essential for phototropism. *Science* **286**: 961-964.
- Mukae K, Inoue Y, Moriyasu Y. 2015.** ATG5-knockout mutants of *Physcomitrella* provide a platform for analyzing the involvement of autophagy in senescence processes in plant cells. *Plant Signal Behav* **10**(11): e1086859.
- Myers C, Romanowsky SM, Barron YD, Garg S, Azuse CL, Curran A, Davis RM, Hatton J, Harmon AC, Harper JF. 2009.** Calcium-dependent protein kinases regulate polarized tip growth in pollen tubes. *Plant Journal* **59**(4): 528-539.
- Nagano S. 2016.** From photon to signal in phytochromes: similarities and differences between prokaryotic and plant phytochromes. *Journal of Plant Research* **129**(2): 123-135.
- Nagashima A, Suzuki G, Uehara Y, Saji K, Furukawa T, Koshiba T, Sekimoto M, Fujioka S, Kuroha T, Kojima M, et al. 2008.** Phytochromes and cryptochromes regulate the differential growth of *Arabidopsis* hypocotyls in both a PGP19-dependent and a PGP19-independent manner. *Plant Journal* **53**(3): 516-529.
- Nagatani A, Kay SA, Deak M, Chua NH, Furuya M. 1991.** Rice type I phytochrome regulates hypocotyl elongation in transgenic tobacco seedlings. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(12): 5207-5211.
- Nagy F, Kircher S, Schäfer E. 2000.** Nucleo-cytoplasmic partitioning of the plant photoreceptors phytochromes. *Semin. Cell Dev. Biol.* **11**(6): 505-510.
- Nagy F, Schäfer E. 2002.** Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 329-355.
- Nakagawa T, Suzuki T, Murata S, Nakamura S, Hino T, Maeo K, Tabata R, Kawai T, Tanaka K, Niwa Y, et al. 2007.** Improved Gateway Binary Vectors: High-Performance Vectors for

- Creation of Fusion Constructs in Transgenic Analysis of Plants. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **71**(8): 2095-2100.
- Nakasako M, Zikihara K, Matsuoka D, Katsura H, Tokutomi S. 2008.** Structural basis of the LOV1 dimerization of Arabidopsis phototropins 1 and 2. *Journal of Molecular Biology* **381**(3): 718-733.
- Nebel BJ. 1968.** Action spectra for photogrowth and phototropism in protonemata of the moss *Physcomitrium turbinatum*. *Planta* **81**: 287-302.
- Nedelcu AM, Michod RE. 2006.** The evolutionary origin of an altruistic gene. *Molecular Biology and Evolution* **23**(8): 1460-1464.
- Negrutskii BS, El'skaya AV. 1998.** Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha: structure, expression, functions, and possible role in aminoacyl-tRNA channeling. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **60**: 47-78.
- Nemeth K, Salchert K, Putnoky P, Bhalerao R, Koncz-Kalman Z, Stankovic-Stangeland B, Bako L, Mathur J, Okresz L, Stabel S, et al. 1998.** Pleiotropic control of glucose and hormone responses by PRL1, a nuclear WD protein, in Arabidopsis. *Genes & Development* **12**(19): 3059-3073.
- Neuhaus G, Bowler C, Hiratsuka K, Yamagata H, Chua N-H. 1997.** Phytochrome-regulated repression of gene expression requires calcium and cGMP. *EMBO Journal* **16**: 2554-2564.
- Neuhaus G, Bowler C, Kern R, Chua N-H. 1993.** Calcium/calmodulin-dependent and -independent phytochrome signal transduction pathways. *Cell* **73**: 937-952.
- Newman IA, Briggs WR. 1972.** Phytochrome-mediated electric potential changes in oat seedlings. *Plant Physiology* **50**(6): 687-693.
- Ng S, Ivanova A, Duncan O, Law SR, Van Aken O, De Clercq I, Wang Y, Carrie C, Xu L, Kmiec B, et al. 2013.** A membrane-bound NAC transcription factor, ANAC017, mediates mitochondrial retrograde signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**(9): 3450-3471.
- Ni M, Tepperman JM, Quail PH. 1998.** PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell* **95**: 657-667.
- Ni M, Tepperman JM, Quail PH. 1999.** Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light. *Nature* **400**(6746): 781-784.
- Nishiyama R, Mizuno H, Okada S, Yamaguchi T, Takenaka M, Fukuzawa H, Ohyama K. 1999.** Two mRNA species encoding calcium-dependent protein kinases are differentially expressed in sexual organs of Marchantia polymorpha through alternative splicing. *Plant & Cell Physiology* **40**(2): 205-212.
- Nishiyama T, Fujita T, Shin IT, Seki M, Nishide H, Uchiyama I, Kamiya A, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K, et al. 2003.** Comparative genomics of Physcomitrella patens gametophytic transcriptome and Arabidopsis thaliana: implication for land plant evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**(13): 8007-8012.
- Noda T, Fujita N, Yoshimori T. 2009.** The late stages of autophagy: how does the end begin? *Cell Death and Differentiation* **16**(7): 984-990.
- Noh B, Bandyopadhyay A, Peer WA, Spalding EP, Murphy AS. 2003.** Enhanced gravi- and phototropism in plant mdr mutants mislocalizing the auxin efflux protein PIN1. *Nature* **423**(6943): 999-1002.
- Nordmeier W, Johnen P, Hiltbrunner A. 2011.** Residues in the light-sensing knot phytochrome A are important for nuclear transport and downstream signaling.
- Nozue K, Kanegae T, Imaizumi T, Fukuda S, Okamoto H, Yeh KC, Lagarias JC, Wada M. 1998.** A phytochrome from the fern *Adiantum* with features of the putative photoreceptor NPH1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**(26): 15826-15830.
- Oh E, Kim J, Park E, Kim JI, Kang C, Choi G. 2004.** PIL5, a phytochrome-interacting basic helix-loop-helix protein, is a key negative regulator of seed germination in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **16**(11): 3045-3058.

- Oikawa K, Kasahara M, Kiyosue T, Kagawa T, Suetsugu N, Takahashi F, Kanegae T, Niwa Y, Kadota A, Wada M. 2003.** Chloroplast unusual positioning1 is essential for proper chloroplast positioning. *Plant Cell* **15**(12): 2805-2815.
- Oikawa K, Yamasato A, Kong SG, Kasahara M, Nakai M, Takahashi F, Ogura Y, Kagawa T, Wada M. 2008.** Chloroplast outer envelope protein CHUP1 is essential for chloroplast anchorage to the plasma membrane and chloroplast movement. *Plant Physiology* **148**(2): 829-842.
- Okajima K, Aihara Y, Takayama Y, Nakajima M, Kashojiya S, Hikima T, Oroguchi T, Kobayashi A, Sekiguchi Y, Yamamoto M, et al. 2014.** Light-induced conformational changes of LOV1 (light oxygen voltage-sensing domain 1) and LOV2 relative to the kinase domain and regulation of kinase activity in Chlamydomonas phototropin. *Journal of Biological Chemistry* **289**(1): 413-422.
- Okamoto H, Matsui M, Deng XW. 2001.** Overexpression of the heterotrimeric G-protein alpha-subunit enhances phytochrome-mediated inhibition of hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**(7): 1639-1652.
- Onelli E, Cittirio S, Labra M, Ghiani A, Sgorbati S. 2000.** The presence of a p53-like protein during pea seed maturation and germination. *Plant Biosystems* **134**(2): 153-165.
- Orozco-Nunnally DA, Muhammad D, Mezzich R, Lee BS, Jayathilaka L, Kaufman LS, Warpeha KM. 2014.** Pirin1 (PRN1) is a multifunctional protein that regulates quercetin, and impacts specific light and UV responses in the seed-to-seedling transition of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* **9**(4): e93371.
- Orzaez D, de Jong AJ, Woltering EJ. 2001.** A tomato homologue of the human protein PIRIN is induced during programmed cell death. *Plant Molecular Biology* **46**(4): 459-468.
- Osterlund MT, Hardtke CS, Wei N, Deng XW. 2000.** Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature* **405**: 462-466.
- Paik I, Yang S, Choi G. 2012.** Phytochrome regulates translation of mRNA in the cytosol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**(4): 1335-1340.
- Palma K, Zhao Q, Cheng YT, Bi D, Monaghan J, Cheng W, Zhang Y, Li X. 2007.** Regulation of plant innate immunity by three proteins in a complex conserved across the plant and animal kingdoms. *Genes & Development* **21**(12): 1484-1493.
- Pang H, Bartlam M, Zeng Q, Miyatake H, Hisano T, Miki K, Wong LL, Gao GF, Rao Z. 2004.** Crystal structure of human pirin: an iron-binding nuclear protein and transcription cofactor. *Journal of Biological Chemistry* **279**(2): 1491-1498.
- Park MH. 1989.** The essential role of hypusine in eukaryotic translation initiation factor 4D (eIF-4D). Purification of eIF-4D and its precursors and comparison of their activities. *Journal of Biological Chemistry* **264**(31): 18531-18535.
- Park MH, Cooper HL, Folk JE. 1982.** The biosynthesis of protein-bound hypusine (N epsilon -(4-amino-2-hydroxybutyl)lysine). Lysine as the amino acid precursor and the intermediate role of deoxyhypusine (N epsilon -(4-aminobutyl)lysine). *Journal of Biological Chemistry* **257**(12): 7217-7222.
- Park MH, Lee YB, Joe YA. 1997.** Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. *Biol Signals* **6**(3): 115-123.
- Park MH, Nishimura K, Zanelli CF, Valentini SR. 2010.** Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. *Amino Acids* **38**(2): 491-500.
- Park MH, Wolff EC, Folk JE. 1993.** Hypusine: its post-translational formation in eukaryotic initiation factor 5A and its potential role in cellular regulation. *BioFactors* **4**(2): 95-104.
- Park MH, Wolff EC, Lee YB, Folk JE. 1994.** Antiproliferative effects of inhibitors of deoxyhypusine synthase. Inhibition of growth of Chinese hamster ovary cells by guanyl diamines. *Journal of Biological Chemistry* **269**(45): 27827-27832.
- Parks BM, Jones AM, Adamse P, Koornneef M, Kendrick RE, Quail PH. 1987.** The #aurea# mutant of tomato is deficient in spectrophotometrically and immunochemically detectable phytochrome. *Plant Mol.Biol.* **9**: 97-107.

- Parks BM, Quail PH, Hangarter RP. 1996.** Phytochrome A regulates red-light induction of phototropic enhancement in Arabidopsis. *Plant Physiology* **110**(1): 155-162.
- Patel PH, Costa-Mattioli M, Schulze KL, Bellen HJ. 2009.** The Drosophila deoxyhypusine hydroxylase homologue nero and its target eIF5A are required for cell growth and the regulation of autophagy. *Journal of Cell Biology* **185**(7): 1181-1194.
- Pathak E, Atri N, Mishra R. 2014.** Analysis of P-Loop and its Flanking Region Subsequence of Diverse NTPases Reveals Evolutionary Selected Residues. *Bioinformation* **10**(4): 216-220.
- Patton EE, Willems AR, Sa D, Kuras L, Thomas D, Craig KL, Tyers M. 1998a.** Cdc53 is a scaffold protein for multiple Cdc34/Skp1/F-box protein complexes that regulate cell division and methionine biosynthesis in yeast. *Genes & Development* **12**(5): 692-705.
- Patton EE, Willems AR, Tyers M. 1998b.** Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skp the F-box hypothesis. *Trends in Genetics* **14**(6): 236-243.
- Paul AL, Folta KM, Ferl RJ. 2008.** 14-3-3 proteins, red light and photoperiodic flowering: A point of connection? *Plant Signal Behav* **3**(8): 511-515.
- Paul AL, Sehnke PC, Ferl RJ. 2005.** Isoform-specific subcellular localization among 14-3-3 proteins in Arabidopsis seems to be driven by client interactions. *Mol Biol Cell* **16**(4): 1735-1743.
- Pedmale UV, Liscum E. 2007.** Regulation of phototropic signaling in Arabidopsis via phosphorylation state changes in the phototropin 1-interacting protein NPH3. *Journal of Biological Chemistry* **282**(27): 19992-20001.
- Peer WA, Blakeslee JJ, Yang H, Murphy AS. 2011.** Seven things we think we know about auxin transport. *Mol Plant* **4**(3): 487-504.
- Peer WA, Brown DE, Tague BW, Muday GK, Taiz L, Murphy AS. 2001.** Flavonoid accumulation patterns of transparent testa mutants of arabidopsis. *Plant Physiology* **126**(2): 536-548.
- Peggion C, Lopreiato R, Casanova E, Ruzzene M, Facchin S, Pinna LA, Carignani G, Sartori G. 2008.** Phosphorylation of the Saccharomyces cerevisiae Grx4p glutaredoxin by the Bud32p kinase unveils a novel signaling pathway involving Sch9p, a yeast member of the Akt / PKB subfamily. *FEBS Journal* **275**(23): 5919-5933.
- Perroud PF, Quatrano RS. 2006.** The role of ARPC4 in tip growth and alignment of the polar axis in filaments of Physcomitrella patens. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **63**(3): 162-171.
- Pfeifer A, Mathes T, Lu Y, Hegemann P, Kottke T. 2010.** Blue light induces global and localized conformational changes in the kinase domain of full-length phototropin. *Biochemistry* **49**(5): 1024-1032.
- Pfeiffer A, Nagel MK, Popp C, Wust F, Bindics J, Viczian A, Hiltbrunner A, Nagy F, Kunkel T, Schäfer E. 2012.** Interaction with plant transcription factors can mediate nuclear import of phytochrome B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**(15): 5892-5897.
- Pnueli L, Gutfinger T, Hareven D, Ben-Naim O, Ron N, Adir N, Lifschitz E. 2001.** Tomato SP-interacting proteins define a conserved signaling system that regulates shoot architecture and flowering. *Plant Cell* **13**(12): 2687-2702.
- Poppe C, Hangarter RP, Sharrock RA, Nagy F, Schäfer E. 1996.** The light-induced reduction of the gravitropic growth- orientation of seedlings of Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. is a photomorphogenic response mediated synergistically by the far-red- absorbing forms of phytochromes A and B. *Planta* **199**: 511-514.
- Possart A, Hiltbrunner A. 2013.** An evolutionarily conserved signaling mechanism mediates far-red light responses in land plants. *Plant Cell* **25**(1): 102-114.
- Purwestri YA, Ogaki Y, Tamaki S, Tsuji H, Shimamoto K. 2009.** The 14-3-3 protein GF14c acts as a negative regulator of flowering in rice by interacting with the florigen Hd3a. *Plant & Cell Physiology* **50**(3): 429-438.
- Putnam-Evans C, Harmon AC, Palevitz BA, Fechheimer M, Cormier MJ. 1989.** Calcium-dependent protein kinase is localized with F-actin in plant cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **12**(1): 12-22.
- Quail PH. 1983.** Rapid action of phytochrome in photomorphogenesis. *Encycl.Pl.Physiol.* **16A**: 178-212.

- Quail PH. 2010.** Phytochromes. *Current Biology* **20**(12): R504-507.
- Quail PH, Boylan MT, Parks BM, Short TW, Xu Y, Wagner D. 1995.** Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. *Science* **268**(5211): 675-680.
- Racusen R, Satter RL. 1975.** Rhythmic and phytochrome-regulated changes in transmembrane potential in samanea pulvini. *Nature* **255**(5507): 408-410.
- Ramakrishnan C, Dani VS, Ramasarma T. 2002.** A conformational analysis of Walker motif A [GXXXXGKT (S)] in nucleotide-binding and other proteins. *Protein Engineering* **15**(10): 783-798.
- Ransom-Hodgkins WD. 2009.** The application of expression analysis in elucidating the eukaryotic elongation factor one alpha gene family in Arabidopsis thaliana. *Molecular Genetics and Genomics* **281**(4): 391-405.
- Reggiori F, Klionsky DJ. 2013.** Autophagic processes in yeast: mechanism, machinery and regulation. *Genetics* **194**(2): 341-361.
- Ren B, Chen Q, Hong S, Zhao W, Feng J, Feng H, Zuo J. 2013.** The Arabidopsis eukaryotic translation initiation factor eIF5A-2 regulates root protoxylem development by modulating cytokinin signaling. *Plant Cell* **25**(10): 3841-3857.
- Rensing SA, Ick J, Fawcett JA, Lang D, Zimmer A, Van de PY, Reski R. 2007.** An ancient genome duplication contributed to the abundance of metabolic genes in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC.Evol.Biol.* **7**: 130.
- Rensing SA, Lang D, Zimmer AD, Terry A, Salamov A, Shapiro H, Nishiyama T, Perroud PF, Lindquist EA, Kamisugi Y, et al. 2008.** The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* **319**(5859): 64-69.
- Repp A, Mikami K, Mittmann F, Hartmann E. 2004.** Phosphoinositide-specific phospholipase C is involved in cytokinin and gravity responses in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Journal* **40**(2): 250-259.
- Roberts D, Pedmale UV, Morrow J, Sachdev S, Lechner E, Tang X, Zheng N, Hannink M, Genschik P, Liscum E. 2011.** Modulation of phototropic responsiveness in Arabidopsis through ubiquitination of phototropin 1 by the CUL3-Ring E3 ubiquitin ligase CRL3(NPH3). *Plant Cell* **23**(10): 3627-3640.
- Roberts DM, Harmon AC. 1992.** Calcium-Modulated Proteins: Targets of Intracellular Calcium Signals in Higher Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **43**(1): 375-414.
- Robson PR, Smith H. 1996.** Genetic and transgenic evidence that phytochrome A and B act to modulate the gravitropic orientation of *Arabidopsis thaliana* hypocotyls. *Plant Physiology* **110**: 211-216.
- Rojas-Benitez D, Ibar C, Glavic A. 2013.** The Drosophila EKC/KEOPS complex: roles in protein synthesis homeostasis and animal growth. *Fly (Austin)* **7**(3): 168-172.
- Rösler J. 2010.** *Charakterisierung und Identifizierung von Komponenten und Ereignissen der frühen Phytochrom A Signaltransduktion in Arabidopsis thaliana*. PhD, Justus Liebig Universität, Giessen.
- Rösler J, Jaedicke K, Zeidler M. 2010.** Cytoplasmic phytochrome action. *Plant & Cell Physiology* **51**(8): 1248-1254.
- Rösler J, Klein I, Zeidler M. 2007.** Arabidopsis fhl/fhy1 double mutant reveals a distinct cytoplasmic action of phytochrome A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**(25): 10737-10742.
- Rouleau M, Marsolais F, Richard M, Nicolle L, Voigt B, Adam G, Varin L. 1999.** Inactivation of brassinosteroid biological activity by a salicylate-inducible steroid sulfotransferase from *Brassica napus*. *Journal of Biological Chemistry* **274**(30): 20925-20930.
- Roux SJ. 1983.** A possible role for Ca²⁺ in mediating phytochrome responses. *Symp.Soc.Exp.Biol.* **36**:561-80: 561-580.
- Rubtsov AM, Lopina OD. 2000.** Ankyrins. *FEBS Letters* **482**(1-2): 1-5.
- Rüdiger W, Brandlmeier T, Bloss I, Goassauer A, Weller JP. 1980.** Isolation of the phytochrome chromophore. The cleavage reaction with hydrogen bromide. *Z.Naturforsch.* **35c**: 763-769.

- Rüdiger W, Thümmeler F, Cmiel E, Schneider S. 1983.** Chromophore structure of the physiologically active form (P_{fr}) of phytochrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**(20): 6244-6248.
- Rutschmann F, Stalder U, Piotrowski M, Oecking C, Schaller A. 2002.** LeCPK1, a calcium-dependent protein kinase from tomato. Plasma membrane targeting and biochemical characterization. *Plant Physiology* **129**(1): 156-168.
- Saibil H, Hewat E. 1987.** Ordered transmembrane and extracellular structure in squid photoreceptor microvilli. *Journal of Cell Biology* **105**(1): 19-28.
- Saijo Y, Sullivan JA, Wang H, Yang J, Shen Y, Rubio V, Ma L, Hoecker U, Deng XW. 2003.** The COP1-SPA1 interaction defines a critical step in phytochrome A-mediated regulation of HY5 activity. *Genes & Development* **17**(21): 2642-2647.
- Saijo Y, Zhu D, Li J, Rubio V, Zhou Z, Shen Y, Hoecker U, Wang H, Deng XW. 2008.** Arabidopsis COP1/SPA1 complex and FHY1/FHY3 associate with distinct phosphorylated forms of phytochrome A in balancing light signaling. *Molecular Cell* **31**(4): 607-613.
- Saini P, Eyler DE, Green R, Dever TE. 2009.** Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. *Nature* **459**(7243): 118-121.
- Sakai T, Kagawa T, Kasahara M, Swartz TE, Christie JM, Briggs WR, Wada M, Okada K. 2001.** Arabidopsis nph1 and npl1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**(12): 6969-6974.
- Sakai T, Wada T, Ishiguro S, Okada K. 2000.** RPT2. A signal transducer of the phototropic response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**: 225-236.
- Sakamoto K, Briggs WR. 2002.** Cellular and subcellular localization of phototropin 1. *Plant Cell* **14**(8): 1723-1735.
- Sakamoto K, Nagatani A. 1996.** Nuclear localization activity of phytochrome B. *Plant Journal* **10**: 859-868.
- Salomon M, Christie JM, Knieb E, Lempert U, Briggs WR. 2000.** Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin. *Biochemistry* **39**(31): 9401-9410.
- Salomon M, Knieb E, von Zeppelin T, Rudiger W. 2003.** Mapping of low- and high-fluence autophosphorylation sites in phototropin 1. *Biochemistry* **42**(14): 4217-4225.
- Salomon M, Lempert U, Rüdiger W. 2004.** Dimerization of the plant photoreceptor phototropin is probably mediated by the LOV1 domain. *FEBS Letters* **572**(17): 8-10.
- Sambrook J, Russel D. 2001.** *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saraste M, Sibbald PR, Wittinghofer A. 1990.** The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem.Sci.* **15**(11): 430-434.
- Sato Y, Wada M, Kadota A. 2001.** Choice of tracks, microtubules and/or actin filaments for chloroplast photo-movement is differentially controlled by phytochrome and a blue light receptor
2. *Journal of Cell Science* **114**(Pt 2): 269-279.
- Saurin AJ, Borden KL, Boddy MN, Freemont PS. 1996.** Does this have a familiar RING? *Trends in Biochemical Sciences* **21**(6): 208-214.
- Sawa M, Nusinow DA, Kay SA, Imaizumi T. 2007.** FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in *Arabidopsis*. *Science* **318**(5848): 261-265.
- Sawahel W, Onde S, Knight C, Cove D. 1992.** Transfer of foreign DNA into *Physcomitrella patens* protonemal tissue by using the gene gun. *Plant Mol.Biol.Reporter*. **10**: 314-315.
- Schaefer DG, Zryd JP. 1997.** Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Journal* **11**(6): 1195-1206.
- Schaefer DG, Zryd JP, Knight CD, Cove DJ. 1991.** Stable transformation of the moss *Physcomitrella patens*. *Mol.Gen.Genet.* **226**(3): 418-424.
- Schäfer E, Nagy F 2006.** Photomorphogenesis in Plants and Bacteria. In Schäfer E, Nagy F. Dordrecht: Springer.

- Schepens I, Duek P, Fankhauser C. 2004.** Phytochrome-mediated light signalling in Arabidopsis. *Curr.Opin.Plant Biol.* **7**(5): 564-569.
- Schild A. 1981.** *Untersuchungen zur Sporenkeimung und Protonemaentwicklung bei dem Laubmoos Physcomitrella patens*. PhD, University of Mainz.
- Schlumpberger M, Schaeffeler E, Straub M, Bredschneider M, Wolf DH, Thumm M. 1997.** AUT1, a gene essential for autophagocytosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **179**(4): 1068-1076.
- Schmidt von Braun S. 2008.** *Chup1 - a chloroplast movement protein and its interactions*. Dissertation, LMU München.
- Schmidt von Braun S, Schleiff E. 2008.** The chloroplast outer membrane protein CHUP1 interacts with actin and profilin. *Planta* **227**(5): 1151-1159.
- Schnepf E. 1986.** Cellular polarity. *Ann.Rev.Plant Physiol.* **37**: 23-47.
- Schumann N, Navarro-Quezada A, Ullrich K, Kuhl C, Quint M. 2011.** Molecular evolution and selection patterns of plant F-box proteins with C-terminal kelch repeats. *Plant Physiology* **155**(2): 835-850.
- Schwechheimer C, Deng XW. 2000.** The COP/DET/FUS proteins-regulators of eukaryotic growth and development. *Semin.Cell Dev.Biol.* **11**(6): 495-503.
- Schwelberger HG, Kang HA, Hershey JW. 1993.** Translation initiation factor eIF-5A expressed from either of two yeast genes or from human cDNA. Functional identity under aerobic and anaerobic conditions. *Journal of Biological Chemistry* **268**(19): 14018-14025.
- Schwuchow JM, Kern VD, White NJ, Sack FD. 2002.** Conservation of the plastid sedimentation zone in all moss genera with known gravitropic protonemata. *Journal of Plant Growth Regulation* **21**: 146-155.
- Schwuchow JM, Kim D, Sack FD. 1995.** Caulonemal gravitropism and amyloplast sedimentation in the moss *Funaria*. *Can.J.Bot.* **73**(1029): 1035.
- Searle I, Coupland G. 2004.** Induction of flowering by seasonal changes in photoperiod. *EMBO Journal* **23**(6): 1217-1222.
- Seo HS, Watanabe E, Tokutomi S, Nagatani A, Chua NH. 2004.** Photoreceptor ubiquitination by COP1 E3 ligase desensitizes phytochrome A signaling. *Genes & Development* **18**(6): 617-622.
- Seo PJ, Kim SG, Park CM. 2008.** Membrane-bound transcription factors in plants. *Trends in Plant Science* **13**(10): 550-556.
- Shacklock PS, Read ND, Trewavas AJ. 1992.** Cytosolic free calcium mediates red light-induced photomorphogenesis. *Nature* **358**(6389): 753-755.
- Sharrock RA, Clack T. 2002.** Patterns of expression and normalized levels of the five Arabidopsis phytochromes. *Plant Physiology* **130**(1): 442-456.
- Sharrock RA, Parks BM, Koornneef M, Quail PH. 1988.** Molecular analysis of the phytochrome deficiency in an *aurea* mutant of tomato. *Mol.Gen.Genet.* **213**: 9-14.
- Shen YH, Godlewski J, Bronisz A, Zhu J, Comb MJ, Avruch J, Tzivion G. 2003.** Significance of 14-3-3 self-dimerization for phosphorylation-dependent target binding. *Mol Biol Cell* **14**(11): 4721-4733.
- Shestakova EA, Motuz LP, Minin AA, Gavrilova LP. 1993.** Study of localization of the protein-synthesizing machinery along actin filament bundles. *Cell Biology International* **17**(4): 409-416.
- Shi XP, Yin KC, Zimolo ZA, Stern AM, Waxman L. 1996.** The subcellular distribution of eukaryotic translation initiation factor, eIF-5A, in cultured cells. *Experimental Cell Research* **225**(2): 348-356.
- Shibata M, Oikawa K, Yoshimoto K, Kondo M, Mano S, Yamada K, Hayashi M, Sakamoto W, Ohsumi Y, Nishimura M. 2013.** Highly oxidized peroxisomes are selectively degraded via autophagy in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**(12): 4967-4983.
- Shiina N, Gotoh Y, Kubomura N, Iwamatsu A, Nishida E. 1994.** Microtubule severing by elongation factor 1 alpha. *Science* **266**(5183): 282-285.
- Shimizu-Sato S, Huq E, Tepperman JM, Quail PH. 2002.** A light-switchable gene promoter system. *Nature Biotechnology* **20**(10): 1041-1044.

- Shin DH, Cho MH, Kim TL, Yoo J, Kim JI, Han YJ, Song PS, Jeon JS, Bhoo SH, Hahn TR. 2010.** A small GTPase activator protein interacts with cytoplasmic phytochromes in regulating root development. *Journal of Biological Chemistry* **285**(42): 32151-32159.
- Shin R, Jez JM, Basra A, Zhang B, Schachtman DP. 2011.** 14-3-3 proteins fine-tune plant nutrient metabolism. *FEBS Letters* **585**(1): 143-147.
- Short TW, Briggs WR. 1990.** Characterization of a rapid, blue-light mediated change in detectable phosphorylation of a plasma membrane protein from etiolated pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. *Pl. Physiol.* **92**: 179-185.
- Shpilka T, Weidberg H, Pietrokovski S, Elazar Z. 2011.** Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family. *Genome Biol* **12**(7): 226.
- Sinnige MP, Roobeek I, Bunney TD, Visser AJ, Mol JN, de Boer AH. 2005.** Single amino acid variation in barley 14-3-3 proteins leads to functional isoform specificity in the regulation of nitrate reductase. *Plant Journal* **44**(6): 1001-1009.
- Slavikova S, Shy G, Yao Y, Glozman R, Levanony H, Pietrokovski S, Elazar Z, Galili G. 2005.** The autophagy-associated Atg8 gene family operates both under favourable growth conditions and under starvation stresses in Arabidopsis plants. *Journal of Experimental Botany* **56**(421): 2839-2849.
- Slobin LI. 1980.** The role of eucaryotic factor Tu in protein synthesis. The measurement of the elongation factor Tu content of rabbit reticulocytes and other mammalian cells by a sensitive radioimmunoassay. *European Journal of Biochemistry* **110**(2): 555-563.
- Smit-McBride Z, Dever TE, Hershey JW, Merrick WC. 1989.** Sequence determination and cDNA cloning of eukaryotic initiation factor 4D, the hypusine-containing protein. *Journal of Biological Chemistry* **264**(3): 1578-1583.
- Smith H. 1982.** Light quality, photoperception and plant strategy. *Annual Review of Plant Physiology* **33**: 481-518.
- Smith H. 2000.** Phytochromes and light signal perception by plants--an emerging synthesis. *Nature* **407**: 585-591.
- Smith H, Whitelam GC. 1997.** The shade avoidance syndrome: multiple responses mediated by multiple phytochromes. *Plant Cell Environ.* **20**: 840-844.
- Soellick T-R, Uhrig JF. 2001.** Development of an optimized interaction-mating protocol for large-scale yeast two-hybrid analyses. *Genome Biology* **2**(12): research0052.0051-research0052.0057.
- Somers DE, Devlin PF, Kay SA. 1998.** Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the Arabidopsis circadian clock. *Science* **282**: 1488-1490.
- Song JB, Gao S, Sun D, Li H, Shu XX, Yang ZM. 2013.** miR394 and LCR are involved in Arabidopsis salt and drought stress responses in an abscisic acid-dependent manner. *BMC Plant Biology* **13**: 210.
- Song JB, Huang SQ, Dalmay T, Yang ZM. 2012.** Regulation of leaf morphology by microRNA394 and its target LEAF CURLING RESPONSIVENESS. *Plant & Cell Physiology* **53**(7): 1283-1294.
- Song JB, Shu XX, Shen Q, Li BW, Song J, Yang ZM. 2015.** Altered Fruit and Seed Development of Transgenic Rapeseed (*Brassica napus*) Over-Expressing MicroRNA394. *PLoS One* **10**(5): e0125427.
- Srinivasan M, Mehta P, Yu Y, Prugar E, Koonin EV, Karzai AW, Sternglanz R. 2011.** The highly conserved KEOPS/EKC complex is essential for a universal tRNA modification, t6A. *EMBO Journal* **30**(5): 873-881.
- Steiner AM. 1969.** Dose response behaviour for polarotropism of the germ tube of the liverwort *Sphaerocarpus donnellii* Aust. *Planta* **86**: 334-342.
- Stellberger T, Hauser R, Baiker A, Pothineni VR, Haas J, Uetz P. 2010.** Improving the yeast two-hybrid system with permutated fusions proteins: the Varicella Zoster Virus interactome. *Proteome Sci* **8**: 8.

- Stocchetto S, Marin O, Carignani G, Pinna LA. 1997.** Biochemical evidence that *Saccharomyces cerevisiae* YGR262c gene, required for normal growth, encodes a novel Ser/Thr-specific protein kinase. *FEBS Letters* **414**(1): 171-175.
- Stogios PJ, Downs GS, Jauhal JJ, Nandra SK, Prive GG. 2005.** Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome Biol* **6**(10): R82.
- Stone BB, Stowe-Evans EL, Harper RM, Celaya RB, Ljung K, Sandberg G, Liscum E. 2008.** Disruptions in AUX1-dependent auxin influx alter hypocotyl phototropism in *Arabidopsis*. *Mol Plant* **1**(1): 129-144.
- Stowe-Evans EL, Luesse DR, Liscum E. 2001.** The enhancement of phototropin-induced phototropic curvature in *Arabidopsis* occurs via a photoreversible phytochrome A-dependent modulation of auxin responsiveness. *Plant Physiology* **126**(2): 826-834.
- Strasser B, Sanchez-Lamas M, Yanovsky MJ, Casal JJ, Cerdan PD. 2010.** *Arabidopsis thaliana* life without phytochromes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**(10): 4776-4781.
- Strauss HM, Schmieder P, Hughes J. 2005.** Light-dependent dimerisation in the N-terminal sensory module of cyanobacterial phytochrome 1. *FEBS Letters* **579**(18): 3970-3974.
- Suetsugu N, Higa T, Gotoh E, Wada M. 2016.** Light-Induced Movements of Chloroplasts and Nuclei Are Regulated in Both Cp-Actin-Filament-Dependent and -Independent Manners in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* **11**(6): e0157429.
- Suetsugu N, Mittmann F, Wagner G, Hughes J, Wada M. 2005.** A chimeric photoreceptor gene, NEOCHROME, has arisen twice during plant evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**(38): 13705-13709.
- Suetsugu N, Wada M. 2007.** Phytochrome-dependent Photomovement Responses Mediated by Phototropin Family Proteins in Cryptogam Plants. *Photochemistry and Photobiology* **83**(1): 87-93.
- Suetsugu N, Yamada N, Kagawa T, Yonekura H, Uyeda TQP, Kadota A, Wada M. 2010.** Two kinesin-like proteins mediate actin-based chloroplast movement in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**(19): 8860-8865.
- Sullivan S, Thomson CE, Kaiserli E, Christie JM. 2009.** Interaction specificity of *Arabidopsis* 14-3-3 proteins with phototropin receptor kinases. *FEBS Letters* **583**(13): 2187-2193.
- Sullivan S, Thomson CE, Lamont DJ, Jones MA, Christie JM. 2008.** In vivo phosphorylation site mapping and functional characterization of *Arabidopsis* phototropin 1. *Mol Plant* **1**(1): 178-194.
- Sun J, Qi L, Li Y, Zhai Q, Li C. 2013.** PIF4 and PIF5 transcription factors link blue light and auxin to regulate the phototropic response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**(6): 2102-2114.
- Sun L, Shi L, Li W, Yu W, Liang J, Zhang H, Yang X, Wang Y, Li R, Yao X, et al. 2009.** JFK, a Kelch domain-containing F-box protein, links the SCF complex to p53 regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(25): 10195-10200.
- Sundqvist C, Björn LO. 1983.** Light-induced linear dichroism in photoreversibly phytochrome sensor pigments - II. Chromophore rotation in immobilized phytochrome. *Photochemistry and Photobiology* **37**: 69-75.
- Suzuki K, Kondo C, Morimoto M, Ohsumi Y. 2010.** Selective transport of alpha-mannosidase by autophagic pathways: identification of a novel receptor, Atg34p. *Journal of Biological Chemistry* **285**(39): 30019-30025.
- Swartz TE, Corchnoy SB, Christie JM, Lewis JW, Szundi I, Briggs WR, Bogomolni RA. 2001.** The photocycle of a flavin-binding domain of the blue light photoreceptor phototropin. *Journal of Biological Chemistry* **276**(39): 36493-36500.
- Swatek KN, Wilson RS, Ahsan N, Tritz RL, Thelen JJ. 2014.** Multisite phosphorylation of 14-3-3 proteins by calcium-dependent protein kinases. *Biochemical Journal* **459**(1): 15-25.
- Szekeres M, Nemeth K, Koncz-Kalman Z, Mathur J, Kauschmann A, Altmann T, Redei GP, Nagy F, Schell J, Koncz C. 1996.** Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in *Arabidopsis*. *Cell* **85**(2): 171-182.

- Takac T, Pechan T, Richter H, Muller J, Eck C, Bohm N, Obert B, Ren H, Niehaus K, Samaj J. 2011.** Proteomics on brefeldin A-treated Arabidopsis roots reveals profilin 2 as a new protein involved in the cross-talk between vesicular trafficking and the actin cytoskeleton. *J Proteome Res* **10**(2): 488-501.
- Takagi S, Kong SG, Mineyuki Y, Furuya M. 2003.** Regulation of actin-dependent cytoplasmic motility by type II phytochrome occurs within seconds in *Vallisneria gigantea* epidermal cells. *Plant Cell* **15**(2): 331-345.
- Takala H, Bjorling A, Berntsson O, Lehtivuori H, Niebling S, Hoernke M, Kosheleva I, Henning R, Menzel A, Ihalaenen JA, et al. 2014.** Signal amplification and transduction in phytochrome photosensors. *Nature* **509**(7499): 245-248.
- Takase T, Nishiyama Y, Tanihigashi H, Ogura Y, Miyazaki Y, Yamada Y, Kiyosue T. 2011.** LOV KELCH PROTEIN2 and ZEITLUPE repress Arabidopsis photoperiodic flowering under non-inductive conditions, dependent on FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT F-BOX1. *Plant Journal* **67**(4): 608-621.
- Takemiya A, Inoue S, Doi M, Kinoshita T, Shimazaki K. 2005.** Phototropins promote plant growth in response to blue light in low light environments. *Plant Cell* **17**(4): 1120-1127.
- Takeshita N, Higashitsuji Y, Konzack S, Fischer R. 2008.** Apical sterol-rich membranes are essential for localizing cell end markers that determine growth directionality in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **19**(1): 339-351.
- Tanada T. 1968.** A rapid photoreversible response of barley root tips in the presence of 3-indoleacetic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **59**(2): 376-380.
- Tanida I, Mizushima N, Kiyooka M, Ohsumi M, Ueno T, Ohsumi Y, Kominami E. 1999.** Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. *Mol Biol Cell* **10**(5): 1367-1379.
- Tepperman JM, Hwang YS, Quail PH. 2006.** phyA dominates in transduction of red-light signals to rapidly responding genes at the initiation of Arabidopsis seedling de-etiolation. *Plant Journal* **48**(5): 728-742.
- Tepperman JM, Zhu T, Chang HS, Wang X, Quail PH. 2001.** Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome A signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**(16): 9437-9442.
- Thelander M, Nilsson A, Olsson T, Johansson M, Girod PA, Schaefer DG, Zryd JP, Ronne H. 2007.** The moss genes PpSKI1 and PpSKI2 encode nuclear SnRK1 interacting proteins with homologues in vascular plants. *Plant Molecular Biology* **64**(5): 559-573.
- Thelander M, Olsson T, Ronne H. 2004.** Snf1-related protein kinase 1 is needed for growth in a normal day-night light cycle. *EMBO Journal* **23**(8): 1900-1910.
- Thelander M, Olsson T, Ronne H. 2005.** Effect of the energy supply on filamentous growth and development in *Physcomitrella patens*. *Journal of Experimental Botany* **56**(412): 653-662.
- Thompson EP, Smith SG, Glover BJ. 2012.** An Arabidopsis rhomboid protease has roles in the chloroplast and in flower development. *Journal of Experimental Botany* **63**(10): 3559-3570.
- Titapiwatanakun B, Blakeslee JJ, Bandyopadhyay A, Yang H, Mravec J, Sauer M, Cheng Y, Adamec J, Nagashima A, Geisler M, et al. 2009.** ABCB19/PGP19 stabilises PIN1 in membrane microdomains in Arabidopsis. *Plant Journal* **57**(1): 27-44.
- Tokutomi S, Sugimoto T, Mimuro M. 1992.** A model for the molecular structure and orientation of the chromophore in a dimeric phytochrome molecule. *Photochemistry and Photobiology* **56**: 545-552.
- Torrelío BM, Paz MA, Gallop PM. 1984.** Cellular proliferation and hypusine synthesis. *Experimental Cell Research* **154**(2): 454-463.
- Tretyn A. 1999.** Calcium-dependent signal transduction pathways in plants-- phytochrome mechanism of action as an example. *Pol.J.Pharmacol.* **51**: 145-151.
- Trupkin SA, Mora-Garcia S, Casal JJ. 2012.** The cyclophilin ROC1 links phytochrome and cryptochrome to brassinosteroid sensitivity. *Plant Journal* **71**(5): 712-723.
- Tseng TS, Briggs WR. 2010.** The Arabidopsis rcn1-1 mutation impairs dephosphorylation of Phot2, resulting in enhanced blue light responses. *Plant Cell* **22**(2): 392-402.

- Tseng TS, Whippo C, Hangarter RP, Briggs WR. 2012.** The role of a 14-3-3 protein in stomatal opening mediated by PHOT2 in Arabidopsis. *Plant Cell* **24**(3): 1114-1126.
- Tsuchida-Mayama T, Sakai T, Hanada A, Uehara Y, Asami T, Yamaguchi S. 2010.** Role of the phytochrome and cryptochrome signaling pathways in hypocotyl phototropism. *Plant Journal* **62**(4): 653-662.
- Tsukita S, Tsukita S, Matsumoto G. 1988.** Light-induced structural changes of cytoskeleton in squid photoreceptor microvilli detected by rapid-freeze method. *Journal of Cell Biology* **106**(4): 1151-1160.
- Tzfadia O, Galili G. 2013.** The Arabidopsis exocyst subcomplex subunits involved in a golgi-independent transport into the vacuole possess consensus autophagy-associated atg8 interacting motifs. *Plant Signal Behav* **8**(10): doi: 10.4161/psb.26732.
- Uenaka H, Kadota A. 2007.** Functional analyses of the *Physcomitrella patens* phytochromes in regulating chloroplast avoidance movement. *Plant Journal* **51**(6): 1050-1061.
- Uenaka H, Kadota A. 2008.** Phototropin-dependent weak and strong light responses in the determination of branch position in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant & Cell Physiology* **49**(12): 1907-1910.
- Uenaka H, Wada M, Kadota A. 2005.** Four distinct photoreceptors contribute to light-induced side branch formation in the moss *Physcomitrella patens*. *Planta* **222**(4): 623-631.
- Ueno K, Kinoshita T, Inoue S, Emi T, Shimazaki K. 2005.** Biochemical characterization of plasma membrane H⁺-ATPase activation in guard cell protoplasts of *Arabidopsis thaliana* in response to blue light. *Plant & Cell Physiology* **46**(6): 955-963.
- Uetz P, Grigoriev A. 2005.** The yeast interactome.
- Urban S, Lee JR, Freeman M. 2001.** Drosophila rhomboid-1 defines a family of putative intramembrane serine proteases. *Cell* **107**(2): 173-182.
- Urban S, Wolfe MS. 2005.** Reconstitution of intramembrane proteolysis in vitro reveals that pure rhomboid is sufficient for catalysis and specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(6): 1883-1888.
- Valverde F, Mouradov A, Soppe W, Ravenscroft D, Samach A, Coupland G. 2004.** Photoreceptor Regulation of CONSTANS Protein in Photoperiodic Flowering. *Science* **303**(5660): 1003-1006.
- Vanhee C, Zapotoczny G, Masquelier D, Ghislain M, Batoko H. 2011.** The Arabidopsis multistress regulator TSPO is a heme binding membrane protein and a potential scavenger of porphyrins via an autophagy-dependent degradation mechanism. *Plant Cell* **23**(2): 785-805.
- Varin L, Ibrahim RK. 1992.** Novel flavonol 3-sulfotransferase. Purification, kinetic properties, and partial amino acid sequence. *Journal of Biological Chemistry* **267**(3): 1858-1863.
- Vetter IR, Wittinghofer A. 1999.** Nucleoside triphosphate-binding proteins: different scaffolds to achieve phosphoryl transfer. *Quarterly Reviews of Biophysics* **32**(1): 1-56.
- Vidal D, Gil MT, Alvarez-Florez F, Moyssset L, Simon E. 2007.** Protein kinase activity in *Cucumis sativus* cotyledons: Effect of calcium and light. *Phytochemistry* **68**(4): 438-445.
- Vidali L, Augustine RC, Kleinman KP, Bezanilla M. 2007.** Profilin is essential for tip growth in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* **19**(11): 3705-3722.
- Vierstra R, Quail PH. 1982.** Native phytochrome: inhibition of proteolysis yields a homogeneous monomer of 124 kilodaltons from *Avena*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**: 5272-5276.
- Voerker SH. 1933.** Untersuchungen über die Phototaxis der Chloroplasten. *Planta* **21**(1): 156-205.
- Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D. 2003.** An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant Journal* **33**(5): 949-956.
- von Schwartzberg K. 2006.** Moss biology and phytohormones--cytokinins in *Physcomitrella*. *Plant Biol.(Stuttg)* **8**(3): 382-388.
- Wada M, Kadota A. 1989.** Photomorphogenesis in lower green plants. *Ann.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.* **40**: 169-191.

- Wada M, Staehelin LA. 1981.** Freeze-fracture observations on the plasma membrane, the cell wall and the cuticle of growing protonemata of *Adiantum capillus-veneris* L. *Planta* **151**(5): 462-468.
- Wada S, Ishida H, Izumi M, Yoshimoto K, Ohsumi Y, Mae T, Makino A. 2009.** Autophagy plays a role in chloroplast degradation during senescence in individually darkened leaves. *Plant Physiology* **149**(2): 885-893.
- Wagner D, Fairchild CD, Kuhn RM, Quail PH. 1996.** Chromophore-bearing NH₂-terminal domains of phytochromes A and B determine their photosensory specificity and differential light lability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**(9): 4011-4015.
- Wagner G, Klein K. 1978.** Differential effect of calcium on chloroplast movement in *Mougeotia*. *Photochemistry and Photobiology* **27**(2): 137-140.
- Wagner JR, Brunzelle JS, Forest KT, Vierstra RD. 2005.** A light-sensing knot revealed by the structure of the chromophore-binding domain of phytochrome. *Nature* **438**(7066): 325-331.
- Walhout AJ, Temple GF, Brasch MA, Hartley JL, Lorson MA, van den Heuvel S, Vidal M. 2000.** GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. *Methods in Enzymology* **328**: 575-592.
- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. 1982.** Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO Journal* **1**(8): 945-951.
- Wan Y, Jasik J, Wang L, Hao H, Volkmann D, Menzel D, Mancuso S, Baluska F, Lin J. 2012.** The signal transducer NPH3 integrates the phototropin1 photosensor with PIN2-based polar auxin transport in *Arabidopsis* root phototropism. *Plant Cell* **24**(2): 551-565.
- Wan YL, Eisinger W, Ehrhardt D, Kubitscheck U, Baluska F, Briggs W. 2008.** The subcellular localization and blue-light-induced movement of phototropin 1-GFP in etiolated seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* **1**(1): 103-117.
- Wang FF, Lian HL, Kang CY, Yang HQ. 2010.** Phytochrome B is involved in mediating red light-induced stomatal opening in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* **3**(1): 246-259.
- Wang L, Xu C, Wang C, Wang Y. 2012.** Characterization of a eukaryotic translation initiation factor 5A homolog from *Tamarix androssowii* involved in plant abiotic stress tolerance. *BMC Plant Biology* **12**: 118.
- Wang TW, Lu L, Wang D, Thompson JE. 2001.** Isolation and characterization of senescence-induced cDNAs encoding deoxyhypusine synthase and eucaryotic translation initiation factor 5A from tomato. *Journal of Biological Chemistry* **276**(20): 17541-17549.
- Wang TW, Lu L, Zhang CG, Taylor C, Thompson JE. 2003.** Pleiotropic effects of suppressing deoxyhypusine synthase expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **52**(6): 1223-1235.
- Wang TW, Zhang CG, Wu W, Nowack LM, Madey E, Thompson JE. 2005.** Antisense suppression of deoxyhypusine synthase in tomato delays fruit softening and alters growth and development. *Plant Physiology* **138**(3): 1372-1382.
- Wang Y, Liu Y. 2013.** Autophagic degradation of leaf starch in plants. *Autophagy* **9**(8): 1247-1248.
- Warpeha KM, Upadhyay S, Yeh J, Adamiak J, Hawkins SI, Lapik YR, Anderson MB, Kaufman LS. 2007.** The GCR1, GPA1, PRN1, NF-Y Signal Chain Mediates Both Blue Light and Absciscic Acid Responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **143**(4): 1590-1600.
- Way M, Sanders M, Garcia C, Sakai J, Matsudaira P. 1995.** Sequence and domain organization of scruin, an actin-cross-linking protein in the acrosomal process of *Limulus* sperm. *Journal of Cell Biology* **128**(1-2): 51-60.
- Weckwerth P, Ehlert B, Romeis T. 2015.** ZmCPK1, a calcium-independent kinase member of the Zea mays CDPK gene family, functions as a negative regulator in cold stress signalling. *Plant Cell Environ* **38**(3): 544-558.
- Wei N, Chamovitz DA, Deng XW. 1994a.** *Arabidopsis* COP9 is a component of a novel signaling complex mediating light control of development. *Cell* **78**(1): 117-124.

- Wei N, Kwok SF, von Arnim AG, Lee A, McNellis TW, Piekos B, Deng XW. 1994b.** Arabidopsis COP8, COP10, and COP11 genes are involved in repression of photomorphogenic development in darkness. *Plant Cell* **6**: 629-643.
- Wei N, Tsuge T, Serino G, Dohmae N, Takio K, Matsui M, Deng XW. 1998.** The COP9 complex is conserved between plants and mammals and is related to the 26S proteasome regulatory complex. *Current Biology* **8**(16): 919-922.
- Weidberg H, Shpilka T, Shvets E, Abada A, Shimron F, Elazar Z. 2011.** LC3 and GATE-16 N termini mediate membrane fusion processes required for autophagosome biogenesis. *Developmental Cell* **20**(4): 444-454.
- Weir BA, Yaffe MP. 2004.** Mmd1p, a novel, conserved protein essential for normal mitochondrial morphology and distribution in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* **15**(4): 1656-1665.
- Wendler WM, Kremmer E, Forster R, Winnacker EL. 1997.** Identification of pirin, a novel highly conserved nuclear protein. *Journal of Biological Chemistry* **272**(13): 8482-8489.
- Went FW, -, Thimann KV. 1937.** *Phytohormones, by F.W. Went ... and Kenneth V. Thimann*. New York: The Macmillan Company.
- Wheeler GL, Brownlee C. 2008.** Ca²⁺ signalling in plants and green algae--changing channels. *Trends in Plant Science* **13**(9): 506-514.
- Whippo CW, Khurana P, Davis PA, DeBlasio SL, DeSloover D, Staiger CJ, Hangarter RP. 2011.** THRUMIN1 is a light-regulated actin-bundling protein involved in chloroplast motility. *Current Biology* **21**(1): 59-64.
- Wilhelm JE, Vale RD. 1993.** RNA on the move: the mRNA localization pathway. *Journal of Cell Biology* **123**(2): 269-274.
- Willige BC, Ahlers S, Zourelidou M, Barbosa IC, Demarsy E, Trevisan M, Davis PA, Roelfsema MR, Hangarter R, Fankhauser C, et al. 2013.** D6PK AGCVIII kinases are required for auxin transport and phototropic hypocotyl bending in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**(5): 1674-1688.
- Wu G, Lewis DR, Spalding EP. 2007.** Mutations in Arabidopsis multidrug resistance-like ABC transporters separate the roles of acropetal and basipetal auxin transport in lateral root development. *Plant Cell* **19**(6): 1826-1837.
- Xia G, Ramachandran S, Hong Y, Chan YS, Simanis V, Chua NH. 1996.** Identification of plant cytoskeletal, cell cycle-related and polarity-related proteins using *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Journal* **10**(4): 761-769.
- Xie Z, Nair U, Klionsky DJ. 2008.** Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Mol Biol Cell* **19**(8): 3290-3298.
- Xiong Y, Contento AL, Nguyen PQ, Bassham DC. 2007.** Degradation of oxidized proteins by autophagy during oxidative stress in Arabidopsis. *Plant Physiology* **143**(1): 291-299.
- Xu G, Ma H, Nei M, Kong H. 2009.** Evolution of F-box genes in plants: different modes of sequence divergence and their relationships with functional diversification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(3): 835-840.
- Xu J, Zhang B, Jiang C, Ming F. 2011.** RceIF5A, encoding an eukaryotic translation initiation factor 5A in *Rosa chinensis*, can enhance thermotolerance, oxidative and osmotic stress resistance of Arabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology* **75**(1-2): 167-178.
- Yaffe MB. 2002.** How do 14-3-3 proteins work?-- Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Letters* **513**(1): 53-57.
- Yamaguchi R, Nakamura M, Mochizuki N, Kay SA, Nagatani A. 1999.** Light-dependent translocation of a phytochrome B-GFP fusion protein to the nucleus in transgenic Arabidopsis. *J. Cell Biol.* **145**: 437-445.
- Yamashino T, Kitayama M, Mizuno T. 2013.** Transcription of ST2A encoding a sulfotransferase family protein that is involved in jasmonic acid metabolism is controlled according to the circadian clock- and PIF4/PIF5-mediated external coincidence mechanism in Arabidopsis thaliana. *Biosci Biotechnol Biochem* **77**(12): 2454-2460.

- Yamawaki S, Yamashino T, Nakamichi N, Nakanishi H, Mizuno T. 2011a.** Light-responsive double B-box containing transcription factors are conserved in *Physcomitrella patens*. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* **75**(10): 2037-2041.
- Yamawaki S, Yamashino T, Nakanishi H, Mizuno T. 2011b.** Functional characterization of HY5 homolog genes involved in early light-signaling in *Physcomitrella patens*. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* **75**(8): 1533-1539.
- Yang W, Boss WF. 1994.** Regulation of phosphatidylinositol 4-kinase by the protein activator PIK-A49. Activation requires phosphorylation of PIK-A49. *Journal of Biological Chemistry* **269**(5): 3852-3857.
- Yang W, Burkhardt W, Cavallius J, Merrick WC, Boss WF. 1993.** Purification and characterization of a phosphatidylinositol 4-kinase activator in carrot cells. *Journal of Biological Chemistry* **268**(1): 392-398.
- Yang X, Kuk J, Moffat K. 2008.** Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophytochrome: Photoconversion and signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**(38): 14715-14720.
- Yang X, Kuk J, Moffat K. 2009.** Conformational differences between the Pfr and Pr states in *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophytochrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**(37): 15639-15644.
- Yasui Y, Mukougawa K, Uemoto M, Yokofuji A, Suzuri R, Nishitani A, Kohchi T. 2012.** The phytochrome-interacting vascular plant one-zinc finger1 and VOZ2 redundantly regulate flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**(8): 3248-3263.
- Yeh KC, Lagarias JC. 1998.** Eukaryotic phytochromes: light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**(23): 13976-13981.
- Yeh KC, Wu SH, Murphy JT, Lagarias JC. 1997.** A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. *Science* **277**: 1505-1508.
- Yoo J, Cho MH, Lee SW, Bhoo SH. 2016.** Phytochrome-interacting ankyrin repeat protein 2 modulates phytochrome A-mediated PIF3 phosphorylation in light signal transduction. *J Biochem.*
- Yoo J, Shin DH, Cho MH, Kim TL, Bhoo SH, Hahn TR. 2011.** An ankyrin repeat protein is involved in anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum* **142**(4): 314-325.
- Yoon JM, Hahn TR, Cho MH, Jeon JS, Bhoo SH, Kwon YK. 2008.** The PHY domain is required for conformational stability and spectral integrity of the bacteriophytochrome from *Deinococcus radiodurans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **369**(4): 1120-1124.
- Zanelli CF, Maragno AL, Gregio AP, Komili S, Pandolfi JR, Mestriner CA, Lustri WR, Valentini SR. 2006.** eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **348**(4): 1358-1366.
- Zanelli CF, Valentini SR. 2005.** Pkc1 acts through Zds1 and Gic1 to suppress growth and cell polarity defects of a yeast eIF5A mutant. *Genetics* **171**(4): 1571-1581.
- Zhang B, Tremousaygue D, Denance N, van Esse HP, Horger AC, Dabos P, Goffner D, Thomma BP, van der Hoorn RA, Tuominen H. 2014.** PIRIN2 stabilizes cysteine protease XCP2 and increases susceptibility to the vascular pathogen *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **79**(6): 1009-1019.
- Zhang KX, Xu HH, Yuan TT, Zhang L, Lu YT. 2013.** Blue-light-induced PIN3 polarization for root negative phototropic response in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **76**(2): 308-321.
- Zhang S, Liu Y, Yu B. 2014.** PRL1, an RNA-binding protein, positively regulates the accumulation of miRNAs and siRNAs in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics* **10**(12): e1004841.
- Zhao X, Ayer RE, Davis SL, Ames SJ, Florence B, Torchinsky C, Liou JS, Shen L, Spanjaard RA. 2005.** Apoptosis factor EI24/PIG8 is a novel endoplasmic reticulum-localized Bcl-2-binding protein which is associated with suppression of breast cancer invasiveness. *Cancer Research* **65**(6): 2125-2129.
- Zhao X, Wang YL, Qiao XR, Wang J, Wang LD, Xu CS, Zhang X. 2013.** Phototropins function in high-intensity blue light-induced hypocotyl phototropism in *Arabidopsis* by altering cytosolic calcium. *Plant Physiology* **162**(3): 1539-1551.

- Zhou Q, Hare PD, Yang SW, Zeidler M, Huang LF, Chua NH. 2005.** FHL is required for full phytochrome A signaling and shares overlapping functions with FHY1. *Plant Journal* **43**(3): 356-370.
- Zhou W, Wei L, Xu J, Zhai Q, Jiang H, Chen R, Chen Q, Sun J, Chu J, Zhu L, et al. 2010.** Arabidopsis Tyrosylprotein Sulfotransferase Acts in the Auxin/PLETHORA Pathway in Regulating Postembryonic Maintenance of the Root Stem Cell Niche. *The Plant Cell Online* **22**(11): 3692-3709.
- Zhu SY, Yu XC, Wang XJ, Zhao R, Li Y, Fan RC, Shang Y, Du SY, Wang XF, Wu FQ, et al. 2007.** Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**(10): 3019-3036.
- Zollman S, Godt D, Prive GG, Couderc JL, Laski FA. 1994.** The BTB domain, found primarily in zinc finger proteins, defines an evolutionarily conserved family that includes several developmentally regulated genes in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(22): 10717-10721.
- Zou JJ, Wei FJ, Wang C, Wu JJ, Ratnasekera D, Liu WX, Wu WH. 2010.** Arabidopsis calcium-dependent protein kinase CPK10 functions in abscisic acid- and Ca²⁺-mediated stomatal regulation in response to drought stress. *Plant Physiology* **154**(3): 1232-1243.

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1:	Karten der <i>Gateway Y2H</i> -Destinationsvektoren pGADT7g (Uetz & Grigoriev, 2005) und pGADCg (Stellberger <i>et al.</i> , 2010) für die Herstellung von N- bzw. C-terminalen ADg-Fusionen.....	32
Abbildung 3-1:	Reportergene in AH109 und Y187 werden durch verschiedene GAL4-responsive Promotoren kontrolliert.....	49
Abbildung 4-1:	Anti-DNA-BD- <i>Western Blot</i> (oben) und 10%iges SDS Gel (unten) mit je 10 µl (<i>WB</i>) bzw. 5 µl (SDS-Gel) Gesamtproteinextrakten aus PHY4:BD- und PHY4 N:BD-exprimierenden AH109 u Y187 Hefen.....	66
Abbildung 4-2:	Selektion von AH109 phy4:BD (<i>PHY4</i> pBAC) + AD: (pGAD) und AH109 phy4 N:BD (<i>PHY4 N</i> pBAC) + AD: (pGAD) auf -Trp/-Leu <i>DSD</i> , -Trp/-Leu/-His <i>TSD</i> ohne und mit 3-AT und auf -Trp/-Leu-His/-Ade <i>QSD</i> + 3-AT.....	67
Abbildung 4-3:	<i>Mating</i> von Y187 phy4:BD mit AH109 AD: und Selektion auf <i>DSD</i> (links), <i>TSD</i> (Mitte, eine 1:10 und eine 1:100-Verdünnung) und <i>TSD</i> + 30 µM PCB 68	
Abbildung 4-4:	<i>Matings</i> von phy4 N-, phy4 C- und Vollängen-phy4-BD-Fusionen (N- (links) und C-terminal fusioniert (rechts))	69
Abbildung 4-5:	Semiquantitatives <i>Y2H</i> -Wachstums- <i>Assay</i> von phyA:BD bzw. BD:phyA mit AD:FHY1 als genetische Positivkontrolle und von BD:phy4 bzw. phy4:BD mit myc:AD / leerem AD:-Vektor als Negativkontrollen und mit AD:phy4 als Dimerisierungskontrolle.	70
Abbildung 4-6:	Funktionstest der <i>Gateway Prey</i> -Vektoren pGADg und pGADCg.....	71
Abbildung 4-7:	<i>Mating</i> von Y187 Holo-phyA:BD mit AH109 AD:FHY1 auf <i>TSD</i> +PCB in D (links), Rc (Mitte) und FRc (rechts) (A) und <i>Mating</i> von Y187 phy4:BD mit AH109 AD: auf <i>TSD</i> (B), <i>TSD</i> + 3-AT (C) und auf <i>TSD</i> + 3-AT +PCB in R (D) 73	
Abbildung 4-8:	Semiquantitatives <i>Y2H</i> -Wachstums- <i>Assay</i> zur Untersuchung der Interaktion von (Holo-) phy4:BD mit den vier <i>Physcomitrella</i> Phototropinen.....	74
Abbildung 4-9:	<i>Split-YFP</i> von phy4:YFP _C mit YFP _N :photA1 und A2 in <i>Physcomitrella</i> Protonemata ohne Licht-Vorbehandlung.....	75
Abbildung 4-10:	Quantitatives ONPG- <i>Y2H</i> - <i>Assay</i> in D, R, FR, B, R+FR und B+FR zur Charakterisierung der Interaktion von phy4 mit den <i>Physcomitrella</i> Phototropinen	76
Abbildung 4-11:	BD: + AD:phot-Negativkontrollen zum quantitativen ONPG- <i>Y2H</i> - <i>Assay</i>	77
Abbildung 4-12:	<i>Western Blots</i> der Extraktion von myc:photB1- und HA:phy4-Fusionsproteinen aus <i>Nicotiana benthamiana</i> , Immunopräzipitation von myc:photB1 mit 20 µg Anti-myc-Antikörpern mit 80 µl Protein G <i>magnetic Beads</i> und Detektion von (co-)immunopräzipitierten phot- bzw. phy4-Fusionsproteinen mit Anti-myc- (oben) bzw. Anti-HA-Antikörpern (unten).	78
Abbildung 4-13:	Anti-myc- <i>Western Blots</i> von Immunopräzipitations-Experimenten mit konstanter Anti-myc-Antikörpermenge (2 µg) und variierender Menge an Protein G <i>magnetic Beads</i>	81
Abbildung 4-14:	<i>Western Blots</i> der Immunopräzipitationen von myc:photB1 mit 60 µg, 20 µg, 7 µg, 2 µg und ohne Anti-myc-Antikörper.....	82
Abbildung 4-15:	<i>Western Blots</i> der Immunopräzipitationen von HA:phy4 mit 20 µg, 7 µg, 2 µg und ohne Anti-HA-Antikörper.....	83

Abbildung 4-16: <i>Western Blots</i> der Immunopräzipitationen von HA:phy4 mit 2 µg und ohne Anti-HA-Antikörper bzw. mit 2 µg Anti-GFP-Antikörper mit 40 µl Protein G <i>magnetic Beads</i>	85
Abbildung 4-17: <i>Western Blots</i> der myc:photA1- und myc:phot-B1-IP-Negativkontrollen.....	86
Abbildung 4-18: Co-IPs von HA:phy4 und myc:photA1, -A2, -B1 & -B2 in verschiedenen (<i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>) Lichtbedingungen und mit Proteinextrakten aus untransformierten Blättern (WT) als Negativkontrolle.....	87
Abbildung 4-19: Semiquantitatives <i>Y2H</i> -Wachstums- <i>Assay</i> zur Untersuchung der Interaktion von (Holo-) BD:phyA (phyA pGBK) und phyA:BD (phyA pBAC) mit ADg:phot1 N, phot1 N:ADg, ADg:phot1 C und phot1 C:ADg.....	88
Abbildung 4-20: <i>Y2H</i> - (A) und <i>Y3H</i> - (B) Untersuchungen der phyA-phot-Interaktion in Abwesenheit (A) und in Anwesenheit von NPH3 oder PKS1 (B) mit einem semiquantitativen Wachstums- <i>Assay</i> in D, Rc, FRc und Bc.	89
Abbildung 4-21: Expressionsnachweis von <i>Bait</i> -, <i>Prey</i> - und <i>Bridge</i> -Proteinen im <i>Y3H</i> -Experiment.....	91
Abbildung 4-22: Co-IP von HA:phyA und myc:phot1 mit monoklonalen Anti-HA-Antikörpern.	92
Abbildung 4-23: <i>Split-YFP</i> - <i>Assay</i> von phyA (A) bzw. phot1 (B) mit PKS1 in Zwiebel-Epidermiszellen ohne Licht-Vorbehandlung. Maßstab 100 µm.	94
Abbildung 4-24: Masterplatten großer putativ positiver Kolonien nach 7d Inkubation in D (<i>DSD</i> u <i>TSD</i> + 3-AT) bzw. in 0,7 µmol / m ² s Rc (<i>TSD</i> + 3-AT + PCB).....	97
Abbildung 4-25: Semiquantitatives <i>Y2H</i> -Wachstums- <i>Assay</i> zur Untersuchung von Interaktionen von N- und C-terminalen phy4-BD-Fusionen mit allen ausgewählten Interaktionspartner-AD-Fusionen in D, Rc und Rp und in Rp + FRp.....	105
Abbildung 4-26: Pirin / HIP1 (Pp3c2_10320V1.1) intrazelluläre Lokalisations- (A) und <i>Split-YFP</i> Studien der Pirin-phy4 Interaktion (B) beide ohne (D) und mit R-Vorbehandlung (R) mittels Fluoreszenz- bzw. Konfokalmikroskopie. Maßstab 30 µm.	111
Abbildung 4-27: ZF-Protein / HIP3 (Pp3c10_4820V1.1) intrazelluläre Lokalisations- (A) und <i>Split-YFP</i> Studien der ZF-Protein-phy4 Interaktion (B).....	113
Abbildung 4-28: PRL1 / HIP4 (Pp3c16_8560E1.1) intrazelluläre Lokalisations- (A) und <i>Split-YFP</i> Studien der PRL1-phy4 Interaktion (B).....	115
Abbildung 4-29: Intrazelluläre Lokalisation von F-Box- <i>interacting</i> /Kelch-Protein (Pp1s271_60V6.1)-GFP-Fusionen ohne (D) und mit R-Vorbehandlung (R) dokumentiert mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	116
Abbildung 4-30: Kelch- <i>Repeat</i> -Protein / HIP5 (Pp3c7_3040V1.1) intrazelluläre Lokalisations- (A) und <i>Split-YFP</i> Studien der Kelch- <i>Repeat</i> -Protein-phy4 Interaktion (B).....	119
Abbildung 4-31: P- <i>Loop</i> -Protein (PLP) / HIP6 (Pp3c6_4480V1.1) intrazelluläre Lokalisations- (A) und <i>Split-YFP</i> Studien der PLP-phy4 Interaktion (B)	121
Abbildung 4-32: Ser/Thr-Proteinkinase / HIP7 (Pp3c17_9390V1.1) intrazelluläre Lokalisations- (A) und <i>Split-YFP</i> Studien der Kinase-phy4 Interaktion (B).....	123
Abbildung 4-33: Intrazelluläre Lokalisation von TP53- <i>regulating</i> Kinase (Pp3c15_20330J1.1)-GFP-Fusionen ohne (D) und mit R-Vorbehandlung (R).....	124
Abbildung 4-34: CDPK / HIP8 (Pp3c11_25550V1.1) intrazelluläre Lokalisations- (A) und <i>Split-YFP</i> Studien der CDPK-phy4 Interaktion (B)	127

Abbildung 4-35: Rhomboid-Protease / HIP9 (Pp1s254_10V6.2) intrazelluläre Lokalisations- (A) und <i>Split-YFP</i> Studien der Rhomboid-phy4 Interaktion (B)	129
Abbildung 4-36: Intrazelluläre Lokalisations- (A) und <i>Split-YFP</i> Studien des unbekannten Proteins / HIP11 (Pp3c20_16210V1.1) bzw. der phy4-Interaktion mit dem unbekannten Protein (B).....	130
Abbildung 4-37: eIF-5A / HIP12 (Pp3c13_15620V1.1) intrazelluläre Lokalisations- (A) und <i>Split-YFP</i> Studien der eIF-5A-phy4 Interaktion (B).....	133
Abbildung 4-38: EF1 α / HIP13 (Pp3c1_23670V1.1) intrazelluläre Lokalisations- (A) und <i>Split-YFP</i> Studien der EF1 α -phy4 Interaktion (B)	135
Abbildung 4-39: 14-3-3 / HIP14 (Pp3c3_8540C1.1) intrazelluläre Lokalisations- (A) und <i>Split-YFP</i> Studien der 14-3-3-phy4 Interaktion (B)	137

11. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1:	Verwendete Vektoren und Plasmide sortiert nach Anwendung. Es sind jeweils Name, Verwendungszweck und Herkunft der DNAs angegeben.....	29
Tabelle 2-2:	Oligonukleotide für Klonierungs- und <i>Y2H-Screening</i> -Zwecke.....	32
Tabelle 2-3:	Anregungs- und Detektionsparameter für die konfokale LASER- <i>Scanning</i> -Mikroskopie am Leica TCS SP2-AOBS.....	39
Tabelle 3-1:	Übersicht über eingesetzte Medien, Zusätze und die daraus resultierende Selektion.....	50
Tabelle 3-2:	Übersicht über Transformationsansätze einer sequenziellen Doppeltransformation	51
Tabelle 3-3:	Belichtungsregimes in semiquantitativen Hefewachstums- <i>Assays</i> mit Holophytochrom.....	54
Tabelle 4-1:	<i>Mating</i> -Daten von AH109 AD:phy4 + Y187 phy4:BD auf Basis der erhaltenen Koloniezahlen	95
Tabelle 4-2:	Vergleich von eingesetzten und erhaltenen Zellzahlen und <i>Mating</i> -Effizienzen von <i>Library-Mating</i> und Negativkontroll- <i>Mating</i>	96
Tabelle 4-3:	Wachstumsverhalten von 207 putativ positiven Hefeklonen nach zwei Selektionsrunden auf <i>TSD</i> + 3-AT + / - PCB	97
Tabelle 4-4:	Kategorisierung putativer phy4-Interaktionspartner anhand ihrer möglichen Funktionen.....	99
Tabelle 4-5:	<i>In silico</i> Charakterisierung der 15 ausgewählten putativen phy4-Interaktionspartner aus dem Holo-phy4:BD- <i>Screen</i> . Wachstumsverhalten auf <i>TSD</i> -Masterplatten mit / ohne PCB in R (- kein, + schwaches, ++ starkes, +++ sehr starkes Wachstum), Homologe in <i>Arabidopsis thaliana</i> , mögliche Funktionen, <i>Gene Ontology</i> (GO) und Lokalisationsvorhersagen.....	102
Tabelle 4-6:	Kategorisierung der Interaktionseigenschaften ausgewählter putativer phy4-BD-Interaktoren in Rp.....	106
Tabelle 6-1:	Zusammenfassung der <i>in silico</i> und experimentellen Analysen aller ausgewählten putativen phy4-Interaktionspartner aus dem Apo-BD:PHY4- und Holo-phy4:BD- <i>Screen</i>	181

12. Abkürzungen

3-AT	3-Amino-1,2,4-triazol
35S	konstitutiver Promoter des Blumenkohl-Mosaikvirus
Abb.	Abbildung
ABA	Abszissinsäure
Ac	<i>Adiantum capillus-veneris</i>
AD	GAL4-Aktivierungsdomäne
Ade	Adenin
ADE2	Gen für die Phosphoribosylaminoimidazol-Carboxylase
AFR	ATTENUATED FAR RED RESPONSE
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AMS	Ammoniumsulphat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BiFC	<i>Bimolecular Fluorescence Complementation</i>
B, BL	Blau, blaues Licht
BD	<i>GAL4 Transcription Factor DNA-binding Domain</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> , Albumin aus Rinderserum
BV	Biliverdin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	<i>circa</i>
CAS9	CRISPR-associated
CaMV	Blumenkohl-Mosaikvirus
CCD	<i>Conserved Domains Database</i>
CDPK	<i>Calcium-dependent</i> Proteinkinase
cDNA	<i>Complementary</i> DNA, Kopie einer mRNA
CDS	<i>Coding DNA Sequence</i>
CFK1	COP9 INTERACTING F-BOX KELCH 1
CFP	CYAN FLUORESCENT PROTEIN
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CHUP1	CHLOROPLAST UNUSUAL POSITIONING
c-myc	<i>Avian Myelocytomatosis Virus Oncogene Cellular Homolog</i> , für Bindung durch Anti-c-myc-Antikörper
CO	CONSTANS
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
COP	CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC
Cp	<i>Ceratodon purpureus</i>
Cph1Δ2	sensorisches Modul des cyanobakteriellen Phytochroms
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat</i>
CRY	Cryptochrom
D	Dunkel

12. Abkürzungen

d	<i>dies</i> (Tag)
d.h.	das heißt
DIC	Differentialinterferenzkontrast-Einstellung
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-BD	GAL4-DNA-Bindedomäne
<i>DSD</i>	<i>Double Synthetic Dropout</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EF1 α	TRANSLATION ELONGATION FACTOR 1A
eFP	<i>electronic Fluorescent Pictograph-Browser</i>
eIF-5A	EUCARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 5A
<i>etc.</i>	<i>et cetera</i>
E-Vektor	Elektrischer Vektor des Lichts
FBK	F-BOX/KELCH
FHL	FHY1-LIKE-PROTEIN
FHY1	FAR-RED-ELONGATED HYPOCOTYL 1
FKF1	FLAVIN-BINDING KELCH- <i>REPEAT</i> F-BOX 1
FL	<i>full length</i> ; Volllänge
FMN	Flavin Mononukleotid
FP	<i>Fluorescent Protein</i> , fluoreszierendes Protein
FR	<i>Far Red (light)</i> (monochromatisches dunkelrotes Licht bei 730 nm)
FRET	<i>Förster resonance energy transfer</i>
FT	FLOWERING LOCUS T (Florigen)
FW	<i>Forward</i>
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GA	Gibberellinsäure
GAF-Domäne	cGMP-spezifische Phosphodiesterase aus Vertebraten / cyanobakteriellen Adenylat-cyclasen/ Transkriptions-aktivator FhlA- Domäne
GFP	GREEN FLUORESCENT PROTEIN (grün fluoreszierendes Protein)
Ggf.	gegebenenfalls
GO	<i>Gene Ontology</i>
GPA1	G-Protein α -Untereinheit
GUS	β -Glucuronidase, ein Reporter-Enzym
GW	<i>Gateway</i> Klonierungstechnologie
h	<i>hora</i> (Stunde)
HA	Hämagglutinin-Epitop, für Bindung durch Anti-HA-Antikörper
HIP	HOLOPHYTOCHROME-INTERACTING PARTNER
His	Histidin
HKRD	<i>Histidin Kinase-related Domain</i>
HR	homologe Rekombination
HRM	<i>High Range</i> Marker
HT1	HIGH LEAF TEMPERATURE 1
Hyg	Hygromycin
IAA	Isoamylalkohol

12. Abkürzungen

Inkl.	Inklusive
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
J/E/H	Jaffe/Etzold/Haupt
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria-Bertani-Medium
KO	<i>Knockout</i>
Leu	Leucin
LiAc	Lithiumacetat
LKP2	LOV-KELCH PROTEIN 2
mCherry	Derivat eines RFP, hier ein Kernmarker im VirD2:NLS:mCherry-Konstrukt
<i>MEL1</i>	Gen für die α -Galaktosidase
MES	2-(N-Morpholino)ethansulphonsäure
μ g	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minute(n)
NaCl	Natriumchlorid
NES	<i>Nuclear Export Signal</i>
ng	Nanogramm
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
NPH3	NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTYL 3
Nt	Nukleotid(e)
OD	optische Dichte
o.g.	oben genannt
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PAR	<i>Photosynthetic Active Radiation</i>
PAS	<i>Period-/ARNT-/Singleminded</i> -Domäne
PCB	Phycocyanobilin
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase Ketten Reaktion
PEG	Polyethylenglykol
PEGT	Polyethylenglykol für Transformation
Pfr	Dunkelrotlicht absorbierende Form von Phytochrom
PHL	PHYTOCHROME-DEPENDENT LATE-FLOWERING
phot	Phototropin-Holoprotein
PHY-Domäne	Phytochrom-spezifische Domäne
phyA-E	<i>Arabidopsis</i> Phytochrom-Holoproteine A-E
phy1-4, 5a-c	<i>Physcomitrella patens</i> Phytochrom-Holoproteine (1-4, 5a-5c)
<i>phy</i>	<i>Knockout</i> Mutante des betreffenden Phytochroms
<i>PIG</i>	<i>Particle Inflow Gun</i>
PIF	PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR
PKS1	PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 1
PLD	<i>PAS-like domain</i> , PAS-ähnliche Domäne
PLP	Phosphat-Loop enthaltendes Protein
PM	Plasmamembran
PORA	Protochlorophyllid Oxidoreduktase A
Pp	<i>Physcomitrella patens</i>

12. Abkürzungen

PP2A	PROTEIN PHOSPHATASE 2A
P ϕ B	Phytochromobilin
Pr	Rotlicht-absorbierende Form von Phytochrom
PRL1	PLEIOTROPIC REGULATORY LOCUS 1
PRN1	PIRIN 1
PSM	<i>Pre-Stained</i> Marker
<i>QSD</i>	<i>Quadruple Synthetic Dropout</i>
RE	Restriktionsendonuklease
R / Rc / Rp	monochromatisches Rotlicht (660 nm) / kontinuierliches Rot / gepulstes
Rot	
RL	Rotlicht
RBL	RHOMBOID-LIKE-PROTEIN
RFI2	RED AND FAR RED INSENSITIVE 2
RFP	RED FLUORESCENT PROTEIN
RING	<i>Really Interesting New Gene</i>
rpm	<i>rotations per minute</i>
RPT2	ROOT PHOTOTROPISM 2
RT	Raumtemperatur
RV	<i>Reverse</i>
s.	siehe
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SCF	SKP1p-Cdc53p (cullin)-RBX1-F-box
SD	<i>Short Day</i>
<i>SD</i>	<i>Synthetic Dropout</i>
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ser	Serin, eine Aminosäure
SLB	<i>Sample loading buffer</i> für SDS-PAGE
SnRK	SNF1-RELATED PROTEIN KINASE
SOC	<i>Super optimal broth</i> mit 20 mM Glukose
SOT	Sulfotransferase
<i>SSD</i>	<i>Single Synthetic Dropout</i>
STE	Salz-TE (Hochsalz TE-Puffer)
T _{an}	<i>Annealing</i> -Temperatur
TAIR	<i>The Arabidopsis Information Resource</i>
TB	<i>Terrific Broth</i> -Medium
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TE	Tris-EDTA Puffer
Techn.	technisch
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TES	Tris EDTA Salz-Puffer
Thr	Threonin, eine Aminosäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)amminomethan
Trp	Tryptophan
<i>TSD</i>	<i>Triple Synthetic Dropout</i>
U	<i>Unit</i> , Einheit zur Angabe der Enzymaktivität

12. Abkürzungen

UAS	<i>Upstream Activating Sequence</i>
ü.N.	über Nacht
ÜS	Überstand
UTR	<i>Untranslated Region</i>
v. A.	vor Allem
vgl.	vergleiche
Vol	Volumen
VOZ1	VASCULAR PLANT ONE ZF 1
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
WL	Weißlicht
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)
WT	Wildtyp
X- α -Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-galatopyranosid
<i>Y2H</i>	<i>Yeast-Two Hybrid</i> , Hefe-Zwei-Hybrid System
<i>Y3H</i>	<i>Yeast-Three Hybrid</i>
YFP / YFP _N / YFP _C	YELLOW FLUORESCENT PROTEIN, N-terminale Region, C-terminale Region
YPDA	<i>Yeast Peptone Dextrose Adenin</i> , Hefe-Vollmedium
z.B.	zum Beispiel
ZF	Zinkfinger
z.T.	zum Teil

13. Anhang

1.1 Y2H-Kontrollen

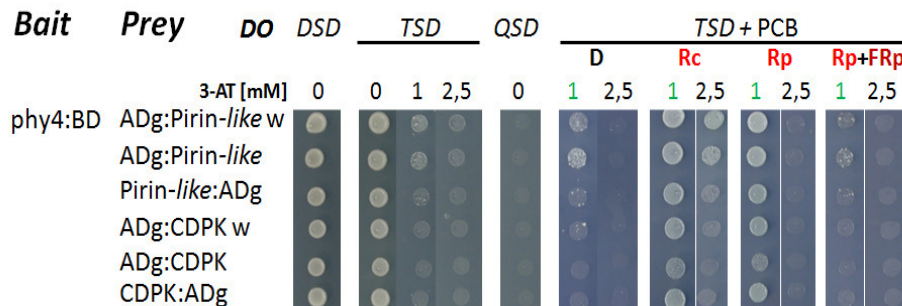
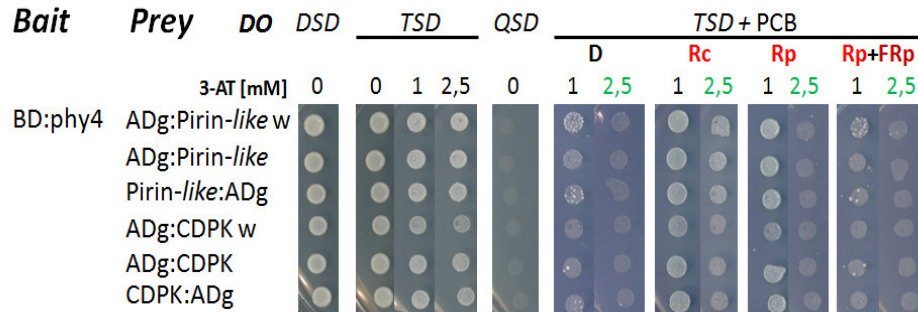


Abbildung 1: Semiquantitatives Y2H-Wachstums-Assay zum Vergleich des Interaktionsverhaltens von N-terminalen ADg-Fusionen (im Gateway Prey-Vektor) mit und ohne Stoppcodon am Beispiel Pirin-like-Protein und CDPK. 2×10^5 Zellen / Spot wurden auf DSD, TSD + 3-AT, TSD + PCB + 3-AT (in D, Rc, Rp, und Rp + FRp) aufgetropft. Beide phy4-Baits (BD:phy4 und phy4:BD) wurden mit ADg:Pirin-like und ADg:CDPK jeweils mit (w) und ohne Stoppcodon und mit Pirin-like:ADg / CDPK:ADg kombiniert. Die für das jeweilige Bait eingestellte 3-AT-konzentration (2,5 mM für BD:phy4 und 1 mM für phy4:BD) ist grün markiert. N-terminale ADg-Fusionen ohne Stoppcodon sind 24 AS länger, als mit Stoppcodon. Bei Pirin-like scheint das Vorhandensein des Stoppcodons keinen Unterschied zu machen, während bei CDPK die Interaktionsstärke von phy4:BD mit ADg:CDPK w stärker zu sein scheint, als mit AD:CDPK ohne Stoppcodon. Aus diesem Grund wurde entschieden, für alle putativen Partner zwei Entry-Klone herzustellen: einer mit und einer ohne Stoppcodon für N- bzw. C-terminale Fusionen.

1.2 Lokalisationskontrollen

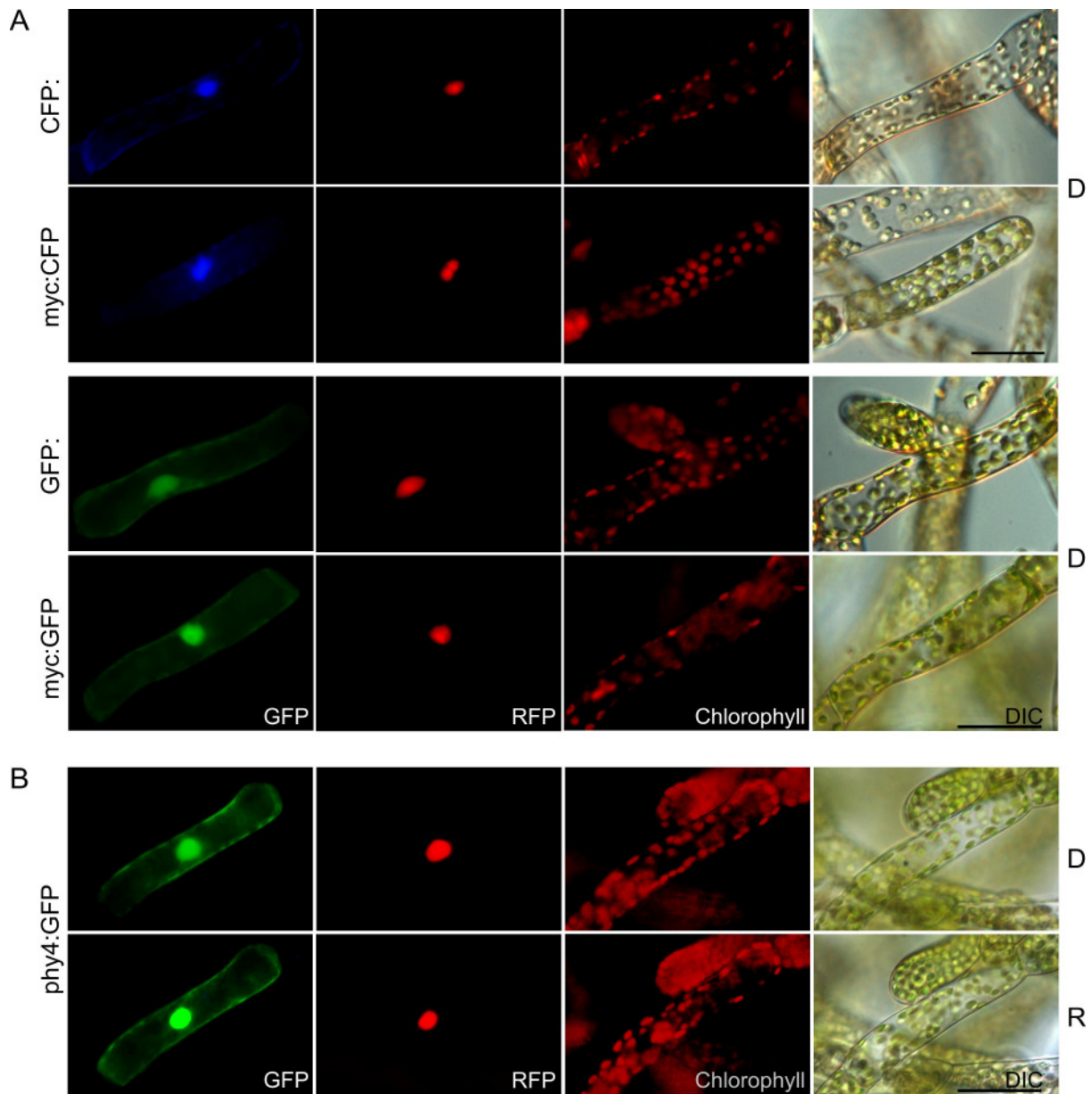


Abbildung 2: *In planta* Lokalisationskontrollen von CFP: und GFP für N-terminale FP-Fusionen bzw. von myc:CFP und myc:GFP für C-terminale FP-Fusionen (A) und Lokalisation von phy4:GFP ohne (D) und mit R-Vorbehandlung (R) alles dokumentiert mittels Fluoreszenzmikroskopie (B). Spalte 1 zeigt die Fluoreszenzverteilung des jeweiligen Fluoreszenzproteins (FP). Spalten 2-4 umfassen die rote Fluoreszenz des mCherry-NLS-Kernmarkers (RFP), Chlorophyll-Autofluoreszenz (Chlorophyll) und ein DIC-Transmissionsbild (DIC). **(A)** Alle FPs sind in Cytoplasma und Zellkern lokalisiert. **(B)** phy4:GFP liegt unabhängig von der Licht-Vorbehandlung in Cytoplasma und Zellkern vor. Maßstab 30 μm .

1.3 Split-YFP-Kontrollen

1.3.1 Split-YFP-Positivkontrollen

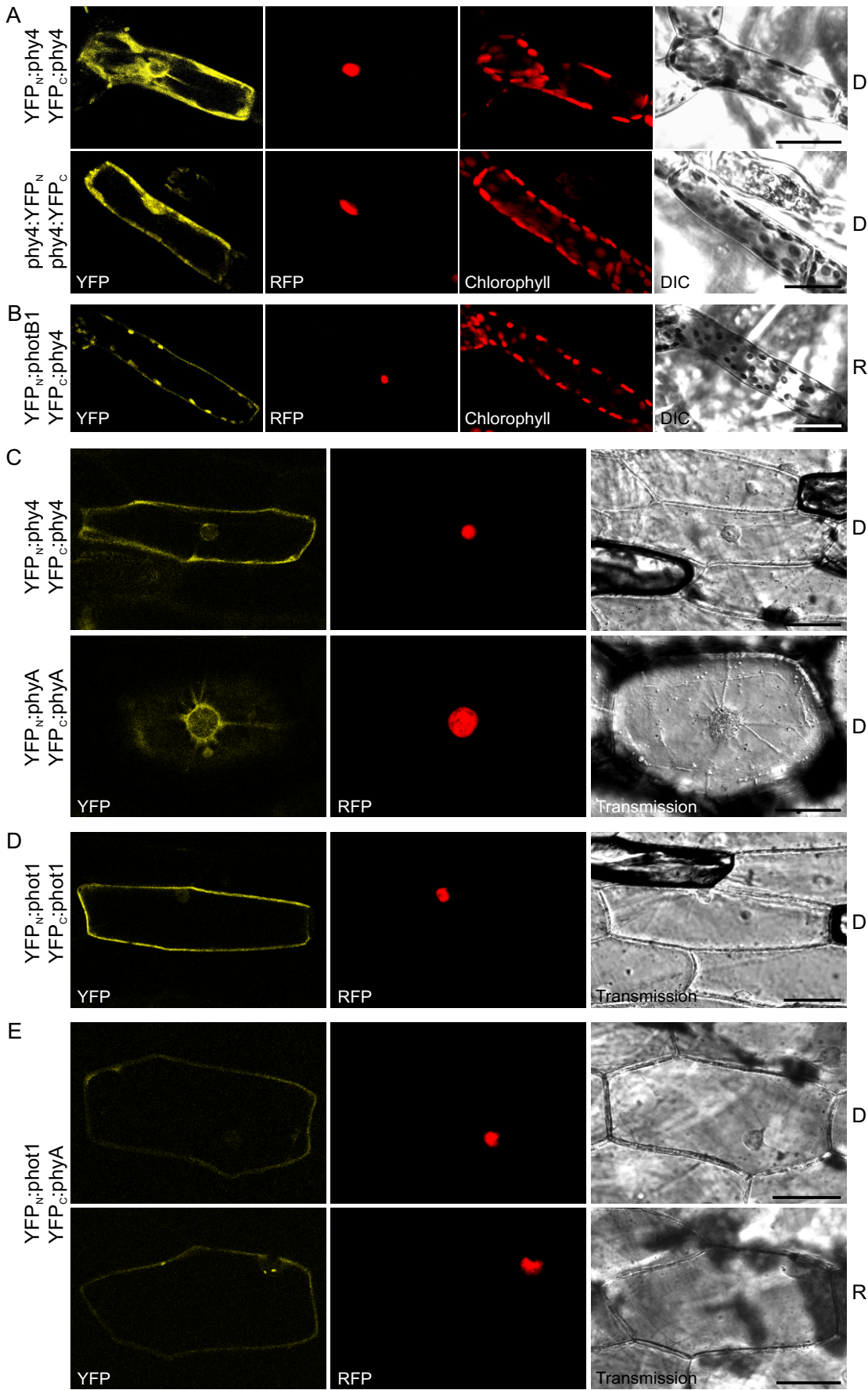


Abbildung 3: Positivkontrollen für *Split-YFP*-Experimente in *Physcomitrella* (A & B) und Zwiebel (C-E): phy4-Dimerisierung (A & C oben), phyA-Dimerisierung (C unten), phot1-Dimerisierung (D) und phy4-photB1- (B) bzw. phyA-phot1-Interaktion in D und R (E). Spalte 1 zeigt das Signalmuster des rekonstituierten YFPs (YFP). Spalten 2-4 umfassen die rote Fluoreszenz des mCherry-NLS-Kernmarkers (RFP), ggf. Chlorophyll-Autofluoreszenz (Chlorophyll, nur in A & B) und ein DIC- oder Transmissionsbild (DIC bzw. Transmission). **(A)** *Split-YFP* von phy4 jeweils mit N- oder C-terminal fusionierten YFP-Hälften in *Physcomitrella* Filamenten. In Einklang mit den Lokalisations- und *Split-YFP*-Daten von Dr. Mailliet lokalisiert YFP_N:phy4+YFP_C:phy4 in D ausschließlich im Cytoplasma und der perinukleären Region. Phy4:YFP_N+phy4:YFP_C hingegen ist in D im Einklang mit den Lokalisationsdaten einfacher FP-Fusionen (s. Anhang Abb. 2) in Cytoplasma und Zellkern zu beobachten. **(B)** YFP_N:photB1+YFP_C:phy4-Interaktion in *Physcomitrella*. Es konnte ein Signal in der Zellperipherie in Plasmamembrannähe gezeigt werden. **(C)** phy4- bzw. *Arabidopsis* phyA-Dimerisierung mit N-terminalen Tags in Zwiebelzellen. Sowohl YFP_N:phy4+YFP_C:phy4, als auch YFP_N:phyA+YFP_C:phyA dimerisieren auch ohne R-Bestrahlung in D und liegen im Cytoplasma vor. **(D)** *Arabidopsis* phot1-Dimerisierung mit N-terminalen Tags in Zwiebel-Epidermiszellen. Das starke Signal des rekonstituierten YFPs ist in D in der Zellperipherie in Plasmamembrannähe zu beobachten. **(E)** Interaktion von *Arabidopsis* phyA mit phot1 mit N-terminal fusionierten YFP-Hälften in Dunkelheit (D, oben) und nach R-Vorbehandlung (R, unten). Das schwache YFP-Signal ist sowohl in D als auch in R in der Zellperipherie erkennbar. Die beobachteten *Split-YFP*-Signalmuster entsprechen den Beobachtungen von Dr. Mailliet. Die Expression der pSAT-Konstrukte und die Funktionalität des *Split-YFP*-Assays in *Physcomitrella* und Zwiebel konnte somit bestätigt werden. Maßstab (A&B) 30 µm, (C-E) 100 µm.

1.3.2 Split-YFP-Negativkontrollen

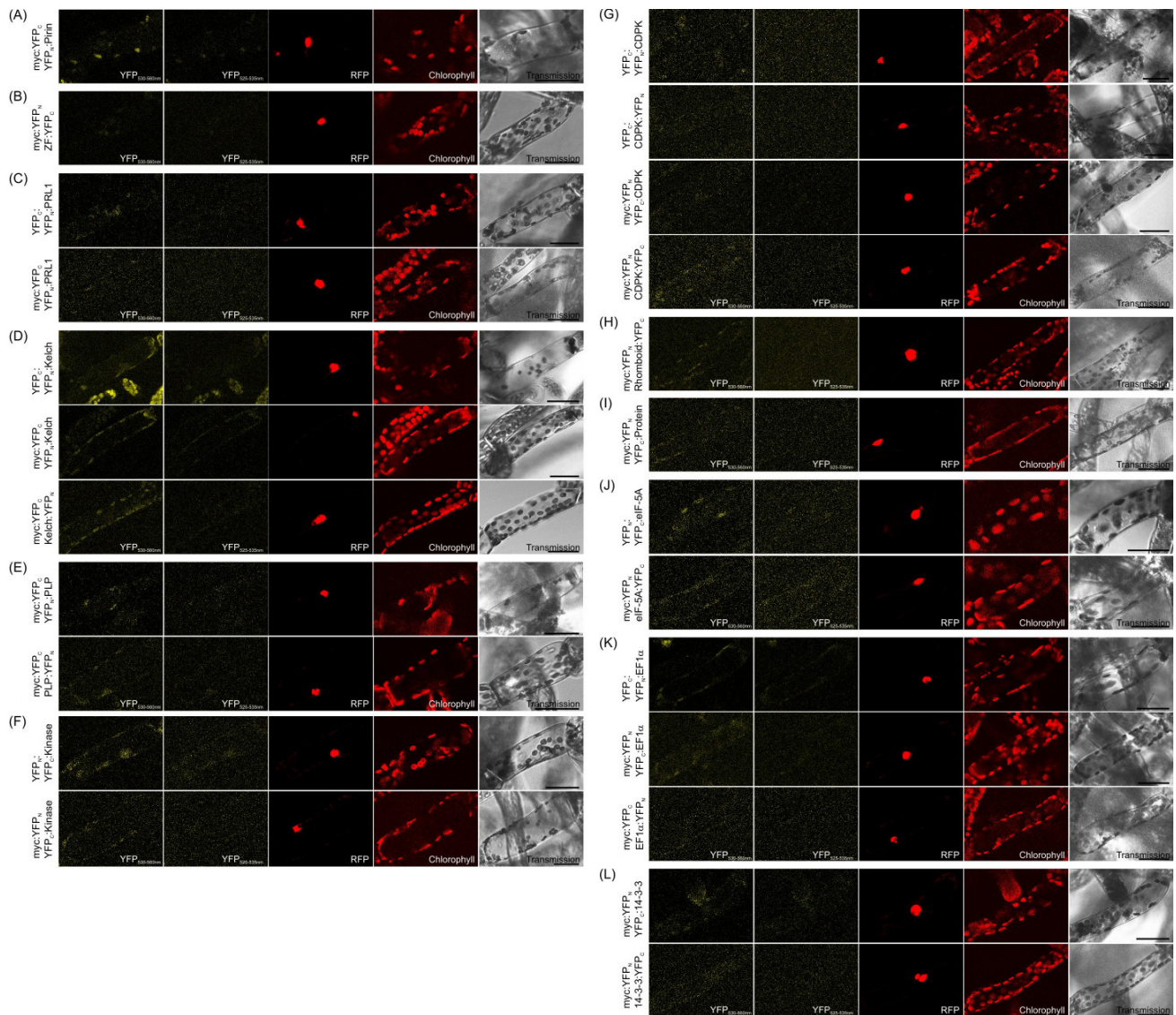


Abbildung 4: Split-YFP Negativkontrollen. Für Negativkontrollen für *in planta* phy4-Partner Split-YFP-Interaktions-Assays wurde das *PHY4*-Konstrukt durch den entsprechenden leeren Destinationsvektor für N-terminale Fusionen (pSAT4 DEST bzw. pSAT5 DEST) bzw. durch myc:YFP_N/myc:YFP_C für C-terminale Fusionen ersetzt. Negativkontrollen wurden mittels Konfokalmikroskopie für Pirin **(A)**, ZF-Protein **(B)**, PRL1 **(C)**, Kelch-Repeat-Protein **(D)**, PLP **(E)**, Ser/Thr-Proteinkinase **(F)**, CDPK **(G)**, Rhomboid-Peptidase **(H)**, unbekanntes Protein **(I)**, eIF-5A **(J)**, EF1α **(K)** und das 14-3-3-Protein **(L)** beobachtet. Spalte 1: YFP-Emission entsprechend der Abbildungen im Text (YFP). Spalte 2: eingeeengte YFP-Emission zwischen 525 und 535 nm zur Unterscheidung zwischen einem putativen mCherry:NLS-Bleedthrough in den YFP-Kanal und einem tatsächlichen YFP-Signal (YFP₅₂₅₋₅₃₅). Spalten 3-5 umfassen die rote Fluoreszenz des Kernmarkers (RFP), Chlorophyll Autofluoreszenz (Chlorophyll) und ein Transmissionsbild (Transmission). Alle Negativkontrollen wurden ohne R-Vorbehandlung durchgeführt, mit Ausnahme von myc:YFP_N+YFP_C:Ser/Thr-Proteinkinase und myc:YFP_N+Rhomboid-Peptidase:YFP_C (~1h R), da diese phy4-Partner-Interaktionen lichtabhängiges Interaktionsverhalten *in planta* aufwiesen. Maßstab 30 μm.

1.4 Semiquantitatives Y2H-Wachstums-Assay zur Untersuchung der phy4-Interaktion ausgewählter Interaktionspartner auf 1 und 2,5 mM 3-AT

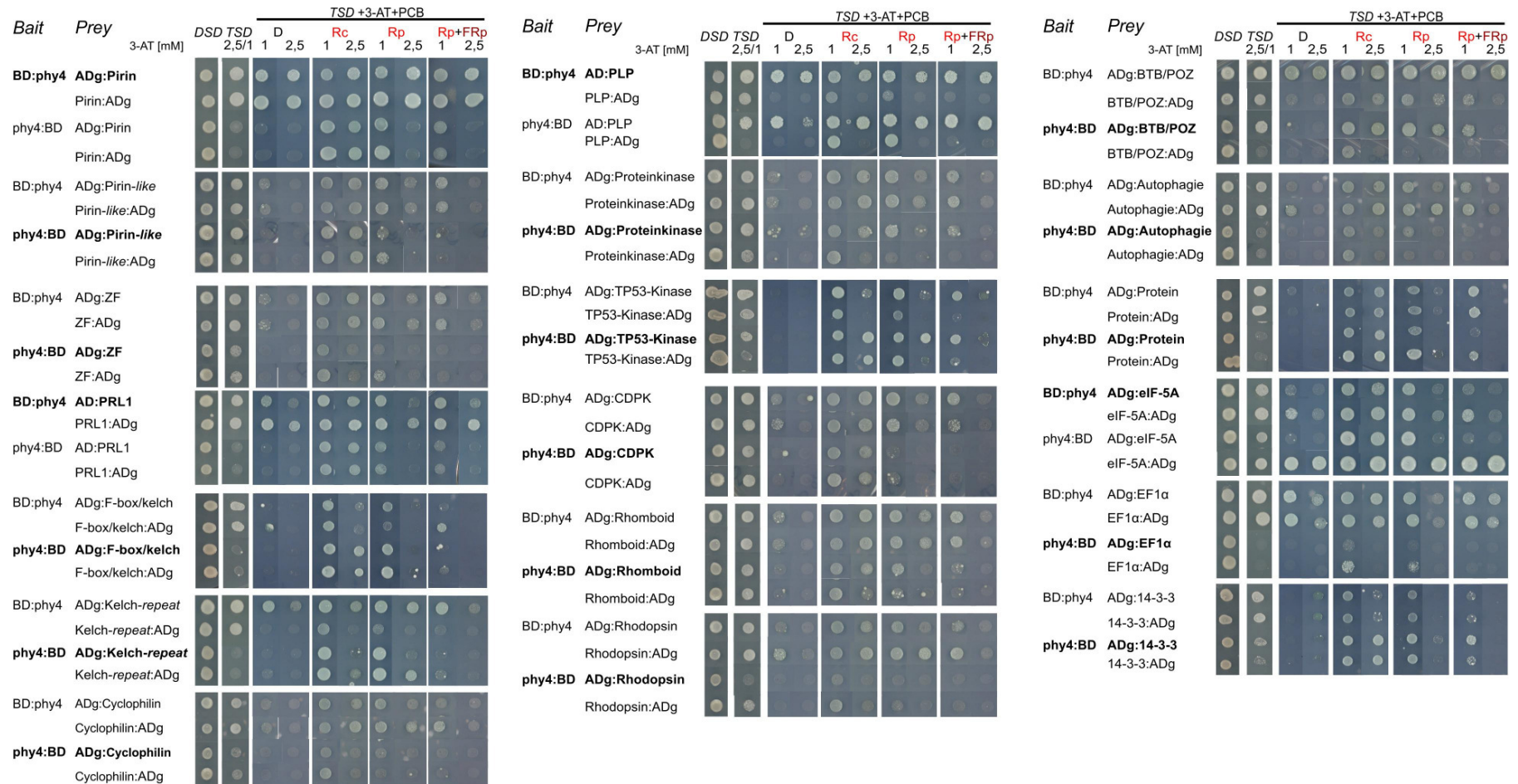


Abbildung 5: Semiquantitatives Y2H-Wachstums-Assay zur Untersuchung von Interaktionen von N- und C-terminal fusioniertem Holo-phy4 mit allen ausgewählten Interaktionspartner-AD(g)-Fusionen in D, Rc und Rp und in Rp + FRp. Der Aufbau der Abbildung entspricht Abb. 4-9. Darüber hinaus ist das Y2H-Interaktionsverhalten aller phy4-Partner-Konformationen auf TSD+PCB mit 1 mM (eigentlich für phy4:BD) und 2,5 mM 3-AT (für BD:phy4) dargestellt.

1.5 Übersicht über alle identifizierten Partner aus dem Holo-phy4:BD-cDNA-Library-Y2H-Screen

Tabelle 1: 60 Sequenzen aus 54 Hefeklonen (exklusive Duplikate) wurden analysiert: Spalten 1-3 geben die Nr. der Sequenz, die Bezeichnung des *Wells* bei der Sequenzierung, und die Bezeichnung des Hefe- bzw. des *E. coli*-Klons an. Spalten 4+5 beschreiben das Wachstumsverhalten der *Screening*-Hefen auf *TSD*+0,25 mM 3-AT + Xα-Gal mit und ohne PCB in Rc bzw. D (2. Selektionsrunde). Weiter rechts folgen NCBI mRNA- und Protein- und Cosmoss *Accession*-Nummern (Spalten 6-7). In Spalte 8 ist angegeben, ob es sich bei dem *Insert* im *Prey*-Vektor um eine FL CDS/cDNA handelte, oder nicht. Spalten 9-13 charakterisieren die *Physcomitrella*-Proteine hinsichtlich funktioneller Domänen, Homologen in *Arabidopsis* oder Viridiplantae, möglicher Funktionen (abgeleitet von Domänen oder Ortholog-Funktionen), Lokalisationsvorhersagen und Zuordnung zu GO-Begriffen. Grün markierte Zeilen markieren experimentell untersuchte Proteine.

Nr.	Well	Hefe / <i>E. coli</i> Klon	+PCB	-PCB	NCBI mRNA NCBI Protein	Cosmoss Modell	FL cDNA	InterPro Domänenvorhersage	Homologe in <i>Arabidopsis thaliana</i> (At) oder Viridiplantae	Mögliche Funktionen und Prozesse	Lokalisationsvorhersage	GO
1	A1	2.1 #1	++	+	dbj AB078009.1 Chloroplasten- Gene für Photosystem I P700 , Apoprotein A & B, ribosomales Protein S14 BAC05488.1 BAC05489.1 BAC05490.1	<i>Physcomitrella</i> Plastom NC_005087 (38714-39679) Pp3s107_40E1.1	Nein, nur 3' UTR	Photosystem I psaA/psaB Protein	Photosystem I P700 Chlorophyll A Apoprotein A1	Photosynthese	Plant-mPLOC: Chloroplast, TargetP: sekretorischer Weg	Metabolis- mus
2	A2	2.2 #2	+	-	Zunächst kein Treffer; aber Cosmoss-Treffer konnte NCBI Modell zugeordnet werden XP_001780083.1	wahrscheinlich Pp1s271_60V6.1	Sequenz liegt in 3'UTR	UTR site: UNR (Upstream of N- ras) Bindestelle; TIGR01640 F- box Protein Interaktionsdomäne; IPR011043 Galaktose Oxidase/Kelch, Beta-Propeller	F-box/Kelch-Repeat Protein in At; verschiedene vorhergesagte F-box/Kelch- Repeat Proteine in verschiedenen Pflanzen	Protein-Protein-Interaktion; z.B. Bestandteil von SCF Komplexen zur Ubiquitinierung und proteolytischem Abbau im Proteasom; Signaltransduktion	Plant-mPLOC: Chloroplast, TargetP: andere	Signal- trans- duktion
3	A3	2.3 #13	+	-	ref XM_00177760 8.1 XP_001777660.1	Pp3c15_20330J1. 1	Ja, exkl. UTR-Teile	Familie IPR022495: Serin/Threonin-Proteinkinase Bud32, IPR011009 Proteinkinase-ähnliche Domäne, IPR00719 Protein Kinase Domäne; IPR008266 Tyrosin-Protein Kinase, Aktives Zentrum	Viele Treffer in anderen Pflanzen; At TP53- regulating Kinase (NP_568482.1), verschiedene Isoformen von EKC/KEOPS Komplex Untereinheit Bud32-like (<i>Nicotiana sylvestris</i>) etc.	Protein Kinaseaktivität, ATP Bindung; Metalloprotease	Plant-mPLOC: Kern, TargetP: andere	Signal- trans- duktion?
4		2.6 #5	++	-	ref XM_00177775 3.1 XP_001777805.1	Pp1s227_44V6.1	Ja, exkl. 5'UTR-Teil	Phytocyanin; IPR003245 Plastocyanin-like; Cu-Binding- like	Beste Treffer At: Cupredoxin Domain- containing Protein; Plantacyanin; Blaues Kupferprotein, putativ; Uclacyanin 1 etc.	Kupferionenbindung, Elektronentransportaktivität	Plant-mPLOC: Zellmembran, TargetP: sekretorischer Weg	Metabolis- mus
5	A5	2.7 #1	++	+	Keine Ähnlichkeit zu NCBI- <i>Physcomitrella</i> mRNA-Sequenzen	Pp3c13_11180V1. 1	Nein	LSm4	U6 snRNA-assoziiertes Sm-like Protein LSm4 (NP_198124.1); Glycin-reiches und unbekanntes Protein	Splicing	Plant-mPLOC: Kern, TargetP: andere	Transkri- ption / Transla- tion
6	A7	2.8 #5 WDH	+	-	ref XM_00177706 7.1 XP_001777119.1	Pp1s215_81V6.1 / Pp3c25_1430C1.1	Ja, exkl. UTR-Teile	IPR001892 ribosomales Protein S13	40S ribosomales Protein S18 (<i>Arabidopsis</i>)	Translation, strukturelle Komponente des Ribosoms	Plant-mPLOC: Mitochondrium, Kern, TargetP: andere	Transkri- ption / Transla- tion
7	A10	2.11 #1	+++	-	Evtl. ref XM_00178226 0.1 XP_001782312.1	Pp1s326_44V6.1	Sequenz- daten unzu- reichend	IPR001155 NADH: Flavin Oxidoreduktase/ NADH Oxidase, N-terminal; Old Yellow Enzyme (OYE)-like FMN- Bindedomäne	Ziemlich konserviert, z.B. in <i>Arabidopsis</i> 12-Oxophytodienuat Reduktase 1 (NP_177794.1)	Ggf. Elektronenakzeptor in katalytischen Reaktionen, 12-Oxophytodienuat Reduktase-Aktivität, Jasmonat Biosynthese	Plant-mPLOC: Cytoplasma, TargetP: andere	Phyto- hormone

Nr.	Well	Hefe / <i>E. coli</i> Klon	+PCB	-PCB	NCBI mRNA NCBI Protein	Cosmos Modell	FL cDNA	InterPro Domänenvorhersage	Homologe in <i>Arabidopsis thaliana</i> (At) oder Viridiplantae	Mögliche Funktionen und Prozesse	Lokalisationsvorhersage	GO
8		2.16 #7	+	-	ref XM_00177227 3.1 XP_001772325.1	Pp1s149_88V6.1	Nein, revers	IPR003406 Glycosyl- Transferase, Familie 14	Recht konserviert, viele Treffer in At: z.B. <i>Core-2/1-branching beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase family protein</i> (ref NP_198815.1), sehr konserviert in Viridiplantae z.B. <i>Selaginella</i> : Glycosyltransferase CAZy Familie 14	Synthese von Di-, Oligo- und Polysacchariden, β -1,6-N-Acetylglucosaminyltransferase-Aktivität; Verzweigungs-Enzym	Plant-mPloc: Chloroplast, TargetP: Mitochondrium, diese Proteinfamilie enthält integrale Membranproteine	Metabolis- mus
9	B5	2.16 AL35 #32			ref XM_00177157 0.1 XP_001771622.1	Pp1s140_63V6.1 bzw. Pp3c3_8540C1.1	Nein	IPR000308 14-3-3 Protein	Sehr konserviert: 13 14-3-3 Proteine in At z.B. 14-3-3-like protein GF14 psi (ref NP_568557.1), At 14-3-3-like protein GF14 omega etc.	14-3-3 intrazelluläres <i>Signaling</i> , Proteinbindung, Phospho- <i>Sensing</i>	Plant-mPloc: Kern, TargetP: andere, WoLFPSORT: Kern/Plastid: 4.5, Cytoplasma: 4.0, Plastide: 4.0	Signal- trans- duktion
10	B6	2.17 #4	++	+	>ref XM_0017715 58.1 XP_001771610.1	Pp1s139_105V6.1 bzw. z.B. Pp3c1_11190C1.1	Nein	cd00204: ANK Ankyrin, pfam00651: BTB/POZ	Viele Treffer z.B. At BTB und TAZ domain protein 1 (NP_201121.1), At BTB/POZ domain-containing protein (NP_173597.1), 2 Homologe in <i>Physcomitrella</i> und <i>Selaginella</i>	Protein-Protein Interaktion (beide Domänen) BTB: Transkriptions-regulation, Cytoskelettdynamik, Ionenkanalassembly und -gating, Targeting von Proteinen zur Ubiquitinierung; Dimerisierung; ANK: divers z.B. Transkriptionsregulation, Ionenentransport und Signaltransduktion; evtl. Phytochrom-Interaktion und Anthocyaninsynthese	Plant-mPloc: Kern, WoLFPSORT Cytoplasma: 5.0, Kern: 4.0, TargetP: andere	Cyto- skelett
11	B8 >1 Hefe	z.B. 2.19 #24	++	+	>ref XM_0017587 85.1 XP_001758837.1	Evtl. Pp1s34_442V6.2. Länge der UTRs anders als NCBI	Nein, Teil d. CDS u. 3'UTR	Keine Treffer	Schlechte Übereinstimmung mit Viridiplantae-Proteinen, nur unbekannte/vorhergesagte/hypothetische Proteine & putativer Ionenkanal (Pollux-like-2-like; <i>Solanum lycopersicon</i>) etc; eher Übereinstimmung mit Pilzproteinen (z.B. <i>Piriformospora indica</i>)	?, Pollux: (Hefe) Aktin-Cytoskelett-Organisation; Zelladhäsion in <i>Drosophila</i> ; Ca^{2+} Signaling; Fabaceae: Ionenkanal für perinukleäres Ca^{2+} -Spiking in Wurzelepidermis (Knöllchenbakteriensymbiose)	Laut Literatur evtl. Plasmamembran, Plant-mPloc: Kern, WoLFPSORT: Chloroplast: 9.0, TargetP: sekretorischer Weg	Unbe- kannt
12	B11	2.20 AL35 #13	++	-	ref XM_00178271 1.1 aufgrund Sequenzierdaten- qualität schlechte Übereinstimmung XP_001782763.1	evtl. Pp1s340_22V6.1	Wahrschein- lich ja	IPR007109 Brix Domäne	Ziemlich konserviert z.B. in At: ribosomales RNA-Prozessierungs Brix Domänen Protein (NP_176564.1), putatives U3 <i>Small Nucleolar Ribonucleoprotein</i> , sehr konserviert in Viridiplantae	Ribosomale RNA-Prozessierung	Plant-mPloc: Chloroplast, TargetP: Mitochondrium	Transkrip- tion / Transla- tion
13		2.21 #32	- bis +	-	ref XM_00178078 1.1 XP_001780833.1	Pp1s287_61V6.2	Nein, Anfang CDS fehlt	IPR000131 ATPase, F1 Komplex, Gamma Untereinheit	sehr konserviert z.B. in <i>Arabidopsis</i> : ATP Synthase Gamma Kette 1 oder 2, Chloroplast, ATP Synthase Gamma Kette, Chloroplastenvorläufer	ATP-Synthase, gekoppelter Protonentransport	Plant-mPloc: Chloroplast, TargetP: Chloroplast	Metabolis- mus
14	C5 >1 Hefe	2.25 #45	+++	-	ref XM_00176207 0.1 XP_001762122.1	Evtl. Pp1s52_261V6.1, UTRs anders als bei NCBI	Ja, exkl. UTR-Teile	Keine Treffer	Schwache Ähnlichkeiten zu At-Proteinen: unbekanntes Protein, Dehydrin ERD10; putative Cinnamyl Alkohol Dehydrogenase etc., kaum Übereinstimmungen mit Viridiplantae-Proteinen (evtl. <i>Plantago major</i> / <i>Capsella bursa-pastoris</i> Dehydrine)	Evtl. Anpassung und Antwort auf Kälte-, Salz- und Trockenstress oder Akkumulation in später Phase der Embryogenese (Dehydrine sind eine Klasse der <i>Late Embryogenesis Abundant Proteins</i>)	Plant-mPloc: Cytoplasma, Kern, TargetP: andere	Stress
15	(C6)	2.27 #55	++	-	ref XM_00176203 7.1 XP_001762089.1	evtl. Pp1s52_157V6.1 UTRs anders als bei NCBI	Nein	IPR001344 Chlorophyll A-B Bindepotein, Pflanze	Viele ähnliche Treffer: z.B. At Photosystem II <i>Light Harvesting Complex</i> Protein 2.1 (NP_178585.1), Chlorophyll a-b Bindepotein 1 etc., konserviert in Viridiplantae: z.B. einige Treffer in <i>Euglena</i>	Photosynthese	Plant-mPloc: Chloroplast, TargetP: Chloroplast	Metabolis- mus
16	C10	2.29 #57	+++	+	>ref XM_0017607 73.1 XP_001760825.1	Pp1s45_25V6.2 / Pp3c1_3610C1.2	Ja, exkl. UTR-Teile	DUF3339 pfam 11820 (unbekannte Funktion)	At: uncharakterisierte Proteine evtl. GPI-verankert; RING-H2 Finger Protein ATL34 (NP_177414.1), Phospholipid-translocating ATPase etc., in Viridiplantae meist vorhergesagte Proteine	Glycosylphosphatidylinositol-Anker?; Verankerung von Glykoproteinen an der Zelloberfläche	Plant-mPloc: Zellmembran, WoLFPSORT: Cytoplasma: 6.5, TargetP: sekretorischer Weg	Membran- protein / Transport
17	C11	2.30 #93	++	+	>ref XM_0017819 30.1 XP_001781982.1	Evtl. Pp1s316_6V6.1, 3'UTR evtl. kürzer	Ja, exkl. UTR-Teile	IPR001971 ribosomales Protein S11; IPR018102 Ribosomal S11, <i>Conserved Site</i>	At: 40S ribosomales Protein S14-1.2 u.3; sehr konserviert in Viridiplantae z.B. in <i>Populus</i> oder <i>Ricinus</i> aber viele Andere auch nicht annotiert	Translation; strukturelle Komponente des Ribosoms	Plant-mPloc: Chloroplast, Cytoplasma; TargetP: andere	Transkrip- tion / Transla- tion

Nr.	Well	Hefe / <i>E. coli</i> Klon	+PCB	-PCB	NCBI mRNA NCBI Protein	Cosmos Modell	FL cDNA	InterPro Domänenvorhersage	Homologe in <i>Arabidopsis thaliana</i> (At) oder Viridiplantae	Mögliche Funktionen und Prozesse	Lokalisationsvorhersage	GO
18	>1 Hefe	z.B. 2.35 #97	++	-	>ref XM_001760712.1 XP_001760764.1	Pp1s44_116V6.1 bzw. Pp3c20_16210V1.1	ja; exkl. UTR-Teile	Signalpeptid und zwei Transmembrandomänen	Geringere Ähnlichkeiten mit At-Proteinen, bestes: pfkB-like Kohlenhydratkinase- Familie-Protein (NP_568369.1)	Regulatorische und / oder katalytische Funktion; es gibt u.A. Fruktokinase-like 1 and 2 in At: <i>Regulating Plastid-Encoded Polymerase</i> (PEP)-abhängige Chloroplasten-Transkription	Plant-mPLOC: Zellmembran, WoLFPSORT: extrazellulär: 10.0, TargetP: sekretorischer Weg	Signal- trans- duktion
19	D5	2.36 #109	+++	-	>ref XM_001769169.1 aber diskontinuierlich XP_001769221.1	Pp1s112_169V6.1	Wahrschein- lich ja, exkl. Teil der 5'UTR	IPR017941 Rieske [2Fe-2S] Eisen-Schwefel Domäne, IPR014909 CytB6-F_Fe-S Untereinheit, IPR014349 Ubiquinol-Cytochrom C Reduktase Eisen-Schwefel <i>related</i>	Sehr konserviert z.B. in At: Cytochrom b6-f Komplex Eisen-Schwefel Untereinheit, CytB6-f Komplex Eisen-Schwefel Untereinheit 1, Chloroplastenvorläufer (Rieske Eisen-Schwefel Protein 1), ISP 1 / RISP 1 <i>Nicotiana tabacum</i>	Plastohydrochinon:Plastocyanin- Oxidoreduktase-Aktivität; Elektronentransportaktivität, Oxidoreduktaseaktivität, Eisen- Schwefelclusterbindung	Plant-mPLOC: Chloroplast, TargetP: Chloroplast	Metabolis- mus
20	D6	2.37 #114	+++	-	nicht korrekt; cDNA <i>align</i> diskontinuierlich mit Modell	Pp1s55_66E3.1	Nein; Anfang der CDS fehlt	PTHR23241 <i>Late Embryogenesis Abundant</i> (Pflanzen) <i>LEA-related</i> ; BlastProDom: PD013253 APOLIPOPHORIN-III	Einige Treffer mit mittlerer Ähnlichkeit: in At z.B. <i>LEA</i> Protein-like (At5g44310), <i>LEA Domain-containing</i> Protein (ref NP_199244.1) etc., in anderen Pflanzen: z.B. <i>Group 3 LEA</i> Protein (<i>Brassica napus</i>), putatives ABA- induziertes Schließzellenprotein (<i>Vicia faba</i>)	Anpassung und Antwort auf Kälte-, Salz- und Trockenstress oder Akkumulation in später Phase der Embryogenese, Lipidbindung	Plant-mPLOC: Kern, TargetP: Chloroplast	Stress
21	D12	2.38 #23 neu	+	-	Mehrere Treffer, keiner perfekt, z.B. ref XM_001752760.1 XP_001752812.1	Pp1s6_313V6.1	Ja, exkl. UTR-Teile	IPR001344 Chlorophyll A-B Bindepotein, Pflanze	Sehr konserviert, viele Treffer z.B. in At: <i>Chlorophyll a-b Binding Protein</i> CP26 , 1 , 3 (NP_192772.1) oder Photosystem II <i>Light Harvesting Complex</i> Protein etc.	Photosynthese, Chlorophyll-Bindung	Plant-mPLOC: Chloroplast, TargetP: Chloroplast	Metabolis- mus
22		2.38 #174			ref XM_001759716.1 aber diskontinuierlich XP_001759768.1	Pp1s39_118V2.1 (Beginn hat keine EST Evidenz), Pp3c11_970V3.4 / V3.1 / J1.1 / J3.2	Möglich, exkl. 5'UTR- Teil	IPR018939 <i>Autophagy-related</i> Protein 27 und Transmembranregionen	At beste 6 Treffer: uncharakterisierte oder hypothetische Proteine; ziemlich konserviert in Viridiplantae, meist nicht annotiert außer z.B. <i>Autophagy-related 27</i> <i>Gossypium arboreum</i>	Autophagie (Hefe): Autophagie ist ein Abbauweg, bei dem cytosolische Proteine in doppellagigen Vesikeln (Autophagosomen) zur Vakuole transportiert werden, Auch: Lipidtransport von Golgi zu Doppelmembran-Vesikeln	Plant-mPLOC: Zellmembran, WoLFPSORT: extrazellulär: 8.0, TargetP: sekretorischer Weg	Metabolis- mus
23	E1	2.39 #186	+++	++	>ref XM_001776678.1 XP_001776730.1	Pp3c23_440V3.1, 4-Hydroxy-3- Methylbut-2-Enyl Diphosphat- reduktase Typ 1	Nein	IPR003451 LytB Protein	4 Treffer mit guter Übereinstimmung; 4- Hydroxy-3-Methylbut-2-Enyl Diphosphatreduktase; Chloroplast 1- Hydroxy-2-Methyl-Butenyl 4- Diphosphatreduktase & 2 putative Proteine	Terpen Biosynthese, Katalyse der Konversion von 1-Hydroxy-2-Methyl-2-(E)- Butenyl-4 Diphosphat in Isopentenyl- Diphosphat (IPP) und Dimethylallyl- Diphosphat (DMAPP)	Plant-mPLOC: Chloroplast, TargetP: Chloroplast	Metabolis- mus
24	E2	2.39 #181	+++	++	>ref XM_001771410.1 XP_001771462.1	evtl. Pp1s138_79V6.1 (cpk17) bzw. Pp3c11_25550V1.1	Nein	IPR000719 Proteinkinase, katalytische Domäne, IPR002048 Calcium-binding EF- Hand	Viele Treffer in At, sehr konserviert: Calcium-dependent Proteinkinase 1 (NP_196107.1) oder Calmodulin-Domänen Proteinkinase cdpk etc.	Protein Phosphorylierung, Proteinbindung, Calmodulin-abhängige Proteinkinase- Aktivität, N-terminale Protein Myristoylierung; At CPK17: polarisiertes Pollenschlauch-Wachstum	Plant-mPLOC: Kern, TargetP: andere, WoLFPSORT: Cytoplasma: 10.0	Signal- trans- duktion
25		2.40 #128	++	+	ref XM_001776106.1 XP_001776158.1	Z.B. Pp1s201_78E1.1, UTRs sind evtl. länger	Ja; exkl. UTR-Teile	IPR010530 NADH-Ubiquinon- Reduktase Komplex 1 MLRQ Untereinheit	Viele Treffer z.B. At B12D protein (NP_190397.1)	ATP-Synthese in Mitochondrien	Plant-mPLOC: Chloroplast, TargetP: sekretorischer Weg	Metabolis- mus
26	E6	2.42 #130	++	-	Nicht korrekt	Pp1s109_232V6.2	Ja	Pepsin-Retropepsin-like Superfamilie	At: Pentatricopeptid-Repeat-containing Protein NP_171976.1 & 1 uncharakterisiertes Protein	Pentatricopeptid-Repeat Proteine: meist RNA-Editing in Chloroplasten / Mitochondrien, Expressionsregulation durch Veränderung von mRNA-Sequenz,- Turnover, -Prozessierung und Translation	Plant-mPLOC: Cytoplasma, TargetP: andere	Transkri- ption / Transla- tion
27	E7	2.43 #142	++	-	>ref XM_001761863.1 XP_001761915.1	Aus Pp1s51_131 V6.1 u G2.1 selbst zusammengestellt bzw. Pp3c10_4820V1.1	Nein	IPR001841 Zinkfinger, RING- Typ; IPR008913 Zinkfinger, CHY-Typ	Viele Treffer, sehr konserviert: PGPD14 Protein (AAM65683.1), RING Finger und CHY ZF <i>Domain-containing</i> Protein 1 (NP_197683.1), <i>CHY</i> and <i>CTCHY</i> and <i>RING-type ZF Protein</i> (NP_197938.2)	GO:0005515 Proteinbindung; GO:0008270 Zinkionen-Bindung: Protein-Protein- Interaktion ; E3-Ligase Aktivität? Bindung von E2 Ubiquitin-konjugierenden Enzymen?	GO: cytoplasmatisches, Membran-umhülltes Vesikel, Plant-mPLOC: Cytoplasma, WoLFPSORT: Kern: 7.0, TargetP andere	Signal- trans- duktion

Nr.	Well	Hefe / <i>E. coli</i> Klon	+PCB	-PCB	NCBI mRNA NCBI Protein	Cosmos Modell	FL cDNA	InterPro Domänenvorhersage	Homologe in <i>Arabidopsis thaliana</i> (At) oder Viridiplantae	Mögliche Funktionen und Prozesse	Lokalisationsvorhersage	GO
28	E8	2.45 #151	+++	+	Keine Ähnlichkeit zu NCBI- <i>Physcomitrella</i> mRNA-Sequenzen, evtl. >ref XM_001769764.1	Pp3c1_14300V1.1 bzw. Pp1s86_25V6.1	Ja, exkl. UTR-Teile	IPR007836 ribosomales Protein L41 Domäne, <i>Coiled-Coil</i>	At 60S ribosomales Protein L41, ref NP_191161.1	Translation, strukturelle Komponente des Ribosoms	TargetP: andere, Proteinssequenz zu kurz für Plant-mPLOC	Transkription / Translation
29	E9	2.46 #220	++	+	Nicht korrekt	Pp1s444_27V6.1, Pp3c14_6380V1.1	Ja, exkl. UTR-Teile	2x <i>Rhodopsintail</i> & Transmembranregionen	At & Viridiplantae viele Treffer (z.T. mit Score 40-50): (adhäsive) Prolinreiche Proteine, <i>PLAC8 Family Protein</i> ; Glycin-/Prolinreiches Protein; <i>Theobroma cacao</i> F-box-protein	Rhodopsin-tail: intrazellulärer Tail mit repetitivem Gln / Pro-reichem Motif: evtl. Immobilisierung des Proteins an der Membran oder evtl. auch ordnende Funktion in Mikrovilli der Sehrezeptoren (dies könnte eine Rolle spielen bei der detektion von linear polarisiertem Licht)	Plant-mPLOC: Kern, PM? WoLFPSORT: extrazellulär: 4.0, Chloroplast: 3.0, TargetP: Mitochondrium	Membranprotein / Transport
30	E10	2.47 #228	++	-	U.A. >ref XM_001771210.1 XP_001771262.1	Evtl. Pp1s135_79V6.1 (UTRs besser als bei NCBI)	Ja, exkl. UTR-Teile	IPR002683 Photosystem II PsbP, <i>Oxygen Evolving Complex</i> , IPR016123 Mog1/PsbP_a/b/a-Sandwich	Viele Treffer z.B. At: putatives Photosystem II <i>Oxygen-Evolving Complex</i> 23K Untereinheit P-1, in Viridiplantae sehr konserviert	Photosynthese, Calciumionen-Bindung	Plant-mPLOC: Chloroplast, TargetP: Chloroplast	Metabolismus
31	E11	2.48 #238	+	-	>ref XM_001760461.1 deckt nicht gesamte Sequenz ab XP_001760513.1	Pp1s43_118V6.5	Ja, exkl. UTR Teile	IPR001765 <i>Carbonic Anhydrase</i> , IPR015892 <i>Carbonic Anhydrase</i> , <i>prokaryotic-like</i> , <i>Conserved Site</i>	Sehr konserviert in Viridiplantae, At: <i>Carbonic Anhydrase</i> 1 und 2, <i>Beta Carbonic Anhydrase</i> 3 und 4; <i>Carbonic Anhydrase</i> in <i>Nicotiana</i> , <i>Selaginella</i> , <i>Prunus</i> etc.	Carbonat-Dehydratase-Aktivität, Zinkionenbindung, Umsatz von Kohlenstoff, Katalyse der Reaktion $H_2O + CO_2 \rightarrow HCO_3^- + H^+$	Plant-mPLOC: Golgi Apparat, Kern, TargetP: andere	Metabolismus
32	E12	2.50 #243	+++	+	ref XM_001771289.1 XP_001771341.1	Pp3c7_3040V1.1 CDS entspricht Pp1s136_109V6.1	Nein	IPR006652 Kelch repeat type 1; IPR011498 Kelch <i>Repeat</i> Typ 2, IPR011043 Galaktose Oxidase/Kelch, Beta-Propeller, IPR015915 Kelch-Typ Beta Propeller	Viele konservierte Treffer z.B. NP_174015.2, diverse F-box/Kelch <i>Repeat</i> Proteine in At z.B. SKIP11 u.A., sehr konserviert in Viridiplantae z.B. <i>Selaginella</i> , <i>Populus</i> , oder evtl. eine Ubiquitin-Proteinligase in <i>Ricinus communis</i>	Kelch u. F-box: Proteinbindung, Kelch: divers u.A. Aktin- <i>Crosslinking</i> , F-box-Proteine: Photomorphogenese, Protein-Degradation als E3 Ubiquitin Ligasekomplex-Komponente? Hypocotylwachstumsregulation (CFK)?	At SKIP11 Kern, At FBK-Proteine sind meist nukleär / cytoplasmatisch, Plant-mPLOC: Kern, WoLFPSORT: Kern: 6.0, TargetP: andere	Signaltransduktion
33	F1	2.50 #11 WDH	+++	+	>ref XM_001776132.1 XP_001776184.1	Evtl. Pp1s202_35E1.1 bzw. Pp3c17_9390 V1.1 aber ein Intron in 5' UTR wird nicht gespleißt	Ja, exkl. UTR-Teile	IPR000719 Proteinkinase, katalytische Domäne, IPR002290 Serin/Threonin- / <i>Dual Specificity</i> Proteinkinase, c. d.; IPR011009 Protein Kinase-like Domäne	Diverse Treffer mit mittlerer Abdeckung und Identität in At, verschiedene Proteinkinasen z.B. Serin/Threonin-Proteinkinase HT1 oder <i>PAS Domain-containing Protein Tyrosine Kinase</i> , Viridiplantae: versch. HT1-like Proteine	Protein Phosphorylierung, ATP-Bindung, Proteinkinase-Aktivität. posttranslationale Modifikation, Regulation der Zielproteinaktivität, -lokalisierung oder -interaktion mit anderen Proteinen	Plant-mPLOC: Kern, Cytoplasma, WoLFPSORT: Chloroplast: 9.5, Chloroplast / Mitochondrium: 6.0, TargetP: andere	Signaltransduktion
34	F2	2.52 #260	+++	++	Keine Ähnlichkeit zu NCBI- <i>Physcomitrella</i> mRNA-Sequenzen	Pp1s67_30V6.4	Ja; exkl. UTR-Teile	Keine Treffer	Evtl. Histon-Lysin N-Methyltransferase (MEDEA) oder <i>Wall-associated Receptor Kinase 2</i> , bessere Übereinstimmung mit <i>Ceratodon purpureus</i> Protein gb AGK91388.1	MEDEA: Gametogenesekontrolle / Wachstum und Proliferation während Samenentwicklung (kontrolliert durch Endospermkomponenten), Repression von autonomer Endospermentwicklung	Plant-mPLOC: Cytoplasma Zellmembran, WoLFPSORT: Mitochondrium: 11.0, TargetP: andere	Unbekannt
35	F3	2.52 #264			>ref XM_001763837.1 XP_001763889.1	Pp1s64_4V6.1 / Pp3c5_7930 V3.1	Nein (NCBI); bzw. Modell-abhängig	IPR002059, IPR011129 & IPR019844 <i>Cold Shock Protein (Conserved Site)</i> , <i>DNA-Binding</i> , IPR016027 & IPR012340 <i>Nucleic Acid-binding (OB-fold)</i> , IPR001878 Zinkfinger, CCHC-Typ	Beste Treffer At: Glycine-reiches Protein 2B & 2, <i>Cold Shock Protein 1</i> , <i>Cold Shock Domain Protein 3</i> ; recht konserviert in Viridiplantae: meist vorhergesagte Glycinreiche Proteine oder Kälteschockproteine	Kältestress, Nukleinsäure-Bindung	Plant-mPLOC: Kern, TargetP: andere	Stress
36	F4	2.54 #273	+++	+	Evtl. >ref XM_001754008.1 XP_001754060.1	Pp1s254_10V6.2, V3 Modelle schlechter	Nein	IPR002610 Peptidase S54, Rhomboid, Rhomboid <i>Superfamily</i>	Viele Treffer in Viridiplantae (ziemlich konserviert), ein guter Treffer in At: <i>Rhomboid-related Intramembrane Serine Protease-like Protein</i> (NP_198667.1) = ein Membranprotein oder Rhomboid-like Protein 10	Intramembran-Serin-Proteasen (regulierte Intramembran-Proteolyse), <i>Enzyme Commission Summary</i> : Endopeptidasen, Multi-Membrandurch-spannende Proteine, Schnitt von Transmembrandomänen, AtRBL10: evtl. Funktion in Hitzeschock (Kanaoka <i>et al.</i> 2005), Intramembran-Protease-Aktivität in Pflanzen	Cosmos GO: integrales Membranprotein, Plant-mPLOC: Zellmembran, WoLFPSORT: Chloroplast: 8.0, TargetP: Mitochondrium	Membranprotein / Transport

Nr.	Well	Hefe / <i>E. coli</i> Klon	+PCB	-PCB	NCBI mRNA NCBI Protein	Cosmos Modell	FL cDNA	InterPro Domänenvorhersage	Homologe in <i>Arabidopsis thaliana</i> (At) oder Viridiplantae	Mögliche Funktionen und Prozesse	Lokalisationsvorhersage	GO
37	F5	2.55 #5	++	-	>ref XM_0017789 52.1 XP_001779004.1	Pp1s249_62V6.1 (5'UTR besser als NCBI)	Ja, exkl. UTR-Teile	IPR002130 <i>Cyclophilin-like Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase</i> Domäne	Sehr viele Treffer mit großer Übereinstimmung: ein Cyclophilin, CYP19- 1(ROC3), -2 (ROC6), CYP18-4, -3 (ROC1), CYP19-3 (ROC2), -4 (Cyp5)	Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase Aktivität, Proteinfaltung, At Cyclophiline: Protein-Trafficking / -Maturation, Rezeptor- Komplex-Stabilisierung, Apoptose, Rezeptor-Signalling, RNA-Prozessierung und Spliceosome-Assembly, Trupkin <i>et al.</i> 2012:ROC1-phy-cry BR Zusammenhang, Lavy <i>et al.</i> 2012: <i>A Pp Cyclophilin in Auxin Signalling</i>	Plant-mPLOC: Cytoplasma, WoLFPSORT: Cytoplasma: 10.0, TargetP: andere	Signal- trans- duktion
38	F6	2.56 #284	++	-	>ref XM_0017678 56.1 XP_001767908.1	Pp1s98_53V6.1	Nein, Ende & 3'UTR fehlen	Signalpeptid	Schlechte Übereinstimmungen mit Viridiplantae-Proteinen: in At & Viridiplantae & allen Organismen nur vorhergesagte und putative Proteine	?	Plant-mPLOC: Chloroplast, Mitochondrium, Kern, Peroxisom, TargetP: Mitochondrium	Unbe- kannt
39		2.58 #5	+++	+	Keine Ähnlichkeit zu NCBI- <i>Physcomitrella</i> mRNA-Sequenzen	Uneindeutig, kaum EST Evidenz, Pp1s339_33 E3.1 bzw. _32E1.1 oder Pp3c4_13110V1.1	Ja, exkl. UTR-Teile außer bei Pp1s339_33 E3.1	V3 Modell und Pp1s339_32E1.1 keine Domänen, Pp1s339_33E3.1 DUF2362	In allen Fällen Ähnlichkeiten zu Viridiplantae schwach, V3 Modell: <i>Actin- related Protein</i> od. <i>Golgi-Transport Complex-related</i> , E3.1 Modell: verschiedenste Treffer z.B. <i>Autophagy- related Protein 18E</i> , E1.1 Modell: meist unbekannte oder putative Proteine	?	Plant-mPLOC Pp1s339_32E1.1 Chloroplast, Golgi, Pp1s339_33E3.1 u. Pp1s339_33E2.1 Kern, Pp3c4_13110V1.1 Zellmembran, Chloroplast	Unbe- kannt
40	F8	2.59 #6	+++	+	>ref XM_0017511 65.1 XP_001751217.1	Pp1s1_74F1.1 / Pp3c2_37000C1.2 oder V3.1	Ja, exkl. UTR-Teile	Kein Treffer in Pp-Protein, aber <i>B-Cell Receptor-associated 31- like</i> in At-Treffern 1,2,4	Einige Treffer: meist unbekannte Proteine, uncharakterisierte Proteine (NP_566195.1 & NP_197221.1), unbekannt (AAM67218.1), <i>Protein B-Cell Receptor- associated 31-like Protein</i> (NP_564527.1)	<i>Protein B-Cell Receptor-associated 31-like</i> : molekulare Funktion unbekannt, ER- Membranprotein, Proteinprozessierung, evtl. intrazellulärer Proteintransport	Endomembransystem, integrales Membranprotein, ER, Plant-mPLOC: Kern, WoLFPSORT Cytoplasma: 5.0, Chloroplast: 3.0, TargetP: sekretorischer Weg	Membran- protein / Transport
41	F9	2.60 #3	++	+	>ref XM_0017563 11.1 XP_001756363.1	evtl. Pp1s22_322V6.1 (5'UTRs besster als bei NCBI)	Ja, exkl. UTR-Teile	IPR000916 <i>Bet v1-like (Birch Pollen Allergen)</i> , SRPBCC <i>Superfamily</i> , IPR019587 Polyketid Cyclase / Dehydrase	At: <i>Major Latex-like Protein 423</i> , <i>Pollen Allergen-like Protein</i> , verschiedene ABA- Rezeptoren: z.B. PYL4 oder PYL8	Bet v 1 u. A. Pathogenogenese-verwandte Proteine, Abwehrreaktion auf Pathogenbefall / Verletzung / abiotischen Stress, Antwort auf biotischen Stimulus oder auch Cytokinin-Bindeproteine	Bet v 1 ist cytoplasmatisch, Plant-mPLOC: Cytoplasma, WoLFPSORT: Cytoplasma: 6.0, TargetP: andere	Stress
42	F10	2.60 #7	++	+	ref XM_00177549 0.1 XP_001775542.1	Evtl. Pp1s193_54E3.1	Nein (?), Seq. Daten unzu- reichend	IPR018545 <i>CASC3/Barentsz eIF4AIII binding</i>	At: NP_565226.1 CASC3/Barentsz eIF4AIII Bindeprotein; AAD55481.1 unbekanntes Protein	CASC3 (<i>Cancer Susceptibility Candidate Gene 3 Protein</i>) / Barentsz (Btz) Komponente des <i>Exon Junction Complex</i> , einem Komplex der an posttranskriptioneller mRNA-Modifikation in Metazoa beteiligt ist	Plant-mPLOC: Kern, TargetP: andere	Transkrip- tion / Transla- tion
43	F11	2.61 #1	+++	++	>ref XM_0017573 60.1 XP_001757412.1	Pp1s27_223E3.1	Von Modell abhängig: nein (NCBI), ja (Cosmos)	IPR Kein Treffer, ProfileScan: PS51257 <i>Prokaryotic Lipoprotein</i>	NCBI Modell: schlechte Übereinstimmung mit Viridiplantae, At: evtl. Arabinogalaktan Protein 12 oder putative Serin Carboxy- Peptidase II, Cosmos Modell: evtl. Arabinogalaktan Protein 12 oder 16, Viridiplantae: versch. Arabinogalaktan Peptide	?	Plant-mPLOC: Kern (NCBI u Cosmos), TargetP: andere (NCBI), sekretorischer Weg (Cosmos)	Unbe- kannt
44	G2	2.63 #1	++	++	>ref XM_0017635 14.1 XP_001763566.1	Evtl. Pp1s61_255V6.2 <i>Trigger Factor</i>	Nein	IPR008880 <i>Trigger Factor, C- terminal, bacterial</i> , IPR008881 & IPR005215 <i>Trigger Factor</i> (ggf. <i>Ribosome-binding</i> , <i>bacterial</i>)	At: <i>Trigger Factor Type Chaperone Family Protein, Trigger Factor-like Protein</i> & ein hypothetisches Protein, sehr konserviert in Viridiplantae: z.B. <i>Selaginella</i> , <i>Vitis</i> , <i>Nicotiana</i> etc.	Triggerfaktor: Proteinexport in Bakterien; Ribosom-assoziiertes molekulares Chaperon (erster Kontakt mit nascierendem Peptid); ggf. Funktion als SRP (<i>Signal Recognition Particle</i>), Proteintransport	Plant-mPLOC: Chloroplast, Mitochondrium, Kern, TargetP: Chloroplast	Transkrip- tion / Transla- tion
45	G6	2.65 #7	++	+	>ref XM_0017730 07.1 XP_001773059.1	Pp1s158_181V2.1 bzw. Pp3c13_15620V1. 1	Ja, exkl. UTR-Teile	IPR001884 <i>Translation Elongation Factor IF5A</i> ; IPR005824 <i>KOW ribosomal Protein</i>	At: <i>Translation Initiation Factor eIF-5A</i> , <i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A- 3, 5A-2</i> ..., sehr konserviert in Viridiplantae: z.B. <i>Solanum spec.</i> , <i>Prunus</i> , <i>Fragaria</i> , <i>Nicotiana</i> etc.	Ribosombindung, RNA-Bindung, translationale Elongationsfaktor-Aktivität, transl. Initiationsfaktor-Aktivität; translationales <i>Frameshifting</i> , positive Regulation der translationalen Termination und Elongation, Peptidyl-Lysin-Modifikation zu Hypusin, Cytoskelett?	Plant-mPLOC: Cytoplasma, Mitochondrium, WoLFPSORT: Cytoplasma: 6.0, TargetP: andere	Transkrip- tion / Transla- tion

Nr.	Well	Hefe / <i>E. coli</i> Klon	+PCB	-PCB	NCBI mRNA NCBI Protein	Cosmos Modell	FL cDNA	InterPro Domänenvorhersage	Homologe in <i>Arabidopsis thaliana</i> (At) oder Viridiplantae	Mögliche Funktionen und Prozesse	Lokalisationsvorhersage	GO
46	G7	2.66 #3	+++	++	>ref XM_0017682 51.1 XP_001768345.1	Evtl. Pp1s101_226V2.1	Ja, fast inkl. UTRs	IPR000425 <i>Major Intrinsic Protein</i>	17 gute Treffer At: verschiedene Aquaporine bzw. verschiedene <i>Tonoplast Intrinsic Proteins</i> (TIP); auch in Viridiplantae sehr konserviert	Transport von Wasser, Ionen und kleinen neutralen Molekülen zwischen Zellen und aus der Zelle hinaus	Transmembranprotein, Plant- mPLOC: Zellmembran, Vakuole, Target P: andere	Membran- protein / Transport
47	G8	2.67 #2	++	+	>ref XM_0017766 51.1 XP_001776703.1	Pp1s209_115V6.2 / Pp3c14_15110V1. 1 (UTRs besser als bei NCBI)	Ja, exkl. UTR-Teile	IPR004241 <i>Autophagy Protein Atg8 Ubiquitin-like</i>	Sehr konserviert in Viridiplantae, At: putatives Microtubuli-assoziiertes Protein, <i>Autophagy-related Proteins</i> 8a/8b/8c etc., <i>GABA(A) Receptor-associated Protein</i> , ähnliche Treffer in <i>Solanum</i> , <i>Vitis</i> , <i>Ricinus</i> etc.	Autophagie (s. 2.38#174), Atg8 (Hefeprotein) an Autophagosom beteiligt, leichte Kette 3: Untereinheit von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAP) 1A und 1B, evtl. Regulator von MT- Bindungsaktivität; evtl. Funktion in intrazellulärem Membran- <i>Trafficking</i> und / oder -fusion	Plant-mPLOC: Cytoplasma, Kern, WoLFPSORT: Cytoplasma: 7.0, Kern: 4.0; TargetP: andere	Cyto- skelett
48		2.69 #3	+++	++	>ref XM_0017515 09.1 XP_001751561.1	Pp1s1_489V6.1 60s <i>ribosomal Protein l35</i>	Ja, exkl. UTR-Teile	IPR001854 <i>ribosomal Protein L29</i>	At: 60S <i>ribosomal Protein L35-4</i> ; sehr konserviert in Viridiplantae	Translation, strukturelle Komponente des Ribosoms	Plant-mPLOC: Chloroplast, TargetP: Chloroplast	Transkri- ption / Transla- tion
49		2.70 #7	+++	+	>ref XM_0017578 93.1 XP_001757891.1	Evtl. Pp1s30_87V6.3	Ja aber ist revers im Vektor	Kein Treffer, aber hat wohl ein Signalpeptid	Schlechte Übereinstimmung mit At Proteinen: verschiedene Metallothioneine, ähnliche Treffer in Viridiplantae: vorhergesagtes <i>Metallothionein-like Protein</i> in <i>Fragaria</i> , <i>Malus</i> , & <i>Metallothionein 1a</i> in <i>Populus</i>	Ubiquitäre Proteine, Schwermetall- Bindeaktivität, in Pflanzen z.T. konstitutiv exprimiert, z.T. durch abiotischen Stress induziert, wahrscheinlich Metall- Detoxifikation oder evtl. Abfangen von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)	Plant-mPLOC: Zellmembran, Kern, TargetP: sekretorischer Weg	Stress
50	G11	2.72 #6	+++	+++	2 Treffer, besserer: >ref XM_0017854 05.1 XP_001785457.1	2 Loci (CDS identisch): Pp1s472_14V6.1, Pp1s472_15V6.1	Nein	IPR001344/IPR001344 Chlorophyll A-B Bindeprotein, pflanzlich	Sehr konserviert, At: Chlorophyll a-b Bindeprotein CP29, ähnliche Treffer in Viridiplantae z.B. <i>Ricinus</i> , <i>Medicago</i> , <i>Nicotiana</i> , <i>Glycine</i> etc. oder z.B. <i>Light- Harvesting Complex II</i> Protein Lhcb4 in <i>Populus</i>	Photosynthese, Lichtreaktionen	Plant-mPLOC: Chloroplast, TargetP: Chloroplast	Metabolis- mus
51	G12 >1 Hefe	2.73 #1	+++	++	Nicht korrekt	Pp1s59_79E1.1 oder E2.1	Ja	PLNO2806 <i>Superfamily, Complex I Subunit (NADH:Ubiquinon- Oxidoreduktase-Komplex I der mitochondrialen Respirationskette)</i> , IPR unintegrated <i>Signal Peptide</i>	Beste Treffer At: putative und uncharakterisierte Proteine, recht konserviert in Viridiplantae aber alle vorhergesagt, hypothetisch oder uncharakterisiert (z.B. <i>Vitis</i> , <i>Prunus</i> , <i>Populus</i> , <i>Zea</i> , <i>Oryza</i> , <i>Sorghum</i> etc.)	Respiration	Plant-mPLOC: Zellmembran, Chloroplast, Cytoplasma, Mitochondrium, Kern, Peroxisom, WoLFPSORT: Chloroplast: 10.0, TargetP: Mitochondrium	Metabolis- mus
52	H1	2.74 #3	+++	+++	dbj AB120708.1 <i>Pp subsp. patens PprbcS1 mRNA for RuBisCO Small Chain</i> BAC87878.1	evtl. Pp3c13_16130V1. 1	Sequenz- daten unzu- reichend	IPR000894 Ribulose Bisphosphate Carboxylase <i>Small Chain</i>	Recht konserviert in Viridiplantae, in At z.B. Ribulose Bisphosphat Carboxylase <i>Small Chain</i> 1A	CO ₂ Fixierung und Photorespiration etc.	Plant-mPLOC: Chloroplast, TargetP: andere	Metabolis- mus
53	H2	2.77 #8	+++	++	>ref XM_0017763 77.1 nicht korrekt XP_001776429.1 nicht korrekt	Pp1s206_11V6.1	Ja, exkl. UTR-Teile	IPR004928 Photosystem I PsaH, Reaktionszentrum Untereinheit VI	At: Photosystem I Reaktionszentrum Untereinheit VI-2, verschiedene PSI Untereinheiten in Viridiplantae z.B. <i>Ricinus</i> , <i>Nicotiana</i> , <i>Brassica</i> , <i>Wolffia</i>	Photosynthese, Lichtreaktionen	Plant-mPLOC: Chloroplast, TargetP: sekretorischer Weg	Metabolis- mus
54		2.78 #6 Re- trans- forma- tion	+++	++	Keine Ähnlichkeit zu NCBI Pp mRNAs aber zu WGS PHYPA scaffold_3 47_Cont13606	Pp1s347_22V6.2	Nein, nur 3'UTR Teil	IPR010357 42-9-9 PROTEIN- <i>RELATED</i> , Protein mit unbekannter Funktion, DUF953; IPR012336 Thioredoxin-like	At: Unbekanntes Protein und ein Thioredoxin-like Protein Clot, sehr konserviert in Viridiplantae	Kontrolle der Aktivität von Zielproteinen durch Veränderung des Redoxstatus von Thiolgruppen, Reduktionsmittel von Disulfidgruppen, aktiviert meist katalytische Aktivität von Disulfidgruppen z.B. von Enzymen des Calvinzyklus	Es gibt Thioredoxin im Chloroplasten und auch eine Gruppe im Cytosol, Plant- mPLOC: Kern, TargetP: andere	Signal- trans- duktion
55	H5	2.81 #8	+	-	Keine Ähnlichkeit zu NCBI- <i>Physcomitrella</i> mRNA-Sequenzen	Pp1s10_389V6.1 50s ribosomales Protein	Nein, nur 3'UTR Teil	IPR001857 RIBOSOMAL PROTEIN L19	Ribosomales Protein L19 Familienprotein, 50S ribosomales Protein L19-1 u.Ä., 2 weitere Homologe in Pp, sehr konserviert in Viridiplantae	Translation, strukturelle Komponente des Ribosoms	Plant-mPLOC: Chloroplast, TargetP: Chloroplast	Transkri- ption / Transla- tion

Nr.	Well	Hefe / <i>E. coli</i> Klon	+PCB	-PCB	NCBI mRNA NCBI Protein	Cosmos Modell	FL cDNA	InterPro Domänenvorhersage	Homologe in <i>Arabidopsis thaliana</i> (At) oder Viridiplantae	Mögliche Funktionen und Prozesse	Lokalisationsvorhersage	GO
56	H6	2.82 #2	+	-	mehrere Treffer, beste 2: ref XM_001753646.1 / XP_001753698.1 >ref XM_001753648.1 / XP_001753700.1	Pp3c23_6600V1.1	Ja, exkl. UTR-Teile	IPR002922/IPR002922 Thiamin-Biosynthese Thi4 Protein	At: <i>Thiazole Biosynthetic Enzyme, Chain A</i> , sehr konserviert in Viridiplantae	Thiamin (Vitamin B1) Biosynthese, Cofaktor in Metabolismus-Wegen z.B. Glycolyse, Pentose-Phosphatweg, Tricarbonsäurezyklus; evtl. Funktion in biotischem und abiotischem Stress	Plant-mPLOC: Chloroplast, Mitochondrium, TargetP: Chloroplast	Metabolismus
57	H7 >1 Hefe	1.34 #8	-	+	>ref XM_001764469.1 nur partielle CDS XP_001764521.1	Pp1s68_239V6.1	Ja, exkl. UTR-Teile	IPR001240 N-(5'phosphoribosyl) Anthranilat-Isomerase (PRAI), IPR013785 Aldolase-Typ TIM barrel	Viele Treffer, recht konserviert z.B. At: Phosphoribosylanthranilat- Isomerase (>ref NP_172257.1) und andere PRAI-Proteine	Tryptophan-Biosynthese	Die At-Proteine sind wohl Chloroplasten-lokalisiert, Plant-mPLOC: Chloroplast, TargetP: andere	Metabolismus
58	H9	1.79 #1	-	(+)	>ref XM_001785445.1 XP_001785497.1	Pp1s3_512V6.1	Ja, exkl. UTR-Teile	IPR001569 ribosomales Protein L37e	At 60S ribosomales Protein L37-2	Translation, strukturelle Komponente des Ribosoms	Plant-mPLOC: Chloroplast, Mitochondrium, Kern, TargetP: Chloroplast	Transkription / Translation
59	H10	K6 #8	+++	-	>ref XM_001763151.1 XP_001763203.1	Pp1s59_196G2.1	Ja, aber exkl. 5'UTR	Keine Treffer	sehr viele Treffer, z.B. >ref NP_564069.1 uncharakterisiertes Protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	?	Plant-mPLOC: Kern, WoLFPSORT Kern: 14.0, TargetP: andere	Unbekannt
60	H12	K12 #7	+++	++	>ref XM_001784925.1 XP_001784977.1	Pp1s433_10V2.1 bzw. bzgl. CDS Pp3c19_20830V1.1	Nein	IPR003829 Pirin, N-terminale Domäne, IPR012093 Pirin, IPR011051 RmlC-like Cupin, IPR014710 RmlC-like Jelly Roll Fold, im ursprünglich exprimierten Stück nur IPR014710	At: 4 Homologe, Pirin-like Proteine und Pirine, in Viridiplantae z.B. RmlC-like Cupin (<i>Coccomyxa subellipsoidea</i>), & nur kürzere Stücke alignen mit diversen Pirinen z.B. in <i>Populus</i> , <i>Triphysaria</i> etc.	Interaktion mit GPA1? Regulation von Samenkeimung und -entwicklung; G-Protein-Signalling	Plant-mPLOC: Cytoplasma, WoLFPSORT: Chloroplast: 3.0, Vakuole: 3.0, E.R.: 3.0, TargetP: sekretorischer Weg	Signaltransduktion

1.6 Hierarchical Clustering-Analyse der Expressionsdaten von HIP1-14

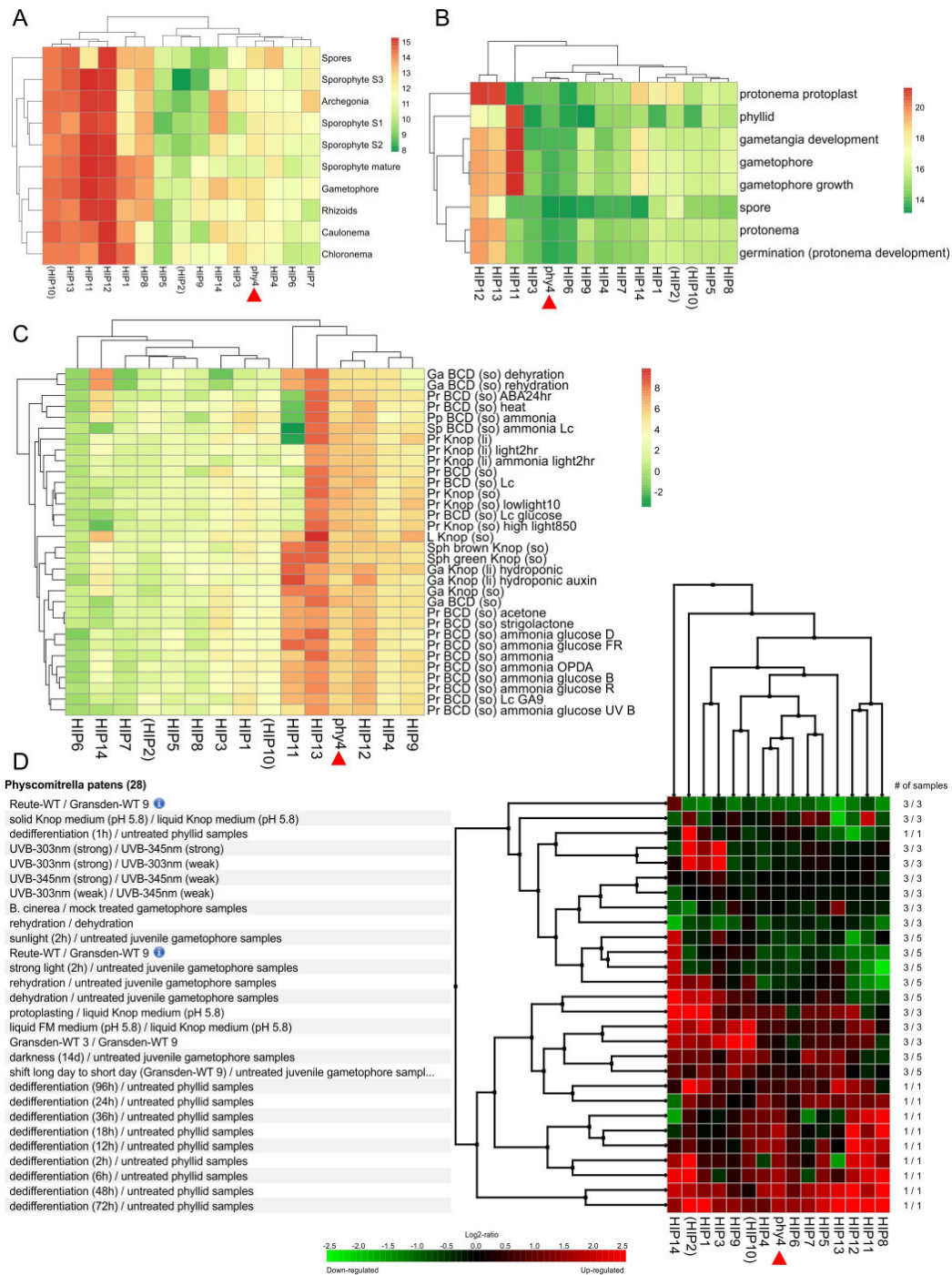


Abbildung 6. Hierarchical clustering von phy4- und HIP-Expressionsdaten vom eFP Browser (A) und Genevestigator (B) für Anatomie- und Entwicklungsstadien und von Phytozome (C) und Genevestigator (D) für unterschiedliche Behandlungen. Daten wurden log₂ transformiert und mittels ClustVis (A,B & C) bzw. Genevestigator (D) nach Genen und Bedingungen geordnet. In allen Fällen wurde das Manhattan-Distanzmaß angewandt. **(A)** Arithmetisches Mittel triplikatier RMA-normalisierter eFP-Microarray-Daten **(B)** Mittelwerte von Genevestigator Microarray-Daten für Anatomie und unterschiedliche Entwicklungsstadien. **(C)** Phytozome11 FPKM (fragments per kb exon per million reads) RNAseq Werte für unterschiedliche Bedingungen. In **(D)** sind die Mittelwerte der log₂-skalierten Genevestigator Microarray-Daten für verschiedene Behandlungen als relative Werte einer Bedingung im Vergleich zu einer Kontrollbedingung dargestellt. Wenn resultierende Werte <1, wurde der negative Reziprokwert berechnet, um eine Skala von negativen Werten (Herunter-Regulation, grün) über 0 (keine Änderung der Expression, schwarz) zu positiven Werten (Hoch-Regulation, rot) zu erhalten.

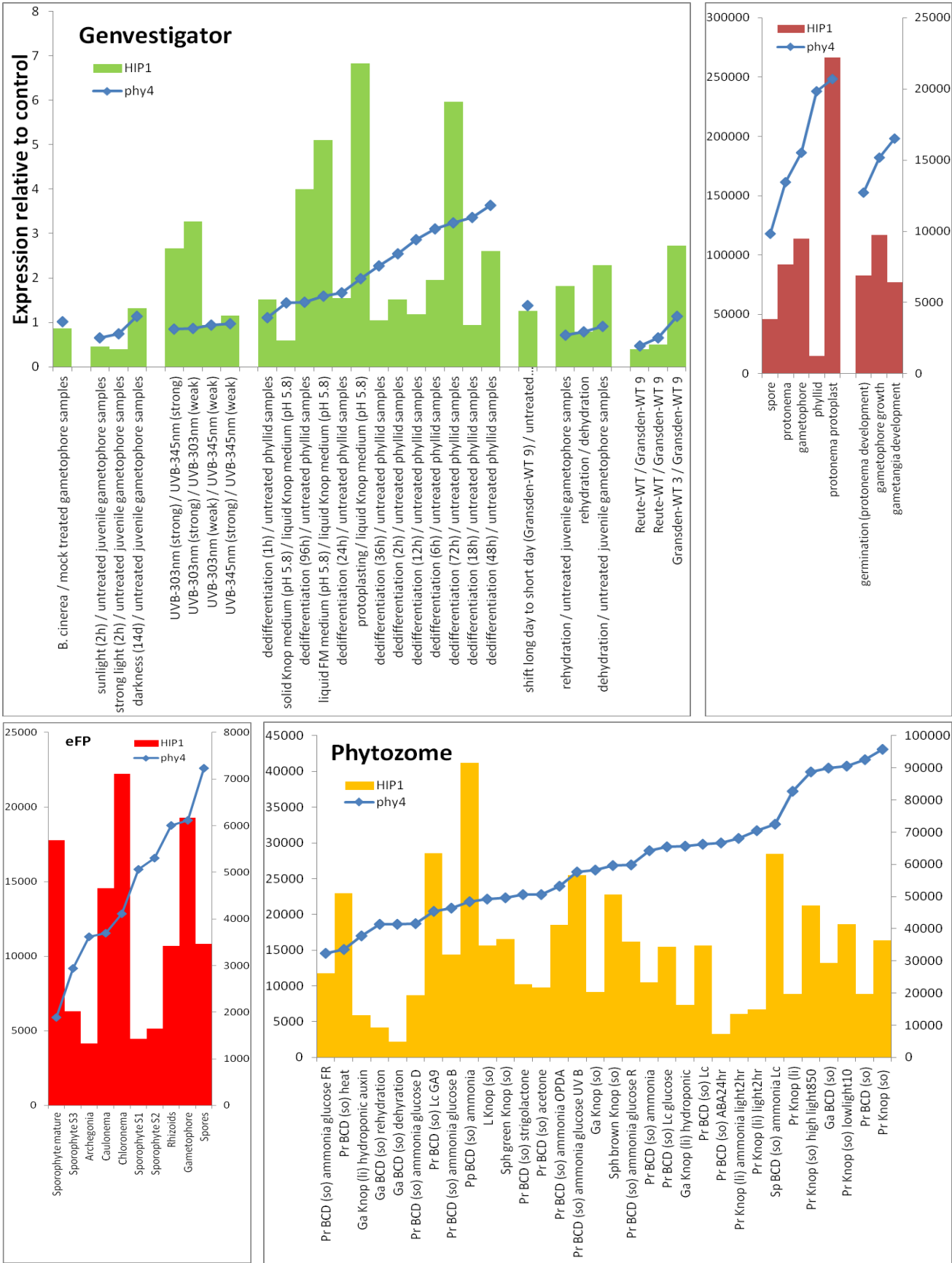
1.7 Zusätzliche Daten zu ausgewählten phy4-Interaktoren

1.7.1 Pirin / HIP1 (Pp3c2_10320V1.1)

CDS

ATGTTTTCCGCTTGTGCTCTCAGAGTTTCTCCGATTCCCTCACTTGTGCGACGTAATTGTGGGTGCTAAGAGTCTATTCGTG
AGGAGGGATTTTCGTGTCCCGTGTTTCGATTTGCGGAGGTTGGATCTCGGCGTGGTAGGAGTTGGGTTGGTGTACGTGCCATG
GGTAGCGTTCCCGCTGATTTCTCTAAACCCCGGAAGGTTGTGAAGAAAGTCCCTCTCTCAAGCGCAGCCCCGAGGGCGATGGC
GCAACCGTGCGACGAAGCATTGGCAGGCCGGAGTTGAAGCAGCTGGACCCTTTCCTGCTTCTAGACTATTTTGAAGCTTCT
GGGCCCCGCTGGTTTTTCCCGATCATCCTCATCGAGGATTTGAGACCGTCACGTACATGCTTCAGGGGTCCTTTACGCATGAA
GATTTTGCGGGTCATAAGGGCATTCTCGAAGCCGGTGACGTTTCAGTGGATGACAGCTGGACGTGGAATAGTACACAGCGAA
ATGCCGTCGCCAGTAGGAGTTCAGAGGGGTCTGCAATTGTGGGTCAATTTGGCAGGAAAAGATAAAAATGATTGAGCCAAAT
TACCAAGAACTAAAAGCTAAAGACATAACCGAGGATTGAAAAAGATGGCGTGGAAGTTGTCATAATTGCTGGGGAATCTTTT
GGCGTCAAGTCACCGGTGTACACTCGCACCCCAACCATGTACTTGGATTTCTACCTACAGCCAGGCGCCTCGTTACACCAA
GCCATTCCCGAAGGATGGAACGCCCTTACCTTTGTCTGAAGGGGAGCATGGTGTTTGGGAAGGAGGACGCACCACCAATT
GGTCCAAGTCATACAGTTGTCTTAAGTGATGGTGACGGTCTCAGTGCTTGGAACAAGGGCACAGAACCTGCTCAGTTTGTG
CTAGTAGGTGGGAAGCCTTTGAATGAACCTGTAGCGCAATACGGCCCCCTTGTGATGAATACTCAGGCGCAACTCATGGAA
GCTGTTAGAGACTATCAGTATGGTAAGAATGGGTTCGAAAGAGCTCACTCTTGGAGATCAGAGGCCAAGGCCCAGTCCACA
CCATAG

Pirin Expressionsdaten

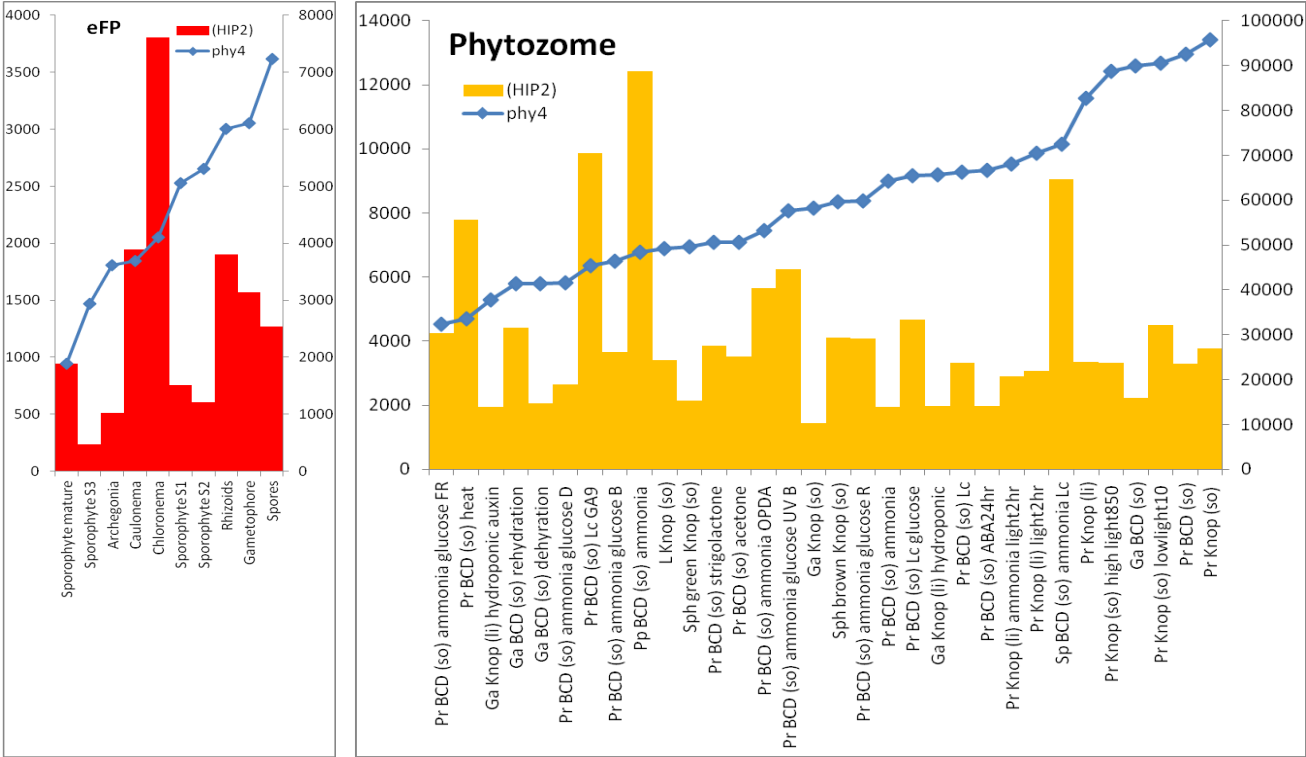
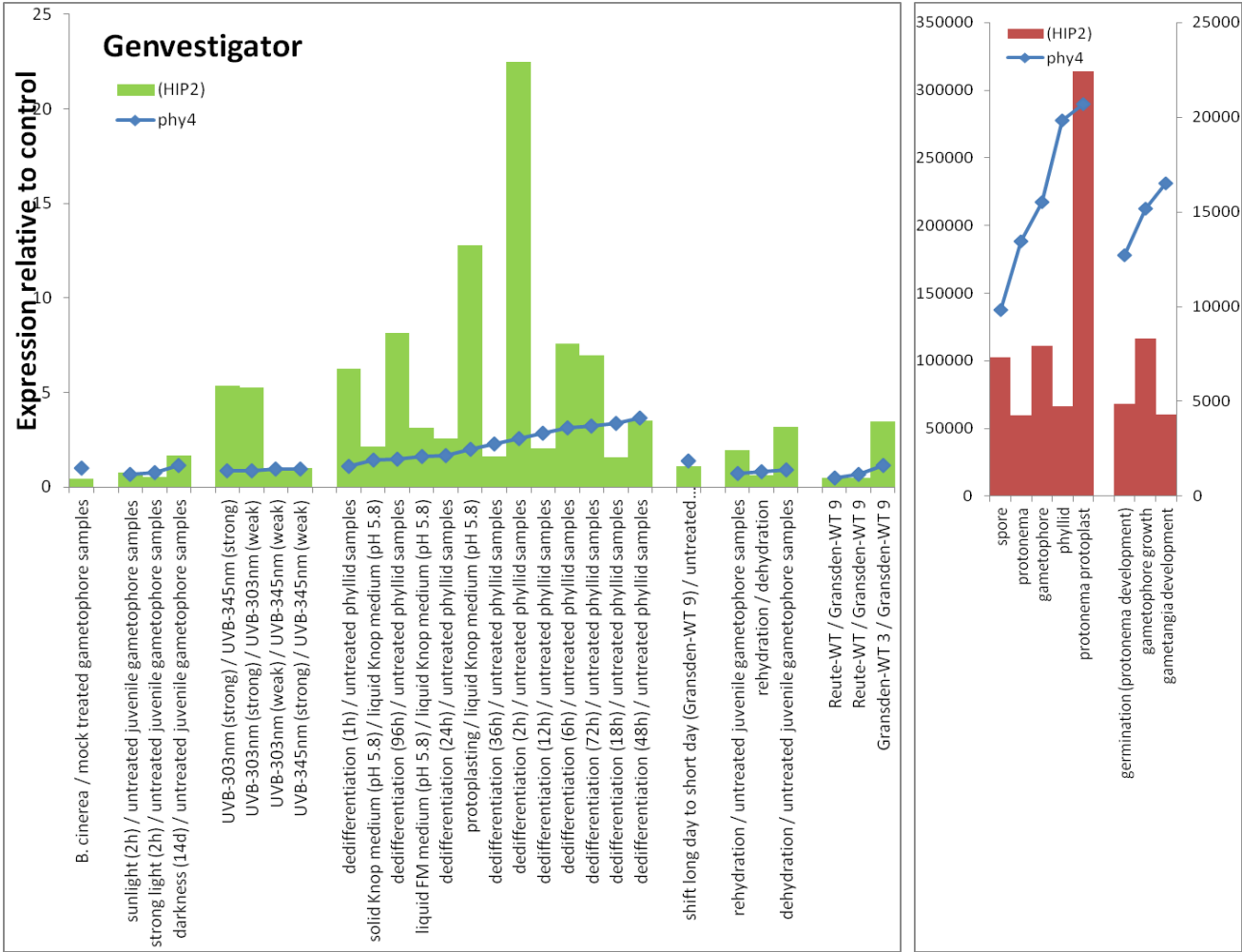


1.7.2 Pirin-like / (HIP2) (Pp3c19_20830V1.1)

CDS

ATGTGTGCATTCTTTCTCCATCTGAAGAGTACCCCTTATTTTCTCATTTTAGTGCTTTGCGTTTTGTACCCGTTTCATCATG
TTTTTCCTCTCCAGGAAAACCTCCTCCAGTGGCAGAGAAGTCTGTCCCTTCTGCATCCCTCGCAGAAGATGAGGCACATTCCA
GCGAAGTGTCTTCACGTTTCCACGCCTACATGGTGGTTGGAGAGCCGCTTTCATTTTCAGTTTTGCAGAGTACTATAACCCG
GCAAACCAAGAGTTTTGGAGTTCTGCGAGTTCTTAACGACGATCTTGTCAAGCCTCAGGCAGGGTTCGGTACTCACGGTCAT
CGTGACATGGAAATCTTCACGTACATTGTGGATGGAAAAC TGACCCACAGAGACAGCATTGGGACGTCTGAGACCTTGGGT
CGTGGCTCGGTTTCAGTACATGAGTGCGGGGACAGGGATTAGACATTCTGAGATGAACAACGGCGATGACTTGTTGCGCTTC
TTACAAATATGGATCAAGCCTGACAGATATGGTCTCAAGCCGAATTATGGTTCACGTGTATTCAAGAAAGACGACCGTCAC
AACAAGCTGCAGCACGTGTTGACAGATTTCAAAAGATACGAGAGCGAGAAAGATGCTGGTGAGGGTGTTATCCCCATCCAC
CAGGACTGCAATATTTATGTATCCGAGGCCGATGCAGGTGTTGTACAAGACTTCGTGCTTGCTAAGAAACGGCAAGCCTAT
ATGGTGTGCATTGAGGGTAAACTTTCTTTAAGTGAGAAGGTGCAGCTGGACTTTTCGTGATGCGGTTGAGATAACGGCGGGA
GCTGTAGAAGATCTACCACTGAAGCTCAAGGCTGATGAGAATGTGGGCGCACACTATATTATAATCGAGATGGCTCTGGCG
TAA

Pirin- like Expressionsdaten



Pirin- *like* Lokalisations- und *Split-YFP*-Daten

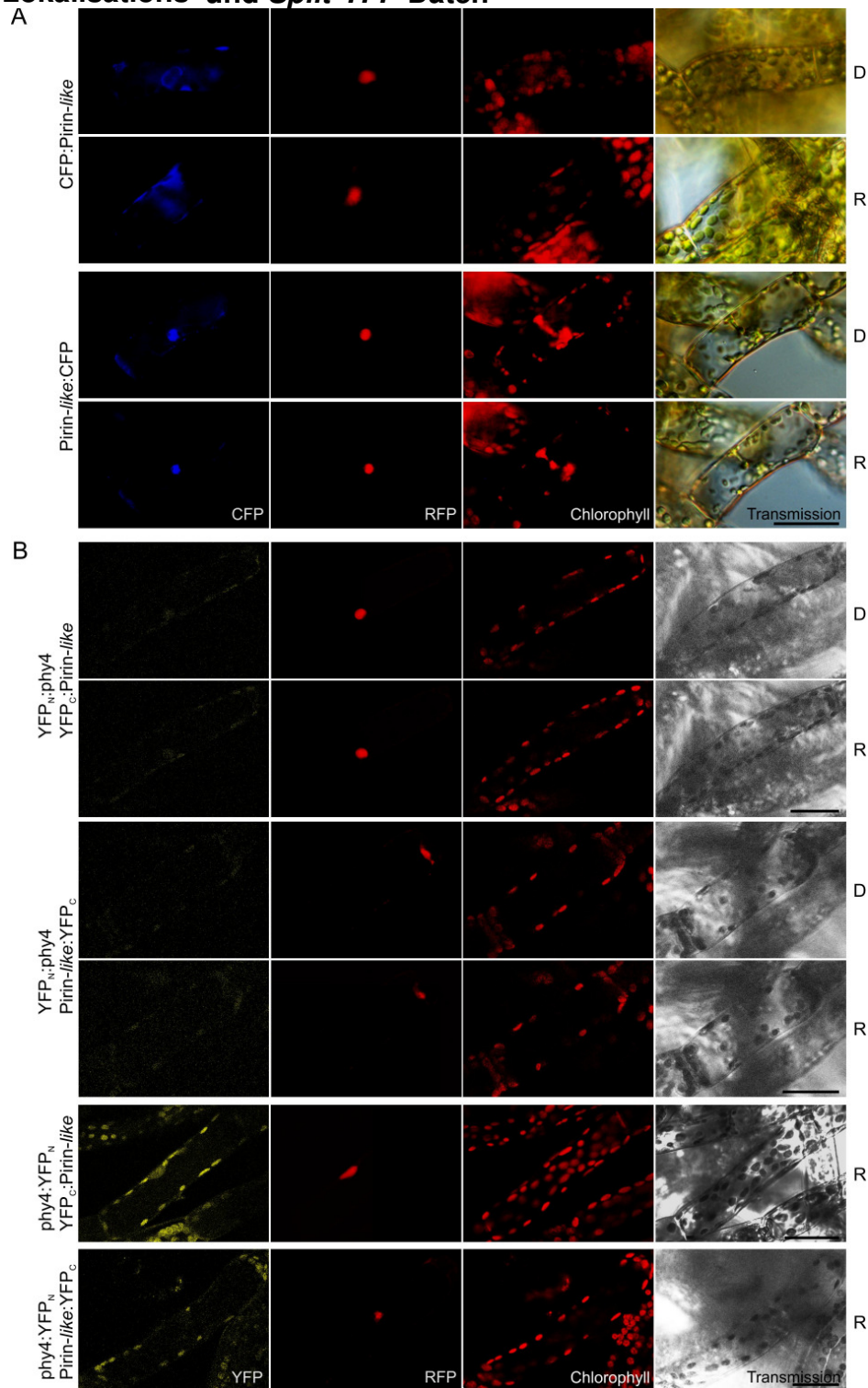


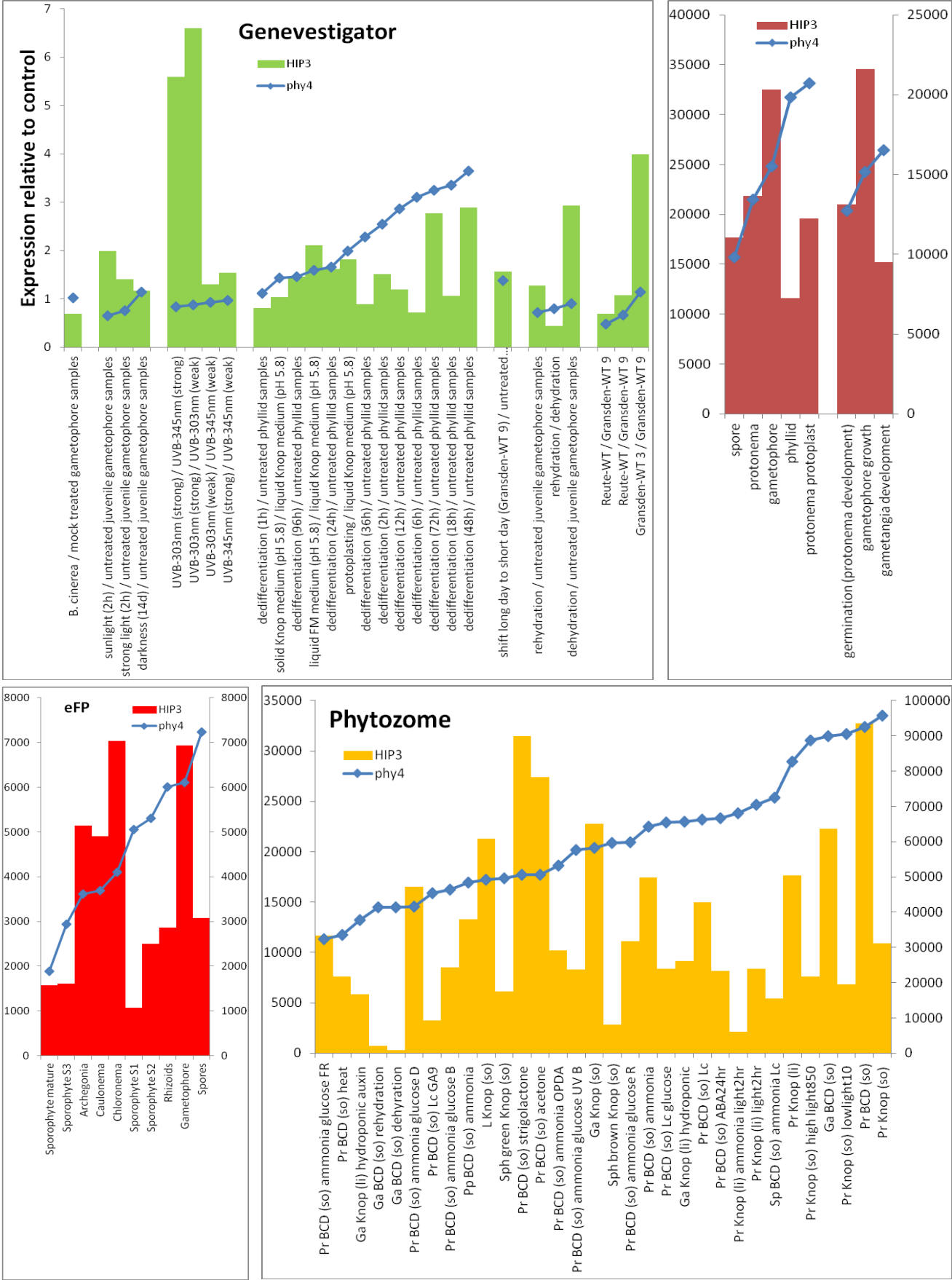
Abbildung 7: Pirin-*like* (Pp3c19_20830V1.1) intrazelluläre Lokalisations- (A) und *Split-YFP* Studien der Pirin-*like*-phy4 Interaktion (B) beide ohne (D) und mit R-Vorbehandlung (R) mittels Fluoreszenz- bzw. Konfokalmikroskopie. Die Struktur der Abb. entspricht Abb. 4-10 im Haupttext (A) CFP:Pirin-*like* (Reihen 1+2) und Pirin-*like*:CFP (Reihen 3+4) lokalisierte im Cytoplasma bzw. in Cytoplasma und Zellkern (Spalte 1, CFP). (B) Alle möglichen *Split-YFP*-Konfigurationen wurden untersucht: YFP_N:phy4+YFP_C:Pirin-*like* (Reihen 1+2), YFP_N:phy4+Pirin-*like*:YFP_C (Reihen 3+4), phy4:YFP_N-YFP_C:Pirin-*like* (Reihe 5, nur R) und phy4:YFP_N-Pirin-*like*:YFP_C (Reihe 6, nur R). Es konnte kein signifikantes YFP-Signal beobachtet werden. Maßstab 30 µm.

1.7.3 ZF-Protein / HIP3 (Pp3c10_4820V1.1)

CDS

ATGGCCGTCCTCGCAGTCCGAATGGAGGCTCTCCTCTCTCCATTGATGAGTGGGGAGCAGTTTCGCTATGCTTACAACAAT
GTCGCAGCGCATTTCTCACCATCATGTCGTTGCGGGACATACTAGCTGTTTAGACTCCGATGTGGAGGATGACGATGATGAT
GATTTTACGGAAGACCTTGTCCAAGCTTGGAAGTTGTCTATTGGAGCCAATCGCTACGGGTGTACACACTACAAAAGGAGA
TGCAAGATCCGTGCTCCGTGCTGCAATGAAGTCTTCGACTGCCGGCATTGTGCATAATGAAGCCAAGAGTGTTAATGAAACA
GACGACAAAAACGCCACGAGATTGACCGGCACCTCGTTGAAAAGGTCATCTGTTTCATTGTGCGACCATGAGCAAAATGTA
CAACAAGTATGTGAAAAGTGCGGGGTCTGTATGGGCGAATTCTTCTGCTCGAAGTGCAACTTCTTTGACGATGATACCTCG
AAGGATCAATATCATTGCGACAAATGTGGGATCTGCAGAACTGGTGGACGTGACAACTTTTTTTCATTGTGATCGTTGTGGC
TGTTGCTACTCAGTTAAATTACGCGAGGGTCACACCTGTGTTGAGAAGTCTATGCACCAAGACTGTCCAGTTTGCATGGAG
TACATGTTTCGACTCACTGAAGGACATCACAGTTTTAACGTGTGGTCATACTTTGCACCTGGAATGTCTACAAGAGATGCAT
AGTCATTATAAGTACAATTGTCCACTTTGCAACAAGTCCGTTTGGCAGATATGTCATCTGTCTGGAAGGAGATTGACGAAGAG
ATTGCTGCAACTCAAATGCCAGCAAATGAAATGAGAATGGTTTGGGTCTTCTGTAATGATTGTGGTGCCACAAATGAAGTG
CAATATCATCATGTTGGACAGAAGTGTGGAACCTGTCCATCTTACAACACTCGTCCCACAGATGCTCCAGCCTCACTTGCC
TCATCTAGATCGTAA

ZF-Protein Expressionsdaten

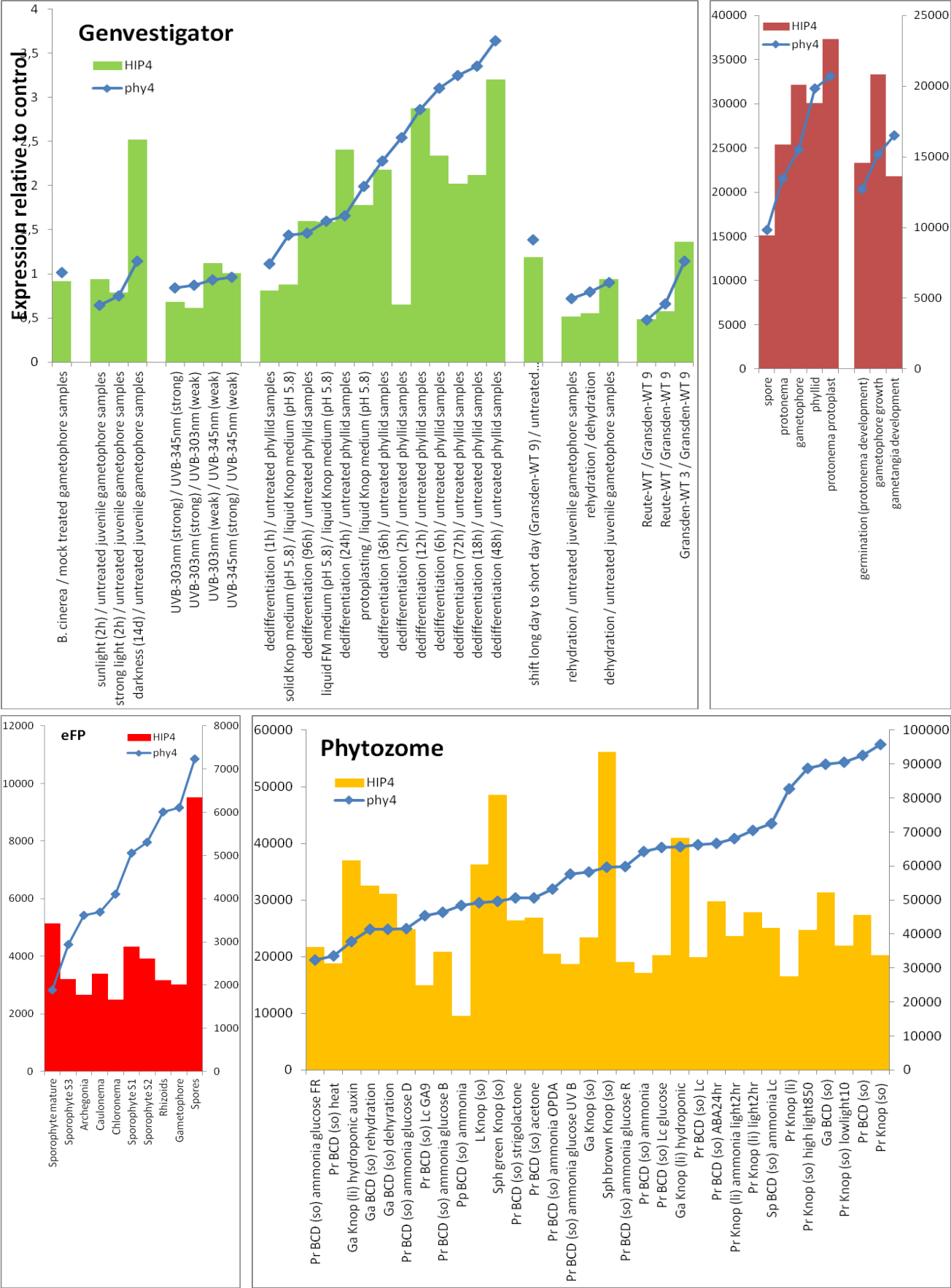


1.7.4 PRL1 / HIP4 (Pp3c16_8560E1.1)

CDS

ATGCCGGCCTCGGGGGGAGGCAGCACCGAGGTGCTGGAGGCTGTGGAGCCCCAGTCCCTGAAGAAGCTCTCCCTCAAGTCC
TTGAAGCGCGCCTTGGATATCTTCGCGCCTACTCATGGCGATCGCAACGGCGCGATGCCGTGAGAGTTGCAAAATTCGTATC
AGTTGCAAGGTGAATGATGAGTATGCTGCTGTCAAGGACATGCCGGCTGCAAGCACTAGGGAGAATGTTGGTGCAAAACCA
GGAGATAATGGACTCCAAAGCTTGCGAGTCCCTGGCTCAGAGCAGCCTACTACAAATGCAGGACCAGCATCTGGAAAAGGA
GGAGGCAAGCAACTTGCAATTGGTGCCCTGCTCGGGCTCAACCTCCAGTTCCAGCACCGGTTGTTGGTGCTGCTCCTGCAGCT
CCTGCTGTGGATCGTACTTCTACAGCTATTGCATCGACTGACCGACATCAACCAAGCGCTGCGGTTATGAAGAGGCTTCCT
AGTAAATGGCCAAAGCCTGTCTGGCATCCACCTTGGGTGAACTATAGGGTTATTAGTGGGCACCTTAGGGTGGGTGCGGTCTG
ATAGCATTTGATCCTGGAAATGAATGGTTTTGTACAGGCTCAGCTGATAGGACCATCAAGATTTGGGATAGTGGAAGTGGGA
CAGCTGAAACTTACTTTAACTGGCCATATCGAGCAAGTTCGAGGCCCTTGCAGTGAGCGCCCGGCATCCTTATTTATTTCTCA
GCTGGTGATGACAAACAGGTCAAATGTTGGGATCTTGAATACAATAAGGTTATTCGGTCATATCATGGTCATTTGAGTGGA
GTTTATTGCTTAGCTCTTCATCCTACACTTGATATTCTCATGACTGGGGGTCGAGATTCAGTGTGCCGAGTATGGGACATT
AGAACCAAGGCCCAGGTGTTTGCATTATCAGGACATGAGAACACGGTCTGCTCTGTGATTACGCAGGCAACTGATCCACAA
GTTGTAACAGGATCACACGACACAACCTATTAAACTTTGGGATCTTGCTGCAGGAAAACTATGTCGACGCTGACATTTTAC
AAAAAGTCAGTCAGAGCATTAGCGATGCATCCTTTTGAACATACTTTTACTTCAGCGTCAGCGGACAACATTAAGAAGTTC
CGGCTACCAAAGGGAGACTTTTTGCATAACATGCTTTCTCAGCAGCGGACAATTGTAACTGCATGTCTATCAACGAAGAT
AATGTAATGGTATCAGCAGGTGATAATGGAAGTTTGTGGTTTTTGGGATTACAAAAGTGGGCATAACTTCCAGCAAGCGCAG
ACAATCGTGAGCCTGGTTCTCTGGATAGTGAGGCCGGAATTTATGCTCTTTTCGTATGATCAGACAGGGTCTCGGTTGATT
ACGTGTGAAGCAGACAAGACTATTAAATTTTGAAGGAAGACGAAACAGCTACACCAGAATCACATCCTGTACACTTTAGG
CCGCCGAAGGACATGCGCCGGTTCTAA

PRL1-Expressionsdaten

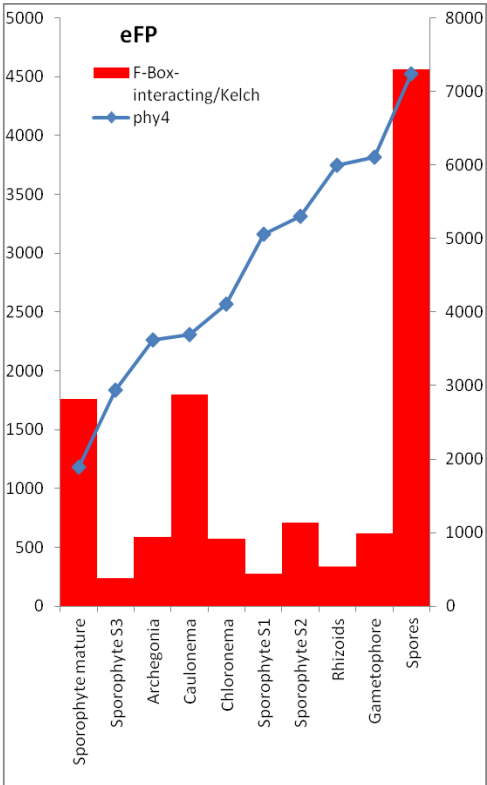
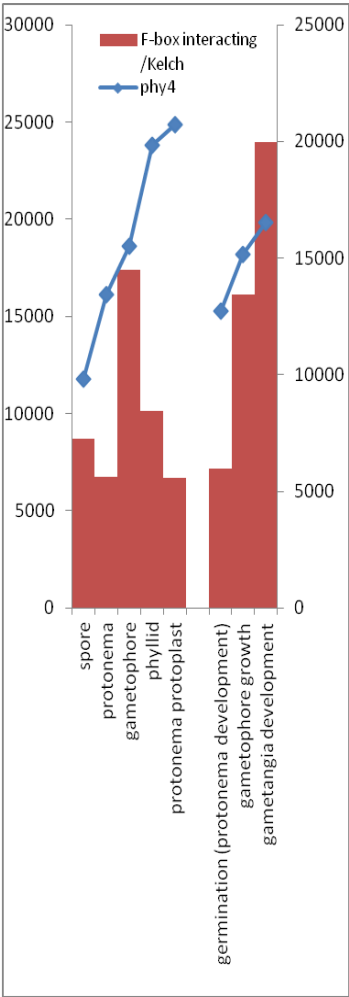
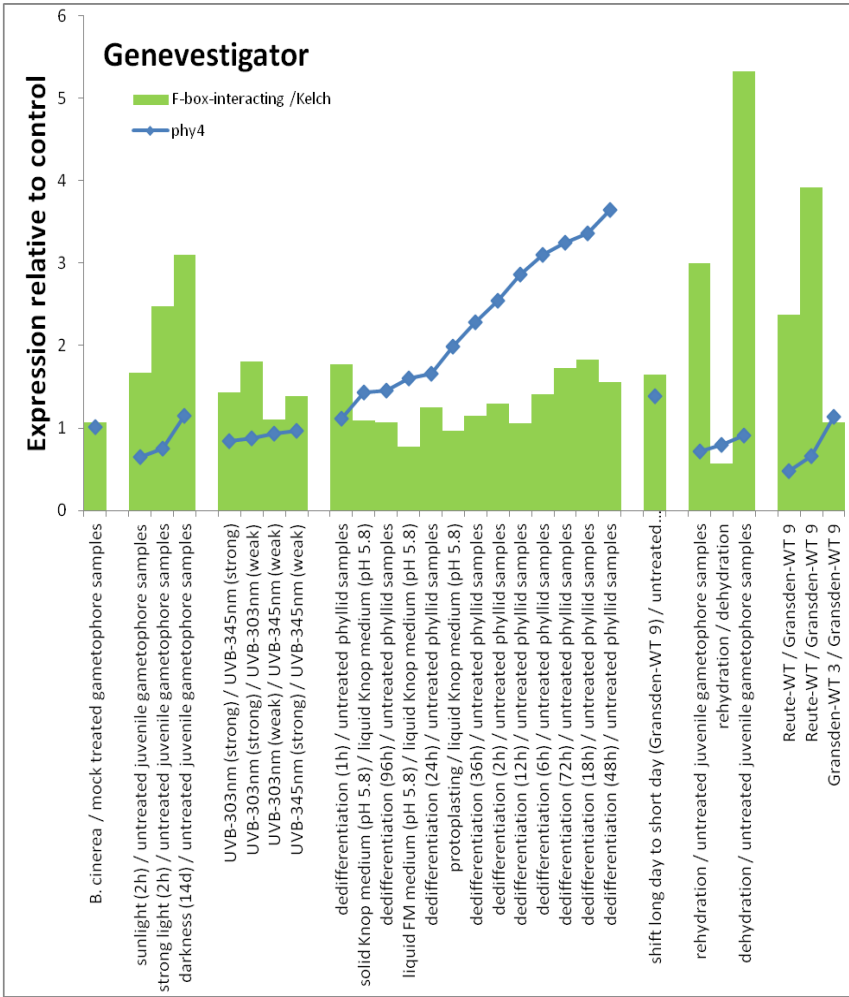


1.7.5 F-Box-interacting / Kelch-Protein (Pp1s271_60V6.1)

CDS

ATGGAGCCGACTCTCCCTGAGGAAGCAGCGGTACTAAAATCTGGGTGCAAACTGCGGTATGGTCATGGTTAGGG
TATGACTCTTCAAAGCAAACCTGGCAGGCTATGAAGCCCTTCGCCACACCCATCGAAGTAAAAACAGGTAATAACA
GGATCTAACGGCCTCCTCTGTTTACGAGCACAGACCTCCCTGCTCGTAGTCAACCCCATGACTGGCACACAAAGG
CAAGTACCATTTCGAGGAGAACATAGCCCAATTGCTGGTCGACAGGGAACGAAACTCCTTCAAAATCATCAGTGTG
TCATCAAAAAAGAGGACGAAAGTGTACGACTCTCAGACCGGAGAATGGAGTAAGAAAGGCAGGCCACCTCCACAC
TTGTCCGTGTCAAAGCACATCGGAGCATAACCGTGATGGAATCCTGTTCTGCGTCGCAAGGGAAGAGAGAAGTAAC
CAGTGGGGCGTGATCCAGTACACCGTCCAAGGTGCCAGAACATGGAGCAGCCTGACATTCTTCCCAGCACAGGTC
GCAGAGACATGCGTGAAAGCCAAGGTGGTTCACTTCGGCGGCGAGATTCTCACCCCTCATCGAACAAGACATCAGC
ACTGGCGACGCCGACAGCAGCTCTAGAACCAAGAGGCTGGCACTGTGGAAGCTGGTGAGGGCCACATCAAAGTGG
CAGCTTGCAGGAGAGGTGCCCACGGAGGCGCTGCAGCACCTGGAAAACCTGGAGGATTTTCGATTGTGTGGCGCTC
AGAAACCAAGTTTGTATCCTGAACAAGAGCACATTCAAGGCACCTTGTGGGCGTCATGTCCAAGGGGATTGTCACT
TCATGGCAACCATTGCCGCTTGAGCCTCACCTCCCGGCTGACACATCTGTTGTCCAACGGTGCATAGTTCAGTTT
GCATTTCAACCCAGTTTGCTGATCTCGGTGTAG

F-Box-interacting / Kelch-Protein Expressionsdaten



F-Box-*interacting* / Kelch-Protein

	AT1G27340 LEAF CURLING RESPONSIVENESS (0.3795)
	AT4G33160 F-box only protein 13 (0.3978)
Pp1s271_60V6.1 F-box interacting/Kelch (0.2236)	
Pp1s80_112V6.1 (0.2148)	

	(1)	1	10	20	30	40	50	68
AT1G27340 LEAF CURLING RESPONSIVENESS	(1)	MEEELAMLRQLIGQ LQE LLHNGS	P P	S S	S S	S PSFLVLHH	P QYQN GWC LP C I E D T S A D D C C D I	
AT4G33160 F-box only protein 13	(1)	-----MPS SATSTYLSSLKQVSLTASSPL						
Pp1s271_60V6.1 F-box interacting/Kelch	(1)	-----						
Pp1s80_112V6.1	(1)	-----MKPPFVMITQA TLQP SD KLE TEA VEV SP PG HDNA QE GA AK TD LR KD S						
Consensus	(1)		P P	S AI	S		MP S G L I S D DI	

(137) 137 150 160 170 180 190 204
 AT1G27340 LEAF CURLING RESPONSIVENESS (137) FFQFRAVCRKWNALIDSDFSRCFTTELPTQTIIPWFYTTITHE NVNSGQVYDPSL LK KWHHPITIPALPKKS-
 AT4G33160 F-box only protein 13 (87) FFRMS SVCKRWKSSQTSKSFKLACSSQIPTRDPWFYFMINDNSNSSSFVFDSTENSWKNLNRDFLHHHR
 Pp1s271_60V6.1 F-box interacting/Kelch (1) ----- MEPTLPPEAAVLKSGCKTAVWSWLGYDSSKQTWQAMKPFATPIE-
 Pp1s80_112V6.1 (116) DGKPKLRISRSRGSKLESNEDLEPIYPTSTSAANSNGHDHERATWSWLGYDSSRRKWQAMKPFITPIH-
 Consensus (137) FFK KAVCKRW S IDS SF ISPTPTSDPWFY IDHESASWSWLGYDSSKKWQAMKPFITPIH

	(205)	205	210	220	230	240	250	260	272																																																											
AT1G27340 LEAF CURLING RESPONSIVENESS (204)	-	I	V	L	P	M	A	S	A	G	G	L	V	C	F	L	D	I	G	H	R	N	F	Y	V	S	N	P	L	T	K	S	F	R	E	L	P	A	R	S	F	K	V	W	S	R	V	A	V	G	M	T	L	N	G	N	S	T	S	H	G	Y	K	V	L	W	V	G
AT4G33160 F-box only protein 13 (155)	Q	D	F	I	P	V	A	S	S	G	G	L	L	C	Y	R	C	S	I	S	G	D	F	L	L	R	N	P	L	T	G	S	S	R	D	I	P	S	Q	D	N	N	N	K	P	L	Q	A	V	A	M	T	T	T	T	V	T	P	S	S	Y	T	L	V	T	I	S	
Pp1s271_60V6.1 F-box interacting/Kelch (45)	-	V	K	Q	V	I	T	G	S	N	G	L	L	C	L	R	--	A	Q	T	S	L	L	V	N	P	M	T	G	T	Q	R	Q	V	P	F	E	E	N	I	A	Q	L	L	V	D	R	--	--	--	--	--	--	E	R	N	S	F	K	I	I	S	V	S				
Pp1s80_112V6.1 (183)	-	V	K	N	V	I	T	S	S	K	G	L	L	C	L	R	--	G	E	N	S	L	L	V	L	N	P	M	T	G	S	Q	R	E	L	P	L	K	E	N	V	V	Q	L	V	V	D	A	--	--	--	--	--	E	S	N	S	F	Q	L	I	C	A	A				
Consensus (205)		V	K	N	V	I	T	S	S	G	G	L	L	C	L	R		G		S	L	L	V	L	N	P	L	T	G	S	Q	R	E	L	P	A	K	E	N	I	V	Q	L	L	V	D	A			T	S	N	S	F	K	L	I	S	V	S								

F-box-associated interaction domain

Galactose oxidase/Kelch, beta propeller

F-box-associated interaction domain

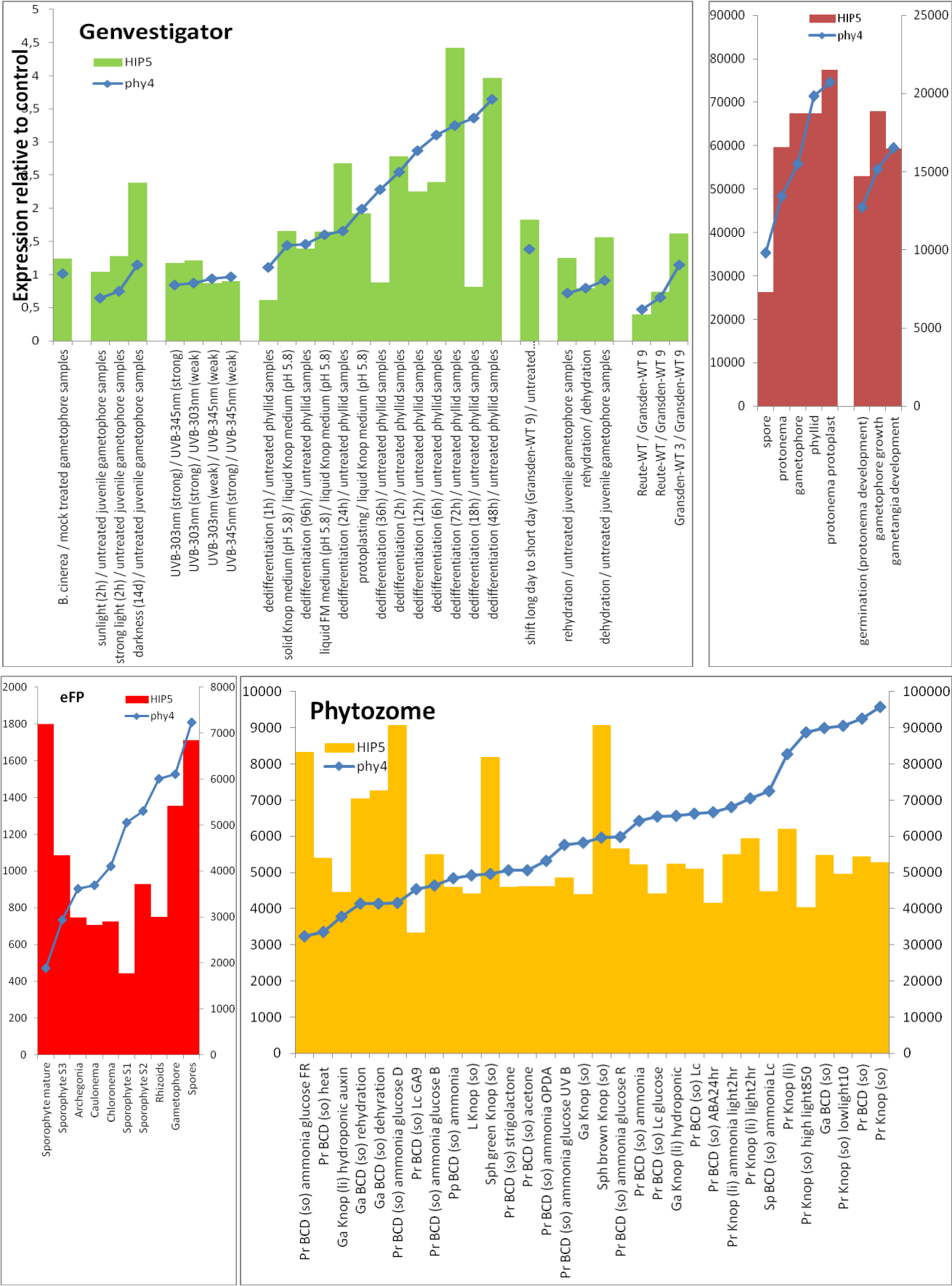
	(273)	273	280	290	300	310	320	330	340						
AT1G27340 LEAF CURLING RESPONSIVENESS (271)	CEGE---	YEVYDSL	SNVWTKRG	TIP	-----	SNIKLPVL	LNFKSQPV	VAIHSTLY	FMLTDP						
AT4G33160 F-box only protein 13 (223)	GEIPNLSF	KIYESN	ADSWSK	DQEL	ESVKNNDSS	LHDDYD	TDSGTVYF	LSKQGNV	VVASNNLQ	RSPSKQ					
Pp1s271_60V6.1 F-box interacting/Kelch (102)	SKKR---	TKVYDS	QTGEWS	SKGRPP	-----	PHLSVSK	HIGAYR	DGILFCV	AREERSNQ						
Pp1s80_112V6.1 (240)	SRKR---	TKVYDS	QTGVWTK	RGRPL	-----	PNLALAN	HIGAYC	DVLYCV	AREERSGM						
Consensus (273)	SEKR	TKVYDS	QTGVWS	KRGRPP		PNLALA	HIGAY	D	VVLHCVLREERS	Q					
	(341)	341	350	360	370	380	390	408							
AT1G27340 LEAF CURLING RESPONSIVENESS (322)	EGILSYDM	VSGKWKQ	FIIPG	-----	PPDLS	DHTLAA	-----	CGER	LMLVGLLT	KN--A					
AT4G33160 F-box only protein 13 (291)	YSSVIT	VTDEAE	IVYFLSS	YGTIV	ACDLTKRC	FTEL	PKLLPPF	LEYS	IDLVE	CEGTMY	VILLSEFFES				
Pp1s271_60V6.1 F-box interacting/Kelch (152)	WGVIQY	TVQGART	WSSLTFF	-----	PAQVAET	CVKAKV	VHFGGE	ILTLIE	QDISTG	DA					
Pp1s80_112V6.1 (290)	WGVTSY	DVKDTR	AWGN	IIF	-----	PLQTC	ETCLKAK	VIQFGGE	IFALVE	KENDDEDI					
Consensus (341)	WGVISYDV	DAR	W	FIIF		PPQLAET	CLKAKVI	FGGEIL	MLVELLSD	DA					
	(409)	409	420	430	440	450	460	476							
AT1G27340 LEAF CURLING RESPONSIVENESS (368)	AT-----	CVCIWEL	LQKMTLL	WKEDR	MPN	NIWC	LEFYG	KHIRMN	CLGN	KGCL	LILLSLR	SQ---MN	RLI		
AT4G33160 F-box only protein 13 (359)	AS-----	LRIWR	LDNN-RE	WVQV	GMLP	PAL	SHELY	GKKG	DINC	VGGAG	NKILV	CFNAS	PPEVYCRYF		
Pp1s271_60V6.1 F-box interacting/Kelch (205)	DSSSR	TKRLAL	WKLV	RATSK	WQLA	GEVP	TEAL	QHLEN	LED	FD	CVAL	RNOVC	ILNKSTFK	---ALVGV	
Pp1s80_112V6.1 (343)	G--PR	MKSL	SLWKL	ERTSL	KWR	SAGIMP	THSR	QHLV	NLD	DFD	CVAL	NDRI	CVLNKSTFK	---AVLCF	
Consensus (409)	AS	R	K	LAIW	KLDR	TLKWK	VGIMP	T	SLQHY	GNLDD	FNCV	ALKGNI	ILLNKSTFK	ALR	F
	(477)	477	490	500	510	524									
AT1G27340 LEAF CURLING RESPONSIVENESS (428)	TYNAV	TREWTK	VP	GCTV	PR---	GRKRL	WIA	CGTAF	HP	SP	PTARA	---			
AT4G33160 F-box only protein 13 (420)	VYDL	VAEEW	NELP	KCFK	DG---	EAV	DFV	SALS	FQ	PRI	EATV	---			
Pp1s271_60V6.1 F-box interacting/Kelch (269)	MSKGI	VT	SWQPL	PLE	PHLP	---	ADT	SVVQ	RC	IVQ	FAFQ	PSLLISV	---		
Pp1s80_112V6.1 (405)	ISD	GVVKS	WEQF	PLD	SSML	LTFL	SDT	DKPF	VER	SIVQ	FAFE	PNLLMSL	---		
Consensus (477)	IYD	GVVKS	WN	LPLCS	L		ADKAVV	RSIVQ	FAP	PSLLISL					

1.7.6 Kelch-Repeat-Protein / HIP5 (Pp3c7_3040V1.1)

CDS

ATGGAAGGGCAGTCTGAAGTGCAGGAACAGAAGAGGAAGGCTACAGGGAAGAGGAGGCTGAGCAGTAGCAGCAGCAGCCGT
AGCAGCAGTAGTAGTAGTAACGGAAACGCTAGCGCGGACGTGGAGATGGCTACTGCGACCTTGTCGGTCCCGAAGGAGCCG
TG TAGATCGTTTTTCGGGTAGGAAAAGGAGTAATCACAAAAATAAAAAAAGCGCTAAGAAGGATGCTGCGTCGCGGAATACT
CAGGGCGAGTGTGTTGAGTCTTCCTCTGTAGTGGATGCCTCGCCGTCTCAAGAGGCAAATCGGTCTACTAGTCAATCCCC
TTGGATGCAAGCGAATCTTCCACTGTCAGTGACCCCTCCCTGCACCTGAGCCGGAAGTGGCTATGGTGGTGGCGGCGGCT
TCGTCTAGAGAGGACGTCCCAATCATCCCTGGCCTGTCGGATAACACGGCGTTGGTCATCCTAGCACTTATACCGCTTTCT
TATCATCAACCTCTGAAGAGAGTGTGTAAGAAATGGCAAAGATGTTTGACAACGTAGAGTCTACGAACGAGGTACTGGAC
ATGCGAAAGTTTCAAGGTGTGAAAGAGACGTGGGTATTCTTGCTGGCCAGTGCAAGACAACAGCGCCAGCAGTGGCGGGCC
TTTGACCCGGTGTACAACAGGTGGAGGTGTTTGCCACAATGCCCTTG TGATTACACGTTTAACAGCTGCGACAAGGAGTCT
GCAGTAGCAGGAAC TCATCTCTTGGTAACTGGTCACAGTTCGACTGGTACGACGGTCTGGAGATATGATCTGCACACCAAC
GAATGGGGGAAAGCTGCCAAGATGCTGCAGAGTCGATGCTTGTTTGCATCTGCAAGTCATGGAAAGTATGCGTACTTCGCT
GGTGGATCATGTGAAGGTT CAGTCATAAGCTCGGCAGAGCGGTATAACTCTCAGACCAGAAAGTGGGAGCCACTTCCCGAT
CTCCATGTGAGTCGGAAATGGTGCTCCGGATGTATTTTGGATAACAAGTTC TTTGTGATAGGTGGGCAAGGTAGTGAAAAG
CAAGCGTTGACGTCAGGAGAGTATTACGATGAGTCGGAAAACAGATGGGTTATAGTTGAAAACATGTGGCCGGCTGCAAGG
ACACAGCCTCCAGGCCAAACAGCACCACCTCTAGTTGCTGTCGTAAAAGATCAACTCTATGCTGCTGATGCCAGCACCATG
GAACTTAATGCTTACCACAAAGGAACAAACACCTGGAGACCTCTAGGACCTGTTCCATATCGTAGTGTTGATGCTAGTGGA
TGGGGCATGGGGTTCAAGGCCGTGGGAGACGAGATTTTTTGTAAATTGGAGGGTCCAGTGACAGGGGAAACGGGACTTTTTTGC
GACCAGATT CATGCATGGCCTCCCGCGCAAATGCAAAATGCGGATGGCTGGCGCCTGGTTCGGCCAAC TCCCAACACAAGT
GGCTTCATCTATAATTGCGCTGTCATGATAGTTTGA

Kelch- Repeat -Protein Expressionsdaten

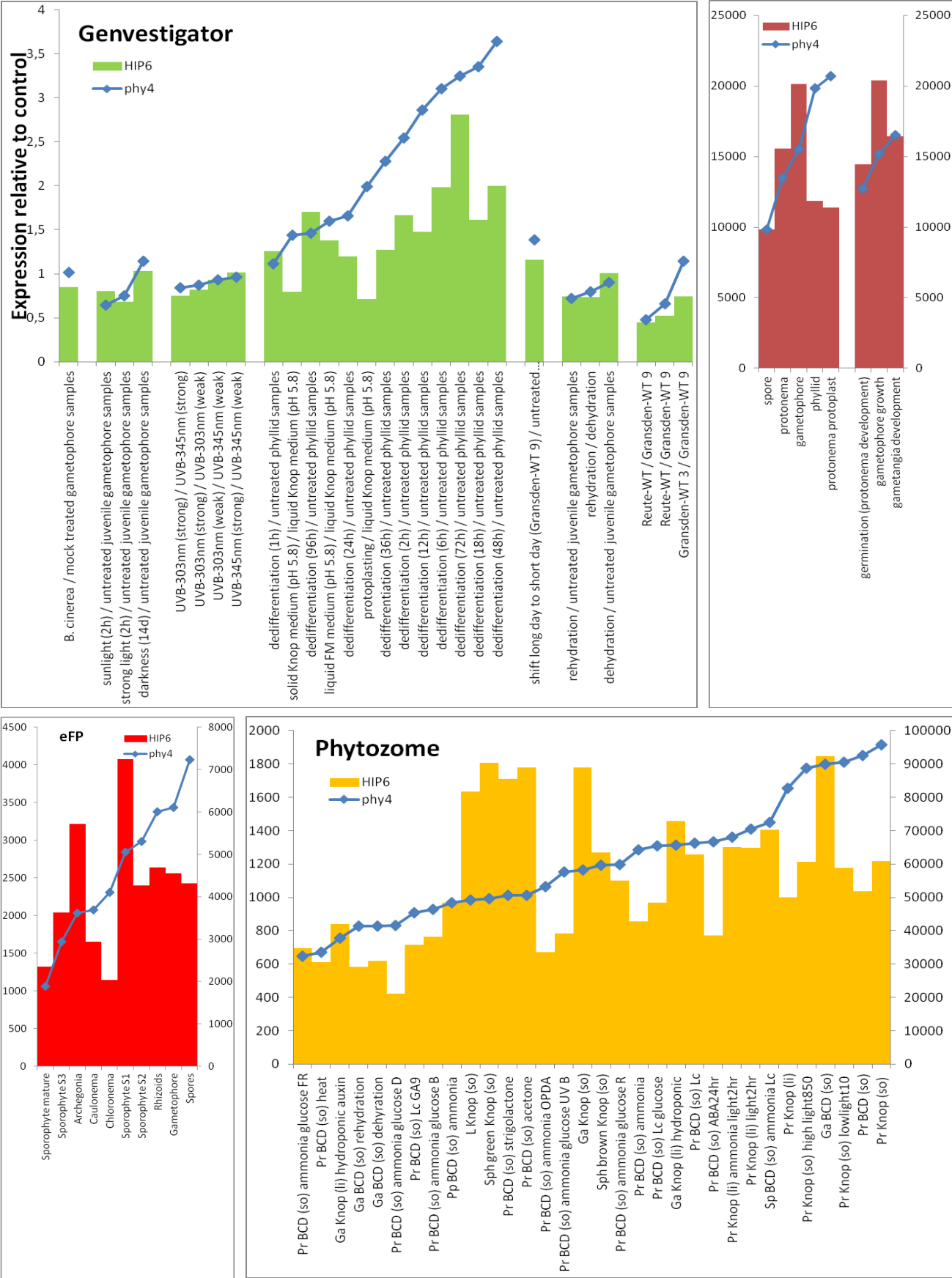


1.7.7 P-loop Protein (PLP) / HIP6 (Pp3c6_4480V1.1)

CDS

ATGGTGGAAAAGAATGCATCTAGGGATGGCGGTACTCCTGCGAGAAATGGACATAATCAGCAGATGGCGGGGAATCAAGTA
GACGCAAGACATGGAGGATGTAAC TTCTTTGCTGGTAATATGAAGGACCTTAGCAGCCTGAAGGAATGGAGAAAGTTATCA
ACTGCATGGAGGCTGTTGGTCTTGGTAGTCATTGGAGCTATTGGTTTATACACGTGTATGGTGGGCGTGGGCACAAGACAA
TTCTCATACGAGTCTGTGCAAGAAGTGATCGTGAAGGATTGGAGACGAGAAGATGATTCTTGTTCTCGACGTGGTCCTTCT
GTAGATTTCTACCAGCACTATCCACTTCCGCATGCATATGAGAGGCAAGAGTGCAC TTGCACCTCCTGTGCAC TATTTTGTA
ATATTATCAATGCAAAGATCAGGAAGTGGATGGTTTGAGACTCTACTCAATAATCACCCAAATATTAGCTCCCATGGCGAG
ATCTTTTCCGTCAAGGATCGGAGAGAAAAATTTTTCCTCTATCGCAAAAACCATGGATAAAGTCTACAAC TTAGATTGGCTG
AATAGTGCTGCTAAGAATGAATGTACTGCAGCTGTTGGTTTCAAGTGGATGCTCAACCAGGGACCGATGGAATACAACAGG
GAGGTCAGGGAATACTTTGAGAGAATGGGTGTTTCTGTGATTCTTTTACTTCGACGGAACGTGTTGAAGCGGCTAATTTCA
ATCTTAGCAAATGCATACGATCGTGTAGTAAAGCCTCTGAATGGCACTCATAAGTCGCATGTTCACTCTGTTGAAGAGGCT
ATGAAACTGGCAGAATACAGGCCAGTCGTAGATGCGAAGCATTTGTTTGAAACTTGGCGCGAGTTGAGCAGATAACTGAT
GACGCCAACGGTTCTTCAATAACACTCGGATCAGAGTTGTTCACTACGAAGATCTTGTGGTGGATCCTAAGTATCTGTCC
GAAATCCAACATTTTTTTGGGGGTGCAACCCCGGAAGCTAGAAAGCCAGCAAGTTAAGATCCATACACGACCACTGAGAGAA
CAAATCCAAAAC TGGGATGAGGTACTGATTCATCTGAAAGGGACAAAGTATGAGAGTCTTCTTCAGGATGACGGATACCCG
TGA

P- loop Protein (PLP) Expressionsdaten

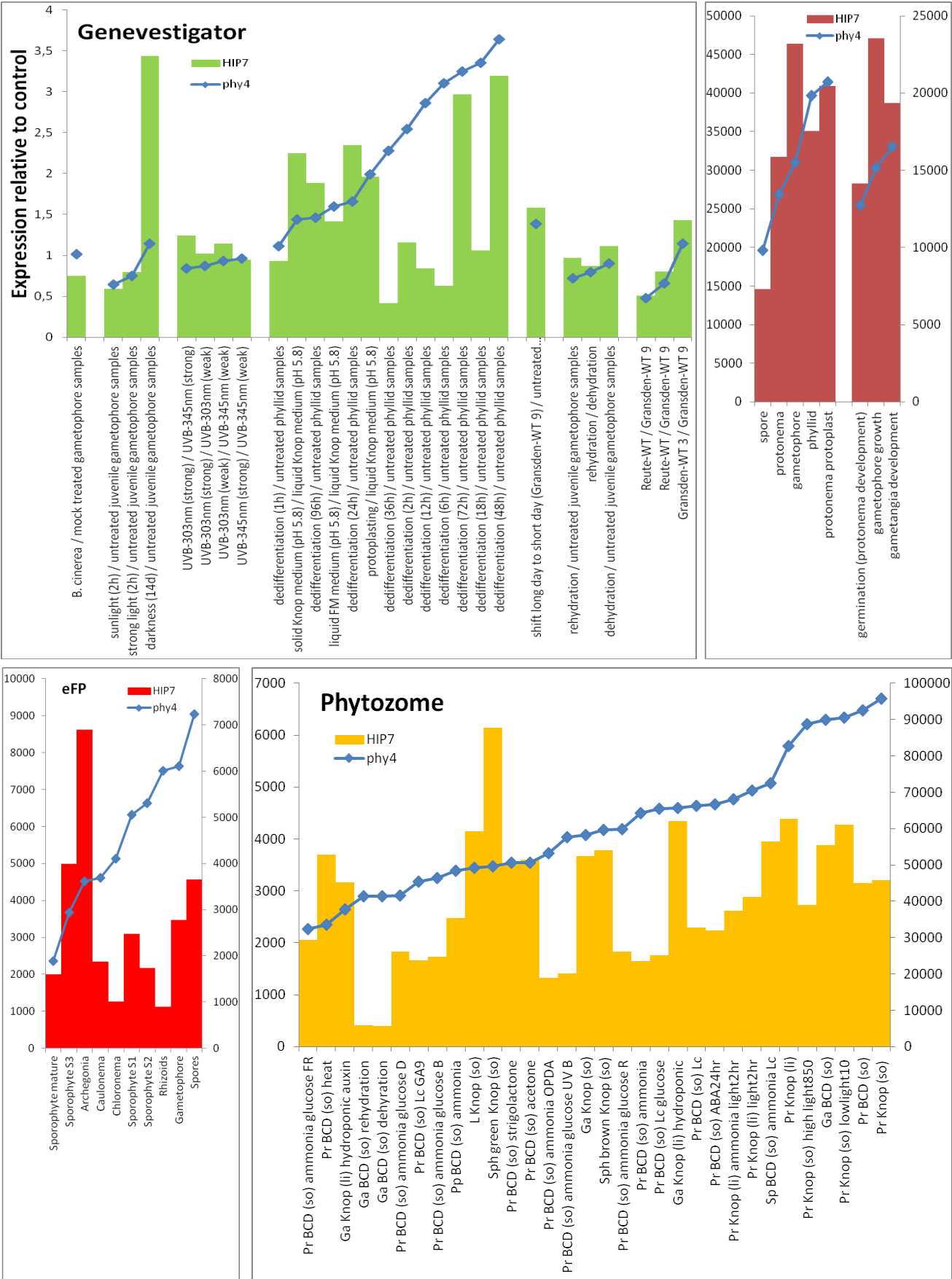


1.7.8 Ser/Thr-Proteinkinase / HIP7 (Pp3c17_9390V1.1)

CDS

ATGTTAAGTACGAGGGCGTGCAGTAGCATCATGGGCTCGAAATCAGCTGAAACCAGTGGTGGGTTCGAGTGGGGGGCGGCAA
CCTAGTCCTTTGGACCTGTACTCCAAAGGCACACAAATTATTGAGCTCGGATCCGCAGTGTGGCCGGAGAACCCCATTCGT
ACTGGTAGGTCTGAGGTGTACATATGGGGTTCTGAGCACGCGGTGAAGCTCTGCATGGGCCCAGCTTTTGCCCTTCATGAA
TATACTATGAGCCGGGCAGCTAGGAACATATGCTGTGCGTACTGTAGCCATGTTTACAATTCATGGTAAACCAAATGGCATA
GTCATGGAACGGGGGAAGTCTGTGAACCCGGTGACGTGCGATTTAAAGCAGATTGCATTTGAGATGGTGCGAGCCGTTCAA
GGACTCTATAGCATAGGCATTATCCACGGGGATATAAAATTGTCTAGTTTCCTCGTTTGTTCGTGATGGATGCGTTCGTCTG
TGTGACTTCGGAAGTAGCGAGTACAAATGTGATAGTGTGAGCCACTCGGAAATGTCTATTCCATGGTCAAGGCCTTCATTG
TTGCGCAATCCTGACAGGCCGCGTGTCAAGGCGGACGATTTGTACTCGTTGGGGCTGACAATATGGGAATTGTATACGGGC
AAGGTTCCATTCGTACCACCTACATCTGAGGGATGGGAGTCACTGGATATAAACGAGGTAGCAGAAGAGGCGATACTGGCG
GGAGAGCAGGTGGACCTCAATGACATATTAGACCTTGAGATTCGCTGTGGTTGCTTCACTTGTGAGCGAGGAGGTCGAGCA
CCCACTCTGCCAGGTGTAGTAACTTGGGGCTTCCGAAAAGTAGCCAAATATTGA

Ser/Thr-Proteinkinase Expressionsdaten

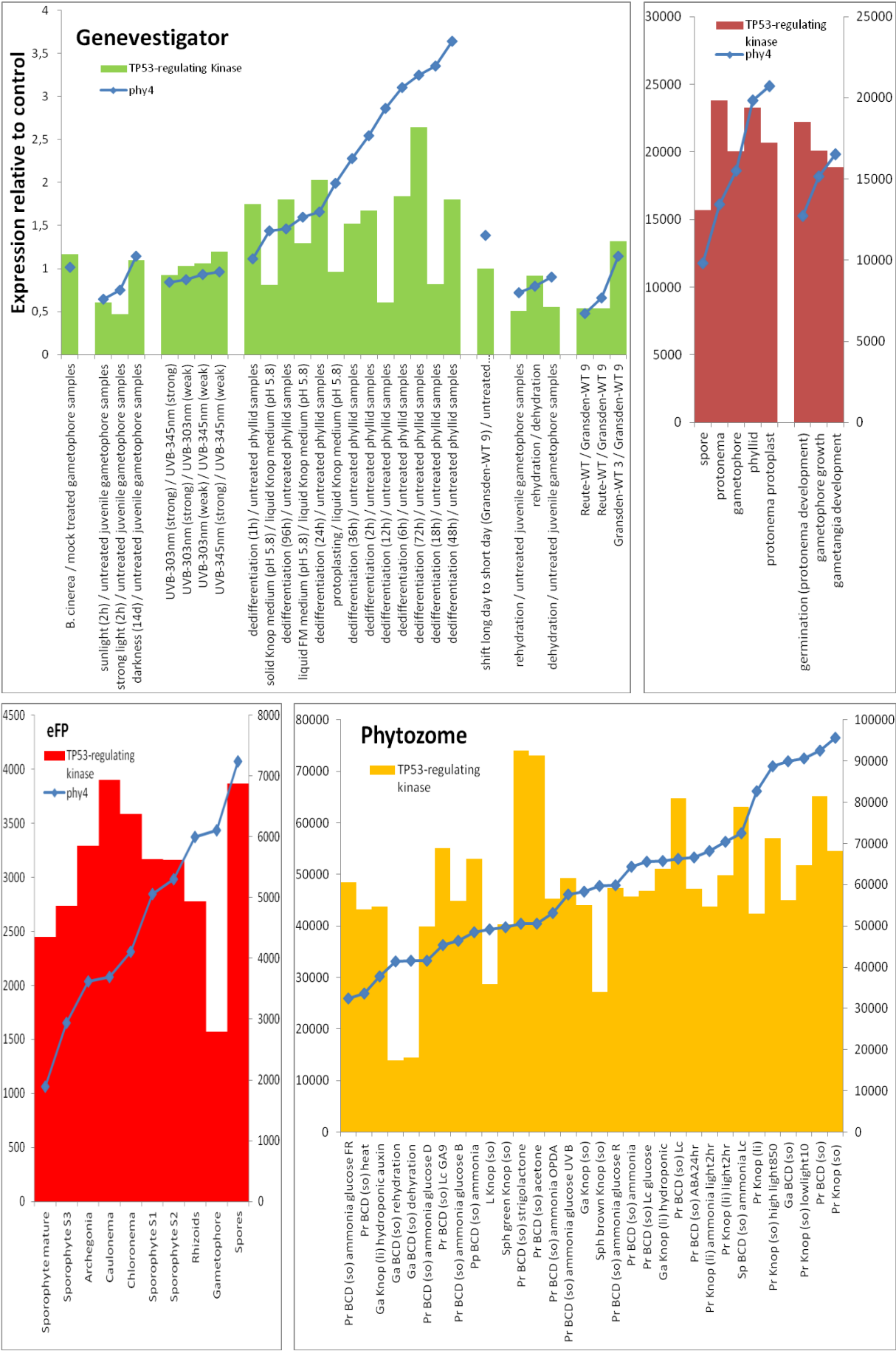


1.7.9 TP53-*regulating* Kinase (Pp3c15_20330J1.1)

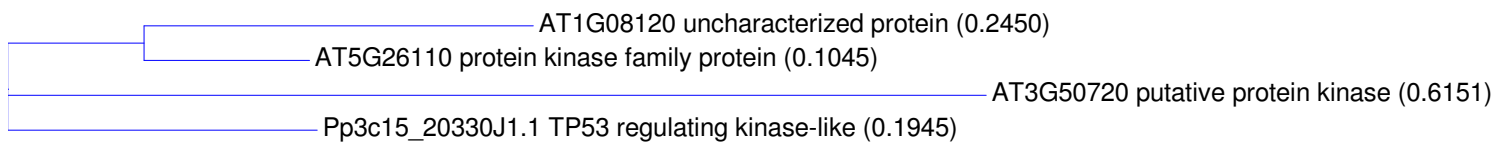
CDS

ATGGCAGACGGCGACAACAATGAGTCTCCCCAGTCGCACCACGACTTGCCCCCTTTACAAGCAGGGCGCCGAAGCT
CGTGTATACGAGAGCACATTTTTGGGAAAGAGAGCGATTGTCAAGGAGCGGTTCTCGAAAAAGTATCGACACCCC
GTACTGGATGTGAAGCTCACTCAGAAGCGTCTTACTGGGGAGGCCCGCACTTTAACAAAGGCACGCAAACTAGGG
GTCGTGACTCCGGCATTGTACGCGGTGAACCTGATGACCAATTCGTTAACGTTTGAATTTGTTGAAGGGCCTTTG
GTGAAGGATATCTTGCTGCGGTGCGGACCTCTTCCAACCTCTGATGATAAAATAGAGGAATTAGCAGGCCACATT
GGCCGAGCAATCGCCAAATTGCACGATGGGGGCCTCATACTGGAGACTTGACCACCTCCAACATGATCGTTTGT
GCCAAACTAACCGACTGGTTCTCATCGATTTTCGGTTTGGGTTATAATTCAACACTGCCAGAAGATAAGGCGGTA
GATCTATATGTGCTTGAACGTGCATGTGTTGCCATGCATTCATCTGTTGGGGATTTTAATGGACTCATATTAGCA
GCATACAACAAAGCTTCCAAGTATTGGAGTTCTACTTACAACAACTTGCTGCTGTGCGTTTACGGGGAAGAAAG
CGAGTCATGGTTGGCTAA

TP53- regulating Kinase Expressionsdaten



TP53- *regulating* Kinase



TP53- regulating Kinase Alignment

	(1)	1	10	20	30	40	50	68																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
AT1G08120 uncharacterized protein	(1)	-----		MKNR	MDCEENV	GNESLVL	IKQGAEARV	LESTFSGR	-----R																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
AT5G26110 protein kinase family protein	(1)	-----			MDCEENV	RDESLVL	IKQGAEARV	FESTFAGR	-----R																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
AT3G50720 putative protein kinase	(1)	MAISPTMMLN	NANYPFF	MSAFGSD	DNN	DES	DNQFDFN	ISRELLLNPKD	IMRGEMI	EGGNSIVYKGR	LK																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
Pp3c15_20330J1.1 TP53 regulating kinase-like	(1)	-----		MAD	GDNN	ESPQS	HHD	LPLY	KQGAEARV	YESTFLGK	-----R																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
Consensus	(1)			M	D	MDCEENV	DESLVL	IKQGAEARV	MESTFLGR		R																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
	(69)	69	80	90	100	110	120	136																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
AT1G08120 uncharacterized protein	(37)	SIV	KERFSK	KYRHPILD	AKLT	LKR	LYDKGK	KARGLYSSH	LCCGY	SASL	FNT	-----																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
AT5G26110 protein kinase family protein	(33)	SIV	KERFSK	KYRHPILD	AKLT	LKR	LNAE	ARCM	TKARKLG	VCTPV	LYAV	DTLLH	SLTLE	YIEG	VSVKDI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
AT3G50720 putative protein kinase	(69)	NIV	PVAVK	IVQPGKTS	AVSI	QDK	QFQ	KEVL	VLS	SMK	HENIV	RFG	ACIE	PQLM	IVTEL	VRGGTL	QR																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
Pp3c15_20330J1.1 TP53 regulating kinase-like	(37)	AIV	KERFSK	KYRHP	VLDV	KLT	QKRL	TGEART	LTKARKLG	VTP	ALYAV	NLM	TN	SLT	F	EF	VEG	P	VKDI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
Consensus	(69)	SIV	KERFSK	KYRHPILD	VKLT	LKRL	FAKAR	LTKARKLG	VCTPV	LYAV	L	SLT	EF	VEG	S	VKDI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
	(137)	137	150	160	170	180	190	204																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
AT1G08120 uncharacterized protein	(88)	-----																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
AT5G26110 protein kinase family protein	(101)	FLE	F	G	T	N	G	V	V	EERL	DDVAA	QIGA	AI	AKLHDGGL	AHGDL	TTSNML	VRS	GTN	QLVL	IDFGL	SVT	STLP	--																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
AT3G50720 putative protein kinase	(137)	MLN	S	R	F	S	P	L	D	L	K	V	S	L	S	F	A	L	D	I	S	R	A	M	E	Y	L	H	S	K	G	I	H	R	D	L	N	P	R	N	V	L	V	T	G	D	M	K	H	V	K	L	A	D	F	G	L	A	R	E	K	T	L	G	G	M																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
Pp3c15_20330J1.1 TP53 regulating kinase-like	(105)	LLR	S	G	P	L	P	T	S	D	D	K	I	E	E	L	A	G	H	I	G	R	A	I	A	K	L	H	D	G	G	L	I	H	G	D	L	T	T	S	N	M	I	V	C	A	K	T	N	R	L	V	L	I	D	F	G	L	A	G	Y	N	STLP	--																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
Consensus	(137)	LL	SGP	PL	DDK	I	D	D	L	A	I	G	R	A	I	A	K	L	H	D	G	G	L	I	H	G	D	L	T	T	S	N	M	L	V	A	T	N	L	V	L	I	D	F	G	L	A	STLP																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										</

Ser/thr protein kinase Bud32

	(273)	<u>273</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>	<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>
AT1G08120 uncharacterized protein	(88)	-----							
AT5G26110 protein kinase family protein	(227)	-----							
AT3G50720 putative protein kinase	(273)	PSLSNIPDEVVPILECCWAADSKTRLEFKDITISLESLLKRFCSEERSNNEITITEDEAYDDEIEELET							
Pp3c15_20330J1.1 TP53 regulating kinase-like	(231)	-----							
Consensus	(273)								

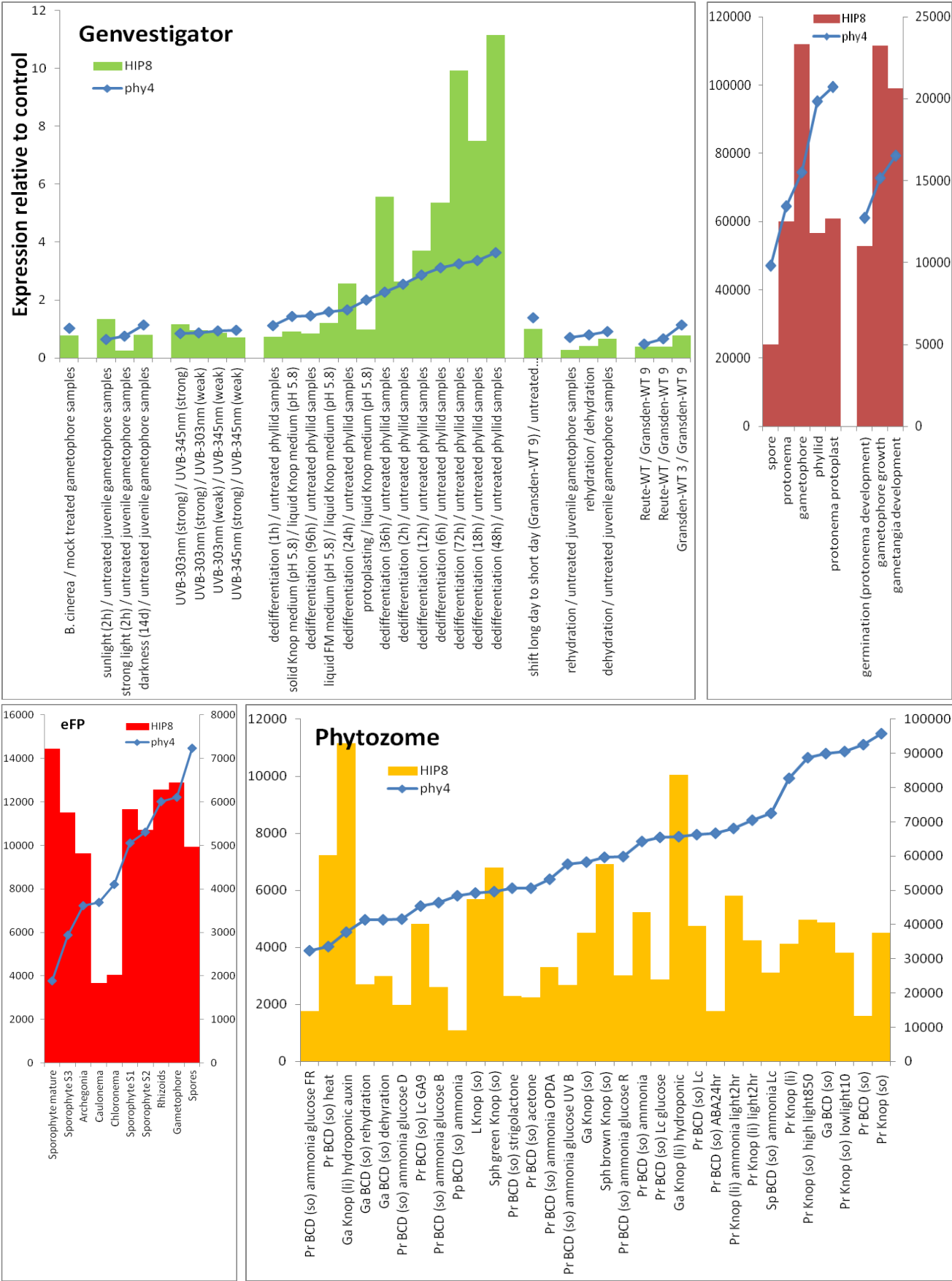
	(341)	<u>341</u>	<u>350</u>	<u>360</u>	<u>377</u>
AT1G08120 uncharacterized protein	(88)	-----			
AT5G26110 protein kinase family protein	(227)	-----			
AT3G50720 putative protein kinase	(341)	TWLLPKRYIKLKKPKKIKQNVMMKKILPFFKKFISSKW			
Pp3c15_20330J1.1 TP53 regulating kinase-like	(231)	-----			
Consensus	(341)				

1.7.10 CDPK / HIP8 (Pp3c11_25550V1.1)

CDS

ATGGCGGATTTTGAAGTATTGGTCGGCTTCCAGGAGCATGTGCCCCCTCCCTGCGCTGTTGCAAAACGCGACGGATGATCTA
GAGAACTATATTTCTCTCGGGAAGAACTGGGAGAGGGTCAATTTGGAACACGTATCTCTGCACCGAGCGTGCGACAGGG
TTACAATTCGCTTGCAAGTGCATTTCCAAGCGAAAACATCATCTCCTCAGAGGAAATCGAAGATGTCGGCCGGGAGGTCGAG
GTTATGTATCACCTCTCTGGCCACCCTAACATCGTCACCCTCAAGGGTGCATACGAGGATGCCACCAATGTCTACTTGGTG
ATGGAGCTTTGCGAGGGTGGGGAGCTTTTCGATCGTATTATTGAACGCGGGACTTACACGGAAGCAGAAGCTGCTCGTCTG
ACAAGAACAATAGTTAGCGTCGTGCAAGCGTGTACAAATCTGGTGTTGTGCACCGGGATCTGAAGCCGGAAAATTTTCTA
TTCAAGACCAAGGAAGACGATTCTGTTTTGAAGGCTGCGGATTTTGGCTCGGCTAGGTTTTTCGAGCCGGGAGATGTGTTT
ACTGATATTGTGCGAAGCCCCTACTATGTTGCGCCGGAGGTCTTGGATCGGCATTACGGGCCAGAAGCTGACATCTGGAGT
GCTGGGGTTATGTTGTACATTTTGTGAGCGGTGCTCCACCGTTTTTGGGCAGAGACAGTGCAGGGTATATTCGAGAAAAGTC
ATGGAGGGGGAACCCCCGACCTTTACCGCCGATCCTTGGCCGAACATTTTCGGAGGTGGCGAAGGATTTGATCCGAAAGATG
TTGGATCCCAATCCAGAAAAGCGGCTTAAAGCCCACGAGGTTTTGAATCACCCTTGGATTCGTGAGGATGGTGTGGCGCCT
AAGAAGCCTATCGCGTCCCTCGTCCAGTTCCGGATGAAGCAATTCGCTGCGATGAACAAGCTGAAGAACTGGCAATTCGG
ATCATTGCCGAGACGCTCTCGGAGGAGGAGATAGCAAATTTAAAGGAAATTTTCACCGAGATGGATAGCGACAACGATGGT
GCCATAAGCTTCGAGGAGCTGAAAGCGGGTCTGCTCAGGGTGGGGACATCCCTCAAGGACGCTGAGCTATTCGACCTTATG
GATGCTGCAGATGTCGACCACGATGGCATGATTGATTGCGGGGAATTTCTAGCTGCCACTCTGAGCCTTAATCACATTGAA
TTGGAGGAGAATCTCATGGCGGCCTTTCAGTATCTCGATAAGAGCGGTAGCGGATATATCACCACCGATGAGCTCCTCGCT
GTCTGCTTCGAATTTACATGGAGGACGTACGCTTGGAGGATCTTTTACATGACGTGAGCATTTGGCGCAGACGGTAGTATT
GACTACAAGATGTTTCGTGACCATGATGCGCAAGTGCAATGGCGGCATGGGTGATCAGAATCTGCGGTGTACCCTGGGCATC
ACAGACGTTCTGACACTAGAGGAGCAGTACTAG

CDPK Expressionsdaten

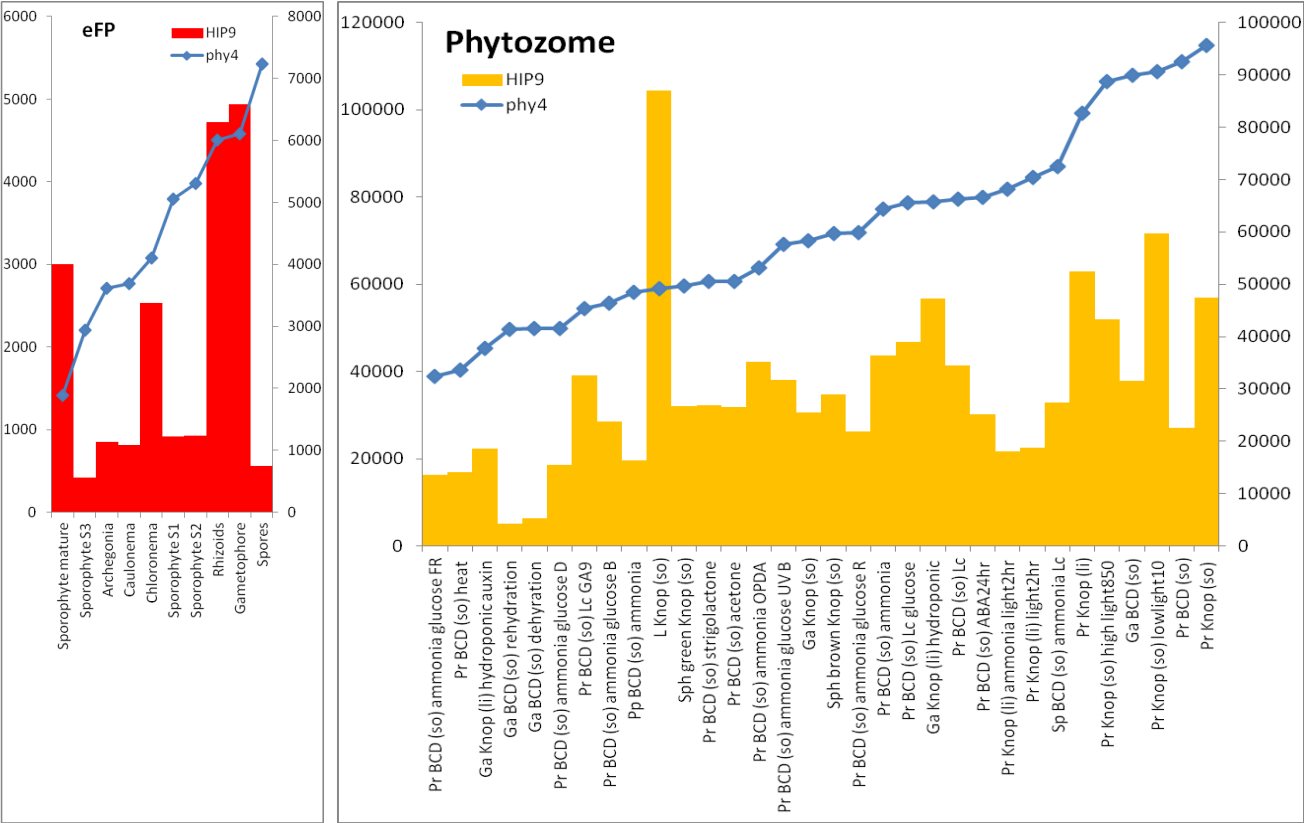
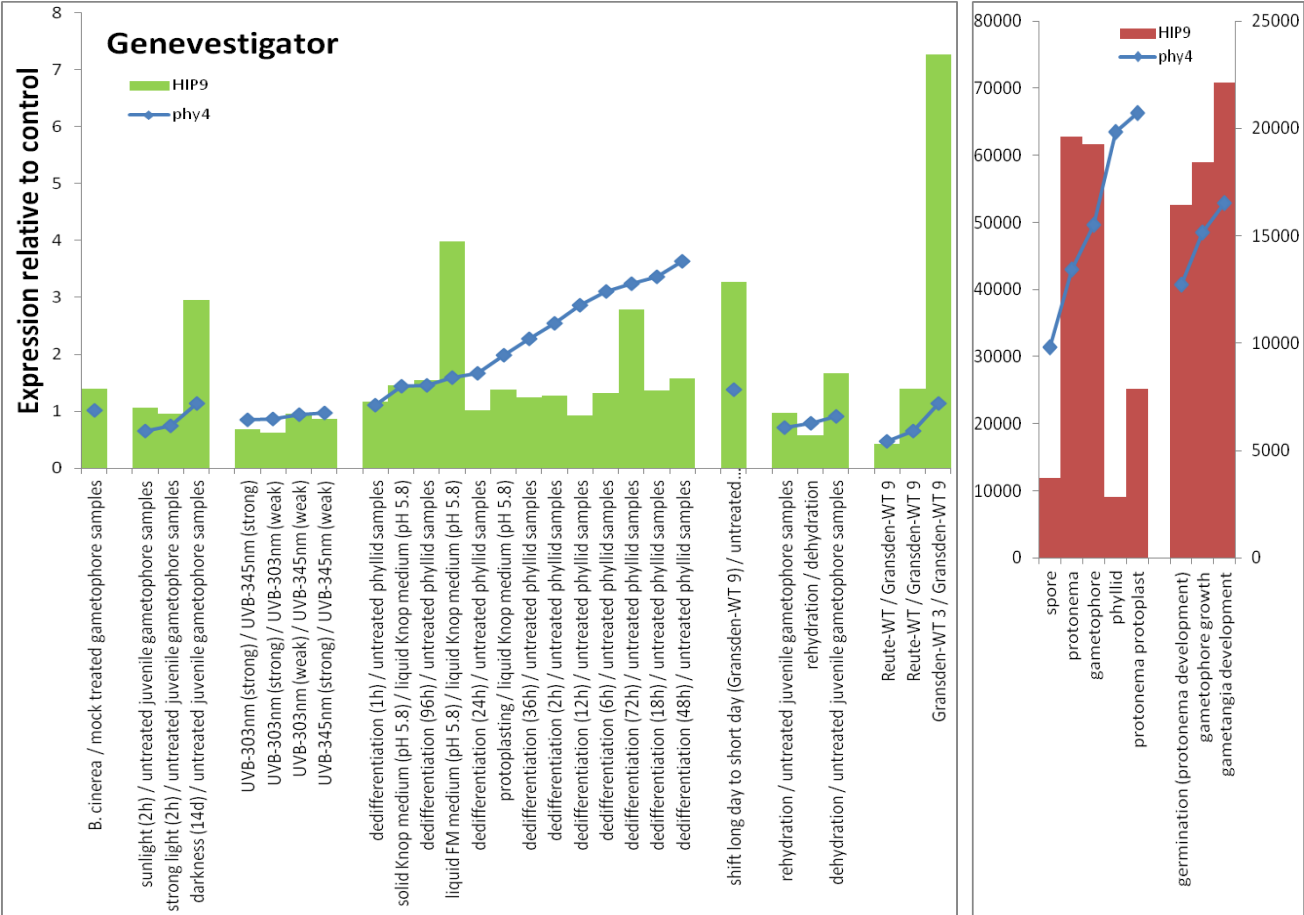


1.7.11 Rhomboid-Peptidase / HIP9 (Pp1s254_10V6.2)

CDS

ATGGCCCTGGTGCATGGCATGCAGGCTGTGCTCTTTAGTCACATTCGACAGCTTCAACCTCCACATCAGTTTATTGATTCT
AATAGCAATTTGAAGGACTTTTCCTGTAGAGTCTTTAGGGATGATCACAGCTTGGGCTCTCAGACTGAGCAAATTATTAGT
TTTGAAGTGAGAAAACGAAGGGTTACTCGTGGGGCACATCGTCTGAGGTTCCCCCAGCCGGACCCGGAAGGTCTGACGTAT
CGCAGTGCATACAGCAGGAGGAGGCAAATACTACCTGCAGGTCCGTGTGAATTGTCTGCAAACAAGTCGAACGGAACAGTTG
GATGACAGGTTCGGTTGAGGAAGAACTGTAAATTTCTACAATCGAAGTCAAAGAGGATGTTGCAGAGACAGATGAATGGGCT
GTTAAGAAGAGTTTGAGTGCACCTGGATGCCTACTTTGACAACTCCATGCGAGTAGAGGAGAAGAACCCTCAAGCTCTACA
CCATATTCGCAAGGAACAGTAAATGGGGCTTCCGCAGCTGTGTGCGCAATCCAAAACCGGCAGTAGCGGGCCAGTTATGGGC
AGTCAGACTTCTCAAGATTTTCGGTGCAGAAAACGTGGTGAAGGATCGTGTAGAAAAGTGATGATAAAAAATAGTGCAGGTGGA
CTCAATGCACTGGATGCATACTTCGACAAGCTACGGCCCCGTGAATCTGAAAAAACTTCAACCTCCTACGAGAATACAAAG
AATGTAGTGGAAGAGGACAAACCGACCATAGGCAAAGACGAGAAAGAAGTAAGTATCAAGGTTGTTAGTGAGTTGGACATC
ACTGTAGGGGAGGAGGAGGAAGCAGAATATAGAGAATTTATGGAAGAGTTGGAGAAGGCCCTTCAGCAACAAGTGGAGTCG
GGAAAACTTTTGTCCGCAGACGATGACAACTTCATGCAGGAATCCTCTTGGGGCTTGCAATCTGCCAATTCGAATTTCTTAT
GTTGTGAATGGCTTGGTAGCTTTAAATGTTGCAGTATACTTATTTGGTTTGGCTAGTCCACAAGAGGTGCCCGGTATGGTA
GATGCCTCTCTTCCTTACCTGTATGGAGCGAAAAGTTAACGAGTTGATTGTAAATGGAGAGTGGTGGCGTCTAATTACCCCA
ACGTTTTCTGCATTTCAGGCTTTTTTGCACCTTAGGTTTGTAGCACGTGGGCGTTGCTAGAAATTTGGACCAGCAGTTGGAAGTGCT
TTTGGCACTTTTAGGATTTTCCGCGATATATCTACTAGGCGGTTTGTATGGTAATCTTTTGTAGCTTCTTCCACACGCCTCAA
GGCACCGTTGGCGGCTCTGGTCCTATTTTTTGCCTTAATGGCTGCTTGGGTGGTCTATATACTACGCAACCGAGATATTATT
GGTCTGGATGTAGCTGGTGAATAATTCGGAAAGTGGTCATCTTTACTGCTATCACTTATGCATTATGTAACCTTTTCCCT
GTTGACGATTGGACCCATCTGGGAGCAGCAATAAGTGGATTGATCTTTGGCCTACTCACTTGTCTCTGGTGCGAGTTAAT
GTTCTGTGTTGAAGACGTGAGTGACGAAAATGACGATGACGTAATGGAGTCATTTCTTCTTTTGAACGAGGGGATCGATCCA
TATCGGCTTCTTCTTGTGTTTGCCTTGCTGTGGCGGTCTTTTCCGCTCTCTTCAGTGTGGGGGTGCCATATGCAACAGAG
TATCACTTTCTCCATGGCGGCCTTGGTGATGAGTATTGG

Rhomboid-Peptidase Expressionsdaten

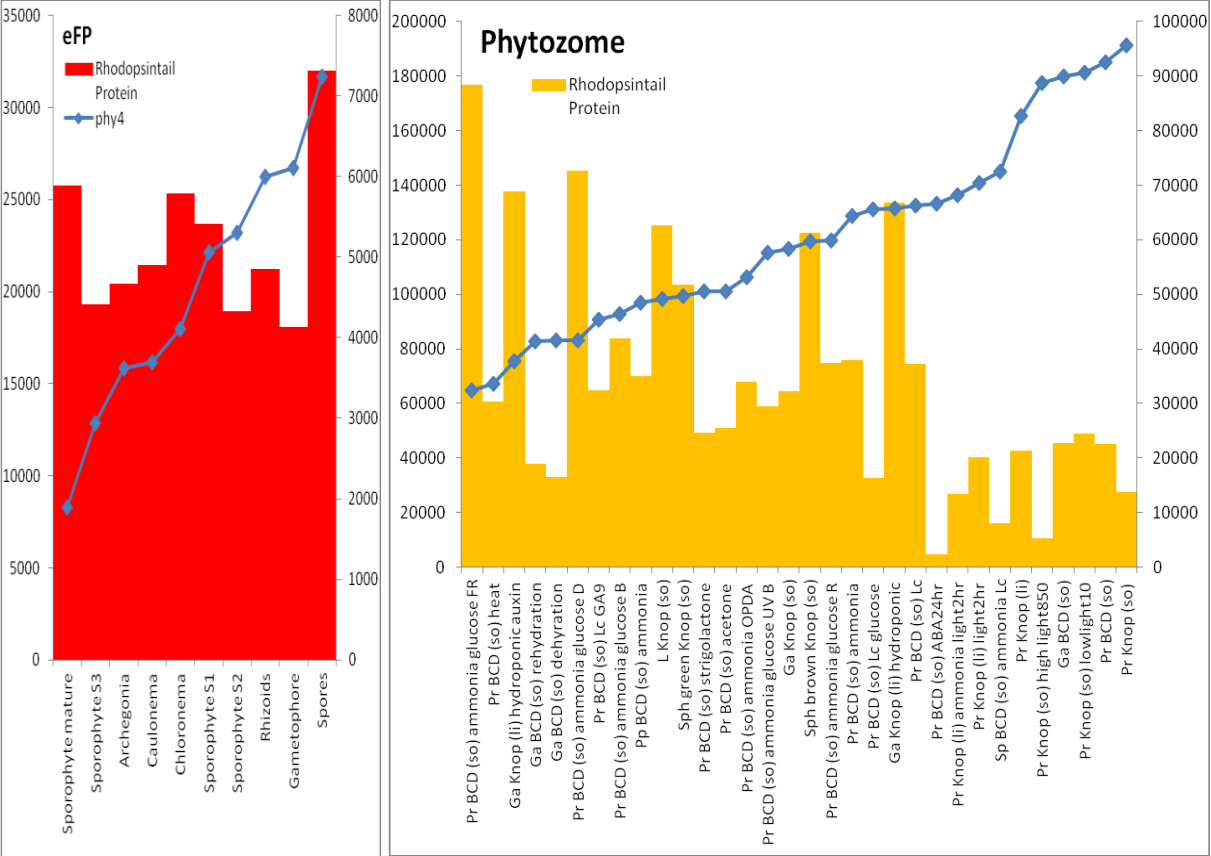
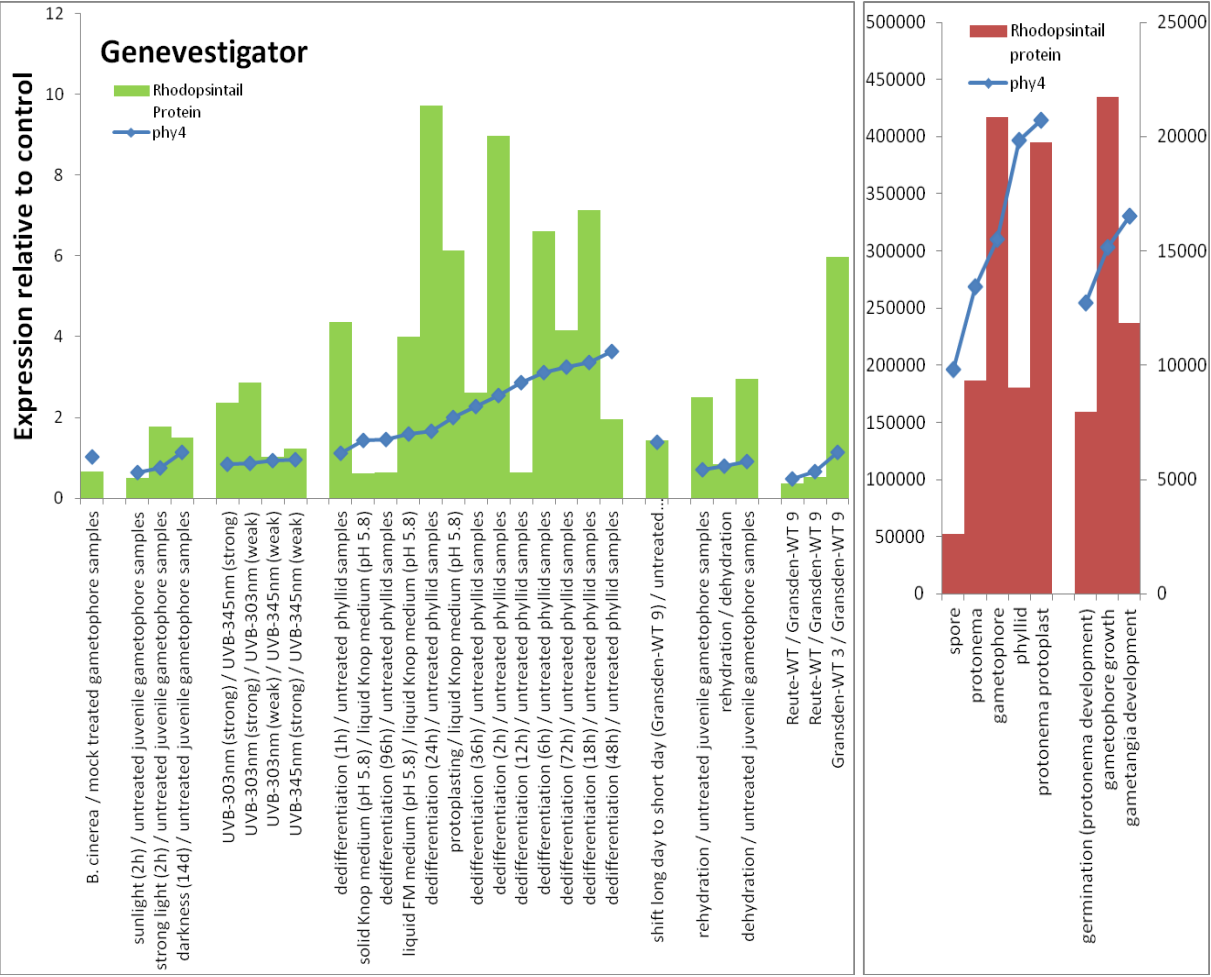


1.7.12 *Rhodopsintail* Protein (Pp1s444_27V6.1 / Pp3c14_6380V1.1)

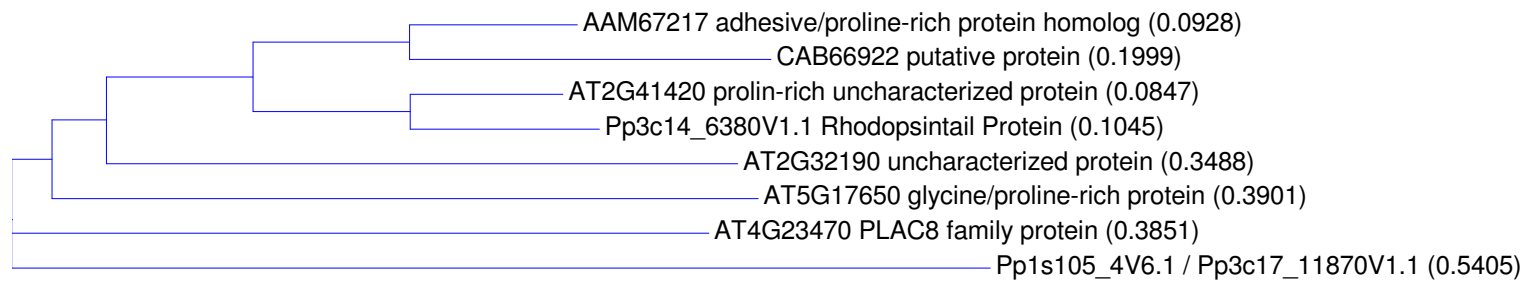
CDS

```
ATGAGTTATTATAATCAAGGAGGGCCACCTGTAGGAGCACCTCCTCCGCAATACGCTCCTCAAGGATATCCTCCT  
CAGGGTTACCCGCCACAAGGATACCCACAACAAGGATACCCGCAACAAGGATACCTCAACAGTATCCACAACAG  
CAGCAGAACAAGAGCCCATCGTTTTGTGAAGCTTTTCTTGCGGCTTTGTGCTGTTGTTGCTTGCTTGATGCATGC  
TTCTGA
```

Rhodopsintail Protein Expressionsdaten



***Rhodopsintail* Protein**



	(1)	1	10	20	30	40	50	60	
AAM67217 adhesive/proline-rich protein homolog	(1)	-----							
CAB66922 putative protein	(1)	MAVLWVEQSPCSNNGYKNKIWCAEIALEKQESCEIWGEVEWFGHVLTVPSTFIVRSSNFIVVILFL							
AT2G41420 prolin-rich uncharacterized protein	(1)	-----							
Pp3c14_6380V1.1 Rhodopsintail Protein	(1)	-----							
AT2G32190 uncharacterized protein	(1)	-----							
AT5G17650 glycine/proline-rich protein	(1)	-----							
AT4G23470 PLAC8 family protein	(1)	-----							
Pp1s105_4V6.1 / Pp3c17_11870V1.1	(1)	-----							
Consensus	(1)	-----							
	(67)	67	80	90	100	110	120	132	
AAM67217 adhesive/proline-rich protein homolog	(1)	-----							
CAB66922 putative protein	(67)	NLVTFFSLVSSNELVFVAVGETGSLQVTPRTEVIYSPGLKRGITSICERLHIHGLQRRLEHIDRYAH							
AT2G41420 prolin-rich uncharacterized protein	(1)	-----							
Pp3c14_6380V1.1 Rhodopsintail Protein	(1)	-----							
AT2G32190 uncharacterized protein	(1)	-----							
AT5G17650 glycine/proline-rich protein	(1)	-----							
AT4G23470 PLAC8 family protein	(1)	-----							
Pp1s105_4V6.1 / Pp3c17_11870V1.1	(1)	-----							
Consensus	(67)	-----							
	(133)	133	140	150	160	170	180	198	
AAM67217 adhesive/proline-rich protein homolog	(1)	-----							
CAB66922 putative protein	(133)	SLKLTLLSNNASNSIDVCFHRNSSRAIGMCPDNQWKRVS KGLPWVGIMSPFDYKILDIRTFGGSSN							
AT2G41420 prolin-rich uncharacterized protein	(1)	-----							
Pp3c14_6380V1.1 Rhodopsintail Protein	(1)	-----							
AT2G32190 uncharacterized protein	(1)	-----							
AT5G17650 glycine/proline-rich protein	(1)	-----							
AT4G23470 PLAC8 family protein	(1)	-----							
Pp1s105_4V6.1 / Pp3c17_11870V1.1	(1)	-----							
Consensus	(133)	-----							

	(199)	199	210	220	230	240	250	264
AAM67217 adhesive/proline-rich protein homolog	(1)	-----						
CAB66922 putative protein	(199)	VSTVELVAKQEFFIYRIVFLIMGIVLLSLASRLSKSVAFYYIGAMSIGIVILVTLIINQGIKRLPT						
AT2G41420 prolin-rich uncharacterized protein	(1)	-----						
Pp3c14_6380V1.1 Rhodopsintail Protein	(1)	-----						
AT2G32190 uncharacterized protein	(1)	-----						
AT5G17650 glycine/proline-rich protein	(1)	-----						
AT4G23470 PLAC8 family protein	(1)	-----						
Pp1s105_4V6.1 / Pp3c17_11870V1.1	(1)	-----						
Consensus	(199)	-----						

	(265)	265	270	280	290	300	310	320	330
AAM67217 adhesive/proline-rich protein homolog	(1)	-----							
CAB66922 putative protein	(265)	RGKSRFQLFFYSSMIGVGGYFLQYIRGLVQDLLMQIEISEDLYIPLAILLVVFVFM LGAWSGFWTV							
AT2G41420 prolin-rich uncharacterized protein	(1)	-----							
Pp3c14_6380V1.1 Rhodopsintail Protein	(1)	-----							
AT2G32190 uncharacterized protein	(1)	-----							
AT5G17650 glycine/proline-rich protein	(1)	-----							
AT4G23470 PLAC8 family protein	(1)	-----							
Pp1s105_4V6.1 / Pp3c17_11870V1.1	(1)	-----							
Consensus	(265)	-----							

	(331)	331	340	350	360	370	380	396
AAM67217 adhesive/proline-rich protein homolog	(1)	-----						
CAB66922 putative protein	(331)	KKFVVTKDGSVDISTSI FVSWSIRAF AVALILQSSLDPLL AGGALITGILISLILKSISRKLLAQR						
AT2G41420 prolin-rich uncharacterized protein	(1)	-----						
Pp3c14_6380V1.1 Rhodopsintail Protein	(1)	-----						
AT2G32190 uncharacterized protein	(1)	-----						
AT5G17650 glycine/proline-rich protein	(1)	-----						
AT4G23470 PLAC8 family protein	(1)	-----MPKQDMEKME LRKNFRNVWHTDLTHSIQNDTPYCCFALWCAPCA						
Pp1s105_4V6.1 / Pp3c17_11870V1.1	(1)	-----						
Consensus	(331)	-----						

Rhodopsintail

		(595)	595	600	610	620	630	640	650	660			
AAM67217 adhesive/proline-rich protein homolog	(41)		GYP	AQGYP	PP	-----	-----	-----	QYSQA	PP---QQKQNAG			
CAB66922 putative protein	(587)		GYP	AQGYP	PPQYP	-----	-----	QGHPPQYPYQGPPPPHY	YGQA	PPKKNKKDKKSSGG			
AT2G41420 prolin-rich uncharacterized protein	(46)		GYP	QAQGY	QQGY	-----	-----	PPPYAPQYP	PP	PQHQQQSSSPG			
Pp3c14_6380V1.1 Rhodopsintail Protein	(37)		GYP	QAQGY	QQ	-----	-----	YP	-----	QQQQNKSSPS			
AT2G32190 uncharacterized protein	(25)		TP	PLGY	TS	-----	-----	DISHATVA	P	---VETKSKGDG			
AT5G17650 glycine/proline-rich protein	(84)		GYP	SHGY	RPSHSGHHHG	GIGAI	IAGGVAAAAGAHHMSHHHG	HGYGYGYHGHG	KFKHKG				
AT4G23470 PLAC8 family protein	(224)		GYP	PSGY	QN	-----	-----	-----	PP	-----SAYSQ			
Pp1s105_4V6.1 / Pp3c17_11870V1.1	(109)		HLK	SLMG	SR	-----	-----	-----	KCRFLVN	VMGVNMEIIR			
Consensus	(595)		GYP	AQGY					Y	PP	Q	S	G

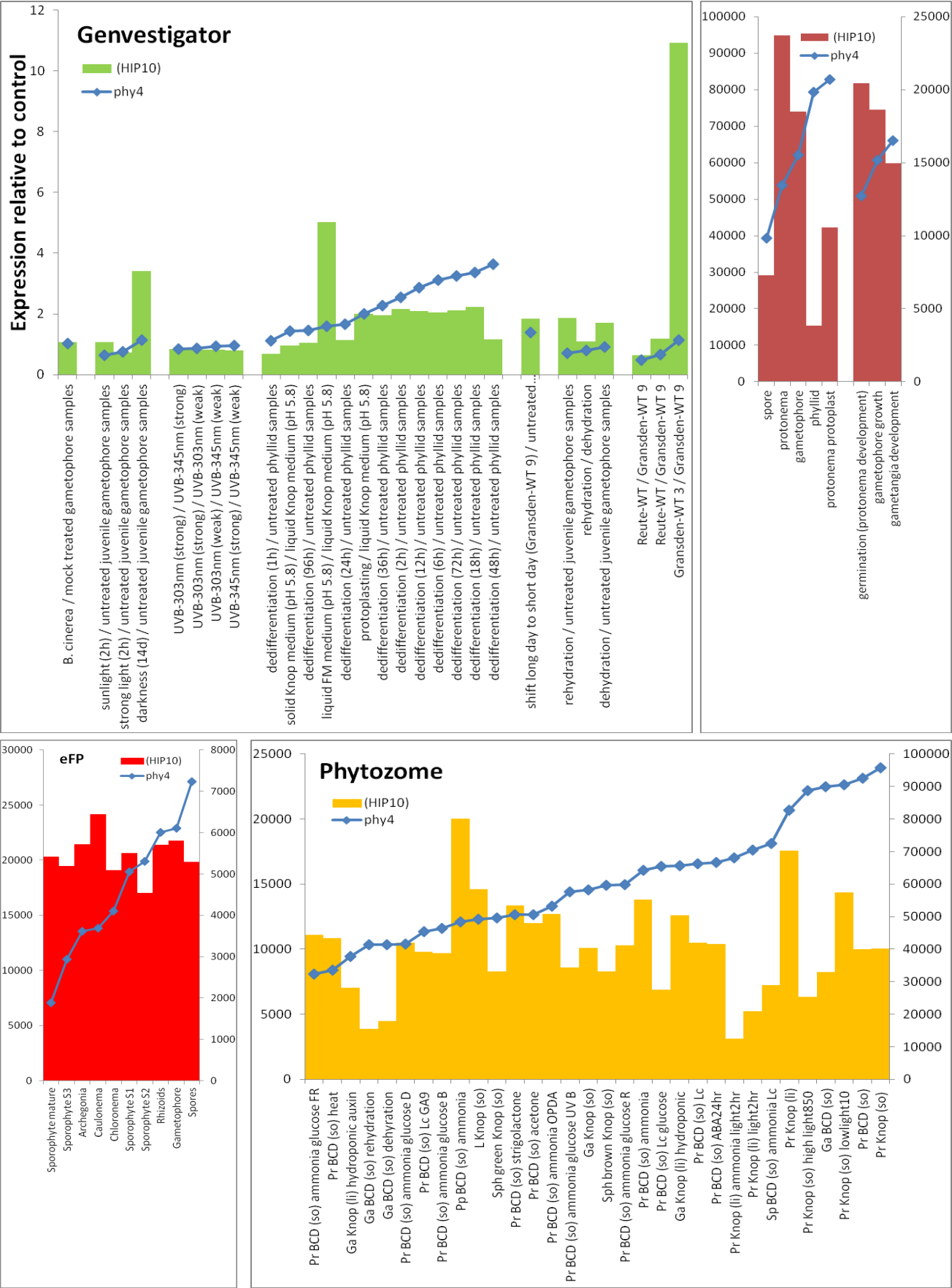
	(661)	661	670	684
AAM67217 adhesive/proline-rich protein homolog (64)	M	L	E	G
CAB66922 putative protein (633)	F	M	E	G
AT2G41420 prolin-rich uncharacterized protein (80)	F	L	E	G
Pp3c14_6380V1.1 Rhodopsintail Protein (58)	F	C	E	A
AT2G32190 uncharacterized protein (53)	F	L	K	G
AT5G17650 glycine/proline-rich protein (150)	F	K	H	G
AT4G23470 PLAC8 family protein (242)	Y	P	P	G
Pp1s105_4V6.1 / Pp3c17_11870V1.1 (136)	F	V	E	P
Consensus (661)	F	L	E	G

1.7.13 Ankyrin- & BTB/POZ-Protein / (HIP10) (Pp3c1_11190C1.1)

CDS

ATGGCTGCCGAGAAGAGCCACGCTGTGGATGAGGTTACTGCTGAGGTCGAAGCCGTGGGACTTGCGGAGGACCCCGGTAGG
AACTTGAAGCTGGACCAAGCGACTTTCTTCCGGTGTGTGGAGAATGGTAACCTTTCAGCTCTAACAGCTTTGCTTAAGAAC
CGTAAGGTGGACATCAACGCATACAATGATGAGGGCGTGACGTGTCTGCACGTTGCATTGTACAAGTATGAGGAGTCGCGG
AGTCTGGACATGGTGAAGTTCCTACTTGCACATGGCGCTAATATCTCACTCAAGGCAGCTGTGATGCCATCTGCGCACAAA
ATTTCTATTATCCGCCACGGTCACGGTGGCAGTGTGCGCAATCCACTCGAAACCAAGAAGGTTGTTTTTGATCAGAAGACT
CCTCTTCTTGTGGCGCTGGAGCTGAAATCGGCGCTTTACCTGAAAGGGTGGGAGTACCGGCATTGGGACGAGATGTTGAGG
ATTTTAGCAGACGCAACCATTTGAGCACCACGCTAAATCTCCTGAACTAAAGGGAGAAAGGCTTCCTTACATTGTGATTCAG
AAGAATTGGGGTAATGTGTTTCGCAAGTGGGAAACATGAGACGATTGAAGTGTGGGCAGAGGACAAGAGTATTACTGTGCTG
AAGCTCCTCCTTACTGGCGCATCAAAGATTCTTAAACTCAATATCGAGAATCCAGACGTACAATATTGCAATAGATTGGAC
ATCAAGGAGGCGTCGTTTAATATTACCAAGGCCATGATGAAGTTTCTTTTACACTGGAAAGGTTGAAGCCGAGTTTCTTGAA
CACAGGGGTCTAGATCTCCTATCTGCGGCTCACAAAGTATGGAATCAAGAGCTTGATGTGGGTTTGTGAGGATTCAATTCGT
GCTACACCGGATAATTGGATCAAGCTTCTATCCACGGCCATGGAGTGCAACTCAGATATGCTAGCTCTCAAATGTGCTCAA
TCGATAAAGGAAGTGATGGACGAACGACATGAAAAACACACCAGTTTGAAGAAGAGCTATTCAAATATGCACAATGTCCCT
AACCAACTCTTCACTTCATTTCCGTGA

Ankyrin- & BTB/POZ-Protein Expressionsdaten



Ankyrin- & BTB/POZ-Protein Lokalisations- und *Split-YFP*-Daten

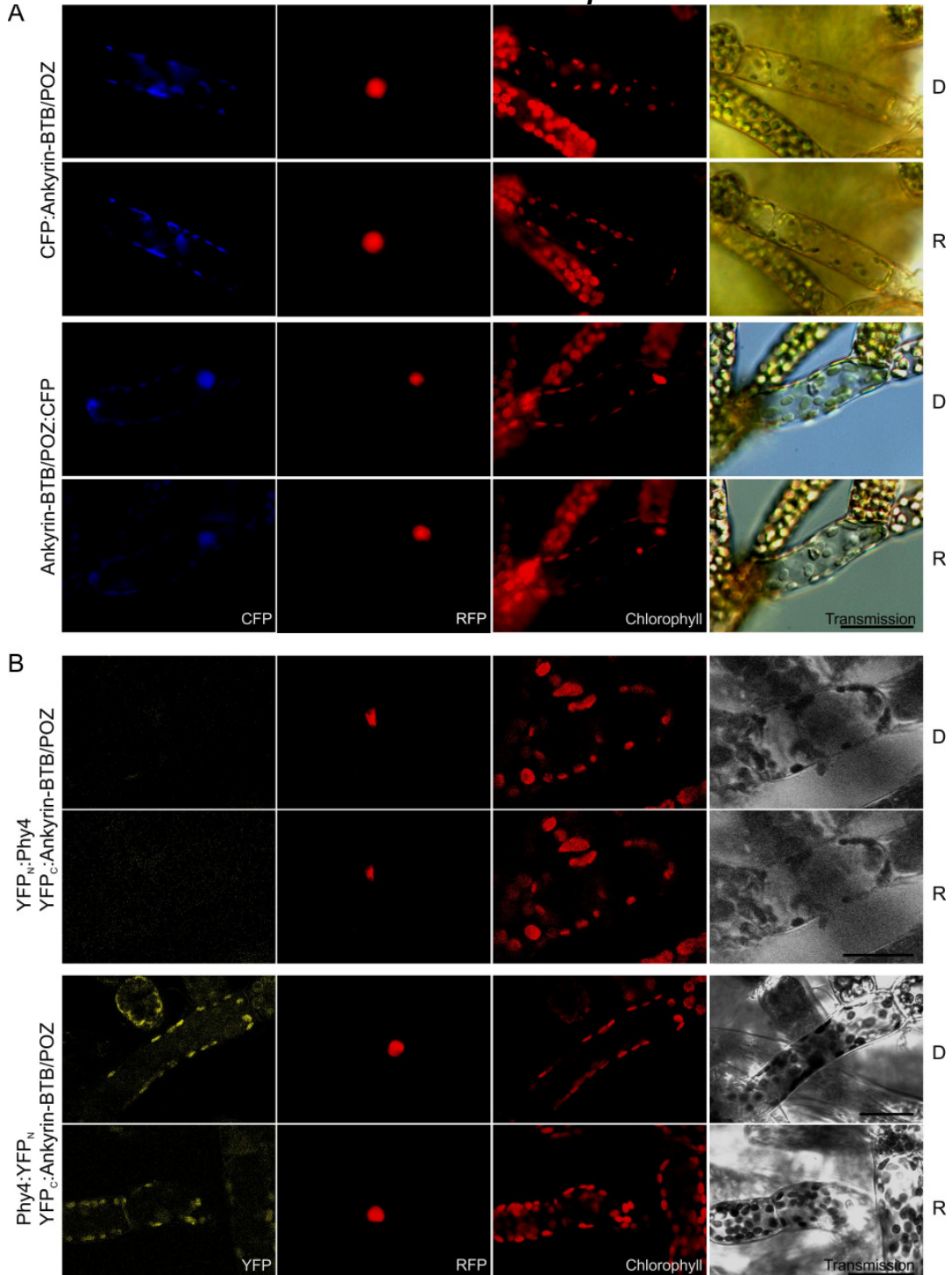


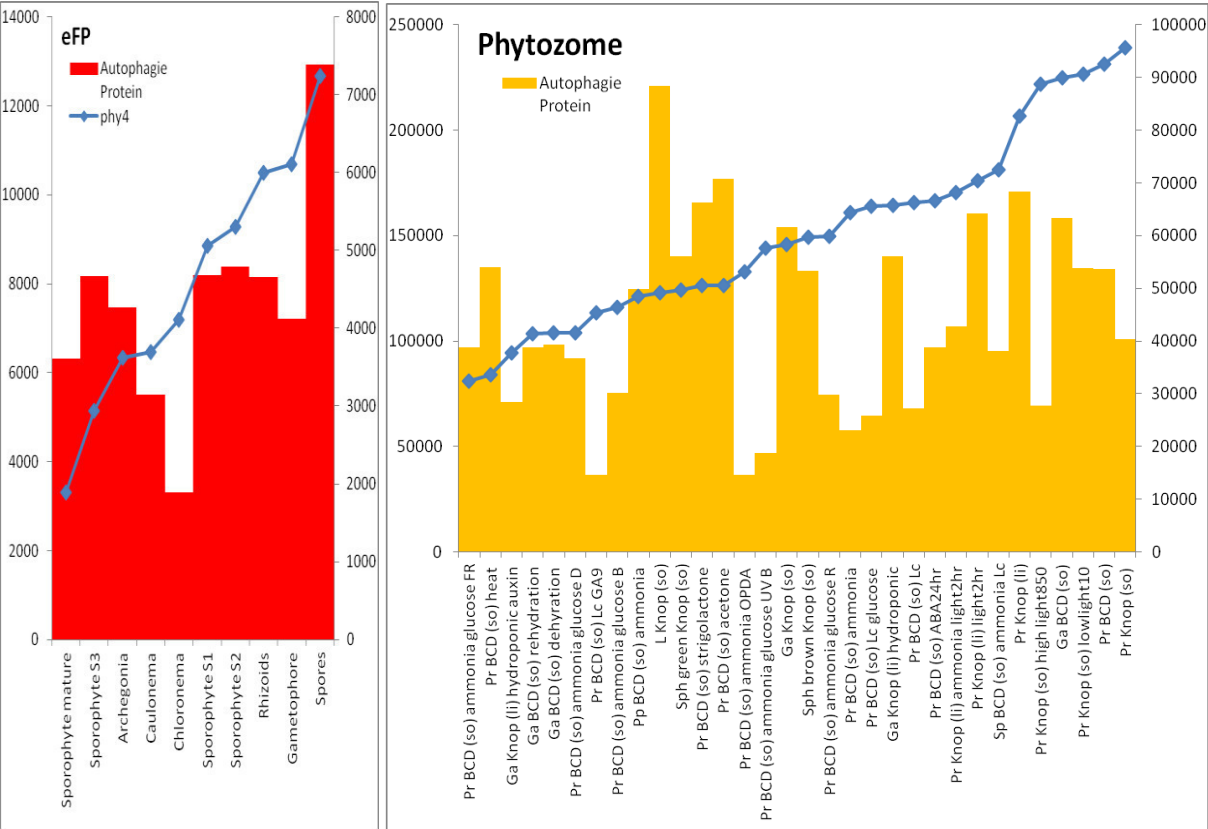
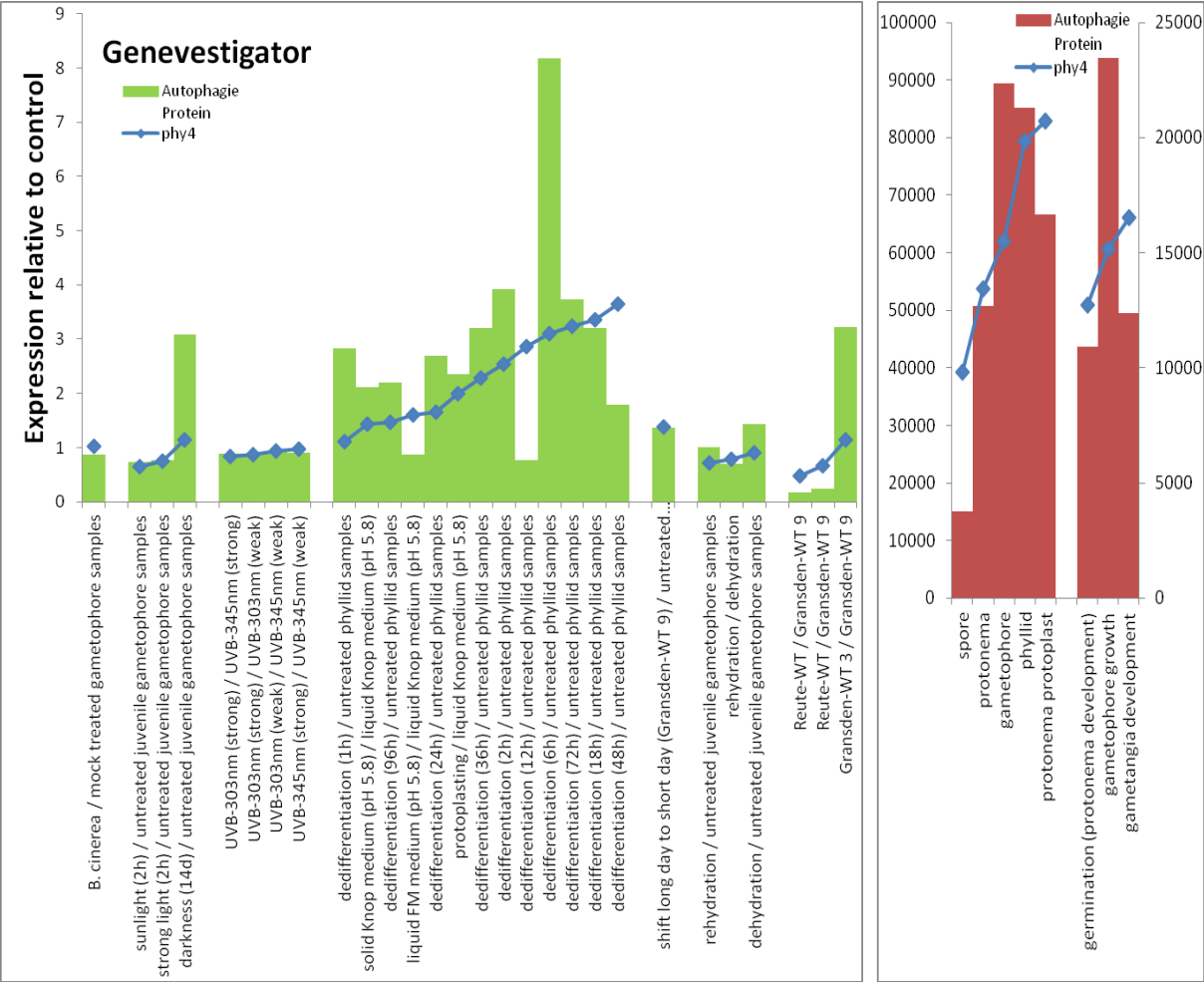
Abbildung 8: Ankyrin- & BTB/POZ-Protein (Pp3c1_11190C1.1) intrazelluläre Lokalisations- (A) und Split-YFP Studien der Ankyrin- & BTB/POZ-Protein-phy4 Interaktion (B) beide ohne (D) und mit R-Vorbehandlung (R) mittels Fluoreszenz- bzw. Konfokalmikroskopie. Die Struktur der Abb. entspricht Abb. 4-10 im Haupttext (A) CFP:Ankyrin&BTB/POZ lokalisierte in distinkten Cytoplasma-Bereichen (Reihen 1+2), während Ankyrin&BTB/POZ:CFP in Cytoplasma und Zellkern vorzufinden war (Reihen 3+4; Spalte 1 CFP). (B) Entsprechend des Y2H-Interaktionsverhaltens wurden Split-YFP-Konfigurationen von YFP_C:Ankyrin&BTB/POZ in Kombination mit N- (Reihen 1+2) und C-terminal fusionierten phy4-YFP_N-Fusionen (Reihen 3+4) untersucht. Keine der analysierten Konfigurationen ergab signifikante YFP-Signale. Maßstab 30 µm.

1.7.14 Autophagie-Protein (Pp1s209_115V6.2 / Pp3c14_15110V1.1)

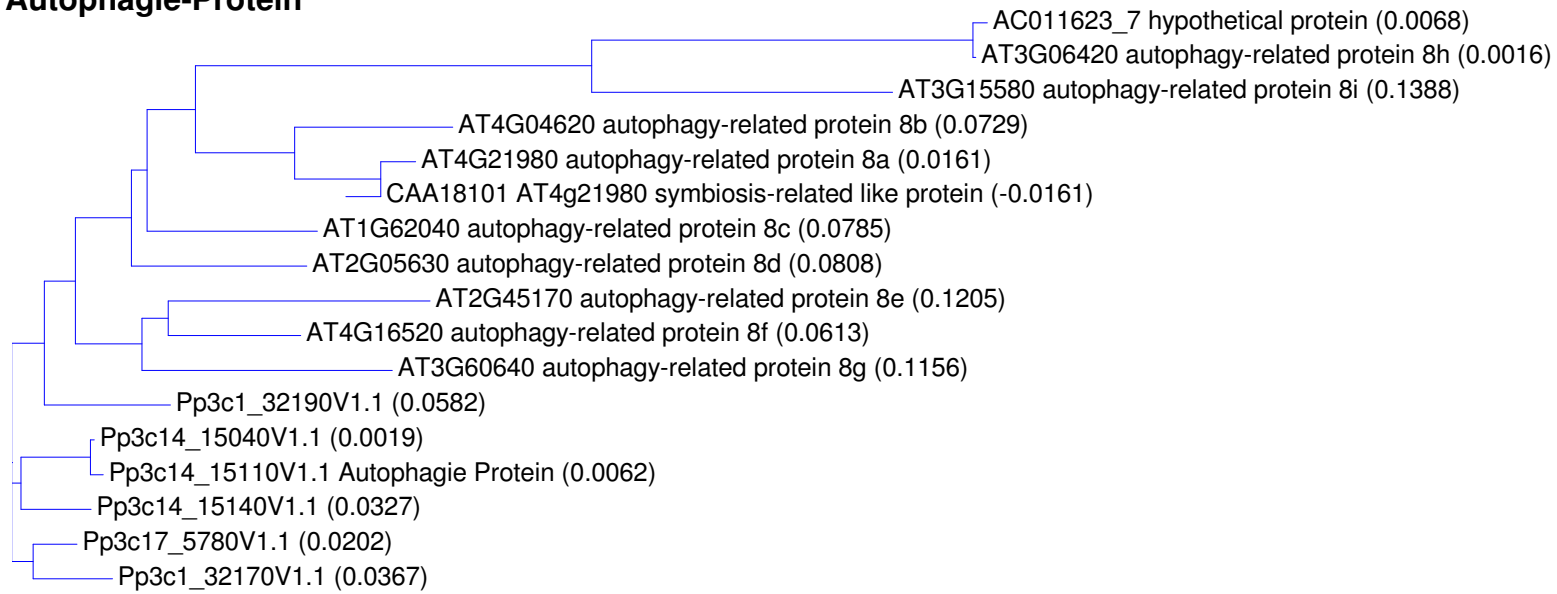
CDS

```
ATGGCGAAGAGTTCTTTCAAGCAAGAGCATCATCTGGAGAAGAGGCAGGCAGAAGCTTCAAGGATCCGTGGCAAG
TACCCTGACAGAATTCCAGTGATCGTGGAGAAGGCGGAGAAAAGCGACATACCAGACATCGACAAGAAGAAGTAT
CTGGTACCAGCGGACTTGACGGTTGGACAGTTTGTGTACGTGATAAGGAAGCGCATCAAGTTGAGTTCGGAGAAG
GCCATCTTCATATTCGTGAAGAACGTGCTGCCCCGACAGCGGCCATGATGTCATCGATATACGACGAGCACAAA
GACGAGGATGGATTTCGTGTACTTCACATACAGCGGGGAAAACACGTTTCGGAGGAGCGAGCGGGTGTTAG
```

Autophagy-Protein Expressionsdaten



Autophagie-Protein



Autophagie-Protein Alignment

	(1)	1	10	20	30	40	50	65
AC011623_7 hypothetical protein	(1)	-----	-----	MGIVVK	SFKDQFSSAKFS	-----	-----	SLFE-----
AT3G06420 autophagy-related protein 8h	(1)	-----	-----	MGIVVK	SFKDQFS	-S	-----	-----
AT3G15580 autophagy-related protein 8i	(1)	-----	-----	-----	MKSFKEQYT	-----	-----	-----
AT4G04620 autophagy-related protein 8b	(1)	-----	-----	MEKN	SFKLSNP	LE	-----	-----
AT4G21980 autophagy-related protein 8a	(1)	MIFACLKFAETNRIA	MAKS	SFKISNP	LE	-----	-----	-----
CAA18101 AT4g21980 symbiosis-related like protein	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AT1G62040 autophagy-related protein 8c	(1)	-MTGQMATKENS	LIA	MANS	SFKLEHP	LE	-----	-----
AT2G05630 autophagy-related protein 8d	(1)	-----	-----	MAIS	SFKHEHP	L	VEMNIDVEVT	KFHL
AT2G45170 autophagy-related protein 8e	(1)	-----	-----	MNKGSI	FKMDNDFE	-----	-----	-----
AT4G16520 autophagy-related protein 8f	(1)	-----	-----	MAKS	SFKQEHDL	LE	-----	-----
AT3G60640 autophagy-related protein 8g	(1)	-----	-----	MSNV	SFRQDHD	FE	-----	-----
Pp3c1_32190V1.1	(1)	-----	-----	-----	MYMK	FQ	-----	-----
Pp3c14_15040V1.1	(1)	-----	-----	MAKS	SFKQEHPL	LE	-----	-----
Pp3c14_15110V1.1 Autophagie Protein	(1)	-----	-----	MAKS	SFKQEHHL	LE	-----	-----
Pp3c14_15140V1.1	(1)	-----	-----	MAKS	SFKQEHPL	LA	E	-----
Pp3c17_5780V1.1	(1)	-----	-----	MAKN	SFKQEHPL	LE	-----	-----
Pp3c1_32170V1.1	(1)	-----	-----	MAKN	SFKQEHPL	ME	-----	-----
Consensus	(1)		MA	SFK	EH	LE		

Autophagy protein Atg8 ubiquitin-like

		(66)	66	80	90	100	110	120	130
AC011623_7 hypothetical protein	(23)	----	D I D E	R L K E S N N I	I A K Y P D R I P V I I	E K Y S N A D L P D M E K N	K Y L V P R D M T V G H F	I H M L S K R M Q L	
AT3G06420 autophagy-related protein 8h	(15)	-----	D E R L K E S N N I	I A K Y P D R I P V I I	E K Y S N A D L P D M E K N	K Y L V P R D M T V G H F	I H M L S K R M Q L		
AT3G15580 autophagy-related protein 8i	(10)	-----	L D E R L A E S R E	I I A K Y P T R I P V I A	E K Y C K T D L P A I E K K K F	L V P R D M S V G Q F	I Y I L S A R L H L		
AT4G04620 autophagy-related protein 8b	(14)	-----	M R M A E S T R I R	A K Y P E R V P V I V E	K A G Q S D V P D I D K K Y	L V P A D L T V G Q F	V Y V R K R I K L		
AT4G21980 autophagy-related protein 8a	(29)	-----	A R M S E S S R I R	E K Y P D R I P V I V E	K A G Q S D V P D I D K K Y	L V P A D L T V G Q F	V Y V R K R I K L		
CAA18101 AT4g21980 symbiosis-related like protein	(1)	-----	M S E S S R I R E K Y	P D R I P V I V E K A G Q	S D V P D I D K K Y	L V P A D L T V G Q F	V Y V R K R I K L		
AT1G62040 autophagy-related protein 8c	(28)	-----	R R Q I E S S R I R	E K Y P D R I P V I V E	R A E R S D V P N I D K K Y	L V P A D L T V G Q F	V Y V R K R I K L		
AT2G05630 autophagy-related protein 8d	(51)	P K I L S L K	K R Q A E A A R I R	E K Y P D R I P V I V E	R A E K S D V P D I D R K K Y	L V P A D L T V G Q F	V Y V R K R I K L		
AT2G45170 autophagy-related protein 8e	(15)	-----	K R K A E A G R I R	E K Y P D R I P V I V E	K A E K S E V P N I D K K Y	L V P S D L T V G Q F	V Y V I R K R I K L		
AT4G16520 autophagy-related protein 8f	(14)	-----	K R R A E A A R I R	E K Y P D R I P V I V E	K A E K S D I P T I D K K Y	L V P A D L T V G Q F	V Y V I R K R I K L		
AT3G60640 autophagy-related protein 8g	(14)	-----	K R K A E A L R I R	E K Y S D R V P V I V E	K S E K S D I P N I D K K Y	L V P A D L T V G Q F	V Y V I R K R I Q L		
Pp3c1_32190V1.1	(7)	-----	K R Q A E A L R I R	E K Y P D R I P V I V E	K A E K S D I P D I D K K Y	L V P A D L T V G Q F	V Y V I R K R I K L		
Pp3c14_15040V1.1	(14)	-----	K R Q A E A S R I R	G K Y P D R I P V I V E	K A E K S D I P D I D K K Y	L V P A D L T V G Q F	V Y V I R K R I K L		
Pp3c14_15110V1.1 Autophagie Protein	(14)	-----	K R Q A E A S R I R	G K Y P D R I P V I V E	K A E K S D I P D I D K K Y	L V P A D L T V G Q F	V Y V I R K R I K L		
Pp3c14_15140V1.1	(15)	-----	K R Q A E A S R I R	D K Y P D R I P V I V E	K A E K S D I P D I D K K Y	L V P A D L T V G Q F	V Y V I R K R I K L		
Pp3c17_5780V1.1	(14)	-----	K R Q A E A A R I R	D K Y P D R I P V I V E	K A E K S D I P D I D K K Y	L V P A D L T V G Q F	V Y V I R K R I K L		
Pp3c1_32170V1.1	(14)	-----	K R Q A E A A R I R	D K Y P D R I P V I V E	K A E K S D I S D I D K K Y	L V P A D L T V G Q F	V Y V I R K R I K L		
Consensus	(66)		K R	A E A S R I R E K Y P D R I P V I V E K A E K S D I P D I D K K Y L V P A D L T V G Q F V Y V I R K R I K L					

Autophagy protein Atg8 ubiquitin-like

		(131)	131	140	150	160	170	185			
AC011623_7 hypothetical protein	(84)	DPS	KALFVFVHN	TLPQTASRMD	SLYNTF	KEEDGFLY	MCYST	EKTTFG	-----		
AT3G06420 autophagy-related protein 8h	(74)	DPS	KALFVFVHN	TLPQTASRMD	SLYNTF	KEEDGFLY	MCYST	EKTTFG	-----		
AT3G15580 autophagy-related protein 8i	(70)	SPG	KALFVFVNN	TLPQTAA	LMDSVYESY	KDDGDFVY	MCYSEK	TFG	-----		
AT4G04620 autophagy-related protein 8b	(72)	GAE	KALFVFVK	NTLPPTAALMS	AIYEEH	KDE	DGFLYMTYSG	ENTFG	GSFYC----		
AT4G21980 autophagy-related protein 8a	(87)	GAE	KALFVFVK	NTLPPTAALMS	AIYEEH	KDE	DGFLYMTYSG	ENTFG	SLTVA----		
CAA18101 AT4g21980 symbiosis-related like protein	(57)	GAE	KALFVFVK	NTLPPTAALMS	AIYEEH	KDE	DGFLYMTYSG	ENTFG	SLTVA----		
AT1G62040 autophagy-related protein 8c	(86)	SAE	KALFVFVK	NTLPPTAAMMS	AIYDEN	KDE	DGFLYMTYSG	ENTFG	LV-----		
AT2G05630 autophagy-related protein 8d	(116)	SPE	KALFIFVK	NI	LPPTAAIM	SAIYEEH	KDE	DGFLYMSYSG	ENTFG	IFF-----	
AT2G45170 autophagy-related protein 8e	(73)	SAE	KALFIFV	DNVLPPTGEL	MSSVYED	KKDE	DGFLYITYSG	ENTFG	ASSI----		
AT4G16520 autophagy-related protein 8f	(72)	SAE	KALFIFV	DNVLP	PAGALMSSVYEE	KKDD	DGFLYV	TYSG	ENTFG	FGSP----	
AT3G60640 autophagy-related protein 8g	(72)	SAE	KALFIFV	DNVLP	PTGAMMSTIYDEN	KEED	DGFLYV	TYSG	ENTFG	SSMT----	
Pp3c1_32190V1.1	(65)	SSE	KALFIFV	KNVLP	PPTAMMSSIYDEH	KDE	DGFLYF	TYSG	ENTFG	DAITC----	
Pp3c14_15040V1.1	(72)	SSE	KALFIFV	KNVLP	PTAAMMSSIYDEH	KDE	DGFLYV	F	TYSG	ENTFG	GASGC----
Pp3c14_15110V1.1 Autophagie Protein	(72)	SSE	KALFIFV	KNVLP	PTAAMMSSIYDEH	KDE	DGFLYV	F	TYSG	ENTFG	GASGC----
Pp3c14_15140V1.1	(73)	SSE	KALFIFV	KNVLP	PTAAMMSSVYDEH	KDE	DGFLYF	TYSG	ENTFG	DCVAC----	
Pp3c17_5780V1.1	(72)	SSE	KALFIFV	KNVLP	PTAAMMSSIYDEH	KDE	DGFLYF	TYSG	ENTFG	LSRIC----	
Pp3c1_32170V1.1	(72)	SSE	KALFIFV	KNVLP	PTAAMMSSIYDEH	KDE	DGFLYF	TYSG	ENTFG	DVINCQKY-	
Consensus	(131)	SAE	KALFIFV	KNVLP	PTAAMMSSIYDEH	KDE	DGFLYMTYSG	ENTFG			

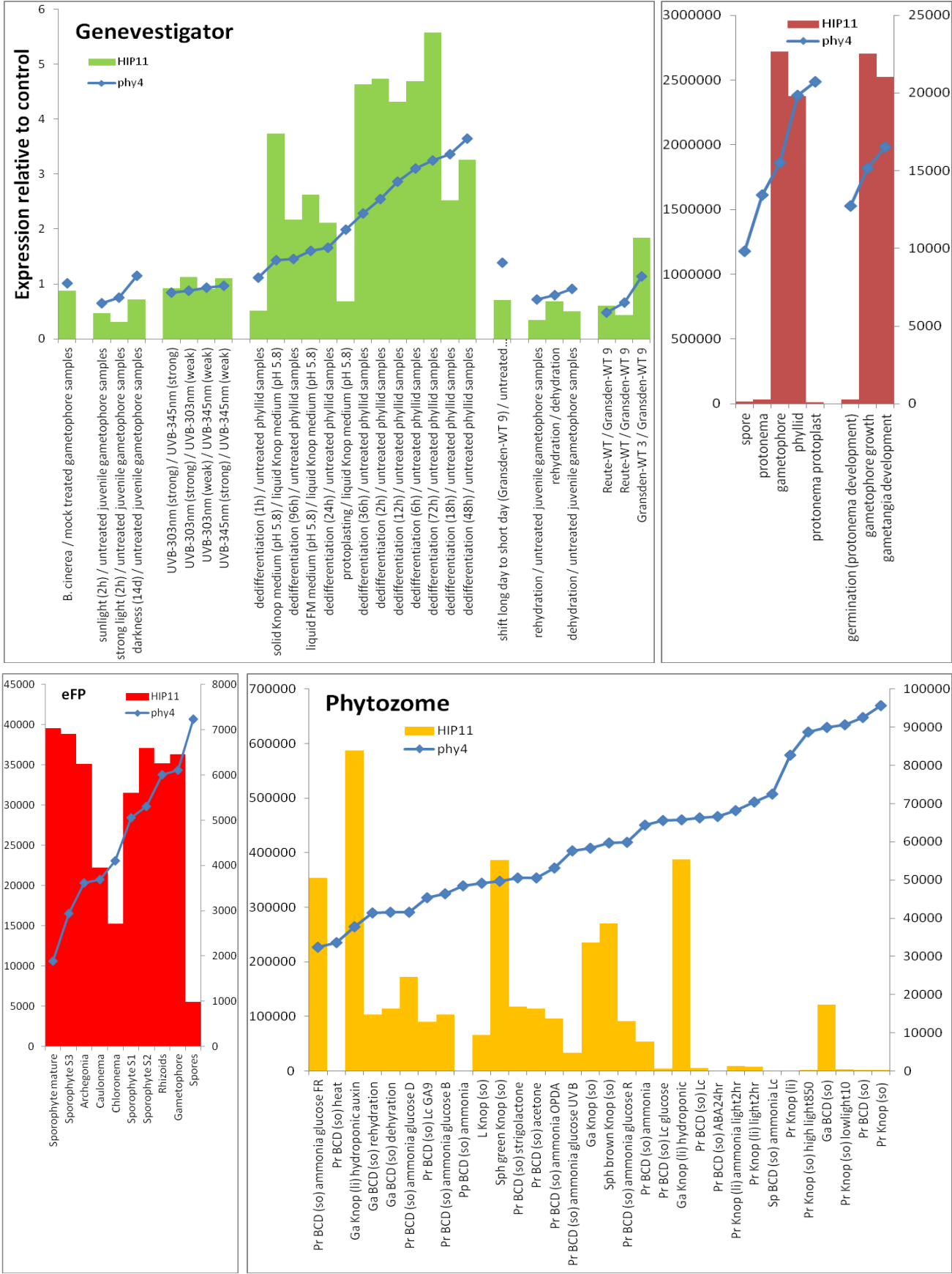
Autophagy protein Atg8 ubiquitin-like

1.7.15 Unbekanntes Protein / HIP11 (Pp3c20_16210V1.1)

CDS

ATGAAGAAGACTACGTGTTTTCAAGCTGCTGCTGGTCATTGCTGCGTTGGTGGTCACCACGCTGCCAGCTGCAGTCGAAGCT
GTGGATATCCAGGGCTTCGACAATTCTGCTGCCTGTACGGGCACAGGATACACCTTCCCAGGAATTGCGCAGCGAACTTGT
GCGGCGTTCACGAATGAAGGATCCATTTTGATCAGAGACCTTCCAGCTGTCAGACCGGCAGAGCTTACCGCAACGGAGGA
TGCACGACTGAGGTGGGAAATGGGAATGGCCCGACTGTGTGGTGTTCGTTCGGTGGCTCATAACAGGAGCGGCCTGGTTC
AATAACTGCAGAAGACGTCGACTTCAGGCGGACAACAGCCACGAATCCTGCACATCTACCTCTGCTCCCAACGGTGTCCAC
TACACTGAGCACCTCTCCAAGGGATCATGGATCCTGCACTCTGACAATGCCACAGAACTCATGGCCGAACCTCAAAAAAATT
GTCGATGAAGAGAAAGTGAACCTGGCTCAAAGCTCGCGGTGCCTATCTTATTCCTGGGAGCGACACAATTGAATACGTCTAA

HIP11 Expressionsdaten

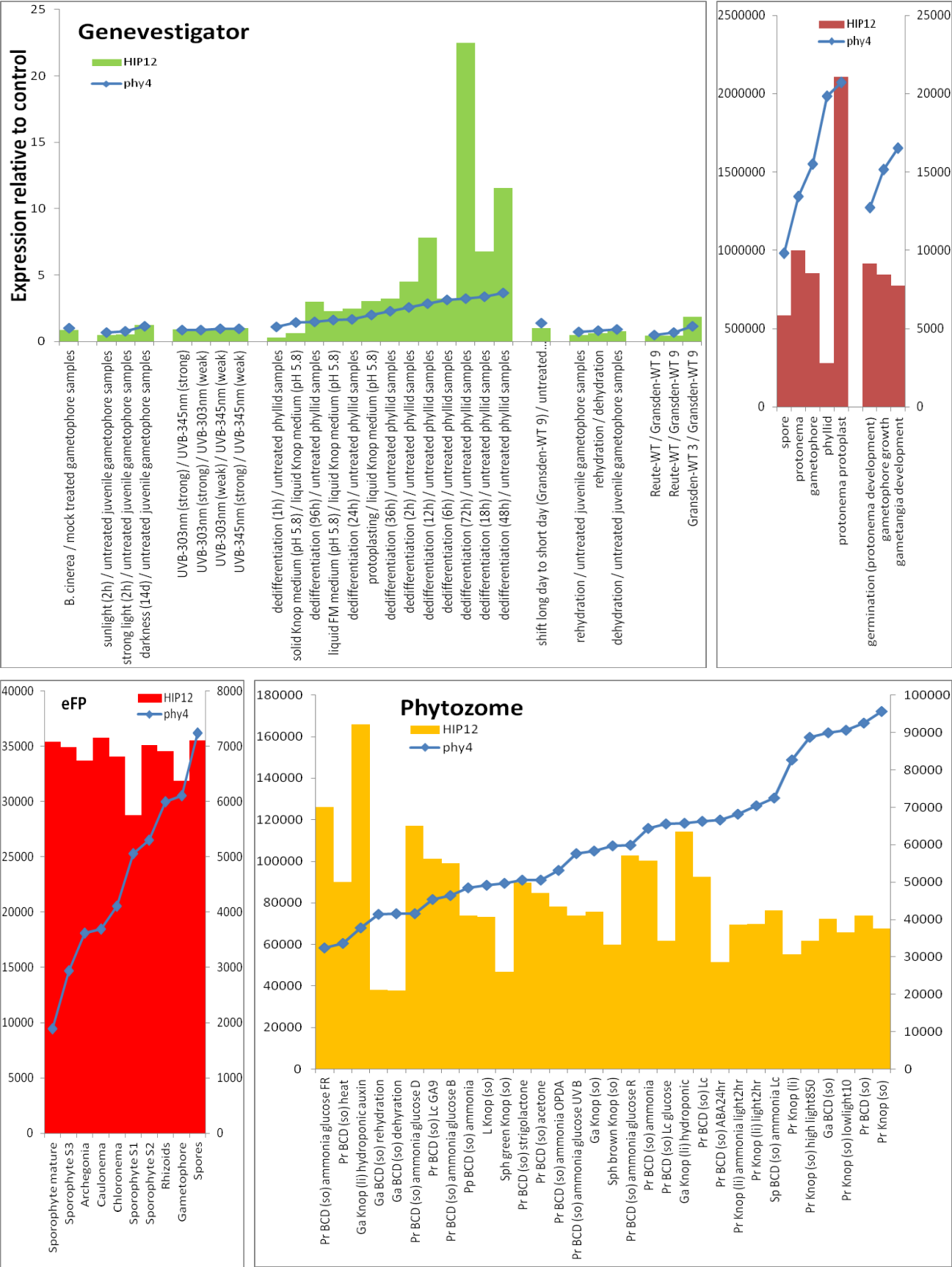


1.7.16 eIF-5A / HIP12 (Pp3c13_15620V1.1)

CDS

ATGTCTGACGACGAGCACCAATTCGAGTCCAAGGCCGACGCCGGAGCGTCCAAGACTTACCCCCAGCAGGCCGGAACCATA
CGCAAGGGCGCGCACCTTGTTCATCAAGCAGAGGCCCTGCAAGGTTGTCGAAGTGTCTACTTCGAAGACTGGGAAGCACGGT
CACGCCAAGTGCCACTTCGTCGCAATCGATATCTTCACTGGGAAGAAGCTCGAGGATATTGTTCCGTCTTCTCACAATTGT
GATGTTCCCTCATGTATCTCGTTCTGATTACCAGCTCATTGACATCTCTGAGGATGGATTTCGTGAGTCTTCTCACTGAAAAT
GGTGTCAACCAAAGACGATCTGCGCCTGCCCACCGACGAGGGCCTCCTGACGCAGATAAGGGATGGATTTGCCGAAGGCAAG
GATCTTGTAGTGACTGTTATGTCTGCTATGGGAGAGGAGCAGATTGCGGCTCTGAAGGATATCGGCGGCAGGAACAATAA

eIF-5A Expressionsdaten

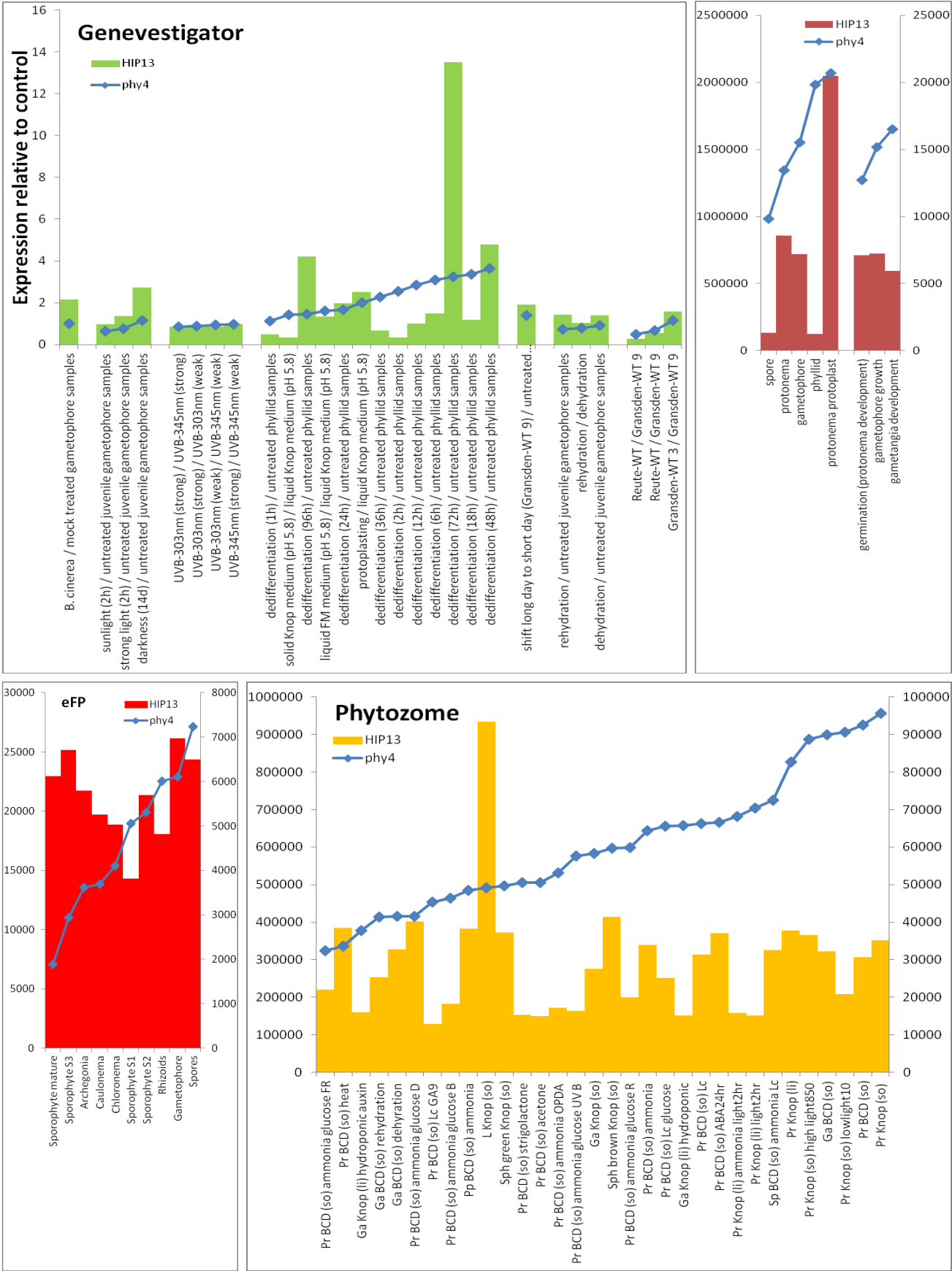


1.7.17 EF1 α / HIP13 (Pp3c1_23670V1.1)

CDS

ATGGGTAAGGAGAAGGTGCACATCAATATCGTGGTCATCGGCCATGTCGACTCTGGCAAGTCGACGACCACTGGGCACCTC
ATCTACAAGTTGGGAGGTATCGACAAGCGTGTGATCGAGCGTTTCGAGAAGGAGGCGGCGGAGATGAACAAGCGTTCGTTT
AAGTATGCGTGGGTGCTGGACAAGCTGAAGGCAGAGCGCGAGCGTGGTATCACGATTGATATTGCGCTGTGGAAGTTCGAG
ACCATGAAGTACTACTGCACTGTGATCGACGCGCCCGGACATCGCGATTTTCATCAAGAACATGATCACGGGAACGTCGCAG
GCAGACTGCGCTGTGCTGATCATCGACTCGACGACGGGAGGGTTCGAGGCCGGTATCTCGAAGGATGGGCAGACGCGTGAG
CACGCACTGCTGGCGTTCACTTTGGGAGTGAAGCAGATGATTTGCTGCTGCAACAAGATGGACGCGACCACCCGAAGTAC
AGCAAGGCCCCGATATGAGGAGATCGTGAAGGAGGTGTCGGCGTACCTGAAGAAGGTGGGGTACAACCCGGAGAAGGTTCG
TTCGTGCCGATCTCAGGGTTCGAGGGCGACAACATGATCGAGAGGTTCGACGAACCTGGACTGGTACAAGGGCCCGACTCTG
TTGGAGGCGTTGGACAACGTGTCAGAGCCGAAGCGGCCATCTGACAAGCCTCTGAGGCTGCCGCTTCAGGACGTGTACAAG
ATTGGAGGCATCGGAACGTGCCAGTGGGACGGGTGGAGACAGGAATCATCAGGCCAGGTATGTTGGTGTGCTTCGCACCG
ACGGGACTGACGACTGAGGTGAAGTCGGTGGAGATGCATCACGAGTCGATGCCCTGAGGCGCACCCAGGTGACAACGTTCGGG
TTCAACGTGAAGAACGTGGCGGTGAAGGACCTGAAGAGAGGGTACGTGGCCTCAGACTCGAAGAACGACCCTGCCAAGGAG
GCAGCCAACCTTCACGGCGCAGGTTATCATCATGAACCACCCGGGACAGATCGGGAACGGTTACGCACCAGTGCTGGATTGC
CACACGTGCGCACATTGCGGTGAAGTTCGCGGAGATCTTGACGAAGGTGGACAGGCGATCGGGTAAGGAGCTGGAGAAGGAG
CCGAAGTTTTTTGAAGAACGGGGACGCAGGGTTCGTGAAGATGATTCGACGAAGCCGATGACAGTGGAGACGTTTCGCGGAG
TACCCACCATTTGGGACGTTTCGCGGTGCGTGATATGAGGCAGACGGTGGCTGTGGGTGTTATCAAGGCCGTAGAGAAGAAG
GAACCCACCGGCGCCAAGGTGACGAAGGCCGCTGCGAAGAAGAAGTGA

EF1α / HIP13 (Pp3c1_23670V1.1) Expressionsdaten

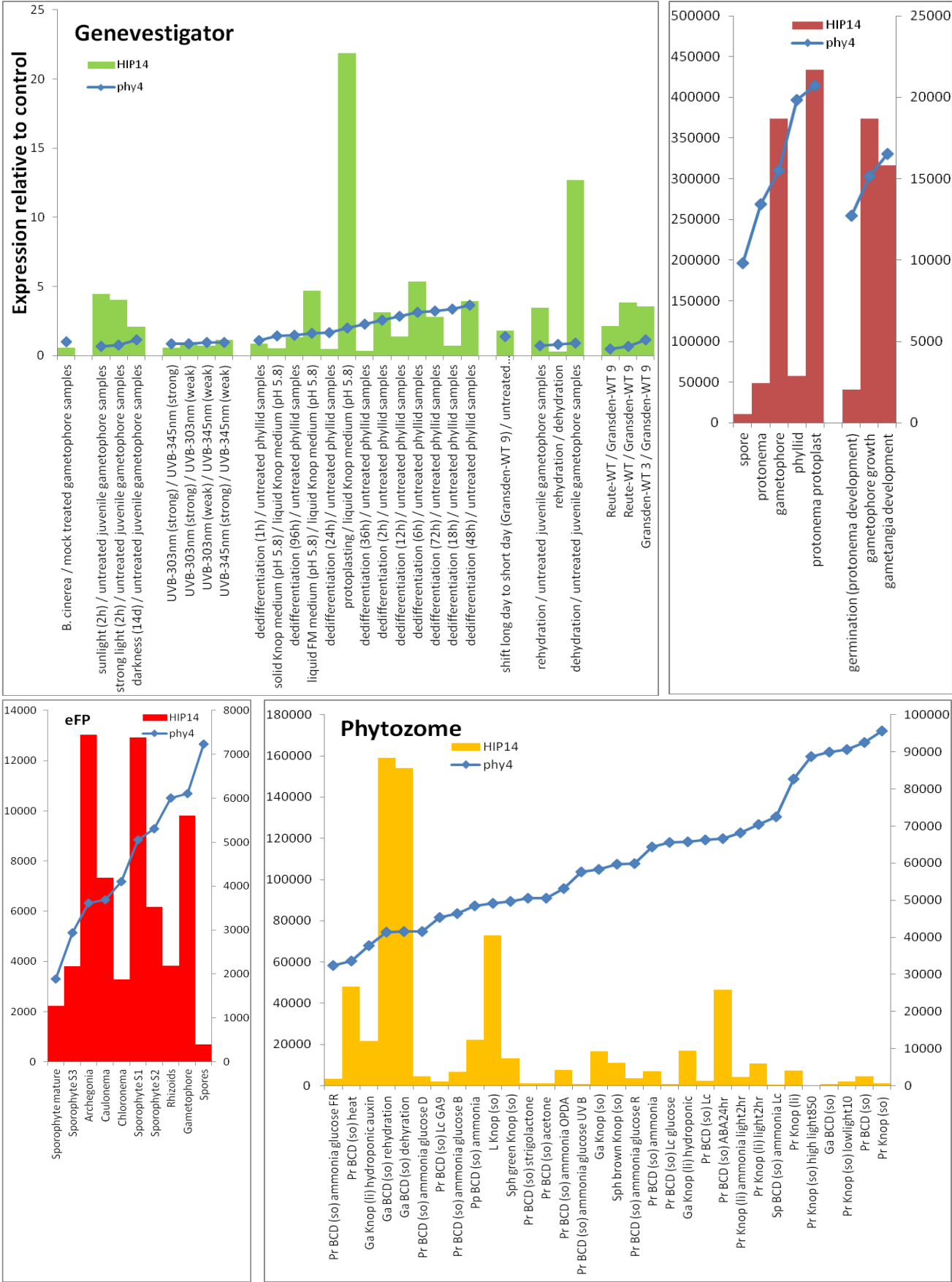


1.7.18 14-3-3 Protein / HIP14 (Pp3c3_8540C1.1)

CDS

ATGACGGAGCTACGAGAGGAAAATGTGTACATGGCTAAGCTCGCCGAGCAGGCGGAGCGGTACGATGAGATGGTGGAAGCC
ATGGAGAATGTGGTAAAGGCGGTGGAGAACGAGGAGCTGACCGTGGAGGAGCGGAACCTGTTGTCGGTGGCGTTTAAGAAC
GTGATTGGTGCGAGGAGGGCGTCGTGGCGGATCATCTCTTCCATCGAGCAGAAGGAAGAGGCCAAGGGGTCTGAGGAGCAC
GTCGCTGCTATTAAGGAGTACCGATCCAAAGTAGAGGCTGAGTTGAGCACCATCTGTGACACTATATTGAAGCTTTTGGAC
TCGCACCTGATCCCGTCCTCCACCTCGGGGGAGTCGAAGGTTTTTTTACTTGAAAATGAAGGGAGACTATCACAGGTACCTG
GCTGAGTTCAAAGCCGGCGCTGAGAGAAAAGAGGCAGCTGAGGCTACATTGCACGCGTACAAGCATGCACAAGACATTTCA
ACGACAGAGTTGGCGTCCACACATCCTATCAGATTGGGATTGGCTTTGAATTTTTTCTGTCTTTTACTACGAAATTTTGGTT
TCTCCAGACCGAGCATGCCATCTTGCCAAGCAGGCTTTTGATGAAGCTATCTCTGAGTTAGATACCTTAGGAGAGGAATCC
TACAAAGACAGTACTCTCATTATGCAGCTGCTCCGGGATAACCTTACCTTATGGACTTCAGATATGCAGGACGACATTGGT
GAAGAAGGAAAGGATTCCAAGGTCGAAGATGCTGATGACCACTAG

14-3-3-Protein Expressionsdaten



1.7.19 phy4 (Pp3c27_7830V1.1)

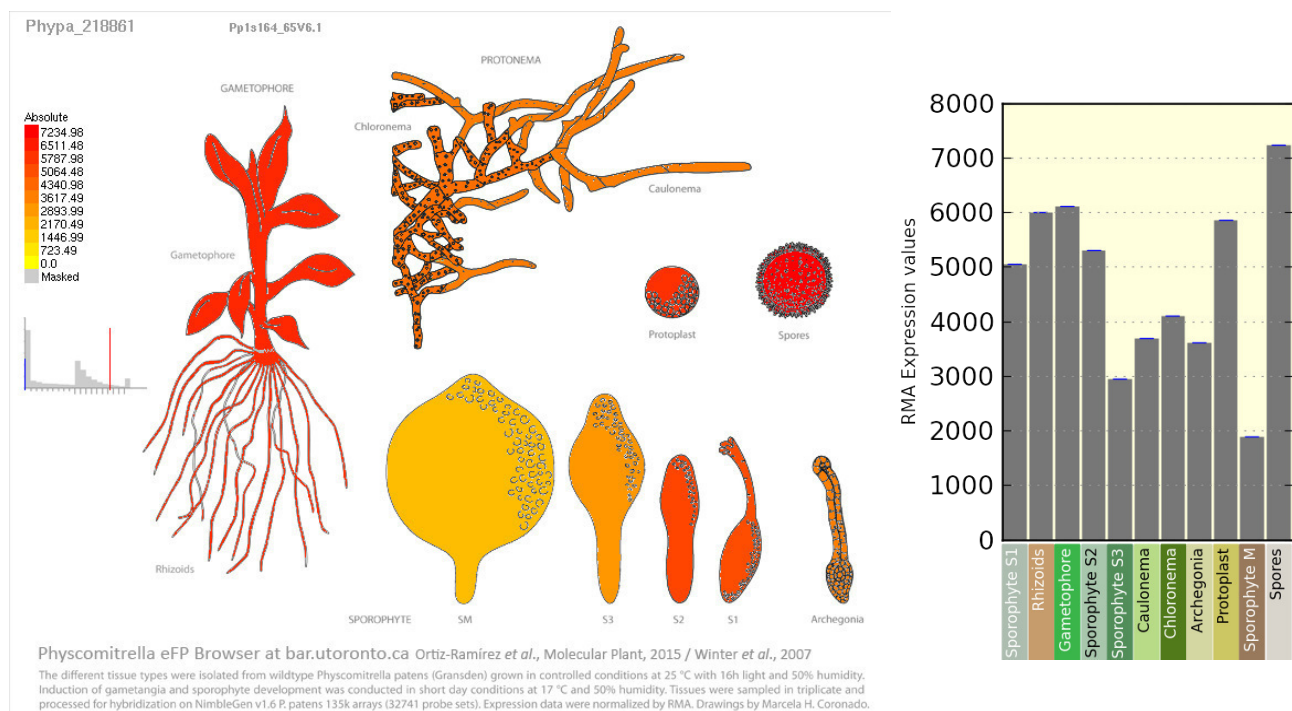
CDS

ATGTCGACCACCAAGTTGGCATACTCGTCAGGGAGTTCTGTGAAGTCGAAGCATAGTGTACGGGTTGCGCAAACCTACAGCA
GATGCCAAGCTGCAGGCAGTGTATGAAGAATCCGGAGATTCCGGGAGACTCATTTGATTATTTCCAAATCAGTTCATGCGTCC
AAATCCACTGGCGAGAATGTCCCTGCCCTAGCAGTCACCGCGTACCTTCAGCGCATGCAAAGAGGGGGTTTGGTGCAGACA
TTCGGGTGTATGCTATGTGTGGACGAGAGTAGTTTTAGGGTTATTGCTTACAGCGAGAATGCGCCAGAGATGCTTGACCTG
ATGCCACAAGCGGTGCCCAGTGTGGGTGAGCAGGAAGTTCTGGGCATTGGAACCGATGCAAGAACTTTGTTCACCCCTTCC
AGTGC GGCCGCCCTGGAGAAATGTGCCGGAGCGGTGGATGTGACCATGCTGAACCCATATCTCAGTGCAGTGTGCAAGCTCG
GGGAAGCCGTTCTATGCGATTCTGCACCGTATTGACGTAGGACTGGTAATTGATTTTGAACCAGTGCGCCCGAATGATGCC
GTTGTGTCTCCGCGAGGGGCTTTGCAGTGCATAAAGTTGGCTGCAAAAGCGATATCTCGGCTGCAGGCACCTTCCCTGGCGGA
GACATTGGCCCTCCTTTGTGATACAGTTGTAGAAGAGGTACGCCAGCTTTCGGGTACGATCGTGTGATGGCATAACAAATTC
CACGAAGACGAACATGGTGAGGTCTTGGCGGAGATTCCAAGATCAGATTTAGAACCTTACTTAGGTCTACATTACCCAGCA
ACAGATATCCACAGGCGTCAAGATTCCCTGTTTATGAAGAACAGGGTGCGAATGATAGGTGATTGCTATGCTCCTCCTGTT
AAAGTGGTTTCAGGACAAGGATTGAGGCAGCCTATTAGTCTGGCCGGGTCTACTTTACGGGCCCCCATGGCTGCCATGCC
CAATACATGGGCAACATGAACCTCATCGCTTCGTTGGTGGTATGGCAGTTATCGTGAATGATCCGGATGAGGATCCTAATTCA
CGTGGGGGCCAGCAGAGAGGGCGCAAGCTCTGGGGATTGGTGGTTTGTACCACACGTCTCCGAGGACCGTCTCCTTTCCCT
TTGAGATCGGCCTGTGAGTTCCCTGATGCAGGTGTTCCGGTCTGCAGCTGAACATGGAAGTTGAACTTGCAGCTCAGCTAAGA
GAAAAACATATTTTGAGAACACAAACCCCTTCTCTGTGACATGTTATTGCGGGATGCACCCATCGGAATTGTTTTCTCAGTCA
CCCAATATCATGGACTTGGTTAAATGCGACGGTGCAGCACCTTACTATGGGAAAAGGTTTTTGGCTTTTGGGAATCACACCT
AACGAGGTCCAGATTAAGGAAATCGCGGACTGGCTCCTAGAACATCATCAAGATTCGACCGGTTTGTAGTACAGACAGCCTG
GCCGATGCTGGTTACCCCTGGCGCAGCGCAACTTGGTGATGCTGTGTGTGGAATGGCTGCGGCAAAGATCACTCCAAGGGAC
TTTCTTTTCTGGTTTCAGGTACACACCCGCCAAGGAGATTAAGTGGGGTGGTGCCAAGCACGATCCTGATGAAAAGGATGAT
GGGAGGAAAATGCATCCCCGCTCCTCGTTCAAGGCCTTTCTAGAAGTTGTGAAGAGAAGAAGTTTGCCATGGGAGGACATA
GAAATGGACGCAATTCATTCTCTTCAACTCATTTTGTAGAGGTTTCATTCCAGGATATAGACGACAGTGATACCAAACTATG
ATACACGCCCCGACTCAACGACTTAAAGCTCCAGGGCATGGATGAACTCAGTACAGTTGCTAATGAAATGGTTAGATTGATA
GAGACAGCGACTGCACCAATTCTCGCTGTGATTTCGAGTGGATTTCATCAATGGTTGGAATGCCAAAGTAGCTGAACTGACT
GGACTTCCAGTTGGAGAAGCCATGGGTGCGTTCGCTGGTTAAAGATTAAATTTTAGAGGAATCAATTGATGTTGTTTCAGCGA
CTTCTCTACCTTGCATTACAAGGTGAAGAAGAACAAAATATTGAGATTTCAGTTGAAGACCTTTGGGCCACAAAAGAGAAG
GGCGCAGTGATTTTGATAGTGAATGCGTGCTCCAGCAGGGATGTACAAGACAATGTCGTTGGAGTTTGTTTTGTGGGGCAA
GATGTGACAGGTCAAAAACAAGTTTTGGATAAATTTACTCGGATACAAGGCGACTACAAAGCAATAGTTCAGAACCCAAAC
CCTTTGATTCCCTCCTATATTTGGCACTGATGAATATGGATATTGCTCTGAGTGGAAATCCTTCAATGGAGAAGCTGACTGGA
TGGAAGAGAGAAGAGGTGCTTGGGAAACTGCTAGTGGGTGAAATTTTTTGGAAATGCAACTTATGTGTTGCCGACTGAAAGGT
CAAGATGCAATGACGAAATTTATGATTGCATTAAATAGTGCAATGGATGGTCAAGATACAGATCGGTTTCCCTTTTCCCTTC
TTTGATCGACAAGGGAATACGTAGATGCCCTACTCACAGTCAATAAAAGAACGGATGCAGAGGGAAGCATCACTGGCGTA
TTCTGCTTTTTTGCACACAACCAGTGTGGAATTATTGCAAGCATTGACTGTCCAACGTGCGACGGAGAAAAGTAGCCTTCGCA
AAACTCAAGGAGTTGGCTTACATTGACAGGAGATCAAGAATCCTTTGTATGGGATTATGTTTACACGTAATTTAATGGAA
GATACGGACTTATCTGAGGACCAAAGGCAGTTTGTGGAGACTAGTGCTGTGTGTGAACGTCAATTGCGCAAAGTATTGGAT
GATATGGATCTTGAGAGTATTGAGGACGGGTACTTAGAGCTGGATACAAATGAATTTGTGATGGGAACAGTGATGGATGCC
GTTGTAAGTCAAGGAATGATCACATCAAGAGAAAAAGGTCTGCAATTGATACGGGAGACTCCCAGGGAGATAAAGAACATG
TGTTTATTTGGGGACCAAGTCCGTTTACAACAAGTGCTCGCGGACTTTTTTGTGTAATGCAGTGAGATTACCCCCATCCTCT
GAAGGCTGGGTGCGGATCAAGGTGGTCCCAACGAAGAAGCGCCTGGGTGGAGGCATTTCATGTCATGCATCTGGAATTCAGG
GTTACACATTACAGGAATGGGACTTCCCTGAGGAGCTTGTGCATGAGATGTTTGATCGAGGACGAGGCATGACTCAAGAAGGC
CTGGGGCTGAGTATGTGTGCTAAACTTGTAAAGCTAATGAATGGTAATGTTCAATATATTAGAGAAACAGGTAAGAGCTAC
TTTTTAGTTGAAGTGGAGCTTCCCTTTGGCACAAACGAGATGATGCAGGCAGTGTGAGATAG

phy4 Expressionsdaten

eFP

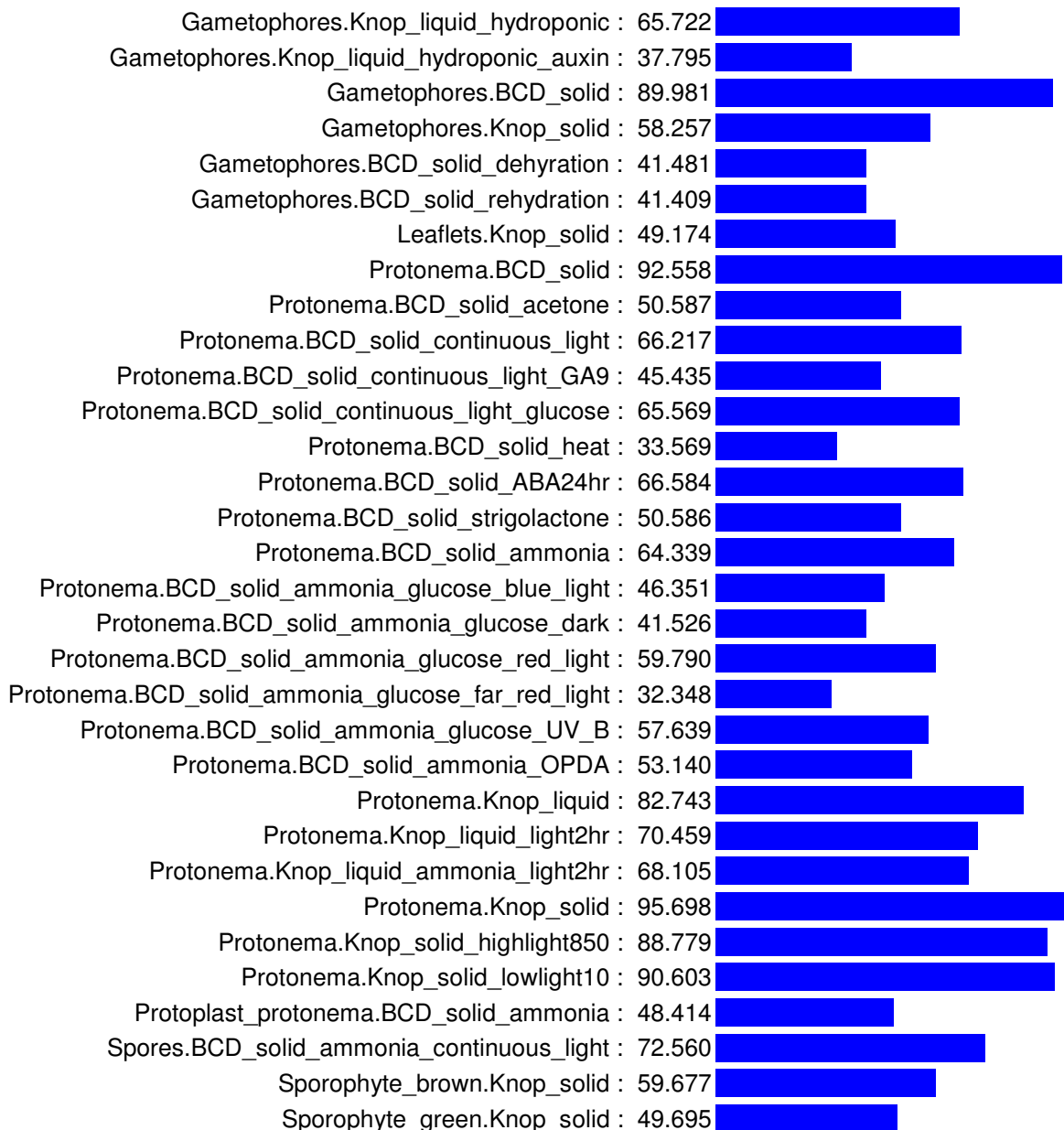
Expressionsdaten für verschiedene Entwicklungsstadien wurden vom *electronic Fluorescent Pictograph (eFP) browser* (http://bar.utoronto.ca/efp_physcomitrella/cgi-bin/efpWeb.cgi) von dem *Bio-analytic Resource for Plant Biology (BAR)-Server* heruntergeladen (Ortiz-Ramírez et al. (2016)). Der eFP-Browser stellt *Microarray*-Daten für die meisten Entwicklungsstadien des *Physcomitrella* Lebenszyklus zur Verfügung, inklusive Protonemata (Choro- und D-gewachsene Caulonemata), Rhizoide, Gametophoren, Archegonien, vier Stadien der Sporophytenentwicklung (basierend auf morphologischen Charakteristika, wie Größe, Form und Grad der Reifung: Sporophyt S1 5-6, S2 9-11, S3 18-20, S4 28-33 Tage nach Befruchtung) und Sporen. Rohdaten wurden mittels *Robust Multi-Array Average (RMA)* normalisiert und der Mittelwert aus Triplikaten berechnet.



JGI *Phytozome 11 Gene Atlas* Gen-Level Expression

Expressionsdaten für unterschiedliche Kulturbedingungen und Entwicklungsstadien wurden vom *Phytozome/JGI-Server* (<https://phytozome.jgi.doe.gov/jbrowse/index.html?data=genomes%2FPpatens&loc>) heruntergeladen. Dort werden RNASeq-Daten mit dem *Physcomitrella patens* Referenzgenom zusammen dargestellt. Der Datensatz umfasst Experimente mit Gametophoren auf unterschiedlichen Medien (De- / Rehydrierung, Behandlung mit NAA, abgetrennte Blättchen *etc.*), Protonemata auf unterschiedlichen Medien und verschiedenen (Licht-) Bedingungen, Protonema-Protoplasten, Sporen und grüne und braune (=gereifte) Sporophyten. Normalisierte Daten werden als FPKM- (*Fragments per Kilobase (of Exon) per Million Reads*) Werte angegeben.

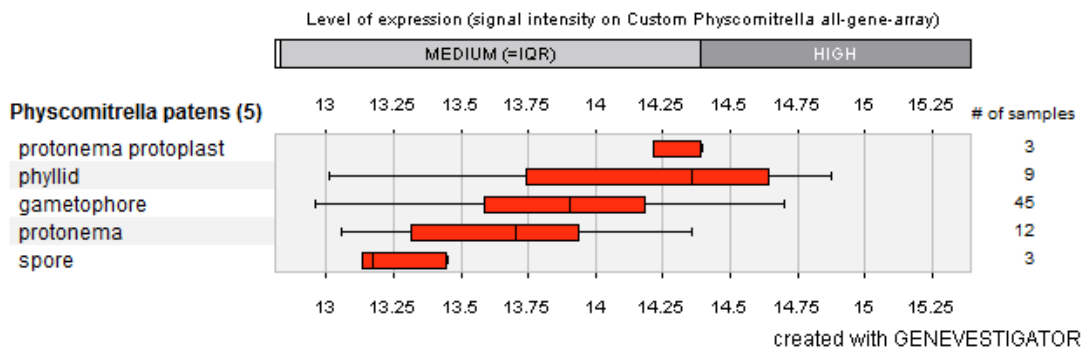
FPKM Coefficient of variance: 0.296 (across samples below)



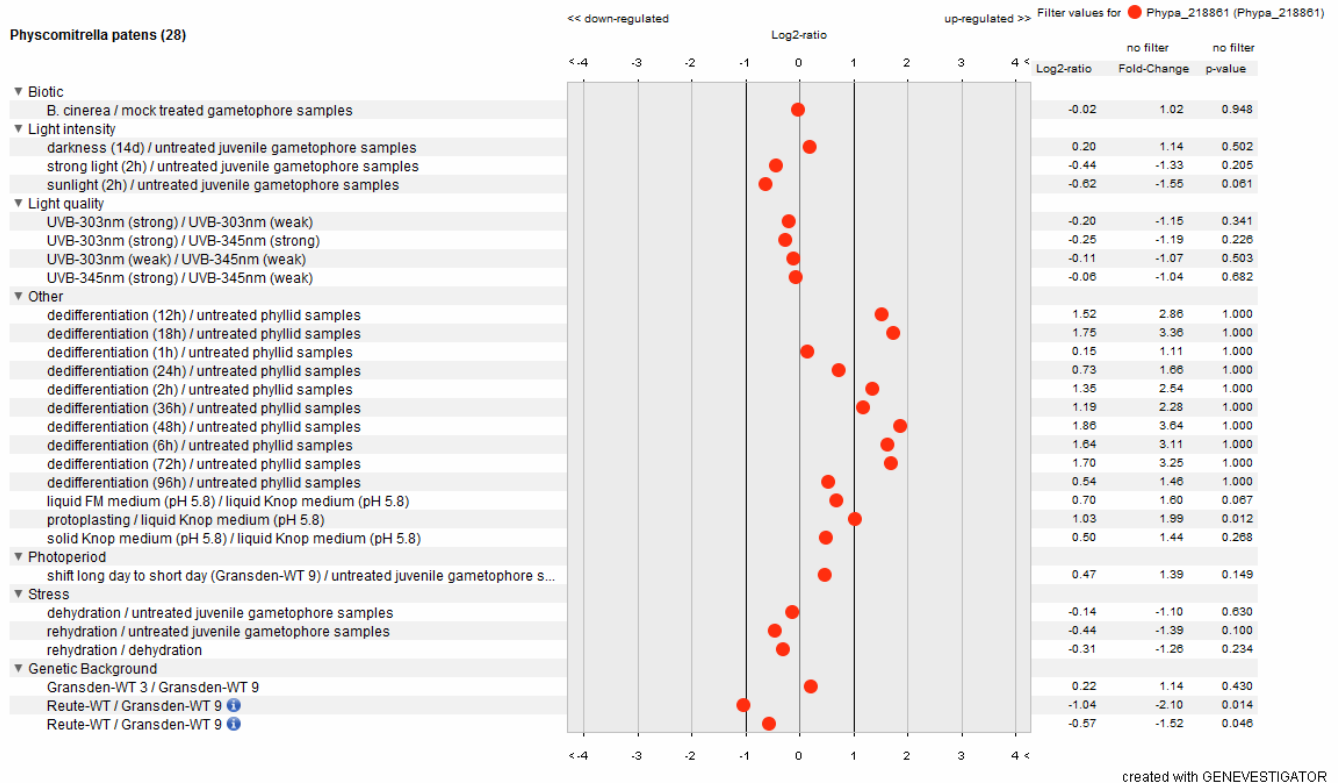
Genevestigator (Phypa_218861)

Genevestigator (www.genevestigator.com) stellt *Microarray*-Expressionsdaten von 74 Proben aus 6 Studien bereit: für Entwicklungsstadien bzw. anatomische Strukturen (Protonema (-Protoplasten), Gametophoren, Phyllide/Blättchen und Sporen *etc.*) und unterschiedliche Bedingungen (biotischer/abiotischer Stress, Lichtintensitäten / -qualitäten, Photoperiode, Dedifferenzierung und genetische Hintergründe *etc.*). Letztere sogenannte Perturbations-Daten werden als relative Werte angegeben, die sich aus dem Vergleich einer Bedingung mit einer geeigneten Kontrollbedingung ableiten. Die Daten sind in der log2-Skala angegeben.

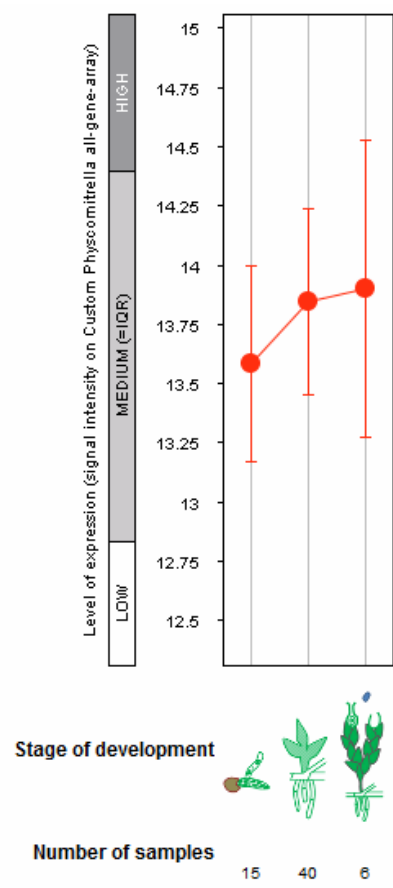
Anatomie



Bedingungen/Perturbationen



Entwicklung



Danksagung

Zuerst möchte ich Jon Hughes dafür danken, dass er mir die Chance gegeben hat, an einem auch nach einigen Jahren immer noch faszinierenden Projekt zu arbeiten. Ich konnte mich sowohl wissenschaftlich als auch persönlich entfalten und weiterentwickeln – ob ich wollte oder nicht ;).

Meiner unerschütterlichen technischen Assistentin Tanja Gans danke ich 1000fach für ihre Unterstützung und Hilfe in allen mentalen und wissenschaftlichen Belangen. Sie war und ist der Fels in der Moosprojektbrandung ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre! Ich bin unendlich dankbar dafür!

Kathi Mailliet bin ich sehr dankbar dafür, dass sie in mühevoller und ausdauernder Arbeit das Moosprojekt in seiner jetzigen Form etabliert und gestaltet und somit einen soliden Grundstein auch für meine Arbeit gelegt hat. Ich bewundere ihren Pragmatismus und auch den Mut sich mit zunächst wenig vielversprechenden Experimenten auseinander zu setzen, die sich letztlich als ein Durchbruch in der Erforschung des cytoplasmatischen Phytochrom-*Signallings* erwiesen haben.

Mathias Zeidler danke ich von Herzen für viele Dinge: dafür, dass er immer eine sichere Anlaufstelle für Probleme aller Art ist und (fast) immer schnelle und pragmatische Lösungsvorschläge parat hat (sowohl in wissenschaftlichen, als auch in IT-Belangen), dafür dass man immer etwas zu lachen hat (also für eine gesunde Portion Sarkasmus) und insbesondere für Rat und vor Allem Tat bei der Etablierung des Co-IP-Protokolls, ohne das die PNAS-Publikation nicht möglich gewesen wäre. Außerdem danke ich im Voraus schon einmal für die Geduld bei der Begutachtung dieser Arbeit ;).

Tina Lang und Melanie Bingel danke ich für die exzellente technische Assistenz (z.B. in Form unzähliger Klonierungsarbeiten, Maxi-Präparationen und PCB-Extraktionen). Ohne die beiden Assistentinnen wäre das Institut kein annähernd so schöner, unterhaltsamer, sauberer und organisierter Arbeitsplatz!

Pierre-François Perroud und Stefan Rensing danke ich für hilfreiche Tipps und Beratung insbesondere bezüglich der Handhabung von Expressionsdaten.

Ich möchte mich bei allen Menschen bedanken, die mir diverse Materialien und/oder etablierte Protokolle *etc.* zur Verfügung gestellt und somit die Arbeit immens erleichtert haben. Dazu gehören Hans Sommer (für die vortransformierte *Physcomitrella* Oligo dT cDNA Bibliothek), Peter Uetz und Jürgen Haas (für die *Gateway Y2H*-Vektoren), Jutta Rösler-Dalton (für den pBAC-Vektor *etc.*), Natalie Kempel und Fabian Stahl (für ihre Mitarbeit im Projekt im Zuge ihrer BSc-Arbeit), Rabea Meyberg (für einen Teil der Lokalisationsdaten) und Nebion (für die Gratis-Genevestigator-Daten). Anne Holz und Adriaan Dorresteyn danke ich dafür, dass ich das (nahezu immer einwandfrei funktionierende) KLSM für mehrere hundert Stunden (kein Witz) belegen und ich somit fast ein Mitglied der zoologischen Arbeitsgruppe sein durfte.

Danksagung

Meinen Eltern und Schwiegereltern möchte ich einfach nur dafür danken, dass sie tolle Menschen und immer da sind, wenn man sie braucht z.B. um als Ausgleich für die sehr anstrengende Arbeit eine schöne Zeit miteinander zu verbringen.

Andreas Ermert & Yvonne Mandt bin ich unendlich dankbar dafür, dass sie mir durch sehr schwere Phasen der Arbeit geholfen und mir immer den Rücken gestärkt und/oder freigehalten haben. Ohne diese beiden Menschen hätte ich vermutlich nicht durchgehalten und die Arbeit höchstwahrscheinlich nicht vollendet.

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.