



Technische Universität München

Lehrstuhl für Systembiologie der Pflanzen

**Die Rolle von SH3 DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 2 im
intrazellulären Transportweg in *Arabidopsis thaliana***

Marie-Kristin Nagel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Prof. Dr. Wolfgang Liebl
Prüfer der Dissertation:	1. Prof. Erika Isono, Ph.D. 2. Prof. Dr. Brigitte Poppenberger-Sieberer

Die Dissertation wurde am 13.03.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 23.05.2018 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Zusammenfassung	3
Summary	4
Liste der Abkürzungen	5
1 Einleitung	8
1.1 Physiologische Prozesse werden durch intrazellulären Membrantransport reguliert	8
1.2 Endosomaler Transport von Proteinen wird durch ubiquitinylierende und deubiquitinylierende Enzyme reguliert	9
1.3 Viele Signalwege in Pflanzen werden durch Ubiquitin-abhängige Endozytose reguliert	13
1.4 Integrale Plasmamembranproteine werden hauptsächlich Clathrin-abhängig endozytiert	15
1.5 Die endosomal sorting complexes required for transport (ESCRTs) koordinieren den endosomalen Transport	18
1.6 Erkennung und Bindung von Ubiquitin spielt eine essentielle Rolle im endosomalen Membrantransport in Pflanzen	22
1.7 ESCRTs und andere endosomale Transport-Proteine haben wichtige physiologische Funktionen in Arabidopsis	24
1.8 Zielsetzung dieser Arbeit	25
2 Ergebnisse	26
2.1 AMSH3 interagiert mit SH3 DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 2 (SH3P2) und ESCRT-I	26
2.1.1 AMSH3 interagiert mit SH3P2 im Hefe-2-Hybrid-Test und direkt im <i>in vitro</i> Affinitätstest	26
2.1.2 Die drei homologen SH3 DOMAIN-CONTAINING PROTEINS (SH3Ps) interagieren unterschiedlich mit den drei AMSH-Proteine aus Arabidopsis	28
2.1.3 SH3P2 lokalisiert mit AMSH3 in SKD1(EQ)-induzierten Kompartimenten	30
2.1.4 AMSH3 interagiert mit ESCRT-I	33
2.2 SH3P2 fungiert in der Clathrin-vermittelten Endozytose	35
2.2.1 SH3P2 kolokalisiert <i>in planta</i> mit Clathrin	35
2.2.2 SH3P2 interagiert mit CLATHRIN HEAVY CHAIN (CHC) <i>in vivo</i> und kofraktioniert mit CHC in der CCV-Fraktion	38
2.2.3 Die BAR-Domäne von SH3P2 ist essenziell für die <i>in vivo</i> Lokalisation mit Membranen	39
2.3 SH3P2 besitzt die Fähigkeit als Ubiquitin-Adapterprotein im endosomalen Transport zu agieren	40

2.3.1	SH3P2 bindet bevorzugt K63-gekoppelte Ubiquitinketten	40
2.3.2	SH3P2 zeigt Binde-Affinität zu anderen Proteinen, die mit ESCRT-Komponenten assoziiert sind	42
2.3.3	SH3P2 interagiert mit ESCRT-I	46
2.3.4	VPS23-RFP kolokalisiert mit Clathrin-positiven Strukturen	49
2.3.5	<i>sh3ps</i> Mutanten zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp	50
2.3.6	<i>vps23.1-3vps23.2-1</i> zeigt Entwicklungsdefekte und akkumuliert ubiquitinylierte Proteine	55
2.3.7	<i>SH3P2</i> zeigt genetische Interaktion mit <i>VPS23.1</i>	57
2.4	Funktionsmodel	59
2.5	Schlussfolgerung	61
3	Diskussion	62
3.1	SH3P2 könnte interagierende Proteine zu Membranen rekrutieren	62
3.2	SH3P2 ist an der Bildung der Zellplatte beteiligt	63
3.3	SH3P2 kann im autophagosomalen Transport eine Rolle spielen	64
3.4	SH3P2 könnte bei der Membrankrümmung oder -abschnürung während der CME eine Funktion ausüben	65
3.5	Steuerung von Clathrin-unabhängiger Endozytose	68
4	Material und Methoden	70
4.1	Materialien	70
4.1.1	Pflanzenlinien	70
4.1.2	Bakterien und Hefestämme	70
4.2	Methoden	71
4.2.1	Pflanzenanzucht	71
4.2.2	Pflanzentransformation	72
4.2.3	Selektion der transgenen Pflanzen	73
4.2.4	PEG vermittelte Transformation von Wurzelzellprotoplasten	73
4.2.5	Molekularbiologische Methoden	74
4.2.6	Biochemische Methoden	79
4.2.7	Zellbiologische Methoden	84
	Literaturverzeichnis	87
	Danksagung	98
	Appendix	100
	Lebenslauf	123
	Publikationsliste	124

Zusammenfassung

Die Abundanz von Rezeptoren und Transportern in der Plasmamembran wird sowohl auf transkriptioneller und translationaler, wie auch auf posttranslationaler Ebene reguliert, so dass die Pflanze sich schnell an äußere Bedingungen anpassen kann. Die Clathrin-vermittelte Endozytose (CME) von Transmembranproteinen sowie deren anschließender Ubiquitin-abhängiger Transport in Endosomen zur Vakuole durch die hochkonservierte endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT)-Maschinerie, spielen dabei essentielle regulatorische Rollen. Im Vergleich zu anderen Organismen sind in Pflanzen nicht alle ESCRT-Komponenten konserviert. Stattdessen besitzen Pflanzen andere Proteine, welche die Funktionen der fehlenden Komponenten übernehmen.

In dieser Arbeit wurde SH3 DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 2 (SH3P2) als ein neues Ubiquitin-Adapterprotein identifiziert, das im intrazellulären Transport die Funktion der fehlenden ESCRT-0 Komponenten übernehmen kann. Es wurde gezeigt, dass SH3P2 an der Plasmamembran und auf Clathrin-markierten Strukturen lokalisiert und mit Clathrin-umhüllten Vesikeln (CCVs) assoziiert ist. SH3P2 bindet Ubiquitinketten und interagiert mit der Ubiquitin-bindenden ESCRT-I-Untereinheit VACUOLAR PROTEIN SORTING 23 (VPS23), was darauf hindeutet, dass SH3P2 ubiquitinylierte Proteine an der Plasmamembran bindet und diese der ESCRT-Maschinerie übergibt. Die Mutanten der drei homologen *SH3Ps* in Arabidopsis zeigen keinen offensichtlich veränderten Phänotyp, was für redundante Funktion untereinander oder mit anderen Proteinen sprechen kann. Die Runterregulation von *SH3P2* führte jedoch zu einer Verstärkung des Phänotyps von *vps23.1vps23.2* Doppelmutanten, was auf eine Funktion der drei Proteine im selben endosomalen Transportweg hindeutet.

SH3-Domänen sind in Pflanzen stark unterrepräsentiert und die Funktionen der wenigen Proteine mit SH3-Domänen noch nicht verstanden. SH3P2 lokalisierte auch auf spätendosomalen Strukturen und interagierte mit anderen Proteinen, die im späteren intrazellulären Transport involviert sind. Daher werden weitere Funktionen von SH3P2 vermutet, die in der Zukunft weiter untersucht werden sollten.

Summary

The abundance of receptors and transporters at the plasma membrane is regulated at the transcriptional, translational and post-translational levels so that the plant can adapt quickly to changing environmental conditions. Clathrin-mediated endocytosis (CME) of transmembrane proteins and their ubiquitin-dependent transport to the vacuole by the highly conserved endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT)-machinery, are essential for the regulation of this process. In contrast to other organism, not all ESCRT components are conserved in plants and it was shown that other proteins can take over the function of the missing components.

In this thesis, the SH3 DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 2 (SH3P2) was identified as a new ubiquitin adaptor protein, that incurs the function of the missing ESCRT-0 in intracellular trafficking. It was shown that SH3P2 localizes to the plasma membrane and on clathrin-positive structures. Furthermore, SH3P2 was shown to associate with clathrin-coated vesicles (CCVs). SH3P2 binds ubiquitin and interacts with the ubiquitin binding subunit ESCRT-I, VACUOLAR PROTEIN SORTING 23 (VPS23), which leads to the hypothesis that it binds ubiquitylated proteins at the plasma membrane and transfers them to the ESCRT-machinery. Mutants of the three *SH3P* homologs do not show obvious phenotypes, suggesting redundant functions among each other or further with other factors. The downregulation of *SH3P2* leads to an enhancement of the *vps23.1vps23.2* double mutant phenotype, indicating that these proteins function in the same pathway.

SH3 domains are underrepresented in plants and the function of the identified SH3 domain containing proteins is not yet well understood. SH3P2 was localized also on late endosomal structures and interacted with other proteins that are involved in the late stages of endocytic degradation. Possible other functions of SH3P2 during intracellular trafficking should be investigated in future studies.

Liste der Abkürzungen

3AT	3-Amino-1,2,4-Triazol
ABA	abscisic acid (Abscisinsäure)
ALIX	ALG-2-INTERACTING PROTEIN X
AMSH	ASSOCIATED MOLECULE WITH THE SH3 DOMAIN OF STAM
AP-2	ADAPTOR PROTEIN COMPLEX 2
ARA	ARABIDOPSIS RAB GTPase
ATG	AUTOPHAGY-RELATED GENE
ATP	Adenosintriphosphat
BAK1	BRI1-ASSOCIATED KINASE 1
BAR	BIN-AMPHIPHYSIN-RVS
BFA	Brefeldin A
BOR1	HIGH BORON REQUIERING 1
Bro1p	Bck1p-like resistance to osmotic shock 1
BRI1	BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1
CME	clathrin mediated endocytosis (Clathrin-vermittelte Endozytose)
CCV	clathrin coated vesicle (Clathrin-umhüllter Vesikel)
CDC2	CELL DIVISION CONTROL PROTEIN 2
CERK1	CHITIN ELICITOR RECEPTOR KINASE 1
CHC	CLATHRIN HEAVY CHAIN
CHMP	CHARGED MULTIVESICULAR BODY PROTEIN
CLC	CLATHRIN LIGHT CHAIN
Col-0	Columbia-0
DRP	DYNAMIN RELATED PROTEINS
DUB	deubiquitylating enzyme (Deubiquitinylierendes Enzym)
EE	early endosome (frühes Endosom)
ESCRT	endosomal sorting complex required for transport
FLS2	FLAGELLIN SENSING 2
FYVE1	Fab1, YOTB, Vac1, EEA1 1
GAD	GAL4 activation domain
GBD	GAL4 DNA-binding domain
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GM	germination medium
GTPase	Guanosintriphosphat-Hydrolase
GST	glutathion-S-transferase
HECT-E3	HOMOLOGOUS TO THE E6-AP CARBOXYL TERMINUS-E3

HRS	HEPATOCYTE GROWTH FACTOR-REGULATED TYROSINE KINASE SUBSTRATE
HSC70	HEAT SHOCK COGNATE 70
ILV	intraluminal vesicle (Intraluminale Vesikel)
IP	Immunpräzipitation
IRT1	IRON-REGULATED TRANSPORTER 1
K48/K63	Lysin 48/63
kDa	Kilodaltons
MBP	Maltose-bindendes Protein
MIM	MIT interacting motif (MIT-interagierendes Motif)
Min	Minuten
MINDY	MOTIF INTERACTING WITH UBIQUITIN (MIU)-CONTAINING NOVEL DUB
MIT	microtubule-interacting and trafficking
mKO	monomeric Kusabira Orange
MPN	Mpr1/Pad1 N-terminal
MVB	multivesicular body (Bläschenkörper)
MS	Murashige & Skoogs Medium
NBR1	NEIGHBOR OF BRCA1 GENE 1
ORF	open reading frame
OTU	OVARIAN TUMOR PROTEASES
PI3PK	PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-PHOSPHATE-KINASE
PIN	PIN-FORMED
PM	Plasmamembran
PUB	PLANT U-BOX
PYR	PYRABACTIN RESISTANCE
RAB	RAS-RELATED PROTEINS IN BRAIN
RFP	Rot-fluoreszierendes Protein
RGLG	RING DOMAIN LIGASE
SH3	Src-homology 3
SKD1	SUPPRESSOR OF K ⁺ TRANSPORT GROWTH DEFECT 1
SH3P	SH3 DOMAIN-CONTAINING PROTEINS
SNF7	SUGAR NON-FERMENTING 7
STAM	STAM SIGNAL TRANSDUCING ADAPTOR MOL
SYP	SYNTAXIN OF PLANTS
TGN	<i>trans</i> -Golgi Netzwerk
TOL	TOM1-LIKE
TOM	TARGET OF MYB 1
UB	Ubiquitin

UBD	Ubiquitin binding domain (Ubiquitin-Binde-Domäne)
UBP	UBIQUITIN-BINDING PROTEINS
UBQ10	UBQUITIN 10
UCH	UBIQUITIN C-TERMINAL HYDROLASE
VPS	VACUOLAR PROTEIN SORTING
WM	Wortmannin
WT	Wildtyp
Y2H	yeast two-hybrid (Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse)
YFP	yellow fluorescence protein (Gelb-fluoreszierendes Protein)

1 Einleitung

Pflanzen sind ständig Umwelteinflüssen und Gefahren in ihrer Umgebung ausgesetzt und müssen sich als sessile Lebewesen den veränderten Bedingungen in der Umgebung anpassen. Die Oberflächen der Pflanzen stellen den Kontakt zu ihrer Umgebung her und über sie findet zum einen Stoffaustausch statt, zum anderen können Reize aus der Umwelt wahrgenommen werden. Über die oberirdischen Organe, vor allem die Blattoberflächen, werden unter anderem Gas und Wasser an die Umgebung abgegeben und Reize wie Lichtintensität und -qualität erkannt. Über die Wurzel nimmt die Pflanze Nährstoffe auf und erkennt die Verfügbarkeit von Mikro- und Makroelementen im Boden. Dabei finden in der Pflanzenzelle vielzählige Signaltransduktionen statt. Zellen nehmen ihre Umgebung über Rezeptoren und Kanäle in der Plasmamembran wahr. Die Menge und das Vorkommen dieser Proteine wird transkriptionell, translational und posttranslational reguliert. Proteinabbau spielt hierbei eine Schlüsselrolle in der Abschwächung der Signalwirkung. Obwohl der Abbauweg für Membranproteine schon länger bekannt ist, sind die molekularen Mechanismen in Pflanzen noch nicht genau aufgeklärt.

1.1 Physiologische Prozesse werden durch intrazellulären Membrantransport reguliert

Signalmoleküle können von Rezeptoren gebunden oder durch Transporter in der Membran in die Zellen aufgenommen werden. In der Zelle werden daraufhin verschiedene Signalkaskaden ausgelöst, die eine Antwort der Zelle, meist auf transkriptioneller Ebene, in Gang setzen. Eine präzise Regulation der Menge und Zusammensetzung von Rezeptoren und Transportern an der Plasmamembran ist unabdingbar für eine adäquate Reaktion der Zelle auf Veränderungen in ihrer Umgebung. Der Abbau dieser Membranproteine, der durch Endozytose initiiert wird, dient als schnelle, posttranslationale Regulierung, um die Signalwirkung abzuschwächen. Endozytose ist ein Prozess, der durch Einstülpung und Abschnüren der Plasmamembran die Aufnahme von Materialien in die Zelle hinein bewirkt. Die Membranproteine an der Plasmamembran werden in ihrem zytosolischen Teil durch Phosphorylierung oder Ubiquitylierung posttranslational modifiziert, was die Endozytose dieser Proteine verursacht. Die ubiquitylierten Membranproteine werden nach der Endozytose über Endosomen zur Vakuole transportiert und dort von den vakuolären Proteasen abgebaut. Manche Membranproteine können aber auch kontinuierlich zwischen Plasmamembran und frühen Endosomen recycelt werden (Übersichtsartikel von (Paez Valencia et al., 2016)) (Abbildung 1).

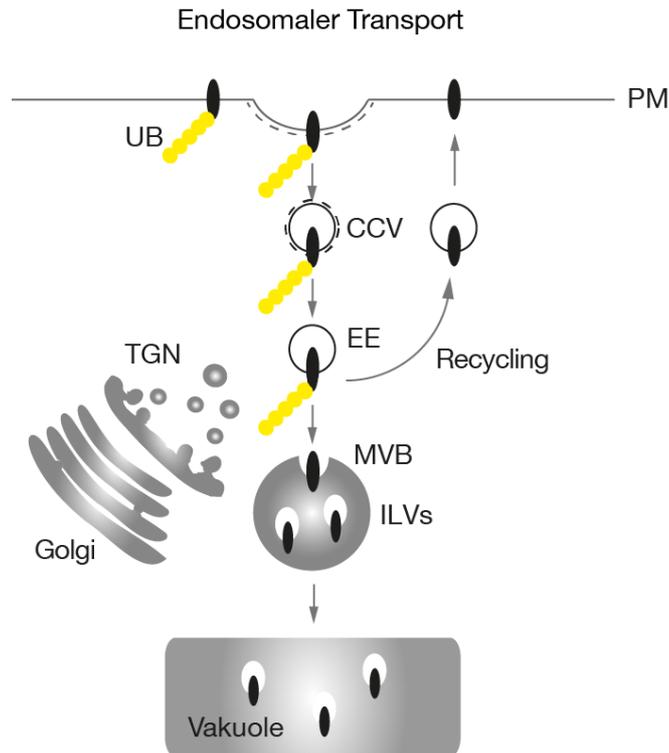


Abbildung 1: Endosomaler Transport von der Plasmamembran zur Vakuole

Schematische Darstellung des endosomalen Transports von der Plasmamembran (PM) zur Vakuole. Integrale Membranproteine werden durch Einstülpen der Plasmamembran internalisiert und in Vesikeln und Endosomen transportiert. Das Markieren eines Proteins mit Ubiquitinmolekülen (UB) oder -ketten ist eine posttranslationale Modifizierung, die als Signal dienen kann, für den Transport eines Membranproteins zur Vakuole. Die ubiquitinylierten Frachtproteine, auch Cargos genannt, werden in Clathrin umhüllten Vesikeln (CCVs) von der Plasmamembran abgeschnürt und über die frühen Endosomen (EE)/das *trans*-Golgi Netzwerk (TGN) zu den multivesicular bodies (MVBs) transportiert, wo sie wiederum in Vesikeln internalisiert werden, den intraluminal vesicles of MVBs (ILVs). Die MVBs verschmelzen mit der Vakuole, in welcher die Frachtproteine durch die vakuolären Proteasen abgebaut werden. Die Frachtproteine können aber auch zwischen Plasmamembran und EE recycelt werden.

1.2 Endosomaler Transport von Proteinen wird durch ubiquitinylierende und deubiquitinylierende Enzyme reguliert

Ubiquitinylierung von Proteinen kann unterschiedliche Funktionen haben. Zum einen markiert es Proteine für den proteolytischen Abbau, zum anderen kann es aber auch Proteininteraktionen, Lokalisation und Aktivität regulieren (Übersichtsartikel von (Komander and Rape, 2012)). Bei der Ubiquitin-abhängigen Regulation von Proteinen spielen Ubiquitinligasen eine entscheidende Rolle. Die Konjugation der Ubiquitinmoleküle findet am Glycin des Carboxylterminus (C-Terminus) statt, welches mit einem Lysin (K) des Zielproteins kovalent verknüpft wird. Um ein Ubiquitinmolekül an ein Substrat zu heften, ist eine Enzymkaskade aus mindestens drei Enzymen, E1, E2 und E3, notwendig, die damit beginnt das Ubiquitinmolekül zu aktivieren. E1 aktiviert das Ubiquitinmolekül (UB) über eine Adenosintriphosphat (ATP)-abhängige

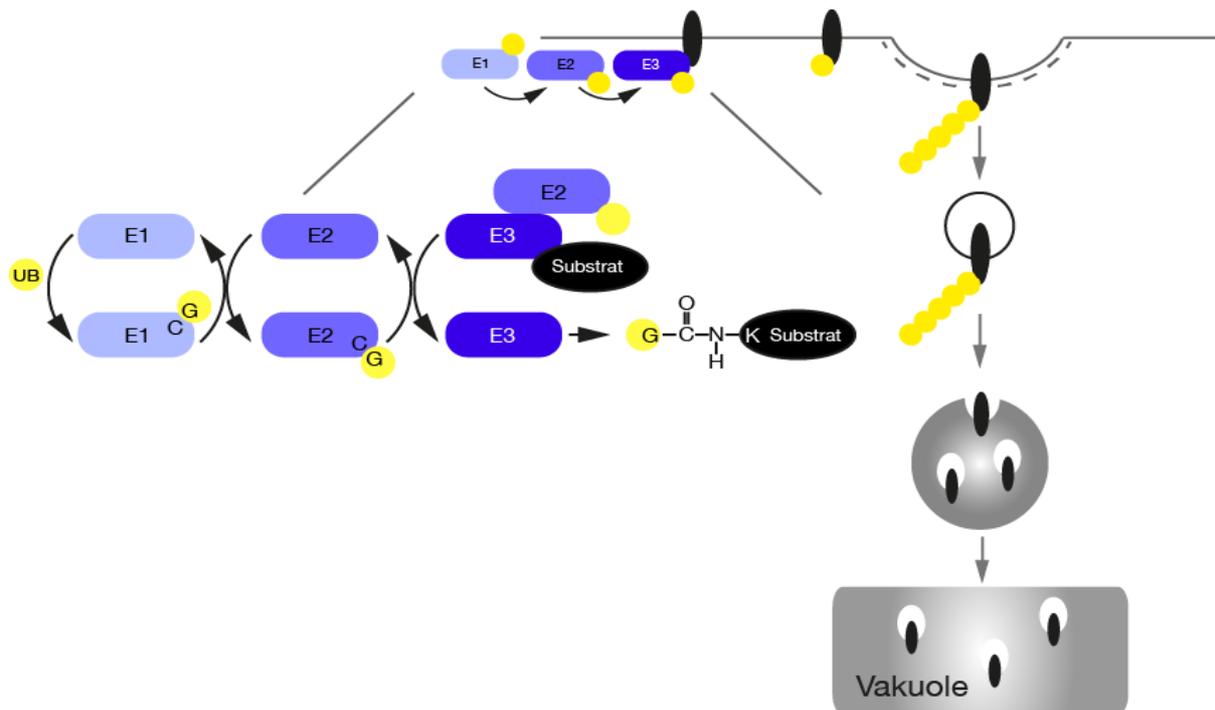


Abbildung 2: Eine Enzymkaskade aus drei Enzymen steuert die Ubiquitinylierung eines Substrats

Schematische Darstellung der E1, E2, E3-Enzymkaskade. E1 ist das aktivierende Enzym, durch welches das Ubiquitin (UB) über das Glycin (G) des C-Terminus, unter ATP-Verbrauch an das Cystein (C) des aktiven Zentrums von E1 gebunden wird. Das aktive Zentrum des konjugierenden Enzyms E2 übernimmt das Ubiquitinmolekül und die E3 Ligase verknüpft das Ubiquitinmolekül mit einem Lysin (K) des Zielsubstrats in einer kovalenten Isopeptidbindung. Nach Markieren eines Membranproteins kann dieses in Endosomen zum Abbau in die Vakuole transportiert werden.

Reaktion und bindet es an einem Cystein-Rest. Anschließend verknüpft es das UB mit dem Cystein-Rest im aktiven Zentrum von E2, dem konjugierenden Enzym. Zum Schluss wird das UB über eine Isopeptidbindung an ein Lysin im Zielprotein gebunden. Hierfür gibt es verschiedene Klassen von Ubiquitinligasen. Zwei Beispiele sind die REALLY INTERESTING NEW GENE (RING)-Typ-E3 Ubiquitinligasen und die HOMOLOGOUS TO THE E6-AP CARBOXYL TERMINUS (HECT)-E3 Ubiquitinligasen (Übersichtsartikel von (Zheng and Shabek, 2017)). Die RING-Finger E3-Ligasen binden das Zielprotein und E2 zur gleichen Zeit und transferieren das Ubiquitinmolekül von E2 auf das zu ubiquitinylierende Protein (Abbildung 2) (Übersichtsartikel von (Kerscher et al., 2006; Zheng and Shabek, 2017)). Die HECT-E3 Ubiquitinligase übernimmt erst das Ubiquitin von E2 und nachdem diese wieder dissoziiert ist, bindet HECT das Zielprotein und heftet das UB an das Zielprotein (Übersichtsartikel von (Kerscher et al., 2006; Zheng and Shabek, 2017)).

Ubiquitin kann in verschiedenen Formen an die Zielproteine gebunden werden. Es kann als Monoubiquitin oder als Polyubiquitinketten in verschiedenen Längen und Verknüpfungen vorkommen. Die Ubiquitinketten können über sieben interne Lysine

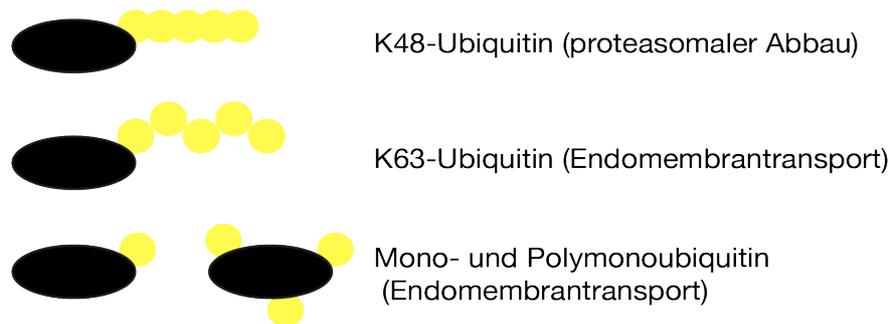


Abbildung 3: Verschiedene Arten der Ubiquitinverknüpfung sind Signale für unterschiedliche Abbauwege

Schematische Darstellung verschiedener Ubiquitin-Topologien und verschiedenen Arten der Ubiquitin-Verknüpfung mit dem Substrat. K48-gekoppelte Ubiquitinketten haben eine sehr kompakte Struktur, während K63-verknüpfte Ketten eine offene Tertiärstruktur bilden. Ubiquitin kann einzeln am Substrat vorliegen (Monoubiquitin), oder mehrere Ubiquitinmoleküle werden mit verschiedenen Lysin-Resten im Substrat verknüpft (Polymonoubiquitin).

(K6, K11, K27, K29, K33, K48 und K63) oder linear über das N-terminale Methionin (Met1) im Ubiquitinmolekül verknüpft werden (Übersichtsartikel von (Kerscher et al., 2006; Komander and Rape, 2012)). Je nachdem wie die Verknüpfung stattfindet, kann die Kette verschiedene Topologien annehmen (Abbildung 3). Die Struktur der Ubiquitinketten wiederum führt zu spezifischer Bindung an Proteine mit verschiedener Ubiquitin-Binde-Domänen (UBDs) und kann somit entweder den Signalweg oder den Abbauweg eines Proteins bestimmen (Übersichtsartikel von (Zheng and Shabek, 2017)). Unter anderem wurde gezeigt, dass Monoubiquitinylierungen und K63-Ubiquitinketten als Signale für den endosomalen Transport und den anschließenden vakuolären Abbau eines Proteins wirken können (Übersichtsartikel von (Zheng and Shabek, 2017)).

Nicht nur Ubiquitinligasen, sondern auch Ubiquitinhydrolasen, auch deubiquitinylierende Enzyme (DUBs) genannt, spielen eine entscheidende Rolle bei der posttranslationalen Regulierung physiologischer Prozesse (Übersichtsartikel von (Komander et al., 2009; Isono and Nagel, 2014)). Sie wirken gegen die ubiquitinylierenden Enzyme indem sie die Ubiquitinketten hydrolysieren oder Ubiquitin vom Zielprotein abspalten, so dass das ursprünglich ubiquitinylierte Protein nicht abgebaut wird. DUBs spalten entweder am distalen Ende einzelne Ubiquitinmoleküle nacheinander ab (Exo-Spaltung) oder die Ubiquitinkette wird innerhalb der Kette gespalten und im Ganzen abgetrennt (Endo-Spaltung) (Übersichtsartikel von (Mevissen and Komander, 2017)). Die DUBs zeigen hierbei eine Spezifität zu verschiedenen Ubiquitin-Verknüpfungen (Abbildung 4A) (Übersichtsartikel von (Mevissen and Komander, 2017)). Manche DUBs spalten Ubiquitinketten auch als ganze Ketten ab. Diese DUBs binden an die Zielproteine, um teilweise auch Ketten-



Abbildung 4: Ubiquitinketten können auf verschiedene Weise hydrolysiert werden

Schematische Darstellung der unterschiedlichen Hydrolysierungs-Aktivitäten der deubiquitylierenden Enzyme (DUBs). A) DUBs erkennen und binden die unterschiedlichen Ubiquitin-Ketten und spalten entweder am distalen Ende ein Ubiquitinmolekül nach dem anderen ab (Exo-Spaltung), oder sie hydrolysieren in der Kette eine kovalente Verknüpfung und spalten eine ganze Kette ab (Endo-Spaltung). B) Manche DUBs binden auch an die Zielproteine und spalten Ketten-unspezifisch die Ubiquitinmoleküle direkt vom Protein ab.

unspezifisch die Ubiquitinketten sowie Monoubiquitin abzuspalten (Abbildung 4B) (Faesen et al., 2011; Ritorto et al., 2014).

Die eukaryontischen DUBs lassen sich in sechs Gruppen einordnen. Die UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASES (UBPs) bilden die größte Gruppe der Cystein-Proteasen unter den DUBs (Übersichtsartikel von (Isono and Nagel, 2014)). Weitere Gruppen mit einem Cystein in der katalytischen Domäne sind die OVARIAN TUMOR PROTEASES (OTUs), die UBIQUITIN C-TERMINAL HYDROLASES (UCHs), die JOSEPHIN-Familie und die MOTIF INTERACTING WITH UBIQUITIN (MIU)-CONTAINING NOVEL DUB Familie (MINDYs). Eine Ausnahme sind die Zink-aktiven Proteasen, auch MPR1/PAD1 N-TERMINAL (MPN)⁺- oder JAB1/MPN/MOV34 (JAMM)-Metalloproteasen genannt. Proteasen der letzten Gruppe enthalten zwei Zinkmoleküle im aktiven Zentrum, die ein Wassermolekül aktivieren, um die Isopeptidbindung der Ubiquitinmoleküle zu hydrolysieren (Übersichtsartikel von (Komander et al., 2009; Mevissen and Komander, 2017)).

DUBs üben auch Funktionen bei der Modifizierung der Frachtproteine, den Cargos, im endosomalen Transport aus (Übersichtsartikel von (Komander et al., 2009)). Durch das Hydrolysieren der Ubiquitinketten kann der Transport eines Frachtproteins zur Vakuole gestoppt werden und das Protein wird zurück an die Plasmamembran transportiert (Abbildung 5) (Nakamura et al., 2006). Des Weiteren sorgen DUBs dafür, dass an den multivesicular bodies (MVBs; Bläschenkörper) die Ubiquitinmoleküle abgespalten werden bevor das Frachtprotein in die intraluminal vesicles (ILVs) der MVBs aufgenommen wird (Abbildung 5). So wird Ubiquitin vor der Proteolyse in der Vakuole bewahrt und der Ubiquitinspeicher (UB-Reservoir) wird aufrechterhalten (Swaminathan et al., 1999).

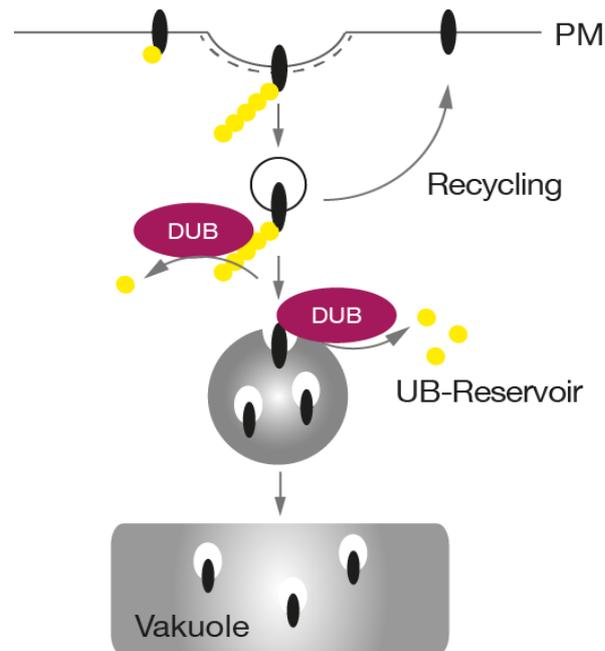


Abbildung 5: DUBs können regulierende Funktion im endosomalen Transport haben

Schematische Darstellung der Rolle von deubiquitylierenden Enzymen (DUBs) im endosomalen Transport. An den frühen Endosomen können DUBs die Ubiquitinketten hydrolysieren, was dazu führen kann, dass die Cargos ihr Signal für den Transport zur Vakuole bzw. für den Abbau verlieren und an die Plasmamembran recycelt werden. An den späten Endosomen hydrolysieren DUBs die Ubiquitinketten, damit die einzelnen Ubiquitinmoleküle nicht mit den Frachtproteinen in der Vakuole abgebaut werden, sondern dem Ubiquitinspeicher (UB-Reservoir) zur Verfügung stehen.

Auch in Pflanzen werden Rezeptoren und Transporter und die entsprechend zugehörigen Signalwege durch Ubiquitinylierung, Endozytose und Deubiquitinylierung gesteuert. Bislang sind in Pflanzen jedoch nur wenige E3 Ubiquitin-Ligasen bekannt, die Transmembranproteine ubiquitinylieren.

1.3 Viele Signalwege in Pflanzen werden durch Ubiquitin-abhängige Endozytose reguliert

Das Phytohormon Auxin wird für fast alle Aspekte der Pflanzenentwicklung benötigt. Für eine adäquate Verteilung von Auxin in den Zellen der einzelnen Organe wird der Auxin-Export aus der Zelle durch die PIN-FORMED-Proteine (PINs) kontrolliert. Die Häufigkeit und Verteilung der PINs an der Plasmamembran wird durch Ubiquitinylierung und Endozytose reguliert. Anwesenheit von Auxin hemmt die Endozytose eines dieser Transporter, PIN2, was zu einer Stabilisierung von PIN2 an der Plasmamembran und zu einem erhöhten Abfluss von Auxin aus der Zelle führt (Paciorek et al., 2005; Pan et al., 2009; Robert et al., 2010). PIN2 wird durch K63-Polyubiquitinketten markiert und Verlust der K63-Ubiquitinylierung führt zu Defiziten im

vakuolären PIN2–Abbau und beeinträchtigt die Auxin-Verteilung in den Zellen, was Auswirkungen auf den Wurzel-Gravitropismus hat (Leitner et al., 2012).

Die E3-Ligase für PIN2 ist bisher noch nicht identifiziert. Die RING-Finger E3 Ubiquitinligasen RING DOMAIN LIGASE 1 (RGLG1) und RGLG2, die K63-Ubiquitinketten bilden, werden als Kandidat gesehen. Die Doppelmutante *rglg1rglg2* zeigt reduzierte apikale Dominanz und Veränderungen in Form und Architektur der Blätter, was auf Defizite in der Auxin-Verteilung hindeutet und PIN2-Ubiquitylierung ist in der Doppelmutante *rglg1rglg2* reduziert (Yin et al., 2007; Leitner et al., 2012). Daher wird vermutet, dass RGLG1 und RGLG2 eine Rolle in der Regulierung von PINs und dem Auxintransport spielen könnten.

Der Hormonrezeptor BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 (BRI1) wird ebenfalls mit K63-Ubiquitinketten markiert und die Beeinträchtigung der Ubiquitylierung führt zu vermindertem vakuolären Abbau von BRI1 und somit zu einer Störung des Brassinosteroid-Signalwegs, was erhöhte Zellelongation hervorrufen kann (Martins et al., 2015). Neueste Studien zeigen, dass auch nicht-integrale Proteine wie der Abscisinsäure (ABA)-Rezeptoren PYRABACTIN RESISTANCE 1 (PYR1) und PYR1-LIKE (PYL4) dem vakuolären Abbau zugeführt werden können. PYR1 UND PYL4 werden von der membranverankerten RING-Finger E3 Ubiquitinligase RING FINGER OF SEED LONGEVITY 1 (RSL1) ubiquityliert und gemeinsam mit dieser als Komplex zur Vakuole transportiert (Bueso et al., 2014; Belda-Palazon et al., 2016).

Ubiquitin-abhängige Endozytose ist auch in der Pathogenabwehr wichtig. Der Abbau und das Recycling der Rezeptorkinase FLAGELLIN SENSING 2 (FLS2) spielt eine Rolle in der pflanzlichen Immunantwort auf Bakterienbefall (Chinchilla et al., 2007). FLS2 bildet nach Bindung von bakteriellem Flagellin, einen Komplex mit BRI1-ASSOCIATED KINASE 1 (BAK1), dessen Kinaseaktivität die Immunantwort auslöst. Nach Phosphorylierung wird das Heterodimer FLS2-BAK1 durch die beiden RING-Finger E3 Ubiquitinligasen PLANT U-BOX 12 (PUB12) und 13 ubiquityliert. FLS2 wird samt seines gebundenen Liganden endozytiert und in der Vakuole abgebaut (Chinchilla et al., 2007; Lu et al., 2011; Ben Khaled et al., 2015). Pathogene sind auch in der Lage, den endozytischen Abbauweg von Pathogenrezeptoren gegen die Pflanze einzusetzen, um unerkannt in die Zellen eindringen zu können. Das Bakterium *Pseudomonas syringae* schleust die E3-Ubiquitin-Ligase AvrPtoB, welche die Ubiquitylierung und den Abbau von FLS2 und der CHITIN ELICITOR RECEPTOR KINASE 1 (CERK1) hervorruft in die Wirtszelle ein und schwächt so die Immunantwort der Pflanze (Abramovitch et al., 2006; Gohre et al., 2008; Gimenez-Ibanez et al., 2009).

Neben der Aufnahme von Makronährstoffen, welche die Pflanze in hohen Mengen für ihr Wachstum benötigt, werden über die Wurzel auch verschiedenen Mikronährstoffe aufgenommen. Der Metallionentransporter IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1) transportiert neben Eisen- auch andere Metallionen in die Wurzelzellen. Die Aufnahme von Eisen reguliert die Menge an IRT1 auf transkriptioneller Ebene. Die Abundanz von IRT1 an der Plasmamembran wird aber auch durch Ubiquitin-abhängige Endozytose reguliert. Bei einer hohen Menge an toxischen Metallionen im Substrat wird IRT1 von der E3 Ubiquitinligase IRT1 DEGRADATION FACTOR E3 LIGASE (IDF) ubiquitinyliert, um die Aufnahme dieser Metallionen ins Innere der Pflanze zu reduzieren (Barberon et al. 2014, Shin et al. 2013). Auch der Transporter HIGH BORON REQUIRING 1 (BOR1), welcher Borsäure ins Innere der Zelle schleust, wird bei einem Überschuss des Nähstoffes in der Umgebung mono- oder diubiquitinyliert und schließlich abgebaut. Bei Borsäuremangel wird BOR1 stetig zwischen Endosomen und Plasmamembran recycelt (Takano et al., 2005; Kasai et al., 2011).

Im Gegensatz zu E3 Ubiquitinligasen, für die ca. 1500 potentielle Gene in Arabidopsis identifiziert wurden, gibt es nur ca. 50 DUBs (Kraft et al., 2005; Stone et al., 2005; Vierstra, 2012; Isono and Nagel, 2014). Während E3 Ubiquitinligasen spezifisch mit ihren Zielproteinen interagieren, binden DUBs an Ubiquitinketten, wodurch sie ein breiteres Spektrum an Proteinen haben, an deren Regulation sie beteiligt sind. In Pflanzen ist die Funktion der DUBs in der Endozytose noch wenig erforscht. Für eine Proteingruppe, die Metalloproteasen ASSOCIATED MOLECULE WITH THE SH3 DOMAIN OF STAM (AMSH), wurde gezeigt, dass sie in Arabidopsis Funktionen im endosomalen Transport haben (Isono et al., 2010; Katsiarimpa et al., 2011; Katsiarimpa et al., 2013; Katsiarimpa et al., 2014; Kalinowska et al., 2015). In Arabidopsis existieren drei AMSH-Homologe (AMSH1, AMSH2 und AMSH3). AMSH2 ist eine stark verkürzte Version, welche keine Proteininteraktionsmotive besitzt. AMSH1 und AMSH3 interagieren über die MICROTUBULE INTERACTING AND TRAFFICKING (MIT)-Domäne mit endosomalen Transport-Komponenten und sind am vakuolären Abbau von Membranproteinen beteiligt (Katsiarimpa et al., 2011; Katsiarimpa et al., 2013; Katsiarimpa et al., 2014).

1.4 Integrale Plasmamembranproteine werden hauptsächlich Clathrin-abhängig endozytiert

In Eukaryonten existieren verschiedene Mechanismen der Endozytose, wobei die integralen Proteine an der Plasmamembran meist durch clathrin mediated endocytosis

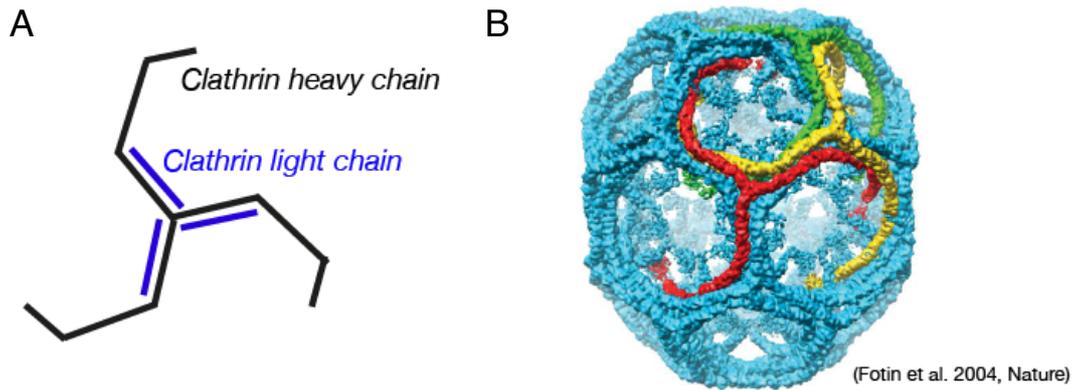


Abbildung 6: Die Clathrinhülle eines endozytierten Vesikels besteht aus mehreren Clathrin-Triskelen

A) Schematische Darstellung einer Clathrin-Triskele. Eine Clathrin-Triskele bildet sich aus jeweils drei clathrin heavy chains und drei clathrin light chains, die sich zusammenfügen und hexagonale Poren bilden. B) Strukturelle Darstellung einer kompletten Clathrinhülle aus (Fotin et al., 2004). Deutlich zu sehen, die hexagonalen Poren.

(CME; Clathrin-vermittelte Endozytose) internalisiert werden. Die ubiquitinylierten Membranproteine werden in den clathrin coated vesicles (CCVs; Clathrin-umhüllte Vesikel) aufgenommen und ins Zellinnere transportiert (McMahon and Boucrot, 2011). Das Hüllprotein Clathrin besteht aus zwei Untereinheiten, dem CLATHRIN HEAVY CHAIN (CHC; große Clathrin-Untereinheit) und dem CLATHRIN LIGHT CHAIN (CLC; kleine Clathrin-Untereinheit), die sich zu einer Triskele aus jeweils drei CHCs und drei CLCs zusammenfügen und jeweils drei halbe Hexagone bilden (Abbildung 6A). Durch Aneinanderlagern vieler dieser Triskelen bildet sich eine Clathrinhülle (Abbildung 6B) (Fotin et al., 2004).

Die Endozytose beginnt mit der Bildung sogenannter Nukleations-Module, Bereiche der Plasmamembran, an welchen die Krümmung der Membran verursacht wird. An diese Stellen in der Membran binden unter anderem Proteine, welche FER-AND-CIP4-Homology-BIN-AMPHIPHYSIN-RVS (F-BAR)-Domänen besitzen, über die sie die Krümmung der Membran erkennen und stabilisieren (Stimpson et al., 2009; Henne et al., 2010). Das zu endozytierende Protein wird von dem ADAPTOR PROTEIN COMPLEX 2 (AP2) und anderen Helferproteinen erkannt und diese Proteine binden auf dem Nukleations-Modul. AP2 rekrutiert nun Clathrin, das nicht selbst an die Membran binden kann, um das Zielprotein herum und die Rekrutierung der Triskelen stabilisiert die Membrangrube (Abbildung 7) (Übersichtsartikel von (McMahon and Boucrot, 2011)).

Das Abschnüren des Vesikels ist ein mechanischer Prozess. In Vertebraten binden N-TERMINAL- α -HELIX (N)-BAR-Domänenproteine wie Endophilin und Amphiphysin an den eingeschnürten Hals des Vesikels und rekrutieren die GTPase Dynamin, die letzten Endes das Abschnüren des Vesikels verursacht, in dem auch sie sich um den

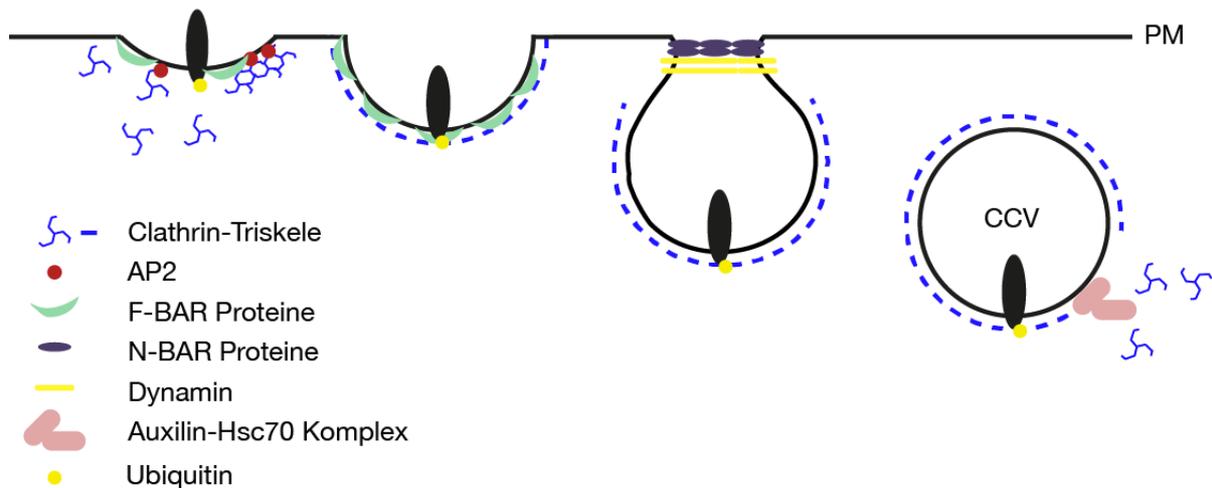


Abbildung 7: Ein integrales Membranprotein wird durch Einstülpfen der Membran endozytiert

Schematische Darstellung der Endozytose an der Plasmamembran. Die Clathrin-vermittelte Endozytose (CME) eines integralen Membranproteins beginnt mit der Nukleation und der Krümmung des Membranbereiches, der das Protein umgibt. Die Krümmung wird von Proteinen hervorgerufen, die eine F-BAR-Domäne enthalten. Während die Membran gebogen wird, rekrutieren Adapterproteine (AP2) die Clathrin-Triskelen an die Membran und diese lagern sich zu einer Hülle (Clathrinhülle) zusammen. Am Hals der entstandenen Grube lagern sich N-BAR-Domänenproteine an, welche die Einschnürung des Halses stabilisieren und die GTPase Dynamin rekrutieren, welche durch Konformationsänderung den Hals einschnürt und damit die Abtrennung des Clathrin-umhüllten Vesikels (CCV) verursacht. Nach der Abtrennung wird die Clathrinhülle wieder entfernt. Dies geschieht durch die Proteine Auxilin und Heat-shock-cognate (Hsc) 70, die gemeinsam die Clathrinhülle demontieren.

Vesikelhals legt und durch Konformationsänderung diesen einschnürt (Abbildung 7) (Übersichtsartikel von (McMahon and Boucrot, 2011)). Nach der Abschnürung des Vesikels spricht man von einem CCV. Ein CCV ist nicht in Lage, mit anderen Endosomen zu verschmelzen, daher muss die Clathrinhülle wieder entfernt werden.

Die Disassemblierung der Clathrinmoleküle wird durch das Protein Auxilin vermittelt. Auxilin interagiert mit der ATPase HEAT SHOCK COGNATE 70 (HSC70) und der Komplex steuert das Entfernen der Clathrinmoleküle vom CCV (Abbildung 7) (Ungewickell et al., 1995). Nach dem Entfernen der Clathrinhülle ist der Vesikel zur Verschmelzung mit anderen Endosomen im Stande. Die CME ist unter ein- und mehrzelligen Eukaryonten konserviert (Übersichtsartikel von (McMahon and Boucrot, 2011)). Das Arabidopsis-Genom codiert für zwei *CHC* Gene (*CHC1* und *CHC2*) und drei *CLC* Gene (*CLC1- CLC3*) (Baisa et al. 2013, Kitakura et al. 2011). Mutanten der Clathrin-Untereinheiten in Arabidopsis zeigen pleiotrope Entwicklungsdefekte. *chc* Nullmutanten zeigen schwere Defekte in der Kotyledonen-Organogenese und in den Embryos wurde eine abnorme Zellteilung beobachtet (Kitakura et al., 2011). Diese Defekte sind auf eine beeinträchtigte Endozytose verschiedener Plasmamembranproteine zurückzuführen. Auch Überexpression einer dominant-negativen Form von CHC, die nicht in der Lage ist einen Komplex mit CLC zu bilden,

zeigt starke Beeinträchtigung in der Endozytose (Liu et al., 1995; Liu et al., 1998; Kitakura et al., 2011). Analysen der *clc* Mehrfachmutanten zeigten ebenfalls schwer beeinträchtigte Endozytose und pleiotrope Entwicklungsdefekte (Wang et al., 2013). Die schweren Defekte der Clathrinmutanten zeigen, wie essentiell die Clathrin-vermittelte Endozytose in Pflanzen ist. Auch der AP2 Komplex ist in Arabidopsis konserviert. Die Mutanten von *AP2A1* und *AP2M*, die jeweils als eine der großen und eine der kleinen AP2-Untereinheiten identifiziert wurden zeigen verschiedene Defekte in der Blütenentwicklung und der Samenproduktion und eine abnorme Phyllotaxis, mit veränderter Anzahl an Blättern und Seitenästen sowie verkleinerte Blattoberflächen und kürzere Wurzelhaare (Kim et al., 2013; Yamaoka et al., 2013).

Neben des AP2-Komplexes existiert in Pflanzen ein weitere, pflanzenspezifischer Adapterkomplex, der TPLATE COMPLEX (TPC), der eine wichtige Rolle bei der Initiierung der CME spielt und mit Clathrin, AP-2 und DRPs interagiert (Gadeyne et al., 2014). Mutationen seiner Komponenten zeigen Störungen in der Samenentwicklung (Gadeyne et al., 2014). In Arabidopsis existieren sechs DYNAMIN RELATED PROTEINS (DRPs) und unter diesen kolokalisieren DRP1C, DRP2A und DRP2B mit Clathrin und scheinen in der CME eine Rolle zu spielen (Fujimoto et al., 2010; Fujimoto and Tsutsumi, 2014). In Arabidopsis existiert auch ein Auxilin-ähnliches Protein, das ebenfalls in der CME beteiligt zu sein scheint (Lam et al., 2001).

Eine Gruppe von BAR-Domänenproteinen, die SRC HOMOLOG 3 (SH3) DOMAIN CONTAINING PROTEINS (SH3Ps), welche im Endomembrantransport involviert sind, wurde ebenfalls in Arabidopsis identifiziert (Lam et al., 2001, 2002; Zhuang et al., 2013; Ahn et al., 2017). SH3P2 ist in der Lage Membranen zu krümmen und es spielt eine Rolle in der Autophagie und in der Zellplattenformierung (Zhuang et al., 2013; Ahn et al., 2017).

1.5 Die endosomal sorting complexes required for transport (ESCRTs) koordinieren den endosomalen Transport

Nach der Endozytose des Transmembranproteins, beginnt der Transport des Proteins in Endosomen zur Vakuole, wo der Abbau der Cargos durch die vakuolären Proteasen stattfindet. Der endosomale Transport wird von den ESCRTs koordiniert (Übersichtsartikel von (Henne et al., 2011)). ESCRT ist ein System, das schon früh in der Evolution auftauchte und auch in vereinfachter Form in Prokaryonten existiert. In Archaeen gibt es zwei orthologe ESCRT-Proteine, die eine wichtige Funktion in der Zellteilung haben (Lindas et al., 2008; Samson et al., 2008). Die ESCRT-Proteine entstanden sehr früh im evolutionären Stammbaum der Archaeen und wurden in

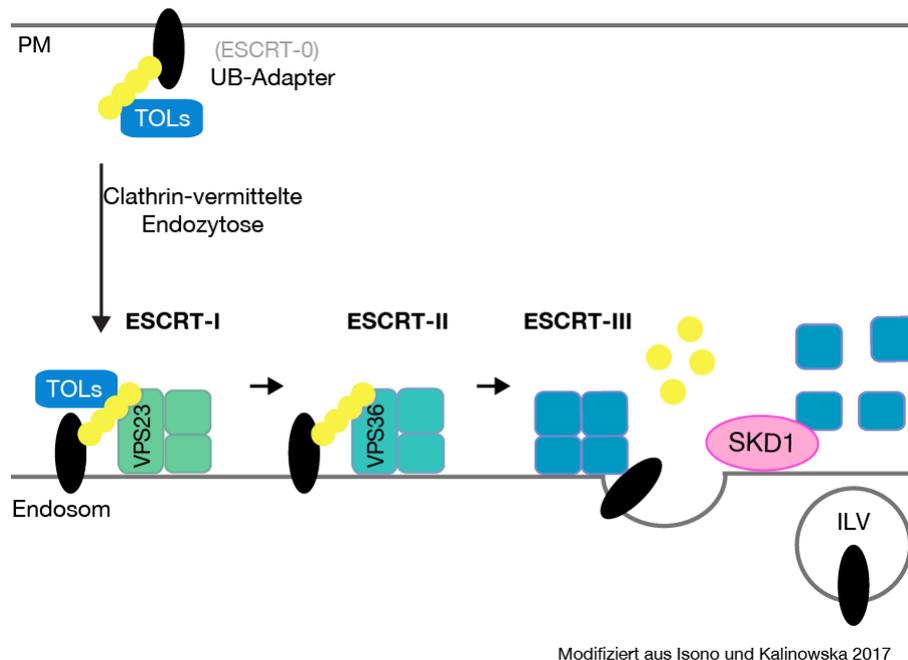


Abbildung 8: Die ESCRTs koordinieren den endosomalen Transport

ESCRT-0 und andere Ubiquitin-Adapterproteine erkennen die ubiquitinylierten Cargos an der Plasmamembran und leiten diese der nachgeschalteten ESCRT-Maschinerie zu. ESCRT-I übernimmt das ubiquitinylierte Cargo an den frühen Endosomen und durch Interaktion mit ESCRT-II wird das Cargo weitergegeben. ESCRT-II rekrutiert die Untereinheiten von ESCRT-III aus dem Zytosol an die endosomale Membran und der Komplex wird gebildet. ESCRT-III internalisiert die Cargos in die Intraluminal Vesicles (ILV) der MVBs und wird durch Aktivität der AAA-ATPase SKD1 aufgelöst und die Untereinheiten werden wieder ins Zytosol entlassen. Modifiziert aus (Isono and Kalinowska, 2017).

späteren Archaeen durch die klassische Zellteilungsmaschinerie ersetzt, die auch in anderen Prokaryonten zu finden ist (Lindas et al., 2008). Über die Zeit und während der Entwicklung von einzelligen zum vielzelligen Organismen entwickelten sich die Komplexe weiter und neue Komplexe und Untereinheiten kamen hinzu. Auch in der eukaryontischen Zellteilung üben ESCRTs immer noch Funktionen aus. In Vertebraten sind ESCRTs an der Abschnürung und Bildung der filamentösen Mikrotubuli-Spindel beteiligt, durch welche die beiden Tochterzellen voneinander getrennt werden (Caballe and Martin-Serrano, 2011; Elia et al., 2011). In der Pflanzenzelle erfolgt der Prozess der Zellteilung im Allgemeinen auf anderem Weg. In der pflanzlichen Zelle bildet sich eine expandierende Teilungsebene, die Zellwandplatte, an der Plasmamembran und Zellwand entstehen. Es findet hierbei keine Ein- bzw. Abschnürung wie in anderen Zellen statt.

Im endosomalen Transport leitet die ESCRT-Maschinerie die Cargos durch Bindung der Ubiquitinketten und Interaktionen untereinander, von einem Komplex zum nächsten weiter, bis das Cargo in die ILVs der MVBs eingestülpt wird. In Metazoen und vielen Pilzen existieren vier dieser Komplexe, ESCRT-0, -I, -II und -III. In

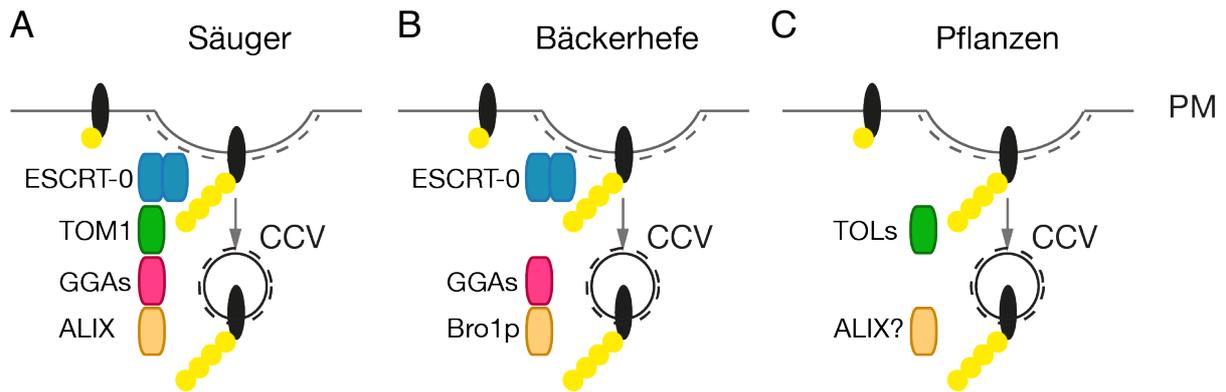


Abbildung 9: Neben ESCRT-0 erkennen weitere Ubiquitin-Adapter die Cargos an der Plasmamembran

Die Schematischen Abbildungen zeigen das unterschiedliche Vorkommen der Ubiquitin-Adapter an der Plasmamembran (PM) und an Clathrin-umhüllten Vesikeln (CCVs) in Säugern, Bäckerhefe und Pflanzen. A) Ubiquitin-Adapterproteine in Mammalia. Neben ESCRT-0 agieren auch noch TOM1 Proteine, GGAs und ALIX in der Erkennung von ubiquitinylierten Proteinen an der Plasmamembran. B) In Hefen existieren keine Orthologe der TOM1 Proteine, aber sowohl GGAs, wie auch ein Homolog für ALIX, das Bro1p Protein, agieren neben ESCRT-0. C) In Pflanzen ist das Erkennen von ubiquitinylierten Cargos an der Plasmamembran und an den CCVs weitestgehend noch unverstanden. Es gibt in Pflanzen keine Homologe der ESCRT-0 Untereinheiten. Die TOLs, die Homologen von TOM1, sind für den endosomalen Transport von PIN2 wichtig (Korbei et al., 2013). Arabidopsis besitzt auch ein ALIX-Homolog. Bislang wurde hierfür nur gezeigt, dass es an späten Endosomen eine Funktion hat (Kalinowska et al., 2015). Ein Y2H-Screeningverfahren zeigt ALIX jedoch als potenziellen Interaktionspartner von VPS23 und es bindet K63-Ubiquitinketten (Richardson et al., 2011). Es könnte also eine Funktion im frühen endosomalen Transport haben.

Landpflanzen, einigen Schleimpilz- und manchen Hefearten fehlt ESCRT-0 (Abbildung 8) (Leung et al. 2008, Paez Valencia et al. 2016).

ESCRT-0 ist ein Heterodimer, das in Säugetieren aus HEPATOCYTE GROWTH FACTOR-REGULATED TYROSINE KINASE SUBSTRATE (HRS) und SIGNAL TRANSDUCING ADAPTOR MOLECULE (STAM) (in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*: VACUOLAR PROTEIN SORTING 27 [Vps27p] und HAS SYMPTOMS OF CLASS-E MUTANTS1 [Hse1p]) besteht. ESCRT-0 ist der erste ESCRT, welcher die ubiquitinylierten Cargos bindet und der nachgeschalteten ESCRT-Maschinerie zuführt, indem es ESCRT-I an die Endosomen rekrutiert (Bache et al., 2003; Katzmann et al., 2003; Henne et al., 2011). Die Funktion, ubiquitinylierte Cargos an der Plasmamembran zu binden und der ESCRT-Maschinerie zuzuleiten, ist nicht ausschließlich ESCRT-0 vorbehalten (Übersichtsartikel von (Shields and Piper, 2011)).

In Säugetieren existieren neben ESCRT-0, auch die Proteine TARGET OF MYB 1 (TOM1), TOM1-like (TOM1L) 1 und -2 und GOLGI-LOCALIZED, γ -EAR-CONTAINING, ADP-RIBOSYLATION-FACTOR-BINDING PROTEINS (GGAs) (Abbildung 9A), die ebenfalls die Fähigkeit haben, ubiquitinylierte Cargos zu binden und durch Interaktion mit ESCRT-I der ESCRT-Maschinerie zuzuführen (Kato et al., 2004; Puertollano and Bonifacio, 2004; Prag et al., 2005; Puertollano, 2005; Liu et

al., 2009; Shields and Piper, 2011). Das Arabidopsis Genom kodiert für neun TOM-LIKE PROTEINS (TOLs; TOM-ähnliche Proteine), welche redundante Funktion haben (Winter and Hauser, 2006; Korbei et al., 2013). Orthologe für GGAs wurden in Arabidopsis nicht gefunden (Abbildung 9B und C).

ALG-2-INTERACTING PROTEIN X (ALIX) in Säugetieren (Bck1p-like resistance to osmotic shock 1 [Bro1p] in Hefen), ist ebenfalls ein Ubiquitin-Adapter, der ubiquitinierte Proteine bindet und mit der ESCRT-Maschinerie interagieren kann (Abbildung 9A und B) (Morita et al., 2007; Dowlatshahi et al., 2012; Pashkova et al., 2013; Cardona-Lopez et al., 2015). In Pflanzen existiert ein Ortholog von ALIX, für das gezeigt wurde, dass es auf späten Endosomen lokalisiert und für die Rekrutierung von AMSH3 zu den MVBs essentiell ist (Kalinowska et al., 2015). Das ALIX-Homolog in Arabidopsis ist auch in der Lage, K63-gekoppelte Ubiquitinketten zu binden und in einem Hefe-Zwei-Hybrid (yeast two-hybrid [Y2H])-Test zeigte sich die Interaktion von ALIX mit ESCRT-Komponenten (Richardson et al., 2011; Kalinowska et al., 2015). Es ist durchaus denkbar, dass auch das pflanzliche ALIX eine Funktion an CCVs oder den frühen Endosomen ausüben kann (Abbildung 9C).

ESCRT-I in Arabidopsis besteht aus drei Untereinheiten, VPS23/ELCH, VPS28 und VPS37, für die jeweils zwei Isoformen vorliegen. VPS23 interagiert und kolokalisiert mit dem Protein Fab1, YOTB, Vac1, and EEA1 (FYVE) DOMAIN-CONTAINING PROTEIN/ FYVE DOMAIN PROTEIN REQUIRED FOR ENDOSOMAL SORTING 1 (FYVE1/FREE1), einem Protein, das im endosomalen Transport und der Vakuolen-Biogenese wichtig ist (Gao et al., 2014; Gao et al., 2015; Kolb et al., 2015; Beldal-Palazon et al., 2016). Über die Untereinheit VPS28 interagiert ESCRT-I mit anderen Komponenten von ESCRT-II und -III interagieren und könnte ESCRT-II zur endosomalen Membran rekrutieren (Winter and Hauser, 2006; Richardson et al., 2011; Shahriari et al., 2011).

ESCRT-II besteht ebenfalls aus drei Untereinheiten, VPS22, VPS25 und VPS36, wie ESCRT-I. Die ESCRT-II Untereinheit VPS25 interagiert mit der ESCRT-III Untereinheit VPS20 und in Hefe wurde gezeigt, dass diese Interaktion die Assemblierung der ESCRT-III-Untereinheiten auf der endosomalen Membran initiiert (Teo et al., 2004; Winter and Hauser, 2006; Richardson et al., 2011; Shahriari et al., 2011; Henne et al., 2013).

ESCRT-III ist für die Internalisierung der Cargos in die ILVs der MVBs und die Einstülpung dieser Vesikel essentiell. ESCRT-III in Arabidopsis besteht aus VPS2, SUCROSE NON-FERMENTING 7 (SNF7), VPS20, VPS24, VPS46/CHARGED MULTIVESICULAR BODY PROTEIN 4 (CHMP1) und VPS60, von denen meist zwei

oder drei Isoformen im Arabidopsis Genom vorliegen (Winter and Hauser, 2006; Gao et al., 2017). Studien in Hefe haben gezeigt, dass nach Rekrutierung von VPS20 die Polymerisierung und Bildung einer filamentösen Spirale von SNF7 ausgelöst wird, welche von VPS24 und VPS2 abgedeckt und so der Kernkomplex von ESCRT-III gebildet wird. VPS46 und VPS60 sind ESCRT-III assoziierte Proteine, welche regulatorische Funktion auf den Komplex haben können (Winter and Hauser, 2006; Spitzer et al., 2009). Ein weiteres ESCRT-III assoziiertes Protein ist die AAA-ATPASE SUPPRESSOR OF K⁺ TRANSPORT GROWTH DEFECT 1 (SKD1) (Abbildung 8). Diese bewirkt die Disassemblierung von ESCRT-III. Erst nach Auflösung von ESCRT-III kann die Einstülpung der ILVs in das innere Lumen der MBVs erfolgen (Haas et al., 2007; Shahriari et al., 2010).

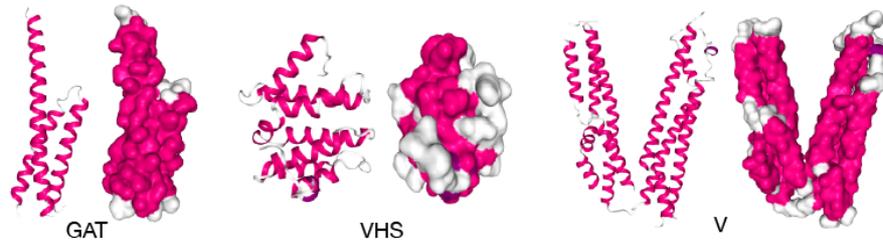
1.6 Erkennung und Bindung von Ubiquitin spielt eine essentielle Rolle im endosomalen Membrantransport in Pflanzen

Eine Schlüsselfunktion im Transport der Frachtproteine zur Vakuole ist das Erkennen und Binden der ubiquitinylierten Proteine. UBDs können verschiedenste Strukturen zeigen. Auch die Ubiquitin-bindenden Proteine im endosomalen Transport haben einige unterschiedliche Ubiquitin-bindende Motive (Abbildung 10). Viele der UBDs, welche bei der Erkennung der ubiquitinylierten Proteine an der Plasmamembran beteiligt sind, zeigen α -Helix-Strukturen. Diese sind meist in Lage, zwei Ubiquitinmoleküle gleichzeitig zu binden, was zu einer erhöhten Affinität und Spezifität führen könnte. Ebenso ist es auffällig, dass solche Ubiquitin-Adapterproteine oft mehrere UBDs tragen, auch das könnte die Affinität der Ubiquitin-Bindung erhöhen (Übersichtsartikel von (Husnjak and Dikic, 2012)).

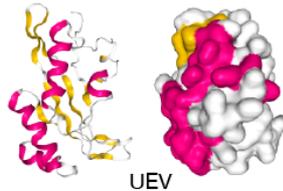
Die Familie der TOM-Proteine enthalten zwei α -Helix-UBDs, eine GGAs AND TOM (GAT)-Domäne und eine VPS27/HRS/STAM (VHS)-Domäne (Misra et al., 2000; Akutsu et al., 2005). Auch die V-Domäne des Ubiquitin-Adapters Bro1p aus Hefe ist eine aus α -Helices bestehende UBD (Pashkova et al., 2013). Für die pflanzlichen Orthologe TOL6 und ALIX wurde gezeigt, dass sie Ubiquitin binden können. (Korbei et al., 2013; Kalinowska et al., 2015). ALIX interagierte im Y2H-Test mit VPS23, es wurde allerdings noch nicht gezeigt, ob es auch eine Funktion mit ESCRT-I im frühen endosomalen Transport hat (Richardson et al., 2011). Die TOL Proteine in Arabidopsis sind für den endosomalen Transport des Auxintransporters PIN2, welcher kontinuierlich ubiquitinyliert und recycelt wird, notwendig (Korbei et al., 2013).

Die ESCRT-I Untereinheit VPS23 ist mit seiner Ubiquitin E2 variant (UEV)-Domäne die Ubiquitin-bindende Untereinheit von ESCRT-I und kann über diese Domäne

UBDs aus alpha-Helices:



UBDs aus Ubiquitinkonjugierenden Domänen:



Weitere Ubiquitinbindende Domänen:

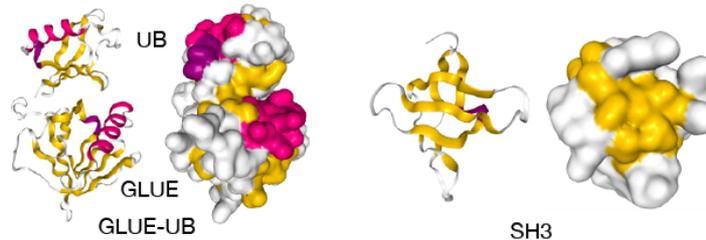


Abbildung 10: Strukturdarstellungen verschiedener Ubiquitin-bindender Domänen (UBDs) in Pflanzen
 UBDs mit alpha-Helices, wie die GGAs AND TOM (GAT)-Domäne (PDB 1WRD), die VPS27/HRS/STAM (VHS)-Domäne (PDB 1ELK) und die V-Domäne (PDB 4JIO) sind in den ESCRT-0 Untereinheiten und in anderen Ubiquitin-Adaptoren wie den TOM1-Proteinen, den GGAs und in ALIX/Bro1p zu finden, die als erste die ubiquitylierten Proteine von der Plasmamembran erkennen, binden und konzentrieren. ESCRT-I und ESCRT-II haben UBDs mit weniger starker Affinität, die Ubiquitin E2 variant (UEV)-Domäne (PDB 1KPP), eine nicht-konjugierende Domäne aus E2 und die GRAM-/LIKE UBIQUITIN-BINDING IN EAP45 (GLUE)-Domäne. Eine weitere Ubiquitin-bindende Domäne ist die Src Homology 3 (SH3)-Domäne (PDB 1Z9Z). Pinke Bereiche zeigen alpha-Helices, gelbe Bereiche beta-Faltblattstruktur.

ubiquitylierte Cargos binden (Spitzer et al., 2006). Die UEV in VPS23 kann durch das Fehlen des Cysteins im aktiven Zentrum keine konjugierende Funktion ausüben, sondern hat nur die Fähigkeit zur Ubiquitin-Bindung. VPS23 gibt das ubiquitylierte Cargo an ESCRT-II weiter. Die GRAM-/LIKE UBIQUITIN-BINDING IN EAP45 (GLUE)-Domäne von Arabidopsis VPS36 ist ausreichend, um *in vitro* Monoubiquitin zu binden (Wang et al., 2017). Eine weitere Ubiquitin-bindende Domäne ist die SH3-Domäne (Stamenova et al., 2007; Hurley, 2008; Ortega Roldan et al., 2013). Bisher wurde für SH3-Domänen-enthaltende Proteine in Pflanzen noch keine Funktion als Ubiquitin-bindende Proteine gezeigt. ESCRT-III ist der einzige unter den ESCRTs, der keine Ubiquitin-bindende Domäne besitzt.

1.7 ESCRTs und andere endosomale Transport-Proteine haben wichtige physiologische Funktionen in Arabidopsis

Nicht nur auf molekularer und zellulärer Ebene zeigen sich die Auswirkungen und die Relevanz des endosomalen Transports in Pflanzen. Viele der Mutanten der im endosomalen Transport beteiligten Gene zeigen schwere Wachstums-Defizite und Entwicklungsstörungen. Die fünffache Mutante *tol2/tol3/tol5/tol6/tol9* (*tol(Q)*), zeigt schwere morphologische Defekte wie Zwergwüchsigkeit, veränderte Blatt- und Blütenmorphologie und sie hat Defekte bei der Auxin-Verteilung in der Wurzel (Korbei et al., 2013).

Die ESCRT-I Untereinheit *VPS23.1* wurde in Arabidopsis zuerst als das *ELCH* Gen identifiziert. Die *elch* Mutante zeigte zytokinetische Defekte in Trichomen und auch in anderen Zellen der Mutanten wurden multiple Nuclei gefunden. (Spitzer et al., 2006). Dies und unvollständige Zellwände deuteten auf die Wichtigkeit des endosomalen Transports und der Funktion von ESCRT-I in der Zellteilung hin. Die Mutanten der ESCRT-II Untereinheiten *vps36.1* und *vps36.2* zeigen schon als Einzelmutanten sehr starken Phänotypen mit pleiotropischen Entwicklungsdefekten (Wang et al., 2017). Die Mutation ruft Embryo- oder Keimlingsletalität hervor und führt zu schweren Zellentwicklungsdefekten sowie Defekten in der Organisation des apikalen Wurzelmeristems und Störung in der Verteilung von PIN1 und Auxin im embryonalen Stadium (Wang et al., 2017). Des Weiteren wurde gezeigt, dass in *vps36* der Transport zur Vakuole und die Bildung von MVBs gestört ist (Wang et al., 2017).

Auch Mutanten der ESCRT-III-Untereinheiten zeigen schwere Defizite in der Entwicklung. Die homozygote Mutante von *vps2.1* führt zu Embryoletalität. Die Überexpression des C-terminalen GREEN FLUORESCENCE PROTEIN (GFP)-Fusionsproteins *35Spro:VPS2.1-GFP* ist kleinwüchsig und zeigt eine verfrühte Seneszenz sowie Defekte in der Autophagie (Katsiarimpa et al., 2011; Katsiarimpa et al., 2013). Ein kompletter Gen-Knockout der beiden Homologen *chmp1a* und *chmp1b* zeigt ebenfalls Entwicklungsstörungen im Embryonalstadium und bei homo-/heterozygoten Keimlingen zeigt sich Bildung multipler Kotyledonen, Anhäufungen von Stomata auf der Blattoberfläche und schwere Entwicklungsdefekte in Wurzel- und Sprossarchitektur (Spitzer et al., 2009). Die Lokalisation der Auxintransporter PIN1, PIN2 und AUXIN-RESISTANT 1 (AUX1) ist in *chmp1a/chmp1b* gestört (Spitzer et al., 2009). In Arabidopsis führt die Überexpression einer mutierten, inaktiven Form der ESCRT-III assoziierten AAA-ATPase SKD1, der SKD1(E232Q) Variante, zu einem dominant-negativen Effekt und die Folge sind schwere zellulären Defekten und eine Ansammlung von vergrößerten MBVs, was schließlich zu einer starken Einschränkung

in der Entwicklung führt (Haas et al., 2007; Shahriari et al., 2010; Paez Valencia et al., 2016).

Auch Analysen der Nullmutanten des ESCRT-assoziierte DUBs *amsh3* in Arabidopsis zeigten schwere Entwicklungsdefekte, Keimlingsletalität und die Akkumulation ubiquitinylierter Proteine in der Membranfraktion, was die Bedeutsamkeit von DUB Funktionen in der Endozytose deutlich macht (Isono et al. 2010, Katsiarimpa et al. 2014). Für ALIX wurde eine Funktion in der Rekrutierung von AMSH3 zu späten Endosomen oder MVBs gezeigt. Wie viele der ESCRT-Mutanten, bzw. Mutanten ESCRT-assoziiierter Proteine, sind auch die *alix* Mutanten weiß, keimlingsletal und haben Defekte in der Vakuolenbiogenese (Kalinowska et al., 2015).

Im Allgemeinen zeigen die Phänotypen der Mutanten von ESCRT-Untereinheiten und ESCRT-assoziierten Komponenten schwere morphologische und zelluläre Defekte und sind oft letal. Die Phänotypen demonstrieren die Relevanz des ESCRT-abhängigen endosomalen Transports in der Entwicklung und während des ganzen Lebenszyklus der Pflanzen.

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit.

Da AMSH-Proteine in Säugetieren als Proteine identifiziert wurden, die mit SH3-Domänen interagieren, war es zum einen das Ziel dieser Arbeit, die Wechselwirkung, zwischen AMSH-Proteinen und SH3-Domänen-enthaltenden Proteinen in Arabidopsis zu testen, um physiologische Funktionen von AMSH3 zu verstehen.

In Arabidopsis wurde gezeigt, dass die TOL-Proteine eine Funktion als Ubiquitin-Adapter haben und für den endosomalen Transport essentiell sind (Korbei et al., 2013). Da in anderen Organismen mehrere Ubiquitin-Adapterproteine neben einander fungieren, besteht die Annahme, dass auch in Pflanzen mehrere Ubiquitin-Adapter vorhanden sein könnten und dass SH3-Domänen-Proteine diese Funktion ausüben könnten. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es daher, die molekulare und physiologische Funktion der SH3-Domänen-Proteine in Arabidopsis aufzuklären. Mittels verschiedener genetischer, biochemischer und zellbiologischer Analysen wurde unter anderem das Protein SH3P2 in Arabidopsis untersucht und als potenzieller Ubiquitin-Adapter identifiziert.

2 Ergebnisse

2.1 AMSH3 interagiert mit SH3 DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 2 (SH3P2) und ESCRT-I

Voran gegangene Arbeiten in unserem Labor zeigten wiederholt, dass AMSH3 mit ESCRT-III Untereinheiten interagiert und auf späten Endosomen bzw. MVBs lokalisiert (Katsiarimpa et al., 2011; Katsiarimpa et al., 2014; Kalinowska et al., 2015). Die humanen AMSH-Proteine wurden als DUBs identifiziert, die sowohl an MVBs als auch im frühen endosomalen Transport eine Rolle spielen und mit der SH3-Domäne der ESCRT-0 Untereinheit STAM interagieren (Tanaka et al., 1999; Agromayor and Martin-Serrano, 2006; Kyuuma et al., 2007).

2.1.1 AMSH3 interagiert mit SH3P2 im Hefe-Zwei-Hybrid-Test und direkt im *in vitro* Affinitätstest

Um heraus zu finden, ob das pflanzliche AMSH3 ebenfalls mit SH3-Domänen-enthaltenden Proteinen interagieren kann, wurde dessen Affinität zu SH3P2 analysiert, von welchem bereits gezeigt wurde, dass es in intrazellulären Transportwegen eine Rolle zu spielen scheint (Zhuang et al., 2013; Gao et al., 2015; Kolb et al., 2015). Um die Affinität beider Proteine zueinander zu testen, wurde zuerst ein Y2H-Test durchgeführt. Hierbei wurde die Interaktion zwischen Gal4 DNA binding domain (GBD)-AMSH3(AXA), einer enzymatisch inaktiven Version von AMSH3 mit einer Aminosäuresubstitution in der MPN⁺-Domäne (Isono et al., 2010) und Gal4 activation domain (GAD)-SH3P2 getestet. Wie am Wachstum der Hefen in Abbildung 11A zu sehen, interagierten GAD-SH3P2 und GBD-AMSH3(AXA). Die Interaktion beider Proteine miteinander konnte in einem *in vitro* Affinitätstest mit den rekombinant exprimierten und aufgereinigten Fusionsproteinen maltose binding protein (MBP)-SH3P2 und glutathion-S-transferase (GST)-AMSH3 als direkte Interaktion verifiziert werden (Abbildung 11B). Die ESCRT-III Untereinheit GST-VPS2.1 interagierte nicht mit MBP-SH3P2 im *in vitro* Affinitätstest und diente somit als negative Kontrolle. In humanen AMSH wurde eine spezifische Bindestelle für STAM identifiziert, die in den pflanzlichen AMSH-Proteinen fehlt. Obwohl AMSH3 diese Bindestelle nicht enthält, scheint die Affinität zu SH3-Domänen konserviert zu sein.

Interaktoren von DUBs haben oft Einfluss auf deren Enzymaktivität. Die Interaktion mit STAM beispielweise steigert die DUB-Aktivität von humanem AMSH (McCullough et al., 2006). In einer fluoreszenzbasierten *in vitro* Deubiquitylierungsanalyse wurde die

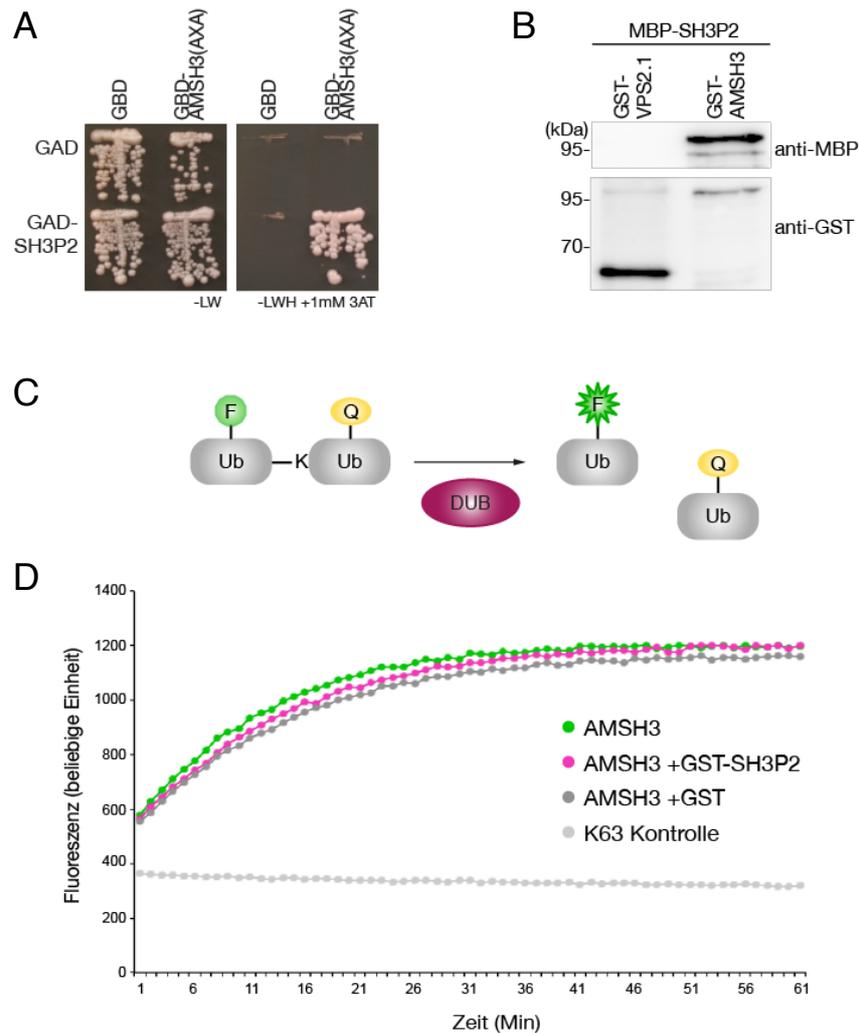


Abbildung 11: SH3P2 interagiert mit AMSH3, ohne dessen Enzymaktivität zu beeinflussen.

A) Y2H-Interaktionsstudie der Vollängenproteine AMSH3 und SH3P2. Hefetransformanten wurden jeweils auf Medium angezogen ohne Leucin und Tryptophan (-LW) und ohne Leucin, Tryptophan und Histidin (-LWH) versetzt mit 1 mM 3-Amino-1,2,4-triazole (3AT), um deren auxothrophes Wachstum zu testen. Die Leervektoren dienten als negative Kontrollen. B) *In vitro* Affinitätstest der Vollängenproteine GST-VPS2.1, GST-AMSH3 und MBP-SH3P2 zur Untersuchung einer direkten Interaktion zwischen den beiden Proteinen. GST-VPS2.1 diente als negative Kontrolle, 80 pmol Protein wurde in äquimolarer Menge eingesetzt. C) Schematische Darstellung der fluoreszenzbasierten *in vitro* Deubiquitylierungsanalyse. Ein Di-Ubiquitinmolekül (Di-UB), gekoppelt mit je einem TAMRA-Fluorophore und einem Quencher, wird durch DUB-Aktivität zu Monoubiquitin gespalten und die Zunahme der Fluoreszenz kann über die Zeit gemessen werden. D) Analyse der DUB-Aktivität über die Zeit. Die grüne Linie zeigt die Enzymaktivität von AMSH3 *in vitro*, beim Spalten von K63-Di-Ubiquitin ohne Zugabe andere Proteine. Die jeweils dunkelgraue und rosa Linie zeigen die Enzymaktivität von AMSH3 mit entsprechender Zugabe von GST oder GST-SH3P2. Die hellgraue Linie zeigt die Grundfluoreszenz von K63-Di-UB-TAMRA.

Enzymaktivität von AMSH3 untersucht. Bei diesem Verfahren wurden kommerziell erhältliche Di-Ubiquitinmoleküle hydrolysiert, die jeweils mit einem TAMRA-Fluorophor an einem Ubiquitinmolekül und einem Fluoreszenzlöscher (Quencher) am zweiten Ubiquitinmolekül gekoppelt waren. Durch DUB-Aktivität wird das Di-Ubiquitin zu Monoubiquitin gespalten und somit der Fluorophor vom Quencher getrennt und die

Enzymaktivität konnte anhand der zunehmenden Fluoreszenz gemessen werden (Abbildung 11C). Die Grafik in Abbildung 11D zeigt, dass AMSH3 in diesem System das TAMRA-gekoppelte K63-Di-Ubiquitin spalten konnte (grüne Linie, AMSH3 allein), allerdings wurde in Anwesenheit von SH3P2 keine veränderte Enzymaktivität von AMSH3 beobachtet (Linie in Magenta, AMSH3 + GST-SH3P2). GST alleine (graue Linie) diente in diesem Fall als negative Kontrolle sowie die puren TAMRA-markierten K63-Di-Ubiquitin-Moleküle (hellgraue Linie), durch welche die Hintergrundfluoreszenz bestimmt wurde. Es zeigte sich also, dass die Interaktion zu SH3P2 *in vitro* keinen Einfluss auf die Enzymaktivität von AMSH3 hat. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass zusätzliche Komponenten in der Pflanze existieren, wie andere Interaktionspartner, die eine essentielle Rolle spielen können, um die Enzymaktivität zu beeinflussen.

2.1.2 Die drei homologen SH3 DOMAIN-CONTAINING PROTEINS (SH3Ps) interagieren unterschiedlich mit den drei AMSH-Proteine aus Arabidopsis

Das Arabidopsis Genom codiert jeweils für drei homologe AMSH-Proteine (AMSH1, AMSH2 und AMSH3) sowie für drei homologen SH3 DOMAIN-CONTAINING PROTEINS (SH3Ps). Die homologen SH3P1, SH3P2 und SH3P3 teilten sich früh im evolutionären Stammbaum und haben eine Ähnlichkeit ihrer Aminosäuresequenz von nur 42 %, was darauf hindeuten könnte, dass sie spezifische Funktionen ausüben können (Dr. Chie Tsutsumi (Nagel et al., 2017)). Auch *AMSH1* und *AMSH3* sind keine Genduplikationen, sondern in mehreren Spezies konserviert (Katsiarimpa et al., 2013). Sie teilen sich nur 47 % Sequenzähnlichkeit und zeigen ein unterschiedliches Interaktionsmuster mit den ESCRT-III Untereinheiten, was auf unterschiedliche physiologische Funktionen hindeutet (Katsiarimpa et al., 2013).

Um heraus zu finden, ob die SH3Ps mit allen AMSH-Proteinen interagieren können, wurden diese im Y2H getestet. In diesem Y2H wurde der Hefe-Stamm Y190 (eine Adeninmangelmutante) verwendet, bei welchem eine positive Interaktion an der Rotfärbung der Kolonien zu erkennen ist, die durch die Anreicherung eines Zwischenmetabolits im Adenin-Syntheseweg hervorgerufen wird. Wie in Abbildung 12A zu sehen, interagierte SH3P1 mit keinem der AMSH-Proteine. Während SH3P2 und SH3P3 mit AMSH1 interagierten, war für SH3P2 nur eine Interaktion mit AMSH3 zu beobachten. Mit AMSH2 interagierte keines der drei SH3Ps. AMSH2 ist eine stark verkürzte Version von AMSH, eventuell fehlt hier die Interaktionsstelle für SH3Ps. Für AMSH3 wurde hier die inaktive AMSH3(AXA)-Version verwendet, da das wildtypische GBD-AMSH3 in den Hefen Autoaktivität zeigte.

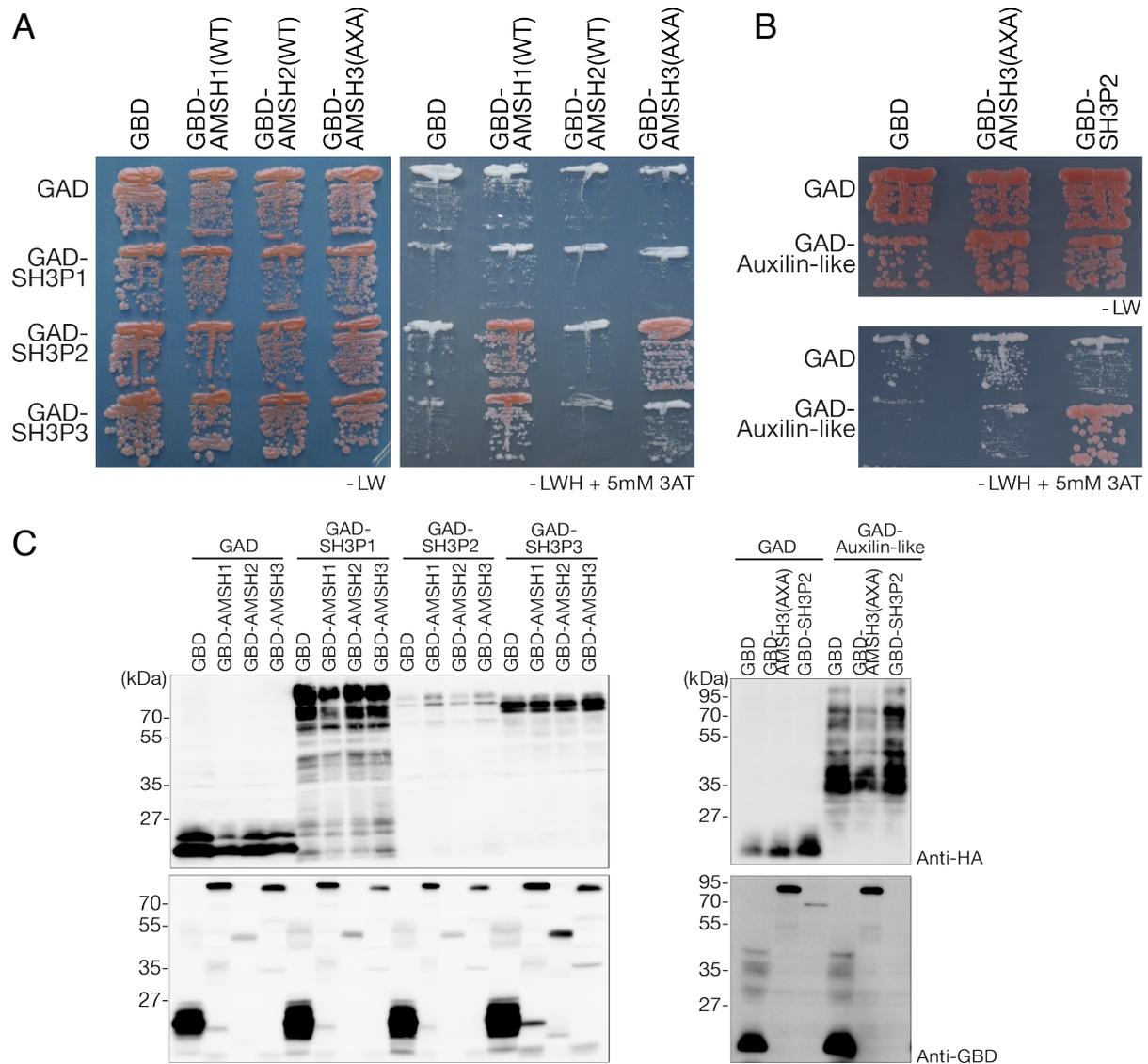


Abbildung 12: Die Interaktion zwischen AMSH-Proteinen und SH3-Domänen-enthaltenden Proteinen (SH3Ps) scheint spezifisch zu sein

A) Y2H-Interaktionsstudie der GBD-fusionierten Vollängenproteine AMSH1, AMSH2 und AMSH3(AXA) mit den drei GAD-fusionierten homologen SH3Ps. B) Y2H-Interaktionsstudie der Vollängenproteine GBD-AMSH3(AXA) und GBD-SH3P2 mit GAD-Auxilin-like protein. Hefetransformanten wurden jeweils auf Medium angezogen ohne Leucin und Tryptophan (-LW) und ohne Leucin, Tryptophan und Histidin (-LWH) versetzt mit 5 mM 3-Amino-1,2,4-triazole (3AT), um deren auxotrophes Wachstum zu testen. Die Leervektoren dienten als negativ-Kontrollen. C) Die Expression der Fusionsproteine wurde mittels Westernblot kontrolliert. Die Proteine wurden aus den Hefezellen, die für den Y2H verwendet wurden, extrahiert und mittels Antikörper gegen GBD und HA (GAD-Konstrukte) visualisiert.

Das unterschiedliche Interaktionsmuster im Y2H lässt auf verschiedene Funktionen von SH3P1 und den anderen beiden SH3Ps schließen. In der Literatur wurde für SH3P1 eine Interaktion mit dem Auxilin-ähnlichen Protein, Auxilin-like protein, aus Arabidopsis gezeigt (Lam et al., 2001). Daher wurde auch die Interaktion von AMSH3 und SH3P2 mit dem Auxilin-ähnlichen Protein getestet. Während für AMSH3 keine Interaktion zu sehen war, interagierte SH3P2 mit dem Auxilin-ähnlichen Protein (Abbildung 12B).

Die Expression der Fusionsproteine in Hefe wurde mittels Westernblot kontrolliert, um auszuschließen, dass negative Ergebnisse auf fehlende Expression zurückzuführen waren. Die Proteine wurden hierfür aus den Hefezellen extrahiert und mittels Antikörper gegen GBD und HA (GAD-Konstrukte) visualisiert (Abbildung 12C). Im Fall der Doppeltransformation von SH3P2 und dem Auxilin-ähnlichen Protein konnte GBD-SH3P2 nicht detektiert werden (Abbildung 12C rechts). Da die Rotfärbung der Hefen aber eindeutig eine Interaktion anzeigte, kann davon ausgegangen werden, dass GBD-SH3P2 exprimiert wurde und eventuell ein Abbau des Proteins stattgefunden hat. Die Interaktion zwischen SH3P2 und dem Auxilin-ähnlichen Protein in Hefe könnte auf eine Funktion von SH3P2 in der CME hindeuten.

Die Frage war nun, haben SH3P2 und AMSH3 eine gemeinsame Funktion im endosomalen Transportweg und an welchem Punkt spielen diese eine Rolle.

2.1.3 SH3P2 lokalisiert mit AMSH3 in SKD1(EQ)-induzierten Kompartimenten

Für AMSH3 wurde gezeigt, dass es auf späten Endosomen lokalisiert und mit ESCRT-III Untereinheiten interagiert (Katsiarimpa et al., 2011). Um die Funktion der Interaktion zwischen AMSH3 und SH3P2 im vakuolären Transport zu untersuchen, wurden Lokalisationsstudien in Protoplasten durchgeführt und nach einer Lokalisation auf späten Endosomen geschaut. Die Protoplasten wurden hierzu mit den Konstrukten *35Spro:SH3P2-GFP* und *AMSH3pro:mCherry-AMSH3* doppeltransformiert und die Lokalisation der Fusionsproteine in Koexpression mit der AAA-ATPase SKD1 (WT) und deren enzymatisch inaktiven Version SKD1(E232Q[EQ]) untersucht. Da die Expression der inaktiven Version von SKD1 in Pflanzen zu einem dominant-negativen Effekt führt und toxisch ist, ist es nicht möglich mit stabil transformierten Pflanzenlinien zu arbeiten, die SKD1(EQ) exprimieren (Haas et al. 2007). Daher wurde hier auf die transiente Expression in Protoplasten aus einer Arabidopsis Wurzelzellkultur zurückgegriffen.

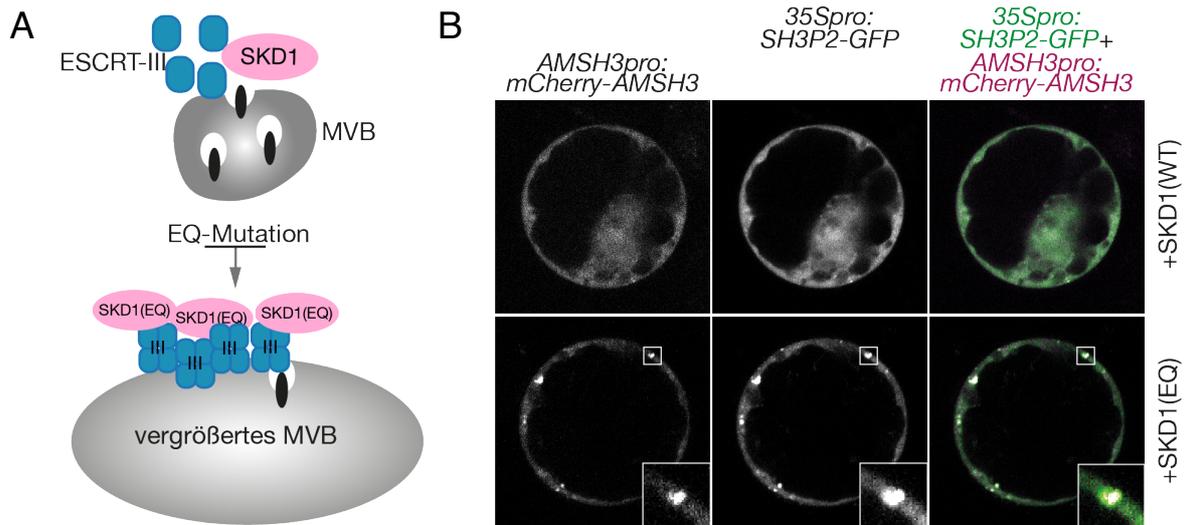


Abbildung 13: AMSH3 und SH3P2 lokalisieren in SKD1 (EQ)-induzierten Kompartimenten

A) Schematische Abbildung eines SKD1(EQ)-induzierten Kompartiments. Durch die EQ-Mutation in der AAA-ATPase SKD1 kann das Demontieren von ESCRT-III nicht stattfinden, was zu einer Akkumulation von ESCRT-III auf vergrößerten multivesicular bodies (MVB) führt, die im Text SKD1(EQ)-induzierten Kompartimente genannt werden. B) *AMSH3pro:mCherry-AMSH3* und *35Spro:SH3P2-GFP* wurden in Arabidopsis Wurzelzellprotoplasten exprimiert, zusammen mit SKD1(WT) und SKD1(EQ) und unter dem Konfokalmikroskop untersucht. Die Expression von SKD1(EQ) führt zur Akkumulation von MVBs. mCherry-AMSH3 und SH3P2-GFP kolokalisieren in diesen sogenannten SKD1(EQ)-induzierten Kompartimenten. Vesikel die für beide Signale positiv waren, Grün und Magenta, sind weiß dargestellt.

In Hefen wurde erstmals gezeigt, dass die Überexpression der AAA-ATPase Vps4(E233Q) dazu führt, dass ESCRT-III nicht mehr demontiert wird und an den MVBs akkumuliert, was die Bildung sogenannter Class-E-Kompartimente auslöst (Babst et al., 1997; Babst et al., 1998). Auch in Pflanzen kommt es durch Überexpression von SKD1(EQ) zu einer Akkumulation und Vergrößerung von MVBs, allerdings nicht zur Bildung von Class-E-Kompartimenten wie in Hefen beschrieben (Haas et al., 2007) (Abbildung 13A). Für Proteine, die an späten Endosomen und MVBs eine Funktion haben, wurde gezeigt, dass sie in Protoplasten mit solchen SKD1(EQ)-induzierten Kompartimenten kolokalisiert sind (Katsiarimpa et al., 2011; Kalinowska et al., 2015). Abbildung 13B zeigt, dass SH3P2 zusammen mit AMSH3 in den SKD1(EQ)-induzierten Kompartimenten lokalisierte, was auf eine gemeinsame Funktion der beiden Proteine im vakuolären Abbauweg hindeuten kann. In Koexpression mit HA-SKD1(WT) waren beide Proteine hauptsächlich zytosolisch lokalisiert (Abbildung 13B).

Um die Spezifität der Lokalisierung von MVB assoziierten Proteinen mit den SKD1(EQ)-induzierten Kompartimente zu testen, wurde die Lokalisation verschiedener endosomaler Marker zusammen mit SKD1(WT) und SKD1(EQ) untersucht. Dabei handelte es sich um die unter dem UBIQUITIN- und 35S-Promotoren überexprimierten Konstrukte für mRFP-CLATHRIN-LIGHT-CHAIN (CLC) als Marker

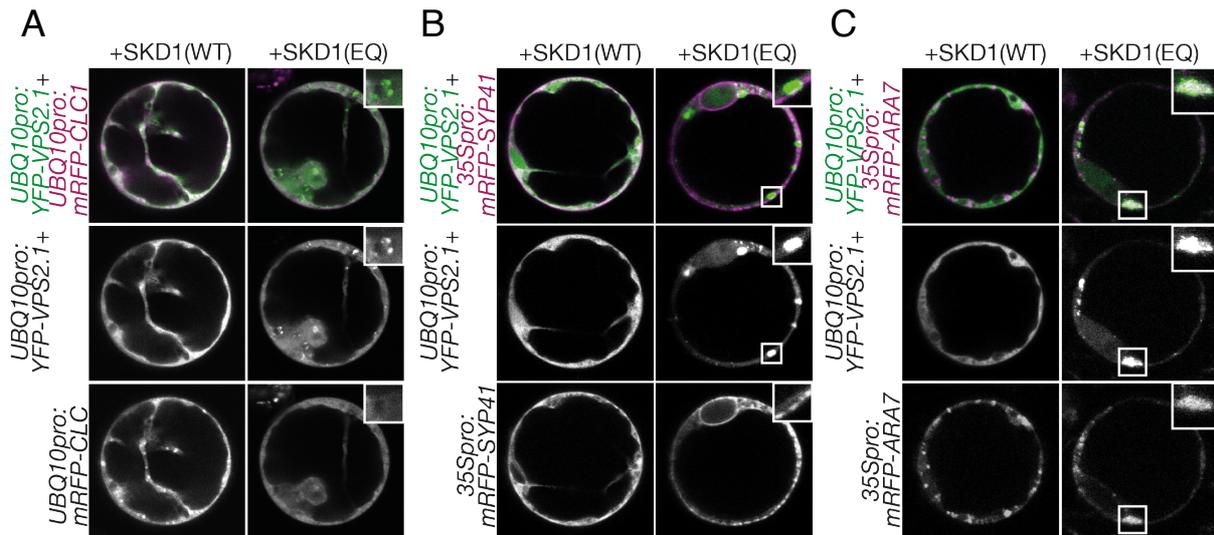


Abbildung 14: Spätendosomale Markerproteine lokalisieren auf SKD1(EQ)-induzierten Kompartimenten

Die endosomalen Marker A) mRFP-CLC, B) mRFP-SYP41 und C) mRFP-ARA7 wurden zusammen mit der ESCRT-III Untereinheit YFP-VPS2.1 und jeweils SKD1(WT) und SKD1(EQ) in Arabidopsis Protoplasten exprimiert und unter dem Konfokalmikroskop untersucht. YFP-VPS2.1 diente als positive Kontrolle. Vesikel die für beide Signale positiv waren, Grün und Magenta, sind weiß dargestellt. Es ist zu beachten, dass lediglich C) mRFP-ARA7 zusammen mit YFP-VPS2.1 in SKD1(EQ)-induzierten Kompartimenten lokalisierte, nicht aber mRFP-CLC oder mRFP-SYP41. Die Ausschnitte zeigen jeweils repräsentative SKD1(EQ)-induzierten Kompartimente.

für Clathrin und Clathrin-positive Strukturen, mRFP-SYNTAXIN OF PLANTS (SYP) 41 als Marker für das TGN bzw. frühe Endosomen und mRFP-ARABIDOPSIS RAT SARCOMA-RELATED PROTEINS IN BRAIN (RAB) GTPase (ARA) 7 als spät-endosomalen Marker (Ueda et al., 2004; Uemura et al., 2004; Geldner et al., 2009a). Als positive Kontrolle diente die ESCRT-III Untereinheit YFP-VPS2.1, für welche bereits gezeigt wurde, dass sie mit SKD1(EQ)-induzierten Kompartimenten kolokalisiert (Katsiarimpa et al., 2011). Während weder mRFP-CLC, noch mRFP-SYP41 auf SKD1(EQ)-induzierten Kompartimenten lokalisierte (Abbildung 14A und B), war der spät-endosomale Marker mRFP-ARA7, zusammen mit YFP-VPS2.1 auf SKD1(EQ)-induzierten Kompartimenten zu finden (Abbildung 14C). Dieses Ergebnis zeigt, dass mit den SKD1(EQ)-induzierten Kompartimenten spezifisch Proteine akkumulieren, welche auf späten Endosomen lokalisiert sind.

Die Lokalisationsstudie der endosomalen Marker und SH3P2 auf SKD1(EQ)-induzierten Kompartimenten deutete zuerst auf eine Beteiligung von SH3P2 im späten endosomalen Transportweg hin. Um die Lokalisierung von SH3P2 auf späten Endosomen zu verifizieren, wurde die Reaktion von SH3P2 auf Behandlung mit Wortmannin (WM) untersucht, welches durch Inhibierung der PI3P/PI4P-Kinasen ein Anschwellen der späten Endosomen verursacht und zur Bildung von WM-induzierten, ringförmigen Kompartimenten führt (Wang et al., 2009). Proteine die an späten Endosomen eine Funktion haben, lokalisieren ebenfalls auf diesen WM-Aggregaten

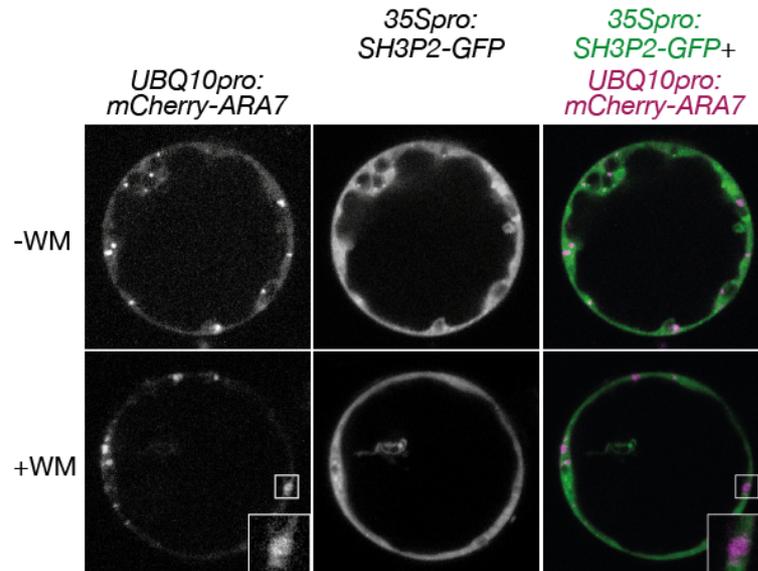


Abbildung 15: SH3P2-GFP lokalisiert nicht in Wortmannin-induzierten Aggregaten

35Spro:SH3P2-GFP und *UBQ10pro:mCherry-ARA7* wurden beide in Arabidopsis Protoplasten koexprimiert und die Lokalisation der Proteine SH3P2-GFP und mCherry-ARA7 nach Wortmannin (WM)-Behandlung und unter dem Konfokalmikroskop beobachtet. Nur mCherry-ARA lokalisierte auf den typischen Wortmannin-induzierten Kompartimenten. Die Ausschnitte zeigen jeweils repräsentative Wortmannin-induzierten Aggregaten.

(Takac et al., 2012; Kalinowska et al., 2015). Der spät-endosomale Marker mCherry-ARA7 lokalisierte nach WM Behandlung auf den WM-typischen, ringförmigen Aggregaten, während SH3P2-GFP nicht auf WM-Aggregaten erschien und auch nicht mit mCherry-ARA7 in diesen kolokalisierte (Abbildung 15) (Kolb et al., 2015). Dies deutete darauf hin, dass SH3P2 nicht stabil auf späten Endosomen lokalisiert ist. Es könnte sich bei der Lokalisation von SH3P2 zu späten Endosomen eventuell auch um eine sehr transiente Lokalisation handeln, die nur durch die Expression von SKD1(EQ) stabilisiert wird und zu einer Anreicherung auf SKD1(EQ)-induzierten Kompartimenten führt.

2.1.4 AMSH3 interagiert mit ESCRT-I

Für AMSH in Säugetieren wurde gezeigt, dass es sowohl mit ESCRT-III als auch mit ESCRT-0 interagieren kann. Daher sollte geprüft werden, ob AMSH3 aus Arabidopsis auch mit anderen ESCRTs interagiert. Hierbei wurde eine Interaktion zwischen AMSH3 und der ESCRT-I Untereinheit VPS23.1 im Y2H festgestellt (Abbildung 16A, oberes Bild). Da GBD-VPS23.1 allein Autoaktivierung bewirkte, wurde dieses als GAD-Fusionsprotein verwendet und mit der inaktiven Version GBD-AMSH3(AXA) getestet, während die anderen ESCRT-I Untereinheiten als GBD-Fusionsproteine mit dem

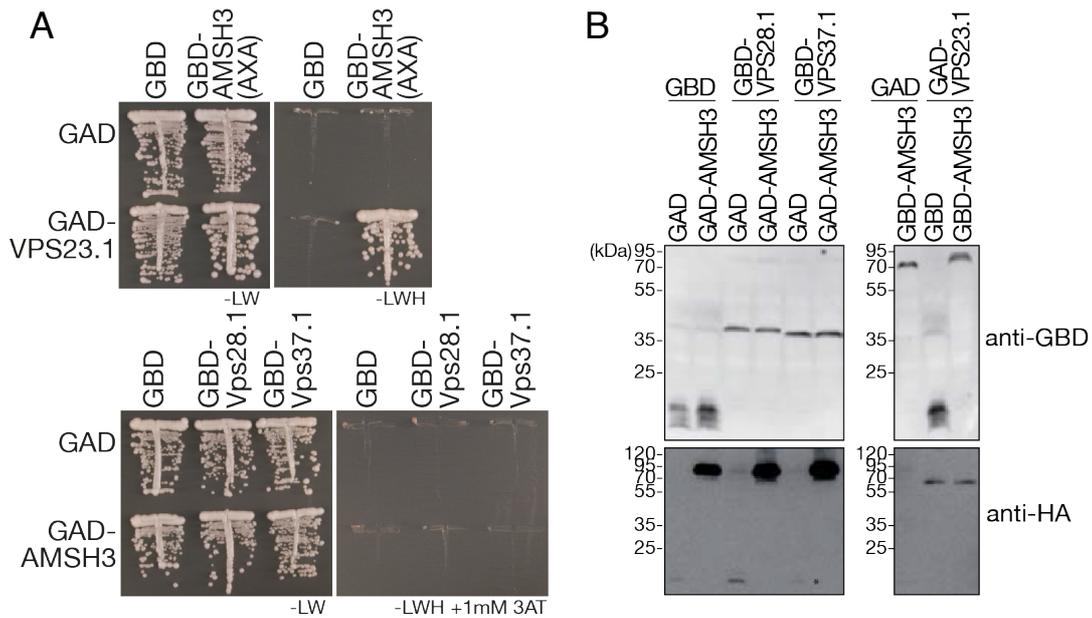


Abbildung 16: AMSH3 interagiert mit ESCRT-I

A) Y2H-Interaktionsstudie der Vollängenproteine AMSH3 mit den drei Untereinheiten des ESCRT-I Komplexes. Hefetransformanten wurden jeweils auf Medium angezogen ohne Leucin und Tryptophan (-LW) und ohne Leucin, Tryptophan und Histidin (-LWH) versetzt mit und ohne 1 mM 3-Amino-1,2,4-triazole (3AT), um deren auxothrophes Wachstum zu testen. Die Leervektoren dienten als negative Kontrollen. B) Die Expression der Fusionsproteine in Hefe wurde mittels Westernblot kontrolliert. Die Proteine wurden aus den Hefezellen, die für den Y2H verwendet wurden, extrahiert und mittels Antikörper gegen GBD und HA (GAD-Konstrukte) visualisiert. (Diese Y2H-Analyse wurde von Franziska Anzenberger durchgeführt).

wildtypischen GAD-AMSH3 verwendet wurden. Mit den anderen Untereinheiten GBD-VPS28.1 und GBD-VPS37.1 wurde keine Interaktion gefunden (Abbildung 15A, unteres Bild). Die Expression der Proteine in Hefe wurde auch hier kontrolliert, in dem eine Proteinextraktion aus Hefe durchgeführt wurde und die Proteine mittels Westernblot detektiert wurden (Abbildung 16B).

Die Interaktion zwischen AMSH3 und VPS23.1 konnte in einem *in vitro* Affinitätstest verifiziert und als direkte Interaktion zwischen den beiden Proteinen identifiziert werden (Abbildung 17). Des Weiteren konnte auch eine *in vivo* Interaktion in einer Koimmunpräzipitation festgestellt. Bei der Immunpräzipitation (IP) von VPS23.1-HA aus Gesamtproteinrohextrakt von Arabidopsis-Keimlingen konnte endogenes, koimmunpräzipitiertes AMSH3 in der Westernblotanalyse detektiert werden (Experiment von Dr. Kamila Kalinowska in (Nagel et al., 2017)). Für AMSH3 wurde in unserem Labor sowohl eine Kolokalisation zu späten endosomalen Markern gezeigt (Wang et al., 2009) als auch eine Kolokalisation mit CLATHRIN-LIGHT-CHAIN (CLC) (Experiment von Dr. Kamila Kalinowska in (Nagel et al., 2017)). Das humane AMSH besitzt eine Clathrin-bindende Domäne (Nakamura et al., 2006), die in den pflanzlichen AMSH-Proteinen nicht identifiziert werden konnte. Die Kolokalisation mit Clathrin sowie die Interaktion mit der ESCRT-I Untereinheit VPS23.1 deutet jedoch stark auf

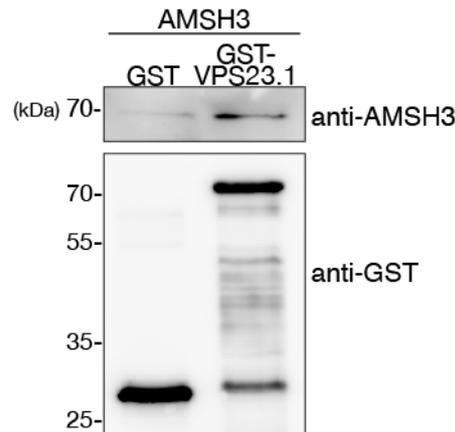


Abbildung 17: AMSH3 und VPS23 interagieren direkt miteinander

In vitro Affinitätstest der Proteine GST und GST-VPS23.1 mit AMSH3 zur Untersuchung einer direkten Interaktion zwischen den beiden Proteinen. GST alleine diente als negative Kontrolle. 80 pmol rekombinant hergestelltes Protein wurde in gleicher Menge eingesetzt. Die Proteine wurden mittels anti-GST- und anti-AMSH3-Antikörpern im Westernblot detektiert (Dieses Experiment wurde von Dr. Kamila Kalinowska wiederholt und reproduziert).

eine Beteiligung von AMSH3 im frühen endosomalen Transportweg hin und lässt den Schluss zu, dass trotz der unterschiedlichen Domänenstruktur auch die Funktionen der AMSH-Proteine im frühen endosomalen Transport in Arabidopsis konserviert sein könnte.

2.2 SH3P2 fungiert in der Clathrin-vermittelten Endozytose

2.2.1 SH3P2 kolokalisiert *in planta* mit Clathrin

Des weiteren ergab sich nun die Frage, ob auch SH3P2 im endosomalen Transport von Plasmamembranproteinen eine Rolle spielt und ob es mit endosomalen Markern kolokalisieren kann. Das zu SH3P2 homologe Protein SH3P1 wurde in einer elektronenmikroskopischen Immunlokalisierung an Clathrin-umhüllten Vesikeln (CCVs) lokalisierend gefunden (Lam et al., 2001). Ein GFP markiertes SH3P2, *SH3P2pro:SH3P2-GFP* (hergestellt von Mie Ichikawa, Labor von Masa H. Sato, Department of Life and Environmental Science Kyoto), lokalisiert an der Plasmamembran und auf punktförmigen Strukturen (Abbildung 18A, (Kolb et al., 2015)).

Um heraus zu finden, um welche Art von Strukturen es sich hierbei handelt, wurde eine Lokalisationsstudie in Wurzelzellen durchgeführt. Hierfür wurde die transgene Pflanzenlinie, mit dem Konstrukt *SH3P2pro:SH3P2-GFP*, mit Pflanzenlinien gekreuzt, die verschiedene endosomale Marker exprimierten. Dabei handelte es sich um Eigen-

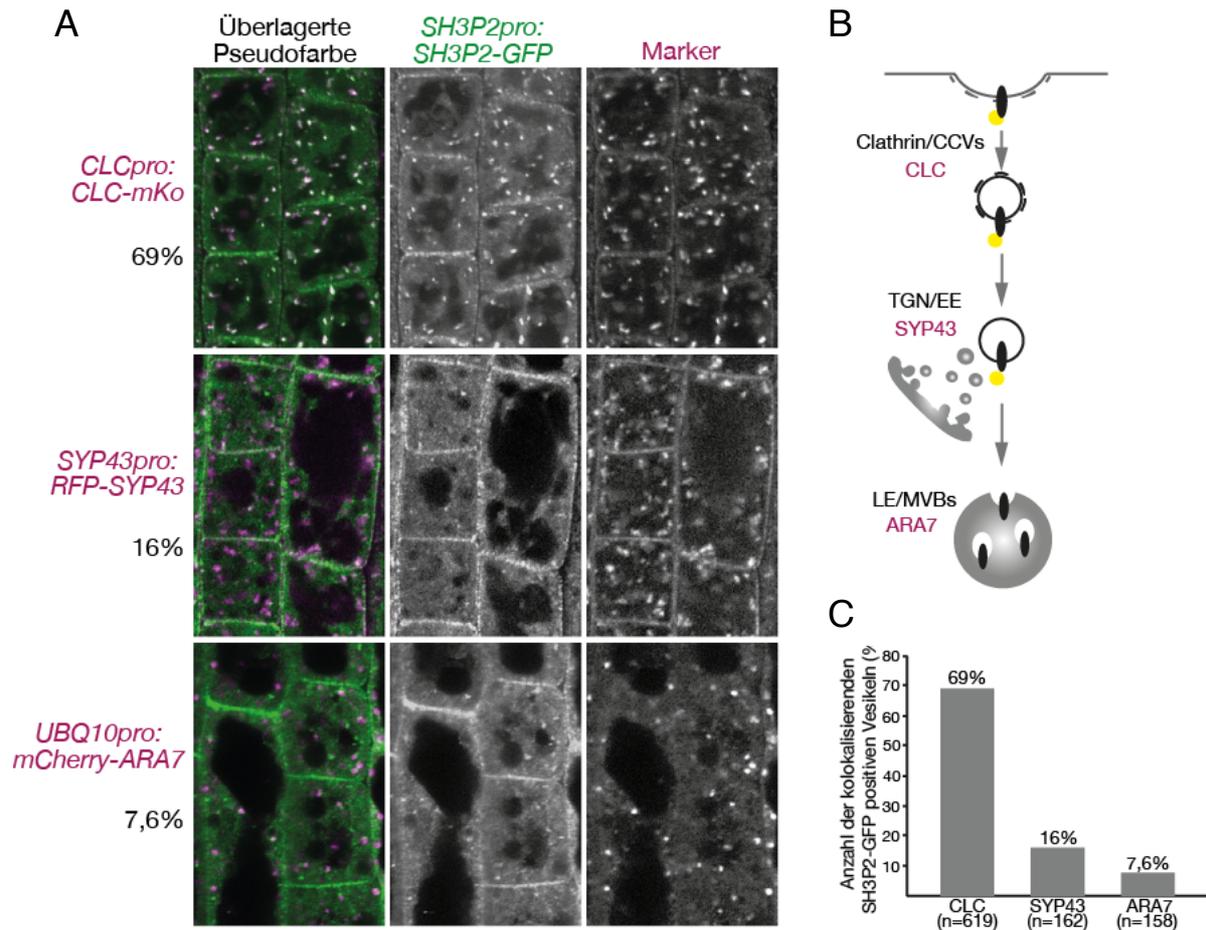


Abbildung 18: SH3P2-GFP kolokalisiert mit CLC-mKO in planta

A) Kolokalisationsstudie von SH3P2-GFP und verschiedenen endosomalen Markern in Arabidopsis Wurzelepidermiszellen. SH3P2-GFP wurde zusammen mit CLC-mKO als Marker für Clathrin-positive Strukturen, mRFP-SYP43 als Marker für TGN oder frühe Endosomen (EE) und mCherry-ARA7 als Marker für späte Endosomen (LE) und MVBs exprimiert. Die Fluoreszenzsignale der Proteine wurden unter dem Konfokalmikroskop analysiert. Vesikel die für beide Signale positiv waren, Grün und Magenta, sind in der überlagerten Pseudofarbe weiß dargestellt. B) Schematische Darstellung der Endosomen im endosomalen Transports und die jeweilige Positionierung der Marker. C) Quantitative Analyse von SH3P2-positiven Vesikeln, die mit den jeweiligen endosomalen Markern kolokalalisieren, CLC-mKO (n=619), RFP-SYP43 (n=162) und mCherry-ARA7 (n=158) kolokalalisieren. n gibt die Anzahl der gezählten SH3P2-GFP positiven Strukturen an.

Promotor exprimierte Konstrukte für CLC-mKO als Marker für Clathrin und CCVs, RFP-SYP43 als Marker für TGN bzw. frühe Endosomen (EE) und um ein unter dem UBQ10 Promotor exprimiertes Konstrukt für mCherry-ARA7 als spät-endosomalen Marker (Abbildung 18B). Alle Markerproteine trugen ein rotes Fluoreszenzprotein.

Wie in Abbildung 18A und B zu sehen, gab es eine hohe Kolokalisationsrate von SH3P2-GFP markierten Strukturen mit CLC-mKO positiven Strukturen. 69 % der SH3P2 positiven punktförmigen Anordnungen kolokalisierten mit CLC, während die Kolokalisation zum TGN/EE Marker RFP-SYP43 und zum späten endosomalen Marker mCherry-ARA7 gering ausfiel. Nur jeweils 16 % und 7,9 % der SH3P2 positiven

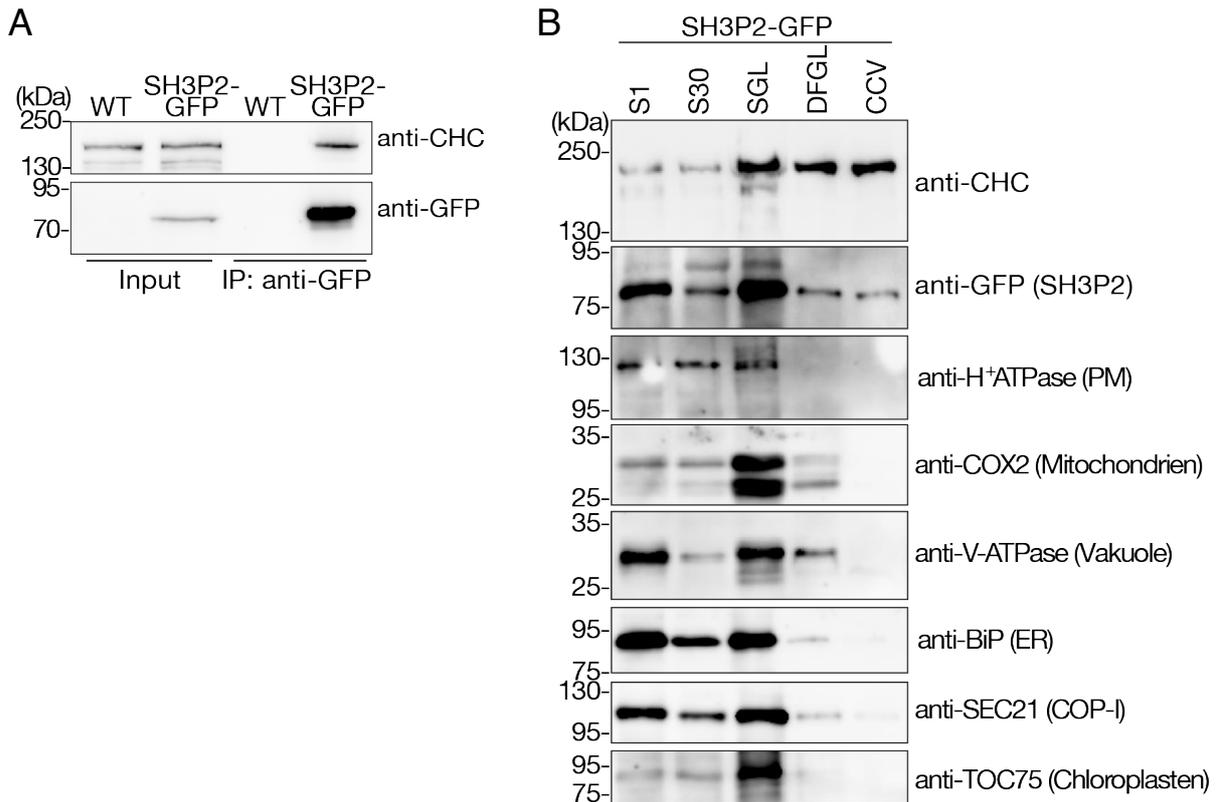


Abbildung 19: SH3P2-GFP ist mit Clathrin assoziiert

A) Koimmunpräzipitation von endogenem Clathrin heavy chain (CHC) aus Gesamtproteinextrakt von SH3P2-GFP-exprimierenden und wildtypischen Arabidopsiskeimlingen mittels anti-GFP magnetischer Agarose (IP:anti-GFP). B) CCVs wurde aus Gesamtproteinextrakt sieben-Tage-alter Keimlinge isoliert. Die Proben wurden in jedem Schritt des Procedere während der gesamten CCV-Aufreinigung gesammelt, um sie später mittels Antikörperdetektion gegen anti-CHC, anti-GFP und verschiedene subzelluläre Marker im Westernblot zu analysieren. S1: Überstand nach 1.000 *g* Zentrifugation; S30: Überstand nach 30.000 *g* Zentrifugation; SGL: Saccharose-Stepgradient-Beladung; DFGL: linearer Ficoll/Deuterium-Oxid-Gradient-Beladung; CCV: finale Fraktion der gereinigten CCVs. Folgende Antikörper wurden als Organellen- bzw. Kompartimenten-spezifische Marker verwendet: anti-H⁺-ATPase (PM: Plasmamembran), anti-COX2 (Mitochondrien: innere mitochondriale Membrane); anti-V-ATPase (vakuoläre Membran); anti_BiP (ER: Endoplasmatisches Retikulum); anti-SEC21 (COPI: COPI-Vesikel) und anti-TOC75 (Chloroplasten: innere Chloroplastenmembran).

Strukturen kolokalisierten mit mRFP-SYP43 und mCherry-ARA7 (Abbildung 18A und B) (Kolb et al., 2015).

Die Clathrin-positiven Strukturen erscheinen hier sehr groß. Es ist zu vermuten, dass es sich bei den großen Strukturen nicht um vesikuläre Strukturen handelt. Eventuell führt die Expression von CLC-mKO zu einer Aggregation von CCVs, auf denen auch die Lokalisation von SH3P2 stabilisiert wird. Es ist nicht auszuschließen, dass SH3P2 trotz fehlender Kolokalisation mit SYP43 vielleicht auch auf Clathrin-positiven Strukturen lokalisiert ist, die vom TGN abgeschnürt werden. Dies könnte in zukünftigen Experimenten zum Beispiel mittels Immunogold-Lokalisationsstudien unter dem Elektronenmikroskop untersucht werden.

2.2.2 SH3P2 interagiert mit CLATHRIN HEAVY CHAIN (CHC) *in vivo* und kofraktioniert mit CHC in der CCV-Fraktion.

Da *in planta* eine Kolo-kalisation von SH3P2 mit Clathrin gezeigt werden konnte, sollte untersucht werden, ob *in vivo* eine Interaktion zwischen SH3P2 und Clathrin stattfindet. Hierzu wurde eine anti-GFP-IP mit Gesamtproteinextrakt aus SH3P2-GFP-exprimierenden, sieben Tage alten Keimlingen durchgeführt. Wie der Westernblot in Abbildung 19A zeigt, wurde CHC in der anti-GFP-IP zusammen mit SH3P2-GFP koimmunpräzipitiert, was für eine *in vivo* Interaktion beider Proteine spricht. Um eine unspezifische Bindung von CHC an die anti-GFP-Agarose ausschließen zu können, wurde Gesamtproteinextrakt aus wildtypischen (WT) Keimlingen als negativ-Kontrolle verwendet. Die gezeigte *in vivo* Interaktion zwischen SH3P2 und CHC bestärkte die Annahme, dass SH3P2 eine Funktion in der Clathrin-vermittelten Endozytose ausübt. Um festzustellen, ob SH3P2 mit CCVs assoziiert ist, wurde eine CCV-Isolierung bzw. -Aufreinigung durchgeführt. Die CCVs wurden mittels verschiedener Ultrazentrifugations-Schritte und Gradient-Fraktionierungen aus sieben Tage alten, SH3P2-GFP-exprimierenden Keimlingen isoliert. Wie auf dem Westernblot in Abbildung 19B zu sehen, fraktionierte SH3P2-GFP gemeinsam mit CHC in der CCV-Fraktion. Dies war ein eindeutiger Beweis dafür, dass SH3P2 mit CCVs assoziiert sein muss und eventuell sogar innerhalb des Clathrin-Mantels lokalisiert ist.

Um zu testen, ob in dieser Aufreinigung die CCV-Fraktion mit anderen Organellen und deren Membranen und Membran-assoziierten Proteinen verunreinigt waren, wurden zur Kontrolle verschiedene andere Membran-assoziierte Proteine mittels Westernblot detektiert. Folgende Antikörper wurden als Organellen- bzw. Kompartimentenspezifische Marker verwendet. Als Plasmamembran (PM)-Marker diente ein anti-H⁺-ATPase Antikörper. Der anti-COX2 Antikörper detektiert das Membranprotein CYTOCHROME C OXIDASE SUBUNIT 2 (COX2) der inneren mitochondrialen Hülle. Als Vakuolenmarker wurde ein Antikörper gegen eine vakuoläre H⁺-ATPase, die V-ATPase, genutzt. Als Marker für das Endoplasmatisches Retikulum (ER) diente BINDING IMMUNOGLOBULIN PROTEIN 2 (BIP2). SECRETORY 21 (SEC21) ist eine Untereinheit des COPI-Vesikel Coatomers und TRANSLOCON OF THE OUTER ENVELOPE OF CHLOROPLASTS 75 (TOC75) ein Membranprotein der äußeren Chloroplastenmembran. Die Westernblotanalyse zeigte, dass außer einer sehr geringen Menge SEC21 keines dieser Proteine in der CCV-Fraktion detektiert werden konnte. Die gereinigten CCVs enthielten demnach keine nennenswerten Anteile sonstiger Organellen-Membranen (Abbildung 19B).

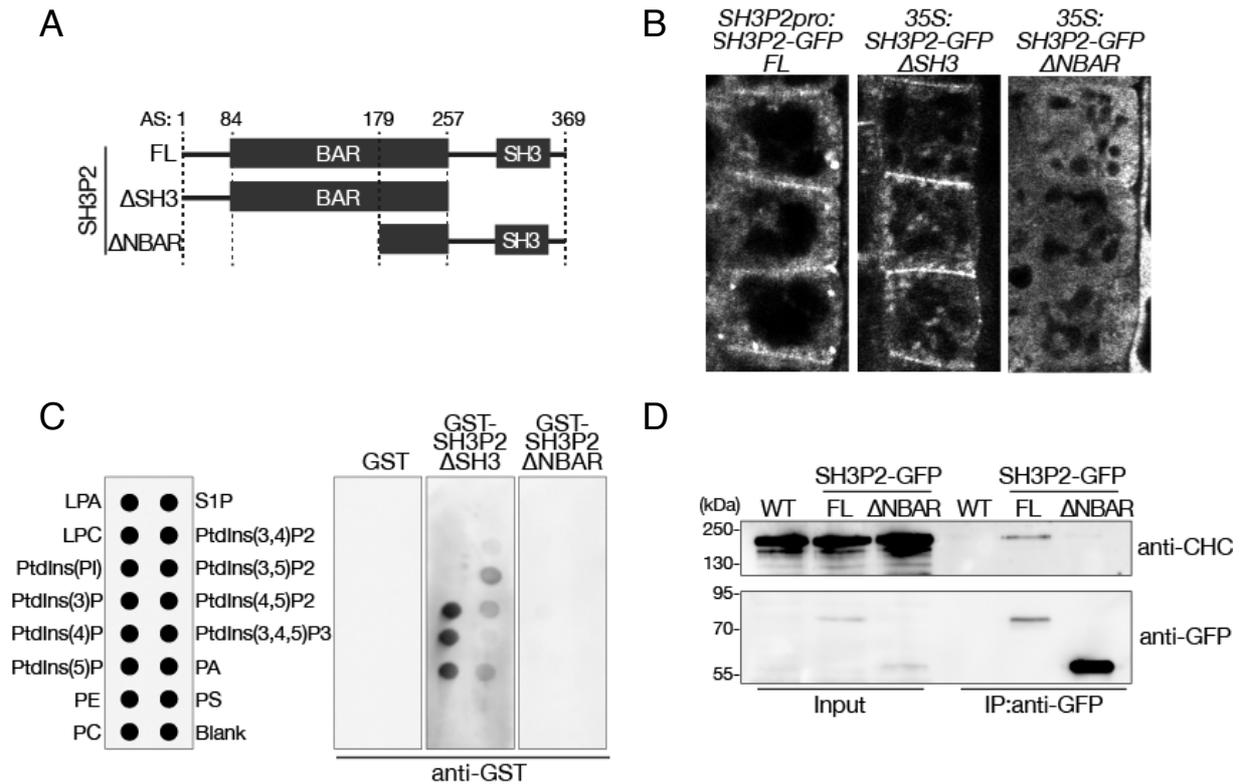


Abbildung 20: Die BAR-Domäne ist essentiell für die Lokalisation an der Plasmamembran und für die Interaktion mit Clathrin

A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur von SH3P2 und der in B)-D) verwendeten SH3P2-Fragmente.

B) Lokalisation des Vollängenproteins SH3P2-GFP (FL) und den jeweiligen Fragmenten SH3P2(Δ SH3)-GFP und SH3P2(Δ NBAR)-GFP in sieben Tage alten Arabidopsis Wurzelepidermiszellen. Es ist zu beachten, dass SH3P2(Δ NBAR)-GFP die Lokalisation an der Plasmamembran und an Endosomen verliert.

C) PIP-Strip-Analyse der Fragmenten GST-SH3P2(Δ SH3) und GST-SH3P2(Δ NBAR). Als negativ-Kontrolle wurde GST alleine verwendet. Im linken Schema ist die Beladung des PIP-Strips der Firma Echelon mit den verschiedenen Phosphoinositiden gezeigt. Anordnung der Phosphoinositide auf dem PIP-Strip. LPA: Lysophosphatide, LPC: Lysophosphatidylcholine, PtdIns(PI): Phosphatidylinositol, PtdIns(3)P: Phosphatidylinositol(3)phosphate, PtdIns(4)P: Phosphatidylinositol(4)phosphate, PtdIns(5)P, Phosphatidylinositol(5)phosphat, PE: Phosphatidylethanolamin, PC: Phosphatidylcholin, S1P: Sphingosine 1-phosphate, PtdIns(3,4)P2: Phosphatidylinositol(3,4)bisphosphate, PtdIns(3,5)P2, Phosphatidylinositol(3,5)bisphosphat, PtdIns(4,5)P2: Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphat, PtdIns(3,4,5)P3: Phosphatidylinositol(3,4,5)triphosphat, PA: Phosphatidsäure, PS: Phosphatidylserin. Das rechte Bild zeigt die PIP-Strip-Analyse mit GST, GST-SH3P2(Δ SH3) und GST-SH3P2(Δ NBAR). Die PIP-Strips wurden jeweils mit 0,5 μ g/ml Protein inkubiert und anschließend die gebundenen Proteine mittels anti-GST detektiert.

D) Koimmunpräzipitation von endogenem CLATHRIN HEAVY CHAIN (CHC) aus Gesamtproteinextrakt von SH3P2-GFP (FL) und SH3P2(Δ NBAR)-GFP exprimierenden und wildtypischen Keimlingen mittels anti-GFP magnetischer Agarose (IP:anti-GFP). Mit SH3P2(Δ NBAR)-GFP wurde kein CHC koimmunpräzipitiert.

2.2.3 Die BAR-Domäne von SH3P2 ist essenziell für die *in vivo* Lokalisation an Membranen

SH3P2 enthält eine BAR-Domäne, welche in anderen Organismen Phosphoinositide und somit Membranen bindet. Um zu testen, ob die BAR-Domäne von SH3P2 für dessen Lokalisation an der Plasmamembran und auf Vesikeln notwendig ist, wurden Deletionskonstrukte von SH3P2 hergestellt (Abbildung 20A). Die Lokalisation des N-

terminale Fragments SH3P2(Δ SH3)-GFP war, von der Lokalisation des Volllängenproteins nicht zu unterscheiden. Das C-terminale Fragment SH3P2(Δ NBAR)-GFP hingegen verlor die Lokalisation an der Plasmamembran völlig (Abbildung 20B). Dieses Resultat wird von dem Ergebnis gestützt, dass rekombinant aufgereinigtes GST-SH3P2(Δ SH3) *in vitro* Phosphoinositide bindet, aber das N-terminale Fragment GST-SH3P2(Δ NBAR) nicht (Abbildung 20C, Bachelor-Arbeit von Stephanie Hühn). Dieses Ergebnis zeigt, dass die N-terminalen Aminosäuren 1-179 essentiell für die Bindung an Phosphoinositide sind.

Es wurde des weiteren getestet, ob SH3P2 seine *in vivo* Interaktion mit Clathrin verliert, wenn die BAR-Domäne größten Teils entfernt wird. Dazu wurde eine GFP-IP mit Pflanzenrohextrakt aus der SH3P2(FL)-GFP- und der oben genannten SH3P2(Δ NBAR)-GFP-Pflanzenlinie durchgeführt und festgestellt, dass keine *in vivo* Interaktion zwischen SH3P2(Δ NBAR)-GFP und CHC mehr stattfindet.

Zusammen mit den oben aufgeführten Ergebnissen für die Lokalisation zeigte dieses Ergebnis, dass die BAR-Domäne für die stabile Interaktion zwischen SH3P2 und Clathrin unerlässlich ist und auch für die Fähigkeit von SH3P2 Membranen zu binden, ausschlaggebend ist (Abbildung 20D).

2.3 SH3P2 besitzt die Fähigkeit als Ubiquitin-Adapterprotein im endosomalen Transport zu agieren

2.3.1 SH3P2 bindet bevorzugt K63-gekoppelte Ubiquitinketten

In der Literatur wurde gezeigt, dass die SH3-Domänen mancher Proteine Monoubiquitin binden können (He et al., 2007; Stamenova et al., 2007; Ortega Roldan et al., 2013). Um heraus zu finden, ob SH3P2 eventuell eine Ubiquitin-bindende Funktion haben kann, wurden *in vitro* Affinitätstests mit dem Volllängenprotein und verschiedenen Fragmenten von SH3P2 (Abbildung 21A) gegen verschiedene Tetra-Ubiquitinkonjugate (Ubiquitinketten bestehend aus vier Ubiquitinmolekülen [Ub₄]) durchgeführt. Das MBP-markierte SH3P2 (MBP-SH3P2) bindet *in vitro* K63-gekoppelte Tetra-Ubiquitinketten (K63), aber es bindet weder linear- (L), noch K48-gekoppeltes Tetra-Ubiquitin (K48) (Abbildung 21B).

Weitere Experimente zeigten, dass das Fragment GST-SH3P2(SH3) ausreichend ist, um K63-gekoppelte Tetra-Ubiquitinketten mit einer stärkeren Affinität zu binden als K48-Ubiquitinkonjugate oder linear-gekoppelte Ubiquitinketten. Die SH3-Domäne

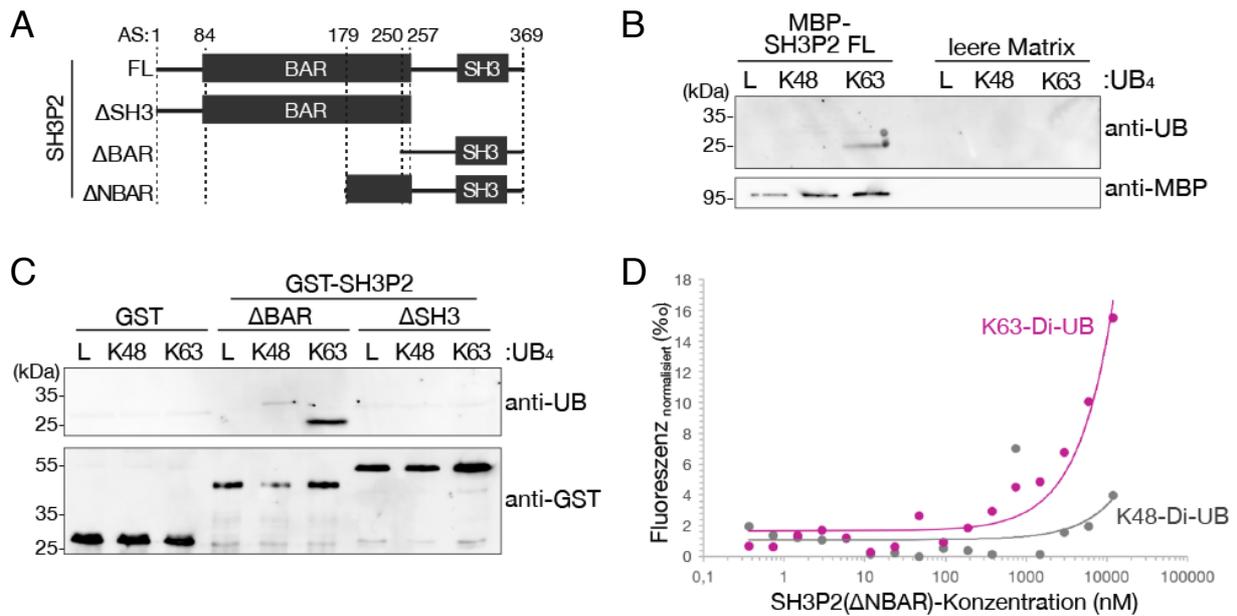


Abbildung 21: SH3P2 bindet bevorzugt K63-gekoppelte Ubiquitinketten

A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur von SH3P2 und dessen Deletionsproteinen, die in B) bis D) verwendet wurden. B) *in vitro* Terta-Ubiquitin Affinitätstest mit rekombinarem MBP-SH3P2. Gleiche Proteinmengen (25 pmol) von Resin-gebundenem MBP-SH3P2(FL) und jeweils linearem (L), K48-gekoppeltem (K48) oder K63-gekoppeltem (K63) Tetra-Ubiquitin (UB₄) wurden zusammen inkubiert und die Interaktion in einem Westernblot mittels anti-Ubiquitin (P4D1) analysiert. Leeres Amylose-Resin diente als negative Kontrolle, um unspezifische Bindung von Tetra-Ubiquitin ausschließen zu können. C) *in vitro* Terta-Ubiquitin Affinitätstest mit rekombinarem GST-SH3P2(ΔBAR) und GST-SH3P2(ΔSH3). GST diente als negative Kontrolle. Gleiche Proteinmengen (80 pmol) von Agarose-gebundenem GST-SH3P2 Fragmenten oder GST wurden jeweils zusammen mit linearem (L), K48-gekoppeltem (K48) oder K63-gekoppeltem (K63) Tetra-Ubiquitin inkubiert und die Interaktion in einer Westernblot mittels anti-Ubiquitin (P4D1) analysiert. Es ist anzumerken, dass SH3P2 sowohl in B) wie auch in C) bevorzugt mit K63-gekoppeltem Tetra-Ubiquitin interagiert. D) Messung der Interaktion zwischen SH3P2(ΔNBAR) und Di-Ubiquitin in der Microscale-Thermophoresis (MST). Rote Linie: Messung der Thermophorese von K63-gekoppelten Di-Ubiquitin bei Titration von SH3P2(ΔNBAR); schwarze Linie: Messung der Thermophorese von K48-gekoppelten Di-Ubiquitin bei Titration von SH3P2(ΔNBAR). Es ist anzumerken, dass für K63-Di-UB eine deutliche Veränderung der Fluoreszenz zu beobachten war, während für K48-Di-UB sich der Wert nicht signifikant änderte.

scheint, der Ubiquitin-bindende Bereich von SH3P2 zu sein, da das Deletionskonstrukt GST-SH3P2(ΔSH3) keines der Ubiquitinkonjugate binden konnte (Abbildung 21C).

Die Interaktion konnte auch mit Hilfe der Microscale Thermophoresis (MST)-Methode gezeigt werden. Hierbei handelt es sich um eine fluoreszenz-basierte Methode, bei der die Bewegung eines fluoreszenz-markierten Proteins in einem thermophoretischen Feld beobachtet wird. Bei Interaktion zweier Proteine verändert sich deren Bewegung und diese Veränderung kann an Hand der Fluoreszenz beobachtet und gemessen werden. Der Anstieg der Fluoreszenzkurve in Abbildung 21D zeigte in diesem Fall die Bindung zwischen SH3P2(ΔNBAR) und K63-gekoppeltem Di-Ub an. Für das rekombinant hergestellte GST-SH3P2(ΔBAR) wurde auch gezeigt, dass es endogenes

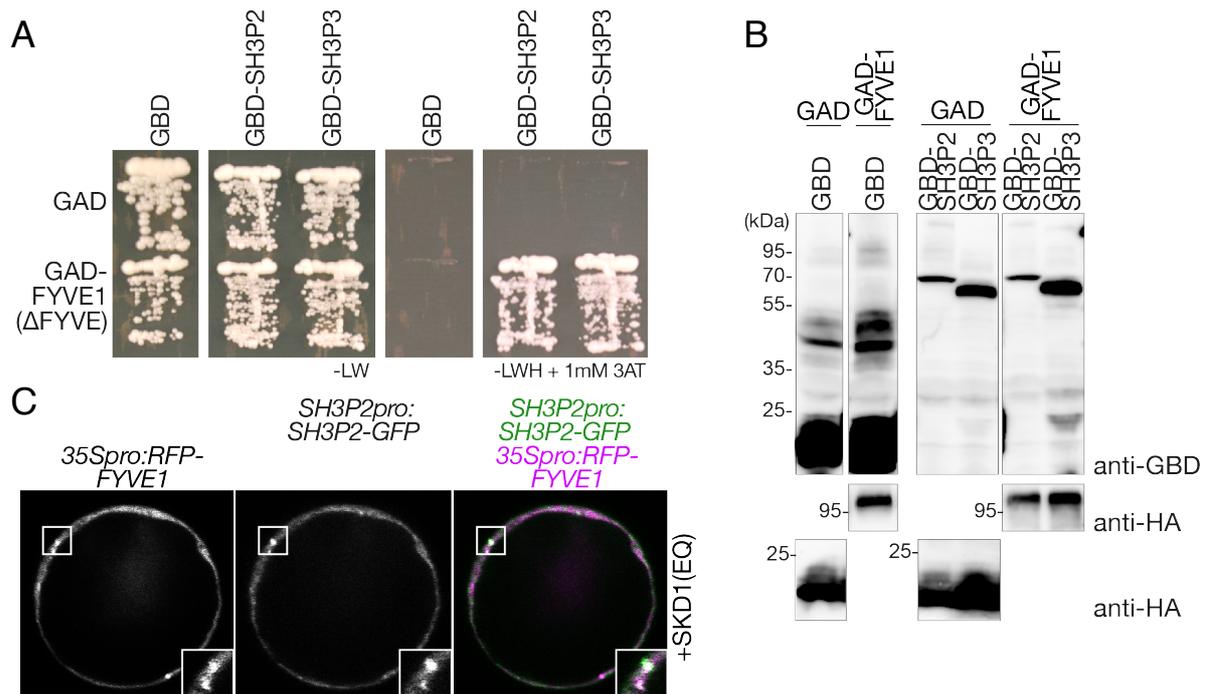


Abbildung 22: SH3P2 interagiert mit FYVE1 im Y2H-Assay und ist mit FYVE1 auf SKD1(EQ)-induzierten Kompartimenten kolokalisiert

A) Y2H-Interaktionsstudie der Vollängenproteine GBD-SH3P2 und GBD-SH3P3 mit GAD-FYVE1(Δ FYVE). Hefetransformanten wurden jeweils auf Medium angezogen ohne Leucin und Tryptophan (-LW) und ohne Leucin, Tryptophan und Histidin (-LWH) versetzt mit 1 mM 3-Amino-1,2,4-triazole (3AT), um deren auxotrophes Wachstum zu testen. Die Leervektoren dienten als negativ-Kontrollen. Die Expression der Konstrukte in Hefe wurde mittels Westernblot kontrolliert (Nagel et al., 2017). B) Die Expression der Konstrukte in Hefe wurde mittels Westernblot kontrolliert. Die Proteine wurden aus den Hefezellen, die für den Y2H verwendet wurden, extrahiert und mittels Antikörper gegen GBD und HA (GAD-Konstrukte) visualisiert. C) $35Spro::TagRFP-FYVE1$ und $SH3P2pro::SH3P2-GFP$ wurden zusammen mit SKD1(EQ) in Arabidopsis Wurzelzellprotoplasten exprimiert und die Zellen im Konfokalmikroskop beobachtet. RFP-FYVE1 und SH3P2-GFP kolokalisieren in den SKD1(EQ)-induzierten Kompartimenten.

Ubiquitin aus Pflanzenrohextrakt bindet (Experiment von Karin Vogel in (Nagel et al., 2017)). Alle Resultate zeigten, dass SH3P2 die Fähigkeit hat K63-Ubiquitinkonjugaten zu binden. Zusammen mit den oben aufgeführten Ergebnissen der zellbiologischen und biochemischen Analysen führte dies zur Annahme, dass SH3P2 eine Rolle bei der Bindung von ubiquitinylierten Proteinen im Endomembrantransport spielen kann.

2.3.2 SH3P2 zeigt Binde-Affinität zu anderen Proteinen, die mit ESCRT-Komponenten assoziiert sind

Um die physiologische Funktion von SH3P2 zu verstehen, wurde dessen Interaktion mit verschiedenen anderen Ubiquitin-bindenden Proteinen aus dem endosomalen Transportweg untersucht. SH3P2 wurde unter anderem in einem Y2H-Screeningverfahren mit GBD-FYVE1(Δ FYVE) als potenzieller Interaktionspartner von FYVE1 gefunden (Kolb et al., 2015). Für FYVE1 wurde eine direkte Ubiquitinbindung

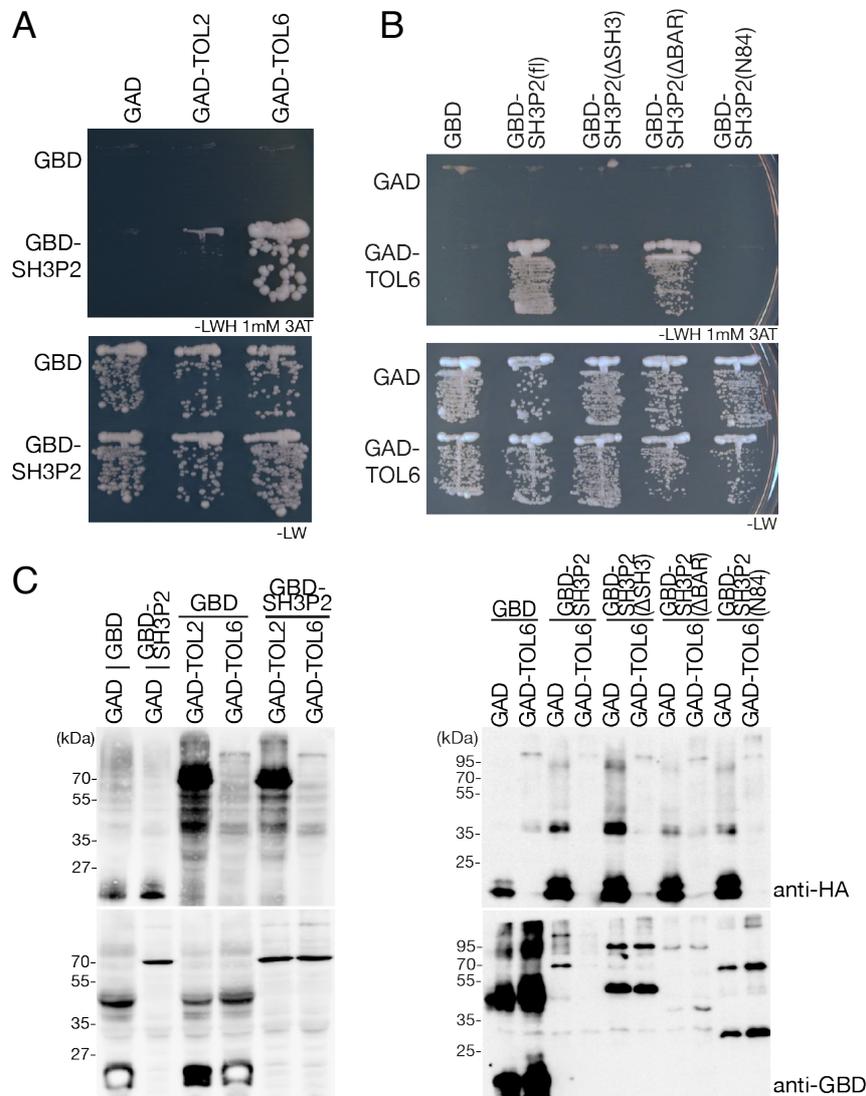


Abbildung 23: SH3P2 interagiert mit TOL6 im Y2H-Assay

A) Y2H-Interaktionsstudie des GBD fusionierten SH3P2 Volllängenproteins mit den beiden homologen GAD-TOL2 und GAD-TOL6. Hefetransformanten wurden jeweils auf Medium angezogen ohne Leucin und Tryptophan (-LW) und ohne Leucin, Tryptophan und Histidin (-LWH) versetzt mit 1 mM 3-Amino-1,2,4-triazole (3AT), um deren auxotrophes Wachstum zu testen. Die Leervektoren dienten als negative Kontrollen. B) Y2H-Interaktionsstudie der GBD fusionierten SH3P2 Fragmente GBD-SH3P2(Δ SH3) und GBD-SH3P2(Δ BAR) mit GAD-TOL6. Hefetransformanten wurden jeweils auf Medium angezogen ohne Leucin und Tryptophan (-LW) und ohne Leucin, Tryptophan und Histidin (-LWH) versetzt mit 1 mM 3-Amino-1,2,4-triazole (3AT), um deren auxotrophes Wachstum zu testen. Die Leervektoren dienten als negative Kontrollen. D) Die Expression der Konstrukte in Hefe wurde mittels Westernblot kontrolliert. Die Proteine wurden aus den Hefezellen, die für den Y2H verwendet wurden, extrahiert und mittels Antikörper gegen GBD und HA (GAD-Konstrukte) visualisiert.

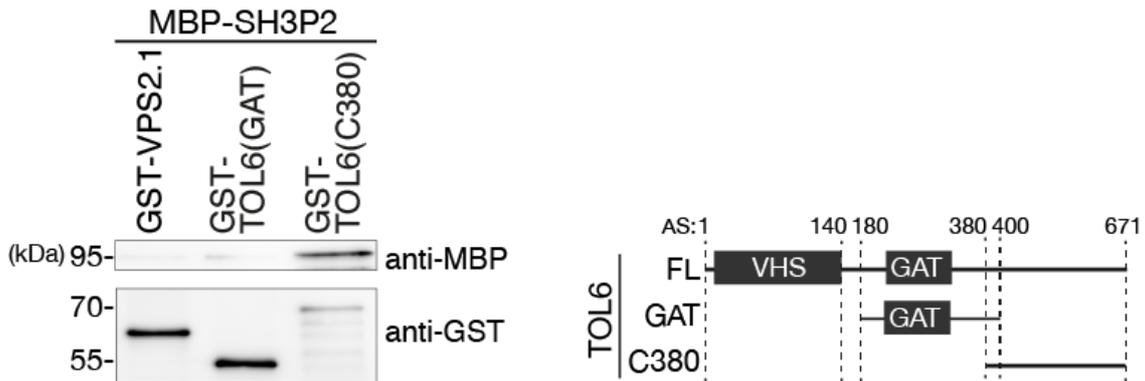


Abbildung 24: SH3P2 interagiert direkt mit dem C-Terminus von TOL6 im *in vitro* Affinitätstest

Links *in vitro* Affinitätstest der TOL6-Fragmente GST-TOL6(GAT) und GST-TOL6(C380) mit MBP-SH3P2 zur Untersuchung einer direkten Interaktion zwischen den beiden Proteinen. GST-VPS2.1 diente als negative Kontrolle. Rechts, schematisch abgebildet die Fragmente von TOL6, die im *in vitro* Affinitätstest verwendet wurden. 65 pmol Protein wurde in gleicher Menge eingesetzt.

und eine Interaktion mit VPS23 gezeigt und es wird neben einer Funktion im späten endosomalen Transportweg und in der AUTOPHAGY-RELATED GENE 8 (ATG8)-abhängigen Autophagie auch eine Funktion als Ubiquitin-Adapterprotein angenommen (Gao et al., 2014; Gao et al., 2015).

Um die Interaktion der beiden Proteine zu bestätigen, wurde eine direkte Y2H-Analyse durchgeführt. Dabei zeigten GAD-SH3P2 und GAD-SH3P3 eine Interaktion mit GBD-FYVE1(Δ FYVE) (Abbildung 22A). Die Expression der Fusionsproteine in Hefezellen wurde wieder mittels Westernblotanalyse bestätigt (Abbildung 22B). Um zu ermitteln, ob die Proteine auch in der pflanzlichen Zelle miteinander interagieren könnten, wurde die Lokalisation beider Proteine in Protoplasten untersucht. Dabei zeigten sich beide Proteine kolokalisierend in SKD1(EQ)-induzierten Kompartimenten (Abbildung 22C) (Kolb et al., 2015). Eine direkte Interaktion und eine Interaktion *in planta* wurde bislang noch nicht untersucht, dies muss in zukünftigen Experimenten ermittelt werden, um eine Aussage über die gemeinsamen Funktionen von SH3P2 und FYVE1 treffen zu können. Die Lokalisation beider Proteine in SKD1(EQ)-induzierten Kompartimenten spricht für eine gemeinsame Funktion an späten Endosomen. Weitere Analysen sollten sich auch auf die Funktion von SH3P2 an MVBs beziehen.

SH3P2 zeigte in der Y2H-Analyse auch eine Interaktion mit dem Ubiquitin-Adapterprotein TOL6 (Abbildung 23A). Die Expression der Proteine in Hefe wurde wieder kontrolliert, indem eine Proteinextraktion aus Hefe durchgeführt wurde und GBD-SH3P2 und GAD-TOL2 und GAD-TOL6 mittels Westernblot detektiert wurden (Abbildung 23B). Die SH3-Domäne von SH3P2 scheint der mit TOL6 interagierende Teil zu sein, wie die Y2H-Analyse in Abbildung 23B zeigt. Das Konstrukt

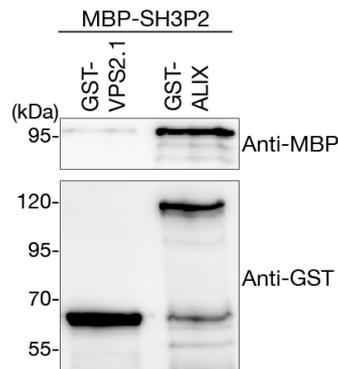


Abbildung 25: SH3P2 interagiert direkt mit ALIX im *in vitro* Affinitätstest

In vitro Affinitätstest der Proteine GST-ALIX und GST-VPS2.1 mit MBP-SH3P2 zur Untersuchung einer direkten Interaktion zwischen den beiden Proteinen. GST-VPS2.1 diente als negative Kontrolle. 80 pmol Protein wurde in gleicher Menge eingesetzt.

SH3P2(Δ BAR) interagierte wie das Volllängenprotein mit TOL6, während SH3P2(Δ SH3) die Interaktion zu TOL6 verlor. Die Expression der Proteine in Hefe wurde nach Aufschluss der transformierten Hefekolonien mittels Westernblot überprüft (Abbildung 23C).

Die Domänenanalyse im Y2H-Test gab bereits einen starken Hinweis darauf, dass die Interaktion zwischen den beiden Proteinen eine direkte Interaktion sein könnte. Daher sollte die direkte Interaktion im *in vitro* Affinitätstest untersucht werden. Die *in vitro* Affinitätsanalyse der gereinigten, rekombinant exprimierten Proteine zeigte, dass der C-Terminus von TOL6 die Bindung zu SH3P2 vermittelt und dass es sich um eine direkte Interaktion zwischen den beiden Proteinen handelt (Abbildung 24).

Ebenso gibt es eine direkte Interaktion von SH3P2 mit dem Arabidopsis Homolog von ALG-2-INTERACTING PROTEIN X (ALIX) (Abbildung 25). Für ALIX wurde in Arabidopsis gezeigt, dass es auf späten Endosomen lokalisiert, *in vitro* und *in vivo* mit AMSH3 interagiert und für dessen Rekrutierung und Lokalisation zu späten Endosomen essentiell ist (Kalinowska et al., 2015). Jüngst wurde ALIX auch in einem Y2H-Screeningverfahren als potentieller Interaktionspartner der ESCRT-I Untereinheit VPS23 gefunden (Richardson et al., 2011).

Für die beiden Ubiquitin-bindenden Proteine, ALIX und FYVE1, gibt es Hinweise, dass diese Proteine nicht nur im späten, sondern auch im frühen vakuolären Transportweg eine Funktion haben können (Richardson et al., 2011; Gao et al., 2014; Kalinowska et al., 2015). Die Interaktion von Ubiquitin-bindenden Proteinen untereinander könnte zu einem verstärkenden Effekt führen und somit zu einem verstärkten Transport bzw. Abbau von bestimmten Proteinen. Es bleibt zu klären, ob SH3P2 auch *in vivo* mit diesen Proteinen interagiert und welche Rolle die Interaktion zwischen SH3P2 und

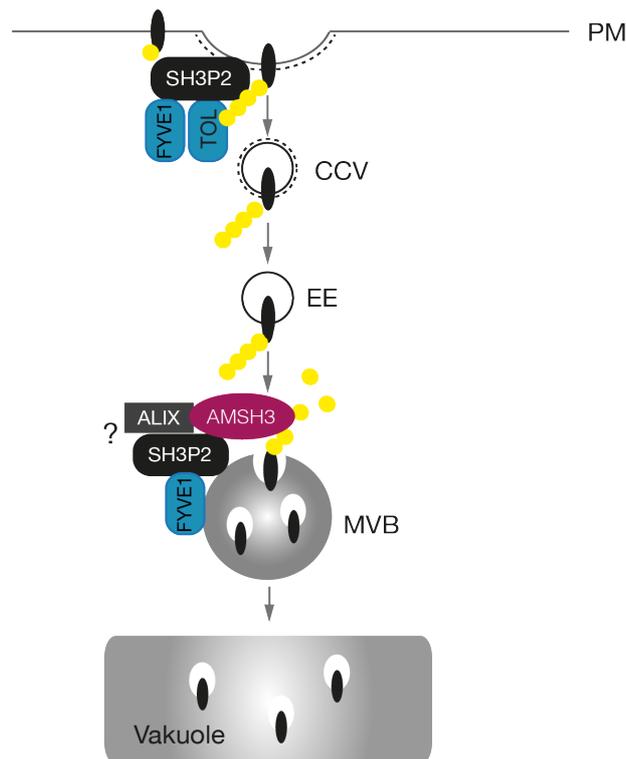


Abbildung 26: SH3P2 interagiert mit anderen Ubiquitin-bindenden Proteinen

Schematische Darstellung von SH3P2 und dessen Interaktionspartnern im endosomal Transportweg. SH3P2 bindet Phosphoinositide und K63-Ubiquitinketten. Es interagiert mit FYVE1 und TOL6, für welche eine Funktion als Ubiquitin-Adapterproteine angenommen wird sowie mit AMSH3 und ALIX, welche mit ESCRT-III an späten Endosomen assoziiert sind.

anderen Ubiquitin-bindenden Proteinen spielt. Abbildung 26 zeigt eine schematische Übersicht der Interaktionen von SH3P2 im endosomal Transportweg.

2.3.3 SH3P2 interagiert mit ESCRT-I

Ubiquitin-Adapterproteine, welche an der Plasmamembran die ubiquitinylierten Cargos erkennen und konzentrieren, haben die Fähigkeit, diese dem endosomal Transportweg zuzuführen, das heißt sie der ESCRT-Maschinerie zu übergeben. Hierfür ist eine Interaktion mit den ESCRTs essentiell. Um zu untersuchen, ob SH3P2 die Funktion eines Ubiquitin-Adapters besitzt, wurde die Interaktion zwischen SH3P2 und den einzelnen ESCRT-I Untereinheiten im Y2H-Test analysiert. ESCRT-I besteht aus den drei Untereinheiten VPS37, VPS28 und VPS23, von welche jeweils zwei Homologe in Arabidopsis existieren. Um die Interaktion mit SH3P2 zu testen, wurde jeweils nur eines der Homologe im Y2H-System untersucht. GAD-SH3P2 wurde jeweils mit GBD fusioniertem VPS37.1, VPS28.1 und VPS23.1 in Hefe exprimiert und deren Wachstum auf Selektionsmedium beobachtet. GAD-SH3P2 zeigte Interaktion mit der Ubiquitin-bindenden Untereinheit VPS23.1, aber nicht mit den Untereinheiten

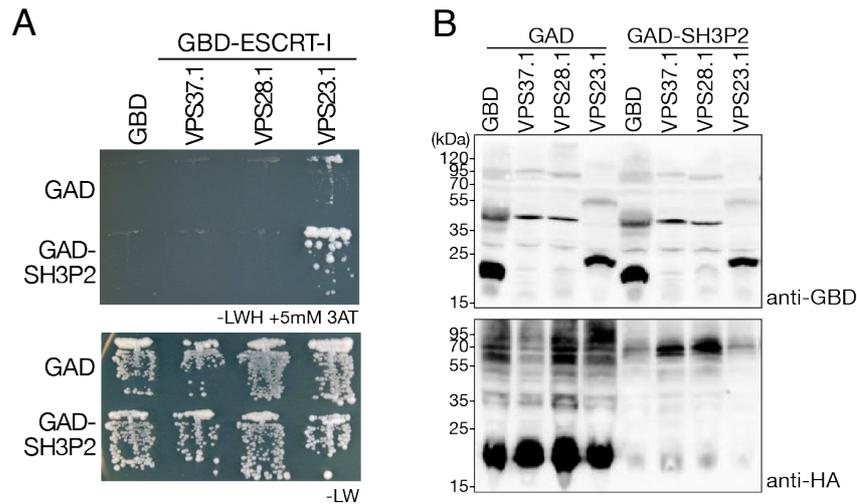


Abbildung 27: SH3P2 interagiert mit der ESCRT-I Untereinheit VPS23.1 im Y2H

A) Y2H-Interaktionsstudie der drei GBD fusionierten Untereinheiten des ESCRT-I Komplexes mit GAD- SH3P2. Hefetransformanten wurden jeweils auf Medium angezogen ohne Leucin und Tryptophan (-LW) und ohne Leucin, Tryptophan und Histidin (-LWH) versetzt mit 5 mM 3-Amino-1,2,4-triazole (3AT), um deren auxotrophes Wachstum zu testen. Die Leervektoren dienten als negative Kontrollen. B) Die Expression der Konstrukte in Hefe wurde mittels Westernblot kontrolliert. Die Proteine wurden aus den Hefezellen, die für den Y2H verwendet wurden, extrahiert und mittels Antikörper gegen GBD und HA (GAD-Konstrukte) visualisiert.

VPS37.1 oder VPS28.1 (Abbildung 27A). Mittels Westernblot wurde bestätigt, dass die Fusionsproteine aller ESCRT I-Untereinheiten etwa gleich stark exprimiert wurden (Abbildung 27B).

Im Y2H wurde auch die Regionen von SH3P2 und VPS23 ermittelt, welche für die Interaktionen essentiell sind. Hierzu wurden verschiedene Fragmente von SH3P2 und VPS23.1 mit GAD fusioniert und die Interaktionen im Y2H analysiert (Abbildung 28A). Auf Seiten von VPS23.1 stellte sich heraus, dass der N-Terminus, welcher die Ubiquitin-bindende UEV-Domäne enthält, für die Interaktion mit SH3P2 nicht benötigt wird. SH3P2 interagiert im Y2H mit dem C-terminalen Konstrukt GAD-VPS23.1(Δ UEV) (Abbildung 28B). Auf Seiten von SH3P2 scheint der N-Terminus die Interaktion zu VPS23.1 zu vermitteln. Der Y2H-Assay zeigte keine Interaktion des Fusionsproteins GAD-SH3P2(Δ BAR) mit VPS23.1, während das Fragment GAD-SH3P2(Δ SH3) mit GBD- VPS23.1 interagiert (Abbildung 28C). Dies zeigte, dass die bindende Region in der BAR Domäne liegen muss. Die Expression der Proteine in Hefe wurde auch hier wieder mittels Westernblotanalyse überprüft (Abbildung 28D). Um die Interaktion von SH3P2 und VPS23.1 zu verifizieren wurde ein *in vitro* Affinitätstest durchgeführt mit dem Volllängenprotein MBP-SH3P2- und einem C-terminalen Fragment von VPS23, GST-VPS23.1(Δ UEV). Es zeigte sich, dass die Proteine direkt miteinander interagieren können (Abbildung 29).

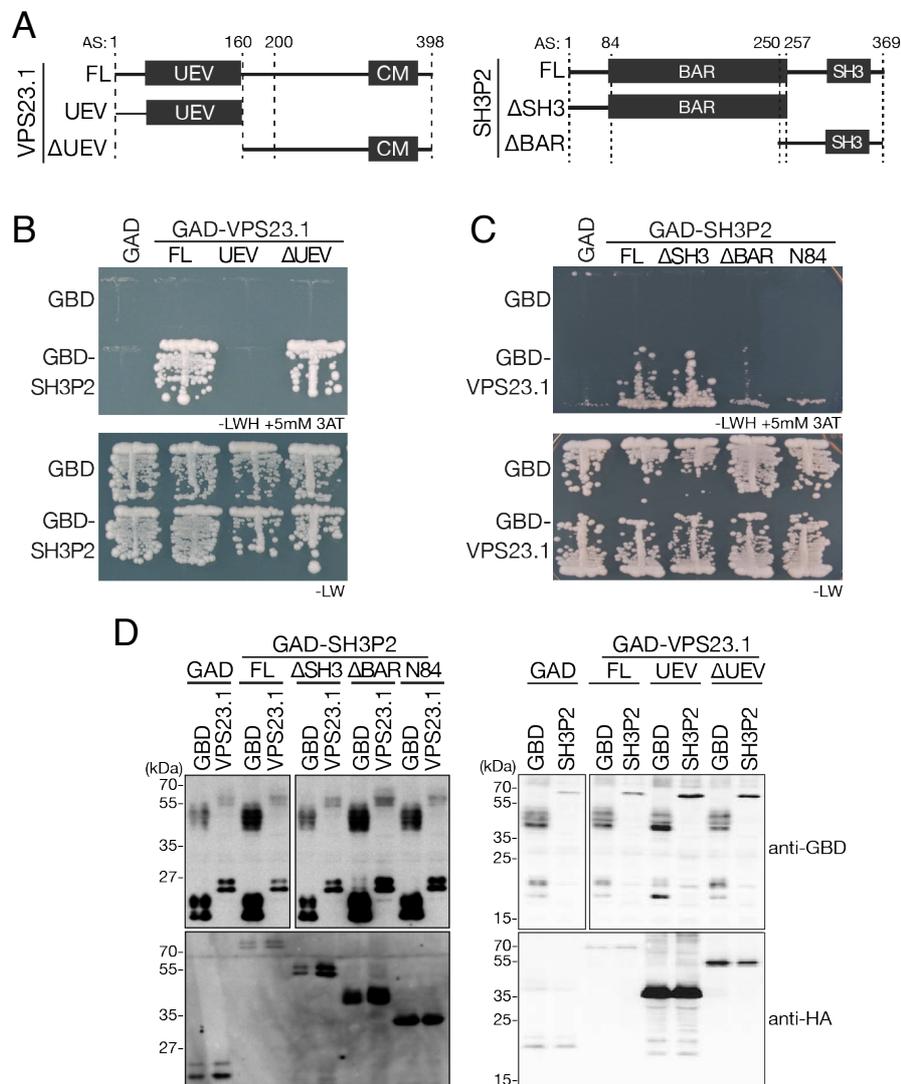


Abbildung 28: Die SH3 Domäne von SH3P2 ist nicht die Interaktionsdomäne für VPS23.1

A) Schematische Darstellung der in B) bis D) verwendeten Fragmente von VPS23.1 und SH3P2. B) Y2H-Interaktionsstudie der GBD fusionierten SH3P2 Vollängenproteins mit GAD-VPS23.1(FL), GAD-VPS23.1(UEV) und GAD-VPS23.1(ΔUEV). C) Y2H-Interaktionsstudie der GBD fusionierten VPS23.1 Vollängenproteins mit GAD-SH3P2(FL) und den Fragmenten GAD-SH3P2(ΔSH3), GAD-SH3P2(ΔBAR) und GAD-SH3P2(N84), wobei letzteres nur aus den Aminosäuren 1-84 bestand. Hefetransformanten wurden jeweils auf Medium angezogen ohne Leucin und Tryptophan (-LW) und ohne Leucin, Tryptophan und Histidin (-LWH) versetzt mit 5 mM 3-Amino-1,2,4-triazole (3AT), um deren auxothrophes Wachstum zu testen. Die Leervektoren dienen als negative Kontrollen. D) Die Expression der Konstrukte in Hefe wurde mittels Westernblot kontrolliert. Die Proteine wurden aus den Hefezellen, die für den Y2H verwendet wurden, extrahiert und mittels Antikörper gegen GBD und HA (GAD-Konstrukte) visualisiert. (Diese Y2H-Analyse wurde von Franziska Anzenberger durchgeführt).

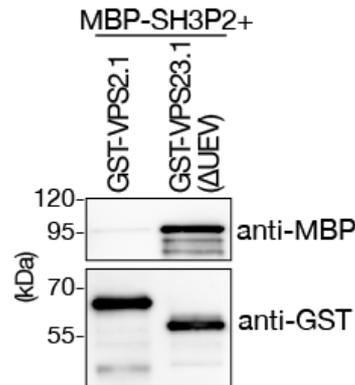


Abbildung 29: VPS23.1 interagiert direkt mit SH3P2

In vitro Affinitätstest des VPS23.1-Fragments GST-VPS23.1(ΔUEV) mit MBP-SH3P2 zur Untersuchung einer direkten Interaktion zwischen den beiden Proteinen. GST-VPS2.1 diente als negative Kontrolle. 65 pmol Protein wurde in gleicher Menge eingesetzt.

Auch *in vivo* wurde eine Interaktion zwischen SH3P2 und VPS23.1 ermittelt. Rohextrakt aus Keimlingen, welche die Konstrukte *SH3P2pro:SH3P2-GFP* und *35S:ELC-HA* exprimierten, wurde mit GFP-Magnetic-Agarose inkubiert und das von der Matrix eluierte Material in einem Westernblot mit anti-HA und anti-GFP Antikörpern analysiert (Abbildung 30A). ELC-HA wurde spezifisch mit SH3P2-GFP koimmunpräzipitiert. Eine Kolokalisationsstudie zwischen SH3P2-GFP und VPS23.1-RFP zeigte, dass 41,3% der VPS23.1-RFP positiven Vesikeln mit SH3P2-GFP positiven Strukturen kolokalisierten (Abbildung 30B). Diese Daten zeigen, dass SH3P2 und VPS23 *in vivo* die Fähigkeit besitzen, mit einander zu interagieren und gemeinsam Funktionen ausüben können.

2.3.4 VPS23-RFP kolokalisiert mit Clathrin-positiven Strukturen

Die Lokalisation der ESCRT-I Untereinheit VPS28.1 wurde bislang nur in Protoplasten und durch Immunogold-Markierung gezeigt. VPS28.1 lokalisierte dabei hauptsächlich auf dem TGN (Scheuring et al., 2011). Von anderen ESCRT-I Untereinheiten wurde bislang noch keine eingehende Lokalisationsstudie gezeigt. Um die Lokalisation von ESCRT-I *in planta* zu beobachten, sollte VPS23.1 zusammen mit den endosomalen Markern getestet und mit der Lokalisation von SH3P2 verglichen werden. Hierfür wurde eine Pflanzenlinie mit dem Konstrukt *VPS23pro:VPS23.1-RFP* mit verschiedenen Markerlinien gekreuzt und zusammen mit *35Spro:YFP-CLC*, *SYP43pro:SYP43-GFP* und *ARA7:YFP-ARA* in Keimlingen angeschaut. VPS23-RFP lokalisierte punktförmig und zeigte die höchste Kolokalisationseffizienz mit YFP-CLC, 52,3% der VPS23 positiven Vesikeln zeigte Kolokalisation mit YFP-CLC, während nur

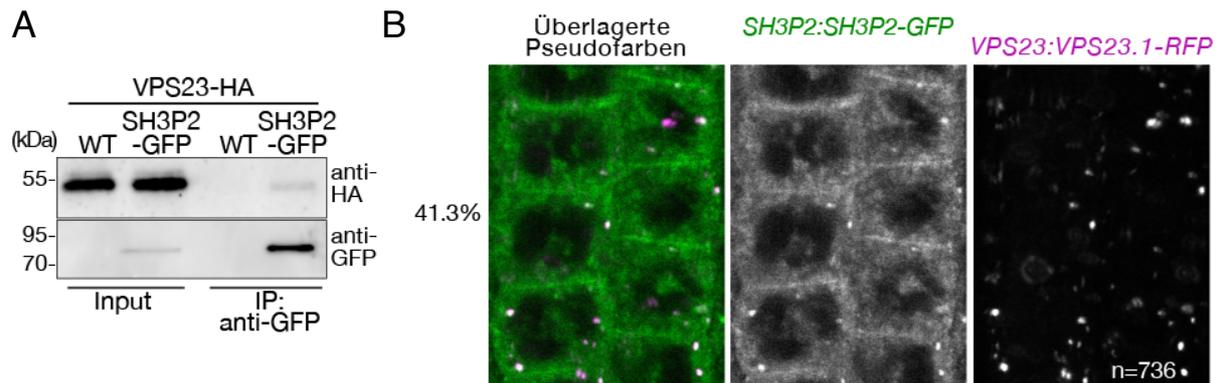


Abbildung 30: SH3P2-GFP und VPS23.1-RFP kolokalisieren *in planta* und interagieren *in vivo*

A) Koimmunpräzipitation von VPS23.1-HA aus Gesamtproteinextrakt von sowohl SH3P2-GFP/VPS23.1-HA exprimierenden und aus nur VPS23-HA exprimierenden Keimlingen, mittels anti-GFP magnetischer Agarose (IP:anti-GFP). B) Kolokalisationsstudie von SH3P2-GFP und VPS23.1-RFP in Arabidopsis Wurzelepidermiszellen. SH3P2-GFP wurde zusammen mit VPS23.1-RFP exprimiert und die Fluoreszenzsignale der Proteine unter dem Konfokalmikroskop analysiert. Vesikel die für beide Signale positiv waren, Grün und Magenta, sind in der überlagerten Pseudofarbe weiß dargestellt. Prozentsatz von VPS23.1-positiven Vesikeln ($n = 736$), die mit SH3P2 kolokalisieren ist unter dem Bild angegeben. n gibt die Anzahl der gezählten VPS23-Vesikeln an.

4,6% und 4,4% der VPS23.1-RFP positiven Vesikeln zusammen mit SYP43-GFP und YFP-ARA7 lokalisierte (Abbildung 31A, B und C).

Die Lokalisationsstudie ergab eine Kolokalisation mit CLC und zeigte, dass VPS23.1, bzw. ESCRT-I, ebenso wie SH3P2 auf Clathrin positiven Strukturen zu finden ist und somit die beiden Proteine eine gemeinsame Funktion auf Clathrin-positiven Strukturen ausüben könnten.

2.3.5 *sh3ps* Mutanten zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp

Um die physiologische Funktion von SH3Ps zu verstehen, wurden T-DNA-Insertionslinien von *SH3P1*, *SH3P2* und *SH3P3* untersucht und Nullmutanten von *sh3p1* und *sh3p3* isoliert (Abbildung 32A und B). Für *SH3P2* gab es keine Mutante unter den T-DNA-Insertionslinie, bei der das Transkriptionslevel beeinflusst war. Von Kollaborationspartnern erhielten wir Pflanzenlinien mit einem Konstrukt, das eine artifizielle mikroRNA für *SH3P2* exprimiert (hergestellt von Mie Ichikawa, Labor von Masa H. Sato, Department of Life and Environmental Science Kyoto). Nur eine Pflanzenlinie (*amish3p2*), die dieses Konstrukt trug zeigte eine Runterregulierung des Transkript-Levels von *SH3P2* auf 10% gegenüber dem Transkriptionslevel im Wildtyp oder der *sh3p1sh3p3* Doppelmutante (Abbildung 32A und C, Die qRT-PCR wurde von Franziska Anzenberger durchgeführt). Sowohl die Doppelmutante *sh3p1sh3p3* als

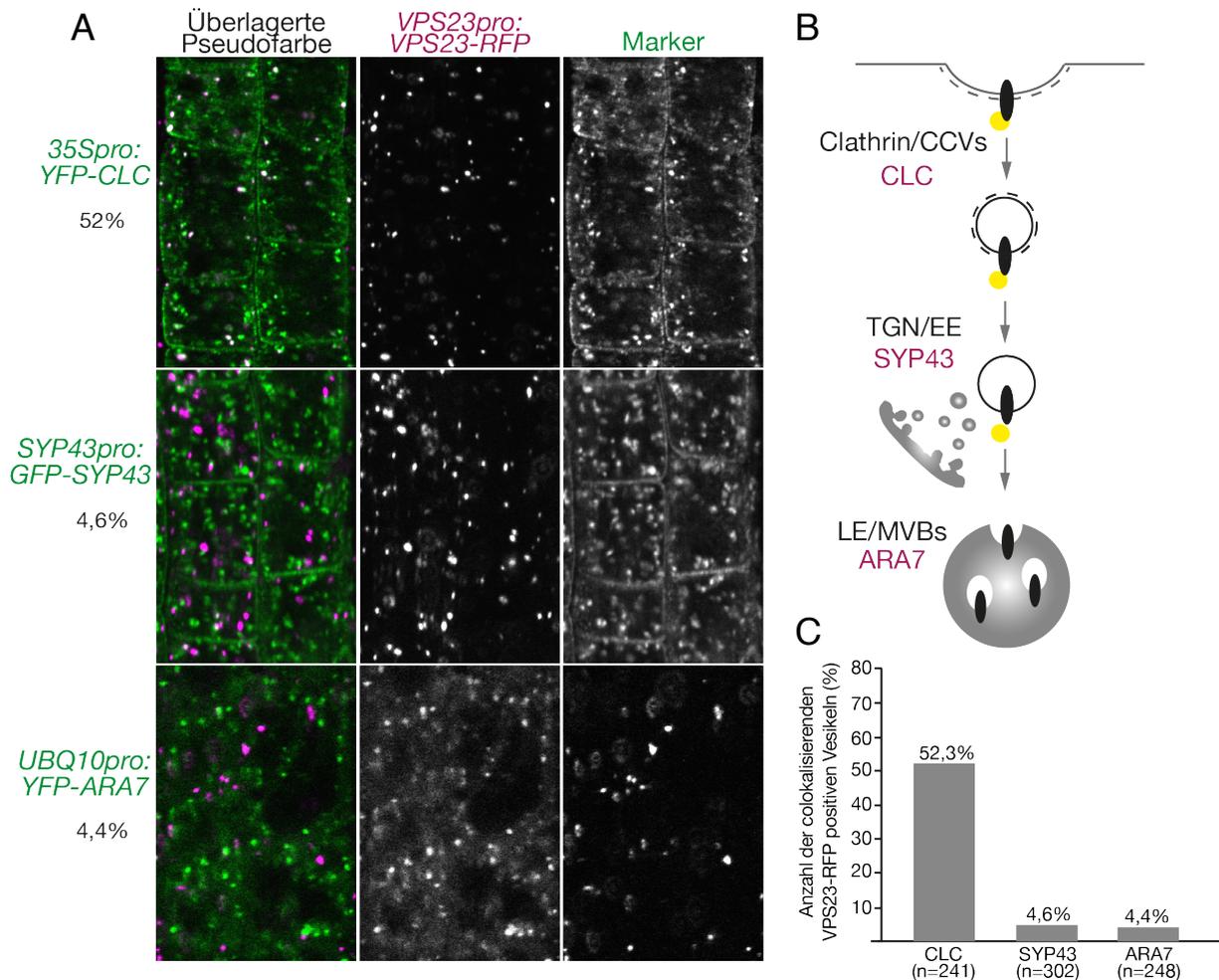


Abbildung 31: VPS23-tagRFP kolokalisiert mit CLC-mKO in planta

A) Kolokalisationsstudie von VPS23.1-RFP und verschiedenen endosomalen Markern in Arabidopsis Wurzelepidermiszellen. VPS23.1-RFP wurde zusammen mit YFP-CLC, ein Marker für Clathrin-positive Strukturen, GFP-SYP43, ein Marker für TGN oder frühe Endosomen (EE), YFP-ARA7, ein Marker für späte Endosomen (LE/MVBs) exprimiert und die Fluoreszenzsignale der Proteine unter dem Konfokalmikroskop analysiert. Schematische Darstellung der jeweiligen Endozytoseschritte wird rechts neben den Bildern angezeigt. Vesikel die für beide Signale positiv waren, Grün und Magenta, sind in der überlagerten Pseudofarbe weiß dargestellt. B) Schematische Darstellung der Endosomen im endosomalen Transports und die jeweilige Positionierung der Marker. C) Quantitative Analyse von VPS23.1-RFP-positiven Vesikeln, die mit den jeweiligen endosomalen Markern, YFP-CLC (n=241), GFP-SYP43 (n=304) und YFP-ARA7 (n=248) kolokalisieren. n gibt die Anzahl der gezählten VPS23-Vesikeln an.

auch *amish3p2* zeigten keinen offensichtlichen Entwicklungsphänotyp (Abbildung 33A). Eine Dreifachmutante ließ sich nicht herstellen, da in den Kreuzungsnachkommen der Mutantenlinien *sh3p1sh3p3* mit *amish3p2*, die Expression des artifiziellen mikroRNA-Konstrukts stillgelegt wurde.

Es wurde gezeigt, dass SH3P2 in der Autophagie eine Rolle spielt (Zhuang et al., 2013). Deshalb sollte die *amish3p2* Linie auf Defekte in der dunkelinduzierten Autophagie getestet werden. Nach 5 Tagen Dunkelbehandlung zeigte die autophagiedefekte Mutante *atg7* eine deutliche Reduktion im Chlorophyllgehalt und

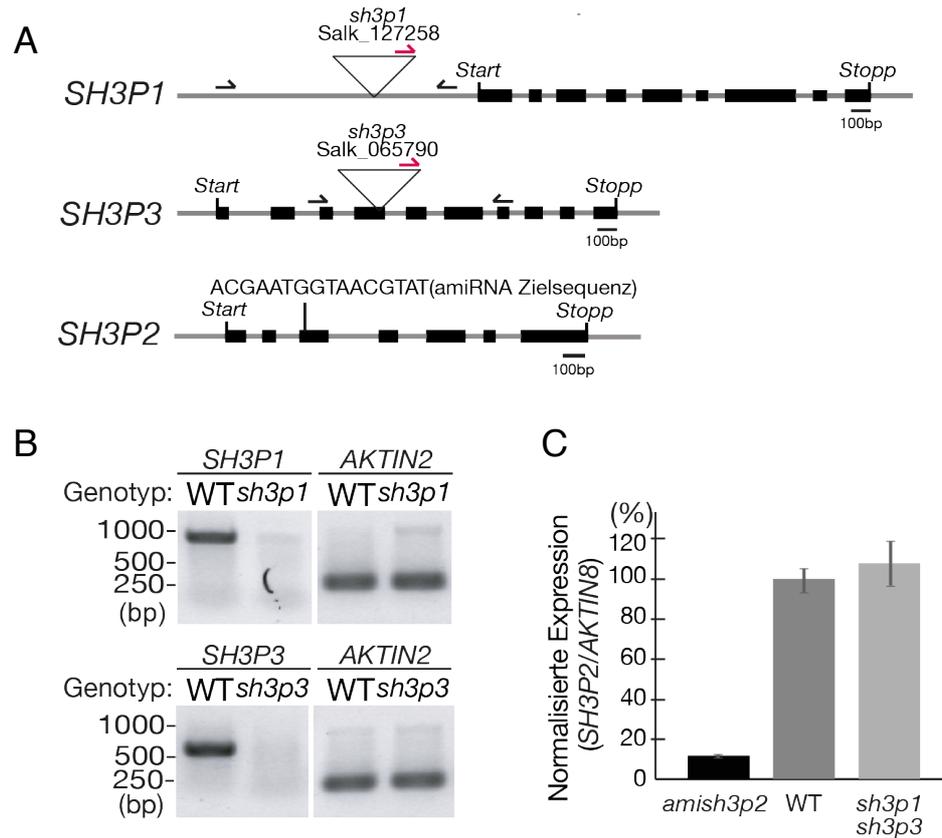


Abbildung 32: Die T-DNA Insertionslinien *sh3p1* und *sh3p3* wurden als Null-Mutanten identifiziert

A) Schematische Darstellung der T-DNA Insertionsstellen in *SH3P1* und *SH3P3* und die Position der Zielsequenz für die künstliche mikroRNA. Nicht-translatierte Regionen und Introns sind in grau dargestellt, schwarze Boxen markieren die Exons und Positionen von Start- und Stopp-Codons sind jeweils angegeben. Die Bindestellen der Vorwärts- und Rückwärts-Genotypisierungsprimer (schwarze Pfeile) sowie Bindestelle des T-DNA *left border* Primers sind durch Pfeile markiert. B) PCR-Analyse von cDNA, generiert aus Gesamt-RNA von *sh3p1* und *sh3p3* homozygoten Mutanten. Mittels *SH3P1*-, *SH3P3*- und *ACTIN2*-spezifischen Oligos wurde die Genexpression von *SH3P1* und *SH3P3* in wildtypischen (WT), *sh3p1* und *sh3p3* Keimlingen analysiert, um Nullmutanten zu identifizieren. Als positive Kontrolle diente ein Gen, das für ein Aktin codiert, das *ACTIN2*. C) Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) von *SH3P2*. Mittels genspezifischer Primer wurde die Expression von *SH3P2* in *amish3p2*-, wildtypischen (WT) und *sh3p1sh3p3* doppelhomozygoten Keimlingen untersucht und über das Transkriptionslevel von *ACTIN8* (*ACT8*) normalisiert. Die qRT-PCR wurde von Franziska Anzenberger durchgeführt.

eine hellgrüne Färbung der Blätter, die sich auch nach Lichtbehandlung nicht wieder erholte. Im Vergleich zu den wildtypischen Keimlingen zeigte die *amish3p2* Mutanten keinen Defekt in der dunkelinduzierten Autophagie (Abbildung 33B).

Des weiteren sollte nun geprüft werden, ob die *sh3p*-Mutanten einen Phänotyp, bzw. eine Abweichung vom Wildtyp aufweisen, wenn sie mit Chemikalien behandelt werden. Der ADP RIBOSYLATION FACTOR-GTP EXCHANGE FACTOR (ARF-GEF) Inhibitor Brefeldin A (BFA) inhibiert den ARF-GEF GNOM, welcher am Golgi-Apparat lokalisiert ist und dessen Inhibierung indirekt dazu führt, dass Prozesse am TGN/EE beeinträchtigt werden (Naramoto et al., 2014; Doyle et al., 2015). Unter anderem wird

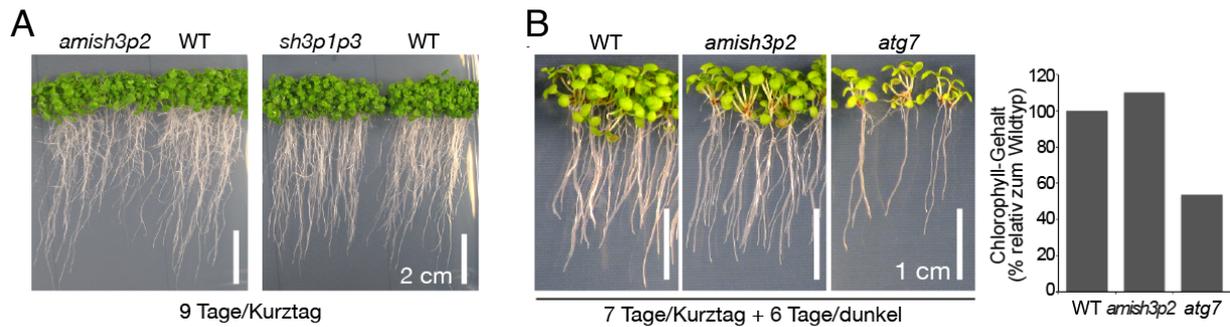


Abbildung 33: *sh3p2* und *sh3p1sh3p3* Mutanten zeigen keine sichtbaren Phänotypen

A) 9 Tage alte Wildtyp- (WT) und *amish3p2*- und *sh3p1sh3p3*-Keimlinge. Keimlinge wurden auf 1/2 MS und unter Kurztagbedingungen angezogen. Maßstabsbalken: 2 cm. B) Keimlinge von Wildtypen (WT), *amish3p2*-Mutanten und *atg7*-Mutanten fotografiert nach 6 Tagen Dunkelbehandlung (links). Maßstabsbalken: 1 cm. Der Gesamtchlorophyllgehalt der Keimlinge wurde gemessen (rechts exemplarisch für die abgebildeten Keimlinge dargestellt), der Chlorophyllgehalt der WT-Keimlinge wurde auf 100% gesetzt. Die Keimlinge wurden sieben Tage auf 1/2 MS unter Kurztagbedingungen angezogen, bevor sie ins Dunkel gebracht wurden.

das PIN2-Recycling gehemmt, was zu Fehlern in der AUXIN-Verteilung führt (Steinmann et al., 1999; Geldner et al., 2003; Naramoto et al., 2010; Naramoto et al., 2014; Doyle et al., 2015). Die Inhibierung von ARF-GEFs führt in Arabidopsis zu pleiotropen Effekten wie unter anderem zu reduziertem und agravotropem Wurzelwachstum (Steinmann et al., 1999; Abas et al., 2006).

Um zu testen, ob SH3P-Funktion für den endosomalen Transport wichtig ist, wurden die *amish3p2*- und *sh3p1sh3p3*-Keimlinge auf GM Medium mit verschiedenen Konzentrationen BFA angezogen und geprüft, ob bei den Mutantenlinien eine verstärkte Reaktion auf BFA vorliegt (Herzlichen Dank an Franziska Anzenberger für die Hilfe beim Auslegen der Samen). Hierfür wurde explizit auf das Wurzelwachstum geachtet und die Wurzellängen der sieben-Tage-alten Keimlinge gemessen. Doch auch in Anwesenheit von 3 μ M BFA konnte kein verändertes oder abnormales Wachstum der *sh3p* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (WT) festgestellt werden (Abbildung 34A).

Wenn SH3P2 eine Funktion in der Endozytose an der Plasmamembran hat, dann könnte eine eingeschränkte Funktion von SH3P2 zu einer verminderten Endozytoserate an der Plasmamembran führen. Um zu testen, ob *amish3p2*-Keimlinge im Allgemeinen eine verminderte Endozytose aufweisen wurde die Aufnahme des Membranmarkers FM4-64 getestet. Hierfür wurden sieben-Tage-alte Wildtypkeimlinge (WT) und *amish3p2*-Keimlinge für 5 Minuten in flüssigem GM mit 2 μ M FM4-64 inkubiert, um die Plasmamembran zu färben. Nach zweimaligem Waschen wurden die FM4-64-Signale und die Aufnahme des Markers unter dem Konfokalmikroskop über die Zeit (im Abstand von 15 Minuten) beobachtet und Bilder aufgenommen. Die Abnahme der Fluoreszenz-Intensität an der Plasmamembran ist

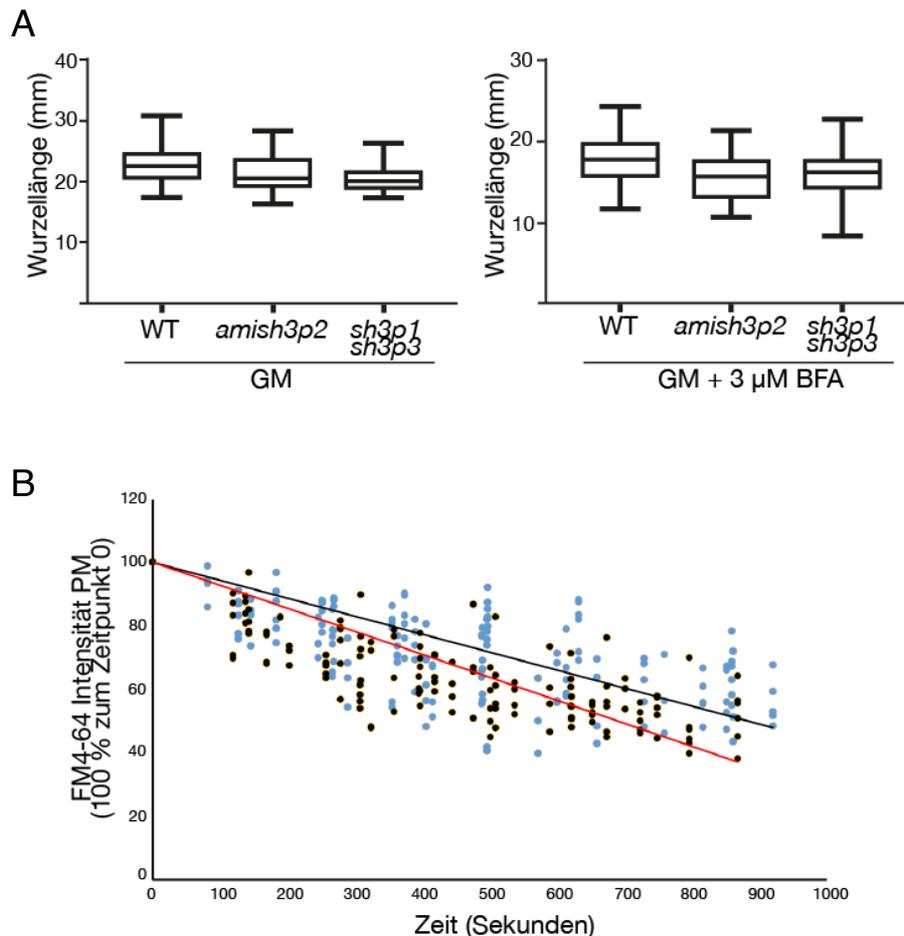


Abbildung 34: Wurzellängenmessungen und Importstudien von FM4-64 zeigten keine signifikanten Abweichungen vom Wildtyp

A) Wurzellängenmessungen von 6 Tage alten Wildtyp- (WT) und Mutanten-Keimlingen, angezogen auf GM (links) und GM, versetzt mit 3 μ M Brefeldin A (BFA) (rechts). Herzlichen Dank an Franziska Anzenberger für die Hilfe beim Auslegen der Samen. B) Aufnahme von FM4-64 an der Plasmamembran in Wurzelepidermiszellen von sieben Tage alten Wildtypkeimlingen (blaue Punkte, schwarze Linie) und *amish3p2*-Keimlingen (schwarze Punkte, rote Linie). FM4-64-Signale wurden mit denselben Belichtungs- und Mikroskop-Einstellungen über die Zeit alle 15 Minuten aufgenommen und die Signalstärke über die die Zeit wurde mit Olympus Fluoview gemessen. Die Signalstärke zum Zeitpunkt Null wurde auf 100% gesetzt.

dabei ein Maß für die Endozytoseaktivität. Die relative Endozytoserate in *amish3p2* Keimlingen (rote Linie) war vergleichbar mit der Endozytoserate in wildtypischen Keimlingen (schwarze Linie) (Abbildung 34B). Es konnte keine signifikante Abnahme der Endozytoserate in *amish3p2*-Keimlingen festgestellt werden, im Gegenteil, die Linie, die das *amish3p2* Konstrukt trug, schien eine erhöhte Endozytoserate aufzuweisen (Abbildung 34B, schwarze Punkte und rote Linie).

Aus den Ergebnissen der oben aufgeführten Experimente ließ sich schlussfolgern, dass die Abwesenheit oder starke Reduktion von einem oder zwei der drei SH3Ps, keine physiologischen Auswirkungen auf die Pflanze und keine molekularen

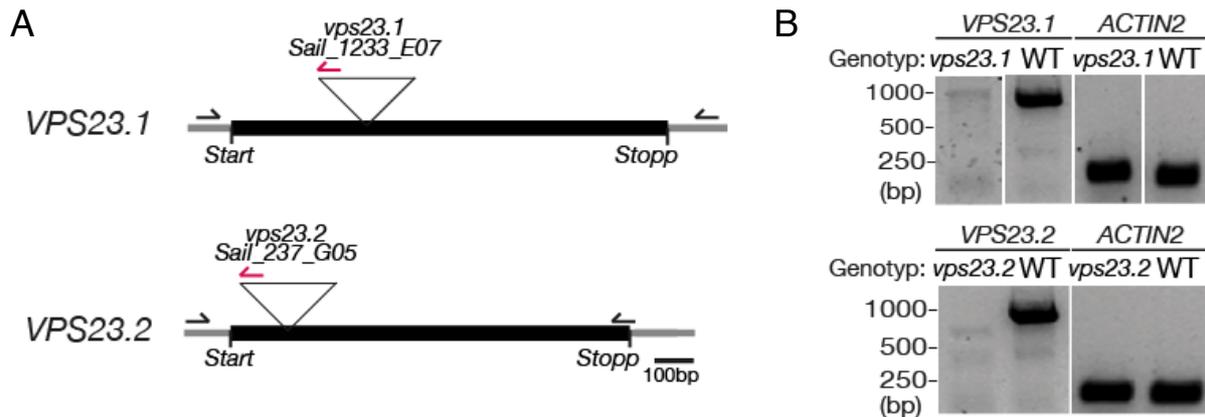


Abbildung 35: Die T-DNA Insertionslinien *vps23.1-3* und *vps23.2-1* wurden als Nullmutanten identifiziert
 A) Schematische Darstellung der T-DNA Insertionsstellen in *VPS23.1-3* und *VPS23.2-1*. Nicht-translatierte Regionen und Introns sind in grau dargestellt, schwarze Boxen markieren die Exons und Positionen von Start- und Stopp-Codons sind jeweils angegeben. Die Bindestellen der Vorwärts- und Rückwärts-Genotypisierungsprimer (schwarze Pfeile) sowie Bindestelle des T-DNA *left border* Primers sind durch Pfeile markiert. B) PCR-Analyse von cDNA, generiert aus Gesamt-RNA von *vps23.1-3* und *vps23.2-1* homozygoten Mutanten. Mittels *VPS23.1*-, *VPS23.2*- und *ACTIN2*-spezifischen Oligos wurde die Genexpression von *VPS23.1* und *VPS23.2* in wildtypischen (WT), *vps23.1* und *vps23.2* Keimlingen analysiert, um Nullmutanten zu identifizieren. Die Mutanten wurde von Franziska Anzenberger etabliert.

Auswirkungen auf die allgemeine Endozytose hatten. Dies könnte auf Redundanz, sowohl unter den drei Homologen als auch zu anderen Proteinen zurückzuführen sein, welche die gleichen Aufgaben in der Zelle erfüllen könnten.

2.3.6 *vps23.1-3vps23.2-1* zeigt Entwicklungsdefekte und akkumuliert ubiquitinylierte Proteine

VPS23.1 wurde als Interaktionspartner von SH3P2 identifiziert. Um die physiologische Funktion dieser Interaktion zu verstehen, wurden zuerst Mutanten von *vps23* isoliert und analysiert. Das Genom von Arabidopsis kodiert für zwei Homologe *VPS23* Gene, *VPS23.1* und *VPS23.2*. Für *VPS23.1* (auch *VPS23a* oder *ELCH*) wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass die *elch* Mutante abnorme Trichome und multiple Zellkerne aufweist, was auf leichte Defekte in der Zytokinese schließen lässt (Spitzer et al., 2006). Es wurde angenommen, dass *VPS23.1* und *VPS23.2* redundante Funktion in Arabidopsis haben, daher wurden zuerst Doppelmutanten der T-DNA Insertionslinien *vps23.1* und *vps23.2* hergestellt, welche als Nullmutanten identifiziert wurden (Abbildung 35A und B).

Unter den Nachkommen der *vps23.1-3vps23.2-1* Linie konnten keine doppelhomozygoten Pflanzen identifiziert werden, was darauf schließen lässt, dass die doppelhomozygote Mutante embryonal ist. Die homo-/heterozygoten Mutanten,

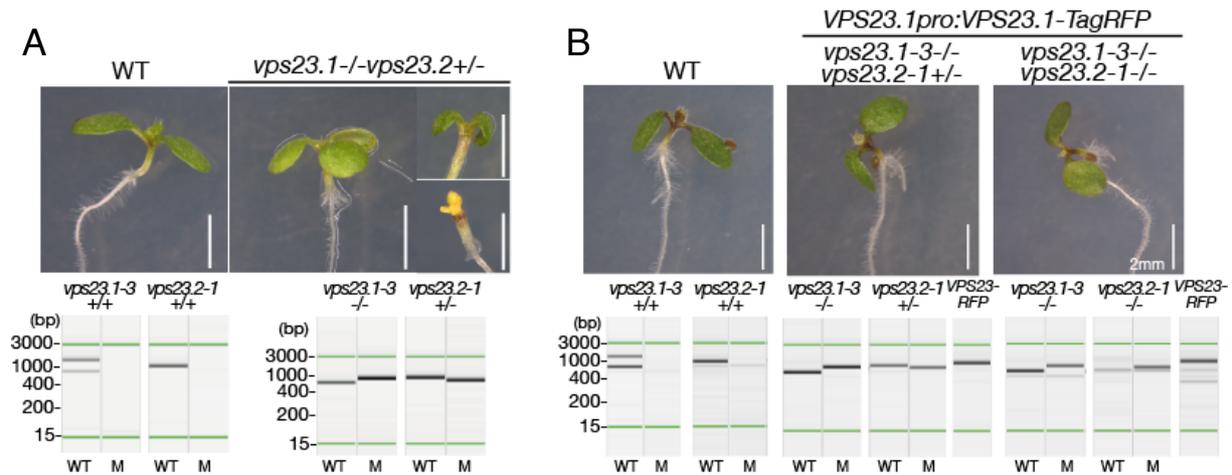


Abbildung 36: *vps23.1-3/vps23.2-1+/-* zeigt Defekte in der Organogenese. *VPS23.1:VPS23.1-RFP* komplementiert die Letalität der *vps23.1-3/vps23.2-1* doppel homozygoten Mutanten

A) Phänotypen eines Wildtypkeimlings (WT; links) und *vps23.1-3/vps23.2-1+/-* Mutanten-Keimlingen mit Organogenesedefekten (rechts). Der Genotyp wurden mittels genspezifischer Oligos bestimmt. Der jeweilige Genotyp ist exemplarisch unter den Fotos gezeigt. WT: genomisches wildtypisches Fragment, M: T-DNA-insertionsspezifisches Fragment. B) Komplementation der Organonesedefekte von *vps23.1-3/vps23.2-1+/-* und der Letalität von *vps23.1-3/vps23.2-1-/-* mit *VPS23.1:VPS23.1-RFP*. Ein Genfragment aus *VPS23.1:VPS23.1-RFP* wurde mit konstruktsspezifischen Oligos amplifiziert. Maßstabsbalken: 2 mm

vps23.1-3/vps23.2-1+/-, wiesen stark veränderte Phänotypen auf, die auf Defekte in der Organogenese und in der Pflanzenentwicklung schließen lassen. Viele Keimlinge hatten drei Kotyledonen, eine schwächere Grünfärbung, manche waren deutlich kleiner und komplett weiß und starben nach ein bis zwei Wochen ab (Abbildung 36A). Die Defekte der homo-/heterozygoten Mutanten sowie auch die Embryoletalität der doppelhomozygoten Mutanten wurden durch Expression von *VPS23.1pro:VPS23.1-RFP* komplementiert (Abbildung 36B). Somit wurde auch gezeigt, dass das Fusionsprotein VPS23.1-RFP, welches für die Lokalisationsstudien verwendet wurde, funktionsfähig ist.

Da VPS23 als ESCRT-I Untereinheit eine Funktion im endosomalen Transport von ubiquitylierten Cargos hat, sollte getestet werden, ob *vps23.1-3/vps23.2-1* Defizite im Ubiquitin-abhängigen Proteinabbau hat. Hierfür wurde das Ubiquitinprofil der Mutanten analysiert. Sieben-Tage-alte Nachkommen von *vps23.1-3+/-vps23.2-1+/-* mit abnormen Aussehen, wie in Abbildung 36A gezeigt, wurden hierfür eingesammelt und eine Gesamtproteinextraktion durchgeführt. Diese wurde mittels Westernblot analysiert. Die abnormal aussehenden Keimlinge zeigten eine deutliche Akkumulation von ubiquitylierten Proteinen, verglichen mit den wildtypisch aussehenden Keimlingen (Abbildung 37). Die abnormen Keimlinge haben demnach eine Störung im Ubiquitin-abhängigen Proteinabbau. Vor kurzem wurde auch gezeigt, dass VPS23.1

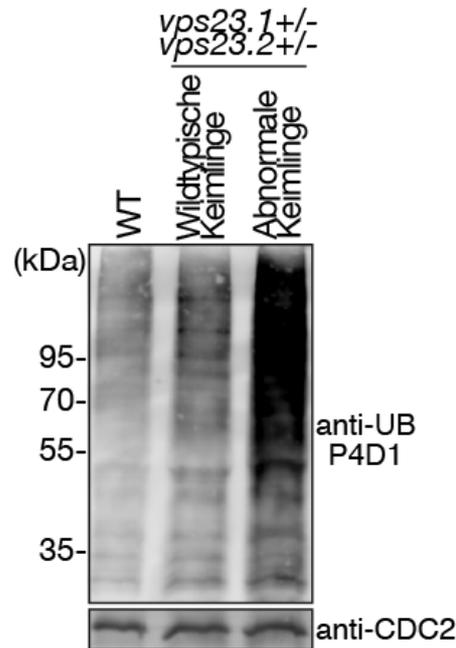


Abbildung 37: Abnorm aussehende Nachkommen von *vps23.1-3+/-vps23.2-1+/-* akkumulieren ubiquitinylierte Proteine

Akkumulation von Ubiquitinkonjugaten in *vps23* Mutanten. Gesamtproteinextrakt aus sieben Tage alten Wildtypkeimlingen (WT) und Nachkommen von *vps23.1-3+/-vps23.2-1+/-* (wildtypisch aussehende Keimlinge und abnormalen Keimlinge) wurde auf einem Westerblot aufgetragen und mittels anti-Ubiquitin (UB) Antikörpern das Ubiquitinprofil analysiert. Im Vergleich zu den Wildtyp-Keimlingen und den wildtypisch aussehenden Keimlingen zeigten die abnormalen Keimlinge eine Anreicherung an ubiquitinylierten Proteinen. Anti-CDC2 diente als Ladekontrolle.

eine Rolle im Ubiquitin-abhängigen Transport des Abscisic acid (ABA)-receptor PYR1-like 4 (PYL4) spielt (Yu et al., 2016), dies unterstütze das Ergebnis des Ubiquitinprofils.

2.3.7 *SH3P2* zeigt genetische Interaktion mit *VPS23.1*

SH3P2 interagiert direkt mit *VPS23.1* *in vitro* und *in vivo*. Um zu sehen, ob *SH3P2* auch genetische Interaktion mit *VPS23* zeigt, wurde die Doppelmutante der T-DNA Insertionslinien, *vps23.1-3vps23.2-1*, mit *amish3p2* gekreuzt. In einer statistischen Auswertung der Nachkommen der doppelheterozygoten Linie, *vps23.1-3+/-vps23.2-1+/-*, wurde das Verhältnis bestimmt, in welchem die grünen und die weißen Keimlinge wiederholt auftraten. Nachkommen der *amish3p2*-Linie zeigten nur wildtypisch aussehende Keimlinge (Experiment von Franziska Anzenberger, Daten nicht gezeigt). In dem gezeigten Experiment wurde nur auf die Farbgebung der Keimlinge geachtet, nicht auf abnorme Organogenese (Abbildung 38). 2,7 % der Mutanten waren weiß und damit letal. Nachkommen der dreifach heterozygoten Linie *vps23.1-3+/-vps23.2-1+/-amish3p2+/-* zeigten eine Verschiebung des Verhältnisses zu eindeutig mehr weißen

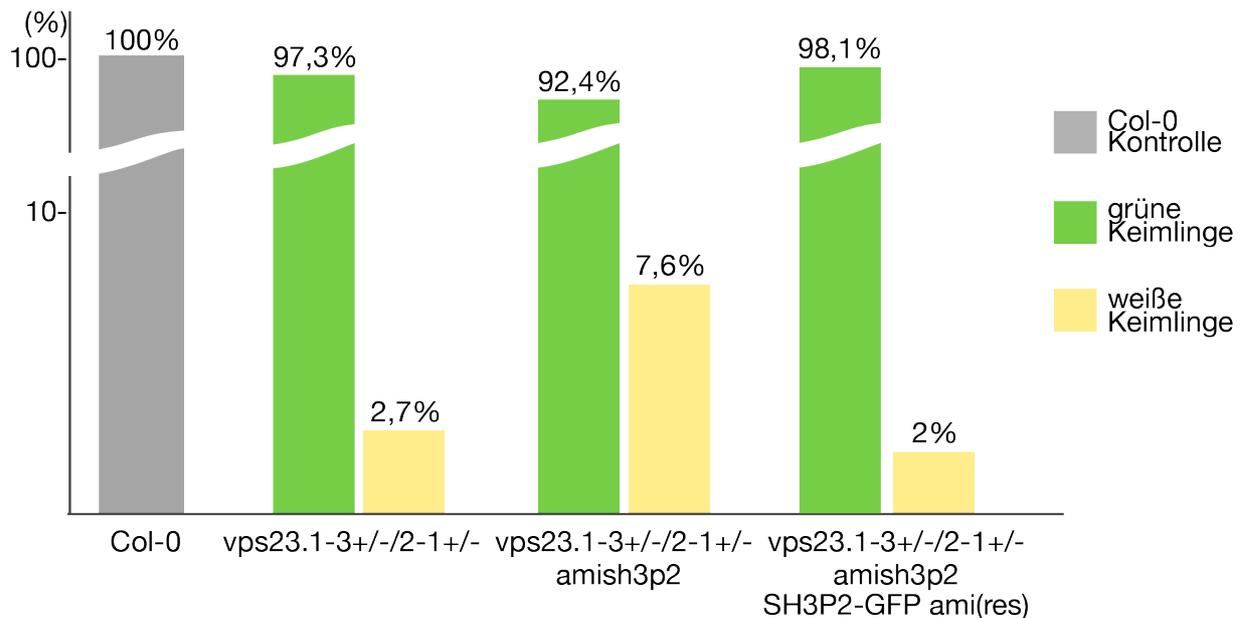


Abbildung 38: *sh3p2* einen genetischen Effekt auf *vps23.1-3vps23.2-1*

Exemplarisches Beispiel einer statistischen Auswertung der Nachkommenschaft der Linien, *vps23.1-3+/-vps23.2-1+/-*, *vps23.1-3+/-vps23.2-1+/-amish3p2+/-* und *vps23.1-3+/-vps23.2-1+/-amish3p2+/-/SH3P2pro:SH3P2(amiRNAs)-GFP*. Durch Auszählen der Keimlinge mit verschiedenen Phänotypen wurde das Verhältnis bestimmt, in welchem die hellgrünen und weißen Keimlinge wiederholt auftraten. Die Nachkommen der Linie *vps23.1-3+/-vps23.2-1+/-amish3p2+/-/SH3P2pro:SH3P2(amiRNAs)-GFP* zeigten annähernd das gleiche Verhältnis von abnormal grünen und weißen Keimlingen, wie in der Nachkommenschaft von *vps23.1-3+/-vps23.2-1+/-*. Das Konstrukt *SH3P2pro:SH3P2(amiRNAs)-GFP* komplementierte demnach den genetischen Effekt von *amish3p2* auf *vps23.1-3vps23.2-1*. Col-0 diente als negative Kontrolle.

Keimlingen (Abbildung 38) (Nagel et al., 2017). Die Anzahl der weißen Keimlinge stieg auf 7,6 % an (Abbildung 38). Um zu verifizieren, dass der Anstieg an weißen Keimlingen auf die Expression der mikroRNA von SH3P2 zurück zu führen ist, wurde das mikroRNA-resistente Konstrukt *SH3P2pro:SH3P2(amiRNAs)-GFP* hergestellt und dieses in eine dreifachheterozygote Linie transformiert. Die Nachkommen der Linie *vps23.1-3+/-vps23.2-1+/-amish3p2+/-/SH3P2pro:SH3P2(amiRNAs)-GFP* zeigten mit 2 % weißen Keimlingen das gleiche Verhältnis von grünen und weißen Keimlingen, wie in der Nachkommenschaft von *vps23.1-3+/-vps23.2-1+/-*, das Konstrukt *SH3P2pro:SH3P2(amiRNAs)-GFP* komplementierte demnach den genetischen Effekt von *amish3p2* auf *vps23.1-3vps23.2-1* (Abbildung 38). Die Expression von *SH3P2(amiRNAs)-GFP* wurde unter dem Konfokalmikroskop nachgewiesen (Abbildung 39) (Nagel et al., 2017).

Die Ergebnisse dieser Mutantanalyse indiziert, dass beide Proteinen einen verstärkenden Effekt auf einander haben und eine genetische Interaktion von SH3P2 mit VPS23.1-3 vorliegt. Dies lässt darauf schließen, dass beide Proteine eine Funktion im endosomalen Transport haben.

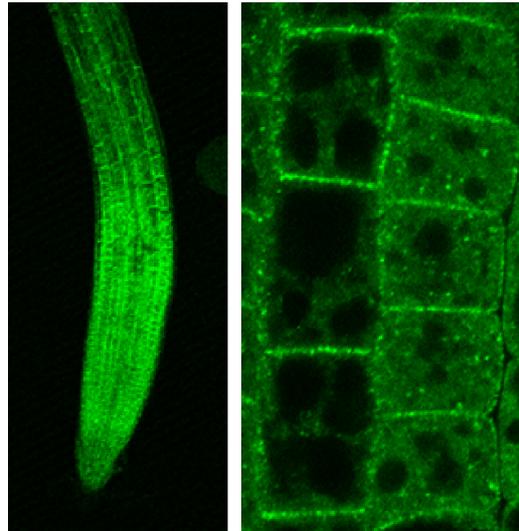
SH3P2pro:SH3P2(amiRNAres)-GFP

Abbildung 39: Expression von *SH3P2pro:SH3P2(amiRNAres)-GFP* wurde unter dem Konfokalmikroskop überprüft

Exemplarische Darstellung einer *SH3P2pro:SH3P2(amiRNAres)-GFP* exprimierenden Keimlingswurzel. Um die Expression des amiRNA-resistenten Konstruktes unter den Nachkommen zu testen, welche als Samen unter dem Fluoreszenzbino selektiert wurden, wurden ca. 50 Wurzeln unter dem Konfokalmikroskop angeschaut, um sicher zu sein, dass alle selektierten Keimlinge das Konstrukt exprimieren.

2.4 Funktionsmodell

SH3P2 besitzt die Fähigkeit, K63-Ubiquitinketten zu binden und während der CME als Ubiquitin-Adapterprotein zu fungieren. Die BAR-Domäne von SH3P2 bindet Membranen und ist für dessen Lokalisation an der Plasmamembran und auf Vesikeln verantwortlich. Durch die Interaktion mit VPS23 kann SH3P2 nun ESCRT-I an die abgeschnürten CCVs heranholen und somit das endozytierte Cargo der nachgeschalteten ESCRT-Maschinerie zuzuführen (Abbildung 40). AMSH3 kann sowohl mit SH3P2 als auch mit VPS23 interagieren und könnte durch diese Interaktion an die CCVs rekrutiert werden. Durch seine Funktion als DUB kann es die Ubiquitinketten hydrolysieren und das Frachtprotein könnte zur Plasmamembran zurück recycelt werden (Abbildung 40). SH3P2 zeigte sich aber nicht nur auf CCVs, sondern auch auf späten Endosomen. Die Lokalisation von SH3P2 auf späten Endosomen scheint von transientser Natur zu sein, da SH3P2 nur in SKD1(EQ)-induzierten Kompartimenten, die aus spätendosomalen Strukturen bzw. vergrößerten MVBs bestehen, zu finden sind (Haas et al., 2007; Kolb et al., 2015). ESCRT-III ist das einzige ESCRT, das keine Ubiquitin-bindende Untereinheit besitzt. An MVBs sind aber auch andere Ubiquitin-bindende und ESCRT-interagierende Proteine assoziiert. Für das Ubiquitin- und Membran-bindende Protein FYVE1, welches im Y2H-Test mit SH3P2 interagiert, wird ebenfalls eine Funktion als Ubiquitin-Adapterprotein im

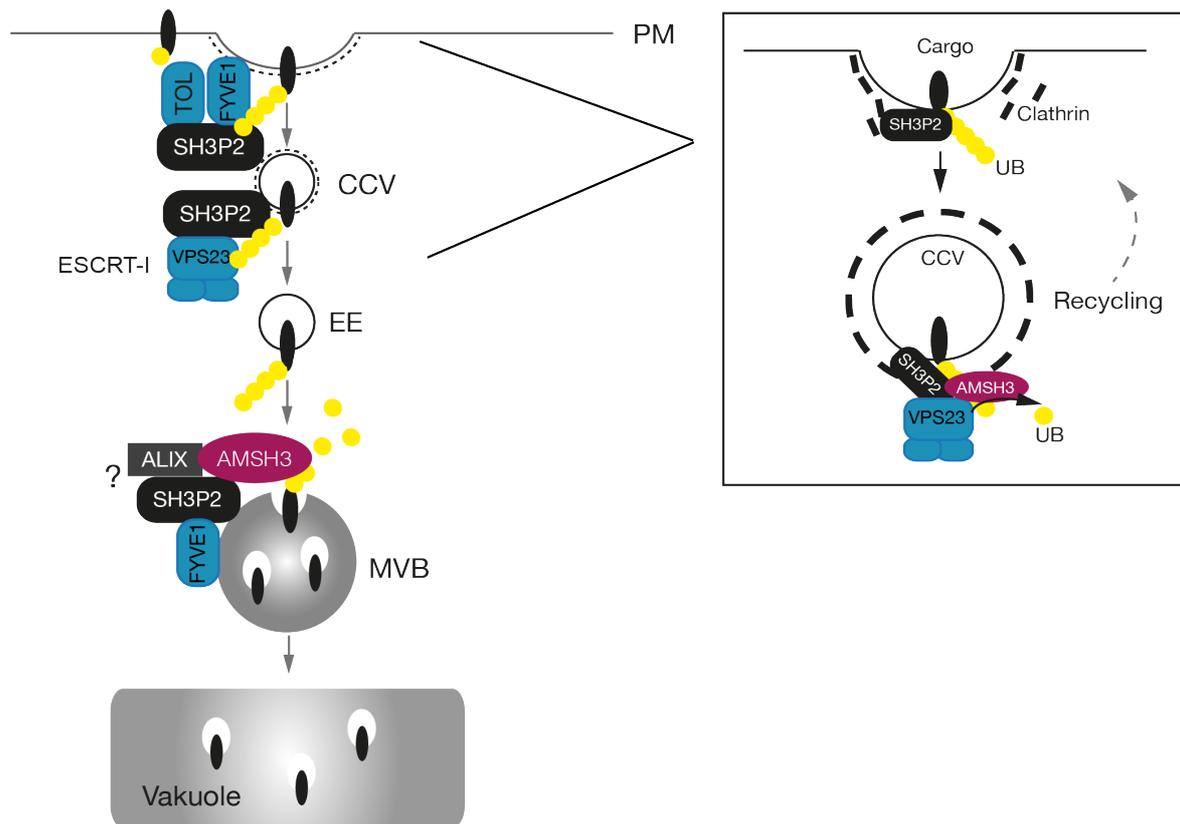


Abbildung 40: SH3P2 kann als Ubiquitin-Adapterprotein an der Plasmamembran fungieren

SH3P2 bindet die K63-gekoppelten Ubiquitinketten (UB) der Frachtproteine, bzw. der Cargos, die von der Plasmamembran (PM) endozytiert werden und durch seine BAR-Domäne ist es ebenso in der Lage an die PM zu binden. SH3P2 ist durch die Interaktion mit VPS23 in der Lage nun ESCRT-I an die abgeschnürten clathrinumhüllte Vesikel (CCV) heran zu holen und somit das endozytierte Cargo der nachgeschalteten ESCRT-Maschinerie zuzuführen (links und Box rechts).

AMSH3 kann sowohl mit SH3P2 als auch mit VPS23 interagieren und kann durch diese Interaktion an die CCVs rekrutieren werden. Durch seine Funktion als DUB kann es die Ubiquitinketten hydrolysieren und das Frachtproteine könnte zur PM zurück recycelt werde (Box rechts, Detailansicht am CCV).

Die Interaktion zwischen SH3P2 und anderen Ubiquitin-bindenden Proteinen könnte z.B. an der Plasmamembran zu einem verstärkten Abbau von endozytierten Proteinen führen. Die Lokalisation oder Funktion von SH3P2 an MVBs könnte transient stattfinden und bedarf weiterer Studien.

frühen endosomalen Transport vermutet und es wurde auf SKD1(EQ)-induzierten Kompartimenten gefunden. SH3P2 könnte also auch am späten Endosomen eine Ubiquitin-Adapterfunktion ausüben. Diese duale Lokalisation könnte auf eine Rolle von SH3P2 im frühen und späten endozytischen Proteinabbauwegs hinweisen (Gao et al., 2014; Gao et al., 2015; Kolb et al., 2015).

Bei der Suche nach Interaktoren wurden verschiedene Ubiquitin-bindende Proteine getestet, von denen bekannt war, dass sie in der Endozytose eine Rolle spielen. Als direktes Interaktionsprotein wurde auch TOL6 entdeckt, ebenfalls ein Ubiquitin-Adapter in Arabidopsis (Korbei et al., 2013). Diese Interaktionen sind in Zukunft tiefer zu analysieren. Das Binden anderer Ubiquitin-Adapter könnte einen verstärkenden

Effekt auf die Ubiquitin-bindende Funktion der Adapterproteine haben. Auch das Ubiquitin-bindende Protein ALIX interagiert direkt mit SH3P2. Es ist noch nicht klar, ob ALIX auch eine Rolle bei der Ubiquitinerkennung in der frühen Endozytose spielen kann. Auch ob SH3P2 eine Funktion an den späten Endosomen ausübt ist noch unklar. Die Interaktionen mit ALIX und FYVE1 sowie die Lokalisation auf SKD1(EQ)-induzierten Kompartimenten deutet aber darauf hin. Die Lokalisation oder Funktion von SH3P2 an MVBs könnte transient stattfinden und bedarf weiterer Studien.

2.5 Schlussfolgerung

Die Resultate dieser Arbeit zeigen, dass SH3P2 die Fähigkeit besitzt K63-Ubiquitinketten zu binden und während der Clathrin-vermittelten Endozytose als Ubiquitin-Adapterprotein zu fungieren. Es bindet Membranen und verschiedene Komponenten, die im endosomalen Transport eine wichtige Rolle spielen. Durch die Interaktion mit ESCRT-I kann SH3P2 die ubiquitinylierte Proteine an die ESCRT-Maschinerie weiterleiten. Die Interaktion von SH3P2 mit weiteren ESCRT-assoziierten Proteinen scheint noch auf weitere Funktionen im endosomalen Transport hinzudeuten. Dies sollte in zukünftigen Studien untersucht werden.

3 Diskussion

3.1 SH3P2 könnte interagierende Proteine zu Membranen rekrutieren

Die meisten Komponenten und Funktionen der ESCRT-Maschinerie sind in Pflanzen konserviert. Dennoch unterscheidet sich die endosomale Transportmaschinerie ein wenig in den verschiedenen Organismen. Im Gegensatz zu Säugetieren zum Beispiel, in welchen nur drei Homologe des Ubiquitin-bindende TOM-Proteins zu finden sind, haben Pflanzen neun Orthologe dieser Familie (die TOLs), welche zum einen redundante Funktion haben, aber auch vermutlich spezifisch agieren könnten (Korbei et al., 2013). Es ist anzunehmen, dass noch weitere Ubiquitin-Adapterproteine in Pflanzen existieren, die parallel zu den TOLs agieren können. Während im Tierreich hunderte Proteine mit SH3-Domänen existieren, gibt es davon in Pflanzen nur wenige (Zarrinpar et al., 2003). Sogar in einzelligen Hefen wurden fünfmal so viele SH3-Domänen-enthaltende Proteine gefunden, wie in Arabidopsis, für welche nur fünf Proteine mit SH3-Domänen annotiert sind (Zarrinpar et al., 2003). SH3-Domänen sind dafür bekannt, dass sie in vielzähligen Prozessen und Signalwegen involviert sind. Da SH3-Domänen in Arabidopsis stark unterrepräsentiert zu sein scheinen, ist es möglich, dass die wenigen vorhandenen SH3Ps verschiedene Aufgaben in der Zelle übernehmen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass SH3P2 mit Clathrin-umhüllten Vesikeln assoziiert ist. Dies lässt die Vermutung zu, dass SH3P2 in der Clathrin-abhängigen Endozytose eine Funktion ausübt. Es interagiert sowohl mit ESCRT-I als auch mit dem DUB AMSH3 und den putativen Ubiquitin-Adapterproteinen ALIX, FYVE1 und TOL6, die ebenfalls im endosomalen Transport involviert sind. Die Interaktion mit anderen Ubiquitin-Adapterproteinen könnte zu einer verstärkten Bindung von Ubiquitin-Konjugate führen und somit eventuell den vakuolären Abbau verschiedener ubiquitinylierter Proteine steigern. In dieser Arbeit und von einer weiteren Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass SH3P2 Phosphoinositide und somit Membranen binden kann (Ahn et al., 2017). SH3P2 könnte daher auch interagierende Proteine zu endosomalen Membranen oder CCVs rekrutieren. Für das Ubiquitin-bindende TOL6 wurde bislang keine Membranbindung nachgewiesen, es lokalisiert aber sowohl an der Plasmamembran, wie auch auf punktuellen Strukturen in der Zelle (Korbei et al., 2013). Es wäre möglich, dass TOL6 durch SH3P2 an die CCVs rekrutiert werden kann. Auch das DUB AMSH3, welches mit SH3P2 und mit der ESCRT-I Untereinheit VPS23 interagiert (Nagel et al., 2017), könnte durch die Interaktion mit beiden Proteinen an die CCVs rekrutiert werden. Das pflanzliche ALIX-Protein bindet K63-Ubiquitinketten

und rekrutiert AMSH3 zu späten Endosomen (Kalinowska et al., 2015). SH3P2 lokalisierte nicht nur an Clathrin-positiven Strukturen, sondern auch auf spät-endosomalen SKD1(EQ)-induzierten Kompartimenten. Vielleicht kann SH3P2 auch eine rekrutierende Funktion auf MVBs ausüben und die Lokalisation von AMSH3 zusätzlich zur Interaktion mit ALIX verstärken, indem es eventuell mit ALIX interagiert und gleichzeitig AMSH3 bindet. AMSH3 könnte an Endosomen deubiquitylierende Funktion ausüben. AMSH3 könnte an MVBs die Ubiquitinketten der Cargos entfernen und somit verhindern, dass Ubiquitinmoleküle in der Vakuole abgebaut werden. An den CCVs kann das Hydrolysieren der Ubiquitinketten zu einem Abbruch des vakuolären Transports führen und die Cargos könnten wieder zurück an die Plasmamembran transportiert werden.

Die fehlenden abnormen Phänotypen der *sh3p*-Mutanten deuten auf redundante Funktionen der SH3Ps hin. Da sich die drei Homologen aber schon früh in der Evolution der Landpflanzen getrennt haben (Nagel et al., 2017), liegt die Vermutung nahe, dass sie eventuell auch Homolog-spezifische Funktionen entwickelt haben. Die physiologischen Experimente in dieser Arbeit wurden mit einer Pflanzenlinie durchgeführt, welche eine artifizielle mikroRNA zur Stilllegung von *SH3P2* exprimiert. Die artifizielle mikroRNA ermöglicht allerdings keinen kompletten Verlust des Transkriptionsprodukts. In diesem Fall gab es eine Runterregulation von *SH3P2* auf zehn Prozent. Eventuell reichen diese zehn Prozent aus, um die Funktionen von SH3P2 in der Zelle aufrecht zu halten.

3.2 SH3P2 ist an der Bildung der Zellplatte beteiligt

Die Zellteilung in Pflanzenzellen nimmt einen anderen Verlauf als in tierischen Zellen. Während der Zytokinese in Pflanzenzellen entwickelt sich die Zellplatte als Teilungsebene, an der sich am Ende die Plasmamembran und die Zellwand bilden. *escrt* Mutanten in Pflanzen zeigen Defekte in der Zytokinese und Organogenese (Spitzer et al., 2006; Spitzer et al., 2009). Jedoch ist die molekulare Funktion von ESCRT während der pflanzlichen Zellteilung noch unklar, denn ESCRT scheint nicht an der Zellplatte zu lokalisieren. ESCRT entstand schon früh in der Evolution und ist Teil des Zellteilungsapparats in Archaeen (Lindas et al., 2008; Samson et al., 2008). Interessanterweise sind in Vertebraten ESCRT-I und ESCRT-III an der Zytokinese beteiligt, genauer an der Abschnürung und Bildung der filamentösen Spirale, die während der Zellteilung gebildet wird (Elia et al., 2011). Auch endosomaler Transport spielt bei der Bildung und Expansion der Zellplatte eine wichtige Rolle. Aus dem Golgi-Apparat heraus bildet sich dabei ein tubuläres Vesikel-Netzwerk, das später zur

Zellplatte verschmilzt. Wegen seiner Lokalisation an der entstehenden Zellplatte und den Defekten bei der Zellplattenbildung in den Mutanten, wird vermutet, dass SH3P2 direkt an der Bildung dieser tubulären Strukturen und an der Zytokinese beteiligt ist (Ahn et al., 2017). Um überschüssiges Membranmaterial, welches bei der Bildung der Zellplatte anfällt zu entfernen, finden dort ebenfalls Clathrin-vermittelte Transport-Ereignisse statt (Otegui et al., 2001). Dort sind sowohl der Clathrin-Adapter TPLATE, als auch Untereinheiten des AP2-Komplexes zu finden und auch für Clathrin wurde Lokalisation zur Zellplatte gezeigt und das Vorhandensein von Clathrin-umhüllten Vesikeln (Otegui et al., 2001; Ito et al., 2012; Gadeyne et al., 2014). Ob auch Ubiquitin-abhängiger Proteintransport an der pflanzlichen Zellplatte eine Rolle spielt wurde bislang noch nicht gezeigt, aber auch hier muss die Proteinmenge und -zusammensetzung an der sich bildenden Membran kontrolliert werden. Eventuell findet dort auch Ubiquitin-abhängiger Proteintransport statt, dann könnte SH3P2 auch an der Zellplatte eine Funktion als Ubiquitin-Adapterprotein übernehmen.

3.3 SH3P2 kann im autophagosomalen Transport eine Rolle spielen

In der Vergangenheit wurde die Beteiligung von SH3P2 in der Autophagie gezeigt (Zhuang et al., 2013). Autophagie ist, unter anderem, ein Prozess der unter Stress einsetzt, um Ressourcen zu reaktivieren. Autophagie kann selektiv oder nicht-selektiv stattfinden. Bei der Nicht-selektiven Makroautophagie werden Organellen und Proteine ohne Modifikation beliebig aus dem Zytosol aufgenommen und zum Abbau in die Vakuole transportiert (Michaeli et al., 2016). Bei der selektiven Autophagie werden Organellen und Proteine selektiv mit Ubiquitin modifiziert. Autophagie-spezifische Adapterproteine wie NEIGHBOR OF BRCA1 GENE 1 (NBR1) erkennen die ubiquitinylierten Organellen und Proteine durch Bindung der Ubiquitinketten und führen diese durch Interaktion mit AUTOPHAGY RELATED GENE 8 (ATG8) zu den entstehenden Phagophoren-Membranen, welche sich später zu den Autophagosomen schließen und mit der Vakuole verschmelzen (Michaeli et al., 2016). K63-Ubiquitinketten sind ein Signal für den selektiven Abbau von Proteinen durch Autophagie (Shaid et al., 2013). SH3P2 kolokalisiert mit ATG6, ATG7 und ATG8. Bei ATG8 handelt es sich um ein Ubiquitin-ähnliches Protein (Inoue et al., 2006). SH3P2 könnte als Adapter zwischen Ubiquitin und ATG8 fungieren und so das Sortieren der ubiquitinylierten Proteine in die Phagophoren vermitteln. Dies würde die Lokalisation von SH3P2 auf Phagophoren und Autophagosomen sowie die Interaktion mit ATG8 erklären (Zhuang et al., 2013).

In Pflanzen ist gezeigt, dass die ESCRT-III Untereinheiten CHMP1A und –B für die Bildung der multilamellaren Autophagosomen wichtig sind und Überexpression von einer nicht funktionellen ESCRT-III Untereinheit VPS2.1 führt zu Defekten in Autophagie (Spitzer et al., 2015) (Katsiarimpa et al., 2013). In wie weit die endosomale Transportmaschinerie in Pflanzen im Prozess der Autophagie und im autophagosomalen Transport involviert ist, ist bislang noch unklar (Kalinowska and Isono, 2017). Da SH3P2 zusammen mit ESCRT-III und ESCRT-III-interagierenden Proteinen auf späten Endosomen lokalisiert, könnte es auch indirekt an der Steuerung von autophagischen Transportprozessen beteiligt sein.

3.4 SH3P2 könnte bei der Membrankrümmung oder -abschnürung während der CME eine Funktion ausüben

Die drei homologen SH3Ps in Arabidopsis besitzen neben der SH3-Domäne, eine BAR-Domäne. Proteine, die BAR- und SH3-Domänen enthalten sind dafür bekannt, dass sie in der Endozytose für das Erkennen von gebogenen Nukleations-Modulen in der Plasmamembran wichtig sind und später bei der röhrenförmigen Ausbildung des Vesikelhalses und der Membranabschnürung eine entscheidende Rolle spielen (Dawson et al., 2006; Daumke et al., 2014). SH3P2 lokalisiert an der Plasmamembran und es wurde gezeigt, dass es die Fähigkeit besitzt, aus Liposomen tubuläre Strukturen zu formen (Ahn et al., 2017). Wenn SH3P2 diese Liposomen verformen kann, dann ist es durchaus möglich, dass es an der Plasmamembran ähnliche Funktionen ausüben könnte und dort die Membrankrümmung und –tubulation bei der Vesikelbildung und -abschnürung verursacht.

Über die Funktion der BAR-Domäne von SH3P2 ist noch nicht viel bekannt, außer dass sie eventuell tubulierende Funktion an der entstehenden Zellplatte haben könnte (Ahn et al., 2017). In Arabidopsis sind bislang nur wenige BAR-Domänen-Proteine und deren Funktion als BAR-Domänen-Protein näher untersucht. Darunter sind die drei homologen SH3Ps und drei Proteine aus der Familie der SORTING NEXIN (SNX) Proteine (Jaillais et al., 2006; Ivanov et al., 2014; Heucken and Ivanov, 2017) (Ahn et al., 2017). Für beide Proteinfamilien wurde gezeigt, dass sie an endosomalen Transportprozessen beteiligt sind. Während die SNX Proteine hauptsächlich auf Endosomen lokalisiert sind, zeigen die SH3Ps, insbesondere SH3P2, Lokalisation an der Plasmamembran und auf Clathrin-markierten Strukturen.

Die Anordnung der Domänen in den SH3Ps ähnelt der Struktur von Endophilin und Amphiphysin in anderen Organismen, indem sie im N-terminalen Teil die BAR-Domäne und im C-Terminus die SH3-Domäne aufweisen (Zhuang et al., 2013;

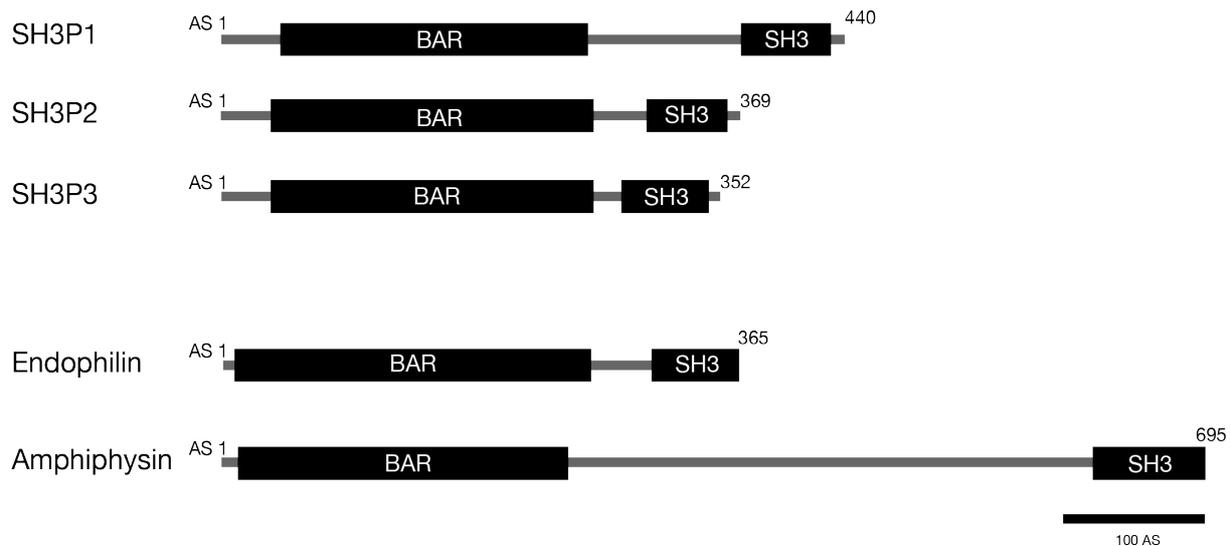


Abbildung 41: Die Strukturen der BAR-Domänen-Proteine zeigen deutliche Unterschiede

Schematische Darstellung der Domänen in den drei Arabidopsis SH3Ps und in Säuger Endophilin und Amphiphysin aus Säugern. Von der Größe zeigen die SH3 Proteine deutlich mehr Ähnlichkeiten zu Endophilin als zu Amphiphysin, welches mit 695 Aminosäuren (AS) fast doppelt so groß ist. Maßstabsbalken: 100 AS.

Daumke et al., 2014) (Abbildung 41). Diese Proteine enthalten sogenannte N-BAR Domänen, welche in der Lage sind Membrankrümmungen zu erkennen und selbst Krümmung von Membranen zu verursachen. Auffällig ist, dass das tierische Amphiphysin deutlich länger ist als Endophilin und die drei SH3Ps (Abbildung 41). Von Länge und Aufbau gleichen die Arabidopsis SH3Ps eher Endophilin als Amphiphysin. SH3P1 allerdings hat einen längeren Abstand zwischen BAR- und SH3-Domäne und könnte daher andere Funktionen als SH3P2 und SH3P3 besitzen. Für die Funktion von SH3P2 kann noch keine Aussage getroffen werden, auch nicht darüber, ob es sich um ein Endophilin- oder ein Amphiphysin-ähnliches Protein handelt. Der Struktur nach zu urteilen, ähnelt es eher einem Endophilin Ortholog.

Die BAR-Domänen-Proteine sind in anderen Organismen maßgeblich an der Clathrin-abhängigen Endozytose von Plasmamembranproteinen beteiligt. Endophilin und Amphiphysin formen und stabilisieren die tubuläre Struktur des Vesikelhalses, an dem die Vesikel von der Membran abgeschnürt werden. In anderen Organismen wurde gezeigt, dass die BAR-Domänen-Proteine die GTPase Dynamin an den tubulären Vesikelhals rekrutieren und diese dann mechanisch die Abschnürung des Vesikels bewirkt (Daumke et al., 2014). Für SH3P2 wurde eine *in vivo* Interaktion mit dem Dynamin-ähnlichen Protein DRP1A in Arabidopsis gezeigt und auch SH3P3 interagiert mit dem Dynamin-Ortholog DRP2A (Lam et al., 2002; Ahn et al., 2017). DRP1A und DRP2B lokalisieren sowohl an der Zellplatte als auch an der Plasmamembran und sind vermutlich auch in Arabidopsis für das mechanische Zusammenschnüren des Vesikelhalses und die Abschnürung der Vesikel verantwortlich (Fujimoto et al., 2008;

Fujimoto et al., 2010). Die Interaktion zwischen SH3Ps und DRPs kann also ein Hinweis darauf sein, dass die SH3Ps auch in Pflanzen eine Funktion bei der Membranabschnürung an der Plasmamembran haben können (Abbildung 42A).

Auf der funktionellen Ebene scheinen Unterschiede zwischen Endophilin und Amphiphysin zu existieren. So lassen sich beispielsweise die phänotypischen Defekte der Endophilin-Mutanten in *Drosophila* mit einem Chimära-Konstrukt, welches die BAR-Domäne von Amphiphysin und die SH3-Domäne von Endophilin trägt, nicht komplementieren (Jung et al., 2010). Dies zeigt, dass die BAR-Domänen der Proteine unterschiedliche und durchaus unerlässliche Funktionen ausüben. Auch bei den SH3-Domänen, die sich in ihrer Aminosäuresequenz sehr ähnlich sind, gibt es funktionelle Unterschiede. Für die SH3-Domäne von Amphiphysin beispielsweise wurde die Fähigkeit gezeigt, Ubiquitin zu binden, während für die SH3-Domäne von Endophilin keine Hinweise auf Ubiquitin-Bindung gefunden wurden (Stamenova et al., 2007). Amphiphysin und andere BAR-Domänenproteine besitzen Clathrin- und AP2-bindende Motive, während für Endophilin weder eine Clathrin-Bindung, noch eine Interaktion mit Adapterproteinen beobachtet wurde (Daumke et al., 2014). Neuere Forschungsergebnisse lassen auch darauf schließen, dass Endophilin beim Lösen der Clathrinhülle von den Vesikeln eine Rolle spielen könnte (Pechstein et al., 2015). Die Interaktion zwischen SH3P2 und dem pflanzlichen Auxilin-ähnlichen Protein könnte ein Hinweis darauf sein, dass auch SH3P2 bei der Disassemblierung der Clathrinmoleküle vielleicht eine Rolle spielen kann. Eine direkte Interaktion mit Clathrin wurde für SH3P2 noch nicht gezeigt, jedoch die Interaktion mit Ubiquitin. Es wäre auch hier wieder möglich, dass SH3P2 mehrere Funktionen ausüben könnte, daher sollten weitere Untersuchungen unternommen werden, um aufzuklären ob die drei SH3Ps in *Arabidopsis* eventuell unterschiedliche Funktionen ausüben könnten. Des Weiteren wurde für Endophilin gezeigt, dass die BAR-Domäne verschiedene Membranmodifizierungen ausüben kann. Abhängig vom Phosphorylierungszustand der BAR-Domäne, wechselt die Funktion der BAR-Domäne zwischen Membrantubulation im nicht-phosphorylierten Zustand und Membrankrümmung bzw. Bildung von gekrümmten Zonen innerhalb der Membranen, im phosphorylierten Zustand (Ambroso et al., 2014). In tierischen Nervenzellen wurde zudem auch eine Beteiligung von Endophilin in der Autophagie gezeigt (Soukup et al., 2016). Phosphoryliertes Endophilin ist direkt an der Bildung von Autophagosomen beteiligt (Soukup et al., 2016). Über den Phosphorylierungszustand von SH3P2 in Pflanzen ist noch nichts bekannt. Eventuell könnte auch SH3P2 durch Phosphorylierung reguliert werden und abhängig davon verschiedene Aufgaben an unterschiedlichen Membranen ausüben. Die BAR-Domäne von SH3P2 könnte auch bei dem Prozess der Bildung und Krümmung der Phagophorenmembran und bei der Schließung zu

Autophagosomen eine Rolle spielen (Abbildung 42B). Zukünftige Arbeiten an SH3P2 sollten die Regulation der SH3Ps in Arabidopsis beinhalten.

3.5 Steuerung von Clathrin-unabhängiger Endozytose

Endophilin hat in tierischen Zellen auch eine Schlüsselfunktion in der schnellen Clathrin-unabhängigen Endozytose (Boucrot et al., 2015; Renard et al., 2015). In der Clathrin-unabhängigen Endozytose werden neben den Caveolin- und Flotillin-umhüllten Vesikeln auch Vesikel ohne Hülle von der Plasmamembran abgeschnürt (Mayor et al., 2014). Die ohne Hülle abgeschnürten Vesikel nehmen in der Zelle die gleichen Wege über den endosomalen Transport, wie die Clathrin-umhüllten Vesikel und auch hier kann Ubiquitylierung ein Signal für den Transport von Proteinen und deren Abbau in Lysosomen sein (Mayor et al., 2014). Der molekulare Mechanismus und die genauen Funktionen der Clathrin-unabhängigen Endozytose ist noch weitgehend unbekannt, aber auch in pflanzlichen Zellen findet diese statt. Während in tierischen Zellen Toxine und Membran-assoziierte Proteine ihren Weg über die Clathrin-unabhängigen Endozytose in die Zellen finden, wurde bislang in Pflanzen gezeigt, dass Glucose und Hexose auf diese Art und Weise aufgenommen werden können (Sandvig et al., 2011; Bandmann and Homann, 2012). Die Endozytose von Glucose wurde in Protoplasten aus Tabak-Zellkultur gezeigt, in welchen die Glucose im TGN der Zellen akkumulierte (Abbildung 42A) (Bandmann and Homann, 2012). Die Clathrin-unabhängige Endozytose kann durch Salzstress induziert werden und ermöglicht eine schnelle und gesteigerte Endozytoserate in Arabidopsis Wurzelzellen (Baral et al., 2015). Bislang ist noch nicht klar, ob in Pflanzen auch Proteine oder anderen Komponenten von der Plasmamembran über die Clathrin-unabhängige Endozytose internalisiert werden und ob auch dieser Endozytoseweg am Proteinabbau beteiligt ist. Als Endophilin-ähnliches Protein könnte SH3P2 in Pflanzen ebenfalls an der Clathrin-unabhängigen Endozytose beteiligt sein, dies wurde jedoch bislang noch nicht untersucht. Zukünftig sollte überprüft werden, ob die drei pflanzlichen SH3Ps eventuell auch dort eine Rolle spielen können.

In dieser Arbeit konnte SH3P2 als ein Ubiquitin-Adapterprotein identifiziert werden, das mit CCVs assoziiert ist und mit der ESCRT-Maschinerie interagiert. Seine Domänenstruktur zeigt starke Ähnlichkeit zu Endophilin und die Interaktionen mit anderen Proteinen, die in der Endozytose, an der Zellplatte und in der Autophagie beteiligt sind lässt vermuten, dass SH3P2 multiple Funktionen ausüben könnte. Dies öffnet weitere interessante Fragen, die es in zukünftigen Studien zu untersuchen gilt.

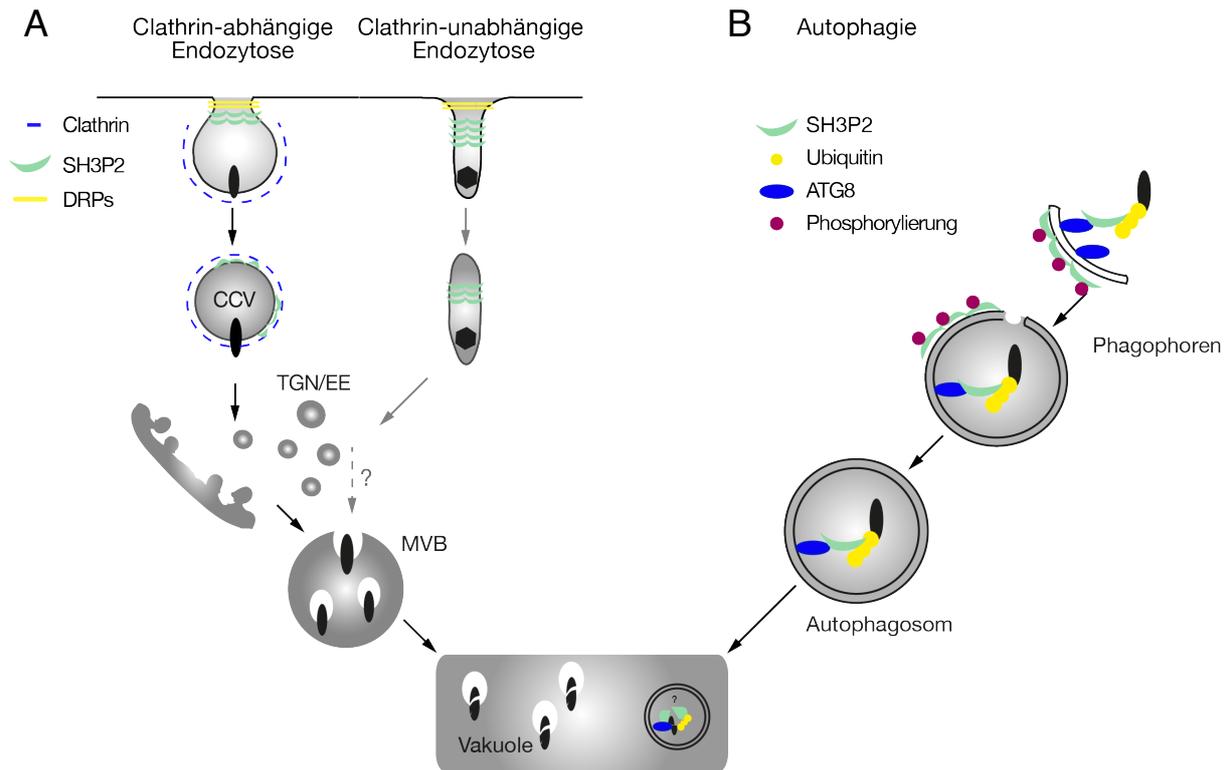


Abbildung 42: Weitere mögliche Funktionen von SH3P2 als Endophilin-ähnliches Protein in Pflanzen

A) SH3P2 kann als BAR-Domänenprotein Endophilin-ähnliche Funktionen während der Clathrin-abhängigen und -unabhängigen Endozytose in Pflanzen ausüben. SH3P2 hat die Fähigkeit Membranen zu binden und zu verformen und es interagiert *in vivo* mit DRP1A, einem Dynamin-ähnlichen Protein, das an der Endozytose beteiligt ist (Fujimoto et al., 2010; Ahn et al., 2017). SH3P2 könnte wie Endophilin die Tubulierung des Vesikelhalses hervorrufen und DRPs zur Membran rekrutieren, welche mechanisch das Abschneiden des Vesikels verursachen. B) SH3P2 lokalisiert auch an Phagophoren und Autophagosomen. Wie Endophilin, könnte auch SH3P2 eine Rolle bei der Bildung von Autophagosomen spielen. Mittels der BAR-Domäne kann es zur Krümmung und Schließung der Phagophorenmembran beitragen. Hier kann SH3P2 aber auch als Adapterprotein fungieren, indem es K63-Ubiquitinketten bindet und mit ATG8 interagiert. Eventuell kann auch in Pflanzen Phosphorylierung, wie bei tierischen Endophilin, eine Rolle in der Regulation von SH3P2 und dessen Aufgabenverteilung spielen.

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

Sequenzen und Bezeichnungen aller während dieser Arbeit hergestellten Oligos sind im Appendix Tabelle 1 zu finden. Die während dieser Arbeit klonierten Plasmide sind im Appendix Tabelle 2 zu finden. Die Oligos für die Genotypisierungen der Mutantenlinien sind im Appendix Tabelle 3 zu finden. Antikörper zur spezifischen Detektion von Proteinen sind gelistet im Appendix Tabelle 4. Chemikalien und Lösungen die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind im Appendix in Tabelle 5 gelistet. In Appendix Tabelle 6 wurden Bakterien- und Hefestämme gelistet. Appendix Tabelle 7 enthält eine Auflistung der Gen-Namen und Gen-Orte, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

4.1.1 Pflanzenlinien

Die Experimente in dieser Dissertation wurden alle im *Arabidopsis thaliana* Ökotyp *Columbia-0* (Col) durchgeführt, abgesehen von jenen Experimenten mit der Linie ELCH-HA, welche den Ökotyp Wassilewskija (Ws) trägt (Spitzer et al., 2006). Die T-DNA Insertionsmutanten *sh3p1* (Salk_127258), *sh3p3* (Salk_065790), *vps23.1-3* (Sail_1233E07_2-4) und *vps23.2-1* (Sail_237G05_3-4) wurden über das Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC) bezogen. Für Mehrfachmutaten wurden diese Linien miteinander gekreuzt.

Bei der Zellkultur für die Protoplastierung handelte es sich um Wurzelzellen von *Arabidopsis thaliana*.

4.1.2 Bakterien und Hefestämme

Klonierte Plasmide wurden zur Vermehrung in die E.coli Zellen DH5 α (F ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK $^-$, mK $^+$) *phoA supE44* λ - *thi-1 gyrA96 relA1*) oder TOP10 (F ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 araD139* Δ (*ara leu*) 7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*) transformiert.

Für die Expression rekombinanter Proteine wurden die E.coli Zellen Rosetta-DE3 (F ϕ -*ompT hsdSB*(rB $^-$ mB $^-$) *gal dcm pRARE*² (Cam^R)), Rosetta-gami 2 (Δ (*ara-leu*)7697 Δ *lacX74* Δ *phoA Pvull phoR araD139 ahpC galE galK rpsL* F'*[lac⁺ lacI^q pro]*)

gor522::Tn10 trxB pRARE2³ (Cam^R, Str^R, Tet^R)⁴ und Rosetta-gami B (F⁻ *ompT hsdSB*(r_B⁻ m_B⁻) *gal dcm lacY1 aphC gor522::Tn10 trxB pRARE² (Cam^R, Kan^R, Tet^R)*) (Merck-Millipore, Deutschland).

Für die Pflanzentransformation wurden die drei *Agrobacterium tumefaciens* Stämme GV3101::pMP90 (C58 (Rif^R), plasmid: pMP90(pTiC58ΔT-DNA) (Gent^R)), GV3101::pMP90RK (C58 (Rif^R), plasmid: pMP90RK(pTiC58ΔT-DNA) (Gent^R, Kan^R)) und GV3101::pMP90 pSOUP (C58 (Rif^R), plasmids: pMP90(pTiC58ΔT-DNA) (Gent^R), pSOUP (Tet^R)) verwendet.

Für die Y2H-Analysen wurden folgenden Hefestämme mit den jeweils zu testenden Plasmiden doppelt transformiert: Der Hefestamm Y8800 (basierend auf dem Stamm PJ69-4; *MATa, leu2-3, 112, trp1-901, his3-200, ura3-52, gal4Δ, gal80Δ, GAL2-ADE2 LYS2::GAL1-HIS3, MET2::GAL7-lacZ cyh2R*) und der Stamm Y190 (*MATa, ura3-52, leu2-3, 112, trp1-901, his3-200, ade2-101, lys2-801, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1-HIS3-HIS3, MEL1, URA3::GAL1-GAL1-lacZ, cyh2*).

4.2 Methoden

4.2.1 Pflanzenanzucht

Arabidopsis thaliana Pflanzen wurden bei 21°C in Dauerlicht oder unter Langtag-Bedingungen (16 Stunde Licht/8 Stunden Dunkelheit) mit einer Lichtintensität zwischen 100 und 120 μmol m⁻² sec⁻¹ angezogen. Für die sterile Anzucht von Keimlingen wurden Samen für 15-20 min in einer gesättigten Calciumhypochloritlösung und anschließend für 15 Sekunden in 80%igem Ethanol sterilisiert und 3-mal mit sterilem Wasser gewaschen. Die Samen wurden auf *Germination medium*- (GM-) (4,3 g/l Murashige & Skoog (MS); 10 g/l Saccharose; 0,5 g/l 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)-Monohydrat; 6,5 g/l Agar; pH 5,8 mit KOH eingestellt) oder ½ MS-Wachstumsmedium (2,15 g/l Murashige & Skoog (MS); 0,5 g/l MES-Monohydrat; 6,5 oder 8 g/l Agar; pH 5,8 mit KOH eingestellt). Bevor die Samen in Licht kamen, wurden sie ein bis 4 Tage bei 4°C stratifiziert. Je nach Bedarf wurden diese Keimlinge nach sieben Tagen auf Erde pikiert und bei 21 °C und Dauerlicht oder Langtagbedingungen für Experimente mit adulten Pflanzen oder zur Propagierung gehalten.

Für die Wurzellängen-Messungen wuchsen die Keimlinge sechs Tage auf GM, das mit 3 μM Brefeldin A (BFA) versetzt war, unter Langtagbedingungen bei 21 °C. Um einen Autophagiedefekt zu erkennen, wurden sieben Tage alte Keimlinge, auf ½ MS

und unter Kurztagbedingungen gewachsen, für fünf oder sechs Tage ins Dunkel gebracht, um deren Seneszenz zu beobachten.

Für die statistische Auswertung der Nachkommenschaft der Mehrfach-Mutante *vps23.1-3+/-vps23.2-1+/-* und *vps23.1-3+/-vps23.2-1+/-amish3p2+/-* wurden Samen dieser Linie auf GM ausgelegt und nach dreitägiger Stratifizierung bei 4 °C für sieben Tage unter Langtag-Bedingungen angezogen. Für die Komplementation mit *SH3P2pro:SH3P2(amiRNAs)-GFP* wurden ca. 200 rot-fluoreszierende T₁-Samen nach der Transformation unter dem Fluoreszenz-Stereomikroskop selektiert und ebenfalls auf GM ausgelegt. Nach dreitägiger Stratifizierung kamen sie zur gleichen Zeit wie die übrigen Platten in Langtag-Bedingungen. Als WT-Kontrolle wurde Col-0 ebenfalls unter denselben Bedingungen gezogen. Die statistische Aufwertung erfolgte durch manuelles Zählen der Keimlinge unter dem Stereomikroskop, dabei wurde zweimal von unterschiedlichen Personen ausgezählt. Um die Expression von SH3P2(amiRNAs)-GFP sicher zu stellen, wurden die Keimlinge nach der Analyse unter dem Konfokalmikroskop betrachtet, dabei wurde festgestellt, dass alle Keimlinge das Konstrukt exprimierten.

4.2.2 Pflanzentransformation

Arabidopsis thaliana wurde mittels der *floral dip*-Methode transformiert (Clough and Bent, 1998). Hierfür wurden die *Agrobacterium tumefaciens* Stämme GV3101::pMP90, GV3101::pMP90RK oder GV3101::pMP90 pSoup mit der jeweiligen Plasmid-DNA transformiert, welche ins pflanzliche Genom integriert werden sollte. Die transformierten Bakterien wurden auf LB-Medium (1 % (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1 % NaCl, pH 7), versetzt mit den entsprechenden Antibiotika, selektiert. Für alle *A. tumefaciens* Stämme wurden hierbei 50 µg/ml Rifampicin und 25 µg/ml Gentamycin eingesetzt. Für GV3101::pMP90RK wurde zusätzlich 50 µg/ml Kanamycin zugegeben und für GV3101:: pMP90 pSoup 12 µg/ml Tetracyclin. Nach der Selektion wurden die Bakterien für 24 Stunden in 500 ml flüssigen LB angezogen und das Zellpellet nach Zentrifugieren bei 4 000 g in 100 bis 200 ml Transformationspuffer (0,22% (w/v) MS, 5% (w/v) Glucose, 0,05% MES-Monohydrat, 44 µM 6-Benzylaminopurin, 0,05% (w/v) Silwet L-77) gelöst. Knospende Arabidopsis Pflanzen des Ökotyps Col-0 wurden nun für 30 Min in diese Zellsuspension eingetaucht und über Nacht bei Raumtemperatur (RT) unter einer Plastikhülle gehalten. Anschließend wurden die Pflanzen unter normalen Bedingungen (s. unter 4.2.1) bis zum Abreifen weitergezogen.

4.2.3 Selektion der transgenen Pflanzen

Die Samen der transformierten Pflanzen wurden auf verschiedene Weisen selektiert, je nachdem, welche Resistenz die eingebrachten Plasmide enthielten.

Für eine Antibiotika-Selektion wurden die Samen sterilisiert und auf $\frac{1}{2}$ MS-Medium mit entsprechend 50 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin oder 30 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin B ausplattiert. Nach sieben bis zehn Tagen wurden die überlebenden Keimlinge auf Erde gesetzt und unter normalen Bedingungen gezogen.

Für eine BASTA (Glufosinat-Ammonium)-Selektion wurden die Samen direkt auf Erde ausgesät und nach der Keimung zweimal, jeweils nach vier bis fünf Tagen und nach acht Tagen, mit BASTA-Lösung (Bayer CropScience, Deutschland) (1:1000 verdünnt) besprüht. Die überlebenden Keimlinge wurden vereinzelt und unter normalen Bedingungen gezogen.

Samen von Pflanzen, die mit dem pFAST-Vektor transformiert wurden exprimierten ein Reporter-gen und konnten unter Fluoreszenzlicht im Olympus BZX16 Stereomikroskop (Olympus, Europa) anhand ihrer Fluoreszenz identifiziert und gesammelt werden. Anschließend wurden die Samen sterilisiert und auf GM ausplattiert, nach sieben Tagen wurden die Keimlinge auf Erde gesetzt.

4.2.4 PEG vermittelte Transformation von Wurzelzellprotoplasten

Aus einer drei bis fünf Tage alte Arabidopsis Wurzelzellkultur wurden 10 ml der Kultur unter sterilen Bedingungen in einem 15-ml Röhrchen gesammelt und bei 400 g für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 10 ml WD (*Wall Digestion*) Lösung (0.4 M Mannitol, 8 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) ohne Enzyme gewaschen und nochmals bei 400 g für 2 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde nun in WD Lösung mit Enzymen (0.4 M Mannitol, 8 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 1 % Cellulase und 0.25% Macerozym) resuspendiert. Für den Zellwandverdau wurde die Zellen zwei bis drei Stunden bei Raumtemperatur (RT) und bei 50 - 55 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Um die Zellverbindungen zu brechen, wurde das Röhrchen ab und zu invertiert. Nach zwei bis drei Stunden wurde die Verdaueffizienz unter dem Mikroskop kontrolliert.

Waren die Zellen protoplastiert, wurde sie in fünf 2-ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und bei 100 g für 2 min zentrifugiert. Die lebenden Zellen pelletierten dabei auf den Boden der Gefäße, der Überstand wurde verworfen. Die Pellets wurden einmal mit WD Lösung ohne Enzyme gewaschen. Die Protoplasten wurden anschließend in W5

Lösung (154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂ x 2H₂O, 5 mM Glucose, 5 mM KCl) ½ Stunde auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Protoplasten unter dem Lichtmikroskop gezählt. Nach 30 min wurden die Protoplasten bei 100 g pelletiert und in MMM Lösung (15 mM MgCl₂, 0.1 % MES Monohydrate, 0.5 M Mannitol) aufgenommen, die Zellkonzentration sollte 10⁶ Zellen/ ml betragen. 250 µl dieser Suspension wurde nun mit 20 µg je DNA-Konstrukt versetzt und 250 µl PEG Lösung (40% Polyethylenglycol (PEG) 4000, 0.4 M Mannitol, 0,1 M CaCl₂ x 2H₂O) hinzugegeben. Zur Transformation werden die Zellen 30 min auf Eis inkubiert, anschließend pelletiert und mit W5 Lösung gewaschen. Die Zellen werden über Nacht in 200-300 µl Nährlösung (4.33 g/L MS mit Gamborg B5 Vitamin medium) bei 21 °C im Dunkeln inkubiert und am darauf folgenden Tag unter dem Konfokalmikroskop untersucht.

4.2.5 Molekularbiologische Methoden

4.2.5.1 Klassische Klonierung

Die zu klonierenden Genen und Fragmente wurden mit der *Phusion High-Fidelity* DNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific) in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. In einem 50 µl Ansatz befanden sich einfach (1x) Phusion HF Puffer, 200 µM Desoxynukleinsäurenmix (dNTPs), je 1 µM Oligos, zwischen 250 ng und 1 µg cDNA oder genomische DNA (für genomische Konstrukte) und 1 U (eine Enzym-Einheit) *Phusion High-Fidelity* DNA-Polymerase. In manchen Fällen wurde 0,5 mM MgCl₂ oder 3 % Dimethyl-sulfoxid (DMSO) der Reaktion zu gegeben. Nach Kontrolle der PCR-Produkte auf einem 0,8 %igem ethidiumbromidhaltigen Agarosegel wurden die PCR Produkte mittels *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) aufgereinigt und ca. 40 µg der aufgereinigten PCR sowie die benötigten Klonierungsvektoren, mit 10 U der jeweiligen Restriktionsenzyme, welche für die Klonierung gewählt wurden, in einem 50 µl Ansatz für 4 Stunden bei 37°C verdaut. Die verdauten Insertionsfragmente wurden mittels DNA-Fällung in Ethanol aufgereinigt oder aus einem 0,8 %igem Agarosegel ausgeschnitten und mittels *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* aufgereinigt. Für die DNA-Fällung wurden 125 µl 100% Ethanol und 5 µl 3 M Natriumacetat-Lösung pH 5,2 zu 50 µl Reaktionsansatz gegeben und 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschließend bei 13 000 g für 15 min zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und nach Trocknung in 20-30 µl Wasser gelöst.

Für die Ligation der Insertionsfragmente und den Vektoren, wurden diese auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen, um die Konzentrationen zu vergleichen. In der Ligation

wurden die Fragmente im Verhältnis Vektor zu Insert 1:5 eingesetzt und 1x T4 DNA Ligase Puffer und 2,5 U der T4-Ligase (Thermo Fisher Scientific). Nach einer Stunde wurde der komplette Ligationsansatz in *E. coli* Zellen (DH5 α oder Top10) transformiert und auf LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika zur Selektion über Nacht bei 37 °C angezogen.

4.2.5.2 Klonierung der, in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte mittels klassischer Klonierung

Die Sequenzen und genutzten Schnittstellen sind den Tabellen 1 und 2 zu entnehmen. Die Konstrukte für die Y2H-Tests wurden jeweils in die Vektoren pGAD7 und pGBKT7 (Clontech) kloniert. Um die Hefe-Konstrukte *GBD-SH3P2* und *GAD-SH3P2* zu erhalten, wurden das offene Leseraster (open reading frame [ORF]) der jeweiligen Gene mit den Oligos MS11 und MS12 aus Arabidopsis cDNA amplifiziert und zwischen die Schnittstellen EcoRI und Sall der Vektoren pGBKT7 und pGAD7 kloniert. *GAD-SH3P1* und *GAD-SH3P3* wurden jeweils mit den Oligopaaren MS7-MS8 und MS9-MS10 amplifiziert und *SH3P1* zwischen die Schnittstellen NcoI und BamHI sowie *SH3P3* zwischen die Schnittstellen EcoRI und Sall des Vektors pGAD7 kloniert. *Auxilin-like protein* wurde mittels Oligos MN106-MN107 amplifiziert und zwischen EcoRI und XhoI in pGAD7 kloniert. Um *35Spro:SH3P2-GFP* zu erhalten wurde, das ORF von SH3P2 mit den Oligos MN6-MN7 von cDNA sowie *GFP* mit dem Oligopaar MN15-MN16 von einem bereits existierenden GFP-Konstrukt amplifiziert und mittels Dreifragmentligation in pUC18 kloniert. Die ESCRT-I-Gene *GAD-VPS23.1*, *GBD-VPS23.1*, *GBD-VPS28.1*, *GBD-VPS37.1* wurden mit den Oligos MN150-MN151 (VPS23.1), MN148-MN149 (VPS28.1) und MN146-MN147 (VPS37.1) amplifiziert und zwischen die Schnittstellen EcoRI-XhoI von pGADT7 oder EcoRI-Sall von pGBKT7 kloniert. Die VPS23 Fragmente wurden mit MN150-MN198 amplifiziert, um *GAD-VPS23(UEV)* zu erhalten und mit MN199-MN151, um *GAD-VPS23(Δ UEV)* zu klonieren. *GBD-SH3P2(Δ SH3)*, *GBD-SH3P2(Δ BAR)* und *GBD-SH3P2(N84)* wurden vom Vollängenkonstrukt amplifiziert, mit jeweils MS11-MN177, MN176-MS12 und MS11-MN178 und zwischen EcoRI und Sall bzw. XhoI von pGBKT7 und pGAD kloniert.

Um *GST-SH3P2(FL)* und die Genfragmente von *SH3P2*, *GST-SH3P2(Δ BAR)*, *GST-SH3P2(Δ SH3)* und *GST-SH3P2(Δ NBAR)* zu erhalten, wurden entsprechend mit folgenden Oligos von dem Konstrukt *GBD-SH3P2* amplifiziert: MS11-MN156-2, MN157-MN156-2, MS11-MN216 und MN158-MN156-2. Alle Gene wurden zwischen die Schnittstellen EcoRI-NotI des Vektors pGEX-6P-1 (GE Healthcare Life Science)

kloniert. Für *MBP-SH3P2* wurde *SH3P2* zwischen die EcoRI-NotI Schnittstellen des Vektors pMAL-p2T (ein Geschenk aus dem Labor von Keiji Tanaka). Der C-Terminus von *VPS23* wurde mit den Oligos MN199-MN151 amplifiziert und zwischen EcoRI-Sall von pGEX-6P-1 kloniert, um *GST-VPS23.1(ΔUEV)* zu generieren. GST-TOL6(GAT) und GST-TOL6(C380) wurden jeweils mit MN217-MN218 und MN219-MN220 mit EcoRI und NotI in pGEX-6P-1 kloniert. Die TOL-Konstrukte für die Y2H-Analyse wurden von Franziska Anzenberger hergestellt. Das ORF von *TOL2* und *TOL6* wurde jeweils mit MN152-MN153 und MN154-MN155 amplifiziert und zwischen den Schnittstellen NdeI und XhoI von pGADT7 platziert.

4.2.5.3 Gateway Klonierung

Die Prozedur und die Kondition der PCR-Amplifizierung waren dieselben, wie unter 4.3.1.2 beschrieben. Die Gateway Klonierung wurde mittels des Gateway BP Clonase II Enzym Mix und Gateway LR Clonase II Enzym Mix (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Deutschland) durchgeführt, dabei wurde dem Protokoll des Herstellers gefolgt. Für die BP-Reaktion wurde der Vektor pDONR207 verwendet. Statt der BP-Reaktion konnte auch eine TOPO-Gateway-Reaktion erfolgen (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Deutschland). Auch hier wurde nach Herstellerprotokoll verfahren, der in dieser Reaktion verwendetet Vektor war pENTR-TOPO/D/TEV. Die TOPO-Gateway-, BP- und LR-Reaktionen wurden in *E.coli* Zellen (DH5α oder TOP10) transformiert und auf LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika zur Selektion über Nacht bei 37 °C angezogen.

4.2.5.4 Klonierung der Konstrukte in dieser Arbeit mittels Gateway Klonierung

Für die pflanzen-expressorischen SH3P2-Konstrukte *35S:SH3P2-GFP*, *35S:SH3P2(ΔSH3)-GFP* and *35S:SH3P2(ΔNBAR)-GFP* wurden jeweils die Oligopaare MN53-MN54, MN229-MN230 und MN231-MN232 verwendet und mittels Gateway Technologie in die Vektoren *35S:GW-GFP* (nur das Volllängenprotein) und in pFAST-R05 kloniert (nur die beiden Fragmente) (Shimada et al., 2010).

Das Konstrukt *VPS23.1:VPS23.1-TagRFP* in pGWB558 (Nakagawa et al., 2007) für die Expression in Pflanzen, wurde mit den Oligos MN185-MN186 aus genomischer DNA amplifiziert. Die Oligos deckten den Bereich einer 1989 bp langer Promoter-Region und das gesamte Gen ab, das aus einem einzigen Intron besteht.

Um eine artifizielle mikroRNA für *amish3p2* zu generieren, wurde die Zielsequenz

ACGAATGGTAACGTAT in den Vektor pGWB502 (Nakagawa et al., 2007) kloniert. Dieses Konstrukt wurde von Mie Ichikawa, Labor von Masa H. Sato, Department of Life and Environmental Science Kyoto hergestellt. Das Konstrukt *SH3P2:SH3P2-GFP(amiRNAs)* (hergestellt von Franziska Anzenberger), welches resistent gegen die artifizielle mikroRNA ist, basiert auf dem Konstrukt *SH3P2pro:SH3P2-GFP*, das ebenfalls von Mie Ichikawa hergestellt wurde. Es weist eine Mutation auf, in der die Zielsequenz ACGAATGGTAACGTAT, welche mit den Oligos FA212-FA213 durch PCR-basierte Mutagenese hergestellt wurde und anschließend mit dem Oligopaar FA214-FA215 amplifiziert und mittels Gateway Klonierung in den Vektor pFAST-R07 (Shimada et al., 2010) kloniert wurde.

Die Klonierung von *35S:YFP-CLC* und *pUBQpro:ECFP-ARA7* war beschrieben in Nagel et al. 2017 (Nagel et al., 2017). Auch die Herstellung weiterer Konstrukte, die in dieser Arbeit verwendet wurden, aber nicht von mir oder Franziska Anzenberger im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden, *SH3P2pro:SH3P2-GFP*, *CLCpro:CLC-mKO*, *AMSH3pro:AMSH3-YFP*, *AMSH3:mCherry-AMSH3*, *35Spro:HA-SKD1*, *UBQ10pro:YFP-VPS2.1*, *UBQ10pro:RFP-CLC*, *35Spro:RFP-SYP41*, *35Spro:RFP-ARA7*, *SYP43pro:GFP-SYP43*, *UBQ10pro:YFP-ARA7*, *UBQ10pro:mCherry-ARA7* and *TOL6pro:TOL6-mCherry*, *35Spro:ELC-HA*, *GST-VPS2.1*, *GST-AMSH3*, *GBD-AMSH1*, *GBD-AMSH2*, *GBD-AMSH3(AXA)*, *GAD-AMSH3*, *GBD-FYVE1(ΔFYVE1)* und *35Spro:RFP-FYVE1* sind in folgenden Veröffentlichungen beschreiben (Geldner et al., 2009b; Katsiarimpa et al., 2011; Ito et al., 2012; Uemura et al., 2012; Korbei et al., 2013; Kolb et al., 2015; Nagel et al., 2017).

4.2.5.5 Plasmidisolierung aus E.coli Zellen

Klonierte Plasmide wurden zur Vermehrung in E.coli Zellen (DH5 α) transformiert und in 3 ml LB-Medium über Nacht bei 37° C schüttelnd inkubiert. Nach dem Pelletieren wurden die Zellen durch eine alkalische Lyse aufgeschlossen und die Plasmide mittels Plasmid-Präparation aufgereinigt. Hierfür wurden das Zellpellet in 100 μ l P1-Lösung (50 mM Tris pH8, 10 mM Ethylendiamintetraessigsäure [EDTA]) resuspendiert. Durch die Zugabe von 200 μ l P2-Lösung (200 mM NaOH, 1 % SDS) fand die Lyse der E.coli Zellen statt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 150 μ l P3-Lösung (3M Kaliumacetat, pH5,5) neutralisiert und dadurch Proteine und DNA denaturiert. Mit 100 μ l Phenol:Chloroform (1:1) wurde die Zellsuspension bei 13 000 g für 5 Min abzentrifugiert und dabei die löslichen Proteine ausgewaschen und in der organischen Phenol-Phase gebunden. Die wässrige Phase wurde nach dem Zentrifugieren abgenommen und mit 300 μ l Isopropanol gemischt, um eine DNA-Fällung bei 4°C und

13.000 *g* durchzuführen. Das DNA-Pellet wurde anschließend mit 80% Ethanol gewaschen und bei RT getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 50 μ l Wasser mit Ribonuclease R (Carl-Roth) gelöst und für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Für Midi- oder Maxi-Präparationen wurde das *JETstar 2.0 Plasmid Purification* MIDI- oder MAXI Kit (GENOMED) verwendet.

4.2.5.6 Isolierung von genomischer DNA aus Arabidopsis

Samen, Keimlinge oder einzelne Blätter von *Arabidopsis thaliana* wurden im 1,5 ml Reagiergefäß zermahlen, entweder mit einem Plastikhomogenisator oder mittels Glasperlen im TissueLyser II (Quiagen). Das gemahlene Samen- oder Pflanzenmaterial wurde in 300 μ l DNA-Extraktionspuffer (250 mM NaCl, 200 mM Tris-HCl pH 7.5, 25 mM EDTA pH 8.0, 0.5% SDS) aufgenommen und für 45 Min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde das Lysat mit 300 μ l Phenol:Chloroform (1:1) vermischt und bei 13 000 *g* für 5 Min zentrifugiert und dabei die löslichen Proteine ausgewaschen und in der organischen Phenol-Phase gebunden. Die wässrige Phase wurde nach dem Zentrifugieren abgenommen und mit 200 μ l Isopropanol gemischt, um eine DNA-Fällung bei 4°C und 13 000 *g* durchzuführen. Das DNA-Pellet wurde anschließend mit 80% Ethanol gewaschen und bei RT getrocknet und das Pellet in 200 μ l Wasser gelöst.

4.2.5.7 Genotypisierungs-PCR und Mutantenanalyse

Genotypisierungen der T-DNA-Insertionslinien und transformierter Linien mit jeweiligen Konstrukte erfolgten mittels PCR Analysen und den jeweiligen genspezifischen Oligos. Für die Genotypisierung von *vps23.1-3* wurden die Oligo-Kombinationen AG49-AG51 für das wildtypische Gen und AG51-LB3Sail für die T-DNA-Insertion verwendet. Für *vps23.2-1* die jeweilige Oligopaare AG47-FA169 und AG47-LB3Sail. Um zu testen, ob das Konstrukt *VPS23.1:VPS23.1-RFP* in einer Pflanze vorhanden war, wurde das Oligopaar MN201-FA121 verwendet. Das Wildtypische Gen *SH3P1* wurde mit dem Oligopaar MN91-MN92b identifiziert und die Mutante *sh3p1* mit MN91-LBb1.3. Wildtypische Gen *SH3P3* wurde mit dem Oligopaar MN93-MN94 identifiziert und die Mutante *sh3p3* mit MN93-LBb1.3. Das Konstrukt, welches die mikroRNA-Zielsequenz von *SH3P2* enthielt wurde mit den Oligos EI1-EI2 amplifiziert, welche an den att-Stellen des Gateway Vektors binden oder mit einem Oligo, das im 35S Promotor bindet und EI2.

4.2.5.8 Reverse Transkriptase - und quantitative Echtzeit (qRT)- PCR

RNA aus Keimlingen wurde mittels *NucleoSpin RNA Plant Kit* (Machery-Nagel) extrahiert und 1 μg der RNA wurde nach Herstellerprotokoll mit Oligo(dT) Primern (20 μM , Sequenz: TTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN) und der *M-MuIV Reverse Transcriptase* (Fermentas) zu cDNA zurück transkribiert. Um die Transkription der *SH3P*-Gene in den T-DNA-Linien *sh3p1* und *sh3p3* zu kontrollieren, wurde mit dieser cDNA, entsprechend mittels Primerpaaren MN99-MN100 und MN103-MN104, eine PCR auf die jeweiligen Gene durchgeführt.

Für eine quantitative Analyse wurde eine qRT-PCR mit *iQ SYBR Green Supermix* (Bio-Rad) in einem *CFX96 Real-Time Systemcycler* (Bio-Rad Laboratories) durchgeführt. Als Kontrolle diente bei beiden PCR-Analysen *ACTIN2* als Kontrolle. Um die Transkriptionsprodukte von *SH3P2* in der artifiziellen mikroRNA-Linie *amish3p2* zu amplifizieren, wurde das Primerpaar MN174-MN175 benutzt. Als Kontrolle diente bei beiden PCR-Analysen *ACTIN2* als Kontrolle (Katsiarimpa et al., 2011) (Katsiarimpa et al., 2013).

4.2.6 Biochemische Methoden

4.2.6.1 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese wurde durchgeführt, wie 1970 beschrieben in (Laemmli, 1970). Um die Gele vorzubereiten, wurden die Minigelsysteme Mini-PROTEAN III System (Bio-Rad Laboratories) und SureCast Gel Handcast (Thermo Scientific) genutzt. Die 10 % -15 %igen Gele wurden mit einer 29:1 Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung der Firma Carl Roth hergestellt. Die Proben lagen in Laemmli-Puffer vor (Laemmli, 1970), als Größenreferenz diente der vorgefärbter Marker PageRuler™ Plus (Thermo Scientific) für die Westernblotanalyse oder der ungefärbte BenchMark™ (Thermo Scientific) zur Quantifizierung im Coomassie-gefärbten Gel.

4.2.6.2 Coomassiefärbung

SDS-Gele für Coomassiefärbung wurden direkt nach der Gelelektrophorese in die Färbelösung (25 % w/v Coomassie Brillantblau G R250, 43 % v/v Ethanol, 7 % v/v Essigsäure) geben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Gel wieder mit Entfärberlösung (43 % v/v Ethanol, 7 % v/v Essigsäure) entfärbt, um die gefärbten Proteinbanden sehen zu können.

4.2.6.3 Westernblotanalyse

Um die Proteine im Westernblot mit den spezifischen Antikörpern zu analysieren, wurden diese im elektrischen Feld aus dem SDS-Gel auf eine Membran übertragen. Hierfür wurde die Polyvinylidenfluoride (PVDF)- Membran für 30 Sekunden in 100 % Methanol inkubiert und anschließend in SD-Puffer (25 mM Tris pH 8.3, 192 mM Glycine, 20 % (v/v) Methanol, 0.04 % (w/v) SDS) aufbewahrt. 1,2 mm dickes Filterpapier wurde ebenfalls mit SD getränkt und wie folgt im Blotter (Pequlab) gestapelt: zwei Filterpapiere, PVDF-Membran, Gel, zwei Filterpapiere. Luftblasen wurden mittels eines Rollers aus dem Sandwich gedrückt. Im elektrischen Feld wurden nun die Proteine für eine Stunde bei 2 mA/cm² vom Gel auf die Membran übertragen. Anschließend wurde die Membran mit Blockpuffer (10 % w/v Magermilchpulver in TBST [50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.05 % (v/v) Tween-20]) schüttelnd blockiert, um zu vermeiden, dass die Antikörper unspezifisch an die noch proteinfreien Stellen auf der Membran binden können. Nach 15 Min wurde die Membran in den ersten Antikörper überführt. Die erste Antikörperlösung wurde je nach Herstellerangaben in Blockpuffer verdünnt. Schüttelnd wurde die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur im ersten Antikörper inkubiert. Alternative konnte die Membran auch über Nacht bei 4 °C inkubiert werden. Nach der Inkubation wurde die Antikörper-Lösung entfernt und für einen wiederholten Gebrauch auf -20 °C eingefroren. Die Membran wurde dreimal für 15 Min mit TBST gewaschen und anschließend die ganze Prozedur mit dem zweiten Antikörper wiederholt, falls der erste Antikörper nicht bereits mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) oder Alkaliner Phosphatase (AP)-gekoppelt war.

Für die HRP-Detektion wurde die Membran nach dem Waschen 3 Min in Pierce ECL Plus Western Blotting Substrat-Lösung (Thermo Fisher Scientific, Deutschland) oder in SuperSignal Femto Maximum Sensitivity (Thermo Fisher Scientific, Deutschland) inkubiert und mittels CCD Kamera-System (LAS 4000, Fujifilm, Deutschland) entwickelt.

Für die AP-Detektion wurde die Membran in AP-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) mit 400 µM NBT und 550 µM BCIP inkubiert, bis die Signale zu sehen waren. Diese Reaktion wurde mit Wasser gestoppt und die Membran getrocknet.

4.2.6.4 PIP-Strip-Analyse

Die PIP Strips (Echelon Biosciences, USA) wurden über Nacht bei 4 °C in Blockpuffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.1% [v/v] Tween-20 und 3 % [w/v] Fettsäure-freiem Rinder-Serum-Albumin [BSA]) blockiert. Der Blockpuffer wurde für alle weiteren Schritte dieser Prozedur als Grundpuffer verwendet. Nach dem Blockieren der freien Bindestellen auf der Membran, wurden die PIP Strips mit 0,5 µg/ml des zu testenden rekombinaten Proteins für eine Stunde bei RT inkubiert und anschließend dreimal für 10 Min mit 5 ml Blockpuffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde bei RT in Blockpuffer mit erstem Antikörper (anti-GST [GE Healthcare, Deutschland]) inkubiert. Nach Entfernen der Antikörperlösung, wurde wieder dreimal für 10 Min mit Blockpuffer gewaschen, bevor der PIP-Strip für eine Stunde in der zweiten Antikörperlösung (anti-Goat [Sigma-Aldrich]) inkubiert wurde. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden die HRP-Signale mittels Pierce SuperSignal Femto Maximum Sensitivity (Thermo Fisher Scientific, Deutschland) im CCD Kamera-System (LAS 4000, Fujifilm, Deutschland) detektiert.

4.2.6.5 Rekombinante Proteinaufreinigung aus *E. coli* Zellen

GST- oder MBP-fusionierte Proteine wurden rekombinant in *E. coli* Rosetta (DE3) -, Rosetta-gami 2- oder Rosetta-gami B-Stämmen (Merck-Millipore) produziert. Die *E. coli* Zellen wurden mit den jeweiligen Konstrukten zur Expression von GST- oder MBP-Fusionsproteinen transformiert und erst auf einer Platte über Nacht bei 37 °C angezogen. Von dieser Platte wurde am Tag darauf eine Kolonie gepickt und über Nacht bei 37 °C eine 3 ml Vorkultur angezogen, mit der am Tag darauf eine 500 ml Hauptkultur inokuliert wurde. Die Expression der Proteine wurde mit 0,2 bis 0,5 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert und je nach Löslichkeit des Proteins wurde für drei Stunden bei 30 °C oder für 18 Stunden bei 18 °C exprimiert. Die Zellen wurden. Nach Ernten der Zellen bei 4 000 g wurden diese einmal in PBS gewaschen und nochmals pelletiert. Die gewonnenen Zell-Pellets wurden geteilt und auf -80° C eingefroren, um einen besseren Zellaufschluss zu erreichen.

Der Zellaufschluss erfolgte entweder mechanisch durch zweimal 15 Min Ultraschall-Impulse (5 Zyklen mit 23 % Leistung) in einem Extraktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,4 % (v/v) Tween, 1x *complete EDTA-free protease inhibitor cocktail* [Roche Diagnostics]), oder chemischen, mittels B-PER™- Reagenz von ThermoFisher Scientific. Das Homogenat wurde für 15 Min bei 13 000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein sauberes 50-ml Reaktionsröhrchen überführt und mit jeweils 100-200 µl *Pierce® Glutathione Magnetic Beads* (Thermo Scientific)

oder *Protino*[®] *Glutathione Agarose 4B* (Macherey-Nagel), zur Aufreinigung GST-fusionierter Proteine versetzt, oder zur Aufreinigung MBP-fusionierter Proteine mit *Amylose Resin* (New England Biolabs) versetzt. Der Extrakt wurde mit der Matrix ein bis zwei Stunden bei 4 °C rotierend inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Matrix gewaschen. Hierfür wurde die Agarose bei 400 g auf den Boden des Reaktionsgefäßes zentrifugiert oder die magnetischen *Beads* mittels Magnetständer an der Wand des Reaktionsgefäßes festgehalten und viermal mit Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) gewaschen. Eluiert wurden die GST- und MBP-fusionierten Proteine jeweils mit 50 mM Glutathion (Sigma Aldrich) und 10 mM Maltose (Sigma Aldrich). Für den *in vitro* Affinitätstest wurden die GST fusionierten Proteine in einigen Fällen nicht eluiert, sondern nach dem Waschen die proteinbeladene Matrix direkt verwendet oder auch mit der *PreScission* Protease (Sigma Aldrich) vom GST-Tag abgeschnitten und im Waschpuffer eluiert.

4.2.6.6 *In vitro* Affinitätstest

Für den *in vitro* Affinitätstest wurde 25, 50 oder 65 pmol GST-fusioniertes Protein, gebunden an *Pierce*[®] *Glutathione Magnetic Beads*, mit der equimolaren Menge eines anderen Proteins oder mit Tetra-Ubiquitin-Ketten (Enzo Life Science), in 400 µl Puffer (50 mM Tris-HCl at pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.05% Tween-20) rotierend bei 4 °C inkubiert. Nach 4 Stunden wurde die Matrix vier Mal mit kaltem Puffer (50 mM Tris-HCl at pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) gewaschen und anschließend die Proteine mit 40 mM Glutathion eluiert und das eluierte Material mittels Westernblot analysiert.

4.2.6.7 Proteinextraktion aus Pflanzen

Proteinrohextrakt wurde aus sieben Tage alten Arabidopsis Keimlingen gewonnen, indem ungefähr 50-100 µg Ausgangsmaterial in einem 2-ml Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff eingefroren und im TissueLyser-II (Qiagen) mittels Glasperlen aufgeschlossen und homogenisiert wurde. Das pulverisierte Pflanzenmaterial wurde anschließend in Extraktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 % Glycerol, 0.4 % Triton X-100 and 1x *complete EDTA-free protease inhibitor cocktail* [Roche Diagnostics]) gelöst und sofort im Verhältnis 1:5 mit 5x Laemmli-Puffer versetzt und bei 95 °C aufgeköcht. Die Proben wurde bei -20 °C für Westernblotanalysen aufbewahrt.

4.2.6.8 Immunpräzipitation

1 g sieben Tage alte Keimlinge, *SH3P2:SH3P2-GFP* oder *35S:VPS23-HA* exprimierend, wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und anschließend in 2 ml Extraktionspuffer (50 mM Tris·HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 % Glycerol, 0.2 % Nonidet P-40 and 1x *complete EDTA-free protease inhibitor cocktail* [Roche Diagnostics]) homogenisiert. Das Homogenat wurde für 15 Min bei 13 000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein sauberes 50-ml Reaktionsröhrchen überführt. Der Überstand wurde mit Puffer (50 mM Tris·HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 % Glycerol, 1x *complete EDTA-free protease inhibitor cocktail*) 10x verdünnt, um die Nonidet-Konzentration zu verringern. Dem verdünnten Zelllysat wurden nun 80 µl GFP-TRAP *Magnetic Agarose Beads* (ChromoTek) zugegeben und für 1,5 Stunden rotierend bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die magnetische Matrix viermal mit kaltem Puffer A gewaschen (50 mM Tris·HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 % Glycerol) und die Elution erfolgte in 30 µl 1x Laemmli Puffer (Laemmli, 1970) und durch zehn minütiges Erhitzen auf 70 °C. Die Proben wurden anschließend mittels Westernblot analysiert.

4.2.6.9 Hefe-Zwei-Hybrid (Y2H)-Analyse

Hefen wurden auf -80 °C gelagert und über Nacht auf YPD-Medium (10 g/L Glucose, 10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L Agar) bei 30 °C aufgeweckt und am nächsten Tag nochmal bei 30 °C für 3-4 Stunden schüttelnd in flüssigem YPD inkubiert. *GAL4-Activation Domain* (GAD)- und *GAL4-Binding Domain* (GBD)-Fusionskonstrukte entweder in den Hefestamm Y8800 oder in den Stamm Y190 kotransformiert. Die transformierten Hefen wurden für drei Tage auf Minus-Leucin-Tryptophan (-LW) Selektionsmedium angezogen (Synthetic Complete: 6,7 g/L Hefe-Stickstoff-Basismedium 20 g/L Glucose, 1,4 g/L Drop Out Medium [Sigma-Aldrich] ohne Leucin und Tryptophan) bei 30 °C angezogen. Für die Y2H-Analyse wurde das auxotrophe Wachstum auf Minus-Leucin-Tryptophan-Histidin (-LWH) Selektionsmedium getestet. Als Histidinantagonist wurde 0 mM, 1 mM, 3mM und 5mM 3-Amino-1,2,4-triazol (3AT) zugeben. Die Hefe wurde 3 Tage bei 30 °C inkubiert und danach analysiert. Um die Expression der Konstrukte zu überprüfen, wurden die Proteine wie folgt extrahiert. Eine 3 ml OD 1,5 Flüssigkultur wurde bei 3 000 g 3 Min lang zentrifugiert und das Zellpellet einmal mit reinem Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 0,1 M NaOH Lösung resuspendiert und für 10 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden anschließend nochmals pelletiert und das Pellet einmal mit Wasser gewaschen. Der Aufschluss erfolgt nun in 100 µl 1x Laemmli-Puffer, bei 98 °C. Die

Proben wurden mittels Westernblot analysiert. Bevor die Proben auf ein SDS-Gel geladen wurden, wurden sie 10 Min zentrifugiert und nur der Überstand verwendet.

4.2.6.10 Deubiquitylierungsanalyse

Für die Deubiquitylierungsanalyse wurde kommerziell erhältliches K63-Di-Ubiquitin, das mit einem TAMRA-Fluorophor an Position drei gekoppelt war (R&D Systems, USA), verwendet. 0,4 μ M TAMRA-K63-Di-Ubiquitin wurde zusammen mit 50 μ M rekombinant aufgereinigtem AMSH3 in 100 μ l TAMRA-DUB-Puffer (50 mM Tris·HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,1 % Pluronic F-127, 1 mM Tris (2-Carboxyethyl) Phosphin) inkubiert. Um den Effekt von SH3P2 auf die Enzymaktivität von AMSH3 zu testen, wurde AMSH3, vor der Zugabe von TAMRA-K63-Di-Ubiquitin, für 30 Min mit rekombinarem GST-SH3P2 vor inkubiert. Als negative Kontrolle diente GST. Die Fluoreszenz wurde in einem Synergy 2 Multimode Microplate Reader (BioTek) mit dem Anregungsfilter bei 530 nm und Emissionsfilter bei 590 nm gemessen. Die Messung lief über 60 Min und jede Minute fand eine Messung statt.

4.2.7 Zellbiologische Methoden

4.2.7.1 Mikroskopie

Die Bilder der Fluoreszenz-markierten Fusionsproteine in den Lokalisationstudien wurden unter dem konfokalem Laserscan-Mikroskop FV-1000/IX81, ausgestattet mit GaAsP Detektoren (Olympus Europa), mit den Objektiven UPlanSApo (Olympus Europa) für 10fache und 60fache Vergrößerung aufgenommen. Die Fluoreszenzsignale von GFP wurden mit dem Laserstrahl bei 488 nm und die Signale von RFP, mCherry und mKO sowie des roten Farbstoffes FM4-64 mit dem Laserstrahl bei 559 nm bei Laserintensitäten zwischen 0,5 % und 3 % visualisiert. Die Bildbearbeitungen und -analysen wurden mit FluoView (Olympus Europa), Fiji (Schindelin et al., 2012) und Photoshop CS6 (Adobe) durchgeführt.

4.2.7.2 Brefeldin A- und Wortmannin-Behandlungen

Für die Wortmannin (WM)-Behandlung der Protoplasten wurden diese für 120 Min mit 33 μ M WM (Applichem) inkubiert. Als negative Kontrolle diente eine Mock-Kontrolle,

die mit der gleichen Menge purem DMSO behandelt wurde. Die Protoplasten wurden unter dem Konfokalmikroskop analysiert.

Die Färbung der Keimlinge mit FM4-64 für die Studie zur Endozytoserate in *amish3p2* wurden Sieben-Tage-alte Keimlinge für 5 Min in flüssigem GM, mit 2 μ M des Membran-Farbstoffs FM4-64 inkubiert, zweimal mit purem GM gewaschen und anschließend unter dem Konfokalmikroskop analysiert. Die FM4-64 Signale wurden über einen Zeitraum von 15 Min jede Minute unter gleichbleibenden Bedingungen fotografiert. Die Signalstärke von FM4-64 an der Membran wurde mit der FluoView Software (Olympus) analysiert. Die Signalstärke bei 0 Min wurde auf 100 % gesetzt.

4.2.7.3 Isolierung von Clathrin-umhüllten Vesikeln (CCVs)

Die Isolierung der CCVs erfolgte weitestgehend nach dem Protokoll aus dem Methodenbuch „Plant Endosomes; Methods and Protcols“ Kapitel 13 (Reynolds et al., 2014) mit nachfolgend beschriebenen Abweichungen: Anstatt Pflanzenmaterial aus einer Zellkultur wurden 10-20 g sieben-Tage-alter Arabidopsis Keimlinge für die Prozedur verwendet. Die Keimlinge wurden nach und nach bei 4 °C im Kühlraum in ca. 70 ml eisgekühltem Clathrin-Isolations-Puffer (CIB) (100 mM MES, 0,5 mM MgCl₂, 3 mM EDTA, 1 mM Ethylenglykol Tetraessigsäure [EGTA], pH 6,4 mit KOH mit Protease-Inhibitor-Cocktail) gemörsert. Die Zellsuspension wurde auf zwei 50-ml-Reaktionsröhrchen aufgeteilt und gleich für 10 Min bei 1 000 g (Avanti™ J-25, Rotor Type JA-14, Festwinkelrotor, Beckman-Coulter) zentrifugiert, der 100 g-Zentrifugationsschritt wurde weggelassen. Die hieraus entstandenen Pellets wurde nochmals gemörsert und bei 1 000 g zentrifugiert. Die Überstände wurde in zwei neue 50-ml-Reaktionsröhrchen überführt und hiervon 500 μ l Probe abgenommen und mit 5x Lämmli-Puffer versetzt. Die Überstände wurden, wie im Protokoll beschrieben, 25 Min bei 30 000 g (Avanti™ J-25, Rotor Type JA-14, Festwinkelrotor, Beckman-Coulter) zentrifugiert. Danach wurden die Überstände in zwei Ultrazentrifugations-Röhrchen (Bottle with Cap, Polycarbonat, 26,3 ml, 25 x 89 mm, 1 x 3-1/2 in qty. 6, Beckman-Coulter) überführt und für 1 Stunde bei 120 000 g in der Ultrazentrifuge (Optima LE-88K, Rotor Type 70.1 Ti, Festwinkelrotor, Titanium, Beckman-Coulter) zentrifugiert. Alle angebenen Waschschrte wurden eingehalten, mit der Abweichung, dass das Pellet nochmals im vorhandenen Überstand resuspendiert wurde, um einen Verdünnungseffekt zu vermeiden. Die Ultrazentrifugationspellets P120 wurden mit einer Spritze und einer dünnen Kanüle in insgesamt 5 ml CIB-Puffer resuspendiert. Von dieser Resuspension wurden 200 μ l Probe mit 5x Lämmle-Puffer versetzt und als SGL Bezeichnet. Während des ersten Ultrazentrifugationsschrittes wurden nach

Protokoll die zwei Saccharose-Gradienten in den Ultrazentrifugations-Röhrchen (Tube, Dünnwand, Ultra-Clear™, 14 ml, 14 x 95 mm in qty. 50, Beckman-Coulter) vorbereitet, auf die jeweils 2,5 ml des Homogenats aus P120 aufgetragen wurden. Der Saccharose-Gradient wurde 50 Min lang bei 116 000 *g* in der Ultrazentrifuge (Optima LE-88K, Rotor SW 40 Ti, Swing-out-Rotor, Titanium, Beckman-Coulter) zentrifugiert und anschließend die Schicht mit 10 % sowie die Trennschicht zwischen 10 % und 35% Saccharose abgenommen. Die Saccharose wurde so lange mit Puffer verdünnt, bis im Refraktometer ein Index < 5 % Saccharose erreicht war. Diese Verdünnung wurde in ein Ultrazentrifugations-Röhrchen (Bottle with Cap, Polycarbonat, 26,3 ml, 25 x 89 mm, 1 x 3-1/2 in qty. 6, Beckman-Coulter) überführt und 50 Min bei 200 000 *g* in der Ultrazentrifuge (Optima LE-88K, Rotor Type 70.1 Ti, Festwinkelrotor, Titanium, Beckman-Coulter) zentrifugiert. P200 wurde insgesamt mit einer Spritze und einer dünnen Kanüle in 2 ml CIB-Puffer gelöst, 200 μ l wurden mit 5x Laemmli-Puffer versetzt und als DFGL bezeichnet. Zu Beginn des Prozedere wurden zwei D₂O/Ficoll-Gradienten per Hand in den Ultrazentrifugations-Röhrchen (Tube, Dünnwand, Ultra-Clear™, 14 ml, 14 x 95 mm in qty. 50, Beckman-Coulter) hergestellt und horizontal für 6-8 Stunden bei 4 °C gelagert. Auf die D₂O/Ficoll-Gradienten wurden jeweils 1 ml des Homogenats aus P200 geschichtet und diese 12-14 Stunden bei 80 000 *g* in der Ultrazentrifuge (Optima LE-88K, Rotor SW 40 Ti, Swing-out-Rotor, Titanium, Beckman-Coulter) zentrifugiert. Anschließend wurden die Gradienten in 750 μ l Fraktionen aufgeteilt, dabei wurde vorsichtig an der Oberfläche abpipettiert. Es wurden die Fraktionen gesammelt, die im Refraktometer (Müller-Optronic, Deutschland) einen äquivalenten Saccharose-Index von 12 %-18 % zeigten. Die Fraktionen wurden nun wieder mit CIB-Puffer verdünnt, bis ein äquivalenter Saccharose-Index < 5% erreicht war. Um am Ende eine CCV-Fraktion zu erhalten, wurde die verdünnten Fraktionen aus dem D₂O/Ficoll-Gradienten in einem Ultrazentrifugations-Röhrchen (Bottle with Cap, Polycarbonat, 26,3 ml, 25 x 89 mm, 1 x 3-1/2 in qty. 6, Beckman-Coulter) für 50 Min bei 174 000 *g* in der Ultrazentrifuge (Optima LE-88K, Rotor Type 70.1 Ti, Festwinkelrotor, Titanium, Beckman-Coulter) zentrifugiert. Die CCV-Fraktion wurde in 200 μ l CIB-Puffer resuspendiert und mit 5x Laemmli-Puffer versetzt, um die Proben mittels Westernblot zu analysieren.

Für die Westernblotanalyse wurden jeweils 10 μ l der während der Isolierung gesammelten Proben auf das SDS-Gel geladen.

Literaturverzeichnis

- Abas, L., Benjamins, R., Malenica, N., Paciorek, T., Wisniewska, J., Moulinier-Anzola, J.C., Sieberer, T., Friml, J., and Luschnig, C.** (2006). Intracellular trafficking and proteolysis of the Arabidopsis auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. *Nat Cell Biol* **8**, 249-256.
- Abramovitch, R.B., Janjusevic, R., Stebbins, C.E., and Martin, G.B.** (2006). Type III effector AvrPtoB requires intrinsic E3 ubiquitin ligase activity to suppress plant cell death and immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2851-2856.
- Agromayor, M., and Martin-Serrano, J.** (2006). Interaction of AMSH with ESCRT-III and deubiquitination of endosomal cargo. *J Biol Chem* **281**, 23083-23091.
- Ahn, G., Kim, H., Kim, D.H., Hanh, N.H., Yoon, Y., Singaram, I., Wijesinghe, K.J., Johnson, K.A., Zhuang, X.H., Liang, Z., Stahelin, R.V., Jiang, L., Cho, W., Kang, B.H., and Hwang, I.** (2017). SH3P2 plays a crucial role at the step of membrane tubulation during cell plate formation in plants. *Plant Cell*.
- Akutsu, M., Kawasaki, M., Katoh, Y., Shiba, T., Yamaguchi, Y., Kato, R., Kato, K., Nakayama, K., and Wakatsuki, S.** (2005). Structural basis for recognition of ubiquitinated cargo by Tom1-GAT domain. *FEBS Lett* **579**, 5385-5391.
- Ambroso, M.R., Hegde, B.G., and Langen, R.** (2014). Endophilin A1 induces different membrane shapes using a conformational switch that is regulated by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 6982-6987.
- Babst, M., Sato, T.K., Banta, L.M., and Emr, S.D.** (1997). Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p. *EMBO J* **16**, 1820-1831.
- Babst, M., Wendland, B., Estepa, E.J., and Emr, S.D.** (1998). The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO J* **17**, 2982-2993.
- Bache, K.G., Raiborg, C., Mehlum, A., and Stenmark, H.** (2003). STAM and Hrs are subunits of a multivalent ubiquitin-binding complex on early endosomes. *J Biol Chem* **278**, 12513-12521.
- Bandmann, V., and Homann, U.** (2012). Clathrin-independent endocytosis contributes to uptake of glucose into BY-2 protoplasts. *Plant J* **70**, 578-584.
- Baral, A., Irani, N.G., Fujimoto, M., Nakano, A., Mayor, S., and Mathew, M.K.** (2015). Salt-induced remodeling of spatially restricted clathrin-independent endocytic pathways in Arabidopsis root. *Plant Cell* **27**, 1297-1315.
- Belda-Palazon, B., Rodriguez, L., Fernandez, M.A., Castillo, M.C., Anderson, E.A., Gao, C., Gonzalez-Guzman, M., Peirats-Llobet, M., Zhao, Q., De Winne, N., Gevaert, K., De Jaeger, G., Jiang, L., Leon, J., Mullen, R.T., and Rodriguez, P.L.** (2016). FYVE1/FREE1 Interacts with the PYL4 ABA Receptor and Mediates its Delivery to the Vacuolar Degradation Pathway. *Plant Cell*.
- Ben Khaled, S., Postma, J., and Robatzek, S.** (2015). A moving view: subcellular trafficking processes in pattern recognition receptor-triggered plant immunity. *Annu Rev Phytopathol* **53**, 379-402.

- Boucrot, E., Ferreira, A.P., Almeida-Souza, L., Debard, S., Vallis, Y., Howard, G., Bertot, L., Sauvonnet, N., and McMahon, H.T.** (2015). Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway. *Nature* **517**, 460-465.
- Bueso, E., Rodriguez, L., Lorenzo-Orts, L., Gonzalez-Guzman, M., Sayas, E., Munoz-Bertomeu, J., Ibanez, C., Serrano, R., and Rodriguez, P.L.** (2014). The single-subunit RING-type E3 ubiquitin ligase RSL1 targets PYL4 and PYR1 ABA receptors in plasma membrane to modulate abscisic acid signaling. *Plant J* **80**, 1057-1071.
- Caballe, A., and Martin-Serrano, J.** (2011). ESCRT machinery and cytokinesis: the road to daughter cell separation. *Traffic* **12**, 1318-1326.
- Cardona-Lopez, X., Cuyas, L., Marin, E., Rajulu, C., Irigoyen, M.L., Gil, E., Puga, M.I., Bligny, R., Nussaume, L., Geldner, N., Paz-Ares, J., and Rubio, V.** (2015). ESCRT-III-Associated Protein ALIX Mediates High-Affinity Phosphate Transporter Trafficking to Maintain Phosphate Homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell* **27**, 2560-2581.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nurnberger, T., Jones, J.D., Felix, G., and Boller, T.** (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**, 497-500.
- Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**, 735-743.
- Daumke, O., Roux, A., and Haucke, V.** (2014). BAR domain scaffolds in dynamin-mediated membrane fission. *Cell* **156**, 882-892.
- Dawson, J.C., Legg, J.A., and Machesky, L.M.** (2006). Bar domain proteins: a role in tubulation, scission and actin assembly in clathrin-mediated endocytosis. *Trends Cell Biol* **16**, 493-498.
- Dowlatshahi, D.P., Sandrin, V., Vivona, S., Shaler, T.A., Kaiser, S.E., Melandri, F., Sundquist, W.I., and Kopito, R.R.** (2012). ALIX is a Lys63-specific polyubiquitin binding protein that functions in retrovirus budding. *Dev Cell* **23**, 1247-1254.
- Doyle, S.M., Haeger, A., Vain, T., Rigal, A., Viotti, C., Langowska, M., Ma, Q., Friml, J., Raikhel, N.V., Hicks, G.R., and Robert, S.** (2015). An early secretory pathway mediated by GNOM-LIKE 1 and GNOM is essential for basal polarity establishment in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E806-815.
- Elia, N., Sougrat, R., Spurlin, T.A., Hurley, J.H., and Lippincott-Schwartz, J.** (2011). Dynamics of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery during cytokinesis and its role in abscission. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 4846-4851.
- Faesen, A.C., Luna-Vargas, M.P., Geurink, P.P., Clerici, M., Merx, R., van Dijk, W.J., Hameed, D.S., El Oualid, F., Ovaa, H., and Sixma, T.K.** (2011). The differential modulation of USP activity by internal regulatory domains, interactors and eight ubiquitin chain types. *Chem Biol* **18**, 1550-1561.
- Fotin, A., Cheng, Y., Sliz, P., Grigorieff, N., Harrison, S.C., Kirchhausen, T., and Walz, T.** (2004). Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy. *Nature* **432**, 573-579.
- Fujimoto, M., and Tsutsumi, N.** (2014). Dynamin-related proteins in plant post-Golgi traffic. *Front Plant Sci* **5**, 408.

- Fujimoto, M., Arimura, S., Nakazono, M., and Tsutsumi, N.** (2008). Arabidopsis dynamin-related protein DRP2B is co-localized with DRP1A on the leading edge of the forming cell plate. *Plant Cell Rep* **27**, 1581-1586.
- Fujimoto, M., Arimura, S., Ueda, T., Takanashi, H., Hayashi, Y., Nakano, A., and Tsutsumi, N.** (2010). Arabidopsis dynamin-related proteins DRP2B and DRP1A participate together in clathrin-coated vesicle formation during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 6094-6099.
- Gadeyne, A., Sanchez-Rodriguez, C., Vanneste, S., Di Rubbo, S., Zauber, H., Vanneste, K., Van Leene, J., De Winne, N., Eeckhout, D., Persiau, G., Van De Slijke, E., Cannoot, B., Vercruyssen, L., Mayers, J.R., Adamowski, M., Kania, U., Ehrlich, M., Schweighofer, A., Ketelaar, T., Maere, S., Bednarek, S.Y., Friml, J., Gevaert, K., Witters, E., Russinova, E., Persson, S., De Jaeger, G., and Van Damme, D.** (2014). The TPLATE adaptor complex drives clathrin-mediated endocytosis in plants. *Cell* **156**, 691-704.
- Gao, C., Zhuang, X., Shen, J., and Jiang, L.** (2017). Plant ESCRT Complexes: Moving Beyond Endosomal Sorting. *Trends Plant Sci*.
- Gao, C., Luo, M., Zhao, Q., Yang, R., Cui, Y., Zeng, Y., Xia, J., and Jiang, L.** (2014). A unique plant ESCRT component, FREE1, regulates multivesicular body protein sorting and plant growth. *Curr Biol* **24**, 2556-2563.
- Gao, C., Zhuang, X., Cui, Y., Fu, X., He, Y., Zhao, Q., Zeng, Y., Shen, J., Luo, M., and Jiang, L.** (2015). Dual roles of an Arabidopsis ESCRT component FREE1 in regulating vacuolar protein transport and autophagic degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 1886-1891.
- Geldner, N., Denervaud-Tendon, V., Hyman, D.L., Mayer, U., Stierhof, Y.D., and Chory, J.** (2009a). Rapid, combinatorial analysis of membrane compartments in intact plants with a multicolor marker set. *Plant J* **59**, 169-178.
- Geldner, N., Denervaud-Tendon, V., Hyman, D.L., Mayer, U., Stierhof, Y.-D., and Chory, J.** (2009b). Rapid, combinatorial analysis of membrane compartments in intact plants with a multicolor marker set. *Plant J* **59**, 169-178.
- Geldner, N., Anders, N., Wolters, H., Keicher, J., Kornberger, W., Muller, P., Delbarre, A., Ueda, T., Nakano, A., and Jurgens, G.** (2003). The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell* **112**, 219-230.
- Gimenez-Ibanez, S., Hann, D.R., Ntoukakis, V., Petutschnig, E., Lipka, V., and Rathjen, J.P.** (2009). AvrPtoB targets the LysM receptor kinase CERK1 to promote bacterial virulence on plants. *Curr Biol* **19**, 423-429.
- Gohre, V., Spallek, T., Haweker, H., Mersmann, S., Mentzel, T., Boller, T., de Torres, M., Mansfield, J.W., and Robatzek, S.** (2008). Plant pattern-recognition receptor FLS2 is directed for degradation by the bacterial ubiquitin ligase AvrPtoB. *Curr Biol* **18**, 1824-1832.
- Haas, T.J., Sliwinski, M.K., Martinez, D.E., Preuss, M., Ebine, K., Ueda, T., Nielsen, E., Odorizzi, G., and Otegui, M.S.** (2007). The Arabidopsis AAA ATPase SKD1 is involved in multivesicular endosome function and interacts with its positive regulator LYST-INTERACTING PROTEIN5. *Plant Cell* **19**, 1295-1312.

- He, Y., Hicke, L., and Radhakrishnan, I.** (2007). Structural basis for ubiquitin recognition by SH3 domains. *J Mol Biol* **373**, 190-196.
- Henne, W.M., Buchkovich, N.J., and Emr, S.D.** (2011). The ESCRT pathway. *Dev Cell* **21**, 77-91.
- Henne, W.M., Stenmark, H., and Emr, S.D.** (2013). Molecular mechanisms of the membrane sculpting ESCRT pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**.
- Henne, W.M., Boucrot, E., Meinecke, M., Evergren, E., Vallis, Y., Mittal, R., and McMahon, H.T.** (2010). FCHO proteins are nucleators of clathrin-mediated endocytosis. *Science* **328**, 1281-1284.
- Heucken, N., and Ivanov, R.** (2017). The retromer, sorting nexins and the plant endomembrane protein trafficking. *J Cell Sci*.
- Hurley, J.H.** (2008). ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 4-11.
- Husnjak, K., and Dikic, I.** (2012). Ubiquitin-binding proteins: decoders of ubiquitin-mediated cellular functions. *Annu Rev Biochem* **81**, 291-322.
- Inoue, Y., Suzuki, T., Hattori, M., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., and Moriyasu, Y.** (2006). AtATG genes, homologs of yeast autophagy genes, are involved in constitutive autophagy in Arabidopsis root tip cells. *Plant Cell Physiol* **47**, 1641-1652.
- Isono, E., and Nagel, M.K.** (2014). Deubiquitylating enzymes and their emerging role in plant biology. *Front Plant Sci* **5**, 56.
- Isono, E., and Kalinowska, K.** (2017). ESCRT-dependent degradation of ubiquitylated plasma membrane proteins in plants. *Curr Opin Plant Biol* **40**, 49-55.
- Isono, E., Katsiarimpa, A., Muller, I.K., Anzenberger, F., Stierhof, Y.D., Geldner, N., Chory, J., and Schwechheimer, C.** (2010). The deubiquitinating enzyme AMSH3 is required for intracellular trafficking and vacuole biogenesis in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **22**, 1826-1837.
- Ito, E., Fujimoto, M., Ebine, K., Uemura, T., Ueda, T., and Nakano, A.** (2012). Dynamic behavior of clathrin in Arabidopsis thaliana unveiled by live imaging. *Plant J* **69**, 204-216.
- Ivanov, R., Brumbarova, T., Blum, A., Jantke, A.M., Fink-Straube, C., and Bauer, P.** (2014). SORTING NEXIN1 is required for modulating the trafficking and stability of the Arabidopsis IRON-REGULATED TRANSPORTER1. *Plant Cell* **26**, 1294-1307.
- Jaillais, Y., Fobis-Loisy, I., Miege, C., Rollin, C., and Gaude, T.** (2006). AtSNX1 defines an endosome for auxin-carrier trafficking in Arabidopsis. *Nature* **443**, 106-109.
- Jung, A.G., Labarrera, C., Jansen, A.M., Qvortrup, K., Wild, K., and Kjaerulff, O.** (2010). A mutational analysis of the endophilin-A N-BAR domain performed in living flies. *PLoS One* **5**, e9492.
- Kalinowska, K., and Isono, E.** (2017). All roads lead to the vacuole-autophagic transport as part of the endomembrane trafficking network in plants. *J Exp Bot*.
- Kalinowska, K., Nagel, M.K., Goodman, K., Cuyas, L., Anzenberger, F., Alkofer, A., Paz-Ares, J., Braun, P., Rubio, V., Otegui, M.S., and Isono, E.** (2015). Arabidopsis ALIX is required for the endosomal localization of the deubiquitinating enzyme AMSH3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E5543-5551.

- Kasai, K., Takano, J., Miwa, K., Toyoda, A., and Fujiwara, T.** (2011). High boron-induced ubiquitination regulates vacuolar sorting of the BOR1 borate transporter in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **286**, 6175-6183.
- Katoh, Y., Shiba, Y., Mitsuhashi, H., Yanagida, Y., Takatsu, H., and Nakayama, K.** (2004). Tollip and Tom1 form a complex and recruit ubiquitin-conjugated proteins onto early endosomes. *J Biol Chem* **279**, 24435-24443.
- Katsiarimpa, A., Munoz, A., Kalinowska, K., Uemura, T., Rojo, E., and Isono, E.** (2014). The ESCRT-III-interacting deubiquitinating enzyme AMSH3 is essential for degradation of ubiquitinated membrane proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **55**, 727-736.
- Katsiarimpa, A., Anzenberger, F., Schlager, N., Neubert, S., Hauser, M.T., Schwechheimer, C., and Isono, E.** (2011). The *Arabidopsis* deubiquitinating enzyme AMSH3 interacts with ESCRT-III subunits and regulates their localization. *Plant Cell* **23**, 3026-3040.
- Katsiarimpa, A., Kalinowska, K., Anzenberger, F., Weis, C., Ostertag, M., Tsutsumi, C., Schwechheimer, C., Brunner, F., Huckelhoven, R., and Isono, E.** (2013). The deubiquitinating enzyme AMSH1 and the ESCRT-III subunit VPS2.1 are required for autophagic degradation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**, 2236-2252.
- Katzmann, D.J., Stefan, C.J., Babst, M., and Emr, S.D.** (2003). Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J Cell Biol* **162**, 413-423.
- Kerscher, O., Felberbaum, R., and Hochstrasser, M.** (2006). Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 159-180.
- Kim, S.Y., Xu, Z.Y., Song, K., Kim, D.H., Kang, H., Reichardt, I., Sohn, E.J., Friml, J., Juergens, G., and Hwang, I.** (2013). Adaptor protein complex 2-mediated endocytosis is crucial for male reproductive organ development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**, 2970-2985.
- Kitakura, S., Vanneste, S., Robert, S., Lofke, C., Teichmann, T., Tanaka, H., and Friml, J.** (2011). Clathrin mediates endocytosis and polar distribution of PIN auxin transporters in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**, 1920-1931.
- Kolb, C., Nagel, M.K., Kalinowska, K., Haggmann, J., Ichikawa, M., Anzenberger, F., Alkofer, A., Sato, M.H., Braun, P., and Isono, E.** (2015). FYVE1 is essential for vacuole biogenesis and intracellular trafficking in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **167**, 1361-1373.
- Komander, D., and Rape, M.** (2012). The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem* **81**, 203-229.
- Komander, D., Clague, M.J., and Urbe, S.** (2009). Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 550-563.
- Korbei, B., Moulinier-Anzola, J., De-Araujo, L., Lucyshyn, D., Retzer, K., Khan, M.A., and Luschig, C.** (2013). *Arabidopsis* TOL proteins act as gatekeepers for vacuolar sorting of PIN2 plasma membrane protein. *Curr Biol* **23**, 2500-2505.
- Kraft, E., Stone, S.L., Ma, L., Su, N., Gao, Y., Lau, O.S., Deng, X.W., and Callis, J.** (2005). Genome analysis and functional characterization of the E2 and RING-type E3 ligase ubiquitination enzymes of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **139**, 1597-1611.
- Kyuuma, M., Kikuchi, K., Kojima, K., Sugawara, Y., Sato, M., Mano, N., Goto, J., Takeshita, T., Yamamoto, A., Sugamura, K., and Tanaka, N.** (2007). AMSH, an

- ESCRT-III associated enzyme, deubiquitinates cargo on MVB/late endosomes. *Cell Struct Funct* **31**, 159-172.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lam, B.C., Sage, T.L., Bianchi, F., and Blumwald, E.** (2001). Role of SH3 domain-containing proteins in clathrin-mediated vesicle trafficking in Arabidopsis. *Plant Cell* **13**, 2499-2512.
- Lam, B.C., Sage, T.L., Bianchi, F., and Blumwald, E.** (2002). Regulation of ADL6 activity by its associated molecular network. *Plant J* **31**, 565-576.
- Leitner, J., Petrasek, J., Tomanov, K., Retzer, K., Parezova, M., Korbei, B., Bachmair, A., Zazimalova, E., and Luschnig, C.** (2012). Lysine63-linked ubiquitylation of PIN2 auxin carrier protein governs hormonally controlled adaptation of Arabidopsis root growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 8322-8327.
- Lindas, A.C., Karlsson, E.A., Lindgren, M.T., Ettema, T.J., and Bernander, R.** (2008). A unique cell division machinery in the Archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 18942-18946.
- Liu, N.S., Loo, L.S., Loh, E., Seet, L.F., and Hong, W.** (2009). Participation of Tom1L1 in EGF-stimulated endocytosis of EGF receptor. *EMBO J* **28**, 3485-3499.
- Liu, S.H., Marks, M.S., and Brodsky, F.M.** (1998). A dominant-negative clathrin mutant differentially affects trafficking of molecules with distinct sorting motifs in the class II major histocompatibility complex (MHC) pathway. *J Cell Biol* **140**, 1023-1037.
- Liu, S.H., Wong, M.L., Craik, C.S., and Brodsky, F.M.** (1995). Regulation of clathrin assembly and trimerization defined using recombinant triskelion hubs. *Cell* **83**, 257-267.
- Lu, D., Lin, W., Gao, X., Wu, S., Cheng, C., Avila, J., Heese, A., Devarenne, T.P., He, P., and Shan, L.** (2011). Direct ubiquitination of pattern recognition receptor FLS2 attenuates plant innate immunity. *Science* **332**, 1439-1442.
- Martins, S., Dohmann, E.M., Cayrel, A., Johnson, A., Fischer, W., Pojer, F., Satiat-Jeunemaitre, B., Jaillais, Y., Chory, J., Geldner, N., and Vert, G.** (2015). Internalization and vacuolar targeting of the brassinosteroid hormone receptor BRI1 are regulated by ubiquitination. *Nat Commun* **6**, 6151.
- Mayor, S., Parton, R.G., and Donaldson, J.G.** (2014). Clathrin-independent pathways of endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**.
- McCullough, J., Row, P.E., Lorenzo, O., Doherty, M., Beynon, R., Clague, M.J., and Urbe, S.** (2006). Activation of the endosome-associated ubiquitin isopeptidase AMSH by STAM, a component of the multivesicular body-sorting machinery. *Curr Biol* **16**, 160-165.
- McMahon, H.T., and Boucrot, E.** (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 517-533.
- Mevissen, T.E.T., and Komander, D.** (2017). Mechanisms of Deubiquitinase Specificity and Regulation. *Annu Rev Biochem* **86**, 159-192.
- Michaeli, S., Galili, G., Genschik, P., Fernie, A.R., and Avin-Wittenberg, T.** (2016). Autophagy in Plants--What's New on the Menu? *Trends Plant Sci* **21**, 134-144.

- Misra, S., Beach, B.M., and Hurley, J.H.** (2000). Structure of the VHS domain of human Tom1 (target of myb 1): insights into interactions with proteins and membranes. *Biochemistry* **39**, 11282-11290.
- Morita, E., Sandrin, V., Chung, H.Y., Morham, S.G., Gygi, S.P., Rodesch, C.K., and Sundquist, W.I.** (2007). Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *EMBO J* **26**, 4215-4227.
- Nagel, M.K., Kalinowska, K., Vogel, K., Reynolds, G.D., Wu, Z., Anzenberger, F., Ichikawa, M., Tsutsumi, C., Sato, M.H., Kuster, B., Bednarek, S.Y., and Isono, E.** (2017). Arabidopsis SH3P2 is an ubiquitin-binding protein that functions together with ESCRT-I and the deubiquitylating enzyme AMSH3. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., and Kimura, T.** (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng* **104**, 34-41.
- Nakamura, M., Tanaka, N., Kitamura, N., and Komada, M.** (2006). Clathrin anchors deubiquitinating enzymes, AMSH and AMSH-like protein, on early endosomes. *Genes Cells* **11**, 593-606.
- Naramoto, S., Kleine-Vehn, J., Robert, S., Fujimoto, M., Dainobu, T., Paciorek, T., Ueda, T., Nakano, A., Van Montagu, M.C., Fukuda, H., and Friml, J.** (2010). ADP-ribosylation factor machinery mediates endocytosis in plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 21890-21895.
- Naramoto, S., Otegui, M.S., Kutsuna, N., de Rycke, R., Dainobu, T., Karampelias, M., Fujimoto, M., Feraru, E., Miki, D., Fukuda, H., Nakano, A., and Friml, J.** (2014). Insights into the localization and function of the membrane trafficking regulator GNOM ARF-GEF at the Golgi apparatus in Arabidopsis. *Plant Cell* **26**, 3062-3076.
- Ortega Roldan, J.L., Casares, S., Ringkjøbing Jensen, M., Cardenas, N., Bravo, J., Blackledge, M., Azuaga, A.I., and van Nuland, N.A.** (2013). Distinct ubiquitin binding modes exhibited by SH3 domains: molecular determinants and functional implications. *PLoS One* **8**, e73018.
- Otegui, M.S., Mastrorade, D.N., Kang, B.H., Bednarek, S.Y., and Staehelin, L.A.** (2001). Three-dimensional analysis of syncytial-type cell plates during endosperm cellularization visualized by high resolution electron tomography. *Plant Cell* **13**, 2033-2051.
- Paciorek, T., Zazimalova, E., Ruthardt, N., Petrasek, J., Stierhof, Y.D., Kleine-Vehn, J., Morris, D.A., Emans, N., Jurgens, G., Geldner, N., and Friml, J.** (2005). Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature* **435**, 1251-1256.
- Paez Valencia, J., Goodman, K., and Otegui, M.S.** (2016). Endocytosis and Endosomal Trafficking in Plants. *Annu Rev Plant Biol* **67**, 309-335.
- Pan, J., Fujioka, S., Peng, J., Chen, J., Li, G., and Chen, R.** (2009). The E3 ubiquitin ligase SCFTIR1/AFB and membrane sterols play key roles in auxin regulation of endocytosis, recycling, and plasma membrane accumulation of the auxin efflux transporter PIN2 in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **21**, 568-580.
- Pashkova, N., Gakhar, L., Winistorfer, S.C., Sunshine, A.B., Rich, M., Dunham, M.J., Yu, L., and Piper, R.C.** (2013). The yeast Alix homolog Bro1 functions as a ubiquitin receptor for protein sorting into multivesicular endosomes. *Dev Cell* **25**, 520-533.

- Pechstein, A., Gerth, F., Milosevic, I., Japel, M., Eichhorn-Grunig, M., Vorontsova, O., Bacetic, J., Maritzen, T., Shupliakov, O., Freund, C., and Haucke, V.** (2015). Vesicle uncoating regulated by SH3-SH3 domain-mediated complex formation between endophilin and intersectin at synapses. *EMBO Rep* **16**, 232-239.
- Prag, G., Lee, S., Mattera, R., Arighi, C.N., Beach, B.M., Bonifacino, J.S., and Hurley, J.H.** (2005). Structural mechanism for ubiquitinated-cargo recognition by the Golgi-localized, gamma-ear-containing, ADP-ribosylation-factor-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2334-2339.
- Puertollano, R.** (2005). Interactions of TOM1L1 with the multivesicular body sorting machinery. *J Biol Chem* **280**, 9258-9264.
- Puertollano, R., and Bonifacino, J.S.** (2004). Interactions of GGA3 with the ubiquitin sorting machinery. *Nat Cell Biol* **6**, 244-251.
- Renard, H.F., Simunovic, M., Lemiere, J., Boucrot, E., Garcia-Castillo, M.D., Arumugam, S., Chambon, V., Lamaze, C., Wunder, C., Kenworthy, A.K., Schmidt, A.A., McMahon, H.T., Sykes, C., Bassereau, P., and Johannes, L.** (2015). Endophilin-A2 functions in membrane scission in clathrin-independent endocytosis. *Nature* **517**, 493-496.
- Reynolds, G.D., August, B., and Bednarek, S.Y.** (2014). Preparation of enriched plant clathrin-coated vesicles by differential and density gradient centrifugation. *Methods Mol Biol* **1209**, 163-177.
- Richardson, L.G., Howard, A.S., Khuu, N., Gidda, S.K., McCartney, A., Morphy, B.J., and Mullen, R.T.** (2011). Protein-Protein Interaction Network and Subcellular Localization of the Arabidopsis Thaliana ESCRT Machinery. *Front Plant Sci* **2**, 20.
- Ritorto, M.S., Ewan, R., Perez-Oliva, A.B., Knebel, A., Buhrlage, S.J., Wightman, M., Kelly, S.M., Wood, N.T., Virdee, S., Gray, N.S., Morrice, N.A., Alessi, D.R., and Trost, M.** (2014). Screening of DUB activity and specificity by MALDI-TOF mass spectrometry. *Nat Commun* **5**, 4763.
- Robert, S., Kleine-Vehn, J., Barbez, E., Sauer, M., Paciorek, T., Baster, P., Vanneste, S., Zhang, J., Simon, S., Covanova, M., Hayashi, K., Dhonukshe, P., Yang, Z., Bednarek, S.Y., Jones, A.M., Luschnig, C., Aniento, F., Zazimalova, E., and Friml, J.** (2010). ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in Arabidopsis. *Cell* **143**, 111-121.
- Samson, R.Y., Obita, T., Freund, S.M., Williams, R.L., and Bell, S.D.** (2008). A role for the ESCRT system in cell division in archaea. *Science* **322**, 1710-1713.
- Sandvig, K., Pust, S., Skotland, T., and van Deurs, B.** (2011). Clathrin-independent endocytosis: mechanisms and function. *Curr Opin Cell Biol* **23**, 413-420.
- Scheuring, D., Viotti, C., Kruger, F., Kunzl, F., Sturm, S., Bubeck, J., Hillmer, S., Frigerio, L., Robinson, D.G., Pimpl, P., and Schumacher, K.** (2011). Multivesicular bodies mature from the trans-Golgi network/early endosome in Arabidopsis. *Plant Cell* **23**, 3463-3481.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., and Cardona, A.** (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**, 676-682.

- Shahriari, M., Richter, K., Keshavaiah, C., Sabovljevic, A., Huelskamp, M., and Schellmann, S.** (2011). The Arabidopsis ESCRT protein-protein interaction network. *Plant Mol Biol* **76**, 85-96.
- Shahriari, M., Keshavaiah, C., Scheuring, D., Sabovljevic, A., Pimpl, P., Hausler, R.E., Hulskamp, M., and Schellmann, S.** (2010). The AAA-type ATPase AtSKD1 contributes to vacuolar maintenance of Arabidopsis thaliana. *Plant J* **64**, 71-85.
- Shaid, S., Brandts, C.H., Serve, H., and Dikic, I.** (2013). Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death Differ* **20**, 21-30.
- Shields, S.B., and Piper, R.C.** (2011). How ubiquitin functions with ESCRTs. *Traffic* **12**, 1306-1317.
- Shimada, T.L., Shimada, T., and Hara-Nishimura, I.** (2010). A rapid and non-destructive screenable marker, FAST, for identifying transformed seeds of Arabidopsis thaliana. *Plant J* **61**, 519-528.
- Soukup, S.F., Kuenen, S., Vanhauwaert, R., Manetsberger, J., Hernandez-Diaz, S., Swerts, J., Schoovaerts, N., Vilain, S., Gounko, N.V., Vints, K., Geens, A., De Strooper, B., and Verstreken, P.** (2016). A LRRK2-Dependent EndophilinA Phosphoswitch Is Critical for Macroautophagy at Presynaptic Terminals. *Neuron* **92**, 829-844.
- Spitzer, C., Reyes, F.C., Buono, R., Sliwinski, M.K., Haas, T.J., and Otegui, M.S.** (2009). The ESCRT-related CHMP1A and B proteins mediate multivesicular body sorting of auxin carriers in Arabidopsis and are required for plant development. *Plant Cell* **21**, 749-766.
- Spitzer, C., Li, F., Buono, R., Roschttardt, H., Chung, T., Zhang, M., Osteryoung, K.W., Vierstra, R.D., and Otegui, M.S.** (2015). The endosomal protein CHARGED MULTIVESICULAR BODY PROTEIN1 regulates the autophagic turnover of plastids in Arabidopsis. *Plant Cell* **27**, 391-402.
- Spitzer, C., Schellmann, S., Sabovljevic, A., Shahriari, M., Keshavaiah, C., Bechtold, N., Herzog, M., Muller, S., Hanisch, F.G., and Hulskamp, M.** (2006). The Arabidopsis elc mutant reveals functions of an ESCRT component in cytokinesis. *Development* **133**, 4679-4689.
- Stamenova, S.D., French, M.E., He, Y., Francis, S.A., Kramer, Z.B., and Hicke, L.** (2007). Ubiquitin binds to and regulates a subset of SH3 domains. *Mol Cell* **25**, 273-284.
- Steinmann, T., Geldner, N., Grebe, M., Mangold, S., Jackson, C.L., Paris, S., Galweiler, L., Palme, K., and Jurgens, G.** (1999). Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science* **286**, 316-318.
- Stimpson, H.E., Toret, C.P., Cheng, A.T., Pauly, B.S., and Drubin, D.G.** (2009). Early-arriving Syp1p and Ede1p function in endocytic site placement and formation in budding yeast. *Mol Biol Cell* **20**, 4640-4651.
- Stone, S.L., Hauksdottir, H., Troy, A., Herschleb, J., Kraft, E., and Callis, J.** (2005). Functional analysis of the RING-type ubiquitin ligase family of Arabidopsis. *Plant Physiol* **137**, 13-30.
- Swaminathan, S., Amerik, A.Y., and Hochstrasser, M.** (1999). The Doa4 deubiquitinating enzyme is required for ubiquitin homeostasis in yeast. *Mol Biol Cell* **10**, 2583-2594.

- Takac, T., Pechan, T., Samajova, O., Ovecka, M., Richter, H., Eck, C., Niehaus, K., and Samaj, J.** (2012). Wortmannin treatment induces changes in Arabidopsis root proteome and post-Golgi compartments. *J Proteome Res* **11**, 3127-3142.
- Takano, J., Miwa, K., Yuan, L., von Wiren, N., and Fujiwara, T.** (2005). Endocytosis and degradation of BOR1, a boron transporter of Arabidopsis thaliana, regulated by boron availability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12276-12281.
- Tanaka, N., Kaneko, K., Asao, H., Kasai, H., Endo, Y., Fujita, T., Takeshita, T., and Sugamura, K.** (1999). Possible involvement of a novel STAM-associated molecule "AMSH" in intracellular signal transduction mediated by cytokines. *J Biol Chem* **274**, 19129-19135.
- Teo, H., Perisic, O., Gonzalez, B., and Williams, R.L.** (2004). ESCRT-II, an endosome-associated complex required for protein sorting: crystal structure and interactions with ESCRT-III and membranes. *Dev Cell* **7**, 559-569.
- Ueda, T., Uemura, T., Sato, M.H., and Nakano, A.** (2004). Functional differentiation of endosomes in Arabidopsis cells. *Plant J* **40**, 783-789.
- Uemura, T., Ueda, T., Ohniwa, R.L., Nakano, A., Takeyasu, K., and Sato, M.H.** (2004). Systematic analysis of SNARE molecules in Arabidopsis: dissection of the post-Golgi network in plant cells. *Cell Struct Funct* **29**, 49-65.
- Uemura, T., Kim, H., Saito, C., Ebine, K., Ueda, T., Schulze-Lefert, P., and Nakano, A.** (2012). Qa-SNAREs localized to the trans-Golgi network regulate multiple transport pathways and extracellular disease resistance in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 1784-1789.
- Ungewickell, E., Ungewickell, H., Holstein, S.E., Lindner, R., Prasad, K., Barouch, W., Martin, B., Greene, L.E., and Eisenberg, E.** (1995). Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature* **378**, 632-635.
- Vierstra, R.D.** (2012). The expanding universe of ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. *Plant Physiol* **160**, 2-14.
- Wang, C., Yan, X., Chen, Q., Jiang, N., Fu, W., Ma, B., Liu, J., Li, C., Bednarek, S.Y., and Pan, J.** (2013). Clathrin light chains regulate clathrin-mediated trafficking, auxin signaling, and development in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**, 499-516.
- Wang, H.J., Hsu, Y.W., Guo, C.L., Jane, W.N., Wang, H., Jiang, L., and Jauh, G.Y.** (2017). VPS36-Dependent Multivesicular Bodies Are Critical for Plasmamembrane Protein Turnover and Vacuolar Biogenesis. *Plant Physiol* **173**, 566-581.
- Wang, J., Cai, Y., Miao, Y., Lam, S.K., and Jiang, L.** (2009). Wortmannin induces homotypic fusion of plant prevacuolar compartments. *J Exp Bot* **60**, 3075-3083.
- Winter, V., and Hauser, M.T.** (2006). Exploring the ESCRTing machinery in eukaryotes. *Trends Plant Sci* **11**, 115-123.
- Yamaoka, S., Shimono, Y., Shirakawa, M., Fukao, Y., Kawase, T., Hatsugai, N., Tamura, K., Shimada, T., and Hara-Nishimura, I.** (2013). Identification and dynamics of Arabidopsis adaptor protein-2 complex and its involvement in floral organ development. *Plant Cell* **25**, 2958-2969.
- Yin, X.J., Volk, S., Ljung, K., Mehlmer, N., Dolezal, K., Ditengou, F., Hanano, S., Davis, S.J., Schmelzer, E., Sandberg, G., Teige, M., Palme, K., Pickart, C., and Bachmair,**

- A.** (2007). Ubiquitin lysine 63 chain forming ligases regulate apical dominance in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**, 1898-1911.
- Yu, F., Lou, L., Tian, M., Li, Q., Ding, Y., Cao, X., Wu, Y., Belda-Palazon, B., Rodriguez, P.L., Yang, S., and Xie, Q.** (2016). ESCRT-I component VPS23A affects ABA signaling by recognizing ABA receptors for endosomal degradation. *Mol Plant*.
- Zarrinpar, A., Bhattacharyya, R.P., and Lim, W.A.** (2003). The structure and function of proline recognition domains. *Sci STKE* **2003**, RE8.
- Zheng, N., and Shabek, N.** (2017). Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation. *Annu Rev Biochem* **86**, 129-157.
- Zhuang, X., Wang, H., Lam, S.K., Gao, C., Wang, X., Cai, Y., and Jiang, L.** (2013). A BAR-domain protein SH3P2, which binds to phosphatidylinositol 3-phosphate and ATG8, regulates autophagosome formation in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**, 4596-4615.

Danksagung

Mein Dank gilt zu allererst meiner Betreuerin Prof. Dr. Erika Isono für die Betreuung und Finanzierung dieses Projektes. Ich möchte mich bedanken für die professionelle Ausbildung, die ich erhalten habe, sowohl im Labor, im Umgang mit biochemischen und molekularbiologischen Methoden sowie auch für die Anleitungen und hilfreichen Ratschläge im Umgang mit wissenschaftlichen Vorträgen und Schriftstücken. Dankbar bin ich auch für viele Konferenzen, an denen ich während meiner Doktorarbeit teilnehmen durfte, um meine Arbeit einem internationalen Publikum zu präsentieren. Vielen Dank, dass Du jederzeit ein freies Ohr und immer Lösungen für alle möglichen Probleme im Laboralltag hattest.

Danke auch an Prof. Dr. Schwechheimer, der es mir ermöglicht hat, unter Leitung seines Lehrstuhls Systembiologie der Pflanzen zu promovieren und mir ebenfalls immer mit gutem Rat und guten Ideen zur Seite stand. Ich danke auch sehr für das Gegenlesen dieser Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich an Frau Prof. Dr. Poppenberger und Herrn Prof. Dr. Liebl richten, die sich bereit erklärt haben, neben Erika Isono, mein Prüfungskomitee zu bilden.

Ich danke unseren Sekretärinnen Petra Wick, Rita Kaindl und Daniela Elephand-Dill, für tatkräftige Hilfe und Unterstützung bei allen administrativen Belangen. Sie wussten immer Rat, egal um was es sich handelte.

Ein ganz besonderer Dank geht an unsere technische Assistentin Franziska Anzenberger, die mir über die Jahre eine gute Freundin geworden ist, für ihre Unterstützung mit vielen Experimenten, sei es Klonierungen von Konstrukten, Y2H-Analysen oder die Etablierung von Mutantenlinien und auch bei der Bewältigung täglicher Probleme im Laboralltag.

Ich danke all meinen Laborkollegen und Freunden aus der Systembiologie der Pflanzen für eine wunderbare und humorvolle Zeit. Ganz besonders danke ich meinen AMSH-Lab-Kolleginnen (die AMSHies) sowie allen Hiwis und Studenten, die mich in den Jahren tatkräftig begleitet haben.

Ein Dankeschön auch an meine neuen Kollegen an der Universität Konstanz, für die gute Zusammenarbeit im vergangenen Jahr und besonders an Dr. Dietmar Funck einen herzlichen Dank für das Gegenlesen dieser Arbeit.

Danke an meine lieben Mädels der Freisinger Mittagspausen-Clique, dass wir gemeinsam Montag Teil 1 bis 4 und Freitag durchgestanden haben.

Einen liebevollen Dank an meine Eltern, die meinen Bruder und mich immer dazu ermuntern und dabei unterstützen haben, unsere eigenen Wege zu finden und selbständig zu gehen.

Appendix

Appendix Tabelle 1: Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Oligos:

Oligo-Name	Sequenz 5'-3'	T _m (°C)	Zusatz
MN1 At3g01340 fw XbaI	AAGGtctagaATGCCTCCTCAGAAGAT TG	60	Klassische Klonierung
MN2 At3g01340 rv BamHI	AAGGggatccTGGCTCAACAACAGTCA C	59	Klassische Klonierung
MN3 At5g02500 fw XbaI	AAGGtctagaATGTCGGGTAAAGGAGA AG	59	Klassische Klonierung
MN4 At5g02500 rv BamHI	AAGGggatccGTCGACCTCCTCGATCT TA	60	Klassische Klonierung
MN5 At4g34660 fw XbaI	AAGGtctagaATGGATGCAATTAGAAA ACA	58	Klassische Klonierung
MN6 At4g34660 rv BamHI	AAGGggatccGAAAACCTTCGGACACTT TG	58	Klassische Klonierung
MN7 At2g30050 fw XbaI	AAGGtctagaATGCCAGGTCAGAAGAT T	58	Klassische Klonierung
MN8 At2g30050 rv BamHI	AAGGggatccAGGCTCAACAGCAGTA ACTT	59	Klassische Klonierung
MN9 At1g78900 fw XbaI	AAGGtctagaATGCCGGCGTTTTAC	59	Klassische Klonierung
MN10 At1g78900 rv BamHI	AAGGggatccCCGAGTTTCATCTTCCA A	59	Klassische Klonierung
MN11 At1g05520 fw XbaI	AAGGtctagaATGTCAGAGATGGCGAG TAT	59	Klassische Klonierung
MN12 At1g05520 rv XhoI	AAGGctcgagAGATTGAACAGCCAATT TCT	58	Klassische Klonierung
MN13 At5g02490 fw XbaI	AAGGtctagaATGGCTGGTAAAGGAGA AG	59	Klassische Klonierung
MN14 At5g02490 rv XhoI	AAGGctcgagGTCGACTTCCTCGATCT T	57	Klassische Klonierung
MN15 eGFP fw XhoI	AAGGctcgagATGGTGAGCAAGGGC	59	Klassische Klonierung
MN16 eGFP rv NotI	AAGGgcgccgcTACTTGTACAGCTC GTCCA	59	Klassische Klonierung
MN17 At5g57460 fw EcoRI	AAGGgaattcATGTCGTGTTTAGCCCT AG	57	Klassische Klonierung
MN18 At5g57460 rv NotI	AAGGgcgccgcTCAATTGCACATATA GACTCC	57	Klassische Klonierung
MN19 At4g12770 fw EcoRI	AAGGgaattcATGGATGATTTACAGG ATT	59	Klassische Klonierung
MN20 At4g12770 rv NotI	AAGGgcgccgcTCAAAGAGTTCCTC TGAGTT	58	Klassische Klonierung
MN21a eGFP fw XbaI	AAGGtctagaATGGTGAGCAAGGGC	59	Klassische Klonierung

MN21b eGFP rv EcoRI	AAGGgaattcCTTGTACAGCTCGTCCA T	57	Klassische Klonierung
MN22 At2g43160 fw SpeI	AAGGactagtATGAAGAAAGTCTTCGG ACA	59	Klassische Klonierung
MN23 At2g43160 rv BamHI	AAGGggatccCCGGTATCCACCACC	59	Klassische Klonierung
MN24 At3g44340 fw SpeI	AAGGactagtATGGCTGCTCCAGTG	57	Klassische Klonierung
MN25 At3g44340 rv BamHI	AAGGggatccGTTTCAGTTTGTGTTGGA TTT	57	Klassische Klonierung
MN26 At4g32285 fw SpeI	AAGGactagtATGGCGCTAAGCATG	57	Klassische Klonierung
MN27 At4g32285 rv BamHI	AAGGggatccGTAAGGGTTGTTGTAGT AATAACC	57	Klassische Klonierung
MN28 At3g11910 fw XbaI	AAGGtctagaATGACTATGATGACTCC GC	58	Klassische Klonierung
MN29 At3g11910 rv XhoI	AAGGctcgagATTGTATATTTTCACCG GCT	58	Klassische Klonierung
MN30 At5g06600 fw XbaI	AAGGtctagaATGACTATGATGACTCC GC	58	Klassische Klonierung
MN31 At5g06600 rv XhoI	AAGGctcgagATTGTATATTTTTACCG GCTTC	58	Klassische Klonierung
MN32 At3g01560 fw EcoRI	AAGGgaattcATGAATACTTGTCAGTTT ATGGATA	58	Klassische Klonierung
MN33 At3g01560 rv NotI	AAGGgcgccgcCTACCGACCACCAAAA AA	57	Klassische Klonierung
MN34 At4g12770 po700 fw	GTAGTCTTGGAGGAGTCTAC	52	Sequenzierung
MN35 At4g12770 po1300 fw	AATGGATATCCTGATCCTTC	57	Sequenzierung
MN36 At1g05520 po700 fw	AGGGATAATTCTGCCAAT	56	Sequenzierung
MN37 At1g05520 po1400 fw	ATGTGTGGCCTCGATAAA	59	Sequenzierung
MN38 At2g43160 po700 fw	AGCAGAAGTGTTGATAACTA	52	Sequenzierung
MN39 At2g43160 po1500 fw	CTCATAACTTTGGCTTTGG	57	Sequenzierung
MN40 At3g44340 po700 fw	CATTTCCCAGAGGATCAC	58	Sequenzierung
MN41 At3g44340 po1450 fw	AGGCCTGAGCTGTGTAG	57	Sequenzierung
MN42 At3g44340 po2200 fw	CCCCCAAAGTTATAACAACG	60	Sequenzierung
MN43 At3g11910 po700 fw	AAAATGATGCACCTACCG	59	Sequenzierung
MN44 At3g11910 po1500 fw	TTTCAATAATCCACCTTTCA	58	Sequenzierung

MN45 At3g11910 po2200 fw	CCTGATGAGGAAATAGAACT	55	Sequenzierung
MN46 At5g06600 po700 fw	ACTGAGAATGATGCACCC	59	Sequenzierung
MN47 At5g06600 po1500 fw	TGGTTTCAATAATAACCCTC	56	Sequenzierung
MN48 At5g06600 po2200 fw	GCTCCTGATGAAGAAATAGA	57	Sequenzierung
MN49 At3g01340 fw GW	aaaaagcaggctATGCCTCCTCAGAAGA TTG	60	GW, C-terminale Fusion
MN50 At3g01340 rv GW	agaaagctgggtTGGCTCAACAACAGTC AC	59	GW, C-terminale Fusion
MN51 At5g02500 fw GW	aaaaagcaggctATGTCTGGGTAAAGGAG AAG	59	GW, C-terminale Fusion
MN52 At5g02500 rv GW	agaaagctgggtGTCGACCTCCTCGATC TTA	60	GW, C-terminale Fusion
MN53 At4g34660 fw GW	aaaaagcaggctATGGATGCAATTAGAA AACA	58	GW, C-terminale Fusion
MN54 At4g34660 rv GW	agaaagctgggtGAAAACCTCGGACACT TTG	58	GW, C-terminale Fusion
MN55 At2g30050 fw GW	aaaaagcaggctATGCCAGGTCAGAAGA TT	58	GW, C-terminale Fusion
MN56 At2g30050 rv GW	agaaagctgggtAGGCTCAACAGCAGTA ACTT	59	GW, C-terminale Fusion
MN57 At1g78900 fw GW	aaaaagcaggctATGCCGGCGTTTTAC	59	GW, C-terminale Fusion
MN58 At1g78900 rv GW	agaaagctgggtCCGAGTTTCATCTTCC AA	59	GW, C-terminale Fusion
MN59 At1g05520 fw GW	aaaaagcaggctATGTCAGAGATGGCGA GTAT	59	GW, C-terminale Fusion
MN60 At1g05520 rv GW	agaaagctgggtAGATTGAACAGCCAAT TTCT	58	GW, C-terminale Fusion
MN61 At5g02490 fw GW	aaaaagcaggctATGGCTGGTAAAGGAG AAG	59	GW, C-terminale Fusion
MN62 At5g02490 rv GW	agaaagctgggtGTCGACTTCCTCGATC TT	57	GW, C-terminale Fusion
MN63 At2g43160 fw GW	aaaaagcaggctATGAAGAAAGTCTTCG GACA	59	GW, C-terminale Fusion
MN64 At2g43160 rv GW	agaaagctgggtCCGGTATCCACCACC	59	GW, C-terminale Fusion
MN65 At4g32640 fw GW	aaaaagcaggctATGGTTGCTCCTGTGC	59	GW, C-terminale Fusion
MN66 At4g32640 rv GW	agaaagctgggtGTTCATTTTAGCTGG ATTTG	58	GW, C-terminale Fusion
MN67 At4g32285 fw GW	aaaaagcaggctATGGCGCTAAGCAT	57	GW, C-terminale Fusion
MN68 At4g32285 rv GW	agaaagctgggtGTAAGGGTTGTTGTAG TAATAAC	57	GW, C-terminale Fusion

MN69 At3g11910 fw GW	aaaaagcaggctATGACTATGATGACTC CGC	58	GW, C- terminale Fusion
MN70 At3g11910 rv GW	agaaagctgggtATTGTATATTTTCACCG GCT	58	GW, C- terminale Fusion
MN71 At5g06600 fw GW	aaaaagcaggctATGACTATGATGACTC CGCC	58	GW, C- terminale Fusion
MN72 At5g06600 rv GW	agaaagctgggtATTGTATATTTTCACCG GCT	58	GW, C- terminale Fusion
MN73 At3g01560 fw GW	aaaaagcaggcttGAATACTTGTGAGTTT ATGG	55	GW, N- terminale Fusion
MN74 At3g01560 rv GW	agaaagctgggtCTACCGACCACCAAAA	54	GW, N- terminale Fusion
MN75 At5g57460 fw GW	aaaaagcaggcttGTCGTGTTTAGCCCTA G	58	GW, N- terminale Fusion
MN76 At5g57460 rv GW	agaaagctgggtTCAATTGCACATATAGA CTCC	57	GW, N- terminale Fusion
MN77 At4g12770 fw GW	aaaaagcaggcttGATGATTTTACAGGA T	57	GW, N- terminale Fusion
MN78 At4g12770 rv GW	agaaagctgggtTCAAAGAGTTCTCTG AGT	56	GW, N- terminale Fusion
MN79 SALK100163 fw	AAGTCGGAAAACGAAGAAA	59	Genotypisierung Auxilin-like
MN80 SALK100163 rv	AAATGGAACCTACCCTTCTCC	59	Genotypisierung Auxilin-like
MN81 SALK097027 fw	CTAGTGGGCAAAATCTAAAG	56	Genotypisierung Auxilin-like
MN82 SALK097027 rv	AAATGAAATTTTGCATATGAA	58	Genotypisierung Auxilin-like
MN83 SALK066126 fw	GATCTTCTGGTGATTCTCGT	59	Genotypisierung Auxilin-like
MN84 SALK066126 rv	GAGAAACAATTTTGAAGAGCA	59	Genotypisierung Auxilin-like
MN85 SALK017855 fw	TATAAGACTTGGGGGACC	57	Genotypisierung Auxilin-like
MN86 SALK017855 rv	GAAGTGAAGGGATTTTG	57	Genotypisierung Auxilin-like
MN87 At4g12780 spez fw	CAAGAGATAAGGCGGC	57	Genotypisierung Auxilin-like
MN88 At4g12780 spez rv	CTAGCTTCTGCCGAG	59	Genotypisierung Auxilin-like
MN89 At4g12780 rv	TCAGAAGAGTTCTTCTGAGTTAAA	58	Genotypisierung Auxilin-like
MN90 At4g12770 spez rv	ATCAGTGAACCCTCCTGT	57	Genotypisierung Auxilin-like
MN91 SALK127258 fw	ACACAACCGTTGTTGGTAT	58	Genotypisierung SH3P1
MN92 SALK127258 rv	ATCAACAACAACAGCATCA	58	Genotypisierung SH3P1

MN92b SALK127258 rv	CCTCAACAATCCTATCTACCC	59	Genotypisierung <i>SH3P1</i>
MN93 SALK065790 fw	TGTCACITTTTCAGGAGTTCC	58	Genotypisierung <i>SH3P3</i>
MN94 SALK065790 rv	AGCTCCTGTAATGCCTCT	57	Genotypisierung <i>SH3P3</i>
MN94b SALK065790 rv	CTTGATGAATGAATGTCTCTC	56	Genotypisierung <i>SH3P3</i>
MN95 SAIL_283_G08 fw	GCTTTTTTTTAACTGTAAAATCAC	57	Genotypisierung At2g19680
MN96 SAIL_283_G08 rv	GTCTTCTAAACGCATCCAT	57	Genotypisierung At2g19680
MN97 SALK_095824 fw	CTTCCGTTGAAGATCAACA	59	Genotypisierung <i>SH3P2</i>
MN98 SALK_095824 rv	GTGGCGTTTACATCAAATG	60	Genotypisierung <i>SH3P2</i>
MN 99 At1g31440 fw	GGACCTCTTACAAGTCGG	58	RTPCR <i>SH3P1</i>
MN100 At1g31440 rv	GAATCATTCTGGCTGAGAA	58	RTPCR <i>SH3P1</i>
MN101 At4g34660 fw	TGGAGGAGGGGGATAT	58	RTPCR <i>SH3P2</i>
MN102 At4g34660 rv	CATACTGTCTGCGCTTGA	59	RTPCR <i>SH3P2</i>
MN103 At4g18060 fw	AGTCAGAACATTGATGAGAATA	56	RTPCR <i>SH3P3</i>
MN104 At4g18060 rv	GGATGGCTGCTATTCTTAAG	58	RTPCR <i>SH3P3</i>
MN105 At1g31440 fw Bsu15I	AAGGatcgatTGGAAAGCTATAAGAAAG	65	Klassische Klonierung
MN106 At4g12770 fw EcoRI	AAGGgaattcGATGATTTACAGGATT GTTA	57	Klassische Klonierung
MN107 At4g12770 rv Sall	AAGGgtcgacTCAAAAGAGTTCCTCTG AG	55	Klassische Klonierung
MN108 At4g12780 rv Sall	AAGGgtcgacTCAGAAGAGTTCTTCTG AGT	57	Klassische Klonierung
MN109 At4g34660 rv NotI	AAGGgcgccgcAGAAACTTCGGACA C	57	Klassische Klonierung
MN110 At1g26630 fw EcoRI	AAGGgaattcTCTGACGACGAGCACCA CTT	58	Klassische Klonierung
MN111 At1g26630 rv Sall	AAGGgtcgacTACTTGCCACCACCAA CTTCC	57	Klassische Klonierung
MN112 At1g07410 fw NdeI	AAGGcatatgGCGAATAGAATAGATCA TGAGTACG	54	Klassische Klonierung
MN113 At1g07410 rv Sall	AAGGgtcgacTTAGGTAGAACAGCATC CTTTTC	53	Klassische Klonierung
MN114 At3g46060 fw EcoRI	AAGGgaattcGCTGCTCCACCTGCTAG AG	57	Klassische Klonierung
MN115 At3g46060 rv Sall	AAGGgtcgacTTAAGTTCCACAGCATG CAGATTTTC	56	Klassische Klonierung
MN116 At4g16520 fw NdeI	AAGGcatatgGCAAAAAGCTCGTTCAA GCA	55	Klassische Klonierung
MN117 At4g16520 rv EcoRI	AAGGgaattcTTATGGAGATCCAAATC CAAATGTG	56	Klassische Klonierung

MN118 GABI_903G11 fw	ATATATGTCTAGGGTTTTGC	54	Genotypisierung
MN119 GABI_903G11 rv	GGATTGACATATGATTGTAGT	54	Genotypisierung
MN120 A3ΔPPP fw	ATGAAGCAACCTTCCGTGCTTGCTC AAGTG	78	Klassische Klonierung
MN121 A3ΔPPP rv	CACTTGAGCAAGCACGGAAGGTTGC TTCAT	78	Klassische Klonierung
MN122 mini A3PPP fw	GCTGCAGATGAATCGATGCCTTCCC CTCCTCCCGTGTAGATACTGAAAAA C	87	Klassische Klonierung
MN123 mini A3PPP rv	GTTTTTCAGTATCTACACGGGAGGA GGGGAAGGCATCGATTCATCTGCAG C	87	Klassische Klonierung
MN124 A3/255-325 fw NdeI	AAGGcatatgATGTTAGATGATGGTCCG ATG	57	Klassische Klonierung
MN125 A3/255-325 rv EcoRI	AAGGgaattcCTACTCTTTTCCTTAG GGA	56	Klassische Klonierung
MN126 P2 I miR-s	gaAAGCAAAGTGTCCGAAGTTTAtctct ctttgtattcc	63	miRNA SH3P2
MN127 P2 II miR-a	gaTAAACTTCGGACACTTTGCTTcaa agagaatcaatga	63	miRNA SH3P2
MN128 P2 III miR*s	gaTACACTTCGGACAGTTTGCTTcac agtcgtgatatg	64	miRNA SH3P2
MN129 P2 IV miR*a	gaAAGCAAAGTGTCCGAAGTGTAtcta catatatattcct	64	miRNA SH3P2
MN130 AuxI I miR-s	gaCAGCAAGTGGGCATTCTTTTAtctct ctttgtattcc	67	miRNA Aux-I
MN131 AuxI II miR-a	gaTAAAAGAATGCCCACTTGCTGtaa agagaatcaatga	67	miRNA Aux-I
MN132 AuxI III miR*s	gaTACAAGAATGCCCTCTTGCTGcac agtcgtgatatg	67	miRNA Aux-I
MN133 AuxI IV miR*a	gaCAGCAAGAGGGCATTCTTGTAAtcta catatatattcct	67	miRNA Aux-I
MN134 Auxli I miR-s	gaCTGCTTTTCGACATTACAATAAtctctc ttttgtattcc	60	miRNA Aux-I
MN135 Auxli II miR-a	gaTTATTGTAATGTGCGAAAGCAGtaa agagaatcaatga	60	miRNA Aux-I
MN136 Auxli III miR*s	gaTTCTTGTAATGTCCAAAGCAGcac agtcgtgatatg	62	miRNA Aux-I
MN137 Auxli IV miR*a	gaCTGCTTTGGACATTACAAGAAAtctac atatatatcct	62	miRNA Aux-I
MN138 A3ΔPPP	ATGAAGCAACCTTCCGTGCTTGCTC AAGTG	51	Klassische Klonierung Overlap
MN139 A3ΔPPP	CACTTGAGCAAGCACGGAAGGTTGC TTCAT	51	Klassische Klonierung Overlap
MN140 mini PPP fw	CATGGAGGCCAGTCCTTCCCCTCCT CCCGTGTAGGAATTCCACCCGG	53	Klassische Klonierung Overlap

MN141 mini PPP rv	CCGGGTGGAATTCCTACACGGGAG GAGGGGAAGGACTGGCCTCCATG		Klassische Klonierung Overlap
MN142 MCS fw	TAATTCCCGAGCCTCC	58	Klonierung Multiple Cloning Site
MN143 MCS rv	TGCACAGTTGAAGTGAAC	58	Klonierung Multiple Cloning Site
MN144 PrA3 fw GW	aaaaagcaggcttgTGGTTTGGTAGCCTA CTCAC	59	GW-Klonierung AMSH3
MN145 A3gen rv GW	agaaagctgggttGCGGAGATCGAGGAC T	59	GW-Klonierung AMSH3 C- terminale Fusion
MN146 At2g36680 fw EcoRI	AAGGgaattcATGTTCAATTTCTGGGG AT	58	Klassische Klonierung VPS36
MN147 At2g36680 rv Sall	AAGGgtcgacTCAGCCAATAGATGAAG TTTT	58	Klassische Klonierung VPS36
MN148 At4g05000 fw EcoRI	AAGGgaattcATGATGGAGGTCAAATT ATG	56	Klassische Klonierung VPS28
MN149 At4g05000 rv Sall	AAGGgtcgacTTAATTACCAGCTTTAG GCA	57	Klassische Klonierung VPS28
MN150 At3g12400 fw EcoRI	AAGGgaattcATGGTTCCCCCGCCG	68	Klassische Klonierung VPS23
MN151 At3g12400 rv Sall	AAGGgtcgacTCATGAATGTAACCTAC CTGCGATG	68	Klassische Klonierung VPS23
MN152 AT1G06210 fw NdeI	AAGGcatatgATGGACAAATTGAAGAT AGCA	59	Klassische Klonierung TOL2
MN153 AT1G06210 rv Sall	AAGGgtcgacTTATTTTTTCATCTTCATC ACTCG	60	Klassische Klonierung TOL2
MN154 AT2G38410 fw NdeI	AAGGgtcatgATGGCGTCGTCTTCAG	58	Klassische Klonierung TOL6
MN155 AT2G38410 rv Sall	AAGGgtcgacTTAAATCATTTTCCTTCC TCC	59	Klassische Klonierung TOL6
MN156-2 At4g34660 rv NotI	AAGGgcgccgcTCAGAAAACCTTCGGA CAC	57	Klassische Klonierung SH3P2
MN157 SH3P2(c250) fw EcoRI	AAGGgaattcCAGCTCGAAGGAGAGAT G	59	Klassische Klonierung
MN158 SH3P2(c179) fw EcoRI	AAGGgaattcGAGTCTCAAGGTAATCC TGAC	57	Klassische Klonierung

MN159 A3 fw	aaaaagcaggctATGAAGATTGATCTGA ACAAG	59	AMSH3 Gateway
MM160 A3 rv	agaaagctgggtGCGGAGATCGAGGAC	58	AMSH3 Gateway
MN161 A3(attB3) fw	ggggacaacctttgtataataaagtgtgATGAAG ATTGATCTGAACAAG	59	GW für BiFC 2in1
MN162 A3(attB2) rv	ggggaccactttgtacaagaaagctgggTTGCG GAGATCGAGGAC	63	GW für BiFC 2in1
MN163 SH3P2(attB1) fw	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttaATGG ATGCAATTAGAAAACA	57	GW für BiFC 2in1
MN164 SH3P2(attB4) rv stop	ggggacaactttgtatagaaaagttgggtTCAG AAAACCTTCGGACACT	57	GW für BiFC 2in1
MN165 SH3P2(attB4) rv	ggggacaactttgtatagaaaagttgggtGAAA ACTTCGGACACTTTG	57	GW für BiFC 2in1
MN166 CHC1 fw EcoRI	AAGGggatccATGGCGGCTGCTAAC	58	Klassische Klonierung
MN167 CHC1 rv NotI	AAGGgcgccgcCTATTTTGGAGTAGC TCTAGCTT	60	Klassische Klonierung
MN168 At4g12770 left	ATTTAATTCCCGGGTTTGGT	63	qRT-Analyse
MN169 At4g12770 right	TGGGATTGACTAGTTGTCTCTGAA	67	qRT-Analyse
MN170 At4g12780 left	TTTGATTCTGGGTTTGGTC	64	qRT-Analyse
MN171 At4g12780 right	CGGATTGATTTGTTGTCTCTGA	67	qRT-Analyse
MN172 SH3P2(N1-134) rv BamHI	AAGGggatccTCAAACCTGTGTACCAA GAG	58	Klassische Klonierung
MN173 SH3P2(Δ SH3) BamHI	AAGGggatccTCAATCTGTTGACGTGT CA	59	Klassische Klonierung
MN174 At4g34660 left	ttgatcagctogaaggagaga	60	qRT-Analyse
MN175 At4g34660 right	gcaaactccattagcttct	59	qRT-Analyse
MN176 SH3P2(C257- 369)fw EcoRI	AAGGgaattcATGTCTGAGAGGCAACG TATAG	55	Klassische Klonierung
MN177 SH3P2(N1-257)rv BamHI	AAGGggatccTCATACCATCTCTCCTT CGAG	57	Klassische Klonierung
MN178 SH3P2(N1-84)rv BamHI	AAGGggatccTCACGTACCTATTTCAA CTTGTT	53	Klassische Klonierung
MN179 FYVE(N1-139) rv XhoI	AAGGctcgagCTATTGCTGATACGGAG CA	58	Klassische Klonierung
MN180 FYVE(139-446) fw BamHI	AAGGggatccatATGCAACCTACCTCG CAACA	58	Klassische Klonierung
MN181 FYVE(139-446) rv XhoI	AAGGctcgagCTAATTAACAGGCTTTA TAATGTTTCATC	58	Klassische Klonierung
MN182 FYVE(C517- 601)fw BamHI	AAGGggatccatATGAGGTTGAGTAAT GCCAAGG	58	Klassische Klonierung
MN183 FYVE overlap Pro/Gen fw	CGATCACCGATTGAGCGATGCAACA GGGAGATTACA	58	Klassische Klonierung
MN184 FYVE overlap Pro/Gen rv	TGTAATCTCCCTGTTGCATCGCTGA ATCGGTGATCG	58	Klassische Klonierung
MN185 VPS23genPro fw	AAGGacaagttgtacaaaaagcaggctGAG ATCATTTTTGTGTCACCA	58	GW-Klonierung

MN186 VPS23w/oStopp rv	AAGGaccactttgtacaagaaagctgggtTGA ATGTAACCTACCTGCG	59	GW, C-terminale Fusion
MN187 TOL6Pro fw	AAGGacaagttgtacaaaaaagcaggctGTA ATCCTCATCCGCAATAA	59	Gateway Klonierung
MN188 TOL6 w/oStopp rv	AAGGaccactttgtacaagaaagctgggtAAT CATTTTCCTTCCTCCTA	57	GW, C-terminale Fusion
MN189 Pro::TOL6	TGTTTGATCGGTGAAGACTATGGCG TCGTCTTCAG	58	Overlap
MN190 TOL6::Pro (rv)	CTGAAGACGACGCCATAGTCTTCAC CGATCAAACA	58	Overlap
MN191 VPS23 Stopp rv	AAGGaccactttgtacaagaaagctgggtTCA TGAATGTAACCTACCTGC	59	Klassische Klonierung N-terminale Fusion
MN192 tRFP:ProVps23 fw	CGACACCGTTTAACTCCGATGGTGT CTAAGGGCGA	59	Overlap
MN193 ProVps23:tRFP rv	TCGCCCTTAGACACCATCGGAGTTA AACGGTGTC	59	Overlap
MN194 tRFP:Vps23genom rv	GGCGGGGGAACCATATTAAGTTTGT GCCCCAGT	59	Overlap
MN195 tRFP:Vps23genom fw	ACTGGGGCACAACTTAATATGGTT CCCCCGCC	63	Overlap
MN196 FYVE(1-139/STOP) rv GW	AAGGaccactttgtacaagaaagctgggtTCA CTGATACGGAGCAGTAGAATC	59	GW, N-terminale Fusion
MN197 SH3P2(N1-179) rv NotI	AAGGgcgccgcCTATCTCGCCTTTGC TTG	58	Klassische Klonierung
MN198 VPS23(N1-159) rv Sall	AAGGgtcgacCTAATAAAGAGGCGGAT CACG	61	Klassische Klonierung
MN199 VPS23(C160-*) fw EcoRI	AAGGgaattcATGTCTCGACGCCGTCC T	58	Klassische Klonierung
MN200 VPS23(N1-199) rv Sall	AAGGgtcgacCTAGCCGTAAGGTGAT GGC	58	Klassische Klonierung
MN201 VPS23(C200-*) fw EcoRI	AAGGgaattcATGGGAGGAGTAAGTAG GGTGC	67	Klassische Klonierung
MN202 ProSH3P2 fw NotI	AAGGgcgccgcCACACCAATGGCGA CATAAC	64	Klassische Klonierung
MN203 genomSH3P2 rv EcoRI	gaattcGAAACTTCGGACACTTTGC	61	Klassische Klonierung
MN204 tagRFP fw EcoRI-linker	gaattcggagttggagttGTGTCTAAGGGCG AAGAG	58	Klassische Klonierung
MN205 TermSH3P2 rv Sall	AAGGgtcgacTACTGAAGTTTAAGTT TGATAAATTGC	61	Klassische Klonierung
MN206 tagRFPxTermSH3P2 fw	GGCACAACTTAATTGAGAATTTGAA GGTAACATTATGGTTC	60	Overlap
MN207 tagRFPxTermSH3P2 rv	TGTTACCTTCAAATTCTCAATTAAGT TTGTGCC	60	Overlap
MN208 tagGFP fw Sall	AAGGgtcgacATGGTGAGCAAGGGC	58	Klassische Klonierung
MN209 tagGFP rv NcoI	AAGGccatggCTTGTACAGCTCGTCCA T	56	Klassische Klonierung

MN210 TOL6(N1-200) rv SacI	AAGGgagctcCTATACTCCATAGCCAG CTTGA	59	Klassische Klonierung
MN211 TOL6(180-400) fw NdeI	AAGGcatatgATGATCAAGCTGGTTAT GGAGTA	56	Klassische Klonierung
MN212 TOL6(180-400) rv SacI	AAGGgagctcCTAAGGGTCTGTAGTCA CAGATG	57	Klassische Klonierung
MN213 TOL6(380-*) fw NdeI	AAGGcatatgATGGATGAGTTTGCACA ATTAGC	58	Klassische Klonierung
MN214 TOL6(380-*) rv SacI	AAGGgagctcTTAAATCATTTTCCTTCC TCC	59	Klassische Klonierung
MN215 SH3P1 fw NcoI	AAGGccatggATATGGAAGCTATAAGA AAGC	57	Klassische Klonierung
MN216 SH3P2(N1-257)rv NotI	AAGGgcgccgcTCATACCATCTCTCC TTCGAG	57	Klassische Klonierung
MN217 TOL6(174-400) fw EcoRI	AAGGgaattcATGCCAGCTGGCTATGG AGTA	59	Klassische Klonierung
MN218 TOL6(174-400) rv NotI	AAGGgcgccgcCTAAGGGTCTGTAGT CACAGATG	57	Klassische Klonierung
MN219 TOL6(380-*) fw EcoRI	AAGGgaattcATGGATGAGTTTGCACA ATTAGC	58	Klassische Klonierung
MN220 TOL6(380-*) rv NotI	AAGGgcgccgcTTAAATCATTTTCCTT CCTCC	59	Klassische Klonierung
MN221 At4g34660 fw GW	aaaaagcaggcttgGATGCAATTAGAAAA CA	58	GW, N- terminale Fusion
MN222 At4g34660 rv GW	agaaagctgggtTCAGAAAACCTTCGGAC ACTTTG	58	GW, N- terminale Fusion
MN223 AT1G59610 EcoRI fw	AAGGgaattcATGGAGGCGATCGAT	58	Klassische Klonierung Dynamin
MN224 AT1G59610 NotI rv	AAGGgcgccgcCTAATACCTGTAAGA TGATCCAG	57	Klassische Klonierung Dynamin
MN225 AT5G42080 XhoI fw	AAGGctcgagATGGAAAATCTGATCTC TCT	55	Klassische Klonierung Dynamin
MN226 AT5G42080 XhoI rv	AAGGctcgagTCACTTGGACCAAGCA	57	Klassische Klonierung Dynamin
MN227 SH3P2(N1-257)rv GW	AAGGagaaagctgggtTACCATCTCTCC TTCGAG	55	GW, C- terminale Fusion
MN228 SH3P2(c179-*) fw GW	AAGGaaaaagcaggcttgATGGAGTCTCA AGGTAATCCTGAC	66	GW-Klonierung
MN229 SH3P2(N1-257)fw TOPO	caccATGGATGCAATTAGAAAACA	57	TOPO-GW- Klonierung
MN230 SH3P2(N1-257)rv TOPO	TACCATCTCTCCTTCGAG	55	TOPO-GW, C- terminale Fusion
MN231 SH3P2(c179-*) fw TOPO	caccATGGAGTCTCAAGGTAATCCTG AC	66	TOPO-GW
MN232 SH3P2(c179-*) rv TOPO	GAAAACCTTCGGACACTTTG	57	TOPO-GW, C- terminale Fusion

MN233 CHC1(1-500) fw TOPO	caccATGGCGGCTGCTAAC	58	TOPO-GW
MN234 CHC1(1-500) rv TOPO	CTATTTTGGAGTAGCTCTAGCTT	60	TOPO-GW, N-terminale Fusion
MN235 TOL2-u	GAACGATGGTGA CT CGAAAC	62	Genotypisierung Korbei et al.
MN236a TOL3-u	GCTCAGGCAACTGCATCAG	65	Genotypisierung Korbei et al.
MN236b TOL5-u	CCTACGCTTGTGAAGATAG	55	Genotypisierung Korbei et al.
MN237 TOL6-u	GTGGATATTTTCCCTCTGGACC	67	Genotypisierung Korbei et al.
MN238 TOL9-u	GAAGTGTGGTGACATGGTTC	61	Genotypisierung Korbei et al.
MN239 ProSH3P2 fw	caccCACACCAATGGCGACATAAC	64	TOPO-GW
MN240 SH3P2 rv	GAAAACCTTCGGACACTTTGC	61	TOPO-GW, C-terminale Fusion
MN241 TOL2-d	TGGTGGAAAACAGGAAGATAAG	65	Genotypisierung Korbei et al.
MN242 TOL3-d	CGGTATTGGAGTGGGAGCTG	67	Genotypisierung Korbei et al.
MN243 TOL5-d	AACTGGAGTCATTCTCAGG	57	Genotypisierung Korbei et al.
MN244 TOL6-d	GCGACGGTGGCTGTTGATAAAG	72	Genotypisierung Korbei et al.
MN245 TOL9-d	CTCCGTTACTGCAAATGCGTGC	72	Genotypisierung Korbei et al.
MN246 AP2A1(b2819) fw	ACAGACCCAGCGGACAG	57	Genotypisierung
MN247 TPLATE (b3211) fw	GCGGCCGAGAAGCTG	59	Genotypisierung
MN248 TML (b1594) fw	CCGGATCTACCTCAGCCT	58	Genotypisierung
MN249 EL/DA fw	GTGACAGATGTGCAAGCTTATC AACT	63	SH3 Mutagenese
MN250 EL/DA rv	AGTTGATAAGCTTGCATCGACATCT GTCAC	63	SH3 Mutagenese
MN251 GW/SF fw	GTTACAGGCAGTtctTttGCCGAAGGT GAA	68	SH3 Mutagenese
MN252 GW/SF rv	TTCACCTTCGGCAAAGA AACTGCCT GTAAC	68	SH3 Mutagenese
MN253 DRP1A(aa528) fw BamHI	AAGGgatccTACGTGAACATGGTCTG TG	59	Klassische Klonierung
MN254 DRP2A(aa740) fw BamHI	AAGGgatccTACGTTGAAGCTGTTCT TAACA	60	Klassische Klonierung
MN255 DRP2A rv XhoI	AAGGctcgagCTAATACCTATAAGCTG AACCTGTAG	58	Klassische Klonierung
MN256 DRP2B(aa747) fw EcoRI	AAGGgaattcTATGTTGAAGCTGTTCT CAAC	58	Klassische Klonierung
MN257 DRP3A(aa681) fw BamHI	AAGGgatccTACTATGACATTGTAAG GAAGAAT	56	Klassische Klonierung

MN258 DRP3A rv XhoI	AAGGctcgagTTAGAATCCGTATCCAT TTT	56	Klassische Klonierung
MN259 TermVPS23.1 (BamHI) rv	AAGGggatccAACAAGGCGTAAGGAT GTT	59	Klassische Klonierung
MN260 tagRFP:TermVPS23.1 fw	GGGGCACAAACTTAATTGAATGAAA TTCAGTGTTTTTGTTTG	60	Overlap
MN261 TermVPS23.1:tagRFP rv	CAAACAAAACACTGAATTTTCATTCA ATTAAGTTTGTGCCCC	60	Overlap
MN262 ProVPS23a (EcoRI) fw	AAGGgaattcGAGATCATTTTTGTGTC ACCA	63	Klassische Klonierung
MN263 Pro:VPS28a fw (EcoRI)	AAGGgaattcTAATAGACCCGATCTGA TCC	58	Klassische Klonierung
MN264 Pro:VPS28a rv (NcoI)	AAGGccatggATTACCAGCTTTAGGCA AAG	58	Klassische Klonierung
MN265 GFP fw (NcoI)	AAGGccatggATGGTGAGCAAGGGC	58	Klassische Klonierung
MN266 GFP rv:TermVPS28	CAAGAAACGTAACCTACATTGATCTT ACTTGTACAGCTCGTCCA	58	Overlap
MN267 GFP:TermVPS28fw	TGGACGAGCTGTACAAGTAAGATCA ATGTAGGTTACGTTTCTTG	58	Overlap
MN268 TermVPS28 rv (BamHI)	AAGGggatccTGGTCCATCAATATCAT AAGTTA	61	Klassische Klonierung
MN269 NOS-Term rv (BamHI)	AAGGggatccAGTTAGCTCACTCATTA GGCA	61	Klassische Klonierung
MN270 SH3P2(1-264) fw (NcoI)	AAGGccatggCGATGGATGCAATTAGA AAACA	58	Klassische Klonierung
MN271 SH3P2(1-264) rv (BamHI)	AAGGggatccCTAAGCTTCTATACGTT GCCTCT	58	Klassische Klonierung N- terminale Fusion
MN272 VPS28 aa501 fw	AGAATGGCTTTTCGAGGTT	59	Genotypisierung
MN273 VPS28:GFP fw	CTTTGCCTAAAGCTGGTAATccatggA TGGTGAGCAAGGGC	58	Overlap
MN274 VPS28:GFP rv	GCCCTTGCTCACCATccatggATTACC AGCTTTAGGCAAAG	58	Overlap
MN275 Pro:VPS28a rv (SmaI)	AAGGccccgggATTACCAGCTTTAGGCA AAG	58	Klassische Klonierung
MN276 GFP fw (SmaI)	AAGGccccgggATGGTGAGCAAGGGC	58	Klassische Klonierung
MN277 VPS28 GW C-term fw	acaagttgtacaaaaaagcaggctATGATGG AGGTCAAATTATG	57	GW-Klonierung
MN278 VPS28 GW w/o stop rv	accactttgtacaagaagctgggttATTACCAG CTTTAGGCAAAG	58	GW, C- terminale Fusion
LBb1.3 mod	ATTTTGCCGATTTTCGGAACCCACCAT C	72	Genotypisierung
Hyg fw	AGCGAACTGTGGACGAGAACTGTG	72	Genotypisierung Hyg-Resistenz
Hyg rv	AACTCACCGCGACGTCTGTGCGAGAA GT	72	Genotypisierung Hyg-Resistenz
35S fw	CCCCACTATCCTTCGCAAGACCC	72	Genotypisierung

LB3Sail	AATTTTCATAACCAATCTCGATACAC	64	Genotypisierung
08409 GABI	ATATTGACCATCATACTCATTGC	62	Genotypisierung
E1538.2 TagRFP fw NcoI	AAGGccatggGGGTGTCTAAGGGCGA AGAG	57	Insertion nach Schnittstelle

Appendix Tabelle 2: Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Konstrukte:

pMN	Genort	Konstrukt	Vektor	Datum	Klonierung
1	At2g30050	<i>putative SEC13</i>	pUC18	12.04.11	MN7-MN8 (XbaI-BamHI)
2	At4g34660	<i>35Spro:SH3P2-GFP</i>	pUC18	12.04.11	MN5-MN6 (XbaI-BamHI)
3	At3g01340	<i>putative SEC13</i>	pUC18	21.04.11	MN1-MN2 (XbaI-BamHI)
4	At4g12770	<i>Auxillin-like</i>	pCR2.1	29.04.11	MN19-MN20 TOPO-Reaktion
5	At4g12770	<i>35S:GFP-Auxillin-like</i>	puUC18	19.05.11	aus pMN4 (EcoRI-NotI)
6	At5g57460	<i>Nicht-charakterisiertes Protein</i>	pJET1.2	17.05.11	MN17-MN18 pJet-Reaktion
7	At5g57460	<i>Nicht-charakterisiertes Protein</i>	pUC18	25.05.11	aus pMN6 (EcoRI-NotI)
8	At1g78900	<i>ATPase catalytic subunit A</i>	pJET1.2	03.06.11	MN9-MN10 pJet-Reaktion
9	At4g32285	<i>Clathrin assembly protein AP180</i>	pJET1.2	03.06.11	MN26-MN27 pJet-Reaktion
10	At3g01560	<i>F4P13.11 (UBA) N-Term tagging</i>	pDONR207	04.07.11	MN73-MN74 GW
11	At3g11910	<i>Ubiquitin Hydrolase 13</i>	pDONR207	12.07.11	MN69-MN70 GW
12	At5g02500	<i>HSC1</i>	pDONR207	12.07.11	MN51-MN52 GW
13	At2g30050	<i>putative SEC13</i>	pDONR207	18.07.11	MN55-MN56 GW
14	At3g01560	<i>F4P13.11 (UBA)</i>	pDONR207	18.07.11	MN73-MN74 GW
15	At4g32285	<i>Clathrin assembly protein AP180</i>	pDONR207	20.07.11	MN67-MN68 GW
16	At5g02500	<i>35S:HSC I-GFP</i>	35S-GW-GFP	25.07.11	LR mit pMN12
17	At3g01560	<i>35S:YFP-F4P13.11(UBA)</i>	pExtag-YFP-GW	27.07.11	LR mit pMN14
18	At4g32285	<i>35S:AP180-GFP</i>	35S-GW-GFP	27.07.11	LR mit pMN9
19	At3g11910	<i>35S:Ubiquitin hydrolase13-GFP</i>	35S-GW-GFP	28.07.11	LR mit pMN11
20	At2g30050	<i>35S:SEC13-GFP</i>	35S-GW-GFP	28.07.11	LR mit pMN13
21	At4g12770	<i>Auxillin-like protein</i>	pDONR207	22.08.11	MN77-MN78 GW

22	At2g43160	<i>Epsin</i>	pDONR207	22.08.11	MN63-MN64 GW
23	At4g12770	<i>35S:YFP-Auxillin-like</i>	pExtag-YFP-GW	26.08.11	LR mit pMN21
24	At2g43160	<i>35S:Epsin-GFP</i>	35S-GW-GFP	29.08.11	LR mit pMN22
25	At4g34660	<i>SH3P2 ohne stopp</i>	pDONR207	05.09.11	MN53-MN54 GW
26	At4g34660	<i>35S:SH3P2-GFP</i>	35S-GW-GFP	13.09.11	LR mit pMN25
27	At4g12770	<i>35S:FLAG-Auxillin-like</i>	pGWB412	09.09.11	LR mit pMN21
28	At4g34660	<i>35S:SH3P2-FLAG</i>	pGWB411	09.09.11	LR mit pMN25
29	At3g01560	<i>35S:RFP-F4P13.11 (UBA)</i>	pGWB461	29.06.12	LR mit pMN17
30	At4g32285	<i>35S:AP180-RFP</i>	pGWB460	29.06.12	LR mit pMN18
31	At2g43160	<i>35S:Epsin-RFP</i>	pGWB460	29.06.12	LR mit pMN22
32	At4g12770	<i>ADH1:GBD-Auxillin like protein</i>	pGBKT7	04.07.12	MN106-MN107 (EcoRI-Sall)
33	At1g26630	<i>ADH1:GBD-FBR12</i>	pGBKT7	01.08.12	MN110-MN111 (EcoRI-Sall)
34	At3g46060	<i>ADH1:GBD-RAB8a</i>	pGBKT7	01.08.12	MN114-MN115 (EcoRI-Sall)
35	At4g16520	<i>ADH1:GAD-ATG8F</i>	pGADT7	02.08.12	MN116-MN117 (NdeI-EcoRI)
36	At4g18060	<i>ADH1:GAD-SH3P3</i>	pGADT7	01.08.12	umkloniert Markus P3
37	At1g31440	<i>ADH1:GAD-SH3P1</i>	pGADT7	02.08.12	MN105-MS8 (Bsu15I-BamHI)
38	At4g34660	<i>T7pro:SH3P2-HIS</i>	pET21a	06.08.12	MS11-MN109 (EcoRI-NotI)
39	At4g34660	<i>ADH1:GAD-SH3P2</i>	pGADT7	24.08.12	umkloniert Markus P2
40	At1g07410	<i>ADH1:GBD-RABA2B</i>	pGBKT7	27.08.12	MN112-MN113 (NdeI-Sall)
41	miRNA	<i>Aux1</i>	pJET1.2	29.09.12	MN130-MN131
42	miRNA	<i>Aux1*</i>	pJET1.2	29.09.12	MN132-MN133
43	miRNA	<i>Aux1</i>	pGreen 0229	23.10.12	aus pMN41 (EcoRI-BamHI)
44	miRNA	<i>Aux1*</i>	pGreen 0229	23.10.12	aus pMN42 (EcoRI-BamHI)
45	At4g16144	<i>ADH1:GAD-AMSH3(miniPPP)</i>	pGADT7	23.10.12	MN140-MN143 (Overlapp)KpnI-Sall
46	At4g16144	<i>AMSH3(ΔPRD)</i>	pJET1.2	27.11.12	MN138-MN139 (Overlapp)
47	At4g16144	<i>ADH1:GAD-AMSH3(ΔPRD)</i>	pGADT7	14.12.12	umkloniert pMN46
48	At4g16144	<i>ADH1:GAD-AMSH3(255-325)</i>	pGADT7	08.01.13	MN124-MN125 (NdeI-EcoRI)

49	At2g36680	<i>ADH1:GBD-VPS37</i>	pGBKT7	08.01.13	MN146-MN147 (EcoRI-Sall)
50	At4g05000	<i>ADH1:GBD-VPS28</i>	pGBKT7	10.01.13	MN148-MN149 (EcoRI-Sall)
51	At3g12400	<i>ADH1:GBD-VPS23</i>	pGBKT7	30.01.13	MN150-MN151 (EcoRI-Sall)
52	At4g34660	<i>Tacpro:GST-SH3P2</i>	pGEX-6p1	30.01.13	MS11-MN156 (EcoRI-NotI)
53	At4g12770	<i>ADH1:GAD-Auxillin-like</i>	pGAD7	21.02.13	umkloniert pMN32
54	At4g16144	<i>ProA3::gen.A3</i>	pJET1.2	08.01.13	MN144-MN145 (GW)
55	At2g20760	<i>CLC::tagRFP</i>	pGWB558	17.06.13	LR mit EI154
56	At4g16144	<i>ADH1:GBD-AMSH3(ΔPRD)</i>	pGBKT7	04.07.13	umkloniert pMN46
57	At4g16144	<i>ADH1:GBD-AMSH3(255-325)</i>	pGBKT7	04.07.13	umkloniert pMN48
58	At4g34660	<i>SH3P2 ohne Stop Codon</i>	pDONR(P4P1)	07.10.13	MN163-MN165 GW
59	At4g34660	<i>SH3P2 mit Stop Codon</i>	pDONR(P4P1)	07.10.13	MN163-MN164 GW
60	At4g16144	<i>AMSH3 ohne Stop Codon</i>	pDONR(P3P2)	07.10.13	MN161-MN162 GW
61	At4g34660	<i>Tacpro:SH3P2(c250)</i>	pGEX-6P-1	07.11.13	MN157-MN156 (EcoRI-NotI)
62	At4g34660	<i>Tacpro:SH3P2(c179)</i>	pGEX-6P-1	07.11.13	MN158-MN156 (EcoRI-NotI)
63	At4g16144	<i>AMSH3(ΔPRD)</i>	pDONR207	07.10.13	MN159-MN160 Template pMN56
64	At4g16144	<i>AMSH3(ΔPRD)</i>	35S-GW-GFP	21.10.13	LR mit pMN63
65	At4g16144	<i>CN AMSH3:nYFP::cYFP:SH3</i>	pBiFct-2in1-CN	24.10.13	LR mit pMN59 und pMN60
66	At4g16144	<i>CC AMSH3:nYFP::SH3:cYFP</i>	pBiFct-2in1-CC	24.10.13	LR mit pMN58 und pMN60
67	miRNA	<i>SH3P2</i>	pTA7002	22.10.13	MN126 bis MN129 (XhoI-SpeI)
68	At4g34660	<i>Tacpro:GST-SH3P2</i>	pGEX-6P-1	08.11.13	MS11-MN156 (EcoRI-NotI)
69	At4g34660	<i>ADH1:GAD-SH3P2(N1-134)</i>	pGADT7	20.11.13	MS11-MN172 (EcoRI-BamHI)
70	At4g34660	<i>ADH1:GAD-SH3P2(ΔSH3)</i>	pGADT7	20.11.13	MS11-MN173 (EcoRI-BamHI)
71	At2g20760	<i>UBQ10pro:RFP::CLC1</i>	pUBN-RFP-DEST	26.11.13	LR mit pEI154
72	At3g12400	<i>Tacpro:GST-Vps23</i>	pGEX-6P-1	02.12.13	umkloniert aus pMN51 (EcoRI-Sall)

73	At4g16144	<i>A3Pro::A3genom::tagRFP::A3Term</i>	pGreen 0229	10.12.13	EI538.2-EI540 EI539-EI141 (NcoI-KpnI)
74	At4g34660	<i>ADH1:GAD-SH3P2</i>	pDEST-AD	21.07.14	kein Stopp! WDH siehe pMN99&100
75	At2g43160	<i>ADH1:GBD-EPSIN</i>	pDEST-BD	21.07.14	LR mit pMN22
76	At4g34660	<i>SH3P2-MBP</i>	pMAL 87/86	24.09.14	umkloniert aus pMN68 (EcoRI-NotI)
77	At1g20110	<i>35S::tagRFP-FYVE1(1-138)</i>	pDONR207	17.10.14	CK40-MN191 GW
78	At1g20110	<i>35S::tagRFP-FYVE1(1-138)</i>	pGWB461	20.10.14	LR mit pMN77
79	At3g12400	<i>ProVPS23::VPS23</i>	pDONR207	17.10.14	MN185-MN186
80	At3g12400	<i>ProVPS23::VPS23::tagRFP</i>	pGWB558	19.11.14	LR mit MN79
81	At1g20110	<i>35S::YFP-FYVE1</i>	pExtag-YFP-GW	12.01.15	LR mit pCK47
82	At3g12400	<i>Tacpro:GST-Vps23(160-*)</i>	pGEX-6P-1	19.03.15	MN199-MN151 (EcoRI-Sall)
83	At3g12400	<i>Tacpro:GST-Vps23(200-*)</i>	pGEX-6P-1	19.03.15	MN201-MN151 (EcoRI-Sall)
84	At4g34660	<i>Tacpro:GST-SH3(1-179)</i>	pGEX-6P-1	19.03.15	MS11-MN197 (EcoRI-NotI)
85	At4g34660	<i>ADH1:GAD-SH3P2</i>	pDEST-BD	20.03.15	WDH siehe pMN99&100
86	At4g34660	<i>SH3P2(1-257)</i>	pJET1.2	23.03.15	MS11-MN216 (EcoRI-NotI)
87	At2g38410	<i>TOL6(174-400)</i>	pJET1.2	23.03.15	MN217-MN218 (EcoRI-NotI)
88	At2g38410	<i>TOL6(380-*)</i>	pJET1.2	25.03.15	MN219-MN220 (EcoRI-NotI)
89	At4g34660	<i>Tacpro:GST-SH3P2(1-257)</i>	pGEX-6p1	31.03.15	aus pMN86
90	At2g38410	<i>Tacpro:GST-TOL6(174-400)</i>	pGEX-6p1	31.03.15	aus pMN87
91	At2g38410	<i>Tacpro:GST-TOL6(380-*)</i>	pGEX-6p1	21.04.15	aus pMN88
92	At5g42080	<i>Tacpro:GST-DRP1A(ADL1)</i>	pGEX-6p1	05.06.15	MN225-MN226 (XhoI-XhoI)
93	At4g34660	<i>SH3P2(1-257)</i>	pENTR-TOPO/D/TEV	16.09.15	MN229-MN230 TOPO-GW
94	At4g34660	<i>SH3P2(179-*)</i>	pENTR-TOPO/D/TEV	16.09.15	MN231-MN232 TOPO-GW
95	At4g34660	<i>SH3P2(1-257)</i>	pFAST/R05	28.09.15	LR mit pMN93
96	At4g34660	<i>SH3P2(179-*)</i>	pFAST/R05	28.09.15	LR mit pMN94

97	At4g34660	<i>SH3P2</i>	pENTR- TOPO/D/TEV	20.10.15	MN229- MN156.2(NotI) TOPO-GW
98	At3g11130	<i>CHC1(1-500)</i>	pENTR- TOPO/D/TEV	30.10.15	MN233-MN234 TOPO-GW
99	At4g34660	<i>ADH1:GAD-SH3P2</i>	pDEST-AD	18.11.15	LR mit pMN97
100	At4g34660	<i>ADH1:GBD-SH3P2</i>	pDEST-BD	18.11.15	LR mit pMN97
101	At3g11130	<i>ADH1:GAD-CHC1(1-500)</i>	pDEST-AD	18.11.15	LR mit pMN98
102	At3g11130	<i>ADH1:GBD-CHC1(1-500)</i>	pDEST-BD	18.11.15	LR mit pMN98
103	At4g34660	<i>SH3P2-RFP</i>	pGWB561	14.12.15	LR mit pMN97
104	At4g34660	<i>ProSH3P2::SH3P2genom</i>	pENTR- TOPO/D/TEV	19.02.16	MN239-MN240 TOPO-GW
105	At4g34660	<i>ProSH3P2::SH3P2genom:: tagRFP</i>	pGWB558	22.02.16	LR mit pMN104
106	At4g34660	<i>ProSH3P2::SH3P2genom:: tagRFP</i>	pGWB458	24.02.16	LR mit pMN104
107	At5g42080	<i>Tacpro:GST-DRP1A (528- 611)</i>	pGEX-6P-1	26.07.16	MN253-MN226 (BamHI-XhoI)
108	At1g10290	<i>Tacpro:GST-DRP2A(740- 915)</i>	pGEX-6P-1	26.07.16	MN254-MN255 (BamHI-XhoI)
109	At1g59610	<i>Tacpro:GST-DRP2B(747- 921)</i>	pGEX-6P-1	26.07.16	MN256-MN255 (EcoRI-XhoI)
110	At4g33650	<i>Tacpro:GST-DRP3A(681- 810)</i>	pGEX-6P-1	26.07.16	MN257-MN258 (BamHI-XhoI)
111	GFP-NOS	<i>nGFP-Tnos aus 404</i>	pJET1.2	06.04.17	MN265-MN269 (NcoI-BamHI)
112	At4g05000	<i>proVPS28a:VPS28a</i>	pJET1.2	06.04.17	MN263-MN264 (EcoRI-NcoI)
113	At3g12400	<i>ProVPS23::VPS23::tagRF P</i>	pUC119	02.03.17	MN262-MN269 (EcoRI-BamHI)
114	At3g12400	<i>ProVPS23::VPS23::tagRF P</i>	pJET1.2	13.04.17	MN262-MN269 (EcoRI-BamHI)
115	At4g05000	<i>ProVPS28::VPS28::sGFP</i>	pUC119	08.05.17	Ligation mit pMN111 und pMN112
116	At4g05000	<i>ProVPS28::VPS28::sGFP</i>	pKS+	08.05.17	Ligation mit pMN111 und pMN112
117	At4g34660	<i>SH3P2(BAR)Crystalization</i>	pETM-11	24.05.17	MN270-MN271 (XhoI-EcoRI)
118	At1g31440	<i>SH3P1</i>	pENTR- TOPO/D/TEV	27.10.17	MN279-MS8 TOPO- GW
119	At1g31440	<i>ADH1:GAD-SH3P1</i>	pDEST-BD	29.10.17	LR mit pMN118

Appendix Tabelle 3: Genotypisierungen der Mutanten

Genotyp oder Konstrukt	Oligo-Name	Sequenz 5'-3'
<i>VPS23.1-3</i>	AG49	AACTTTGGACTTTGGAACATGTCCACTCCTTAC A
	AG51	AGGAACCATCATCACACGCATAGCCACAG
<i>vps23.1-3</i> (Sail_1233E07_2-4)	AG51-	AGGAACCATCATCACACGCATAGCCACAG
	LB3Sail	AATTTTCATAACCAATCTCGATACAC
<i>VPS23.2-1</i>	AG47-	GTATCACGAATGCAACCTAGCTGCAATGGAAG
	FA169	TCGTCATCTGTCTGTCTTCAAG
<i>vps23.2-1</i> (Sail_237G05_3-4)	AG47	GTATCACGAATGCAACCTAGCTGCAATGGAAG
	LB3Sail	AATTTTCATAACCAATCTCGATACAC
<i>VPS23.1:VPS23.1-RFP</i>	MN201-	AAGGgaattcATGGGAGGAGTAAGTAGGGTGC
	FA121	cgcGAATTCtcaattaagttgtgcc
<i>SH3P1</i>	MN91-	ACACAACCGTTGTTGGTAT
	MN92b	CCTCAACAATCCTATCTACCC
<i>sh3p1</i> (Salk_127258)	MN91-	ACACAACCGTTGTTGGTAT
	LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAACCACCATC
<i>SH3P3</i>	MN93-	TGTCACCTTTCAGGAGTTCC
	MN94	AGCTCCTGTAATGCCTCT
<i>sh3p3</i>	MN93-	TGTCACCTTTCAGGAGTTCC
	LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAACCACCATC
<i>35S:amish3p2</i> (att1-att2)	EI1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
	EI2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT
<i>35S:amish3p2</i> (Hyg-Kasette)	Hyg fw	AGCGAACTGTGGACGAGAACTGTG
	Hyg rv	AACTCACCGCGACGTCTGTGCGAGAAGT
<i>35S:amish3p2</i> (35Spro-att2)	35S fw	CCCCACTATCCTTCGCAAGACCC
	EI2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT

Appendix Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Antikörper:

Antikörper	Hersteller oder Referenz
Primäre Antikörper	
anti-AMSH3	Isono et al., 2010
anti-GAL4BD	Santa Cruz Biotechnology
anti- CDC2 PSTAIRE	Santa Cruz Biotechnology

anti-UGPase	Agrisera
anti-H ⁺ -ATPase	Agrisera
anti-BiP2	Agrisera
anti-COX2	Agrisera
anti-Sec21	Agrisera
anti-V-ATPase	Agrisera
anti-Toc75	Agrisera
anti-CHC	Agrisera
anti-GST	GE Healthcare
anti-HA	Sigma-Aldrich
anti-MBP	New England Biolabs
anti-GFP	Roche
anti-Ubiquitin P4D1	Santa Cruz Biotechnology
Sekundäre Antikörper	
anti-goat-HRP	Sigma-Aldrich, Deutschland
anti-mouse-HRP	Sigma-Aldrich, Deutschland
anti-rabbit-AP	Sigma-Aldrich, Deutschland
anti-rabbit-HRP	Sigma-Aldrich, Deutschland

Appendix Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien:

Bezeichnung der Chemikalie	Lieferant
2,4-D (2,4-Dichlorphenoxyessigsäure)	Duchefa Biochemie, Niederlande
2-Mercaptoethanol	Carl Roth, Deutschland
2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES monohydrate)	Carl Roth, Deutschland
2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES hydrate)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Epoxysuccinyl- L -Leucylamido(4- Guanidino)-Butan (E-64)	Carl Roth, Deutschland
3-Amino-1,2,4-Triazol (3AT)	Sigma-Aldrich, Deutschland
5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP)	Sigma-Aldrich, Deutschland
6-Benzylaminopurin (6-BA)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Essigsäure 25 %	Carl Roth, Deutschland

Acrylamide Rotiphorese Gel 30 (37, 5:1)	Carl Roth, Deutschland
Agar, für Bakteriologie	AppliChem, Deutschland
Agarose, peqGOLD Universal	Peqlab, Deutschland
Ammoniumperoxydisulphat (APS)	Carl Roth, Deutschland
Ampicillin	Carl Roth, Deutschland
Aprotinin	Carl Roth, Deutschland
BASTA	Bayer CropScience, Deutschland
Bicine	Carl Roth, Deutschland
Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris-(hydroxymethyl)-methan (Bis-Tris)	Carl Roth, Deutschland
Rinderserum Albumin (Albumin Fraktion V, BSA)	AppliChem, Deutschland
Rinderserum Albumin Fraktion V, fettsäurefrei (BSA)	Carl Roth, Deutschland
Brefeldin A (BFA)	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Bromophenol blue	Carl Roth, Deutschland
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Deutschland
Calciumhypochloride	Carl Roth, Deutschland
Cellulase "Onozuka R-10"	Yakult Pharmaceutical Industry, Japan
Chloroform	Carl Roth, Deutschland
Chymostatin	Carl Roth, Deutschland
cOMpleteEDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue R-250	AppliChem, Deutschland
D-Glucose	AppliChem, Deutschland
D-Mannitol	AppliChem, Deutschland
Deuteriumoxid	Carl Roth, Deutschland
Deoxyribonucleoside-Triphosphat (dNTPs)-Set	Carl Roth, Deutschland
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Carl Roth, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Deutschland
e-Aminocaproinsäure	Carl Roth, Deutschland
EDTA (Ethylendiamin-tetraessigsäure) Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth, Deutschland
EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure)	Carl Roth, Deutschland
Ethanol	Carl Roth, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth, Deutschland
Ficoll 400	Carl Roth, Deutschland
Gentamicinsulfat	Duchefa Biochemie, Niederlande
Glycerin	Carl Roth, Deutschland
Glycin	Carl Roth, Deutschland

Salzsäure	Carl Roth, Deutschland
Hefeextrakt	Carl Roth, Deutschland
Hefe-Stickstoff-Basismedium	Sigma-Aldrich, Deutschland
Hefe-Drop Out Medium ohne Leucin, Tryptophan, Uracil	Sigma-Aldrich, Deutschland
Hefe-Drop Out Medium ohne Leucin, Tryptophan, Uracil, Histidin	Sigma-Aldrich, Deutschland
Hygromycin B	Sigma-Aldrich, Deutschland
Isopropanol (2-Propanol)	Carl Roth, Deutschland
Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranosid (IPTG)	AppliChem, Deutschland
Kanamycin	AppliChem, Deutschland
Kaliumacetat	Carl Roth, Deutschland
Kaliumchlorid	AppliChem, Deutschland
Kaliumhydroxid	AppliChem, Deutschland
L-Glutathione	Sigma-Aldrich, Deutschland
L-Histidine	Sigma-Aldrich, Deutschland
L-Leucine	Sigma-Aldrich, Deutschland
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Deutschland
L-Uracil	Sigma-Aldrich, Deutschland
Leupeptin	Carl Roth, Deutschland
Lithiumacetat	Carl Roth, Deutschland
Macerozyme R-10	Yakult Pharmaceutical Industry, Japan
Magermilchpulver	Carl Roth, Deutschland
Magnesiumchlorid Hexahydrate	Sigma-Aldrich, Deutschland
Maltose	Sigma-Aldrich, Deutschland
Methanol	Carl Roth, Deutschland
Murashige & Skoog (MS-0)	Duchefa Biochemie, Niederlande
N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(Diethylamino) Phenyl) Hexatrienyl) Pyridinium Dibromid (FM4-64)	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Natriumhydroxid	Carl Roth, Deutschland
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth, Deutschland
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Orange G	Carl Roth, Deutschland
p -Aminobenzamidin	Carl Roth, Deutschland
Pepstatin A	Carl Roth, Deutschland
Phenol	Carl Roth, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth, Deutschland
Plant agar	Duchefa Biochemie, Niederlande
Pluronic F-127	Sigma-Aldrich, Deutschland

Poly(ethylenglycol) 4000 (PEG4000)	Carl Roth, Deutschland
Poly(ethylenglycol) 4000 (PEG4000)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Poly(ethylenglycol) 6000 (PEG6000)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Rifampicin	Duchefa Biochemie, Niederlande
Silwet L-77	Lehle Seeds, USA
Tetracyclin	Carl Roth, Deutschland
Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Triton X-100	AppliChem, Deutschland
Tween-20	AppliChem, Deutschland
Wortmannin (WM)	Sigma-Aldrich, Deutschland

Appendix Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Bakterien- und Hefestämme:

Stamm	Genotyp
<i>Escherichia coli</i>	
DH5α	F ⁻ Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺) <i>phoA supE44 λ- thi-1gyrA96 relA1</i>
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>ara leu</i>) 7697 <i>galJ galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>
Rosetta	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>gal dcm</i> pRARE2 (Cam ^R)
Rosetta-gami 2	Δ(<i>ara-leu</i>)7697 Δ <i>lacX74</i> Δ <i>phoA Pvull phoR araD139 ahpC galE galK rpsL</i> F ⁺ [<i>lac+ lacIq pro</i>] <i>gor522::Tn10 trxB</i> pRARE23 (Cam ^R , Str ^R , Tet ^R)4
Rosetta-gami B	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>gal dcm lacY1 aphC gor522::Tn10 trxB</i> pRARE2 (Cam ^R , Kan ^R , Tet ^R)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	
GV3101::pMP90	C58 (Rif ^R), Plasmid: <i>pMP90(pTiC58ΔT-DNA)</i> (Gent ^R)
GV3101::pMP90RK	C58 (Rif ^R), Plasmid: <i>pMP90RK(pTiC58ΔT-DNA)</i> (Gent ^R , Kan ^R)
GV3101::pMP90 pSOUP	C58 (Rif ^R), Plasmide: <i>pMP90(pTiC58ΔT-DNA)</i> (Gent ^R), pSOUP (Tet ^R)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Y8800	<i>MATa, leu2-3,112 trp1-901 his3-200 ura3-52 gal4Δ gal80Δ GAL2-ADE2 LYS2::GAL1-HIS3 MET2::GAL7-lacZ cyh2^R</i>
Y190	<i>MATa gal4 gal80 his3 trp1-901 ade2-101 ura3-52 leu2-3,-112</i> (Clontech)

Appendix Tabelle 7: Gennamen und Genorte:

Gename	Genort	T-DNA-Insertionslinie
<i>ALIX (ALG-2-INTERACTING PROTEIN X)</i>	AT1G15130	
<i>AMSH1 (ASSOCIATED MOLECULE WITH THE SH3 DOMAIN OF STAM 1)</i>	AT1G48790	
<i>AMSH2</i>	AT1G10600	
<i>AMSH3</i>	AT4G16144	
<i>ARA7 (ARABIDOPSIS RAB GTPASE)</i>	AT4G19640	
<i>AUXILIN-ÄHNLICHES PROTEIN</i>	AT4G12770	
<i>CHC (CLATHRIN HEAVY CHAIN)</i>	AT3G11130	
<i>CLC (CLATHRIN LIGHT CHAIN)</i>	AT2G40060	
<i>FYVE1/FREE1 (FYVE-DOMAIN PROTEIN 1)</i>	AT1G20110	
<i>SH3P1 (SH3 DOMAIN CONTAINING PROTEIN 1)</i>	AT1G31440	Salk_127258
<i>SH3P2</i>	AT4G34660	
<i>SH3P3</i>	AT4G18060	Salk_065790
<i>SKD1 (SUPPRESSOR OF K⁺ TRANSPORT GROWTH DEFECT 1)</i>	AT2G27600	
<i>SYP43 (SYNTAXIN OF PLANTS 43)</i>	AT3G05710	
<i>TOL2 (TOM LIKE PROTEIN 2)</i>	AT1G06210	
<i>TOL6</i>	AT2G38410	
<i>VPS2.1(VACUOLAR PROTEIN SORTING 2.1)</i>	AT2G06530	
<i>VPS23.1</i>	AT3G12400	Sail_1233E07_2-4
<i>VPS23.2</i>	AT5G13860	Sail_237G05_3-4
<i>VPS28.1</i>	AT4G05000	
<i>VPS37.1</i>	AT2G36680	

Lebenslauf

Marie-Kristin Nagel

Geburtsdatum: 22.06.1981
Geburtsort: Titisee-Neustadt



Ausbildung:

1988- 1992 Grundschule Hinterzarten
1992-2001 Gymnasium, Schule Birklehof
 Abitur im Juni 2001

Berufsausbildung:

09/2001- 07/2003 Berufsausbildung zur medizinisch kaufmännischen
 Assistentin
 Examen im Juli 2003
10/2003- 03/2009 Studium der Biologie
 Albert-Ludwig-Universität in Freiburg im Breisgau
04/2009- 03/2010 Diplomarbeit
 Kerntransport von Phytochrom B in einem zellfreien
 System
 Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie
 Prof. Dr. Eberhart Schäfer
 Albert-Ludwig-Universität in Freiburg im Breisgau
Seit 04/2011 Promotion
 Lehrstuhl für Systembiologie der Pflanzen
 Prof. Dr. Claus Schwechheimer
 Prof. Dr. Erika Isono
 Technische Universität München
04/2017 Wissenschaftliche Angestellte
 Lehrstuhl für Physiologie und Biochemie der Pflanzen
 Prof. Dr. Erika Isono
 Universität Konstanz

Publikationsliste

Publikationen:

***Nagel, M.K., Kalinowska, K., Vogel, K., Reynolds, G.D., Wu, Z., Anzenberger, F., Ichikawa, M., Tsutsumi, C., Sato, M.H., Kuster, B., Bednarek, S.Y., and Isono, E. (2017).** Arabidopsis SH3P2 is an ubiquitin-binding protein that functions together with ESCRT-I and the deubiquitylating enzyme AMSH3. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

Kalinowska, K., Nagel, M.K., Goodman, K., Cuyas, L., Anzenberger, F., Alkofer, A., Paz-Ares, J., Braun, P., Rubio, V., Otegui, M.S., and Isono, E. (2015). Arabidopsis ALIX is required for the endosomal localization of the deubiquitinating enzyme AMSH3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E5543-5551.

***Kolb, C., Nagel, M.K., Kalinowska, K., Hagmann, J., Ichikawa, M., Anzenberger, F., Alkofer, A., Sato, M.H., Braun, P., and Isono, E. (2015).** FYVE1 is essential for vacuole biogenesis and intracellular trafficking in Arabidopsis. *Plant Physiol* **167**, 1361-1373.

Howing, T., Huesmann, C., Hoefle, C., Nagel, M.K., Isono, E., Huckelhoven, R., and Gietl, C. (2014). Endoplasmic reticulum KDEL-tailed cysteine endopeptidase 1 of Arabidopsis (AtCEP1) is involved in pathogen defense. *Front Plant Sci* **5**, 58.

Isono, E., and Nagel, M.K. (2014). Deubiquitylating enzymes and their emerging role in plant biology. Review in *Front Plant Sci* **5**, 56.

Pfeiffer, A., Nagel, M.K., Popp, C., Wust, F., Bindics, J., Viczian, A., Hiltbrunner, A., Nagy, F., Kunkel, T., and Schafer, E. (2012). Interaction with plant transcription factors can mediate nuclear import of phytochrome B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 5892-5897.

Buchkapitel:

Kalinowska, K., Nagel, M.K., and Isono, E. (2016). Measuring the Enzyme Activity of Arabidopsis Deubiquitylating Enzymes. *Methods Mol Biol* **1450**, 35-44.

* Publikationen betreffend den Inhalt dieser Arbeit