

Technische Universität München  
Lehrstuhl für Systembiologie der Pflanzen

# Neddylierung in *Arabidopsis thaliana*: Charakterisierung eines Inhibitors und eines neuen Substrats

Jana Pia Hakenjos

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:

Univ.-Prof. Dr. A. Gierl

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. C. Schwechheimer

2. Univ.-Prof. Dr. J. Durner

3. Priv.-Doz. Dr. E. J. Glawischnig

Die Dissertation wurde am 17.10.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 06.12.2013 angenommen.

**“Things are much more marvelous than the scientific method allows us to conceive.”**

**Barbara McClintock**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Abkürzungen</b> .....	<b>VI</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>Summary</b> .....	<b>2</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>3</b>
1.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System .....	4
1.2 NEDD8- ein Ubiquitin-ähnliches Protein.....	5
1.3 MLN4924- eine neues Medikament gegen Krebs .....	8
1.4 Signalwege von Phytohormonen und des Lichts.....	9
1.5 MD-2-related lipid-recognition domain containing proteins .....	13
1.6 ER bodies und ihre Biologie.....	14
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
2.1 Material.....	17
2.1.1 Bakterienstämme .....	17
2.1.2 Pflanzenlinien und Mutanten .....	17
2.1.3 Antikörper .....	18
2.1.4 Primer .....	19
2.1.5 Vektoren .....	20
2.1.6 Chemikalien und Reagenzien.....	21
2.1.6.1 Chemikalien .....	21
2.1.6.2 Enzyme und Kits.....	22
2.1.6.3 Marker.....	23
2.2 Methoden .....	24
2.2.1 Generelle Pflanzenarbeiten.....	24
2.2.1.1 Samensterilisierung und Wachstumsbedingungen.....	24
2.2.1.2 Pflanzentransformation .....	24
2.2.1.3 Selektion transgener Pflanzenlinien.....	24
2.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	25
2.2.2.1 PCR.....	25
2.2.2.2 Klassische Klonierung .....	25
2.2.2.3 Klonierung mit der Gateway-Technologie .....	26

2.2.2.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	27
2.2.2.5	Isolierung genomischer DNA aus Pflanzen.....	27
2.2.2.6	RNA-Extraktion aus Pflanzen.....	27
2.2.2.7	cDNA-Synthese .....	28
2.2.2.8	Quantitative Real-Time-PCR.....	28
2.2.2.9	<i>Yeast Two-Hybrid</i> .....	28
2.2.3	Biochemische Methoden .....	29
2.2.3.1	Proteinextraktion.....	29
2.2.3.2	Immunopräzipitation.....	29
2.2.3.3	Proteinaufreinigung mit dem Streptavidin/Biotin-System.....	29
2.2.3.4	Tryptischer Verdau im Gel und Elution der Peptide.....	30
2.2.3.5	Massenspektrometrie .....	30
2.2.3.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	30
2.2.3.7	Western-Blot .....	30
2.2.4	Physiologische Experimente .....	31
2.2.4.1	Physiologische Experimente.....	31
2.2.4.2	Behandlung mit Hormonen, Inhibitoren und anderen Substanzen .....	31
2.2.5	Histologische und zellbiologische Methoden .....	31
2.2.5.1	GUS-Färbung.....	31
2.2.5.2	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....	32
2.2.5.3	Subzelluläre Fraktionierung.....	32
2.2.5.4	Aufreinigung von Vakuolen.....	32
2.2.6	Phytopathologische Methoden .....	32
2.2.7	Bioinformatische Methoden.....	32
2.2.7.1	Sequenz- und phylogenetische Analysen.....	32
2.2.7.2	3D-Modellierung.....	33
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>
3.1	MLN4924 ist ein effizienter Inhibitor der NEDD8-Aktivierung in Pflanzen .....	34
3.1.1	Strukturvorhersage der MLN4924-Bindung an ECR1.....	34
3.1.2	Spezifische Inhibition der Neddylierung in <i>Arabidopsis thaliana</i> durch MLN4924 .....	35
3.1.3	Der Auxin-insensitive Phänotyp der Neddylierungsmutanten kann mit MLN4924 hervorgerufen werden.....	37
3.1.4	MLN4924 stabilisiert die Substrate weiterer CRLs .....	39

3.1.5	MLN4924 inhibiert die Neddylierung in weiteren Pflanzenspezies .....	42
3.1.6	NEDD8 scheint neben den Cullinen weitere Substrate in <i>Arabidopsis thaliana</i> zu haben.....	43
3.2	Das MD-2-related lipid-recognition domain containing protein ML3 ist ein neues Substrat der Neddylierung .....	45
3.2.1	Identifizierung neuer NEDD8-Substrate in <i>Arabidopsis</i> .....	45
3.2.2	ML3 interagiert wahrscheinlich mit NEDD8 und Ubiquitin.....	49
3.2.3	ML3 gehört zur Familie der MD-2-related lipid-recognition domain Proteine	51
3.2.4	Identifizierung von <i>ml3</i> -Mutanten .....	54
3.2.5	ML3 lokalisiert in die Vakuole und in ER <i>bodies</i> .....	55
3.2.6	Regulation der <i>ML3</i> -Expression durch NAI1 .....	57
3.2.7	ML3 hat eine Rolle in der Abwehr mikrobieller Pathogene .....	60
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>62</b>
4.1	MLN4924- Inhibitor der Neddylierung in Pflanzen.....	62
4.1.1	Spezifische Inhibition der NEDD8-Aktivierung durch MLN4924.....	62
4.1.2	Die Wirkung von MLN4924 auf Hormonsignalwege.....	63
4.1.3	Inhibition weiterer CRLs durch MLN4924.....	65
4.1.4	Anwendungen von MLN4924 in der Pflanzenforschung.....	66
4.1.5	Identifizierung neuer NEDD8-Substrate .....	67
4.2	ML3 ist ein neues NEDD8-Substrat in <i>Arabidopsis</i> .....	68
4.2.1	ML3 ist ein <i>Brassicales</i> -spezifisches ML-Protein .....	68
4.2.2	ML3 wird durch NEDD8 und Ubiquitin modifiziert .....	69
4.2.3	Die Interaktion ML3s mit NEDD8 und Ubiquitin .....	70
4.2.4	Die subzelluläre Lokalisierung ML3s .....	71
4.2.5	ML3 ist mit der ER <i>body</i> -Biologie assoziiert.....	73
4.2.6	ML3 spielt eine Rolle in der Pathogenabwehr .....	74
4.2.7	Glukosinolate und ML3 .....	75
4.3	Schlussfolgerung .....	76
<b>5</b>	<b>Quellenverzeichnis .....</b>	<b>78</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>91</b>
	<b>Appendix .....</b>	<b>93</b>
	Hakenjos et al., 2011	
	Hakenjos et al., 2013	

# Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Das Ubiquitin-Proteasom-System.....	4
<b>Abbildung 2:</b> Der NEDD8-Weg in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	6
<b>Abbildung 3:</b> Cullin-RING-Ligasen in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	7
<b>Abbildung 4:</b> MLN4924 und sein Wirkmechanismus .....	9
<b>Abbildung 5:</b> Die Signalwege von Auxin, Jasmonsäure und Gibberellin. ....	10
<b>Abbildung 6:</b> Der Ethylensignalweg.....	11
<b>Abbildung 7:</b> Der Lichtsignalweg.....	12
<b>Abbildung 8:</b> MD-2 und TLR4 binden LPS und lösen eine Immunantwort aus. ....	13
<b>Abbildung 9:</b> NPC2s Rolle im Cholesterin-Recycling. ....	14
<b>Abbildung 10:</b> ER <i>bodies</i> in der Epidermis des Hypokotyls. ....	15
<b>Abbildung 11:</b> Strukturvorhersage der Bindung MLN4924s an AtECR1.....	35
<b>Abbildung 12:</b> Spezifische Inhibition der Neddylierung in <i>Arabidopsis</i> durch MLN4924. ...	36
<b>Abbildung 13:</b> Induktion eines Auxin-insensitiven Phänotyps durch MLN4924.....	38
<b>Abbildung 14:</b> Induktion eines lichtgewachsenen Phänotyps im Dunkeln durch MLN4924. ....	40
<b>Abbildung 15:</b> Inhibition des SCF <sup>SLY1/SNE</sup> - und SCF <sup>SKP1b</sup> -abhängigen Proteinabbaus durch MLN4924. ....	41
<b>Abbildung 16:</b> Induktion charakteristischer Phänotypen in anderen Pflanzenspezies durch MLN4924. ....	42
<b>Abbildung 17:</b> MLN4924-verursachtes, agravitropes Wurzelwachstum in verschiedenen Pflanzenspezies. ....	43
<b>Abbildung 18:</b> ML3 wird neddyliert. ....	46
<b>Abbildung 19:</b> Neddylierung von ML3-Lysinmutanten. ....	47
<b>Abbildung 20:</b> Massenspektrometrische Identifizierung des NEDD8- bzw. Ubiquitin-Fingerabdrucks an K137 aus ML3. ....	48
<b>Abbildung 21:</b> Interaktion ML3s mit NEDD8 und Ubiquitin/ Modifikation ML3s mit Ubiquitin.....	49
<b>Abbildung 22:</b> Inhibition der Neddylierung ML3s durch MLN4924. ....	50
<b>Abbildung 23:</b> Alignment der ML-Proteine aus Mensch und <i>Arabidopsis</i> . ....	51
<b>Abbildung 24:</b> Zugehörigkeit ML3s zu einer <i>Brassicales</i> -spezifischen Gruppe der ML-Proteine.....	53
<b>Abbildung 25:</b> Identifizierung von <i>ml3</i> -Mutanten. ....	54
<b>Abbildung 26:</b> Subzelluläre Lokalisierung ML3s in die Vakuole und in ER <i>bodies</i> .....	55
<b>Abbildung 27:</b> Regulation der <i>ML3</i> -Expression durch NAI1. ....	58
<b>Abbildung 28:</b> ER <i>bodies</i> in <i>ml3-3</i> .....	58
<b>Abbildung 29:</b> Regulation der <i>ML3</i> -Expression durch Methyljasmonat, Ethylen und Verwundung. ....	59
<b>Abbildung 30:</b> Veränderte Pathogenabwehr der <i>ml3</i> -Mutanten. ....	60
<b>Abbildung 31:</b> Wirkung MLN4924s auf verschiedene, hormonregulierte Aspekte der Wurzelbildung. ....	64
<b>Abbildung 32:</b> Widerspruch zwischen ML3 Lokalisierung und Neddylierung? .....	72
<b>Abbildung 33:</b> Zusammenfassung.....	77

# Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> NEDD8-Substrate.....	8
<b>Tabelle 2:</b> Transgene Linien .....	17
<b>Tabelle 3:</b> T-DNA Insertionslinien.....	17
<b>Tabelle 4:</b> EMS-Mutanten .....	18
<b>Tabelle 5:</b> Antikörper.....	18
<b>Tabelle 6:</b> Matrices für Proteinaufreinigungen.....	19
<b>Tabelle 7:</b> Genotypisierungsprimer .....	19
<b>Tabelle 8:</b> Klonierungsprimer.....	19
<b>Tabelle 9:</b> qRT-PCR-Primer .....	20
<b>Tabelle 10:</b> Vektoren .....	20
<b>Tabelle 11:</b> Chemikalien.....	21
<b>Tabelle 12:</b> Enzyme .....	22
<b>Tabelle 13:</b> Marker .....	23
<b>Tabelle 14:</b> Selektionsmittel .....	25
<b>Tabelle 15:</b> Klassisch-klonierte Konstrukte .....	26
<b>Tabelle 16:</b> <i>Entry</i> -Klone .....	26
<b>Tabelle 17:</b> Liste der klonierten, putativen NEDD8-Substrate.....	45
<b>Tabelle 18:</b> Mit <i>ML3</i> koregulierte Gene. ....	57
<b>Tabelle 19:</b> Liste der mittels Massenspektrometrie identifizierten Proteine nach HSN- Aufreinigung. ....	93

# Abkürzungen

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
3AT	3-Amino-1,2,4-triazol
3-HBA	3-Hydroxybenzoesäure
ACC	1-Aminocyclopropan-carbonsäure
AD	Aktivierungsdomäne
AFB	AUXIN SIGNALING F-BOX
AMP	Adenosinmonophosphat
APPBP1	AMYLOID PRECURSOR PROTEIN BINDING PROTEIN 1
ARF	AUXIN RESPONSE FACTOR
ASK	Arabidopsis SKP
Atg	AUTOPHAGY-RELATED PROTEIN
ATP	Adenosintri-phosphat
ATR1	ALTERED TRYPTOPHAN REGULATION 1
Aux/IAA	AUXIN/ INDOLE-3-ACETIC ACID
AXL	AXR1-LIKE
AXR1	AUXIN RESISTANT 1
BCA3	BREAST-CANCER ASSOCIATED-PROTEIN 3
BD	DNA-Bindedomäne
BDL	BODENLOS
BRAP2	BRCA1-ASSOCIATED PROTEIN 2
BRIZ1	BRAP2 RING ZNF UBP DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 1
BTB	BRIC-A-BRAC/TRAMTRACK/BROAD COMPLEX
CAND1	CULLIN-ASSOCIATED AND NEDDY-LATION-DISSOCIATED PROTEIN 1
CDC2	CELL DIVISION CONTROL 2
CDK	CYCLIN-DEPENDENT KINASE
cDNA	<i>complementary</i> DNA
CK1 $\alpha$	CASEIN KINASE 1 $\alpha$
COI1	CORONATINE INSENSITIVE 1
COP	CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC
CRL	Cullin-RING-Ligase
CRY1	CRYPTOCHROME 1
CUL	CULLIN
dATP	Desoxyadenosintri-phosphat
DCAF	DDB1-CUL4 ASSOCIATED FACTOR
dCTP	Desoxycytidintri-phosphat
DDB1	DAMAGED DNA BINDING PROTEIN 1
DDE	DELAYED DEHISCENCE
DEN1	DENEDDY-LASE 1
DEX	Dexamethason
dGTP	Desoxyguanosintri-phosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtri-phosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintri-phosphat
EBF	EIN3-BINDING F-BOX PROTEIN
ECR1	E1 C-TERMINAL RELATED 1
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EIN	ETHYLENE INSENSITIVE
EOL	ETO1-LIKE
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-associated degradation
ETO1	ETHYLENE OVERPRODUCER 1
ETP	EIN2 TARGETING PROTEIN
FedA	Ferredoxin A
GA	Gibberellin
GAI	GA INSENSITIVE

## Abkürzungen

---

GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GID	GA INSENSITIVE DWARF
GLL	GDSL LIPASE-LIKE PROTEIN
GM2A	GM2-ACTIVATOR
GUS	$\beta$ -Glucuronidase
HA	Hämagglutinin
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HIF	HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR
HR	<i>hypersensitive response</i>
HSN	HA-STREPII-NEDD8
HSUB	HA-STREPII-Ubiquitin
HY5	ELONGATED HYPOCOTYL 5
IAA	INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE
IP	Immunpräzipitation
ISG15	INTERFERON STIMULATED GENE
JA	Jasmonsäure
JAL	JACALIN-RELATED LECTIN
JAZ	JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN
KRP1	KIP-RELATED PROTEIN 1
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	<i>leucine rich repeats</i>
MD-2	MYELOID DIFFERENTIATION FACTOR 2
MDM2	MURINE DOUBLE MINUTE 2
MEB1	MEMBRANE OF ER BODY 1
MeJA	Methyljasmonat
MEN	MOPS, Natriumacetat, EDTA
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
ML	MD-2-related lipid-recognition
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MYB34	MYB DOMAIN PROTEIN 34
NAE	NEDD8-aktivierendes Enzym
NEDD8	NEURAL PRECURSOR CELL EXPRESSED, DEVELOPMENTALLY DOWNREGULATED 8
NEDP1	NEDD8-SPECIFIC PROTEASE 1
NINJA	NOVEL INTERACTOR OF JAZ
NPC2 /NPC1	NIEMANN-PICK DISEASE, TYPE C2 /C1
NSP	NITRILE SPECIFIER PROTEIN
OPR	OXOPHYTODIENOATE-REDUCTASE
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
PIF	PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR
PINK1	PTEN-INDUCED PUTATIVE KINASE 1
PM	Plasmamembran
PR1	PATHOGENESIS-RELATED GENE 1
PsbA	PHOTOSYSTEM II REACTION CENTER PROTEIN A
pVHL	VON HIPPEL-LINDAU PROTEIN
qRT-PCR	quantitative Real-Time-PCR
RbcS1A	RIBULOSE BIPHOSPHATE CARBOXYLASE SMALL CHAIN 1A
RBX1	RING-BOX 1
RCAN1	REGULATOR OF CALCINEUTRIN 1
RCE1	RUB1 CONJUGATING ENZYME
RFP	<i>red fluorescent protein</i>
RGA	REPRESSOR OF <i>gal-3</i>
RKP	RELATED TO KPC1
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RUB	RELATED TO UBIQUITIN
SA	Salicylsäure
SCF	SKP, CUL1, F-BOX
SD	<i>Synthetic Drop-out Medium</i>

## Abkürzungen

---

SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SENp8	SUMO/SENTRIN SPECIFIC PEPTIDASE FAMILY MEMBER 8
SKP1	S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN 1
SLY	SLEEPY1
SNE	SNEEZY
SPA	SUPPRESSOR OF phyA-105
SUMO	SMALL UBIQUITIN-LIKE MODIFIER
T-DNA	Transfer-DNA
TFA	Trifluoressigsäure
TIR	TOLL-INTERLEUKIN-1 RECEPTOR
TIR1	TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1
TLR	TOLL LIKE RECEPTOR
TM	Transmembrandomäne
TPL	TOPELESS
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UBA	UBIQUITIN-ACTIVATING ENZYME
UBQ	Ubiquitin
UCH-L3	UBIQUITIN CARBOXYL-TERMINAL ESTERASE L3
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
VSP1	VEGETATIVE STORAGE PROTEIN 1
WT	Wildtyp
X-Gluc	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronid
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>

# Zusammenfassung

NEDD8 (NEURAL PRECURSOR CELL-EXPRESSED, DEVELOPMENTALLY DOWN-REGULATED PROTEIN 8) ist ein in Eukaryoten gut konserviertes, Ubiquitin-ähnliches Protein. Es wird in drei enzymkatalysierten Schritten an Proteinsubstrate konjugiert und dient somit als posttranslationale Modifikation. Am besten verstanden ist die NEDD8-Modifikation der Culline, Untereinheiten der Cullin-RING-Ubiquitinligasen (CRLs), die zu einer Aktivierung der Ligase führt und damit die Ubiquitinierung der CRL-Substrate begünstigt. In Menschen spielen CRLs eine wichtige Rolle im Zellzyklus, in der DNA-Replikation und der Reparatur von DNA, in der Antwort auf oxidativen Stress sowie im Hypoxiesignalweg. Da diese Prozesse mit der Entstehung und dem Wachstum von Krebs in Zusammenhang stehen, wurde von Millenium Pharmaceuticals mit MLN4924 ein Medikament zur Behandlung von Krebs entwickelt, das die Neddylierung und damit CRLs inhibieren kann. Ich konnte im Rahmen dieser Arbeit auf molekularer und physiologischer Ebene zeigen, dass MLN4924 auch in Pflanzen wirksam ist. In der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* ist der Signalweg des Phytohormons Auxin der am besten verstandene Prozess, der durch eine CRL und damit durch NEDD8 reguliert wird. So war die erste Mutante der Neddylierung in *Arabidopsis* aufgrund ihrer Auxin-Insensitivität isoliert worden. Meine Experimente verdeutlichen, dass MLN4924 vergleichbare Auxin-insensitive Phänotypen hervorruft und die Auxinsignaltransduktion inhibiert. Außerdem inhibiert MLN4924 mit dem Ubiquitin-abhängigen Abbau positiver Regulatoren der Photomorphogenese im Dunkeln und dem Abbau des DELLA-Repressors RGA zwei weitere, gut charakterisierte CRL-abhängige Prozesse in Pflanzen. Da MLN4924 in drei weiteren Pflanzenspezies Phänotypen auslöst, wie sie typisch sind für eine Inhibition der Neddylierung, kann davon ausgegangen werden, dass MLN4924 in vielen, wenn nicht allen, Pflanzen funktionell ist.

Die Culline waren zu Beginn dieser Arbeit die einzigen bekannten NEDD8-Substrate in Pflanzen. Um neue NEDD8-Substrate aus *Arabidopsis* zu identifizieren wurden neddylierte Proteine von mir aufgereinigt. Nach der massenspektrometrischen Identifikation der putativen NEDD8-Substrate wurden einige der identifizierten Proteine daraufhin getestet, ob sie wirklich mit dem Ubiquitin-ähnlichen Protein modifiziert werden. Tatsächlich konnte ich belegen, dass das MD-2-related lipid-recognition domain containing protein ML3 neddyliert wird. Im Laufe dieser Arbeit stellte sich heraus, dass ML3 auch mit Ubiquitin modifiziert sein kann. Da ML3 keine bekannte Funktion hatte, wurden erste Schritte unternommen, es zu charakterisieren. Ich konnte beobachten, dass ML3 in die Vakuole und in ER *bodies* lokalisiert. Die Lokalisierung in ER *bodies* ist besonders interessant, da ML3 auch mit der Biologie der ER *bodies* verbunden zu sein scheint. ER *bodies* sind *Brassicales*-spezifische Organellen und meine Untersuchungen haben ergeben, dass auch ML3 zu einer *Brassicales*-spezifischen Gruppe der ML-Proteine gehört. Da ich zeigen konnte, dass ML3 durch Methyljasmonat, Ethylen und Verwundung reguliert wird, lag die Vermutung nahe, dass ML3 eine Rolle in der Pathogenabwehr besitzt. Tatsächlich waren *ml3*-Mutanten anfälliger für Infektionen mit dem Pilz *Alternaria brassicicola* und resistenter gegen Infektionen mit dem Bakterium *Pseudomonas syringae* DC3000.

## Summary

NEDD8 (NEURAL PRECURSOR CELL-EXPRESSED, DEVELOPMENTALLY DOWN-REGULATED PROTEIN 8) is a ubiquitin-like protein that is well conserved throughout eukaryotes. In three enzyme catalyzed steps NEDD8 can be conjugated to a substrate protein and therefore serves as a posttranslational modification. Best understood is the NEDD8 modification of cullins, core subunits of cullin-RING-ubiquitin ligases (CRLs), leading to an activation of the ligase and thus activation of the ubiquitination of CRL substrates. In humans CRLs play an important role in cell cycle regulation, DNA replication and DNA repair, oxidative stress response and hypoxia signaling. All these processes are implicated in cancer formation and growth. For this reason Millenium Pharmaceuticals developed a anticancer drug called MLN4924 that inhibits neddylation and thereby indirectly CRL activity. I could show on molecular and physiological level that MLN4924 is also capable of inhibiting neddylation in plants. The best understood NEDD8- and CRL- dependent process in the plant model species *Arabidopsis thaliana* is the signaling pathway of the phytohormone auxin. The first neddylation mutant in *Arabidopsis* was isolated based on its auxin insensitivity. MLN4924 induces similar auxin insensitive phenotypes and inhibits auxin signal transduction. Furthermore MLN4924 inhibits ubiquitin dependent degradation of positive regulators of photomorphogenesis in the dark and degradation of the DELLA repressor RGA, two additional well characterized CRL dependent processes. MLN4924 also induces phenotypes, typical for neddylation inhibition in three additional plant species. Hence, MLN4924 is functional in a wide range of plant species.

At the beginning of this study, the cullins were the only known NEDD8 substrates in plants. To identify new NEDD8 substrates in *Arabidopsis* I purified neddylated proteins. After identification of these putative NEDD8 substrates by mass spectrometry I tried to verify the NEDD8 modification for some of the identified proteins. Indeed my results proofed that the MD-2 related lipid-recognition domain containing protein ML3 is neddylated. During this study it came apparent that ML3 can also be modified by ubiquitin. Due to the fact that ML3 had no known function I undertook first steps to characterize it. I could show that ML3 localizes to the vacuole and ER bodies. The ER body localization is of special interest as my results indicate that ML3 is associated with ER body biology. ER bodies are organelles specific for *Brassicales* and I could demonstrate the ML3 also belongs to a *Brassicales* specific branch of ML proteins. Since I could show that *ML3* is regulated by methyl jasmonate, ethylene and wounding it seemed plausible that ML3 might be involved in defense against pathogens. Indeed *ml3* mutants are more sensitive to attacks by the fungi *Alternaria brassicicola* and more resistant against infections by the bacterium *Pseudomonas syringae DC3000*.

# 1 Einleitung

Das Ubiquitin-ähnliche Protein NEDD8 (NEURAL PRECURSOR CELL-EXPRESSED, DEVELOPMENTALLY DOWN-REGULATED PROTEIN 8) dient als posttranslationale Modifikation anderer Proteine und reguliert auf diese Weise eine Vielzahl an wichtigen Prozessen in Eukaryoten. Die Bedeutung NEDD8s wird dadurch unterstrichen, dass der Funktionsverlust des *NEDD8*-Gens in fast allen Spezies letal ist, wobei die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* eine Ausnahme bildet (Rabut and Peter, 2008). In Menschen spielt NEDD8 eine Rolle in der Entstehung von Krebs und jüngere Studien zeigen, dass es auch bei der Ausbildung der Krankheit Morbus Parkinson involviert sein könnte (Watson et al., 2011; Choo et al., 2012; Um et al., 2012). In den letzten Jahren wurden große Fortschritte in der Entwicklung von Krebsmedikamenten gemacht, die in die Neddylierung eingreifen (Soucy et al., 2009; Tanaka et al., 2012). So hat die Firma Millenium Pharmaceuticals mit MLN4924 einen Inhibitor der NEDD8-Aktivierung mit großem Potenzial in der Behandlung menschlicher Krebserkrankungen entwickelt (Soucy et al., 2009). In Pflanzen ist die Regulation durch NEDD8 von großer Bedeutung, da sie ein gemeinsames Element vieler Phytohormonsignalwege ist und NEDD8 ebenfalls in der Signaltransduktion des Lichts beteiligt ist (Santner and Estelle, 2009; Lau and Deng, 2012).

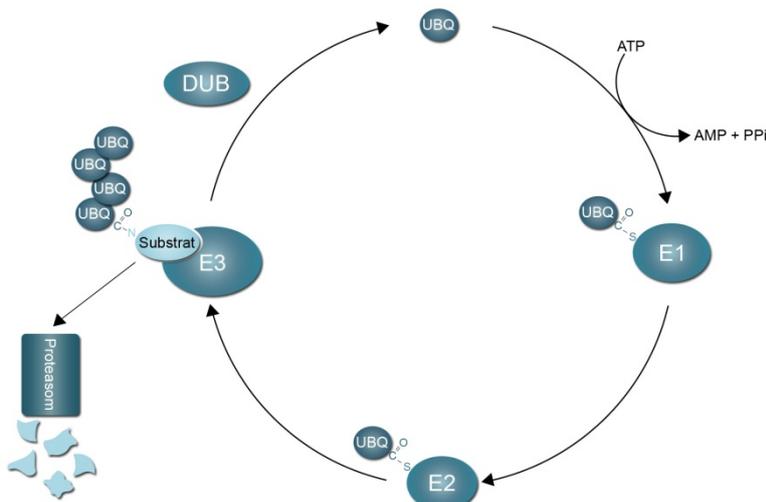
Vor etwa 40 Jahren wurde mit Ubiquitin das erste, als posttranslationale Modifikation dienende Protein entdeckt. Darauf folgten Jahrzehnte intensiver Forschung, die zur Aufklärung des Mechanismus der Ubiquitin-Konjugation und der Funktionsweise des Proteasom-Systems führten und im Jahr 2004 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet wurden (Herrmann et al., 2007). So sind für Ubiquitin heute eine sehr große Zahl an Substraten aus verschiedenen Spezies bekannt. Im Gegensatz dazu wurden für NEDD8 bis dato nur wenige Substrate beschrieben, obwohl es Ubiquitin in vielen Aspekten sehr ähnlich ist (Rabut and Peter, 2008). In Pflanzen beschränkt sich das Wissen über die Modifikation mit NEDD8 sogar auf eine einzige Proteinfamilie (Vierstra, 2012).

Um die Rolle der Neddylierung in Pflanzen besser zu verstehen, war das Ziel dieser Arbeit, unbekannte NEDD8-Substrate aus dem Pflanzenmodellorganismus *Arabidopsis thaliana* zu identifizieren und zu charakterisieren. Des Weiteren sollte die Wirksamkeit des als Krebsmedikament entwickelten Inhibitors der NEDD8-Aktivierung, MLN4924, in Pflanzen getestet werden. Einen Inhibitor der Neddylierung in Form eines kleinen Moleküls zur Verfügung zu haben, würde die Erforschung der NEDD8-Funktion in Pflanzen erleichtern und weiter vorantreiben.

## 1.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Ubiquitin ist ein kleines, evolutionär konserviertes Protein aus lediglich 76 Aminosäuren. Es kann in drei Enzym-katalysierten Schritten an andere Proteine konjugiert werden und dient damit als posttranslationale Modifikation (Hershko and Ciechanover, 1998). Im ersten Schritt der Ubiquitinierung wird Ubiquitin, durch ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1), aktiviert (Abbildung 1). Dazu hydrolysiert E1 ATP, um eine energiereiche Thioesterverbindung mit dem C-Terminus des Ubiquitins herzustellen. Das nun an E1-gebundene Ubiquitin wird im nächsten Schritt an ein Cystein des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms E2 überführt. Das Ubiquitin-beladene E2 interagiert mit E3-Ubiquitinligasen, um das Ubiquitin an ein Lysin (K) des Substrats zu konjugieren. Der C-Terminus des Ubiquitins bildet dabei eine stabile Isopeptidbrücke mit dem Lysin des Substrats. Ubiquitin enthält selbst mehrere Lysine und so können, durch Wiederholung des beschriebenen Prozesses, Ubiquitinketten gebildet werden. Je nachdem welches Lysin verwendet wird, entstehen unterschiedliche Ketten, die unterschiedliche Effekte auf das Substrat haben. Am besten verstanden ist die Funktion von Ketten, die mit Hilfe von Lysin 48 (K48) gebildet werden. Trägt ein Protein eine K48-Kette aus mindestens vier Ubiquitinen, dient dies als Signal für den Abbau des Proteins durch das 26S Proteasom (Deveraux et al., 1994; van Nocker et al., 1996). Das Proteasom ist eine große, aus mehreren Untereinheiten bestehende, ATP-abhängige Protease, die polyubiquitinierte Proteine durch Proteolyse abbaut (Voges et al., 1999). Es besteht aus einer zylindrischen 20S-Proteaseeinheit, die auf beiden Seiten durch 19S-Komplexe verschlossen ist. Die 19S-Komplexe erkennen ubiquitinierte Proteine, entfalten diese und spalten die Ubiquitinmoleküle ab. Das Ubiquitin wird dadurch recycelt. Die entfaltenen Proteine werden danach in die 20S-Proteaseeinheit eingeschleust, wo sie abgebaut werden. Nicht nur der 19S-Komplex kann Ubiquitin von Proteinen abspalten, sondern auch sogenannte deubiquitinierende Enzyme (DUBs), wodurch der Prozess der Ubiquitinierung wieder rückgängig gemacht werden kann (Abbildung 1) (Komander et al., 2009).

E3-Ubiquitinligasen nehmen im Ubiquitin-Proteasom-System eine zentrale Rolle ein, da sie für die Erkennung der Substrate zuständig sind. Nur in der Anwesenheit einer spezifischen, aktiven E3 wird das Substrat ubiquitiniert und anschließend abgebaut. Um die Stabilität vieler verschiedener Proteine, zu vielen verschiedenen Zeitpunkten, regulieren zu können, bedarf es



**Abbildung 1: Das Ubiquitin-Proteasom-System.**

Ubiquitin (UBQ) wird durch die Enzyme E1, E2 und E3 aktiviert, konjugiert und schließlich an sein Substrat ligiert. Durch die Wiederholung des Prozesses können Ubiquitinketten gebildet werden, die unter anderem als Signal für den Abbau des Proteins über das Proteasom dienen. Ubiquitin kann von seinem Substrat, über die Aktivität von DUBs, wieder abgespalten werden.

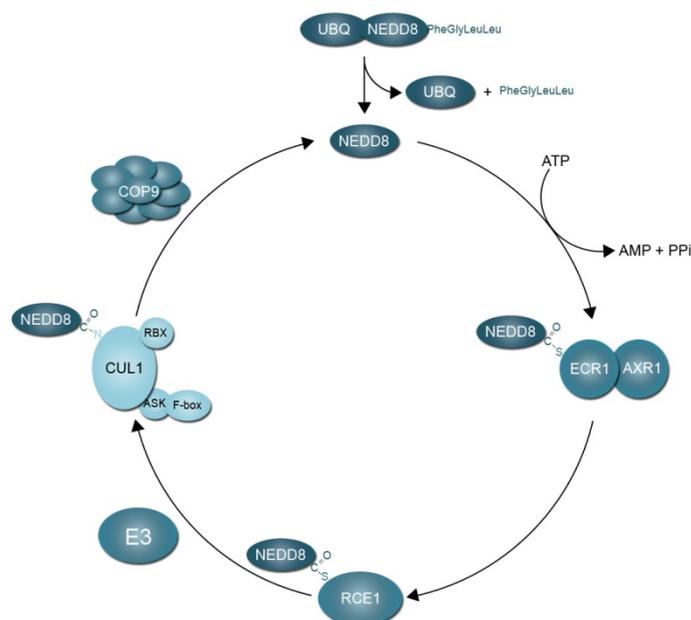
daher einer großen Zahl an E3-Ubiquitinligasen. In Einklang damit gibt es in Eukaryoten verschiedene Klassen an Ubiquitinligasen, die zum Teil sehr viele Mitglieder umfassen (Metzger et al., 2012). Ein Beispiel hierfür sind die SCF (S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN (SKP), CUL1, F-BOX)-Ubiquitinligasen aus *Arabidopsis thaliana*, die wahrscheinlich mehrere Hundert verschiedene Komplexe bilden können und die eine wichtige Rolle in vielen Prozessen spielen, allen voran in der Phytohormonsignaltransduktion (Gagne et al., 2002; Kelley and Estelle, 2012). SCF<sup>TIR1</sup>, ein besonders gut verstandenes Mitglied dieser Gruppe, ubiquitiniert in Abhängigkeit des Phytohormons Auxin Repressoren des Auxinsignalwegs, wodurch schlussendlich eine Auxinantwort ausgelöst wird (Dharmasiri et al., 2005). Das Ubiquitin-Proteasom-System wird von Pflanzen besonders intensiv für die Regulation von Wachstum und Entwicklung genutzt und daher ist die Erforschung dieses Systems in Pflanzen auch von besonderem Interesse (Vierstra, 2009; Sadanandom et al., 2012).

## 1.2 NEDD8- ein Ubiquitin-ähnliches Protein

Neben Ubiquitin sind einige weitere Ubiquitin-ähnliche Proteine bekannt. Dazu zählen NEDD8, SUMO, ISG15, FAT10, Atg8 und Atg12 (Vierstra, 2012). Alle diese Proteine werden analog zu Ubiquitin an Proteinsubstrate konjugiert und dienen als posttranslationale Modifikation. NEDD8, auch RUB (RELATED TO UBIQUITIN) genannt, ist Ubiquitin auf Sequenzebene und in der Struktur am ähnlichsten (Kumar et al., 1992; Kumar et al., 1993; Callis et al., 1995; Hochstrasser, 1998). Es besteht wie Ubiquitin aus 76 Aminosäuren und wird ebenfalls in drei enzymkatalysierten Schritten an sein Substrat konjugiert.

In *Arabidopsis* gibt es drei NEDD8-Homologe, RUB1, 2 und 3, wobei sich RUB1 und RUB2 nur in einer Aminosäure unterscheiden und funktional redundant sind, was dadurch gezeigt wurde, dass *rub1/rub2*-Pflanzen im frühen Embryostadium sterben, während die Einzelmutanten keinen Mutantenphänotyp aufweisen (Bostick et al., 2004). RUB1 wird im Weiteren als NEDD8 bezeichnet.

NEDD8 wird wie Ubiquitin kovalent an andere Proteine konjugiert, wobei der C-Terminus NEDD8s eine Isopeptidbrücke mit einem Lysin des Substrats bildet (Kamitani et al., 1997). In allen Spezies wird NEDD8 als eine nicht konjugierbare Vorläuferform exprimiert, die noch eine oder mehrere Aminosäuren nach Glycin 76 trägt, welche vor der Aktivierung NEDD8s abgespalten werden müssen. In Menschen übernehmen das die Proteasen UCH-L3, die auch Ubiquitin prozessieren kann, und NEDP1 (auch als DEN1 oder SENP8 bekannt) (Wada et al., 1998; Gan-Erdene et al., 2003; Mendoza et al., 2003; Wu et al., 2003; Shin et al., 2011). In *Arabidopsis thaliana* ist die Situation noch komplexer, da NEDD8 nicht nur vier Aminosäuren nach Gly76 trägt, sondern auch noch in einer translationalen Fusion mit Ubiquitin exprimiert wird (Abbildung 2)(Callis et al., 1995). Hier muss nicht nur der C-Terminus abgespalten werden, sondern auch das N-terminale Ubiquitin. Welche Proteasen diese Aufgabe in *Arabidopsis* übernehmen ist nicht bekannt. Nach der Prozessierung wird NEDD8 in einem ATP-abhängigen Schritt aktiviert. Das katalysierende Enzym dieser Aktivierung ist ein Heterodimer aus AUXIN RESISTANT 1 (AXR1, APPBP1 beim Menschen) und E1 C-TERMINAL RELATED 1 (ECR1, UBA3 beim Menschen), die jeweils Homologie zu dem N- bzw. dem C-Terminus des Ubiquitin-aktivierenden Enzyms E1



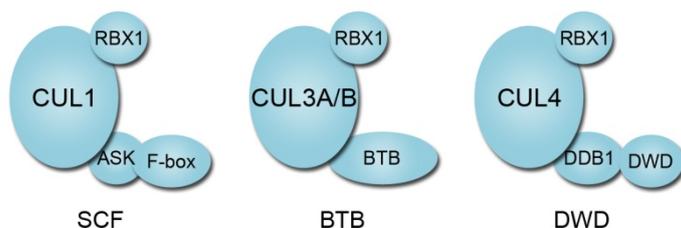
**Abbildung 2: Der NEDD8-Weg in *Arabidopsis thaliana*.**

Die Vorläuferform NEDD8s wird in einer translationalen Fusion mit Ubiquitin exprimiert. Nach dem Abspalten des Ubiquitins und des C-Terminus kann NEDD8 durch das Heterodimer bestehend aus AXR1 und ECR1 in einem ATP-abhängigen Schritt aktiviert werden. NEDD8 ist nach der Aktivierung über eine energiereiche Thioesterverbindung an ECR1 gebunden und wird im nächsten Schritt an RCE1 weiter gegeben. Mit Hilfe einer E3-Ligase wird NEDD8 dann an sein Substrat konjugiert, in diesem Fall CUL1. NEDD8 kann von seinem Substrat aber auch wieder abgespalten werden, zum Beispiel durch das COP9-Signalosom. Nach (Rabut and Peter, 2008).

besitzen (Leyser et al., 1993; Liakopoulos et al., 1998; Osaka et al., 1998; Walden et al., 2003; Woodward et al., 2007). Nach der Reaktion ist NEDD8 über eine Thioesterbindung an ECR1 gebunden. Im folgenden Schritt wird NEDD8 an das NEDD8-konjugierende Enzym RUB1 CONJUGATING ENZYME (RCE1) übergeben, das wiederum eine Thioesterbindung mit dem Ubiquitin-ähnlichen Protein eingeht (Liakopoulos et al., 1998; del Pozo and Estelle, 1999). Schlussendlich wird es mit Hilfe einer E3-Ligase an sein Substrat ligiert.

Die Neddylierung ist ein reversibler Prozess, da NEDD8 von seinem Substrat wieder abgespalten werden kann. Das aus acht Untereinheiten bestehende COP9-Signalosom ist eine solche Deneddylase und kann NEDD8 von seinem bekanntesten Substrat, den Cullinen, entfernen (Abbildung 2)(Lyapina et al., 2001; Schwechheimer et al., 2001). In Menschen wurde außerdem gezeigt, dass die NEDD8-prozessierende Protease NEDP1 auch Deneddylaseaktivität besitzt (Gan-Erdene et al., 2003; Mendoza et al., 2003; Wu et al., 2003). Durch die Entfernung des NEDD8s wird einerseits das NEDD8 recycelt, andererseits der Effekt der Neddylierung wieder aufgehoben.

Die am besten studierten NEDD8-Substrate sind die Culline, Untereinheiten einer E3-Ubiquitinligasefamilie, den Cullin-RING-Ligasen (CRLs) (Hua and Vierstra, 2011). Neben dem Cullin bestehen CRL aus einem RING-BOX 1 (RBX1) Protein, das Ubiquitin-beladene E2s rekrutiert und einer Substrat-erkennenden Untereinheit, die entweder direkt oder durch einen Adaptor an Cullin bindet. Je nachdem welches Cullin das Kernstück der Ubiquitinligase bildet, werden verschiedene CLR unterschieden (Abbildung 3)(Hua and Vierstra, 2011). CUL1 ist Teil von SCF-Komplexen, bei denen das Substrat erkennende F-BOX-Protein, über das Adaptorprotein ARABIDOPSIS SKP1 (ASK1), an Cullin bindet. Im *Arabidopsis* Genom sind etwa 700 F-BOX-Proteine codiert, was vermuten lässt, dass es ähnlich viele Substrate für SCF-Komplexe gibt (Gagne et al., 2002). Es ist daher wahrscheinlich, dass diese Komplexe in einer Vielzahl von Prozessen eine Rolle spielen. An CUL3 direkt binden die Substrat-erkennenden Proteine BTB (BRIC-A-BRAC/TRAMTRACK / BROAD COMPLEX). Neben



**Abbildung 3: Cullin-RING-Ligasen in *Arabidopsis thaliana*.**

CRL bestehen aus einem Cullin (CUL1, CUL3A/B oder CUL4), einem RBX1-Protein, einem Adapterprotein (ASK1 für CUL1, DDB1 für CUL4) und einem Substrat-erkennenden Protein (F-BOX, BTB oder DWD).

Nach (Hua and Vierstra, 2011).

SCF- und BTB-Komplexen sind in *Arabidopsis* noch die CUL4-enthaltenden CRL beschrieben. Diese bestehen aus CUL4, dem Adaptorprotein DAMAGED DNA-BINDING 1 (DDB1) und der Substrat-erkennenden Untereinheit DDB1-BINDING WD40 (DWD). CUL2- und CUL5-enthaltende CRL sind für *Arabidopsis* nicht beschrieben und auch die Cullin-ähnlichen Proteine CUL7 und PARC kommen in *Arabidopsis* nicht vor. CRL werden durch die Neddylierung der Cullin-Untereinheit aktiviert. Strukturanalysen der C-Termini von CUL1 und CUL5 aus Mensch mit RBX1 und NEDD8 haben gezeigt, dass durch die Neddylierung eine starke Konformationsänderung ausgelöst wird, die dazu führt, dass die RING-Domäne RBX1s beweglicher wird und damit der große Abstand zwischen dem gebundenen Substrat und dem Ubiquitin-beladenen E2 überbrückt werden kann (Duda et al., 2008). Die Deneddylierung durch das COP9-Signalsom deaktiviert die CRLs wieder. Im Falle der SCF-Komplexe bedeutet das zum Beispiel, neben der Hemmung der Aktivität, dass das Substrat-erkennende F-BOX-Protein zusammen mit dem Adaptorprotein durch CAND1 (CULLIN-ASSOCIATED AND NEDDYLYATION-DISSOCIATED PROTEIN1) ausgetauscht werden kann, wodurch die CRL ein neues Substrat erkennen und ubiquitinieren kann (Pierce et al., 2013; Wu et al., 2013; Zemla et al., 2013).

Neben den Cullinen ist eine zwar stetig steigende, aber immer noch relativ kleine Zahl an weiteren NEDD8-Substraten beschrieben (Tabelle 1). Alle diese Substrate stammen aus Säugetieren, hauptsächlich aus dem Menschen, und so stellen die Culline die einzigen bekannten neddylierten Proteine in Pflanzen dar. Zu den menschlichen NEDD8-Substraten zählen weitere E3-Ubiquitinligasen, Transkriptionsfaktoren, Transmembranrezeptoren, zwei Kinasen, ein Histon und ribosomale Proteine (Tabelle 1). Proteine können durch NEDD8 aktiviert oder gehemmt, stabilisiert oder destabilisiert werden, es kann die Interaktion mit anderen Proteinen ermöglichen und auch die Änderung der Lokalisierung wurde für ribosomale Proteine gezeigt (Sundqvist et al., 2009). Dies verdeutlicht, dass der Effekt einer Modifikation mit NEDD8 sehr unterschiedlich ausfallen kann und in jedem Fall einzeln untersucht werden muss.

Da in Menschen, neben den Cullinen, weitere NEDD8-Substrate bekannt sind, liegt die Vermutung nahe, dass es auch in *Arabidopsis* mehr Substrate des Ubiquitin-ähnlichen Proteins gibt. In Pflanzen wird sowohl das Ubiquitin-Proteasom-System, sowie die posttranslationale Modifikation mit SUMO zur Regulation unterschiedlicher Prozesse extensiv genutzt und so ist die Erforschung der NEDD8-Modifikation im Pflanzenmodellorganismus *Arabidopsis thaliana* besonders spannend und lohnenswert (Vierstra, 2009; Miller et al., 2010; Sadanandom et al., 2012; Miller et al., 2013). Neben der

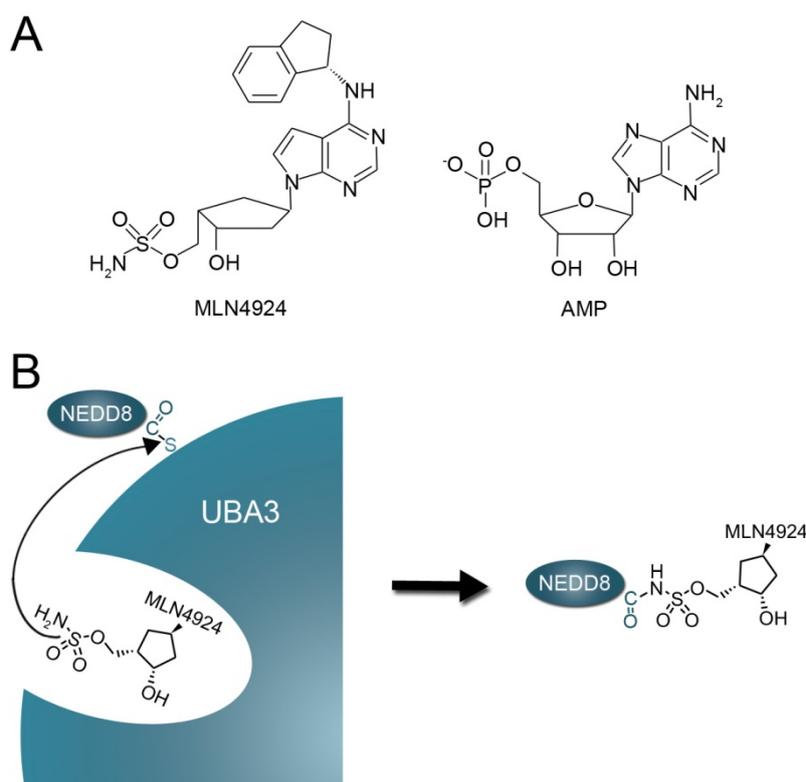
**Tabelle 1: NEDD8-Substrate.**

Protein	Funktion	Multiple Neddylisierung	Effekt der Neddylisierung	Spezies	Referenz
Culline, CUL7 und PARC	E3-Ubiquitinligase (Untereinheit)	Nein	Aktivierung	Eukaryoten	(Hori et al., 1999) (Parry and Estelle, 2004) (Sarikas et al., 2011) (Duda et al., 2011)
MURINE DOUBLE MINUTE 2 (MDM2)	E3-Ubiquitinligase	-	Inhibierung	Mensch	(Xirodimas et al., 2004)
p53	Transkriptionsfaktor	Ja	Inhibierung	Mensch	(Xirodimas et al., 2004) (Abida et al., 2007)
p73	Transkriptionsfaktor	-	Inhibierung	Mensch	(Watson et al., 2006)
VON HIPPEL-LINDAU PROTEIN (pVHL)	Substrat-erkennende Untereinheit von CUL2 enthaltenden CRL	Nein	Regulation der Aktivität	Mensch	(Stickle et al., 2004) (Russell and Ohh, 2008)
EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (EGFR)	Rezeptor	Ja	Verbesserung der Ubiquitinierung	Säugetiere	(Oved et al., 2006)
Amyloid precursor protein intracellular domain (AICD)	Transkriptionsfaktor	Ja	Inhibierung	Mensch	(Lee et al., 2008)
BREAST-CANCER ASSOCIATED-PROTEIN 3 (BCA3)	Transkriptionaler Inhibitor	Ja	Aktivierung	Mensch	(Gao et al., 2006)
L11, S14 und andere ribosomale Proteine	Translation	-	Stabilisierung/ Lokalisierung	Mensch	(Xirodimas et al., 2008) (Zhang et al., 2012)
PARKIN	E3-Ubiquitinligase	Ja	Stimulation der Aktivität	Mensch	(Um et al., 2012) (Choo et al., 2012)
PINK1	Kinase	Ja	Stabilisierung einer PINK1-Form	Mensch	(Choo et al., 2012)
E2F1	Transkriptionsfaktor	Ja	Inaktivierung / Destabilisierung	Mensch	(Aoki et al., 2012) (Loftus et al., 2012)
CASEIN KINASE 1 $\alpha$ (CK1 $\alpha$ )	Kinase	-	?	Mensch	(Huart et al., 2012)
HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR 1 $\alpha$ und 2 $\alpha$ (HIF1 $\alpha$ )	Transkriptionsfaktor	-	Stabilisierung	Mensch	(Ryu et al., 2011)
SHC	Signaltransduktion-Adaptorprotein	Nein	?	Mensch	(Jin et al., 2013)
REGULATOR OF CALCINEURIN 1 (RCAN1)	Transkriptionaler Inhibitor	Nein	Stabilisierung/ Protein-Protein-Interaktion	Mensch	(Noh et al., 2012)
T $\beta$ RII	Rezeptor	Ja	Stabilisierung	Mensch	(Zuo et al., 2013)
Histon H4	Histon	Ja und Ketten	Interaktion mit Downstream-Komponenten	Mensch	(Ma et al., 2013)
BRCA1-ASSOCIATED PROTEIN 2 (BRAP2)	E3-Ubiquitinligase	Nein	?	Mensch	(Takashima et al., 2013)

Aufdeckung evolutionär konservierter NEDD8-regulierter Vorgänge, wäre auch die Entdeckung Pflanzen-spezifischer NEDD8-Substrate von besonderem Interesse, da dies einen Beitrag leisten würde, die Rolle Ubiquitin-ähnlicher Proteine in der Pflanzenbiologie besser zu verstehen.

### 1.3 MLN4924- eine neues Medikament gegen Krebs

Die durch Neddylisierung aktivierten CRLs spielen im Menschen eine wichtige Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus, im NF- $\kappa$ B-Signalweg, in der DNA-Replikation und der Reparatur von DNA, in der Antwort auf oxidativen Stress und im Hypoxiesignalweg (Soucy et al., 2009). Da diese Prozesse mit der Entstehung, dem Wachstum und dem Überleben von Tumoren assoziiert sind, wurde in der Firma Millenium Pharmaceuticals nach einem Inhibitor der Neddylisierung gesucht. CRLs versprachen ein guter Angriffspunkt zur Behandlung von Krebs zu sein, ohne dabei den generellen Proteinabbau über das Proteasom zu hemmen. Die allgemeine Inhibition des proteasomalen Proteinabbaus zu vermeiden, erscheint dabei besonders wichtig, da toxische Nebenwirkungen des als Krebsmedikament verwendeten Proteasominhibitors Bortezomib damit erklärt werden, dass auch sehr viele wichtige Prozesse beeinträchtigt sind, die keine Rolle in der Entstehung von Krebs haben (Richardson et al., 2003; Kane et al., 2007; Soucy et al., 2009). Mit dem AMP-Analog MLN4924 ist Millenium Pharmaceuticals auf der Suche nach einem Inhibitor der Neddylisierung fündig geworden (Abbildung 4A)(Soucy et al., 2009). Es ist ein kleines, zellpermeables Molekül, das sich den Mechanismus der NEDD8-Aktivierung zunutze macht, um diesen zu hemmen. MLN4924 bindet an die ATP-Bindestelle des aktiven Zentrums des menschlichen NEDD8-aktivierenden Enzyms (NAE) und greift von dort das über eine Thioesterverbindung gebundene NEDD8 an, wodurch das eigentliche inhibitorische Molekül entsteht: NEDD8-MLN4924 (Abbildung 4B)(Brownell et al., 2010). NEDD8-MLN4924 ist ein ATP-kompetitiver Inhibitor, der sehr



**Abbildung 4: MLN4924 und sein Wirkmechanismus**

(A) MLN4924 ist ein AMP-Analog.

(B) MLN4924 bindet an das aktive Zentrum von UBA3 und greift von dort das über eine Thioesterbindung mit UBA3 verknüpfte NEDD8 an, wodurch das Addukt NEDD8-MLN4924 entsteht.

Nach (Brownell et al., 2010).

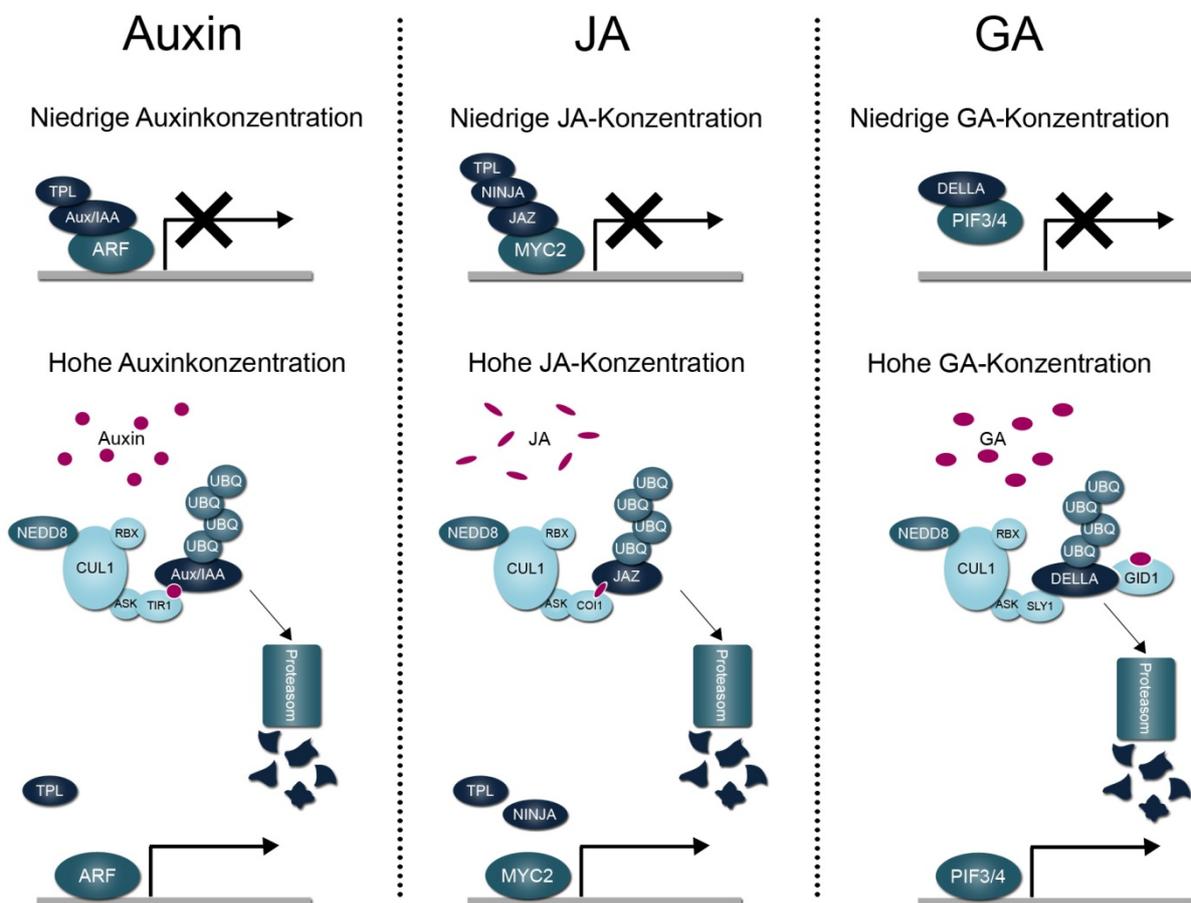
stark an NAE bindet und damit seine Aktivität hemmt (Brownell et al., 2010). Dabei inhibiert es spezifisch nur das NEDD8-aktivierende Enzym, nicht aber die Ubiquitin-aktivierenden Enzyme oder das aktivierende Enzym des Ubiquitin-ähnlichen Proteins SUMO (Soucy et al., 2009). Im Vergleich zu Bortezomib hemmt MLN4924 den allgemeinen Proteinabbau kaum und im Einklang damit wurde beobachtet, dass Mäuse eine Behandlung mit MLN4924 gut vertragen. Außerdem zeigte sich im Experiment mit Mäusen, dass das Wachstum verschiedener menschlicher Tumor-Xenotransplantate durch MLN4924 stark gehemmt wird. Dies konnte durch den Tod der Krebszellen durch Apoptose erklärt werden, der durch die Deregulation der DNA-Synthese in der S-Phase ausgelöst wurde (Soucy et al., 2009). Es zeichnet sich ab, dass die Inhibition des NAE und der CRLs ein guter Ansatz zur Behandlung von Krebserkrankungen in Menschen ist.

## 1.4 Signalwege von Phytohormonen und des Lichts

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) wird von Pflanzen extensiv zur Regulation von Wachstums- und Entwicklungsprozessen genutzt. Zu den UPS-regulierten Prozessen gehören auch viele wichtige Hormonsignalwege und die Lichtsignaltransduktion. Da CRLs einen zentralen Punkt in diesen Signalwegen einnehmen und CRLs durch NEDD8 in ihrer Aktivität modifiziert werden, ist es von besonderer Bedeutung, diese Signalwege zu verstehen, wenn man die Neddylierung in Pflanzen untersuchen möchte.

Heute bekannte Phytohormone sind Auxin, Abscisinsäure, Cytokinin, Gibberellin, Ethylen, Brassinosteroid, Jasmonsäure, Salicylsäure, Stickstoffmonoxid (NO) und Strigolacton (Browse, 2005; Vert et al., 2005; Grun et al., 2006; Loake and Grant, 2007; Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008; Santner and Estelle, 2009). Für acht dieser zehn Hormone wurde eine Beteiligung des UPS an den Signalwegen gezeigt oder angenommen (Peng et al.,

2008; Santner and Estelle, 2010; Fu et al., 2012). Besonders gut verstanden ist der Auxinsignalweg in dessen Zentrum eine CRL namens SCF<sup>TIR1/AFB1-5</sup> steht (Abbildung 5). Das F-BOX-Protein TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1) und seine Homologe AFB1 bis AFB5 (AUXIN SIGNALING F-BOX 1-5) sind die Auxinrezeptoren und sie können in Anwesenheit des Hormons die Repressoren des Auxinsignalwegs Aux/IAA binden und ubiquitinieren, wodurch diese dann im Proteasom abgebaut werden (Dharmasiri et al., 2005; Kepinski and Leyser, 2005). In Abwesenheit Auxins binden und inhibieren die Aux/IAAs mit Hilfe des Korepressors TOPLESS (TPL) die Transkriptionsfaktoren AUXIN RESPONSE FACTORS (ARFs) (Tiwari et al., 2004; Szemenyei et al., 2008). Durch den protasomalen Abbau der Aux/IAAs werden die ARFs aus der Inhibition entlassen und können ihre Aufgabe als transkriptionelle Aktivatoren oder Repressoren nachgehen, wodurch die Auxinantwort ausgelöst wird.



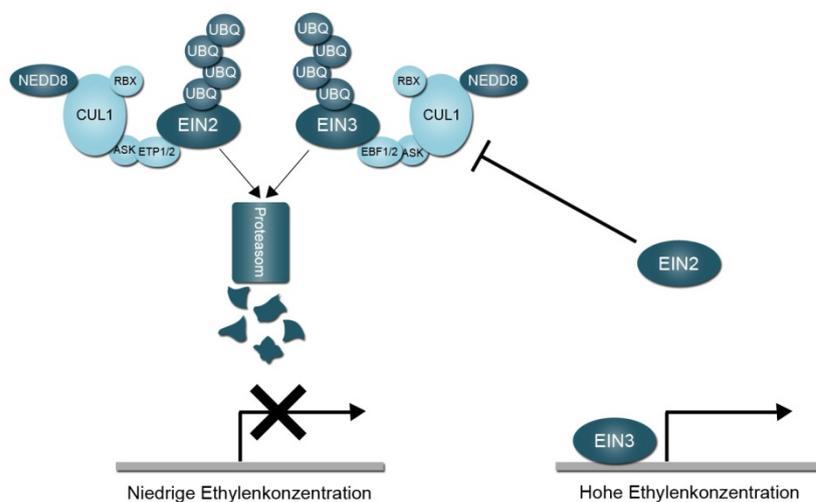
**Abbildung 5: Die Signalwege von Auxin, Jasmonsäure und Gibberellin.**

Die Repressoren Aux/IAA, JAZ und DELLA unterdrücken die Aktivität der Transkriptionsfaktoren ARF, MYC2 und PIF3/4, wenn die Hormonkonzentration niedrig ist. Die Aux/IAAs und JAZ benötigen dafür den Korepressor TPL, der an JAZ über NINJA gebunden wird. Steigt die Hormonkonzentration, werden die Repressoren von einem SCF-Komplex ubiquitiniert und über das Proteasom abgebaut. Im Falle von Auxin ist diese CRL SCF<sup>TIR1/AFB1-5</sup>, wobei TIR1 und seine Homologe AFB1-5 die Rezeptoren für Auxin darstellen. Bei JA übernimmt diese Aufgabe die SCF<sup>COI1</sup>, wobei auch COI1 als Rezeptor für JA dient. GA wird von dem Rezeptor SLY1 gebunden, das daraufhin die DELLAs bindet und somit die Interaktion mit der CRL SCF<sup>SLY1</sup> ermöglicht. Nach (Santner and Estelle, 2009).

Dem Auxinsignalweg sehr ähnlich ist der Signalweg des Phytohormons Jasmonsäure (JA, Abbildung 5). Die Repressoren JAZ (JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN) inhibieren mit Hilfe des Korepressors TPL die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wie MYC2 mit dem Unterschied, dass TPL nicht direkt an JAZs binden kann, sondern dafür das Adaptorprotein NINJA (NOVEL INTERACTOR OF JAZ) benötigt (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007; Pauwels et al., 2010). Wird JA durch den Rezeptor COI1 (CORONATINE INSENSITIVE 1) gebunden, der ebenfalls ein F-BOX-Protein ist, kann SCF<sup>COI1</sup> die JAZ-Repressoren binden, ubiquitinieren und damit für den Abbau über das Proteasom markieren (Melotto et al., 2008). MYC2 kann daraufhin die JA-abhängige Antwort auslösen.

Im Signalweg des Phytohormons Gibberellin (GA), anders als in den Signalwegen Auxins und der Jasmonsäure, ist der GA-Rezeptor *GID1* (GA INSENSITIVE DWARF1) kein F-BOX-Protein, sondern zeigt Homologie zu hormonsensitiven Lipasen (Schwechheimer, 2008). Die Aufgabe des Repressor-erkennenden F-BOX-Proteins übernimmt im GA-Signalweg *SLEEPY1* (SLY1), das auch Teil einer SCF-Ubiquitinligase ist (Abbildung 5). Die DELLA-Repressoren werden aber nur effizient von SLY1 erkannt und ubiquitiniert, wenn *GID1* GA gebunden hat und mit den DELLAs interagiert (Griffiths et al., 2006). Durch den proteasomalen Abbau der DELLAs können die Transkriptionsfaktoren PIF3 und PIF4 die GA-Antwort auslösen (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008).

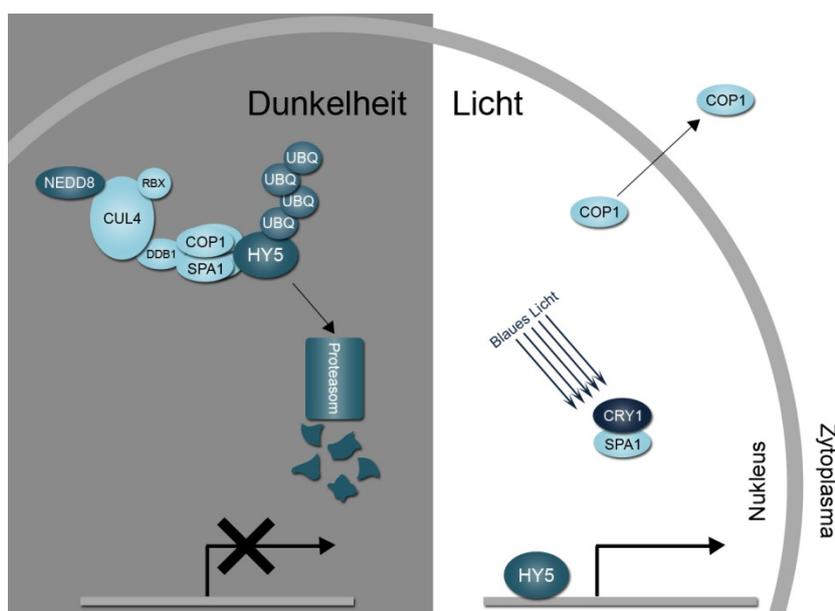
Diese drei Hormonsignalwege verdeutlichen sehr anschaulich, wie sich Pflanzen wiederholt das UPS zu Nutze machen, um biologische Prozesse zu regulieren. Ganz anders wird das UPS im Etyhlensignalweg eingesetzt (Abbildung 6). Dort werden die positiven Regulatoren EIN2 und EIN3 (ETHYLENE INSENSITIVE 2 und 3) in Abwesenheit des Ethylens ständig ubiquitiniert und abgebaut (Binder et al., 2007). Dies geschieht über SCF-Komplexe, die ETP1/2 (EIN2 TARGETING PROTEIN 1 und 2) bzw. EBF1/2 (EIN3-BINDING-F-BOX PROTEIN) als Substrat-erkennende Untereinheiten enthalten (Guo and Ecker, 2003; Potuschak et al., 2003; Binder et al., 2007). Wird EIN2 in Anwesenheit des Ethylens stabilisiert, inhibiert es die Ubiquitinierung des Transkriptionsfaktors EIN3, der dann die Etyhlenantwort auslöst.



**Abbildung 6: Der Etyhlensignalweg.**

Die positiven Regulatoren EIN2 und EIN3 werden in der Abwesenheit Ethylens mit Hilfe von SCF<sup>ETP1/2</sup> und SCF<sup>EBF1/2</sup> ubiquitiniert und dann über das Proteasom abgebaut. Durch Ethylen wird EIN2 stabilisiert, das wiederum den Abbau des Transkriptionsfaktors EIN3 inhibiert. EIN3 kann dann die Etyhlenantwort auslösen. Nach (Santner and Estelle, 2009).

Das Prinzip, einen positiven Regulator beständig zu exprimieren, aber dann über das UPS abzubauen, wenn der richtige Stimulus fehlt, findet man auch im Lichtsignalweg wieder. So wird im Dunkeln der positive Regulator der Photomorphogenese HY5 (ELONGATED HYPOCOTYL 5) durch eine CRL, bestehend aus CUL4, RBX1, DDB1 und einem Tetramer aus zwei Molekülen COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1) und zwei Molekülen SPA1 (SUPPRESSOR OF PHYA-105 1), ubiquitiniert, was HY5 zum Ziel des Proteasoms macht (Abbildung 7) (Osterlund et al., 2000; Chen et al., 2010). Im Licht wird HY5 über einen Mechanismus stabilisiert, der noch nicht vollständig aufgeklärt ist (Lau and Deng, 2012). Bekannt ist, dass COP1 im Licht aus dem Zellkern exportiert wird und damit den Abbau HY5s nicht mehr stimulieren kann (von Arnim et al., 1997). Da dieser Prozess sehr langsam vonstatten geht und die Reaktion der Pflanze auf Licht sehr schnell messbar ist, muss es andere Regulationsmechanismen geben. Es wurde gezeigt, dass der Photorezeptor CRY1 (CRYPTOCHROME 1) mit SPA1 in Antwort auf blaues Licht interagiert (Lian et al., 2011; Liu et al., 2011; Zuo et al., 2011). Dadurch könnte SPA1 aus dem CRL-Komplex abgezogen werden, wodurch dieser nicht mehr funktional wäre. Dies könnte ein Mechanismus für eine schnelle Lichtantwort darstellen.



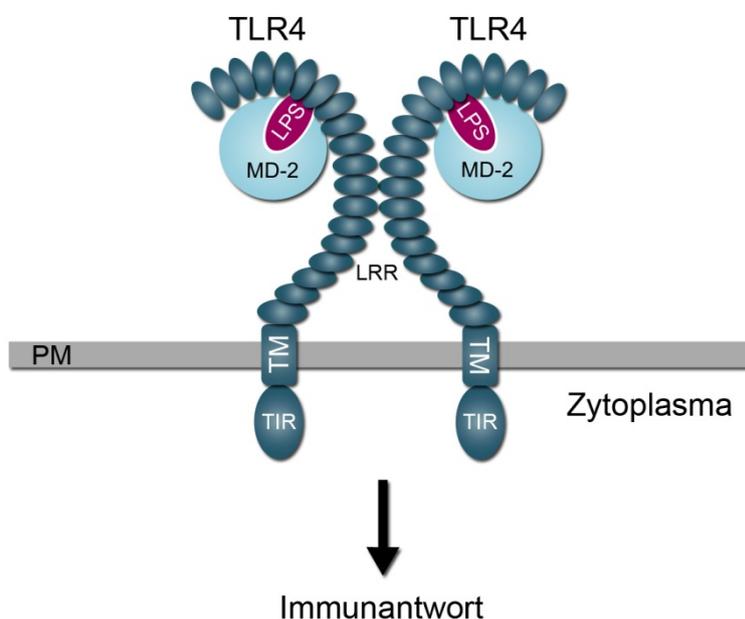
**Abbildung 7: Der Lichtsignalweg.**

Die CRL CUL4-DDB1<sup>COP1-SPA1</sup> ubiquitiniert im Dunkeln den positiven Regulator der Photomorphogenese HY5, der dann über das Proteasom abgebaut wird. Im Licht wird HY5 stabilisiert und kann die Lichtantwort auslösen. Der Mechanismus, der zur Stabilisierung HY5s führt, ist noch nicht ganz aufgeklärt, aber ein Teil davon dürfte der Export von COP1 aus dem Nukleus darstellen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass abhängig von blauem Licht der Photorezeptor CRY1 mit SPA1 interagieren kann und damit die CRL CUL4-DDB1<sup>COP1-SPA1</sup> wahrscheinlich inhibiert. Nach (Lau and Deng, 2012).

Die beschriebenen fünf Signalwege sind essenziell für das Leben der Pflanze. Interessanterweise sind alle diese Wege abhängig von einer CRL, deren Aktivität wiederum abhängig von NEDD8 ist. Dies unterstreicht die enorme Bedeutung, die diese posttranslationale Modifikation für die Pflanze hat.

## 1.5 MD-2-related lipid-recognition domain containing proteins

In dieser Arbeit wurde ML3 (MD-2-related lipid-recognition domain containing protein 3) als ein NEDD8-Substrat in *Arabidopsis thaliana* identifiziert. ML-Proteine sind eine Familie kleiner Proteine (meist unter 20 kD) mit Vertretern im Tier-, Pilz- und Pflanzenreich (Inohara and Nunez, 2002). Sie bestehen aus einem N-terminalen Signalpeptid für den Import in das ER und einer ML-Domäne. Da ML-Proteine keine Homologie zu unspezifischen Lipidtransferproteinen aufweisen, geht man davon aus, dass sie spezifische Lipide binden (Inohara and Nunez, 2002). Diese Ansicht wird dadurch unterstützt, dass alle gut charakterisierten ML-Proteine aus Menschen einen bestimmten, lipophilen Liganden haben. So bindet MD-2 (MYELOID DIFFERENTIATION FACTOR), der Namensgeber der Domäne vom Menschen, zusammen mit dem TOLL-LIKE RECEPTOR 4 (TLR4) den Lipid A-Teil von Lipopolysacchariden (LPS) aus der äußeren Membran gramnegativer Bakterien (Viriyakosol et al., 2001; Miyake, 2004). Die Kristallisation des TLR4-MD-2-Komplexes mit gebundenem LPS hat gezeigt, dass durch die Bindung der LPS ein Multimer aus zwei Molekülen TLR4, zwei MD-2-Proteinen und zwei LPS entsteht (Abbildung 8), (Park et al., 2009). Das Zusammenkommen der zwei zyttoplasmatischen TOLL-INTERLEUKIN-1 RECEPTOR (TIR)-Domänen des TLR4 löst eine intrazelluläre Signalkaskade aus, die schlussendlich zu einer Immunantwort führt (Miyake, 2004; Park et al., 2009). Das mit MD-2 am nächsten verwandte Protein beim Menschen ist MD-1, das auch LPS bindet und zusammen mit dem Rezeptor RP105 eine Reaktion in B-Lymphozyten auf die Infektion mit gramnegativen Bakterien auslöst (Miura et al., 1998). Neben MD-1 und MD-2 gibt es in Menschen zwei weitere ML-Proteine: NIEMANN-PICK DISEASE, TYPE C2 (NPC2) und GM2-ACTIVATOR (GM2A) (Inohara and Nunez, 2002). NPC2 lokalisiert in Endosomen bzw. Lysosomen und hilft bei der Extraktion Cholesterins aus der Membran intraendosomaler Vesikel und damit bei dessen Recycling (Abbildung 9), (Friedland et al., 2003; Storch and Xu, 2009; Kolter and Sandhoff, 2010). Das ebenfalls lysosomale GM2A extrahiert



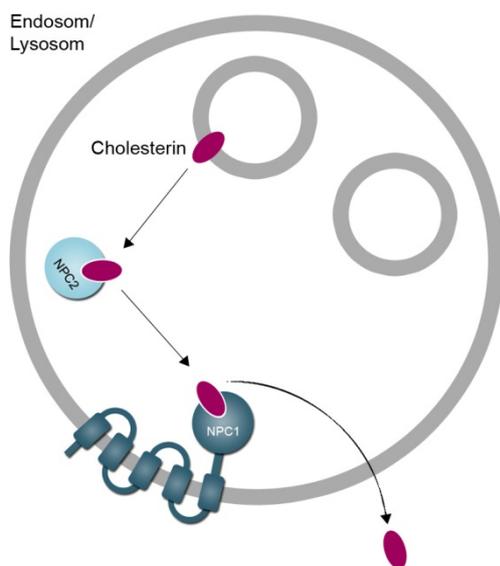
**Abbildung 8: MD-2 und TLR4 binden LPS und lösen eine Immunantwort aus.**

Der Komplex aus MD-2 und TLR4 bindet LPS, was zu der Bildung eines Multimers führt, bestehend aus zwei TLR4-, zwei MD-2- und zwei LPS-Molekülen, das Zusammenkommen der zyttoplasmatischen TIR-Domänen der zwei TLR4 löst eine Signalkaskade aus, die zu einer Immunantwort führt.

LPS- Lipopolysaccharide, LRR- leucine rich repeats, TM- Transmembrandomäne, PM- Plasmamembran.

Nach (Miyake, 2004; Park et al., 2009).

anschließend das Gangliosid GM2 aus den Cholesterin-armen Membranen dieser Vesikel und präsentiert es der  $\beta$ -Hexosaminidase A, die es zu GM3 abbaut (Werth et al., 2001; Kolter and Sandhoff, 2010). Zur Familie der ML-Proteine gehört auch das Allergen Der f 2, ein Protein aus *Dermatophagoides farinae* (Hausstaubmilbe), das Allergien gegen Hausstaubmilben verursacht und das ebenfalls LPS bindet (Inohara and Nunez, 2002; Ichikawa et al., 2009). Im Gegensatz zu der sehr guten Charakterisierung menschlicher ML-Proteine wurde bisher keines der pflanzlichen Homologe auf biochemischer, zellbiologischer oder funktioneller Ebene untersucht (Inohara and Nunez, 2002).

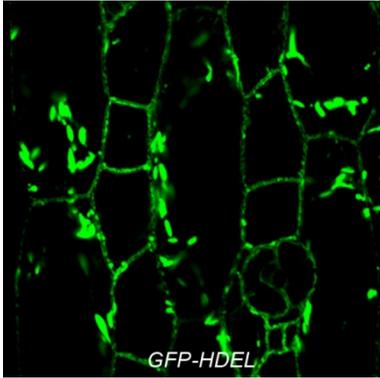


**Abbildung 9: NPC2s Rolle im Cholesterin-Recycling.**

NPC2 bindet in Endosomen/Lysosomen Cholesterin und übergibt es an NPC1, das es über die Membran transportiert. Auf diese Weise wird Cholesterin recycelt. Vereinfachte Darstellung von NPC1, welches insgesamt 13 Transmembrandomänen besitzt. Nach (Kolter and Sandhoff, 2010).

## 1.6 ER *bodies* und ihre Biologie

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das neue NEDD8-Substrat ML3 mit ER *bodies* und deren Biologie assoziiert ist. ER *bodies* sind kleine Organellen, die vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) gebildet werden. Klassisch werden drei Typen des ER unterschieden: das raue ER, das unter anderem für die Synthese und Prozessierung sekretorischer Proteine zuständig ist, das glatte ER, das eine wichtige Rolle in der Lipidsynthese hat und die Kernhülle. Darüber hinaus sind aber auch weitere vom ER gebildete Strukturen bekannt. Dazu zählen zum Beispiel die im Endosperm von *Zea mays* (Mais) und *Oryza sativa* (Reis) vorkommenden, Protein-speichernde Vesikel, die *protein bodies* genannt werden oder Ricinosomen, die eine Papain-ähnliche Protease mit einem ER-Rückhaltesignal akkumulieren und eine Rolle beim programmierten Zelltod in *Ricinus communis* (Wunderbaum) spielen (Schmid et al., 1998). ER *bodies* sind eine weitere Struktur, die vom ER gebildet werden. Diese etwa 10  $\mu\text{m}$  langen und 1  $\mu\text{m}$  breiten, stäbchenförmigen Organellen sind von einer mit Ribosomen besetzten Membran umgeben und akkumulieren die  $\beta$ -Glukosidase PYK10, die ebenfalls ein ER-Rückhaltesignal trägt (Hayashi et al., 2001; Matsushima et al., 2003). Diese Organellen sind besonders abundant in der Epidermis von Keimlingen und in der Wurzel, wohingegen Rosettenblätter nur wenige ER *bodies* aufweisen (Abbildung 10), (Hayashi et al., 2001; Matsushima et al., 2002). In Rosettenblättern kann ihre Bildung allerdings durch Verwundung und das Phytohormon Methyljasmonat induziert werden (Matsushima et al., 2002).



**Abbildung 10: ER *bodies* in der Epidermis des Hypokotyls.**

In 5 d alten Keimlingen sind ER *bodies* besonders in der Epidermis des Hypokotyls abundant. Sie wurden mit dem ER-Marker GFP-HDEL sichtbar gemacht.

ER *bodies* fördert, ist nicht bekannt. Interessant ist allerdings, dass NAI2 nur Homologe in der Ordnung *Brassicales* zu haben scheint, was in Einklang damit steht, dass auch ER *bodies* bislang nur in *Brassicales* beschrieben wurden (Yamada et al., 2011). Auch wenn andere Pflanzenordnungen ähnliche Strukturen des ERs bilden können, geht man davon aus, dass ER *bodies* von diesen Strukturen verschieden sind, zum einem wegen der erwähnten Notwendigkeit des *Brassicales*-spezifischen Proteins NAI2 für deren Bildung per se und zum anderen aufgrund der Tatsache, dass diese, im Gegensatz zu den ähnlichen Strukturen des ERs, nicht durch die Überexpression der Hauptkomponente PYK10 ausgelöst werden kann (Yamada et al., 2008).

Auf der Suche nach ER *body*-losen Mutanten wurden NAI1 und NAI2 als essenzielle Faktoren für die Bildung dieser Organellen identifiziert (Matsushima et al., 2003; Yamada et al., 2008). NAI1 ist ein Helix-loop-helix-Transkriptionsfaktor, der die Transkription wichtiger Komponenten der ER *bodies* und deren Bildung, wie z. B. die Transkription des Hauptbestandteils der ER *bodies* PYK10 und die Transkription NAI2s reguliert (Matsushima et al., 2004; Yamada et al., 2008). NAI2 besitzt ein N-terminales Signalpeptid für den Import in das ER und 10 EFE-Motive. C-terminal enthält es die neuartige NAI2-Domäne (Yamada et al., 2008). Trotz der Abwesenheit eines C-terminalen ER-Rückhaltesignals wie HDEL oder KDEL lokalisiert NAI2 spezifisch in das Lumen der ER *bodies*. Auf welche Art und Weise NAI2 die Bildung der

Die Spezifität der ER *bodies* für *Brassicales* ist besonders interessant in Hinblick darauf, dass ER *bodies* die Myrosinase-ähnliche  $\beta$ -Glukosidase PYK10 akkumulieren (Matsushima et al., 2003). Myrosinasen katalysieren die Spaltung von Glukosinolaten in Antwort auf Pathogenbefall, wodurch giftige Substanzen wie Isothiocyanate, Thiocyanate, Nitrile oder Epithionitrile entstehen, die eine Rolle in der Pathogenabwehr spielen (Wittstock and Burow, 2010; Mithofer and Boland, 2012). Glukosinolate kommen ebenfalls fast ausschließlich in *Brassicales* vor und sind Grundlage für die sogenannte *mustard oil bomb* (Senfölbombe), bei der Abwehr von Herbivoren und anderen Pflanzenpathogenen. PYK10 hat  $\beta$ -Glukosidase- und  $\beta$ -Fukosidaseaktivität (Matsushima et al., 2004). Nach Zerstörung der Zelle durch Insektenfraß bildet PYK10 große, unlösliche, aktive Komplexe mit JACALIN-RELATED LECTINS (JALs) und GDSL LIPASE-LIKE PROTEINS (GLLs) (Nagano et al., 2005; Nagano et al., 2008). Es wird angenommen, dass die Bildung solcher Komplexe PYK10 am Ort des Geschehens hält, es vom Abbau durch Proteasen oder vor Inhibition schützt und damit die Produktion der Glukosinolat-Katabolite fördert (Nagano et al., 2008). Es wurde gezeigt, dass PYK10 das häufigste Wurzelglukosid Scopolin spalten kann (Ahn et al., 2010). Das Spaltprodukt Scopoletin hat eine toxische Wirkung auf Pilze und ist in deren Abwehr beteiligt (Carpinella et al., 2005; Ahn et al., 2010). In Einklang damit können *pyk10*-Mutanten bei einem Befall mit dem mutualistischen Pilz *Piriformospora indica* dessen Wachstum nicht ausreichend einschränken, was zu einer Hyperkolonisierung der Wurzeln führt (Sherameti et

al., 2008). Ob PYK10 neben dem Glukosid Scopolin auch Glukosinolate spalten kann, ist nicht bekannt.

Es wird davon ausgegangen, dass ER *bodies* eine Rolle in der Pathogenabwehr in *Brassicales* spielen. Zum einen weil sie die Myrosinase-ähnliche  $\beta$ -Glukosidase PYK10 akkumulieren, zum anderen aufgrund der Induzierbarkeit der Bildung der ER *bodies* durch Verwundung und Methyljasmonat, ein Pflanzenhormon, das eine wichtige Rolle bei der Antwort auf Pathogene spielt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bakterienstämme

Für Klonierungen und die Vermehrung von Plasmiden wurde der *Escherichia coli* Stamm XL1-Blue (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac*, [F', *proAB*, *lacIqZΔM15*, Tn10 Tet<sup>r</sup>]; Agilent Technologies/Stratagene, Santa Clara, USA) verwendet. Gateway-Vektoren wurden in dem *Escherichia coli* Stamm ccdB Survival 2 T1<sup>R</sup> (*mcrA*, Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*), Φ80*lacZΔM15*, Δ*lacX74*, *recA1*, *araΔ139*, Δ(*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL* (Str<sup>R</sup>), *endA1*, *nupG*, *fhuA::IS2*, F; Life technologies/Invitrogen, Carlsbad, USA) vermehrt. Die *Agrobacterium tumefaciens* Stämme GV3101 pMP90 (Koncz and Schell, 1986), GV3101 pMP90RK (Koncz and Schell, 1986) und GV3101 pSOUP (Hellens et al., 2000) wurden für die Transformation von *Arabidopsis* verwendet.

#### 2.1.2 Pflanzenlinien und Mutanten

Der Großteil der Experimente wurde in *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia-0 durchgeführt. Außerdem wurden die Dikotylen *Cardamine hirsuta* (Behaartes Schaumkraut), *Solanum lycopersicum* (Tomate), Sorte Moneymaker, sowie der Monokotyle *Brachypodium distachyon* verwendet.

**Tabelle 2: Transgene Linien**

Linie	Referenz
<i>HA-STREPII-NEDD8</i>	Diese Arbeit. Generiert und bereitgestellt von Esther M. N. Dohmann. (Hakenjos et al., 2011)
<i>HA-STREPII-UBIQUITIN</i>	Diese Arbeit. Generiert und bereitgestellt von Anthi Katsiarimpa, Erika Isono (TU München). (Hakenjos et al., 2011)
<i>DR5:GUS</i>	(Ulmasov et al., 1997)
<i>BDL:BDL-GUS</i>	(Weijers et al., 2005)
<i>KRPI:KRPI-GUS</i>	(Ren et al., 2008)
<i>KRPI:GUS</i>	(Ren et al., 2008)
<i>SP-GFP-HDEL</i>	(Nelson et al., 2007)
<i>SP-RFP-AVFY</i>	(Scabone et al., 2011)
Q4 (ER-Membranmarker)	(Cutler et al., 2000)

**Tabelle 3: T-DNA Insertionslinien**

Mutante	Primer für die Genotypisierung		T-DNA Insertionslinie	Referenz
<i>ml3-3</i>	Wt	ml3-1 FW ml3-1 RV	SALK_001255	Diese Arbeit. (Hakenjos et al., 2013)
	mut	ml3-1 RV LBb1.3		
<i>ml3-4</i>	Wt	ml3-2 FW ml3-2 RV	SAIL_182_G07	Diese Arbeit. (Hakenjos et al., 2013)
	mut	ml3-2 RV LB3		

Mutante	Primer für die Genotypisierung		T-DNA Insertionslinie	Referenz
<i>nai1-3</i>	Wt	NAI1 sense 1 NAI1 antisense	GK-136G06-012754	Diese Arbeit. (Hakenjos et al., 2013)
<i>nai1-3</i>	mut	<i>NAI1</i> sense 1 o8409		
<i>nai2-2</i>	Wt	<i>nai2</i> SALK_005896 LP <i>nai2</i> SALK_005896 RP	SALK_005896	(Yamada et al., 2008)
	mut	<i>nai2</i> SALK_005896 RP LBb1.3		
<i>nai2-3</i>	Wt	<i>nai2</i> SALK_043149 LP <i>nai2</i> SALK_043149 RP	SALK_043149	(Yamada et al., 2008)
	mut	<i>nai2</i> SALK_043149 RP LBb1.3		

**Tabelle 4: EMS-Mutanten**

Mutante	Referenz
<i>axr1-3</i>	(Pozo et al., 1998)
<i>axr1-12</i>	(Lincoln et al., 1990)
<i>ecr1-1</i>	(Woodward et al., 2007)

### 2.1.3 Antikörper

**Tabelle 5: Antikörper**

Antikörper	Verdünnung	Ursprung	Hersteller / Referenz
$\alpha$ HA-Peroxidase	1:1000	Ratte	Roche, Penzberg, Deutschland
$\alpha$ CDC2	1:3000	Hase	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
$\alpha$ MYC	1:3000	Maus	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
$\alpha$ NEDD8	1:1000	Hase	siehe unten, Eurogentec, Liege, Belgien (Hakenjos et al., 2011)
$\alpha$ GAL4 DBD	1:1000	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
$\alpha$ V-ATPase $\epsilon$ -Untereinheit	1:2000	Hase	Agrisera, Vännäs, Schweden
$\alpha$ GFP	1:3000	Hase	Life technologies, Carlsbad, USA
$\alpha$ ML3	1:1000	Hase	siehe unten, Eurogentec, Liege, Belgien (Hakenjos et al., 2013)
$\alpha$ RGF	1:1000	Hase	(Willige et al., 2007)
$\alpha$ HY5	1:3000	Hase	Roman Ulm, Université de Genève, Schweiz
$\alpha$ Hase-IgG-Peroxidase	1:1000	-	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
$\alpha$ Maus-IgG-Peroxidase	1:1000	-	Thermo Scientific/ Pierce, Waltham, USA

Zur Herstellung des  $\alpha$ NEDD8 Antikörpers wurden zwei Hasen mit dem an das Trägerprotein KHL gekoppelte synthetische Peptid IDR IKER VEEKEGIP immunisiert. Der Antikörper wurde aus dem Serum mit Hilfe des Peptids aufgereinigt. Der  $\alpha$ ML3 Antikörper wurde analog gegen das Peptid VSLRRKTLEED produziert. Beide Antikörper stammen von der Firma Eurogentec (Liege, Belgien).

**Tabelle 6: Matrizes für Proteinaufreinigungen**

Name	Hersteller
$\alpha$ HA-Agarose	Roche, Penzberg, Deutschland
$\alpha$ MYC-Agarose	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Strep-Tactin Superflow, 1 ml Säulen	IBA, Göttingen, Deutschland

## 2.1.4 Primer

Alle Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen.

**Tabelle 7: Genotypisierungsprimer**

Primername	Sequenz
<i>nai1</i> sense 1	CACTCGACCACATTCACATAAC
<i>nai1</i> antisense	CTTCAAGAAGTGTGCCTTGTC
o8409	ATATTGACCATCATACTCATTGC
<i>nai2</i> SALK_005896 LP	TTTTTCAACCTCTCTCCCTG
<i>nai2</i> SALK_005896 RP	AGGTCTTCTAAAGCCTGCAGG
<i>nai2</i> SALK_043149 LP	TTATTTCTTGCTAGTTCTGGCC
<i>nai2</i> SALK_043149 RP	TAGCGGAGATACTCGCAGAAG
<i>ml3-1</i> FW	TGTTGGAGCTAAATTCGGATG
<i>ml3-1</i> RV	AGACCACAATGCTAGTGACGG
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC
<i>ml3-2</i> FW	CGGCAAAACCCCTAAAAGTAG
<i>ml3-2</i> RV	TTTTAACGGCTAGCAAAGTCG
LB3	TAGCATCTGAATTCATAACCAATCTCGATACAC

**Tabelle 8: Klonierungsprimer**

Primername	Sequenz
GW ML3 FW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGGCGATGTCTCATGTCCAGCCTA
GW ML3 $\Delta$ 1-24 FW +ATG	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGGCCATAGATTTTCGAATACTGCGC
ML3 GW RV (-Stop)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC AATAGAGACAAATGCAGGAGCTGGG
EcoR1 ML3 FW	GAATTCATGGCGATGTCTCATGTCCA
ML3 Xho1 RV	CTCGAGCTAAATAGAGACAAATGCAGGAG
EcoR1 NEDD8 FW	GAATTCATGATTAAGGTGAAGACTCTCAC
NEDD8 Xho1 RV	CTCGAGCTAACCACCCCTAAGGGCAA
EcoR1 UBQ FW	ATGAATTCATGCAGATCTTCGTGAAAACCTTGA
UBQ Sal1 RV	TAGTCGACCTAACCTCCTCTAAGCCTCAACACA
K33R FW	AATACTGCGCCAGAAATGGAAACGA
K33R RV	TCGTTTCCATTTCTGGCGCAGTATT
K68R FW2	GTTCTGCAAGCAGAAACATCC
K68R RV2	GGATGTTTCTGCTTGCAGAAC
K90R FW	CCGGCCTTTTAAGAACTTACAACCT
K90R RV	AGGTTGTAAGTTCTTAAAAGGCCGG
K129R FW	ATGAGGAAATCAGGTAAGTCTCGGTATC
K129R RV	GATACCGAGTACCTGATTTCTCAT
K137R FW	CTTTGCGCCGAAGGACCTTAGAGGA
K137R RV	TCCTCTAAGGTCTTCGGCGCAAAG
K147R FW	ATCCAATAATAAGAATGTGTGTCTGA
K147R RV	TCGACACACATTCTTATTATTGGAT
K153R FW	GTGTCGACTTCAGAGTACCTGCCCC
K153R RV	GGGGCAGGTACTCTGAAGTCGACAC
HindIII Pro ML3 FW	ATAAGCTTACATGGTATGGCTCTCTCTTGT

Primername	Sequenz
Pro ML3 EcoRI RV	ATGAATTCGGATCTTCAAAGCTCTTTAAAAAGA
ML3 NheI RV	ATGCTAGCAATAGAGACAAATGCAGGAGCTG
BamHI Ter ML3 FW	ATGGATCCTCAAGTTGGCTGATGAAAAGATGTT
Ter ML3 XhoI RV	ATCTCGAGATCGCCATGGTTCTTCAAAGCTT
NheI mCherry FW	GCTAGCATGTTGAGCAAGGGCGAGGA
mCherry BamHI RV	GGATCCCTACTTGTACAGCTCGTCCATGC
eYFP NheI FW	ATGCTAGCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
YFP BamHI RV	ATGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG

Tabelle 9: qRT-PCR-Primer

Primername	Sequenz	Zielgen
ML3 qPCR Left	GCCTATGCTACTCCTCCTCGTAT	ML3 (AT5G23820)
ML3 qPCR Right	CCGTAATCGTTTCCATTTTTG	
NAI1 qPCR Left	CCTGGCCTCAAAAAGACG	NAI1 (AT2G22770)
NAI1 qPCR Right	CCGCTCTTGAAGTTGTTTCA	
PYK10 qPCR Left	AACACAGACGCCTTTAGAATGTC	PYK10 (AT3G09260)
PYK10 qPCR Right	CCTTTCTCCTTTCTCCATGA	
UBC21 LP	TCCTCTTAACTGCGACTCAGG	UBC21 (AT5G25760)
UBC21 RP	GCGAGGCGTGTATACATTTG	

## 2.1.5 Vektoren

Tabelle 10: Vektoren

Vektor	Referenz	Konstrukte	Agrobakterienstamm
pJW2B-5xMYC-GW	Jane Parker, Max-Planck-Institut, Köln	MYC-ML3 MYC-ML3 K33R MYC-ML3 K68R MYC-ML3 K90R MYC-ML3 K124R MYC-ML3 K137R MYC-ML3 K147R MYC-ML3 K153R	GV3101 pMP90RK
pDONR201	Life technologies/ Invitrogen, Carlsbad, USA	pDONR201-ML3- STOP pDONR201-Δ1-24-ML3 +ATG - STOP	-
pEarleyGate101	(Earley et al., 2006)	ML3-YFP-HA Δ1-24-ML3-YFP-HA	GV3101 pMP90
pGreen0029	(Hellens et al., 2000)	ML3p:ML3-mCherry	GV3101 pSOUP
pGreen0229	(Hellens et al., 2000)	ML3p:ML3-YFP	GV3101 pSOUP
pCAMBIA1391Z	www.cambia.org	ML3p:GUS	GV3101 pMP90
pGBKT7	BD Biosciences, San Jose, USA	BD-ML3	-
pGADT7 AD	BD Biosciences, San Jose, USA	AD-NEDD8 AD-UBIQUITIN	-
pNIGEL17	(Geldner et al., 2009)	Template für ML3p:ML3-mCherry	-
pEXTAG-YFP-GW	Jane Parker, Max-Planck-Institut, Köln	Template für ML3p:ML3-YFP	-

## 2.1.6 Chemikalien und Reagenzien

### 2.1.6.1 Chemikalien

Tabelle 11: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2,4-D (2,4-Dichlorphenoxyessigsäure)	Duchefa, Haarlem, Niederlande
3AT (3-Amino-1,2,4-triazol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
3-HBA (3-Hydroxybenzoesäure)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
6-BA (6- Benzylaminopurin)	Duchefa, Haarlem, Niederlande
Aceton	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Acetonitril	Sigma-Aldrich (Fluka), St. Louis, USA
Acrylamid / Bisacrylamid 29:1	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agar für die Bakteriologie	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Agarose	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Ammoniumhydrogencarbonat (NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> )	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Avidin	IBA, Göttingen, Deutschland
Basta	Bayer, Leverkusen, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Calciumhypochlorit	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>cOmpleteEDTA-free Protease Inhibitor Cocktail</i>	Roche, Penzberg, Deutschland
Desthiobiotin	IBA, Göttingen, Deutschland
DEX (Dexamethason)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe, Deutschland
dNTPs (Desoxyribonukleosid-Triphosphate)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DTT (Dithiothreitol)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EDTA (Ethylendiamin-tetraessigsäure) Dinatriumsalz Dihydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol, vergällt	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ficoll 400	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe, Deutschland
GA3 (Gibberellinsäure 3)	Duchefa, Haarlem, Niederlande
Glucose	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hepes (4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Heptan	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Hygromycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Iodacetamid	Sigma-Aldrich (Fluka), St. Louis, USA
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhexacyanidoferrat(II)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhexacyanidoferrat(III)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydroxid (KOH)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Kanamycinsulfat	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Lithiumacetat-Dihydrat	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Mannitol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MeJA (Methyljasmonat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
MES Monohydrat (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure Monohydrat)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MG132	Enzo Life Sciences, Farmingdale, USA
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MLN4924	Geschenk von Millenium Pharmaceuticals, Cambridge, USA
MOPS (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<i>Murashige &amp; Skoog medium, including B5 vitamins incl. gamborg B5 vitamins</i>	Duchefa, Haarlem, Niederlande
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
N-Ethylmaleimid	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Neutralrot	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Orange G	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PEG 4000	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Pflanzenagar	Duchefa, Haarlem, Niederlande
Phenol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Plant Protease Inhibitor Cocktail</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<i>Protein Assay Dye Reagent Concentrate</i>	Bio-Rad, Hercules, USA
SA (Salicylsäure)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Saccharose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Silwet	BASF, Ludwigshafen, Deutschland
TFA (Trifluoressigsäure)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Trypton	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Uracil	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
X-Gluc (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-glucuronid)	Duchefa, Haarlem, Niederlande
<i>Yeast Nitrogen Base without amino acids</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<i>Yeast Synthetic Drop-out Medium Supplements without histidine, leucine, tryptophan and uracil</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<i>Yeast Synthetic Drop-out Medium Supplements without leucine and tryptophan</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

### 2.1.6.2 Enzyme und Kits

Tabelle 12: Enzyme

<b>Enzym</b>	<b>Hersteller</b>
<i>M-MuLV Reverse Transcriptase</i>	Thermo Scientific/Fermentas, Waltham, USA
Restriktionsenzyme	Thermo Scientific/Fermentas, Waltham, USA
<i>T4 DNA Ligase</i>	Thermo Scientific/Fermentas, Waltham, USA
<i>Trypsin Sequencing Grade</i>	Roche, Penzberg, Deutschland
<i>Phusion High-Fidelity DNA Polymerase</i>	New England BioLabs, Ipswich, USA
RNase A	Thermo Scientific/Fermentas, Waltham, USA
Lysozym	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Zellulase ONOZUKA R-10	Yakult Pharmaceutical Industry Co., Tokyo, Japan
Macerozym R-10	Yakult Pharmaceutical Industry Co., Tokyo, Japan

### 2.1.6.3 Marker

Tabelle 13: Marker

<b>Marker</b>	<b>Hersteller</b>
<i>GeneRuler 1 kb DNA Ladder</i>	Thermo Scientific/Fermentas, Waltham, USA
<i>PageRuler Plus Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Scientific/Fermentas, Waltham, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Generelle Pflanzenarbeiten

#### 2.2.1.1 Samensterilisierung und Wachstumsbedingungen

*Arabidopsis*-Samen wurden mit einer gesättigten Calciumhypochloritlösung mit 0,1 % Silwet für 15 min oberflächensterilisiert. Danach wurden die Samen kurz mit 80 % Ethanol und dreimal mit sterilem Wasser mit 0,05 % Silwet gewaschen. Für Tomaten- und *Brachypodium*-Samen wurde die Sterilisationszeit auf 30 min erhöht. Die Samen wurden auf GM-Medium (4,3 g/l *Murashige & Skoog medium*, 10 g/l Saccharose, 0,5 g/l MES-Monohydrat, 5,5 g/l Agar, pH mit KOH auf 5,8 eingestellt) oder ½-MS (2,15 g/l *Murashige & Skoog Medium*, 0,5 g/l MES-Monohydrat, 6,5 oder 8 g/l Agar, pH mit KOH auf 5,8 eingestellt) ausplattiert. *Arabidopsis*- und *Brachypodium*-Samen wurden für 2 d im Dunkeln bei 4 °C stratifiziert und danach bei 21 °C und einer Lichtintensität von 150  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  kultiviert. Zur Propagation und für Experimente mit adulten Pflanzen wurden 7 d alte Keimlinge auf feuchte Erde transferiert. Für die Transformation von *Arabidopsis* mit der *floral dip*-Methode (Clough and Bent, 1998) wurden die Samen direkt auf die feuchte Erde ausgestreut, 2 d bei 4 °C stratifiziert und dann ins Licht transferiert. Zur Keimung der Tomatensamen im Dunkeln wurden die Platten in Alufolie verpackt und 6 d bei 25 °C inkubiert. Danach wurden die Platten ans Licht gestellt und bei 25 °C weiterkultiviert.

#### 2.2.1.2 Pflanzentransformation

*Arabidopsis thaliana* wurde mit der *floral dip*-Methode transformiert (Clough and Bent, 1998). Dafür wurde mit Hilfe der Elektroporation der passende *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm mit dem Konstrukt transformiert. Die Zellen wurden 2 bis 4 h bei 30 °C und 180 rpm in 1 ml LB (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Natriumchlorid, pH mit NaOH auf 7,0 eingestellt) geschüttelt und alle Zellen wurden auf LB mit 15 g/l Agar und den passenden Antibiotika ausplattiert. Die Platten wurden bei 30 °C für 2 bis 4 d inkubiert. Mit einer Kolonie wurden 8 ml LB mit Antibiotika angeimpft. Nach 1 bis 2 d im Schüttelinkubator bei 30 °C wurde mit 1 ml der Vorkultur 500 ml LB mit Antibiotika angeimpft. Die Hauptkultur wurde erneut für 1 bis 2 d bei 30 °C geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4000 g und Raumtemperatur für 15 min pelletiert und danach in 300 ml Transformationsmedium (2,2 g/l *Murashige & Skoog Medium*, 0,5 g/l MES-Monohydrat, 50 g/l Glucose, 10  $\mu\text{l}$  6-BA in 1 l, 200  $\mu\text{l}$  Silwet in 1 l) resuspendiert. Infloreszenzen von *Arabidopsis thaliana* wurden für mehrere Sekunden bis mehrere Minuten in die Agrobakteriumsuspension getaucht. Die Pflanzen wurden in einer Pflanzschale liegend und mit Plastikfolie bedeckt über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Am nächsten Morgen wurden Reste des Transformationsmediums mit Wasser abgesprüht und die Pflanzen wurden unter den oben beschriebenen Bedingungen weiterkultiviert.

#### 2.2.1.3 Selektion transgener Pflanzenlinien

Zur Selektion der transgenen Linien mit dem Herbizid *Basta* (Wirkstoff Phosphinothricin) wurden direkt auf Erde gekeimte Pflanzen mehrfach mit einer *Basta*-Lösung besprüht. Für die Selektion auf Platten wurden oberflächensterilisierte Samen auf ½-MS Medium mit dem passendem Antibiotikum ausgebracht.

**Tabelle 14: Selektionsmittel**

Konstrukte	Selektionsmittel
MYC-ML3 MYC-ML3 K33R MYC-ML3 K68R MYC-ML3 K90R MYC-ML3 K124R MYC-ML3 K137R MYC-ML3 K147R MYC-ML3 K153R	Basta (1:3000)
ML3-YFP-HA $\Delta 1-24$ -ML3-YFP-HA	Basta (1:3000)
ML3p:ML3-mCherry	Kanamycin (50 µg/ml)
ML3p:ML3-YFP	Basta (1:3000)
ML3p:GUS	Hygromycin (50 µg/ml)

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1 PCR

Für Klonierungen wurde die *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* verwendet. Ein 50 µl-Reaktionsansatz enthielt 1 U *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase*, *Phusion HF Buffer*, dNTPs (50 µM dATP, 50 µM dCTP, 50 µM dGTP, 50 µM dTTP), je 0,5 mM Primer und entweder 5 µl genomische DNA aus *Arabidopsis* oder circa 500 ng Plasmid-DNA als Template. Die PCR wurde nach folgendem Schema durchgeführt: 98 °C für 30 s - 24 mal (98 °C für 10 s - Schmelztemperatur ( $T_M$ ) des Primers minus 2 °C für 20 s - 72 °C für 30 s / 1 kb) - 72 °C für 8 min. Der  $T_M$ -Wert wurde nach folgender Formel berechnet:  $T_M = (\text{GC-Gehalt [\%]} * 0,41) - (650 / \text{Primerlänge [bp]}) + 69,3$ .

Zur Einführung der Punktmutationen in MYC-ML3 (Lysin zu Arginin) wurde das ganze Plasmid mit den in Tabelle 8 angegebenen Primern amplifiziert (Fisher and Pei, 1997). Nach der PCR wurden 20 µl des Ansatzes mit 4 U *DpnI* versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Das PCR-Produkt wurde anschließend mit dem Kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* aufgereinigt und 4 µl wurden in elektrokompente *E. coli*-Zellen transformiert.

Für analytische PCRs wie für Genotypisierungen wurde eine im Labor hergestellte Taq-Polymerase verwendet. Ein 25 µl-Ansatz enthielt 0,2 µl im Labor hergestellte Taq-Polymerase, PCR-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>), dNTPs (50 µM dATP, 50 µM dCTP, 50 µM dGTP, 50 µM dTTP), je 0,5 mM Primer und 5 µl genomische DNA. Die PCR wurde nach folgendem Schema durchgeführt: 94 °C für 2 min - 32 mal (94 °C für 30 s - Schmelztemperatur ( $T_M$ ) des Primers minus 2 °C für 45 s - 72 °C für 1 min/1 kb) - 72 °C für 7 min.

### 2.2.2.2 Klassische Klonierung

Für klassische Klonierungen wurden die PCR-Produkte mit dem Kit *CloneJet PCR Cloning* (Thermo Scientific/Fermentas, Waltham, USA) nach Herstellerangaben zwischenkloniert. Das PCR-Produkt wurde im *pJET*-Vektor sequenziert. Um die Fragmente und den Vektor für die Ligation zu erhalten, wurden die Plasmide in einem 20 µl-Ansatz mit den passenden Restriktionsenzymen und den vom Hersteller empfohlenen Puffer bei 37 °C für 1,5 h verdaut. Die verdauten Plasmide wurden über ein Agarosegel aufgetrennt, die gewünschten Fragmente

wurden ausgeschnitten und mit Hilfe des Kits *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Fitchburg, USA) aufgereinigt. Die DNA-Konzentrationen wurden über ein Agarosegel mit Hilfe des Markers abgeschätzt und für die Ligation wurde ein molares Verhältnis von Insert zu Vektor von 3:1 bis 2:1 gewählt. Der 10 µl-Ligationsansatz enthielt neben dem Vektor und dem Insert *T4 DNA Ligase Buffer* und 2,5 U der *T4 DNA Ligase*. Die Reaktion wurde 1 h bis über Nacht bei Raumtemperatur oder alternativ über Nacht bei 4 °C inkubiert und 4 µl des Ansatzes wurden in elektrokompente *E. coli* transformiert.

**Tabelle 15: Klassisch-klonierte Konstrukte**

Konstrukt	Insert(s)	Primer	Bemerkungen
<i>ML3p:ML3-mCherry</i>	<i>HindIII-ML3p:ML3-NheI</i>	HindIII Pro ML3 FW	ML3p = 2 kb vor ATG Template: gDNA Col-0
		ML3 NheI RV	
	<i>NheI-mCherry-BamHI</i>	NheI mCherry FW mCherry BamHI RV	<i>pNIGEL17</i>
<i>BamHI-ML3t-XhoI</i>	<i>BamHI-ML3t-XhoI</i>	BamHI Ter ML3 FW	ML3t = 1 kb nach TAG Template: gDNA Col-0
		Ter ML3 XhoI RV	
<i>ML3p:ML3-YFP</i>	<i>HindIII-ML3p:ML3-NheI</i>	siehe oben	Template: <i>pEXTAG-YFP-GW</i>
		<i>NheI-YFP-BamHI</i>	
	<i>BamHI-ML3t-XhoI</i>	siehe oben	
<i>ML3p:GUS</i>	<i>HindIII-ML3p-EcoRI</i>	HindIII Pro ML3 FW	ML3p = 2 kb vor ATG Template: gDNA Col-0
		Pro ML3 EcoRI RV	
<i>BD-ML3</i>	<i>EcoRI-ML3-XhoI</i>	EcoRI ML3 FW	Template: cDNA-Klon G13160 (ABRC)
		ML3 XhoI RV	
<i>AD-NEDD8</i>	<i>EcoRI-NEDD8-XhoI</i>	EcoRI NEDD8 FW	Template: gDNA HSN
		NEDD8 XhoI RV	
<i>AD-UBQ</i>	<i>EcoRI-UBQ-SalI</i>	EcoRI UBQ FW	Template: cDNA-Klon G10096 (ABRC)
		UBQ SalI RV	

### 2.2.2.3 Klonierung mit der Gateway-Technologie

Gateway-Klonierungen wurden nach den Herstellerangaben der Kits *Gateway BP Clonase II enzyme mix* und *Gateway LR Clonase II enzyme mix* durchgeführt (Life technologies/Invitrogen, Carlsbad, USA). Alle Reaktionen wurden mit dem halben Volumen angesetzt und schlussendlich wurden 2 µl des Ansatzes in elektrokompente *E. coli*-Zellen transformiert.

Für die Herstellung von *MYC-ML3* wurde der Gateway-kompatible cDNA-Klon G13160 vom *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC) verwendet. *ML3-YFP-HA* und *Δ1-24-ML3-YFP-HA* wurden mit den entry-Klonen *pDONR201-ML3-STOP* und *pDONR201-Δ1-24-ML3+ATG-STOP* (siehe Tabelle 16) kloniert.

**Tabelle 16: Entry-Klone**

entry-Klon	Primer	Template
<i>pDONR201-ML3-STOP</i>	GW ML3 FW	Template: cDNA-Klon G13160 (ABRC)
	ML3 GW RV (-Stop)	
<i>pDONR201-Δ1-24-ML3 +ATG - STOP</i>	GW ML3 Δ1-24 FW +ATG	Template: cDNA-Klon G13160 (ABRC)
	ML3 GW RV (-Stop)	

#### **2.2.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien**

Plasmid-DNA wurde mit Hilfe der alkalischen Lyse isoliert (Birnboim and Doly, 1979). Dafür wurden die Bakterien einer 3 ml-Übernachtskultur bei 7000 g für 2 min pelletiert. Das Pellet wurde in 100 µl Puffer 1 (50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0)) resuspendiert. Zu der Bakteriensuspension wurden 100 µl Puffer 2 (0,2 N NaOH, 1 % SDS) gegeben und sofort durch Invertieren gemischt. Anschließend wurden 100 µl Puffer 3 (3 M Natriumacetat (pH 4,8)) zugegeben und der Ansatz sofort wieder durch Invertieren gemischt. Nach einer Zentrifugation von 20 000 g und 10 min bei Raumtemperatur wurde der Überstand mit 750 µl 100 % Ethanol vermischt und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 80 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,1 M EDTA (pH 8,0)) mit 500 U/ml RNase A gelöst.

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *Agrobacterium tumefaciens* wurde das gleiche Protokoll mit den folgenden Änderungen verwendet. Es wurden die Zellen aus 5 ml-Flüssigkultur pelletiert und in 300 µl Puffer 1 mit 80.000 U/ml Lysozym resuspendiert. Nach einer Inkubation von 5 min wurden 300 µl Puffer 2 zugegeben, weitere 5 min inkubiert und dann 300 µl Puffer 3 zugegeben. Nach der Zentrifugation wurden 600 µl des Überstands mit 600 µl Phenol-Chloroform (1:1) gemischt und die Phasen wurden durch eine Zentrifugation bei 20 000 g für 2 min bei Raumtemperatur getrennt. Die obere Phase wurde abgenommen und mit dem gleichen Volumen an Isopropanol gemischt. Die Plasmid-DNA wurde durch Zentrifugieren pelletiert und in 80 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in Wasser resuspendiert.

#### **2.2.2.5 Isolierung genomischer DNA aus Pflanzen**

Für die Isolierung genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana* wurde ein Keimling oder ein Rosettenblatt gemörsert und es wurden 300 µl DNA-Extraktionspuffer (200 mM Tris-HCl (pH 7,5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA (pH 8,0), 0,5 % SDS) zugegeben. Nach einer Inkubation von 20 min bei 65 °C wurde die Lösung mit 300 µl Phenol/Chloroform (1:1) gründlich vermischt. Es folgte eine Zentrifugation bei 20 000 g für 2 min. 200 µl der oberen Phase wurden mit 200 µl Isopropanol versetzt und die DNA wurde durch eine Zentrifugation bei 20 000 g und 10 min pelletiert. Das Pellet wurde in 80 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in reinem Wasser aufgenommen.

#### **2.2.2.6 RNA-Extraktion aus Pflanzen**

RNA wurde mit Hilfe des Kits *NucleoSpin RNA* (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben isoliert. Die Inkubation mit rDNase wurde von 15 min auf 20 min verlängert. Die Qualität der RNA wurde mit Hilfe eines Agarosegels kontrolliert. Dafür wurden 1 bis 3 µl der isolierten RNA mit dem dreifachen Volumen an Probenpuffer (400 µl Formamid, 140 µl Formaldehyd (37 %), 80 µl 10x MEN-Puffer (200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt) und 1,5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)) versetzt und 5 min bei 65 °C inkubiert. Der Ansatz wurde mit 5x Ladepuffer (10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,15 % Orange G, 60 % Glycerin, 60 mM EDTA (pH 8,0)) gemischt und die RNA wurde in einem Agarosegel (1,5 % Agarose in MEN-Puffer, 0,74 % Formaldehyd) aufgetrennt. MEN-Puffer (20 mM MOPS, 5 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH 7,0) diente als Laufpuffer.

### 2.2.2.7 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurden 1 bis 2 µg RNA in 10 µl reinem Wasser aufgenommen und mit oligo-dT-Primer (Endkonzentration= 1 mM, Sequenz: TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN, T= Thymin, V= Adenin, Cytosin oder Guanin, N= Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin) versetzt. Nach einer Inkubation von 5 min bei 65 °C wurde der Ansatz auf Eis gekühlt. Anschließend wurde Reaktionspuffer und dNTPs (250 µM dATP, 250 µM dCTP, 250 µM dGTP, 250 µM dTTP) zugegeben. Die Lösung wurde für 5 min bei 42 °C inkubiert und danach mit 40 U *M-MuLV Reverse Transcriptase* versetzt. Die cDNA-Synthese erfolgte bei 42 °C für eine Stunde. Anschließend wurde die Reaktion durch eine Inkubation bei 70 °C für 10 min gestoppt.

### 2.2.2.8 Quantitative Real-Time-PCR

Für die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) wurde das cDNA-Äquivalent von 25 ng RNA und der *iQ SYBR Green Supermix* (Bio-Rad) in einem 10 µl PCR-Ansatz verwendet. Ein 2-Schritt-Programm (10 s bei 95 °C, 30 s bei 60 °C) mit 40 Zyklen wurde mit Hilfe des Geräts *CFX96 Real-Time System Cycler* (Bio-Rad) für die qRT-PCR genutzt. Pro Experiment wurden mindestens zwei biologische Replikate und je vier technische Replikate analysiert. Die Expressionsdaten der einzelnen Gene wurden mit der Expression von *UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME 21 (UBC21)* normalisiert. Es wurde der Mittelwert und der Standardfehler relativ zur Wildtyp- bzw. zur unbehandelten Kontrolle berechnet.

qRT-PCR-Ergebnisse für die Gene *IAA3*, *IAA13*, *FedA*, *RbcS1A*, *PsbA* und *HY5* wurden von René Richter generiert, wie in (Hakenjos et al., 2011) beschrieben.

### 2.2.2.9 Yeast Two-Hybrid

Es wurden jeweils ein Plasmid für ein BD-Konstrukt (pGBKT7) und ein AD-Konstrukt (pGADT7 AD) in den *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm Y190 mit Hilfe der Lithiumacetat/PEG-Methode kotransformiert (Schwechheimer and Deng, 2002). Transformanten wurden auf Medium ohne Leucin und Tryptophan (SD-LW, 0,67 % *Yeast Nitrogen Base without amino acids*, 0,154 % *Yeast Synthetic Drop-out Medium Supplements without leucine and tryptophan*, 2 % Glucose, 2 % Agar) bei 30 °C selektioniert. Für jede BD-AD-Kombination wurden mehrere Kolonien mindestens zwei Mal neu ausgestrichen um sicherzustellen, dass es sich jeweils um eine reine Transformantenlinie handelt.

Zur Kontrolle der Expression der einzelnen Konstrukte wurden die Proteine der Transformantenlinien extrahiert. Dafür wurden einige Zellen von einer Platte abgestrichen und in 1 ml reinem Wasser resuspendiert. Die Zellen wurden bei 1000 g für 2 min pelletiert und anschließend in 200 µl 0,1 M NaOH aufgenommen. Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur wurde erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 bis 100 µl Laemmli (62 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10 % Glycerin, 2 % SDS, 0,1 % Bromphenolblau, 0,7 % β-Mercaptoethanol) resuspendiert und bei 98 °C für 5 min erhitzt. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation bei 20 000 g für 1 min bei Raumtemperatur entfernt. Zum Nachweis der Fusionsproteine mittels Western-Blot wurde der αGAL4 DBD-Antikörper (BD-Konstrukte) bzw. der αHA-Antikörper (AD-Konstrukte) verwendet. Linien, die sowohl das BD- wie das AD-Konstrukt exprimierten, wurden für den *Yeast Two-Hybrid* verwendet. Dafür wurden die Hefen in flüssigem SD-LW bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 bis 1,5 kultiviert. Eine

OD<sub>600</sub> von 1,0 wurde eingestellt und die Zellen wurden in drei Zehnerschritten verdünnt (1:10, 1:100 und 1:1000). Es wurden je 2 µl auf eine SD-LW-Platte und auf eine SD-LWH-Platte (0,67 % *Yeast Nitrogen Base without amino acids*, 0,154 % *Yeast Synthetic Drop-out Medium Supplements without histidine, leucine, tryptophan and uracil*, 0,002 % Uracil, 2 % Glucose, 2 % Agar) mit 3 mM 3-Amino-1,2,4-triazol (3AT) getropft. Nach dem Trocknen der Platten wurden diese für 3 d bei 30 °C inkubiert und anschließend analysiert.

## 2.2.3 Biochemische Methoden

### 2.2.3.1 Proteinextraktion

Zur Proteinextraktion aus Pflanzen wurde Pflanzenmaterial in Proteinextraktionspuffer (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,5 % Triton X-100, *cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail*) homogenisiert. Zu 100 mg Pflanzenmaterial wurden 200 µl Proteinextraktionspuffer zugegeben. Für Immunopräzipitationen (IPs) wurde der Proteinextraktionspuffer für IPs (50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 100 mM NaCl, 10 % Glycerin, 0,1 % Triton X-100, *cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail*) verwendet und lediglich die 1,5fache Menge eingesetzt (zu 100 mg Pflanzenmaterial wurden 150 µl Puffer gegeben). Nach der Homogenisierung wurden die unlöslichen Pflanzenbestandteile durch Zentrifugation bei 16 000 g und 4 °C für 15 min entfernt. Die Proteinkonzentration des Überstands wurde mit Hilfe der Bradford-Methode (Bradford, 1976) bestimmt. Die Proteinextrakte wurden 1:4 mit 5x Laemmli versetzt und 5 min bei 95 °C erhitzt.

### 2.2.3.2 Immunopräzipitation

Zu 1 ml Proteinextrakt wurden etwa 20 µl Antikörper gekoppelte Agarose gegeben. αHA-Agarose wurde direkt dem Proteinextrakt zugefügt. αMYC-Agarose wurde zuvor dreimal mit PBS (139 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) gewaschen und anschließend 15 min mit einer gesättigten Milchpulverlösung in PBS blockiert. Die Proteinextrakte mit der Antikörper gekoppelten Agarose wurden für 1,5 bis 2 h bei 4 °C rotierend inkubiert. Die Agarose wurde anschließend durch kurzes Zentrifugieren pelletiert, dreimal mit kaltem Proteinextraktionspuffer für IPs und dreimal mit PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Die Proteine wurden mit 2x Laemmli bei 95 °C für 5 min (für anschließende Analyse durch Western-Blot) beziehungsweise mit 1x Laemmli ohne β-Mercaptoethanol bei 50 °C (für anschließende Analyse mittels Massenspektrometrie) eluiert.

### 2.2.3.3 Proteinaufreinigung mit dem Streptavidin/Biotin-System

Zur Proteinaufreinigung mittels des STREPII-Tags wurden 10 g Keimlinge in 10 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM EDTA (pH 8,0), 5 mM MEGTA (pH 8,0), 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100, 10 mM Dithiothreitol (DTT), 5 mM N-Ethylmaleimid, 100 mg/ml Avidin, *Plant Protease Inhibitor Cocktail* (Sigma-Aldrich)) homogenisiert. Nach einer Zentrifugation bei 50 000 g und 4 °C für 30 min wurde der Überstand auf eine 1 ml-*Strep-Tactin* Affinitätssäule geladen. Die Säule wurde 5 Mal mit eiskaltem Waschpuffer mit Triton X-100 (100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 2,5 mM EDTA (pH 8,0), 150 mM NaCl, 2 mM DTT, 0,05% Triton X-100) und 5 Mal mit eiskaltem Waschpuffer ohne Triton X-100 gewaschen. Anschließend wurden die Proteine mit Elutionspuffer (100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 10 mM Desthiobiotin, 2 mM DTT) eluiert und mit Aceton/ 0,2 % DTT über

Nacht bei - 20 °C gefällt. Nach einer Zentrifugation bei 10 000 g und 4 °C für 15 min wurde das Pellet getrocknet und für die SDS-PAGE in 2x Laemmli gelöst und 5 min bei 95 °C erhitzt.

#### **2.2.3.4 Tryptischer Verdau im Gel und Elution der Peptide**

Für die Vorbereitung der Proteine für die massenspektrometrische Analyse wurden diese in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Gelspur wurde anhand des Größenmarkers mit einer Rasierklinge in Stücke geschnitten, um die Menge an Proteinen pro Probe zu verringern. Jedes Gelfragment wurde in kleine Stücke (etwa 1 mm<sup>3</sup>) zerschnitten. Die Stücke wurden mit Reduktionspuffer (50 mM DTT, 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) bedeckt und für 1 h bei 60 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur wurde der Reduktionspuffer durch eine Lösung aus 100 mM Iodacetamid und 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> ersetzt. Es folgte eine Inkubation der Proben im Dunkeln bei Raumtemperatur für 1 h. Die Proben wurden während der Inkubation gelegentlich geschüttelt. Die Gelstücke wurden dann dreimal für 10 min mit Waschpuffer (50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (pH 8,0)) gewaschen und anschließend eingefroren und wieder aufgetaut. Nach dem Trocknen der Gelstücke im Vakuum für 10 bis 30 min wurden die Stücke mit einer Trypsinlösung (50 ng/μl Trypsin, 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) rehydriert und anschließend mit Puffer (50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) bedeckt. Die Proben wurden über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach einer kurzen Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und aufbewahrt. Die Gelstücke wurden mit 5 % Trifluoressigsäure (TFA) bedeckt und im Ultraschallbad für 1 min behandelt. Der Überstand wurde abgenommen und aufbewahrt. Dieser Schritt wurde mit 5 % TFA / 15 % Acetonitril wiederholt. Die gesammelten Überstände wurden zusammengeführt und unter Vakuum bei Raumtemperatur auf etwa 25 μl reduziert.

#### **2.2.3.5 Massenspektrometrie**

Die tryptischen Peptide, die durch die Aufreinigung von HSN und HSN-Konjugaten mit anschließendem Verdau im Gel entstanden sind, wurden von Sjeff Boeren (Biqualis, Wageningen) wie in (Hakenjos et al., 2011) beschrieben analysiert.

Aufgereinigtes Δ1-24-ML3-YFP-HA wurde von Stephanie Heinzlmeir (Lehrstuhl Proteomik und Bioanalytik, Prof. Dr. Bernhard Küster, TU München), wie in (Hakenjos et al., 2013) beschrieben, prozessiert und massenspektrometrisch analysiert.

#### **2.2.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde wie in (Laemmli, 1970) beschrieben in *Mini Protean II* Zellen (Bio-Rad) durchgeführt. Für die 5 %igen Sammelgele und die 10 bis 15 %igen Trenngele wurde Acrylamid/Bisacrylamid im Verhältnis 29:1 eingesetzt.

#### **2.2.3.7 Western-Blot**

Zur Detektion von Proteinen mittels Western-Blot wurden SDS-Polyacrylamidgele auf eine Nitrocellulosemembran (*Hybond ECL*, GE Healthcare) geblottet. Der Transfer fand in einem Semidryblotter in Semidrypuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol, 1,3 mM SDS, mit NaOH auf pH 8,3 eingestellt) statt. Die Membran wurde anschließend in PBS mit 5 % Magermilchpulver für 30 min geblockt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper

fand in PBS mit 5 % Magermilchpulver bei 4 °C über Nacht statt. Anschließend wurde die Membran mit PBST (1 % Tween 20 in PBS) zweimal für 10 min und in PBS einmal für 10 min gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper in PBS mit 5 % Magermilchpulver für 1 bis 5 h bei Raumtemperatur. Die Membran wurde erneut gewaschen. Die mit dem sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidaseaktivität und damit die Anwesenheit des zu detektierenden Proteins wurde mit Hilfe des *Super Signal West Femto Maximum Sensitivity* Substrats (Thermo Scientific) und dem *Luminescent Image Analyzer LAS-4000 mini series* (Fujifilm) detektiert.

## 2.2.4 Physiologische Experimente

### 2.2.4.1 Physiologische Experimente

Zur Analyse des Wurzelwachstum in Antwort auf Auxin wurden 4 d alte, auf GM gewachsene Keimlinge auf Medium mit 2,4-D und MLN4924 transferiert. Die Wurzelspitze wurde markiert und nach weiteren 4 d wurde das Wurzelwachstum analysiert. Dafür wurden die Platten eingescannt und die Zunahme der Wurzellänge mit Hilfe der Software ImageJ gemessen. Die Hypokotyllängen von 4 d alten, im Dunkeln auf ½ MS gewachsenen Keimlingen wurden mit der Software ImageJ gemessen ( $n \geq 10$ ). Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden berechnet. Zur Untersuchung der Signifikanz wurde ein T-Test durchgeführt. Um zu untersuchen, ob die Expression von ML3 eine Reaktion auf Verwundung zeigt, wurde das erste und zweite Rosettenblatt von 16 d alten *ML3p:GUS*-Pflanzen abgeschnitten und mit einem hölzernen Zahnstocher sechsmal verletzt. Die Blätter wurden 48 h auf reinem Wasser schwimmend inkubiert bevor eine GUS-Färbung durchgeführt wurde.

### 2.2.4.2 Behandlung mit Hormonen, Inhibitoren und anderen Substanzen

Für Hormonbehandlungen wurden Keimlinge oder Rosettenblätter in eine Hormonlösung in flüssigem GM (2,4-D, GA3) oder in reinem Wasser (MeJA) getaucht. Für die Behandlung mit den Inhibitoren MLN4924 und MG132 wurden die in DMSO gelösten Substanzen mit flüssigem GM auf die passende Konzentration gebracht. Keimlinge wurden in die Lösung getaucht. Zur Induktion der Transkription mit Dexamethason (DEX) wurden Keimlinge über Nacht in flüssigem GM mit 30  $\mu$ M DEX und 0,01 % Tween 20 inkubiert. Danach wurden die Keimlinge mit einem Papiertuch vorsichtig trocken getupft und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Als Kontrolle wurde das jeweilige Lösungsmittel der Substanz in der gleichen Konzentration verwendet.

## 2.2.5 Histologische und zellbiologische Methoden

### 2.2.5.1 GUS-Färbung

Keimlinge und Rosettenblätter wurden für die GUS-Färbung für 15 min in Heptan fixiert. Nach dem Trocknen wurden die Keimlinge und Rosettenblätter in GUS-Färbelösung (100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0), 0,5 mM Kaliumhexacyanidoferrat(II), 0,5 mM Kaliumhexacyanidoferrat(III), 0,5 % Triton X-100, 1 mg/ml X-Gluc) bis zum Erscheinen einer Blaufärbung bei 37 °C inkubiert. Es folgte ein Bleichschritt in 80 % Ethanol. Bilder der

Keimlinge und Rosettenblätter wurden mit dem Stereomikroskop MZ16 (Leica) aufgenommen.

### **2.2.5.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie**

Für mikroskopische Aufnahmen wurde das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop FV1000/IX81 mit den Objektiven UPLFL (10x) und UPLSAPA (60x) von Olympus verwendet.

### **2.2.5.3 Subzelluläre Fraktionierung**

Die subzelluläre Fraktionierung von 7 d alten Keimlingen wurde wie in (Matsushima et al., 2003) beschrieben durchgeführt. Für die Zentrifugation bei 100 000 g wurde eine Sorvall MTX 150 Ultrazentrifuge (Thermo Scientific) mit dem Rotor S55-A2 (Thermo Scientific) verwendet.

### **2.2.5.4 Aufreinigung von Vakuolen**

Vakuolen wurden mit folgenden Änderungen, wie in (Robert et al., 2007) beschrieben, aufgereinigt. Es wurden 12 bis 14 d alte, im Dauerlicht angezogene Keimlinge verwendet. Für die Ultrazentrifugation wurde eine Sorvall MTX 150 Zentrifuge (Thermo Scientific), mit S50-ST-Rotor (Thermo Scientific) und 7 ml-Röhrchen S309146A (Hitachi Koki Co., Tokyo, Japan) verwendet.

## **2.2.6 Phytopathologische Methoden**

Experimente mit Larven des Schmetterling *Spodoptera littoralis*, dem nekrotrophen Pilz *Alternaria brassicicola* und dem gramnegativen Bakterienstamm *Pseudomonas syringae* DC3000 wurden von Sarosh Bejai (Sveriges lantbruksuniversitet, Uppsala, Schweden) wie in (Hakenjos et al., 2013) beschrieben durchgeführt.

## **2.2.7 Bioinformatische Methoden**

### **2.2.7.1 Sequenz- und phylogenetische Analysen**

Zur Planung von Klonierungen, Kontrolle von Sequenzierdaten und für Proteinalignments wurde die Software *geneious* Version R6 (Biomatters, Auckland, Neuseeland) verwendet. Für das Alignment ECR1s und seiner Homologe wurde der *pairwise alignment* Algorithmus und die *score matrix* Blosum62 verwendet.

Die Sequenzen von Proteinen mit der MD-2-related *lipid recognition*-Domäne (PFAM-Domäne PF02221) wurde der Datenbank Ensembl BioMart entnommen, mit der Ausnahme von den zwei Homologen aus *Selaginella moellendorffii*, welche aus der Phytozome-Datenbank entnommen wurden ([www.phytozome.net](http://www.phytozome.net)). Die Position der ML-Domäne wurde mit Hilfe von PFAM bestimmt und das Alignment der Proteinsequenzen wurde mit dem Programm ClustalOmega unter Standardeinstellungen ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/)) erstellt und falls nötig korrigiert. Der phylogenetische Baum wurde auf Grundlage des korrigierten Alignments mit Hilfe der Software MEGA5 berechnet (Tamura et al., 2011). Dafür wurde die Maximum-Likelihood-Methode verwendet und der Baum wurde mit der Bootstrap-Methode in 1000 Replikaten getestet. Werte unter 0,6 wurden als nicht signifikant betrachtet.

### **2.2.7.2 3D-Modellierung**

Das 3D-Modell von AtECR1 wurde mit Hilfe des SWISS-MODEL Servers (Arnold et al., 2006) erstellt. Als Vorlage diente die 3D-Struktur von HsUBA3 ((Brownell et al., 2010), *RCSB Protein Data Bank*-Eintrag 3gznB). Das 3D-Modell von AtECR1 wurde mit Hilfe des Programms UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004) analysiert.

## 3 Ergebnisse

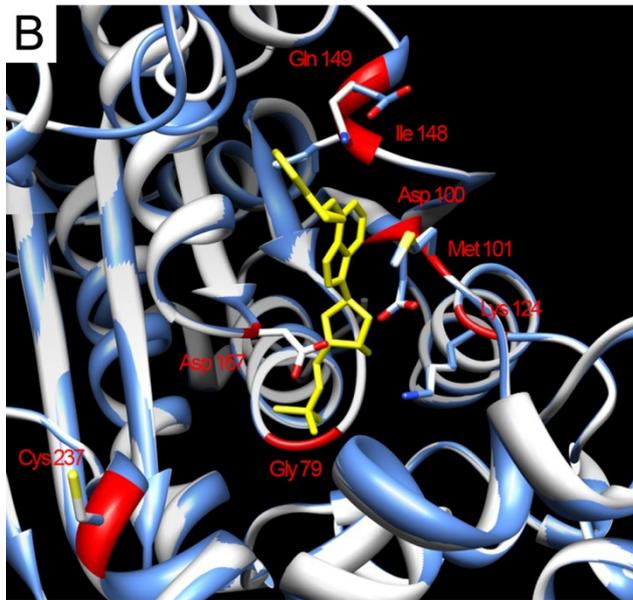
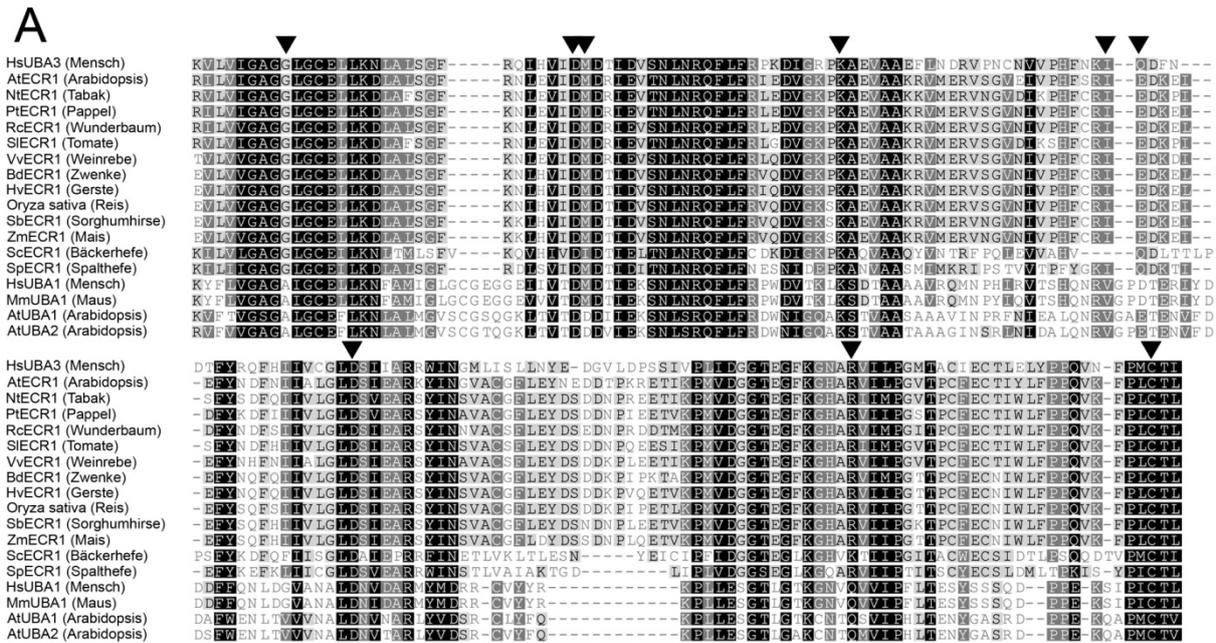
### 3.1 MLN4924 ist ein effizienter Inhibitor der NEDD8-Aktivierung in Pflanzen

#### 3.1.1 Strukturvorhersage der MLN4924-Bindung an ECR1

Zu Beginn dieser Arbeit stand die Frage, ob der für das menschliche System entwickelte Inhibitor der NEDD8-Aktivierung MLN4924 auch in Pflanzen und speziell in *Arabidopsis thaliana* funktionell ist. Um die Wirksamkeit von MLN4924 in Pflanzen vorherzusagen, sollte erst mit bioinformatischen Methoden eine Prognose gestellt werden, ob MLN4924 an die katalytische Untereinheit des NEDD8-aktivierenden Enzyms ECR1 aus Pflanzen binden kann. Dafür wurden die Proteinsequenzen der ECR1-Homologe aus den Pflanzenspezies *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand), *Nicotiana tabacum* (Tabak), *Populus trichocarpa* (Pappel), *Ricinus communis* (Wunderbaum), *Solanum lycopersicum* (Tomate), *Vitis vinifera* (Wein), *Brachypodium distachyon* (Zwenke), *Hordeum vulgare* (Gerste), *Oryza sativa* (Reis), *Sorghum bicolor* (Sorghumhirse) und *Zea mays* (Mais) sowie die Homologe aus den Hefen *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) und *Schizosaccharomyces pombe* (Spaltheife) mit dem menschlichen Homolog HsUBA3 verglichen. Außerdem wurden die Ubiquitinaktivierenden Enzyme aus Mensch (HsUBA1), Maus (MmUBA1) und *Arabidopsis thaliana* (AtUBA1 sowie AtUBA2) in den Vergleich miteinbezogen. Im Alignment in Abbildung 11A ist zu erkennen, dass alle Aminosäuren, die für die Bindung und die Aktivität MLN4924s wichtig sind, in den pflanzlichen UBA3-Homologen konserviert sind (Pfeile). Lediglich ein Glutamin ist durch die ähnliche Aminosäure Glutamat ausgetauscht.

Die hohe Sequenzähnlichkeit zwischen HsUBA3 und AtECR1 machte es möglich, die Tertiärstruktur AtECR1s an Hand der publizierten HsUBA3-Struktur (Brownell et al., 2010) zu modellieren. Das von SWISS-MODEL berechnete AtECR1-Modell weist hohe Ähnlichkeit in der Faltung zu HsUBA3 auf. Insbesondere die Struktur des aktiven Zentrums scheint konserviert und auch die für die Bindung und Aktivität MLN4924s wichtigen Aminosäuren nehmen die gleiche Position ein (Abbildung 11B).

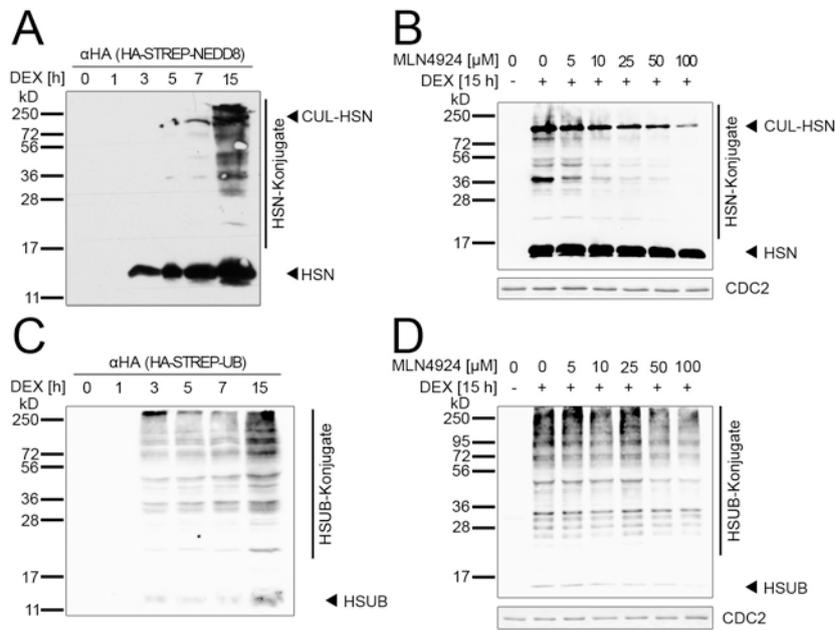
Aufgrund der Ergebnisse der Sequenzanalysen der pflanzlichen Homologe des NEDD8-aktivierenden Enzyms und des Vergleichs des AtECR1-Strukturmodells mit der Struktur HsUBA3s konnte eine positive Prognose für die Wirksamkeit von MLN4924 in *Arabidopsis thaliana* und anderen Pflanzenspezies gestellt werden.



**Abbildung 11: Strukturvorhersage der Bindung MLN4924s an AtECR1.**  
 (A) Alignment der Proteinsequenzen des aktiven Zentrums der katalytischen Untereinheiten des NEDD8-aktivierenden Enzyms aus Mensch (UBA3), mehreren Pflanzenspezies und aus zwei Hefen (ECR1) sowie der Ubiquitin-aktivierenden Enzyme aus Mensch, Maus und *Arabidopsis* (UBA1 und UBA2). Aminosäuren, die für die Bindung und Aktivität MLN4924s wichtig sind, wurden mit einem Pfeil markiert.  
 (B) 3D-Modell von AtECR1 (blau) im Vergleich zur Struktur HsUBA3s (weiß) mit gebundenem MLN4924 (gelb). Wichtige Aminosäuren für die Bindung und Aktivität MLN4924s sind rot gekennzeichnet.

### 3.1.2 Spezifische Inhibition der Neddylierung in *Arabidopsis thaliana* durch MLN4924

Da die Vorhersage für die Wirksamkeit MLN4924s in Pflanzen positiv war, sollte *in vivo* getestet werden, ob die NEDD8-Aktivierung in *Arabidopsis thaliana* durch das kleine Molekül inhibiert werden kann. Dazu wurde eine im Labor generierte, transgene Linie verwendet, die ein Fusionsprotein aus HA-, STREPII-Tag und NEDD8 (HSN) unter der



**Abbildung 12: Spezifische Inhibition der Neddylierung in *Arabidopsis* durch MLN4924.**

(A) und (C) Induktion der HSN- und HSUB- Expression über die Zeit.

(B) und (D) Keimlinge wurden mit verschiedenen MLN4924-Konzentrationen behandelt. 2 h nach Beginn der Behandlung wurde die HSN- und HSUB- Expression durch DEX-Zugabe induziert. Aufgetrennt wurden je 45 μg Protein aus 7 d alten Keimlingen. HSN und HSUB wurden mit einem Antikörper gegen den HA-Tag nachgewiesen. Immunoblots gegen CDC2 dienen als Ladekontrolle.

Kontrolle eines Dexamethason (DEX)-induzierbaren Promotors exprimiert (Aoyama and Chua, 1997). Die Induktion des HSN-Konstrukts und das Erscheinen von mit HSN modifizierten Substraten ließ sich im Western-Blot gut verfolgen (Abbildung 12A). Nach 3 h der DEX-Behandlung ließ sich das unkonjugierte HSN nachweisen. Nach 7 h konnte man die ersten Banden mit höherem Molekulargewicht erkennen, vermeintlich HSN-Konjugate. Eine Vielzahl solcher HSN-Konjugate waren nach 15 h zu sehen. Interessant ist die Beobachtung, dass nicht nur die Culline, die als prominente Bande mit einem Molekulargewicht zwischen 85 und 92 kD erkennbar waren, neddyliert wurden, sondern auch einige Proteine mit anderem Molekulargewicht.

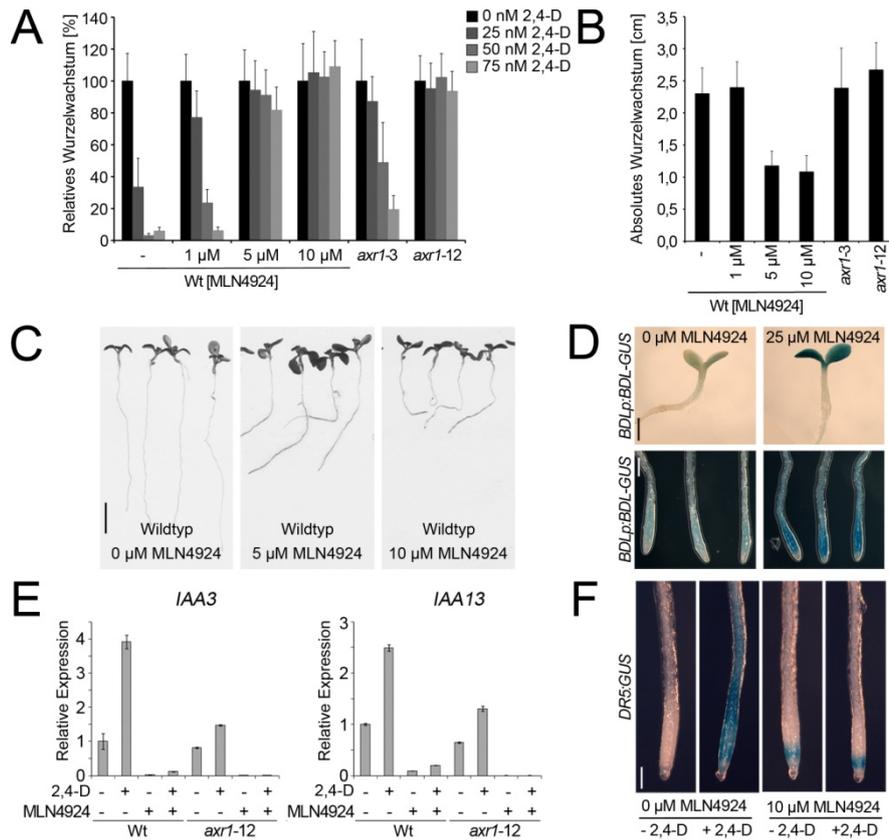
Wurden Keimlinge zusätzlich zu der DEX-Behandlung mit MLN4924 behandelt, so konnten mit steigender MLN4924-Konzentration immer weniger HSN-Konjugate detektiert werden (Abbildung 12B), woraus geschlossen werden kann, dass MLN4924 die Neddylierung in *Arabidopsis* inhibiert. Da sich NEDD8 und Ubiquitin sowie deren aktivierende Enzyme auf Aminosäure-Ebene sehr ähnlich sind, wurde getestet, ob MLN4924 auch die Ubiquitinierung inhibieren kann. Dafür wurde eine Linie verwendet, die analog zu HSN ein HA-STREPII-Ubiquitin-Fusionsprotein (HSUB) unter der Kontrolle eines DEX-induzierbaren Promotors exprimiert. Wie HSN wurde auch HSUB an Substrate konjugiert und stellt bezüglich dieser Eigenschaft ein funktionelles Ubiquitin dar (Abbildung 12C). Diese Konjugation konnte nur durch vergleichsweise hohe MLN4924-Konzentrationen leicht inhibiert werden (Abbildung 12D), woraus geschlossen werden kann, dass MLN4924 weitgehend spezifisch für die Neddylierung ist. Zudem ließe sich die leichte Reduktion der HSUB-konjugierten Proteine bei Behandlung mit hohen MLN4924-Konzentrationen auch damit erklären, dass Cullin-RING-Ubiquitin-Ligasen (CRLs) durch die inhibierte Neddylierung inaktiviert werden. Dadurch wären die CRL-Substrate nicht ubiquitiniert, was ebenfalls zu einer Reduktion an Ubiquitin-konjugierten Proteinen führen würde. Für die Hypothese, dass MLN4924 nicht direkt die Ubiquitinierung inhibiert, spricht auch, dass einige Aminosäuren, die wichtig für die Bindung und Aktivität MLN4924s sind, in den Ubiquitin-aktivierenden Enzymen AtUBA1 und

AtUBA2 nicht konserviert sind (Abbildung 11A). Außerdem hatten *in vitro*-Experimente mit den humanen Proteinen gezeigt, dass MLN4924 spezifischer für das NEDD8-aktivierende Enzym HsUBA3 als für das Ubiquitin-aktivierende Enzym HsUBA1 ist (Soucy et al., 2009). Zusammenfassend sprechen die vorliegenden Daten dafür, dass MLN4924 in *Arabidopsis* spezifisch die Neddylierung inhibiert.

### 3.1.3 Der Auxin-insensitive Phänotyp der Neddylierungsmutanten kann mit MLN4924 hervorgerufen werden

*AUXIN RESISTANT 1 (AXR1)*, die zweite Untereinheit des NEDD8-aktivierenden Enzyms, war eines der ersten Gene der Neddylierung, das kloniert wurde (Leyser et al., 1993). Es war in einem Screen identifiziert worden, in dem nach Mutanten gesucht wurde, die insensitive auf exogene Gaben des Phytohormons Auxin reagieren (Estelle and Somerville, 1987; Lincoln et al., 1990). Auch Mutanten aller weiterer bekannter Komponenten der Neddylierung zeigen eine Resistenz gegenüber Auxin: NEDD8/RUB1/2 (Bostick et al., 2004), ECR1 (Woodward et al., 2007) und RCE1 (Dharmasiri et al., 2003; Larsen and Cancel, 2004). Dieser Phänotyp kann dadurch erklärt werden, dass die Neddylierung und damit die Aktivierung der E3-Ubiquitinligasen SCF<sup>TIR1/AFB1-5</sup> essenziell für den Auxinsignalweg ist. Auxin wird durch TIR1/AFB1-5 und die Repressoren des Auxinsignalwegs Aux/IAAs gebunden, was zu einer Ubiquitinierung der Aux/IAA-Substrate durch SCF<sup>TIR1/AFB1-5</sup> und zu deren Abbau durch das Proteasom führt. Die ARF-Transkriptionsfaktoren, die in der Abwesenheit Auxins durch die Aux/IAAs gehemmt werden, werden aus der Repression entlassen und können die Auxinantwort auslösen.

Wenn MLN4924 die Neddylierung tatsächlich inhibiert, sollte es in der Lage sein, einen zu Neddylierungsmutanten vergleichbaren Auxin-insensitiven Phänotyp hervorzurufen. Um diese Hypothese zu testen, wurde die Tatsache ausgenutzt, dass das künstliche Auxin 2,4-D das Wurzelwachstum von Keimlingen inhibiert. Dafür wurden 4 d alte Keimlinge auf Medium mit MLN4924 und 2,4-D in verschiedenen Konzentrationen überführt. Nach weiteren 4 d wurde die Zunahme der Wurzellänge quantifiziert. In Abhängigkeit der MLN4924-Konzentration zeigten die Keimlinge ein Auxin-unabhängiges Wurzelwachstum, vergleichbar zu der *axr1*-Mutante *axr1-12* (Abbildung 13A). *axr1-12* ist ein starkes *axr1*-Allel, das durch eine Punktmutation im 11. Exon ein verfrühtes Stopcodon trägt (Leyser et al., 1993). *axr1-3* ist im Vergleich zu *axr1-12* ein schwaches Allel, bei dem durch eine Punktmutation, Cystein 154 durch ein Tyrosin ausgetauscht ist (Leyser et al., 1993). Interessant ist auch die Beobachtung, dass MLN4924 selbst konzentrationsabhängig das Wurzelwachstum inhibiert (Abbildung 13B), ein Phänotyp, der auch von den starken Mutanten des NEDD8-aktivierenden Enzyms *axr1-12/axr1-12 axl-1/AXL* (Dharmasiri et al., 2007) und *ecr1-1* (Woodward et al., 2007) bekannt ist. Ein weiterer Wurzelphänotyp, der durch MLN4924 hervorgerufen wurde und ebenfalls einen Bezug zu einer gestörten Auxinantwort hat, ist das agravitrope Wachstum (Abbildung 13C). Eine Behandlung mit MLN4924 kann also typische Auxin-insensitive Phänotypen hervorrufen. Dies unterstützt die Hypothese weiter, dass MLN4924 die NEDD8-Aktivierung in *Arabidopsis* inhibieren kann.



**Abbildung 13: Induktion eines Auxin-insensitiven Phänotyps durch MLN4924.**

(A) Zunahme der Wurzellänge von Keimlingen, die im Alter von 4 d auf Medium mit verschiedenen Konzentrationen MLN4924 und 2,4-D umgesetzt wurden. Nach weiteren 4 d wurde die Zunahme der Wurzellänge quantifiziert. *axr1-3* und *axr1-12* sind jeweils ein schwaches und ein starkes *axr1*-Allel. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung relativ zur Kontrolle ohne 2,4-D. ( $n \geq 15$ ).

(B) Absolute Zunahme der Wurzellänge der in (A) analysierten Keimlinge. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung.

(C) Agravitropes Wurzelwachstum 8 d alter Keimlinge, die 4 d auf Medium ohne MLN4924 und 4 d mit MLN4924 gewachsen sind. Balken = 5 mm.

(D) Fotos 5 d alter Keimlinge, die das Konstrukt *BDLp:BDL-GUS* exprimieren. Keimlinge wurden für 24 h in flüssiges GM mit 25  $\mu\text{M}$  MLN4924 (oder der gleichen Konzentration an Lösungsmittel) inkubiert und anschließend GUS gefärbt. Balken oben = 5 mm, Balken unten = 0,2 mm.

(E) Analyse der Expression der Gene *IAA3*/*SHY2* und *IAA13* mittels qRT-PCR. Die Keimlinge wurden für 8 d auf Medium mit 50  $\mu\text{M}$  MLN4924 angezogen und dann für 45 min mit 50  $\mu\text{M}$  2,4-D behandelt. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler. Daten von René Richter.

(F) Fotos von Wurzeln 7 d alter Keimlinge, die 24 h mit 10  $\mu\text{M}$  MLN4924, anschließend zusätzlich für 2 h mit 5  $\mu\text{M}$  2,4-D behandelt und dann GUS gefärbt wurden. Balken = 0,2 mm.

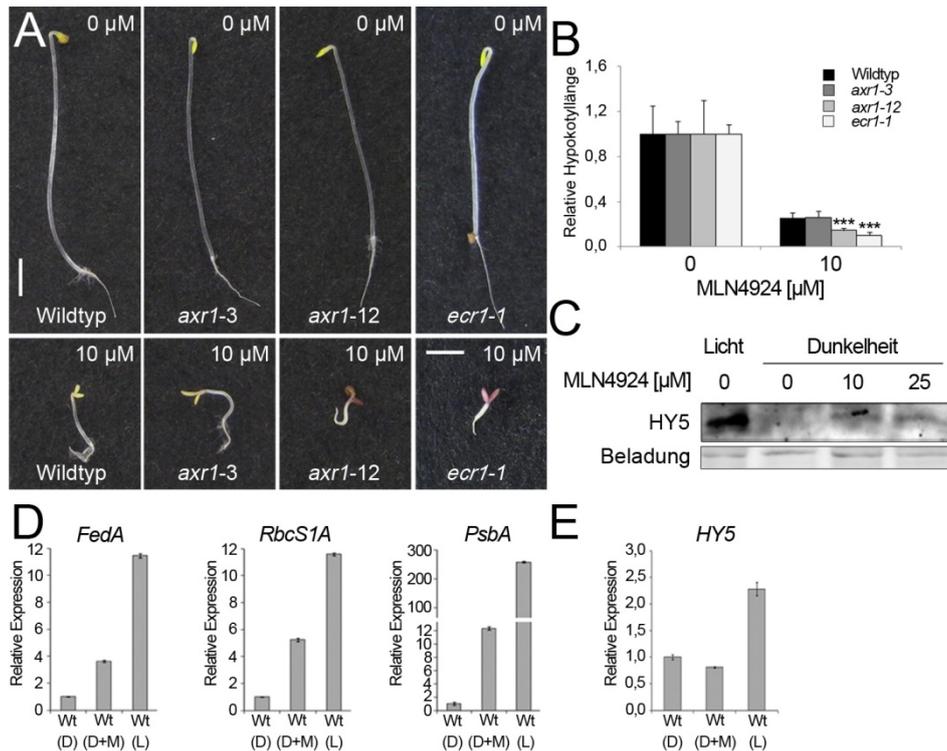
Da die Auxin-Insensitivität der Neddylierungsmutanten durch eine Stabilisierung der Repressoren des Auxinsignalwegs, den Aux/IAAs, erklärt werden kann, kann man annehmen, dass auch MLN4924 diese Proteine stabilisiert. Als nächstes sollte daher auf molekularer Ebene untersucht werden, ob die Abundanz der Aux/IAAs tatsächlich durch MLN4924 verändert wird. Dafür wurde eine Linie verwendet, die das Aux/IAA BODENLOS (BDL)/IAA12 als Fusion mit dem Enzym  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) unter dem eigenen Promotor exprimiert (Weijers et al., 2005). Durch die Behandlung mit MLN4924 wurde BDL sowohl in den Keimblättern wie auch in der Wurzel stabilisiert, was durch eine höhere GUS-Aktivität und damit mit einer stärkeren Blaufärbung sichtbar gemacht wurde (Abbildung 13D). Da die Aux/IAAs in Anwesenheit MLN4924s nicht mehr abgebaut werden können, sollte auch die Expression der Gene verändert sein, die durch Aux/IAAs und ARFs reguliert

werden. Zu diesen Genen zählen *IAA3/SHY2* und *IAA13*. Die Expression dieser beiden Gene und deren Induzierbarkeit durch Auxin wurde durch MLN4924 stark reduziert, ein Effekt der im genetisch sensibilisierten Hintergrund der *axr1-12*-Mutante noch verstärkt wurde (Daten von René Richter, Abbildung 13E). Genauso wurde die Auxininduktion des oft verwendeten Reporters des Auxinsignalwegs, *DR5:GUS*, durch MLN4924 inhibiert (Abbildung 13F). Auf molekularer Ebene ist MLN4924 also in der Lage, Aux/IAAs zu stabilisieren und damit die Auxin-regulierte Genexpression zu stören.

Dies verdeutlicht, dass MLN4924 durch die Inhibition der Neddylierung der E3-Ubiquitinligase SCF<sup>TIR1/AFB1-5</sup>, die Ubiquitinierung und damit den Abbau der Aux/IAA-Repressoren verhindert, was zu einer veränderten Genexpression in Antwort auf Auxin und damit schlussendlich zu Auxin-insensitiven Phänotypen der Pflanze führt.

### 3.1.4 MLN4924 stabilisiert die Substrate weiterer CRLs

CRLs haben eine Vielzahl von Substraten, die zum Teil bekannt, aber größtenteils unbekannt sind. CRLs regulieren damit viele verschiedene biologische Prozesse. So ist die Etiolierung von Keimlingen im Dunkeln ein gut charakterisierter Prozess, der unter anderem die Aktivität der CRL CUL4-DDB1<sup>COP1-SPA</sup> benötigt. Positive Regulatoren der Photomorphogenese, wie der Transkriptionsfaktor HY5, werden durch CUL4-DDB1<sup>COP1-SPA</sup> in Abwesenheit von Licht ubiquitiniert und über das Proteasom abgebaut (Osterlund et al., 2000; Saijo et al., 2003; Chen et al., 2010). Der resultierende Phänotyp im Dunkeln gewachsener Keimlingen ist ein langes Hypokotyl mit einem Hypokotylhaken und geschlossenen Keimblättern. Mutanten der Lichtsignaltransduktion, wie die *constitutive photomorphogenic (cop)*-Mutanten, weisen einen lichtgewachsenen Phänotyp auch im Dunkeln auf: sie haben ein kurzes Hypokotyl und geöffnete Keimblätter. Da der zentrale Regulator des Lichtsignalwegs eine CRL ist und diese ebenfalls durch die Modifikation mit NEDD8 aktiviert wird, liegt die Hypothese nahe, dass eine MLN4924-Behandlung im Dunkeln wachsender Keimlinge zu deren Photomorphogenese führt. Tatsächlich zeigten Keimlinge, die im Dunkeln auf MLN4924-haltigem Medium gewachsen waren, typische Charakteristika eines lichtgewachsenen Phänotyps (Abbildung 14A und B). Beachtenswert hierbei ist, dass Keimlinge mit einer Mutation in den Untereinheiten des NEDD8-aktivierenden Enzyms, hypersensitiv auf MLN4924 reagierten, zumindest wenn sie ein starkes Allel trugen (*axr1-12* und *ecr1-1*). Diese Hypersensitivität drückte sich nicht nur in einem kürzeren Hypokotyl aus, sondern ebenfalls in der Akkumulation von Anthocyanen in den Keimblättern, ein Phänotyp, der auch für Mutanten des COP9-Signalosom beschrieben ist (Wei et al., 1994; Staub et al., 1996; Karniol et al., 1999; Serino et al., 1999; Peng et al., 2001; Serino et al., 2003; Dohmann et al., 2005). Des Weiteren führte die Behandlung im Dunkeln wachsender Keimlingen mit MLN4924 zur Zunahme des HY5-Proteins (Abbildung 14C), die nicht durch eine verstärkte Transkription erklärt werden konnte (Daten von René Richter, Abbildung 14E), sondern wahrscheinlich durch die Inhibition der Ubiquitinligase CUL4-DDB1<sup>COP1-SPA</sup> hervorgerufen wurde. In Einklang damit war zu beobachten, dass die stärkere Abundanz des HY5-Proteins mit der verstärkten Expression lichtregulierter Gene korrelierte (Daten von René Richter, Abbildung 14D).



**Abbildung 14: Induktion eines lichtgewachsenen Phänotyps im Dunkeln durch MLN4924.**

(A) Fotos von Keimlingen, die 4 d auf 1/2 MS ohne und mit 10 µM MLN4924 gewachsen sind.

(B) Quantifizierung der Hypokotyllängen Dunkel-gewachsener Keimlinge wie in (A). Gezeigt sind die Hypokotyllängen im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung, \*\*\* T-Test Signifikanz ( $P < 0,005$ ).

(C)  $\alpha$ HY5-Western-Blot mit Gesamtproteinextrakten (20 µg) aus Keimlingen, die für 4 d im Dunkeln auf 1/2 MS mit MLN4924 gewachsen sind. Als Ladekontrolle dient eine kreuzreagierende Bande.

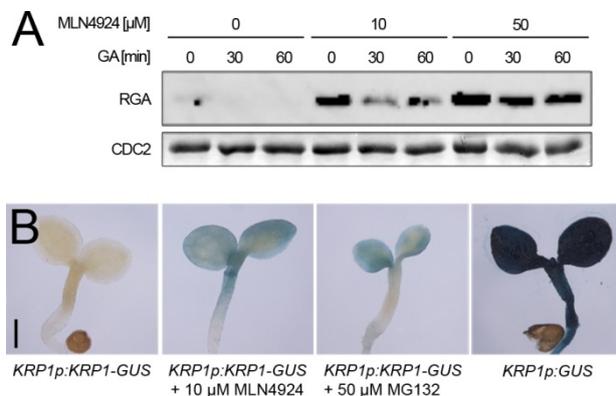
(D) und (E) qRT-PCR-Analyse der Expression der Gene die für Ferredoxin A (*FedA*), die kleine Untereinheit der Ribulosebiphosphatcarboxylase 1A (*RbcS1A*), die D1 Untereinheit des Photosystems II (*PsbA*) (D) und HY5 (E) codieren. D – Dunkel-gewachsen, D+M – auf Medium mit 10 µM MLN4924 im Dunkeln gewachsen, L – Licht-gewachsen. Es wurde mit der unbehandelten Kontrolle normalisiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler. Daten von René Richter.

Um den inhibitorischen Effekt MLN4924s auf CRLs weiter zu belegen, wurden zwei weitere SCF-Ubiquitinligase-Substrate untersucht: RGA und KRP1. RGA ist ein Repressor der GA-Signaltransduktion und wird in Abhängigkeit von GA durch die CRL SCF<sup>S<sup>LY1</sup>/S<sup>NE</sup></sup> ubiquitiniert und anschließend über das Proteasom abgebaut (Dill et al., 2004). Wenn MLN4924 die Neddylierung aller CRLs inhibiert, sollte auch die Aktivität von SCF<sup>S<sup>LY1</sup>/S<sup>NE</sup></sup> durch eine MLN4924-Behandlung gestört werden. Um die Wirkung MLN4924s auf den GA-Signalweg zu testen, wurden Keimlinge für 8 d auf MLN4924-haltigem Medium angezogen und anschließend mit GA in Kombination mit MLN4924 behandelt. Ein Western-Blot zeigte, dass die Behandlung mit MLN4924 zu einer Akkumulation des DELLA-Proteins RGA geführt hatte (Abbildung 15). Außerdem konnte RGA in Anwesenheit des Inhibitors durch einen Stimulus mit GA nicht mehr destabilisiert werden. Dies verdeutlicht, dass MLN4924 auch den GA-Signalweg inhibiert, indem es den proteasomalen Abbau der DELLA-Repressoren verhindert.

Der Cyclin-abhängige Kinaseinhibitor KRP1 ist ein Repressor der Zellteilung. Die *KRP1*-Expression ist in Keimblättern und im Hypokotyl sehr stark, doch wird das KRP1-Protein beständig durch die RING-Ubiquitinligase RKP und die CRL SCF<sup>S<sup>KP2b</sup></sup> ubiquitiniert und

anschließend abgebaut (Ren et al., 2008). Im Gegensatz zu SCF-Komplexen ist für RKP keine Modifikation mit NEDD8 beschrieben. MLN4924 sollte also nur die Ubiquitinierung KRP1s über SCF<sup>SKP2b</sup> inhibieren, nicht aber über RKP. Mit MLN4924 sollte es daher möglich sein, zwischen den beiden Wegen zu diskriminieren, um zu untersuchen, welche Rolle die beiden E3-Ubiquitinligasen für die Regulation der KRP1-Proteinstabilität spielen. Die Diskrepanz zwischen starker *KRP1*-Expression und geringer KRP1-Proteinstabilität lässt sich besonders anschaulich mit dem Vergleich einer transkriptionellen und einer translationalen Fusion KRP1s mit dem Reporterenzym GUS zeigen. Während Keimlinge, die die transkriptionelle Fusion *KRP1p:GUS* exprimierten, eine sehr starke Färbung zeigten, war in Keimlingen, die die translationale Fusion *KRP1p:KRP1-GUS* exprimierten, gar keine Färbung zu sehen, da das ansonsten stabile GUS zusammen mit KRP1 abgebaut wurde (Abbildung 15B) (Ren et al., 2008). Wurden Keimlinge jedoch mit dem Proteasominhibitor MG132 oder mit MLN4924 behandelt, wurde KRP1 stabilisiert und es ließ sich eine leichte Färbung feststellen. Da die Inhibition des KRP1-Proteinabbaus durch MLN4924 mit der generellen Inhibition des Proteasoms durch MG132 vergleichbar war, kann angenommen werden, dass KRP1 hauptsächlich durch SCF<sup>SKP2b</sup> für den proteasomalen Abbau markiert wird und RKP dabei eine untergeordnete Rolle spielt.

Die vorliegenden Ergebnisse beweisen indirekt, dass MLN4924 die NEDD8-Aktivierung in *Arabidopsis thaliana* inhibiert, da es die Aktivitäten verschiedener CRLs hemmt und damit die Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau deren Substrate blockiert.



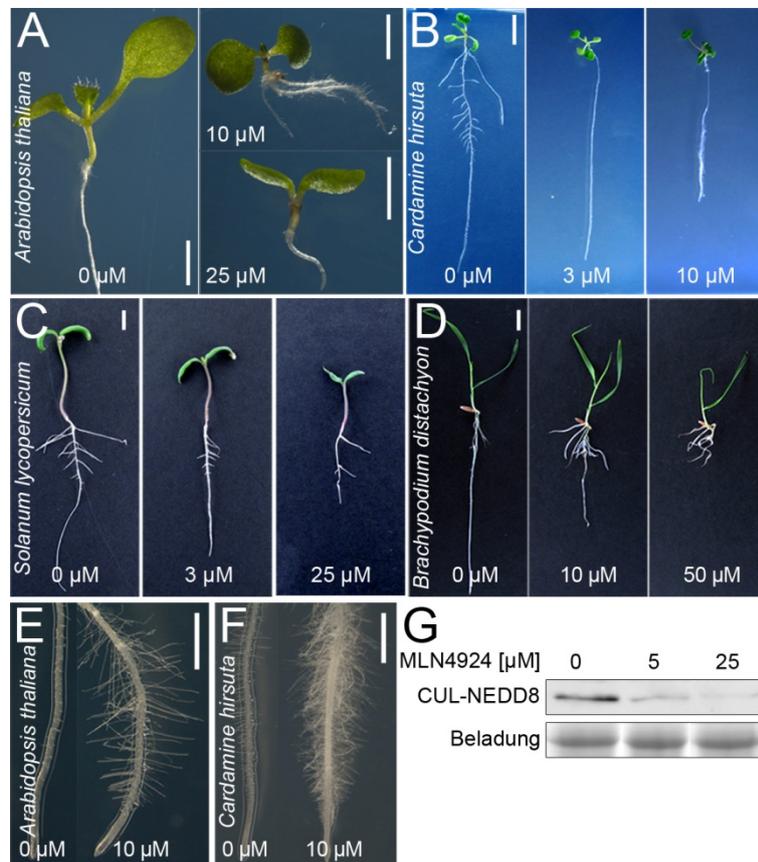
**Abbildung 15: Inhibition des SCF<sup>Sly1/SNE</sup>- und SCF<sup>SKP1b</sup>-abhängigen Proteinabbaus durch MLN4924.**

(A)  $\alpha$ RGA-Western-Blot von Gesamtproteinextrakten aus Keimlingen, die 8 d auf GM mit MLN4924 gewachsen sind und dann mit 100  $\mu$ M GA3 behandelt wurden. CDC2 dient als Ladekontrolle.

(B) Fotos 4 d alter, GUS gefärbter Keimlinge die entweder *KRP1p:KRP1-GUS* oder *KRP1p:GUS* exprimieren. Die Keimlinge wurden für 24 h mit 10  $\mu$ M MLN4924 bzw. für 8 h mit 50  $\mu$ M MG132 behandelt und anschließend GUS gefärbt. Balken = 5 mm.

### 3.1.5 MLN4924 inhibiert die Neddylierung in weiteren Pflanzenspezies

Da MLN4924 ein effizienter Inhibitor der Neddylierung in *Arabidopsis thaliana* zu sein scheint und das Alignment der katalytischen Untereinheit der NEDD8-aktivierenden Proteine aus verschiedenen Pflanzenspezies zeigt, dass alle wichtigen Aminosäuren für die Bindung und Aktivität MLN4924s konserviert sind (Abbildung 11A), wurde angenommen, dass MLN4924 auch in anderen Pflanzenspezies funktionell ist. Dies würde den großen Vorteil mit sich bringen, dass die Rolle der Neddylierung mit Hilfe von MLN4924 auch in Pflanzenspezies untersucht werden könnte, für die es keine Mutanten der Neddylierung gibt. Daher wurde das Wachstum von *Cardamine hirsuta* (Behaartes Schaumkraut), *Solanum lycopersicum* (Tomate) und *Brachypodium distachyon* (Zwenke) auf Medium mit MLN4924 mit dem von *Arabidopsis thaliana* verglichen (Abbildung 16). Es stellte sich heraus, dass die verschiedenen Pflanzenspezies zum Teil gemeinsame, zum Teil unterschiedliche Phänotypen



**Abbildung 16: Induktion charakteristischer Phänotypen in anderen Pflanzenspezies durch MLN4924.**

(A) Phänotyp 8 d alter *Arabidopsis thaliana*-Keimlinge, die auf GM mit MLN4924 gewachsen sind. Balken = 2 mm.

(B) Phänotyp 14 d alter *Cardamine hirsuta*-Keimlinge, die 6 d auf GM ohne und dann weitere 8 d auf GM mit MLN4924 gewachsen sind. Balken = 1 cm.

(C) Phänotyp 10 d alter Tomatenkeimlinge, die 6 d im Dunkeln auf GM ohne und weitere 4 d im Licht auf GM mit MLN4924 gewachsen sind. Balken = 1 cm.

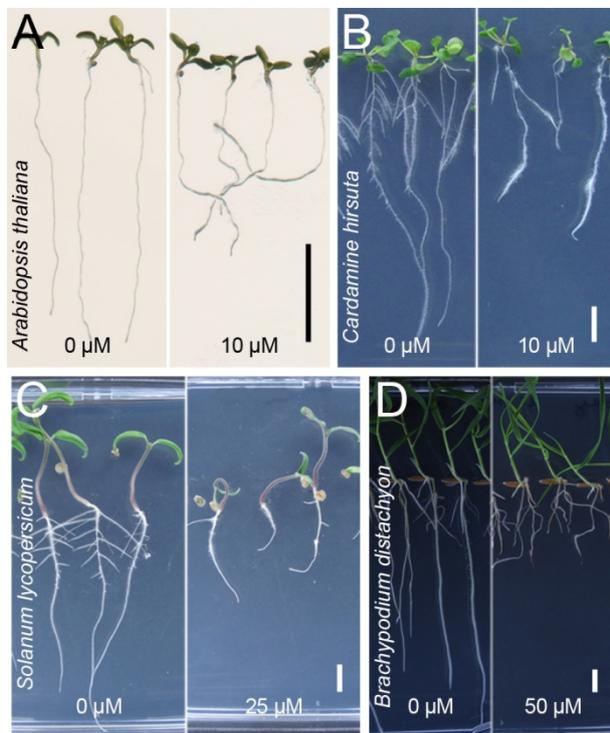
(D) Phänotyp 11 d alter *Brachypodium distachyon*-Keimlinge, die 1 d auf GM ohne und weitere 10 d auf GM mit MLN4924 gewachsen sind. Balken = 1 cm.

(E) Wurzeln 8 d alter *Arabidopsis thaliana*-Keimlinge, angezogen wie in (A) beschrieben. Balken = 100 µm.

(F) Wurzeln 14 d alter *Cardamine hirsuta*-Keimlinge, angezogen wie in (B) beschrieben. Balken = 200 µm.

(G) Nachweis von CUL-NEDD8-Konjugaten aus *Cardamine* mittels  $\alpha$ NEDD8-Western-Blot. Als Ladekontrolle dient eine mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbte Proteinbande.

zeigten. So wurde in allen untersuchten Spezies in Abhängigkeit der Konzentration eine Reduktion des Wachstums der Primär- und der Seitenwurzeln beobachtet (Abbildung 16A-D). Die Initiation der Seitenwurzeln war besonders in *Cardamine* gestört und in *Arabidopsis* sowie *Brachypodium* wurde durch MLN4924 die Bildung von Adventivwurzeln ausgelöst. Eine verstärktes Wurzelhaarwachstum konnte in *Arabidopsis* und *Cardamine*, aber nicht in Tomate und *Brachypodium* beobachtet werden (Abbildung 16E und F). Unterschiedlich stark ausgeprägt war auch das agravitrope Wurzelwachstum auf Medium mit MLN4924 (Abbildung 17). Außerdem zeigte sich, dass für die verschiedenen Pflanzenspezies unterschiedliche MLN4924-Konzentrationen nötig waren, um eine vergleichbare Reaktion auszulösen. Größtenteils ließen sich die beobachteten Phänotypen durch die Inhibition von CRLs erklären, die unter anderem eine sehr wichtige Rolle in Hormonsignalwegen haben. In *Cardamine* ließ sich eine reduzierte Neddylierung der Culline auf molekularer Ebene zeigen, da der NEDD8-Antikörper aus *Arabidopsis* auch mit *Cardamine* NEDD8 kreuzreagierte (Abbildung 16G).



**Abbildung 17: MLN4924-verursachtes, agravitropes Wurzelwachstum in verschiedenen Pflanzenspezies.**

Fotos von *Arabidopsis thaliana*- (A), *Cardamine hirsuta*- (B), *Solanum lycopersicum*- (C) und *Brachypodium distachyon*- (D) Keimlingen. *Arabidopsis*-Keimlinge sind, wie in Abbildung 13C beschrieben herangezogen worden. Die Keimlinge von *Cardamine hirsuta*, *Solanum lycopersicum* und *Brachypodium distachyon* sind wie in Abbildung 16 beschrieben gewachsen. Balken = 1 cm.

### 3.1.6 NEDD8 scheint neben den Cullinen weitere Substrate in *Arabidopsis thaliana* zu haben

Die Cullinuntereinheit der CRL sind bis dato die einzigen bekannten NEDD8-Substrate in Pflanzen, während in Menschen bereits einige weitere neddylierte Proteine charakterisiert sind. Es scheint jedoch so, als gäbe es auch in *Arabidopsis thaliana* zusätzliche NEDD8-modifizierte Proteine, da nach der Induktion des HA-STREPII-NEDD8-Konstrukts mit DEX viele Proteine mit einer größeren Molekularmasse als HSN im  $\alpha$ HA-Western-Blot auftauchen (Abbildung 12A). Da es sich bei den Cullinen um relativ große Proteine (zwischen 85 und 92 kD) handelt und es auch viele HSN-Konjugate zu geben scheint, die ein anderes Molekulargewicht aufweisen, liegt die Hypothese nahe, dass die Culline nicht die einzigen

Substrate der Neddylierung in *Arabidopsis* sind. Um diese Substrate zu identifizieren, wurden HSN und seine Konjugate mit Hilfe des Streptavidin-Biotin-Systems unter nativen Bedingungen aufgereinigt, tryptisch verdaut und mittels LC-MS/MS analysiert. Dieser Versuch wurde zweimal durchgeführt. Nur Proteine, die ausschließlich in der HSN-Probe vorkamen und nicht in der Wildtyp-Kontrolle gefunden wurden und die mit mindestens zwei Peptiden identifiziert wurden, wurden als mögliche NEDD8-Substrate angesehen. Insgesamt entsprachen 149 Proteine diesen Kriterien (siehe Appendix). Identifiziert wurden Untereinheiten der Neddylierung (NEDD8, AXR1, AXL, ECR1) sowie die bekannten NEDD8-Substrate CUL1, CUL3A, CUL3B und CUL4, was zeigt, dass die Anreicherung NEDD8s und assoziierter Proteine erfolgreich war. Es wurden außerdem viele Proteine identifiziert, die nicht als NEDD8-Substrate beschrieben waren. Diese ließen sich in zwei Kategorien einteilen. Erstens wurden einige Proteine identifiziert, die möglicherweise mit den zuvor genannten Proteinen mit aufgereinigt wurden, da sie mit NEDD8 oder den NEDD8-modifizierten Cullinen interagieren. Dazu zählen zum Beispiel die Untereinheiten der CRL RBX1, ASK1, F-BOX Proteine und DCAF Proteine sowie Untereinheiten des Proteasoms. Zweitens wurden Proteine identifiziert, die nicht mit dem Ubiquitin-Proteasom-System assoziiert sind, wie Proteine, die in der Proteinfaltung, in der Translation, im interzellulären Transport, in Signaltransduktionswegen oder im Metabolismus eine Rolle spielen. Diese Proteine sind möglicherweise NEDD8-Substrate oder interagieren mit neddylierten Proteinen. Dies verstärkt die Hypothese, dass es neben den Cullinen andere NEDD8-Substrate in *Arabidopsis thaliana* gibt.

## 3.2 Das MD-2-related lipid-recognition domain containing protein ML3 ist ein neues Substrat der Neddylierung

### 3.2.1 Identifizierung neuer NEDD8-Substrate in *Arabidopsis*

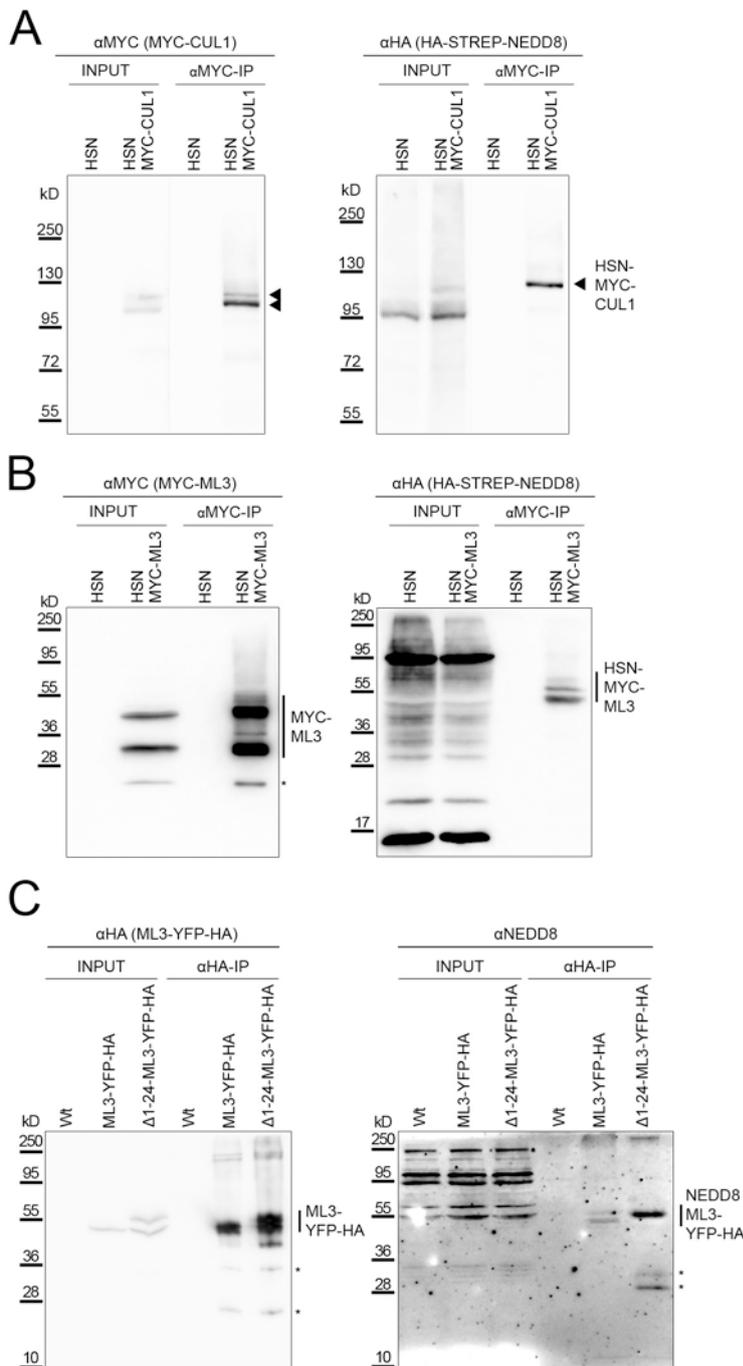
Durch die Aufreinigung und die anschließende massenspektrometrische Analyse von HSN und HSN-konjugierten Proteinen war es gelungen, viele putative NEDD8-Substrate zu identifizieren (Kapitel 3.1.6). Da es aufgrund der großen Anzahl nicht möglich war, alle Proteine daraufhin zu testen, ob es sich tatsächlich um NEDD8-Substrate handelt, wurden 22 Proteine aus der Liste für weitere Untersuchungen ausgewählt. Darunter befand sich das bekannte Substrat CUL1 als Positivkontrolle, NEDD8 selbst, um zu testen, ob es mehrfach neddylierte Substrate bzw. NEDD8-Ketten in *Arabidopsis* gibt, sowie weitere Proteine mit bekannter oder unbekannter Funktion (Tabelle 17). Um die Proteine später im Western-Blot nachweisen zu können, wurden sie N-terminal mit fünf MYC-Tags versehen und das Konstrukt wurde in *Arabidopsis*pflanzen transformiert, die bereits das HSN-Konstrukt trugen. Von drei Konstrukten wurden keine Transformanten erhalten und von weiteren drei Konstrukten exprimierte kein Transformant das Fusionsprotein. Schlussendlich konnten 16 Proteine daraufhin getestet werden, ob sie tatsächlich NEDD8-modifiziert sind (in Tabelle 17 mit einem Plus gekennzeichnet). Dafür wurden die MYC-getaggten Proteine immunpräzipitiert und mit einem Antikörper gegen den HA-Tag wurde auf eine mögliche Modifikation mit HSN getestet. Es zeigte sich, dass neben dem bereits bekannten Substrat CUL1 auch das MD-2-related lipid-recognition domain containing protein ML3 neddyliert ist

**Tabelle 17: Liste der klonierten, putativen NEDD8-Substrate.**

AGI Code	Gen	
AT4G02570	CULLIN1	+
AT3G01090	ARABIDOPSIS SNF1 KINASE HOMOLOG 10	+
AT5G46760	Basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	+
AT3G09840	CELL DIVISION CYCLE 48A	+
AT3G09440	Heat shock cognate 70 kDa protein 3 (HSC70-3)	
AT5G42020	Luminal binding protein BIP2	
AT1G31340	NEDD8	+
AT2G38380	Peroxidase 22 (PER22)	+
AT2G42600	PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE 2	
AT2G20140	Putative 26S proteasome regulatory subunit 4	+
AT2G44100	RAB GDP DISSOCIATION INHIBITOR	+
AT3G59920	RAB GDP DISSOCIATION INHIBITOR 2	+
AT5G67360	Serine-type endopeptidase (ARA12)	
AT5G15550	Transducin family protein / WD-40 repeat family protein	+
AT5G60390	Translation elongation factor (Elongation factor 1-alpha)	+
AT3G62980	TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1) F-box protein	+
At3G52590	UBIQUITIN	
AT1G78900	VACUOLAR ATP SYNTHASE SUBUNIT A	
AT2G26770	Unbekannte Funktion	+
AT4G20260	Unbekannte Funktion	+
AT3G16640	Unbekannte Funktion	+
AT5G23820	Unbekannte Funktion (MD-2-related lipid recognition domain containing protein / ML3)	+

(siehe unten). Für alle weiteren Proteine konnte die Neddylierung nicht bestätigt werden. Auch wurden keine Kettenbildung und mehrfach Neddylierungen detektiert. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass im Einzelfall zu wenig Protein aufgereinigt wurde, um die Neddylierung nachzuweisen. Da neben CUL1 nur die NEDD8-Modifikation eines weiteren Proteins bestätigt werden konnte (siehe unten), ist davon auszugehen, dass die Liste der putativen NEDD8-Substrate viele Proteine enthält, die nicht selbst neddyliert werden, sondern mit solchen interagieren. Die Ursache dafür kann in der Aufreinigung unter nativen Bedingungen gesehen werden.

Als Positivkontrolle für den gewählten experimentellen Ansatz wurde CUL1 verwendet, ein gut charakterisiertes NEDD8-Substrat in *Arabidopsis*. Für MYC-CUL1 wurden im Western-Blot zwei Formen detektiert, die nach der  $\alpha$ MYC-IP noch deutlicher zu erkennen waren



**Abbildung 18: ML3 wird neddyliert.**

(A)  $\alpha$ MYC-IP von MYC-CUL1 aus 7 d alten Keimlingen, die über Nacht mit DEX behandelt worden sind. Linke Seite: Nachweis MYC-CUL1s vor und nach der IP. Die Pfeile markieren die unmodifizierte und die neddylierte Form MYC-CUL1s. Rechte Seite: Nachweis von HSN vor und nach der IP.

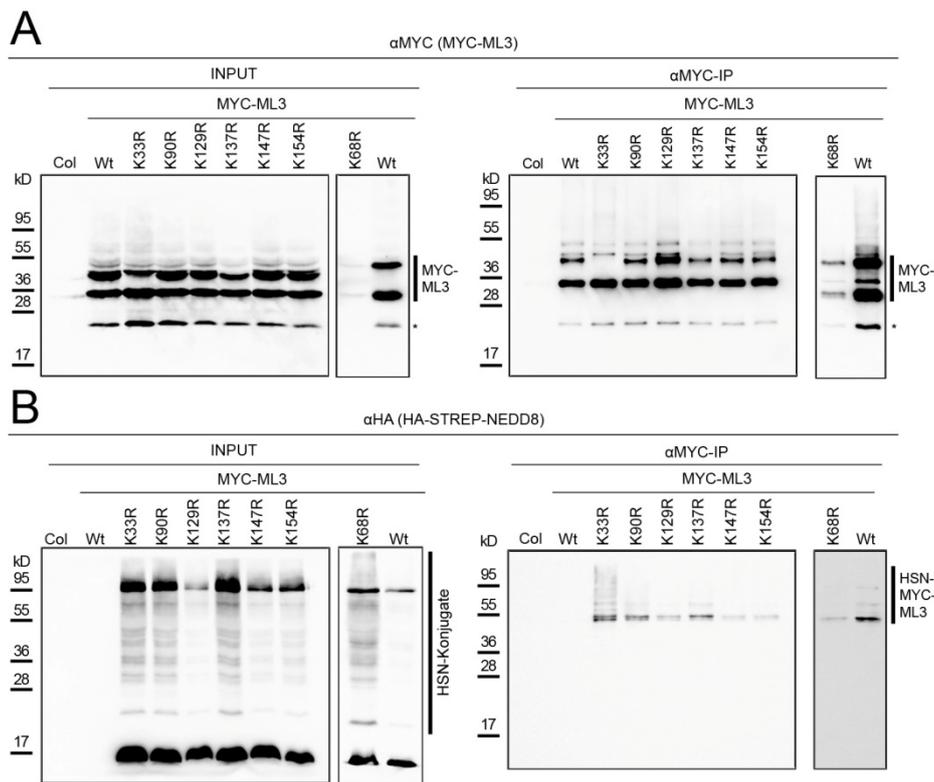
(B)  $\alpha$ MYC-IP von MYC-ML3 aus 7 d alten Keimlingen, die über Nacht mit DEX behandelt worden sind. Linke Seite: Nachweis von MYC-ML3 vor und nach der IP. Das Sternchen markiert ein Abbauprodukt MYC-ML3s. Rechte Seite: Nachweis von HSN vor und nach der IP.

(C)  $\alpha$ HA-IP von ML3-YFP-HA und  $\Delta$ 1-24-ML3-YFP-HA aus 7 d alten Keimlingen. Linke Seite: Nachweis von ML3-YFP-HA und  $\Delta$ 1-24-ML3-YFP-HA vor und nach der IP. Die Sternchen markieren Abbauprodukte von ML3-YFP-HA und  $\Delta$ 1-24-ML3-YFP-HA. Rechte Seite: Nachweis von NEDD8 und neddylierten Proteinen vor und nach der IP. Die Sternchen markieren Abbauprodukte von neddyliertem  $\Delta$ 1-24-ML3-YFP-HA.

(Abbildung 18A). Mit Hilfe eines  $\alpha$ HA-Western-Blots konnte dann gezeigt werden, dass es sich bei der oberen Bande um die HSN-konjugierte CUL1-Form handelt. Die MYC-CUL1-Form mit dem kleineren Molekulargewicht stellt somit die unmodifizierte Variante des Proteins dar. Da die NEDD8-Modifikation CUL1s bestätigt werden konnte, beweist dies, dass der verwendete experimentelle Ansatz funktionell ist.

Das MD-2-related lipid-recognition domain containing protein ML3 war trotz seines kleinen Molekulargewichts von etwa 18 kD mit vielen Peptiden (40 bzw. 51) in der massenspektrometrischen Analyse identifiziert worden (siehe Appendix). Das Fusionsprotein MYC-ML3 zeigt im Western-Blot zwei dominante Banden von etwa 32 und 44 kD (Abbildung 18B). Da das berechnete Molekulargewicht für MYC-ML3 bei 28,3 kD liegt, ist es wahrscheinlich, dass es sich bei der 32 kD großen Form um das unmodifizierte Volllängenprotein handelt. Nach der IP von MYC-ML3 sind mindestens zwei HSN-modifizierte Varianten MYC-ML3s zu sehen, was nahelegt, dass es sich bei ML3 tatsächlich um ein NEDD8-Substrat handelt.

Sequenzanalysen des zuvor uncharakterisierten Proteins ergaben, dass ML3 N-terminal ein Signalpeptid für den Import in das ER trägt. Da ein N-terminaler Protein-Tag möglicherweise



**Abbildung 19: Neddylierung von ML3-Lysinmutanten.**

$\alpha$ MYC-IP von MYC-ML3 (Wt) und MYC-ML3 Varianten in denen ein Lysin (K) zu einem Arginin (R) mutiert wurde. Es wurden 7 d alte, über Nacht mit DEX-behandelte Keimlinge für die Proteinextrakte und die IP verwendet. K68R wurde zusammen mit einer MYC-ML3 (Wt) Kontrolle in einem separaten Experiment untersucht.

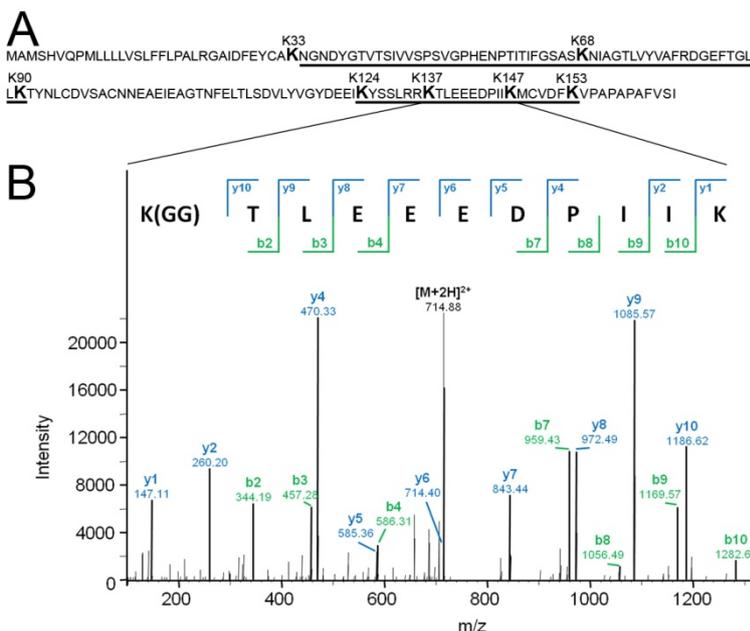
(A)  $\alpha$ MYC-Western-Blot der Proteinrohextrakte (INPUT) und nach der  $\alpha$ MYC-IP, Detektion von MYC-ML3 und der verwendeten Varianten, das Sternchen kennzeichnet ein MYC-ML3-Abbauprodukt.

(B)  $\alpha$ HA-Western-Blot der Proteinrohextrakte (INPUT) und nach der  $\alpha$ MYC-IP, Detektion von HSN und HSN-Konjugaten.

dieses Signalpeptid maskiert, wurde ML3 C-terminal mit einem YFP und einem HA-Tag versehen und das Fusionsprotein wurde unter Kontrolle des CaMV-35S-Promotors im Wildtyphintergrund exprimiert. Ein gleich aufgebautes Konstrukt wurde auch für ML3 ohne das vorhergesagte Signalpeptid (Aminosäuren 1 bis 24, Abbildung 24) kloniert. ML3-YFP-HA hat ein berechnetes Molekulargewicht von 51 kD und läuft etwa auch auf dieser Höhe im SDS-Polyacrylamidgel (Abbildung 18C). Nach der IP von ML3-YFP-HA konnten zwei neddylierte Formen des Proteins mit dem  $\alpha$ -NEDD8-Antikörper nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass ML3 auch neddyliert wird, wenn das Signalpeptid nicht maskiert ist und dass die Neddylierung kein Artefakt der NEDD8-Überexpression ist. Interessanterweise konnten für das ML3-Konstrukt ohne das Signalpeptid, das ein berechnetes Molekulargewicht von 48,5 kD hat, zwei Banden detektiert werden. Nach der IP von  $\Delta$ 1-24-ML3-YFP-HA ist dahingegen nur eine neddylierte Form sichtbar. Diese NEDD8 modifizierte ML3-Form ohne Signalpeptid entspricht dem Molekulargewicht der größeren der beiden neddylierten Formen des Volllängen ML3s. Diese Beobachtung lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt schwer erklären, sie zeigt allerdings, dass das Signalpeptid ML3s nicht für die Neddylierung notwendig ist.

Um herauszufinden, welches der sieben Lysine in ML3 neddyliert wird, wurden alle Lysine in MYC-ML3 einzeln zu Arginin mutiert und in den HSN-Hintergrund transformiert. Nach der IP von MYC-ML3 mit den Lysinmutationen zeigte sich, dass alle Varianten noch neddyliert werden können (Abbildung 19). Dieses Ergebnis und die Beobachtung, dass oft mehrere neddylierte ML3-Formen auftreten (Abbildung 18B und C, Abbildung 19), deuten darauf hin, dass mehrere Lysine in ML3 neddyliert werden können.

Die Lysine eines Proteins, die mit NEDD8 modifiziert werden, kann man nicht nur durch Lysinmutanten identifizieren, sondern auch mittels Massenspektrometrie. NEDD8 hinterlässt an seinem Konjugat nach dem Verdau mit Trypsin ein kurzes Peptid bestehend aus zwei Glycinen, das in der Massenspektrometrie durch einen Massenzuwachs von 114 Da identifiziert werden kann. Ein Peptid mit einer GG-Modifikation wurde in der massenspektrometrischen Analyse des aufgereinigten  $\Delta$ 1-24-ML3-YFP-HAs aus Keimlingen



**Abbildung 20:**  
**Massenspektrometrische Identifizierung des NEDD8- bzw. Ubiquitin-Fingerabdrucks an K137 aus ML3.**

(A) Aminosäuresequenz ML3s. Alle enthaltenen Lysine wurden markiert. Die in der massenspektrometrischen Analyse gefundenen Peptide sind unterstrichen.

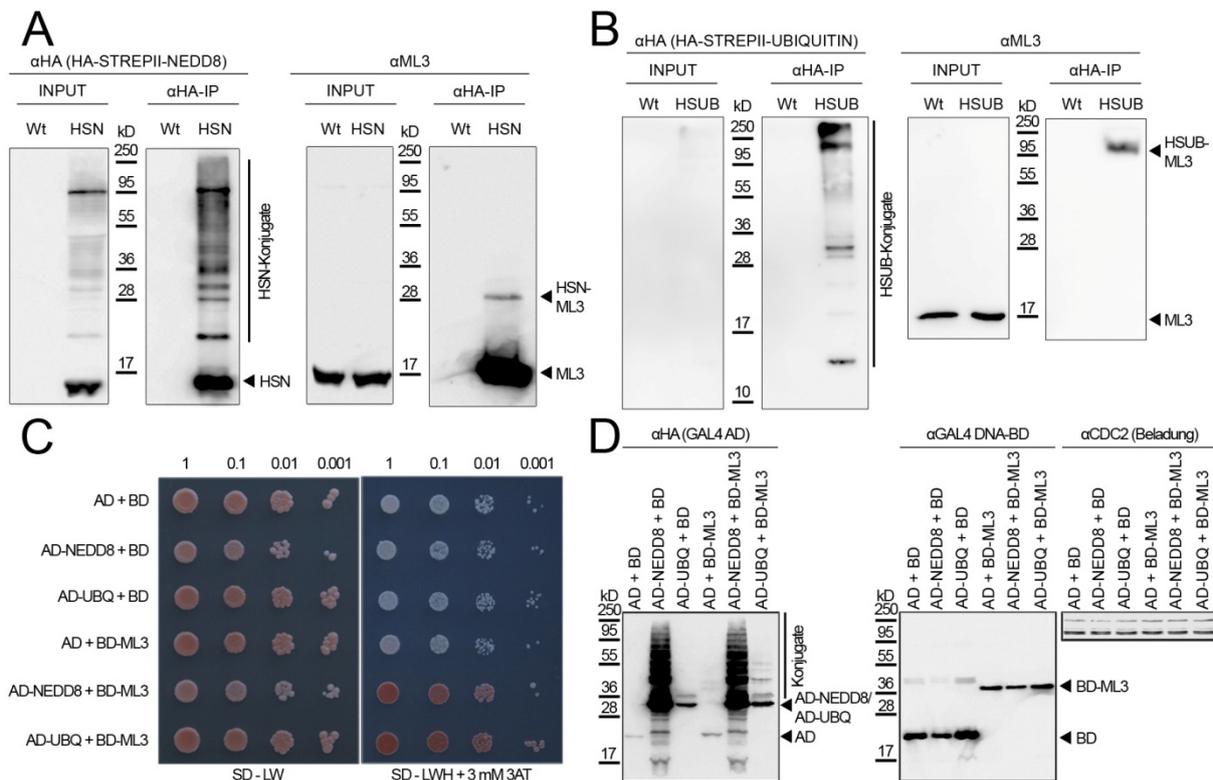
(B) Ausschnitt aus dem Massenspektrum. Das Peptid KTLEEDPIIK wurde mit der Modifikation aus zwei Glycinen am N-terminalen Lysin (K137) identifiziert, dem Fingerabdruck der von NEDD8 und Ubiquitin bei einem tryptischen Verdau hinterlassen wird.

Daten von Stephanie Heinzlmeir.

gefunden (Daten von Stephanie Heinzlmeir, Lehrstuhl Proteomik und Bioanalytik, TU München, Abbildung 20). Laut dieser massenspektrometrischen Analyse ist das Lysin 137 modifiziert. Da aber neben einer NEDD8- auch eine Ubiquitin-Modifikation den gleichen Fingerabdruck aus zwei Glycinen an einem Lysin hinterlässt und ML3 auch ubiquitiniert wird (Kapitel 3.2.2), lässt sich nicht sicher sagen, ob hier die NEDD8- oder Ubiquitin-Modifikation nachgewiesen wurde.

### 3.2.2 ML3 interagiert wahrscheinlich mit NEDD8 und Ubiquitin

Um das endogene ML3 nachweisen zu können, wurde ein Antikörper gegen das Peptid VSLRRKTLEED aus ML3 produziert. Der Antikörper erkennt ein Protein von 18 kD, was der berechneten Größe ML3s entspricht. Es zeigte sich, dass diese Proteinbande in *ml3*-Mutanten fehlt und es sich daher um ML3 handeln muss (Abbildung 25B). Nach der Aufreinigung von HA-STREPII-NEDD8 und HSN-Konjugaten wurde mit dem  $\alpha$ ML3-Antikörper ein größeres Protein detektiert, bei dem es sich um neddyliertes ML3 handeln muss (Abbildung 21A). Diese Proteinbande war deutlich schwächer in Proben, in denen die Neddylierung mit dem ECR1-Inhibitor MLN4924 blockiert worden war (Abbildung 22). Dies zeigt, dass endogenes ML3 ein NEDD8-Substrat ist und dass diese Neddylierung über den



**Abbildung 21: Interaktion ML3s mit NEDD8 und Ubiquitin/ Modifikation ML3s mit Ubiquitin.**

(A) und (B)  $\alpha$ HA-IP von HA-STREPII-NEDD8/ HA-STREPII-Ubiquitin aus 7 d alten Keimlingen. Die zwei linken Bilder zeigen jeweils HSN/HSUB vor (INPUT, 45  $\mu$ g Protein des Rohextrakts) und nach der IP. Die zwei rechten Bilder zeigen jeweils ML3 vor (INPUT, 45  $\mu$ g Protein des Rohextrakts) und nach der IP.

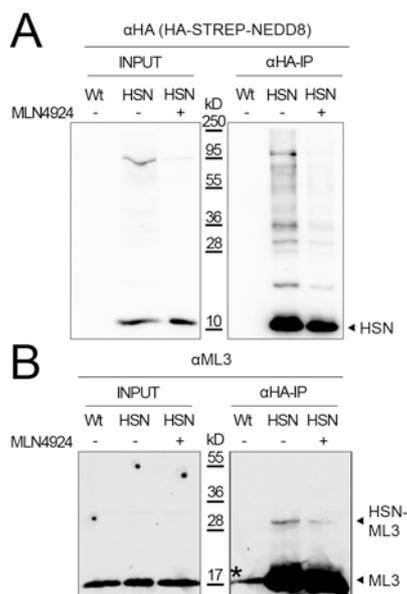
(C) Ergebnis des *Yeast Two-Hybrid* Experiments mit NEDD8 bzw. Ubiquitin, fusioniert mit der GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) und ML3 fusioniert mit der GAL4-DNA-Bindedomäne (BD). Es wurden je 2  $\mu$ l der Hefekulturen mit der angegebenen OD<sub>600</sub> auf SD-LW bzw. auf SD-LWH + 3mM 3AT Medium getropft.

(D) Expressionskontrolle, der in (C) gezeigten Hefelinien. AD-Konstrukte wurden mit einem  $\alpha$ HA-Antikörper nachgewiesen, BD-Konstrukte mit einem  $\alpha$ GAL4 DNA-BD-Antikörper. Mit  $\alpha$ CDC2 wurde die gleichmäßige Beladung kontrolliert.

bekanntem Weg mit dem NEDD8-aktivierenden Enzym AXR1/ECR1 zustande kommt.

Überraschenderweise wurde nicht nur die HSN-modifizierte ML3-Form nach der HSN-Aufreinigung detektiert, sondern auch unmodifiziertes ML3. Aufgrund der großen Menge an unmodifiziertem ML3 und der verhältnismäßig kleinen Menge an neddyliertem ML3 ist es unwahrscheinlich, dass ML3 während der Aufreinigung deneddyliert wurde. Es wirft vielmehr die Frage auf, ob ML3 mit NEDD8 oder NEDD8-Konjugaten interagieren kann. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass ML3 bereits in einem *Yeast Two-Hybrid Screen* aufgetaucht war, in dem ein Pentamer aus Ubiquitinen als Köderprotein verwendet worden war (siehe EMBL-ENA Datenbankeintrag ABH03542). In einem *Yeast Two-Hybrid* Experiment mit AD-NEDD8 bzw. AD-UBQ (Fusion aus Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors GAL4 (AD) und NEDD8 bzw. Ubiquitin) und BD-ML3 (Fusion aus der DNA-Bindedomäne GAL4s (BD) und ML3) zeigte sich, dass ML3 sowohl mit NEDD8 wie auch mit Ubiquitin interagieren kann (Abbildung 21C). Bei der Überprüfung der Expression der Konstrukte in Hefe stellte sich allerdings heraus, dass AD-NEDD8 wie auch AD-UBQ von der Hefe erkannt wird und eigene Substratproteine damit modifiziert werden (Abbildung 21D). Es ist also möglich, dass die im *Yeast Two-Hybrid* beobachtete Interaktion nicht durch eine non-kovalente Bindung von ML3 und NEDD8 bzw. Ubiquitin hervorgerufen wird, sondern durch die kovalente Modifikation von ML3 mit NEDD8 bzw. Ubiquitin. Eine dritte Möglichkeit, die Interaktion zu erklären, ist, dass ML3 nicht mit monomeren NEDD8 interagiert, sondern mit einem oder mehreren neddylierten Proteinen. Der Versuch, die Interaktion des monomeren NEDD8s mit ML3 in einem *in vitro* Experiment zu untersuchen scheiterte, da ML3 weder in *E. coli* noch in *Pichia pastoris* rekombinant exprimiert werden konnte.

Da ML3 im *Yeast Two-Hybrid* auch mit Ubiquitin interagieren konnte, sollte getestet werden, ob diese Protein-Protein-Interaktion auch *in vivo* besteht. Dazu wurde das zu HSN analoge HSUB verwendet. Nach der Aufreinigung von HSUB wurde ein Protein mit sehr hohem Molekulargewicht durch den ML3-Antikörper erkannt, das wahrscheinlich einer ubiquitinierten ML3-Form entspricht (Abbildung 21B). Unmodifiziertes ML3 wurde nur in



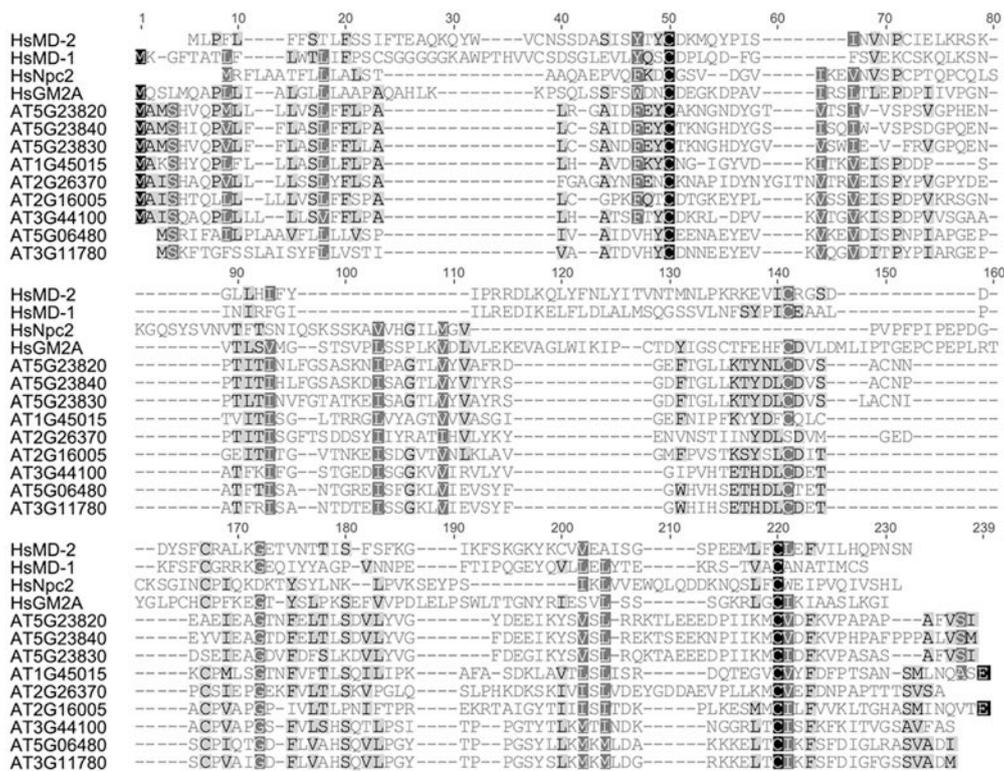
**Abbildung 22: Inhibition der Neddylierung ML3s durch MLN4924.**

(A) und (B)  $\alpha$ HA-IP von HA-STREPII-NEDD8 aus 7 d alten Keimlingen, die für 2 h mit 50  $\mu$ M MLN4924 oder der gleichen Konzentration an Lösungsmittel behandelt worden sind, bevor DEX zugegeben und über Nacht weiter inkubiert wurde. Es wurden jeweils 45  $\mu$ g Protein des Rohextrakts als INPUT-Kontrolle geladen (jeweils linkes Bild). Im jeweils rechten Bild sieht man das Ergebnis der IP. In (A) wurden HSN und HSN-Konjugate mit einem  $\alpha$ HA-Antikörper nachgewiesen, in (B) ML3.

manchen Aufreinigungsexperimenten in kleinen Mengen detektiert, was sich wahrscheinlich dadurch begründen lässt, dass in diesen Fällen ML3 während der Aufreinigung deubiquitiniert wurde. Da unmodifiziertes ML3 nur in großen Mengen mit HSN und HSN-modifizierten Proteinen mitaufgereinigt wurde, nicht aber mit HSUB und HSUB-modifizierten Proteinen, scheint es so, als würde ML3 *in vivo* nur mit NEDD8, aber nicht mit Ubiquitin interagieren, obwohl es im *Yeast Two-Hybrid* System mit beiden Proteinen eine Interaktion zeigte.

### 3.2.3 ML3 gehört zur Familie der MD-2-related lipid-recognition domain Proteine

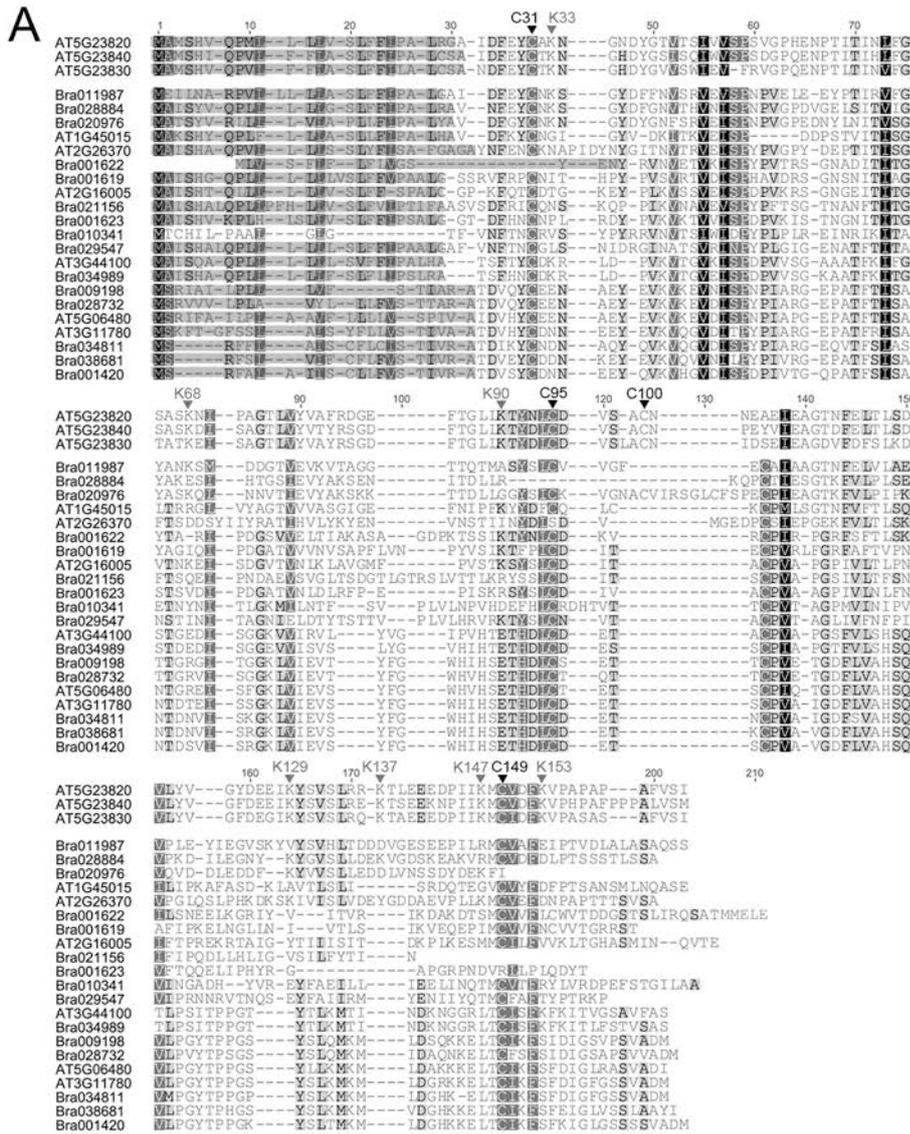
ML3 gehört zur Familie der MD-2-related lipid-recognition domain (ML) Proteine (Inohara and Nunez, 2002). Der Namensgeber dieser Domäne, MD-2, ist ein menschliches Protein, das als Korezeptor zusammen mit dem TOLL-LIKE RECEPTOR 4 (TLR4) im Rahmen der angeborenen Immunität Lipopolysaccharide aus der Membran gramnegativer Bakterien bindet, wodurch eine Immunantwort ausgelöst wird (Viriyakosol et al., 2001; Park et al., 2009). Alle charakterisierten Proteine mit dieser Domäne binden ein hydrophobes Molekül, MD-2 bindet Lipopolysaccharide und das ebenfalls menschliche NPC2 bindet Cholesterin (Friedland et al., 2003). Keines der pflanzlichen ML-Proteine wurde bis jetzt charakterisiert und daher ist nicht bekannt, welche Moleküle sie binden. Aufgrund der schlechten Konservierung ML3s aus *Arabidopsis thaliana* mit bereits charakterisierten ML-Proteinen lässt sich nicht vorhersagen, welchen Ligand es binden könnte (Abbildung 23).



**Abbildung 23: Alignment der ML-Proteine aus Mensch und *Arabidopsis*.**  
ClustalOmega-Alignment der menschlichen ML-Proteine MD-2, MD-1, NPC2 und GM2A mit den 9 Homologen aus *Arabidopsis*.

ML3 hat in *Arabidopsis* acht Homologe (ML1 bis 9), von denen keines eine bekannte biologische oder biochemische Funktion hat (Inohara and Nunez, 2002). ML5 (AT5G23840, 76 % Identität) und ML6 (AT5G23830, 73 % Identität) sind die nächsten Homologe ML3s (Abbildung 24). Da ML3, ML6 und ML5 direkt hintereinander auf Chromosom 5 codiert sind, handelt es sich wahrscheinlich um Paraloge. Eine Analyse der neun ML-Proteine aus *Arabidopsis* und der fünfzehn ML-Proteine aus *Brassica rapa* ergab, dass alle Proteine außer Bra010341 ein vorhergesagtes Signalpeptid für den Import in das ER besitzen (SignalP 4.1 Server, Abbildung 24A). Über das ER gelangen die ML-Proteine dann wahrscheinlich in die Vakuole oder in den extrazellulären Raum (Inohara and Nunez, 2002). Des Weiteren sind in den meisten ML-Proteinen aus *Arabidopsis* und *Brassica rapa* vier Cysteine konserviert, die wahrscheinlich zwei intramolekulare Disulfidbrücken bilden, wie sie für MD-2 beschrieben sind (Inohara and Nunez, 2002; Park et al., 2009). Zwar ist die Position des dritten Cysteins in ML3 (C100), ML5 und ML6 im Verhältnis zu den anderen ML-Proteinen leicht verschoben, aber es ist anzunehmen, dass es die gleiche Aufgabe übernimmt.

Die phylogenetische Analyse einiger pflanzlicher ML-Proteine aus den Dikotyledonen *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand), *Brassica rapa* (Rübsen), *Glycine max* (Sojabohne), *Vitis vinifera* (Weinrebe), *Solanum lycopersicum* (Tomate), den Monokotyledonen *Brachypodium distachyon* (Zwenke), *Oryza sativa* (Reis) und dem Bärlappgewächs *Selaginella moellendorffii* sowie dem Moos *Physcomitrella patens* (kleines Blasenmützenmoos) zeigte zudem, dass ML3 zu einer *Brassicales*-spezifischen Gruppe der ML-Proteine gehört (Abbildung 24B). So haben ML3, ML5 und ML6 nur in *Brassica rapa* nahe Homologe, nämlich Bra011987, Bra028884 und Bra020976. Da jedes dieser Proteine näher mit den Vertretern aus der gleichen Spezies verwandt ist als mit einem Vertreter aus einer anderen Spezies, sind diese Gruppen wahrscheinlich durch unabhängige Genduplikationen entstanden. Da ML3 einer *Brassicales*-spezifischen Gruppe der ML-Proteine angehört, liegt die Vermutung nahe, dass ML3 auch eine Funktion in einem *Brassicales*-spezifischen Prozess hat.



**Abbildung 24:**  
**Zugehörigkeit ML3s zu einer Brassicales-spezifischen Gruppe der ML-Proteine.**

(A) Alignment der MD-2-related lipid recognition domain Proteine aus *Brassica rapa* (Bra) und *Arabidopsis thaliana* (AT). Von SignalP vorhergesagte Signalpeptide für den Import in das ER sind grau hinterlegt. Vier konservierte Cysteine und die Lysine ML3s (AT5G23820) sind markiert.

(B) Phylogenie der pflanzlichen MD-2-related lipid recognition domain Proteine aus *Arabidopsis thaliana* (AT), *Brassica rapa* (Bra), *Glycine max* (GLYMA), *Vitis vinifera* (Vv), *Solanum lycopersicum* (Solyc), *Brachypodium distachyon* (BRADI), *Oryza sativa* (Os), *Selaginella moellendorffii* (Sm) und *Physcomitrella patens* (PP). Der Baum wurde aufgrund eines ClustalO-Alignments (siehe Appendix) mit der Maximum-Likelihood-Methode berechnet und mit der Bootstrap-Methode in 1000 Replikaten getestet. Nur Werte über 0,6 wurden als signifikant betrachtet. Die Bootstrap-Werte stehen an den Knotenpunkten. Der Baum wurde mit der Bärlappgewächse/ Moos-Gruppe bewurzelt.

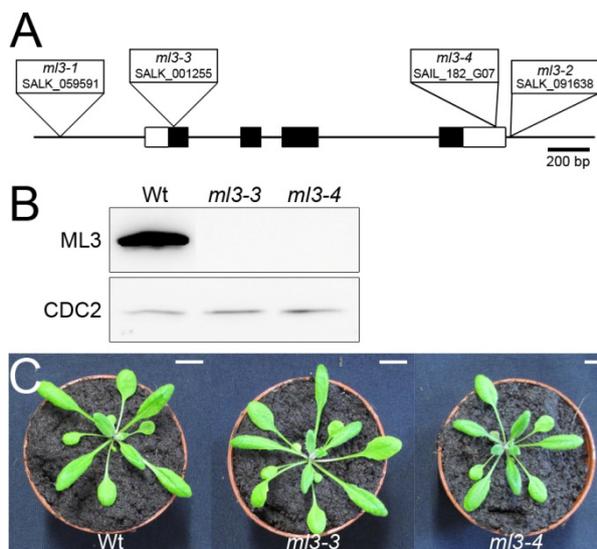
0.5

### 3.2.4 Identifizierung von *ml3*-Mutanten

Da zu Beginn dieser Arbeit für ML3 weder ein Mutantenphänotyp noch eine biochemische Funktion beschrieben war, wurden die T-DNA-Insertionslinien SALK\_001255 und SAIL\_182\_G07 untersucht (Abbildung 25A). Die T-DNA in SALK\_001255 sitzt ganz zu Beginn des ersten Exons, während die T-DNA in SAIL\_182\_G07 im 3'-untranslatierten Bereich integriert ist. In beiden Linien ist das ML3-Protein im Western-Blot nicht mehr nachweisbar (Abbildung 25B), was beweist, dass es sich tatsächlich um *ml3*-Mutanten handelt.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden in einer Studie über Gene, die mit dem Befall von Herbivoren assoziiert sind, zwei weitere T-DNA-Insertionslinien für ML3 publiziert: *ml3-1* (SALK\_059591) und *ml3-2* (SALK\_091638) (Fridborg et al., 2013). Daher erhielt die in dieser Arbeit charakterisierte T-DNA-Insertionslinie SALK\_001255 den Namen *ml3-3* und die Linie SAIL\_182\_G07 den Namen *ml3-4*. Im Gegensatz zu *ml3-1* und *ml3-2*, für die ein leichter Zwergwuchs beschrieben worden war (Fridborg et al., 2013), konnte für die Mutantenlinien *ml3-3* und *ml3-4* unter den gegebenen Wachstumsbedingungen kein Phänotyp beobachtet werden (Abbildung 25C). Das zeigt, dass ML3 keine essenzielle Rolle in Wachstum und Entwicklung in *Arabidopsis thaliana* hat. Es ist auch denkbar, dass ML3, ML5 und ML6 redundante Funktionen haben und daher die Mutation eines einzelnen Genes keinen Effekt hat. Aufgrund der räumlichen Nähe der drei Loci ist es allerdings technisch schwierig bis unmöglich eine Tripelmutante herzustellen.

Da es sich bei *ml3-3* um die einzige *ml3*-Mutante handelt, bei der die T-DNA im Gen integriert ist und *ml3-3* sowohl auf Protein- wie auch auf Transkriptebene ein *knockout* ist (Abbildung 25B und Abbildung 27B), wurde diese Linie für alle weiteren Experimente ausgewählt.



**Abbildung 25: Identifizierung von *ml3*-Mutanten.**

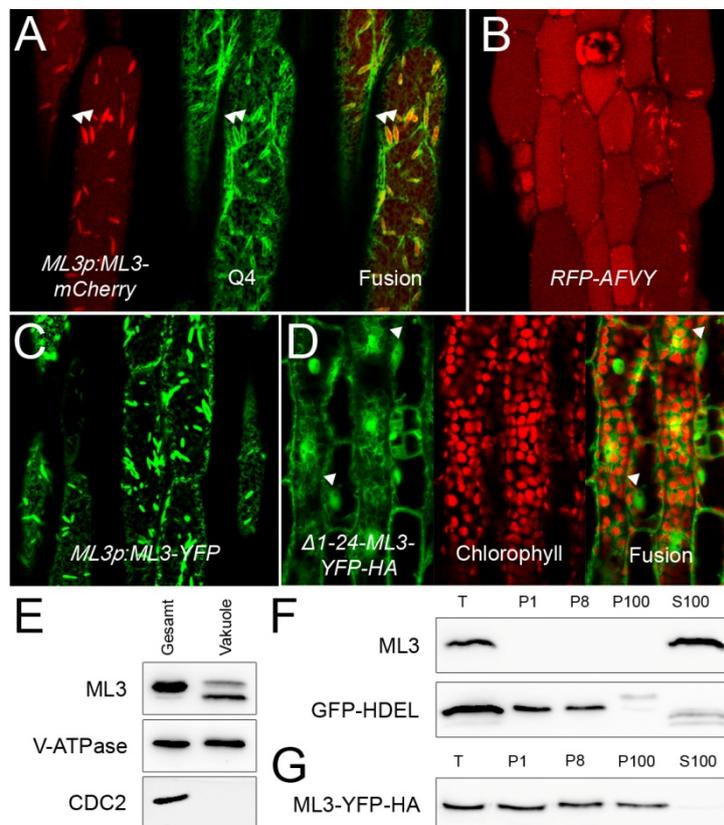
(A) Schematische Darstellung des *ML3*-Locus. Die Position der einzelnen T-DNAs ist eingezeichnet. Linien: 5'- und 3'-untranskribierte Sequenz sowie Introns. Weiße Kästchen: 5'- und 3'-untranslatierte Bereiche. Schwarze Kästchen: Exons.

(B)  $\alpha$ ML3-Immunoblot von Proteinextrakten (45  $\mu$ g) aus 7 d alten Keimlingen. Der  $\alpha$ CDC2-Immunoblot dient als Ladekontrolle.

(C) Phänotyp 1 Monat-alter Arabidopsispflanzen, die in Dauerlicht angezogen wurden. Balken = 1cm.

### 3.2.5 ML3 lokalisiert in die Vakuole und in ER *bodies*

Da für ML3 ein N-terminales Signalpeptid für den Import in das ER vorhergesagt wurde, lag die Frage nahe, wohin ML3 in der Zelle lokalisiert. Um diese Frage beantworten zu können, wurde die genomische *ML3*-Sequenz kloniert. Dem Gen wurde ein eigenes Promotorfragment (2kb vor dem Startcodon) vorangestellt und die codierende Sequenz für *mCherry* sowie der eigene Terminator (Sequenz 1 kb nach dem Stopcodon) wurden an das 3'-Ende angefügt. Es zeigte sich, dass ML3-mCherry sowohl in die Vakuole lokalisiert als auch in kleine stäbchenförmige Kompartimente (Abbildung 26A), die aufgrund ihrer Form, dem Auftreten in der Epidermis von Keimlingen und dadurch, dass sie mit dem ER-Membranmarker Q4 (Cutler et al., 2000) sichtbar gemacht werden konnten, als ER *bodies* identifiziert wurden. Die Lokalisierung ML3s in ER *bodies* kann auch mit einem zu *ML3p:ML3-mCherry* analogen



**Abbildung 26: Subzelluläre Lokalisierung ML3s in die Vakuole und in ER *bodies*.**

(A) Konfokale Lasermikroskop-Aufnahmen von ML3-mCherry, das unter seinem eigenen Promotor exprimiert ist und der ER-Membranmarkerlinie Q4 in der Epidermis des Hypokotyls 5 d alter Keimlinge. Die Pfeilspitzen zeigen zwei von mehreren ER *bodies*.

(B) Konfokale Lasermikroskop-Aufnahmen des vakuolären Marker *SP-RFP-AFVY* in der Epidermis des Hypokotyls 5 d alter Keimlinge.

(C) Konfokale Lasermikroskop-Aufnahmen von ML3-YFP, das unter seinem eigenen Promotor exprimiert ist, in der Epidermis des Hypokotyls 5 d alter Keimlinge.

(D) Konfokale Lasermikroskop-Aufnahmen von  $\Delta 1-24$ -ML3-YFP-HA und der Autofluoreszenz von Chlorophyll in Cortezellen des Hypokotyls 5 d alter Keimlinge. Die Pfeile kennzeichnen zwei Zellkerne.

(E) Immunoblots von Proteinrohextrakt und aufgereinigten Vakuolen aus 14 d alten Pflanzen.

(F) und (G) Immunoblots von Gesamtproteinextrakten (T) und Fraktionen der subzellulären Fraktionierung durch differenzielle Zentrifugation bei 1000 g (P1), 8000 g (P8) und 100 000 g (P100) sowie der löslichen Fraktion (S100). Für die subzelluläre Fraktionierung wurden 7 d alte Keimlinge verwendet, die entweder das ER-Markerprotein *SP-GFP-HDEL* (A) bzw. *ML3-YFP-HA* (B) exprimierten. GFP-HDEL wurde mit einem  $\alpha$ GFP-Antikörper nachgewiesen, ML3-YFP-HA mit einem  $\alpha$ HA-Antikörper.

Konstrukt, in dem das mCherry durch ein YFP ausgetauscht ist, sichtbar gemacht werden (Abbildung 26C). Allerdings lässt sich hier kein Protein in der Vakuole detektieren, was mit der Instabilität YFPs in der Vakuole durch den niedrigen pH zu begründen ist (Tamura et al., 2003). Interessanterweise lokalisiert RFP mit einem ER-Importsignal und der C-terminale Aminosäuresequenz AFVY für den Transport in die Vakuole, auch in ER *bodies* (Abbildung 26B)(Hunter et al., 2007). Das könnte bedeuten, dass allgemein Proteine auf ihrem Weg in die Vakuole in ER *bodies* nachweisbar sind.

Da angenommen wird, dass die Neddylierung im Nukleus stattfindet und ML3 ein NEDD8-Substrat ist, sollte untersucht werden, ob ML3 auch in den Zellkern lokalisieren kann. Dafür wurde ML3 ohne das N-terminale Signalpeptid kloniert und es wurde C-terminal mit einem YFP und einem HA-Tag versehen. Ohne das N-terminale Signalpeptid lokalisierte ML3-YFP-HA in das Zytoplasma und in den Nukleus (Abbildung 26D). Da es mit 48,5 kD etwas zu groß sein sollte, um passiv in den Zellkern zu diffundieren, sollte es aktiv importiert worden sein. Es lässt sich allerdings auch nicht ausschließen, dass das Signal im Zellkern nur durch intrazelluläre Proteasen abgespaltenes, monomeres YFP verursacht wird, das mit etwa 27 kD klein genug für die Diffusion in den Kern ist. Um die Hypothese zu beweisen, dass ML3 auch in den Nukleus lokalisieren kann um dort z. B. neddyliert zu werden, bedarf es weiterer Experimente.

Die Verwendung von Proteintags kann unter Umständen zur fehlerhaften Lokalisierung des Proteins in der Zelle führen. Um zu untersuchen, ob das endogene ML3 tatsächlich in die Vakuole lokalisiert, wurden Vakuolen mittels einer Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt (Robert et al., 2007). Ein Immunoblot gegen die  $\epsilon$ -Untereinheit der vakuolären H<sup>+</sup>-ATPase bestätigt die erfolgreiche Aufreinigung der Vakuolen, die weitgehend rein von zytoplasmatischen Proteinen ist, was der Immunoblot gegen die zytoplasmatische und Zellkern-lokalisierte Cyclin-abhängige Kinase CDC2 beweist (Abbildung 26E)(Imai et al., 2006; Boruc et al., 2010). Mit dem Antikörper gegen das endogene ML3 konnte auch die Anwesenheit ML3s in den aufgereinigten Vakuolen bestätigt werden. Dies beweist, dass ML3 ein vakuoläres Protein ist, auch wenn es kein vorhersagbares Signalpeptid für die Vakuole besitzt.

Da ML3-mCherry nicht nur in der Vakuole, sondern auch in ER *bodies* sichtbar war, sollte untersucht werden, ob auch das endogene ML3 in diesen Organellen nachweisbar ist. Dafür wurde eine subzelluläre Fraktionierung 7 d alter Keimlinge durchgeführt (Hayashi et al., 2001). Endogenes ML3 konnte nach einer Zentrifugation bei 100.000 g nur in der löslichen Fraktion (S100) nachgewiesen werden (Abbildung 26F). Da in dieser Fraktion auch die vakuolären Proteine vorkommen, passt dieses Ergebnis zu der zuvor beobachteten Lokalisierung in die Vakuole. Allerdings konnte das Vorkommen ML3s in den ER *bodies* mit dieser Methode, in der ER *bodies* hauptsächlich bei 1000 (P1) bzw. 8000 g (P8) pelletieren, nicht bestätigt werden (Hayashi et al., 2001). GFP mit einem N-terminalen Signalpeptid für den Import in das ER und einem C-terminalen HDEL ER-Retentionssignal war hingegen in den Fraktionen P1 und P8 nachweisbar, in denen ER *bodies* pelletieren, sowie in der P100-Fraktion, in der das ER-Netzwerk akkumuliert. Im Gegensatz zu endogenem ML3 konnte die ER *body*-Lokalisierung für ML3-YFP-HA mit Hilfe der subzellulären Fraktionierung bestätigt

werden (Abbildung 26G). Um die Frage beantworten zu können, ob endogenes ML3 tatsächlich in ER *bodies* zu finden ist und nur aufgrund zu geringer Mengen nicht nachweisbar war, oder ob es sich beim Befund mit ML3-YFP-HA um ein Artefakt handelt, das durch die Fusion mit einem Proteintag hervorgerufen wurde, bedarf es noch weiterer Untersuchungen.

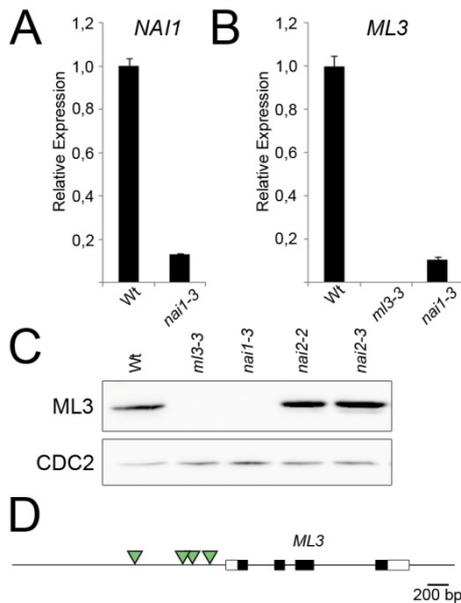
### 3.2.6 Regulation der *ML3*-Expression durch *NAI1*

Um Rückschlüsse auf die Funktion *ML3*s machen zu können, wurde mittels aller bei Genevestigator hinterlegten Microarraydaten eine Liste *ML3*-koregulierter Gene erstellt (Tabelle 18). Interessanterweise befinden sich unter den ersten zwanzig koregulierten Genen acht, für die eine Rolle in ER *bodies* oder deren Biologie beschrieben oder angenommen wird (Tabelle 18). Darunter ist der Transkriptionsfaktor *NAI1*, der für die Bildung der ER *bodies* essenziell ist und der die Expression einiger Gene, wie zum Beispiel *PYK10* und *NAI2* reguliert, deren Genprodukte in ER *bodies* lokalisieren (Matsushima et al., 2004; Yamada et al., 2008).

Da *ML3* mit *NAI1* koreguliert ist und *ML3* in einem Microarrayexperiment mit *nai1-1* und dem Wildtyp als eines der stärksten missregulierten Gene aufgetaucht war (Matsushima et al., 2004), liegt die Vermutung nahe, dass die *ML3*-Expression durch *NAI1* reguliert wird. Um diese Hypothese zu testen, wurde die Expression *ML3*s in *nai1-3* (GK-136G06-012754) untersucht. Tatsächlich war die *ML3*-Transkriptmenge im *nai1*-Hintergrund verglichen zum Wildtyp stark reduziert (Abbildung 27A und B). Da *nai1*-Mutanten keine ER *bodies* bilden können und *ML3* auch in ER *bodies* lokalisieren kann, wurde die Frage aufgeworfen, ob die

**Tabelle 18: Mit *ML3* koregulierte Gene.**

AGI	Score	Genname/ Beschreibung	Referenz
AT5G23820	1	ML3	(Nagano et al., 2008)
AT3G16410, AT3G16390, AT3G16400	0,75	NITRILE SPECIFIER PROTEIN 4, 3 und 1	(Kuchernig et al., 2012)
AT3G16430, AT3G16420	0,74	JACALIN-RELATED LECTIN 31 und 30	(Nagano et al., 2008) (Nagano et al., 2005) (Matsushima et al., 2004)
AT1G54010, AT1G54000	0,70	GDSL LIPASE-LIKE PROTEIN 22	(Nagano et al., 2005)
AT3G09260	0,69	PYK10	(Ogasawara et al., 2009) (Matsushima et al., 2004) (Matsushima et al., 2003)
AT2G39310	0,66	JACALIN-RELATED LECTIN 22	(Nagano et al., 2008)
AT3G15950	0,66	NAI2	(Nagano et al., 2008)
AT1G31710	0,65	Copper amine oxidase family protein	
AT3G16460	0,65	JACALIN-RELATED LECTIN 34	
AT2G22170	0,65	PLAT DOMAIN PROTEIN 2	
AT2G22770	0,64	NAI1	(Matsushima et al., 2004)
AT1G76790	0,64	INDOLE GLUCOSINOLATE O-METHYLTRANSFERASE 5	(Pfalz et al., 2011)
AT3G16450	0,64	JACALIN-RELATED LECTIN 33	(Nagano et al., 2008)
AT5G15230	0,63	GAST1 PROTEIN HOMOLOG 4	
AT3G20370	0,62	TRAF-like family protein	
AT5G44020	0,61	HAD superfamily, subfamily IIIB acid phosphatase	
AT4G27860	0,60	MEMBRANE OF ER BODY 1 (MEB1)	(Yamada et al., 2013)
AT3G54400	0,60	Eukaryotic aspartyl protease family protein	
AT4G23670	0,60	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein	
AT3G63200	0,60	PATATIN-LIKE PROTEIN 9	



**Abbildung 27: Regulation der *ML3*-Expression durch *NAI1*.**

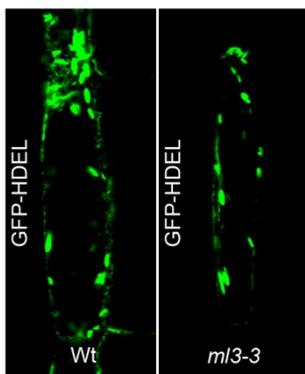
(A) *NAI1*-Genexpression in 7 d alten Keimlingen, im Wildtyp und *nai1-3*. Die Transkriptmenge wurde mittels qRT-PCR quantifiziert. Gezeigt sind Mittelwert und Standardfehler.

(B) *ML3*-Genexpression in 7 d alten Keimlingen, im Wildtyp, *ml3-3* und *nai1-3*. Die Transkriptmenge wurde mittels qRT-PCR quantifiziert. Gezeigt sind Mittelwert und Standardfehler.

(C)  $\alpha$ ML3-Western-Blot mit Proteinextrakten (45  $\mu$ g) aus 7 d alten Keimlingen. Der  $\alpha$ CDC2-Western-Blot dient als Ladekontrolle.

(D) Schematische Darstellung des *ML3*-Lokus. Die Position der *E*-boxes sind durch grüne Dreiecke gekennzeichnet. Linien: 5'- und 3'-untranskribierte Sequenz sowie Introns, weiße Kästchen: 5'- und 3'-untranslatierte Bereiche, schwarze Kästchen: Exons.

starke Reduktion an ML3-Proteinmengen in *nai1*-Mutanten durch das Fehlen des transkriptionellen Regulators zu begründen ist oder durch die Abwesenheit der ER *bodies* per se. Es wäre denkbar, dass ER *bodies* eine Rolle im Transport ML3s zur Vakuole spielen und dass die Abwesenheit dieser Organellen zu einer falschen Lokalisierung und damit zur Proteininstabilität ML3s führt. Um dieser Frage nachzugehen, wurden zwei *nai2*-Mutantenlinien verwendet, die ebenfalls keine ER *bodies* bilden können (Yamada et al., 2008). *NAI2* ist im Gegensatz zu *NAI1* funktionell nicht mit transkriptioneller Regulation assoziiert. Es zeigte sich, dass weder in *nai2-2* (SALK\_005896) noch in *nai2-3* (SALK\_043149) die Menge an ML3-Protein reduziert ist (Abbildung 27C). Dies verdeutlicht, dass die Abwesenheit der ER *bodies* keinen Einfluss auf die ML3-Abundanz hat. In *nai1*-Mutanten führt also nicht das Fehlen dieser Organellen zu weniger ML3-Protein, sondern vielmehr muss es sich um eine transkriptionelle Regulation handeln. Diese Regulation der *ML3*-Expression durch *NAI1* könnte direkt oder indirekt sein. Für eine direkte Regulation,



**Abbildung 28: ER *bodies* in *ml3-3*.** Konfokale Lasermikroskop-Aufnahmen des ER-Markers GFP-HDEL in Epidermiszellen des Hypokotyls 5 d alter Keimlinge. Links im Wildtyp, rechts in *ml3-3*.

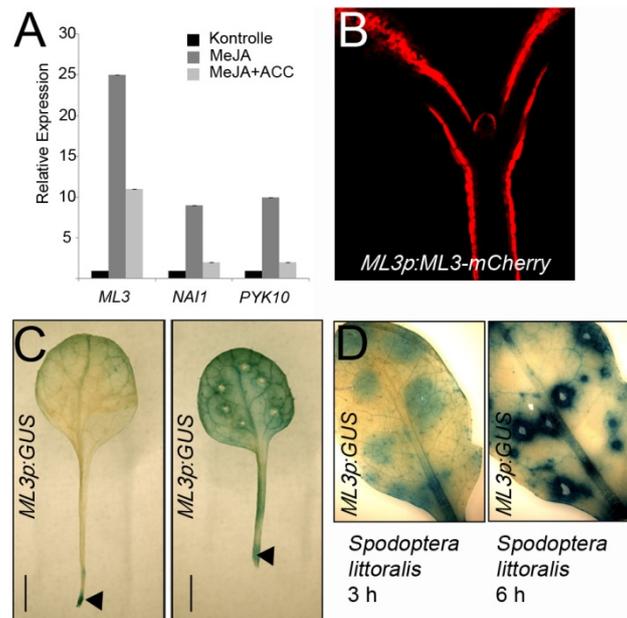
also dafür, dass *NAI* selbst an den *ML3* -Promotor bindet, spricht, dass eine Analyse der Promotorsequenz von *ML3* gezeigt hat, dass diese vier *E*-boxes (CANNTG) enthält, Elemente an die Helix-loop-helix-Transkriptionsfaktoren wie *NAI1* binden können (Abbildung 27D). Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass *NAI1* die Expression eines weiteren Transkriptionsfaktors reguliert, der dann an den *ML3*-Promotor bindet. Damit wäre die Regulation der *ML3*-Expression durch *NAI1* indirekt.

Die Mutanten, der in ER *bodies* lokalisierten Proteine *PYK10* und *NAI2* können keine ER *bodies* bilden. Um zu überprüfen, ob *ML3* auch eine Rolle in der Bildung dieser Organellen spielt, wurde der ER- und ER *body*-Marker *SP-GFP-HDEL* in *ml3-3* eingekreuzt. Es zeigte sich, dass auch

im *ml3*-Mutantenhintergrund immer noch ER *bodies* vorhanden sind und ML3 daher nicht für die Bildung dieser Strukturen essenziell ist (Abbildung 28).

Die Bildung von ER *bodies* wird durch das Pflanzenhormon Jasmonsäure (JA) induziert (Matsushima et al., 2002) und im Einklang damit wird auch die Expression *NAI1s* durch die Behandlung mit Methyljasmonat induziert (Matsushima et al., 2004). Diese Induktion kann mit der gleichzeitigen Behandlung mit dem Pflanzenhormon Ethylen gehemmt werden. Wenn die *ML3*-Expression direkt durch *NAI1* reguliert wäre, dann sollte sie diesem Muster folgen. Um diese Hypothese zu testen, wurden Blätter 16 d alter Pflanzen für 24 h mit Methyljasmonat (MeJA) oder mit MeJA und der Ethylenbiosynthesevorstufe 1-Aminocyclopropancarbonsäure (ACC) behandelt. ACC wird nach der Aufnahme in die Pflanze in das gasförmige Ethylen umgewandelt. Tatsächlich zeigte *ML3* das gleiche Expressionsmuster wie *NAI1* und dem durch *NAI1* regulierten Gen *PYK10* (Abbildung 29A). Diese Beobachtung ist eine weitere Unterstützung der Hypothese, dass die *ML3*-Expression durch *NAI1* reguliert wird.

ER *bodies* werden nicht nur in Antwort auf Methyljasmonat gebildet, sondern auch, wenn das Pflanzengewebe verletzt wird (Matsushima et al., 2002). Um zu untersuchen, ob die Expression *ML3s* ebenfalls durch Verwundung induziert werden kann, wurde eine Fusion aus



**Abbildung 29: Regulation der *ML3*-Expression durch Methyljasmonat, Ethylen und Verwundung.**

(A) Genexpression von *ML3*, *NAI1* und *PYK10* in Blättern 16 d alter Pflanzen, die für 12 h mit 50  $\mu$ M Methyljasmonat (MeJA), 50  $\mu$ M 1-Aminocyclopropancarbonsäure (ACC, eine Vorstufe Ethylens) oder dem jeweiligen Lösungsmittel (Kontrolle) behandelt worden sind. Die Transkriptmenge wurde mittels qRT-PCR quantifiziert. Gezeigt sind Mittelwert und Standardfehler.

(B) Konfokale Lasermikroskopaufnahme von *ML3*-mCherry, das unter seinem eigenen Promotor exprimiert wurde. Zu sehen ist ein optischer Querschnitt eines 5 d alten Keimlings.

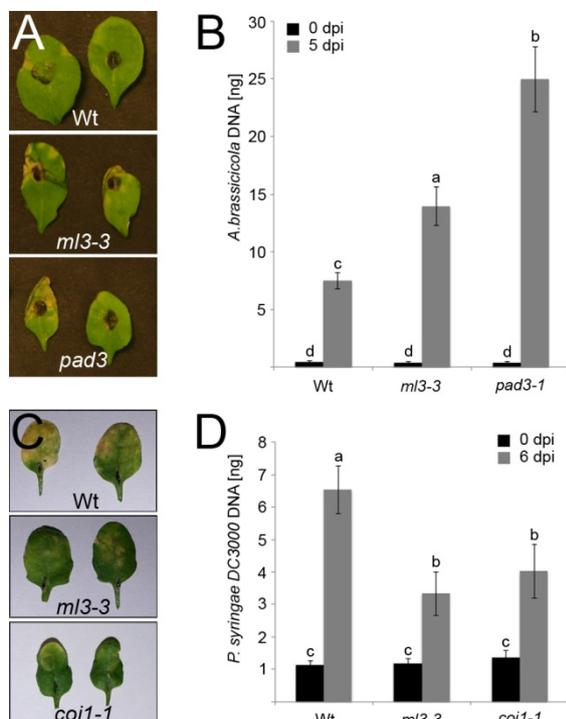
(C) Analyse der Expression von *ML3p*:*GUS* in Blättern 16 d alter Pflanzen, die 48 h nach dem sie abgeschnitten und mit einem Zahnstocher verletzt worden waren, gefärbt worden sind. Die Induktion der Expression ist an den mit dem Zahnstocher hervorgerufenen Wunden, sowie an der Stelle an der das Blatt abgeschnitten wurde (Pfeile), zu beobachten.

(D) Analyse der Expression von *ML3p*:*GUS* in Blättern einem Monat alter Pflanzen, 3 bzw. 6 h nach dem Larven im zweiten Larvenstadium des Schmetterlings *Spodoptera littoralis* von den Blättern gefressen hatten. Daten von Sarosh Bejai.

dem *ML3*-Promotor (2 kb vor dem Startcodon) und dem Gen für die  $\beta$ -Glucuronidase (*GUS*) kloniert und in *Arabidopsis* transformiert. Blätter der erhaltenen transgenen Linien zeigten eine *GUS*-Färbung an den Stellen der Verwundung sowie an der Stelle, an der das Blatt abgeschnitten und dadurch ebenfalls verwundet worden war (Abbildung 29C). Die *ML3*-Expression kann also durch Verwundung induziert werden. Da zuvor gezeigt worden war, dass *ML3* eine Rolle in der Antwort auf den Befall mit Herbivoren spielt, wurde die *ML3p:GUS*-Expression untersucht, nachdem Larven im zweiten Larvenstadium des Schmetterlings *Spodoptera littoralis* von den Pflanzen gefressen hatten (Daten von Sarosh Bejai, Sveriges lantbruksuniversitet, Uppsala, Schweden, Abbildung 29D). Bereits nach 3 h war eine Induktion der Expression um die Stellen, an denen gefressen wurde, sichtbar und nach 6 h war diese Färbung sehr deutlich. Es scheint also wahrscheinlich, dass *ML3* eine Funktion in der Antwort auf Herbivorenbefall hat und vielleicht auch in der Antwort auf andere Pathogene. Im Einklang mit einer möglichen Rolle *ML3*s in der Antwort auf Pathogenbefall wird es hauptsächlich in der Epidermis der oberirdischen Teile von Keimlingen exprimiert (Abbildung 29B), also dem Gewebe, das zuerst mit Pathogenen in Berührung kommt.

### 3.2.7 *ML3* hat eine Rolle in der Abwehr mikrobieller Pathogene

Da die Hypothese aufgestellt wurde, dass *ML3* eine Rolle in der ER *body*-Biologie spielt und ER *bodies* wahrscheinlich eine Funktion in der Pathogenantwort haben (Yamada et al., 2011), wurde untersucht, ob *ml3*-Mutanten eine veränderte Reaktion auf die Pathogene *Alternaria brassicicola* und *Pseudomonas syringae* Stamm *DC3000* zeigen. *Alternaria brassicicola* ist



**Abbildung 30: Veränderte Pathogenabwehr der *ml3*-Mutanten.**

(A) Fotos von Blättern 3 Wochen alter Pflanzen, 5 d nach der Infektion mit 10  $\mu$ l einer *Alternaria brassicicola*-Sporensuspension (Konzentration= 5  $\times$  10<sup>5</sup> Sporen pro ml). Daten von Sarosh Bejai.

(B) Quantifizierung der genomischen DNA von *Alternaria brassicicola* in 100 mg Blattmaterial mittels qRT-PCR. Der DNA-Gehalt spiegelt das Wachstum des Pilzes in infizierten Blättern wieder. Daten von Sarosh Bejai.

(C) Fotos von Blättern 3 Wochen alter Pflanzen, 6 d nach der Infiltration mit 10<sup>7</sup> cfu pro ml einer *Pseudomonas syringae* DC3000 Suspension. Daten von Sarosh Bejai.

(D) Quantifizierung der genomischen DNA von *Pseudomonas syringae* DC3000 in 100 mg Blattmaterial mittels qRT-PCR. Der DNA-Gehalt spiegelt das Wachstum des Bakteriums in infiltrierten Blättern wieder. Daten von Sarosh Bejai.

cfu= colony forming units= Kolonie-bildende Einheiten, dpi= days post infection= Tage nach der Infektion.

Gezeigt sind Mittelwert und Standardfehler, es wurde eine einfache ANOVA mit einem paarweisen Vergleich nach Fisher (P < 0,001) durchgeführt, unterschiedliche Buchstaben (a, b, c und d) kennzeichnen signifikant unterschiedliche Mittelwerte.

ein nekrotropher Pilz, der den Zelltod induziert, um sich dann von den abgestorbenen Zellen zu ernähren. Fünf Tage nach der Infektion mit Sporen von *Alternaria brassicicola* zeigten *ml3-3*-Pflanzen ein verstärktes Pilzwachstum, was an den breitflächigeren Nekrosen und dem höheren Pilz-DNA-Gehalt im Vergleich zum Wildtyp zu sehen war (Daten von Sarosh Bejai, Sveriges lantbruksuniversitet, Uppsala, Schweden, Abbildung 30A und B). Damit zeigte *ml3-3* die gleiche Tendenz wie *pad3-1*, eine Camalexinbiosynthesemutante, von der bekannt ist, dass sie anfälliger auf Infektionen mit *Alternaria brassicicola* reagiert (Thomma et al., 1999; Schuegger et al., 2006). Einen gegensätzlichen Phänotyp zeigte *ml3-3* auf die Infektion mit *Pseudomonas syringae* DC3000, einem virulenten Stamm des gramnegativen Bakteriums. Hier zeigten die *ml3-3*-Blätter 6 d nach der Infektion weniger großflächige Läsionen und auch der bakterielle DNA-Gehalt war geringer als im Wildtyp (Daten von Sarosh Bejai, Abbildung 30C und D). Damit war *ml3-3* in gleichem Ausmaß resistent gegenüber einer Infektion mit *Pseudomonas syringae* DC3000 wie *coi1-1*, eine Mutante des Jasmonsäurerezeptors, die eine beschriebene Resistenz gegenüber *Pseudomonas* hat (Xie et al., 1998). Diese Ergebnisse zeigen, dass ML3 eine Funktion in der Pathogenabwehr hat. Während ML3 eine positive Rolle in der Abwehr des nekrotrophen Pilz *Alternaria brassicicola* spielt, scheint es für die Abwehr gegen das hemi-biotrophe Bakterium *Pseudomonas syringae* DC3000 hinderlich zu sein.

## 4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Wirksamkeit von MLN4924, eines Inhibitors der NEDD8-Aktivierung beim Menschen, im pflanzlichen System zu überprüfen und die Identifizierung und Charakterisierung neuer NEDD8-Substrate aus dem Modellorganismus *Arabidopsis thaliana*.

Zum einen konnte ich auf molekularer, wie auf physiologischer Ebene zeigen, dass MLN4924 die Neddylierung in *Arabidopsis* sowie in den Pflanzenspezies *Cardamine hirsuta* (Behaartes Schaumkraut), *Solanum lycopersicum* (Tomate) und *Brachypodium distachyon* (Zwenke) inhibiert. Damit ist MLN4924 ein neues Instrument, mit dem die Neddylierung und deren Effekte in Pflanzen studiert werden können.

Zum anderen gelang es mir mit dem MD-2-related lipid-recognition domain Protein ML3, ein neues NEDD8-Substrat zu identifizieren. Da für ML3 keine Funktion bekannt gewesen war, wurden erste Schritte unternommen, das Protein zu charakterisieren.

Da sowohl die Wirksamkeit MLN4924s in Pflanzen gezeigt werden konnte, wie auch die Identifizierung eines neuen NEDD8-Substrats aus *Arabidopsis* gelang, wurden die Ziele dieser Promotionsstudien erreicht.

### 4.1 MLN4924- Inhibitor der Neddylierung in Pflanzen

#### 4.1.1 Spezifische Inhibition der NEDD8-Aktivierung durch MLN4924

MLN4924 war zur Behandlung menschlicher Krebserkrankungen als Inhibitor der NEDD8-Aktivierung entwickelt worden. Es ist ein AMP-Analog und bindet an das aktive Zentrum des NEDD8-aktivierenden Enzyms, greift von dort das über eine Thioesterbindung gebundene NEDD8 an, wodurch ein Konjugat aus NEDD8 und MLN4924 entsteht (Brownell et al., 2010). Die Kristallstruktur des menschlichen NEDD8-aktivierenden Enzyms mit gebundenem MLN4924 hatte gezeigt, dass spezifische Aminosäuren der NAE-Untereinheit UBA3 für diese Bindung und Aktivität wichtig sind (Brownell et al., 2010). Diese Aminosäuren sind in allen Homologen der untersuchten Pflanzenspezies konserviert und nach dem Strukturmodell des Homologs aus *Arabidopsis* nehmen sie die richtige Position im Protein ein (Abbildung 11). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass MLN4924 die Neddylierung in *Arabidopsis* inhibiert, da in dessen Anwesenheit HA-STREPII-NEDD8 nicht mehr an seine Substrate konjugiert werden kann. Für die Inhibition der NEDD8-Aktivierung in *Arabidopsis* waren höhere Konzentrationen an MLN4924 nötig als im menschlichen Zellkultursystem. Während in einer menschlichen Darmkrebszelllinie eine Konzentration von 0,04  $\mu\text{M}$  MLN4924 ausreichend war, um eine deutliche Reduktion an neddyliertem Cullin zu beobachten, war in *Arabidopsis*-Keimlingen eine Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  MLN4924 nötig (Abbildung 12B)(Soucy et al., 2009). Da Pflanzen aufgrund ihrer starken Zellwände Substanzen schlechter aufnehmen können, bedarf es daher möglicherweise einer höheren Konzentration an MLN4924 um die Aktivierung von NEDD8 in *Arabidopsis* zu blockieren. Es kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden, dass das NEDD8-aktivierende Enzym aus *Arabidopsis* weniger sensitiv für die Inhibition durch MLN4924 ist. Da aber das Ubiquitin-

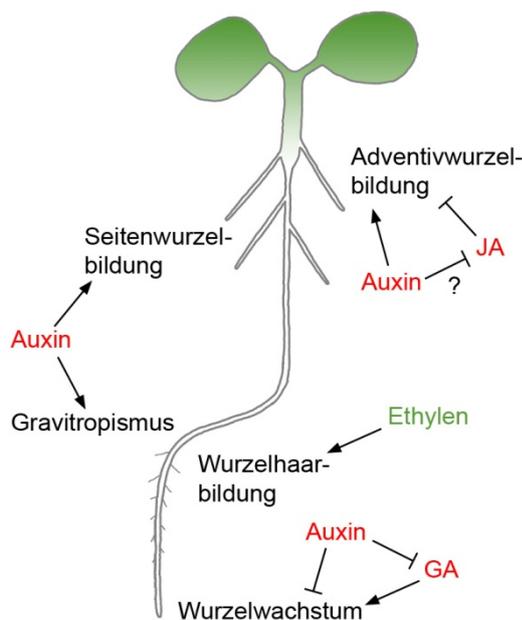
aktivierende Enzym nicht durch MLN4924 gehemmt wurde, scheint die Inhibition trotz der erhöhten Konzentration nicht unspezifisch zu sein. Es erscheint daher auch unwahrscheinlich, dass andere ATP-verwendende Enzyme durch MLN4924 in ihrer Aktivität gestört werden, da sie dem NEDD8-aktivierenden Enzym noch weniger ähneln als das Ubiquitin-aktivierende Enzym, welches nicht inhibiert wurde.

#### 4.1.2 Die Wirkung von MLN4924 auf Hormonsignalwege

Die Culline CUL1, CUL3A und B, sowie CUL4 sind gut untersuchte Substrate für NEDD8 in *Arabidopsis*. Sie sind die Hauptkomponenten von Cullin-RING-Ligasen (CRLs), einer Familie von E3-Ubiquitinligasen. Die Konformation der Culline wird durch die Neddylierung verändert, wodurch das E2 und das CRL-Substrat nah genug zusammen kommen, um die Ubiquitinierung zu ermöglichen (Duda et al., 2008). Die Neddylierung von Cullin führt also zu einer Aktivierung der CRL. Eine der in *Arabidopsis* am besten untersuchten CRL ist SCF<sup>TIR1/AFB1-5</sup>. TIR1 und seine Homologe AFB1-5 sind Substrat-bindende F-BOX-Proteine und gleichzeitig die Rezeptoren für das Phytohormon Auxin (Dharmasiri et al., 2005; Dharmasiri et al., 2005; Kepinski and Leyser, 2005). Auxin wird von TIR1 und einem Aux/IAA gebunden, wodurch die Ubiquitinierung des Aux/IAAs ermöglicht wird, das dann über das Proteasom abgebaut wird (Tan et al., 2007). Aux/IAAs sind Repressoren des Auxinsignalwegs und hemmen in der Abwesenheit von Auxin die Aktivität der ARF-Transkriptionsfaktoren (Reed, 2001; Guilfoyle and Hagen, 2007). Nach dem proteasomalen Abbau der Aux/IAAs können die ARFs als Transkriptions-Regulatoren der Auxinantwort aktiv werden. Um die Wirkung von MLN4924 auf die Funktion von CRLs zu testen, wurde dessen Einfluss auf den Auxinsignalweg und die Auxinantwort untersucht. Eine Behandlung mit MLN4924 löste eine Insensitivität des Wurzelwachstums gegenüber dem künstlichen Auxin 2,4-D aus, vergleichbar mit der Auxinantwort von *axr1-12* (Abbildung 13A). Neben der Auxininsensitivität des Wurzelwachstums verursachte MLN4924 auch ein agravitropes Wachstum der Wurzel (Abbildung 13Abbildung 17). Es ist schon lange bekannt und gut untersucht, dass Auxin eine wichtige Rolle für das gravitrope Wachstum der Wurzel spielt (Went and Thimann, 1937). Ändert sich der Gravistimulus, so wird der durch die Auxintransporter PIN-FORMED regulierte Auxinfluss so geleitet, dass ein Auxinmaximum an der unteren Wurzelseite entsteht (Luschnig et al., 1998; Swarup et al., 2005; Abas et al., 2006). Durch das Auxinmaximum wird das Wachstum der Zellen an dieser Seite inhibiert, wodurch die Wurzel sich in Richtung des Gravistimulus biegt. Ist der Auxintransport oder der Auxinsignalweg gestört, kommt es zu einem agravitropen Wurzelwachstum (Maher and Martindale, 1980; Timpte et al., 1994; Chen et al., 1998; Muller et al., 1998; Tian et al., 2002). Das Auftreten von agravitropen Wurzelwachstum durch eine Behandlung mit MLN4924 kann also durch die Unfähigkeit erklärt werden, Auxinmaxima zu bilden oder diese auf zellulärer Ebene zu erkennen (Abbildung 17 und Abbildung 31). Das Fehlen von Seitenwurzeln in Keimlingen von *Cardamine* ist ebenfalls in Einklang mit einer gestörten Auxinsignaltransduktion, da Auxin für die Bildung von Seitenwurzeln essenziell ist (Abbildung 16 und Abbildung 31)(Peret et al., 2009). Eine Behandlung mit MLN4924 löst damit typische Auxin-assoziierte Phänotypen in der Wurzel aus, die durch eine Inhibition der CRL SCF<sup>TIR1/AFB1-5</sup> erklärt werden können. Dies konnte auf molekularer Ebene durch die

Stabilisierung des Aux/IAAs BODENLOS und der veränderten Genexpression der auxinregulierten Gene *IAA3*, *IAA13* und des Auxinreporters *DR5:GUS* gezeigt werden.

Im Gegensatz zum Auxinsignalweg ist das Ubiquitin-Proteasom-System ein negativer Regulator des Ethylensignalwegs. So werden EIN2 und EIN3, die positiven Regulatoren einer Ethylen-abhängigen Antwort, in Abwesenheit von Ethylen beständig durch das Proteasom abgebaut (Solano et al., 1998; Guo and Ecker, 2003; Potuschak et al., 2003; Binder et al., 2007; Qiao et al., 2009). Da EIN2 und EIN3 von den CRLs SCF<sup>ETP1/2</sup> und SCF<sup>EBF1/2</sup> ubiquitiniert werden, war es wahrscheinlich, dass auch dieser Signalweg durch MLN4924 beeinflusst wird. Tatsächlich zeigten Keimlinge, die mit MLN4924 behandelt worden waren, Phänotypen, die durch einen ständig aktiven Ethylensignalweg erklärt werden können. Zu diesen Phänotypen zählt das Auftreten vieler, sehr langer Wurzelhaare, die in *Arabidopsis* und in *Cardamine* beobachtet werden konnten (Abbildung 16E und F, Abbildung 31). Ethylen beeinflusst die Bildung von Wurzelhaaren positiv und besonders im *axr1*-Mutanten-Hintergrund sind besonders viele und lange Wurzelhaare durch die Behandlung mit dem Ethylenvorläufer ACC beobachtet worden (Tanimoto et al., 1995; Pitts et al., 1998). Neben dem Ethylensignalweg ist auch die Biosynthese von Ethylen negativ durch das Ubiquitin-Proteasom-System reguliert. TYPII ACC-Synthasen werden von einer CRL aus CUL3 und ETO1 bzw. dessen Homologe EOL1 und EOL2 ubiquitiniert und somit dem proteasomalen Abbau zugeführt (Christians et al., 2009). Im Einklang damit sind in *rub1 rub2* RNAi Linien und in einer *rcel*-Mutante erhöhte Ethylenkonzentrationen gemessen worden (Bostick et al., 2004; Larsen and Cancel, 2004). Daher können die beobachteten, Ethylen-assoziierten Phänotypen nicht nur durch einen kontinuierlich angeschalteten Ethylensignalweg erklärt werden, sondern auch durch eine mögliche Ethylenüberproduktion.



**Abbildung 31: Wirkung MLN4924s auf verschiedene, hormonregulierte Aspekte der Wurzelbildung.**

Auxin fördert die Bildung von Seiten- und Adventivwurzeln und hat eine wichtige Rolle im Gravotropismus. Auxin hemmt hingegen das Wurzelwachstum, u.a. durch die Stabilisierung der DELLA-Repressoren des GA-Signalwegs. Da GA den Abbau der DELLAs fördert, hat es einen positiven Effekt auf das Wurzelwachstum. Des Weiteren inhibiert JA die Bildung von Adventivwurzeln und die Wurzelhaarbildung wird durch Ethylen gefördert. MLN4924 inhibiert die Signalwege Auxins, GAs und JAs und damit die von ihnen geförderten Aspekte der Wurzelbildung, wohingegen der inhibitorische Effekt dieser Hormone auf andere Aspekte der Wurzelbildung durch MLN4924 aufgehoben wird. Der Ethylen-Signalweg wird durch MLN4924 aktiviert, was zur Förderung der Wurzelhaarbildung führen kann. Rot bedeutet die Inhibition des Hormonsignalwegs durch MLN4924, grün bedeutet Aktivierung der Hormonsignaltransduktion durch MLN4924.

Neben den Aux/IAAs, EIN2 und EIN3 wird auch die Stabilität der DELLA-Repressoren des GA-Signalwegs über CRLs reguliert (Schwechheimer and Willige, 2009). DELLAs binden die Transkriptionsfaktoren PIF3/PIF4 und inhibieren deren Aktivität (de Lucas et al., 2008;

Feng et al., 2008). Wenn GA an den Rezeptor GID1 bindet, kann dieser mit den DELLAs interagieren und führt sie der Ubiquitinierung durch die CRL SCF<sup>SLY1/SNE</sup> zu (Strader et al., 2004; Ueguchi-Tanaka et al., 2005; Griffiths et al., 2006; Willige et al., 2007; Ariizumi et al., 2011). Das DELLA-Protein RGA wurde durch eine Behandlung mit MLN4924 stabilisiert und auch dessen GA-abhängiger Abbau wurde durch MLN4924 gestört (Abbildung 15A). Es ist daher möglich, dass die beobachtete Inhibition des Wurzelwachstums in *Arabidopsis*, *Cardamine*, Tomate und *Brachypodium* durch die Stabilisierung von DELLAs wie RGA und GAI ausgelöst wurde, da diese das Wurzelwachstum inhibieren (Abbildung 13B, Abbildung 16 und Abbildung 31)(Dill and Sun, 2001; Fu and Harberd, 2003).

Die Bildung von Adventivwurzeln, die durch MLN4924 in *Arabidopsis thaliana* und *Brachypodium distachyon* ausgelöst wurde (Abbildung 16A und B), lässt sich nicht ohne Weiteres erklären. Auxin löst die Initiation und das Auswachsen von Adventivwurzeln sowohl in Monokotyledonen als auch in Dikotyledonen aus (Inukai et al., 2005; Xu et al., 2005; da Costa et al., 2013). Allerdings wird der Auxinsignalweg durch MLN4924 inhibiert und man würde daher einen gegensätzlichen Phänotyp erwarten. Neben Auxin spielen aber auch die Phytohormone Cytokinin, Abscisinsäure, Gibberellin, Ethylen, Strigolacton und Jasmonsäure eine Rolle in der Bildung von Adventivwurzeln (da Costa et al., 2013). Es ist beobachtet worden, dass die Jasmonsäurebiosynthesemutanten *opr3/dde1* und *dde2-2* mehr Adventivwurzeln als der Wildtyp bilden (Sanders et al., 2000; Stintzi and Browse, 2000; von Malek et al., 2002) und eine Studie hatte die Möglichkeit aufgezeigt, dass die positive Wirkung von Auxin auf die Bildung von Adventivwurzeln unter Umständen durch die Reduktion an aktiven JA zu erklären ist (Gutierrez et al., 2012). Es ist daher möglich, dass die MLN4924-induzierte Bildung von Adventivwurzeln durch eine Blockierung des JA-Signalwegs, der wie der Auxinsignalweg eine CRL als positiven Regulator enthält, zu erklären ist (Abbildung 31). Da aber die Bildung von Adventivwurzeln, die durchaus Unterschiede zur Bildung von Seitenwurzeln aufweist, noch nicht ganz verstanden ist und nicht geklärt ist, wie bei diesem Prozess die verschiedenen Phytohormone aufeinander wirken, lässt sich der durch MLN4924 beobachtet Phänotyp nicht eindeutig erklären.

#### 4.1.3 Inhibition weiterer CRLs durch MLN4924

Licht ist für Pflanzen essenziell, da es als Energiequelle dient. Es enthält aber auch Informationen über die Umwelt und kann in zu hohen Mengen schädlich sein. Pflanzen können daher verschiedene Lichtqualitäten wahrnehmen, der Signalweg, der daraufhin aktiviert wird, ist in den letzten Jahrzehnten intensiv beforscht worden (Lau and Deng, 2012). Ein zentraler Knotenpunkt stellt die CRL CUL4-DDB1<sup>COPI-SPA</sup> dar, die in der Dunkelheit positive Regulatoren der Photomorphogenese ubiquitiniert und damit für den Abbau durch das Proteasom markiert (Saijo et al., 2003; Chen et al., 2010). Einer dieser Regulatoren ist der Transkriptionsfaktor HY5 (Osterlund et al., 2000). HY5 kann im Dunkeln durch MLN4924 stabilisiert werden (Abbildung 14C). Die beobachtete, verstärkte Menge an HY5-Protein durch die MLN4924-Behandlung wurde nicht durch eine verstärkte Transkription ausgelöst (Abbildung 14E), sondern lässt sich vielmehr damit erklären, dass CUL4-DDB1<sup>COPI-SPA</sup> inhibiert wurde. Im Einklang mit einer stabilisierten Menge an HY5 waren Gene, die durch Licht reguliert werden, in MLN4924-behandelten Keimlingen im Dunkeln stärker exprimiert (Abbildung 14D). Dunkelgewachsene Keimlinge die auf MLN4924-haltigem Medium

gewachsen waren, zeigen typische lichtgewachsene Phänotypen wie ein kurzes Hypokotyl, einen geöffneten Hypokotylhaken und geöffnete Kotyledonen (Abbildung 14A). Starke Mutanten der Neddylierung wie *axr1-12* und *ecr1-1* reagierten auf die Behandlung mit MLN4924 überempfindlich und hatten noch kürzere Hypokotyle als der MLN4924-behandelte Wildtyp (Abbildung 14A und B). Diese Ergebnisse zeigen eindrücklich, dass MLN4924 auch die Aktivität von CUL4-haltigen CRL inhibieren kann, indem es deren Neddylierung verhindert.

Der Zellzyklus ist ein streng regulierter Prozess. In dieser Regulation spielen CYCLIN-DEPENDENT KINASE (CDK)/ CYCLIN-Komplexe eine wichtige Rolle, die wiederum durch CDK Inhibitoren reguliert werden können. KRP1 ist ein solcher CDK Inhibitor in *Arabidopsis thaliana* und spielt dort eine wichtige Rolle in der Regulation vom Übergang von der G1- zur S-Phase im Zellzyklus (Ren et al., 2008). Es war gezeigt worden, dass die Stabilität von KRP1 durch die E3-Ubiquitinligasen RKP und SCF<sup>SKP2b</sup> reguliert wird (Ren et al., 2008). In Einklang damit konnte der Abbau von KRP1 durch den Proteasominhibitor MG132 sowie durch MLN4924 inhibiert werden (Abbildung 15B)(Ren et al., 2008). Da der Effekt von MG132 und MLN4924 auf die KRP1-Proteinstabilität vergleichbar war, kann man annehmen, dass RKP eine untergeordnete Rolle in der Regulation der KRP1-Proteinstabilität hat, da für diese E3-Ubiquitinligase keine Modifikation mit NEDD8 beschrieben wurde und RKP daher von MLN4924 nicht inhibiert worden ist.

#### 4.1.4 Anwendungen von MLN4924 in der Pflanzenforschung

Die gezeigten Ergebnisse eröffnen die Möglichkeit, MLN4924 zu nutzen, um die Rolle der Neddylierung in jeder Pflanzenspezies, jedem Entwicklungsstadium und unter allen äußeren Bedingungen zu untersuchen. Die teils überlappenden und teils unterschiedlichen Phänotypen, die MLN4924 in verschiedenen Pflanzenarten auslöst, verdeutlichen, dass die Neddylierung in verschiedenen Spezies unterschiedliche Wirkung hat und dass der Einfluss von Phytohormonen auf diese Prozesse in unterschiedlichen Spezies unterschiedlich gewichtet wird. MLN4924 eignet sich daher besonders gut, um Vergleiche zwischen Pflanzenspezies zu ziehen. Die Notwendigkeit, Mutanten der Neddylierung hierfür zu besitzen, ist nicht mehr gegeben. Einen Inhibitor in Form eines kleinen Moleküls zu haben, der die NEDD8-Aktivierung und damit auch die Aktivität von CRL hemmt, ist besonders in Pflanzen wichtig. Von genomweiten Analysen in *Arabidopsis* weiß man, dass es in Pflanzen im Vergleich zu Hefe und Säugetieren eine weit größere Zahl an CRLs gibt, da eine wesentlich größere Zahl Substrat-erkennender CRL-Untereinheiten vorhanden ist. Während das *Arabidopsis*-Genom rund 700 F-BOX-Proteine codiert, sind es beim Menschen nur 68 (Bai et al., 1996; Gagne et al., 2002; Jin et al., 2004). Da diese 700 F-BOX-Proteine wahrscheinlich Untereinheiten für eine ähnlich hohe Zahl an SCF-Komplexen sind, ist es wahrscheinlich, dass SCF und andere CRLs eine Rolle in vielen Prozessen spielen. Bis heute sind aber nur die Funktionen weniger CRL in Pflanzen bekannt. Mit MLN4924 ist es jetzt möglich, die Rolle von CRL in verschiedenen Entwicklungsschritten und Prozessen zu untersuchen.

Des Weiteren ist es mit MLN4924 nun möglich, die Stabilität von Proteinen zu untersuchen, die von CRL ubiquitiniert und über das Proteasom abgebaut werden. Es ist nur eine kleine Zahl an Substraten von CRL bekannt; die große Anzahl an möglichen CRLs in Pflanzen lässt

aber vermuten, dass es sehr viel mehr Substrate gibt (Schwechheimer et al., 2009). Bisher standen nur Inhibitoren des Proteasoms wie MG132 zur Verfügung, um die Stabilität solcher Proteine zu untersuchen. Mit MLN4924 kann nun der Abbau von CRL-Substraten wesentlich spezifischer und vielleicht sogar effektiver inhibiert werden.

#### 4.1.5 Identifizierung neuer NEDD8-Substrate

Die Beobachtung, dass es in *Arabidopsis thaliana* viele verschiedene neddylierte Proteine gibt, ist besonders spannend, da zu Beginn dieser Arbeit in Pflanzen nur Culline als Substrate für NEDD8 bekannt waren. In Säugetieren hingegen ist eine kleine Zahl weiterer neddylierter Proteine beschrieben. Dazu zählen z. B. eine Reihe von Transkriptionsaktivatoren und -inhibitoren (Tabelle 1). Außerdem wurden weitere E3-Ubiquitinligasen, einige ribosomale Proteine, Transmembranrezeptoren, Kinasen und das Histon H4 als NEDD8-Substrate identifiziert (Tabelle 1).

Der Effekt der Neddylierung auf die Funktion des Zielproteins kann sehr unterschiedlich sein. Manche Proteine werden durch die Modifikation mit NEDD8 stabilisiert, manche destabilisiert. NEDD8 kann seine Substrate aktivieren oder ihre Aktivität inhibieren. Es ist auch möglich, dass ein Protein seine subzelluläre Lokalisierung durch die Neddylierung verändert, wie eine Studie an ribosomalen Proteinen zeigt (Sundqvist et al., 2009). Dies verdeutlicht, dass die Modifikation mit NEDD8 keineswegs immer die gleiche Wirkung hat, sondern dass in jedem Einzelfall untersucht werden muss, welche Konsequenzen die Neddylierung hervorruft.

Zur Identifizierung neuer, bisher unbekannter NEDD8-Substrate aus *Arabidopsis thaliana* wurden HA-STREPII-NEDD8 (HSN) und HSN-modifizierte Proteine aufgereinigt und anschließend durch Massenspektrometrie analysiert. In der erhaltenen Liste der putativen NEDD8-Substrate befindet sich nur ein Transkriptionsfaktor, für den eine Modifikation mit NEDD8 allerdings nicht bestätigt werden konnte (siehe Appendix, Tabelle 1). Außerdem befindet sich die E3-Ubiquitinligase BRIZ1 (BRAP2 RING ZNF UBP DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 1), neben den Untereinheiten von CRLs, in der Liste. Es war kürzlich gezeigt worden, dass ein menschliches Homolog von BRIZ1 namens BRAP2 neddyliert wird (Takashima et al., 2013). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass auch BRIZ1 ein NEDD8-Substrat ist, was im Rahmen dieser Arbeit aber nicht untersucht wurde. Für die untersuchte Untereinheit einer CRL TIR1 konnte keine Neddylierung festgestellt werden. Auch für die einzige Proteinkinase aus der Liste der putativen NEDD8-Substrate ARABIDOPSIS SNF1 KINASE HOMOLOG 10 konnte die Modifikation mit dem Ubiquitin-ähnlichen Protein nicht bestätigt werden.

Obwohl Histone sehr gut konservierte und abundante Proteine sind und in Menschen Histon H4 neddyliert ist, wurde kein Histon als putatives NEDD8-Substrat identifiziert. Es ist sehr wahrscheinlich, dass dies technische Gründe hat. Histone sind Teil des Chromatins und mit DNA-Strängen fest umwunden. Um Histone von der DNA zu trennen, bedarf es einer speziellen Extraktion, für die entweder ein niedriger pH-Wert oder eine hohe Salzkonzentration verwendet wird (Shechter et al., 2007). Da es sich bei der verwendeten Aufreinigungsmethode nicht um eine solche Extraktion gehandelt hat, wurden die Histone

wahrscheinlich mit dem Chromatin durch Zentrifugation entfernt. Um die Neddylierung von Histonen in *Arabidopsis* zu untersuchen, muss folglich ein anderer Ansatz gewählt werden.

Es wurden auch keine ribosomalen Proteine oder Transmembranrezeptoren identifiziert, was ebenfalls technische Gründe haben könnte, oder diese Proteine sind im Entwicklungsstadium des Keimlings und unter den verwendeten Bedingungen nicht neddyliert.

Die Tatsache, dass für viele der untersuchten putativen NEDD8-Substrate die Neddylierung nicht bestätigt werden konnte, unterstützt die Vermutung, dass viele der identifizierten Proteine Interaktoren von NEDD8 und neddylierten Proteinen sind, die mit aufgereinigt wurden, da die Aufreinigung unter nativen Bedingungen stattgefunden hat.

Dennoch konnte für ein Protein die Modifikation mit NEDD8 bestätigt werden: das MD-2-related lipid-recognition domain Protein ML3.

## 4.2 ML3 ist ein neues NEDD8-Substrat in *Arabidopsis*

### 4.2.1 ML3 ist ein *Brassicales*-spezifisches ML-Protein

ML3 gehört in die Familie der MD-2-related lipid-recognition domain Proteine (ML), eine Gruppe kleiner Proteine (meist unter 20 kD), die N-terminal ein Signalpeptid für den Import in das ER tragen und ansonsten meist ausschließlich aus der ML-Domäne bestehen (Inohara and Nunez, 2002). Da diese Familie keine Homologie zu unspezifischen Lipidtransferproteinen aufweist, geht man davon aus, dass spezifische Lipide die Liganden von ML-Proteinen sind (Inohara and Nunez, 2002). So bindet der Namensgeber der Domäne MD-2, ein menschliches Protein, den Lipid A-Teil von Lipopolysacchariden (LPS) aus der Membran gramnegativer Bakterien (Viriyakosol et al., 2001; Park et al., 2009). Das extrazelluläre MD-2 agiert als Korezeptor zusammen mit dem TOLL-LIKE RECEPTOR 4 (TLR4). Werden LPS durch MD-2 und TLR4 gebunden, löst dies eine Immunantwort aus. In Menschen gibt es drei weitere ML-Proteine. MD-1, das wie MD-2 LPS bindet, aber nur in B-Lymphozyten exprimiert wird (Miura et al., 1998) und die zwei lysosomalen Proteine NIEMANN-PICK DISEASE, TYPE C2 (NPC2) und GM2-ACTIVATOR (GM2A). NPC2 bindet Cholesterin und ist in dessen Recycling beteiligt (Friedland et al., 2003; Storch and Xu, 2009; Kolter and Sandhoff, 2010). GM2A unterstützt die  $\beta$ -Hexosaminidase A beim Abbau des Gangliosids GM2 zu GM3 (Conzelmann and Sandhoff, 1979; Kolter and Sandhoff, 2010). Dies zeigt, dass ML-Proteine sehr spezifisch Lipide binden können und dass sie an sehr verschiedenen Stellen in der Zelle lokalisieren, auch wenn sie alle ein ER-Importsignal besitzen.

Obwohl es in Pflanzen eine Vielzahl an Proteinen mit einer ML-Domäne gibt (Abbildung 24B)(Inohara and Nunez, 2002), wurde, im starken Gegensatz zu den gut charakterisierten menschlichen Homologen, keines dieser Proteine bisher biochemisch oder zellbiologisch untersucht. Auf Grund der schlechten Konservierung der Domäne (Abbildung 23) und der unterschiedlichen Struktur der Liganden, lässt sich nicht vorhersagen, welchen Liganden ML3 bindet. Die Beobachtung, dass ML3 zu einer *Brassicales*-spezifischen Gruppe der ML-

Proteine gehört (Abbildung 24B), legt jedoch die Vermutung nahe, dass es sich um ein Molekül handelt, das spezifisch für diese Ordnung ist.

#### 4.2.2 ML3 wird durch NEDD8 und Ubiquitin modifiziert

In *Arabidopsis thaliana* waren zu Beginn dieser Arbeit nur die Culline als Substrate von NEDD8 bekannt (Hua and Vierstra, 2011). Durch die Aufreinigung und anschließende massenspektrometrische Analyse von NEDD8 und neddylierten Proteinen wurde ML3 als mögliches Substrat identifiziert. Die darauf folgenden Experimente zeigten, dass es sich bei ML3 tatsächlich um ein neddyliertes Protein handelt. Da die Überexpression von NEDD8 dazu führen kann, dass Ubiquitin-Substrate neddyliert werden (Hjerpe et al., 2012), ist es besonders bemerkenswert, dass ML3 auch von endogenem NEDD8 modifiziert wurde (Abbildung 18C). Als weiteren Beweis, dass es sich um ein echtes NEDD8-Substrat handelt, ist die MLN4924 Sensitivität dieser Modifikation zu betrachten, die zeigt, dass das NEDD8 über den vorgesehenen Weg angehängt wurde (Abbildung 22). Interessanterweise ist ML3 auch von anderen als mögliches NEDD8-Substrat identifiziert worden (Hotton et al., 2012). In dieser Studie gelang es allerdings nicht, die NEDD8-Modifikation von ML3 zu beweisen. Dies lässt sich unter anderem damit erklären, dass versucht worden war, die Neddylierung in *Nicotiana benthamiana* (Tabak) zu untersuchen. Da es sich bei ML3 aber um ein *Brassicales*-spezifisches Protein handelt, ist es denkbar, dass Komponenten, die für die NEDD8-Modifikation von ML3 nötig sind, in Tabak fehlen.

Die Identifizierung des modifizierten Lysins eines NEDD8-Substrats ist ein wichtiger Schritt für die Charakterisierung der Modifikation. Die Mutation einzelner Lysine in ML3 konnte dessen Neddylierung jedoch nicht verhindern (Abbildung 19). Zusammen mit der Beobachtung, dass oft mehrere NEDD8-ML3-Banden in Western-Blots detektiert wurden, spricht dies dafür, dass ML3 an multiplen Lysinen neddyliert wird. Dies ist ein häufiges Phänomen von NEDD8-Substraten in anderen Spezies (Rabut and Peter, 2008). So konnte in menschlichen Zelllinien z. B. gezeigt werden, dass das Histon H4 sowohl an mehreren Lysinen neddyliert wird, wie auch, dass NEDD8 an Histon H4 Ketten bilden kann (Ma et al., 2013).

Die massenspektrometrische Identifikation der NEDD8- oder Ubiquitin-Modifikation ist technisch schwierig und so wurde mit K137 bisher nur eine mögliche Neddylierungsstelle in ML3 gefunden (Abbildung 20). Da Ubiquitin nach einem Verdau mit Trypsin den gleichen Rest wie NEDD8 hinterlässt und ML3 auch ubiquitiniert wird (Abbildung 21), lässt sich nicht eindeutig sagen, ob das Peptid neddyliert oder ubiquitiniert war. Zusammenfassend ist zu sagen, dass für die eindeutige Identifizierung der NEDD8-modifizierten Lysine in ML3 weitere Experimente nötig sind. Eine Möglichkeit, die Neddylierungsstelle über Massenspektrometrie zu identifizieren, ist ein NEDD8 mit einem mutierten C-Terminus zu exprimieren. So kann nach dem tryptischen Verdau die Modifikation mit NEDD8 eindeutig nachgewiesen werden, ein Ansatz der für SUMO erfolgreich angewendet wurde (Miller et al., 2010).

Neben der Modifikation von ML3 mit NEDD8 wurde auch eine Ubiquitinierung des Proteins beobachtet (Abbildung 21B). NEDD8-Substrate können häufig auch ubiquitiniert werden und

werden dann meist über das Proteasom abgebaut (Herrmann et al., 2007). Ein bekanntes Beispiel hierfür ist das Tumorsuppressor-Protein p53, das von der E3-Ubiquitinligase MDM2 sowohl neddyliert wie auch ubiquitiniert werden kann (Michael and Oren, 2003; Xirodimas et al., 2004; Abida et al., 2007). p53 wird durch die Neddylierung in seiner Aktivität als Transkriptionsfaktor inhibiert und durch Ubiquitin für den proteasomalen Abbau markiert. Bemerkenswert ist, dass das ubiquitinierte ML3 stabil zu sein scheint, da es nachgewiesen werden konnte, obwohl zuvor kein Proteasominhibitor zum Einsatz gekommen war. Die Ubiquitinierung ML3s scheint daher nicht als Signal für den Abbau des Proteins über das Proteasom zu dienen. Um die Frage zu klären, ob ML3 ein Substrat des Proteasoms ist, könnten Stabilitätsstudien mit MG132 durchgeführt werden. Außerdem könnte untersucht werden, über welches Lysin die Ubiquitinmoleküle miteinander verbunden sind, da Antikörper gegen die verschieden verknüpften Ubiquitinketten existieren. Dies könnte helfen, die Funktion der Ubiquitinierung von ML3 aufzuklären.

#### 4.2.3 Die Interaktion ML3s mit NEDD8 und Ubiquitin

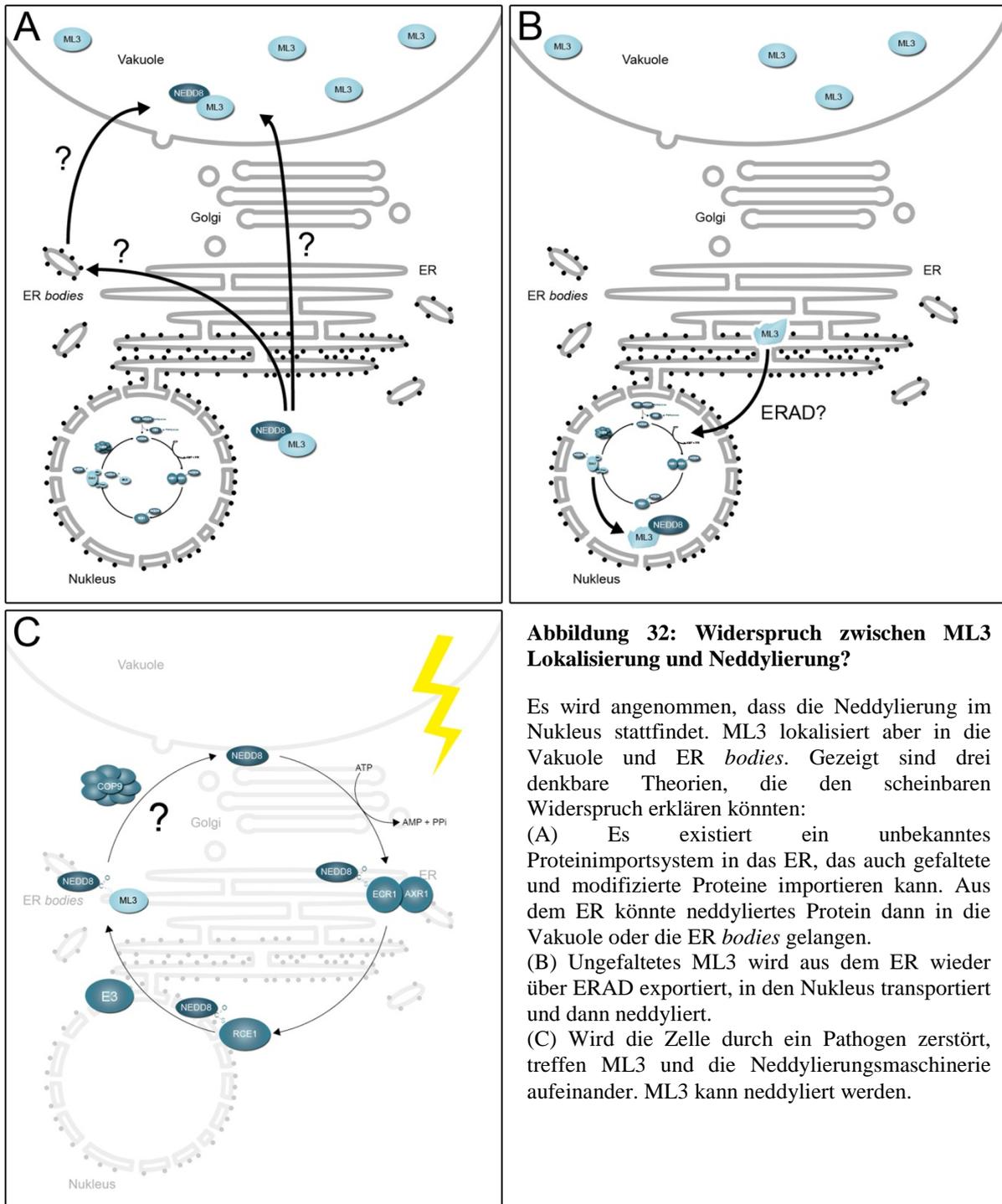
Sehr interessant und zugleich überraschend ist die beobachtete Interaktion von ML3 mit NEDD8 und Ubiquitin (Abbildung 21). Es scheint unwahrscheinlich, dass die große Menge an unmodifiziertem ML3, im Vergleich zu der kleinen Menge an neddyliertem ML3, nach der Aufreinigung von HSN, durch Deneddylierung von ML3 zu erklären ist. Vielmehr scheint es wahrscheinlich, dass ML3 mit NEDD8 oder neddylierten Proteinen non-kovalent interagieren kann. ML3 war zuvor schon einmal als Interaktor eines Pentaubiquitins in einem *Yeast Two-Hybrid-Screen* beschrieben worden (siehe EMBL-ENA Datenbankeintrag ABH03542) und auch ein *Yeast Two-Hybrid-Experiment* mit ML3 fusioniert mit der DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktor GAL4 (BD-ML3) und NEDD8 bzw. Ubiquitin fusioniert mit der Aktivierungsdomäne von GAL4 (AD-NEDD8, bzw. AD-UBQ) konnte die Interaktion zwischen ML3 und dem Ubiquitin-ähnlichen Protein NEDD8 bzw. Ubiquitin bestätigen (Abbildung 21C). Allerdings wurde AD-NEDD8 und AD-Ubiquitin auch von der Hefe erkannt und es wurden, zumindest im Fall von AD-NEDD8 erkennbar, auch eigene Proteinsubstrate damit modifiziert (Abbildung 21D). AD-Ubiquitin-Substrate waren allerdings weniger abundant, was sich wahrscheinlich dadurch erklären lässt, dass diese Proteine über das Proteasom abgebaut wurden. Es lässt sich nicht ausschließen, dass die beobachtete Interaktion zwischen BD-ML3 und AD-NEDD8 bzw. AD-Ubiquitin durch die stabile Modifikation der Proteine, und nicht durch eine non-kovalente Interaktion zu erklären ist. Da nach der Aufreinigung von HSN große Mengen an unmodifiziertem ML3 detektiert wurden und nach der Aufreinigung von HSUB kein oder in Einzelfällen nur kleine Mengen unmodifiziertes ML3 gefunden wurde, scheint *in planta* aber eine Diskriminierung zwischen NEDD8 und Ubiquitin durch ML3 durchaus möglich zu sein (Abbildung 21). Da es nicht gelang ML3, in dem Bakterium *Escherichia coli* oder in der Hefe *Pichia pastoris* zu exprimieren, war es nicht möglich, diese Interaktionen näher zu untersuchen.

Die Beobachtung, dass ML3 Ubiquitin und das Ubiquitin-ähnliche Protein NEDD8 binden kann, ist besonders faszinierend, da ML3 keine bekannte Ubiquitin-Bindedomäne aufweist und auch für kein anderes ML-Protein eine solche Interaktion beschrieben wurde. Mehr als zwanzig Familien von Ubiquitin-Bindedomänen sind bereits charakterisiert und es werden ständig mehr identifiziert (Dikic et al., 2009). Da diese Familien teils sehr unterschiedliche

Strukturen ausweisen (Dikic et al., 2009), scheint es durchaus möglich, dass ML3 eine neue Familie dieser Bindedomänen enthält. Auf Grund der schlechten Konservierung zwischen ML3 und MD-2 oder zwischen ML3 und anderen Proteinen, für die eine Kristallstruktur publiziert wurde, lässt sich die Struktur von ML3 nicht modellieren und daher an dieser Stelle auch nicht darüber spekulieren, in welcher Weise diese Interaktion stattfinden könnte.

#### 4.2.4 Die subzelluläre Lokalisierung ML3s

Aufgrund der Lokalisierung bekannter Komponenten der Neddylierung in den Nukleus, geht man davon aus, dass dieser Prozess im Zellkern stattfindet (Kamitani et al., 1997; Pozo et al., 1998; del Pozo et al., 2002). Daher ist es überraschend, dass ein Protein, das ein ER-Importsignal besitzt und schlussendlich in die Vakuole und ER *bodies* lokalisiert, neddyliert wird. Denkbar sind verschiedene Szenarien: (1) Ein theoretisch denkbare Szenario, in dem neddyliertes ML3 über die ER-Membran importiert wird, scheint unwahrscheinlich, da Proteine während der Translation durch Ribosomen, die mit dem ER assoziiert sind, in das ER importiert und erst im Lumen des ERs gefaltet werden. Dabei wird das N-terminale Signalpeptid abgespalten. Es kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass der Import neddylierten ML3s über einen bisher unbekanntem Mechanismus vonstatten geht (Abbildung 32A). (2) Des Weiteren wäre es denkbar, dass es für ML3 weitere Splicevarianten gibt, oder alternative Startcodons genutzt werden können, so dass das entstehende Protein kein Signalpeptid besitzt. Allerdings ist für ML3 keine Splicevariante annotiert. Auch die Nutzung alternativer Startcodons scheint nicht plausibel. ML3 hat vier Methionine, M1, M3, M9 und M148. Wenn M3 oder M9 dem Startcodon entsprechen würden, hätte das entstehende Protein immer noch ein vorhergesagtes Signalpeptid. (3) Es konnte gezeigt werden, dass Proteine, die nicht richtig gefaltet sind und über den ER-associated degradation-Weg (ERAD) abgebaut werden sollen, aus dem ER exportiert werden und dann sowohl im Zytoplasma wie auch im Nukleus detektierbar sind, wobei der Import in den Nukleus aktiv ist und nicht durch Diffusion erklärt werden kann (Brandizzi et al., 2003). Interessant ist, dass davon ausgegangen wird, dass die Proteine dabei die vorhandene Faltung beibehalten. Es wäre also denkbar, dass falsch gefaltetes ML3 aus dem ER exportiert wird, in den Nukleus gelangt und dort neddyliert wird (Abbildung 32B). Da aber ML3 ohne ein Signalpeptid auch neddyliert werden kann (Abbildung 18C), scheint auch dieses Szenario nicht allzu wahrscheinlich. (4) Die Vakuole und ER *bodies* dienen als Speicherort für Proteine, die für die Abwehr von Pathogenen benötigt werden, aber für den normale Metabolismus einer Zelle nicht gebraucht werden oder diesen sogar stören können. Da ML3 sowohl in der Vakuole, wie auch in ER *bodies* lokalisiert und eine Rolle in der Pathogenabwehr hat, ist es möglich, dass ML3 dort auch nur gespeichert wird und erst bei der Zerstörung der Zelle durch Pathogene freigesetzt wird, um seine Aufgabe zu erfüllen. Es wäre also denkbar, dass ML3 erst neddyliert wird, wenn die Zelle aufgebrochen wurde (Abbildung 32C). Ob die Neddylierungsmaschinerie bei dem niedrigen pH und dem hohen Gehalt an aktiver Proteasen in einer aufgelösten Zelle noch funktioniert, ist allerdings fraglich.



**Abbildung 32: Widerspruch zwischen ML3 Lokalisierung und Neddylierung?**

Es wird angenommen, dass die Neddylierung im Nukleus stattfindet. ML3 lokalisiert aber in die Vakuole und ER *bodies*. Gezeigt sind drei denkbare Theorien, die den scheinbaren Widerspruch erklären könnten:

(A) Es existiert ein unbekanntes Proteinimportsystem in das ER, das auch gefaltete und modifizierte Proteine importieren kann. Aus dem ER könnte neddyliertes Protein dann in die Vakuole oder die ER *bodies* gelangen.

(B) Ungefaltetes ML3 wird aus dem ER wieder über ERAD exportiert, in den Nukleus transportiert und dann neddyliert.

(C) Wird die Zelle durch ein Pathogen zerstört, treffen ML3 und die Neddylierungsmaschinerie aufeinander. ML3 kann neddyliert werden.

Neben den aufgeführten Szenarien gibt es noch weitere denkbare Möglichkeiten, wie, wo und wann ML3 neddyliert werden könnte. Es bedarf daher auf jeden Fall noch weiterer Experimente, um den scheinbaren Widerspruch zwischen ER-Import und Neddylierung von ML3 zu erklären.

Im Gegensatz zu dem Widerspruch zwischen Neddylierung und ER-Import von ML3, ist die vakuoläre Lokalisierung in Einklang mit dem, was über andere ML-Proteine bekannt ist. So lokalisieren NPC2 und GM2A auch in die lytischen Organellen der menschlichen Zelle, die Lysosomen (Conzelmann and Sandhoff, 1979; Storch and Xu, 2009). Bioinformatische Vorhersagen für die subzelluläre Lokalisierung von Proteinen sagen für ML3 allerdings keine

vakuoläre Lokalisierung voraus, da ML3 kein bekanntes Signalpeptid für die Vakuole besitzt (siehe z. B. suba.plantenergy.uwa.edu.au/). Hingegen sprechen sehr viele experimentelle Daten für das Vorhandensein von ML3 in diesem Kompartiment. So ist das Fusionsprotein aus ML3 und mCherry in der Vakuole sichtbar, endogenes ML3 lässt sich in aufgereinigten Vakuolen nachweisen und auch das Ergebnis der subzellulären Fraktionierung passt zu der Lokalisierung in der Vakuole (Abbildung 26A, E und F). Des Weiteren wurde ML3 in einer Proteomanalyse als vakuoläres Protein identifiziert (Carter et al., 2004). Schwieriger hingegen ist der Beweis der ER *body* Lokalisierung von ML3. Zwar können ML3-mCherry und ML3-YFP mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie zweifelsfrei in diesen Organellen detektiert werden und auch die subzelluläre Fraktionierung von ML3-YFP-HA bestätigt das Vorhandensein von ML3 in ER *bodies*, jedoch scheiterten alle Versuche diese Lokalisierung für das endogene Protein nachzuweisen (Abbildung 26F). Dies lässt sich vielleicht damit begründen, dass eine relativ kleine Proteinmenge in den ER *bodies* gespeichert ist, ER *bodies* nur in wenigen Zellen vorkommen und daher ML3 durch Western-Blot nach der subzellulären Fraktionierung nicht nachweisbar ist. Die Beobachtung, dass ein durch die C-terminale Aminosäuresequenz AFVY in die Vakuole lokalisiertes RFP auch in ER *bodies* detektiert werden kann, räumt die Möglichkeit ein, dass ML3-mCherry und ML3-YFP unspezifisch auf dem Weg in die Vakuole in diesem Kompartiment akkumulieren (Abbildung 26B)(Scabone et al., 2011). ER *bodies* können auch direkt mit der Vakuole fusionieren und es ist daher möglich, dass es sich um einen alternativen Weg für den Proteintransport in die Vakuole handelt (Abbildung 32A)(Hayashi et al., 2001). Trotzdem erscheint es unwahrscheinlich, dass es sich um einen Zufall oder ein Artefakt handelt, dass Fusionsproteine von ML3 in ER *bodies* lokalisieren, da ML3 mit der Biologie von ER *bodies* eng verknüpft ist.

#### 4.2.5 ML3 ist mit der ER *body*-Biologie assoziiert

Einer der ersten Hinweise darauf, dass ML3 mit der ER *body*-Biologie assoziiert ist, kam durch die Beobachtung, dass *ML3* mit einigen Genen koreguliert ist, die eine bekannte Rolle in der Bildung von ER *bodies* und deren Funktion haben (Tabelle 18). So befinden sich in der Liste der mit *ML3* koregulierten Gene *NAI1* und *NAI2*, die beide für die Bildung von ER *bodies* benötigt werden (Matsushima et al., 2003; Yamada et al., 2008), *PYK10*, eine  $\beta$ -Glukosidase, die als Hauptbestandteil der ER *bodies* angesehen wird (Matsushima et al., 2003), ein ER *body*-Membran spezifisches Protein MEB1 (Yamada et al., 2013), sowie einige JACALIN-RELATED LECTIN-Proteine und ein GDSL LIPASE-LIKE PROTEIN, die eine Rolle in der Bildung von PYK10-haltigen Komplexen spielen (Nagano et al., 2005; Nagano et al., 2008). *ML3* wurde zudem in einem Microarrayexperiment mit *nai1-1* als eines der am stärksten runterregulierten Gene gefunden (Nagano et al., 2008). Da *NAI1* ein Transkriptionsfaktor ist, lag die Vermutung nahe, dass die Expression von *ML3* direkt durch *NAI1* reguliert wird. Diese Hypothese wurde unterstützt, durch die Bestätigung, dass *ML3* in *nai1*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp nur schwach exprimiert wird und dadurch, dass es nicht die Abwesenheit von ER *bodies* ist, die zu einer geringeren Akkumulation von ML3 in *nai1* führt (Abbildung 27B und C). Außerdem ergab eine Analyse des *ML3*-Promotors, dass dieser mindestens vier *E-boxes* enthält, Elemente an die Helix-loop-helix-Transkriptionsfaktoren wie *NAI1* binden (Abbildung 27D). Es erscheint daher möglich, dass *NAI1* die Expression von *ML3* direkt reguliert. Als ein weiterer Beweis für diese Hypothese

kann angesehen werden, dass die Expression von *ML3*, auch im Hinblick auf die MeJA-Induzierbarkeit und die Repression durch eine gleichzeitige Behandlung mit dem Etyhlenvorläufer ACC, dem Expressionsmuster von *NAI1* und dem von *NAI1*-regulierten Gen *PYK10* folgt (Abbildung 29A)(Matsushima et al., 2004). Da die Bildung von ER *bodies* nicht nur durch die Behandlung mit MeJA induziert werden kann, sondern auch durch die Verletzung der Blätter (Matsushima et al., 2002), wurde die Expression von *ML3* in Antwort auf Verwundung untersucht. Tatsächlich konnte beobachtet werden, dass der Promotor von *ML3* auf Verwundung aktiviert wird (Abbildung 29C). Noch stärker schien die Induktion allerdings, wenn Larven des Schmetterlings *Spodoptera littoralis* von den Blättern der Pflanze gefressen hatten (Abbildung 29D), was in Einklang mit der Rolle von *ML3* in der Antwort auf Herbivorenbefall ist (Fridborg et al., 2013).

#### 4.2.6 *ML3* spielt eine Rolle in der Pathogenabwehr

Aufgrund der Induzierbarkeit der Bildung von ER *bodies* durch Verwundung und Methyljasmonat wird schon lange angenommen, dass diese Organellen eine Rolle in der Pathogenabwehr spielen (Matsushima et al., 2002). Dafür spricht auch das Vorkommen dieser Strukturen in der Epidermis, dem Gewebe, das zuerst mit dem Pathogen in Kontakt kommt. Spannend ist daher auch die Beobachtung, dass *ML3* ebenfalls spezifisch in der Epidermis von 5 d alten Keimlingen exprimiert wird (Abbildung 29B). Um zu testen, ob *ML3* eine Rolle in der Pathogenabwehr hat, wurden *ml3*-Mutanten mit dem nekrotrophen Pilz *Alternaria brassicicola* und dem hemi-biotrophen Bakterium *Pseudomonas syringae DC3000* infiziert. Es zeigte sich, dass *ml3-3* im Vergleich zum Wildtyp anfälliger für Infektionen mit *A. brassicicola* ist und resistenter auf Infektionen mit *P. syringae* reagiert (Abbildung 30).

Im Allgemeinen wird angenommen, dass nekrotrophe Pathogene über Jasmonsäure- und Ethylen-abhängige Wege abgewehrt werden und biotrophe Pathogene über Salicylsäure-abhängige (Bostock, 2005; Glazebrook, 2005). Jasmonsäure (JA) und Salicylsäure (SA) beeinflussen sich gegenseitig negativ. So werden SA-abhängige Wege durch JA unterdrückt und umgekehrt. Das erscheint sinnvoll, da die Antwort auf biotrophe und nekrotrophe Pathogene oft gegensätzlich ist. Durch den Befall mit einem biotrophen Pathogen wird z. B. an der Stelle der Infektion der Zelltod ausgelöst, ein Prozess den man als *hypersensitive response* (HR) kennt (Glazebrook, 2005; Coll et al., 2011). Damit bewirkt die Pflanze, dass der auf lebende Zellen angewiesene Angreifer sich aufgrund von Wasser- und Nährstoffmangel nicht weiter entwickeln kann. Da aber ein nekrotrophes Pathogen sich von toten Zellen ernährt, wäre das Auslösen einer HR für den Pathogen vorteilhaft und daher schädlich für die Pflanze. Faszinierend ist, dass *Pseudomonas syringae* das antagonistische Verhältnis zwischen SA und JA für sich nutzt, indem es das Phytotoxin Coronatin produziert, das als JA-Analog fungiert und so die SA-Antwort unterdrückt (Glazebrook, 2005). Die beobachtete Überempfindlichkeit gegenüber *Alternaria brassicicola* und die Resistenz gegenüber *Pseudomonas syringae DC3000* der *ml3*-Mutante scheint daher in Einklang mit der Induzierbarkeit der *ML3*-Expression durch MeJA und dessen Repression durch SA (Abbildung 29A)(Fridborg et al., 2013). Außerdem wurde gezeigt, dass die Unterdrückung der *ML3*-Expression zu einer veränderten Expression von SA- und JA-induzierter Gene führt. So wird das SA-induzierte Gen *PR1* in Pflanzen, in denen die *ML3*-Expression unterdrückt ist, stark überexprimiert und die Expression des JA-induzierten Gens *VSP2* ist schwächer und

kann durch einen Befall mit *Spodoptera littoralis* kaum noch induziert werden (Fridborg et al., 2013). Eine veränderte Antwort von *ml3*-Mutanten auf MeJA und SA könnte daher eine mögliche Erklärung für den beobachteten Pathogen-assoziierten Phänotyp sein.

#### 4.2.7 Glukosinolate und ML3

*ML3* ist neben Genen, die mit *ER bodies* in Verbindung stehen auch mit Glukosinolat-assoziierten Genen koreguliert (Tabelle 18). Glukosinolate sind chemische Substanzen, die nach Pathogenbefall gespalten werden, wodurch giftige Verbindungen wie Isothiocyanate entstehen, die für die Abwehr des Angreifers wichtig sein können (Wittstock and Burow, 2010; Bednarek, 2012; Mithofer and Boland, 2012). Zu den mit *ML3*-koregulierten und mit Glukosinolaten-assoziierten Genen zählen *NITRILE SPECIFIER PROTEIN 1 (NSP1)*, *NSP3* und *NSP4*, die beim Abbau von Glukosinolaten die Entstehung von Nitrilen katalysieren (Kuchernig et al., 2012), die *INDOLE GLUCOSINOLATE O-METHYLTRANSFERASE5*, die wahrscheinlich eine Rolle in der Synthese von Indolglukosinolaten spielt (Pfalz et al., 2011), der Glukosinolatbiosynthese-regulierende Transkriptionsfaktor *ATRI/MYB34* (Score 0,564) (Bender and Fink, 1998; Celenza et al., 2005) und *PYK10*, eine Myrosinase-ähnliche  $\beta$ -Glukosidase. Diese Beobachtung ist besonders interessant im Hinblick darauf, dass Larven des Generalisten *Spodoptera littoralis* im Vergleich zum Wildtyp besser gedeihten, wenn sie sich von *ml3*-Mutanten ernährten, eine Beobachtung die für den Spezialisten *Plutella xylostella* nicht gemacht werden konnte (Fridborg et al., 2013). Eine mögliche Erklärung wäre, dass *ml3*-Mutanten bei Befall mit Herbivoren weniger giftige Abbauprodukte von Glukosinolaten produzieren. Für *P. xylostella*, der auf *Brassicaceae*-Spezies spezialisiert ist und daher mit den giftigen Abbauprodukten von Glukosinolaten umgehen kann, wäre das kein Vorteil, wohl aber für den Generalisten *S. littoralis*. Zu einem Mangel an giftigen Abbauprodukten von Glukosinolaten in *ml3*-Mutanten würde auch die beobachtete Resistenz gegenüber dem nekrotrophen Pilz *A. brassicicola* passen, da Glukosinolate auch in der Abwehr dieser Pathogenklasse aktiv sind (Stotz et al., 2011). Das Vorkommen von Glukosinolaten ist weitgehend beschränkt auf die Ordnung *Brassicales*. Auch das Vorkommen von *ER bodies* scheint auf diese Pflanzengruppe beschränkt zu sein und so hat das Protein NAI2, das essenziell für die Bildung von *ER bodies* ist, keine Homologe außerhalb dieser Ordnung (Yamada et al., 2008). Interessanterweise hat der Hauptbestandteil der *ER bodies* PYK10 Homologie zu Myrosinasen, Glukosidasen, die den Zucker von Glukosinolaten abspalten und damit die Entstehung der giftigen Abbauprodukte wie Isothiocyanate, Thiocyanate, Nitrile oder Epithionitrile katalysieren (Rask et al., 2000; Matsushima et al., 2002; Nagano et al., 2005). Für PYK10 wurde gezeigt, dass es  $\beta$ -D-Glucosidase- und  $\beta$ -D-Fukosidaseaktivität hat und dass es das häufigste Glucosid in Wurzeln, Scopolin, spalten kann (Matsushima et al., 2004; Ahn et al., 2010). Der Beweis, dass PYK10 auch Myrosinaseaktivität hat, steht allerdings noch aus. Es wurde auch gezeigt, dass *pyk10*-Mutanten von dem mutualistischen Pilz *Piriformospora indica* hyperkolonisiert werden und der sonst positive Effekt dieser Symbiose nicht zu beobachten war (Sherameti et al., 2008). Es wird daher angenommen, dass PYK10 daran beteiligt ist, ein zu starkes Wachstum des Pilzes zu verhindern (Sherameti et al., 2008). Neben Glukosinolaten, *ER bodies* und NAI2 scheint auch *ML3* *Brassicales*-spezifisch zu sein (Abbildung 24). Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass *ML3* in die Vakuole lokalisiert, dem Kompartiment in dem

Glukosinolate gespeichert werden. Auf Grund dieser Beobachtungen scheint es durchaus möglich zu sein, dass der Ligand von ML3 mit Glukosinolaten und deren Biologie assoziiert ist.

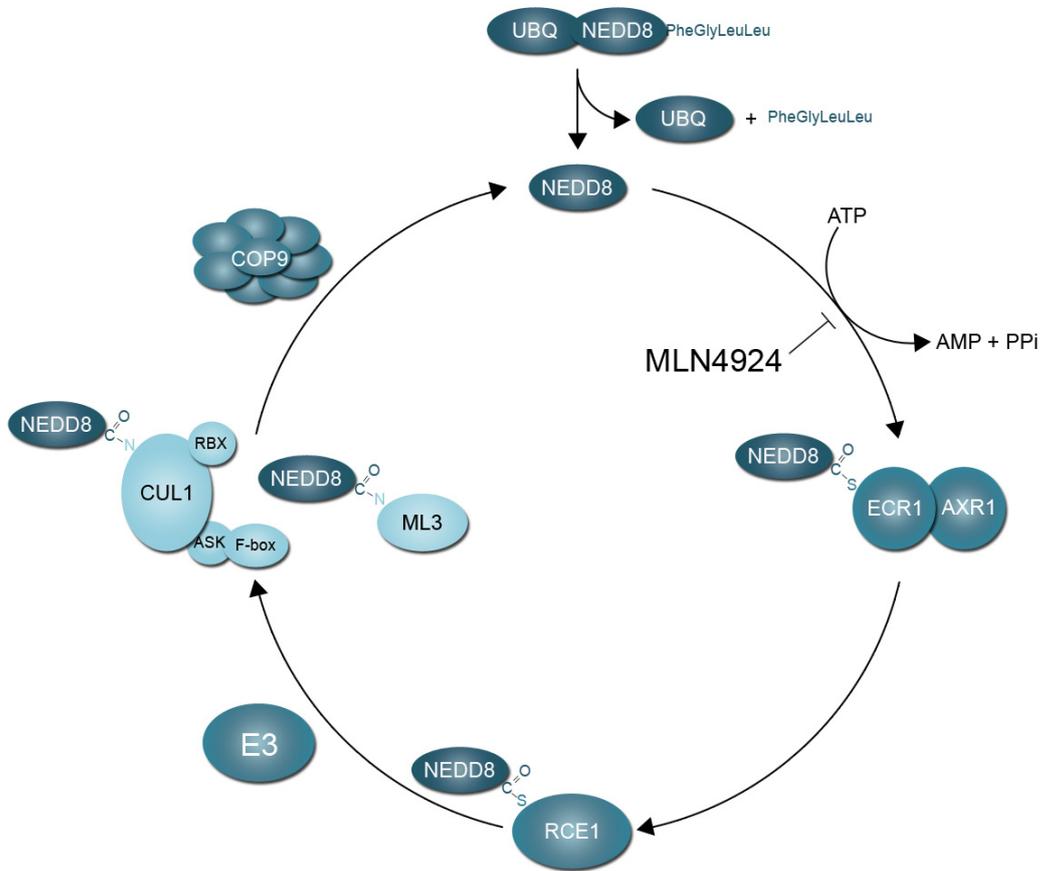
### 4.3 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit galt es, die Funktionalität des Inhibitors MLN4924 in Pflanzen zu testen und unbekannte NEDD8-Substrate in *Arabidopsis thaliana* zu identifizieren und zu charakterisieren.

Ich konnte auf molekularer Ebene zeigen, dass MLN4924 in *Arabidopsis* spezifisch die Neddylierung inhibieren kann, während die Ubiquitinierung nicht beeinflusst wird. Die Inhibition der NEDD8-Aktivierung konnte ich weiter belegen, indem ich zeigen konnte, dass die Aktivität von CRL durch MLN4924 gestört wird und CRL-Substrate dadurch stabilisiert werden. Als Beispiel für CRL-regulierte Prozesse wurde die Wirkung MLN4924s auf die Auxinsignaltransduktion und die Lichtsignaltransduktion untersucht. Der Auxinsignalweg wird durch MLN4924 gestört, was zu einer Auxininsensitivität der behandelten Pflanzen, mit typischen Phänotypen wie dem agravitropen Wurzelwachstum führt. Der Lichtsignalweg wird im Gegensatz durch MLN4924 aktiviert, und so durchlaufen behandelte Keimlinge die Photomorphogenese auch im Dunkeln. In *Arabidopsis thaliana*, *Cardamine hirsuta*, *Solanum lycopersicum* und *Brachypodium distachyon* konnte ich zeigen, dass MLN4924 allgemein Phänotypen auslöst, die durch die Inhibition der CRLs in den Signalwegen der Phytohormone Gibberellin, Jasmonsäure, Ethylen und Auxin erklärt werden können. Dies beweist, dass MLN4924 in verschiedenen Pflanzengruppen spezifisch die NEDD8-Aktivierung inhibieren kann.

Mit dem Beweis der NEDD8-Modifikation des MD-2-related lipid-recognition domain Protein ML3 ist es mir gelungen, das erste NEDD8-Substrat neben den Cullinen in Pflanzen zu identifizieren. Ich konnte zeigen, dass ML3 nicht nur mit NEDD8 modifiziert werden kann, sondern dass es auch ein Ubiquitin-Substrat ist. Des Weiteren legen meine Experimente nahe, dass ML3 mit NEDD8 und Ubiquitin auch non-kovalent interagieren kann. Da zu Beginn dieser Arbeit ML3 keine bekannte Funktion hatte, wurden erste Schritte unternommen, ML3 zu charakterisieren. So konnte ich zeigen, dass ML3 in die Vakuole und in ER *bodies* lokalisiert. Die Lokalisierung in ER *bodies* ist besonders interessant mit Hinblick darauf, dass *ML3* mit ER *body*-assoziierten Genen koreguliert ist und die *ML3*-Expression durch den Transkriptionsfaktor NAI1 gesteuert wird, einem essenziellen Regulator der ER *body*-Bildung. In Einklang damit konnte ich zeigen, dass die Expression *ML3*s durch Methyljasmonat und Ethylen, sowie durch Verwundung in gleicher Weise beeinflusst wird, wie die Bildung der ER *bodies*. Da diese Organellen spezifisch in der Ordnung der *Brassicales* vorkommen, passt auch die Beobachtung, dass ML3 in eine Gruppe *Brassicales*-spezifischer ML-Proteine gehört, in das entstehende Bild. Mein Kollaborator Sarosh Bejai konnte dieses Bild von ML3 erweitern, indem er gezeigt hat, dass *ml3*-Mutanten sensibler für Infektionen mit dem nekrotrophen Pilz *Alternaria brassicicola* sind, aber eine Resistenz gegen das hemi-biotrophe Bakterium *Pseudomonas syringae* DC3000 zeigen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass ML3, vielleicht zusammen mit weiteren ER *body*-Proteinen, eine Rolle in der Pathogenabwehr spielt.

Zusammenfassend konnten die zuvor gesetzten Ziele, die Funktionalität des Inhibitors MLN4924 in Pflanzen zu zeigen und unbekannte NEDD8-Substrate in *Arabidopsis thaliana* zu identifizieren und zu charakterisieren, erreicht werden (Abbildung 33).



**Abbildung 33: Zusammenfassung**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass MLN4924 in *Arabidopsis* spezifisch die Aktivierung von NEDD8 inhibiert. Außerdem habe ich ML3 als ein neues NEDD8-Substrat identifiziert und erste Schritte unternommen, dieses zu charakterisieren.

## 5 Quellenverzeichnis

- Abas L, Benjamins R, Malenica N, Paciorek T, Wisniewska J, Moulinier-Anzola JC, Sieberer T, Friml J, 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
- Abida WM, Nikolaev A, Zhao W, Zhang W, Gu W** (2007) FBXO11 promotes the Neddylation of p53 and inhibits its transcriptional activity. *J Biol Chem* **282**: 1797-1804
- Ahn YO, Shimizu B, Sakata K, Gantulga D, Zhou C, Bevan DR, Esen A** (2010) Scopolin-hydrolyzing beta-glucosidases in roots of Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **51**: 132-143
- Aoki I, Higuchi M, Gotoh Y** (2012) NEDDylation controls the target specificity of E2F1 and apoptosis induction. *Oncogene*
- Aoyama T, Chua NH** (1997) A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J* **11**: 605-612
- Ariizumi T, Lawrence PK, Steber CM** (2011) The role of two f-box proteins, SLEEPY1 and SNEEZY, in Arabidopsis gibberellin signaling. *Plant Physiol* **155**: 765-775
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T** (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**: 195-201
- Bai C, Sen P, Hofmann K, Ma L, Goebel M, Harper JW, Elledge SJ** (1996) SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* **86**: 263-274
- Bednarek P** (2012) Sulfur-containing secondary metabolites from Arabidopsis thaliana and other Brassicaceae with function in plant immunity. *Chembiochem* **13**: 1846-1859
- Bender J, Fink GR** (1998) A Myb homologue, ATR1, activates tryptophan gene expression in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5655-5660
- Binder BM, Walker JM, Gagne JM, Emborg TJ, Hemmann G, Bleecker AB, Vierstra RD** (2007) The Arabidopsis EIN3 binding F-Box proteins EBF1 and EBF2 have distinct but overlapping roles in ethylene signaling. *Plant Cell* **19**: 509-523
- Birnboim HC, Doly J** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523
- Boruc J, Mylle E, Duda M, De Clercq R, Rombauts S, Geelen D, Hilson P, Inze D, Van Damme D, Russinova E** (2010) Systematic localization of the Arabidopsis core cell cycle proteins reveals novel cell division complexes. *Plant Physiol* **152**: 553-565
- Bostick M, Lochhead SR, Honda A, Palmer S, Callis J** (2004) Related to ubiquitin 1 and 2 are redundant and essential and regulate vegetative growth, auxin signaling, and ethylene production in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 2418-2432
- Bostock RM** (2005) Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. *Annu Rev Phytopathol* **43**: 545-580
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Brandizzi F, Hanton S, DaSilva LL, Boevink P, Evans D, Oparka K, Denecke J, Hawes C** (2003) ER quality control can lead to retrograde transport from the ER lumen to the cytosol and the nucleoplasm in plants. *Plant J* **34**: 269-281

- Brownell JE, Sintchak MD, Gavin JM, Liao H, Bruzzese FJ, Bump NJ, Soucy TA, Milhollen MA, Yang X, Burkhardt AL, Ma J, Loke HK, Lingaraj T, Wu D, Hamman KB, Spelman JJ, Cullis CA, Langston SP, Vyskocil S, Sells TB, Mallender WD, Visiers I, Li P, Claiborne CF, Rolfe M, Bolen JB, Dick LR** (2010) Substrate-assisted inhibition of ubiquitin-like protein-activating enzymes: the NEDD8 E1 inhibitor MLN4924 forms a NEDD8-AMP mimetic in situ. *Mol Cell* **37**: 102-111
- Browse J** (2005) Jasmonate: an oxylipin signal with many roles in plants. *Vitam Horm* **72**: 431-456
- Callis J, Carpenter T, Sun CW, Vierstra RD** (1995) Structure and evolution of genes encoding polyubiquitin and ubiquitin-like proteins in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. *Genetics* **139**: 921-939
- Carpinella MC, Ferrayoli CG, Palacios SM** (2005) Antifungal synergistic effect of scopoletin, a hydroxycoumarin isolated from *Melia azedarach* L. fruits. *J Agric Food Chem* **53**: 2922-2927
- Carter C, Pan S, Zouhar J, Avila EL, Girke T, Raikhel NV** (2004) The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *Plant Cell* **16**: 3285-3303
- Celenza JL, Quiel JA, Smolen GA, Merrikh H, Silvestro AR, Normanly J, Bender J** (2005) The *Arabidopsis* ATR1 Myb transcription factor controls indolic glucosinolate homeostasis. *Plant Physiol* **137**: 253-262
- Chen H, Huang X, Gusmaroli G, Terzaghi W, Lau OS, Yanagawa Y, Zhang Y, Li J, Lee JH, Zhu D, Deng XW** (2010) *Arabidopsis* CULLIN4-damaged DNA binding protein 1 interacts with CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1-SUPPRESSOR OF PHYA complexes to regulate photomorphogenesis and flowering time. *Plant Cell* **22**: 108-123
- Chen R, Hilson P, Sedbrook J, Rosen E, Caspar T, Masson PH** (1998) The *Arabidopsis thaliana* AGRVITROPIC 1 gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 15112-15117
- Chini A, Fonseca S, Fernandez G, Adie B, Chico JM, Lorenzo O, Garcia-Casado G, Lopez-Vidriero I, Lozano FM, Ponce MR, Micol JL, Solano R** (2007) The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**: 666-671
- Choo YS, Vogler G, Wang D, Kalvakuri S, Iliuk A, Tao WA, Bodmer R, Zhang Z** (2012) Regulation of parkin and PINK1 by neddylation. *Hum Mol Genet* **21**: 2514-2523
- Christians MJ, Gingerich DJ, Hansen M, Binder BM, Kieber JJ, Vierstra RD** (2009) The BTB ubiquitin ligases ETO1, EOL1 and EOL2 act collectively to regulate ethylene biosynthesis in *Arabidopsis* by controlling type-2 ACC synthase levels. *Plant J* **57**: 332-345
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735-743
- Coll NS, Eppele P, Dangl JL** (2011) Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Differ* **18**: 1247-1256
- Conzelmann E, Sandhoff K** (1979) Purification and characterization of an activator protein for the degradation of glycolipids GM2 and GA2 by hexosaminidase A. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **360**: 1837-1849
- Cutler SR, Ehrhardt DW, Griffiths JS, Somerville CR** (2000) Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of *Arabidopsis* at a high frequency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 3718-3723
- da Costa CT, de Almeida MR, Ruedell CM, Schwambach J, Maraschin FS, Fett-Neto AG** (2013) When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. *Front Plant Sci* **4**: 133

- de Lucas M, Daviere JM, Rodriguez-Falcon M, Pontin M, Iglesias-Pedraz JM, Lorrain S, Fankhauser C, Blazquez MA, Titarenko E, Prat S** (2008) A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* **451**: 480-484
- del Pozo JC, Dharmasiri S, Hellmann H, Walker L, Gray WM, Estelle M** (2002) AXR1-ECR1-dependent conjugation of RUB1 to the Arabidopsis Cullin AtCUL1 is required for auxin response. *Plant Cell* **14**: 421-433
- del Pozo JC, Estelle M** (1999) The Arabidopsis cullin AtCUL1 is modified by the ubiquitin-related protein RUB1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 15342-15347
- Deveraux Q, Ustrell V, Pickart C, Rechsteiner M** (1994) A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J Biol Chem* **269**: 7059-7061
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M** (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**: 441-445
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Weijers D, Karunarathna N, Jurgens G, Estelle M** (2007) AXL and AXR1 have redundant functions in RUB conjugation and growth and development in Arabidopsis. *Plant J* **52**: 114-123
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Weijers D, Lechner E, Yamada M, Hobbie L, Ehrismann JS, Jurgens G, Estelle M** (2005) Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Dev Cell* **9**: 109-119
- Dharmasiri S, Dharmasiri N, Hellmann H, Estelle M** (2003) The RUB/Nedd8 conjugation pathway is required for early development in Arabidopsis. *EMBO J* **22**: 1762-1770
- Dikic I, Wakatsuki S, Walters KJ** (2009) Ubiquitin-binding domains - from structures to functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 659-671
- Dill A, Sun T** (2001) Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in Arabidopsis thaliana. *Genetics* **159**: 777-785
- Dill A, Thomas SG, Hu J, Steber CM, Sun TP** (2004) The Arabidopsis F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell* **16**: 1392-1405
- Dohmann EM, Kuhnle C, Schwechheimer C** (2005) Loss of the CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC9 signalosome subunit 5 is sufficient to cause the cop/det/fus mutant phenotype in Arabidopsis. *Plant Cell* **17**: 1967-1978
- Duda DM, Borg LA, Scott DC, Hunt HW, Hammel M, Schulman BA** (2008) Structural insights into NEDD8 activation of cullin-RING ligases: conformational control of conjugation. *Cell* **134**: 995-1006
- Duda DM, Scott DC, Calabrese MF, Zimmerman ES, Zheng N, Schulman BA** (2011) Structural regulation of cullin-RING ubiquitin ligase complexes. *Curr Opin Struct Biol* **21**: 257-264
- Earley KW, Haag JR, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K, Pikaard CS** (2006) Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J* **45**: 616-629
- Estelle M, Somerville CR** (1987) Auxin-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* with an altered morphology *Mol Gen Genet* **206**: 200-206
- Feng S, Martinez C, Gusmaroli G, Wang Y, Zhou J, Wang F, Chen L, Yu L, Iglesias-Pedraz JM, Kircher S, Schafer E, Fu X, Fan LM, Deng XW** (2008) Coordinated regulation of Arabidopsis thaliana development by light and gibberellins. *Nature* **451**: 475-479
- Fisher CL, Pei GK** (1997) Modification of a PCR-based site-directed mutagenesis method. *Biotechniques* **23**: 570-571, 574
- Fridborg I, Johansson A, Lagensjo J, Leelarasamee N, Flokova K, Tarkowska D, Meijer J, Bejai S** (2013) ML3: a novel regulator of herbivory-induced responses in Arabidopsis thaliana. *J Exp Bot* **64**: 935-948

- Friedland N, Liou HL, Lobel P, Stock AM** (2003) Structure of a cholesterol-binding protein deficient in Niemann-Pick type C2 disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 2512-2517
- Fu X, Harberd NP** (2003) Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response. *Nature* **421**: 740-743
- Fu ZQ, Yan S, Saleh A, Wang W, Ruble J, Oka N, Mohan R, Spoel SH, Tada Y, Zheng N, Dong X** (2012) NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature* **486**: 228-232
- Gagne JM, Downes BP, Shiu SH, Durski AM, Vierstra RD** (2002) The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 11519-11524
- Gan-Erdene T, Nagamalleswari K, Yin L, Wu K, Pan ZQ, Wilkinson KD** (2003) Identification and characterization of DEN1, a deneddylase of the ULP family. *J Biol Chem* **278**: 28892-28900
- Gao F, Cheng J, Shi T, Yeh ET** (2006) Neddylation of a breast cancer-associated protein recruits a class III histone deacetylase that represses NFkappaB-dependent transcription. *Nat Cell Biol* **8**: 1171-1177
- Geldner N, Denervaud-Tendon V, Hyman DL, Mayer U, Stierhof YD, Chory J** (2009) Rapid, combinatorial analysis of membrane compartments in intact plants with a multicolor marker set. *Plant J* **59**: 169-178
- Glazebrook J** (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **43**: 205-227
- Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, Puech-Pages V, Dun EA, Pillot JP, Letisse F, Matusova R, Danoun S, Portais JC, Bouwmeester H, Becard G, Beveridge CA, Rameau C, Rochange SF** (2008) Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* **455**: 189-194
- Griffiths J, Murase K, Rieu I, Zentella R, Zhang ZL, Powers SJ, Gong F, Phillips AL, Hedden P, Sun TP, Thomas SG** (2006) Genetic characterization and functional analysis of the *GID1* gibberellin receptors in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**: 3399-3414
- Grun S, Lindermayr C, Sell S, Durner J** (2006) Nitric oxide and gene regulation in plants. *J Exp Bot* **57**: 507-516
- Guilfoyle TJ, Hagen G** (2007) Auxin response factors. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 453-460
- Guo H, Ecker JR** (2003) Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF(EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell* **115**: 667-677
- Gutierrez L, Mongelard G, Flokova K, Pacurar DI, Novak O, Staswick P, Kowalczyk M, Pacurar M, Demailly H, Geiss G, Bellini C** (2012) Auxin controls Arabidopsis adventitious root initiation by regulating jasmonic acid homeostasis. *Plant Cell* **24**: 2515-2527
- Hakenjos JP, Bejai S, Ranftl Q, Behringer C, Vlot AC, Absmanner B, Hammes U, Heinzlmeir S, Kuster B, Schwechheimer C** (2013) ML3 is a NEDD8- and ubiquitin-modified protein. *Plant Physiol* **163**: 135-149
- Hakenjos JP, Richter R, Dohmann EM, Katsiarimpa A, Isono E, Schwechheimer C** (2011) MLN4924 is an efficient inhibitor of NEDD8 conjugation in plants. *Plant Physiol* **156**: 527-536
- Hayashi Y, Yamada K, Shimada T, Matsushima R, Nishizawa NK, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2001) A proteinase-storing body that prepares for cell death or stresses in the epidermal cells of Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **42**: 894-899
- Hellens RP, Edwards EA, Leyland NR, Bean S, Mullineaux PM** (2000) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* **42**: 819-832
- Herrmann J, Lerman LO, Lerman A** (2007) Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in protein regulation. *Circ Res* **100**: 1276-1291

- Hershko A, Ciechanover A** (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**: 425-479
- Hjerpe R, Thomas Y, Chen J, Zemla A, Curran S, Shpiro N, Dick LR, Kurz T** (2012) Changes in the ratio of free NEDD8 to ubiquitin triggers NEDDylation by ubiquitin enzymes. *Biochem J* **441**: 927-936
- Hochstrasser M** (1998) There's the rub: a novel ubiquitin-like modification linked to cell cycle regulation. *Genes Dev* **12**: 901-907
- Hori T, Osaka F, Chiba T, Miyamoto C, Okabayashi K, Shimbara N, Kato S, Tanaka K** (1999) Covalent modification of all members of human cullin family proteins by NEDD8. *Oncogene* **18**: 6829-6834
- Hotton SK, Castro MF, Eigenheer RA, Callis J** (2012) Recovery of DDB1a (damaged DNA binding protein1a) in a screen to identify novel RUB-modified proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* **5**: 1163-1166
- Hua Z, Vierstra RD** (2011) The cullin-RING ubiquitin-protein ligases. *Annu Rev Plant Biol* **62**: 299-334
- Huart AS, MacLaine NJ, Narayan V, Hupp TR** (2012) Exploiting the MDM2-CK1alpha protein-protein interface to develop novel biologics that induce UBL-kinase-modification and inhibit cell growth. *PLoS One* **7**: e43391
- Hunter PR, Craddock CP, Di Benedetto S, Roberts LM, Frigerio L** (2007) Fluorescent reporter proteins for the tonoplast and the vacuolar lumen identify a single vacuolar compartment in *Arabidopsis* cells. *Plant Physiol* **145**: 1371-1382
- Ichikawa S, Takai T, Yashiki T, Takahashi S, Okumura K, Ogawa H, Kohda D, Hatanaka H** (2009) Lipopolysaccharide binding of the mite allergen Der f 2. *Genes Cells* **14**: 1055-1065
- Imai KK, Ohashi Y, Tsuge T, Yoshizumi T, Matsui M, Oka A, Aoyama T** (2006) The A-type cyclin CYCA2;3 is a key regulator of ploidy levels in *Arabidopsis* endoreduplication. *Plant Cell* **18**: 382-396
- Inohara N, Nunez G** (2002) ML -- a conserved domain involved in innate immunity and lipid metabolism. *Trends Biochem Sci* **27**: 219-221
- Inukai Y, Sakamoto T, Ueguchi-Tanaka M, Shibata Y, Gomi K, Umemura I, Hasegawa Y, Ashikari M, Kitano H, Matsuoka M** (2005) Crown rootless1, which is essential for crown root formation in rice, is a target of an AUXIN RESPONSE FACTOR in auxin signaling. *Plant Cell* **17**: 1387-1396
- Jin HS, Liao L, Park Y, Liu YC** (2013) Neddylation pathway regulates T-cell function by targeting an adaptor protein Shc and a protein kinase Erk signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 624-629
- Jin J, Cardozo T, Lovering RC, Elledge SJ, Pagano M, Harper JW** (2004) Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. *Genes Dev* **18**: 2573-2580
- Kamitani T, Kito K, Nguyen HP, Yeh ET** (1997) Characterization of NEDD8, a developmentally down-regulated ubiquitin-like protein. *J Biol Chem* **272**: 28557-28562
- Kane RC, Dagher R, Farrell A, Ko CW, Sridhara R, Justice R, Pazdur R** (2007) Bortezomib for the treatment of mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res* **13**: 5291-5294
- Karniol B, Malec P, Chamovitz DA** (1999) *Arabidopsis* FUSCA5 encodes a novel phosphoprotein that is a component of the COP9 complex. *Plant Cell* **11**: 839-848
- Kelley DR, Estelle M** (2012) Ubiquitin-mediated control of plant hormone signaling. *Plant Physiol* **160**: 47-55
- Kepinski S, Leyser O** (2005) The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**: 446-451
- Kolter T, Sandhoff K** (2010) Lysosomal degradation of membrane lipids. *FEBS Lett* **584**: 1700-1712

- Komander D, Clague MJ, Urbe S** (2009) Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 550-563
- Koncz C, Schell J** (1986) The promoter of T<sub>L</sub>-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet* **204**: 383-396
- Kuchernig JC, Burow M, Wittstock U** (2012) Evolution of specifier proteins in glucosinolate-containing plants. *BMC Evol Biol* **12**: 127
- Kumar S, Tomooka Y, Noda M** (1992) Identification of a set of genes with developmentally down-regulated expression in the mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun* **185**: 1155-1161
- Kumar S, Yoshida Y, Noda M** (1993) Cloning of a cDNA which encodes a novel ubiquitin-like protein. *Biochem Biophys Res Commun* **195**: 393-399
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Larsen PB, Cancel JD** (2004) A recessive mutation in the RUB1-conjugating enzyme, RCE1, reveals a requirement for RUB modification for control of ethylene biosynthesis and proper induction of basic chitinase and PDF1.2 in *Arabidopsis*. *Plant J* **38**: 626-638
- Lau OS, Deng XW** (2012) The photomorphogenic repressors COP1 and DET1: 20 years later. *Trends Plant Sci* **17**: 584-593
- Lee MR, Lee D, Shin SK, Kim YH, Choi CY** (2008) Inhibition of APP intracellular domain (AICD) transcriptional activity via covalent conjugation with Nedd8. *Biochem Biophys Res Commun* **366**: 976-981
- Leyser HM, Lincoln CA, Timpte C, Lammer D, Turner J, Estelle M** (1993) *Arabidopsis* auxin-resistance gene AXR1 encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature* **364**: 161-164
- Liakopoulos D, Doenges G, Matuschewski K, Jentsch S** (1998) A novel protein modification pathway related to the ubiquitin system. *EMBO J* **17**: 2208-2214
- Lian HL, He SB, Zhang YC, Zhu DM, Zhang JY, Jia KP, Sun SX, Li L, Yang HQ** (2011) Blue-light-dependent interaction of cryptochrome 1 with SPA1 defines a dynamic signaling mechanism. *Genes Dev* **25**: 1023-1028
- Lincoln C, Britton JH, Estelle M** (1990) Growth and development of the *axr1* mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2**: 1071-1080
- Liu B, Zuo Z, Liu H, Liu X, Lin C** (2011) *Arabidopsis* cryptochrome 1 interacts with SPA1 to suppress COP1 activity in response to blue light. *Genes Dev* **25**: 1029-1034
- Loake G, Grant M** (2007) Salicylic acid in plant defence--the players and protagonists. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 466-472
- Loftus SJ, Liu G, Carr SM, Munro S, La Thangue NB** (2012) NEDDylation regulates E2F-1-dependent transcription. *EMBO Rep* **13**: 811-818
- Luschnig C, Gaxiola RA, Grisafi P, Fink GR** (1998) EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* **12**: 2175-2187
- Lyapina S, Cope G, Shevchenko A, Serino G, Tsuge T, Zhou C, Wolf DA, Wei N, Deshaies RJ** (2001) Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome. *Science* **292**: 1382-1385
- Ma T, Chen Y, Zhang F, Yang CY, Wang S, Yu X** (2013) RNF111-dependent neddylation activates DNA damage-induced ubiquitination. *Mol Cell* **49**: 897-907
- Maher EP, Martindale SJ** (1980) Mutants of *Arabidopsis thaliana* with altered responses to auxins and gravity. *Biochem Genet* **18**: 1041-1053

- Matsushima R, Fukao Y, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2004) NAI1 gene encodes a basic-helix-loop-helix-type putative transcription factor that regulates the formation of an endoplasmic reticulum-derived structure, the ER body. *Plant Cell* **16**: 1536-1549
- Matsushima R, Hayashi Y, Kondo M, Shimada T, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2002) An endoplasmic reticulum-derived structure that is induced under stress conditions in Arabidopsis. *Plant Physiol* **130**: 1807-1814
- Matsushima R, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2003) A novel ER-derived compartment, the ER body, selectively accumulates a beta-glucosidase with an ER-retention signal in Arabidopsis. *Plant J* **33**: 493-502
- Melotto M, Mecey C, Niu Y, Chung HS, Katsir L, Yao J, Zeng W, Thines B, Staswick P, Browse J, Howe GA, He SY** (2008) A critical role of two positively charged amino acids in the Jas motif of Arabidopsis JAZ proteins in mediating coronatine- and jasmonoyl isoleucine-dependent interactions with the COII F-box protein. *Plant J* **55**: 979-988
- Mendoza HM, Shen LN, Botting C, Lewis A, Chen J, Ink B, Hay RT** (2003) NEDP1, a highly conserved cysteine protease that deNEDDylates Cullins. *J Biol Chem* **278**: 25637-25643
- Metzger MB, Hristova VA, Weissman AM** (2012) HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *J Cell Sci* **125**: 531-537
- Michael D, Oren M** (2003) The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Semin Cancer Biol* **13**: 49-58
- Miller MJ, Barrett-Wilt GA, Hua Z, Vierstra RD** (2010) Proteomic analyses identify a diverse array of nuclear processes affected by small ubiquitin-like modifier conjugation in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 16512-16517
- Miller MJ, Scalf M, Rytz TC, Hubler SL, Smith LM, Vierstra RD** (2013) Quantitative proteomics reveals factors regulating RNA biology as dynamic targets of stress-induced SUMOylation in Arabidopsis. *Mol Cell Proteomics* **12**: 449-463
- Mithofer A, Boland W** (2012) Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annu Rev Plant Biol* **63**: 431-450
- Miura Y, Shimazu R, Miyake K, Akashi S, Ogata H, Yamashita Y, Narisawa Y, Kimoto M** (1998) RP105 is associated with MD-1 and transmits an activation signal in human B cells. *Blood* **92**: 2815-2822
- Miyake K** (2004) Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiol* **12**: 186-192
- Muller A, Guan C, Galweiler L, Tanzler P, Huijser P, Marchant A, Parry G, Bennett M, Wisman E, Palme K** (1998) AtPIN2 defines a locus of Arabidopsis for root gravitropism control. *EMBO J* **17**: 6903-6911
- Nagano AJ, Fukao Y, Fujiwara M, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2008) Antagonistic jacalin-related lectins regulate the size of ER body-type beta-glucosidase complexes in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* **49**: 969-980
- Nagano AJ, Matsushima R, Hara-Nishimura I** (2005) Activation of an ER-body-localized beta-glucosidase via a cytosolic binding partner in damaged tissues of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* **46**: 1140-1148
- Nelson BK, Cai X, Nebenfuhr A** (2007) A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *Plant J* **51**: 1126-1136
- Noh EH, Hwang HS, Min B, Im E, Chung KC** (2012) Covalent NEDD8 conjugation increases RCAN1 protein stability and potentiates its inhibitory action on calcineurin. *PLoS One* **7**: e48315
- Ogasawara K, Yamada K, Christeller JT, Kondo M, Hatsugai N, Hara-Nishimura I, Nishimura M** (2009) Constitutive and inducible ER bodies of Arabidopsis thaliana accumulate distinct beta-glucosidases. *Plant Cell Physiol* **50**: 480-488

- Osaka F, Kawasaki H, Aida N, Saeki M, Chiba T, Kawashima S, Tanaka K, Kato S** (1998) A new NEDD8-ligating system for cullin-4A. *Genes Dev* **12**: 2263-2268
- Osterlund MT, Hardtke CS, Wei N, Deng XW** (2000) Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of Arabidopsis. *Nature* **405**: 462-466
- Oved S, Mosesson Y, Zwang Y, Santonico E, Shtiegman K, Marmor MD, Kochupurakkal BS, Katz M, Lavi S, Cesareni G, Yarden Y** (2006) Conjugation to Nedd8 instigates ubiquitylation and down-regulation of activated receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* **281**: 21640-21651
- Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO** (2009) The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* **458**: 1191-1195
- Parry G, Estelle M** (2004) Regulation of cullin-based ubiquitin ligases by the Nedd8/RUB ubiquitin-like proteins. *Semin Cell Dev Biol* **15**: 221-229
- Pauwels L, Barbero GF, Geerinck J, Tilleman S, Grunewald W, Perez AC, Chico JM, Bossche RV, Sewell J, Gil E, Garcia-Casado G, Witters E, Inze D, Long JA, De Jaeger G, Solano R, Goossens A** (2010) NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature* **464**: 788-791
- Peng P, Yan Z, Zhu Y, Li J** (2008) Regulation of the Arabidopsis GSK3-like kinase BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2 through proteasome-mediated protein degradation. *Mol Plant* **1**: 338-346
- Peng Z, Serino G, Deng XW** (2001) A role of Arabidopsis COP9 signalosome in multifaceted developmental processes revealed by the characterization of its subunit 3. *Development* **128**: 4277-4288
- Peret B, De Rybel B, Casimiro I, Benkova E, Swarup R, Laplaze L, Beeckman T, Bennett MJ** (2009) Arabidopsis lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci* **14**: 399-408
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE** (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**: 1605-1612
- Pfalz M, Mikkelsen MD, Bednarek P, Olsen CE, Halkier BA, Kroymann J** (2011) Metabolic engineering in *Nicotiana benthamiana* reveals key enzyme functions in Arabidopsis indole glucosinolate modification. *Plant Cell* **23**: 716-729
- Pierce NW, Lee JE, Liu X, Sweredoski MJ, Graham RL, Larimore EA, Rome M, Zheng N, Clurman BE, Hess S, Shan SO, Deshaies RJ** (2013) Cnd1 promotes assembly of new SCF complexes through dynamic exchange of F box proteins. *Cell* **153**: 206-215
- Pitts RJ, Cernac A, Estelle M** (1998) Auxin and ethylene promote root hair elongation in Arabidopsis. *Plant J* **16**: 553-560
- Potuschak T, Lechner E, Parmentier Y, Yanagisawa S, Grava S, Koncz C, Genschik P** (2003) EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two Arabidopsis F box proteins: EBF1 and EBF2. *Cell* **115**: 679-689
- Pozo JC, Timpte C, Tan S, Callis J, Estelle M** (1998) The ubiquitin-related protein RUB1 and auxin response in Arabidopsis. *Science* **280**: 1760-1763
- Qiao H, Chang KN, Yazaki J, Ecker JR** (2009) Interplay between ethylene, ETP1/ETP2 F-box proteins, and degradation of EIN2 triggers ethylene responses in Arabidopsis. *Genes Dev* **23**: 512-521
- Rabut G, Peter M** (2008) Function and regulation of protein neddylation. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep* **9**: 969-976
- Rask L, Andreasson E, Ekblom B, Eriksson S, Pontoppidan B, Meijer J** (2000) Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Mol Biol* **42**: 93-113
- Reed JW** (2001) Roles and activities of Aux/IAA proteins in Arabidopsis. *Trends Plant Sci* **6**: 420-425

- Ren H, Santner A, del Pozo JC, Murray JA, Estelle M** (2008) Degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor KRP1 is regulated by two different ubiquitin E3 ligases. *Plant J* **53**: 705-716
- Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, Singhal S, Jagannath S, Irwin D, Rajkumar SV, Srkalovic G, Alsina M, Alexanian R, Siegel D, Orlowski RZ, Kuter D, Limentani SA, Lee S, Hideshima T, Esseltine DL, Kauffman M, Adams J, Schenkein DP, Anderson KC** (2003) A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med* **348**: 2609-2617
- Robert S, Zouhar J, Carter C, Raikhel N** (2007) Isolation of intact vacuoles from *Arabidopsis* rosette leaf-derived protoplasts. *Nat Protoc* **2**: 259-262
- Russell RC, Ohh M** (2008) NEDD8 acts as a 'molecular switch' defining the functional selectivity of VHL. *EMBO Rep* **9**: 486-491
- Ryu JH, Li SH, Park HS, Park JW, Lee B, Chun YS** (2011) Hypoxia-inducible factor alpha subunit stabilization by NEDD8 conjugation is reactive oxygen species-dependent. *J Biol Chem* **286**: 6963-6970
- Sadanandom A, Bailey M, Ewan R, Lee J, Nelis S** (2012) The ubiquitin-proteasome system: central modifier of plant signalling. *New Phytol* **196**: 13-28
- Saijo Y, Sullivan JA, Wang H, Yang J, Shen Y, Rubio V, Ma L, Hoecker U, Deng XW** (2003) The COP1-SPA1 interaction defines a critical step in phytochrome A-mediated regulation of HY5 activity. *Genes Dev* **17**: 2642-2647
- Sanders PM, Lee PY, Biesgen C, Boone JD, Beals TP, Weiler EW, Goldberg RB** (2000) The *Arabidopsis* DELAYED DEHISCENCE1 gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. *Plant Cell* **12**: 1041-1061
- Santner A, Estelle M** (2009) Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature* **459**: 1071-1078
- Santner A, Estelle M** (2010) The ubiquitin-proteasome system regulates plant hormone signaling. *Plant J* **61**: 1029-1040
- Sarikas A, Hartmann T, Pan ZQ** (2011) The cullin protein family. *Genome Biol* **12**: 220
- Scabone CM, Frigerio L, Petrucci S** (2011) A fluorescent reporter protein containing AtRMR1 domains is targeted to the storage and central vacuoles in *Arabidopsis thaliana* and tobacco leaf cells. *Plant Cell Rep* **30**: 1823-1833
- Schmid M, Simpson D, Kalousek F, Gietl C** (1998) A cysteine endopeptidase with a C-terminal KDEL motif isolated from castor bean endosperm is a marker enzyme for the ricinosome, a putative lytic compartment. *Planta* **206**: 466-475
- Schuhegger R, Nafisi M, Mansourova M, Petersen BL, Olsen CE, Svatos A, Halkier BA, Glawischnig E** (2006) CYP71B15 (PAD3) catalyzes the final step in camalexin biosynthesis. *Plant Physiol* **141**: 1248-1254
- Schwechheimer C** (2008) Understanding gibberellic acid signaling--are we there yet? *Curr Opin Plant Biol* **11**: 9-15
- Schwechheimer C, Deng XW** (2002) Studying protein-protein interactions with the yeast two-hybrid system. . *In* PM Gilmartin, C Bowler, eds, *Molecular Plant Biology: A Practical Approach*. Oxford University Press., Oxford, UK, pp 173-198
- Schwechheimer C, Serino G, Callis J, Crosby WL, Lyapina S, Deshaies RJ, Gray WM, Estelle M, Deng XW** (2001) Interactions of the COP9 signalosome with the E3 ubiquitin ligase SCFTIR1 in mediating auxin response. *Science* **292**: 1379-1382
- Schwechheimer C, Willige BC** (2009) Shedding light on gibberellic acid signalling. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 57-62
- Schwechheimer C, Willige BC, Zourelidou M, Dohmann EM** (2009) Examining protein stability and its relevance for plant growth and development. *Methods Mol Biol* **479**: 147-171

- Serino G, Su H, Peng Z, Tsuge T, Wei N, Gu H, Deng XW** (2003) Characterization of the last subunit of the Arabidopsis COP9 signalosome: implications for the overall structure and origin of the complex. *Plant Cell* **15**: 719-731
- Serino G, Tsuge T, Kwok S, Matsui M, Wei N, Deng XW** (1999) Arabidopsis cop8 and fus4 mutations define the same gene that encodes subunit 4 of the COP9 signalosome. *Plant Cell* **11**: 1967-1980
- Shechter D, Dormann HL, Allis CD, Hake SB** (2007) Extraction, purification and analysis of histones. *Nat Protoc* **2**: 1445-1457
- Sherameti I, Venus Y, Drzewiecki C, Tripathi S, Dan VM, Nitz I, Varma A, Grundler FM, Oelmuller R** (2008) PYK10, a beta-glucosidase located in the endoplasmatic reticulum, is crucial for the beneficial interaction between Arabidopsis thaliana and the endophytic fungus Piriformospora indica. *Plant J* **54**: 428-439
- Shin YC, Tang SJ, Chen JH, Liao PH, Chang SC** (2011) The molecular determinants of NEDD8 specific recognition by human SENP8. *PLoS One* **6**: e27742
- Solano R, Stepanova A, Chao Q, Ecker JR** (1998) Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes Dev* **12**: 3703-3714
- Soucy TA, Smith PG, Milhollen MA, Berger AJ, Gavin JM, Adhikari S, Brownell JE, Burke KE, Cardin DP, Critchley S, Cullis CA, Doucette A, Garnsey JJ, Gaulin JL, Gershman RE, Lublinsky AR, McDonald A, Mizutani H, Narayanan U, Olhava EJ, Peluso S, Rezaei M, Sintchak MD, Talreja T, Thomas MP, Traore T, Vyskocil S, Weatherhead GS, Yu J, Zhang J, Dick LR, Claiborne CF, Rolfe M, Bolen JB, Langston SP** (2009) An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer. *Nature* **458**: 732-736
- Soucy TA, Smith PG, Rolfe M** (2009) Targeting NEDD8-activated cullin-RING ligases for the treatment of cancer. *Clin Cancer Res* **15**: 3912-3916
- Staub JM, Wei N, Deng XW** (1996) Evidence for FUS6 as a component of the nuclear-localized COP9 complex in Arabidopsis. *Plant Cell* **8**: 2047-2056
- Stickle NH, Chung J, Klcio JM, Hill RP, Kaelin WG, Jr., Ohh M** (2004) pVHL modification by NEDD8 is required for fibronectin matrix assembly and suppression of tumor development. *Mol Cell Biol* **24**: 3251-3261
- Stintzi A, Browse J** (2000) The Arabidopsis male-sterile mutant, opr3, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 10625-10630
- Storch J, Xu Z** (2009) Niemann-Pick C2 (NPC2) and intracellular cholesterol trafficking. *Biochim Biophys Acta* **1791**: 671-678
- Stotz HU, Sawada Y, Shimada Y, Hirai MY, Sasaki E, Krischke M, Brown PD, Saito K, Kamiya Y** (2011) Role of camalexin, indole glucosinolates, and side chain modification of glucosinolate-derived isothiocyanates in defense of Arabidopsis against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant J* **67**: 81-93
- Strader LC, Ritchie S, Soule JD, McGinnis KM, Steber CM** (2004) Recessive-interfering mutations in the gibberellin signaling gene SLEEPY1 are rescued by overexpression of its homologue, SNEEZY. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 12771-12776
- Sundqvist A, Liu G, Mirsalotis A, Xirodimas DP** (2009) Regulation of nucleolar signalling to p53 through NEDDylation of L11. *EMBO Rep* **10**: 1132-1139
- Swarup R, Kramer EM, Perry P, Knox K, Leyser HM, Haseloff J, Beemster GT, Bhalerao R, Bennett MJ** (2005) Root gravitropism requires lateral root cap and epidermal cells for transport and response to a mobile auxin signal. *Nat Cell Biol* **7**: 1057-1065
- Szemenyei H, Hannon M, Long JA** (2008) TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during Arabidopsis embryogenesis. *Science* **319**: 1384-1386

- Takashima O, Tsuruta F, Kigoshi Y, Nakamura S, Kim J, Katoh MC, Fukuda T, Irie K, Chiba T** (2013) Brap2 regulates temporal control of NF-kappaB localization mediated by inflammatory response. *PLoS One* **8**: e58911
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S** (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**: 2731-2739
- Tamura K, Shimada T, Ono E, Tanaka Y, Nagatani A, Higashi SI, Watanabe M, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2003) Why green fluorescent fusion proteins have not been observed in the vacuoles of higher plants. *Plant J* **35**: 545-555
- Tan X, Calderon-Villalobos LI, Sharon M, Zheng C, Robinson CV, Estelle M, Zheng N** (2007) Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* **446**: 640-645
- Tanaka T, Nakatani T, Kamitani T** (2012) Inhibition of NEDD8-conjugation pathway by novel molecules: potential approaches to anticancer therapy. *Mol Oncol* **6**: 267-275
- Tanimoto M, Roberts K, Dolan L** (1995) Ethylene is a positive regulator of root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **8**: 943-948
- Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, Nomura K, He SY, Howe GA, Browse J** (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**: 661-665
- Thomma BP, Nelissen I, Eggermont K, Broekaert WF** (1999) Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *Plant J* **19**: 163-171
- Tian Q, Uhlir NJ, Reed JW** (2002) *Arabidopsis* SHY2/IAA3 inhibits auxin-regulated gene expression. *Plant Cell* **14**: 301-319
- Timpte C, Wilson AK, Estelle M** (1994) The *axr2-1* mutation of *Arabidopsis thaliana* is a gain-of-function mutation that disrupts an early step in auxin response. *Genetics* **138**: 1239-1249
- Tiwari SB, Hagen G, Guilfoyle TJ** (2004) Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. *Plant Cell* **16**: 533-543
- Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, Itoh H, Katoh E, Kobayashi M, Chow TY, Hsing YI, Kitano H, Yamaguchi I, Matsuoka M** (2005) GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* **437**: 693-698
- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ** (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* **9**: 1963-1971
- Um JW, Han KA, Im E, Oh Y, Lee K, Chung KC** (2012) Neddylation positively regulates the ubiquitin E3 ligase activity of parkin. *J Neurosci Res* **90**: 1030-1042
- Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, Kyojuka J, Yamaguchi S** (2008) Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* **455**: 195-200
- van Nocker S, Deveraux Q, Rechsteiner M, Vierstra RD** (1996) *Arabidopsis* MBP1 gene encodes a conserved ubiquitin recognition component of the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 856-860
- Vert G, Nemhauser JL, Geldner N, Hong F, Chory J** (2005) Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 177-201
- Vierstra RD** (2009) The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 385-397
- Vierstra RD** (2012) The expanding universe of ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. *Plant Physiol* **160**: 2-14

- Viriyakosol S, Tobias PS, Kitchens RL, Kirkland TN** (2001) MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide. *J Biol Chem* **276**: 38044-38051
- Voges D, Zwickl P, Baumeister W** (1999) The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* **68**: 1015-1068
- von Arnim AG, Osterlund MT, Kwok SF, Deng XW** (1997) Genetic and developmental control of nuclear accumulation of COP1, a repressor of photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **114**: 779-788
- von Malek B, van der Graaff E, Schneitz K, Keller B** (2002) The *Arabidopsis* male-sterile mutant *dde2-2* is defective in the ALLENE OXIDE SYNTHASE gene encoding one of the key enzymes of the jasmonic acid biosynthesis pathway. *Planta* **216**: 187-192
- Wada H, Kito K, Caskey LS, Yeh ET, Kamitani T** (1998) Cleavage of the C-terminus of NEDD8 by UCH-L3. *Biochem Biophys Res Commun* **251**: 688-692
- Walden H, Podgorski MS, Schulman BA** (2003) Insights into the ubiquitin transfer cascade from the structure of the activating enzyme for NEDD8. *Nature* **422**: 330-334
- Watson IR, Blanch A, Lin DC, Ohh M, Irwin MS** (2006) Mdm2-mediated NEDD8 modification of TAp73 regulates its transactivation function. *J Biol Chem* **281**: 34096-34103
- Watson IR, Irwin MS, Ohh M** (2011) NEDD8 pathways in cancer, *Sine Quibus Non*. *Cancer Cell* **19**: 168-176
- Wei N, Chamovitz DA, Deng XW** (1994) *Arabidopsis* COP9 is a component of a novel signaling complex mediating light control of development. *Cell* **78**: 117-124
- Weijers D, Benkova E, Jager KE, Schlereth A, Hamann T, Kientz M, Wilmoth JC, Reed JW, Jurgens G** (2005) Developmental specificity of auxin response by pairs of ARF and Aux/IAA transcriptional regulators. *EMBO J* **24**: 1874-1885
- Went FW, Thimann KV** (1937) *Phytohormones*. MacMillan, New York
- Werth N, Schuette CG, Wilkening G, Lemm T, Sandhoff K** (2001) Degradation of membrane-bound ganglioside GM2 by beta -hexosaminidase A. Stimulation by GM2 activator protein and lysosomal lipids. *J Biol Chem* **276**: 12685-12690
- Willige BC, Ghosh S, Nill C, Zourelidou M, Dohmann EM, Maier A, Schwechheimer C** (2007) The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 1209-1220
- Wittstock U, Burow M** (2010) Glucosinolate breakdown in *Arabidopsis*: mechanism, regulation and biological significance. *Arabidopsis Book* **8**: e0134
- Woodward AW, Ratzel SE, Woodward EE, Shamooy Y, Bartel B** (2007) Mutation of E1-CONJUGATING ENZYME-RELATED1 decreases RELATED TO UBIQUITIN conjugation and alters auxin response and development. *Plant Physiol* **144**: 976-987
- Wu K, Yamoah K, Dolios G, Gan-Erdene T, Tan P, Chen A, Lee CG, Wei N, Wilkinson KD, Wang R, Pan ZQ** (2003) DEN1 is a dual function protease capable of processing the C terminus of Nedd8 and deconjugating hyper-neddylated CUL1. *J Biol Chem* **278**: 28882-28891
- Wu S, Zhu W, Nhan T, Toth JI, Petroski MD, Wolf DA** (2013) CAND1 controls in vivo dynamics of the cullin 1-RING ubiquitin ligase repertoire. *Nat Commun* **4**: 1642
- Xie DX, Feys BF, James S, Nieto-Rostro M, Turner JG** (1998) COI1: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* **280**: 1091-1094
- Xirodimas DP, Saville MK, Bourdon JC, Hay RT, Lane DP** (2004) Mdm2-mediated NEDD8 conjugation of p53 inhibits its transcriptional activity. *Cell* **118**: 83-97
- Xirodimas DP, Sundqvist A, Nakamura A, Shen L, Botting C, Hay RT** (2008) Ribosomal proteins are targets for the NEDD8 pathway. *EMBO Rep* **9**: 280-286

- Xu M, Zhu L, Shou H, Wu P** (2005) A PIN1 family gene, OsPIN1, involved in auxin-dependent adventitious root emergence and tillering in rice. *Plant Cell Physiol* **46**: 1674-1681
- Yamada K, Hara-Nishimura I, Nishimura M** (2011) Unique defense strategy by the endoplasmic reticulum body in plants. *Plant Cell Physiol* **52**: 2039-2049
- Yamada K, Nagano AJ, Nishina M, Hara-Nishimura I, Nishimura M** (2008) NAI2 is an endoplasmic reticulum body component that enables ER body formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **20**: 2529-2540
- Yamada K, Nagano AJ, Nishina M, Hara-Nishimura I, Nishimura M** (2013) Identification of two novel endoplasmic reticulum body-specific integral membrane proteins. *Plant Physiol* **161**: 108-120
- Zemla A, Thomas Y, Kedziora S, Knebel A, Wood NT, Rabut G, Kurz T** (2013) CSN- and CAND1-dependent remodelling of the budding yeast SCF complex. *Nat Commun* **4**: 1641
- Zhang J, Bai D, Ma X, Guan J, Zheng X** (2012) hCINAP is a novel regulator of ribosomal protein-HDM2-p53 pathway by controlling NEDDylation of ribosomal protein S14. *Oncogene*
- Zuo W, Huang F, Chiang YJ, Li M, Du J, Ding Y, Zhang T, Lee HW, Jeong LS, Chen Y, Deng H, Feng XH, Luo S, Gao C, Chen YG** (2013) c-Cbl-mediated neddylation antagonizes ubiquitination and degradation of the TGF-beta type II receptor. *Mol Cell* **49**: 499-510
- Zuo Z, Liu H, Liu B, Liu X, Lin C** (2011) Blue light-dependent interaction of CRY2 with SPA1 regulates COP1 activity and floral initiation in *Arabidopsis*. *Curr Biol* **21**: 841-847

# Danksagung

Zu aller erst möchte ich mich bei Prof. Dr. Claus Schwechheimer für die Betreuung meiner Arbeit und die sehr zuverlässige Finanzierung dieses spannenden Projekts bedanken.

Außerdem danke ich Prof. Dr. Jörg Durner, PD Dr. Erich Glawischnig und Prof. Dr. Alfons Gierl dafür, dass sie sich bereit erklärt haben die Prüfungskommission zu bilden.

Bei Millenium Pharmaceuticals möchte ich mich für die kostenlose Bereitstellung des Inhibitors MLN4924 bedanken.

Bei Dr. Erika Isono bedanke ich mich für die fachliche Unterstützung und die vielen wertvollen Ratschläge.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Sarosh Bejai, Dr. Corina Vlot-Schuster, Marion Wenig, Prof. Dr. Bernhard Küster, Stephanie Heinzlmeier, Dr. Carina Behringer, Qurin Ranftl, Susan Kläger, Dr. René Richter und Dr. Sjef Boeren bedanken, dass sie mit ihrer Arbeit und ihren Daten mein Projekt unterstützt und bereichert haben.

Ich danke Prof. Dr. Mark Estelle, Prof. Dr. Tom Guilfoyle, Prof. Dr. Dolf Weijers, Prof. Dr. Milto Tsiantis, Dr. Lorenzo Frigerio, Dr. Erika Isono, Anthi Katsiarimpa und Dr. Esther M. N. Dohmann dafür, dass sie von ihnen generierte Pflanzenlinien mit mir geteilt haben.

Für die Hilfe bei kleinen und großen Problemen des Laboralltags möchte ich Franziska Anzenberger, Carola Nill, Dr. Carina Behringer, Dr. Monika Kavanova, Dr. Björn Willige, Dr. Melina Zourelidou, Jutta Elgner und Julia Mergner danken.

Dafür, dass sie sich immer Zeit genommen haben mir zu helfen und für ihre herzliche Art danke ich Petra Wick und Rita Kaindl. Außerdem danke ich beiden für die vielen kleinen Aufmerksamkeiten und die hervorragende Versorgung mit Süßigkeiten.

Ich danke Josef „Sepp“ Reischenbeck für all die von ihm reparierten Gegenstände, seine Hilfe bei handwerklichen und technischen Fragen, für seine Kreativität bei der Reparatur des Homogenizers und natürlich für die Ausrichtung der unterhaltsamen Fußballtipprunden.

Für ihre Zuverlässigkeit, ihre Treue und ihre stoische Ruhe beim Samenabsammeln danke ich Teresa Scheibenzuber.

Ein ganz besonders großer Dank gilt dem **GIRLS CLUB** und dessen Mitglieder Siv, Franzi, Carina und Isi für die unglaublich unterhaltsamen, kulinarisch anspruchsvollen, diskussionsträchtigen, nachdenklichen, schweigsamen, schreiend lustigen, besinnlichen, nahrhaften und vor allem erholsamen Mittagspausen. Ohne Euch wäre der Laboralltag trist und grau gewesen!

Ich danke Maike und Inês für die wunderschönen, kreativen Abende! Maike danke ich besonders dafür, dass sie meine handwerklichen Kenntnisse erweitert hat, für ihr herzliches Wesen und dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatte.

## Danksagung

---

Meinen Eltern, Peter und Barbara, danke ich von Herzen, dafür dass sie mich immer unterstützt haben, dass sie mich so akzeptieren wie ich bin und dafür dass wir nicht nur Eltern und Kind, sondern auch Freunde sind.

Der größte Dank gilt meinem Mann Georg, für die Sicherheit und die Geborgenheit, die er mir gibt und dafür, dass er mein Leben so unglaublich bereichert hat.

# Appendix

**Tabelle 19: Liste der mittels Massenspektrometrie identifizierten Proteine nach HSN-Aufreinigung.**

<u>AGI Code</u>	<u>Genbeschreibung</u>	<u>Peptide</u>	<u>Final score</u>	<u>P (pro)</u>	<u>Score (&gt;24)</u>
<b><u>NEDD8-Weg</u></b>					
AT1G05180	AUXIN RESISTANT 1 (AXR1)	20 / 13	11.6 / 7.05	$10^{-9} / 10^{-10}$	130.3 / 90.22
AT2G32410	AUXIN RESISTANT 1-LIKE (AXL)	9	6.1	$10^{-9}$	70.2
AT5G19180	E1 C-TERMINAL RELATED 1 (ECR1)	25 / 13	14.3 / 6.91	$10^{-13} / 10^{-8}$	158.3 / 90.22
AT1G31340	NEDD8	17 / 15	2.5 / 3.38	$10^{-8} / 10^{-12}$	28.2 / 40.26
<b><u>Ubiquitin-Proteasom-System</u></b>					
AT2G20580	*26S proteasome regulatory subunit S2 1A (AtRPN1A)	10	2.3	$10^{-5}$	36.2
AT4G02570	*CULLIN1	107 / 101	61.3 / 48.90	$10^{-13} / 10^{-11}$	704.3 / 528.31
AT1G26830	*CULLIN3A	33 / 55	13.09 / 17.9	$10^{-12} / 10^{-14}$	152.28 / 194.3
AT1G69670	*CULLIN3B	39 / 24	21.3 / 14.36	$10^{-8} / 10^{-12}$	276.2 / 182.3
AT5G46210	*CULLIN4	63 / 42	33.1 / 24.66	$10^{-12} / 10^{-11}$	396 / 280.2
AT3G52590	*UBIQUITIN	16 / 19	2.7 / 3.90	$10^{-9} / 10^{-8}$	38.3 / 48.27
AT1G16470	20S proteasome alpha subunit B1 (PAB1)	3	2.66	$10^{-6}$	30.19
AT3G51260	20S proteasome alpha subunit D1 (PAD1)	4	2.6	$10^{-7}$	30.2
AT5G42790	20S proteasome alpha subunit F1 (PAF1)	5	3.4	$10^{-6}$	40.2
AT3G60820	20S proteasome beta subunit F1 (PBF1)	4	3.1	$10^{-7}$	40.2
AT2G44900	ARABIDILLO-1 F-box protein	8	2.5	$10^{-4}$	30.1
AT1G75950	ARABIDOPSIS SKP1 HOMOLOGUE 1 (ASK1)	4	2.44	$10^{-3}$	40.13
AT3G26810	AUXIN SIGNALING F-BOX 2 (AFB2) F-box protein	5	2.7	$10^{-4}$	44.1
AT2G39940	CORONATINE INSENSITIVE 1 (COI1) F-box protein	12 / 5	7.4 / 3.27	$10^{-8} / 10^{-4}$	90.2 / 40.17
AT4G21100	DAMAGED DNA BINDING PROTEIN 1 B (DDB1B)	7	2.6	$10^{-5}$	30.2
AT4G05420	DAMAGED DNA BINDING PROTEIN 1A (DDB1A)	9	6.0	$10^{-5}$	78.2
AT3G32730	Putative 26S proteasome regulatory subunit	6	2.3	$10^{-5}$	30.2
AT2G20140	Putative 26S proteasome regulatory subunit 4	3	2.4	$10^{-8}$	30.2
AT5G20570	RING-BOX 1 (RBX1)	6	2.63	$10^{-8}$	24.20
AT1G06110	SKP1/ASK-INTERACTING PROTEIN 16 (ASK16)	6 / 8	3.5 / 5.16	$10^{-8} / 10^{-7}$	34.2 / 60.26
AT3G18860	Transducin family protein / WD-40 repeat family protein	12	7.3	$10^{-8}$	90.2
AT5G15550	Transducin family protein / WD-40 repeat family protein	25 / 10	16.2 / 7.02	$10^{-14} / 10^{-13}$	198.3 / 80.29
AT3G62980	TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1) F-box protein	6	3.5	$10^{-10}$	40.2
AT5G06460	UBIQUITIN ACTIVATING ENZYME 2	14	7.1	$10^{-8}$	80.3
AT2G42160	UBIQUITIN PROTEIN LIGASE BRIZ1	9	4.8	$10^{-8}$	60.2
AT2G30110	UBIQUITIN-ACTIVATING ENZYME1	10	3.47	$10^{-5}$	46.19
AT3G08700	UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME 12	11 / 7	4.30 / 2.7	$10^{-7} / 10^{-9}$	48.26 / 30.2
AT5G50870	UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME 27	3	2.9	$10^{-7}$	30.2
AT5G06600	UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 12	12	5.02	$10^{-5}$	60.17
AT3G11910	UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 13	17	4.0	$10^{-6}$	58.2
AT3G20630	UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 14	22 / 22	12.2 / 12.90	$10^{-9} / 10^{-14}$	160.3 / 170.30
AT3G58930	Uncharacterized F-box protein	8	5.9	$10^{-12}$	70.2
AT4G02740	Uncharacterized F-box protein	4	2.9	$10^{-9}$	30.2
AT5G63520	Uncharacterized F-box protein	5	3.69	$10^{-13}$	40.19
<b><u>Proteinfaltung und Chaperone</u></b>					
AT2G28000	*CHAPERONIN-60ALPHA	8 / 8	3.6 / 3.80	$10^{-11} / 10^{-8}$	40.2 / 46.28
AT5G56030	*HEAT SHOCK PROTEIN 81-2	16 / 15	10.6 / 10.67	$10^{-10} / 10^{-9}$	134.2 / 130.22
AT4G34870	*ROTAMASE CYCLOPHILIN 5	3	2.6	$10^{-8}$	30.2
AT3G09840	CELL DIVISION CYCLE 48	45 / 28	29.2 / 17.21	$10^{-11} / 10^{-9}$	334.3 / 198.22
AT1G55490	CHAPERONIN 60 BETA	11	8.17	$10^{-6}$	90.27
AT4G24280	CHLOROPLAST HEAT SHOCK PROTEIN 70-1	19	3.63	$10^{-6}$	40.18
AT5G50920	CLPC HOMOLOGUE 1	6	2.4	$10^{-3}$	28.2
AT5G02490	HEAT SHOCK COGNATE 70 kDa protein 2 (HSC70-2)	145	14.1	$10^{-14}$	170.3
AT3G09440	HEAT SHOCK COGNATE 70 kDa protein 3 (HSC70-3)	145 / 93	20.8 / 18.61	$10^{-14} / 10^{-11}$	210.3 / 190.29
AT3G23990	HEAT SHOCK PROTEIN 60	7	3.84	$10^{-7}$	50.21
AT3G12580	HEAT SHOCK PROTEIN 70	61 / 86	9.6 / 14.36	$10^{-14} / 10^{-14}$	110.3 / 152.36
AT5G02500	HEAT SHOCK PROTEIN 70-1	15	8.4	$10^{-11}$	96.2
AT5G49910	HEAT SHOCK PROTEIN 70-7	5	2.4	$10^{-4}$	40.1
AT5G52640	HEAT SHOCK PROTEIN 90-1	9	2.8	$10^{-7}$	34.2
AT5G28540	LUMINAL BINDING PROTEIN BIP1	23	15.1	$10^{-16}$	178.3
AT5G42020	LUMINAL BINDING PROTEIN BIP2	55 / 35	2.6 / 2.8	$10^{-9} / 10^{-11}$	30.3 / 30.27
AT4G37910	MITOCHONDRIAL HEAT SHOCK PROTEIN 70-1	18	10.92	$10^{-11}$	122.27
AT1G74560	NAP1-RELATED PROTEIN 1	3	2.8	$10^{-7}$	30.2

## Appendix

<u>AGI Code</u>	<u>Genbeschreibung</u>	<u>Peptide</u>	<u>Final score</u>	<u>P (pro)</u>	<u>Score (&gt;24)</u>
	<b><u>Translation</u></b>				
AT1G56070	*Translation factor	24 / 23	16.2 / 15.31	10 <sup>-10</sup> / 10 <sup>-14</sup>	190.3 / 190.28
AT5G60390	Translation elongation factor (Elongation factor 1-alpha)	5 / 6	2.6 / 2.6	10 <sup>-8</sup> / 10 <sup>-4</sup>	30.2 / 30.19
AT4G29060	Translation elongation factor (EMBRYO DEFECTIVE 2726)	6	4.98	10 <sup>-12</sup>	60.29
AT4G20360	Translation elongation factor (RAB GTPASE HOMOLOG E1B)	6 / 10	3.7 / 4.96	10 <sup>-8</sup> / 10 <sup>-11</sup>	40.2 / 64.26
AT1G49760	Translation initiation factor (POLYA BINDING PROTEIN 8)	8	4.86	10 <sup>-6</sup>	60.22
AT4G34110	Translation initiation factor (POLYA BINDING PROTEIN 2)	5	2.24	10 <sup>-8</sup>	30.18
	<b><u>Intrazellulärer Transport</u></b>				
AT1G72150	PATELLIN1	6	3.45	10 <sup>-5</sup>	40.13
AT3G08530	Putative clathrin heavy chain	13	5.7	10 <sup>-5</sup>	70.3
AT4G34450	Putative coatomer gamma-2 subunit	6	4.4	10 <sup>-6</sup>	50.2
AT2G44100	RAB GDP DISSOCIATION INHIBITOR	13	3.3	10 <sup>-6</sup>	40.2
AT3G59920	RAB GDP DISSOCIATION INHIBITOR 2	6	4.2	10 <sup>-7</sup>	50.2
AT3G15430	Ran GTPase binding	5	4.6	10 <sup>-8</sup>	50.3
	<b><u>Proteasen</u></b>				
AT2G41790	*Metalloendopeptidase (Peptidase M16 family protein)	9	3.5	10 <sup>-6</sup>	60.2
AT5G67360	*Serine-type endopeptidase (ARA12)	6 / 3	3.5 / 2.01	10 <sup>-8</sup> / 10 <sup>-7</sup>	50.3 / 30.17
AT2G24200	Leucyl aminopeptidase	7	4.3	10 <sup>-10</sup>	54.2
AT4G21650	Serine-type endopeptidase (subtilase family protein)	17	9.0	10 <sup>-14</sup>	100.3
AT3G14067	Serine-type endopeptidase (subtilase family protein)	5	3.0	10 <sup>-8</sup>	42.2
	<b><u>Strukturproteine</u></b>				
AT1G64740	ALPHA-1 TUBULIN	5	2.35	10 <sup>-8</sup>	36.20
AT1G50010	TUBULIN ALPHA-2 CHAIN	6 / 12	2.0 / 5.30	10 <sup>-8</sup> / 10 <sup>-8</sup>	28.2 / 60.25
AT5G62700	TUBULIN BETA CHAIN 3	14 / 7	2.7 / 2.85	10 <sup>-14</sup> / 10 <sup>-11</sup>	30.3 / 28.21
AT1G75780	TUBULIN BETA-1 CHAIN	10	6.1	10 <sup>-10</sup>	70.2
	<b><u>Signaltransduktion und Genregulation</u></b>				
AT1G22300	*14-3-3 PROTEIN G-BOX FACTOR14 EPSILON	5	2.5	10 <sup>-5</sup>	30.2
AT3G01090	*ARABIDOPSIS SNF1 KINASE HOMOLOG 10	12	4.0	10 <sup>-8</sup>	52.3
AT4G09000	14-3-3 HOMOLOG ISOFORM CHI	8 / 7	3.6 / 4.23	10 <sup>-7</sup> / 10 <sup>-6</sup>	40.2 / 50.17
AT4G13940	S-ADENOSYL-L-HOMOCYSTEINE HYDROLASE 1	10	6.2	10 <sup>-14</sup>	80.3
AT5G46760	BASIC HELIX-LOOP-HELIX (bHLH) family protein	8	4.00	10 <sup>-5</sup>	50.19
	<b><u>Metabolische Enzyme</u></b>				
AT3G24503	*ALDEHYDE DEHYDROGENASE 1A	9	4.5	10 <sup>-8</sup>	68.2
AT3G46970	*ALPHA-GLUCAN PHOSPHORYLASE 2	5	3.51	10 <sup>-6</sup>	40.19
AT5G49570	*ARABIDOPSIS THALIANA PEPTIDE-N-GLYCANASE 1	3	2.09	10 <sup>-5</sup>	30.16
ATCG00120	*ATP SYNTHASE SUBUNIT ALPHA	7	3.8	10 <sup>-4</sup>	50.1
AT3G06650	*ATP-CITRATE LYASE B-1	6	4.8	10 <sup>-12</sup>	60.3
AT2G24270	*GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE 11A3	5	3.1	10 <sup>-12</sup>	36.3
AT4G37870	*PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE	20	14.6	10 <sup>-12</sup>	168.3
AT1G53310	*PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE 1	59 / 22	37.5 / 7.77	10 <sup>-11</sup> / 10 <sup>-11</sup>	444.3 / 100.26
AT2G42600	*PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE 2	97 / 39	39.3 / 19.81	10 <sup>-30</sup> / 10 <sup>-10</sup>	452.3 / 230.28
AT3G52930	*Putative FRUCTOSE-BISPHOSPHATE ALDOLASE	16 / 9	6.9 / 4.06	10 <sup>-11</sup> / 10 <sup>-5</sup>	96.3 / 50.28
AT5G01410	*PYRIDOXINE BIOSYNTHESIS 1.3	31	3.9	10 <sup>-10</sup>	48.2
AT2G33150	3-KETOACYL-COA THIOLASE 2	7 / 5	3.7 / 3.60	10 <sup>-8</sup> / 10 <sup>-8</sup>	40.3 / 40.26
AT2G40840	4-ALPHA-GLUCANOTRANSFERASE	7	4.6	10 <sup>-6</sup>	60.2
AT2G05710	ACONITASE 3	9	3.5	10 <sup>-10</sup>	40.3
AT3G08580	ADP/ATP CARRIER 1	5	4.0	10 <sup>-5</sup>	50.1
ATMG01190	ATP SYNTHASE SUBUNIT 1	4	2.55	10 <sup>-6</sup>	28.18
ATCG00480	ATP SYNTHASE SUBUNIT BETA	6	2.3	10 <sup>-4</sup>	30.2
AT3G01500	CARBONIC ANHYDRASE 1	12	3.58	10 <sup>-13</sup>	50.25
AT5G14740	CARBONIC ANHYDRASE 2	4	2.8	10 <sup>-12</sup>	30.3
AT1G20630	CATALASE 1	3	2.6	10 <sup>-5</sup>	30.1
AT1G20620	CATALASE 3	7	4.6	10 <sup>-6</sup>	50.2
AT2G44350	CITRATE SYNTHASE 4	8 / 13	4.5 / 7.34	10 <sup>-9</sup> / 10 <sup>-8</sup>	70.2 / 90.26
AT4G28520	CRUCIFERIN 3	4	2.24	10 <sup>-8</sup>	30.23
AT4G14880	CYSTEINE SYNTHASE	6	3.7	10 <sup>-6</sup>	50.2
AT1G65930	CYTOSOLIC NADP+-DEPENDENT ISOCITRATE DEHYDROGENASE	12	8.5	10 <sup>-10</sup>	96.3
AT2G36530	ENOLASE 2	23 / 3	15.1 / 2.47	10 <sup>-12</sup> / 10 <sup>-8</sup>	170.3 / 30.24
AT5G17330	GLUTAMATE DECARBOXYLASE 1	3	2.6	10 <sup>-5</sup>	30.2
AT5G37600	GLUTAMINE SYNTHASE 1;1	9	5.0	10 <sup>-9</sup>	56.3
AT1G66200	GLUTAMINE SYNTHASE 1;2	9	2.4	10 <sup>-9</sup>	30.2
AT5G35630	GLUTAMINE SYNTHETASE 2	5	2.64	10 <sup>-4</sup>	38.18
AT3G04120	GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE C SUBUNIT	11 / 5	7.0 / 2.47	10 <sup>-14</sup> / 10 <sup>-4</sup>	88.3 / 30.17
AT3G58610	KETOL-ACID REDUCTOISOMERASE	6	4.73	10 <sup>-10</sup>	50.21
AT3G16950	LIPOAMIDE DEHYDROGENASE 1	7	3.35	10 <sup>-4</sup>	52.15
AT5G08670	Mitochondrial ATP SYNTHASE SUBUNIT BETA	9	6.5	10 <sup>-8</sup>	70.3
AT5G03630	MONODEHYDROASCORBATE REDUCTASE (ATMDAR2)	4	3.0	10 <sup>-5</sup>	40.1
AT1G55090	NAD+ SYNTHASE	5	2.7	10 <sup>-7</sup>	30.2
AT1G37130	NITRATE REDUCTASE 2	9	3.7	10 <sup>-9</sup>	40.2
AT2G15620	NITRITE REDUCTASE	11	4.86	10 <sup>-10</sup>	60.20
AT1G23740	OXIDOREDUCTASE	6	5.43	10 <sup>-10</sup>	60.26
AT2G38380	PEROXIDASE 22 (PER22)	65 / 24	15.6 / 6.57	10 <sup>-11</sup> / 10 <sup>-6</sup>	184.2 / 96.18
AT3G15730	PHOSPHOLIPASE D ALPHA 1	3	2.63	10 <sup>-7</sup>	28.16
AT5G65750	Putative 2-OXOGLUTARATE DEHYDROGENASE E1 component	4	2.7	10 <sup>-9</sup>	30.2
AT2G36460	Putative FRUCTOSE-BISPHOSPHATE ALDOLASE	12	2.8	10 <sup>-8</sup>	26.3
AT1G56190	Putative PHOSPHOGLYCERATE KINASE	11	3.84	10 <sup>-6</sup>	58.18

## Appendix

<u>AGI Code</u>	<u>Genbeschreibung</u>	<u>Peptide</u>	<u>Final score</u>	<u>P (pro)</u>	<u>Score (&gt;24)</u>
AT2G45290	Putative TRANSKETOLASE	8	4.07	10 <sup>-6</sup>	52.19
AT3G60750	Putative TRANSKETOLASE	11 / 15	2.9 / 5.49	10 <sup>-10</sup> / 10 <sup>-12</sup>	40.2 / 70.25
AT2G38230	PYRIDOXINE BIOSYNTHESIS 1.1	26 / 4	10.2 / 3.18	10 <sup>-10</sup> / 10 <sup>-4</sup>	106.2 / 38.17
AT2G39730	RIBULOSE BISPHOSPHATE CARBOXYLASE ACTIVASE	3 / 16	2.5 / 7.59	10 <sup>-9</sup> / 10 <sup>-11</sup>	30.2 / 80.29
AT1G67090	RIBULOSE BISPHOSPHATE CARBOXYLASE SMALL CHAIN 1A	6	2.0	10 <sup>-10</sup>	30.3
AT1G02500	S-ADENOSYLMETHIONINE SYNTHETASE 1	4	2.8	10 <sup>-5</sup>	30.2
AT4G13930	SERINE HYDROXYMETHYLTRANSFERASE 4	8	7.0	10 <sup>-11</sup>	80.3
AT1G78900	VACUOLAR ATP SYNTHASE SUBUNIT A	13 / 5	7.1 / 3.42	10 <sup>-9</sup> / 10 <sup>-3</sup>	90.3 / 40.13
AT1G76030	VACUOLAR ATP SYNTHASE SUBUNIT B1	6	5.6	10 <sup>-15</sup>	60.3
<b><u>Proteine mit unbekannter Funktion</u></b>					
AT2G26770	Unknown function	15	6.9	10 <sup>-8</sup>	80.3
AT3G23940	Unknown function	5	3.57	10 <sup>-7</sup>	40.21
AT2G01190	Unknown function	13	9.1	10 <sup>-14</sup>	110.3
AT4G20260	Unknown function	4 / 10	2.8 / 3.67	10 <sup>-5</sup> / 10 <sup>-7</sup>	30.2 / 38.32
AT4G30530	Unknown function	9	3.3	10 <sup>-4</sup>	38.2
AT3G16640	Unknown function	3	2.8	10 <sup>-4</sup>	30.2
AT1G78850	Unknown function (lectin family protein)	4	2.34	10 <sup>-8</sup>	30.25
AT5G23830	Unknown function (ML domain-containing protein)	24 / 18	5.1 / 2.87	10 <sup>-11</sup> / 10 <sup>-14</sup>	56.3 / 30.25
AT5G23820	Unknown function (ML domain-containing protein)	40 / 51	7.2 / 6.45	10 <sup>-12</sup> / 10 <sup>-10</sup>	66.3 / 58.30
AT1G49600	Unknown function (RNA-binding protein 47A)	6	2.59	10 <sup>-7</sup>	24.25
AT3G07660	Unknown protein	10 / 11	5.4 / 6.57	10 <sup>-9</sup> / 10 <sup>-11</sup>	70.2 / 80.21
AT5G28500	Unknown protein	4	2.59	10 <sup>-7</sup>	28.19
AT3G62010	Unknown protein	20	12.8	10 <sup>-12</sup>	150.2
AT1G80480	Unknown protein (PLASTID TRANSCRIPTIONALLY ACTIVE17)	5	2.73	10 <sup>-7</sup>	30.17

Mit einem Sternchen (\*) markiert sind Proteine für die ein Peptid gefunden wurde, das einen Rest von NEDD8 oder Ubiquitin, bestehend aus zwei Glycinen, trägt. Unter Peptide sind die Anzahl der für ein Protein gefundenen Peptide aufgeführt. In BioWorks (Thermo Scientific) ist der *final score* ein Wert für die Qualität eines Proteintreffers, eine Aussage dafür wie gut die experimentellen MS-Daten mit den theoretischen Daten übereinstimmen; der *probability score* P (pro) bewertet die Wahrscheinlichkeit, dass ein Peptid ein zufälliger Treffer des Spektrums ist und der *score* ist die Summe der *consensus scores*, der für die einzelnen Peptide in der Analyse berechnet wurde. Proteine mit einem *score* unter 24 wurden nicht in die Liste aufgenommen. Ein Schrägstrich (/) trennt die Werte, die in zwei unabhängigen Experimenten identifiziert wurden.

Appendix

ClustalOmega-Alignment pflanzlicher ML-Proteine, das als Grundlage für den phylogenetischen Baum in Abbildung 24 diente.

AT5G23820	AIDFEY	AKNGND	YGTMTS	MSVSPV	PHENPT	ITINMFGS	ASKN	MPASTM	VYVAFR	DGE	FTGLL	KT
AT5G23830	ANDFEY	TKNGHD	YGVMSW	HEVFRV	GPOENP	TLTINMFGT	TATKE	MSASTM	VYVAYRSGD		FTGLL	KT
AT5G23840	AIDFEY	TKNGHD	YGSMSQ	MSVSPD	GPOENP	TLTINMFGS	ASKD	MSASTM	VYVAYRSGD		FTGLL	KT
Bra011987	AIDFEY	NKSGYD	FFNMSR	MSVSPN	VELE	EYPTIR	MFGYANKS	MDDTME	VKVTAGG		TQTMAS	
Bra028884	AVNFEY	NKSGYD	FGNMTN	MSVSPN	VEVGDV	GELSI	TIVIGYAKES	MHTSME	VYAKSEN		TTDLLR	
Bra020976	AVDFGY	NKNGYD	YGNFSR	MSVSPN	VEVGPED	NLYLIT	MSGYASKO	MNNVTME	VYAKSKN		TTDLLG	
AT2G26370	YNFEN	KNAPI	DYNYG	ITNMTN	MSVSPN	VEVGPYD	EPTITMS	GTSDDSY	MNYRAT	MHVLYK	EN	VNSTI
AT1G45015	AVDFKY	NGIGYV	DKMTK	MSVSPN	VEVGPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT	MVNVVS	APFLVN	FNIPF
Bra001619	RVFRP	NITH	NY	PKM	MTMSV	SPNVEV	GPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT	MVNVVS
Bra001622	VSDFRI	QNSK	OP	PKM	MTMSV	SPNVEV	GPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT	MVNVVS
Bra021156	GTDENH	NPLR	DY	PKM	MTMSV	SPNVEV	GPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT	MVNVVS
Bra001623	GPKFQT	DTCK	EY	PKM	MTMSV	SPNVEV	GPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT	MVNVVS
AT2G16005	FVNFTN	GLSN	IDR	GNATS	MSVSPN	VEVGPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT	MVNVVS	APFLVN
Bra029547	FVNFTN	RLS	YYPYR	RNATS	MSVSPN	VEVGPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT	MVNVVS	APFLVN
Bra010341	APTFKY	EKNA	DY	AMK	MSVSPN	VEVGPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT	MVNVVS	APFLVN
GLYMA02G437...	KIKVTY	DKKA	DY	AMK	MSVSPN	VEVGPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT	MVNVVS	APFLVN
GLYMA11G179...	KIKVTY	DKKA	DY	AMK	MSVSPN	VEVGPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT	MVNVVS	APFLVN
GLYMA12G101...	ATSERY	AD	V	NY	AMK	MSVSPN	VEVGPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT	MVNVVS
GLYMA13G387...	VMS	TSLS	D	V	NY	AMK	MSVSPN	VEVGPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT
GLYMA12G316...	ATS FHN	DKR	L	D	PKM	MTMSV	SPNVEV	GPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT
Bra034989	ATS FTY	DKR	L	D	PKM	MTMSV	SPNVEV	GPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT
AT3G44100	AKSVQY	DKK	Q	Y	AMK	MSVSPN	VEVGPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT	MVNVVS
Vv06s0080g01...	ATDVEY	DDNK	EY	EMK	MSVSPN	VEVGPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT	MVNVVS	APFLVN
Bra038681	ATDVS Y	DDNK	EY	EMK	MSVSPN	VEVGPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT	MVNVVS	APFLVN
Bra001420	ATDIKY	NDNA	OY	QMK	MSVSPN	VEVGPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT	MVNVVS	APFLVN
Bra034811	ATDVHY	DDNK	EY	EMK	MSVSPN	VEVGPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT	MVNVVS	APFLVN
AT3G11780	ATDVHY	DDNK	EY	EMK	MSVSPN	VEVGPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT	MVNVVS	APFLVN
AT5G06480	ATDVHY	DDNK	EY	EMK	MSVSPN	VEVGPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT	MVNVVS	APFLVN
Bra028732	ATDVHY	DDNK	EY	EMK	MSVSPN	VEVGPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT	MVNVVS	APFLVN
Bra009198	ATDVHY	DDNK	EY	EMK	MSVSPN	VEVGPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT	MVNVVS	APFLVN
Vv06s0032g01...	AVDVTY	DKKA	DY	DMK	MSVSPN	VEVGPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT	MVNVVS	APFLVN
GLYMA02G350...	ATDIHY	DKKA	DY	DMK	MSVSPN	VEVGPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT	MVNVVS	APFLVN
GLYMA10G103...	STDFHY	DKKA	DY	DMK	MSVSPN	VEVGPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT	MVNVVS	APFLVN
Solyc01g00690...	STDFHY	NKKA	DY	AMK	MSVSPN	VEVGPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT	MVNVVS	APFLVN
Solyc10g08181...	STDFHY	NKKA	DY	AMK	MSVSPN	VEVGPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT	MVNVVS	APFLVN
Solyc10g08180...	STDFHY	NKKT	DY	AMK	MSVSPN	VEVGPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT	MVNVVS	APFLVN
BRAD11G57110	ATEFEY	KKHK	HY	PKM	MTMSV	SPNVEV	GPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT	MVNVVS
Ost7g0159900	VIDVEY	NKKG	KY	PKM	MTMSV	SPNVEV	GPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT	MVNVVS
BRAD11G06320	AADEGY	KKGR	HY	PKM	MTMSV	SPNVEV	GPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT	MVNVVS
Ost03g0788200	ATDVEY	RQGR	DY	PKM	MTMSV	SPNVEV	GPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT	MVNVVS
Sm69362				PKM	MTMSV	SPNVEV	GPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT	MVNVVS
Sm77082				PKM	MTMSV	SPNVEV	GPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT	MVNVVS
PP1S120_100V6	PSDWK	LSH	N	Y	DMV	MTN	MSVSPN	VEVGPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT
PP1S69_198V6	PSDWK	LSH	N	Y	DMV	MTN	MSVSPN	VEVGPYD	DDPSTV	ITMSGL	TRRG	MVYAGT
AT5G23820	YNI	CDVS	A	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AT5G23830	YDI	CDVSLA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AT5G23840	YDI	CDVS	A	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Bra011987	YS	ICVGVG	FA	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Bra028884	YS	ICVGNACV	IRSG	LCFS	PE	---	---	---	---	---	---	---
Bra020976	YD	FS	DV	MG	E	---	---	---	---	---	---	---
AT2G26370	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AT1G45015	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Bra001619	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Bra001622	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Bra021156	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Bra001623	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AT2G16005	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Bra029547	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Bra010341	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
GLYMA02G437...	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
GLYMA11G179...	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
GLYMA12G101...	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
GLYMA13G387...	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
GLYMA12G316...	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Bra034989	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AT3G44100	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Vv06s0080g01...	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Bra038681	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Bra001420	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Bra034811	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AT3G11780	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
AT5G06480	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Bra028732	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Bra009198	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Vv06s0032g01...	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
GLYMA02G350...	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
GLYMA10G103...	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Solyc01g00690...	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Solyc10g08181...	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Solyc10g08180...	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
BRAD11G57110	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Ost7g0159900	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
BRAD11G06320	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Ost03g0788200	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Sm69362	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Sm77082	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
PP1S120_100V6	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---
PP1S69_198V6	YDF	Q	LC	---	---	---	---	---	---	---	---	---

# MLN4924 Is an Efficient Inhibitor of NEDD8 Conjugation in Plants<sup>1</sup>[C][W][OA]

Jana Pia Hakenjos, René Richter, Esther Mirjam Natascha Dohmann<sup>2</sup>, Anthi Katsiarimpa, Erika Isono, and Claus Schwechheimer\*

Plant Systems Biology, Technische Universität München, 85354 Freising, Germany (J.P.H., R.R., A.K., E.I., C.S.); and Developmental Genetics, Center for Plant Molecular Biology, Tübingen University, 72076 Tuebingen, Germany (J.P.H., E.M.N.D., C.S.)

The conjugation of the ubiquitin-like modifier NEURAL PRECURSOR CELL-EXPRESSED DEVELOPMENTALLY DOWN-REGULATED PROTEIN8/RELATED TO UBIQUITIN1 (NEDD8/RUB1; neddylation) is best known as an important post-translational modification of the cullin subunits of cullin-RING-type E3 ubiquitin ligases (CRLs). MLN4924 has recently been described as an inhibitor of NEDD8-ACTIVATING ENZYME1 (NAE1) in human. Here, we show that MLN4924 is also an effective and specific inhibitor of NAE1 enzymes from *Arabidopsis thaliana* and other plant species. We found that MLN4924-treated wild-type seedlings have phenotypes that are highly similar to phenotypes of mutants with a partial defect in neddylation and that such neddylation-defective mutants are hypersensitive to MLN4924 treatment. We further found that MLN4924 efficiently blocks the neddylation of cullins in *Arabidopsis* and that MLN4924 thereby interferes with the degradation of CRL substrates and their downstream responses. MLN4924 treatments also induce characteristic phenotypes in tomato (*Solanum lycopersicum*), *Cardamine hirsuta*, and *Brachypodium distachyon*. Interestingly, MLN4924 also blocks the neddylation of a number of other NEDD8-modified proteins. In summary, we show that MLN4924 is a versatile and specific neddylation inhibitor that will be a useful tool to examine the role of NEDD8- and CRL-dependent processes in a wide range of plant species.

The small ubiquitin-like modifier NEURAL PRECURSOR CELL-EXPRESSED DEVELOPMENTALLY DOWN-REGULATED PROTEIN8 (NEDD8) or RELATED TO UBIQUITIN (RUB), hitherto referred to as NEDD8, is the closest sequence paralog of ubiquitin in the family of ubiquitin-like proteins (Hochstrasser, 2009). NEDD8 is conjugated to target proteins via an enzymatic cascade that is composed of an E1 NEDD8-activating enzyme (a heterodimer composed of NEDD8-ACTIVATING ENZYME1 [NAE1] and a UBA3 subunit), an E2 conjugating enzyme (Ubc12p), and an E3 ligase (RING BOX1 [RBX1] or DEFECTIVE IN CULLIN NEDDYLATION1; Gong

and Yeh, 1999; Gray et al., 2002; Kurz et al., 2005). Neddylation is best studied as a posttranslational modification of the cullin (CUL) subunits of CUL-RING-type E3 ubiquitin ligases (CRLs; Hori et al., 1999), where it has been shown that neddylation is important for the proper enzymatic function of CRLs (Hotton and Callis, 2008). CRLs are evolutionarily conserved E3 ligase complexes that share the CUL and RBX1 subunits and that, depending on the identity of the CUL subunit, associate with different adaptor and degradation substrate receptor modules, such as S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN1 (SKP1) and F-box proteins to form CUL1-containing SCF-type E3 ligases or DNA DAMAGE-BINDING PROTEIN1 (DDB1) and DDB1-CUL4-ASSOCIATED FACTOR (DCAF) subunits to form CUL4-containing DCAF E3s (Hotton and Callis, 2008; Deshaies and Joazeiro, 2009). NEDD8 is hydrolyzed from target proteins by CUL-deneddylating enzymes including subunit 5 of the CONSTITUTIVELY PHOTORMOPHOGENIC9 SIGNALOSOME (Lyapina et al., 2001; Schwechheimer et al., 2001; Cope et al., 2002) or the deneddylase DEN1 (Gan-Erdene et al., 2003; Wu et al., 2003). Besides CULs, several other NEDD8-modified proteins have been reported from animal species, and in some cases a functional understanding of the role of their neddylation has been obtained (Rabut and Peter, 2008; Xirodimas, 2008). While the neddylation and deneddylation pathways are conserved in plants and the role of NEDD8 conjugation of plant CULs is well docu-

<sup>1</sup> This work was supported by the SFB446 program at Tübingen University and by funds from the Technische Universität München and the SPP1365 program (grant no. SCHW751/7-1) of the Deutsche Forschungsgemeinschaft.

<sup>2</sup> Present address: Plant Cell Biology, Biophore, Université de Lausanne, 1015 Lausanne, Switzerland.

\* Corresponding author; e-mail claus.schwechheimer@wzw.tum.de.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors ([www.plantphysiol.org](http://www.plantphysiol.org)) is: Claus Schwechheimer ([claus.schwechheimer@wzw.tum.de](mailto:claus.schwechheimer@wzw.tum.de)).

[C] Some figures in this article are displayed in color online but in black and white in the print edition.

[W] The online version of this article contains Web-only data.

[OA] Open Access articles can be viewed online without a subscription.

[www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.111.176677](http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.111.176677)

mented, no NEDD8-modified proteins other than CULs have been reported from plants as yet (Schwechheimer and Isono, 2010).

Neddylation was initially identified based on Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) *auxin resistant1* (*axr1*) mutants that are impaired in growth responses mediated by the phytohormone auxin (Leyser et al., 1993; del Pozo et al., 1998; Lammer et al., 1998; del Pozo and Estelle, 1999). In Arabidopsis, NEDD8 is known as RUB and is encoded by three different genes (Bostick et al., 2004); NAE is composed of the NAE1 subunit AXR1 or its homolog AXR1-LIKE (AXL) and the UBA3 subunit E1 C-TERMINAL RELATED (ECR1; del Pozo et al., 2002; Dharmasiri et al., 2007). *axr1* and *ecr1* mutants are insensitive to the root growth-inhibiting effect of the phytohormone auxin and have reduced root gravitropism (Leyser et al., 1993; Woodward et al., 2007). *axr1* mutants are partially impaired in NEDD8 conjugation, and the effect of the *axr1* mutation on NEDD8 conjugation and development is enhanced when the AXR1 homolog AXL is dysfunctional, resulting in embryo lethality (Dharmasiri et al., 2007; Hotton et al., 2011).

The auxin-related phenotypes of *axr1* and *ecr1* mutants are best explained by a functional impairment of SCF-type E3 complexes that are associated with the F-box protein TRANSPORT INHIBITOR RESISTANT1 (TIR1) and its homologs AUXIN-BINDING F-BOX1 (AFB1), AFB2, and AFB3 (Dharmasiri et al., 2005a, 200b). SCF<sup>TIR1/AFB1-3</sup> promotes the degradation of AUXIN/INDOLE ACETIC ACID (AUX/IAA) repressor proteins in response to auxin, and several AUX/IAA family members have been attributed roles in different auxin-dependent processes, including the initiation of root formation during embryogenesis, primary root growth, and root gravitropism (Reed, 2001; Lokerse and Weijers, 2009). In the absence of auxin, AUX/IAAs repress the activity of AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) transcription factors. In the presence of auxin, AUX/IAAs are degraded and ARFs can regulate the expression of their target genes (Lokerse and Weijers, 2009). As part of a negative feedback mechanism, the transcription of many AUX/IAAs is regulated by AUX/IAA-ARF regulons. Besides SCF<sup>TIR1/AFB1-3</sup>, CUL1-type E3s have been implicated in the degradation of DELLA regulators in response to the phytohormone GA [SCF<sup>SLEEPY(SLY1)</sup>; Dill et al., 2004] and the cell cycle inhibitor KIP1-RELATED PROTEIN1 (KRP1; [SCF<sup>SKP2b</sup>]; Ren et al., 2008). The best-characterized CUL4 CRL from Arabidopsis acts together with DDB1, CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1, DEETIOLATED1, and SUPPRESSOR-OF-*phyA-1051* to promote the degradation of the transcription factor ELONGATED HYPOCOTYL5 (HY5) that normally represses hypocotyl elongation in light-grown Arabidopsis seedlings (Osterlund et al., 2000; Yanagawa et al., 2004; Chen et al., 2006, 2010).

MLN4924 has recently been characterized as an inhibitor of human NAE (Soucy et al., 2009; Bennett et al., 2010) and as a candidate drug for the treatment of mammalian cancers (Milhollen et al., 2010; Swords et al.,

2010). Structural studies revealed the molecular mode of function of MLN4924 as a mechanism-based inhibitor that acts through the formation of a NEDD8-AMP mimic (Brownell et al., 2010). These structural data have allowed us now to predict that MLN4924 may also be functional in plants. Here, we show that MLN4924 inhibits NEDD8 conjugation in Arabidopsis and other plant species and that MLN4924 treatment of wild-type seedlings induces morphological and molecular phenotypes that are reminiscent of those observed in mutants with partially impaired neddylation. Therefore, we propose that MLN4924 is an important tool that will allow studying the role of neddylation in the growth and development of Arabidopsis and other plant species.

## RESULTS

### Sequence Comparisons Predict an Inhibitory Role for MLN4924 in Arabidopsis

To be able to predict whether MLN4924 may function as a neddylation inhibitor in plants, we aligned the protein sequences of human NAE subunit UBA3 (HsUBA3) with those of their plant ECR1 and yeast UBA3p counterparts (Fig. 1A). The high sequence similarity between ECR1 and HsUBA3 as well as the previously published structure of the NEDD8-MLN4924 adduct bound to NAE allowed us also to model the interaction of Arabidopsis ECR1 with MLN4924 (Fig. 1B; Brownell et al., 2010). Both approaches, sequence alignment and structure prediction, indicated that the amino acid residues required for MLN4924 interaction are conserved between the human and Arabidopsis NAE subunits and that their predicted spatial orientation and positions in ECR1 may allow binding of MLN4924 in the same way as proposed for HsUBA3.

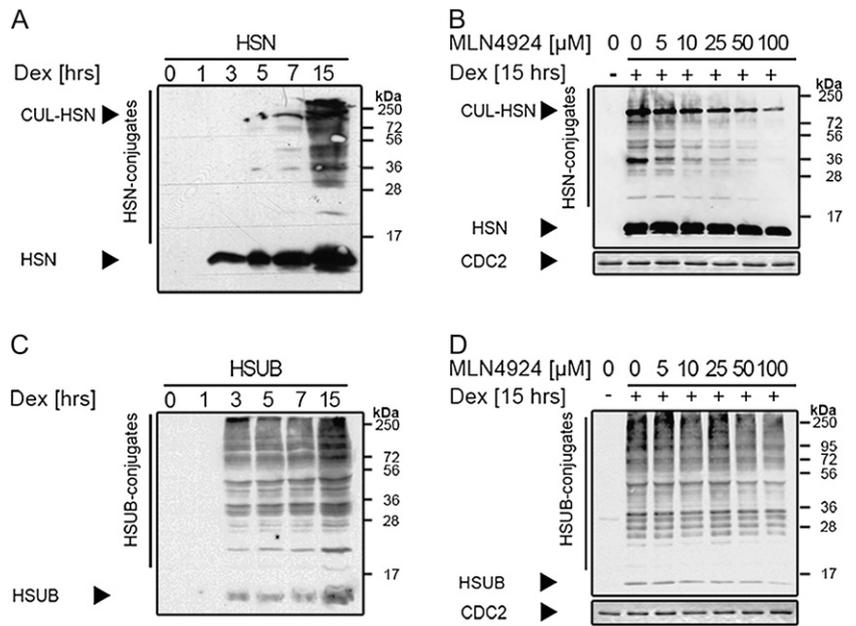
### MLN4924 Is an Inhibitor of Neddylation in Arabidopsis

In order to examine the effect of MLN4924 on neddylation in plants, we established transgenic lines that express hemagglutinin (HA)-STREPII-tagged NEDD8 (HSN) under the control of a dexamethasone (Dex)-inducible promoter (Aoyama and Chua, 1997). Following Dex induction, we found that HSN is efficiently translated and conjugated to proteins (Fig. 2A). We then also showed in a western blot with an anti-CUL1 antibody that the most prominent NEDD8-modified protein comigrates with CUL1 and, based on this observation, that this prominent neddylated band corresponds to NEDD8-modified CULs (Supplemental Fig. S1). Since the NEDD8 conjugation was efficiently suppressed in an MLN4924 dose-dependent manner (Fig. 2B), we judged that MLN4924 inhibits NEDD8 conjugation, most likely by inhibiting ECR1 function.

Since NEDD8 and ubiquitin as well as NAE1 and ubiquitin-activating enzymes are highly related proteins (Fig. 1), we also wanted to examine whether MLN4924 blocks ubiquitin-activating enzymes and



**Figure 2.** MLN4924 treatment blocks neddylation in planta. A, Immunoblot with an anti-HA antibody of protein extracts from 7-d-old Dex-induced HSN seedlings. Samples were taken following Dex induction at the time points indicated. Unconjugated and CUL-conjugated HSN were identified based on molecular weight and anti-NEDD8 and anti-CUL1 western blots (Supplemental Fig. S1). B, Immunoblot with an anti-HA antibody of protein extracts prepared from 7-d-old Dex-induced and MLN4924-treated HSN seedlings. C, Immunoblot with an anti-HA antibody of protein extracts from 7-d-old Dex-induced transgenic HSUB seedlings. D, Immunoblot with an anti-HA antibody of protein extracts from 7-d-old Dex-induced and MLN4924-treated HSUB seedlings. Immunoblots with CDC2 served as loading controls.

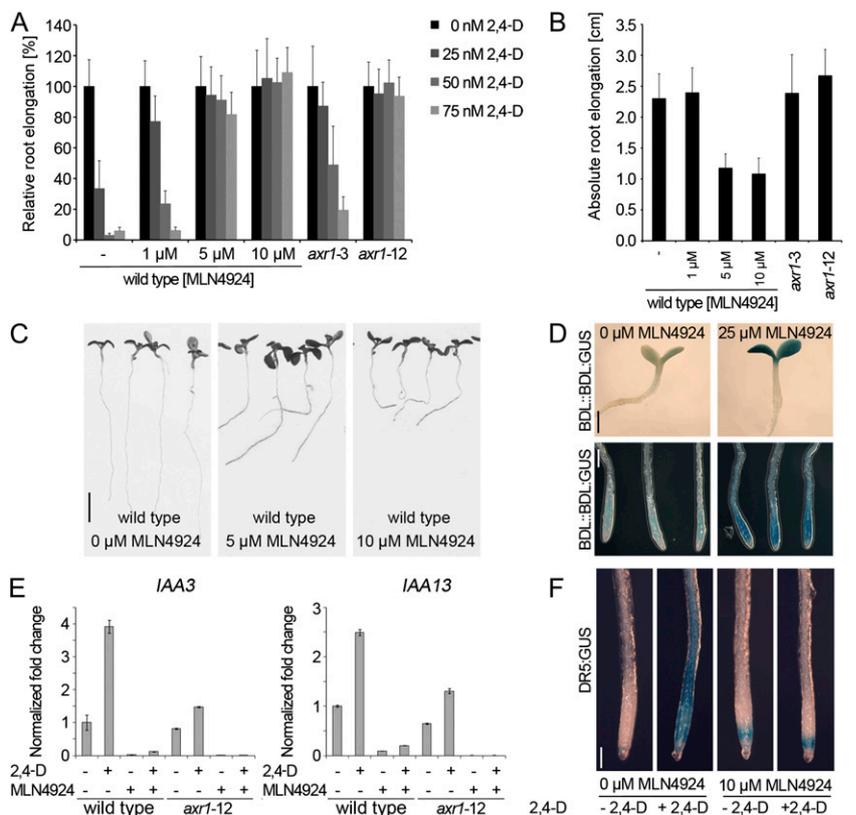


Supplemental Table S1). Second, we identified proteins that are not functionally connected to the ubiquitin-proteasome system, such as proteins involved in protein folding, protein synthesis, intracellular transport, signal transduction, as well as proteins with metabolic functions (Supplemental Table S1). We thus hypothesize that these proteins are either NEDD8 modified or are associated with NEDD8-modified proteins.

**MLN4924 Treatment Induces the Auxin Insensitivity Phenotype of Arabidopsis Neddylation Mutants**

Although AXR1 mediates CRL neddylation and activity at a global level, *axr1* mutants have a number of phenotypes that are characteristic for mutants impaired in the auxin receptor CRL SCF<sup>TIR1/AFB2-4</sup>. *axr1* mutants are auxin insensitive and have reduced gravitropism in

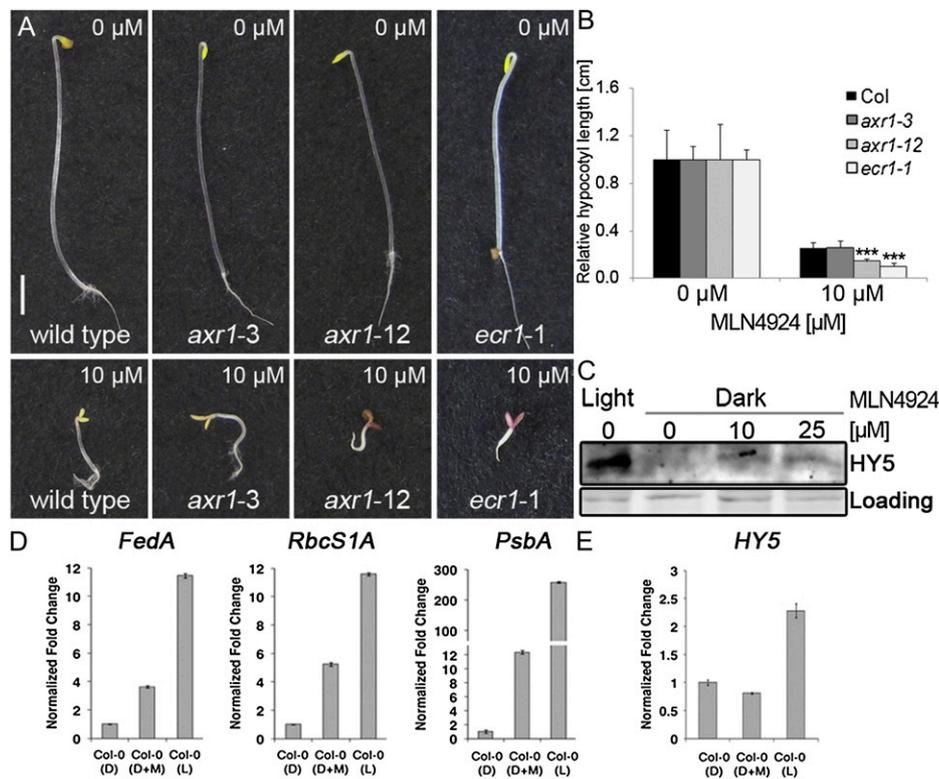
**Figure 3.** MLN4924 treatment confers auxin-insensitive growth. A, Root growth assay with wild-type seedlings and *axr1* mutants. Four-day-old GM-grown seedlings were transferred to MLN4924- and 2,4-D-containing media. Root growth was quantified after an additional 4 d and is shown relative to the root growth of the untreated roots. *axr1-3* and *axr1-12* are weak and strong *axr1* alleles, respectively ( $n \geq 15$ ). Average and SD values are shown. B, Absolute root elongation of the seedlings analyzed in A. Average and SD values are shown. For representative photographs of the seedlings from A and B, see Supplemental Figure S2. C, Agravitropic growth of MLN4924-treated 8-d-old seedling roots grown for 4 d without and then for 4 d with MLN4924. Bar = 5 mm. D, Photographs of GUS-stained seedlings and roots of transgenic seedlings expressing a BDL::BDL::GUS transgene. Bars = 0.5 mm (top) and 0.2 mm (bottom). E, Results of a quantitative RT-PCR analysis of *IAA3* and *IAA13* transcript abundance in MLN4924- and 2,4-D-treated wild-type and *axr1* seedlings. The expression levels of the untreated wild type were used to normalize the data. Error bars correspond to SE. F, Photographs of roots from MLN4924- and 2,4-D-treated (5 μM for 2 h) DR5::GUS-expressing Arabidopsis seedlings. Bar = 0.2 mm.



root growth; they also fail to efficiently degrade AUX/IAA repressors and are consequently impaired in auxin-induced gene expression (Lincoln et al., 1990; Gray et al., 2001). We reasoned that MLN4924 treatments should lead to a phenocopy of the *axr1* phenotype in the wild type. Indeed, when we grew wild-type Arabidopsis seedlings on MLN4924 in the presence of critical concentrations of the synthetic auxin 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), we noted that MLN4924 treatment confers auxin insensitivity to the roots of wild-type seedlings (Fig. 3A; Supplemental Fig. S2). In addition, we also observed a significant reduction of root growth following MLN4924 treatment at elevated concentrations (greater than 5  $\mu\text{M}$ ) as well as agravitropic root growth (Fig. 3, B and C; Supplemental Fig. S2). We thus concluded that MLN4924 treatment induces the auxin-insensitive and agravitropic root growth of neddylation-deficient *axr1* mutants. The strong root growth reduction of MLN4924-treated seedlings may be the consequence of the inhibition of both NAEs, AXR1 and AXL, rather than the inhibition of AXR1 alone. Similar root growth defects, for example, have been

reported for an *axr1-12/s-12 axl-1/AXL* mutant (Dharmasiri et al., 2007).

We next examined whether MLN4924 treatment leads to a stabilization of AUX/IAA repressors, which may be explained by the inhibition of SCF<sup>TIR1/AFB1-3</sup> by MLN4924. Indeed, we observed an MLN4924-dependent accumulation of the AUX/IAA protein BODENLOS (BDL)/IAA12 by examining a transgenic line expressing a translational fusion between BDL and the reporter GUS (BDL:BDL:GUS; Fig. 3D; Weijers et al., 2005). We further observed that the transcripts of two representative auxin-induced genes, *IAA3* and *IAA13*, whose expression is normally repressed by AUX/IAAs and induced following AUX/IAA degradation, is compromised in MLN4924-treated wild-type seedlings and even more so in the genetically sensitized *axr1-12* mutants (Fig. 3E). In addition, we found that the auxin induction of the established and widely used auxin response reporter DR5:GUS was compromised following MLN4924 treatment (Fig. 3F; Sabatini et al., 1999). We thus conclude that MLN4924 treatment of wild-type seedlings mimics the phenotypes of Arabi-



**Figure 4.** MLN4924 treatment induces photomorphogenic growth in Arabidopsis seedlings. A, Photographs of 4-d-old seedlings grown on MLN4924-containing one-half-strength Murashige and Skoog medium. Bar = 2 mm. B, Quantification of the hypocotyl length of the seedlings shown in A ( $n \geq 10$ ). Average and SD values are shown; the values of untreated wild-type and mutant seedlings were set to 1 to normalize the data. \*\*\*  $t$  test significance ( $P < 0.005$ ). C, Immunoblot using an anti-HY5 antibody of total protein extracts prepared from 4-d-old light- and dark-grown seedlings germinated and grown on MLN4924. A cross-reacting band served as a loading control. D, Results of quantitative RT-PCR analyses of the genes encoding ferredoxin A (*FedA*), the small subunit of ribulose biphosphate carboxylase 1A (*RbcS1A*), and the D1 protein of PSII (*PsbA*). E, *HY5* in dark-grown (D) and light-grown (L) seedlings as well as MLN4924 (10  $\mu\text{M}$ )-treated dark-grown seedlings (D+M). The expression level of the untreated wild type was used to normalize the data. Error bars correspond to SE. [See online article for color version of this figure.]

dopsis neddylation pathway mutants at the morphological, physiological, and molecular levels. MLN4924 may thus act as an inhibitor of neddylation in Arabidopsis and thereby impair SCF<sup>TIR1/AFB1-3</sup> and auxin responses.

### MLN4924 Inhibits the Function of Other CRLs

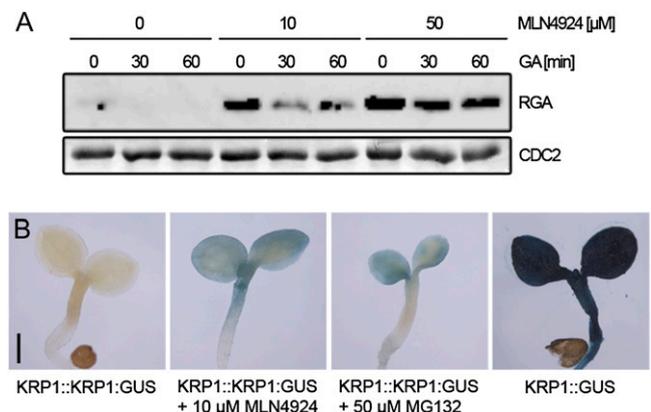
We next tested whether the predicted inhibition of neddylation by MLN4924 also affects the degradation of other CRL E3 ligases. The deetiolation of seedlings in response to light is a well-characterized process, which requires the activity of a CUL4-containing CRL that promotes the degradation of photomorphogenesis regulators such as HY5 in the dark (Osterlund et al., 2000; Holm et al., 2002). While dark-grown etiolated seedlings are characterized by an elongated hypocotyl, closed cotyledons, and an apical hook, light-grown deetiolated seedlings have a short hypocotyl, open cotyledons, and express a large set of light-induced genes. With MLN4924 treatment, we were able to induce deetiolated seedling growth in dark-grown wild-type seedlings (Fig. 4, A and B). The even stronger decrease in hypocotyl elongation together with the visible increase in anthocyanin accumulation suggested that *axr1* as well *ecr1* mutants are already sensitized in this pathway (Fig. 4, A and B; Leyser et al., 1993; Woodward et al., 2007). We then also found that HY5 protein but not *HY5* transcript level increases in dark-grown MLN4924-treated seedlings and that this correlates with an increase in transcript abundance of light-induced genes in these seedlings (Fig. 4, C–E). These findings suggest that MLN4924 treatment promotes deetiolation in dark-grown seedlings, which may be explained by a dysfunction of CUL4-containing CRLs that normally repress this process in the dark (Chen et al., 2006, 2010).

In order to confirm the effect of MLN4924 on additional CRLs, we also examined the behavior of the SCF<sup>SLY1</sup> substrate and DELLA repressor RGA as well as that of the SCF<sup>SKP2b</sup> substrate and cell cycle regulator KRP1 following MLN4924 treatment (Dill et al., 2004; Ren et al., 2008). Using immunoblots, we found that RGA accumulates in MLN4924-treated but not in untreated wild-type seedlings and that its GA-induced degradation is compromised after MLN4924 treatment (Fig. 5A). In agreement with an impairment of SCF<sup>SKP2b</sup> function, we observed that a translational fusion protein of KRP1 to GUS (*KRP1::KRP1::GUS*) is stabilized in wild-type seedlings treated with MLN4924 or the proteasome inhibitor MG132 (Fig. 5B). We thus concluded that MLN4924 treatment also impairs other CRL-dependent protein degradation events and growth responses. MLN4924, therefore, may act as a general inhibitor of CRL-dependent processes by inhibiting neddylation.

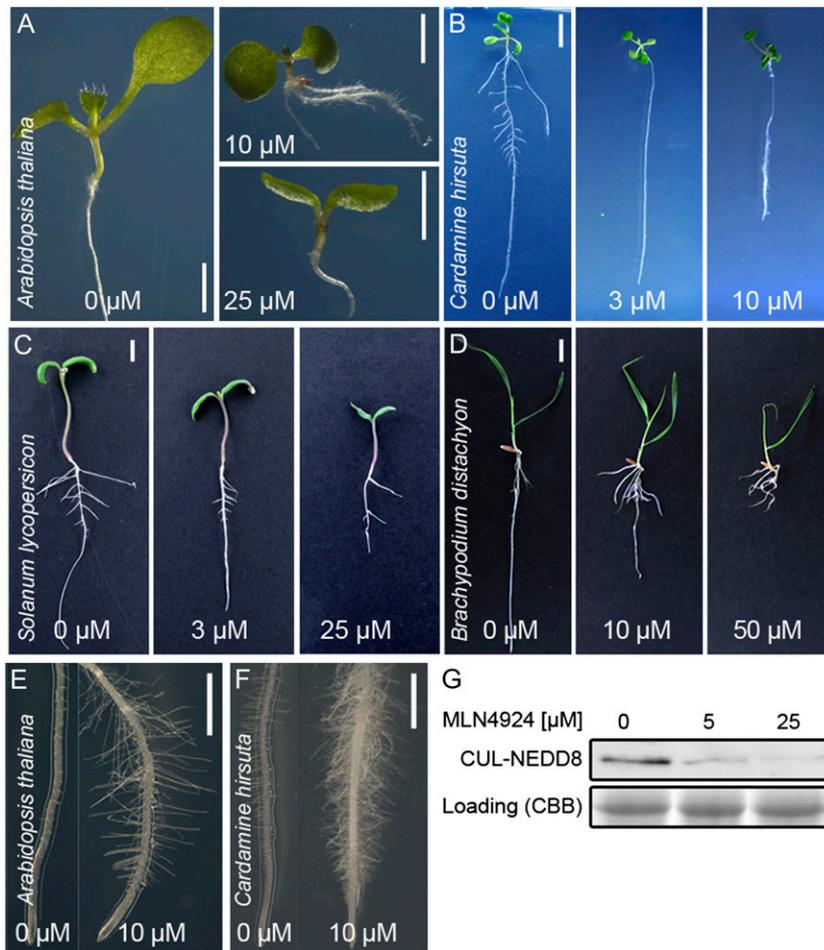
### MLN4924 Inhibits Neddylation in Other Plant Species

The availability of MLN4924 as a neddylation inhibitor would allow examining the role of this posttrans-

lational modification also in species where neddylation-defective mutants are not available. Our sequence comparisons had revealed that MLN4924-binding sites are conserved in all plant ECR1 proteins available in the databases (Fig. 1). To test this, we examined the effects of MLN4924 on plant development by treating *Cardamine hirsuta*, tomato (*Solanum lycopersicum*), and purple false brome (*Brachypodium distachyon*) with MLN4924. For each of the tested plant species, we observed in part overlapping and in part distinct growth phenotypes. In all species, we noted a dosage-dependent reduction in primary root growth, lateral root growth, and lateral root initiation, suggesting that these processes require neddylation for proper function (Fig. 6, A–D). We also noted that the sensitivity toward the inhibitor was different for each species and that different critical concentrations were required to induce similar phenotypes in the three species tested. Interestingly, *Cardamine*, similar to Arabidopsis but not tomato or *Brachypodium*, showed a strong induction of root hair formation in response to MLN4924 treatment (Fig. 6, E and F). On the other hand, *Cardamine*, unlike Arabidopsis, tomato, and *Brachypodium*, was at least partially insensitive to MLN4924 with regard to gravitropic growth (Supplemental Fig. S3). In all cases, the observed phenotypes may be attributed to the stabilization of CRL substrates or the dysfunctional NEDD8 conjugation of hitherto uncharacterized NEDD8 conjugation substrates. Since the available NEDD8 antibody from Arabidopsis cross-reacts with NEDD8 proteins from other species, we were able to demonstrate a reduction in *Cardamine* cullin neddylation after MLN4924 treatment on immunoblots (Fig. 6E). We thus conclude



**Figure 5.** MLN4924 treatment blocks SCF<sup>SLY1</sup>- and SCF<sup>SKP2b</sup>-dependent protein degradation. A, Immunoblot with an anti-RGA antibody of protein extracts prepared from 8-d-old GA-treated wild-type seedlings germinated and grown on MLN4924. B, Photographs of 4-d-old GUS-stained Arabidopsis seedlings expressing *KRP1::KRP1::GUS*. The seedlings had been treated with MLN4924 for 24 h and with MG132 for 8 h. GUS staining of transgenic lines expressing the GUS gene under control of the *KRP1* promoter (*KRP1::GUS*) revealed that *KRP1* is strongly expressed throughout the seedling. Immunoblots with CDC2 served as loading controls. Bar = 5 mm.



**Figure 6.** MLN4924 induces characteristic phenotypes in plant species. A to D, Photographs of *Arabidopsis* (A), *Cardamine* (B), tomato (C), and *Brachypodium* (D) seedlings grown on MLN4924. Eight-day-old *Arabidopsis* seedlings were germinated on MLN4924-containing medium. *Cardamine* (14 d old) and tomato (10 d old) were grown for 6 d before transfer to MLN4924-containing medium. *Brachypodium* (11 d old) was grown for 1 d before transfer to MLN4924-containing medium. Bars = 2 mm (*Arabidopsis*) and 1 cm (other species). E, Root segments of 8-d-old *Arabidopsis* seedlings grown in the absence and presence of MLN4924. Bar = 100 μm. F, Root segments of 14-d-old *Cardamine* seedlings grown in the absence and presence of MLN4924. Seedlings were germinated without MLN4924 for 6 d and then transferred to MLN4924. Bar = 200 μm. G, Immunoblot detection of NEDD8-conjugated CULs from *Cardamine* using an anti-NEDD8 antibody. Coomassie Brilliant Blue (CBB) staining served as a loading control. [See online article for color version of this figure.]

that MLN4924 is a functional NEDD8 inhibitor in plants that can now be used for developmental and comparative studies on neddylation in plant species other than *Arabidopsis*.

## DISCUSSION AND CONCLUSION

In this paper, we evaluate the role and mode of action of the compound MLN4924, which had previously been shown to inhibit NEDD8 conjugation in mammalian cells. Plant responses to the phytohormone auxin and light are both well-established processes that require the activity of NEDD8-dependent CRL E3 ubiquitin ligases. In a set of physiological and molecular experiments, we demonstrate that the application of MLN4924 to wild-type *Arabidopsis* seedlings produces phenotypes that strongly support the conclusion that MLN4924 inhibits neddylation and CRL function in this plant species. Furthermore, we find that mutants with a partial deficiency in neddylation are hypersensitive to MLN4924 and that MLN4924 treatment of wild-type seedlings induces growth phenotypes that are strongly reminiscent of those observed in the neddylation mutants. Finally, we

show that NEDD8 conjugation to CULs and other proteins is blocked when MLN4924 is applied to *Arabidopsis* seedlings expressing a tagged version of NEDD8. Since the amino acid residues required for MLN4924 binding are conserved in all plant ECR1 orthologous sequences available to date (Fig. 1), we hypothesize that MLN4924 may be functional in all plant species. Interestingly, we also noted that several MLN4924-interacting amino acids are not conserved in the budding and fission yeast Uba3p counterparts, suggesting that MLN4924 may not bind to yeast Uba3p proteins (Fig. 1A). In summary, our data suggest that NEDD8 is a functional neddylation inhibitor in plants. To date, studies on the role of neddylation for plant growth could only be performed with genetic mutants that are impaired in NEDD8 conjugation. Our results now open the possibility to use MLN4924 to examine the requirement of neddylation in any plant species and at any stage of growth and development, thus facilitating interspecies comparisons of the regulation of developmental processes.

Particularly in plants, the availability of a small molecule inhibitor that interferes with NEDD8 conjugation, and thereby also with the function of CRL-type E3 ubiquitin ligases, is of importance. First, it is appar-

ent from genome-wide analyses in *Arabidopsis* that the different CRL families with CUL1, CUL3, and CUL4 subunits have, in comparison with yeast and mammalian species, greatly expanded in plants; thus, it can be anticipated that CRL-dependent protein degradation plays an important role in plant development and plant physiology (Gagne et al., 2002; Figueroa et al., 2005; Bernhardt et al., 2006; Chen et al., 2006; Jain et al., 2007). This has been analyzed in great detail in *Arabidopsis* and rice (*Oryza sativa*), where approximately 700 F-box protein-encoding genes were found, suggesting the presence of a similar number of distinct SCF-type CRLs in plant species (Gagne et al., 2002; Jain et al., 2007). To date, only a few CRL functions are known in plants, and the roles of only a very small number of these CRLs, such as SCF<sup>TIR1/AFB2-4</sup> and SCF<sup>SLY1</sup>, are understood at the molecular level (Schwechheimer et al., 2009). This may be due to the fact that specific CRL functions, and in this particular example, F-box protein functions, cannot easily be identified with genetic mutants due to the functional redundancy of individual CRLs and F-box proteins. With MLN4924, it will now be possible to test for the involvement of a CRL in a particular growth process or response.

Second, MLN4924 will allow testing for the stability of proteins that are destined for degradation by CRLs and the ubiquitin-proteasome system. The anticipated large number of CRLs suggests that a similarly large number of substrate proteins exist that are targeted for proteasomal degradation by these CRLs. However, to date, only a few proteins have been shown to be regulated by CRLs and the proteasome pathway (Schwechheimer et al., 2009). This can be attributed at least in part to the restricted number of genetic tools but also to the restricted number of chemical tools that are available for this field of plant research. Commonly, 26S proteasome inhibitors, most importantly MG132, are being used in plant studies to demonstrate that selected proteins are turned over by the 26S proteasome (Schwechheimer et al., 2009). The availability of MLN4924 will now allow for specific, and possibly also more efficient, blocking of CRL-dependent protein turnover and thereby allow determining whether protein instability is promoted by a CUL-containing E3 ligase.

Our observation that proteins other than CULs are modified by NEDD8 in plants is intriguing (Fig. 5; Supplemental Table S1). Importantly, several studies conducted in animal cells also report a similar accumulation of NEDD8-modified proteins, suggesting that many NEDD8 targets remain to be identified (Norman and Shiekhhattar, 2006; Chan et al., 2008). Few of these proteins have been characterized as yet, and to date, besides CULs, only a very limited number of NEDD8 targets are known from mammalian studies. In plants, no NEDD8 conjugates other than CULs have been identified as yet. This is in sharp contrast to the related modifiers ubiquitin and SMALL UBIQUITIN-LIKE MODIFIER, for which a steadily increasing number of target proteins are being identified and for which a diverse range of regulatory functions are continuously

being discovered (Ravid and Hochstrasser, 2008; Acconcia et al., 2009; Bergink and Jentsch, 2009). This invites the hypothesis that many NEDD8 targets still remain to be identified. The most prominent studies of the known non-CUL NEDD8 targets are studies that demonstrate the neddylation of the tumor suppressor protein p53 and the ribosomal protein L11 (Xirodimas et al., 2004, 2008). In the case of p53, neddylation is mediated by Mdm2, and neddylated p53 has reduced transcriptional activity (Xirodimas et al., 2004). Neddylation was also reported for ribosomal proteins (Xirodimas et al., 2008), and specifically L11 was shown to be deneddylated in response to nucleolar stress and to then relocalize from the nucleolus to the cytoplasm. In addition, other mammalian proteins such as APP1 (Lee et al., 2008), BCA3 (Gao et al., 2006), EGFR (Oved et al., 2006), and pVHL (Stickle et al., 2004; Russell and Ohh, 2008) have been described to be neddylated, and regulatory roles have been attributed to the NEDD8 modification. Future research will now allow for the confirmation and examination of the role of NEDD8 as a modifier of the set of putative NEDD8-modified proteins presented in this study.

## MATERIALS AND METHODS

### Biological Material and Physiological Experiments

*Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) ecotype Columbia as well as previously published mutants as referenced in the text were used for all physiological experiments. DR5::GUS, BDL::BDL::GUS, KRP1::GUS, and KRP1::KRP1::GUS were obtained from Tom Guilfoyle (University of Columbia), Dolf Weijers (Wageningen Agricultural University), and Mark Estelle (University of San Diego), respectively. *Brachypodium distachyon*, *Cardamine hirsuta*, and tomato (*Solanum lycopersicum* 'MoneyMaker') wild-type seeds were obtained from Monika Kavanová (Technische Universität München), Miltos Tsiantis (Oxford University), and Catarina Brancato (Universität Tübingen), respectively.

### Quantitative Real-Time PCR

Quantitative RT-PCR was performed as described previously (Richter et al., 2010). For auxin response assays, RNA was extracted from 8-d-old seedlings that had been grown on standard growth medium (GM + 1% Suc) supplemented with 50  $\mu$ M MLN4924 and that were treated for 45 min with 50  $\mu$ M 2,4-D. For the analysis of light-induced gene expression, RNA was extracted from 4-d-old dark- and light-grown seedlings that had, where indicated, been grown on 10  $\mu$ M MLN4924. Primer sequences are listed in Supplemental Table S2.

### Cloning Procedures

The HSN construct was generated by overlap extension PCR with the primers HSN-FW1 and HSN-RV1 using the vector pXCS-HAStrep as a template for the STREPII-HA tag (a gift from Tina Romeis) and HSN-FW2 and HSN-RV2 using *Arabidopsis* cDNA as a template for NEDD8/RUB1 (AT1G31340). The fusion construct was cloned in pTA7002. The HSUB construct was generated in a similar manner with the primers HSUB-FW1 and HSUB-RV1 as well as HSUB-FW2 and HSUB-RV2. Primer sequences are listed in Supplemental Table S2. HSN and HSUB were transformed into *Arabidopsis* wild-type plants using the floral dip method and selected using standard protocols (Clough and Bent, 1998).

### Immunoblots

Immunoblotting was performed according to standard protocols. The following antibodies were used for protein detection: anti-HA-peroxidase

(1:1,000; Roche), anti-HY5 (1:3,000; a gift from Roman Ulm, Université de Genève), and anti-RGA (1:1,000; Willige et al., 2007). The anti-NEDD8 antibody was raised in rabbits against a peptide sequence of Arabidopsis NEDD8 protein RUB1 (AT1G31340; N'-IDRIKERVEEKEGIP-C') and subsequently affinity purified (Eurogentec). GA<sub>3</sub> was used for GA treatments (Duchefa).

## Mass Spectrometric Analysis

HSN and HSN-tagged proteins were purified from 7-d-old seedlings after a 15-h induction with 30  $\mu$ M Dex in liquid GM/0.01% Tween 20. Ten grams of seedlings were extracted from liquid nitrogen-frozen samples at 4°C with extraction buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, pH 8.0, 5 mM EGTA, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 10 mM dithiothreitol [DTT], 5 mM N-ethylmaleimide, 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> avidin, and plant protease inhibitor cocktail [Sigma-Aldrich]) using a HomGen homogenizer (Schuett). After centrifugation at 50,000g and 4°C for 30 min, the supernatant was loaded on a 1-mL StrepTactin affinity column (IBA). The column was washed five times with ice-cold washing buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2.5 mM EDTA, pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM DTT, and 0.05% Triton X-100) and then with ice-cold washing buffer without Triton X-100. Proteins were eluted with elution buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM desthiobiotin, and 2 mM DTT) and precipitated with acetone/0.2% DTT at -20°C overnight. After centrifugation at 10,000g and 4°C for 15 min, the pellet was dried, dissolved in 2 $\times$  Laemmli buffer, and boiled for 5 min. The solution was subjected to SDS-PAGE, and the samples were prepared for liquid chromatography-tandem mass spectrometry as described elsewhere (<http://biochemistry.wur.nl/Biochem/>). Mass spectrometry was performed using an nLC-LTQ-Qrbitrap tandem mass spectrometer at Bionalys, and the data were analyzed using the Bioworks software (ThermoFisher). The same procedure was performed with Columbia wild-type seedlings as a negative control.

## Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

**Supplemental Figure S1.** Immunoblot with an anti-CUL1 antibody of total protein extracts prepared from MLN4924-treated wild-type and *axr1* mutant seedlings.

**Supplemental Figure S2.** MLN4924 treatment induces auxin-insensitive growth in Arabidopsis wild-type seedlings.

**Supplemental Figure S3.** MLN4924 induces agravitropic root growth in different plant species.

**Supplemental Table S1.** List of proteins identified by mass spectrometry following purification of HSN.

**Supplemental Table S2.** List of primers employed in this study.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Julia Mergner (Technische Universität München) for critical comments on the manuscript, Katrin Schachtl (Technische Universität München) for preparing the HSUB construct, and Jeff Boeren (Bionalys, Wageningen, The Netherlands) for mass spectrometric analysis. We greatly appreciate the gift of MLN4924 from Millennium Pharmaceuticals (Cambridge, MA).

Received March 19, 2011; accepted April 28, 2011; published April 28, 2011.

## LITERATURE CITED

- Acconcia E, Sigismund S, Polo S (2009) Ubiquitin in trafficking: the network at work. *Exp Cell Res* 315: 1610–1618
- Aoyama T, Chua NH (1997) A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J* 11: 605–612
- Bennett EJ, Rush J, Gygi SP, Harper JW (2010) Dynamics of cullin-RING ubiquitin ligase network revealed by systematic quantitative proteomics. *Cell* 143: 951–965
- Bergink S, Jentsch S (2009) Principles of ubiquitin and SUMO modifications in DNA repair. *Nature* 458: 461–467
- Bernhardt A, Lechner E, Hano P, Schade V, Dieterle M, Anders M, Dubin

- MJ, Benvenuto G, Bowler C, Genschik P, et al (2006) CUL4 associates with DDB1 and DET1 and its downregulation affects diverse aspects of development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 47: 591–603
- Bostick M, Lochhead SR, Honda A, Palmer S, Callis J (2004) Related to ubiquitin 1 and 2 are redundant and essential and regulate vegetative growth, auxin signaling, and ethylene production in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 2418–2432
- Brownell JE, Sintchak MD, Gavin JM, Liao H, Bruzzese FJ, Bump NJ, Soucy TA, Milhollen MA, Yang X, Burkhardt AL, et al (2010) Substrate-assisted inhibition of ubiquitin-like protein-activating enzymes: the NEDD8 E1 inhibitor MLN4924 forms a NEDD8-AMP mimetic *in situ*. *Mol Cell* 37: 102–111
- Chan Y, Yoon J, Wu JT, Kim HJ, Pan KT, Yim J, Chien CT (2008) DEN1 deneddylates non-cullin proteins *in vivo*. *J Cell Sci* 121: 3218–3223
- Chen H, Huang X, Gusmaroli G, Terzaghi W, Lau OS, Yanagawa Y, Zhang Y, Li J, Lee JH, Zhu D, et al (2010) *Arabidopsis* CULLIN4-damaged DNA binding protein 1 interacts with CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1-SUPPRESSOR OF PHYA complexes to regulate photomorphogenesis and flowering time. *Plant Cell* 22: 108–123
- Chen H, Shen Y, Tang X, Yu L, Wang J, Guo L, Zhang Y, Zhang H, Feng S, Strickland E, et al (2006) *Arabidopsis* CULLIN4 forms an E3 ubiquitin ligase with RBX1 and the CDD complex in mediating light control of development. *Plant Cell* 18: 1991–2004
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 735–743
- Cope GA, Suh GS, Aravind L, Schwarz SE, Zipursky SL, Koonin EV, Deshaies RJ (2002) Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cul1. *Science* 298: 608–611
- del Pozo JC, Dharmasiri S, Hellmann H, Walker L, Gray WM, Estelle M (2002) AXR1-ECR1-dependent conjugation of RUB1 to the *Arabidopsis* cullin AtCUL1 is required for auxin response. *Plant Cell* 14: 421–433
- del Pozo JC, Estelle M (1999) The *Arabidopsis* cullin AtCUL1 is modified by the ubiquitin-related protein RUB1. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 15342–15347
- Deshaies RJ, Joazeiro CA (2009) RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* 78: 399–434
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M (2005a) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: 441–445
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Weijers D, Karunarathna N, Jurgens G, Estelle M (2007) AXL and AXR1 have redundant functions in RUB conjugation and growth and development in *Arabidopsis*. *Plant J* 52: 114–123
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Weijers D, Lechner E, Yamada M, Hobbie L, Ehrismann JS, Jurgens G, Estelle M (2005b) Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Dev Cell* 9: 109–119
- Dill A, Thomas SG, Hu J, Steber CM, Sun TP (2004) The *Arabidopsis* F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell* 16: 1392–1405
- Figuroa P, Gusmaroli G, Serino G, Habashi J, Ma L, Shen Y, Feng S, Bostick M, Callis J, Hellmann H, et al (2005) *Arabidopsis* has two redundant Cullin3 proteins that are essential for embryo development and that interact with RBX1 and BTB proteins to form multisubunit E3 ubiquitin ligase complexes *in vivo*. *Plant Cell* 17: 1180–1195
- Gagne JM, Downes BP, Shiu SH, Durski AM, Vierstra RD (2002) The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11519–11524
- Gan-Erdene T, Nagamalleswari K, Yin L, Wu K, Pan ZQ, Wilkinson KD (2003) Identification and characterization of DEN1, a deneddylase of the ULP family. *J Biol Chem* 278: 28892–28900
- Gao F, Cheng J, Shi T, Yeh ET (2006) Neddylation of a breast cancer-associated protein recruits a class III histone deacetylase that represses NF- $\kappa$ B-dependent transcription. *Nat Cell Biol* 8: 1171–1177
- Gong L, Yeh ET (1999) Identification of the activating and conjugating enzymes of the NEDD8 conjugation pathway. *J Biol Chem* 274: 12036–12042
- Gray WM, Hellmann H, Dharmasiri S, Estelle M (2002) Role of the *Arabidopsis* RING-H2 protein RBX1 in RUB modification and SCF function. *Plant Cell* 14: 2137–2144
- Gray WM, Kepinski S, Rouse D, Leyser O, Estelle M (2001) Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* 414: 271–276
- Hochstrasser M (2009) Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature* 458: 422–429

- Holm M, Ma LG, Qu LJ, Deng XW (2002) Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in *Arabidopsis*. *Genes Dev* **16**: 1247–1259
- Hori T, Osaka F, Chiba T, Miyamoto C, Okabayashi K, Shimbara N, Kato S, Tanaka K (1999) Covalent modification of all members of human cullin family proteins by NEDD8. *Oncogene* **18**: 6829–6834
- Hotton SK, Callis J (2008) Regulation of cullin RING ligases. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 467–489
- Hotton SK, Eigenheer RA, Castro MF, Bostick M, Callis J (2011) AXR1-ECR1 and AXL1-ECR1 heterodimeric RUB-activating enzymes diverge in function in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **75**: 515–526
- Jain M, Nijhawan A, Arora R, Agarwal P, Ray S, Sharma P, Kapoor S, Tyagi AK, Khurana JP (2007) F-box proteins in rice: genome-wide analysis, classification, temporal and spatial gene expression during panicle and seed development, and regulation by light and abiotic stress. *Plant Physiol* **143**: 1467–1483
- Kurz T, Ozlü N, Rudolf F, O'Rourke SM, Luke B, Hofmann K, Hyman AA, Bowerman B, Peter M (2005) The conserved protein DCN-1/Dcn1p is required for cullin neddylation in *C. elegans* and *S. cerevisiae*. *Nature* **435**: 1257–1261
- Lammer D, Mathias N, Laplaza JM, Jiang W, Liu Y, Callis J, Goebel M, Estelle M (1998) Modification of yeast Cdc53p by the ubiquitin-related protein rub1p affects function of the SCFCdc4 complex. *Genes Dev* **12**: 914–926
- Lee MR, Lee D, Shin SK, Kim YH, Choi CY (2008) Inhibition of APP intracellular domain (AICD) transcriptional activity via covalent conjugation with Nedd8. *Biochem Biophys Res Commun* **366**: 976–981
- Leyser HM, Lincoln CA, Timpte C, Lammer D, Turner J, Estelle M (1993) *Arabidopsis* auxin-resistance gene *AXR1* encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature* **364**: 161–164
- Lincoln C, Britton JH, Estelle M (1990) Growth and development of the *axr1* mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2**: 1071–1080
- Lokerse AS, Weijers D (2009) Auxin enters the matrix: assembly of response machineries for specific outputs. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 520–526
- Lyapina S, Cope G, Shevchenko A, Serino G, Tsuge T, Zhou C, Wolf DA, Wei N, Shevchenko A, Deshaies RJ (2001) Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome. *Science* **292**: 1382–1385
- Milhollen MA, Traore T, Adams-Duffy J, Thomas MP, Berger AJ, Dang L, Dick LR, Garnsey JJ, Koenig E, Langston SP, et al (2010) MLN4924, a NEDD8-activating enzyme inhibitor, is active in diffuse large B-cell lymphoma models: rationale for treatment of NF-kappaB-dependent lymphoma. *Blood* **116**: 1515–1523
- Norman JA, Shiekhatter R (2006) Analysis of Nedd8-associated polypeptides: a model for deciphering the pathway for ubiquitin-like modifications. *Biochemistry* **45**: 3014–3019
- Osterlund MT, Hardtke CS, Wei N, Deng XW (2000) Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature* **405**: 462–466
- Oved S, Mosesson Y, Zwang Y, Santonico E, Shtiegman K, Marmor MD, Kochupurakkal BS, Katz M, Lavi S, Cesareni G, et al (2006) Conjugation to Nedd8 instigates ubiquitylation and down-regulation of activated receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* **281**: 21640–21651
- Pozo JC, Timpte C, Tan S, Callis J, Estelle M (1998) The ubiquitin-related protein RUB1 and auxin response in *Arabidopsis*. *Science* **280**: 1760–1763
- Rabut G, Peter M (2008) Function and regulation of protein neddylation: 'protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep* **9**: 969–976
- Ravid T, Hochstrasser M (2008) Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 679–690
- Reed JW (2001) Roles and activities of Aux/IAA proteins in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* **6**: 420–425
- Ren H, Santner A, del Pozo JC, Murray JA, Estelle M (2008) Degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor KRP1 is regulated by two different ubiquitin E3 ligases. *Plant J* **53**: 705–716
- Richter R, Behringer C, Müller IK, Schwechheimer C (2010) The GATA-type transcription factors GNC and GNL/CGA1 repress gibberellin signaling downstream from DELLA proteins and PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS. *Genes Dev* **24**: 2093–2104
- Russell RC, Ohh M (2008) NEDD8 acts as a 'molecular switch' defining the functional selectivity of VHL. *EMBO Rep* **9**: 486–491
- Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, Murfett J, Guilfoyle T, Malamy J, Benfey P, Leyser O, Bechtold N, Weisbeek P, et al (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* **99**: 463–472
- Schwechheimer C, Isono E (2010) The COP9 signalosome and its role in plant development. *Eur J Cell Biol* **89**: 157–162
- Schwechheimer C, Serino G, Callis J, Crosby WL, Lyapina S, Deshaies RJ, Gray WM, Estelle M, Deng XW (2001) Interactions of the COP9 signalosome with the E3 ubiquitin ligase SCFTIR1 in mediating auxin response. *Science* **292**: 1379–1382
- Schwechheimer C, Willige BC, Zourelidou M, Dohmann EM (2009) Examining protein stability and its relevance for plant growth and development. *Methods Mol Biol* **479**: 147–171
- Soucy TA, Smith PG, Milhollen MA, Berger AJ, Gavin JM, Adhikari S, Brownell JE, Burke KE, Cardin DP, Critchley S, et al (2009) An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer. *Nature* **458**: 732–736
- Stickle NH, Chung J, Klcio JM, Hill RP, Kaelin WG Jr, Ohh M (2004) pVHL modification by NEDD8 is required for fibronectin matrix assembly and suppression of tumor development. *Mol Cell Biol* **24**: 3251–3261
- Swords RT, Kelly KR, Smith PG, Garnsey JJ, Mahalingam D, Medina E, Oberheu K, Padmanabhan S, O'Dwyer M, Nawrocki ST, et al (2010) Inhibition of NEDD8-activating enzyme: a novel approach for the treatment of acute myeloid leukemia. *Blood* **115**: 3796–3800
- Weijers D, Benkova E, Jäger KE, Schlereth A, Hamann T, Kientz M, Wilmoth JC, Reed JW, Jürgens G (2005) Developmental specificity of auxin response by pairs of ARF and Aux/IAA transcriptional regulators. *EMBO J* **24**: 1874–1885
- Willige BC, Ghosh S, Nill C, Zourelidou M, Dohmann EM, Maier A, Schwechheimer C (2007) The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 1209–1220
- Woodward AW, Ratzel SE, Woodward EE, Shamoo Y, Bartel B (2007) Mutation of E1-CONJUGATING ENZYME-RELATED1 decreases RELATED TO UBIQUITIN conjugation and alters auxin response and development. *Plant Physiol* **144**: 976–987
- Wu K, Yamoah K, Dolios G, Gan-Erdene T, Tan P, Chen A, Lee CG, Wei N, Wilkinson KD, Wang R, et al (2003) DEN1 is a dual function protease capable of processing the C terminus of Nedd8 and deconjugating hyper-neddylated CUL1. *J Biol Chem* **278**: 28882–28891
- Xirodimas DP (2008) Novel substrates and functions for the ubiquitin-like molecule NEDD8. *Biochem Soc Trans* **36**: 802–806
- Xirodimas DP, Saville MK, Bourbon JC, Hay RT, Lane DP (2004) Mdm2-mediated NEDD8 conjugation of p53 inhibits its transcriptional activity. *Cell* **118**: 83–97
- Xirodimas DP, Sundqvist A, Nakamura A, Shen L, Botting C, Hay RT (2008) Ribosomal proteins are targets for the NEDD8 pathway. *EMBO Rep* **9**: 280–286
- Yanagawa Y, Sullivan JA, Komatsu S, Gusmaroli G, Suzuki G, Yin J, Ishibashi T, Saijo Y, Rubio V, Kimura S, et al (2004) *Arabidopsis* COP10 forms a complex with DDB1 and DET1 in vivo and enhances the activity of ubiquitin conjugating enzymes. *Genes Dev* **18**: 2172–2181

# ML3 Is a NEDD8- and Ubiquitin-Modified Protein<sup>1</sup><sup>[C]</sup><sup>[W]</sup><sup>[OPEN]</sup>

Jana P. Hakenjos, Sarosh Bejai, Quirin Ranftl, Carina Behringer, A. Corina Vlot, Birgit Absmanner, Ulrich Hammes, Stephanie Heinzlmeir, Bernhard Kuster, and Claus Schwechheimer\*

Department of Plant Systems Biology (J.P.H., Q.R., C.B., C.S.) and Department of Proteomics and Bioanalytics (S.H., B.K.), Technische Universität München, 85354 Freising, Germany; Department of Plant Biology and Forest Genetics, Swedish University of Agricultural Sciences, 75007 Uppsala, Sweden (S.B.); Institute of Biochemical Plant Pathology, Helmholtz Zentrum München, 85764 Neuherberg, Germany (A.C.V.); and Department of Cell Biology and Plant Biochemistry, University of Regensburg, 93053 Regensburg, Germany (B.A., U.H.)

NEDD8 (NEURAL PRECURSOR CELL-EXPRESSED, DEVELOPMENTALLY DOWN-REGULATED PROTEIN8) is an evolutionarily conserved 8-kD protein that is closely related to ubiquitin and that can be conjugated like ubiquitin to specific lysine residues of target proteins in eukaryotes. In contrast to ubiquitin, for which a broad range of substrate proteins are known, only a very limited number of NEDD8 target proteins have been identified to date. Best understood, and also evolutionarily conserved, is the NEDD8 modification (neddylation) of cullins, core subunits of the cullin-RING-type E3 ubiquitin ligases that promote the polyubiquitylation of degradation targets in eukaryotes. Here, we show that Myeloid differentiation factor-2-related lipid-recognition domain protein ML3 is an NEDD8- as well as ubiquitin-modified protein in *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) and examine the functional role of ML3 in the plant cell. Our analysis indicates that ML3 resides in the vacuole as well as in endoplasmic reticulum (ER) bodies. ER bodies are Brassicales-specific ER-derived organelles and, similar to other ER body proteins, ML3 orthologs can only be identified in this order of flowering plants. *ML3* gene expression is promoted by wounding as well as by the phytohormone jasmonic acid and repressed by ethylene, signals that are known to induce and repress ER body formation, respectively. Furthermore, ML3 protein abundance is dependent on NAI1, a master regulator of ER body formation in *Arabidopsis*. The regulation of *ML3* expression and the localization of ML3 in ER bodies and the vacuole is in agreement with a demonstrated importance of ML3 in the defense to herbivore attack. Here, we extend the spectrum of ML3 biological functions by demonstrating a role in the response to microbial pathogens.

The 8-kD protein ubiquitin is a well-studied modifier of eukaryotic proteins that is best known for targeting proteins conjugated to Lys-48-linked ubiquitin chains for degradation by the 26S proteasome (Komander and Rape, 2012). In addition, Lys-63-linked ubiquitin chains are required for targeting membrane proteins for degradation to the vacuole or the lysosome, and mono-ubiquitylation as well as polyubiquitylation events have been shown to control the activity, fate, or cellular behavior of proteins (Komander and Rape, 2012). E3 ubiquitin ligases recognize the ubiquitylation targets and promote ubiquitylation, while deubiquitylating enzymes are able to hydrolyze ubiquitin linkages (Hotton and Callis, 2008; Deshaies and Joazeiro, 2009; Komander et al., 2009). In addition to ubiquitin, several other ubiquitin-

related proteins regulate cellular functions in eukaryotic cells, such as SMALL UBIQUITIN-LIKE MODIFIER (SUMO) or RELATED TO UBIQUITIN/NEURAL PRECURSOR CELL-EXPRESSED, DEVELOPMENTALLY DOWN-REGULATED (RUB/NEDD8 [herein NEDD8]; Rabut and Peter, 2008; Praefcke et al., 2012; Vierstra, 2012).

The fact that NEDD8 is the closest homolog of ubiquitin suggests that NEDD8 may have a similarly broad range of targets and activities as ubiquitin. However, only a very limited number of NEDD8-modified proteins has been identified to date (Rabut and Peter, 2008; Xirodimas, 2008; Ma et al., 2013). Best understood is the role of neddylation in regulating the cullin subunits of cullin-RING-type E3 ubiquitin ligases (Duda et al., 2008). Eukaryotic cells contain different types of cullin-RING ligases of varying architecture and varying substrate specificity (Duda et al., 2011; Harper and Tan, 2012). Cullin neddylation promotes E3 ligase complex activity as well as ubiquitylation by controlling E3 assembly and by inducing conformational rearrangements that promote substrate ubiquitylation (Duda et al., 2008). Additionally, a small number of animal proteins have been described as NEDD8 targets in recent years, but the biological significance of their NEDD8 modification is only vaguely understood (Xirodimas et al., 2004, 2008; Rabut and Peter, 2008; Mahata et al., 2012; Noh et al., 2012; Ma et al., 2013).

ML proteins are defined as proteins with an MD-2-related lipid-recognition domain (Inohara and Nuñez,

<sup>1</sup> This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant nos. SCHW 751/9 and SCHW 751/11 to C.S. through SPP 1365 and to A.C.V. and U.H. through SFB924).

\* Address correspondence to claus.schwechheimer@wzw.tum.de.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors ([www.plantphysiol.org](http://www.plantphysiol.org)) is: Claus Schwechheimer ([claus.schwechheimer@wzw.tum.de](mailto:claus.schwechheimer@wzw.tum.de)).

<sup>[C]</sup> Some figures in this article are displayed in color online but in black and white in the print edition.

<sup>[W]</sup> The online version of this article contains Web-only data.

<sup>[OPEN]</sup> Articles can be viewed online without a subscription.

[www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.113.221341](http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.113.221341)

2002). MD-2 is an extracellular binding partner of Toll-LIKE RECEPTOR4 (TLR4), and together, the two proteins mediate the response to bacterial lipopolysaccharides that are recognized as pathogen-associated molecular patterns that induce innate immunity responses in mammals (Viriyakosol et al., 2001; Kim et al., 2007; Park et al., 2009). The crystal structure of MD-2 has been resolved in its complex with TLR4 (Park et al., 2009). MD-2 consists of two antiparallel  $\beta$ -sheets that form a hydrophilic pocket for binding of the lipopolysaccharide ligand (Park et al., 2009). The protein Niemann-Pick-type C2 (NPC2) is another well-characterized ML protein. NPC2 binds cholesterol in the mammalian lysosome to initiate the transport of cholesterol across the lysosomal membrane via the activity of the transporter NPC1 (Xu et al., 2007). Loss of NPC1 and NPC2 leads to NPC disease, a rare lipid storage disorder where intracellular lipid transport is disrupted, leading to the accumulation of lipid products in late endosomes and lysosomes. The biochemical and cell biological functions of plant ML proteins are completely unresolved.

The endoplasmic reticulum (ER) exhibits a variety of shapes and movements in eukaryotic cells. The ER is composed of an extensive network of cisternae and tubules and can give rise to a range of ER-derived compartments that vary in size from 0.1 to 10  $\mu\text{m}$ . ER bodies are such ER-derived compartments that were originally observed by electron microscopy in radish (*Raphanus sativus*) root cells as organelles of unknown origin (Bonnett and Newcomb, 1965). In Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), these plant-specific spindle-shaped organelles were first recognized as ER-derived structures based on their ability to retain the ER marker protein green fluorescent protein (GFP)-HDEL, which carries an ER-targeting signal as well as an ER-retention signal (Haseloff et al., 1997; Ridge et al., 1999; Hayashi et al., 2001). In Arabidopsis, ER bodies can be found in seedlings and mature roots, and their formation can be induced in mature rosette leaves by methyl jasmonate (MeJA), a phytohormone induced in response to herbivore attack as part of the internal defense response and for signaling to neighboring plants. Mutant screens for ER body-deficient mutants have so far led to the identification of two proteins required for ER body formation, NAI1 and NAI2 (Matsushima et al., 2004; Yamada et al., 2008, 2009). NAI1 is a basic helix-loop-helix transcription factor essential for the formation of ER bodies in seedlings and roots that regulates the expression of the ER body proteins PYK10/BGLU23 and NAI2 (Matsushima et al., 2004). NAI2 is an ER body protein of unknown function with 10 glutamic acid-phenylalanine-glutamic acid repeats that has a signal peptide but, interestingly, no ER retention signal (Yamada et al., 2008, 2009). The purification of ER bodies from roots followed by mass spectrometric analysis resulted in the identification of the  $\beta$ -glucosidases PYK10/BGLU23 and BGLU21 as two major components of ER bodies (Matsushima et al., 2003; Nagano et al., 2008). The abundance of PYK10/BGLU23 correlates in different stages of plant growth and development with

the absence, induction, and presence of ER bodies, and mutations in PYK10/BGLU23 and BGLU21 affect ER body size positively (Nagano et al., 2009). PYK10/BGLU23, therefore, is thought to be a major and possibly specific component of ER bodies.

At present, ER bodies have only been observed in species of the order Brassicales, which includes Arabidopsis and *Brassica rapa*. The observation that ER bodies are induced by jasmonate has given rise to the hypothesis that ER bodies may participate in plant-pathogen responses (Matsushima et al., 2002, 2004; Hara-Nishimura and Matsushima, 2003). ER bodies may form in response to pathogen attack to release hydrolytic enzymes to fend off the herbivore after wounding (e.g. by hydrolyzing inactive secondary metabolites such as scopolin into active scopoletin; Ahn et al., 2010). In support of this hypothesis, a deletion in the *NAI1* promoter was associated with increased susceptibility to the mutualistic fungus *Piriformospora parasitica* (Sherameti et al., 2008). Jacalin-related lectins and GDSL lipase-like proteins may contribute to such defense responses by forming complexes with PYK10/BGLU23. Also, ML3 has recently been linked to defense signaling in a study that showed that *ml3* mutants are hypersensitive to herbivore attack (Fridborg et al., 2013).

In this study, we characterize the ML domain protein ML3. We and others have previously identified ML3 as a putatively NEDD8-modified protein (Hakenjos et al., 2011; Hotton et al., 2012). Here, we show that ML3 is indeed a NEDD8- as well as a ubiquitin-conjugated protein in planta. ML3 is also conjugated to ubiquitin, but it can also noncovalently interact with both ubiquitin family proteins. *ML3* expression is induced after wounding and herbivore attack as well as by treatment with the hormone MeJA. ML3 localizes to the vacuole and to ER bodies, and *ml3* mutants are defective in their response not only to herbivores but also to microbial pathogens.

## RESULTS

### ML3 Is a Novel NEDD8- and Ubiquitin-Modified Protein

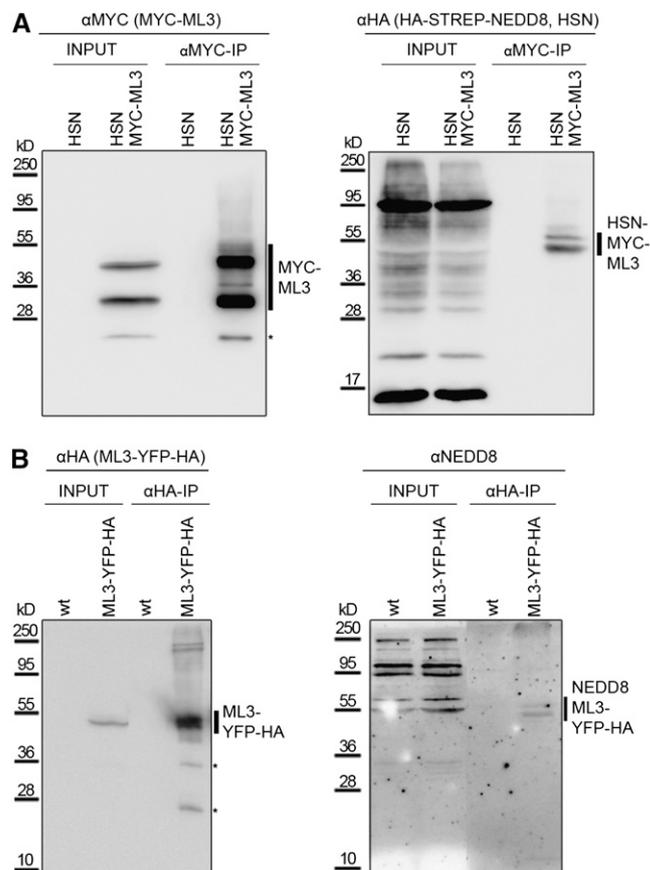
We have previously used transgenic lines that express hemagglutinin-STREP-tagged NEDD8 (HSN) under the control of a dexamethasone-inducible gene expression system to isolate NEDD8-modified proteins from Arabidopsis (Aoyama and Chua, 1997; Hakenjos et al., 2011). Using the STREP affinity tag, we were able to purify a number of proteins as putative NEDD8 conjugates from total protein extracts prepared from an HSN line (Hakenjos et al., 2011). However, our experimental strategy suffered from the weakness that the choice of the purification tag only allowed purifying HSN conjugates under native conditions, so that we may have recovered proteins that are themselves not NEDD8 modified but interact with such conjugates. Therefore, we set out to examine a subset of these putative NEDD8 conjugates more critically with regard to their

NEDD8 modification. In this context, we also generated MYC-ML3 lines for the expression of a MYC-tagged variant of the putative NEDD8 conjugate ML3 in the HSN transgenic background. Following immunoprecipitation of the MYC-ML3 fusion protein (calculated mass of 28.3 kD), we could detect the protein with an anti-MYC antibody in two prominent forms of approximately 32 and 44 kD. Detection of HSN conjugates with an anti-hemagglutinin (HA) antibody then revealed the presence of at least two additional HSN-conjugated forms of MYC-ML3 of approximately 55 kD, suggesting that a minor fraction of MYC-ML3 is indeed NEDD8 modified (Fig. 1A). Since our further analysis of the protein sequence revealed that ML3 carries an N-terminal signal peptide that should be proteolytically cleaved during protein transport, we also generated a construct for the expression of a C-terminally tagged ML3, ML3-YFP-HA (where YFP stands for yellow fluorescent protein; calculated mass of 51 kD). Following immunoprecipitation of ML3-YFP-HA, we could again confirm that ML3 is NEDD8 modified, because a fraction of immunoprecipitated ML3-YFP-HA was also recognized by an antibody directed against the endogenous NEDD8 protein, which detected a higher mass form of ML3-YFP-HA that could be explained by the conjugation of the 8-kD NEDD8 (Fig. 1B). We thus concluded that ML3 is indeed a NEDD8-modified protein.

Following immunoprecipitation and mass spectrometry (MS), we subsequently identified Lys-137 as at least one Lys residue of immunoprecipitated ML3-YFP-HA that carried the di-Gly footprint that is retained on NEDD8- and ubiquitin-modified proteins after trypsin digestion (Supplemental Fig. S1). We then mutagenized Lys-137 and subsequently all other Lys residues of ML3 to Arg with the goal of obtaining a nonneddylatable ML3 variant. However, the NEDD8 modification of ML3 was detected in each of these ML3 mutant variants, indicating that NEDD8 may be attached to multiple or to variant Lys residues in the wild type or the mutated ML3 proteins (Supplemental Fig. S2). The conclusion that ML3 may be neddylated at multiple residues is also supported by our observation that frequently more than one neddylated form of ML3 was apparent in immunoblots following the immunoprecipitation of ML3 and the detection of HSN or endogenous NEDD8 (Fig. 1). In summary, these data suggest that ML3 may be modified by multiple NEDD8 molecules.

### ML3 May Be a NEDD8- and Ubiquitin-Binding Protein

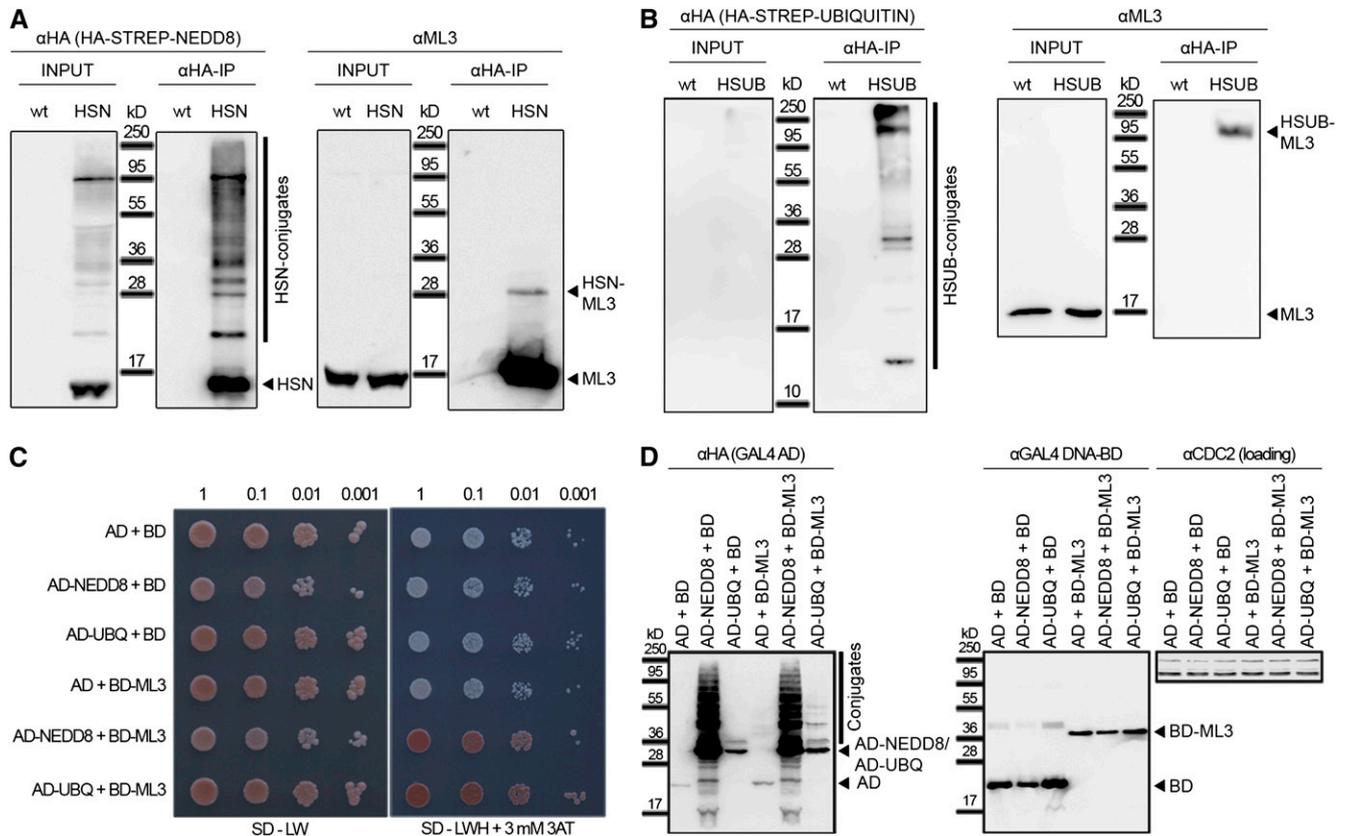
To be able to detect endogenous ML3 protein, we raised an anti-ML3 peptide antibody that readily detected the 18-kD (calculated) ML3 protein in total protein extracts from wild-type plants. Since we detected HSN-conjugated ML3 following HSN immunoprecipitation, we concluded that also endogenous ML3 is NEDD8 modified (Fig. 2A). We then used the neddylation inhibitor MLN4924 to test whether the modification of



**Figure 1.** ML3 is a NEDD8-modified protein. A, Results of an immunoprecipitation of MYC-ML3 from 7-d-old Arabidopsis seedlings with anti-MYC agarose. Left panel, immunoblot with anti-MYC of the input control (45  $\mu$ g of total protein) and the immunoprecipitate (IP) of MYC-ML3; right panel, immunoblot with anti-HA of the input and the anti-MYC immunoprecipitate. MYC-ML3 is detected in the form of two abundant variants of approximately 32 and 44 kD. B, Results of an immunoprecipitation of ML3-YFP-HA from 7-d-old Arabidopsis seedlings. Left panel, immunoblot with anti-HA of the input control (45  $\mu$ g of total protein) and immunoprecipitate of ML3-YFP-HA; right panel, immunoblot with anti-NEDD8 of the input and the anti-HA immunoprecipitate. wt, Wild type. Asterisks indicate apparent degradation products.

ML3 was dependent on the activity of the NEDD8 E1 conjugation enzyme (Hakenjos et al., 2011). Indeed, ML3 neddylation was reduced following a pretreatment of the plants with MLN4924, suggesting that ML3 is NEDD8 modified by the established NEDD8 conjugation pathway (del Pozo et al., 1998, 2002; del Pozo and Estelle, 1999; Woodward et al., 2007; Supplemental Fig. S3).

Interestingly, when we immunoprecipitated NEDD8 using the tagged HSN fusion variant, we noted that anti-ML3 did not only detect ML3 as a neddylated HSN conjugate but also ML3 in its apparent unmodified form (Fig. 2A). Similar results were obtained following immunoprecipitations of HSN conjugates from the MYC-ML3 transgenic line (Supplemental Fig. S4). In these immunoprecipitations, we detected specifically the



**Figure 2.** ML3 is conjugated to and binds to NEDD8 and ubiquitin. A and B, Results of immunoprecipitations of HSN (A) or HSUB (B) from 7-d-old Arabidopsis seedlings with anti-HA agarose. Left panel, immunoblot with anti-HA of the input control (45  $\mu$ g of total protein) and immunoprecipitate (IP) of HSN or HSUB; right panel, immunoblot with anti-ML3 of the input (45  $\mu$ g of total protein) and the anti-HA immunoprecipitate. wt, Wild type. C, Result of a yeast two-hybrid interaction analysis with GAL4 DNA-binding domain (BD) and activation domain (AD) fusion constructs testing for the interaction of ML3 with NEDD8 and ubiquitin (UBQ). Yeast was grown on selection media lacking leucine and tryptophane (SD-LW) for growth control and on media additionally lacking histidine and 3-aminotriazole (SD-LWH + 3 mM 3AT) to check for interaction. D, Protein expression analysis of the various yeast strains shown in C. GAL4 AD fusions are detected with anti-HA; DB fusions are detected with anti-GAL4 DNA-BD; equal protein loading is controlled for with anti-CDC2. Note the presence of numerous AD-NEDD8 conjugates in the anti-HA immunoblot. [See online article for color version of this figure.]

32-kD variant of MYC-ML3 and not the 44-kD higher mass form (Supplemental Fig. S4), and we took this finding as an indirect indication that the 32-kD variant detected in MYC-ML3 lines represents the neddylatable form of MYC-ML3 (Fig. 1). The 44-kD form, in turn, may represent a posttranslationally modified form that cannot be neddylated and that could result from the protein's N-terminal signal peptide being blocked by the MYC tag.

We reasoned that the appearance of unconjugated ML3 may be the result of an enzymatic deconjugation of HSN-ML3 during the immunoprecipitation procedure. Alternatively, ML3 may bind to NEDD8 or to NEDD8 conjugates in a noncovalent manner. The latter view was supported by an EMBL-European Nucleotide Archive database entry for ML3 that described the protein as a yeast two-hybrid interactor of a ubiquitin pentamer (ABH03542) as well as by the fact that abundant amounts of ML3 were precipitated in the immunoprecipitation experiments that, in our view, could

not be explained by the small amounts of NEDD8-modified ML3 detected in immunoblots after HSN immunoprecipitations.

To test whether ML3 can be covalently linked to ubiquitin, we carried out immunoprecipitations from transgenic lines that express HSUB, a construct analogous to HSN for the inducible expression of an HA-STREP-tagged ubiquitin. Indeed, we could detect ML3 also in the form of a high-mass ubiquitin conjugate of approximately 150 kD in the HSUB immunoprecipitates (Fig. 2B). Thus, we concluded that ML3 is a NEDD8-conjugated as well as a ubiquitin-conjugated protein in vivo. While we detected small amounts of the apparently unmodified ML3 variant also in several HSUB-ML3 purifications (data not shown), this form of ML3 was absent in others. Therefore, we reasoned that the coprecipitation of the unmodified ML3 is the result of a deconjugation of ML3 from HSUB-ML3 (e.g. by deubiquitylating enzymes) that occurred during the immunoprecipitation of HSUB

conjugates. Similarly, ML3 may be deconjugated from HSN-ML3 in the respective immunoprecipitations of HSN.

To test whether NEDD8 and ubiquitin can interact with ML3 also in a noncovalent manner, we tested their interactions using the yeast two-hybrid system. Indeed, this interaction analysis revealed that ML3 readily interacts with both ubiquitin family proteins in the yeast system (Fig. 2C). Analysis of the expression of the fusion proteins in yeast confirmed that all proteins were expressed, but interestingly, also that the GAL4 activation domain fusion protein fused to NEDD8 (AD-NEDD8) was conjugated to a broad range of proteins in the yeast host (Fig. 2D). No such conjugates could be detected in the case of activation domain-ubiquitin (AD-UBQ), possibly reflecting the fact that such ubiquitin conjugates are directly targeted for proteasomal degradation.

### ML3 Belongs to the MD-2-Related Lipid-Recognition Domain Family of Proteins

ML3 is encoded by the Arabidopsis gene *AT5G23820*. ML3 has two closely related putative paralogs adjacent to the *ML3* locus on chromosome 5 of the Arabidopsis genome, namely ML5 (*AT5G23840*; 76% amino acid identity to ML3) and ML6 (*AT5G23830*; 73% identity; Fig. 3A). Additionally, these three ML domain proteins share sequence homology with a number of proteins from Arabidopsis and *B. rapa* and with other proteins from non-Brassicaceae species, such as the dicots tomato (*Solanum lycopersicum*), grapevine (*Vitis vinifera*), and soybean (*Glycine max*) and the monocots rice (*Oryza sativa*) and *Brachypodium distachyon* (Fig. 3; Supplemental Figs. S5 and S6). Although the genomes of both Arabidopsis and *B. rapa* encode three ML3-like proteins, namely Arabidopsis ML3, ML5, and ML6 and *B. rapa* Bra020976, Bra028884, and Bra011987, the three ML3 paralogs of each species are more closely related to each other than to the proteins from the respective other species, suggesting that they originated from independent duplication events (Fig. 3B; Supplemental Fig. S5).

Based on the current annotation of these proteins, the vast majority of ML3-related proteins from Arabidopsis and *B. rapa* contains an N-terminal signal peptide, which suggests that these proteins are directed to the ER and from there targeted to the vacuole or the secretory pathway (Fig. 3A; Petersen et al., 2011). The remaining part of these ML proteins has sequence homology with the lipid recognition domain of the mammalian ML domain proteins MD-2 and NPC2 (Supplemental Fig. S6; Viriyakosol et al., 2001; Inohara and Nuñez, 2002). However, the restricted homology within this domain does not allow drawing any conclusions on the binding specificity of any of the Arabidopsis proteins (Supplemental Fig. S6). Based on their homology to MD-2, the members of this protein family were previously classified as ML proteins; however, none of the plant ML domain proteins have been characterized at the biochemical, cell biological, or functional level as

yet (Inohara and Nuñez, 2002). We also noted with interest that proteins closely related to ML3 can only be found in Brassicales species, including Arabidopsis and *B. rapa*, or inversely that these proteins are seemingly absent from the genomes of non-Brassicales dicots, monocots, the moss *Physcomitrella patens*, and the lycophyte *Selaginella moellendorffii* (Fig. 3B; Supplemental Fig. S5).

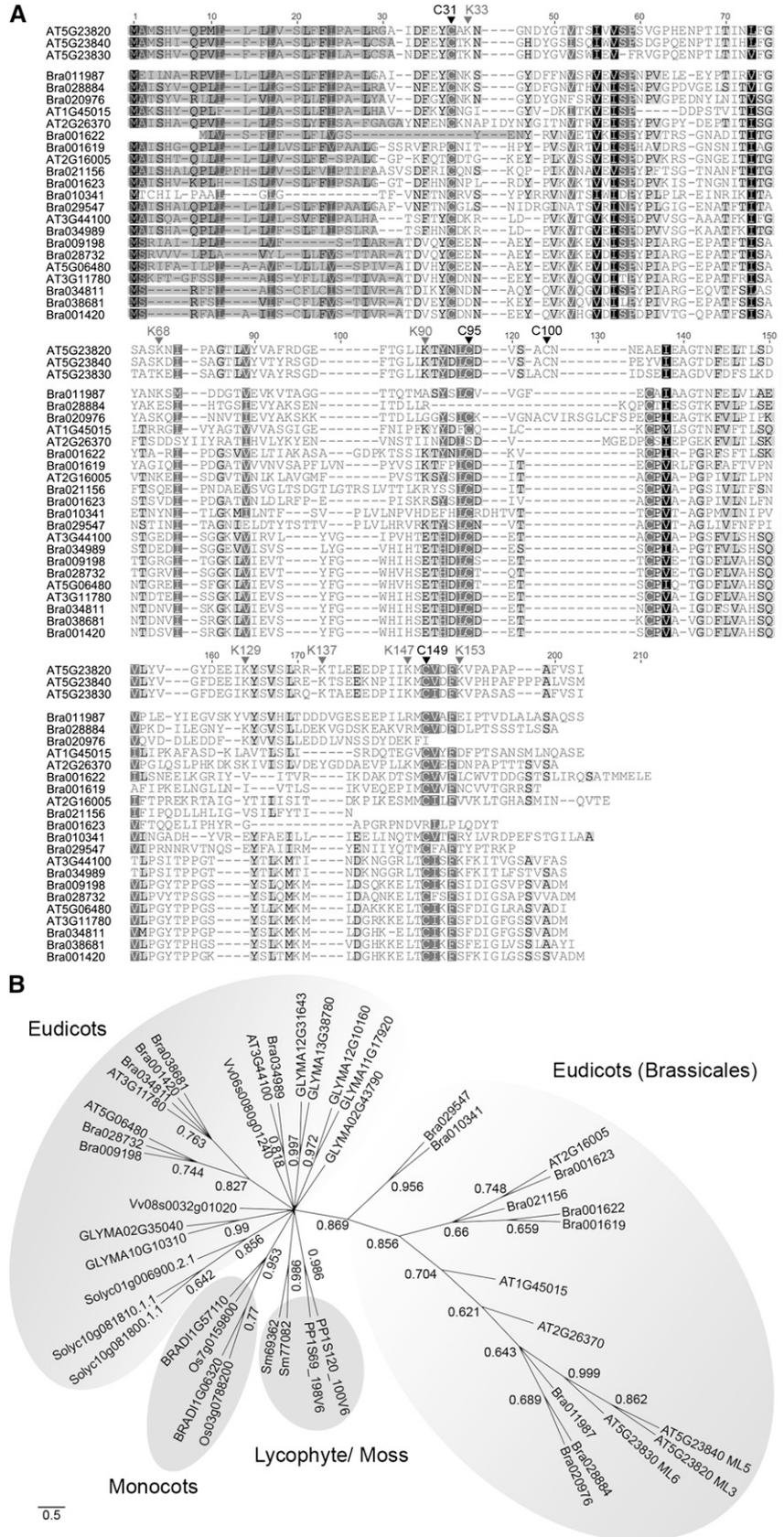
### Identification of *ml3* Mutants

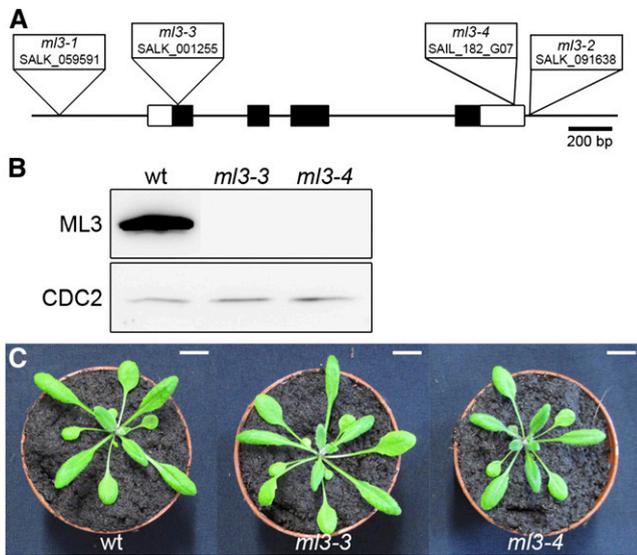
In order to understand the biological function of ML3, we examined two putative *ml3* alleles with transfer DNA (T-DNA) insertions in the *ML3* open reading frame and 3' untranslated region, *ml3-3* (SALK\_001255) and *ml3-4* (SAIL\_182\_G07; Fig. 4A). Our subsequent analysis of ML3 protein abundance in the *ml3-3* and *ml3-4* mutants showed that ML3 protein cannot be detected in *ml3-3* and *ml3-4* (Fig. 4B). While this work was in progress, two additional mutant alleles, *ml3-1* (SALK\_059591) and *ml3-2* (SALK\_091638), were described as part of another study of genes related to the defense to herbivores (Fridborg et al., 2013). While this study had associated semidwarfed growth with *ml3-1* and *ml3-2*, we could not detect such a phenotype in *ml3-3* and *ml3-4* when grown in continuous light growth conditions (Fig. 4C). For our further work, we considered the exon insertion allele *ml3-3* as the prototypical *ml3* mutant allele.

### ML3 Resides in the Vacuole and in ER Bodies

In order to understand the intracellular distribution of ML3, we generated transgenic lines that express ML3 as a fusion with the fluorescent protein mCherry under the control of a 2-kb *ML3* promoter fragment (*ML3p:ML3-mCherry*). Our analysis of transgenic lines expressing this protein revealed that the protein accumulates in the vacuole as well as in rod-shaped structures that we identified as ER bodies based on their size and shape. This was also supported by their partial colocalization with the marker Q4, which highlights the membranes of ER bodies as well as the cellular ER network, and by their exclusive presence in the seedling epidermis and the cotyledons (Fig. 5A). The ER body localization of ML3 was also verified in lines expressing ML3-YFP from the *ML3* promoter fragment (*ML3p:ML3-YFP*; Fig. 5B). In turn, *ML3p:ML3-YFP* lines did not allow us to visualize the vacuolar localization of ML3 (Fig. 5C), most likely due to the fact that GFP and the closely related YFP are degraded in the vacuole (Tamura et al., 2003). To confirm the vacuole and ER body localization for the endogenous ML3, we purified vacuoles and performed a subcellular fractionation based on previously established protocols (Matsushima et al., 2003; Robert et al., 2007). In these analyses, we identified endogenous ML3 in vacuolar preparations from 14-d-old seedlings where ML3 cofractionated with the marker vacuolar ATPase (Fig. 5D). To resolve ER bodies, we performed centrifugation of protein extracts at 1,000g from a transgenic line expressing

**Figure 3.** ML3 is a conserved plant protein that belongs to the family of MD2-related proteins. A, ClustalOmega alignment of ML3 (AT5G23820) and its homologous sequences retrieved from Arabidopsis (AT) and *B. rapa* (Bra). The N-terminal signaling peptide (shaded) was predicted with SignalP 4.0 (Petersen et al., 2011). The seven Lys (K) residues that are conserved in ML3, ML5, and ML6 but also in other MD-2 domain proteins are indicated. Cys residues required for the formation of two intramolecular Cys bridges that have been reported for MD-2 also appear to be conserved in the plant proteins. An exception are the Arabidopsis proteins ML3, ML5, and ML6 that lack one of these conserved Cys residues; Cys-100 (ML3) may functionally replace this missing Cys residue. B, Phylogenetic tree of the MD-2 domain proteins related to ML3 from Arabidopsis (AT) and *B. rapa* (Bra) as shown in A as well as from the moss *P. patens* (PP), soybean (GLYMA), rice (Os), *B. distachyon* (BRADI), grapevine (Vv), and tomato (Soly). Protein sequences were retrieved at www.ensembl.org. The phylogenetic tree was generated with the conserved MD-2 domain and is drawn to scale. The underlying alignment is shown in Supplemental Figure S5. Bootstrap values are indicated by each node. Bar = 0.2 amino acid substitutions per site.





**Figure 4.** Identification of *ml3* mutants. A, Schematic view of the *ML3* locus and positioning of the respective T-DNA insertion mutant alleles. Black boxes, exons; white boxes, untranslated regions; line, untranscribed upstream and downstream regions as well as introns. B, Immunoblot from protein extracts of 7-d-old wild-type (wt) and *ml3-3* as well as *ml3-4* mutant seedlings. C, Photograph of 1-month-old plants of the wild type and the alleles *ml3-3* and *ml3-4*. There are no apparent growth differences between the wild type and these *ml3* mutant alleles. Bars = 1 cm. [See online article for color version of this figure.]

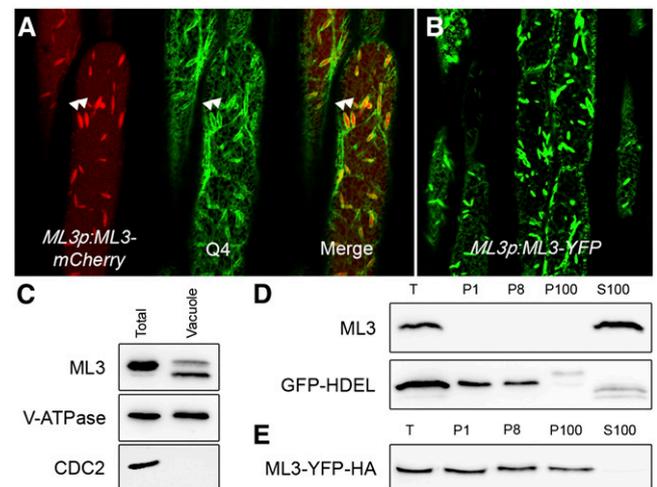
the ER marker GFP-HDEL. Interestingly, ML3 could not be retrieved in the 1,000g fraction that contains the ER bodies, suggesting that native ML3 may not reside in ER bodies and that the ER body localization of ML3-mCherry may be an artifact of the protein fusion (Fig. 5D). In turn, we detected ML3 in the soluble S100 fraction, in line with its localization to the vacuole. Identical fractionations of the YFP-tagged ML3-YFP-HA, however, confirmed the proposed ER body localization also for ML3-YFP-HA (Fig. 5E). In summary, we concluded that ML3 is a vacuolar protein that may potentially also reside in ER bodies.

The vacuolar localization of ML3 observed here is in agreement with the results of a previously published proteomics study that had identified ML3 in vacuoles of Arabidopsis plants (Carter et al., 2004). Interestingly, ML3 was also identified in another proteomics study that aimed at the identification of proteins that are secreted in response to treatments with the plant hormone salicylic acid (SA; Oh et al., 2005). Since ML3 had been shown to be involved in the plant's defense to herbivore attack, which induces SA responses (Oh et al., 2005; Bejai et al., 2012; Fridborg et al., 2013), we reasoned that ML3 may relocate to the extracellular space in response to activation of the SA pathway. While we noticed indeed a presence of ML3-mCherry after SA treatment (2 h), our subsequent analyses indicated that this is likely artifactual, because it was also found with the unrelated vacuolar lumen marker sp-RFP-AFVY (Hunter et al., 2007) and because ML3-mCherry secretion

was the apparent result of pH changes and did not occur in buffered solutions or in the presence of mannitol (Supplemental Fig. S7).

### *ML3* Is Coexpressed with ER Body Genes and in Response to NAI1

To gain further insight into the function of ML3, we searched for genes that are coexpressed with *ML3*. Through the analysis of all available microarray data sets deposited in Genevestigator, we identified a number of coexpressed genes and noticed with interest that eight genes among the first 20 coregulated genes had a demonstrated or proposed function in ER body biology or formation (Table I). This set of coregulated genes included *NAI1*, a basic helix-loop-helix transcription factor essential for ER body formation, as well as proposed *NAI1* target genes such as *NAI2* and *PYK10* (Matsushima et al., 2004). Since *ML3* had also been found to be differentially expressed in a comparison of *nai1* mutants with the wild type, we hypothesized that *NAI1* may regulate *ML3* gene expression. This assumption found support in our observation that *ML3* expression was strongly reduced in the *nai1* mutant *nai1-3* (GK-136G06-012754; Fig. 6A). Since *nai1* mutants are defective in the formation of ER bodies and since we had identified ML3



**Figure 5.** ML3 is a vacuolar and ER body-localized protein. A, Confocal microscopy images of hypocotyl epidermal cells from 5-d-old seedlings expressing ML3-mCherry (left panel) from the *ML3p* and the ER and ER body membrane marker Q4 (middle panel). The merged image is shown in the right panel. The double arrowheads point at ER bodies. B, Confocal image of the expression of ML3p:ML3-YFP in the epidermis of a 5-d-old Arabidopsis seedling. C, Immunoblots of total protein extracts and a vacuole preparation from 14-d-old Arabidopsis wild-type seedlings. D and E, Immunoblots of a total protein extract and pellet fractions obtained after differential centrifugation of a protein extract prepared from 7-d-old GFP-HDEL (D) and ML3-YFP-HA (E) transgenic seedlings after centrifugation at 1,000g (P1), 8,000g (P8), or 100,000g (P100). S100, Soluble supernatant after centrifugation at 100,000g; T, total protein extract.

as a putative ER body protein, we questioned whether the apparent absence of ML3 protein in the *nai1* mutant was the consequence of the absence of NAI1 as its transcriptional regulator or the indirect consequence of the absence of ER bodies in this mutant. To address this question, we examined ML3 protein abundance also in *nai2-2* (SALK\_005896) and *nai2-3* (SALK\_043149) mutants. NAI2 is a protein of unknown function in ER bodies that is essential for ER body formation but does not have an apparent function related to transcriptional regulation (Yamada et al., 2008). Importantly, ML3 protein was detectable in *nai2* but, as mentioned above, absent in *nai1*, suggesting that the absence of ML3 in *nai1* is the result of the absence of the transcriptional regulation by NAI1 rather than the indirect consequence of the absence of ER bodies (Fig. 6C). Inversely, we found no evidence that the absence of ML3 in *ml3-3* has an influence on the formation of ER bodies (Supplemental Fig. S8).

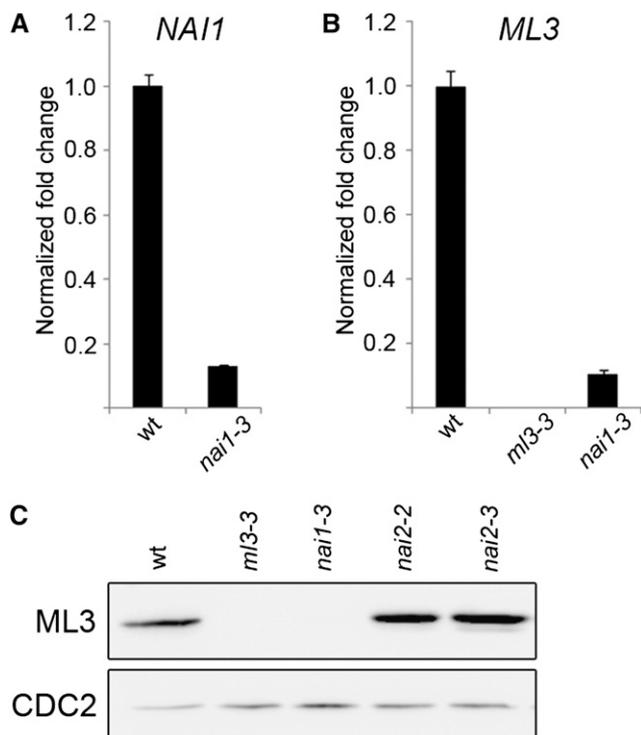
NAI1 is essential for ER body formation, which is promoted by the plant hormone jasmonic acid (JA; Matsushima et al., 2004). It has previously been established that *NAI1* transcription is induced by MeJA and reduced in response to ethylene (Matsushima et al., 2004). We hypothesized that *ML3* expression should follow this pattern of transcriptional regulation of *NAI1* if it was a direct NAI1 transcription target. Indeed, we found that the abundance of *ML3* and *NAI1* as well as the ER body-resident *PYK10* gene is induced by MeJA treatments and suppressed by concomitant treatments with

the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, which is converted into the gaseous ethylene hormone when taken up by the plant (Fig. 7A). This finding thus supported the notion that *ML3* is a direct NAI1 transcription target.

MeJA is produced in plants in response to wounding by herbivore pathogens. The knowledge about the regulation of NAI1 and ER body formation by MeJA has given rise to the concept that ER bodies may play a role in the response to pathogens (Yamada et al., 2011). Interestingly, we found *ML3* expression in the *ML3p:ML3-mCherry* lines to be restricted to the epidermis, an observation that could be considered in support of the proposed function in biotic and abiotic interactions with the environment (Fig. 7B). To assess the possibility of a putative regulation of *ML3* expression by wounding, we generated transgenic lines that express the reporter *GUS* under the control of a 2-kb *ML3* promoter fragment. Following the wounding of leaves of transgenic lines expressing this *ML3p:GUS* construct, we observed indeed increased staining at the sites of wounding as well as systemic spreading of the signal over the entire blade of the wounded leaf (Fig. 7C). Since *ML3* had previously been analyzed in the context of herbivore defense, we also challenged *ML3p:GUS* lines with second instar larvae of the herbivore *Spodoptera littoralis* and found clear evidence for *ML3* induction at the sites of wounding after insect feeding (Fig. 7D). In summary, these findings support that notion that *ML3* is a transcription target downstream from NAI1

**Table 1.** List of genes identified by Genevestigator as being coexpressed with *ML3*

Arabidopsis Genome Initiative Identifier	Score	Gene Name	Reference
AT5G23820	1.000	ML3	Nagano et al. (2008)
AT3G16410, AT3G16390, AT3G16400	0.748	NITRILE-SPECIFIER PROTEIN4, NITRILE-SPECIFIER PROTEIN3, and NITRILE-SPECIFIER PROTEIN1	Kuchernig et al. (2012)
AT3G16430, AT3G16420	0.737	JACALIN-RELATED LECTIN31 and JACALIN-RELATED LECTIN30	Nagano et al. (2008)
AT1G54010, AT1G54000	0.701	GDSL LIPASE-LIKE PROTEIN22	Nagano et al. (2005) Matsushima et al. (2004)
AT3G09260	0.694	PYK10	Ogasawara et al. (2009) Matsushima et al. (2004) Matsushima et al. (2003)
AT2G39310	0.660	JACALIN-RELATED LECTIN22	Nagano et al. (2008)
AT3G15950	0.655	NAI2	Nagano et al. (2008)
AT1G31710	0.653	Copper amine oxidase family protein	
AT3G16460	0.653	JACALIN-RELATED LECTIN34	
AT2G22170	0.647	PLAT DOMAIN PROTEIN2	
AT2G22770	0.640	NAI1	Matsushima et al. (2004)
AT1G76790	0.639	IGOMT5	Pfalz et al. (2011)
AT3G16450	0.635	JACALIN-RELATED LECTIN33	Nagano et al. (2008)
AT5G15230	0.634	GAST1 PROTEIN HOMOLOG4	
AT3G20370	0.621	TRAF-like family protein	
AT5G44020	0.607	HAD superfamily, subfamily IIIB acid phosphatase	
AT4G27860	0.599	MEMBRANE OF ER BODY1	Yamada et al. (2013)
AT3G54400	0.597	Eukaryotic aspartyl protease family protein	
AT4G23670	0.596	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein	
AT3G63200	0.596	PATATIN-LIKE PROTEIN9	



**Figure 6.** *ML3* expression is promoted by the ER body regulator *NAI1*. A and B, Results of qRT-PCR analyses testing for *NAI1* (A) and *ML3* (B) transcript abundance in 7-d-old wild-type (wt) and *nai1-3* or *ml3-3* mutant seedlings. C, Immunoblot with anti-*ML3* testing for the abundance of *ML3* in total protein extracts (45  $\mu$ g) prepared from 7-d-old wild-type seedlings as well as *nai1* and *nai2* mutant seedlings. Anti-*CDC2* served as a loading control for this experiment.

that is induced in response to wounding and herbivore attack.

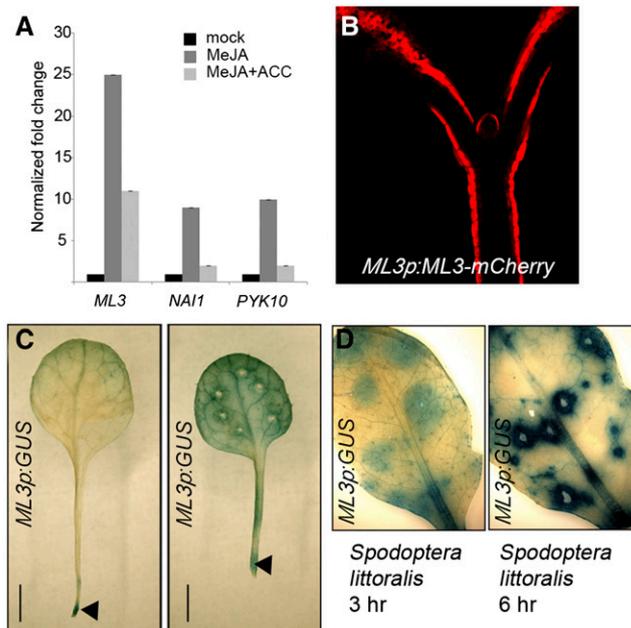
### A Role for *ML3* in the Pathogen Response

ER bodies have been proposed to function in pathogen responses (Yamada et al., 2011). For this reason, we were interested in examining the performance of *ml3* mutants after challenge with the fungal pathogen *Alternaria brassicicola* and the pathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* DC3000. *A. brassicicola* is a necrotrophic fungus that induces cell death upon infection. In comparison with the wild type, in which cell lesions were largely restricted to the inoculation spots, *ml3* mutants showed increased susceptibility, visible by the increased spreading of necrosis away from the site of infection at 5 d after infection (Fig. 8, A and B). Lesion expansion was associated with an increase of fungal DNA in *ml3* mutants and was partially similar to the responses of the camalexin-deficient mutant *pad3-1* that has previously been shown to possess enhanced susceptibility to *A. brassicicola* (Schuhegger et al., 2006). In the case of the *P. syringae* infection experiments, we detected reduced pathogen growth 6 d post infiltration in the *ml3* mutants when compared with the wild type (Fig. 8, C and D). In

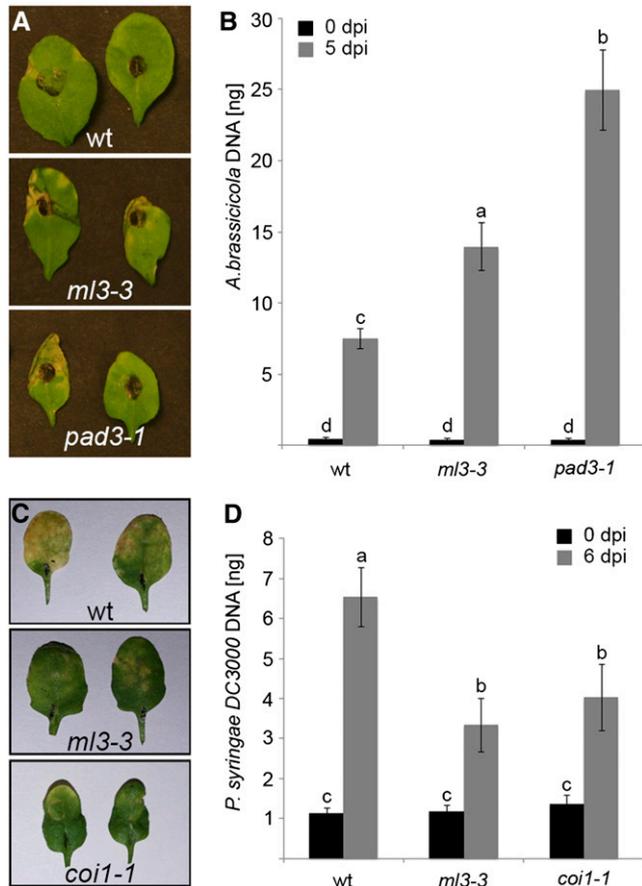
quantitative terms, this reduced growth was comparable to the reduced growth observed in the *coi1-1* mutant, an established mutant of the *P. syringae* pathogen response (Xie et al., 1998). Based on these observations, we concluded that *ML3* has a role in pathogen response in Arabidopsis.

### DISCUSSION

In this study, we identify *ML3* as a NEDD8- and ubiquitin-modified protein that can be detected in the vacuole and in ER bodies of epidermal cells in Arabidopsis seedlings. *ML3* is related to the mammalian proteins MD-2 and NPC2 (Fig. 3; Supplemental Fig. S6). MD-2 recognizes bacterial lipopolysaccharides together with TLR4 as part of the mammalian innate immune response (Viriyakosol et al., 2001; Kim et al., 2007). NPC2 binds to cholesterol in the mammalian lysosome and participates in intracellular cholesterol transport together with the transport protein NPC1 (Frolov et al., 2003; Xu et al., 2007). Thus, ML domain proteins bind to different ligands and localize to diverse cellular compartments. Many ML domain proteins can be



**Figure 7.** *ML3* expression is regulated by MeJA, ethylene, and wounding. A, Results of qRT-PCR analyses testing for transcript abundance of *ML3*, *NAI1*, and *PYK10* in 16-d-old plants treated for 12 h with a mock solution, MeJA (50  $\mu$ M), or MeJA and the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC; 50  $\mu$ M). B, Confocal image of an optical cross section of a 5-d-old seedling expressing *ML3p:ML3-mCherry*. C, Expression analysis of *ML3p:GUS* in the leaves of 16-d-old plants 48 h after wounding with wooden toothpicks (right panel); the left panel shows the mock control. *ML3p:GUS* expression is induced at the sites of toothpick wounding and in the petiole where the leaf was cut off (arrowheads). D, Expression analysis of *ML3p:GUS* in the leaves of 1-month-old plants after feeding by second instar larvae of *S. littoralis*.



**Figure 8.** *ml3* mutants are impaired in microbial pathogen responses. A, Representative photographs of leaves from 3-week-old Arabidopsis plants 5 d post infection with 10  $\mu$ L of a  $5 \times 10^5$  spores  $\text{mL}^{-1}$  *A. brassicicola* suspension. B, qRT-PCR analysis for the *A. brassicicola* genomic DNA from 100 mg of plant material as a quantitative measure for fungal growth on infected leaves. C, Representative photographs of leaves from 3-week-old Arabidopsis plants 6 d post infiltration with  $10^7$  colony-forming units  $\text{mL}^{-1}$  *P. syringae* DC3000 suspension. D, qRT-PCR analysis of *P. syringae* DC3000 genomic DNA from 100 mg of plant material as a quantitative measure for bacterial growth on infiltrated leaves. dpi, Days post infection; wt, wild type.

identified in the genomes of a variety of plants (Fig. 3), but none of these proteins have been studied at the biochemical or cell biological level to date. Although their overall homology to the better studied mammalian proteins allows suggesting that their biochemical function as binding proteins for a hydrophobic ligand may be conserved, the restricted degree of homology does not allow drawing conclusions on their putative binding partner or transport cargo (Supplemental Fig. S6). Interesting, and possibly also helpful for the identification of candidate ligands for ML3, is the fact that ML3 and its closest homologs appear to form a Brassicales-specific subfamily of ML domain proteins within the larger plant ML protein family (Fig. 3; Supplemental Fig. S5). Thus, also, the ligand of ML3 may be specific for the order Brassicales.

Our cell biological analyses revealed that ML3 is a vacuolar protein that we detected using mCherry fusions of the protein. The vacuolar localization of ML3 could also be confirmed for the endogenous protein in biochemical fractionation experiments. The localization of ML3 to the vacuole is in agreement with the presence of an N-terminal signal peptide that suggests targeting of ML3 to the ER, from where it may be targeted to the vacuole or the secretory pathway (Petersen et al., 2011). This signal peptide is also conserved in the vast majority of ML domain proteins from plants (Fig. 3). The vacuolar localization of ML3 is also in line with the finding that ML3 had previously been reported by others to be a component of the vacuolar proteome (Carter et al., 2004). Thus, similar to mammalian NPC2, ML3 resides in the lysosomal compartment of the cell, where it may retain a specific ligand or participate in a transport process.

We also observed ML3-mCherry and ML3-YFP in ER bodies that were recognizable based on their size and shape in epidermal cells of Arabidopsis seedlings (Fig. 5). Our attempts to confirm the ER body localization for the endogenous ML3 protein by biochemical methods were not successful. This inability to detect endogenous ML3 in ER body fractions using biochemical methods may reflect the fact that ER bodies are only present in epidermis cells and, additionally, represent only a minor fraction of the cellular proteome. Thus, the abundance of ML3 in ER bodies, particularly in comparison with the amount of vacuolar ML3, may be too small to be detected after fractionation on immunoblots with the ML3-specific antibody. For a number of reasons, we consider our observation of the ER body localization of the fluorescent protein-tagged ML3 variants biologically significant. First, *ML3* expression is strongly coregulated with a number of genes that have a known and, in part, demonstrated function in ER body biology, including *NAI1* and *NAI2*, two proteins required for ER body formation (Table I). *NAI1* has been proposed to regulate the expression of a number of ER body genes, and *ML3* was previously identified as one of the most strongly down-regulated genes in a gene expression analysis of *nai1* mutants (Nagano et al., 2008). In line with this finding, *ML3* gene expression and protein abundance are strongly reduced in *nai1* mutants, and *ML3* expression follows the dynamics of *NAI1* regulation by MeJA and ethylene (Figs. 6 and 7). *ML3* expression is also coregulated with that of *NAI2*, a protein of unknown biochemical function that is also required for ER body formation (Yamada et al., 2008). Although *nai2* mutants lack ER bodies, ML3 protein is still detectable in this mutant, indicating that ML3 abundance is not dependent on the presence of ER bodies and that the absence of ML3 in *nai1* is most likely the result of the absence of *NAI1* as a dominant transcriptional regulator of ML3. In turn, the presence of ER bodies is not affected by the presence or absence of ML3, as revealed by the presence of GFP-HDEL-positive ER bodies in the *ml3-3* mutant (Supplemental Fig. S8). ML3 expression is furthermore coregulated with the  $\beta$ -glucosidase *PYK10/BLU23*, an ER body-specific glucosidase (Sherameti

et al., 2008), the gene encoding MEMBRANE OF ER BODY1 (Yamada et al., 2013), as well as several Jacalin-related lectins and GDSL lipase, which all have been associated with the biology of ER bodies (Nagano et al., 2005, 2008; Yamada et al., 2011). In summary, we conclude that ML3 has a function in ER body biology.

ER bodies have a proposed role in pathogen responses (Yamada et al., 2011). In line with this, we could reveal altered pathogen responses in *ml3* mutants after treatment with the pathogens *A. brassicicola* and *P. syringae* DC3000. Plants often employ distinct recognition mechanisms and signaling pathways for different pathogen elicitors. In this context, the plant hormones SA, JA, or JA/ethylene appear to form a network of synergistic and antagonistic interactions (Glazebrook, 2001; Spoel et al., 2003; Spoel and Dong, 2008; Leon-Reyes et al., 2009). Plants restrict the colonization of some pathogens like *P. syringae* through the elicitation of SA defense responses (Shirasu et al., 1997). Whereas JA-mediated defenses are necessary to inhibit fungal pathogens like *A. brassicicola* (van Wees et al., 2003), in this study, we provide evidence that *ml3-3* mutants are compromised in their JA-mediated defense responses by their enhanced susceptibility toward *A. brassicicola* (Fig. 8A). *P. syringae* is known to suppress SA responses in plants by inducing coronatine-mediated JA signaling (Fig. 8B). The resistant phenotype seen in *ml3* mutants upon *P. syringae* infection is congruent with other studies showing the antagonistic effects of JA and SA signaling (Mur et al., 2006; Spoel et al., 2007; Koornneef et al., 2008).

Interestingly, our results also show that a number of genes of the glucosinolate pathway are strongly co-regulated with *ML3*, including the genes for the nitrile specifier proteins NSP1, NSP3, and NSP4 that convert glucosinolates to nitrile (Kuchernig et al., 2012), INDOLE GLUCOSINOLATE O-METHYLTRANSFERASE5 (Pfalz et al., 2011), the glucosinolate biosynthesis regulatory transcription factor ATR/MYB34 (score 0.564; Bender and Fink, 1998; Celenza et al., 2005), as well as the ER body marker PYK10 (Sherameti et al., 2008; Table I). Glucosinolate hydrolysis at pH < 5 leads to the formation of nitriles by the activation of the nitrile specifier proteins (Halkier and Gershenzon, 2006; Kissen and Bones, 2009), and in this respect, our observation that a pH shift to 3.5 can lead to changes in the distribution of *ML3-mCherry* may be biologically significant (Supplemental Fig. S7). PYK10 protein has previously been shown to possess enhanced activity upon hyperinfection by symbiotic fungi by activating toxic compounds such as indole glucosinolates (Ahn et al., 2007; Sherameti et al., 2008). Other studies have revealed that camalexin- and indole glucosinolate-deficient plants are hypersusceptible to the fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Stotz et al., 2011). In addition, JA signaling is essential for the induction of indole glucosinolates (van Dam and Oomen, 2008). Previous studies have shown that *ml3* mutants are compromised in wound-induced JA signaling and are more appetizing for the generalist larva *S. littoralis* (Fridborg et al., 2013). However, plants compromised in *ML3* expression did not show any

antiherbivory traits toward the specialist herbivore *Plutella xylostella* (Fridborg et al., 2013). This could be attributed to the fact that *Plutella* spp. have evolved to combat the glucosinolate-myrosinase defense (Kliebenstein et al., 2002). Based on these studies and our observations, we speculate that *ML3* is a positive regulator downstream from JA responses and glucosinolate-mediated plant defenses. This suggested link between *ML3* and the biology of glucosinolates may also be helpful for the identification of a putative *ML3* ligand, which may be a glucosinolate or a glucosinolate-related metabolite, compounds that are known to be stored in the vacuole (Grubb and Abel, 2006).

Our interest in *ML3* was triggered following our identification of the protein as a putatively NEDD8-modified protein. *ML3* had also been found by others in similar attempts to identify novel NEDD8 conjugates (Hotton et al., 2012). Our experiments now clearly identify a small fraction of *ML3* as NEDD8 modified (Fig. 1). Interestingly, we identify also a ubiquitin-conjugated form of *ML3* that does not appear to be neddylated, and we are able to show that *ML3* can interact with NEDD8 as well as with ubiquitin in the yeast two-hybrid system. Since yeast also contains active neddylation as well as ubiquitylation systems, these interactions may also be the result of conjugation between the respective bait and prey fusion proteins. The modification and binding of both ubiquitin-related proteins to *ML3* may be suggestive for a regulatory interplay between these modifier proteins. Unfortunately, we were unable to express and purify *ML3* using recombinant expression systems, and this has prevented us from further investigating the interactions between *ML3* and the ubiquitin family proteins. Non-covalent interactions of *ML3* with NEDD8 and, therefore, an anticipated enrichment of *ML3* in purifications of NEDD8 conjugates may be the reason for the identification of *ML3* in both proteomics studies aiming at the identification of novel NEDD8 targets from plants (Hakenjos et al., 2011; Hotton et al., 2012). We note that also the *ML3*-related *ML6* was identified unequivocally in our initial MS analysis following HSN purification and that, thus, the findings reported here for *ML3* may also apply to the paralogs *ML6* and *ML5* (Hakenjos et al., 2011; Hotton et al., 2012). Since *ML3* does not have any protein features that would be indicative for a binding activity to ubiquitin or ubiquitin-like proteins, these observations as well as the fact that the protein is NEDD8 and ubiquitin modified are very intriguing. At the same time, they give rise to a number of questions about the role and the possible interplay of these modifications and interactions for *ML3* biology and function. Future research will have to address these important and exciting issues.

## MATERIALS AND METHODS

### Biological Material

All experiments were performed in the Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) ecotype Columbia. Transgenic lines expressing HSN or HSUB were described

previously (Hakenjos et al., 2011). *ml3-3* (SALK\_001255) and *ml3-4* (SAIL\_182\_G07) were obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC) and selected for homozygosity by PCR-based genotyping. *nai1-3* (GK-136G06-012754) is a previously uncharacterized allele of *NAI1*, and *nai2-2* (SALK\_005896) and *nai2-3* (SALK\_043149) T-DNA insertion mutants were described previously (Yamada et al., 2008). The *nai1* and *nai2* mutant seeds were obtained from NASC and selected for homozygosity by genotyping. *pad3-1* and *coi1-1* are previously published mutants (Xie et al., 1998; Schuëgger et al., 2006). The ER marker lines GFP-HDEL and Q4 were also obtained from NASC (Cutler et al., 2000; Nelson et al., 2007). The transgenic *sp-RFP-AFVY* line was generously provided by Lorenzo Frigerio (University of Warwick). Primer sequences for genotyping are listed in Supplemental Table S1.

## Cloning Procedures

To generate MYC-ML3, an *ML3* entry clone (G13160) was obtained from the Arabidopsis Biological Resource Center and then cloned into *pJawohl2B-5xMYC-GW* using Gateway technology (Invitrogen). Mutagenesis of *MYC-ML3* was performed using *DpnI*-based site-directed mutagenesis with the primers 19 and 20 (*MYC-ML3 K33R*), 21 and 22 (*MYC-ML3 K68R*), 23 and 24 (*MYC-ML3 K90R*), 25 and 26 (*MYC-ML3 K129R*), 27 and 28 (*MYC-ML3 K137R*), 29 and 30 (*MYC-ML3 K147R*), and 31 and 32 (*MYC-ML3 K153R*). *ML3-YFP-HA* was obtained by insertion of a PCR fragment obtained with primers 11 and 12 into the Gateway-compatible vector *pEarleyGate101* (Earley et al., 2006). The constructs for the expression of the *ML3* promoter-driven *ML3-YFP* (*ML3p:ML3-YFP*) and *ML3-mCherry* (*ML3p:ML3-mCherry*) were generated in the following manner. An *ML3* promoter gene fragment was amplified by PCR from Arabidopsis ecotype Columbia genomic DNA with the primers 33 and 35 that added a *HindIII* and a *NheI* restriction site to the promoter gene termini, respectively. A PCR fragment of the *mCherry* or *YFP* coding sequence flanked by *NheI* and *BamHI* restriction sites was obtained with primers 38 and 39 (*mCherry*) or 40 and 41 (*YFP*), and a 1-kb *ML3* terminator fragment flanked by *BamHI* and *XhoI* sites was amplified using primers 36 and 37. All fragments were ligated into the *HindIII* and *XhoI* restriction sites of *pGreen0029* (*mCherry*) or *pGreen0229* (*YFP*), and the final construct was transformed into the Q4 ER marker line (*ML3p:ML3-mCherry*; Cutler et al., 2000) or *ml3-3* (*ML3p:ML3-YFP*; Hellens et al., 2000).

*ML3p:GUS* was generated by inserting a 2-kb promoter fragment amplified by PCR (primers 33 and 34) from Arabidopsis Columbia genomic DNA into the vector *pCAMBIA1391Z* ([www.cambia.org/daisy/cambia/](http://www.cambia.org/daisy/cambia/)). At least 10 transgenic Arabidopsis plants were generated for each construct using the floral dip transformation protocol. T1 seeds were selected for resistance to the respective antibiotic or herbicide as well as for transgene expression. Individual lines were chosen for cell biological and biochemical analyses and for genetic crosses. Primer sequences for cloning are listed in Supplemental Table S1.

The yeast two-hybrid construct BD-ML3 was obtained by PCR amplification of the *ML3* open reading frame with oligonucleotides 13 and 14 and was then inserted into *pGBKT7* as an *EcoRI* and *XhoI* fragment. AD-NEDD8 and AD-UBQ were cloned in a similar manner by ligation of the *NEDD8/RUB1* (AT1G31340) and *UBQ* (AT3G52590) open reading frames as *EcoRI-XhoI/Sall* fragments into *pGADT7* AD. Primer sequences are listed in Supplemental Table S1.

## Quantitative Real-Time PCR

Extraction of total RNA and complementary DNA synthesis were conducted as described previously (Richter et al., 2010). The complementary DNA equivalent of 25 ng of total RNA was used in a 10- $\mu$ L PCR in a CFX96 Real-Time System Cycler with iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad). A 40-cycle two-step amplification protocol (10 s at 95°C, 30 s at 60°C) was used for all measurements. Primer sequences are listed in Supplemental Table S1. Unless otherwise stated, the average and SE of four technical replicates pooled from at least two biological replicates are shown. The experiment was repeated at least once, and the result of a representative experiment is shown.

## Immunobiological Analyses

The anti-ML3 antibody was raised in rabbits by immunization with a chemically synthesized ML3 peptide (VSLRRKTLEED) coupled to a keyhole limpet hemocyanin carrier protein (Eurogentec). The crude serum was affinity purified against the ML3 peptide, and the purified serum was used in a 1:1,000 dilution for immunoblots. Anti-MYC agarose (Roche) and anti-HA agarose (Roche) were used for immunoprecipitations using 1 to 2 g (fresh weight) from

7-d-old seedlings. The anti-NEDD8 antibody (1:1,000) was described previously (Hakenjos et al., 2011). The following commercial antibodies were used: anti-CDC2 (1:3,000; Santa Cruz Biotechnology), anti-GAL4 (DNA-binding domain; 1:1,000; Santa Cruz Biotechnology), anti-GFP (1:3,000; Life Technologies), anti-HA-peroxidase (1:1,000; Roche), and anti-vacuolar-ATPase  $\epsilon$ -subunit (1:2,000; Agrisera).

## Cell Biological and Histological Analyses

For GUS staining of *ML3p:GUS*, the first and second leaves of 16-d-old plants were wounded using a wooden toothpick and fixed, 48 h after wounding, in heptane for 15 min and then incubated in GUS staining solution [100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 2 mM  $K_4Fe(CN)_6$ , 2 mM  $K_3Fe(CN)_6$ , 0.1% Triton X-100, and 1 mg mL<sup>-1</sup> 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -glucuronic acid]. GUS-stained seedlings were photographed using a Leica MZ16 stereomicroscope with a PLAN-APOX1 objective (Leica). Herbivore feeding experiments with *ML3p:GUS* were performed as described (Fridborg et al., 2013). Microscopy of fluorescent protein fusions was performed on 5-d-old seedlings using an FV1000/IX81 laser-scanning confocal microscope (Olympus).

Subcellular fractionation from 7-d-old seedlings was performed as described previously (Matsushima et al., 2003). Vacuoles were purified from 12- to 14-d-old seedlings using a Ficoll gradient as described previously, and vacuolar proteins were subsequently precipitated using TCA (Robert et al., 2007).

## MS

For protein digestion, a sample of immunoprecipitated *ML3-YFP-HA* was reduced and alkylated by 50 mM dithiothreitol and 10 mg mL<sup>-1</sup> chloroacetamide, respectively. Tryptic in-gel digestion was performed according to standard procedures. Nanoflow liquid chromatography-tandem MS was performed using an Eksigent nanoLC-Ultra 1D+ system coupled online to an LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific) mass spectrometer. Tryptic peptides were dissolved in 20  $\mu$ L of buffer A (0.1% formic acid in double-distilled water), and 10  $\mu$ L was injected for each measurement. Peptide samples were first loaded on a trap column (100  $\mu$ m i.d.  $\times$  2 cm, packed in house with 5  $\mu$ m Repronil PUR AQ; Dr. Maisch) in 100% buffer A. Peptides were transferred to an analytical column (75- $\mu$ m  $\times$  40-cm C18 column, 3  $\mu$ m Repronil PUR AQ Gold; Dr. Maisch) and separated using a 225-min gradient from 7% to 35% buffer B (0.1% formic acid in acetonitrile). MS measurements were performed in data-dependent acquisition mode, automatically subjecting the 10 most abundant precursor ions in the full MS spectra for higher-energy collisional dissociation fragmentation at 30% collision energy. Full MS spectra and tandem MS spectra were acquired at 30,000 and 7,500 resolution, respectively. Intensity-based label-free quantification was performed using Progenesis (version 4.0; Nonlinear Dynamics). The generated peak list was then searched using Mascot (version 2.4.1) against the protein sequence databases National Center for Biotechnology Information non-redundant (download October 26, 2011; 15.8 million sequences) and SwissProt (version 57; 0.5 million sequences) for protein identification. The variable modification of Lys(GlyGly) was considered in the database search in order to identify NEDD8-modified *ML3*.

## Phylogenetic Analysis

Protein sequences containing the MD-2-related lipid-recognition domain (PF02221) were retrieved from the Ensembl BioMart database for the dicot species Arabidopsis, *Brassica rapa*, soybean (*Glycine max*), tomato (*Solanum lycopersicum*), and grapevine (*Vitis vinifera*), the monocot species *Brachypodium distachyon* and rice (*Oryza sativa*), as well as the moss *Physcomitrella patens* and the lycophyte *Selaginella moellendorffii*. Sequences were aligned with ClustalOmega ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/)) and manually amended when necessary. The phylogenetic tree was constructed based on the amended alignment with MEGA5 using the maximum likelihood method and the bootstrap method with 1,000 bootstrap replications. The tree was rooted with the sequences from *P. patens* and *S. moellendorffii*. The cutoff values for the bootstrap analysis were set to 60%, and bootstrap values are indicated by each node.

## Genevestigator

A list of 20 genes coexpressed with *ML3* was generated on the basis of 8,689 Affymetrix 22k ATH1 microarray samples using the Genevestigator coexpression tool ([www.genevestigator.com](http://www.genevestigator.com)).

## Chemical Treatments

To examine the effects of MeJA and ethylene on ML3 expression, rosette leaves of 16-d-old plants were floated for 12 h on water containing 50  $\mu\text{M}$  MeJA. The ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (50  $\mu\text{M}$ ) was added for the combined treatments with MeJA and ethylene. To examine the cellular distribution of ML3-mCherry and RFP-AVFY, 5-d-old seedlings were treated for 2 h with SA (500  $\mu\text{M}$ ), 3-hydroxybenzoic acid (500  $\mu\text{M}$ ) dissolved in water, germination medium (4.3 g L<sup>-1</sup> Murashige and Skoog medium, 10 g L<sup>-1</sup> saccharose, and 0.5 g L<sup>-1</sup> MES, pH 5.8) or 0.5 M mannitol or, alternatively, in water, pH 3.5 (HCl). Dexamethasone-inducible transgenes were induced by immersing the plant material overnight in liquid germination medium supplemented with 30  $\mu\text{M}$  dexamethasone (Sigma; Aoyama and Chua, 1997).

## Yeast Two-Hybrid Assay

The yeast two-hybrid assay was performed as described previously (Katsiarimpa et al., 2011).

## Pathogen Assays

*Alternaria brassicicola* strain MUCL20297 was grown on potato dextrose agar plates for 2 weeks at 22°C. Spores were then harvested and suspended in water ( $5 \times 10^5$  spores mL<sup>-1</sup>). *A. brassicicola* inoculation was performed by adding 5- $\mu\text{L}$  drops onto the leaf surface as described previously (Thomma et al., 1998). Two leaves per plant were inoculated with two drops each. Ten plants were taken as one biological replicate, and three biological replicates were used. Five days after challenge, disease severity was scored and samples were collected for pathogen quantification. Disease rating was assessed on the basis of symptom severity (Van der Ent et al., 2008). For each pathogen assay, inoculated leaves of 10 plants were pooled together and taken as one biological replicate, and three biological replicates were used. Fungal DNA quantification was carried out by quantitative real-time (qRT)-PCR of ABU03393 using the primers 48 and 49. In preparation for a *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 experiment, the bacteria were grown overnight in Luria-Bertani medium at 37°C. The cells were centrifuged, and the pellet was washed once with sterile 10 mM MgCl<sub>2</sub> and resuspended in 10 mM MgCl<sub>2</sub> to an optical density at 600 nm of 0.02 (10<sup>7</sup> colony-forming units mL<sup>-1</sup>). Inoculations for the *P. syringae* pv *tomato* DC3000 bioassays were performed through pressure infiltration with bacterial suspension into the tissue of the abaxial part of the rosette leaves (two leaves per plant). About 100  $\mu\text{L}$  of suspension was used for each leaf, and 10 plants were infiltrated for one biological replicate. Three biological replicates were used in the study. The experiment was carried out twice, and a representative experiment is shown. Pathogen quantification for *P. syringae* pv *tomato* DC3000 was performed by qRT-PCR of NC\_004578 using the primers 50 and 51.

Sequence data from this article can be found in the GenBank/EMBL data libraries under accession numbers: ML3 (AT5G23820), NEDD8 (AT1G31340), NAI1 (AT2G22770), NAI2 (AT3G15950), PYK10 (AT3G09260), COI1 (AT2G39940), and PAD3 (AT3G26830). GenBank accession numbers of human genes mentioned in this work are MD-2 (AB018549), MD-1 (AF057178), NPC2 (NM\_006432) and GM2A (NM\_000405).

## Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

**Supplemental Figure S1.** Mass spectrometric analysis of ML3.

**Supplemental Figure S2.** Mutational analysis of MYC-ML3 protein.

**Supplemental Figure S3.** MLN4924 blocks NEDD8-modification of ML3.

**Supplemental Figure S4.** HSN-immunoprecipitates recover ML3.

**Supplemental Figure S5.** Protein alignment of the ML domain used for the phylogeny.

**Supplemental Figure S6.** Protein sequence alignment of ML3 with human and Arabidopsis ML domain proteins.

**Supplemental Figure S7.** Acidic pH causes relocalization of vacuolar proteins.

**Supplemental Figure S8.** ER body formation is unaltered in *ml3-3* mutants.

**Supplemental Table S1.** List of primers.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ralph Hückelhoven (Technische Universität München) and Erich Glawischnig (Technische Universität München) for their expert advice. We thank Susan Kläger (Technische Universität München) for technical assistance.

Received May 13, 2013; accepted July 30, 2013; published July 31, 2013.

## LITERATURE CITED

- Ahn YO, Shimizu B, Sakata K, Gantulga D, Zhou C, Bevan DR, Esen A (2010) Scopolin-hydrolyzing beta-glucosidases in roots of Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **51**: 132–143
- Ahn YO, Zheng M, Bevan DR, Esen A, Shiu SH, Benson J, Peng HP, Miller JT, Cheng CL, Poulton JE, et al (2007) Functional genomic analysis of Arabidopsis thaliana glycoside hydrolase family 35. *Phytochemistry* **68**: 1510–1520
- Aoyama T, Chua NH (1997) A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J* **11**: 605–612
- Bejai S, Fridborg I, Ekbom B (2012) Varied response of *Spodoptera littoralis* against Arabidopsis thaliana with metabolically engineered glucosinolate profiles. *Plant Physiol Biochem* **50**: 72–78
- Bender J, Fink GR (1998) A Myb homologue, ATR1, activates tryptophan gene expression in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 5655–5660
- Bonnett HT Jr, Newcomb EH (1965) Polyribosomes and cisternal accumulations in root cells of radish. *J Cell Biol* **27**: 423–432
- Carter C, Pan S, Zouhar J, Avila EL, Girke T, Raikhel NV (2004) The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *Plant Cell* **16**: 3285–3303
- Celenza JL, Quiel JA, Smolen GA, Merrikh H, Silvestro AR, Normanly J, Bender J (2005) The Arabidopsis ATR1 Myb transcription factor controls indolic glucosinolate homeostasis. *Plant Physiol* **137**: 253–262
- Cutler SR, Ehrhardt DW, Griffiths JS, Somerville CR (2000) Random GFP: cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of Arabidopsis at a high frequency. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 3718–3723
- del Pozo JC, Dharmasiri S, Hellmann H, Walker L, Gray WM, Estelle M (2002) AXR1-ECR1-dependent conjugation of RUB1 to the Arabidopsis cullin AtCUL1 is required for auxin response. *Plant Cell* **14**: 421–433
- del Pozo JC, Estelle M (1999) The Arabidopsis cullin AtCUL1 is modified by the ubiquitin-related protein RUB1. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 15342–15347
- del Pozo JC, Timpte C, Tan S, Callis J, Estelle M (1998) The ubiquitin-related protein RUB1 and auxin response in Arabidopsis. *Science* **280**: 1760–1763
- Deshais RJ, Joazeiro CA (2009) RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* **78**: 399–434
- Duda DM, Borg LA, Scott DC, Hunt HW, Hammel M, Schulman BA (2008) Structural insights into NEDD8 activation of cullin-RING ligases: conformational control of conjugation. *Cell* **134**: 995–1006
- Duda DM, Scott DC, Calabrese MF, Zimmerman ES, Zheng N, Schulman BA (2011) Structural regulation of cullin-RING ubiquitin ligase complexes. *Curr Opin Struct Biol* **21**: 257–264
- Earley KW, Haag JR, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K, Pikaard CS (2006) Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J* **45**: 616–629
- Fridborg I, Johansson A, Lagensjö J, Leelarasamee N, Floková K, Tarkowská D, Meijer J, Bejai S (2013) ML3: a novel regulator of herbivory-induced responses in Arabidopsis thaliana. *J Exp Bot* **64**: 935–948
- Frolov A, Zielinski SE, Crowley JR, Dudley-Rucker N, Schaffer JE, Ory DS (2003) NPC1 and NPC2 regulate cellular cholesterol homeostasis through generation of low density lipoprotein cholesterol-derived oxysterols. *J Biol Chem* **278**: 25517–25525
- Glazebrook J (2001) Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis: 2001 status. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 301–308
- Grubb CD, Abel S (2006) Glucosinolate metabolism and its control. *Trends Plant Sci* **11**: 89–100
- Hakenjos JP, Richter R, Dohmann EM, Katsiarimpa A, Isono E, Schwachheimer C (2011) MLN4924 is an efficient inhibitor of NEDD8 conjugation in plants. *Plant Physiol* **156**: 527–536
- Halkier BA, Gershenzon J (2006) Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 303–333

- Hara-Nishimura I, Matsushima R (2003) A wound-inducible organelle derived from endoplasmic reticulum: a plant strategy against environmental stresses? *Curr Opin Plant Biol* 6: 583–588
- Harper JW, Tan MK (2012) Understanding cullin-RING E3 biology through proteomics-based substrate identification. *Mol Cell Proteomics* 11: 1541–1550
- Haseloff J, Siemering KR, Prasher DC, Hodge S (1997) Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2122–2127
- Hayashi Y, Yamada K, Shimada T, Matsushima R, Nishizawa NK, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2001) A proteinase-storing body that prepares for cell death or stresses in the epidermal cells of Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 42: 894–899
- Hellens RP, Edwards EA, Leyland NR, Bean S, Mullineaux PM (2000) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* 42: 819–832
- Hotton SK, Callis J (2008) Regulation of cullin RING ligases. *Annu Rev Plant Biol* 59: 467–489
- Hotton SK, Castro MF, Eigenheer RA, Callis J (2012) Recovery of DDB1a (damaged DNA binding protein1a) in a screen to identify novel RUB-modified proteins in Arabidopsis thaliana. *Mol Plant* 5: 1163–1166
- Hunter PR, Craddock CP, Di Benedetto S, Roberts LM, Frigerio L (2007) Fluorescent reporter proteins for the tonoplast and the vacuolar lumen identify a single vacuolar compartment in Arabidopsis cells. *Plant Physiol* 145: 1371–1382
- Inohara N, Nuñez G (2002) ML: a conserved domain involved in innate immunity and lipid metabolism. *Trends Biochem Sci* 27: 219–221
- Katsiarimpa A, Anzenberger F, Schlager N, Neubert S, Hauser MT, Schwachheimer C, Isono E (2011) The Arabidopsis deubiquitinating enzyme AMSH3 interacts with ESCRT-III subunits and regulates their localization. *Plant Cell* 23: 3026–3040
- Kim HM, Park BS, Kim JI, Kim SE, Lee J, Oh SC, Enkhbayar P, Matsushima N, Lee H, Yoo OJ, et al (2007) Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell* 130: 906–917
- Kissen R, Bones AM (2009) Nitrile-specifier proteins involved in glucosinolate hydrolysis in Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem* 284: 12057–12070
- Kliebenstein D, Pedersen D, Barker B, Mitchell-Olds T (2002) Comparative analysis of quantitative trait loci controlling glucosinolates, myrosinase and insect resistance in Arabidopsis thaliana. *Genetics* 161: 325–332
- Komander D, Clague MJ, Urbé S (2009) Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 550–563
- Komander D, Rape M (2012) The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem* 81: 203–229
- Koornneef A, Leon-Reyes A, Ritsema T, Verhage A, Den Otter FC, Van Loon LC, Pieterse CM (2008) Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. *Plant Physiol* 147: 1358–1368
- Kuchernig JC, Burow M, Wittstock U (2012) Evolution of specifier proteins in glucosinolate-containing plants. *BMC Evol Biol* 12: 127
- Leon-Reyes A, Spoel SH, De Lange ES, Abe H, Kobayashi M, Tsuda S, Millenaar FF, Welschen RA, Ritsema T, Pieterse CM (2009) Ethylene modulates the role of NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1 in cross talk between salicylate and jasmonate signaling. *Plant Physiol* 149: 1797–1809
- Ma T, Chen Y, Zhang F, Yang CY, Wang S, Yu X (2013) RNF111-dependent neddylation activates DNA damage-induced ubiquitination. *Mol Cell* 49: 897–907
- Mahata B, Sundqvist A, Xirodimas DP (2012) Recruitment of RPL11 at promoter sites of p53-regulated genes upon nucleolar stress through NEDD8 and in an Mdm2-dependent manner. *Oncogene* 31: 3060–3071
- Matsushima R, Fukao Y, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2004) *NAII* gene encodes a basic-helix-loop-helix-type putative transcription factor that regulates the formation of an endoplasmic reticulum-derived structure, the ER body. *Plant Cell* 16: 1536–1549
- Matsushima R, Hayashi Y, Kondo M, Shimada T, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2002) An endoplasmic reticulum-derived structure that is induced under stress conditions in Arabidopsis. *Plant Physiol* 130: 1807–1814
- Matsushima R, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2003) A novel ER-derived compartment, the ER body, selectively accumulates a beta-glucosidase with an ER-retention signal in Arabidopsis. *Plant J* 33: 493–502
- Mur LA, Kenton P, Atzorn R, Miersch O, Wasternack C (2006) The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol* 140: 249–262
- Nagano AJ, Fukao Y, Fujiwara M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2008) Antagonistic jacalin-related lectins regulate the size of ER body-type beta-glucosidase complexes in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* 49: 969–980
- Nagano AJ, Maekawa A, Nakano RT, Miyahara M, Higaki T, Kutsuna N, Hasezawa S, Hara-Nishimura I (2009) Quantitative analysis of ER body morphology in an Arabidopsis mutant. *Plant Cell Physiol* 50: 2015–2022
- Nagano AJ, Matsushima R, Hara-Nishimura I (2005) Activation of an ER-body-localized beta-glucosidase via a cytosolic binding partner in damaged tissues of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* 46: 1140–1148
- Nelson BK, Cai X, Nebenführ A (2007) A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *Plant J* 51: 1126–1136
- Noh EH, Hwang HS, Hwang HS, Min B, Im E, Chung KC (2012) Covalent NEDD8 conjugation increases RCAN1 protein stability and potentiates its inhibitory action on calcineurin. *PLoS ONE* 7: e48315
- Ogasawara K, Yamada K, Christeller JT, Kondo M, Hatsugai N, Hara-Nishimura I, Nishimura M (2009) Constitutive and inducible ER bodies of Arabidopsis thaliana accumulate distinct beta-glucosidases. *Plant Cell Physiol* 50: 480–488
- Oh IS, Park AR, Bae MS, Kwon SJ, Kim YS, Lee JE, Kang NY, Lee S, Cheong H, Park OK (2005) Secretome analysis reveals an Arabidopsis lipase involved in defense against *Alternaria brassicicola*. *Plant Cell* 17: 2832–2847
- Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO (2009) The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 458: 1191–1195
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8: 785–786
- Pfalz M, Mikkelsen MD, Bednarek P, Olsen CE, Halkier BA, Kroymann J (2011) Metabolic engineering in *Nicotiana benthamiana* reveals key enzyme functions in Arabidopsis indole glucosinolate modification. *Plant Cell* 23: 716–729
- Praefcke GJ, Hofmann K, Dohmen RJ (2012) SUMO playing tag with ubiquitin. *Trends Biochem Sci* 37: 23–31
- Rabut G, Peter M (2008) Function and regulation of protein neddylation. ‘Protein modifications: beyond the usual suspects’ review series. *EMBO Rep* 9: 969–976
- Richter R, Behringer C, Müller IK, Schwachheimer C (2010) The GATA-type transcription factors GNC and GNL/CGA1 repress gibberellin signaling downstream from DELLA proteins and PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS. *Genes Dev* 24: 2093–2104
- Ridge RW, Uozumi Y, Plazinski J, Hurley UA, Williamson RE (1999) Developmental transitions and dynamics of the cortical ER of Arabidopsis cells seen with green fluorescent protein. *Plant Cell Physiol* 40: 1253–1261
- Robert S, Zouhar J, Carter C, Raikhel N (2007) Isolation of intact vacuoles from Arabidopsis rosette leaf-derived protoplasts. *Nat Protoc* 2: 259–262
- Schuhegger R, Nafisi M, Mansourava M, Petersen BL, Olsen CE, Svatos A, Halkier BA, Glawischnig E (2006) CYP71B15 (PAD3) catalyzes the final step in camalexin biosynthesis. *Plant Physiol* 141: 1248–1254
- Sherameti I, Venus Y, Drzewiecki C, Tripathi S, Dan VM, Nitz I, Varma A, Grundler FM, Oelmüller R (2008) PYK10, a beta-glucosidase located in the endoplasmic reticulum, is crucial for the beneficial interaction between Arabidopsis thaliana and the endophytic fungus Piriformospora indica. *Plant J* 54: 428–439
- Shirasu K, Nakajima H, Rajasekhar VK, Dixon RA, Lamb C (1997) Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *Plant Cell* 9: 261–270
- Spoel SH, Dong X (2008) Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. *Cell Host Microbe* 3: 348–351
- Spoel SH, Johnson JS, Dong X (2007) Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 18842–18847
- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SM, Korzelius JP, Van Pelt JA, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux JP, Brown R, Kazan K, et al (2003) NPR1 modulates

- cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* **15**: 760–770
- Stotz HU, Sawada Y, Shimada Y, Hirai MY, Sasaki E, Krischke M, Brown PD, Saito K, Kamiya Y** (2011) Role of camalexin, indole glucosinolates, and side chain modification of glucosinolate-derived isothiocyanates in defense of *Arabidopsis* against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant J* **67**: 81–93
- Tamura K, Shimada T, Ono E, Tanaka Y, Nagatani A, Higashi SI, Watanabe M, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2003) Why green fluorescent fusion proteins have not been observed in the vacuoles of higher plants. *Plant J* **35**: 545–555
- Thomma BP, Eggermont K, Penninckx IA, Mauch-Mani B, Vogelsang R, Cammue BP, Broekaert WF** (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 15107–15111
- van Dam NM, Oomen MW** (2008) Root and shoot jasmonic acid applications differentially affect leaf chemistry and herbivore growth. *Plant Signal Behav* **3**: 91–98
- Van der Ent S, Verhagen BW, Van Doorn R, Bakker D, Verlaan MG, Pel MJ, Joosten RG, Proveniers MC, Van Loon LC, Ton J, et al** (2008) *MYB72* is required in early signaling steps of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **146**: 1293–1304
- van Wees SC, Chang HS, Zhu T, Glazebrook J** (2003) Characterization of the early response of *Arabidopsis* to *Alternaria brassicicola* infection using expression profiling. *Plant Physiol* **132**: 606–617
- Vierstra RD** (2012) The expanding universe of ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. *Plant Physiol* **160**: 2–14
- Viriyakosol S, Tobias PS, Kitchens RL, Kirkland TN** (2001) MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide. *J Biol Chem* **276**: 38044–38051
- Woodward AW, Ratzel SE, Woodward EE, Shamooy Y, Bartel B** (2007) Mutation of *E1-CONJUGATING ENZYME-RELATED1* decreases RELATED TO UBIQUITIN conjugation and alters auxin response and development. *Plant Physiol* **144**: 976–987
- Xie DX, Feys BF, James S, Nieto-Rostro M, Turner JG** (1998) COI1: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* **280**: 1091–1094
- Xirodimas DP** (2008) Novel substrates and functions for the ubiquitin-like molecule NEDD8. *Biochem Soc Trans* **36**: 802–806
- Xirodimas DP, Saville MK, Bourdon JC, Hay RT, Lane DP** (2004) Mdm2-mediated NEDD8 conjugation of p53 inhibits its transcriptional activity. *Cell* **118**: 83–97
- Xirodimas DP, Sundqvist A, Nakamura A, Shen L, Botting C, Hay RT** (2008) Ribosomal proteins are targets for the NEDD8 pathway. *EMBO Rep* **9**: 280–286
- Xu S, Benoff B, Liou HL, Lobel P, Stock AM** (2007) Structural basis of sterol binding by NPC2, a lysosomal protein deficient in Niemann-Pick type C2 disease. *J Biol Chem* **282**: 23525–23531
- Yamada K, Hara-Nishimura I, Nishimura M** (2011) Unique defense strategy by the endoplasmic reticulum body in plants. *Plant Cell Physiol* **52**: 2039–2049
- Yamada K, Nagano AJ, Nishina M, Hara-Nishimura I, Nishimura M** (2008) NAI2 is an endoplasmic reticulum body component that enables ER body formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **20**: 2529–2540
- Yamada K, Nagano AJ, Nishina M, Hara-Nishimura I, Nishimura M** (2013) Identification of two novel endoplasmic reticulum body-specific integral membrane proteins. *Plant Physiol* **161**: 108–120
- Yamada K, Nagano AJ, Ogasawara K, Hara-Nishimura I, Nishimura M** (2009) The ER body, a new organelle in *Arabidopsis thaliana*, requires NAI2 for its formation and accumulates specific beta-glucosidases. *Plant Signal Behav* **4**: 849–852