

ZUSAMMENFASSUNG

Das Zellmorphogenese Gen *Angustifolia* (*AN*) ist an der Regulation der Mikrotubuli Organisation in *Arabidopsis* beteiligt. Aufgrund seiner partiellen Lokalisation mit dem trans-Golgi Netzwerk, wird zudem vermutet, dass *AN* Aspekte des Membrantransports reguliert. *AN* ist das pflanzliche Homolog von *CtBPs* (*C*-terminale Bindungsproteine), bekannten transkriptionellen Co-Repressoren, welche die Expression von mehreren Tumorsuppressoren steuern. *CtBPs* gehören zu einer Familie von NAD-abhängigen D2-Hydroxysäure-Dehydrogenasen (D2 - HDHs) mit einer Nicotinamadenindinucleotid (NAD) Bindungsdomäne. Die Bindung von NADH fördert die Oligomerisierung der *CtBPs*, die für die Rekrutierung des *CtBP*-vermittelten Transkriptions-Repressor-Komplexes von Bedeutung ist. Ziel dieser Studie ist es zu untersuchen, ob die bekannte NADH abhängige Co- Repressor-Funktion der *CtBPs* auch in *AN* konserviert ist. Diese Studie wurde durch die Feststellung angeregt, dass der Funktionsverlust einer durch EMS-Mutagenese erzeugten Null Mutante, genannt *doq1*, durch eine Punktmutation in der NADH-Bindungsdomäne vermittelt wird.

Das erste und zweite Kapitel umfassen die Funktion von *AN* als Regulator von Stress-Körpern (SGs), den Aggregaten aus mRNA und Proteinen (mRNP) die durch stress gebildet werden. Um das Wissen über die Interaktionen von *AN* zu vertiefen, wurde eine MALDI-MS-Analyse mit *AN*, aufgereinigt aus *Arabidopsis* Zellkultur, durchgeführt. Mehrere vielversprechende Kandidaten wurden durch Peptidmassenfingerprint entdeckt, von denen einige RNA-bindende Proteine (RBPs) bekannterweise eine Rolle in der Post-Transkriptionskontrolle spielen. Diese Kandidaten, zusammen mit einigen gut charakterisierten RBPs aus der Literatur, wurden auf eine Interaktion und Co-Lokalisation mit *AN* überprüft. Hierbei wurde festgestellt, dass *AN* mit mehreren RBPs interagiert und co-lokalisiert, die an SGs lokalisieren. Durch die Verwendung von Mutanten, die eine defekte NADH-Bindungsstelle aufweisen, wurde entdeckt, dass *AN* die Dissoziation von SGs über seine NADH-Bindungsdomäne steuert. Des weiteren wurde festgestellt, dass an Mutanten hyposensitiv auf Salz und osmotischer Stress reagieren, wodurch die funktionelle Relevanz der Assoziation mit SGs weiter unterstützt wird.

Das dritte Kapitel behandelt die molekulare Charakterisierung von AIK (Angustifolia interagierende Kinase), einer Proteinkinase die als Interaktor von *AN* in einem Hefe-Zwei-Hybrid-Screening entdeckt wurde. AIK weist Homologien zu der DYRK (Dual-Spezifität tyrosinphosphorylierten und -regulierten Kinase-ähnlichen Proteinkinase) Familie von

Kinasen auf. Die Assoziation von AN mit AIK wurde weiter validiert und untersucht. AIK interagiert mit AN und co-lokalisiert an SGs unter Hitzestress. Diese Interaktion wird durch eine Mutation in der NAD-Bindungsdomäne von AN gestört. Demzufolge ist AIK eine neue Komponente von SGs in *Arabidopsis*. Diese molekulare Lokalisierung ist evolutionär konserviert, da DYRK3, ein Mitglied der DYRK Familie, an SGs in Säugerzellen lokalisiert, wo es die SG Bildung/Dissoziation über seine Kinaseaktivität kontrolliert.

Das vierte Kapitel beschreibt die molekulare Charakterisierung der NADH-Domäne von AN. Mutationen in der NADH-Bindungsdomäne beeinträchtigen die Dimerisierungseffizienz von AN, was mit Berichten über reduzierte Dimerisierung von CtBPs mit NAD-Bindungs-Mutationen im Einklang steht.

Diese Studie erschließt AN als neuartige Komponente von SGs, die mit verschiedenen RBPs assoziiert und die SG Kinetik reguliert. Dies ist eine unerwartete und bislang unerforschte Funktion von AN, die noch für kein Mitglied der CtBP Familie bekannt ist. Die Rolle der NADH -Bindungsdomäne von AN bei der Dimerisierung, der Interaktion mit AIK und Lokalisierung an Stress-Körpern unterstützt die Hypothese, dass die NADH-Domäne für die Funktion von AN entscheidend ist. Ein tieferes Verständnis der Regulation von SG Kinetik durch AN kann neue Aspekte der post-transkriptionellen Kontrolle aufdecken.

ABSTRACT

The cell morphogenesis gene *ANGUSTIFOLIA* (*AN*) is involved in the regulation of microtubule arrangement in *Arabidopsis*. It has also been proposed to be involved in membrane trafficking, owing to its partial localization to the trans-Golgi network. *AN* is a plant homologue of mammalian *CtBP's* (C-terminal binding proteins) which are transcriptional co-repressors controlling the expression of several tumor suppressors. *CtBP's* belong to a family of NAD-dependent D2-hydroxy acid dehydrogenases (D2-HDHs) and contain a nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) binding domain. Binding to NADH promotes the CtBPs oligomerization which is postulated to be important for the recruitment of the CtBP-mediated transcription repression complex. This study aimed at investigating if the NADH dependent co-repressor function of mammalian *CtBP's* is also conserved in *Arabidopsis AN*. This study was prompted by the finding that a null mutant of *AN* generated by EMS mutagenesis, named *doq1*, has a point mutation in the NADH binding domain.

The first and second chapter report the novel function of AN as a regulator of Stress Granules (SGs) kinetics which are the mRNA ribonucleic protein (mRNP) particles formed upon stress

treatments. In order to gain an insight into AN's interactome, a MALDI-MS analysis was performed on AN purified from *Arabidopsis* cell culture. Several interesting candidates were observed by peptide mass fingerprinting, chief among them were RNA binding proteins (RBP's) known to play a crucial role in post-transcriptional control. These candidates, along with some well characterized RBP's chosen from literature, were checked for interaction and co-localization with AN. AN was found to interact and co-localize with several RBP's to SGs. By using mutants which have a disrupted NADH binding site, AN was found to control the dissolution of SGs via its NADH binding domain. *an* mutants were found to be hyposensitive to salt and osmotic stress indicating the functional relevance of association with SGs.

The third chapter covers the molecular characterization of AIK (ANGUSTIFOLIA INTERACTING KINASE), a protein kinase discovered as an interactor of AN in a yeast two hybrid screen. AIK shares homology to the DYRK (Dual-specificity tYrosine-phosphorylated and -Regulated Kinase-like protein kinases) family of kinases. AN's association with AIK was further validated and explored. AIK interacts with AN and co-localizes to SGs upon heat stress. This interaction is disrupted by a mutation in the NAD binding domain of AN. Hence, AIK is a novel component of SGs in *Arabidopsis*. This molecular localization is evolutionarily conserved as DYRK3, a member of DYRK family, localizes to SGs in mammalian cells where it controls SG condensation/dissolution via its kinase activity.

The fourth chapter describes the molecular characterization of AN's NADH domain. Mutations in the NADH binding domain impaired the dimerization efficiency of AN, which is consistent with previous reports on reduced dimerization observed with NAD binding mutant forms of CtBP.

To summarize, this study led to the discovery and characterization of AN as a novel component of SGs which associates with many RBP's and regulates SG kinetics. This is novel and unexplored function of AN, which has not been characterized for any member of the CtBP family so far. The role of AN's NADH binding domain in regulating AN's dimerization, interaction with AIK and localization to SGs supports the idea that the NADH domain is crucial for AN's function. Further understanding of AN's role in regulating SG kinetics can help to decipher new aspects of post-transcriptional control.