

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Botanik

Die peroxisomale *processing-protease* DEG15:  
Vermittlung von Dimerisierung und Substrat-Spezifität durch  
das *calmodulin-like-protein* CML3

Esther A. Dolze

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. E. Grill

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Chr. Gietl

2. Univ.-Prof. Dr. R. Hückelhoven

Die Dissertation wurde am 18.05.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 28.06.2011 angenommen.



**„You always get, what your are screening for!“**

**Author unbekannt**

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>ix</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>xi</b>
<b>Summary .....</b>	<b>xiii</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Peroxisomen .....	1
1.1.1 Stoffwechselabläufe in Peroxisomen.....	1
1.1.1.1 Glyoxysomale Fettmobilisierung .....	2
1.1.1.2 Photorespiration in den Blatt-Peroxisomen.....	4
1.1.1.3 Weitere Stoffwechselabläufe.....	5
1.1.2 Peroxisomaler Matrixproteinimport .....	7
1.2 Peroxisomale Proteasen.....	11
1.2.1 DEG15-Protease .....	12
1.2.2 Lon-Protease.....	16
1.2.3 Metallopeptidase.....	18
1.3 Calmodulin .....	19
1.3.1 Calmodulin: Struktur- und Konformationsänderung durch Calcium-Koordination.....	21
1.3.2 Calciumabhängige Interaktion von Calmodulin mit Zielproteinen .....	21
1.3.3 Calmodulin-Bindemotiv .....	23
1.3.4 Calciumunabhängige Interaktion von Calmodulin mit Zielproteinen .....	24
1.4 Proteinfaltung und –struktur.....	25
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	27
<b>2 Ergebnisse.....</b>	<b>29</b>
2.1 <i>In silico</i> Strukturanalyse der DEG15-Protease.....	32
2.1.1 Strukturvorhersage .....	33
2.1.2 Ungewöhnliche Aminosäuresequenz der AtDEG15 bedingt flexible und dynamische Struktur der Protease .....	37
2.1.3 Identifizierung unstrukturierte Bereiche innerhalb der AtDEG15 über RONN und FoldIndex .....	37
2.2 CML3 ist ein typischer Vertreter der Calmoduline .....	40
2.3 AtDEG15 ist zur Dimerisierung befähigt.....	42
2.4 Interaktion von AtDEG15 mit CML3 .....	46
2.4.1 AtDEG15 bindet in Anwesenheit von Ca <sup>2+</sup> -Ionen spezifisch an Calmodulin-Sepharose .....	47



2.4.2	Interaktion von AtDEG15 mit CML3: Untersuchung im <i>yeast-two-hybrid</i>	50
2.5	Charakterisierung der CML3-Bindedomäne der AtDEG15	52
2.6	Dimerisierung der AtDEG15 wird durch CML3-Bindung gefördert	62
2.7	Für eine Dimerisierung der AtDEG15 ist die CaM-Bindestelle auf beiden AtDEG15-Molekülen nötig	66
2.8	Domänen-Analyse der AtDEG15 <i>in planta</i>	68
2.8.1	Phänotyp der <i>deg15</i> -KO-Mutante: T-DNA Insertions-Mutanten der AtDEG15 sind in der Prozessierung PTS2-tragender Enzyme gestört	68
2.8.2	Nur das Vollängenprotein der AtDEG15 prozessiert die pre-gMDH zur reifen Untereinheit: Untersuchung von DEG15-Deletionskonstrukten in der T-DNA Insertionsmutante SALK007184 der DEG15	70
2.9	Expression der AtDEG15 im heterologen System	75
2.9.1	Expression in <i>Escherichia coli</i>	75
2.9.1.1	Native Expression	76
2.9.1.2	Denaturierende Aufreinigung der AtDEG15 und anschließende Rückfaltungsexperimente	80
2.9.1.2.1	Denaturierende Aufreinigung	80
2.9.1.2.2	Renaturierung durch Verdünnen	81
2.9.1.2.2.1	<i>Schnelles Verdünnen durch direkte Proteingabe in Pulsen</i>	82
2.9.1.2.2.2	<i>Langsames Verdünnen durch Dialyse</i>	83
2.9.1.2.3	Renaturierung nach erfolgter Bindung an Ni-Affinitäts-Säule (GE Healthcare)	84
2.9.1.2.4	Renaturierung mittels berechneter Pufferzusammensetzungen	86
2.9.2	Expression in <i>Pichia pastoris</i>	88
2.9.3	Transiente Expression in <i>Tabacum nicotiana</i>	91
<b>3</b>	<b>Diskussion</b>	<b>93</b>
3.1.1	Calmodulin-Bindung an die DEG15 und Calmodulin vermittelte Dimerisierung	96
3.1.2	Mögliche CML-Interaktionspartner der AtDEG15	101
3.1.3	Regulierung der proteolytischen Aktivität der AtDEG15 über Calmodulin-Bindung	102
3.1.4	Oligomerisierung der DEG-Proteasen: Nur pflanzliche DEG15 liegen als Gleichgewicht zwischen Monomer und Dimer vor	104
3.1.5	Expression der AtDEG15 im heterologem System	106
3.1.6	Handelt es sich bei DEG15 um ein intrinsisch ungeordnetes Protein?	107

<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>113</b>
4.1	Molekularbiologische Methoden	113
4.1.1	Verwendete <i>Escherichia coli</i> -Stämme und ihre Kultivierung	113
4.1.2	Anzucht von <i>A. tumefaciens</i>	114
4.1.3	Anzucht von <i>A. thaliana</i>	114
4.1.4	Anzucht von <i>Nicotiana tabacum</i>	115
4.1.5	Methoden zur DNA-Isolierung	116
4.1.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	116
4.1.7	Agarose-Gelelektrophorese	118
4.1.8	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	119
4.1.9	Bestimmung der DNA-Konzentration	119
4.1.9.1	Bestimmung der DNA-Konzentration mittels $\lambda$ -DNA	119
4.1.9.2	Photometrische Vermessung	120
4.1.10	Verdau von DNA durch Endonukleasen	120
4.1.11	Ligation von DNA-Fragmenten	121
4.1.12	Herstellung chemisch kompetenter und elektro-kompetenter Zellen	121
4.1.13	Transformation chemisch kompetenter <i>E.coli</i> mit rekombinanter DNA	122
4.1.14	Transformation elektrokompetenter <i>A. tumefaciens</i> mit rekombinanter DNA	123
4.1.15	DNA-Isolation aus <i>A.thaliana</i> :	123
4.1.15.1	CTAB	123
4.1.15.2	Isolationskit (Biozym)	124
4.1.16	Transformation von <i>A.thaliana</i> mittels <i>floral dipping</i>	124
4.1.17	Transiente Transformation von Tabakpflanzen mit <i>A. tumefaciens</i>	125
4.1.18	Aktivitätsassay mit dem fluorogenen Substrat Cbz-FR-AMC	126
4.2	Yeast Two-Hybrid Interaktionscreen	127
4.2.1	Verwendete Hefe-Stämme und ihre Kultivierung	127
4.2.2	Minipräparation genomischer DNA aus Hefe	129
4.2.3	Transformation von <i>S.cerevisiae</i> mit rekombinanter DNA	129
4.2.4	Bestimmung der Interaktion im Yeast Two-Hybrid Interaktionscreen	131
4.2.4.1	Selektion und Bestimmung des Wachstumsphänotyps („Tüpfeltest“)	131
4.2.4.2	$\beta$ -Galacosidase-Assay	131
4.2.5	Transformation von <i>P. pastoris</i> mit rekombinanter DNA	132
4.3	Proteinbiochemische Methoden	133
4.3.1	Ermittlung der Expressionsbedingungen für eine optimale Proteinausbeute in <i>E.coli</i>	133

4.3.2	Proteinexpression in <i>E.coli</i> .....	134
4.3.3	Herstellung eines Proteinrohextrakts ( <i>E.coli</i> ) .....	134
4.3.4	Proteinexpression in <i>P. pastoris</i> .....	134
4.3.5	Herstellung eines Proteinrohextrakts ( <i>P.pastoris</i> ) .....	135
4.3.6	Herstellung eines Proteinrohextrakts ( <i>N.tabacuum</i> ) .....	135
4.3.7	Aufreinigung von nativen Proteinen mittels His-Tag .....	136
4.3.8	Aufreinigung von denaturierter DEG15 mittels His-Tag .....	136
4.3.9	Rückfaltungsexperimente mit denaturierter DEG15.....	137
4.3.9.1	Rückfaltung des an Ni-TED-Matrix gebundenen Proteins.....	137
4.3.9.2	Rückfaltung durch schnelles Verdünnen .....	138
4.3.9.3	Ermittlung der optimalen Pufferzusammensetzung über Algorithmus .	138
4.3.10	Aufreinigung der DEG15 über Säulenchromatographie (DEAE, Hydroxyapatit) .....	139
4.3.11	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	140
4.3.12	Coomassie-Färbung .....	142
4.3.13	Silberfärbung (Blum, 1987).....	142
4.3.14	Western Blot .....	143
4.3.15	Immunologische Detektion.....	143
4.3.16	Verwendete Antikörper.....	144
4.3.17	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	144
4.3.17.1	Bradford.....	145
4.3.17.2	2-D-Quant-Kit (GE-Healthcare).....	145
4.3.18	Bestimmung der proteolytischen Aktivität .....	145
4.4	Chemikalien und Geräte .....	146
4.4.1	Geräte.....	146
4.4.2	Chemikalien .....	147
4.4.3	Enzyme .....	147
4.5	Oligonukleotide .....	147
4.6	<i>In silico</i> -Analysen.....	150
<b>5</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>151</b>
5.1	Alignment der DEG-Proteasen für die phylogenetischen Analyse.....	151
5.2	Alignment pflanzlicher DEG15 .....	161
5.3	Verwendete DNA- und Protein-Standarts .....	168
5.4	Klonierungsstrategien .....	169
5.4.1	DEG15 Volllänge und Deletionskonstrukte in planta.....	169

5.4.2	DEG15 Volllänge und Deletionskonstrukte für <i>Yeast-Two-Hybrid</i> <i>Interaktionsscreen</i> .....	180
5.4.3	DEG15-T7-6xHis-Tag und DEG15-6xHis-Tag zur Überexpression in <i>E.coli</i> .....	193
5.5	Verwendete Rückfaltungspuffer.....	196
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>198</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>218</b>

## Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyssäure
<i>A.t.</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AOX	Alkohol-Oxidase-Promotor
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BAP	6-Benzylamino-9-methylpurin
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Cam	Chloramphenicol
CaMV	Blumenkohl-Mosaikvirus ( <i>Cauliflower mosaic virus</i> )
Cbz-FR-AMC	N-benzoyl-carbonyl-Phe-Arg-7-amino-4-methylcoumarin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CML3	<i>Calmodulin-like-protein 3</i>
Col	Ökotyp Columbia
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
C-Term	Carboxylterminus
DAB	Diaminobenzidin
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5-Triphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
et al.	und andere (lateinisch)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FA	Formaldehyd
FG	Frischgewicht
fl N <sub>2</sub>	Flüssiger Stickstoff
Gly	Glycin
gMDH	Glyoxysomale Malatdehydrogenase
GSH	Glutathion
GUS	β-D-Glucuronidase
h	Stunde(n)
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethanesulfonic acid]
Hygr	Hygromycin

IAA	Indol-3-Essigsäure
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
LB	Luria-Bertani Nährmedium
LD	<i>loading dye</i>
LiAc	Lithiumacetat
LMW	<i>Low molecular weight</i>
M	mol/l
MeOH	Methanol
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
mQ	milliQ-destilliertes Wasser
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
N-Term	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pI	Isoelektrischer Punkt
PTS1	Peroxisomales Targeting Singal 1
PTS2	Peroxisomales Targeting Singal 2
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Minimalmedium ( <i>S.cerevisiae</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TBS	<i>tris bufferd saline</i>
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
ÜN	über Nacht
Verd.	verdaut
Vgl.	Vergleich
WT	Wildtyp
Y2H	<i>Yeast Two-Hybrid</i>
Y3H	<i>Yeast Three-Hybrid</i>
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
z.B.	zum Beispiel

## Zusammenfassung

Die glyoxysomale *processing*-Protease (GPP), die für die Abspaltung der Präsequenz der PTS2-Enzyme verantwortlich ist, liegt in einem  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigem Gleichgewicht aus Monomer und Dimer vor. Die aus Wassermelone gereinigte GPP reagiert mit Antikörpern gegen die peroxisomale DEG15-Protease aus Arabidopsis. Eine *knock-out* Mutante der AtDEG15 ist in der Abspaltung der pre-Sequenz peroxisomaler Matrix-Enzyme gestört. Für die Prozessierung der PTS2-Enzyme ist das Dimer verantwortlich, während das Monomer *in vitro* generell degradierende Wirkung zeigt. Das Gleichgewicht wird durch Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  in Richtung Dimer verschoben, ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Entzug begünstigt dagegen die monomere Form der DEG15 (Helm et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Dimerisierung der AtDEG15 über ein Yeast 2 Hybrid-System bestätigt, die Regulierung des Gleichgewichtes analysiert und die Domänen-Struktur der DEG15 über ihre Prozessierungs-Aktivität *in planta* untersucht.

Die ermittelte Dimerisierung der GPP konnte über ein Yeast 2 Hybrid-System für die DEG15 aus Arabidopsis bestätigt werden. Anhand von Deletions-Konstrukten, die auf ihre Dimerisierungs-Fähigkeit getestet wurden, konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus der Protease an der Dimerisierung beteiligt ist. Der C-Terminus und der Pflanzen-spezifische *loop* innerhalb der Protease-Domäne besitzen dagegen keinen Einfluss auf die Dimerisierung der AtDEG15.

Die Regulierung des Gleichgewichtes der DEG15 zwischen Monomer und Dimer über Calcium lassen eine Calmodulin-Bindung der Protease vermuten. Rekombinant exprimierte denaturierte AtDEG15 bindet spezifisch in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an Calmodulin-Sepharose und kann sowohl mit käuflichem Rinder-Calmodulin, als auch mit rekombinant exprimiertem pflanzlichen peroxisomalen Calmodulin-like-Protein 3 (CML3) von der Calmodulin-Sepharose eluiert werden. Die Bindung von Calmodulin an AtDEG15 konnte im Y2H-System bestätigt und die Calmodulin-Bindungsstelle ermittelt werden. Die ersten 25 Aminosäuren des N-Terminus der AtDEG15 bilden eine amphiphile Helix, die für die Bindung des Calmodulins verantwortlich ist. In einem Y3H, indem neben den zwei Interaktionspartnern noch ein weiteres Protein gezielt exprimiert werden kann, wurde gezeigt, dass die Anwesenheit von Calmodulin die Dimerisierung der AtDEG15 fördert.

Deletionskonstrukte der AtDEG15 wurden *in planta* auf ihre Fähigkeit zur Prozessierung der PTS2-Enzyme analysiert. Mit den Deletionskonstrukten komplementierte *knock-out*

Mutanten der DEG15 wurden auf die Prozessierung der pre-gMDH untersucht. Nur Voll-längen AtDEG15 ist in der Lage die pre-gMDH zur reifen Untereinheit zu prozessieren.

Über verschiedene *in silico* Untersuchungen der DEG15 konnte gezeigt werden, dass sich die DEG15 aufgrund ihrer Sequenz und ihrer Struktur deutlich von den übrigen Vertretern der Familie der DEG-Proteasen unterscheidet. Diese Unterschiede wurden besonders anhand der phylogenetischen Untersuchungen der DEG15 aus verschiedenen Organismen deutlich. Die untersuchten DEG15 unterschieden sich deutlich von den übrigen DEG-Proteasen aus *A. thaliana*. Die Gruppe der DEG15-Vertreter gliederte sich dabei auf in eine Gruppe aus pflanzlichen DEG15 und in eine Gruppe, die die DEG15 aus Säugern und mehrzelligen Schleimpilzen enthält. Innerhalb der pflanzlichen DEG15 konnte eine weitere Aufgliederung in Monokotyledonen und Dikotyledonen festgestellt werden. *Physcomitrella patens*, grenzt sich als einziger Vertreter der Moose von diesen beiden Untergruppen der pflanzlichen DEG15 ab.

Neben der phylogenetischen Untersuchung wurde ein Alignment der pflanzlichen DEG15 Proteine und eine Struktur-Model der AtDEG15 erstellt. Das Alignment zeigte einen auffällig hohen Gehalt an Glycinen und Prolinen der DEG15 und eine dadurch bedingte hohe strukturelle Flexibilität der Protease. In dem erstellten Struktur-Model werden darüber hinaus Teilbereiche der AtDEG15 als ungeordnet erkannt, was auf eine funktionelle Diversität schließen lässt.



## Summary

The glyoxysomal processing protease (GPP) removes the pre-sequence of peroxisomal PTS2-enzymes. It occurs in a bi-functional equilibrium as monomer and dimer, the latter functioning as the processing protease, while the monomer exhibits a general degrading proteolytic activity *in vitro*. Specific antibodies against the peroxisomal DEG-protease from Arabidopsis (AtDEG15) interact with the purified watermelon GPP. A knock-out mutation in the DEG15 gene of Arabidopsis abolishes the processing of the pre-sequence of the peroxisomal PTS2-matrix enzymes. The equilibrium is shifted upon  $\text{Ca}^{2+}$  removal toward the monomer and upon  $\text{Ca}^{2+}$  addition toward the dimer (Helm et al., 2007).

In this work, the dimerization of the AtDEG15 was confirmed in a yeast two-hybrid system, the regulation of the detected equilibrium was analyzed and the processing-activity in planta explored by variation with the domain-structure of AtDEG15.

The dimerization of GPP could be verified for the DEG15 from Arabidopsis in a yeast two-hybrid system. Deletion-constructs of AtDEG15 were analyzed for their ability to dimerize. With this approach it could be shown, that the N-terminal part of the AtDEG15 is required for dimerization. In contrast the C-terminus and the plant-specific loop within the protease-domain have no effect on dimerization of AtDEG15.

The  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated regulation of the equilibrium between monomer and dimer of the AtDEG15 suggest a calmodulin-binding of the protease. Recombinantly expressed, denatured AtDEG15 binds specific to calmodulin-Sepharose in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ . AtDEG15 could be eluted from calmodulin-Sepharose with purchasable bovin calmodulin and with recombinantly expressed peroxisomal calmodulin-like-protein 3 (CML3). In a yeast two-hybrid system the calmodulin-binding of AtDEG15 was ascertained and the calmodulin-binding-site identified. The first 25 amino acids of the N-terminus form an amphiphilic helix, which is responsible for calmodulin-binding of AtDEG15. When calmodulin was expressed additionally to the interacting AtDEG15-molecules in a Y3H experiment the dimerization of AtDEG15 was enhanced.

Deletions of the AtDEG15 were analyzed in planta for their ability to process the N-terminal pre-sequence of peroxisomal matrix-enzymes. The *deg15*-knock-out mutant was transformed with AtDEG15 deletions and with the transformants processing of pre-gMDH

analyzed. Only the AtDEG15 full-length protein was able to process the pre-gMDH to its mature subunit.

By various *in silico* investigations AtDEG15 was shown to differ from other DEG-proteases by their amino acid-sequence and their protein-structure. These differences became obvious in phylogenetic trees of DEG15s from different organisms. Additional DEG-proteases from Arabidopsis were included in this phylogenetic tree and separated from the here investigated DEG15. The DEG15 enzymes divided in two groups. One group represent DEG15 of plant, the other group those of mammals and cellular slime molds. Also among plant DEG15 enzymes substantial differences are observed between monocotyledons and dicotyledons. *Physcomyrella patens* harbors unique structured enzymes. The primary and secondary structure variability uncovered indicates numerous functionalities, to be explored. For this speaks a structural model with its high content of glycins and pro-lins permitting high flexibility for adapting to different protein domains. Additionally, several unstructured domains suggest functional diversity.

# 1 Einleitung

## 1.1 Peroxisomen

Peroxisomen sind Zellorganellen, die ubiquitär in Eukaryonten vorkommen und dort eine Vielzahl lebensnotwendiger Funktionen übernehmen. Aufgrund der hohen Variabilität biochemischer Funktionen, die die Peroxisomen einnehmen können, werden sie auch als „multifunktionelle“ Organellen bezeichnet. Peroxisomen ändern in Abhängigkeit ihres Stoffwechselweges ihre Anzahl, Form und Proteinzusammensetzung und damit auch ihre biochemischen Funktionen, wodurch eine flexible Anpassung ermöglicht wird (Nunnari und Walter, 1996). Peroxisomen lassen sich in Glyoxysomen, Blatt-Peroxisomen, Peroxisomen bei der Bildung von Wurzelknöllchen und *unspecialized peroxisoms* (Breidenbach et al., 1968), die Glycosomen der Trypanosomen (Van der Bosch et al., 1992) und die worin-bodies in *Neurospora crassa* (Jedd et al., 2000) unterteilen. Peroxisomen sind -anders als Chloroplasten und Mitochondrien- von einer einfachen Lipidmembran umgeben. Da Peroxisomen keine DNA und keine Ribosomen besitzen, werden ihre Proteine kernkodiert und posttranslational importiert.

### 1.1.1 Stoffwechselabläufe in Peroxisomen

In den Peroxisomen führen verschiedene Stoffwechselwege zur Bildung von Wasserstoffperoxid. Der Abbau dieser für die Zelle toxischen Verbindung durch die Katalase, die gleichzeitig das mengenmäßig am stärksten vertretene Enzym in den Peroxisomen darstellt, wurde als einer der charakteristischen Prozesse für die Peroxisomen identifiziert (Baudhuin et al., 1965). Daher war die Entdeckung einer Wasserstoffperoxid-produzierenden Oxidase und einer Peroxid-zersetzenden Katalase durch DeDuve und Baudhuin 1966 gleichzeitig namensgebend für die Zellorganellen. Neben diesem  $H_2O_2$ -Metabolismus findet in den Peroxisomen vor allem die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren statt, aber auch die Plasmalogen-, Cholesterin- und Gallensäurebiosynthese, sowie der Prostaglandinstoffwechsel der Säuger (Hajra und Bishop, 1982; Biardi und Krisans 1996), der Glyoxylatzyklus Höherer Pflanzen (Breidenbach und Beevers 1967) und die Penicillinbiosynthese einiger Niederer Pilze (Müller et al., 1991).

### 1.1.1.1 Glyoxysomale Fettmobilisierung

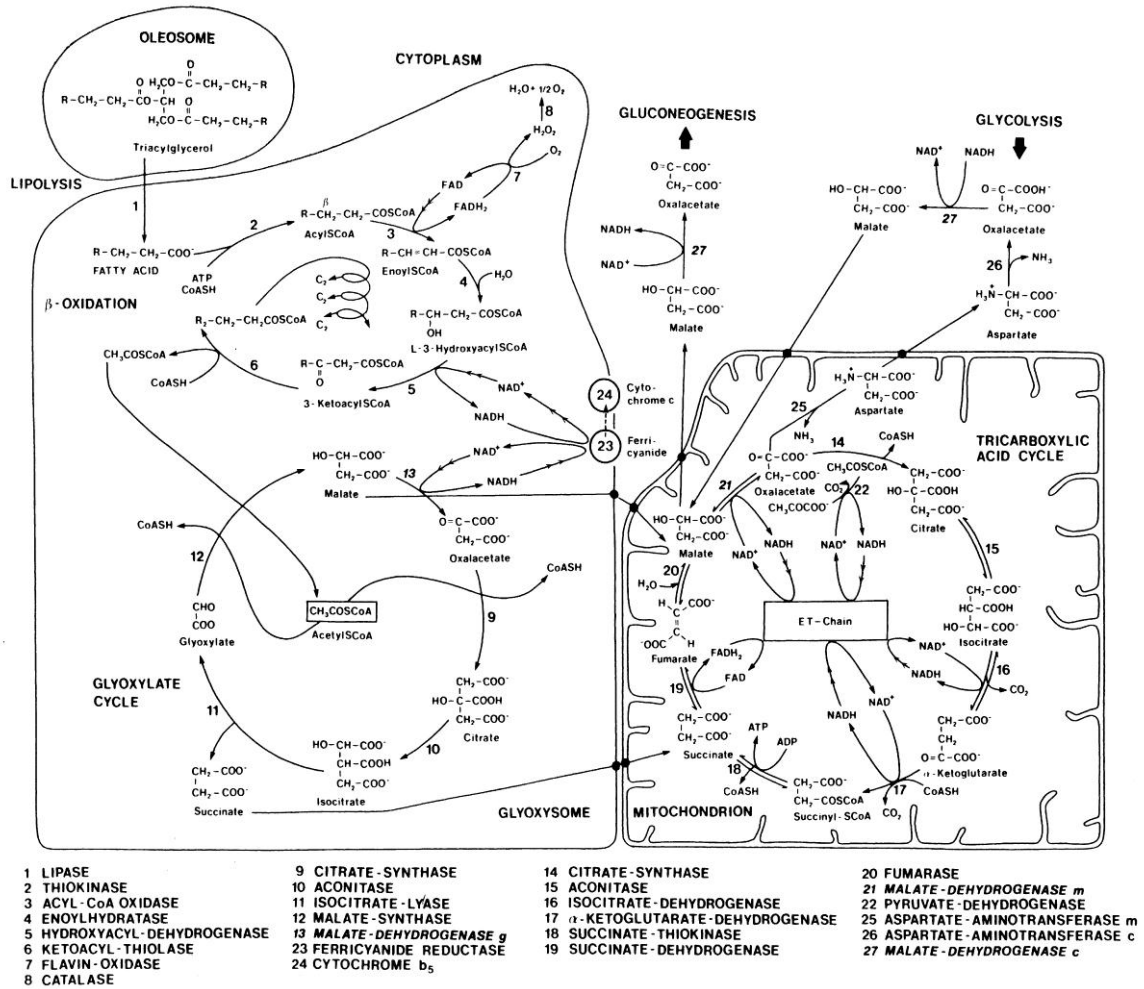
Glyoxysomen übernehmen sowohl während der Keimung als auch bei der Seneszenz von Pflanzen wichtige Aufgaben und stellen aufgrund ihrer speziellen Funktion eine eigenständige Gruppe der Peroxisomen dar. Die Glyoxysomen sind während der Keimung an der Mobilisierung von Speicherfetten, beteiligt, wodurch es der Pflanze ermöglicht wird, bis zum Erreichen der Photoautotrophie zu wachsen. Maßgeblich für diese Mobilisierung von Reservestoffen ist dabei der sogenannte Glyoxylat-Zyklus, nach dem die Glyoxysomen benannt wurden.

Die Speicherfette werden als Triglyceride im endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und im Zuge der Abknospung vom ER mit einer Phospholipidmembran umgeben, so dass sich Ölkörper von etwa 1µm Durchmesser bilden, die der Speicherung dienen (Huang, 1996). Als ersten Schritt der Fettmobilisierung werden die Triglyceride aus diesen Ölkörpern durch Membran-lokalisierte Lipasen in Fettsäuren und Glycerin gespalten. Die Fettsäuren werden anschließend in den Glyoxysomen schrittweise abgebaut.

Die freien Fettsäuren werden in der  $\beta$ -Oxidation (Abb.1) zu Acyl-CoA-Einheiten zerlegt. Dabei erfolgt zunächst eine Veresterung mit dem Coenzym A am Carboxy-Terminus der Fettsäuren. Diese Ester werden durch eine Acyl-CoA-Oxidase unter Mitwirkung des FAD-Coenzym reduziert, im Anschluss hydratisiert und in Gegenwart von  $\text{NAD}^+$  oxidiert. In einem letzten Schritt der  $\beta$ -Oxidation wird durch eine Thiolase der C2-Körper Acetyl-CoA abgespalten, der in den Glyoxylat-Zyklus einfließt und aus dem letztendlich der C<sub>4</sub>-Körper Succinat gebildet wird.

Dabei ist der erste Schritt identisch zu dem des Citratzyklus. Es wird ein Molekül Acetyl-CoA an Oxalat gebunden, wodurch Citrat gebildet wird. Diese Reaktion wird katalysiert durch das Enzym Citratsynthase. Das Citrat wird durch Aconitase in Isocitrat überführt, welches in einem Folgeschritt durch Isocitratlyase in Succinat und Glyoxylat gespalten wird. In einem weiteren Schritt wird durch Malatsynthase ein weiteres Molekül Acetyl-CoA angehängt und somit Malat gebildet. In einem letzten Schritt des Glyoxylat-Cyclus wird Malat durch eine Malatdehydrogenase zu Oxalacetat oxidiert, wobei NADH gewonnen wird.

Von den fünf Enzymen, die am Glyoxylat-Zyklus beteiligt sind, kommen die Isocitratlyase und die Malatsynthese ausschließlich in den Glyoxysomen vor, sie dienen damit auch als Markerenzyme für Glyoxysomen.

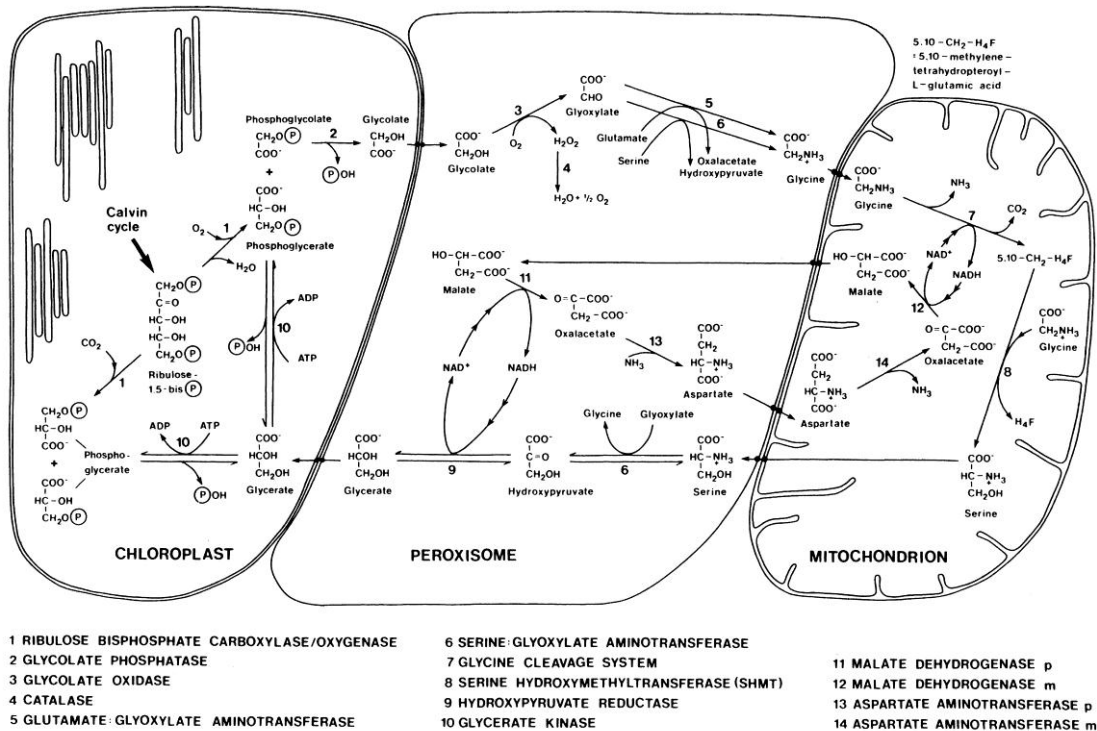


**Abbildung 1:  $\beta$ -Oxidation:** Reaktionen und Transport der Zwischenprodukte bei der Umwandlung von Fettsäuren in Saccharose im Verlauf der Keimung von fettspeichernden Samen (entnommen aus Gietl, 1992; Copyright (1992) Biochimica et Biophysica Acta).

### 1.1.1.2 Photorespiration in den Blatt-Peroxisomen

Bei der Photorespiration handelt es sich um einen Prozess, der zumindest in Teilen der CO<sub>2</sub>-Fixierung der Photosynthese gegenläufig ist. Das Schlüsselenzym der Photosynthese, die Ribulosebiphosphat-Carboxylase (RuBisCo) nutzt Kohlendioxid, um Ribulose-1,6-bis-Phosphat zu bilden. Dieser in den Chloroplasten ablaufende Prozess wird als Calvin-Zyklus bezeichnet. Bei niedrigem CO<sub>2</sub>-Partialdruck kann das Enzym aber auch Sauerstoff umsetzen, wodurch das toxische Photosynthesenebenprodukt Glykolat entstehen. Glykolat wird aus den Chloroplasten in die Peroxisomen transportiert, wo in einem ersten Schritt des Glykolat-Weges das Glykolat zu Glyoxylat oxidiert wird. Dies geschieht unter der Umsetzung von Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid. In einem nächsten Schritt wird Glyoxylat zu Glycin transaminiert und in die Mitochondrien transferiert. Bei Belichtung und unter Aufnahme von Sauerstoff entstehen in den Mitochondrien aus zwei Molekülen Glycin Serin und Kohlenstoffdioxid. Das Serin wird wieder in die Peroxisomen importiert, dort zu Hydroxypyruvat desaminiert, zu Glycerat reduziert und nach erfolgter Phosphorylierung wieder dem Calvin-Zyklus in den Chloroplasten zugeführt. Der Mechanismus der Photorespiration sorgt somit dafür, dass das durch die Rubisco gebildete Phosphoglykolat zu 75% zurückgeführt wird und somit dem Calvin-Cyclus wieder als C<sub>3</sub>-Körper zur Verfügung steht.

Der Nutzen, den die Pflanze aus der Photorespiration zieht, ist ein Schutz des Photosyntheseapparates vor „Überenergetisierung“. Bei hoher Sonneneinstrahlung schließt die Pflanze die Stomata, wodurch es in der Pflanze zu einem CO<sub>2</sub>-Mangel und folglich zum Erliegen des Calvin-Zyklus kommt, während die Photosynthese aber ungehindert weiter läuft. dadurch kommt es zu einem Mangel an NADP und ADP und zu einer Akkumulation gebildeter Elektronen. Diese Elektronen bilden Radikale, welche die Photosysteme schädigen und Chlorose in den Blättern hervorrufen. Durch die Photorespiration wird Energie in Form von ATP und NADPH verbraucht und es können wieder Elektronen auf die Reduktionsäquivalente übertragen werden.



**Abbildung 2: Photorespiration in den Blatt-Peroxisomen:** Reaktionen, Kompartimentierung und Transport der Zwischenprodukte des Glycolat-Weges (entnommen Gietl, 1992; Copyright (1992) Biochimica et Biophysica Acta).

### 1.1.1.3 Weitere Stoffwechselabläufe

Sauerstoffradikale und andere oxidativ wirksame Sauerstoffspezies wie z.B. Wasserstoffperoxid oder Stickoxide werden ständig durch verschiedene Vorgänge, wie z.B. die Photorespiration, die mitochondrialen Elektronentransportkette, aber auch durch das Auslösen der Signalkaskade in Folge eines Pathogenbefalls der Pflanzenzelle, in allen Kompartimenten der Zelle gebildet. Sie sind in hohem Maße zell- und gewebschädigend, besitzen darüber hinaus aber auch physiologische Funktionen, z.B. Signal- oder Abwehrfunktion, und nehmen an einer Vielzahl von Reaktionen teil. In intakten Zellen liegt daher ein Gleichgewicht an pro-oxidativen und anti-oxidativen Systemen vor, welches durch die Entgiftung der Oxidantien durch verschiedene differenzierte Mechanismen aufrecht erhalten wird. So werden beispielsweise bei verschiedenen Reaktionen in der pflanzlichen Zelle durch eine

Reihe unterschiedlicher Oxidasen Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen und dadurch  $H_2O_2$  generiert. Ein Großteil dieser Flavin-abhängigen Oxidasen ist in den Peroxisomen lokalisiert, wo sie  $H_2O_2$  bilden, wie z.B. die Acyl-CoA-Oxidasen der  $\beta$ -Oxidation (Eastmond et al., 2000), die Glycolat-Oxidase (Andrews, 1971) oder die Aminoxidasen (Medda et al., 1996). In den Glyoxysomen entsteht  $H_2O_2$  darüber hinaus auch durch die Disproportionierung freier Superoxid-Radikale (Bueno et al., 1995). Um oxidative Schäden zu vermeiden, muss das  $H_2O_2$  an Ort und Stelle entfernt werden. Diese Aufgabe übernimmt in den Peroxisomen die Katalase, die  $H_2O_2$  abbaut und dabei Wasser und Sauerstoff bildet (Mc Clung 1997; Willekens et al., 1997).

Neben  $H_2O_2$  werden in den Peroxisomen durch eine Xanthin-Oxidase (del Rio et al., 1992) und eine membranständige NADH-Dehydrogenase (Donaldson et al., 1987) Superoxid-Radikale freigesetzt, die von einer Superoxid-Dismutase entgiftet werden (del Rio et al., 1998). Ein weiteres System in den Peroxisomen, durch das Oxidantien abgebaut werden können, ist der Ascorbat-Glutathion-Zyklus (Bunkelmann und Trelease 1996). Peroxisomen kompensieren aber nicht nur oxidativen Stress durch den Abbau der Oxidantien, sondern spielen auch bei der Seneszenz der Pflanze eine entscheidende Rolle. Bei diesen Seneszenz-Vorgängen kommt es zu einer gezielten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, die eine Autolyse der Zelle hervorrufen, die letztendlich zum Absterben der Zelle führt (Buchanan-Wollaston, 1997; del Rio et al., 1998).

Neben den bekanntesten Funktionen der Peroxisomen, der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren und dem Abbau von  $H_2O_2$ , sind die Organellen am Stickstoff-Metabolismus (Huang et al., 1983), am Purin-Metabolismus (Schubert, 1986), der Synthese der Phytohormone Jasmonsäure und Auxin (Feussner und Wasternack 2002; Stintzi und Browse, 2000), und dem Abbau verzweigter Aminosäuren (Zolman et al., 2001; Lange et al., 2004) beteiligt. Darüber hinaus werden ihnen verschiedenste Aufgaben in der Entwicklung, Differenzierung und Morphogenese sowohl in pflanzlichen als auch in tierischen Zellen zugeschrieben. Peroxisomen sind beispielsweise an der Produktion von Signal-Lipiden wie Phytansäure und langkettigen Fettsäuren beteiligt (Desvergne und Wahli, 1999). Diese steuern eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren im Kern (Kersten et al., 2000) oder sind an der Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies und NO beteiligt (Corpas et al., 2001), die ebenfalls als Botenstoffe fungieren können und die Transkription von peroxisomalen Genen regulieren (Lopez-Huertas et al., 2000).



### 1.1.2 Peroxisomaler Matrixproteinimport

Peroxisomen sind im Gegensatz zu Chloroplasten und Mitochondrien von einer einfachen Membran umgeben und beinhalten weder DNA, noch Ribosomen. Dies hat zur Folge, dass alle peroxisomalen Proteine vom Kern kodiert sind, an freien cytosolischen Ribosomen translatiert werden und aus dem Cytosol in die Peroxisomen importiert werden müssen (Lazarow und Fujiki, 1985). Der Import der peroxisomalen Proteine macht zum einen spezielle Signalsequenzen nötig, die die Proteine in das Organell leiten. Diese Signalsequenzen werden in den Peroxisomen als *peroxisomal targeting signal* (PTS) bezeichnet.

Es konnten bislang zwei konservierte Motive identifiziert werden, die für einen Proteinimport in die Peroxisomen verantwortlich sind. Das erste als PTS1 bezeichnete *peroxisomal targeting signal* ist am Carboxyl-Terminus der peroxisomalen Proteine lokalisiert und wurde als ein konserviertes Tripeptid mit der Consensus-Sequenz (S/A/C)(K/R/H)(L/M) definiert (Gould et al., 1989). Dieses Tripeptid wurde sowohl in Hefen, als auch in Pflanzen, Insekten und Säugern identifiziert und die unterschiedlichen Signale für den Import peroxisomaler Proteine werden von den unterschiedlichen Organismen gleichermaßen erkannt, was zu der Hypothese führte, dass der Mechanismus des Proteinimports in die Peroxisomen während des Prozesses der Evolution konserviert blieb (Gould et al., 1990). Das PTS1 ist verantwortlich für den Import der Mehrzahl an peroxisomalen Proteinen und es konnte gezeigt werden, dass für einen korrekten Import der peroxisomalen Matrixproteine mitunter zusätzliche Aminosäuren vor dem SKL, bevorzugt Leucin und Valin, eine Rolle spielen (Brocard and Hartig, 2006). In einer Genomanalyse in *Arabidopsis* wurden bislang etwa 220 Proteine gefunden, die ein PTS1-Signal tragen und damit in den Peroxisomen lokalisiert sind (Reumann et al., 2004). Im Gegensatz zu dem ebenfalls bekannten PTS2 wird das PTS1 nach dem Import in die Peroxisomen nicht prozessiert, es gibt aber dennoch eine Reihe von PTS1-Enzymen, die hoch selektiv und strikt limitiert gespalten werden. Es konnte gezeigt werden, dass bei Menschen und Nagern die PTS1 tragende Acyl-CoA-Oxidase (Acox), die Hydroxysteroid-Dehydrogenase (HSD17b4) und ein Sterol-carrier-Protein (Scp2) in der Peroxisomen-Matrix selektive Spaltungen durchlaufen und dass das selbe Enzym, das für die Prozessierung des PTS2 verantwortlich ist auch diese Spaltungen der PTS1-Enzyme bewirkt (Otera et al., 2001; Liz und Sousa, 2005). In Menschen wurde das Enzym Tysnd1 als Prozessierungs-Protease identifiziert (Kurochkin et al., 2007). Es wurde gezeigt, dass es neben der Prozessierung der PTS2 Enzyme auch zu einer Spaltung

der PTS1 Enzyme und zu einer spezifischen „Selbstprozessierung“ der Tysnd1 kommt (Kurochkin et al., 2007). Dabei wird ein Ala-Ala-Pro-Motiv nahe der Schnittstelle der PTS1 Enzyme (Hijikata et al., 1987; Leenders et al., 1994; Mori et al., 1991) von Tysnd1 erkannt. Die Funktion, die hinter der Spaltung mancher PTS1-Enzyme steht, bleibt bisher ungeklärt; es wird jedoch angenommen, dass es sich um regulatorische Mechanismen handelt, die eine Aktivierung bzw. Inaktivierung der prozessierten PTS1-Enzyme bewirken (Kurochkin et al., 2007).

Neben dem PTS1-Signal wurde eine weitere, am Amino-Terminus der peroxisomalen Matrixproteine lokalisierte Signal-Sequenz identifiziert, die als PTS2 bezeichnet wird. Dieses Importsignal ist weit weniger verbreitet als das PTS1-Signal, in *A. thaliana* sind beispielsweise 74 PTS2-tragende Proteine bekannt (Kamada et al., 2003) und in *S.cerevisiae* trägt die Thiolase als einziges Enzym ein PTS2 (Marzioch et al., 1994). Trotz dieser „Unterrepräsentation“ der PTS2-tragenden Enzyme, besitzen alle höheren Eukaryonten mindestens ein PTS2-Enzym. Die einzige Ausnahmen stellt *Caenorhabditis elegans* dar, dem der PTS2-vermittelte Import von peroxisomalen Matrixproteinen vollständig fehlt (Motley et al., 2000). Die Signalsequenz des PTS2 besteht aus einem Nonapeptid mit der Consensus-Sequenz (R/K)(L/I/V)X<sub>5</sub>(H/Q)(L/A) (Lazarow, 2006). Dieses Importsignal wird, anders als das PTS1, in Höheren Eukaryonten nach erfolgtem Import in die Peroxisomen abgespalten, wobei die Abspaltung der Signal-Sequenz kaum Einfluss auf die Aktivität bzw. Funktionalität der PTS2-tragenden Enzyme zu nehmen scheint (Gietl et al., 1994; Kato et al., 1996). In Niederen Eukaryonten wie Hefen wird das PTS2 nicht abgespalten; es befindet sich am N-Terminus der reifen Untereinheit der Proteine. Die Abspaltung der Pre-Sequenz in Höheren Eukaryonten wie Pflanzen und Säugern erfordert das Vorkommen einer *processing*-Protease. Untersuchungen peroxisomaler Proteasen zeigen, dass in *A. thaliana* die DEG15-Protease die Prozessierung der PTS2-Enzyme übernimmt (Helm et al.; 2007).

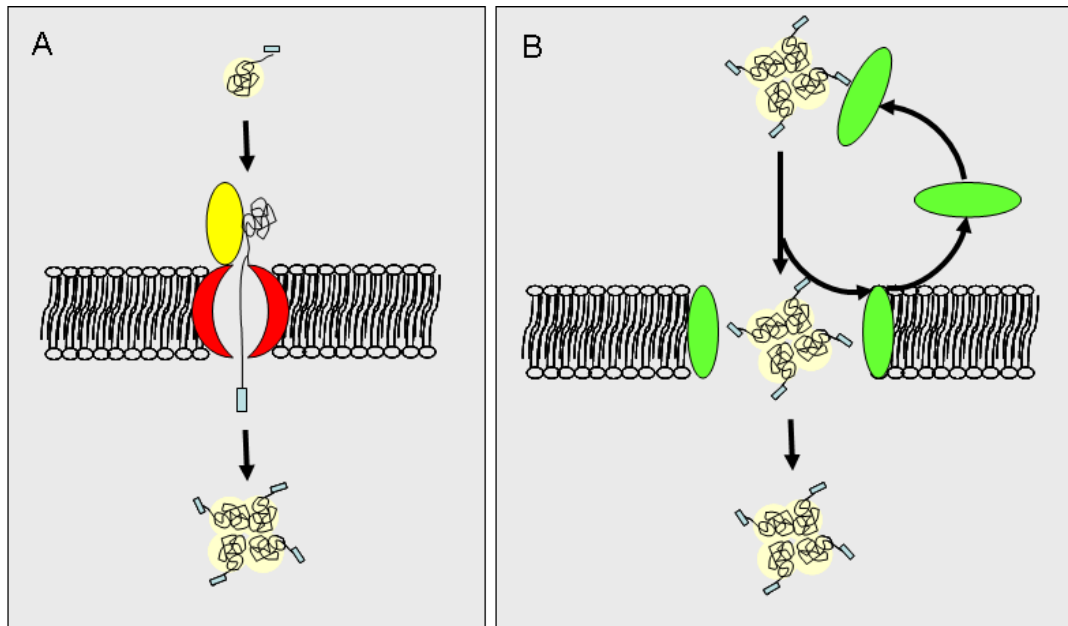
Neben Proteinen, die ein PTS1 oder PTS2 tragen, konnten auch Proteine in den Peroxisomen identifiziert werden, die keines der beiden beschriebenen Importsignale tragen, was auf die Existenz weiterer Signal-Sequenzen schließen lässt. So lieferten Importstudien der Acyl-CoA-Synthase aus *C. tropicalis* erste Hinweise auf Signalsequenzen, die innerhalb der Proteine lokalisiert sind. Das Protein enthält zwei interne Signal-Sequenzen, die dazu in der Lage sind, unabhängig voneinander Rezeptorproteine zu den Peroxisomen zu transportieren (Small et al., 1988). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass beispielsweise eine Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) oder eine Acyl-CoA-Oxidase (Aox) in einem

Komplex mit anderen PTS-tragenden Proteinen und den entsprechenden Rezeptoren in die Peroxisomen importiert werden, ohne selbst eine Importsequenz für die Peroxisomen zu besitzen (Mc New and Goodman, 1994; Titorenko et al., 2002). Bei Catalase und Malat-synthase aus *H. polymorpha* wurde eine direkte Interaktion mit PEX5 nachgewiesen, obwohl beide Proteine weder ein PTS1 noch ein PTS2 tragen (van der Klei und Veenhuis, 2002).

Neben den *targeting*-Signalen wird für den Proteinimport in die Peroxisomen eine Transport-Maschinerie nötig, die diese Signal-Sequenzen spezifisch erkennt und die Proteine im Anschluss in die Peroxisomen transportiert. Proteine die an dieser Peroxisomen-Biogenese beteiligt sind werden als „PEX-Proteine“ bezeichnet. Der Mechanismus, der hinter diesem Proteinimport steht, kann in verschiedene Schritte untergliedert werden. Der erste Schritt des Proteinimports ist dabei die Erkennung der peroxisomalen Proteine im Cytosol durch die spezifischen Rezeptoren PEX5 und PEX7, die die *cargo*-Proteine zur peroxisomalen Membran leiten. PEX5, das als Rezeptor für die Proteine mit einem peroxisomalen *targeting* Signal 1 (PTS1) in löslicher Form im Cytosol vorliegt, wandelt sich dabei während des Proteinimports in die Peroxisomen zu einem peroxisomalen Membranprotein um, wobei der C-Terminus von PEX5, auf dem die PTS1-Bindedomäne lokalisiert ist, innerhalb der Peroxisomen-Matrix liegt (Gouveia et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass ein Membranproteinkomplex aus dem Importrezeptor Pex5p und den Dockingproteinen PEX13 und PEX14 einen dynamischen Kanal bilden, der in Abhängigkeit von der Größe des Rezeptor-*cargo*-Komplexes sehr schnell seine Öffnungszustände ändern kann (Meincke et al., 2010). Das Andocken des Rezeptor-Cargo-Komplexes an die Membran-gebundenen Proteine PEX13 und PEX14 ist der zweite Schritt des Proteinimportes in die Peroxisomen. Nach der Translokation des *cargo*-Proteins erfolgt die Dissoziation von Rezeptor und *cargo*-Protein. In einem letzten Schritt wird der Rezeptor wieder freigesetzt, ein als Recycling bezeichneter Vorgang, der Import-Zyklus kann nun von Neuem beginnen.

Der Proteinimport in die Peroxisomen unterscheidet sich grundlegend von dem in die Chloroplasten oder die Mitochondrien. Im Gegensatz zu dem Proteinimport in Chloroplasten oder Mitochondrien, für den die aus dem Cytosol zu importierenden Proteine entfaltet bleiben, werden in die Peroxisomen gefaltete Proteine und sogar Oligomere-Komplexe importiert (Abb.3). Das bedeutet, dass die Transportkanäle in der peroxisomalen Membran um ein Vielfaches größer sind, als in den übrigen Organellen. Ihre Größe ist abhängig von der Größe des importierten Proteins und kann einen Durchmesser von bis zu 9 nm erreichen

(Meinecke et al., 2010). Die Transportkanäle der Mitochondrien und Chloroplasten sind im Vergleich mit 1-2 nm um ein Vielfaches kleiner.



**Abbildung 3: Vergleich des Proteinimports in die Mitochondrien (A) und in die Peroxisomen (B).** (A): Für den Import in die Mitochondrien werden die Proteine entfaltet und dann schnurartig durch die Membran geleitet. Erst in den Mitochondrien erhalten die Proteine ihre räumliche Struktur (B): Peroxisomale Matrixproteine werden im Cytosol von Rezeptorproteinen erkannt und an die peroxisomale Membran geleitet, an der die Importrezeptoren zusammen mit anderen Komponenten der Importmaschinerie eine Pore ausbilden. Diese Pore existiert nur transient und erlaubt es den Proteinen, gefaltet und/oder als Komplex mit anderen Proteinen durch die Membran zu treten.

(abgeändert nach: Peroxisomaler Importkanal für Proteine kann sich bis 9nm weit öffnen (URL: <http://www.organische-chemie.ch/chemie/2010/mae/porxisomen.shtm>))

Es existieren unterschiedliche Modelle, wie Oligomer-Komplexe über die peroxisomale Membran importiert werden. Das erste Modell geht davon aus, dass durch die Bindung der oligomeren Proteine an die peroxisomale Membran spezifische Gruppen von Proteinen in den Transportkanal eingebaut werden, die rasch nach dem erfolgtem Proteinimport wieder in ihre Untereinheiten dissoziieren (McNew und Goodman 1994). Das zweite Modell geht davon aus, dass die Bindung der oligomeren Proteine an die peroxisomale Membran zu Einstülpungen dieser Membran führt und die Proteine letztlich in Form von vesikulären Strukturen in die Peroxisomen aufgenommen werden (McNew und Goodman 1996). In einem dritten Modell wird von der Annahme ausgegangen, dass oligomere Komplexe be-

reits im Cytosol aggregieren und als Vesikel abgesondert werden, die anschließend mit den Peroxisomen fusionieren (Teter et al., 1999).

## 1.2 Peroxisomale Proteasen

Proteasen sind Enzyme, die die Hydrolyse von Peptidbindungen katalysieren, also den Abbau von Proteinen bewirken. Sie kommen ubiquitär in allen Organismen vor und stellen durch den Verdau von nicht mehr benötigten oder beschädigten Proteinen dem Organismus die Aminosäurebausteine wieder zur Verfügung. Darüber hinaus nehmen Proteasen Einfluss auf die Regulation biologischer Prozesse, wie durch die sogenannte limitierte Proteolyse, bei der Transit- oder Signalpeptide von inaktiven Proteinen abgespalten werden und diese somit zu ihren reifen Untereinheiten prozessiert werden (Robinson et al., 2001). Der Prozess der regulierten Proteolyse spielt eine wichtige Rolle bei der Anpassung von Organismen an Stressbedingungen, bei der Sicherstellung der Proteinqualität und der Seneszenz in Pflanzen. Dabei unterliegt die proteolytische Aktivität jeder Protease einer Vielzahl spezifischer und selektiver Regulationsprozesse, um Schädigungen der Zelle zu verhindern.

Proteasen sind aber nicht nur am Abbau von Proteinen beteiligt, sondern steuern in der Zelle die Zusammensetzung von Komplexen und regulieren über posttranslationale Modifikationen die korrekte Faltung von Proteinen. Es gibt etliche Proteasen, die neben ihrer Proteasefunktion als Chaperon fungieren können (Spiess et al., 1999).

Eine *in silico* Analyse des Arabidopsis-Genoms auf mögliche peroxisomale Proteine identifizierte aufgrund eines C-terminalen PTS1 (SKL bzw. PKL) acht Proteasen (Reumann et al., 2004). Von diesen acht möglichen peroxisomalen Proteasen wurden zwei (At4g14570 und At4g36195) ebenfalls in *Proteomics*-Studien der Vakuole gefunden (Carter et al., 2004; Shimaoka et al., 2004), was zusammen mit dem nicht gesicherten PTS PKL (Reumann et al., 2004) darauf schließen lässt, dass diese beiden Proteasen nicht in den Peroxisomen lokalisiert sind. In einer Untersuchung des peroxisomalen Proteoms aus Arabidopsis-Flüssigkulturen konnten lediglich drei Proteasen identifiziert werden (Eubel et al., 2008), die ebenfalls aufgrund der *in silico* Analyse des Arabidopsis Genoms den Peroxisomen zugeordnet wurden (Reumann et al., 2004).

At1g28320 kodiert für DEG15, ein Protein von 76,1 kDa, bei dem es sich um eine Trypsin-ähnliche Serin-Protease mit der katalytischen Triade His-Asp-Ser (Chung und Goldberg,

2004) handelt. At2g41790 kodiert für ein Protein von 111 kDa, bei dem es sich um eine Insulinase handelt, deren Homologe aus Maus Zn-Metallopeptidasen der Pitrylsin-Familie mit dem für die Familie typischen, inversen HXXEH-Zinkbindemotiv darstellt (Rawlings et al., 2004; Roth, 2004). At5g47040 kodiert für ein Protein von 97,9 kDa, bei dessen Homologen aus *E.coli* es sich um eine Lon-Protease handelt, die ebenso wie die DEG15 zu den Serin-Proteasen gehört (Barrett et al., 2001), im Unterschied zu dieser aber ATP-abhängig ist und eine katalytische Diade Ser-Lys besitzt (Besche und Zwickl, 2004).

Die DEG15-Protease und die Lon2-Protease wurden neben der *in silico* Analyse des Arabidopsis Genoms (Reumann et al., 2004) und der Untersuchung des peroxisomalen Proteoms (Eubel et al., 2008) auch über GFP-Fusion und anschließende Detektion in den Peroxisomen lokalisiert (Schuhmann et al., 2008; Ostersetzer et al., 2007).

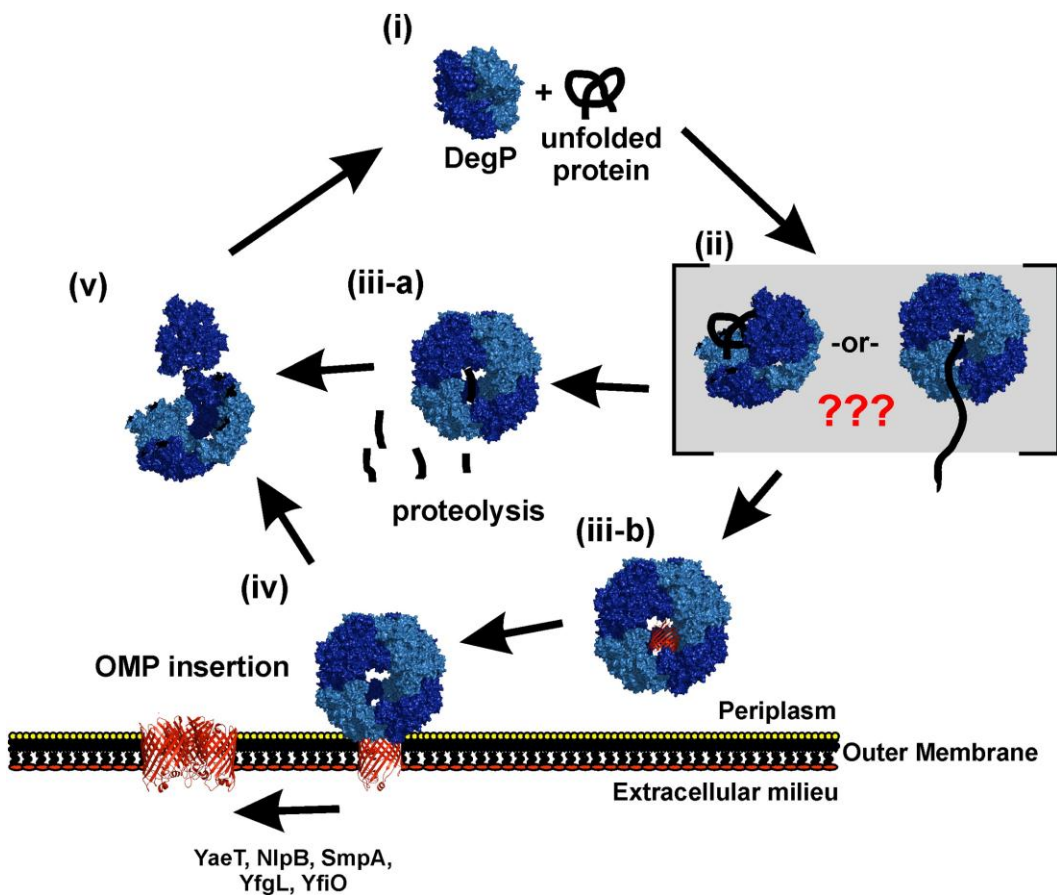
### **1.2.1 DEG15-Protease**

Die DEG15 gehört zur Familie der Deg/HtrA-Proteasen. Charakteristisch für diese Familie ist das Vorkommen einer Trypsin-ähnlichen Protease-Domäne. Damit gehören Vertreter dieser Familie zu den Serinproteasen und besitzen in den meisten Fällen eine oder mehrere PDZ-Domänen. Die PDZ-Domänen sind Interaktionsdomänen, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln. Innerhalb der Deg-Proteasen nehmen sie jedoch auch Einfluss auf die Aktivierung der Proteasen, da durch die C-terminale Bindung des Interaktionspartners an die PDZ-Domäne diese in eine konservierte Tasche der Protease-Domäne bindet und dadurch eine Konformationsänderung und letztlich eine Aktivierung der Protease-Domäne bewirkt (Hauske et al., 2009). Interessanterweise fehlen einigen pflanzlichen Deg-Proteasen diese PDZ-Domänen, wobei die funktionellen Auswirkungen für die Proteine noch unklar sind (Adam et al., 2001). Den Vertretern der Deg-Familie ist ein ungewöhnlicher Aktivierungsmechanismus gemein, der diese Proteasen von allen übrigen Serinproteasen unterscheidet und das große Interesse an den Deg-Proteasen begründet. Herkömmliche Serinproteasen werden proteolytisch prozessiert und erhalten dadurch ihre spezifische und „unveränderliche“ Aktivität. Im Gegensatz dazu ist es allen bis jetzt untersuchten Deg-Proteasen möglich, reversibel zwischen verschiedenen Zuständen zu wechseln und somit unterschiedliche Funktionen auszuüben oder zwischen aktiver und inaktiver Form zu wechseln (Hauske et al.; 2009).

DEG-Proteasen wurden bislang in allen Spezies gefunden, am besten untersucht und charakterisiert sind die Vertreter der Proteasefamilie aus bakteriellen Organismen, besonders aus *E. coli*. Weitgehend aufgeklärt sind hier Struktur und Funktionsweise der DegS und der DegP, die beide an der Proteinqualitätskontrolle im periplasmatischen Raum beteiligt sind. DegS wird durch die Bindung von fehllokalisierten Proteinen, die ins Periplasma gelangen, an den C-Terminus der Protease aktiviert und löst durch seine allosterische Aktivierung der Protease-Domäne eine Stressantwort des Systems und eine anschließende Signaltransduktion aus. Eine proteolytische Kaskade wird initiiert, die aus den Proteasen DegS, RseP und ClpXP besteht und letztendlich zur Freisetzung von RpoE führt. Diese RpoE bewirkt unter anderem eine vermehrte Expression von DegP (Ruiz und Silhavy, 2005). DegS dient somit über eine Regulierung der Transkription von stressassoziierten Genen als Stress-Sensor im Periplasma (Walsh et al., 2003; Wilken et al., 2004; Meltzer et al., 2008; Hauske et al., 2009) und wechselt zwischen aktiver und inaktiver Form.

DegP nimmt sowohl in Prokaryonten, als auch in Eukaryonten zwei Funktionen ein. Eine proteolytische Funktion, wobei die DegP-Expression unter Stressbedingungen, die zu einer vermehrten Produktion fehlgefalteter Proteine führen, hochreguliert wird (Ruiz und Silhavy, 2005), und eine Chaperon-Funktion, bei der DegP an der korrekten Faltung von Proteinen im Periplasma beteiligt ist (Spiess et al., 1999). Über röntgenkristallographische Untersuchungen wurde gezeigt, dass DegP als Hexamer auftritt, wobei dieses Hexamer aus zwei trimeren Ringen aufgebaut ist. Die beiden Trimere lagern sich mit ihren proteolytisch aktiven Domänen aneinander, während die beiden PDZ-Domänen der einzelnen DegP-Moleküle nach außen gerichtet sind (Krojer et al., 2002). Diese hexamere Form der DegP stellt die inaktive Form der Deg-Protease dar. Die aktive Form hingegen besteht aus 12 oder 24 DegP-Molekülen, also aus großen Multimeren (Krojer et al.; 2008), die sich erst aus den DegP-Trimeren in Anwesenheit ihrer physiologischen Substrate bilden. Als Substrate der DegP wurden vorwiegend die sogenannten *outer membran proteins* (OMPs) identifiziert (Krojer et al.; 2008). Durch eine Bindung von nicht- oder fehlgefalteten Proteinen an die hydrophobe Innenseite oder die PDZ-Domänen des Hexamers der DegP wird die Trimer-Trimer-Bindung destabilisiert. Über die Interaktion mit den Substraten wird die Bildung der Multimere durch Interaktion der PDZ-Domänen miteinander hervorgerufen und das Substrat in diesen Komplex eingebaut. Durch diese Interaktionen wird eine lokale Konformationsänderung von Loops innerhalb des katalytisch aktiven Bereiches der DegP Moleküle erzielt, die *in vitro* eine 15-fache Steigerung der proteolytischen Aktivität zur

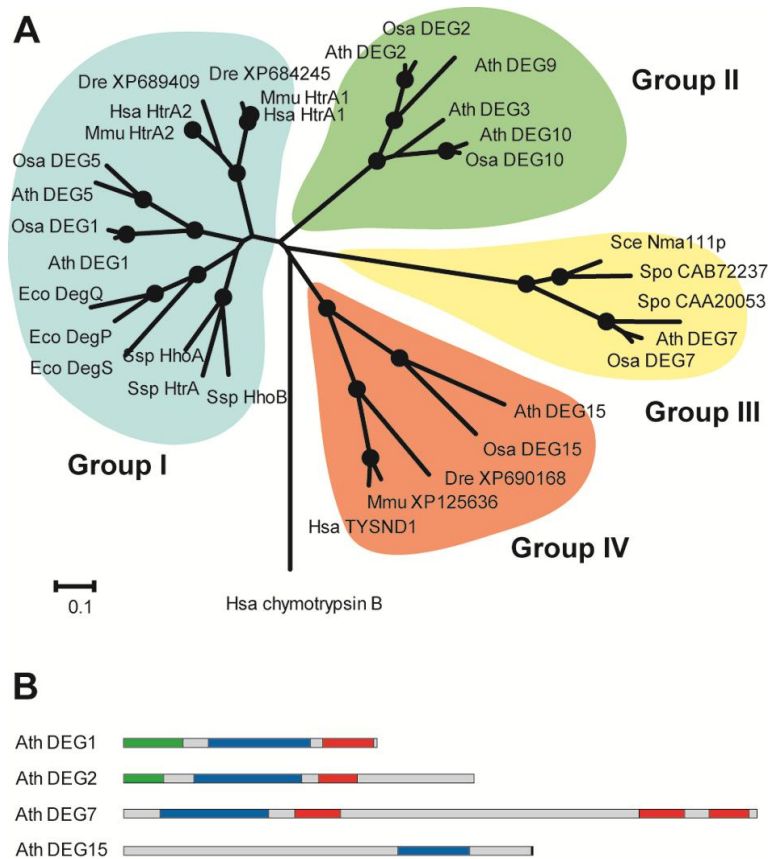
Folge hat. Das eingebaute Substrat wird als Folge seines Einbaus in den DegP-Komplex entweder abgebaut oder erhält seine korrekte Faltung. Bei letzterem wird das korrekt gefaltete Protein in einem nächsten Schritt durch Interaktion des DegP-Multimers mit der äußeren Membran des Periplasmas an diese abgegeben und eingebaut. Der Verlust des Substrates durch den Abbau des Substrates oder dessen Abgabe an die Periplasmamembran führt zu einer Destabilisierung des multimeren Komplexes und zur Wiederherstellung des inaktiven, hexameren Zustandes (Abb. 4) (Krojer et al.; 2008).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des postulierten katalytischen Zyklus von DegP.** (i) DegP-Hexamer bindet fehlgefaltete Proteine, wodurch eine Destabilisierung des Trimer-Trimer-Komplexes erfolgt (ii); (iii-a) proteolytischer Abbau der fehlgefalteten Proteine; (iii-b) Faltung der Proteine über Chaperon-Funktion der DegP; (iv) Interaktion des multimeren Komplexes der DegP mit der äußeren Membran des Periplasmas und Abgabe des Substrates; (v) Abgabe des Substrates führt zur Destabilisierung des Komplexes und damit wieder zur Bildung der hexameren Form (entnommen aus Huber und Bukau, 2008; Copyright (2008) Structure).



Neben den aus *E.coli* stammenden Deg-Proteasen sind einige Vertreter dieser Familie aus Pflanzen, vornehmlich aus Arabidopsis ebenfalls charakterisiert. Das Arabidopsis-Genom besitzt 16 Gene, die für DEG-Proteasen kodieren (Arabidopsis Genom Initiative, 2000). Über Sequenzvergleiche wurde dabei für vier DEG-Proteasen (DEG1, DEG2, DEG5, DEG8) eine Lokalisation in den Chloroplasten, für sechs eine in den Mitochondrien (DEG3, DEG4, DEG10, DEG11, DEG12, DEG14) postuliert. DEG9 ist im Nucleus lokalisiert, eine Kernlokalisierung von DEG7 wird diskutiert (Schumann et al., 2011). Drei der 16 Gene, die für DEG-Proteasen kodieren gelten als Pseudo-Gene, nämlich DEG6, DEG13 und DEG16 (Huesgen et al., 2005). Darüber hinaus besitzt eine DEG-Protease ein PTS1 und ist somit in den Peroxisomen lokalisiert. Biochemisch analysiert sind bislang DEG1 (Chassin et al., 2002), DEG2 (Hausühl et al., 2001) und DEG7 (Schumann et al., 2011). Phylogenetische Untersuchungen zeigen, dass sich die Familie der DEG-Proteasen in vier Gruppen unterteilen lässt (Helm et al., 2007). AtDEG1 weist eine enge Verwandtschaft zu den typischen DEG-Proteasen DegS, DegP und DegQ aus *E. coli* auf, die eine oder zwei PDZ-Domänen C-terminal zur Protease-Domäne besitzen, und in Gruppe I zusammengefasst sind (Abb. 5). AtDEG2, die in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten lokalisiert ist und dort am Abbau des durch oxidative Vorgänge während der Photosynthese zerstörten D1-Proteins beteiligt ist (Mizusawa et al., 2003; Lindahl et al., 2000), gehört neben anderen pflanzlichen Vertretern der Deg-Proteasen zu Gruppe II (Abb. 5). Innerhalb dieser Gruppe weisen die DEG-Proteasen eine PDZ-Domäne und einen verlängerten C-Terminus auf. Die Gruppe III (Abb. 5), der die AtDeg7 zugeordnet werden kann, weist eine sehr ungewöhnliche Domänen-Struktur auf. Alle Mitglieder dieser Gruppe sind nahezu doppelt so groß wie andere DEG-Proteasen, besitzen zwei Protease-Domänen, von denen eine degeneriert ist, und bis zu vier PDZ-Domänen (Clausen et al., 2002; Helm et al., 2007, Schumann et al., 2011). AtDEG7 ist die einzige DEG-Protease aus Pflanzen, die mit DEG-Proteasen aus Pilzen eng verwandt ist. Gruppe IV wird ausschließlich von Homologen der AtDEG15 aus verschiedenen eukaryotischen Organismen gebildet. Alle Vertreter dieser Gruppe besitzen ein PTS1, sind also in den Peroxisomen lokalisiert, weisen jedoch keine PDZ-Domänen auf (Abb. 5) (Helm et al., 2007).



**Abbildung 5: Phylogenetische Analyse und Domänen-Struktur der Deg-Proteasen.** (A) Phylogenetischer Baum der Deg Protease-Domäne. Eine Bestätigung in über 80% der durchgeführten 10.000 Bootstrap-Wiederholungen wird innerhalb des phylogenetischen Baumes als schwarzer Punkt angezeigt. Unbenannte Proteine werden mit der *protein accession number* des National Center of Biotechnology angegeben. (B) Gezeigt wird die Domänen-Struktur charakteristischer Vertreter der vier individuellen Deg-Protease Gruppen. Blau: Trypsin-ähnliche Protease-Domäne; Rot: PZD-Domäne; Grün: Transitpeptid für die Chloroplasten; Schwarz: Signalsequenz für die Peroxisomen PTS1 (SKL). Ath: *Arabidopsis thaliana*; Bsu: *Bacillus subtilis*; Dme: *Drosophila melanogaster*; Eco: *Escherichia coli*; Hsa *Homo sapiens*; Mmu: *Mus musculus*; Osa: *Oryza sativa*; Sce: *Saccharomyces cerevisiae*; Spo: *Schizosaccharomyces pompe*; Ssp: *Synechocystis sp. PCC 6803* (entnommen aus Helm et al., 2007; Copyright (2007) National Academy of Sciences, U.S.A).

## 1.2.2 Lon-Protease

Die in den Peroxisomen lokalisierte LON2-Protease gehört zu den *high molecular weight* Proteasen, die ATP-abhängig degradierte oder fehlgefaltete Proteine abbauen. Die Familie der LON-Proteasen ist damit entscheidend an der „Protein-Qualitätskontrolle“ und an der Regulierung diverser Stoffwechselprozesse durch die Kontrolle der Menge an kurzlebigen

regulatorischen Proteinen beteiligt (Van Melderer und Gottesman, 1999). Die LON-Protease aus *E.coli* steht unter der Kontrolle eines Hitzeschock-Promotors (Goff und Goldberg, 1985), was ihre Rolle bei der Degradation von fehlerhaften Proteinen noch verdeutlicht. Die LON-Proteasen besitzen drei konservierte Domänen: eine N-terminale Domäne, die die größten Sequenzunterschiede der drei Domänen innerhalb der Familie der LON-Proteasen aufweist und von der vermutet wird, dass sie an der Substraterkennung beteiligt ist (Ogura und Wilkinson, 2001), eine zentral gelegene ATPase-Domäne und eine C-terminale Protease-Domäne mit der katalytischen Diade Ser-Lys (Lee und Suzuki, 2008). Dieses aktive Zentrum der LON-Proteasen, weist keinerlei Homologien zu anderen Proteasen auf, ist jedoch unter den LON-Proteasen hochkonserviert. Der ATPase-Domäne der LON-Proteasen, die der AAA<sup>+</sup>-Superfamilie der AAA-Proteine (*ATPase-associated with a variety of cellular activity*) angehört, werden Chaperonfunktionen zugeschrieben. Bei der Degradation fehlgefalteter Proteine muss die Protease ihre Substrate aus einer enormen Menge an Proteinen finden, die nicht abgebaut werden sollen. Teile der abzubauenen Proteine werden nach erfolgter Bindung an die AAA<sup>+</sup>-Domäne der LON-Proteasen entfaltet (Wickner et al., 1999), und so die Translokation des Substrates zur proteolytisch aktiven Domäne ermöglicht (Van Melderer et al., 1996; Wickner et al., 1994). Die Substrate werden nach dieser ersten erfolgten Degradation weiter abgebaut bis letztendlich kleine Peptide der Größe 6-15 AS vorliegen.

Das Arabidopsis Genom kodiert vier LON-Proteasen, die in den Mitochondrien, den Plastiden und den Peroxisomen lokalisiert sind (Ostersetzer et al., 2007; Eubel et al., 2008; Rawling et al., 2008). Die mitochondriale LON1 ist die am besten charakterisierte LON-Protease. Sie fungiert sowohl als ATP-abhängige Protease, als auch als Chaperon, indem sie die Bildung von Proteinkomplexen fördert (Lee und Suzuki, 2008).

Die LON2 trägt ein PTS1 (-SKL) und ist in den Peroxisomen lokalisiert (Ostersetzer et al., 2007; Eubel et al., 2008; Reumann et al., 2009). Sie ist nötig, um einen korrekten Import von PTS1- und PTS2-Enzymen in die Peroxisomen zu gewährleisten. Gezeigt wurde dies für Peroxisomen aus alternden Kotyledonen und Wurzelzellen von Keimlingen (Lingard und Bartel, 2009). Ähnlich der LON1 aus Mitochondrien wird auch bei der LON2 eine Funktion als Chaperon diskutiert. Es wird angenommen, dass die LON2 eine Dissoziation des PEX5- und PEX7-Rezeptors nach dem Import oder des Rezeptor-Matrixprotein-Komplexes fördert (Lingard und Bartel, 2009).

### 1.2.3 Metallopeptidase

Die Aktivität von Metalloproteasen beruht auf der Bindung zweiwertiger Kationen in den meisten Fällen  $Zn^{2+}$ -Ionen, die ein Wassermolekül aktivieren und dadurch den nucleophilen Angriff der zu spaltenden Peptidbindung katalysieren. Aufgrund dieses Mechanismus sind Metalloproteasen typischerweise sensitiv in Bezug auf Chelatoren, wie z.B. die  $Zn^{2+}$ -Metallopeptidasen, die am Insulinabbau beteiligt sind (Ebrahim et al., 1991; Ansorge et al., 1984). Für das *insulin degrading enzym* (IDE) in Menschen konnte gezeigt werden, dass neben  $Zn^{2+}$  auch andere zweiwertige Kationen, wie  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  oder  $Ca^{2+}$  das Enzym nach Inaktivierung durch Chelatoren wieder aktivieren können und sogar eine höhere Aktivität als  $Zn^{2+}$  erbringen. Besonders  $Ca^{2+}$  wird eine verstärkte Aktivierung des IDE zugeschrieben, da in Muskeln, die mit  $Ca^{2+}$  unterversorgt sind, eine reduzierte IDE-Aktivität und eine Abnahme im Insulin-Abbau beobachtet werden kann, wohingegen  $Ca^{2+}$ -Zugabe zu einem vermehrten Insulin-Abbau in den Muskeln führte (Ryan et al., 1985; Ansorge et al., 1984, Ryan et al., 1983).

Unter den Metallo-Proteasen ist das Zinkbindemotiv HEXXH weit verbreitet. Eine Ausnahme stellt die Pitrilysin-Familie M16 dar, die ein inverses Bindemotiv (HXXEH) besitzt (Becker und Roth, 1992). Den Namen hat die Familie von der Oligopeptidase Pitrilysin, die weder Aminopeptidase-, noch Carboxypeptidase-Aktivität zeigt (Anastasi et al., 1993). Trotz erfolgter Kristallisation ist die Funktion, die Pitrilysin *in vivo* übernimmt, bislang weitgehend unklar. Die Zn-Metallopeptidase PXM16 gehört zur M16-Proteasefamilie, die in Arabidopsis 9 Vertreter besitzt (Garcia-Lorenzo et al., 2006; Rawlings et al., 2008). Sie ist die einzige Protease dieser Familie mit einem vorhergesagten PTS1 (-SKL) (Reumann et al., 2004). Die Familie der M16-Proteasen ist unterteilt in drei Unterfamilien A-C, wobei die Unterfamilien B und C die Prozessierungs-Proteasen der Mitochondrien und der Plastiden beinhalten (Schaller, 2004). Die peroxisomale XM16 gehört zur Unterfamilie A der M16-Proteasen, die die Peptidasen des Insulin-Abbaus umfasst (Schaller, 2004). Ein charakteristisches Merkmal der M16-Familie der Metalloproteasen scheint das Fehlen von bevorzugten Aminosäuresequenzen für die Regulierung der Substraterkennung zu sein. Es scheint, dass potentielle Substrate der M16-Familie durch höher geordnete Strukturen und nicht aufgrund spezifischer Motive innerhalb der Primärsequenz der Substrate erkannt werden (Kurochkin 2001; Richter und Lamppa 2003; Moberg et al., 2003).

In *Solanum lycopersicum* wurde eine M16-Protease der Unterfamilie A mit einem potentiellen PTS1 identifiziert, welche das bei der Wund-Antwort beteiligte Peptidhormon Systemin spaltet (Pearce et al., 1993; Strassner et al., 2002). Inwieweit PMX16 aus Arabidopsis eine ähnliche Aufgabe bei der Hormonumsetzung spielt ist bislang nicht geklärt.

### 1.3 Calmodulin

Calcium-Ionen sind in höheren Konzentrationen toxisch für die pflanzliche Zelle, da sie den zellulären Energie-Stoffwechsel stören. Daher wird Calcium in einem aktiven Transport durch  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen am Plasmalemma, ER und Tonoplasten aus dem Cytoplasma transportiert und so die Konzentration an freiem cytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auf einem niedrigen Basiswert von 100nM reduziert (McAinsh et al., 2009; Clapham, 2007; Wood et al., 2000). Aufgrund dieser niedrigen Konzentration im Cytoplasma können  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen als sekundäre Botenstoffe fungieren und eingehende abiotische Reize wie Licht, Trockenheit, Salzstress und oxidativen Stress oder biotische Reize, wie einen Pathogenbefall oder Verletzung, in transiente intrazelluläre Signale umgewandeln. Dabei lösen die Reize auf zellulärer Ebene eine Stress-Antwort aus, die häufig eine Änderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Cytosol durch das Freisetzen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem Apoplasten oder aus den internen  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern der Zelle (ER, Vakuole) bewirkt. Die Änderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Cytosol wird durch verschiedene Calcium-Sensoren erkannt, die das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal umsetzen und die enthaltene Information in eine spezifische Antwort der Zelle auf den eingehenden Reiz umwandeln (Reddy et al., 2004; Hetherington et al., 2004). In Höheren Pflanzen wird diese Rolle der Calcium-Sensoren überwiegend von Proteinkinasen, Calcineurin und Calmodulinen (CaM) übernommen. Während Hefen nur 1 CaM-Gen besitzen, weisen Pflanzen und Säuger eine große Calmodulin-Genfamilie auf, die neben den typischen und hochkonservierten CaM auch Calmodulin-like-Proteine (CMLs) beinhalten (Davis et al., 1986; Tootenhoofd et al., 2000). Es sind zwar auch in Säugern einige Calmodulin-like-Proteine bekannt, diese sind aber strukturell eng mit den typischen CaM verwandt. Das Vorkommen dieser erweiterten CaM-Formen in Pflanzen ist einer der auffälligsten Unterschiede der  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierten Signalweitergabe zwischen Pflanzen und Tieren. Viele der Calmodulin-like-Proteine werden aktuell untersucht und charakterisiert. Einigen von diesen Proteinen wurde bereits eine Rolle bei der Signal-Transduktion und im weiteren Verlauf der  $\text{Ca}^{2+}$ -

Signal-Cascade in Pflanzen zugeordnet (Mc Cormack et al., 2005; Lee et al., 2000; Ma et al., 1999). Häufig kann eine erhöhte Gen-Expression der Calcium-Sensoren als Antwort auf unterschiedlichste abiotische Stress-Faktoren beobachtet werden. Ein Großteil der konservierten Calmoduline und der rund 50 *calmodulin-like*-Proteine sind in Pflanzen durch abiotischem Stress oder Hormonbehandlung hoch reguliert, wie anhand von EST-Datenbanken nachvollzogen werden kann. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass Calmoduline und *calmodulin-like*-Proteine die Antwort auf Umwelt-Reize durch die Aktivierung über spezifische Calmodulin-Bindungs-Proteine bedingen (McComack et al., 2005). Die erhöhte Konzentration an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, die durch die Umwelt-Reize hervorgerufen wird, führt zu einer Bindung des Calciums an spezifische Domänen dieser Calcium-Sensoren, den sogenannten EF-Händen. Die Calcium-Sensoren erfahren dadurch eine Konformationsänderung und sind nun in die Lage, mit anderen Zielproteinen zu interagieren (Gifford et al., 2007; Ikura et al., 2006). Neben den EF-Hand-Motiven gibt es einige weitere Motive, die  $\text{Ca}^{2+}$  binden können, so zum Beispiel das 70 AS-Annexin-Motiv, welches das typische  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsmotiv der membrangebundenen Annexin Subfamilie darstellt oder die C2-Domäne, ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungs-Motiv von 130-145 Aminosäuren, das ebenfalls in membrangebundenen Proteinen zu finden ist, und von denen im Arabidopsis Genom 140 Vertreter identifiziert werden konnten (Reddy und Reddy, 2004).

Durch ihre Interaktion mit den Zielproteinen können die Calcium-Sensoren mannigfaltige Zellprozesse regulieren, zum Beispiel die biologischen Aktivitäten einer Vielzahl zellulärer Proteine, wie Transmembran-Ionen-Transporter (Zühlke et al., 1999) oder der DNA-Transkriptoren (Bouche et al., 2005). Bemerkenswert ist dabei, dass Calmodulin Einfluss auf eine solche Vielzahl von Prozessen innerhalb der pflanzlichen Zelle nimmt, obwohl es selbst keinerlei enzymatische Aktivität besitzt. Seine Funktion beruht ausschließlich auf einer Konformationsänderung, die durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung hervorgerufen wird (Crivici et al., 1995). Obwohl Calmodulin eines der am besten untersuchten und charakterisierten Proteine innerhalb der Calcium-Signal-Kette ist, ist das Verständnis über die Bindung und der damit einhergehende Einfluss auf die Funktionalität der Effektor-Proteine erst im Aufbau begriffen.

Bekannt sind mittlerweile eine Reihe von Proteinen, wie beispielsweise eine pflanzliche Glutamat-Decarboxylase (GAD) (Gut et al., 2009) oder eine im menschlichen Endothel vorkommende Stickoxid-Synthase (eNOS) (Xia et al., 2009), die durch CaM-Bindung in der Lage sind, höhermolekulare Komplexe auszubilden. Für GAD konnte eine CaM-

abhängige Dimerisierung nachgewiesen werden. Durch diese Dimerisierung wiederum wird die Ausbildung von hochmolekularen oligomeren Komplexen des GAD ermöglicht (Gut et al., 2009). Für eNOS konnte eine Dimerisierung über eine Oxygenase-Domäne in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM nachgewiesen werden und eine damit einhergehende Aktivierung des Enzyms (Xia et al., 2009).

### **1.3.1 Calmodulin: Struktur- und Konformationsänderung durch Calcium-Koordination**

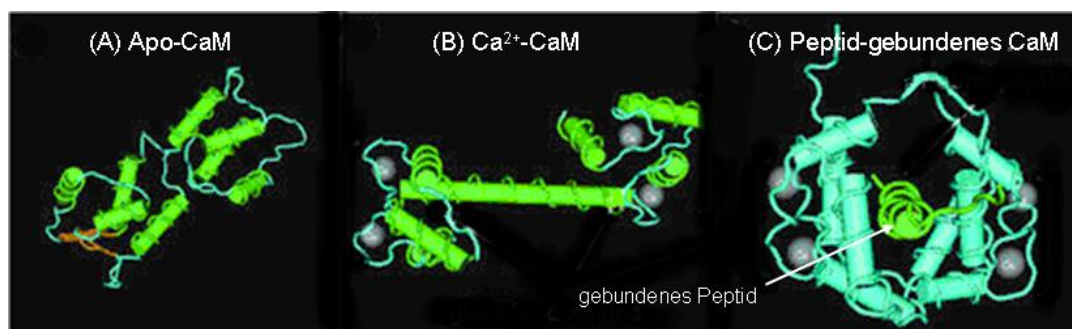
Calmodulin ist mit 16 kDa ein vergleichsweise kleines, saures Protein, das ubiquitär in allen eukaryotischen Zellen zu finden ist. Es besitzt vier EF-Hand-Motive, von denen jeweils zwei einen globulären Bereich ausbilden. Die zwei strukturell sehr ähnlichen, globulären Bereiche des Calmodulins werden über eine  $\alpha$ -Helix miteinander verbunden (Abb. 6 B). Jede der vier EF-Hände besteht aus zwei  $\alpha$ -Helices, die durch einen *loop* von 12 Aminosäuren verbunden sind. In der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Konformation liegen diese beiden  $\alpha$ -Helices der EF-Hände nahezu parallel zueinander. Innerhalb des *loops* zwischen diesen  $\alpha$ -Helices erfolgt die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an spezielle Aminosäure-Positionen und verändert dadurch die relative Position der  $\alpha$ -Helices, bis diese nahezu senkrecht zueinander stehen (Yap et al., 1999). Dadurch wird die sogenannte *dumbbell*-Form des  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-Komplexes hervorgerufen (Babu et al., 1985; Babu et al., 1988) und die Bindungs-Affinität des Calmodulins für eine Reihe von Zielproteinen erhöht (Gerstein und Krebs, 1998). Steigt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Cytosol auf  $10^{-5}\text{M}$  an, binden  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an alle vier EF-Hände des Calmodulins. Die so hervorgerufene Konformationsänderung des Calmodulins ermöglicht es dem Calmodulin- $\text{Ca}^{2+}$ -Komplex an seine Interaktionspartner zu binden und dadurch eine Signalkaskade auszulösen.

### **1.3.2 Calciumabhängige Interaktion von Calmodulin mit Zielproteinen**

Die Konformation, die das Calmodulin durch die Calcium-Koordination erhält, erlaubt es dem Molekül, über die zentrale *linker*-Region flexibel an verschiedene Zielproteine zu binden (Barbato et al., 1992) und sich um diese „herumzulegen“. Durch die Bindung an

seine Zielproteine geht das Calmodulin erneut eine Konformationsänderung ein und formt eine kompakte globuläre Struktur indem die zentrale Helix abgewinkelt wird. Dieses Verhalten erklärt auch, warum Calmodulin an seine Zielproteine in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 bindet, obwohl es mit seinen beiden globulären Domänen zwei potentielle Interaktions-Domänen besitzt. Für drei Calmodulin-bindende Proteine, darunter zwei Myosin-*light-chain*-Kinasen und die Calmodulin-abhängige-KinaseII, konnte über Strukturanalysen bewiesen werden, dass das Calmodulin-Bindungs-Motiv eine  $\alpha$ -Helix formt, die bei Calmodulin-Bindung in der Mitte des Calmodulin-Moleküls hindurch verläuft (Ikura et al., 1992; Meador et al., 1992).

Über Röntgen- und NMR-Studien konnte nachgewiesen werden, dass 8 von 9 Methioninen des Calmodulins direkt an der Bindung der Zielproteine beteiligt sind (Ikura et al., 1992). Diese Methionine werden durch die Konformationsänderung während der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung an die EF-Hände freigelegt und damit für die Bindung an die Zielproteine zugänglich gemacht.



**Abbildung 6: Struktur der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien und der  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Form sowie des  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-Zielprotein-Komplexes.** Die Struktur des Apo-CaM (A); und des  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM (B) zeigen die substantiellen Änderungen der Konformation des Calmodulins durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung. (C) zeigt die über NMR-Spektroskopie ermittelte Struktur eines Peptid-gebundenen  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-Komplexes in Lösung. Durch die Peptid-Bindung wird die flexible Bindung zwischen den beiden globulären Domänen des CaMs unterbrochen und die globulären Domänen näher zusammengebracht, so dass ein Kanal ausgebildet wird. Der größte Teil der Interaktion von  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM mit seinen Zielproteinen beruht dabei auf unspezifischen Van-der-Waals-Kräften die von hydrophoben Aminosäuren auf der Oberfläche hervorgerufen werden (abgeändert nach Luan et al., 2002).



### 1.3.3 Calmodulin-Bindemotiv

Calmodulin stellt einen der wichtigsten Calcium-Sensoren in der pflanzlichen Zelle dar und nimmt über seine Interaktion mit unterschiedlichen Proteinen Einfluss auf regulatorische Abläufe der Zelle. Die Regionen der Zielproteine, die mit Calmodulin interagieren, wurden untersucht, ebenso wie der Einfluss, den die Calmodulin-Bindung auf die Aktivität bzw. Funktionalität der Zielproteine nimmt. Auffällig war dabei, dass im Gegensatz zum Calmodulin, dessen Sequenz in allen Eukaryonten hoch konserviert ist, die Calmodulin-Bindungs-Domänen der Zielproteine eine hohe Variabilität innerhalb ihrer Sequenz zeigen.

Bei den meisten Zielproteinen bindet das Calmodulin an eine kurze  $\alpha$ -Helix (Eisenberg et al., 1982), wodurch die für die Calmodulin-Bindung essentiellen Elemente stark eingegrenzt werden können und über Sequenzvergleiche nun neue CaM-bindende Proteine identifiziert werden. Aufgrund der Vielzahl an experimentellen Untersuchungen an Calmodulin-Bindungs-Proteinen sind inzwischen mehrere Erkennungs-Motive etabliert. Zum einen die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Erkennungs-Motive, wie das 1-10, das 1-14 oder das 1-8-14-Motiv (Rhoads und Friedberg, 1997), die nach der Position ihrer konservierten hydrophoben Aminosäuren eingeteilt sind (Abb. 7) (Ikura et al., 1992), zum anderen das IQ-Motiv (Abb. 8), das bislang das einzige bekannte  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Erkennungs-Motiv ist. Die meisten der identifizierten CaM-Bindungsregionen auf Zielproteinen können einem dieser Motive zugeordnet werden. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Erkennungs-Motive weisen oft neben den hydrophoben Aminosäuren, die das Motiv begrenzen, basische Aminosäuren auf, von denen vermutet wird, dass sie über zusätzliche Interaktionen mit den zwei Glutamat-Clustern des  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM die Stabilität des Komplexes von  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM mit seinem Zielprotein erhöhen.

Neben diesen bekannten Erkennungs-Motiven konnten auch Calmodulin-Bindungsstellen ermittelt werden, deren Sequenzen keine dieser bekannten Bindungs-Motive umfassen

<b>Calmodulin-Bindungs-Motiv</b>	<b>Consensus-Sequenz</b>
<b>1-5-10 Motiv</b>	xxx(FILVW)xxxx(FAILVW)xxxx(FILVW)
<b>Basisches 1-5-10 Motiv</b>	(RK)(RK)(RK)(FAILVW)xxxx(FILV)xxxx(FILVW)
<b>1-10 Motiv</b>	(FILVW)xxxxxxxx(FILVW)
<b>1-8-14 Motiv</b>	(FILVW)xxxxxx(FAILVW)xxxx(FILVW)
<b>Basisches 1-8-14 Motiv</b>	(RK)(RK)(RK)(FILVW)xxxxxx(FAILVW)xxxx(FILVW)
<b>1-5-8-14 Motiv</b>	(FILVW)xxx(FAILVW)xx(FAILVW)xxxx(FILVW)
<b>1-14 Motiv</b>	(FILVW)xxxxxxxxxxxx(FILVW)
<b>1-16 Motiv</b>	(FILVW)xxxxxxxxxxxxxxxx(FILVW)

**Abbildung 7: Consensus-Sequenz der bekannten  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Calmodulin-Bindungs-Motive.** Die Motive werden gebildet aus hydrophoben AS in definierten Abständen; die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben, X steht für eine beliebige AS;

### 1.3.4 Calciumunabhängige Interaktion von Calmodulin mit Zielproteinen

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Komplexbildung von Calmodulin mit seinen Zielproteinen ist die am weitesten verbreitete Art der Interaktion des Calmodulins. Es gibt aber auch Proteine, wie zum Beispiel das Neuromodulin oder das Neurogranin, die auch in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen Calmodulin binden können. Die Affinität von Neuromodulin sinkt sogar bei der Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  (Alexander et al., 1988). Es gibt jedoch auch Proteine, die zwar in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an Calmodulin binden, jedoch für eine maximale Interaktion  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen benötigen. Als Beispiel ist hier unter anderem das Myosin zu nennen. Ist die Konzentration an  $\text{Ca}^{2+}$  in der Zelle niedrig, bindet das Calmodulin in seiner  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Konformation (Apo-Calmodulin) an Myosin. Es wird angenommen, dass Myosin neben 2  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen IQ-Erkennungs-Motiven, die auf den sogenannten *light-chains* des Myosins liegen, ein zusätzliches  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges Erkennungs-Motiv besitzt. Das Vorkommen von 2 gepaarten IQ-Erkennungs-Motiven wird häufig bei Proteinen beobachtet,

die Calmodulin in  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängiger Form binden, wobei bis jetzt die Stöchiometrie der Calmodulin-Bindung unklar ist (Abb.8).

<p><b>Consensus-Sequenz des IQ-Motivs:</b></p> <p><b>IQ</b> (FILV)Qxxx(RK)Gxxx(RK)xx(FILVWY) <b>IQ-like</b> (FILV)Qxxx(RK)xxxxxxx</p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

**Abbildung 8: Consensus-Sequenz der beiden Subklassen von IQ-Motiven:** Die erste hydrophobe AS ist in den meisten Fällen ein Isoleucin, Valin oder Leucin, die zweite basische AS in Position 6 des Motivs ist in den meisten Fällen ein Arginin, das darauf folgende Glycin in Position 7 ist nicht strikt konserviert. **IQ-like-Motive:** verkürztes Bindungs-Motiv, das nur aus der hydrophoben AS in Position 1, dem Glutamin in Position 2 und der sauren AS in Position 6 besteht; die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben, X steht für eine beliebige AS;

#### 1.4 Proteinfaltung und –struktur

Die Faltung von Proteinen unterliegt verschiedenen Prinzipien und Mechanismen, die die zeitliche Effizienz der Faltung optimieren und eine Qualitätskontrolle der gebildeten Proteine ermöglichen. Ein Großteil der Proteine in eukaryotischen Zellen wird im Endoplasmatischen Retikulum (ER) gebildet, in dem beispielsweise durch komplexe Glykosylierungsschritte sichergestellt wird, dass nur korrekt gefaltete Proteine erhalten bleiben. Eine Akkumulation nicht korrekt gefalteter Proteine führt zu einer Aggregation innerhalb der Zelle, die für diese toxisch ist (Hammond und Helenius, 1995; Kaufmann, 2002). Untersuchungen der Proteinfaltung zeigten, dass sich Teile von Proteinen unabhängig voneinander falten und diese Domänen schon in einem frühen Stadium der Proteinfaltung dieselbe Struktur wie in ihrem nativem Endzustand aufweisen. Sekundärstrukturelemente wie  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter werden dabei besonders schnell in 100 ns- 1 $\mu$ s ausgebildet (Mayor et al., 2002). Nach der Ausbildung dieser Sekundärstrukturen liegt das Protein als sogenannter „molten globul“ vor (Klein-Seetharam et al., 2002). Die Form des *molten globul* wird von Proteinen auch während der Denaturierung durchlaufen, die in den meisten Fällen schrittweise erfolgt und im Zuge derer zunächst Quartär- und Tertiärstrukturen zerstört

werden (Wirmer et al., 2004). Damit sich ein Protein aus der Form des *molten globul* in seine native Konformation faltet, ist ein Kontakt von sogenannten Schlüssel-Resten der Aminosäuren innerhalb des Proteins notwendig (Dobson, 2003). Grundlage für die Ausbildung dieser Kontakte bzw. Wechselwirkungen ist das Erreichen eines energetisch möglichst günstigen Zustandes des Proteins. Dieser Zustand ist dann erreicht, wenn hydrophobe Aminosäurereste im Inneren der Proteinstruktur und hydrophile Aminosäurereste auf der Oberfläche des Proteins lokalisiert sind. Auf diese Weise wird der thermodynamisch stabilste Zustand eines Proteins erreicht, da der Kontakt mit dem Solvens minimiert wird (Dobson, 2003). Durch eine Fehlfaltung von Proteinen gelangen die hydrophoben Aminosäurereste an die Oberfläche des Proteins und verursachen durch die Ausbildung von hydrophoben Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrücken eine Aggregation der Proteinmoleküle (Chiti et al., 1999; Dobson, 1999).

Es wurde lange Zeit angenommen, dass die Ausbildung einer 3D-Struktur von Proteinen notwendig für ihre enzymatische Aktivität ist. Bereits 1894 wurde von Fischer das sogenannte „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ vorgeschlagen, nachdem in extrazellulären Extrakten aus *Saccharomyces cerevisiae* chirale Selektivität bei der Hydrolyse glykosidischer Bindungen nachgewiesen werden konnte. 1936 bestätigten Mirsky und Pauling dieses Prinzip, indem sie nachwiesen, dass Pepsin durch den Einfluss denaturierender Reagenzien wie Harnstoff, Säuren oder Basen seine enzymatische Aktivität verliert. Zweifel daran, dass die Funktion von Enzymen nur gegeben ist, wenn diese eine definierte 3D-Struktur ausbilden, kamen erstmals auf, als Karush 1949 feststellte, dass Serumalbumin eine Vielzahl kleiner hydrophober anionischer Moleküle bindet. Da diese Moleküle sehr unterschiedliche Formen aufwiesen, folgerte er, dass auch Serumalbumin unterschiedliche Konformationen einnimmt und erstellte das Prinzip der „*configurational adaptability*“. Kurze Zeit später wurde das *induced fit* Modell eingeführt (Koshland, 1954). Das erste Protein, für das nachgewiesen wurde, dass es in weiten Teilen ungeordnet vorliegt, war das Histon H5 (Aviles et al., 1978). Dieser ungeordnete Teil des Histon H5 kann über Röntgenkristallographie nicht identifiziert werden, ist aber durch NMR-Spektroskopie nachweisbar und konnte so charakterisiert werden. Nach der Entdeckung dieses intrinsisch ungeordneten Proteins (IUP) wurden zahlreiche weitere Proteine nachgewiesen, die in ihrem nativen Zustand unter physiologischen Bedingungen entweder keine oder nur in Teilbereichen des Proteins eine regelmäßige tertiäre Struktur ausbilden wie z.B. Calsequestrin (Krause et al., 1991), der Kinaseinhibitor p21 (Kriwacki et al., 1996) und der Transkriptionsfaktor p53 (Weinberg et

al., 2004). Aufgrund dieser Ergebnisse wird davon ausgegangen, dass Proteine dazu in der Lage sind, in drei unterschiedlichen Zuständen ihre biologische Funktion auszuüben, in ihrer geordneten Struktur, in der *molten globul* Form, die sowohl teilstrukturierte Bereiche als auch ungeordnete Bereiche beinhaltet, und im sogenannten *random coil* Zustand, der keinerlei strukturierte Bereiche aufweist (Dunker et al., 2002). Damit wird nicht nur das Paradigma, dass Proteine eine definierte 3D-Struktur benötigen, um enzymatisch aktiv zu sein, aufgehoben, sondern es wird mittlerweile davon ausgegangen, dass einige Proteine ihre Funktion sogar nur aufgrund ihrer fehlenden Struktur ausüben können. Durch die mangelnde 3D-Struktur ist eine hohe Flexibilität der Proteine bezüglich ihrer Konformation gegeben, die es ermöglicht, eine Vielzahl von unterschiedlichen Substraten gleichermaßen umzusetzen (Wright und Dyson, 1999). Für das Protein p21-KID konnte z.B. gezeigt werden, dass es eine große Anzahl unterschiedlicher Kinasen binden und inhibieren kann (Kriwacki et al., 1996).

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die glyoxysomale *processing*-Protease DEG15, die eine Abspaltung der N-terminalen pre-Sequenz mit dem peroxisomalen *targeting*-Signals 2 in peroxisomalen Matrixenzyme von Pflanzen bewirkt, tritt als Monomer bzw. Dimer auf. Das Monomer zeigt *in vitro* eine generell degradierende Protease-Aktivität, während für die Abspaltung der glyoxysomalen pre-Sequenz das Dimer zuständig ist. Das Gleichgewicht zwischen Monomer und Dimer ist  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig: Durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Zugabe wird es in Richtung des Dimers durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Entzug, beispielsweise durch die Zugabe von EDTA oder Phosphat-Ionen, in Richtung des Monomers verschoben (Helm et al., 2007).

Ziel dieser Arbeit war es, die Struktur der DEG15 *in silico* zu analysieren, eine biochemische Charakterisierung der DEG-Protease hinsichtlich Dimerisierung und CaM-Bindung durchzuführen und die DEG15 in nativer Form für anschließende röntgenkristallographische Untersuchungen zu exprimieren.

Verschiedene *in silico* Untersuchungen der DEG15, wie Strukturvorhersagen, *Alignments* und die Analysen über spezielle Rechnersimulationen zur Vorhersage unstrukturierter Bereiche innerhalb des Proteins sollten Aufschluss über die Struktur der Protease geben, da die Proteinsequenz der AtDEG15 für die Familie der Deg-Proteasen eine sehr ungewöhnli-

che Primärstruktur aufweist. Die Protease-Domäne der DEG15 liegt ungewöhnlich nahe am C-Terminus und die für Protein-Interaktion und damit auch für Substrat-Erkennung und Aktivierung der Protease-Domäne wichtigen PDZ-Domänen fehlen. Darüber hinaus fehlen Informationen über Struktur und Funktionen des N- und des C-Terminus der DEG15, da keine Homologien zu anderen bekannten Proteinen in Pflanzen, Säugern oder Hefen gefunden werden können. Die *in silico* Analysen sollten für diese bislang nicht bekannten Bereiche neue Erkenntnisse hinsichtlich der Struktur und dem Vorkommen von Domänen liefern.

Die biochemische Charakterisierung der DEG15 wurde auf zwei Weisen verfolgt. Zum einen wurden Deletionskonstrukte der DEG15 im Y2H/Y3H-System untersucht, zum anderen wurden Untersuchungen *in planta* vorgenommen, für die entsprechende Deletionskonstrukte der DEG15 in die deg15-KO-Mutante transformiert wurden. Diese Konstrukte wurden anhand ihrer Fähigkeit zur Prozessierung der pre-gMDH zur reifen MDH-Untereinheit auf ihre Funktionalität und Dimerisierung hin analysiert.

Mit Hilfe dieser beiden experimentellen Ansätze sollte die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Dimerisierung der DEG15 bestätigt, eine Interaktion der DEG15 mit Calmodulin untersucht, die mögliche Bindungs-Domäne für Calmodulin auf der DEG-Protease identifiziert werden, sowie die Funktion der konservierten *loop*-Domäne innerhalb der Protease-Domäne und nahe der katalytischen Tasche bzw. die Funktion des N- und des C-Terminus aufgeklärt werden.

Eine Aufklärung der Struktur der monomeren und der dimeren Form der DEG15 sollte im Laufe dieser Arbeit über Röntgenkristallographie und/oder Kernresonanz-Analysen erfolgen. Die AtDEG15 sollte zu diesem Zwecke rekombinant überexprimiert und gereinigt werden. Verschiedene Systeme (*E.coli*, *P. pastoris*, *N. tabacum*) für die Expression der DEG15 wurden getestet und optimiert, um eine größtmögliche Menge an rekombinant erzeugtem nativen Protein zu erhalten.

## 2 Ergebnisse

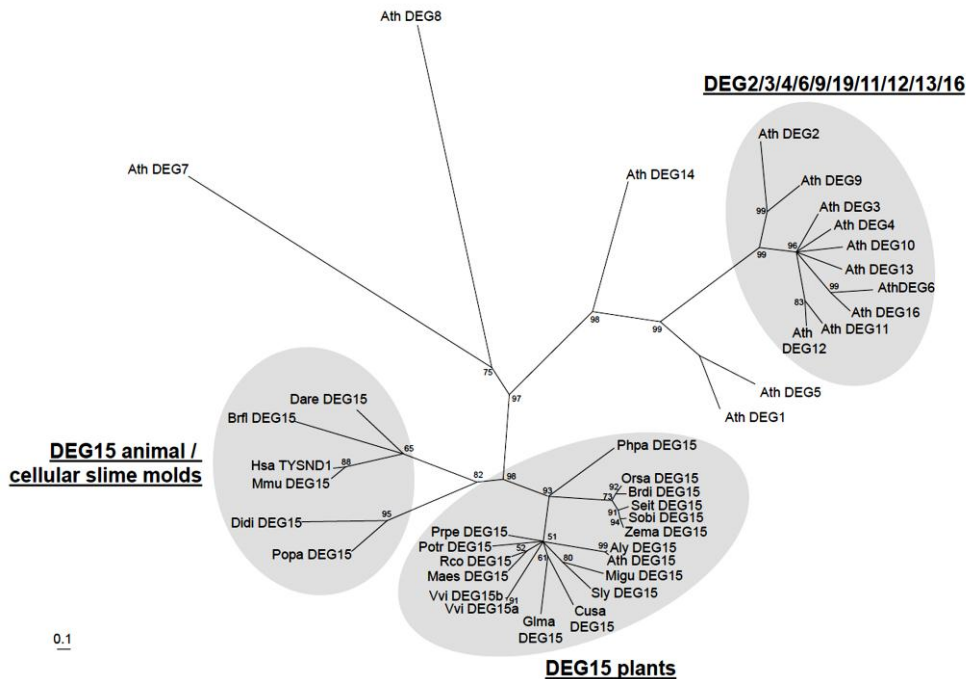
Der Import von Matrixproteinen über das peroxisomale *targeting*-Signal 2 in die Peroxisomen findet sich in Niederen und Höheren Eukaryoten, wie zum Beispiel in Pilzen und Pflanzen. Die Prozessierung des PTS2 ist nur aus Höheren Eukaryoten bekannt. Niedere Eukaryoten, wie beispielsweise die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, spalten das PTS2 nach dem Import der Proteine nicht ab (Olsen, 1998) und besitzen in Folge dessen auch keine peroxisomale Prozessierungs-Protease. Vor dem Hintergrund, dass in Pflanzen auch die nicht prozessierten PTS2-Enzyme funktional sind, stellte sich die Frage, warum in Höheren Eukaryoten das PTS2 abgespalten wird und an welchem Punkt der stammesgeschichtlichen Entwicklung diese Prozessierung eingeführt wurde. Um diese Frage zu beantworten, wurde in verfügbaren Datenbanken DEG15-Proteine verschiedener Organismen identifiziert, die gefundenen Sequenzen aligned und überprüft. Anhand der erhaltenen Alignments wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Ute Vothknecht (LMU, Martinsried) ein phylogenetischer Baum erstellt und so die phylogenetische Systematik der DEG15 untersucht (Abb.9). Neben den DEG15 wurden die übrigen 15 DEG-Proteasen aus *Arabidopsis thaliana* als *outgroup* mit in den phylogenetischen Baum einbezogen. Das Alignment, das der phylogenetischen Untersuchung zu Grunde liegt befindet sich im Anhang 5.1.

Es zeigte sich, dass die phylogenetische Taxonomie die Domänen-Struktur der DEG-Proteasen widerspiegelt. Die phylogenetische Verteilung zeigt die Aufgliederung der DEG-Proteasen in verschiedene Gruppen. Die DEG-Proteasen DEG 2-4, 6, 9-13 und 16 aus *A. thaliana* bilden eine Gruppe (Abb. 9). Diese DEG-Proteasen besitzen 1 PDZ-Domäne und zusätzlich einen verlängerten C-Terminus. AtDEG2, 6, 9 und 16 sind in den Chloroplasten lokalisiert, AtDEG3, 4 und 10-12 in den Mitochondrien. Die Lokalisation von ATDEG13 ist nicht bekannt. AtDEG 1, 8 und 14 besitzen 1 PDZ-Domäne, aber keinen verlängerten C-Terminus (Abb. 5). Sie grenzen sich von den übrigen DEG-Proteasen aus *A. thaliana* deutlich ab (Abb. 9). Interessant ist die Tatsache, dass AtDEG1 eng verwandt mit AtDEG5 ist (Abb. 9). Bei AtDEG5 handelt es sich um eine verkürzte DEG-Protease, die keine PDZ-Domäne besitzt (Huesgen et al., 2005). Sowohl AtDEG1, als auch AtDEG5 sind in den Chloroplasten lokalisiert, ebenso AtDEG8. AtDEG14 ist in den Mitochondrien lokalisiert. Auch DEG7 grenzt sich von den übrigen DEG-Proteasen aus *A. thaliana* ab (Abb. 9). AtDEG7 ist aus einer Gen-Doppelung hervorgegangen und besitzt zwei Protease-Domänen,

von denen eine durch einen Austausch von Aminosäuren degeneriert ist, und 3 PDZ-Domänen. AtDEG7 scheint im Nucleus lokalisiert zu sein (Schuhmann et al., 2011).

Die DEG15-Proteasen der verschiedenen untersuchten Organismen grenzen sich deutlich von den übrigen DEG-Proteasen ab und zeigen untereinander eine enge Verwandtschaft (Abb. 9). Gleichwohl gliedern sie sich auf in zwei Gruppen. Eine Gruppe wird gebildet aus den DEG15-Proteasen aus Säugern und mehrzelligen Pilzen. In der zweiten Gruppe sind ausschließlich die DEG15 aus Pflanzen zu finden (Abb. 9). Die DEG15 aus Pflanzen besitzen im Gegensatz zu den DEG15-Proteasen aus Säugern und mehrzelligen Pilzen einen *loop* innerhalb der katalytischen Triade der Protease-Domäne und unterscheiden sich somit strukturell von den übrigen eukaryotischen DEG15. Innerhalb der Gruppe der pflanzlichen DEG15 kann eine Aufgliederung in Monokotyledonen und Dikotyledonen beobachtet werden. Die DEG15 aus *Physcomitrella patens* grenzt sich von diesen beiden Untergruppen der pflanzlichen DEG15 ab (Abb. 9).

Anhand des erstellten phylogenetischen Baumes wird deutlich, dass die pflanzlichen DEG15 stammesgeschichtlich eng miteinander verwandt sind und sich sowohl von den übrigen DEG-Proteasen, als auch von den DEG15 aus Säugern und mehrzelligen Pilzen deutlich abgrenzen. Diese Abgrenzung der pflanzlichen DEG15 ist bemerkenswert, da sie dieselbe Aufgabe übernehmen wie die DEG15 der Säuger, nämlich die Abspaltung des PTS2.





**Abbildung 9: Phylogenetische Analyse (erstellt in Zusammenarbeit mit Prof. Ute Vothknecht (LMU, Martinsried)): graphische Auftragung der Verwandtschafts-Beziehungen (*maximum likelihood*) der DEG-Proteasen in unterschiedlichen Organismen.** Verwendete DEG-Proteasen siehe Tabelle 1. Die Sequenzen wurden über ClustalX 1.8 (Thompson et al 1997) abgeglichen und das Kladogramm über *maximum likelihood* mit Hilfe des Programms tree-puzzle 5.2. (Strimmer und Haesler, 1997) ermittelt.

Benennung	Organismus	Accession-Nr.	Lokalisation	Domänen-Struktur
Ath_DEG15	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_174153	Peroxisomen	Keine PDZ-Domänen
Aly_DEG15	<i>Arabidopsis lyrata</i>	XP_002893523	SKL (Peroxisomen)	Keine PDZ-Domänen
Rco_DEG15	<i>Ricinus communis</i>	XP_002509448	SKL (Peroxisomen)	Keine PDZ-Domänen
Potr_DEG15	<i>Populus trichocarpa</i>	XP_002305124	SKL (Peroxisomen)	Keine PDZ-Domänen
Cusa_DEG15	<i>Cucumis sativus</i>	Cucsa046320	SKL (Peroxisomen)	Keine PDZ-Domänen
Glma_DEG15	<i>Glycine max</i>	Glyma13g31080	SKL (Peroxisomen)	Keine PDZ-Domänen
Migu_DEG15	<i>Mimulus guttatus</i>	mgf007197	SKL (Peroxisomen)	Keine PDZ-Domänen
Prpe_DEG15	<i>Prunus persica</i>	ppa001854	SKL (Peroxisomen)	Keine PDZ-Domänen
Maes_DEG15	<i>Manihot esculenta</i>	4.1_003779m + 4.1_018442m.g	SKL (Peroxisomen)	Keine PDZ-Domänen
Vvia_DEG15	<i>Vitis vinifera</i>	XP_002273997	SKL (Peroxisomen)	Keine PDZ-Domänen
Vvib_DEG15	<i>Vitis vinifera</i>	CBI30593	SKL (Peroxisomen)	Keine PDZ-Domänen
Sobi_DEG15	<i>Sorghum bicolor</i>	XP_002441322	SKI (Peroxisomen)	Keine PDZ-Domänen
Zema_DEG15	<i>Zea mays</i>	GRMZM2G162699	SKI (Peroxisomen)	Keine PDZ-Domänen
Orsa_DEG15	<i>Oryza sativa</i>	EEE64231	SKI (Peroxisomen)	Keine PDZ-Domänen
Seit_DEG15	<i>Setaria italica</i>	SiPROV003192	SKM (Peroxisomen)	Keine PDZ-Domänen
Brdi_DEG15	<i>Brachypodium distachyon</i>	Bradi2g21020	SKI (Peroxisomen)	Keine PDZ-Domänen
Phpa_DEG15	<i>Physcomitrella patens</i>	XP_001775762	SRL (Peroxisomen)	Keine PDZ-Domänen
Popa_DEG15	<i>Polysphondylium pallidum</i>	EFA82668	AKL (Peroxisomen)	Keine PDZ-Domänen
Didi_DEG15	<i>Dictyostelium discoideum</i>	XP_641938	SKL (Peroxisomen)	Keine PDZ-Domänen
Darer_NP_001	<i>Danio rerio</i>	XP_690168	SKL (Peroxisomen)	Keine PDZ-Domänen
Brfl_DEG15	<i>Branchyostome floridae</i>	XP_002609926	SKI (Peroxisomen)	Keine PDZ-Domänen
HsaTYSND1	<i>Homo sapiens</i>	NM_173555	SKL (Peroxisomen)	Keine PDZ-Domänen
Mumu_NP082188	<i>Mus musculus</i>	XP_125636 XP_002509448	SKL (Peroxisomen)	Keine PDZ-Domänen
Ath_DEG1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	XM_002667490	Chloroplasten	1 PDZ-Domäne

Ath_DEG2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AF245171	Chloroplasten	1 PDZ-Domäne, verlängerter C-Terminus
Ath_DEG3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_105236	Mitochondrien	1 PDZ-Domäne, verlängerter C-Terminus
Ath_DEG4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_105237	Mitochondrien	1 PDZ-Domäne, verlängerter C-Terminus
Ath_DEG5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_117947	Chloroplasten	truncated, keine PDZ-Domäne
Ath_DEG6	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_103994	Chloroplasten	keine PDZ-Domäne
Ath_DEG7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_111209	Nucleus (?)	2 Protease-Domänen (1 inaktiv), 4 PDZ-Domänen (1 idegeniert)
Ath_DEG8	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_123346	Chloroplasten	1 PDZ-Domäne
Ath_DEG9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_123384	Chloroplasten	1 PDZ-Domäne, verlängerter C-Terminus
Ath_DEG10	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_123053	Mitochondrien	1 PDZ-Domäne, verlängerter C-Terminus
Ath_DEG11	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_112526	Mitochondrien	1 PDZ-Domäne, verlängerter C-Terminus
Ath_DEG12	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_112527	Mitochondrien	1 PDZ-Domäne, verlängerter C-Terminus
Ath_DEG13	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_123420	unbekannt	1 PDZ-Domäne, verlängerter C-Terminus
Ath_DEG14	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_122648	Mitochondrien	1 PDZ-Domäne
Ath_DEG16	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_148132	Chloroplasten	1 PDZ-Domäne, verlängerter C-Terminus

**Tabelle 1: Verwendete Organismen der phylogenetischen Analyse**

## 2.1 *In silico* Strukturanalyse der DEG15-Protease

Die DEG15-Protease weicht strukturell von den übrigen bislang untersuchten DEG-Proteasen deutlich ab. Gut untersucht und kristallisiert sind derzeit vor allem die Strukturen von Deg-Proteasen aus *E.coli* (DegS, DegP) (Grininger et al., 2004; Meltzer et al., 2009).

Die Arabidopsis DEG15 unterscheidet sich von diesen strukturell sehr stark. Sie ist mit 709 Aminosäuren größer als die übrigen bekannten DEG-Proteasen mit Ausnahme der At-

DEG7, die 1079 Aminosäuren lang ist. Die Protease-Domäne der AtDEG15 ist im Vergleich zu den übrigen Vertretern der pflanzlichen DEG-Proteasen in Richtung C-Terminus des Proteins verschoben (AS 375-614); über Sequenzvergleiche konnten keine PDZ-Domänen identifiziert werden. Den PDZ-Domänen werden Aufgaben in der Substraterkennung und in der Aktivierung der proteolytischen Funktion zugeschrieben (Krojer et al., 2008). Darüber hinaus wurde für pflanzliche DEG15-Proteasen ein „Loop“ innerhalb der Protease-Domäne identifiziert (AS 397-465), der in den übrigen pflanzlichen DEG-Proteasen in den Chloroplasten, den Mitochondrien und dem Nucleus nicht zu finden ist. Die Protease-Domäne (AS 374- 615) der AtDEG15 belegt ihre Verwandtschaft zu den übrigen DEG-Proteasen (siehe Abb. 5); für den langen N-Terminus (AS 1-396) und den etwas kürzeren C-Terminus (AS 616-709) außerhalb der Protease-Domäne finden sich in den Datenbanken für Pflanzen, Säuger und Pilze keinerlei Sequenz-Analogien. Dies verhindert Schlussfolgerungen zur Struktur und damit zur Funktionsweise dieser Domänen der At-DEG15. Deshalb wurde über *in silico* Untersuchungen der AtDEG15-Sequenz versucht, Strukturvorhersagen zu treffen, um auf diese Weise Anhaltspunkte zur Funktion einzelner Domänen zu bekommen.

### **2.1.1 Strukturvorhersage**

Die Sequenzbereiche N-terminal und C-terminal zur Protease-Domäne der AtDEG15 zeigen keine Homologien zu anderen Proteinen, so dass keine Aussagen über Funktion und eventuelle regulatorische Effekte der Bereiche außerhalb der Protease-Domäne getroffen werden können.

Die Sequenz eines Proteins, also die Primärstruktur, lässt sich zweifelsfrei bestimmen. Auch die Sekundärstruktur kann genau vorhergesagt werden, da hier die Ausbildung intramolekularer Wasserstoffbrücken ausschlaggebend ist, welche mittlerweile durch verschiedenste Programme ermittelt werden kann. Die Bestimmung der Tertiär- bzw. der Quartärstrukturen ist allerdings nach wie vor kritisch, denn die Verfahren der Röntgenkristallographie und der Kernresonanz können nicht auf alle Proteine angewendet werden. Das Protein, dessen Struktur bestimmt werden soll, muss in nativer Form und aufgereinigt vorliegen. Die Proteine, deren Strukturen bestimmt werden sollen, dürfen nur in geringem Umfang Strukturen enthalten, die flexibel sind, die also unterschiedliche Konformationen

einnehmen können, da dadurch eine geordnete Kristallisation und anschließende Röntgenuntersuchung oft nicht möglich ist.

Eine Alternative bietet daher eine Rechnersimulation der Faltung eines Proteins. Dabei verfolgt die Strukturoptimierung den Ansatz, dass die natürliche Faltung eines Proteins im Zustand der geringsten Energie vorliegt, d.h. die Struktur des Proteins wird so berechnet und optimiert, dass die Faltungsenergie minimiert wird. Bei diesen Berechnungen werden allerdings jegliche Einflüsse der Umwelt auf die Faltung des Proteins unberücksichtigt gelassen, da das entsprechende Wissen fehlt, warum und wie genau sich Proteine in ihre 3D-Form falten. Es können aufgrund dessen keine Algorithmen erstellt werden, die den natürlich vorkommenden Ablauf des Faltungsvorganges simulieren.

Aufgrund dieser Probleme wird häufig das so genannte *homology modelling* verwendet, ein Verfahren, bei dem eine neue Proteinsequenz auf eine schon bekannte abgebildet und in diese sozusagen „eingepasst“ wird. Dieses Verfahren der Strukturvorhersage von Proteinen findet weit verbreitete Anwendung, erzielt jedoch nur gesicherte Ergebnisse, wenn bereits Strukturen von Proteinen mit ähnlicher Sequenz bekannt sind. Sind keine ähnlichen Strukturen bekannt, wie dies für die Bereiche N-terminal und C-terminal der Protease-Domäne in der DEG15 zutrifft, wird auch die Vorhersage schwieriger. Trotz dieser bekannten Probleme und der Tatsache, dass es nur für die Protease-Domäne der DEG15 übereinstimmende Sequenzen gibt, wurde dieses Verfahren des *homology modelling* für eine Vorhersage der räumlichen Struktur der DEG15 herangezogen.

Über <http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred> wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Michael Ehrmann (Uni Duisburg-Essen) eine Struktur-Vorhersage mit Hilfe bekannter kristallisierter Deg-Proteasen erstellt. Wie schon erwähnt, gibt es aber außerhalb der AtDEG15 Protease-Domäne keinerlei Homologie der DEG15 zu anderen Proteinen, die zur Struktur-Vorhersage herangezogen werden könnten.

Zur Visualisierung der Ergebnisse wurde das Programm RasMol gewählt, welches den Datensatz mit den ermittelten Atomkoordinaten des Makromoleküls ausliest, sowie eventuell erhaltene Zusatzinformationen. Innerhalb dieses Programms kann der räumliche Verlauf der Aminosäurekette auf verschiedene Arten dargestellt werden. Es wurde der Darstellungsmodus „*ribbons*“ gewählt, da in diesem Modus Elemente wie regulär gewundene Bereiche (Helices), zu Faltblättern aneinander gelegte beta-Stränge, durch Wasserstoffbrücken gehaltene Knicke (*bends*, *turns*) sowie ungeordnete *coils* dargestellt werden können.

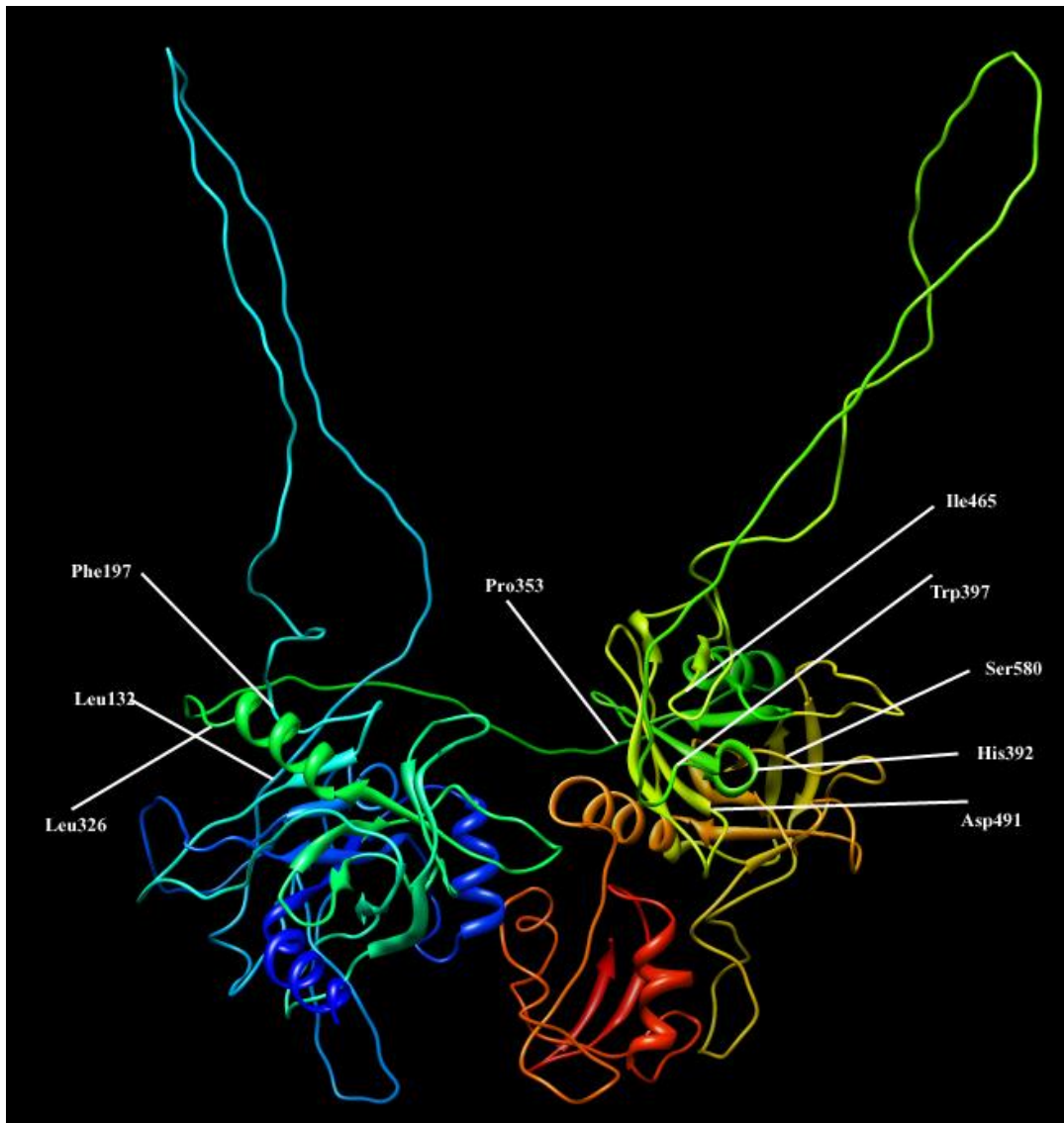
Im weiteren Verlauf soll das Augenmerk insbesondere auf diese, als geschwungene Linie dargestellten, *coils* oder *loops* gerichtet werden.

Am verlässlichsten ist die Struktur-Vorhersage im Bereich der Protease-Domäne (AS 374-615), welche dem grünen und gelben Bereich der Abbildung 10 entspricht. Die Aminosäuren der katalytischen Triade (His392, Asp491 und Ser580) liegen hier in direkter Nähe zueinander und formen eine Art Tasche innerhalb der Protease-Domäne. Außerhalb der Protease-Domäne endet die Analogie zur *E.coli*-DegP.

Neben der Protease-Domäne weist der N-Terminus der AtDEG15 strukturierte Bereiche auf, die durch einen relativ großen, blau dargestellten *loop* (Leu132 bis Phe197) unterbrochen werden. Ein weiterer *loop* ist innerhalb der Protease-Domäne (Trp 397 bis Ile465) zu finden, der in Abbildung 10 dem grünen *loop* entspricht. Für die 374 Aminosäuren, die C-terminal zur Protease-Domäne liegen, gibt es ebenfalls keine homologen Sequenzen und somit keine verlässlichen Struktur-Vorhersagen.

An diesem Punkt lässt sich nicht sagen, ob es sich bei den unstrukturierten Bereichen der berechneten Struktur-Vorhersage tatsächlich um Bereiche der AtDEG15 handelt, die keine Faltung aufweisen oder ob lediglich kein *template*, also keine bekannte Struktur vorhanden ist, in die die AtDEG15-Sequenz eingepasst werden kann.

Besitzt die AtDEG15 tatsächlich unstrukturierte Domänen, handelt es sich bei der Protease möglicherweise um ein sogenanntes *intrinsically unstructured protein* (IUP). Diese Gruppe an Proteinen benötigt für ihre vollständige Faltung weitere Bindungspartner, die im Zuge ihrer Interaktion mit den IUPs strukturgebend wirken.



**Abbildung 10: Über *Homology modelling* ermittelte Struktur der AtDEG15.** Dem Modelling wurde die Struktur der E.coli DegP zu Grunde gelegt. N-Terminus, blau; C-Terminus rot. Markiert sind die Aminosäuren His392, Asp491 und Ser580 der katalytischen Triade, darüber hinaus Leu132, Phe197, die einen N-terminalen Loop begrenzen und Trp397 und Ile465, die den pflanzenspezifischen Loop innerhalb der Protease-Domäne begrenzen. Verbunden werden die gefalteten Bereiche des N-Terminus und des C-Terminus über einen hier grün dargestellten *coil*, der von den Aminosäuren Leu326 und Pro353 begrenzt wird. Die Strukturvorhersage wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Ehrmann (Uni Duisburg) erstellt über: <http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred> (Söding, 2005; Söding et al., 2005).

### **2.1.2 Ungewöhnliche Aminosäuresequenz der AtDEG15 bedingt flexible und dynamische Struktur der Protease**

Die Computer-basierte Vorhersage der räumlichen Struktur der AtDEG15 lässt auf unstrukturierte Teilbereiche innerhalb des Proteins schließen. Ein Alignment (siehe Anhang 5.2.) von bekannten pflanzlichen DEG15-Proteasen verdeutlicht die ungewöhnliche Aminosäuresequenz dieser Protease. Anhand des Alignments wurde gezeigt, dass die AtDEG15-Protease einen ungewöhnlich hohen Gehalt an Prolinen (AtDEG15 6,5%, RcDEG15 5,8%) und Glycinen (AtDEG15 8,0%, RcDEG15 8,9%) aufweist. Auffallend ist dabei, dass Proline und Glycine in bestimmten Bereichen des Proteins gehäuft bzw. zusammengelagert vorkommen, so dass hier von „geclusterten“ Prolinen und Glycinen gesprochen werden kann. Das Auftreten dieser „geclusterten“ Proline und Glycine über die komplette Sequenz der DEG15 ist als sehr ungewöhnlich einzustufen. Proline sind starke „Helix- und  $\beta$ -Faltblatt-Brecher“ und die Ausbildung geordneter Proteinstrukturen wird durch das Vorkommen von Prolinen gestört, oder gänzlich unterbrochen. Glycine führen zu einer hohen Flexibilität in Proteinstrukturen, da durch das Fehlen einer Seitenkette der Aminosäure die Struktur hier jeden Torsionswinkel einnehmen kann. Durch diese Flexibilität wird die Ausbildung geordneter Strukturen innerhalb des Proteins gestört.

Neben dem hohen Gehalt an Glycinen und Prolinen ist auch ein relativ hoher Serin-Gehalt (>10%) und ein hoher Alanin-Gehalt (>8%) auffällig, wodurch ebenfalls eine sehr dynamische Proteinstruktur bedingt und die Ausbildung regelmäßiger Strukturen innerhalb des Proteins gestört wird.

Diese Erkenntnisse unterstützen die Annahme, dass den in der Strukturvorhersage als unstrukturierte Bereiche angegebenen Teilen der AtDEG15 tatsächlich strukturgebende Elemente fehlen und die Ausbildung einer geordneten Proteinstruktur gestört ist.

### **2.1.3 Identifizierung unstrukturierter Bereiche innerhalb der AtDEG15 über RONN und FoldIndex**

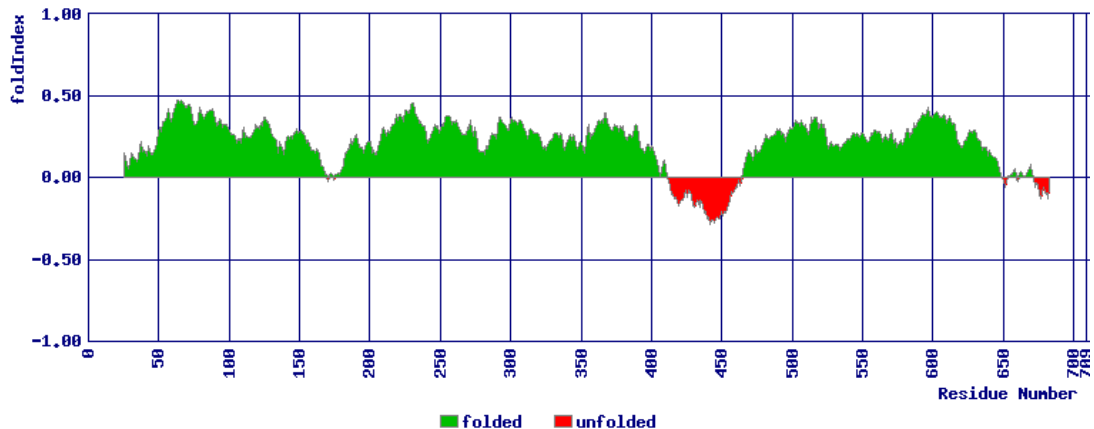
Lange Zeit wurde angenommen, dass die Ausbildung einer Tertiärstruktur unerlässlich für die Funktionalität von Proteinen ist. Diese Annahme musste mit der Entdeckung der *IUPs* revidiert werden. Es gibt mittlerweile eine Reihe von Programmen, die sich mit der Vorher-

sage von unstrukturierten Bereichen innerhalb von Proteinstrukturen befassen, z.B. PONDR, SEG, DisoPred2, Globplot, Disembl oder FoldIndex. Diese Programme beziehen in ihre Berechnungen für die Vorhersage unstrukturierter Bereiche verschiedene Parameter mit ein. Sequenzmerkmale für eine Fehlordnung von Proteinen sind beispielsweise ein hoher Anteil an geladenen Aminosäuren und die Abwesenheit von großen hydrophoben Aminosäuren, die in einer regelmäßigen Tertiärstruktur eines Proteins innerhalb des Moleküls liegen und durch hydrophobe Wechselwirkungen die globuläre Struktur von Proteinen stabilisieren. Daneben werden bei einigen der Programme wie PONDR, Disopred2 und RONN weitere Strukturmerkmale mit in die Vorhersage einbezogen. Dazu gehören unter anderem die Ausbildung von *loops* und *coils*, die Fähigkeit zur Ausbildung regulärer Sekundärstrukturen, also  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter, und beispielsweise das Vorkommen von Serin, welches die Löslichkeit und Flexibilität eines Proteins erhöht und dadurch ebenfalls das Fehlen einer stabilen Tertiärstruktur begünstigt.

Die AtDEG15-Sequenz wurde auf das Vorkommen unstrukturierter Bereiche hin analysiert. Es werden die Ergebnisse einer Untersuchung der AtDEG15 mit FoldIndex vorgestellt, einem Programm, das Proteinregionen mit einer niedrigen Hydrophobizität bzw. hoher Nettoladung ermittelt, die entweder *loops* oder unstrukturierte Bereiche ergeben (Prilusky et al., 2005). Neben FoldIndex wurde die AtDEG15-Sequenz mit RONN (*regional order neural network*) untersucht, einem Programm, das Bereiche innerhalb eines Proteins ermittelt, die unter nativen Bedingungen nicht zur Ausbildung von geordneten 3-dimensionalen Strukturen befähigt sind (Yang et al., 2005).

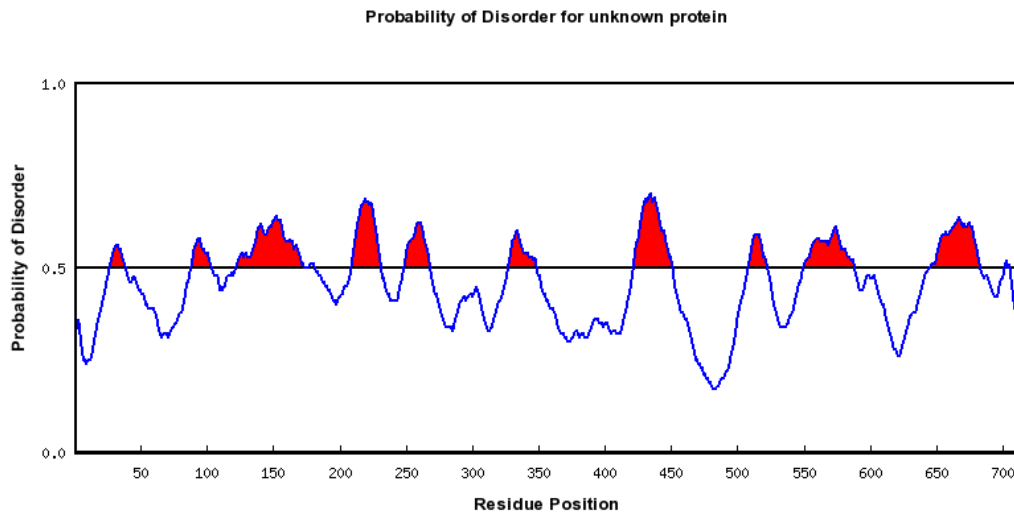
Die Untersuchungen der AtDEG15-Sequenz mit FoldIndex ergaben, dass der Bereich der Protease, der bisher als Pflanzen-spezifischer *loop* innerhalb der Protease-Domäne (Trp 397-Ile465) postuliert wurde, tatsächlich eine niedrige Hydrophobizität bzw. eine hohe Nettoladung aufweist. Diese Region der AtDEG15 wird von FoldIndex in der Tat als unstrukturierter Bereich angegeben (Abb.11), was mit den bisher erhaltenen Ergebnissen der Protease-internen Strukturvorhersage übereinstimmt. Neben dem Pflanzen-spezifischen *loop*, weist RONN auch den äußersten Teil des C-Terminus als unstrukturiert aus, in dem das PTS1 der AtDEG15 lokalisiert ist. Es scheint durchaus sinnvoll, dass die Aminosäuren N-terminal zum *targeting*-Signal keine starre Struktur einnehmen, sondern flexibel und frei beweglich sind. Sie machen die AtDEG15 somit zugänglicher für das Rezeptor-Protein PEX5, das die PTS1-tragenden Enzyme im Cytosol bindet und zur peroxisomalen Membran leitet.





**Abbildung 11: FoldIndex weist den Pflanzen-spezifischen *loop* innerhalb der Protease-Domäne und das PTS1 der DEG15 als unstrukturierte Bereiche aus.** Angegeben werden Bereiche des Proteins, die eine niedrige Hydrophobizität der einzelnen Aminosäurereste aufweisen. Dabei wird die Hydrophobizität für einzelne Aminosäuresequenzen kalkuliert und auf ein Größenverhältnis von 0 bis 1 normalisiert. Die durchschnittliche Hydrophobizität ist dabei als die Summe der normalisierten Hydrophobizitäten aller Aminosäurereste geteilt durch die Anzahl der Reste in dem Polypeptid angegeben. Bereits ab einer durchschnittlichen Hydrophobizität von  $<0,4$  gilt die Wahrscheinlichkeit als hoch, dass dieser Bereich nicht zur Ausbildung regelmäßiger Strukturen befähigt ist. In dem Bereich AS 405-470 ergibt sich sogar ein negativer Wert für die durchschnittliche Hydrophobizität. Der Pflanzen-spezifische *loop* innerhalb der Protease-Domäne der AtDEG15 wird in diesem Bereich als gesichert unstrukturiert angegeben.

Eine Analyse der AtDEG15-Sequenz mit dem Programm RONN ergab eine ganze Reihe an Bereichen, für die eine geordnete Struktur als unwahrscheinlich gilt. Betrachtet man Lage und Umfang dieser Bereiche, so fällt auf, dass sich die hier erhaltenen Ergebnisse gut mit den Ergebnissen der ermittelten Strukturvorhersage (siehe Abb. 10) decken. RONN weist die beiden in der Strukturvorhersage angegebenen *loops* (Leu132 – Phe197; Trp397 – Ile465) ebenfalls als Bereiche ohne regelmäßige Struktur aus. Ebenso den unstrukturierten Bereich, der die strukturierten Bereiche des N-Terminus mit der Protease-Domäne verbindet (Leu326 – Pro353). Auch andere Bereiche der Deg-Protease wie zum Beispiel Leu88-Lys103, Glu328-Ser348 und Ser646-Asn675 werden als unstrukturierte Bereiche postuliert. Diese Bereiche werden ebenfalls in der Strukturvorhersage als nicht geordnet angegeben (Abb. 12).



**Abbildung 12: Die über RONN berechnete und graphisch dargestellte Wahrscheinlichkeit ungeordneter Bereiche zeigt über die gesamte DEG15-Sequenz immer wieder Unterbrechungen regelmäßiger Strukturen.** Angegeben werden hierbei die Wahrscheinlichkeiten einer vorhergesagten Unstrukturiertheit für einzelne Peptid-Bereiche, die graphisch zusammengefasst werden. Dabei gilt eine angegebene Wahrscheinlichkeit  $>0,5$  als Indiz für einen unstrukturierten Bereich innerhalb des Proteins.

Fasst man die Ergebnisse der in Punkt 2.1.1., 2.1.2. und 2.1.3. durchgeführten *in silico*-Untersuchungen zusammen und betrachtet sie im Kontext, so wird deutlich, dass es sich bei der AtDEG15 um ein Protein mit sehr ungewöhnlicher Struktur handelt. Mehrere unabhängige Verfahren der Strukturuntersuchung weisen die DEG15-Protease als ein dynamisches und flexibles Protein aus, dessen regelmäßige Struktur immer wieder von ungeordneten Bereichen unterbrochen wird.

## 2.2 CML3 ist ein typischer Vertreter der Calmoduline

Die DEG15 liegt in einem Protein-Rohextrakt aus Wassermelone als Gleichgewicht zwischen Monomer mit 72kDa und Dimer mit 144kDa vor, wobei das Gleichgewicht durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Zugabe in Richtung Dimer, durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Entzug in Richtung Monomer verschoben wird (Helm et al., 2007). Wie jedoch genau das Gleichgewicht durch die Calcium-Ionen beeinflusst wird, ist nicht bekannt.

Calcium ist ein universeller Botenstoff in eukaryotischen Organismen (Berridge et al., 2000). Eine Änderung der Calcium-Konzentration durch biotische oder abiotische Reize wird in der Zelle von Calcium-Sensoren erkannt. Einer der wichtigsten Sensoren für Calcium in den eukaryotischen Zellen ist Calmodulin. Eine mögliche Regulierung des Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Gleichgewichtes wurde daher in der Bindung von Calmodulin gesehen. Zudem ist mit CML3 ein *calmodulin-like*-Protein in den Peroxisomen und damit in demselben Zell-Kompartiment wie die DEG15 lokalisiert.

Das Arabidopsis Genom weist 7 Calmoduline (CaM) und 50 *calmodulin-like*-Gene (CML) auf, die mögliche Calciumsensor-Proteine codieren. Unter den *calmodulin-like*-Proteinen sind Sequenz-Unterschiede weit verbreitet, was auf unterschiedliche Funktionen und unterschiedliche Arten der Regulierung der CMLs hindeutet. Die Analogie eines CMLs zu den typischen CaM und deren Funktion als Ca<sup>2+</sup>-abhängiger Sensor muss daher im Einzelnen bestimmt werden.

Zu diesem Zweck wurde die Sequenz von CML3 mit der anderer Calmoduline verglichen und die EF-Hände auf ihre Fähigkeit zur Ca<sup>2+</sup>-Koordination hin überprüft (Abb. 13).

```

AtCML3 1 -----MDQAEELARIFQMFDRNGDGKIKQELNDSLENLGIYIPDKDLVQMIETDLNGDGYVDIEEFGGLYQTIMEERD 74
AtCaM1 1 MADQLTDEQISEFKEAFSLFDKDDGDCITTKELGTVMRSLGQNPTAEELQDMINEVDADGNGTIDFPEFLNLMAKMKDTD 81
HsCaM1 1 MADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDDGDTITTKELGTVMRSLGQNPTAEELQDMINEVDADGNGTIDFPEFLTMMARKMKDTD 81
      : :* . . . : * : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
      Eh~hh~hX Y ZG#I`X `Zh~ hh~h~ Eh~hh~hX Y ZG#I`X `Zh~hh~h~
AtCML3 75 EEEEDMREAFNVFDQNRDGFITVEELRSVLASLGLKQGRTECDCKRMISKVDVDGDMVNFKEFKQMMKGGGFAALGSNL 153
AtCaM1 82 SEEEELKEAFRVFDKQNGFISAAELRHVMTNLGEK--LTDEEVEEMIREADVDDGQINYEELFKIMMAK----- 149
HsCaM1 82 SEEEIREAFRVFDKQNGYISAAELRHVMTNLGEK--LTDEEVDDEMIREADIDGQVNYEELFKQMMTAK----- 149
      . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
      Eh~hh~hX Y ZG#I`X `Zh~hh~h~ Eh~hh~ hX Y ZG#I`X `Zh~hh~h~

```

**Abbildung 13: Alignment des peroxisomalen AtCML3 mit AtCaM1 (*A. thaliana*) und HsCaM1 (*H. sapiens*).** Die beiden Helices einer EF-Hand sind dunkelgrau hinterlegt, die Ca<sup>2+</sup>-koordinierenden AS einer EF-Hand in hellgrau. Unterhalb der Sequenzen wurden die Übereinstimmungen der AS mit \*, :, . angegeben, wobei \* identische AS über alle Sequenzen anzeigt, : und . geben berechnete Ähnlichkeiten an oberhalb eines festgelegten Schwellenwertes (Higgins et al., 1988). Die Consensussequenz der EF-Hände ist ebenfalls unterhalb der Sequenzen angegeben. E steht für Glu, h für eine hydrophobe AS, ~ kann durch eine beliebige AS besetzt werden. Der Ca<sup>2+</sup>-koordinierenden 12 AS lange *loop* innerhalb der EF-Hand bindet das Ca<sup>2+</sup> über 7 Koordinationsstellen (X, Y, Z, #, `X, `Z) (Gifford et al., 2007).

Anhand des Sequenzvergleiches von AtCML3 mit den typischen Calmodulinen AtCaM1 aus *A. thaliana* und HsCaM1 aus *H. sapiens* konnte gezeigt werden, dass eine hohe Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen gegeben ist (Abb. 13). AtCML3 weist im Vergleich zu den anderen beiden Calmodulinen einen verlängerten C-Terminus auf, da hier das peroxisomale *targeting* Signal lokalisiert ist. AtCML3 besitzt wie die typischen Calmoduline 4 EF-Hände mit ihrer charakteristischen Consensussequenz, wobei in drei EF-Händen das gebräuchliche Glu (E) gegen ein Asp (D) ausgetauscht ist (Abb. 13). Die 7 Ca<sup>2+</sup>-koordinierenden Aminosäuren sind hochkonserviert. An Position X ist ein Asp (D) zu finden, an Position Y ein Asp (D), ein Asn (N), in Position Z ein Asp (D), ein Asn (N) oder ein Serin (S), in Position # und X sind unterschiedliche AS möglich, wobei die Position X meistens ein Asp (D), ein Asn (N) oder ein Ser (S) aufweist, und in Position Z ist ein Glu (E) entscheidend, da diese AS 2 Koordinationsstellen für das Ca<sup>2+</sup> liefert. Position 6 weist ein konserviertes Gly (D), Position 8 ein Ile (I) oder ein Val (V). Alle diese konservierten AS des Ca<sup>2+</sup>-koordinierenden loops sind auch in den 4 EF-Händen des AtCML3 zu finden (Abb. 13). Es kann somit gefolgert werden, dass AtCML3 wie auch die typischen Calmoduline zur Bindung von Ca<sup>2+</sup> fähig ist und sich aufgrund der hohen Sequenzübereinstimmung auch strukturell wie diese typischen Vertreter verhält.

### 2.3 AtDEG15 ist zur Dimerisierung befähigt

Die DEG15 aus Pflanzen bildet ein Gleichgewicht aus monomerer und dimerer Form. Das Gleichgewicht wird durch Ca<sup>2+</sup>-Zugabe in Richtung des Dimeres, durch Ca<sup>2+</sup>-Entzug zum Beispiel durch die Zugabe von EDTA oder Phosphat-Ionen in Richtung des Monomers verschoben. Die Existenz der monomeren und dimeren Form der DEG15 konnte nach der Reinigung aus angereicherten Wassermelonen-Glyoxysomen über Sephadex75- und Hydroxyapatit-Säulen auf nativen Polyacrylamid-Gelen nachgewiesen werden. Die proteolytische Aktivität des Dimers wurde über ein „Aktivitäts-Gel“ mit Gelatine nachgewiesen. Die proteolytische Aktivität des Monomers wurde nach erfolgter Inkubation der Gele mit dem fluorogenen Peptid Cbz-FR-AMC anhand der auftretenden Fluoreszens nachgewiesen (Helm et al., 2007).

Eine Dimerisierung der AtDEG15 ähnlich der der CvDEG15 sollte in einem unabhängigen System bestätigt werden. Für den Nachweis der Interaktion von zwei AtDEG15-Molekülen wurde daher das *yeast-two-hybrid*-System gewählt.

Das Verfahren des *yeast-two-hybrid* basiert auf der Verwendung von Transkriptionsfaktoren, die verschiedene Untereinheiten für DNA-Bindung bzw. Aktivierung eines Reporter-Genes besitzen. Die codierenden Sequenzen der zu überprüfenden Proteine bzw. Interaktionspartner werden mit diesen Domänen fusioniert. Kommt es zu einer Interaktion der beiden getesteten Proteine bedingt dies eine räumliche Annäherung der Bindungs- und der Aktivierungsdomäne, was zu einer Transkription des Reporter-Genes führt. In dem verwendeten *yeast-two-hybrid*-System von Clontech besitzt das Genom des Hefestammes AH109 vier Gal4-empfindliche Reporter-Gene. Es wurden in den nachfolgenden Versuchen jeweils zwei der Reporter-Gene auf ihre Transkription hin untersucht, zum einen das HIS3-Reporter-gen, dessen Transkription es den Hefezellen erlaubt auf Minimalmedium ohne Histidin-Supplementation zu wachsen, zum anderen das lacZ-Reporter-gen, welches zu einer Expression von  $\beta$ -Galactosidase führt, deren Konzentration indirekt über die Umsetzung von o-Nitrophenolgalactosid bestimmt werden kann. Wird das Substrat dabei der Enzymreaktion in einem Überschuss zugesetzt, ist die Bildung des o-Nitrophenols in einer bestimmten Zeitspanne proportional zur Konzentration der enthaltenen  $\beta$ -Galactosidase. Dadurch ist nicht nur ein Nachweis der Interaktion zweier Proteine möglich, sondern auch eine quantitative Bestimmung der Interaktion und somit Aussagen über die Affinität der beiden Bindungspartner zueinander.

Die AtDEG15-cDNA wurde zunächst in die Vektoren pBridge und pGAD424-AD kloniert. Dadurch wurde die AtDEG15 sowohl mit der DNA-Bindedomäne, als auch mit der DNA-Aktivierungsdomäne fusioniert. Nach erfolgter Transformation in den Hefestamm AH109 wurden positive Transformanten zum einen auf die Transkription des HIS3-Reportergens getestet, indem Verdünnungsreihen einer Übernachtskultur auf Minimal-Medium ohne Histidin-Zusatz aufgebracht wurden (Tüpfeltest) (Abb. 14), und zum anderen auf die Transkription des lacZ-Reportergens, die über einen Galactosidase-Assay bestimmt wurde (Abb. 15). Als negative Kontrollen wurden die beiden Vektoren bzw. jeweils ein Vektor und ein Vektor, der die AtDEG15-cDNA trägt, in den Hefestamm AH109 transformiert. Als positive Kontrolle diente eine Transformationslinie, die die beiden Proteine ABI2 und RCAR1 enthielt, die nachgewiesenermaßen im *yeast-two-hybrid*-System interagieren

(Szostkiewicz et al., 2010). Die Ergebnisse des  $\beta$ -Galactosidase-Assays werden in *Miller units* angegeben.

$$1 \text{ Miller unit} = \frac{(Abs_{420} - (1,75 \cdot Abs_{550}))}{(t \cdot v \cdot Abs_{600})}$$

wobei:

- $Abs_{420}$  die Absorption des o-Nitrophenol ist
- $Abs_{550}$  ist die Streuung des *cell debris*, die, wenn sie mit 1,75 multipliziert wird, der Streuung der Absorption bei 420nm entspricht
- $t$  = Reaktionszeit in Minuten
- $v$  = eingesetztes Volumen der Kultur
- $Abs_{600}$  = Zelldichte.

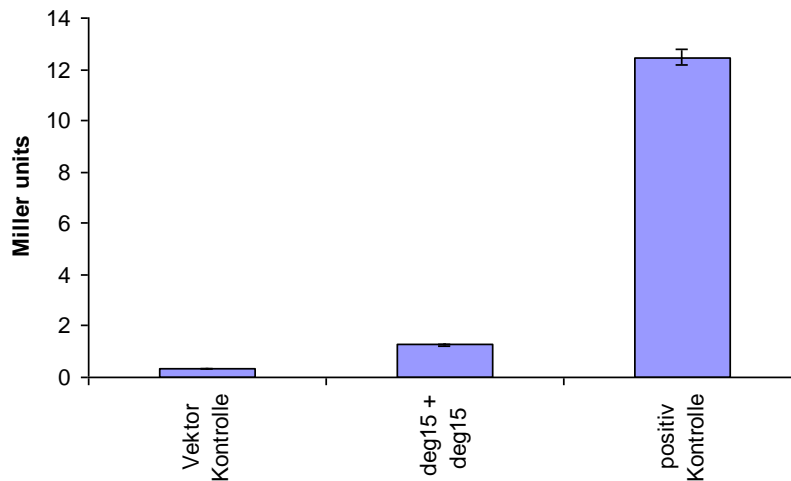
Durch die Berechnung der *Miller units*, in denen sowohl die  $OD_{600}$  der Ausgangs-Kultur, als auch die Reaktionszeit mit einbezogen wird, kann über die Konzentration des gebildeten Nitrophenols die während des Wachstums der Zellen freigesetzte Menge an  $\beta$ -Galactosidase bestimmt werden. Die Menge der gebildeten  $\beta$ -Galactosidase ist dabei proportional zur Interaktion der beiden untersuchten Proteine. Somit können über den  $\beta$ -Galactosidase-Assay und die Bestimmung der *Miller units* Rückschlüsse über die Stärke der Interaktion der beiden Bindungs-Partner geschlossen werden.

Verwendete Konstrukte	Verwendetes Selektions-Medium	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>
Vektor-Kontrolle	SD: -His, -Leu, -Trp					
	SD: -Leu, -Trp					
DEG15_pBridge + DEG15_pGAD	SD: -His, -Leu, -Trp					
	SD: -Leu, -Trp					

**Abbildung 14: Test auf Dimerisierung der AtDEG15 durch Nachweis der Transkription des HIS3-Reportergens.** Der Test auf Interaktion zeigt, dass die Kulturen die die AtDEG15-Protease enthalten zum Wachstum auf Selektions-Medium ohne Histidin-Supplementation fähig sind. Eine Interaktion der AtDEG15 mit sich selbst konnte gezeigt werden. Aufgetragen wurden unterschiedliche Verdünnungen einer Übernachtskultur auf Selektions-Medium (SD). Leucin (Leu) dient als Selektionsmarker für den verwendeten pGAD424AD-Vektor, Tryptophan (Trp) für den verwendeten pBridge-Vektor. Beide AS werden dem Selektions-Medium nicht zugefügt (SD:-Leu, -Trp). Interagieren die beiden untersuchten Proteine, wird das HIS3-Reportergen transkribiert und die Kulturen können auf Selektions-Medium ohne Histidin-Supplementation (SD: -His, -Leu, -Trp) wachsen. Die untersuchten Kulturen wurden auf SD: -His, -Leu, -Trp zum Nachweis der Interaktion und auf SD: -Leu, -Trp als Wachstumskontrolle aufgetragen. Die Verdünnungen wurden dabei so gewählt, dass in etwa 10<sup>1</sup> Zellen (rechts) bis 10<sup>5</sup> Zellen (links) enthalten waren. Als negativ Kontrolle diente eine Transformationslinie, die die leeren pBridge- und pGAD424AD-Vektoren enthielt.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl das HIS3-Reportergen, als auch das lacZ-Reportergen transkribiert wurden. Die untersuchten Transformanten konnten auf Minimal-Medium ohne Histidin-Supplementation kultiviert werden, und im Zuge des Galactosidase-Assay wurde bei den AtDEG15-Transformanten eine Umsetzung des Substrates o-Nitrophenol-galactoside gezeigt, die bei den verwendeten negativen Kontrollen nicht zu beobachten war. Der Galactosidase-Assay zeigt darüber hinaus, dass die untersuchte Interaktion der AtDEG15 relativ schwach war. Die erhaltenen Miller *units* für die Interaktion der AtDEG15 waren um den Faktor 10 niedriger, als die der verwendeten positiven Kontrolle.

### β-Galactosidase-assay



**Abbildung 15: Nachweis der Dimerisierung der AtDEG15.** Es konnte eine schwache Interaktion der AtDEG15 mit sich selbst gezeigt werden, die um den Faktor 3 über der verwendeten negativen Kontrolle, aber um den Faktor 10 unter der positiv Kontrolle lag. Gezeigt werden die Untersuchungen auf Interaktion der AtDEG15 mit sich selbst durch Bestimmung der β-Galactosidase-Aktivität, angegeben in *Miller units*. ABI2/RCAR1 dient dabei als positive Kontrolle. Die erhaltenen Werte setzen sich aus drei Doppelbestimmungen mit angegebener Standardabweichung zusammen.

Durch den Nachweis der Transkription der beiden untersuchten Reporter-Gene konnte eine Dimerisierung der AtDEG15 bestätigt und darüber hinaus nachgewiesen werden, dass die Dimerisierung eine schwache Interaktion der AtDEG15 mit sich selbst darstellt.

## 2.4 Interaktion von AtDEG15 mit CML3

Das  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Gleichgewicht zwischen Monomer und Dimer der DEG15 lässt eine Regulierung durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor Calmodulin vermuten. Es ist bekannt, dass Calmodulin häufig an Protein-Protein-Interaktionen aktiv beteiligt ist oder diese indirekt über eine Konformationsänderung der Bindungspartner vermittelt (Hellermann et al., 1997). Daher wurde eine mögliche Interaktion von AtDEG15 mit CaM bzw. dem in den Peroxisomen lokalisiertem CML3 untersucht.



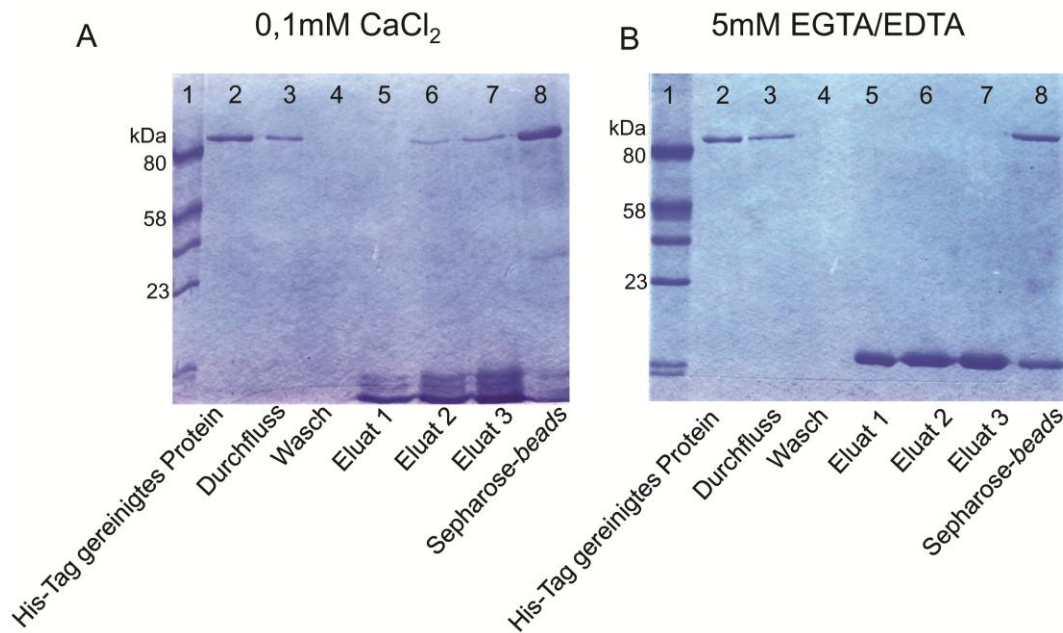
### 2.4.1 AtDEG15 bindet in Anwesenheit von $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen spezifisch an Calmodulin-Sepharose

Um eine mögliche Interaktion von AtDEG15 mit Calmodulin nachzuweisen, wurde als Vorversuch eine Affinitätschromatographie mit Calmodulin-Agarose durchgeführt. Da sich die AtDEG15 wie unter 2.9.1. beschrieben in *E.coli* in den notwendigen Mengen nur in denaturierter Form exprimieren ließ, wurde die Bindung der gereinigten AtDEG15 an die Calmodulin-Agarose unter denaturierenden Bedingungen getestet. Die *inclusion bodies* wurden dazu in 4M Harnstoff solubilisiert und anschließend über eine Ni-TED-Affinitäts-Säule (Macherey-Nagel) gereinigt. Das über His-tag gereinigte Protein zeigte nach der Auftrennung über 12,5% SDS-PAGE und Detektion über Coomassie-Färbung eine deutliche Bande bei ca. 70 kDa, darüber hinaus waren keine zusätzlichen Banden detektierbar (siehe Abb. 16, A2).

Der Bindungs-Assay wurde in Gegenwart von 0,1mM  $\text{CaCl}_2$  durchgeführt, da die meisten Proteine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig mit Calmodulin interagieren. Als negative Kontrolle wurde parallel ein Bindungs-Assay in Anwesenheit von 5mM EGTA/EDTA durchgeführt, wodurch in den Puffern vorhandene  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen abgefangen werden sollten und der Assay somit in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durchgeführt werden konnte.

Nach der erfolgten Bindung an die Calmodulin-Agarose und genau definierten Waschschritten wurden mögliche Interaktionspartner des Calmodulins durch die Zugabe von exogenem Calmodulin kompetitiv von der Agarose eluiert. Die einzelnen Fraktionen des Bindungs-Assays wurden über 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt und nach erfolgter Coomassie-Färbung analysiert (Abb. 16).

War Calcium in dem Ansatz anwesend, wurde AtDEG15 gebunden und durch die Zugabe von Calmodulin von der Calmodulin-Agarose eluiert, wie anhand der Bande bei 72 kDa in den Eluaten gezeigt werden konnte (Abb16: A 5-7). Zusätzlich zu der Bande bei 72 kDa wurde eine Bande bei ca. 20 kDa detektiert, die das zur Elution verwendete Calmodulin zeigt. Der letzte Waschschritt des Assays enthielt kein Protein mehr. Wurde Calcium durch die Zugabe von EDTA/EGTA abgefangen, konnte AtDEG15 nicht gebunden werden; es wurde neben der Calmodulin-Bande bei 20 kDa kein weiteres Protein in den Elutionsfraktionen detektiert (Abb.16: B 5-7). Es konnte somit gezeigt werden, dass die AtDEG15 spezifisch in Ca-abhängiger Form an die Calmodulin-Sepharose bindet.

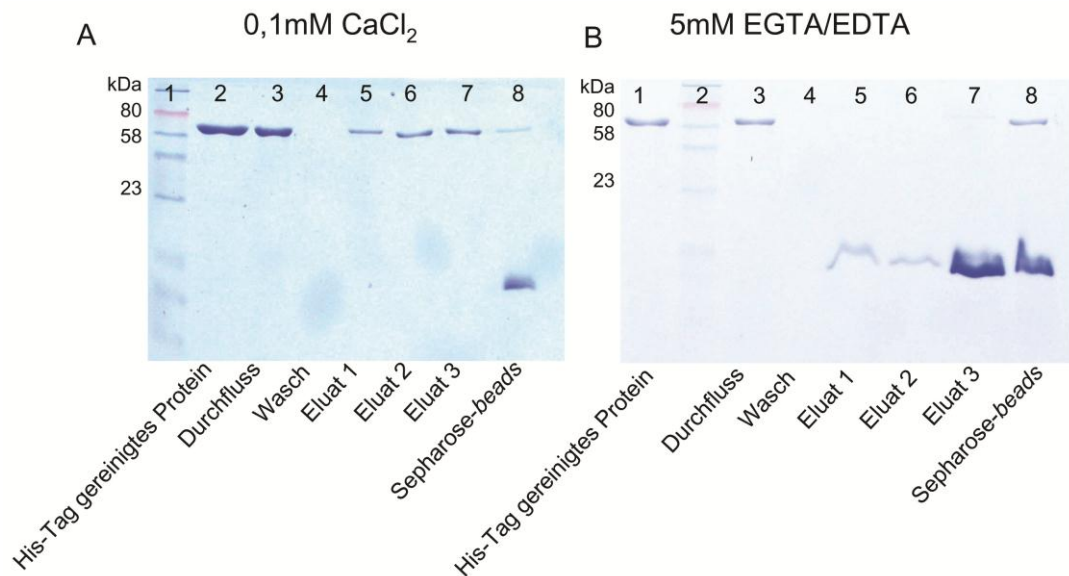


**Abbildung 16: Denaturierte AtDEG15 bindet  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig an Calmodulin-Sepharose.** Die Bindung der AtDEG15 an Calmodulin-Sepharose wurde in Anwesenheit von 0,5 mM  $\text{CaCl}_2$  bzw. in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (gewährleistet durch die Zugabe von 5 mM EGTA/EDTA) untersucht. Dazu wurde AtDEG15\_6xHis-Tag denaturierend in 4M Harnstoff über eine Ni-Affinitäts-Säule gereinigt und für den Assay eingesetzt. Es wurden jeweils 20 $\mu$ l der einzelnen Fraktionen des Bindungs-Assays (Durchfluss, Waschschrift und Eluate) über 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt und nach Detektion der Proteine über Coomassie-Färbung analysiert.

Sowohl in Anwesenheit, als auch in Abwesenheit von Calcium wurde ein gewisser Teil der geladenen AtDEG15 an die Agarose-beads gebunden, der auch durch die Zugabe des exogenen Calmodulins nicht verdrängt werden konnte (Abb. 16: A8; B8). Es wird daher angenommen, dass neben der spezifischen auch eine unspezifische Bindung vorliegt. Diese dürfte aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen der denaturierten AtDEG15 mit der Calmodulin-Agarose zu Stande kommen, da denaturierte Proteine häufig Hydrophobizität exponieren, die bei einer korrekten Faltung der Proteine innerhalb der Proteinstruktur verborgen wäre. Möglich ist zudem auch eine unspezifische Assoziation der AtDEG15 mit der Agarose-Matrix dieses Verhalten hervorrufen.

Eine Arabidopsis-Genom-Analyse identifizierte ein Calmodulin, das aufgrund seiner postulierten peroxisomalen targeting-Sequenz –SNL in den Peroxisomen lokalisiert ist. Es handelt sich dabei um das *calmodulin-like*-Protein 3 (CML3). Da dieses *calmodulin-like*

Protein den mutmaßlichen Interaktionspartner der AtDEG15 in den Peroxisomen darstellt, wurde die Affinitäts-Chromatographie wiederholt und die gebundene AtDEG15 mit peroxisomaler CML3 kompetitiv von der Calmodulin-Agarose eluiert (Abb.17).



**Abbildung 17: Denaturierte AtDEG15 bindet  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig an Calmodulin-Sepharose und kann mit rekombinant exprimiertem CML3 eluiert werden.** Die Bindung der AtDEG15 an Calmodulin-Sepharose wurde in Anwesenheit von 0,5mM  $\text{CaCl}_2$  bzw. in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (gewährleistet durch die Zugabe von 5mM EGTA/EDTA) untersucht. Dazu wurde AtDEG15\_6xHis-Tag denaturierend in 4M Harnstoff über eine Ni-Affinitäts-Säule gereinigt und für den Assay eingesetzt. Zur Elution der gebundenen Proteine wurden 0,2 $\mu\text{g}$  nativ exprimierter und ebenfalls über einen His-Tag gereinigter CML3 eingesetzt. Es wurden jeweils 20 $\mu\text{l}$  der einzelnen Fraktionen des Bindungs-Assays (Durchfluss, Waschschrift und Eluate) über 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt und nach erfolgter Detektion der Proteine mit Coomassie-Färbung analysiert.

In dem Ansatz, der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen enthielt, konnte durch die Zugabe des peroxisomalen CML3 die AtDEG15 von der Calmodulin-Agarose eluiert werden (Abb.17: A Eluat 5-7). Im letzten Waschschrift des Assays war kein Protein mehr enthalten (Abbildung 17: A 4). Wurde Calcium durch die Zugabe von EDTA/EGTA abgefangen, konnte AtDEG15 nicht gebunden werden und es konnte neben dem zur Elution zugesetzten CML3 bei ca. 20 kDa kein weiteres Protein in den Elutionsfraktionen nachgewiesen werden (Abb.17: B 5-7). Anhand dieser Affinitäts-Chromatographie konnte somit gezeigt werden, dass das rekombinant exprimierte CML3 in der Lage ist, in  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Weise gebundene AtDEG15 von der Calmodulin-Sepharose zu verdrängen.

Fasst man die Ergebnisse der beiden durchgeführten Affinitäts-Chromatographie zusammen, so konnte zum einen gezeigt werden, dass es sich bei der AtDEG15 um ein Calmodulin-bindendes-Protein handelt, zum anderen konnte das peroxisomale *calmodulin-like*-Protein 3 (CML3) als Interaktionspartner der AtDEG15 nachgewiesen werden.

#### **2.4.2 Interaktion von AtDEG15 mit CML3: Untersuchung im *yeast-two-hybrid***

Die Interaktion von AtDEG15 mit dem peroxisomalen CML3 konnte in einer Affinitäts-Chromatographie in Anwesenheit von 4M Harnstoff mit denaturierter AtDEG15 nachgewiesen werden. Diese Interaktion sollte im *yeast-two-hybrid*-System bestätigt werden. Damit wird die AtDEG15 in einem weiteren System als ein Calmodulin-bindendes-Protein identifiziert werden.

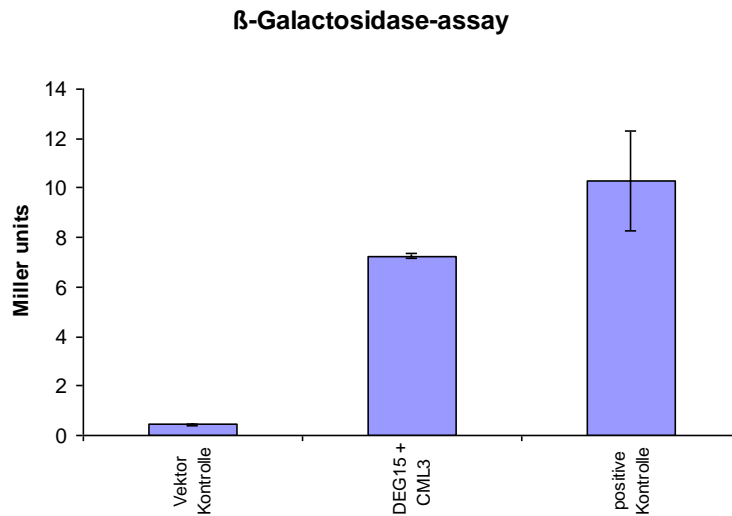
Die AtCML3-cDNA wurde zunächst in die Vektoren pBridge und pGAD424AD kloniert. Dadurch wurde die CML3 sowohl mit der DNA-Bindedomäne, als auch mit der DNA-Aktivierungsdomäne fusioniert. Für die Transformation wurden hier die Transformanden des Hefestammes AH109 aus den Dimerisierungs-Untersuchungen verwendet, die bereits das entsprechende Plasmid mit der AtDEG15-cDNA trugen. Nach erfolgter Transformation der CML3-Konstrukte wurden positive Transformanden zum einen auf die Transkription des HIS3-Reportergens getestet, indem Verdünnungsreihen einer Übernachtskultur auf Minimal-Medium ohne Histidin aufgebracht wurden (Tüpfeltest) (Abb. 18), und zum anderen auf die Transkription des lacZ-Reportergens, die über einen Galactosidase-Assay erfolgte (Abb. 19). Als negative Kontrollen wurden die beiden Vektoren bzw. jeweils ein leerer Vektor und ein Vektor, der die AtDEG15-cDNA bzw. die CML3-cDNA enthielt, in den Hefestamm AH109 transformiert. Als positive Kontrolle diente eine Transformationslinie, die die beiden Proteine ABI2 und RCAR1 enthielt, die nachgewiesenermaßen im *yeast-two-hybrid*-System interagieren (Szostkiewicz et al., 2010).

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl das HIS3-Reportergen, als auch das lacZ-Reportergen transkribiert wurden. Die untersuchten Transformanden konnten auf Minimal-Medium ohne Histidin-Supplementation kultiviert werden (Abb. 18), und im Zuge des Galactosidase-Assay wurde bei Transformanden, die sowohl die AtDEG15, als auch CML3 exprimierten, eine Umsetzung des Substrates o-Nitrophenol-galactoside gezeigt, die bei

den verwendeten negativen Kontrollen nicht zu beobachten war (Abb. 19). Durch den Galactosidase-Assay konnte weiterhin gezeigt werden, dass es sich um eine starke Interaktion der beiden Partner handelt. Die erhaltenen Miller units lagen um den Faktor 10 über der verwendeten negativen Kontrolle und lediglich um den Faktor 0,3 unterhalb der positiven Kontrolle (Abb. 19).

Verwendete Konstrukte	Verwendetes Selektions-Medium	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>
Vektor-Kontrolle	SD: -His, -Leu, -Trp					
	SD: -Leu, -Trp					
DEG15_pBridge + CML3_pGAD	SD: -His, -Leu, -Trp					
	SD: -Leu, -Trp					

**Abbildung 18: Test auf Interaktion von AtDEG15 mit CML3 durch Nachweis der Transkription des HIS3-Reportergens.** Aufgetragen wurden unterschiedliche Verdünnungen einer Übernachtskultur auf Selektions-Medium (SD). Leucin (Leu) ist der Selektionsmarker für den verwendeten pGAD424AD-Vektor, Tryptophan (Trp) für den verwendeten pBridge-Vektor. Beide AS werden dem Selektions-Medium nicht zugefügt (SD: -Leu, -Trp). Interagieren die beiden untersuchten Proteine, wird das HIS3-Reportergen transkribiert und die Kulturen können auf Selektions-Medium ohne Histidin-Supplementation (SD: -His, -Leu, -Trp) wachsen. Die untersuchten Kulturen wurden auf SD: -His, -Leu, -Trp zum Nachweis der Interaktion und auf SD: -Leu, -Trp als Wachstumskontrolle aufgetragen. Die Verdünnungen wurden dabei so gewählt, dass in etwa 10<sup>1</sup> Zellen (rechts) bis 10<sup>5</sup> Zellen (links) enthalten waren. Als negativ Kontrolle diente eine Transformationslinie, die die leeren pBridge- und pGAD424AD-Vektoren enthielt. Der Test auf Interaktion zeigt, dass die Kulturen die die AtDEG15 und CML3 enthalten zum Wachstum auf Selektions-Medium ohne Histidin-Supplementation fähig sind. Eine Interaktion der AtDEG15 mit CML3 konnte gezeigt werden.



**Abbildung 19: Test auf Interaktion von AtDEG15 mit CML3 durch Nachweis der Transkription des lacZ-Reportergens.** AtDEG15 zeigt eine deutliche Interaktion mit CML3. Die erhaltenen *Miller units* liegen um den Faktor 10 über der verwendeten negativen Kontrolle und nur um den Faktor 0,3 unter der positiven Kontrolle. Gezeigt werden die Untersuchungen auf Interaktion der AtDEG15 mit dem peroxisomalen CML3 durch Bestimmung der β-Galactosidase-Aktivität, angegeben in *Miller units*. ABI2/RCAR1 dient dabei als positive Kontrolle. Die erhaltenen Werte setzen sich aus drei Doppelbestimmungen mit angegebener Standardabweichung zusammen.

Durch den Nachweis der Transkription der beiden untersuchten Reporter-Gene konnte die Interaktion der beiden peroxisomalen Proteine AtDEG15 und AtCML3 nachgewiesen werden.

## 2.5 Charakterisierung der CML3-Bindedomäne der AtDEG15

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Bindung von Calmodulin an ein Zielprotein ist von Seiten des Calmodulins her eingehend untersucht (Barbato et al., 1992; Gerstein und Krebs 1998). Da es sich bei CML3 um einen typischen Vertreter der Familie der Calmoduline handelt, wie unter 2.2. beschrieben, war dieser Teil der Interaktion hinreichend geklärt. Auf Seiten der Bindungspartner der Calmoduline sind hingegen weit weniger Erkenntnisse über die Interaktion vorhanden, was vor allem darauf zurück zu führen ist, dass eine Vielzahl unterschiedlichster Proteine mit Calmoduline interagiert. Es sind eine Reihe von Bindungs-Motiven für Calmoduline bekannt, jedoch gibt es auch eine Vielzahl an Proteinen, für die eine Cal-

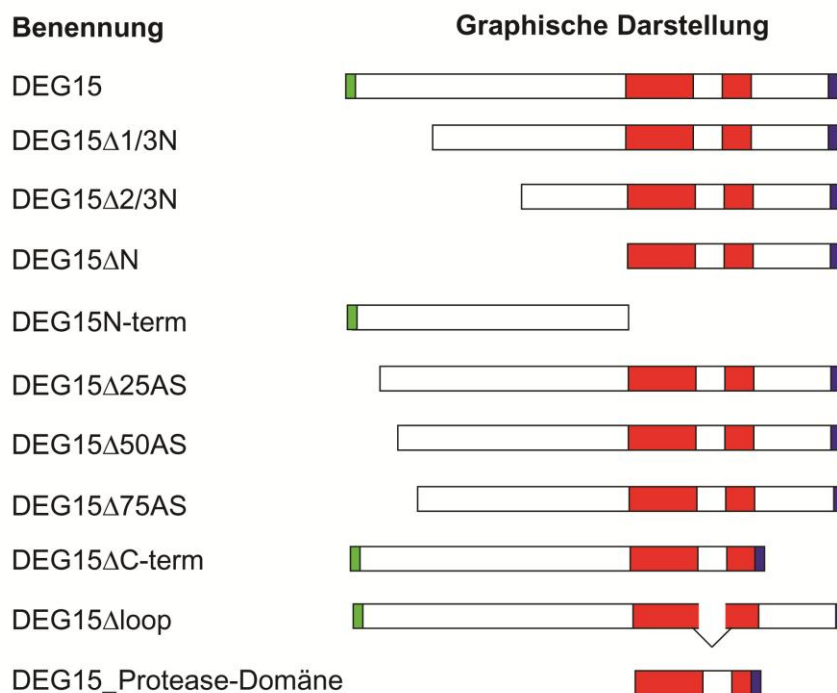
modulin-Bindung nachgewiesen werden konnte, die keines dieser bekannten Motive besitzen (Leclerc et al., 1998; Yang und Poovaiah 2000). Die bekannten Bindungs-Motive beruhen auf dem Vorkommen großer hydrophober Aminosäuren in gewisser Distanz zueinander, was letztlich zur Ausbildung einer amphiphilen Helix führt. Dieser strukturelle Aufbau einer Vielzahl an Calmodulin-Bindungs-Motiven ermöglicht eine Vorhersage eventueller Bindungs-Domänen auf dem Interaktionspartner des Calmodulins. Die Datenbank *calmodulin-target-database* bietet z.B. verschiedene *tools* zur Vorhersage von Bindungsstellen und über <http://cti.itc.virginia.edu/~cmg/Demo/wheel/wheelApp.html> kann eine Aminosäuresequenz auf die Ausbildung einer amphiphilen Helix hin untersucht werden.

Im Zuge dieser Arbeit sollte die Interaktion zwischen CML3 und AtDEG15 genauer charakterisiert und die Bindungs-Domäne der AtDEG15 für das *calmodulin-like*-Protein eingegrenzt werden.

Da die Interaktion der AtDEG15 und der AtCML3 im *yeast-two-hybrid*-System nachgewiesen werden konnte, wurde dieses System auch für die weiterführenden Untersuchungen gewählt. Um einen Anhaltspunkt zu bekommen, welcher Teil der DEG-Protease zur Bindung des Calmodulins fähig ist, wurden Deletionskonstrukte der AtDEG15 auf die Interaktion mit CML3 hin analysiert. Dabei wurde die AtDEG15-cDNA zunächst in zwei Hälften amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen EcoRI und SalI in die Vektoren pBridge und pGAD424AD kloniert. Es ergaben sich die Konstrukte DEG15 $\Delta$ N-Term. und DEG15\_N-Term. (Abb. 20). Für die Transformation der Konstrukte wurden hier Transformanten des Hefestammes AH109 gewählt, die bereits die entsprechenden Plasmide mit der AtCML3-cDNA enthielten. Nach erfolgter Transformation wurde erneut getestet, ob die Transformanten dazu befähigt waren, auf Minimal-Medium in Abwesenheit von Histidin zu wachsen, ob also das HIS3-Reportergen transkribiert wurde, und ob die Zugabe eines Zellaufschlusses der Transformanten im Galactosidase-Assay zur Umsetzung des Substrates o-Nitrophenolgalactosid führte, ob also das lacZ-Reportergen transkribiert wurde. Von den beiden untersuchten Hälften der AtDEG15 konnte nur für den N-terminalen Teil der Protease eine Transkription der Reporter-Gene nachgewiesen werden. Nur Transformanten, die den N-terminalen Teil der AtDEG15 enthielten, waren in der Lage auf Minimal-Medium ohne Histidin-Supplementation zu wachsen (Abb. 21) und nur bei diesen Transformanten konnte im Zuge eines Galactosidase-Assays eine Umsetzung des Substrates o-Nitrophenolgalactosid nachgewiesen werden (Abb. 22). Es konnte somit gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen AtDEG15 und CML3 auf der N-terminalen Hälfte der

AtDEG15 stattfinden muss. Für den C-terminalen Teil der AtDEG15 konnte kein Wachstum auf Minimal-Medium ohne Histidin-Supplementation gezeigt werden (Abb. 21) und Umsetzung des Substrates in einem Galactosidase-Assays lag im Bereich der verwendeten negativen Kontrollen (Abb. 22). Anhand dieser Ergebnisse konnte darauf geschlossen werden, dass die Interaktion zwischen AtDEG15 und CML3 auf der N-terminalen Hälfte der AtDEG15 stattfindet.

Durch die Untersuchung weiterer Deletionskonstrukte sollte nun die CML3-Bindungs-Domäne auf der AtDEG15 stärker eingegrenzt werden. Zu diesem Zweck wurde der N-Terminus der AtDEG15 in drei Teile untergliedert und diese einzeln entfernt, so dass sich die Deletionskonstrukte DEG15 $\Delta$ 1/3N-Term. (AS 94-709) , DEG15 $\Delta$ 2/3N-Term. (AS 210-709) und DEG15 $\Delta$ N-Term (AS 374-709) ergaben (Abb. 20). Diese wurden, wie oben beschrieben, in die Vektoren pBridge und pGAD424AD kloniert. Anschließend wurden diese Deletionskonstrukte in die entsprechenden Hefe-Transformanden, die bereits die CML3-Konstrukte enthielten, transformiert.



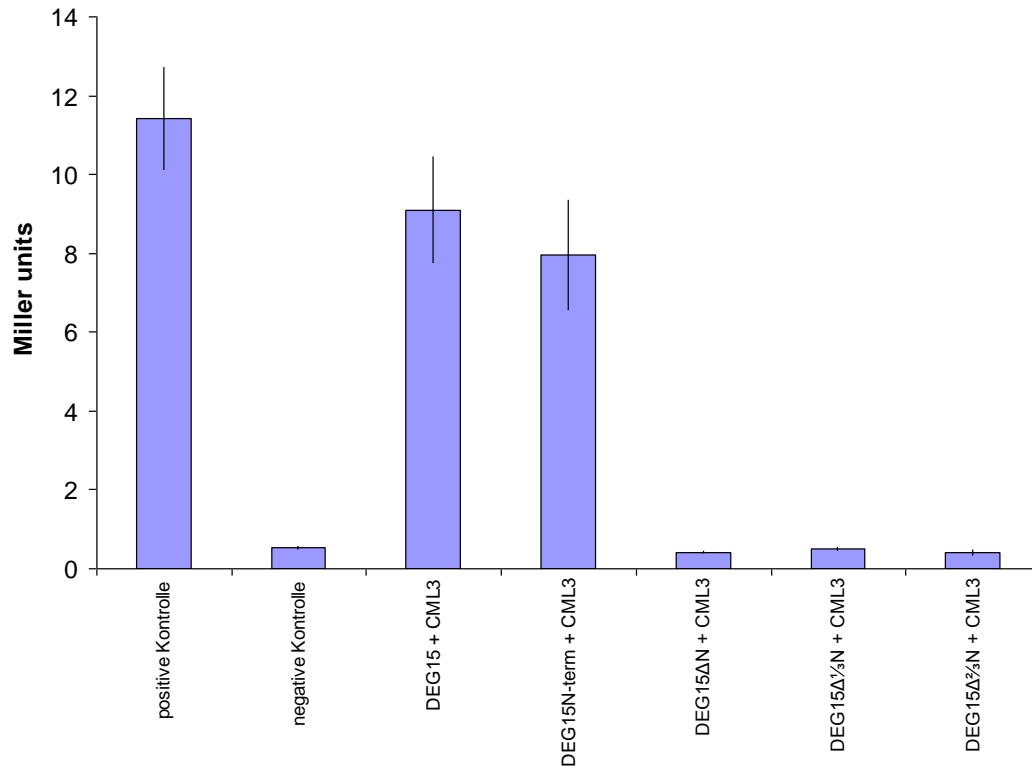
**Abbildung 20: Eingrenzung der CML3-Bindungs-Domäne der AtDEG15 anhand von Deletionskonstrukten.** Gezeigt werden die erstellten Deletionskonstrukte der AtDEG15; Rot: Protease-Domäne mit Pflanzen-spezifischem *loop*, Blau: peroxisomales *targeting*-Signal 1 (-SKL), Grün: CML3-Bindungs-Domäne.



Verwendete Konstrukte	Verwendetes Selektions-Medium	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>
Vektor-Kontrolle	SD: -His, -Leu, -Trp					
	SD: -Leu, -Trp					
DEG15_pBridge + CML3_pGAD	SD: -His, -Leu, -Trp					
	SD: -Leu, -Trp					
DEG15N_pBridge + CML3_pGAD	SD: -His, -Leu, -Trp					
	SD: -Leu, -Trp					
DEG15ΔN_pBridge + CML3_pGAD	SD: -His, -Leu, -Trp					
	SD: -Leu, -Trp					
DEG15Δ1/3N_pBridge + CML3_pGAD	SD: -His, -Leu, -Trp					
	SD: -Leu, -Trp					
DEG15Δ2/3N_pBridge + CML3_pGAD	SD: -His, -Leu, -Trp					
	SD: -Leu, -Trp					

**Abbildung 21: Test auf Interaktion von AtDEG15 und -Deletionskonstrukten mit CML3 durch Nachweis der Transkription des HIS3-Reportergens zur Identifizierung der CML3-Bindedomäne der Deg-Protease.** Aufgetragen wurden unterschiedliche Verdünnungen einer Übernachtskultur auf Selektions-Medium (SD). Leucin (Leu) ist der Selektionsmarker für den verwendeten pGAD424AD-Vektor, Tryptophan (Trp) für den verwendeten pBridge-Vektor. Beide AS werden dem Selektions-Medium nicht zugefügt (SD: -Leu, -Trp). Interagieren die beiden untersuchten Proteine, wird das HIS3-Reportergen transkribiert und die Kulturen können auf Selektions-Medium ohne Histidin-Supplementation (SD: -His, -Leu, -Trp) wachsen. Die untersuchten Kulturen wurden auf SD: -His, -Leu, -Trp zum Nachweis der Interaktion und auf SD: -Leu, -Trp als Wachstumskontrolle aufgetragen. Die Verdünnungen wurden dabei so gewählt, dass in etwa 10<sup>1</sup> Zellen (rechts) bis 10<sup>5</sup> Zellen (links) enthalten waren. Als negativ Kontrolle diente eine Transformationslinie, die die leeren pBridge- und pGAD424AD-Vektoren enthielt. Der Test auf Interaktion zeigt, dass lediglich die Kulturen, die die AtDEG15-Volllänge und CML3 enthalten zum Wachstum auf Selektions-Medium ohne Histidin-Supplementation fähig sind. Die Interaktion der AtDEG15 mit CML3 muss somit auf den ersten 94 AS stattfinden.

## $\beta$ -Galactosidase-assay



**Abbildung 22: Test auf Interaktion von AtDEG15 und -Deletionskonstrukten mit CML3 durch Nachweis der Transkription des lacZ-Reportergens zur Identifizierung der CML3-Bindedomäne der Deg-Protease.** Gezeigt werden die Untersuchungen auf Interaktion der AtDEG15 und Deletionskonstrukte der AtDEG15 mit dem peroxisomalen CML3 durch Bestimmung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität, angegeben in *Miller units*. Zunächst wurden die N-terminale Hälfte der AtDEG15 (DEG15-N-term) und die C-terminale Hälfte der AtDEG15 (DEG15 $\Delta$ N-term) auf ihre Interaktion mit CML3 untersucht. Im Anschluss wurde der N-Terminus der Protease weiter unterteilt, so dass sich die Konstrukte DEG15 $\Delta$ 1/3N, DEG15 $\Delta$ 2/3N ergaben. Lediglich die Volllänge der AtDEG15 und die N-terminale Hälfte der AtDEG15 sind zur Interaktion mit CML3 in der Lage. ABI2/RCAR1 dient dabei als positive Kontrolle, als negative Kontrolle wurde eine Transformationslinie mit den leeren pBridge- und pGAD424AD-Vektoren verwendet. Die erhaltenen Werte setzten sich aus drei Doppelbestimmungen mit angegebener Standardabweichung zusammen.

Keines der untersuchten Deletionskonstrukte zeigte eine Transkription der Reporter-Gene. Die Transformanden zeigten kein Wachstum auf Minimal-Medium in Abwesenheit von Histidin (Abb. 21) und setzten im Zuge eines Galactosidase-Assays kein o-Nitrophenol frei (Abb. 22). Lediglich für das Volllängen-Protein der AtDEG15 konnte eine Interaktion mit CML3 nachgewiesen werden. Anhand dieses Ergebnisses wurde gezeigt, dass die für die

Calmodulin-Bindung verantwortliche Domäne innerhalb der ersten 125 Aminosäuren der AtDEG15 liegen muss.

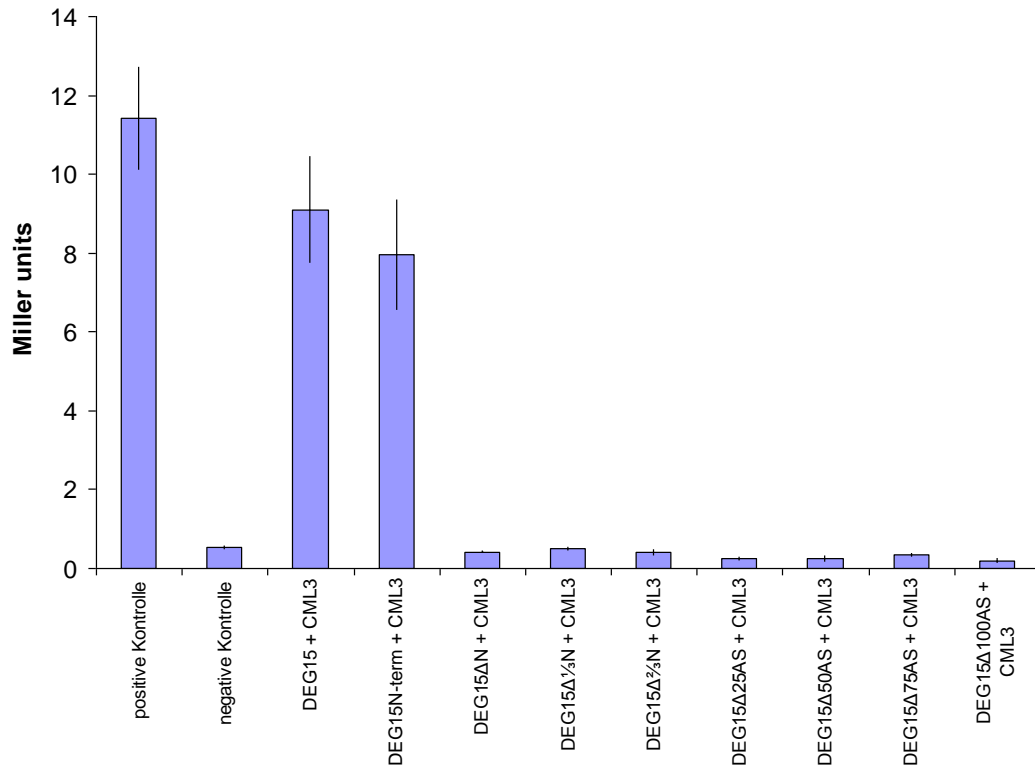
Die bekannten Motive, die eine Interaktion mit Calmodulin vermitteln, sind in der Regel zwischen 20 und 25 Aminosäuren lang. Aufgrund dieser Tatsache wurden die ersten 125 N-terminalen Aminosäuren der AtDEG15 in weitere Teile von je 25 Aminosäuren untergliedert und diese wiederum einzeln von der Deg-Protease entfernt, so dass sich folgende weitere Deletionskonstrukte ergaben: DEG15 $\Delta$ 25ASN-Term., DEG15 $\Delta$ 50ASN-Term., DEG15 $\Delta$ 75ASN-Term und DEG15 $\Delta$ 100ASN-Term (Abb. 20). Diese Konstrukte wurden, wie auch schon die vorangegangenen Deletionskonstrukte aus AtDEG15-cDNA amplifiziert und in die Vektoren pBridge und pGAD424AD kloniert. Anschließend wurden diese neuen Deletionskonstrukte in die entsprechenden Hefe-Transformanden, die bereits die CML3-Konstrukte enthielten, transformiert.

Wie auch schon bei den vorherigen N-terminalen Deletionskonstrukten konnte für keines dieser Deletionskonstrukte eine Transkription der Reporter-Gene nachgewiesen werden. Die Transformanden der Deletionskonstrukte zeigten weder Wachstum auf Minimal-Medium ohne Histidin (Abb.23), noch einen Umsatz des Substrates o-Nitrophenolgalactosid im Galactosidase-Assay (Abb.24). Das bedeutet, dass für die Interaktion von Calmodulin mit der AtDEG15 die ersten 25 Aminosäuren der Deg-Protease verantwortlich sind.

Verwendete Konstrukte	Verwendetes Selektions-Medium	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>
Vektor-Kontrolle	SD: -His, -Leu, -Trp					
	SD: -Leu, -Trp					
DEG15_pBridge + CML3_pGAD	SD: -His, -Leu, -Trp					
	SD: -Leu, -Trp					
DEG15Δ25AS_pBridge + CML3_pGAD	SD: -His, -Leu, -Trp					
	SD: -Leu, -Trp					
DEG15Δ50AS_pBridge + CML3_pGAD	SD: -His, -Leu, -Trp					
	SD: -Leu, -Trp					
DEG15Δ75AS_pBridge + CML3_pGAD	SD: -His, -Leu, -Trp					
	SD: -Leu, -Trp					
DEG15Δ100AS_pBridge + CML3_pGAD	SD: -His, -Leu, -Trp					
	SD: -Leu, -Trp					

**Abbildung 23: Identifizierung der CML3-Bindungsdomäne der AtDEG15 durch den Nachweis der Interaktion von AtDEG15-Deletionskonstrukten mit CML3.** Aufgetragen wurden unterschiedliche Verdünnungen einer Übernachtskultur auf Selektions-Medium (SD). Leucin (Leu) ist der Selektionsmarker für den verwendeten pGAD424AD-Vektor, Tryptophan (Trp) für den verwendeten pBridge-Vektor. Beide AS werden dem Selektions-Medium nicht zugefügt (SD:-Leu, -Trp). Interagieren die beiden untersuchten Proteine, wird das HIS3-Reportergen transkribiert und die Kulturen können auf Selektions-Medium ohne Histidin-Supplementation (SD: -His, -Leu, -Trp) wachsen. Die untersuchten Kulturen wurden auf SD: -His, -Leu, -Trp zum Nachweis der Interaktion und auf SD: -Leu, -Trp als Wachstumskontrolle aufgetragen. Die Verdünnungen wurden dabei so gewählt, dass in etwa 10<sup>1</sup> Zellen (rechts) bis 10<sup>5</sup> Zellen (links) enthalten waren. Als negativ Kontrolle diente eine Transformationslinie, die die leeren pBridge- und pGAD424AD-Vektoren enthielt. Der Test auf Interaktion zeigt, dass lediglich die Kulturen die die AtDEG15-Volllänge enthalten zum Wachstum auf Selektions-Medium ohne Histidin-Supplementation fähig sind. Eine Interaktion der AtDEG15 mit CML3 muss somit innerhalb der ersten 25AS des N-Terminus der AtDEG15 stattfinden.

## β-Galactosidase-assay



**Abbildung 24: Identifizierung der CML3-Bindedomäne der AtDEG15 durch den Nachweis der Interaktion von AtDEG15-Deletionskonstrukten mit CML3.** Nur die AtDEG15-Volllänge ist zur Interaktion mit CML3 in der Lage. Fehlen der AtDEG15 die ersten 25AS des N-Terminus, wird CML3 nicht mehr gebunden. Gezeigt werden die Untersuchungen auf Interaktion der AtDEG15-Deletionskonstrukte mit dem peroxisomalen CML3 durch Bestimmung der β-Galactosidase-Aktivität, angegeben in *Miller units*. ABI2/RCAR1 dient dabei als positive Kontrolle, als negative Kontrolle wurde eine Transformationslinie mit den leeren pBridge- und pGAD424AD-Vektoren verwendet. Dabei wurde das erste Drittel (ca. 125AS) des N-Terminus der Protease weiter unterteilt und die AtDEG15 N-terminal verkürzt, so dass sich die Konstrukte DEG15Δ25AS, DEG15Δ50AS, DEG15Δ75AS und DEG15Δ100AS ergaben. Die erhaltenen Werte des Galactosidase-Assays für die gezeigten Konstrukte setzen sich aus drei Doppelbestimmungen mit angegebener Standardabweichung zusammen.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die ersten 25 Aminosäuren der AtDEG15 auf das Vorkommen möglicher bekannter und etablierter Calmodulin-Bindungs-Motive hin untersucht. Es sind verschiedene Instrumente und Programme verfügbar, mit deren Hilfe diese Motive identifiziert werden können.

Die Datenbank *Calmodulin target database* bietet zum Beispiel ein Vorhersage-Programm, mit dessen Hilfe Bereiche eingegrenzt werden können, die eine hohe Wahrscheinlichkeit für das Vorkommen einer Calmodulin-Bindungsstelle besitzen. Dieses Programm evaluiert die Wahrscheinlichkeiten anhand vorkommender Hydrophobizität, Neigung zur Ausbildung einer  $\alpha$ -Helix, Ladung und Größe der Aminosäuren für ein Fenster von 20 Aminosäuren, das gestaffelt verschoben wird und normalisiert diese Wahrscheinlichkeiten anschließend für die komplette Sequenz auf Werte von 0-9, wobei 9 die höchste Wahrscheinlichkeit angibt. Für die AtDEG15 liefert die Datenbank die größtmögliche Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein eines Calmodulin-Bindungs-Motivs innerhalb der ersten 25 Aminosäuren (Abb. 25).

**Wahrscheinlichkeit einer Calmodulin-Bindungs-Sequenz (Calmodulin target database):**

```

...1 MDVSKVVSFS RNFVAVLVKVE GPDPKGLKMR KHAFHQYHSG NATL
..... 2477799999 9999999999 7422200000 0000000000 0000

```

**Abbildung 25:** *Calmodulin target database* errechnet eine hohe Wahrscheinlichkeit für das Vorkommen eines Calmodulin-Bindungs-Motivs innerhalb der ersten 25 Aminosäuren der AtDEG15. Die errechnete Wahrscheinlichkeit wird dabei von 0-9 angegeben, wobei 9 die höchste mögliche Wahrscheinlichkeit für das Vorkommen eines CaM-Bindungs-Motivs angibt. Von Val6 bis Glu20 wird damit von dem Programm die höchste Wahrscheinlichkeit ermittelt.

Es konnten in diesem Bereich der AtDEG15 durch direkte Analyse der Aminosäuren mehrere bekannte Calmodulin-Bindungs-Motive identifiziert werden. Innerhalb der ersten 25 AS des N-Terminus der AtDEG15 sind ein 1-14 Bindungs-Motiv, ein 1-8-14 Bindungs-Motiv und ein 1-10 Bindungs-Motiv zu finden (Abb. 26). Ein Sequenzvergleich der bekannten DEG15-Proteasen aus Pflanzen (siehe Anhang 5.2) ergab, dass die ersten beiden Binde-Motive auf der DEG15 in allen gefundenen Organismen konserviert sind, während das 1-10 Motiv nicht durchgängig konserviert ist. Es ist daher anzunehmen, dass eines der ersten beiden Bindungs-Motive für die Interaktion der AtDEG15 mit Calmodulin verantwortlich ist.

Neben den Bindungs-Motiven wurden die ersten 25 Aminosäuren der DEG15 auch auf die Möglichkeit hin untersucht, eine basische amphiphile Helix auszubilden. Da Calmodulin nach der Calcium-Bindung eine Konformationsänderung eingeht, bei der hydrophobe Methylgruppen der Methionine zugänglich gemacht werden und diese hydrophoben Bereiche

durch eine flexible Helix-Struktur verbunden sind, bindet das Calmodulin bevorzugt an eine amphiphile Helix des *target*-Proteins, indem es sich um diese herumlegt (Ikura et al., 1992; Meador et al., 1992). Da es sich bei Calmodulin um ein saures Protein handelt, werden basische Bereiche als Bindungs-Stelle bevorzugt, denn dadurch können neben den hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den interagierenden Molekülen auch elektrostatische Wechselwirkungen ausgebildet werden. Die Möglichkeit zur Ausbildung einer solchen basischen amphiphilen Helix kann über:

<http://cti.itc.virginia.edu/~cmg/Demo/wheel/wheelApp.html>

visualisiert werden. Die Untersuchung der ersten 25 Aminosäuren ergab eindeutig eine amphiphile Helix, mit einem Überschuss an basischen Aminosäuren, was insgesamt zu einer positiven Nettoladung der Helix führte (Abb. 26).

#### Calmodulin-Bindungs-Motive:

Sequenzen sind ja nach Abstand der hydrophoben Schlüssel-AS-Reste in Motive unterteilt:

DEG15:

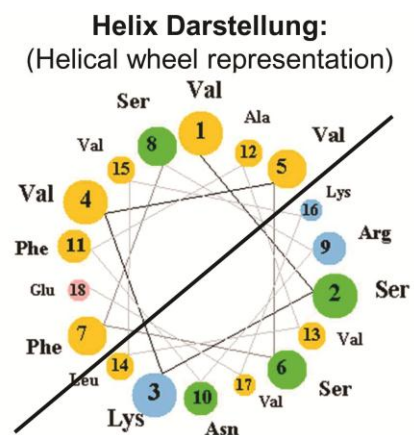
MDVSKVVSFSRNFAVLVKVEGPDPKGLKMR

1		14
1	8	14
(1		10)

**1-14** (FILVW)xxxxxxxxxxxx(FILVW)

**1-8-14** (FILVW)xxxxxx(FAILVW)xxxxx(FILVW)

**1-10** (FILVW)xxxxxxxx(FILVW)



**Abbildung 26: Identifizierung möglicher Motive für die CaM-Bindung innerhalb der ersten 25AS der AtDEG15. Linker Teil:** Angegeben ist die AtDEG15-Sequenz, auf der die Aminosäuren, die möglicherweise für die CaM-Bindung verantwortlich sind, markiert sind. Unterhalb werden die bekannten Calmodulin-Bindungs-Motive zugeordnet. Sie sind definiert durch den Abstand der für die Calmodulin-Bindung entscheidenden hydrophoben AS zueinander. Die AS werden in Ein-Buchstaben-Code angegeben; X steht für eine beliebige AS. **Rechter Teil:** Darstellung der ersten 20 AS in Helix-Struktur. Die Unterteilung der Helix in eine unpolare (gelbe AS), nicht geladene und eine polare (grüne AS), geladene (rosa und blaue AS) Hälfte wird durch die Trennung der Helix dargestellt.

## 2.6 Dimerisierung der AtDEG15 wird durch CML3-Bindung gefördert

Neben der Untersuchung der Interaktion zweier Proteine bietet das für die vorangegangenen *yeast-two-hybrid*-Studien verwendete „Matchmarker GAL4 two Hybrid System“ (Clontech) auch die Möglichkeit ein *yeast-three-hybrid*-System zu etablieren. Die Interaktion zweier Proteine wird dabei in Anwesenheit bzw. Abwesenheit eines dritten möglichen Interaktionspartners getestet, der unter die Kontrolle eines Met25-Promotors in eine zweite *multiple-cloning-site* des pBridge-Vektors kloniert wird. Das erhaltene Fusionsprotein wird nur in Abwesenheit von Methionin im Minimal-Medium exprimiert und über ein *nuclear-targeting*-Signal (-NLS) in den Nucleus geleitet, wo es eine Interaktion der beiden untersuchten Proteine mit der DNA-Bindedomäne bzw. der DNA-Aktivierungsdomäne vermitteln kann.

Das *yeast-three-hybrid*-System wurde dazu verwendet, den möglichen Einfluss der Calmodulin-Bindung auf die Dimerisierung der AtDEG15 zu untersuchen. Es ist bekannt, dass es durch die Bindung von Calmodulinen an ihre *target*-Proteine häufig zu Interaktionen zwischen Proteinen kommt, eine Komplexbildung ermöglicht oder diese reguliert wird (Hellermann et al., 1997). Eine Rolle des Calmodulins bei der Dimerisierung der AtDEG15 sollte daher bestimmt werden.

Die AtCML3-cDNA wurde mittels PCR amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen NotI und BglII in die MCS II des Vektors pBridge-DEG15(MCSI) kloniert. Dadurch wurde es nach erfolgter Transformation möglich, CML3 bei Abwesenheit von Methionin im Minimal-Medium gezielt zu exprimieren bzw. die Expression von CML3 durch die Zugabe von 1mM Methionin in dem verwendeten Medium zu reprimieren. Für die Transformation wurden hier die Transformanden des Hefestammes AH109 aus den Dimerisierungs-Untersuchungen verwendet, die bereits die AtDEG15 in dem Plasmid pGAD enthielten. Nach erfolgter Transformation der pBridge-Plasmide wurden positive Transformanden auf eine Transkription des lacZ-Reportergens untersucht.

Die Ermittlung der Transkription des HIS3-Reportergens erschien an dieser Stelle nicht als sinnvoll, da bereits die schwache Dimerisierung der AtDEG15 in Abwesenheit von CML3 im *yeast-two-hybrid*-System ausreichte, um das Reporter-Gen soweit zu transkribieren, dass es zu einem Wachstum der Zellen auf Minimal-Medium ohne Histidin-Supplementation kam. Da es sich bei dem Wachstumstest nicht wie bei dem Galactosidase-Assay um eine quantitative Bestimmung der Transkription des Reportergens handelt, war

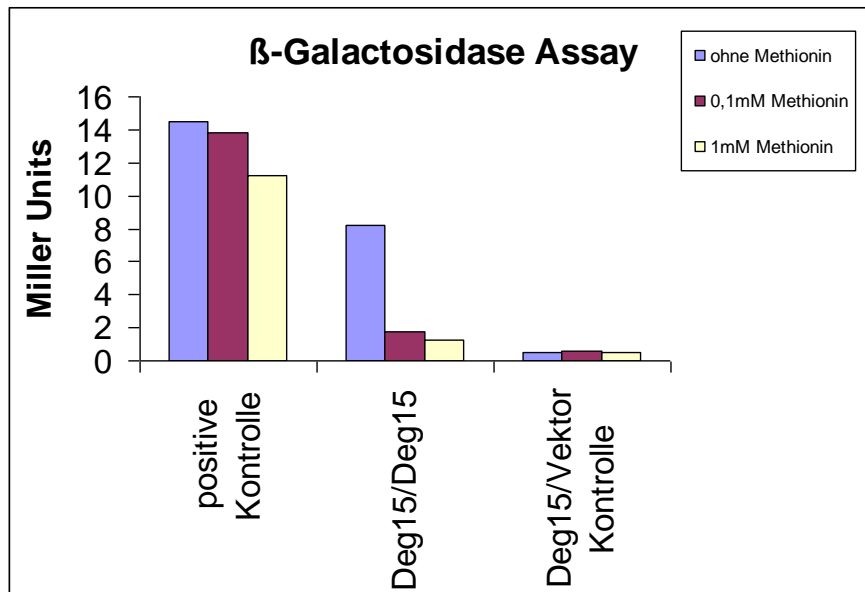


ein offensichtlicher Unterschied in der Interaktion in Anwesenheit oder Abwesenheit des CML3 nicht zu erwarten.

Eine quantitative Bestimmung der Interaktion ist über das lacZ-Reporter-Gen möglich. Um die Transkription des lacZ-Reportergens zu testen, wurde eine Übernachtskultur in Minimal-Medium ohne Histidin mit 0,1mM Methionin, auf Minimal-Medium ohne Histidin mit 1mM Methionin und auf Minimal-Medium ohne Histidin ohne Methionin überimpft und die Kulturen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 weiter kultiviert, (mindestens aber 6h). Die Zellen dieser Kulturen wurden abzentrifugiert und für einen Galactosidase-Assay verwendet.

Für die positive Kontrolle konnte keine signifikante Änderung der Interaktion in Bezug auf die Methionin-Konzentration festgestellt werden (Abb. 27). Für die Interaktion der AtDEG15 mit sich selbst ergaben sich dagegen deutliche Unterschiede. Wurden die Kulturen in Abwesenheit von Methionin angezogen, also zusätzlich zu den AtDEG15-Fusionsproteinen auch CML3 exprimiert, ergaben sich im vorliegenden Assay *Miller units*, die um den Faktor 10 höher lagen, als die der Kulturen, die in Anwesenheit von 0,1mM bzw. 1mM Methionin, also in Abwesenheit von CML3, angezogen wurden (Abb. 27). Es wurde aber auch deutlich, dass im Vergleich zur negativen Kontrolle (DEG15+pGAD424AD), die AtDEG15 auch in Abwesenheit von CML3 in geringem Ausmaß mit sich selbst interagiert. Die *Miller units*, die für die Interaktion der AtDEG15 mit sich selbst in Abwesenheit von CML3 ermittelt wurden, lagen um den Faktor 1,5-2 höher als für die negative Kontrolle (Abb. 27).

Die Untersuchungen der Interaktion der AtDEG15 im *yeast-three-hybrid*-System ergaben, dass es zu einer deutlich stärkeren Interaktion der AtDEG15 mit sich selbst kommt, wenn zusätzlich zur AtDEG15 in beiden Interaktionsvektoren das CML3 exprimiert wird. In Abwesenheit des CML3 lag eine deutlich schwächere Dimerisierung der AtDEG15 vor. Es wurde anhand dieser Ergebnisse bewiesen, dass die Dimerisierung der AtDEG15 durch CML3 befördert wird

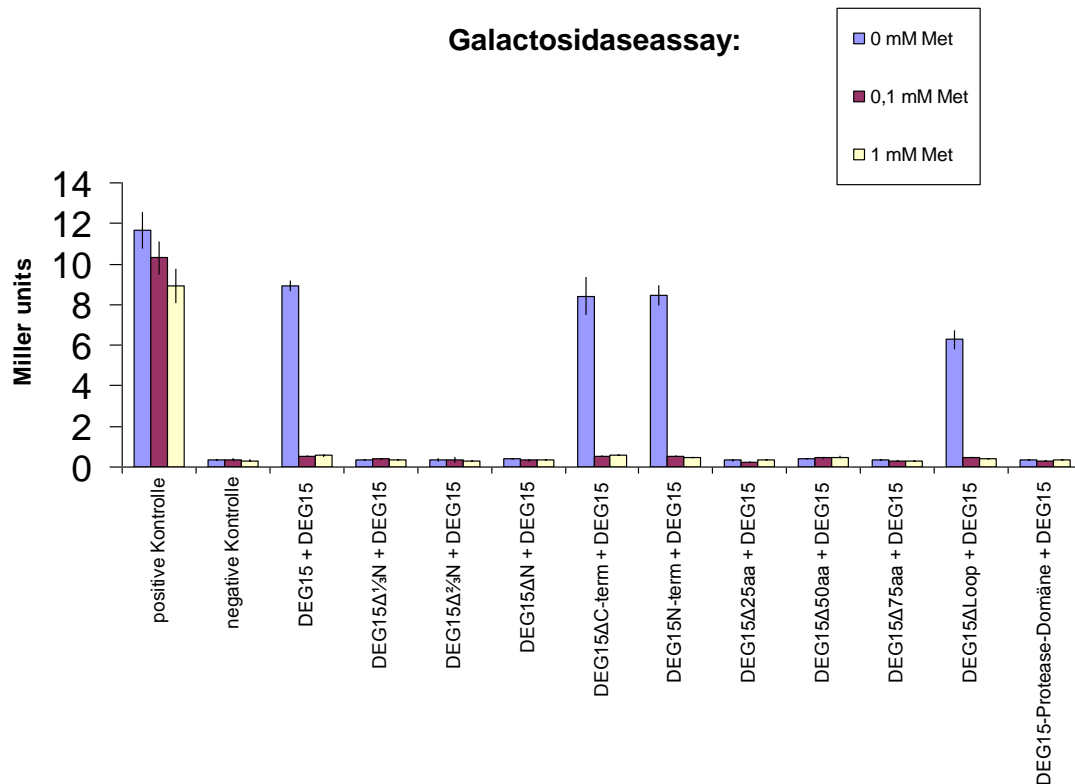


**Abbildung 27: Test des Einflusses von CML3 auf die Dimerisierung der AtDEG15 durch Nachweis der Transkription des lacZ-Reportergens.** Die Kulturen, die in Abwesenheit von Methionin angezogen wurden zeigen eine um den Faktor 10 höhere Interaktion der AtDEG15 mit sich selbst, als Kulturen, die in Anwesenheit von Methionin angezogen wurden. Dabei hat die eingesetzte Methionin-Konzentration keinen Einfluss auf die Interaktion. Für den Assay wurden Zellen in Anwesenheit von 0,1mM, 1mM Methionin und in Abwesenheit von Methionin in Minimal-Medium kultiviert und für den  $\beta$ -Galactosidase-Assay eingesetzt, dabei wurde die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität bestimmt und in *Miller units* angegeben. ABI2/RCAR1 dienen dabei als positive Kontrolle, als negative Kontrolle wurde eine Transformationslinie der AtDEG15\_pBridge und des leeren pGAD424AD-Vektors verwendet.

Um Domänen der AtDEG15 zu identifizieren, die an der Dimerisierung beteiligt sind, wurden Deletions-Konstrukte der AtDEG15 im Y3H-System auf ihre Fähigkeit zur Dimerisierung untersucht. Es wurden Deletions-Konstrukte erstellt, denen 1/3, 2/3 oder der komplette N-Terminus fehlte, Deletions-Konstrukte denen der C-Terminus fehlte, Deletions-Konstrukte, die nur den N-Terminus bis zur Protease-Domäne enthielten, Deletions-Konstrukte ohne den Pflanzen-spezifischen *loop* und Deletions-Konstrukte, die lediglich die Protease-Domäne enthielten (Abb.20).

Im Y3H zeigte sich erneut, dass die AtDEG15-Vollängen in Anwesenheit von CML3 stark miteinander interagierten (Abb. 28). Darüber hinaus konnte eine starke Interaktion des N-Terminus mit der AtDEG15 in Anwesenheit von CML3 nachgewiesen werden. Auch die

Deletions-Konstrukte, die keinen C-Terminus bzw. keinen Pflanzen-spezifischen loop innerhalb der Protease-Domäne besaßen, waren weiterhin zur Dimerisierung in der Lage und zeigten eine starke Interaktion, wenn zusätzlich zur AtDEG15 und den Deletions-Konstrukten CML3 exprimiert wurde (Abb. 28).



**Abbildung 28: Untersuchung von Deletions-Konstrukten der AtDEG15 auf ihre Fähigkeit zur Dimerisierung in Anwesenheit von CML3.** Deletions-Konstrukte der AtDEG15, die N-terminal verkürzt waren, zeigten keine Interaktion im Y3H. Deletions-Konstrukte, die C-terminal verkürzt waren bzw. denen der Pflanzen-spezifische loop innerhalb der Protease-Domäne fehlte zeigten in Anwesenheit von CML3 eine um den Faktor 10 höhere Interaktion mit der AtDEG15, als Kulturen, die in Anwesenheit von Methionin, also in Abwesenheit von CML3 angezogen wurden. Dabei hat die eingesetzte Methionin-Konzentration keinen Einfluss auf die Interaktion. Für den Assay wurden Zellen in Anwesenheit von 0,1mM, 1mM Methionin und in Abwesenheit von Methionin in Minimal-Medium kultiviert und für den  $\beta$ -Galactosidase-Assay eingesetzt, dabei wurde die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität bestimmt und in *Miller units* angegeben. ABI2/RCAR1 dienen dabei als positive Kontrolle, als negative Kontrolle wurde eine Transformationslinie der AtDEG15\_pBridge und des leeren pGAD424AD-Vektors verwendet.

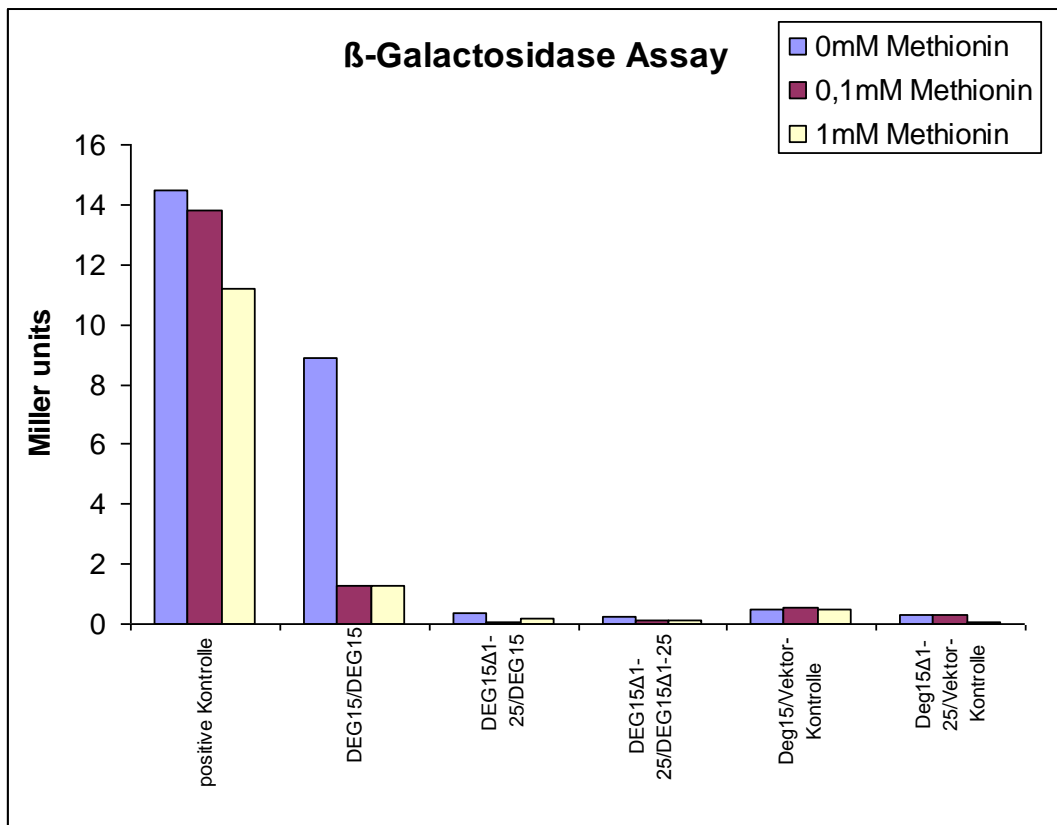
Anhand der Ergebnisse der Y3H-Experimente konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus der AtDEG15 für eine Dimerisierung des Konstruktes ausreicht. Der C-Terminus und der Pflanzen-spezifische *loop* innerhalb der Protease-Domäne haben dagegen keinen Einfluss auf die Dimerisierung der AtDEG15. Deletions-Konstrukte die keinen C-Terminus bzw. keinen Pflanzen-spezifische *loop* innerhalb der Protease-Domäne nicht enthielten, waren dennoch zur Dimerisierung in der Lage.

## **2.7 Für eine Dimerisierung der AtDEG15 ist die CaM-Bindestelle auf beiden AtDEG15-Molekülen nötig**

Die Dimerisierung der AtDEG15 wird durch die Anwesenheit von CML3 gefördert. Da die Bindungs-Domäne des CML3 auf der DEG15 identifiziert werden konnte, wurde in einem nächsten Schritt untersucht, ob für eine Dimerisierung der AtDEG15 die Calmodulin-Bindung an ein Molekül oder an beiden Molekülen der DEG-Protease erfolgen muss. In dem hier verwendeten *yeast-three-hybrid*-System konnte dies getestet werden, indem zusätzlich zu den beiden Deg15-Vollängen-Konstrukten die Deg15-Volllänge und das DEG15 $\Delta$ 1-25AS-Konstrukt (Abb. 20) in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von CML3 auf ihre Interaktion hin untersucht wurden. Bindet Calmodulin lediglich an eines der DEG15-Moleküle so sollte auch im Falle der Expression der Deg15-Volllänge und des DEG15 $\Delta$ 1-25AS-Konstruktes eine Interaktion stattfinden und damit eine Transkription des lacZ-Reportergens erfolgen. Bindet Calmodulin an beide DEG15-Moleküle so sollte eine Interaktion nur im Falle der Expression der beiden Vollängen-Konstrukte zu beobachten sein. Getestet wurden im *yeast-three-hybrid*-System DEG15 gegen DEG15, DEG15 gegen DEG15 $\Delta$ 1-25AS, DEG15 $\Delta$ 1-25AS gegen DEG15 $\Delta$ 1-25AS und die jeweiligen Kontrollen in Gegenwart und in Abwesenheit von CML3. Es konnte gezeigt werden, dass nur bei einer Expression der beiden Vollängen-Konstrukte in Anwesenheit von CML3 eine deutliche Interaktion stattfindet, bei den übrigen getesteten Konstrukten lag die Interaktion im Bereich der negativen Kontrolle (Abb. 29).

Damit konnte im *yeast-three-hybrid*-System gezeigt werden, dass CML3 die Dimerisierung der AtDEG15 fördert und dass für diesen Effekt die Calmodulin-Bindung auf beiden Molekülen der Deg-Protease erfolgen muss. Es wurde daraus gefolgert, dass Calmodulin je-

weils direkt an ein AtDEG15-Molekül bindet und somit aktiv die Dimerisierung fördert bzw. ermöglicht.



**Abbildung 29: Die Vermittlung der Dimerisierung von DEG15 durch CML3 setzt die Anwesenheit der CML3-Bindungs-Domäne auf beiden DEG15-Molekülen voraus.** Für den Assay wurden Zellen in Anwesenheit von 0,1mM und 1mM Methionin und in Abwesenheit von Methionin in Minimal-Medium kultiviert und für den  $\beta$ -Galactosidase-Assay eingesetzt, dabei wurde die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität bestimmt und in *Miller units* angegeben. Getestet wurden die beiden DEG15-Vollängen-Konstrukte, ein Vollängen-Konstrukt und ein Konstrukt, dem die CML3-Bindungs-Domäne fehlt (DEG15 $\Delta$ 1-25) und die beiden verkürzten Konstrukte (DEG15 $\Delta$ 1-25) gegeneinander. Nur bei der Expression der beiden Vollängen-DEG15 kann in Anwesenheit von CML3 eine starke Interaktion nachgewiesen werden. ABI2/RCAR1 dienen als positive Kontrolle, als negative Kontrolle wurde eine Transformationslinie der DEG15\_pBridge und des leeren pGAD424AD-Vektors bzw. des verkürzten Konstruktes DEG15 $\Delta$ 1-25\_pBridge und des leeren pGAD424AD-Vektors verwendet

## 2.8 Domänen-Analyse der AtDEG15 in planta

Die Dimerisierung der DEG15 ist die Voraussetzung für ihre *processing*-Aktivität. Nur das Dimer ist dazu befähigt, die N-terminale pre-Sequenz der pre-gMDH zu erkennen und abzuspalten (Helm et al., 2007).

Da noch keine Kenntnisse über den strukturellen Aufbau der AtDEG15 existierten, sollten im Zuge dieser Arbeit Domänen, die an der Dimerisierung beteiligt sind, indirekt über den Verlust der *processing*-Aktivität in der Pflanze nachgewiesen werden. Ist keine Dimerisierung der AtDEG15 möglich, erfolgt auch keine Abspaltung der pre-Sequenz PTS2-tragender Enzyme in den Peroxisomen.

### 2.8.1 Phänotyp der *deg15*-KO-Mutante: T-DNA Insertions-Mutanten der AtDEG15 sind in der Prozessierung PTS2-tragender Enzyme gestört

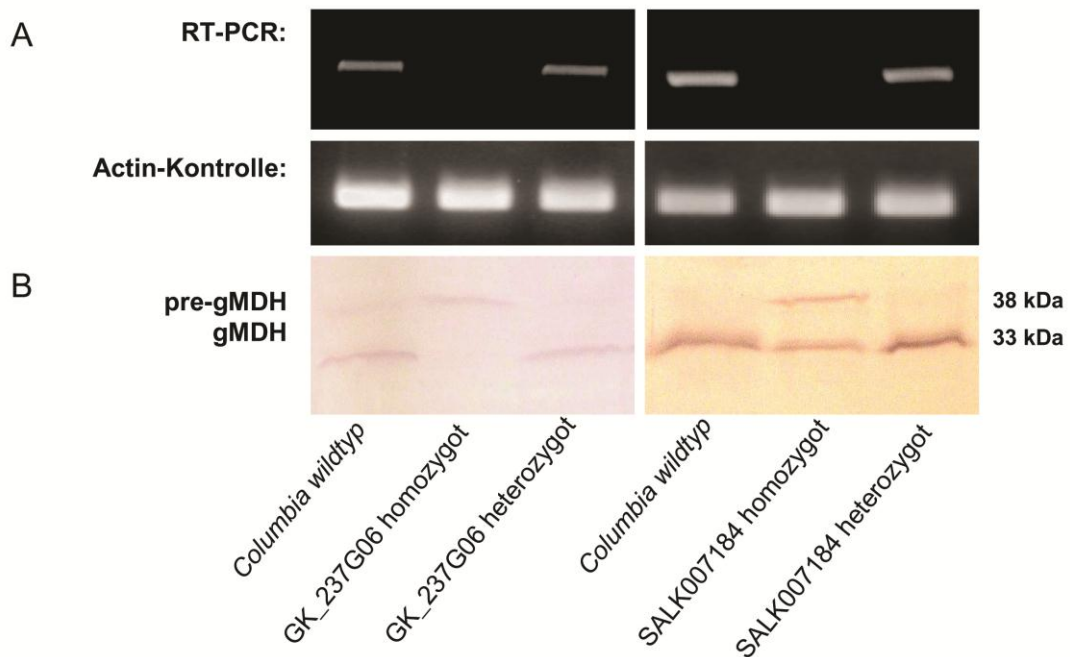
Die SALK-Linie 007184 trägt eine T-DNA-Insertion im 4. Intron des *DEG15* Gens. Die Transkription der AtDEG15 wurde anhand einer durchgeführten RT-PCR überprüft und mit dem Transkriptions-Level der *DEG15* in Wildtyp Columbia Pflanzen verglichen. Im Gegensatz zu der Wildtyp-Kontrolle zeigte die homozygote SALK-Linie 007184 keine Transkription der *DEG15*, für die heterozygote Linie konnte dagegen das Transkript nachgewiesen werden (Abb. 30A). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch keine verkürzten Versionen des *DEG15* Gens transkribiert wurden und es sich somit bei der vorliegenden Mutante um eine totale *knock-out*-Mutante der *DEG15* handelt.

Die Gabi-Kat-Linie GK\_237G06 trägt eine T-DNA-Insertion in der 5'UTR des *DEG15* Gens. Über RT-PCR wurde gezeigt, dass die homozygote Linie der GK\_237G06 keine Transkription des *DEG15*-Gens zeigt; dagegen konnte in den Wildtyp-Pflanzen und in der heterozygoten Linie der GK\_237G06 das Transkript nachgewiesen werden (Abb 30A).

Die *knock-out*-Mutanten der *DEG15* zeigten eine deutlich reduzierte Prozessierung PTS2-tragenden Matrix-Enzymen, wie im Folgenden am Beispiel der pre-gMDH als Prototyp gezeigt wird. Die Abspaltung der pre-Sequenz der glyoxysomalen Malatdehydrogenase wurde dabei durch Auftrennung der Proteine der jeweiligen Pflanzenextrakte über 12,5% SDS-PAGE und anschließende Dekorierung mit  $\alpha$ -gMDH-Antikörpern untersucht (Abb. 30B). Aufgrund des Größenunterschieds von etwa 5 kDa zwischen der höhermoleku-

laren Vorstufe (38 kDa) und der reifen Untereinheit der gMDH (33 kDa), können beide Formen am Western-Blot als getrennte Banden detektiert werden.

Über eine Western-Blot-Analyse der *knock-out*-Mutanten der *DEG15* (SALK-Linie 007184 und GK\_237G06) konnte gezeigt werden, dass die Proteinextrakte der homozygoten Linien der beiden *knock-out*-Mutanten neben der Bande bei 33 kDa auch eine größere Bande, die der nicht prozessierten pre-gMDH entspricht, enthielten (Abb. 30B). Die heterozygoten Linien zeigten dagegen ebenso wie die untersuchten Wildtyp-Pflanzen lediglich eine Bande bei 33 kDa, was eine Prozessierung der pre-gMDH belegt. Es konnte für die beiden untersuchten unabhängigen *knock-out*-Mutanten gezeigt werden, dass in Abwesenheit der AtDEG15 keine vollständige Prozessierung der pre-gMDH zur reifen Untereinheit mehr möglich war.



**Abbildung 30: Analyse der *deg15* T-DNA-Insertions-Mutanten GK\_237G06 und SALK007184 in Arabidopsis.** (A) Im Vorfeld wurden über RT-PCR die entsprechenden Transkripte in Wildtyp-Pflanzen und in den heterozygoten Linien der knock out Mutanten nachgewiesen bzw. gezeigt, dass in den verwendeten homozygoten Linien der knock out Mutanten SALK007184 und GK\_237G06 keinerlei Transkription des *DEG15*-Gens erfolgte. Um den Erfolg der RT-Reaktion zu überprüfen, wurde eine Actinkontrolle durchgeführt. (B) Durch Westernblot-Analyse wurde die Prozessierung der pre-gMDH in Wildtyp-Pflanzen und in den homozygoten, sowie in den heterozygoten knock out Mutanten untersucht. Für die Analysen wurden Proteinextrakte 7Tage alter Pflanzen über 12,5% SDS-PAGE analysiert und mit Antikörpern gegen die glyoxysomale Malatdehydrogenase dekoriert.

## **2.8.2 Nur das Volllängenprotein der AtDEG15 prozessiert die pre-gMDH zur reifen Untereinheit: Untersuchung von DEG15-Deletionskonstrukten in der T-DNA Insertionsmutante SALK007184 der DEG15**

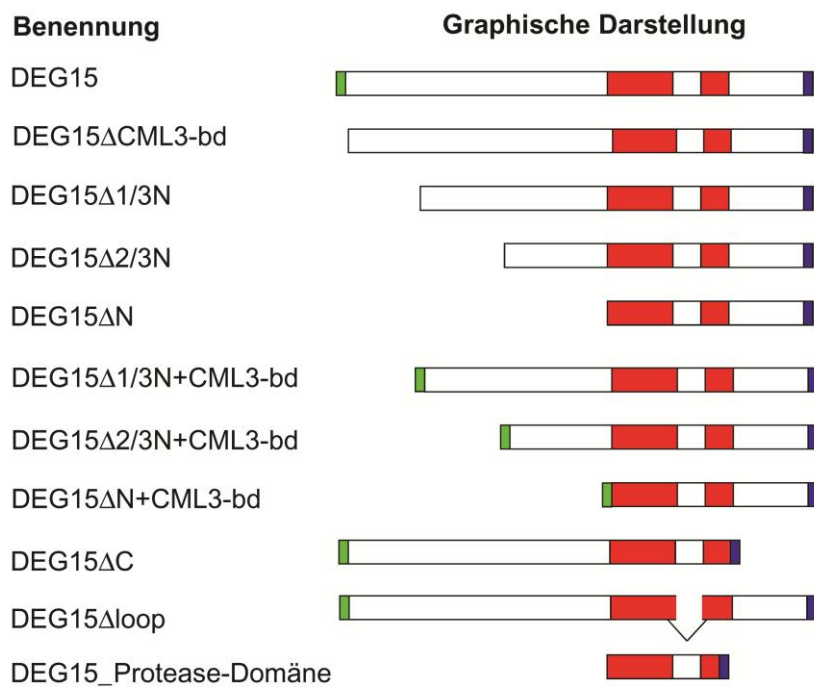
Die Domänen-Struktur der AtDEG15 sollte mit Hilfe von Deletionskonstrukten untersucht werden. Die *deg15-knock-out*-Mutante SALK007184 wurde daher mit den Deletionskonstrukten der AtDEG15 komplementiert und auf ihre Fähigkeit zur Prozessierung der höhermolekularen Vorstufe der PTS2-Enzyme am Beispiel der pre-gMDH analysiert. Über die Komplementation der *knock-out*-Mutante mit Deletions-Konstrukten sollten Bereiche der AtDEG15 identifiziert werden, die für die nachgewiesene Dimerisierung und somit für Prozessierungs-Aktivität der AtDEG15 verantwortlich sind.

Besonderes Augenmerk wurde dabei auf den langen N-Terminus der AtDEG15 und den C-Terminus außerhalb der Protease-Domäne und den Pflanzen-spezifischen *loop* innerhalb der Protease-Domäne gerichtet. Die 374 Aminosäuren des N-Terminus wurden in drei Teile eingeteilt und diese entfernt. Es ergaben sich die Konstrukte DEG15 $\Delta$ 1/3N-Term., DEG15 $\Delta$ 2/3N-Term. und DEG15 $\Delta$ N-Term (Abb. 31), die in den binären Vektor pCAMBIA1301 unter die Kontrolle des 35S-Promotors kloniert wurden. Darüber hinaus wurden Konstrukte erstellt, denen die Aminosäuren C-terminal zur Protease-Domäne fehlten (DEG15 $\Delta$ C-Term.) bzw. der pflanzen-spezifische *loop* innerhalb der Protease-Domäne (DEG15 $\Delta$ Loop) (Abb. 31). Als letztes Konstrukt wurde die Protease-Domäne mit dem pflanzenspezifischen *loop* (DEG15-Protease-Domäne) erstellt. Auch diese Konstrukte wurden wie beschrieben zur Überexpression in *A. thaliana* in den binären Vektor pCAMBIA1301 unter die Kontrolle eines 35S-Promotors kloniert (Klonierungsstrategien siehe Anhang 5.4.).

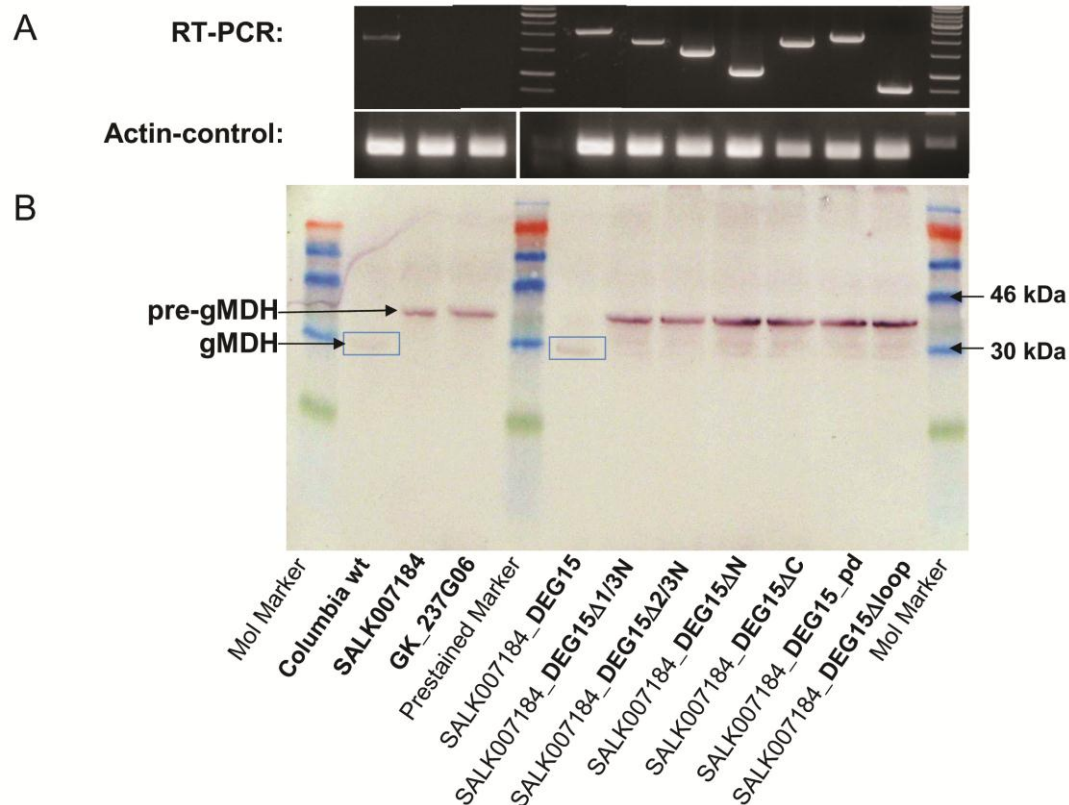
Nach der Klonierung wurden die Vektoren für die Expression der Deletionskonstrukte in *A. tumefaciens* transformiert und sowohl Columbia-Wildtyp-Pflanzen, als auch die *deg15-knock-out*-Mutante mit den Agrobakterien transfektiert. Neben den Deletionskonstrukten wurde auch die DEG15-Volllänge als Kontrolle in die *deg15-knock-out*-Mutante eingebracht: Bei erfolgter Transfektion der Pflanzen sind diese wieder zur Prozessierung der höhermolekularen Vorstufe der glyoxysomalen Malatdehydrogenase befähigt. Die nach der Transfektion erhaltenen Samen wurden auf MS-Platten mit 50 $\mu$ g/ml Hygromycin gescreent und dadurch positive Transformanden ermittelt. Es ergab sich eine hohe Transformationsra-



te von etwa 2-12 Mutanten/1000 getesteter Samen. Die so erhaltenen Mutanten wurden zunächst mittels RT-PCR auf die Transkription der eingebrachten Deletionskonstrukte und danach auf die Abspaltung der pre-Sequenz der glyoxysomalen Malatdehydrogenase hin untersucht. Wie in Abbildung 32 zu sehen, konnte nach erfolgter RT-Reaktion für alle getesteten Transformanten die Transkription der eingebrachten Konstrukte nachgewiesen werden. Um die Abspaltung der pre-Sequenz der glyoxysomalen Malatdehydrogenase zu untersuchen, wurde von den jeweiligen Transformanten ein Proteinextrakt 7d alter Blätter hergestellt und dieses über 12,5% SDS-PAGE und Westerblot ( $\alpha$ -pre-gMDH-Antikörper) analysiert (Abb. 32).



**Abbildung 31: Untersuchung der Domänen-Struktur der AtDEG15 *in planta*.** Gezeigt werden die erstellten Deletionskonstrukte der AtDEG15; Rot: Protease-Domäne mit Pflanzen-spezifischem *loop*, Blau: peroxisomales *targeting*-Signal 1 (-SKL), Grün: CML3-Bindungs-Domäne.



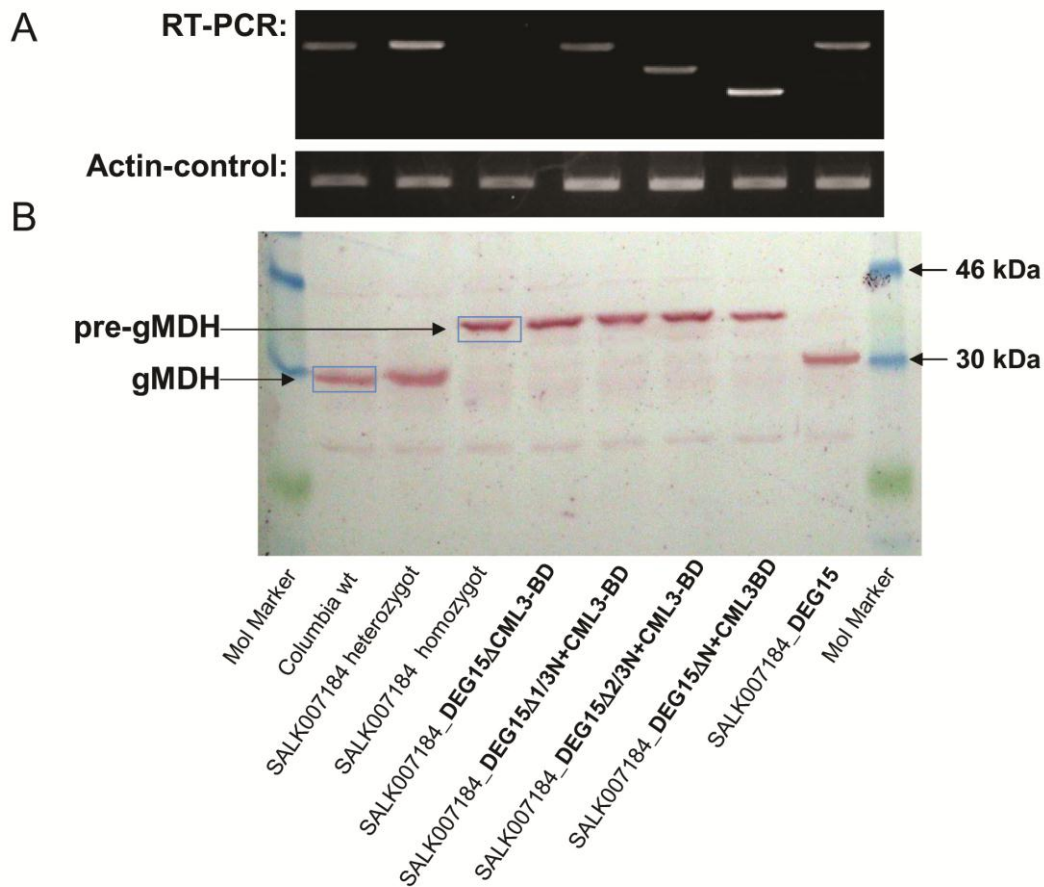
**Abbildung 32: Nur die Volllänge der AtDEG15 kann dimerisieren und somit die Pre-Sequenz der pre-gMDH prozessieren.** Die *deg15* T-DNA-Insertions-Mutante (SALK007184) wurde mit der Volllänge bzw. mit Deletionskonstrukten der AtDEG15-cDNA komplementiert. (A) Über RT-PCR wurden die entsprechenden Transkripte in Wildtyp-Pflanzen und in den mit den Deletionskonstrukten transformierten Pflanzen nachgewiesen. Es wurde gezeigt, dass in den verwendeten *knock-out*-Mutanten SALK007184 und GK\_237G06 keine Transkription des *deg15*-Gens erfolgte. Um den Erfolg der RT-Reaktion zu überprüfen wurde eine Actinkontrolle durchgeführt. (B) Durch Westernblot-Analyse wurde die Prozessierung der pre-gMDH in Wildtyp-Pflanzen, *knock-out*-Mutanten, sowie den mit Deletionskonstrukten transformierten *knock-out*-Mutanten untersucht. Für die Analysen wurden Proteinextrakte 7d alter Pflanzen über 12,5% SDS-PAGE analysiert und mit Antikörpern gegen die glyoxysomale pre-gMDH dekoriert.

Es konnte gezeigt werden, dass lediglich die *knock-out*-Mutanten der *DEG15*, die mit der *DEG15*-Volllänge komplementiert wurden, wieder zur Prozessierung der pre-gMDH befähigt waren. Alle übrigen Deletionskonstrukte waren nicht in der Lage, die pre-gMDH zu ihrer reifen Untereinheit zu prozessieren.

Über die durchgeführten Y2H-Studien konnte gezeigt werden, dass die AtDEG15 Calmodulin bindet und dass diese Bindung zur Dimerisierung nötig ist. Es wurde weiterhin nachgewiesen, dass sich die Calmodulin-Bindungsstelle auf den ersten 25 Aminosäuren des N-

Terminus der AtDEG15 befindet. Die N-terminal verkürzten Konstrukte, die für die geschilderten Untersuchungen auf ihre Prozessierungsfähigkeit *in planta* verwendet wurden, enthielten somit die Calmodulin-Bindungsstelle nicht und konnten daher auch nicht dimerisieren. Um nachzuweisen, dass das Fehlen der Calmodulin-Bindungsstelle und die damit verbundene Störung der Dimerisierung die Prozessierung-Aktivität der AtDEG15 beeinträchtigt, wurde ein Konstrukt, dem die ersten 25 Aminosäuren fehlen erstellt. Darüber hinaus wurden den N-terminal verkürzten Konstrukten die ersten 25 Aminosäuren der AtDEG15, also die Calmodulin-Bindungsstelle angehängt, um einen möglichen Einfluss des N-Terminus auf die Dimerisierung der AtDEG15 unabhängig von der Calmodulin-Bindung zu untersuchen. Sowohl die N-terminal verkürzten Konstrukte mit der Calmodulin-Bindungsstelle, als auch das Volllängen-Protein ohne die Calmodulin-Bindungsstelle wurden mit Hilfe von *A. tumefaciens* in die *deg15-knock-out*-Mutante transformiert. Im Anschluss wurden positive Transformanden über RT-PCR auf die Transkription der eingebrachten Konstrukte und über Westernblot auf die Prozessierung der pre-gMDH untersucht. Anhand der RT-PCR konnte gezeigt werden, dass die eingebrachten Deletionskonstrukte der AtDEG15 transkribiert wurden. Auch in Wildtyp Pflanzen und in einer heterozygoten Linie der *DEG15-knock-out*-Mutante konnte das Transkript des *deg15*-Gens nachgewiesen werden. In der homozygoten *deg15-knock-out*-Mutante wurde das *deg15*-Gen dagegen nicht transkribiert (Abb. 33 A).

Die Analyse von Proteinextrakten der untersuchten Transformanden über SDS-PAGE und Westernblot zeigte zum einen, dass Deletionskonstrukte, denen die Calmodulin-Bindungsstelle fehlte, nicht zur Prozessierung der pre-gMDH zu ihrer reifen Untereinheit in der Lage waren (Abb. 33 B). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Calmodulin-Bindungsstelle für die Dimerisierung und damit auch für die proteolytische Spaltung des PTS2 nötig ist. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass auch die N-terminal verkürzten Konstrukte der AtDEG15, die die Calmodulin-Bindungsstelle besitzen, nicht zur Abspaltung der pre-Sequenz der Malatdehydrogenase fähig waren (Abb. 33 B). Daraus lässt sich schließen, dass der N-Terminus der AtDEG15 neben der CML3-Bindungsstelle weitere Bereiche besitzt, die an der Dimerisierung der Protease und damit an der Regulierung der Prozessierung-Aktivität der Protease beteiligt sind.



**Abbildung 33: Einfluss der Calmodulin-Bindung auf die Prozessierungs-Aktivität und Einfluss des N-Terminus auf die Dimerisierung der AtDEG15.** (A) Der Wildtyp, die knock-out-Mutante und die Transformanten wurden auf die Transkription des *deg15*-Gens bzw. der entsprechenden Deletionskonstrukte hin untersucht. Um den Erfolg der RT-Reaktion zu überprüfen, wurde eine Actinkontrolle durchgeführt. (B) Durch Westernblot-Analyse wurden die N-terminal verkürzten Konstrukte mit der Calmodulin-Bindungsstelle und die Volllängen-DEG15 ohne Calmodulin-Bindungsstelle auf die Prozessierung der pre-gMDH getestet. Für die Analysen wurden Proteinextrakte 7d alter Pflanzen über 12,5% SDS-PAGE analysiert und mit Antikörpern gegen die glyoxysomale Malatdehydrogenase dekoriert.

Fasst man die Ergebnisse der Untersuchungen der AtDEG15 *in planta* zusammen, so konnte nachgewiesen werden, dass die ersten 125 Aminosäuren des N-Terminus, der C-Terminus und der Pflanzen-spezifische *loop* innerhalb der Protease-Domäne entweder an der Dimerisierung der AtDEG15 oder an der proteolytischen Aktivität beteiligt sind.

## 2.9 Expression der AtDEG15 im heterologen System

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die AtDEG15 sowohl funktionell als auch strukturell charakterisiert werden. Daher war ein Ziel der Arbeit die Überexpression und die anschließende Kristallisation der AtDEG15. Zu diesem Zwecke sollte die Überexpression der AtDEG15 in einem geeigneten Expressionssystem etabliert werden, um eine ausreichende Menge an nativer AtDEG15 für die Untersuchung der dreidimensionalen Struktur über Röntgenkristallographie zu erhalten.

Neben der Strukturaufklärung war die biochemische Charakterisierung der AtDEG15 ein weiteres Ziel der Arbeit, die ebenfalls mit dem rekombinant erzeugten Protein erfolgen sollte.

Es wurden verschiedene Systeme und Organismen zur Expression der AtDEG15 getestet, die im Weiteren beschrieben werden sollen.

### 2.9.1 Expression in *Escherichia coli*

*E. coli* ist eines der am meisten eingesetzten Expressionssysteme, da es entscheidende Vorteile gegenüber anderen Organismen aufweist. *E. coli* können leicht genetisch manipuliert werden, die Kulturen können einfach angezogen werden, es ist eine große Anzahl an Expressionsvektoren mit unterschiedlich starken induzierbaren Promotoren verfügbar und viele der Systeme sind für die Expression von Fusionsproteinen optimiert.

AtDEG15 wurde zur rekombinanten Expression in *E. coli* in die Expressionsvektoren pET24(a)+ und pET28(a)+ kloniert. Die pET-Vektoren basieren auf dem T7-Expressionssystem, das sich durch eine hohe Transkriptionseffizienz auszeichnet. Das System stammt aus dem Bakteriophagen T7, der über starke T7 Promotoren verfügt, die von der T7-RNA-Polymerase in den Phagen erkannt werden, und der mit der Transkriptionsmaschinerie des Wirtes in Konkurrenz tritt.

Diese beiden unterschiedlichen pET-Vektoren wurden gewählt, um das rekombinante Protein sowohl mit einem N-terminalen, als auch mit einem C-terminalen 6xHis-Tag zu versehen. Die rekombinant exprimierten Proteine können dadurch über den 6xHis-Tag mittels immobilisierter Metallaffinitätschromatographie gereinigt werden (Porath et al., 1975). Der 6xHis-Tag besitzt gegenüber anderen verwendeten Tags den Vorteil, dass er mit hoher Effi-

zienz sowohl im Niedrig- als auch im Hochsalzpuffer und in Gegenwart denaturierender Reagenzien (Hochuli et al., 1990) verwendet werden kann.

### 2.9.1.1 Native Expression

Nach erfolgter Klonierung wurden die Konstrukte in verschiedene Expressionsstämme transformiert, um eine native Expression der AtDEG15 zu erreichen. Für die Expression wurde der „Rosetta2“-Stamm (Novagen) gewählt, der eine optimierte „*codon usage*“ für die Expression pflanzlicher Proteine besitzt. Diese Anpassung der *codon usage* ist notwendig, da jeder Organismus die 61 Aminosäure-Codons unterschiedlich häufig verwendet und somit auch die tRNAs in unterschiedlicher Häufigkeit vorkommen. Für Codons, die in einem Organismus selten genutzt werden, liegen nur wenige tRNAs vor (Dong et al., 1996) und die Translationseffizienz von Proteinen, die diese seltenen Codons vermehrt enthalten, wird negativ beeinflusst (Kane et al., 1995). Der „Rosetta2“-Stamm besitzt darüber hinaus einen lacUV5-Promotor, der nach IPTG-Zugabe, die T7-RNA-Polymerase exprimiert, die die unter der Kontrolle des T7-Promotors liegenden Gene transkribieren.

Neben dem „Rosetta2“-Stamm wurde der „Rosetta2pLys“-Stamm (Novagen), eine weiter entwickelte Form des „Rosetta2“-Stammes, der ein zusätzliches pACYC184-Plasmid enthält, verwendet. Dieses Plasmid codiert für das T7 Lysozym, einen natürlichen Inhibitor der T7 Polymerase, das eine Grundexpression des Wunschproteins durch den T7-Promotor verhindert. Als letztes wurde der Stamm „Arctic Express“(Agilent), der speziell für die Expression bei Temperaturen unter 18°C entwickelt wurde und befähigt ist, bis zu einer Temperatur von 12°C große Mengen an Protein zu exprimieren, getestet.

Die meist verwendeten Bedingungen für die Expression von Proteinen in *E.coli* sind eine Kultivierung der Kulturen bei 37°C, eine Induktion mit 1mM IPTG und Probennahme nach 3-6h. Diese Bedingungen führen zu einer Expression einer größtmöglichen Menge an rekombinantem Protein. Da jedoch eine exzessive Proteinsynthese häufig zur Aggregation des Zielproteins und damit zur Produktion von sogenannten *inclusion bodies* führt, kleinen Partikeln aus einer Ansammlung fehlerhaft oder unvollständig gefalteter Proteine, werden mittlerweile zumeist „mildere“ Expressionsbedingungen angewendet. Damit soll ein möglichst hoher Prozentsatz an nativem Protein exprimiert werden. Generell beruhen die meisten Methoden zur Reduzierung von *inclusion bodies* auf einer Reduzierung der Konzentra-

tion des rekombinanten Proteins. Durch eine geringere Expression des Zielproteins in der Zelle sinkt die Aggregationswahrscheinlichkeit, was wiederum zu einem erhöhten Anteil an nativem Protein führt (Weickert et al., 1996). Die Bedingungen für diese Reduktion müssen jedoch für jedes einzelne Protein neu bestimmt und getestet werden. Einfluss auf die Menge des exprimierten Proteins haben die Wachstumstemperatur der Kulturen, wobei Temperaturen unter 37°C in *E.coli* zu einer verlangsamten Proteinexpression führen, die Dauer der Expression und die verwendete Induktor-Konzentration.

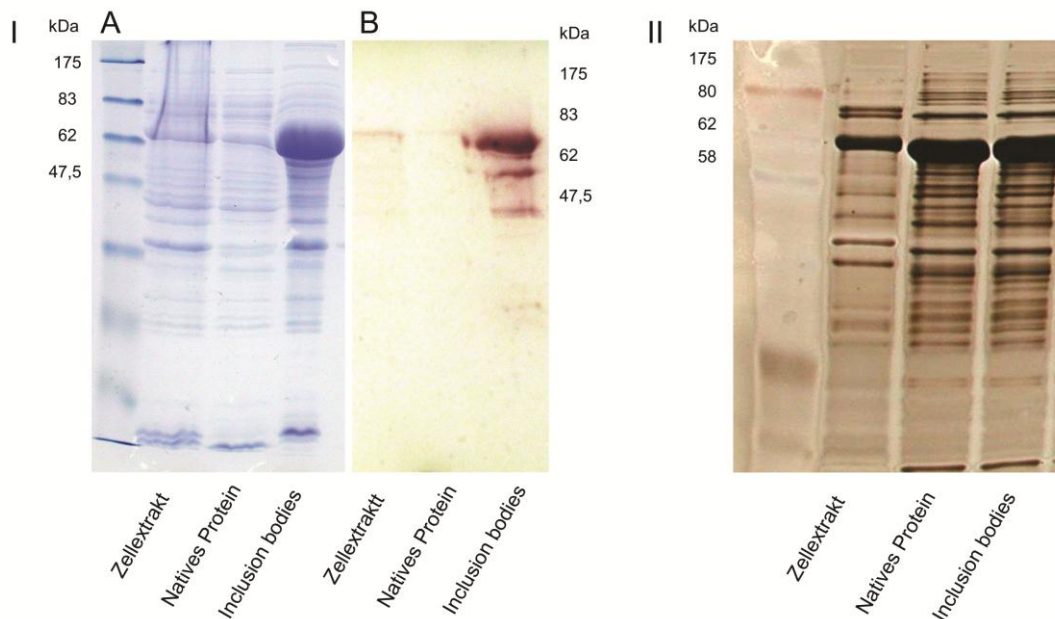
Daher wurden für die einzelnen Konstrukte der AtDEG15 in den verschiedenen Stämmen die jeweils optimalen Expressionsbedingungen ermittelt, um eine möglichst hohe Ausbeute an nativ überexprimierter AtDEG15 zu erhalten.

Zu diesem Zweck wurden 25ml Kulturen bei verschiedenen Temperaturen (12-37°C) mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen (125µM-1mM) induziert und zu verschiedenen Zeitpunkten (1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 12h, 24h) Proben aus den Kulturen entnommen. Diese wurden über 12,5% SDS-PAGE und Western-Blot ( $\alpha$ -DEG15-Antikörper) auf Expression und Menge der nativ exprimierten AtDEG15 untersucht (Abb. 34).

Für die Expression in *E.coli* Rosetta2 und *E.coli* Rosetta2pLys lagen die ermittelten optimalen Expressionsbedingungen bei einer Expressionstemperatur von 25°C, einer IPTG-Konzentration von 250 µM und einer Expressionsdauer von 8h. Für die Expression im Arctic Express-Stamm lagen die optimalen Expressionsbedingungen bei 12°C, einer IPTG-Konzentration von 500 µM und einer Expressionsdauer von 12h.

Bei den ermittelten Expressionsbedingung sollte eine möglichst große Menge an nativem, löslichem Protein erhalten werden. Es wurde jedoch deutlich, dass auch unter den als „optimal“ ermittelten Bedingungen die AtDEG15 fast ausschließlich in unlöslicher Form als sogenannte *inclusion bodies* exprimiert wurde. Der Anteil an nativer AtDEG15 ist verschwindend gering und erst nach deutlicher Anreicherung (Ni-Affinitäts-Säule) und anschließender Aufkonzentrierung überhaupt detektierbar. Die höchste Ausbeute an nativer AtDEG15 konnte bei der Expression im Arctic Express-Stamm erzielt werden, diese war jedoch immer noch sehr niedrig und das Verhältnis nativer zu denaturierter AtDEG15 war nicht konstant. Die Proben wurden nach erfolgter Ni-Affinitätschromatographie und Aufkonzentrierung über 12,5% SDS-PAGE analysiert. Eine Sequenzierung der erhaltenen Proteinbande (in Zusammenarbeit mit Prof. Friedrich Lottspeich, MPI Martinsried) ergab, dass neben der exprimierten AtDEG15 auch hsp70 in der als AtDEG15 erachteten Bande enthalten war. Das Vorhandensein dieses Hitzeschockproteins erklärt die schwankende Ausbeute

an nativer AtDEG15, da es sich bei der untersuchten Bande nicht ausschließlich um die AtDEG15 handelte. Da der Anteil der AtDEG15 auch noch weit hinter dem des hsp70 lag, wurde dieses Expressionssystem als nicht praktikabel angesehen. Es wären zu große Ansätze nötig, um eine ausreichende Menge an Protein zu erhalten, um damit weitere Untersuchungen durchführen zu können. Daneben wurde deutlich, dass die Effektivität der Reinigung entscheidend vom Ausgangsmaterial abhängt. Eine Aufreinigung des Proteins wird durch zu geringe Mengen an exprimierter AtDEG15 extrem erschwert, da zum einen jeder Reinigungsschritt Verluste an Protein mit sich bringt und zum anderen bei zu niedrigen Konzentrationen an exprimiertem Protein auch vermehrt andere unerwünschte Proteine an die verwendeten Affinitäts-Matrices binden und somit die Effektivität der Reinigung und die Anreicherung des Proteins stark verringert wird.



**Abbildung 34: Expression der AtDEG15-cDNA in *E. coli*. I: Expression der AtDEG15 in Rosetta2 (Novagen).** Die AtDEG15 wurde 16h bei 25°C durch die Zugabe von 250  $\mu$ M IPTG exprimiert, anschließend über 12,5% SDS-PAGE analysiert und über Coomassie-Färbung (A) bzw. Dekoration mit  $\alpha$ -DEG15-AK (B) detektiert. Aufgetragen wurden jeweils 5 $\mu$ l des vollständigen Zell-Lysats, sowie jeweils 5 $\mu$ l der nativen und der denaturierten Proteine. **II: Expression der AtDEG15 in ArcticExpress(DE3)RIL (Agilent).** Die AtDEG15 wurde 16h bei 12°C durch die Zugabe von 500  $\mu$ M IPTG exprimiert, anschließend über 12,5% SDS-PAGE analysiert und über Silberfärbung detektiert. Aufgetragen wurden jeweils 5 $\mu$ l des vollständigen Zell-Lysats, sowie jeweils 5 $\mu$ l der nativen und der denaturierten Proteine.



Neben den angepassten Expressionsbedingungen wird häufig auch versucht, die Bildung von *inclusion bodies* zu vermeiden, indem man gleichzeitig seltene tRNAs oder Chaperone überexprimiert oder Fusionsproteine produziert.

Die Expression der tRNAs entfällt in diesem Fall, da unter anderem der Rosetta2-Stamm verwendet wurde, der diese angepassten tRNAs zur Expression pflanzlicher Proteine bereits besitzt. Die Produktion von Fusionsproteinen ist bei einem solch großen Protein wie der AtDEG15 generell als nicht sinnvoll zu erachten, da eine vollständige und korrekte Faltung weiterhin sehr unwahrscheinlich bleibt. Der Einfluss einer Expression von Chaperonen auf die Expression der AtDEG15 wurde getestet, indem gleichzeitig zu der Deg-Protease hsp60 in *E.coli* Zellen überexprimiert wurde (Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Michael Ehrmann, Uni Duisburg-Essen), doch auch durch eine Überproduktion an hsp60 konnte das Gleichgewicht von nativer zu denaturierter AtDEG15 nicht zu Gunsten des nativen Anteils verschoben werden (Daten nicht gezeigt).

Im Zuge dieser Arbeit wurde CML3 als Interaktionspartner der AtDEG15 identifiziert. Da in Prokaryoten wie *E.coli* keine Calmoduline vorkommen, fehlt der mögliche Interaktionspartner der AtDEG15 in diesem Expressions-System. Es ist denkbar, dass der CML3 an der korrekten Faltung und damit an der nativen Expression der AtDEG15 beteiligt ist. Es wurde daher eine Co-Expression von AtDEG15 mit CML3 im Rosetta 2-Stamm durchgeführt. Die Expressions-Bedingungen wurden ähnlich der nativen Expression der AtDEG15 optimiert und die Ausbeute an nativem Protein nach erfolgter Reinigung über His-Tag und Aufkonzentrierung über Centricon 30 kDa (Millipore) über 12% SDS-PAGE analysiert. Es konnte eine schwache Expression an löslicher AtDEG15 gezeigt werden. Ein Aktivitätstest mit dem fluorogenen Peptid Cbz-FR-AMC (Sigma) zeigte jedoch keine proteolytische Aktivität der exprimierten AtDEG15. Es konnte somit auch durch Co-Expression mit CML3 keine native, proteolytische AtDEG15 exprimiert werden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass eine native Expression der AtDEG15 in *E.coli* nicht möglich war. Trotz verschiedener getesteter Systeme, blieb die Ausbeute zu gering, die Expression des Proteins teilweise nicht reproduzierbar und es konnte keine aktive AtDEG15 nachgewiesen werden.

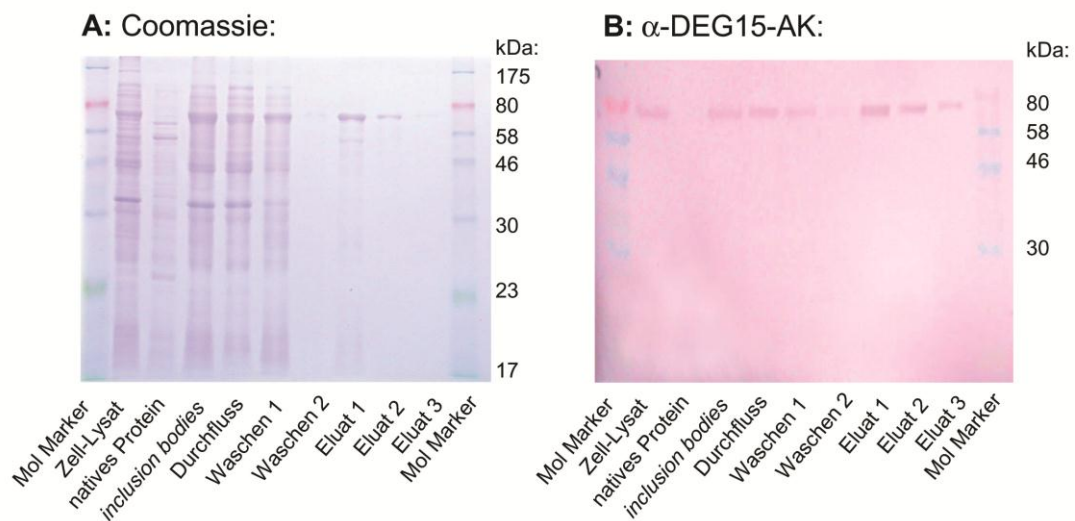
### **2.9.1.2 Denaturierende Aufreinigung der AtDEG15 und anschließende Rückfaltungsexperimente**

Aufgrund der unter 2.9.1.1. beschriebenen Probleme bei der nativen Expression der AtDEG15 und der Tatsache, dass *E.coli* große Mengen an denaturierter AtDEG15 exprimiert, wurde eine denaturierende Aufreinigung der Deg-Protease und eine anschließende Rückfaltung des Proteins verfolgt. Normalerweise sind aufwendige CD-Untersuchungen (Circulardichroismus) nötig, um das Protein nach der Renaturierung auf korrekte Faltung hin zu überprüfen, da die Substrate der AtDEG15 aber bekannt sind, konnte ein Aktivitäts-Assay für die DEG15 etabliert werden (Helm et al., 2007). Das käufliche fluorogene Peptid Cbz-FR-AMC (GE Healthcare) wird dabei von der DEG15 gespalten und es kommt zu einer konzentrationsabhängigen Fluoreszenz. Somit kann indirekt über die Aktivität der AtDEG15 die korrekte Faltung der Protease und der Erfolg der Rückfaltungsexperimente untersucht werden.

#### **2.9.1.2.1 Denaturierende Aufreinigung**

Für die Expression und die anschließende denaturierende Aufreinigung der *inclusion bodies* wurde der Expressionsvektor pET28a(+)\_6xHis-Tag\_T7\_DEG15 in den Expressionsstamm Rosetta2 transformiert. Da bei dieser Expression die Ablagerung des rekombinanten Proteins durchaus erwünscht war und eine größtmögliche Menge der Deg-Protease exprimiert werden sollte, wurden die Kulturen bei 37°C inkubiert und die Proteinexpression mit 500µM IPTG induziert. Nach 6h Induktionszeit konnte somit eine Konzentration an AtDEG15 von etwa 400-600mg/L Kultur erzielt werden. Die *inclusion bodies* wurden durch Zell-Lyse, Zentrifugation und ein anschließendes Detergenzienwaschverfahren angereichert und gereinigt. Danach erfolgte eine Solubilisierung des pelletierten rekombinanten Proteins über Denaturierungsmittel wie Guanidiniumhydrochlorid oder Harnstoff.

Das solubilisierete denaturierte Protein wurde wie unter 4.5.7. beschrieben über Ni-Affinitäts-Chromatographie gereinigt. Als Denaturierungsmittel wurde in diesem Falle 8M Harnstoff gewählt, da dieser im Gegensatz zu Guanidiniumhydrochlorid eine Analyse über SDS-PAGE erlaubt und somit der Verlauf der Reinigung verfolgt werden konnte. Die Konzentration von 8M Harnstoff wurde in allen Schritten der Ni-Affinitäts-Chromatographie beibehalten.



**Abbildung 35: Reinigung der AtDEG15 nach erfolgter Expression in Rosetta2 (Novagen).** Die AtDEG15 wurde 6h bei 37°C durch die Zugabe von 500  $\mu$ M IPTG exprimiert, anschließend wurden die denaturierten Proteine mit 8M Harnstoff solubilisiert und die AtDEG15 erfolgreich über Ni-TED-Säule (Macharey-Nagel) angereichert. Die einzelnen Fraktionen der Reinigung wurden über 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt und über Coomassie-Färbung (A) bzw. Dekorierung mit  $\alpha$ -DEG15-AK (B) detektiert. Aufgetragen wurden jeweils 10 $\mu$ l der einzelnen Fraktionen. Es wurde deutlich, dass neben der DEG15-Volllänge auch verkürzte Abbauprodukte an die Ni-Matrix gebunden wurden, dennoch war die Anreicherung der AtDEG15 vielversprechend, besonders in Eluat1.

Es wird deutlich, dass *E.coli* die AtDEG15 in großen Mengen exprimiert, wie anhand der prominenten Banden bei ca. 70 kDa der gewaschenen und solubilisierten *inclusion bodies* zu sehen ist (Abb. 35). Die anschließende denaturierende Aufreinigung der 6xHis-Tag-DEG15 über Ni-Affinitäts-Chromatographie führt zu einer hohen Anreicherung des Proteins und gleichzeitig zu einer guten Aufreinigung (Abb. 35).

#### 2.9.1.2.2 Renaturierung durch Verdünnen

Als Renaturierung bezeichnet man im Allgemeinen einen Prozess, bei dem denaturierte Proteine unter bestimmten Bedingungen spontan, d.h. ohne Einwirkung von anderen Enzymen, wieder ihre native Konformation annehmen. Dabei erlangt das Protein auch seine jeweilige Funktionalität wieder, die durch die Denaturierung verloren gegangen war.

Der erste Schritt bei der Renaturierung ist die Solubilisierung der denaturierten AtDEG15. Dazu wurden die gewaschenen *inclusion bodies* in 6M Guanidiniumhydrochlorid gelöst, wobei das Guanidiniumhydrochlorid intermolekulare Wechselwirkungen zwischen den Proteinmolekülen zurückdrängt und somit eine Aggregation der fehlerhaft gefalteten Proteine verhindert. Die Unterbindung der Aggregation ist entscheidend für die anschließende Rückfaltung der Proteine, da nur so störende sterische Effekte zwischen den Molekülen verhindert werden können. Durch starkes Verdünnen wird das Denaturierungsreagenz anschließend entfernt, das fehlgefaltete Protein soll spontan seine native Faltung einnehmen. Dabei gelten generell die Annahmen, dass eine möglichst schnelle Verdünnung des Denaturierungsreagenz und eine möglichst hohe Verdünnung der Proteinlösung sich positiv auf die Faltung des Proteins auswirken. Neben diesen Faktoren ist die Zusammensetzung und der pH-Wert des Renaturierungspuffers entscheidend.

#### 2.9.1.2.2.1 Schnelles Verdünnen durch direkte Proteingabe in Pulsen

Die Proteinkonzentration der zur Renaturierung verwendeten, solubilisierten *inclusion bodies* wurde auf 10 mg/ml eingestellt, wobei der Anteil an AtDEG15 bei etwa 90 % lag. Der Verdünnungsfaktor, der für die Rückfaltung gewählt wurde, lag bei 1/1000, so dass eine Protein-Endkonzentration von 10µg/ml nach dem Verdünnungsschritt vorlag. Dabei wurde die Proteinmenge nicht auf einmal, sondern in drei Schritten zugegeben, so dass der eigentliche Verdünnungsfaktor bei jeder Zugabe der AtDEG15 1/3000 betrug. Zwischen den einzelnen Proteinzugaben lag eine Inkubationszeit von 2h, um dem Protein ausreichend Zeit zu geben, seine native Konformation einzunehmen. Nach der letzten Proteinzugabe wurden die Ansätze über Nacht inkubiert.

Um einen geeigneten Renaturierungspuffer für die Rückfaltung der AtDEG15 zu finden, wurden verschiedenste Pufferreagenzien (MES, MOPS, HEPES, TRIS, Phosphat) in unterschiedlichen Konzentrationen und bei unterschiedlichen pH-Werten getestet. Darüber hinaus wurden diese Puffer mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen versetzt (NaCl, KCl), des Weiteren wurden verschiedene Zusätze wie Arginin, Glutamin, Glycin, Glycerin, PEG-4000 in unterschiedlichen Konzentrationen sowie verschiedene Redoxreagenzien wie DTT, TCEP, Glutathion (oxidiert und reduziert) und mögliche Co-Faktoren wie Ca-, Zn-, Mg-, Cu-, Mn-Ionen bzw. EDTA getestet. Eine genaue Auflistung der verwendeten Puffer findet sich im Anhang (siehe Anhang 5.5.).

Die solubilisierten AtDEG15 *inclusion bodies* wurden wie beschrieben in diesen Puffern verdünnt und nach erfolgter Inkubation 20µl der Probe mit dem Fluoreszenzpeptid Cbz-FR-AMC versetzt und auf ihre proteolytische Aktivität hin untersucht. Als negative Kontrolle für diesen Assay wurden die jeweils verwendeten Renaturierungspuffer vermessen, als positive Kontrolle diente eine Trypsinlösung (10 µg/ml).

Die verwendete Trypsinkontrolle, die in etwa die gleiche Proteinkonzentration aufwies, wie die Konzentration der AtDEG15 in den Rückfaltungspuffern, ergab eine deutliche Fluoreszenz von über 44000 RFU/20µl. Selbst unter der Annahme, dass nur ein Teil der AtDEG15 im Verlauf der Rückfaltungsversuche seine native und damit proteolytisch aktive Form eingenommen hat, sollte der hier verwendete Assay dennoch empfindlich genug sein, diesen Prozentsatz nachzuweisen. Die verwendeten negativen Kontrollen zeigten ein leichtes Hintergrundsignal von 250 RFU/20µl.

Für keine der untersuchten Proben konnte eine reproduzierbare proteolytische Aktivität bestimmt werden. Vereinzelt konnte in bestimmten Proben eine leichte Aktivität gemessen werden, die jedoch bei Wiederholung des Versuchs nicht mehr auftrat. Es wird angenommen, dass es hier zwar zu einer teilweisen Renaturierung des Proteins gekommen ist, was durch die proteolytische Aktivität nachgewiesen wurde, dass jedoch weiterhin nicht gefaltete Teile des Proteins wieder zu einer Aggregation der AtDEG15 führten und diese somit wieder in unlöslicher und nicht aktiver Form vorliegt.

#### 2.9.1.2.2.2 Langsames Verdünnen durch Dialyse

Bei der Renaturierung von Proteinen wird generell angenommen, dass sich eine möglichst schnelle Verdünnung des Denaturierungsreagenz und eine möglichst hohe Verdünnung der Proteinlösung positiv auf die Faltung des Proteins auswirken. Daher wird in den meisten Fällen eine schlagartige Verdünnung der solubilisierten denaturierten Proteine, wie unter 2.7.3.2.2.1. beschrieben, durchgeführt. Es gibt aber auch Proteine, für die gezeigt werden konnte, dass eine langsame und kontinuierliche Verdünnung des Denaturierungsreagenzes zu einem besseren Ergebnis führte. Diese kontinuierliche Verdünnung wird in Form einer Dialyse realisiert, wobei die Denaturierungsreagenz-Konzentration in den verwendeten Puffern schrittweise herabgesetzt wird.

Im Fall der AtDEG15 wurde das denaturierte Protein in 6M Guanidiniumhydrochlorid-Lösung solubilisiert und gegen 5,5M, 5M, 4,5M, 4M, 3,5M, 3M, 2,5M Guanidiniumhydro-

chlorid-Lösungen dialysiert. Dabei wurde jeder Puffer 3mal im Abstand von 2h gewechselt, danach wurde der Dialyse-Puffer mit der nächst niedrigeren Guanidiniumkonzentration verwendet. Gegen diesen wurde erneut 3mal zwei Stunden dialysiert und das Protein erneut in die nächste niedrigere Verdünnungsstufe des Guanidiniumhydrochlorid überführt.

Es konnte beobachtet werden, dass das Protein bereits bei einer Verdünnungsstufe von 2,5M Guanidiniumhydrochlorid beginnt auszufallen. Es bildete sich ein weißer Niederschlag in den Dialyseschläuchen, was auf eine Aggregation der enthaltenen Proteinmoleküle aufgrund intermolekularer Wechselwirkungen in Folge zu niedriger Denaturierungsreagenz-Konzentration hindeutet. Es erschien an dieser Stelle nicht sinnvoll, diesen Renaturierungsansatz weiter zu verfolgen, da die Aggregation der AtDEG15 eine Renaturierung des Proteins unmöglich macht.

Dennoch wurden die Protein-Lösungen der unterschiedlichen Dialyseschritte auf ihre proteolytische Aktivität hin untersucht, um zu testen, ob möglicherweise bei höheren Konzentrationen an Denaturierungsreagenz eine Faltung des Proteins erfolgte. In diesem Falle sollte eine proteolytische Aktivität nachweisbar sein, da die Funktionalität der AtDEG15 mit der korrekten Faltung wieder erlangt werden sollte.

Als negative Kontrollen für den Aktivitätsassay dienten hierbei die Dialyse-Puffer, als positive Kontrolle eine 10mg/ml Trypsinlösung, was in etwa der Konzentration an AtDEG15 vor der Dialyse entsprach. Die positive Kontrolle zeigte ein deutliches Signal von 136000 RFU/20µl, für die Dialyse-Puffer, die als negative Kontrollen dienten, wurde je nach Guanidiniumkonzentration ein schwaches Hintergrundsignal von 200-670 RFU/20µl bestimmt. Für die untersuchten AtDEG15-Proben konnte jedoch in keinem der Ansätze eine Fluoreszenz bestimmt werden, die von der entsprechenden untersuchten negativen Kontrolle abwich. Somit konnte keine proteolytische Aktivität in den untersuchten Proben nachgewiesen werden, es erfolgte keine Renaturierung der AtDEG15.

#### **2.9.1.2.3 Renaturierung nach erfolgter Bindung an Ni-Affinitäts-Säule (GE Healthcare)**

Die Vorgehensweise bei der Renaturierung von Proteinen wird durch zwei kritische Faktoren bestimmt. Zum einen wird in allen Ansätzen versucht, die erneute Aggregation der

solubilisierten Proteine zu verhindern, zum anderen werden Bedingungen gesucht, die es dem Protein erlauben, sich spontan in seine native Konformation zurück zu falten.

Die Aggregation der entfalteten Aminosäureketten wird generell durch die Zugabe denaturierender Agenzien verhindert. Der kritische Schritt ist daher die Entfernung dieses Agens, da es hier, bei nicht optimalen Bedingungen für die spontane Rückfaltung erneut zur Aggregation der Proteinmoleküle kommt. Um dies zu verhindern, wurde in dem hier beschriebenen Versuch die solubilisierete, denaturierte AtDEG15 zunächst in Anwesenheit des Renaturierungsagens an eine Ni-Affinitäts-Säule gebunden. Die Bindung an die Säulen-Matrix sollte die Wechselwirkung der AtDEG15-Moleküle während der Verdünnung des Renaturierungs-Reagenzes unterbinden und somit die korrekte Faltung der AtDEG15 positiv beeinflussen.

Die denaturierte AtDEG15 wurde zu diesem Zweck in 8M Harnstoff solubilisiert und über eine FPLC-Anlage auf eine Ni-NTA-His-Trap-Säule (GE Healthcare) geladen. Die gebundene AtDEG15 wurde zunächst mit einem Puffer gewaschen, der ebenfalls 8M Harnstoff enthielt.

Im nächsten Schritt wurde ein Puffer ohne Harnstoff verwendet, was zu einer Rückfaltung der AtDEG15 führen sollte. Um dem Protein genügend Zeit zu geben, sich in seine korrekte native Konformation zu falten, wurde die Säule nach diesem Waschschrift über Nacht bei 10°C in dem Rückfaltungspuffer inkubiert und das geladene Protein am nächsten Tag mit 500mM Imidazol von der Säule eluiert.

Alle Schritte der Reinigung wurden auf Anwesenheit proteolytischer Aktivität hin untersucht, wobei die jeweils verwendeten Puffer als negative Kontrollen dienten. Dies ist hier besonders wichtig, da Imidazol aufgrund seines aromatischen Ringsystems eine Fluoreszenz zeigt, die nicht von einer proteolytischen Aktivität in dem verwendeten Puffer stammt. Für die übrigen vermessenen Puffer ergab sich eine geringe Fluoreszenz von 220-320 RFU/20µl, der verwendete Imidazolpuffer zeigte eine Fluoreszenz von 950 RFU/20µl. Als positive Kontrolle wurde auch hier eine 10 mg/ml und darüber hinaus eine 1 mg/ml Trypsinlösung verwendet, wobei letztere in etwa der Proteinkonzentration der AtDEG15 nach erfolgter Elution entsprach. Die 10 mg/ml Trypsinlösung erbrachte eine proteolytische Aktivität von 128000 RFU/20µl, die 1 mg/ml Trypsinlösung zeigte eine Aktivität von 9819 RFU/20 µl. Für die untersuchten Proben konnte keine signifikante Aktivität bestimmt werden. Die ermittelte Fluoreszenz lag im Bereich der jeweils untersuchten negativen Kontrollen.

len. Somit konnte auch durch die zunächst erfolgte Bindung an eine Ni-Affinitätssäule keine Rückfaltung der AtDEG15 in seine native Konformation vermittelt werden.

#### **2.9.1.2.4 Renaturierung mittels berechneter Pufferzusammensetzungen**

Wie unter 2.7.3.2.3. beschrieben, wird die Rückfaltung von Proteinen vor allem durch zwei Faktoren beeinflusst, zum einen durch die erneute Aggregation der solubilisierten Proteine, zum anderen durch die Bedingungen, unter denen die Rückfaltung erfolgen soll. Dabei haben verschiedenste Faktoren Einfluss auf die Rückfaltung des Proteins. So hat die Pufferzusammensetzung, -konzentration und der pH-Wert des Puffers Auswirkungen auf die Faltung des Proteins, die An- oder Abwesenheit von Ionen, Co-Faktoren, Thiol-Verbindungen oder Detergenzien, wodurch sich insgesamt eine Vielzahl an möglichen Pufferzusammensetzungen ergeben, die getestet werden müssen. Die *in vitro* Rückfaltung rekombinant exprimierter Proteine ist damit eine sehr komplexe Reaktion mit einer großen Bandbreite an kritischen Parametern und die geeigneten Rückfaltungsbedingungen werden meist in zeitintensiven *screening*-Experimenten ermittelt. Um dies zu umgehen wird am Lehrstuhl für Biochemie (Prof., Dr. Buchner; TUM) eine neue Methode entwickelt, die das *screening* und eine anschließende Optimierung der Rückfaltung verbindet und letztendlich in der Erstellung eines genetischen Algorithmus für die Vorhersage der optimalen Rückfaltungsbedingungen enden soll. Die Erstellung eines Algorithmus schien für das Problem der Proteinrückfaltung als geeignet, da Algorithmen generell als zuverlässige und leistungsstarke Methoden zur Ermittlung und Optimierung von experimentellen Bedingungen erachtet werden, bei denen es darum geht, einen weit gefassten Suchraum und verschiedenste Objekte (hier Proteine) abzudecken. Ziel der Arbeit des Lehrstuhles Prof. Buchner (Biotechnologie, TUM) war es, einen routinemäßigen Ablauf zu entwickeln, der es erlaubt, für verschiedenste Proteine Vorhersagen über die Rückfaltungsbedingungen zu treffen, ohne zeitintensive experimentelle *screening*-Verfahren durchlaufen zu müssen. Für das *screening* und eine anschließende Optimierung der Rückfaltung wurden verschiedenste Additive miteinbezogen, deren positive Wirkung auf Proteinrückfaltung bekannt sind. Auf diese Weise wurden verschiedene funktionell und strukturell unterschiedliche Modellproteine rückgefaltet und die Bedingungen für die Rückfaltung optimiert. Denn bei einem genetischen Algorithmus muss nach der Benennung des Problems und der Identifizierung der kritischen



Parameter, der Suchraum definiert und eingegrenzt werden, was bei dem vorliegenden Problem der Proteinrückfaltung über die Ermittlung der experimentellen Bedingungen erfolgen sollte. Dies alles führte letztlich zu einer Ausbeute von 74-100% an rückgefalteten Modellprotein und ließ den Schluss zu, dass der etablierte Algorithmus vielversprechend und auch für andere Proteine anwendbar war.

Im Zuge der experimentellen Umsetzung des genetischen Algorithmus werden iterative Serien an Experimenten durchgeführt. Dabei generiert der Algorithmus für jedes Experiment eine Sammlung an experimentellen Bedingungen (Generation), die praktisch getestet und ausgewertet werden. Während die erste Generation zufällig ausgewählte experimentelle Bedingungen enthält, werden in den weiteren Generationen die Prinzipien der Evolution (genetischer Algorithmus) angewendet. Der genetische Algorithmus wählt die besten Bedingungen mit der höchsten Wahrscheinlichkeit in jedem Experiment aus und verändert diese mit Hilfe eines *mutation operators*, um neue, mit den alten Experimenten in Beziehung stehende Bedingungen, zu ermitteln. Anschließend werden diese neu ermittelten Bedingungen in einem nächsten parallelen Experiment getestet. Dieser Prozess wird wiederholt (bis er vom Benutzer beendet wird) und endet damit in einer heurastischen Optimierungsstrategie, die den Prozess der natürlichen Evolution imitiert. Dadurch bietet die Anwendung eines solchen Algorithmus die Chance, effizient große Mengen an Parametern für die Rückfaltung zu analysieren, ohne dabei auf die limitierenden experimentellen Analysen angewiesen zu sein.

Der hier verwendete Algorithmus wurde so ausgelegt, dass das *screening* in 96-well-Titerplatten erfolgen konnte, wobei jeweils eine Dreifachbestimmung der getesteten Pufferbedingungen erfolgte. Unter Einbeziehung der entsprechenden Kontrollen konnten somit 23 verschiedene Puffer in jeder Generation getestet werden.

Die Proteinkonzentration der zur Renaturierung verwendeten, solubilisierten *inclusion bodies* wurde auf 10 mg/ml eingestellt, wobei der Anteil an AtDEG15 bei etwa bei 90% lag. Der Verdünnungsfaktor, der für die Rückfaltung gewählt wurde, lag bei 1/1000, so dass eine Protein-Endkonzentration von 10µg/ml nach dem Verdünnungsschritt vorlag. Das Volumen an verwendetem Rückfaltungspuffer war durch die Verwendung der 96-well-Titerplatten auf 1,5ml beschränkt. Es wurden 1,48 ml des jeweils getesteten Puffers vorgelegt und auf 10°C temperiert. Im Anschluss wurden 1,5µl der AtDEG15-Lösung zugegeben und über Nacht bei 10°C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden je 20µl der verschiedenen Rückfaltungsansätze mit Hilfe des käuflichen Fluoreszenz-Peptids Cbz-FR-AMC auf

proteolytische Aktivität hin untersucht, wobei die jeweiligen verwendeten Puffer als negative Kontrollen dienten. Für die untersuchten Puffer ergab sich je nach Zusammensetzung eine geringe Hintergrundaktivität von 250-420 RFU/20 $\mu$ l. Als positive Kontrolle wurde hier eine 10 $\mu$ g/ml Trypsin-Lösung verwendet, die mit 16000 RFU/20 $\mu$ l eine deutliche Aktivität zeigte und in etwa die gleiche Protease-Konzentration aufwies, wie sie nach den Rückfaltungs-Versuchen der AtDEG15 vorlag.

Für keine der untersuchten Rückfaltungsproben konnte eine signifikante Aktivität bestimmt werden. Die ermittelte Fluoreszenz lag im Bereich der jeweils untersuchten negativen Kontrollen. Es war auch unter Zuhilfenahme des entwickelten Algorithmus zur Vorhersage der Pufferzusammensetzung für die Rückfaltung denaturierter Proteine nicht möglich, eine Renaturierung der AtDEG15 in seine native Konformation zu erzielen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die AtDEG15 in *E.coli* nicht in ausreichender nativer Form exprimiert werden konnte und auch die Renaturierung der denaturierten AtDEG15 erfolglos blieb. Da im Rahmen dieser Arbeit eine Kristallisation und eine biochemische Charakterisierung der peroxisomalen Deg-Protease erfolgen sollte, wurden daher weitere Expressionssysteme getestet, um AtDEG15 in ausreichender Menge nativ rekombinant zu exprimieren.

## **2.9.2 Expression in *Pichia pastoris***

Dieses Expressionssystem wurde zum einen gewählt, da es sich um ein eukaryotisches Expressionssystem handelt und zum anderen, da dieses System die Möglichkeit bietet, die heterolog exprimierten Proteine ins Medium zu sekretieren. Die Sekretion ins Medium erschien dabei vielversprechend, da das exprimierte Proteinen keinen wirtseigenen Proteasen ausgesetzt ist und eine eventuell auftretende Selbst-Proteolyse durch Zugabe entsprechender Inhibitoren zum Medium gehemmt werden kann. Darüber hinaus kommt die Sekretion ins Minimal Wachstumsmedium, welches kaum weitere Proteine beinhaltet, einem ersten Reinigungsschritt der exprimierten Proteine gleich. *P. pastoris* schien damit als Expressionssystem für die AtDEG15 sinnvoll und für die Expression von größeren Mengen der Protease geeignet.

Zur Expression in *P. pastoris* wurde das „Easy select Pichia Expressions Kit“ (Invitrogen) verwendet. Die AtDEG15-cDNA wurde zum einen in den pPICZ $\alpha$ -Vektor kloniert, der eine

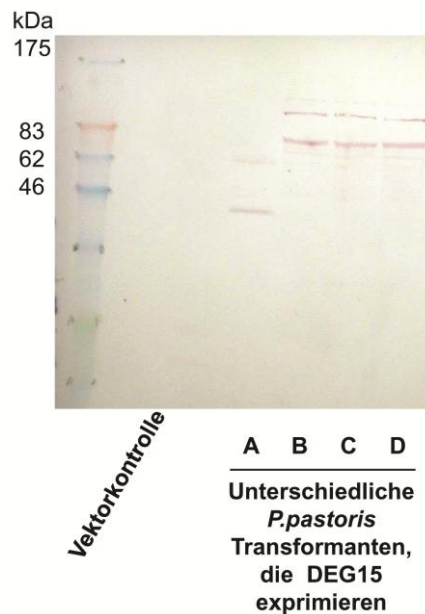
Signalsequenz ( $\alpha$ -Faktor) zur Sekretion des rekombinant erzeugten Proteins ins Medium beinhaltet, zum anderen wurde die cDNA zur intrazellulären Expression in den pPICZ-Vektor kloniert. Die AtDEG15-cDNA wurde sowohl mit, als auch ohne die *targeting*-Sequenz 1 für die Peroxisomen (-Ser,Lys,Leu) in den pPICZ-Vektor kloniert, so dass das Protein cytoplasmatisch exprimiert und bei der Variante mit -SKL anschließend in die Peroxisomen transportiert wird. Nach erfolgter Transformation wurden die positiven Transformanten auf Minimal-Wachstumsmedium mit 100  $\mu$ g/ml Zeocin als Selektionsmarker selektioniert. Auffällig war dabei, dass die Anzahl positiver Transformanten bei der Transformation der AtDEG15-Konstrukte extrem niedrig war und die Transformanten im Wachstum weit hinter der negativen Kontrolle, als die der leere Vektor fungierte, zurück blieben. Diese Tatsache wurde durch diverse unabhängige Transformationen bestätigt.

Nach der Selektion der positiven Transformanten sollten diese zunächst in Vollmedium (YPD) angezogen werden und danach die Proteinexpression durch Überführen der Kultur in Expressionsmedium, welches 0,5% MeOH enthält, induziert werden. Es zeigte sich jedoch schon im Vollmedium eine Stagnation des Wachstums der AtDEG15-Transformanten. Die Vektor-Kontrolle konnte im Gegensatz dazu wie vorgesehen kultiviert werden. 3-4 Tage nach erfolgter Transformation konnte keinerlei Wachstum mehr festgestellt werden, die *P. pastoris* Zellen starben ab.

Es wurden daher Kolonien direkt nach der Selektion auf Zeocin nach erfolgter Transformation in Expressionsmedium überführt und diese, soweit möglich, kultiviert. Da die Zelldichte dennoch sehr gering blieb ( $OD_{600}$  0,2-0,4) und damit keine größeren Mengen an exprimierter AtDEG15 zu erwarten waren, wurden die Proteine nach Abzentrifugation der *P. pastoris*-Zellen im Medium durch eine Fällung mit Trichloressigsäure angereichert. Das Präzipitat wurde direkt mit SDS-loading-dye aufgekocht, über 12,5% SDS-PAGE analysiert und anschließend mit  $\alpha$ -DEG15-Antikörpern dekoriert. Es wurden unterschiedliche Linien an Transformanten kultiviert und diese auf die Expression und Sekretion der AtDEG15 hin untersucht. Dabei wurden zum einen Transformanten ermittelt, die die AtDEG15 exprimieren, was anhand eines Signals bei 72 kDa am Western-Blot gezeigt wurde, die aber neben der AtDEG15 auch eine höhermolekulare Verbindung exprimieren, was anhand der Bande >83 kDa am Western-Blot deutlich wurde (Abb. 36). Es wird angenommen, dass es sich bei dieser höhermolekularen Verbindung um ein Oligomer der AtDEG15 handelt, da das Protein von dem verwendeten  $\alpha$ -DEG15-Antikörper erkannt wurde. Zum anderen wurden Transformanten ermittelt, die eine verkürzte Variante der

AtDEG15 exprimieren und ins Medium sekretieren, wie anhand der Banden bei ca. 40 und 60 kDa am Western-Blot gezeigt wurde. Die Transformanden, die lediglich den leeren Vektor enthielten und damit kein Protein exprimieren sollten, zeigten keine Bande auf dem Western-Blot. Kreuzreaktionen des Antikörpers mit anderen Proteinen der *P. pastoris*-Zellen konnten somit ausgeschlossen werden.

Auch die Transformanden, die die Konstrukte pICZ\_DEG15\_SKL und pICZ\_DEG15 enthielten, die also die AtDEG15 nach erfolgter Expression nicht ins Medium abgaben, sondern diese cytosolisch bzw. in den Peroxisomen anreicherten, zeigten ähnliche Probleme bei der Transformation und bei der anschließenden Kultivierung. Auch bei diesen Konstrukten konnte keine stabile Transformations-Linie ermittelt werden.



**Abbildung 36: Expression der AtDEG15-cDNA mit  $\alpha$ -Faktor in *P. pastoris* zur Sekretion des rekombinanten Proteins ins Medium.** Nach Kultivierung der Transformanden für 72h bei 30°C wurden die Zellen abzentrifugiert und die im Überstand enthaltenen Proteine durch Trichloressigsäure-Fällung präzipitiert. Das Präzipitat wurde in SDS-loading-dye aufgenommen, über 12,5% SDS-PAGE analysiert und mit  $\alpha$ -DEG15-AK dekoriert. A-D: verschiedene Transformations-Linien

Es war somit nicht möglich eine Linie von Pichia Zellen zu selektionieren, die nach der Transformation mit den Expressionsvektoren die AtDEG15 stabil exprimierte. Es wurde zwar gezeigt, dass nach der erfolgreichen Transformation AtDEG15 exprimiert wurde,

jedoch stagnierten die Zellen im Vergleich zu Linien, die mit den leeren Vektoren transformiert wurden, im Wachstum und starben 3-4-Tage nach der Transformation ab. Da es sich bei der AtDEG15 um eine Protease handelt, die *in vitro* generell degradierende Protease-Aktivität zeigt (Helm et al., 2007), wurde vermutet, dass bereits relativ geringe Mengen an überexprimierter AtDEG15 toxisch für die *P. pastoris*-Zellen sind. Die AtDEG15 sollte zwar in dem gewählten System nur exprimiert werden, wenn eine ausreichende Menge an Methanol im Medium vorhanden ist, es liegen aber keinerlei Erfahrungen vor, inwieweit der in diesem System verwendete AOX-Promotor die Proteinexpression in Abwesenheit von MeOH tatsächlich hemmt oder unterdrückt.

### **2.9.3 Transiente Expression in *Tabacum nicotiana***

Neben *P. pastoris* wurde *N. tabacum* als ein weiteres eukaryotisches Expressionssystem für die Expression von AtDEG15 gewählt. Die Vorteile von *N. tabacum* liegen dabei in einer experimentell relativ einfachen transienten Expression der Proteine und in der großen Menge an Blattmaterial, das die Tabakpflanzen liefern.

Zur transienten Expression in *N. tabacum* wurden unterschiedliche Konstrukte kloniert und über eine Transfektion mit *A. Tumefaciens* in *N. tabacum* var. *Petit havanna* eingeschleust.

Da es sich bei der Expression in Tabak um ein pflanzliches Expressionssystem handelt, sind hier mehrere Möglichkeiten der Expression gegeben. Die Zielproteine können im Cytoplasma exprimiert werden, hierzu wurde die AtDEG15-cDNA unter die Kontrolle eines 35S-Promotors in den pCAMBIA-Vektor (International Agriculture, Canberra, Australien) kloniert.

Da es sich bei der AtDEG15 um ein peroxisomales Matrixprotein handelt, besitzt die Protease eine *targeting*-Sequenz für die Peroxisomen (PTS1). Für die Expression im Cytosol wurde bei der Klonierung ein Stopp-Codon vor diese *targeting*-Sequenz eingefügt. Es wurde jedoch auch ein Konstrukt ohne dieses Stopp-Codon in den pCAMBIA-Vektor kloniert, was nach erfolgter Transfektion von *N. tabacum* zu einer Expression der AtDEG15 im Cytosol und anschließendem Import in die Peroxisomen führt.

Neben dem pCAMBIA-Vektor wurde die AtDEG15-cDNA auch in den pTRAKc-AH-Vektor (Fraunhofer IME, Aachen) kloniert. In diesem Vektor wird das Wunschprotein eben-

falls unter der Kontrolle eines 35S-Promotors exprimiert und kann darüber hinaus durch Anhängen einer Sekretions-Sequenz in den Apoplasten sekretiert werden. Die AtDEG15-cDNA wurde mit und ohne diese Sekretions-Sequenz in den pTRAKc-AH-Vektor kloniert, so dass sowohl eine Expression im Cytosol, als auch eine anschließende Sekretion des exprimierten Proteins in den Apoplasten möglich war.

Die beschriebenen Konstrukte wurden in *A. tumefaciens* transformiert und im Anschluss 3-4 Wochen alte Tabakpflanzen mit diesen Agrobakterien-Suspensionen infiltriert. Es wurden zum einen ganze Tabakpflanzen für die Transfektion verwendet, die unter Vakuum in die Agrobakterien-Suspension eingebracht wurden und somit die Agrobakterien durch den anliegenden Unterdruck ins Gewebe gesogen wurden, zum anderen wurden nur die Blätter der Tabakpflanzen verwendet, in die eine Agrobakterien-Suspension mittels einer Spritze über die Blattunterseite direkt in das Gewebe gedrückt wurde. Nach erfolgter Transfektion wurden die Tabakpflanzen weiterkultiviert und zu verschiedenen Zeitpunkten (24h, 48h, 72h, 96h) Proben entnommen, wobei 72h Expressionszeit für die Expression anderer Proteine als optimal gelten (Kavanagh et al., 1999).

Zu allen Zeitpunkten der Probenahme wurde ein Stück eines Blattes mit identischer Größe ausgestanzt, ein Proteinextrakt aus diesen Blatt-Teilen hergestellt und dieser über 12,5% SDS-Page und anschließende Dekorierung mit  $\alpha$ -DEG15-Antikörpern auf die Anwesenheit exprimierter AtDEG15 hin untersucht. Als negative Kontrollen wurden Proben von nicht infizierten Pflanzen und von Pflanzen, die mit Agrobakterien infiltriert wurden, die die entsprechenden leeren Vektoren enthielten, ebenso aufgearbeitet und über 12,5% SDS-PAGE analysiert und mit  $\alpha$ -DEG15-Antikörpern dekoriert.

Es konnte bei keinem der getesteten Konstrukte und zu keinem Zeitpunkt nach der Transfektion mit den entsprechenden *A. tumefaciens*-Kulturen die Expression von AtDEG15 nachgewiesen werden. Die analysierten Proben zeigten keinerlei Signal auf dem Western-Blot. Es wird davon ausgegangen, dass die Expression unterhalb der Nachweisgrenze der Western-Blot-Analyse lag. Problematisch war bei diesem Expressions-System, dass keine positiv Kontrolle zugänglich war, mit der bereits eine erfolgreiche transiente Expression eines Proteins durchgeführt wurde und anhand derer die experimentelle Vorgehensweise hätte überprüft oder optimiert werden können.

### 3 Diskussion

Für die pflanzlichen DEG15 aus *C. vulgaris* und *A. thaliana* (Helm et al., 2007; Schuhmann et al., 2008), sowie für die homologe Protease Tysnd1 aus Ratte (Kurochkin et al., 2007) wurde gezeigt, dass sie die Prozessierung des PTS2 in den Peroxisomen übernehmen. Die DEG15 in Pflanzen liegt in einem  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Gleichgewicht zwischen monomerer und dimerer Form mit unterschiedlicher Substrat-Spezifität vor, wobei das Dimer für die spezifische Prozessierung des PTS2 verantwortlich ist (Helm et al., 2007).

Im Laufe dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich bei der AtDEG15 um ein Calmodulin-bindendes Protein handelt. Die Calmodulin-Bindungsstelle wurde im Y2H-System identifiziert: Sie befindet sich innerhalb der ersten 25 Aminosäuren des N-Terminus. Die Calmodulin-Bindungsstelle ist in Pflanzen konserviert; DEG15 aus Säugern und mehrzelligen Schleimpilzen besitzen anscheinend keine Calmodulin-Bindungsstelle am N-Terminus (siehe Alignment Anhang 5.1.).

Ein Ziel dieser Arbeit war die biochemische Charakterisierung der AtDEG15. Die Domänen-Struktur sollte im Zuge dieser biochemischen Charakterisierung untersucht werden und Bereiche der AtDEG15 identifiziert werden, die an der Dimerisierung und der damit verbundenen Prozessierungs-Fähigkeit beteiligt sind. Die Dimerisierung der AtDEG15 wurde in zwei unabhängigen Experimenten untersucht. Zum einen wurde die Fähigkeit von Deletions-Konstrukten zur Dimerisierung im Y2H- bzw. Y3H-System untersucht, zum anderen wurden Deletions-Konstrukte *in planta* auf ihre Prozessierungs-Fähigkeit des PTS2 von peroxisomalen Matrix-Proteinen untersucht. Da nur das Dimer der AtDEG15 zur Prozessierung PTS2-tragender Enzyme in der Lage ist (Helm et al., 2007), kann über einen Verlust der Prozessierungs-Fähigkeit indirekt nachgewiesen werden, ob die untersuchten Deletions-Konstrukte zur Dimerisierung in der Lage sind.

Es konnte gezeigt werden, dass die Calmodulin-Bindung an die AtDEG15 für die Dimerisierung an beide Partner des Dimers nötig ist (Abb. 29). Deletions-Konstrukte, die N-terminal verkürzt waren und somit keine CML3-Bindungs-Stelle mehr besaßen, waren im Y3H-System nicht mehr zur Dimerisierung fähig (Abb. 28).

Deletions-Konstrukte der AtDEG15, denen der C-Terminus bzw. der Pflanzen-spezifische *loop* innerhalb der Protease-Domäne fehlten, waren dagegen weiterhin zur Dimerisierung

in der Lage, wie über Y3H gezeigt werden konnte (Abb. 28). Auch die Protease-Domäne scheint an der Dimerisierung der AtDEG15 nicht beteiligt zu sein, da im Y3H nachgewiesen wurde, dass der Bereich N-terminal zur Protease-Domäne dimerisieren kann (Abb. 28). Die Ergebnisse der Y3H-Untersuchungen sind in Abb. 37 zusammen gefasst.

Die Untersuchungen der Prozessierungs-Fähigkeit der Deletions-Konstrukte *in planta* zeigte, dass der N-Terminus der AtDEG15 unabhängig von der CML3-Bindungs-Stelle an der Dimerisierung beteiligt ist. N-terminal verkürzte Konstrukte der AtDEG15, bei denen die CML3-Bindungs-Stelle erhalten wurde, waren weiterhin nicht zur Prozessierung der pre-gMDH in der Lage (Abb. 33). Es konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von 1/3 des N-Terminus bei gleichzeitigem Erhalt der CML3-Bindungs-Stelle zu einem Verlust der Prozessierungs-Fähigkeit führte (Abb. 33). Damit wurde belegt, dass das erste Drittel des N-Terminus der AtDEG15 (Met 1-Ser 94) an deren Dimerisierung beteiligt ist.

Deletions-Konstrukte der AtDEG15, denen der Bereich C-terminal zur Protease-Domäne bzw. der Pflanzen-spezifische *loop* innerhalb der Protease-Domäne fehlten, waren ebenfalls nicht zur Prozessierung der pre-gMDH in der Lage (Abb. 32). Über Y3H wurde gezeigt, dass diese Konstrukte aber zur Dimerisierung in der Lage sind (Abb. 28). Damit konnte gezeigt werden, dass sowohl der C-Terminus der AtDEG15 als auch der Pflanzen-spezifische *loop* innerhalb der Protease-Domäne an der Prozessierungs-Aktivität und/oder an der Substrat-Erkennung beteiligt sind.

Die Ergebnisse der Komplementation der *deg15* KO-Mutante mit Deletionskonstrukten der AtDEG15, sowie die Ergebnisse der Y3H-Untersuchungen sind in Abbildung 37 zusammengefasst.

Offen bleibt die Frage, ob die DEG15 in Pflanzen zusätzliche Aufgaben neben der Prozessierung übernimmt, wie dies zum Beispiel für Tysnd1 gezeigt werden konnte. Diese homologe Protease aus Ratte spaltet nicht nur das *targeting*-Signal der PTS2-Enzyme, sondern ist ebenfalls für die spezifische Spaltung von PTS1-Enzymen, die an der  $\beta$ -Oxidation beteiligt sind, verantwortlich (Kurochkin et al., 2007). Tysnd1 wird daher eine Rolle in der Regulation der  $\beta$ -Oxidation zugeschrieben. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Tysnd1 selbst spezifisch gespalten wird, vermutlich nach dem Import in die Peroxisomen, und dadurch aktiviert wird (Kurochkin et al., 2007).



		Dimerisierung im Y3H	Prozessierung der pre-gMDH in <i>A.t.</i>
DEG15		+	+
DEG15ΔCML3-bd		-	n.g.
DEG15Δ1/3N		-	-
DEG15Δ2/3N		-	-
DEG15ΔN		-	-
DEG15Δ1/3N+CML3-bd		n.g.	-
DEG15Δ2/3N+CML3-bd		n.g.	-
DEG15ΔN+CML3-bd		n.g.	-
DEG15ΔC		+	-
DEG15Δloop		+	-
DEG15_Protease-Domäne		-	-
DEG15_N-Terminus		+	n.g.

**Abbildung 37: Graphische Darstellung untersuchter Deletionskonstrukte der AtDEG15 im Y3H und *in planta*.** CML3-Bindungs-Domäne grün, Protease-Domäne rot, *targeting*-Signal für die Peroxisomen der AtDEG15 blau. Es sind die Ergebnisse des Y3H angegeben („+“ die Konstrukte sind zur Dimerisierung fähig, „-“ es konnte keine Dimerisierung im Y3H gezeigt werden, „n.g.“ diese Konstrukte wurden nicht getestet) und die Ergebnisse der Untersuchungen der Deletionskonstrukte *in planta*; hier wurden die Konstrukte auf ihre Fähigkeit zur Prozessierung der pre-gMDH untersucht („+“ die pre-gMDH wurde zur reifen Untereinheit prozessiert, „-“ die pre-gMDH wurde nicht prozessiert, „n.g.“ diese Konstrukte wurden nicht getestet).

Für die aus *C. vulgaris* gereinigte glyoxysomale Prozessierungs-Protease konnte für das Monomer *in vitro* eine generell degradierende proteolytische Aktivität nachgewiesen werden (Helm et al., 2007). Es erscheint daher wahrscheinlich, dass die AtDEG15 neben der Prozessierung von PTS2-tragenden Enzymen weitere Aufgaben innerhalb der Peroxisomen übernimmt. Denkbar ist eine Beteiligung der AtDEG15 an regulatorischen Prozessen, wie dies auch für Tysnd1 gezeigt wurde, eine Protein-Degradation durch die AtDEG15 während der Seneszenz oder die Regulierung der Matrix-Protein-Zusammensetzung im Zuge der Re-Programmierung von Glyoxysomen zu Peroxisomen (Sautter, 1986; Titus und Becker, 1985).

### 3.1.1 Calmodulin-Bindung an die DEG15 und Calmodulin vermittelte Dimerisierung

Es konnte im Laufe dieser Arbeit gezeigt werden, dass die AtDEG15 Calmodulin bindet, und es wird angenommen, dass durch diese Interaktion eine Konformationsänderung stattfindet. Es wird weiter angenommen, dass durch diese Konformationsänderung eine Dimerisierung der Protease ermöglicht wird.

Es wurde eine Strukturvorhersage des Komplexes von AtDEG15 und CML3 erstellt, um eine grundsätzliche Vorstellung über die Interaktion der AtDEG15 und des CML3, sowie eine mögliche Konformationsänderung zu gewinnen. Über *homology modelling* wurde eine Strukturvorhersage (in Zusammenarbeit mit Prof. Michael Ehrmann, Uni Essen-Duisburg) für einen Komplex aus AtDEG15 und CML3 erstellt (Abb. 38). Die beiden interagierenden Moleküle wurden über einen Ser-Gly-Linker verbunden.

Anhand dieser Strukturvorhersage konnte gezeigt werden, dass CML3 die typische Hantelform besitzt, die Calmoduline in ihrer  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Konformation einnehmen. Damit werden zum einen die Aussagen der Untersuchungen der CML3-Sequenz (Abb. 13) gestützt, dass CML3 zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Koordination in der Lage ist und durch die Exposition hydrophober Bereiche an sein *target*-Protein bindet. CML3 verhält sich damit wie ein typisches Calmodulin.

Die Strukturvorhersage belegt weiter, dass die hydrophobe Helix zwischen den beiden globulären Bereichen des CML3 mit der N-terminalen amphiphilen Helix der AtDEG15 interagiert (Abb 38). Die Strukturvorhersage schlägt zudem zwei Interaktionsstellen zwischen der AtDEG15 und dem CML3 vor. Die eine Interaktionsstelle ist die über *yeast-two-hybrid* als CML3-Bindungsdomäne identifizierte Helix am N-Terminus der AtDEG15 (Abb. 24, 25, 26), die stark mit CML3 interagiert. Die zweite Interaktionsstelle wird aus dem N-terminalen und C-terminalen Bereich der Protease-Domäne der DEG15 gebildet. Für diese Interaktionsstelle wird eine schwache Wechselwirkung mit CML3 postuliert (Abb 38, 39). Im Bereich der Protease-Domäne konnten anhand der Aminosäuresequenz potentielle CaM-Bindungsstellen identifiziert werden. Die AtDEG15 besitzt im Bereich von I538-V547 ein 1-5-10-Motiv. Dieses Calmodulin-Bindungs-Motiv ist in Pflanzen, in Säugern und in mehrzelligen Schleimpilzen konserviert (Anhang 5.1.). Bei L458-C470 liegt ein potentielles IQ-like-Bindungsmotiv vor. Ein 1-16-Motiv kann von V547-V562 identifiziert werden. Diese beiden Calmodulin-Bindungs-Motive können nur in *A. thaliana* und *A. lyr-*

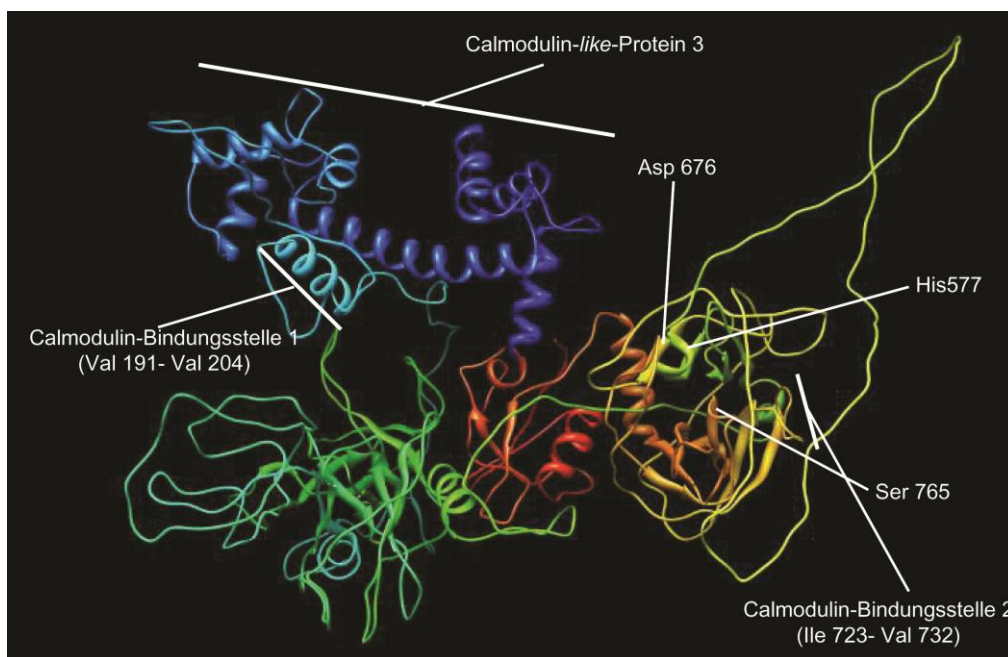
ta gefunden werden (siehe Alignement Anhang 5.1.). Die gefundenen Calmodulin-Bindungs-Motive befinden sich alle innerhalb der katalytischen Triade der AtDEG15.

Interessant ist das potentielle IQ-like-Motiv, da durch dieses Motiv auch eine Interaktion der AtDEG15 mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Form des Calmodulins, dem Apo-CaM, möglich wäre. Über IQ-Motive können in der Regel sowohl Bindungen des  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM, als auch des Apo-CaM erfolgen, die Affinität zu den unterschiedlichen Formen des Calmodulins variiert dabei sehr stark. Eine Subklasse des Myosins I (myr4) beispielsweise besitzt zwei IQ-Motive, die Calmodulin mit unterschiedlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität binden (Bähler et al., 2002). Das erste IQ-Motiv myr4-1 interagiert stark mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Form des Calmodulins und nur schwach in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, während das zweite IQ-Motiv myr4-2 stärker in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  mit Calmodulin interagiert (Bähler et al., 2002). Es wird vermutet, dass über die unterschiedlichen Affinitäten der Bindungsstellen zum CaM in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen eine Regulierung der Enzyme erfolgt (Köhler et al., 2005). Für den Exotoxin-Edema-Faktor (EF) aus *Bacillus anthracis* konnten ebenfalls mehrere CaM-Bindungsstellen identifiziert werden (Ladant, 1988), die mit dem C-Terminus und dem N-Terminus des CaM gleichzeitig interagieren (Drum et al., 2002). Bei der Interaktion schiebt sich das CaM zwischen die N-terminale katalytische Domäne und die C-terminale Domäne des Exotoxin-Edema-Faktors und verursacht dadurch eine Konformationsänderung des Enzyms, durch die letztendlich die Substrat-Bindungstasche gebildet und das Enzym aktiviert wird (Drum et al., 2002).

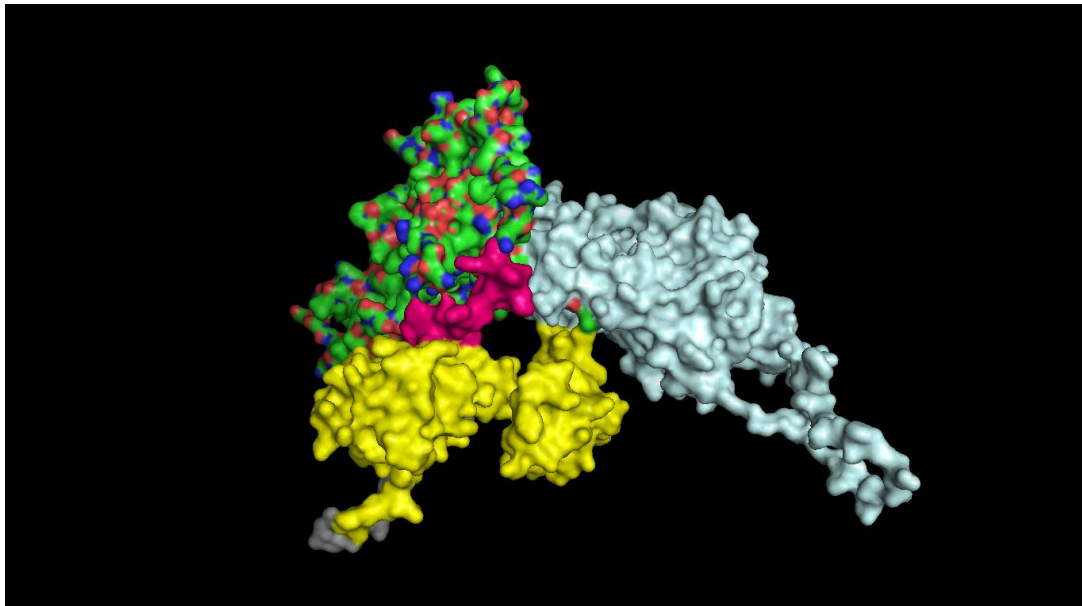
Aufgrund der zweiten Interaktionsstelle der AtDEG15 mit dem CML3 ist ein ähnlicher Mechanismus der Regulierung der peroxisomalen Protease wie für den Exotoxin-Edema-Faktor aus *Bacillus anthracis* denkbar. Möglicherweise wird über diese schwache Interaktion nach erfolgter Bindung des Calmodulins an die N-terminale Helix der AtDEG15 deren proteolytische Aktivität initiiert bzw. reguliert oder eine Konformationsänderung der AtDEG15 bewirkt, die die Dimerisierung der Protease bewirkt und somit die Aktivierung des Enzyms moduliert. Vor allem die Lage des zweiten Calmodulin-Bindungs-Motives innerhalb der katalytischen Triade der AtDEG15 lässt auf diese Regulierung der proteolytischen Aktivität schließen. Aufgrund der zwei unterschiedlichen Interaktionsstellen ist eine Regulierung durch unterschiedliche Affinität der beiden Bindungsstellen zum Calmodulin bzw. durch eine unterschiedliche Affinität zur  $\text{Ca}^{2+}$ -freien oder  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Form des Calmodulins denkbar.

Ein ähnlicher Mechanismus wurde auch für die *small-conductance* K<sup>+</sup>-Kanäle (*SK channels*) in eukaryotischen Zellen nachgewiesen (DeMaria et al., 2001). Diese binden CaM sowohl in der Ca<sup>2+</sup>-freien Apo-Form, als auch in Anwesenheit von Calcium. Durch die Bindung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen an das Calmodulin wird eine Dimerisierung der Proteine hervorgerufen und der Kanal dadurch aktiviert (Schumacher et al., 2001). Neben diesen Beispielen sind noch eine ganze Reihe weiterer Proteine bekannt, deren Dimerisierung bzw. Oligomerisierung über Calmodulin vermittelt wird und die unterschiedlich stark mit den verschiedenen Konformationen des Calmodulins interagieren.

Im Falle der AtDEG15 ist eine Regulierung der proteolytischen Aktivität durch die beiden unabhängigen Calmodulin-Bindungsstellen ähnlich wie bei den aufgeführten Beispiele möglich. Ein Einfluss der Calmodulin-Bindung auf die Aktivierung bzw. Modulierung der proteolytischen Aktivität der AtDEG15 unabhängig von der Dimerisierung der Protease ist denkbar.



**Abbildung 38: Homology modelling: ermittelte Struktur des AtDEG15-CML3-Komplexes (Darstellung „ribbons“).** CML3, blau; markiert wurden die experimentell ermittelte CML3-Bindungsstelle 1 (türkis Helix) und die zweite über Struktur- und Sequenz-Analysen postulierte Calmodulin-Bindungsstelle 2 innerhalb der Protease-Domäne, sowie der in die Strukturvorhersage eingefügte Ser-Gly-linker; N-Terminus AtDEG15, grün; C-Terminus AtDEG15, rot. Markiert sind außerdem die Aminosäuren His577, Asp676 und Ser765 der katalytischen Triade. Die Strukturvorhersage wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Ehrmann (Uni Duisburg) mittels *Bioinformatics toolkit* (Söding, 2005; Söding et al., 2005) erstellt.

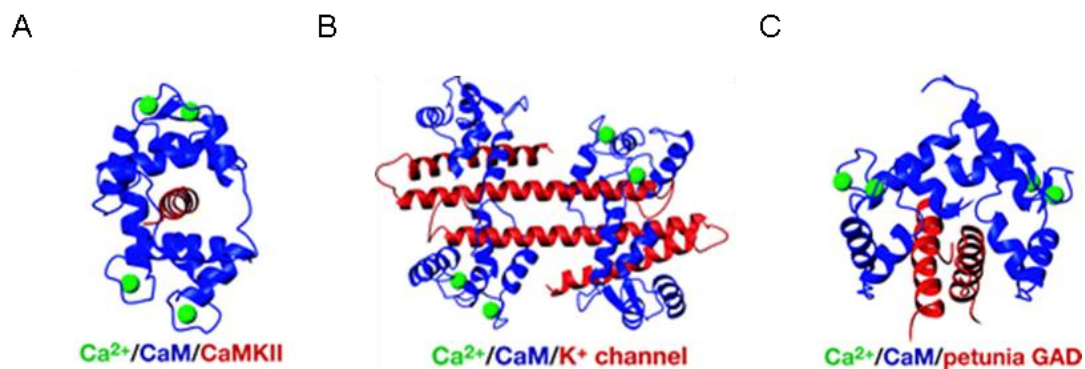


**Abbildung 39: Homology modelling: ermittelte Struktur des AtDEG15-CML3-Komplexes (Darstellung „surface“).** CML3, gelb; Ser-Gly-Linker, grau; N-Terminus der DEG15, der mit CML3 interagiert, rot; nicht interagierender Teil des N-Terminus der DEG15, grün; DEG15-Proteasedomäne, *light cyan*; zweite Interaktions-Stelle des CML3 mit der AtDEG15 zwischen gelbem und *light cyanem* Bereich, rot. Die Strukturvorhersage wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Ehrmann (Uni Duisburg) mittels *Bioinformatics toolkit* (Söding, 2005; Söding et al., 2005) erstellt.

Im Y3H-System konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Calmodulin an die AtDEG15 die Dimerisierung der Protease fördert (Abb. 27). Wie die Dimerisierung über die Calmodulin-Bindung reguliert wird, ist nicht bekannt und könnte nur anhand einer Kristallisation des dimeren Komplexes der AtDEG15 geklärt werden.

Erste Aufschlüsse über die Regulation der Dimerisierung der AtDEG15 durch die Interaktion mit Calmodulin könnten allerdings stöchiometrische Untersuchungen der beiden Interaktionspartner liefern. Anhand der Stöchiometrie von CaM/Zielprotein können Rückschlüsse über Art und Weise der Interaktion getroffen werden. So bindet CaM beispielsweise an die neuronale Calmodulin-*dependent* Protein-Kinase II (CaMKII) aus Säugern im Verhältnis 1:1, indem es sich um die Binde-Domäne des Zielproteins legt (Abb. 40). Mit einem Kalium-Kanal bildet Calmodulin größere Komplexe im Verhältnis 2:2, indem neben der eigentlichen Bindungs-Domäne noch weitere Bereiche des *target*-Proteins mit den N-terminalen und C-terminalen *loops* des Calmodulins interagieren (Abb. 40) (Hoeflich et al., 2002). Mit der Glutamat Decarboxylase (GAD) interagiert Calmodulin im Verhältnis 1:2

(Yap et al., 2003). Bei dieser Bindung kommt es zu einer zusätzlichen Interaktion des Zielproteins mit dem C-terminalen *loop* des Calmodulins (Abb. 40). Die Fähigkeit von einem Molekül Calmodulin zwei Moleküle GAD zu binden, lässt eine Rolle des CaM bei der Dimerisierung von GAD und bei der Ausbildung von hochmolekularen Komplexen vermuten (Yap et al., 2003). Es wurden in Pflanze GAD-Komplexe mit einer Größe von bis zu 500 kDa gefunden, die in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen stabilisiert, in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelatoren destabilisiert werden (Baum et al., 1996). Bislang konnte nicht geklärt werden, ob die Dimerisierung der GAD-Untereinheiten einen Einfluss auf die Aktivität der GAD nimmt. Es wird jedoch diskutiert, dass die Ausbildung der oligomeren Komplexe zu einer Aktivierung der GAD führt (Baum et al., 1996).



**Abbildung 40: 3D-Struktur von Calmodulin in Komplexen mit  $\text{Ca}^{2+}$  und seinen Zielproteinen.** Calmodulin: blau; Zielprotein: rot;  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen: grün. Die Strukturen sind der Protein Datenbank entnommen, accession codes: A)  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{CaMKIIa}$  (1CM1); B)  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{K}^+$ -channel (1G4Y); C)  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{petunia GAD}$  (1NWD); Die Strukturen wurden über X-ray Analysen (A, B) oder über NMR Analysen (C) ermittelt (entnommen und abgeändert aus Bouche et al., 2005).

Im Falle der DEG15 wurde über ein Y3H-System gezeigt, dass die Calmodulin-Bindung für eine Dimerisierung der DEG15 an beiden Molekülen der Protease stattfinden muss (Abb. 29). Da es sich bei der DEG15 mit 72 kDa um eine relativ große Protease handelt, wird angenommen, dass Calmodulin im Verhältnis 1:1 gebunden wird. Es ist aufgrund sterischer Effekte unwahrscheinlich, dass zwei DEG15 Moleküle an ein Calmodulin-Molekül binden können, auch wenn dies bei dem derzeitigen Forschungsstand nicht endgültig ausgeschlossen werden kann.

### 3.1.2 Mögliche CML-Interaktionspartner der AtDEG15

Peroxisomen importieren - anders als Mitochondrien und Chloroplasten - gefaltete Proteine (Wickner et al., 2005). Im Cytosol translatierte peroxisomale Proteine werden in ihrem gefalteten Zustand in die Peroxisomen importiert (Lazarow et al., 1985), und es wurde gezeigt, dass der Import von Proteinkomplexen bis zu einer Größe von 9 nm Durchmesser möglich ist (Meinecke et al., 2010). Über diesen Import-Mechanismus ist es möglich, dass hetero-Oligomere in die Peroxisomen importiert werden, von denen nur ein Partner ein PTS1 besitzt. Es wäre also denkbar, dass die AtDEG15 bereits im Cytosol mit einem CaM bzw. CML interagiert und dieses „huckepack“ mit in die Peroxisomen importiert.

Ein weiterer Hinweis darauf, dass die AtDEG15 möglicherweise mit einem nicht-peroxisomalen CML interagiert, ist in der Interaktion der AtDEG15 mit käuflichem Rinder-Calmodulin zu sehen, die im Laufe dieser Arbeit gezeigt werden konnte (Abb. 16). Die Frage, welches Calmodulin wann an die DEG15 bindet, bleibt damit bislang offen.

Es ist beispielsweise denkbar, dass Pflanzen durch die Calmodulin-Bindung im Cytosol und die dadurch vermittelte Dimerisierung der AtDEG15 einen Mechanismus zur Inaktivierung der generell degradierenden Wirkung der Protease (Helm et al., 2007) und damit zum Schutz vor unerwünschter Proteolyse entwickelt haben. Auch von anderen DEG-Proteasen ist bekannt, dass sie in unterschiedlichen Komplexen vorliegen und über die Komplexbildung die Aktivität beeinflusst wird bzw. die Proteasen gezielt gehemmt und inaktiviert werden. So liegt beispielsweise *E.coli* DegP in seiner Grundform als proteolytisch inaktives Hexamer vor und geht erst durch die Substrat-Bindung und die Ausbildung von höhermolekularen Komplexen in seinen aktiven Zustand über (Kim et al., 2005; Huber und Bakau, 2008).

Obwohl bislang nicht geklärt werden konnte, ob AtDEG15 innerhalb oder außerhalb der Peroxisomen mit Calmodulin interagiert, scheint doch zumindest die Regulierung der Protease an ihrem „Wirkungs-Ort“, also innerhalb der Peroxisomen sinnvoll. Eine Klärung der Frage, wo und mit welchem CML als Interaktionspartner die AtDEG15 interagiert, könnte Aufschluss über die Regulierung der Protease und über weitere Aufgaben der AtDEG15 neben der Prozessierung der PTS2-Enzyme liefern.

### 3.1.3 Regulierung der proteolytischen Aktivität der AtDEG15 über Calmodulin-Bindung

Im Laufe dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Calmodulin-Bindung für die Dimerisierung der AtDEG15 nötig ist (Abb. 27). In Abwesenheit von CML3 zeigte sich lediglich eine schwache Dimerisierung der AtDEG15 (Abb. 15, 28), die womöglich auf einer Interaktion der AtDEG15 mit einem Calmodulin des verwendeten Hefe-Stammes beruht. Bei gleichzeitiger Expression von CML3 und zwei Molekülen AtDEG15 konnte eine Steigerung der Dimerisierung um den Faktor 10 nachgewiesen werden (Abb. 27).

Über die Dimerisierung wird die Prozessierungs-Aktivität der AtDEG15 reguliert. Somit wird über die Calmodulin-Bindung auch die Prozessierung peroxisomaler Matrix-Enzyme durch die AtDEG15 beeinflusst. Die Calmodulin-Bindungs-Domäne ist jedoch nur in Pflanzen konserviert und kann in DEG15 aus Säugern und mehrzelligen Schleimpilzen nicht gefunden werden (Anhang 5.1.). Die Regulierung der proteolytischen Aktivität der peroxisomalen *processing*-Protease über Calmodulin wäre somit Pflanzen-spezifisch.

Im Vergleich zur evolutionär in allen Eukaryonten konservierten Form des Calmodulins (CaM) besitzen Pflanzen eine große Gen-Familie von CaM-Isoformen und Calmodulin-like-Proteinen (CML) (Mc Cormack et al., 2005). Diese Tatsachen deuten auf eine signifikante Ausweitung der Regulierung verschiedener Stoffwechselwege durch Calmodulin in der Pflanze hin. Es sind viele Calmodulin-bindende Enzyme bekannt, die nur in Pflanzen vorkommen oder die in anderen Organismen zwar existieren, dort aber nicht Calmodulin-reguliert sind.

Ein Beispiel für Pflanzen-spezifische Calmodulin-Bindungs-Proteine sind die sogenannten *cyclic-nucleotide gated channel* Proteine (CNGCs). Für die CNGCs wurde in Pflanzen eine Inaktivierung des Kanals durch die Bindung von Calmodulin an die *cyclic-nucleotide-monophosphate*-Domäne (cNMPs) nachgewiesen (Arazi et al., 2000; Hua et al., 2003). In Säugern dagegen sind die CaM-Bindungsdomäne und die cNMP getrennt auf den CNGCs zu finden, es kann somit nicht mehr zu einer Inaktivierung des Kanals durch die Calmodulin-Bindung kommen. In Säugern liegt somit ein anderer Mechanismus der Regulierung der CNGCs vor (Mäser et al., 2001).

Weitere Beispiele für Enzyme, die ausschließlich in Pflanzen CaM-reguliert sind, sind die Glutamatdecarboxylase (Yap et al., 2003), wobei diese in *Saccharomyces cerevisiae* eben-



falls CaM bindet, die Apyrase, die NAD-Kinase (Hua et al., 2004) und AtCAT3 (Yang und Pooviah, 2002).

Die Katalase AtCAT3 ist wie auch die AtDEG15 in den Peroxisomen lokalisiert (Yang und Pooviah, 2002). AtCAT3 ist CaM-reguliert und dies scheint ebenfalls Pflanzen-spezifisch zu sein, da CaM keinen Einfluss auf Katalasen aus *Aspergillus niger*, aus menschlichen Erythrozyten oder aus Rinderleber hat (Yang und Pooviah, 2002). Die Aktivität der Katalase aus *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum* konnte dagegen durch Zugabe von CaM/Ca<sup>2+</sup> um das zweifache gesteigert werden (Yang und Pooviah, 2002). Wie auch bei AtDEG15 ist für AtCAT3 nicht bekannt, ob die Katalase in den Peroxisomen mit dem dort lokalisierten AtCML3 interagiert oder ob es bereits im Cytosol mit einem anderen CaM oder CML zu einer Interaktion kommt und dieses dann gemeinsam mit AtCAT3 in die Peroxisomen importiert wird. Werden sowohl die AtDEG15 als auch AtCAT3 in den Peroxisomen durch AtCML3 reguliert, stellt sich die Frage, ob eine Hochregulierung oder eine vermehrte Expression eines der beiden Proteine die Aktivität des anderen durch „Abfangen“ des AtCML3 beeinflusst. Unter Stress-Bedingungen, bei denen vermehrt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gebildet wird, wie beispielsweise bei erhöhter Photorespiration durch Lichtstress, ist eine verstärkte Katalaseaktivität nötig. Es scheint naheliegend, dass dies zu einer Beeinträchtigung der Prozessierung des *targeting*-Signals von PTS2-Enzymen führen würde, wenn sowohl Katalase AtCAT3 als auch AtDEG15 durch CML3 reguliert werden. Eine unabhängige Regulierung der beiden peroxisomalen Calmodulin-Bindungsproteine AtDEG15 und AtCAT3 durch unterschiedliche Calmoduline erscheint aufgrund der Möglichkeit „huckepack“ Importes mit unterschiedlichen CaMs bzw. CMLs aus dem Cytosol möglich.

Da in Pflanzen eine große Anzahl an CaMs und CMLs existieren, ist es ebenfalls denkbar, dass unter unterschiedlichen physiologischen Bedingungen verschiedene CaMs oder CMLs mit demselben Zielprotein, in diesem Falle der AtDEG15 interagieren. Eine Bindung von unterschiedlichen Calmodulinen an die AtDEG15 wäre somit im Cytosol und/oder in den Peroxisomen möglich. Diese unterschiedlichen Interaktionen könnten verschiedene Konformationsänderungen des Zielproteins bewirken. Die Bindung von verschiedenen Calmodulinen an die N-terminale Bindungsstelle der DEG15 könnte unterschiedliche Sensitivität gegenüber der zweiten Calmodulin-Bindungsstelle innerhalb der Protease-Domäne hervorrufen. Damit sind unterschiedliche regulatorische Effekte möglich (Bouche et al., 2005).

### 3.1.4 Oligomerisierung der DEG-Proteasen: Nur pflanzliche DEG15 liegen als Gleichgewicht zwischen Monomer und Dimer vor

Die AtDEG15 grenzt sich stark von den übrigen Vertretern der DEG-Proteasen ab. Sie ist bislang die einzige DEG-Protease, für die eine Calmodulin-Bindung nachgewiesen werden konnte. Auch die in diesem Zusammenhang untersuchte, Calmodulin-vermittelte Dimerisierung ist unter den DEG-Proteasen einzigartig.

Die Strukturen von DegS und DegP aus *E.coli* (Krojer et al., 2002; Wilken et al., 2004), als auch die Struktur von DEG1 aus *Arabidopsis thaliana* (Kley et al., 2011) wurden über Röntgenkristallographie aufgeklärt.

DegP tritt als Hexamer auf, wobei dieses Hexamer aus zwei trimeren Ringen aufgebaut ist. Die beiden trimeren Untereinheiten lagern sich über ihre proteolytisch aktiven Domänen aneinander. Die beiden PDZ-Domänen von jedem DegP-Molekül sind nach außen gerichtet (Krojer et al., 2002). Dieses Hexamer der DegP stellt die inaktive Form der Deg-Protease dar. In ihrer aktiven Form bildet die DegP höhere Oligomere aus den trimeren Untereinheiten. Es wurden Oligomere aus 12 bis 24 DegP-Molekülen nachgewiesen (Krojer et al., 2008), die sich erst in Anwesenheit der physiologischen Substrate, nämlich fehlgefalteter Proteine, bilden. Durch die Bindung von nicht- oder fehl-gefalteten Proteinen an die hydrophobe Innenseite des Hexamers wird die Trimer-Trimer-Bindung der DegP destabilisiert. Durch die Ausbildung höherer Oligomere aus den trimeren Untereinheiten der DegP, kommt es zu einer Konformationsänderung von *loops* innerhalb der katalytisch aktiven Domäne der DegP und dadurch zu deren Aktivierung der Protease (Krojer et al., 2008).

DegS liegt im Gegensatz zu DegP als Trimer vor. Die trimere Form der DegS wird über Wechselwirkungen zwischen den Protease-Domänen der einzelnen DegS-Moleküle stabilisiert (Sohn et al., 2010). Es wurde nachgewiesen, dass DegS in seiner Grundform enzymatisch inaktiv ist (Wilken et al., 2004). Erst durch die Bindung von Stress-Signalen an die PDZ-Domäne der DegS kommt es zu Änderungen der Konformationen der einzelnen DegS-Moleküle des trimeren Komplexes (Walsh et al., 2003). Durch diese Konformationsänderung kommt es zu einer Re-Orientierung eines *loops* innerhalb der Protease-Domäne und der *loops* L1, L2 und LD der Aktivierungs-Domänen. Diese Änderungen der Konformation führt letztlich zu einer Aktivierung der Protease. Im Unterschied zur DegP, ändert DegS nicht ihren oligomeren Zustand im Zuge der Aktivierung, sondern liegt weiterhin als Trimer vor (Hasenbein et al., 2010).

DEG1 aus *A. thaliana* liegt wie DegP aus *E.coli* als Hexamer vor, das aus zwei trimeren Untereinheiten aufgebaut ist (Kley et al., 2011). Die beiden trimeren Untereinheiten lagern sich über Wechselwirkungen zwischen ihren Protease-Domänen und den PDZ-Domänen aneinander. Durch die Ausbildung des Hexamers sind die Protease-Domänen nur von der Innenseite des Hexamers zugänglich. Die Substrate müssen über eine der drei möglichen Poren, die durch die Interaktion der PDZ-Domänen mit den *loops* LA der Protease-Domänen gebildet werden, in das Innere des Hexamers gelangen. Durch die limitierte Größe der Poren können nur ungefaltete Proteine oder Proteinen mit ausgeprägten *loop*-Strukturen ins Innere des Hexamers gelangen und dort proteolytisch gespalten werden (Kley et al., 2011). Es konnte gezeigt werden, dass das Gleichgewicht zwischen monomerer und hexamerer Form der DEG1 pH abhängig ist. Unter leicht sauren Bedingungen (pH 6) wird das Gleichgewicht in Richtung des Hexamers verschoben; bei pH 8 liegt die DEG1 fast ausschließlich als Monomer vor (Kley et al., 2011).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle bislang strukturell charakterisierten DEG-Proteasen als Trimere oder höhere Oligomere, die aus Trimeren aufgebaut sind, vorliegen. Die enzymatische Aktivität der DEG-Proteasen kann reversibel moduliert werden bzw. können DEG-Proteasen reversibel zwischen zwei unterschiedlichen Zuständen wechseln. Damit können die DEG-Proteasen zwei unterschiedliche Funktionen, wie z. B. Protease- und Chaperon-Funktion der DegP (Spiess et al., 1999), ausüben (Hasenbein et al., 2010). Die Modulierung der Aktivität wird dabei über Konformations-Änderungen der *loops* innerhalb der Protease-Domäne hervorgerufen. Die Bedingungen, die zu diesen Konformations-Änderungen führen sind bei den einzelnen Vertretern der DEG-Proteasen unterschiedlich und sind angepasst an ihre Funktionen bzw. Aufgaben (Sohn et al., 2010; Kley et al., 2011).

Für die pflanzliche DEG15 konnte gezeigt werden, dass sie in einem  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigem Gleichgewicht aus monomerer und dimerer Form vorliegt. Sowohl das Monomer, als auch das Dimer der AtDEG15 sind proteolytisch aktiv (Helm et al., 2007). Im Laufe dieser Arbeit konnte die Dimerisierung der AtDEG15 über ein Y2H-System bestätigt werden. Zudem wurde die AtDEG15 als Calmodulin-bindendes Protein identifiziert und gezeigt, dass die Calmodulin-Bindung für die Dimerisierung der AtDEG15 nötig ist. Die AtDEG15 unterscheidet sich damit deutlich von den übrigen DEG-Proteasen. Für keine der übrigen Vertreter der DEG-Proteasen wurde bislang eine Interaktion mit Calmodulin nachgewiesen und die übrigen Vertreter der DEG-Proteasen bilden Trimere bzw. höhere Oligomere und

keine Dimere. Es gibt bislang keine Hinweise, dass konzentrations-abhängig höhermolekulare Strukturen bzw. Oligomere ausgebildet werden. Es scheint, dass die pflanzliche DEG15 einen eigenen Mechanismus zur Modulierung ihrer Aktivität entwickelt hat, der sich deutlich von dem der übrigen DEG-Proteasen unterscheidet. Auffällig ist, dass die pflanzliche DEG15 ihre Aktivität, wie auch die übrigen DEG-Proteasen, reversibel modulieren kann und damit ein charakteristisches Merkmal der DEG-Proteasen beibehält.

### 3.1.5 Expression der AtDEG15 im heterologem System

Die Expression der AtDEG15 in verschiedenen heterologen Systemen (*E. coli*, *P. pastoris*, *N. tabacum*) wurde zur Gewinnung des nativen Proteins in den erforderlichen Mengen untersucht. Die Expression in *E.coli* lieferte denaturierte AtDEG15; in den übrigen getesteten Expressions-Systemen konnte keine stabile Expression der Protease erreicht werden. Dies kann zum einen darauf zurückgeführt werden, dass es sich bei der AtDEG15 um eine Protease mit *in vitro* generell degradierender Protease-Aktivität handelt (Helm et al., 2007), welche die verwendeten Organismen bei der Expression stark schädigen würde. Zum anderen besitzt die AtDEG15 eine ungewöhnliche Aminosäure-Sequenz mit einem hohen Gehalt an Prolinen und Glycinen und dadurch bedingt eine flexible Proteinstruktur. Diese flexible Struktur führt zu Problemen bei der Expression, da das exprimierte Protein aggregiert und besonders in *E.coli* als *inclusion bodies* abgelagert wird (Abb. 34).

Über Strukturvorhersagen wurden zwei Bereiche der AtDEG15 ermittelt, die zur Ausbildung einer regelmäßigen Tertiär-Struktur in der Lage sind (Abb. 10). Bei diesen Bereichen handelt es sich zum einen um die Protease-Domäne (Trp 465-Pro 615) ohne den *loop* innerhalb der Protease-Domäne (Trp 397- Ile 465) und zum anderen um einen N-terminalen Bereich der AtDEG15 (Met 1- Leu 326) ohne den *loop* im N-Terminus (Leu 132- Phe 197). Die Expression der Protease-Domäne ohne den Pflanzen-spezifischen *loop* lieferte ebenfalls denaturiertes Protein. Es wird davon ausgegangen, dass dieser Teil der AtDEG15 weiterhin proteolytisch aktiv ist und daher von den zur Expression verwendeten Organismen abgelagert wird. Auch die Coexpression der AtDEG15 und CML3 in *E.coli* führte zu allenfalls geringfügiger und nicht reproduzierbarer Erhöhung der Löslichkeit; proteolytische Aktivität war nicht nachweisbar.

### 3.1.6 Handelt es sich bei DEG15 um ein intrinsisch ungeordnetes Protein?

Intrinsisch ungeordnete Proteine (IUP) zeigen hinsichtlich ihrer Aminosäure-Sequenz Gemeinsamkeiten, wie beispielsweise das vermehrte Vorkommen von geladenen und hydrophilen Aminosäuren oder das weitgehende Fehlen von hydrophoben Bereichen. Diese hydrophoben Bereiche liegen bei einer korrekten Protein-Faltung im Inneren der Proteinstruktur, wodurch die Ausbildung einer kompakten, globulären Struktur des Proteins begünstigt wird (Gast et al., 1995; Weinreb et al., 1996). Die ungeordneten Strukturen der Proteine können sich dabei über das gesamte Protein erstrecken oder einzelne Domänen betreffen. Local ungeordnete Proteinregionen sind weit verbreitet und konnte in zahlreichen NMR-Strukturen von Proteinen nachgewiesen werden. Für viele dieser ungeordneten Domänen konnte eine biologische Funktion nachgewiesen werden (Dyson et al., 2005). Unstrukturierte Domänen der IUPs besitzen Chaperon-Funktion, sind also beteiligt an der Faltung von RNA und Proteinen, wie beispielsweise  $\alpha$ -Synuclein (Morar et al., 2001) oder das Nucleocapsid protein 7/9 (Tompa, 2005). IUPs fungieren zudem als Effektor-Moleküle indem sie die Aktivität von Partnermolekülen modulieren. Beispiele für IUPs, die Aufgaben als Effektor-Moleküle übernehmen sind Securin, das eine Inhibierung bzw. Aktivierung der Separase während der Anaphase bewirkt (Cox et al., 2002), oder PKI, das die cAMP-abhängigen Protein-Kinase gezielt inaktiviert (Tompa, 2005). Unstrukturierte Proteine haben darüber hinaus beispielsweise Funktionen bei der Ausbildung von Komplexen, wie das Caldesmon, das an der Polymerisierung und der Bündelung von Actin beteiligt ist (Lynch et al., 1987).

Ausgehend von den Ergebnissen der *in silico* Untersuchungen der AtDEG15 (Abb. 10, 11, 12) wird vermutet, dass die AtDEG15 zumindest in Teilbereichen des Proteins keine regelmäßigen Protein-Strukturen ausbilden kann und somit zu den intrinsisch unstrukturieren Proteinen zählt. Anhand der durchgeführten *in silico* Untersuchungen der AtDEG15, wird deutlich, dass es sich bei der pflanzlichen DEG15 um ein Protein mit sehr ungewöhnlicher Aminosäure-Sequenz handelt, die zu einer hohen Flexibilität und strukturellen Variabilität führt. Besonders auffällig ist dabei der hohe Gehalt an Prolinen in der AtDEG15-Sequenz (Anhang 5.2.). Proline sind bekanntermaßen starke  $\alpha$ -Helix- und  $\beta$ -Faltblatt-Brecher. Darüber hinaus werden Prolin-reiche Regionen auch in Zusammenhang mit Protein-Protein- und Protein-DNA-Bindung gebracht (Williamson et al., 1994). Dabei wird gerade die eingeschränkte Beweglichkeit des Prolinrestes für die Interaktion mit anderen

Proteinen verantwortlich gemacht, da der Verlust der Entropie bei der Proteinbindung herabgesetzt wird. Es kommt über die Prolin-reichen Regionen zu einer wenig spezifischen, aber sehr schnellen Interaktion mit den Zielproteinen (Williamson et al., 1994). Über die Prolin-reichen Regionen der AtDEG15 könnten Protein-Protein Bindungen verursacht werden, wie die Dimerisierung bzw. Substrat-Bindung an die AtDEG15.

Die Tatsache, dass die AtDEG15 einen deutlich erhöhten Gehalt an Prolinen und darüber hinaus auch an Glycinen aufweist (Anhang 5.2.), die ebenfalls starke  $\alpha$ -Helix- und  $\beta$ -Faltblatt-Brecher sind, bringt die Protease wiederum in Zusammenhang mit anderen intrinsisch ungeordneten Proteinen. Ob die Protease jedoch tatsächlich zu dieser besonderen Klasse von Proteinen mit den strukturellen und funktionellen Besonderheiten gehört, wäre für künftige Untersuchungen von Interesse.

Es wurden über 120 Proteine experimentell als IUP identifiziert (Dunker et al., 2001) und anhand von Sequenzanalysen weit über 15000 Proteine zumindest in Teilbereichen ihrer Struktur als ungeordnet postuliert (Romero et al., 1998). Es erscheint somit durchaus denkbar, dass zumindest Teile der AtDEG15 keine geordnete 3D-Struktur besitzen.

Das Vorkommen von unstrukturierten Bereichen in Proteinen ist dabei kein unveränderlicher, starrer Zustand. Von vielen IUPs ist bekannt, dass sie nach erfolgter Bindung an ihre Interaktionspartner oder Liganden Faltungsprozesse durchlaufen und nach der Bindung eine geordnete Struktur aufweisen. Dieses Modell wird als *coupled-binding-and-folding* bezeichnet (Dyson und Wright, 2001).

Die Interaktion der AtDEG15 mit CML3 deutet darauf hin, dass es im Zuge der Bindung des Calmodulins an die AtDEG15 zu einer Konformationsänderung ehemals unstrukturierter Bereiche der Protease kommen kann und somit eine Dimerisierung der AtDEG15 ermöglicht würde.

Anhand der Strukturvorhersage der AtDEG15 scheint die Protease in zwei Bereiche mit geordneter Struktur unterteilt zu sein. Diese beiden Bereiche werden jeweils von einem relativ großen *loop* unterbrochen (Leu132-Phe197, Trp397-Ile465) und über einen unstrukturierten Bereich (Leu326-Pro353) verbunden (Abb. 10). Dieser unstrukturierte Bereich der AtDEG15 könnte als Linker zwischen den beiden strukturierten Domänen fungieren und eine Rolle bei der Dimerisierung der DEG15 übernehmen. Beispielsweise könnte durch die Bindung eines CMLs und einer dadurch hervorgerufenen Änderung der Konformation des Linkers (Leu326-Pro353), die Lage der beiden strukturierten Domänen zueinander verän-

dert werden. Durch eine solche Änderung könnte die Interaktion mit anderen Proteinen oder mit sich selbst induziert werden.

Ein ähnlicher Mechanismus ist beispielsweise für die Bindung von Calmodulin an seine Zielproteine bekannt. Durch die Bindung an seine Interaktionspartner erfährt die Linker-Region zwischen den beiden globulären Bereichen des Calmodulins eine Konformationsänderung, legt sich um sein Zielprotein und formt eine Art Tunnel, durch den die Bindungs-Domäne des Zielproteins verläuft (Luan et al., 2002).

Wenn es sich bei der AtDEG15 um ein IUP handelt, ist neben der Strukturinduzierung durch die Calmodulin-Bindung auch eine Änderung der Konformation durch die Bindung von PTS2-tragenden Enzymen an die AtDEG15 möglich. Möglicherweise spielt dabei der Pflanzen-spezifische *loop* innerhalb der Protease-Domäne eine Rolle, da im Laufe dieser Arbeit nachgewiesen wurde, dass Deletionskonstrukte der AtDEG15 ohne diesen *loop* zwar zur Dimerisierung fähig sind (Abb. 28), aber PTS2-Enzyme von diesen Konstrukten nicht mehr prozessiert werden (Abb. 32). Durch eine Bindung des Substrates an den *loop* und eine dadurch induzierte Faltung dieses unstrukturierten Bereiches könnte es zu einer Modulation der Prozessierungs-Aktivität der AtDEG15 kommen.

Ein ähnlicher Mechanismus der Aktivierung der Protease-Aktivität durch Bindung des Substrates konnte bereits für DegS identifiziert werden (Wilken et al., 2004). Die Inaktivierung von DegS wird durch eine unkorrekte Position der katalytischen Triade im Molekül hervorgerufen, wodurch die Tasche, die für die spezifische Substrat-Bindung verantwortlich ist, verdeckt wird und weitere Strukturen, die an der Substrat-Bindung beteiligt sind, zerstört werden. Durch die Bindung von Stress-Signalen an eine PDZ-Domäne der DegS, kommt es zu einer Reorientierung des *loops* L3 der Protease-Domäne und zur Bindung des Stress-Signals an die Protease-Domäne. Durch die Reorientierung von L3 wird eine Konformations-Änderung der übrigen *loops* innerhalb der Protease-Domäne hervorgerufen, wodurch DegS letztlich seine aktive Konformation erhält (Hasenbein et al., 2010). Ein ähnlicher Mechanismus ist auch bei der AtDEG15 denkbar, die in Pflanzen ebenfalls einen *loop* innerhalb der Protease-Domäne und laut Strukturvorhersagen (Abb. 10) einen zweiten *loop* innerhalb des N-Terminus besitzt. Allerdings fehlen der AtDEG15 die PDZ-Domänen, die in DegS die Substrat-Bindung vermitteln. Es ist nicht bekannt, welche Teile der AtDEG15 an der Substrat-Bindung beteiligt sind. Die im Zuge dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse liefern erste Hinweise darauf, dass das erste Drittel des N-Terminus (Met1-Ser94) der AtDEG15 an der Dimerisierung beteiligt ist und dass der C-Terminus der AtDEG15

und der Pflanzen-spezifische *loop* innerhalb der Protease-Domäne für die Modulierung der proteolytischen Aktivität von Bedeutung sind. Zur vollständigen Klärung der Mechanismen, die hinter der Substrat-Umsetzung stehen, sind weitere Untersuchungen nötig.

Nicht zuletzt müssten über verschiedene Struktur-Untersuchungen z.B. mittels NMR oder CD, die Konformation der AtDEG15 und eventuelle Struktur-Änderungen der Protease oder einzelner Domänen durch die Bindung des Calmodulins oder der PTS2-tragenden Enzyme als Substrate geklärt werden. Erst anhand dieser Untersuchungen könnte ein *coupled-folding-and-binding*-Mechanismus endgültig bestätigt werden.

Neue Untersuchungen haben gezeigt, dass intrinsisch unstrukturierte Proteine oft Regionen sequentieller oder struktureller Wiederholungen beinhalten (Tompa et al., 2003). Es wurden 126 intrinsisch unstrukturierte Proteine untersucht und die codierenden Gene zeigten eine auffällig hohe Anzahl an Sequenz-Dopplungen. Der Prozentsatz an Proteinen mit kurzen Sequenz-Segmenten, die sich wiederholten, liegt bei 39% und ist damit deutlich höher als bei strukturierten Proteinen. Bei diesen liegt der Anteil an Dopplungen von Sequenzen zwischen 14% und 28% (Tompa et al., 2003).

Aneinandergereihte, sich wiederholende Sequenzen, die in allen bislang untersuchten Genomen zu finden sind, werden nach der Länge ihrer Wiederholungen unterteilt in Satelliten, die eine Größe von mehreren tausend Basenpaaren aufweisen, in Minisatelliten, die aus 10-1000 bp bestehen und in Mikrosatelliten, die aus bis zu 10 bp aufgebaut sind (Bois et al., 1999; Vergnaud et al., 2000). Innerhalb von Micro- und Minisatelliten zeigen Gene einen hohen Grad an Polymorphismen und können dadurch relativ schnell neue funktionelle Nebenformen ausbilden. Da die Funktionen der IUPs auf großen ungeordneten Strukturbereichen der Proteine beruhen, können diese generell leichter durch Sequenzdopplungen verändert werden als globuläre Proteine, ohne dabei ihre Funktionalität einzubüßen. Es ist damit eine höhere genetische Variabilität möglich und eine schnellere funktionelle Entwicklung der IUPs. Erstmals wurde das vermehrte Vorkommen von Sequenz-Dopplungen bei Proteinbereichen mit niedriger struktureller Komplexität (Wotton et al., 1994) und bei Bereichen mit einem hohen Prolin-Gehalt gezeigt (Williamson et al., 1994). Auch die At-DEG15 weist einen erhöhten Prolin-Gehalt auf, wodurch sie erstmals in Zusammenhang mit den IUPs gebracht wurde. Es stellt sich die Frage, ob es bei der AtDEG15 im Laufe der Evolution aufgrund der ungeordneten Proteinstruktur ähnlich anderen IUPs zu Sequenz-Dopplungen gekommen ist.



Sequenz-Dopplungen sind unter den Vertretern der Familie der DEG-Proteasen bekannt. Es wird beispielsweise angenommen, dass DEG7, die in Pflanzen, Pilzen und Algen zu finden ist, im Zuge der Evolution aus einer kompletten Gen-Dopplung hervorgegangen ist (Schuhmann et al., 2011). DEG7 besitzt zwei Protease-Domänen, von denen eine aktiv und eine degeneriert ist, und vier PDZ-Domänen (Clausen et al., 2002). Es ist also denkbar, dass DEG7 durch Duplizierung eines *DegP-like* Genes, das für eine Protease-Domäne und für zwei PDZ-Domänen codiert, entstanden ist (Schuhmann et al., 2011). Die zweite Protease-Domäne wurde im Laufe der Evolution degeneriert und besitzt die Aminosäuren der katalytischen Triade nicht mehr. Gleichwohl wird sie von gängigen Datenbanken, wie HHpred oder InterPro als Serin-Protease-Domäne erkannt. Es wurde gezeigt, dass die degenerierte Protease-Domäne statt einer proteolytischen Aktivität Aufgaben bei der Bildung von Homo-Oligomeren übernimmt (Schuhmann et al., 2011).

Für die AtDEG15 kann zwar anhand einer Motiv-Suche mit den gängigen Datenbanken wie HHpred oder InterPro keine Gendopplung nachgewiesen werden, es ist aber möglich, dass die Motive im Laufe der Entwicklung auf Aminosäure-Ebene bereits zu weit abgewandelt wurden. Im Gegensatz zu der Motiv-Suche lässt die Strukturvorhersage (Abb 10) Vermutungen zu, dass es im N-terminalen Bereich der AtDEG15 zu einer Sequenz-Dopplung gekommen ist, da hier hohe strukturelle Ähnlichkeiten zur Protease-Domäne mit dem Pflanzen-spezifischen *loop* zu finden sind. Das Vorkommen einer Gen-Dopplung bzw. die Dopplung eines Sequenz-Bereiches der AtDEG15 ähnlich der AtDEG7 würde die Annahme, dass es sich bei der AtDEG15 um ein IUP handelt, unterstützen.

Neben den Strukturvorhersagen und Sequenz-Analysen gibt es aber weitere Anhaltspunkte, die die Annahme stützen, dass es sich bei der pflanzlichen DEG15 um ein IUP handelt. So lassen auch die experimentellen Ergebnisse darauf schließen, dass die AtDEG15 zumindest in Teilbereichen keine ausgeprägte 3D-Struktur besitzt. Es ist bekannt, dass IUPs unter nicht physiologischen Bedingungen zur Aggregation neigen und daher bei der Expression in heterologen Systemen vermehrt in *inclusion bodies* abgelagert werden. Auch die AtDEG15 neigt besonders in prokaryotischen Systemen vermehrt zur Bildung von unlöslichen Aggregaten. Eine gleichzeitige Expression von Calmodulin im prokaryotischen System erhöht minimal die Löslichkeit der AtDEG15, es kann aber nach wie vor keine proteolytische Aktivität der AtDEG15 nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass es tatsächlich durch die Bindung von Calmodulin an die AtDEG15 zu einer

Konformationsänderung bzw. zur Ausbildung einer geordneteren Struktur der AtDEG15 kommt, wie die höhere Löslichkeit der AtDEG15 belegt. Das Fehlen der proteolytischen Aktivität lässt vermuten, dass für die Prozessierungs-Aktivität bzw. die Dimerisierung der AtDEG15 weitere Interaktionspartner oder Liganden benötigt werden, die bislang nicht identifiziert wurden, die aber für die Aktivität der AtDEG15 und die Ausbildung der endgültigen Struktur der Protease entscheidend sind.

Im Laufe dieser Arbeit konnte am Beispiel der AtDEG15 gezeigt werden, dass sich die Pflanzen-DEG15 aufgrund ihrer Sequenz und ihrer Struktur deutlich von den übrigen Vertretern der Familie der DEG-Proteasen unterscheidet. Die hohe strukturelle Flexibilität und das postulierte Vorkommen ungeordneter Teilbereiche innerhalb des Proteins deuten in Zusammenhang mit der nachgewiesenen Calmodulin-Bindung auf einen vollkommen neuen Mechanismus der Regulierung proteolytischer Aktivität hin. Es gibt Hinweise darauf, dass dieser Mechanismus Pflanzen-spezifisch ist. Vor dem Hintergrund, dass PTS2-tragende Enzyme auch ohne die Abspaltung ihrer pre-Sequenz enzymatisch aktiv sind (Gietl et al., 1994; Kato et al., 1996), kann davon ausgegangen werden, dass die AtDEG15 neben der Prozessierung des PTS2 weitere für die Pflanze essentielle Funktionen hat.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Molekularbiologische Methoden

#### 4.1.1 Verwendete *Escherichia coli*-Stämme und ihre Kultivierung

Stamm	Genotyp	Resistenz	Quelle
DH5 $\alpha$	F- $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 $\lambda$ -	-	Invitrogen (Karlsruhe)
XL1-blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZ $\Delta$ M15 Tn10 (Tetr)]	Tetracyclin	Stratagene (Heidelberg)
BL21 (DE3)	F- dcm ompT hsdS(rB- mB-) gal $\lambda$ (DE3),	-	Novagen (Merck, Darmstadt)
Rosetta (DE3) pLysS	F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm (DE3) pLysSRARE (CamR)	Chloramphenicol	Novagen (Merck, Darmstadt)
ArcticExpress RIL	F- ompT hsdS(rB- mB-) dcm+ Tetr gal endA Hte [cpn10 cpn60 Gentr] [argU ileY leuW Strr]	Gentamycin	Stratagene (Heidelberg)

Die Anzucht von *E.coli* erfolgte bei 37°C entweder in LB-Flüssigmedium im Schüttler bei 200 rpm oder auf LB-Agarplatten.

Zur Selektion der Transformanten wurden dem LB-Medium entsprechende Antibiotika in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

Antibiotikum	Konzentration [mg/l]	Stammlösung [mg/ml]
Ampicillin	50-100 (bzw. 180)	100, in sterilem H <sub>2</sub> O
Chloramphenicol	34	34, in 100% Ethanol
Gentamycin	12,5	25, in sterilem H <sub>2</sub> O
Kanamycin	25-50	50, in sterilem H <sub>2</sub> O
Rifampicin	25	25, in 100% Ethanol
Tetracyclin	20	20, in sterilem H <sub>2</sub> O

#### LB-Medium (Luria-Bertani)

5 g/l Hefeextrakt  
10 g/l Pepton  
10 g/l NaCl  
15 g/l Agar (optional: nur bei Festmedium)

Mit 5M NaOH auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren, Antibiotika-Zugabe erfolgte nach Abkühlen des Mediums auf ca. 60°C.

#### **4.1.2 Anzucht von *A. tumefaciens***

Die Anzucht von *A. tumefaciens* erfolgte bei 28°C entweder in LB-Flüssigmedium im Schüttler bei 200 rpm oder auf LB-Agarplatten siehe 4.1.1.

#### **4.1.3 Anzucht von *A. thaliana***

Bei den für die Versuche verwendeten Pflanzen handelte es sich ausschließlich um *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen des Ökotyps Columbia (Col) oder um transgene Pflanzen dieses Ökotyps. Bei den Versuchen dieser Arbeit wurden die Pflanzen entweder zunächst auf MS-Platten vorgezogen oder direkt in Erde ausgebracht.

Für die Vorzucht auf Platten wurden die Samen nach Oberflächensterilisation auf MS-Medium (MS 0,5x Saccharose) ausgebracht, die Platten zur Stratifizierung für 2 Tage bei 4°C unter Licht gelagert und anschließend unter Dauerlicht (60  $\mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ ) bei 22-23°C 4 bis 14 Tage bis zu ihrer Verwendung angezogen.

Für die vorgenommene Oberflächensterilisation von Arabidopsis-Samen, wurden jeweils die benötigten trockene Samen mit 0,75 ml 80% EtOH (v/v) / 0,1% Triton X-100 (v/v) versetzt und 30 min bei RT geschüttelt. Anschließend wurde 0,25 ml einer 3% (v/v) Natriumhypochlorit (NaOCl)-Lösung zugegeben und weitere zwei Minuten sterilisiert. Nach 5-maligem Waschen mit je 1 ml sterilem mQ-Wasser wurden die Samen auf MS-Platten ausgebracht.

MS-Medium (0,5x Saccharose) (Murashige & Skoog, 1962)

2,5 ml/l 400x Mikrosalz-Lösung  
100 ml/l 10x Makrosalz-Lösung  
5,0 g/l Saccharose  
1,0 g/l MES

mit 5 M KOH auf einen pH-Wert von 5,8 einstellen

optional: 10,0 g/l Agar für festes Medium zugeben und  
autoklavieren

400x Mikrosalze

0,01 g/l  $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$   
0,01 g/l  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$   
11,2 g/l  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$   
1,2 g/l  $\text{H}_3\text{BO}_3$   
0,3 g/l KI  
14,6 g/l  $\text{Na}_2\text{EDTA}$   
0,1 g/l  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$   
0,8 g/l  $\text{ZnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$

10x Makrosalze

3,3 g/l  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$   
1,7 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
19,0 g/l  $\text{KNO}_3$   
3,7 g/l  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$   
4,0 g/l  $\text{MnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$   
16,5 g/l  $\text{NH}_4\text{NO}_3$

Lagerung nach Autoklavieren bei RT

Lagerung bei  $-20^\circ\text{C}$

Die Anzucht in Erde erfolgte in Phytokammern (Convicon, Kanada) unter Langtagbedingungen (16h Licht -  $100 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ ,  $22^\circ\text{C}$ , 65% Luftfeuchtigkeit; 8h Dunkelheit bei  $17^\circ\text{C}$ , 75% Luftfeuchtigkeit) bzw. im Gewächshaus in einer Perlit-Einheitserde-Mischung (Typ T). Die Generationszeit lag bei 6 bis 8 Wochen.

#### **4.1.4 Anzucht von *Nicotiana tabacum***

Die Anzucht von *Nicotiana tabacum* erfolgte in Phytokammern (Convicon, Kanada) unter Langtagbedingungen (16h Licht -  $100 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ ,  $22^\circ\text{C}$ , 65% Luftfeuchtigkeit; 8h Dunkelheit bei  $17^\circ\text{C}$ , 75% Luftfeuchtigkeit) bzw. im Gewächshaus. Zur Aussaat der Samen und für die Kultivierung der Pflanzen wurde eine Perlit-Einheitserde-Mischung (Typ T) verwendet. Die Generationszeit lag bei 4-5 Monaten. Es wurden Tabakpflanzen der Varietät *Petit havanna* bzw. *Xanthic* kultiviert.

#### 4.1.5 Methoden zur DNA-Isolierung

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde ein alkalisches Lyse-Protokoll (Birnboim & Doly, 1979) verwendet. Für die Plasmid-DNA-Präparation wurde eine 5 ml-ÜN-Kultur einer Einzelkolonie verwendet, von der 4 ml für 5 min bei 4000 xg abzentrifugiert wurden. Das Pellet wurde in 250 µl GET-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 250 µl Lysepuffer wurde das Reaktionsgefäß 6-8mal invertiert. Die Lyse erfolgte während einer Inkubation von 5 min auf Eis. Danach wurden zur Neutralisation und Fällung von genomischer DNA und vorhandener Proteinen 250 µl 3 M Kaliumacetat, pH 4,8 zugegeben. Nach Zentrifugation für 10 min bei 16000 xg wurde der Überstand mit demselben Volumen vorgekühltem Ethanol versetzt und für 20 min bei -20°C die Plasmid-DNA gefällt. Anschließend wurde 10 min lang bei 16000 xg zentrifugiert. Das erhaltene DNA-Pellet wurde mit 500 µl 80% (v/v) Ethanol gewaschen, erneut für 5 min bei 16000 xg zentrifugiert und bei RT ca. 30 min getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 25-50 µl 0,1x TE-Puffer mit 25 µg/ml RNase aufgenommen und 1 h bei 37°C inkubiert.

##### GET-Puffer

50 mM Glucose  
10 mM EDTA (pH 8,0)  
25 mM Tris-HCl (pH 8,0)

##### 0,1 x TE-Puffer

1 mM Tris-HCl (pH 8,0)  
0,1 mM EDTA

##### Lyse-Puffer

0,2 M NaOH  
1 % SDS

##### Neutralisationspuffer

3 M Kaliumacetat (pH 4,8 bis 5,2)

#### 4.1.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR-Techniken können DNA-Fragmente exponentiell vermehrt und durch Verwendung entsprechender Primer verändert bzw. modifiziert werden. Für die durchgeführten Klonierungen erfolgte die Amplifizierung von DNA-Fragmenten unter Verwendung von Polymerasen mit Korrekturfunktion (*proof reading*) (Phusion *high fidelity*, Biozym), um ein Auftreten von falsch eingebauten Nucleotiden zu verhindern bzw. deren Anzahl möglichst gering zu halten. Wurde die PCR verwendet, um Transformanten zu ermitteln bzw. um Pflanzen auf Homozygotie zu überprüfen wurde die GoTaq<sup>®</sup>-Polymerase (Promega) bzw. die Phire-Polymerase (Biozym) verwendet.

Dabei wurde in den meisten Fällen folgender PCR-Ansatz verwendet, der unter gegebenen Umständen aber auch abgewandelt bzw. angepasst wurde:

Komponente	Endkonzentration	Volumen [ $\mu$ l]
DNA- <i>template</i>	1 - 20 ng	1
Puffer (enthält 25 mM MgCl <sub>2</sub> ): 5x Phusion- <i>buffer</i> low GC 5x GoTaq <sup>®</sup> Green für GoTaq <sup>®</sup> -Polymerase	1x (2,5 mM MgCl <sub>2</sub> )	2 4
dNTP-Mix (10 mM)	2,5 mM	1
Primer forward (100 $\mu$ M)	0,1 $\mu$ M	0,5
Primer reverse (100 $\mu$ M)	0,1 $\mu$ M	0,5
Polymerase: Phusion (5 U/ $\mu$ l) GoTaq <sup>®</sup> (5 U/ $\mu$ l)	0,5 U	0,2 0,5
mQ-H <sub>2</sub> O	Auffüllen auf 20 $\mu$ l	

Die PCR wurde unter folgenden Beispielbedingungen im Pico-Cycler (Biozym) durchgeführt:

Dauer	Temperatur	Vorgang	Zyklusanzahl
2 min	95 °C	Initialdenaturierung	1
10 sec	95 °C	Denaturierung	30-35 <sup>(C)</sup>
10 sec	50-65°C <sup>(A)</sup>	Primer-Annealing	
30sec-2min <sup>(B)</sup>	72 °C	Elongation	
7 min	72 °C	finale Elongation	1

(A)Die Annealingtemperatur muss für jeden Primer aufgrund seiner Länge und des GC-Gehaltes der Sequenz bestimmt werden. Angaben hierzu liefert der Hersteller MWG

(B) Die Elongationszeit ist abhängig von der Länge des DNA-Fragmentes, das amplifiziert werden soll und von der verwendeten Polymerase; die verwendete Phusion Polymerase amplifiziert beispielsweise ca. 1 kb in 15 sec

(C) Die Zykluszahl der PCR muss je nach erhaltenem Produkt gegebenenfalls ebenfalls angepasst werden; die Standard-PCR wurde mit 30 Zyklen gefahren

#### 4.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Analyse isolierter DNA bzw. von PCR-Produkten oder Produkten eines Restriktionsverdau erfolgte über Agarose-Gelelektrophorese. Zur Auftrennung der DNA-Fragmente entsprechend ihrer Molekülgröße wurde eine Agarose-Konzentration von 1,0% (w/v) in 1x TAE als Elektrophorese-Puffer verwendet. Die Visualisierung der DNA konnte durch Zusatz von 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zu den Gelen unter UV-Licht ( $\lambda=302$  nm) vorgenommen werden. Die Elektrophorese erfolgte bei 180 V und 400 mA in der Gelkammer. Als Größenstandards diente je nach zu erwartender Molekülgröße der Produkte entweder mit HindIII verdaute  $\lambda$ -DNA oder verschiedene DNA-Marker (siehe Anhang 5.3.). Die DNA-Proben wurden vor dem Probenauftrag mit 6-fach Gelladepuffer (Endkonzentration 1x, MBI Fermentas) versetzt. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1x TAE-Puffer aufgekocht, nach dem Abkühlen auf ca. 60°C wurden 5 µl Ethidiumbromid-Stammlösung pro 100 ml zugesetzt und das Gel in eine entsprechende Gelkammer gegossen.

##### EtBr-Stammlösung:

10 g/l Ethidiumbromid in mQ-H<sub>2</sub>O

##### Gelladepuffer 6x

0,09 % Bromphenolblau (w/v)  
0,09 % Xylene Cyanol FF (w/v)  
60 mM EDTA

##### 50x TAE

2 M TrisBase  
5,71 % (v/v) Essigsäure  
50 mM EDTA (pH 8,0)

##### Verwendete Größenstandards

1 kb DNA-Ladder (MBI Fermentas)  
 $\lambda$ -HindIII-Marker (MBI Fermentas)  
100 bp Ladder (MBI Fermentas)



#### **4.1.8 DNA-Extraktion aus Agarosegelen**

Damit nachfolgende Reaktionen wie Ligationen und Sequenzierungen nicht durch Verunreinigungen oder kleine DNA-Fragmente gestört wurden, wurden Produkte der PCR sowie der Restriktionsverdau über Gelelektrophorese aufgetrennt und aus den Agarosegelen gereinigt. Hierfür wurden nach der Agarose-Gelelektrophorese die DNA-Banden unter langwelligem UV-Licht ( $\lambda = 316 \text{ nm}$ ) möglichst schnell aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe eines Gelextraktionskits (ExtractionII, Macherey-Nagel<sup>®</sup>) aus dem Gel isoliert. Die Elution der geextrahierten DNA nach der Bindung an die Reinigungssäule erfolgte mit auf 60°C erwärmten mQ-Wassers.

#### **4.1.9 Bestimmung der DNA-Konzentration**

Bei einer Reihe molekular biologischer Methoden (Restriktionsverdau, PCR, Ligation) muss im Vorfeld des Versuches die Konzentration der eingesetzten DNA bestimmt werden. Dies erfolgte zum einen über eine Mengenabschätzung der DNA im Vergleich zu HindIII verdauter  $\lambda$ -DNA, zum anderen über eine photometrische Vermessung der einzusetzenden Probe.

##### **4.1.9.1 Bestimmung der DNA-Konzentration mittels $\lambda$ -DNA**

Um die Konzentration von DNA-Fragmenten zum Beispiel für eine Ligation zu bestimmen, wurde der  $\lambda$ -HindIII-Marker verwendet. Anhand eines Intensitätsvergleiches von den Markerbanden mit den Probenbanden konnte die Menge an aufgetragener DNA auf dem Gel bestimmt werden und durch Einbeziehen des Volumens an eingesetzter DNA konnte die Konzentration in der Probe ermittelt werden.

Zur Herstellung des  $\lambda$ -HindIII-Markers wurden 300  $\mu\text{l}$   $\lambda$ -DNA (300  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) in einem Endvolumen von 1600  $\mu\text{l}$  für 1 h bei 37°C mit HindIII verdaut. Im Anschluss wurde das Enzym hitzeinaktiviert (20 min, 65°C) und der Ansatz mit 200  $\mu\text{l}$  Gelladepuffer versehen (Endkonzentration: 50  $\text{ng}/\mu\text{l}$ ). Aufgetragen wurden 2  $\mu\text{l}$  Marker, so dass eine DNA-Menge von 100 ng eingesetzt wurde.

#### **4.1.9.2 Photometrische Vermessung**

Die DNA-Konzentration einer Lösung wurde durch Bestimmung des Extinktionskoeffizienten bei 260 nm ermittelt. Für die Messung wurde ein Spektralphotometer mit einer UV-Lichtquelle verwendet und 100µl Probe (1:50 verdünnt in H<sub>2</sub>O bidest.) in entsprechenden Küvetten eingesetzt. Neben der Konzentrationsbestimmung konnte auch die Reinheit der Probe abgeschätzt werden, wenn neben der Extinktion bei 260 nm auch die Extinktionswerte bei den Wellenlängen 230 und 280 nm bestimmt wurden.

#### **4.1.10 Verdau von DNA durch Endonukleasen**

Für das Schneiden von DNA-Fragmenten wurden Restriktionsendonukleasen von New England BioLabs (NEB) oder MBI Fermentas in den vom Hersteller vorgeschlagenen Puffern (1x Endkonzentration) verwendet. Wurden Vektoren für eine Klonierung verdaut, wurden 0,5 - 1 µg DNA eingesetzt, wurden lediglich Testverdaue von klonierten Fragmenten durchgeführt, wurden 0,1 – 0,5 µg DNA für den Verdau verwendet. Beim Verdau von PCR-Produkten wurden diese vorher über Gelextraktion gereinigt und der gesamte PCR-Ansatz für den Verdau verwendet. Jeder Ansatz enthielt 2-4 U Restriktionsenzym pro µg eingesetzte Plasmid-DNA bzw. pro µg PCR-Produkt. Sollte ein Doppelverdau erfolgen, wurden entweder die Restriktionsenzyme im Vorfeld so gewählt, dass für beide Enzyme der selbe Puffer verwendet werden konnte oder es wurde einzeln in dem jeweils angegebenen Puffer verdaut und zwischen den einzelnen Verdauen umgepuffert. Die Inkubation erfolgte nach Angaben des Herstellers für die jeweiligen Enzyme 30 min bis 3h bei 37°C. Die Größe der entstandenen Fragmente wurde über Agarosegele geprüft und die DNA-Fragmente gegebenenfalls über Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt.

#### **4.1.11 Ligation von DNA-Fragmenten**

Vor der Ligation wurde der verdauten Vektor dephosphoryliert, um die Religation der linearisierten DNA-Fragmente zu unterbinden. Es wurden die entsprechenden komplementären Enden dephosphoryliert. Zu einem 20 µl Ansatz eines Restriktionsverdau wurden 1 µl Alkalische Phosphatase (AP, alkaline phosphatase, NEB) sowie 2,5 µl 10x Puffer und 1,5 µl mQ gegeben, so dass ein Endvolumen von 25 µl erreicht wurde. Die Dephosphorylierung erfolgte bei 37°C für bis zu 30 min, anschließend wurde das Enzym 20 min lang bei 65°C hitzeinaktiviert.

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde der linearisierte, dephosphorylierte Vektor und das einzuklonierende Insert in einem molaren Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:3 bis 1:5 eingesetzt, je nach Fragmentlänge und Ausgangskonzentration der DNA-Fragmente. Die Ligation erfolgte in einem Ansatz mit einem Volumen von 10 µl, wobei 1 µl T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas) und 1 µl des vom Hersteller bereitgestellten Puffers enthalten waren. Der Ansatz wurde 1 h bei 22°C bzw. über Nacht bei 16°C inkubiert und anschließend in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen transformiert.

#### **4.1.12 Herstellung chemisch kompetenter und elektro-kompetenter Zellen**

##### **Chemisch kompetente Zellen:**

Eine 250 ml-Kultur von *Escherichia coli*-Zellen wurde in Anzucht-Medium bei 18°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 kultiviert (ca. 16h). Nachdem die Kultur für 10 min auf Eis abgekühlt wurde, wurden die Zellen 15 min bei 4000 rpm (2500 xg) und 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 80 ml eiskaltem TB-Medium resuspendiert und unter den gleichen Bedingungen abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml eiskaltem TB-Medium resuspendiert und der Zellsuspension 0,7 ml DMSO zugesetzt. Nach einer Inkubation von 10 min auf Eis wurden 200 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

#### Anzucht-Medium

20 g/l Pepton  
5 g/l Hefeextrakt  
10 mM NaCl  
2,5 mM KCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM MgSO<sub>4</sub>

#### TB-Medium

10 mM PIPES (pH 6,4)  
55 mM MnCl<sub>2</sub>  
15 mM CaCl<sub>2</sub>  
250 mM KCl

#### **Elektro-kompetente Zellen:**

Die Anzucht von Kulturen erfolgte bei 28°C in LB-Medium. Eine 500 ml-ÜN-Kultur wurde bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,8 zunächst 10 min lang auf Eis abgekühlt, dann 10 min bei 5000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit 500 ml eiskaltem mQ-Wasser gewaschen und erneut 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Nach Wiederholung dieses Wasch- und Zentrifugationsschrittes wurde das Pellet in 20 ml 10% (v/v) Glycerin (steril) resuspendiert und erneut bei 5000 rpm 10 min zentrifugiert. In einem letzten Schritt wurden die Zellen in 3 ml Glycerin aufgenommen und 250 µl Aliquots nach dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

#### **4.1.13 Transformation chemisch kompetenter *E.coli* mit rekombinanter DNA**

Zunächst wurden die benötigten, bei -80°C gelagerten Zellen für 20 min auf Eis aufgetaut, 1 µl Plasmid-DNA bzw. 10 µl eines Ligationsansatzes zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 30 s bei 42°C im Wasserbad, im Anschluss wurden die Transformationsansätze für 2 min auf Eis inkubiert und 1 ml SOC-Medium zugegeben. Nach einer Inkubation von 1 h unter Schütteln bei 37°C wurden die transformierten Zellen auf LB-Platten, die mit entsprechende Antibiotika supplementiert waren, ausplattiert und bei 37°C über Nacht (mindestens 16 h) inkubiert.

#### SOC-Medium:

5 g/l Hefeextrakt  
10 g/l Pepton  
10 g/l NaCl  
20 mM Glucose  
10 mM MgSO<sub>4</sub>  
10 mM MgCl<sub>2</sub>

#### **4.1.14 Transformation elektrokompenter *A. tumefaciens* mit rekombinanter DNA**

Für die Elektroporation wurden die elektrokompenten Agrobakterien und die Elektroporationsküvette und auf Eis vor gekühlt. Zu den Zellen wurden zwischen 100-200 ng Plasmid-DNA zugegeben und die Zellen 30 min auf Eis inkubiert. Bei einem Abstand der Küvettenelektroden von 0,5 cm wurden folgende Elektroporationsparameter eingestellt:  $V = 1,25 \text{ kV}$ ,  $C = 25 \text{ iFD}$ ,  $R = 700 \text{ }\Omega$ ,  $t = 17,5 \text{ ms}$ . Nach dem Impuls wurde 1 ml LB-Medium zugegeben, gemischt und die Suspension in ein 10ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Transformationsansätze wurden für 1 h bei  $30^\circ\text{C}$  geschüttelt und anschließend auf LB-Platten, die mit entsprechenden Antibiotika supplementiert waren, ausplattiert und diese bei  $30^\circ\text{C}$  für 2 bis 3 Tage inkubiert.

#### **4.1.15 DNA-Isolation aus *A.thaliana*:**

##### **4.1.15.1 CTAB**

Über die CTAB-Methode (Rogers & Bendich, 1994) wurde genomische Pflanzen-DNA isoliert. Das Pflanzenmaterial (Blätter bzw. Keimlinge) wurde zunächst homogenisieren, indem die Proben in flüssigem Stickstoff abgekühlt und anschließend fein gemörsert wurden. Nach der Homogenisierung wurden  $300 \text{ }\mu\text{l}$  eines 2x CTAB-Puffers zugegeben und gut gemischt. Nach Inkubation bei  $65^\circ\text{C}$  für 1 h wurden die Proben auf Eis abgekühlt und  $300 \text{ }\mu\text{l}$  Chloroform zur Entfernung von Proteinen und Chlorophyllen aus der CTAB-Phase zugegeben, gevortext und 5 min lang abzentrifugiert. Die wässrige (obere) Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der genomischen DNA  $300 \text{ }\mu\text{l}$  Isopropanol ( $-20^\circ\text{C}$ ) zugegeben. Nach der 10-minütigen Fällung des CTAB-DNA-Komplexes wurde bei  $14000 \text{ rpm}$  für 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde nach erfolgter Zentrifugation abgenommen und das Pellet mit  $500 \text{ }\mu\text{l}$  80% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das DNA-Pellet bei RT für 30 min getrocknet und in  $50 \text{ }\mu\text{l}$  0,1x TE mit 0,05% RNase aufgenommen, 15 min bei  $37^\circ\text{C}$  suspendiert und nach Denaturierung der RNase bei  $65^\circ\text{C}$  zur PCR eingesetzt.

#### **4.1.15.2 Isolationskit (Biozym)**

Verwendet wurde das Phire plant direct PCR-Kit (Biozym). Das Phire Plant Direct PCR Kit wurde für eine DNA-Amplifikation direkt aus Pflanzenmaterial eingesetzt. Eine DNA-Extraktion/Isolierung ist nicht notwendig. Das Kit basiert auf der Phire Hot Start DNA-Polymerase (Biozym) und enthält die Reagenzien für die PCR, sowie Tools zur Probenentnahme. Es wurden vorgegebene Teile an Pflanzenmaterial ausgestanzt, diese direkt in PCR-Reaktionsgefäße überführt und die PCR mit Hilfe der im Kit enthaltenen Reagenzien und entsprechenden Primern angesetzt.

#### **4.1.16 Transformation von *A.thaliana* mittels *floral dipping***

Die Agrobakterien-vermittelte stabile Transformation von Arabidopsis-Pflanzen erfolgte unter Verwendung des Agrobakterienstammes C58 pGV3101 (Van Larebeke et al., 1974). Es wurde der binäre Vektor pCAMBIA 1301 mit bakteriellen Resistenzmarker gegen Kanamycin und dem pflanzlichen Resistenzmarker Hygromycin verwendet. Für die Transformation wurden Arabidopsis-Pflanzen (Ökotyp Columbia), deren Blüten gerade noch nicht geöffnet waren, verwendet. Die Transformation wurde nach der *Floral Dip*-Methode (Bechtold, 1993; Clough & Bent, 1998) durchgeführt. Die Agrobakterienstämme, welche das zu transformierende Plasmid mit Kanamycin-Resistenz trugen, wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika (neben Kanamycin auch Rifampicin und Gentamycin) angezogen (ca. 400 ml pro 3 zu transformierenden Pflanzen), bei 2500 rpm 15 min bei RT abzentrifugiert, und das Bakterienpellet in 400 ml einer 5% Saccharose-Lösung mit 0,05% (v/v) Silwet L-77 resuspendiert. Die Pflanzen wurden mit den Infloreszenzen kopfüber für 2 min in diese Lösung getaucht, schräg in eine Pflanzschale gestellt und für 24h abgedeckt, um eine möglichst hohe Luftfeuchtigkeit zu erzielen. Nach ausreichendem Gießen wurden die Pflanzen nach 24h ohne Licht weiter in Phytokammern gezogen. Die Prozedur wurde zweimal in einem Abstand von drei bis vier Tagen wiederholt. Positive Transformanden wurden in der nächsten Generation T1 bei einem Screen auf Hygromycin (50µg/ml)-MS-Platten isoliert.

#### 4.1.17 Transiente Transformation von Tabakpflanzen mit *A. tumefaciens*

2 ml einer Übernachtskultur, die aus einer Einzelkolonie der entsprechenden *A. tumefaciens*-Transformanten in YEB-Medium angesetzt wurde, wurde in 50 ml Induktions-Medium überimpft und bei 30°C und 300 rpm im Schüttler inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,8 erreicht wurde. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 3000 xg und RT für 10 min präzipitiert mit 10 ml Puffer A gewaschen, erneut abzentrifugiert und wiederum in 10 ml Puffer A resuspendiert. Im Anschluss wurde zu der Suspension 100 µM Acetosyringon zugegeben und eine OD<sub>600</sub> von 1,0 eingestellt. Es wurden zum einen ganze Tabakpflanzen für die Transfektion verwendet, die 20 min unter Vakuum (60-80 mbar) kopfüber in die Agrobakterien-Suspension eingebracht wurden und somit die Agrobakterien durch den anliegenden Unterdruck ins Gewebe gesogen wurden, zum anderen wurden nur die Blätter der Tabakpflanzen verwendet, in die eine Agrobakterien-Suspension mittels einer Spritze über die Blattunterseite direkt in das Gewebe gedrückt wurde. Nach erfolgter Transfektion wurden die Tabakpflanzen in Klarsichtfolie gepackt, um eine möglichst hohe Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten, und weiterkultiviert. Es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (24h, 48h, 72h, 96h) Proben entnommen. Hierzu wurde zu allen Zeitpunkten ein Stück eines infiltrierte Blattes mit identischer Größe ausgestanzt, ein Proteinextrakt aus diesen Blatt-Teilen hergestellt und dieser über 12,5% SDS-Page. Als negativ Kontrollen wurden Proben von nicht infizierten Pflanzen und von Pflanzen, die mit Agrobakterien infiltrierte wurden, die die entsprechenden leeren Vektoren enthielten, ebenso aufgearbeitet und über 12,5% SDS-PAGE analysiert. Zur Erstellung des Proteinextraktes wurden die Blattscheiben unter flüssigem Stickstoff eingefroren, mit einem Glaspistill zerrieben, anschließend mit 100 µl Puffer B homogenisiert und 5 min bei 95°C inkubiert.

##### YEB-Medium

15 g Peptone  
3 g Hefeextrakt  
6 g NaCl  
1 g Glucose

Mit 5M NaOH auf pH 7,4 einstellen autoklavieren,  
nach dem Autoklavieren Zugabe von 2 mM MgSO<sub>4</sub>

##### Induktions-Medium

15 g Peptone  
3 g Hefeextrakt  
6 g NaCl  
1 g Glucose  
5 g MES

Mit 5M HCl auf pH 5,6 einstellen autoklavieren,  
nach dem Autoklavieren Zugabe von 2 µM Acetosyringon und 2 mM MgSO<sub>4</sub>

#### Puffer A

10 mM MgSO<sub>4</sub>  
10 mM MES pH 5,5

#### Puffer B

125 mM Tris/HCl pH 6,8  
1 % SDS (w/v)  
10 % Glycerin (v/v)  
50 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

### **4.1.18 Aktivitätsassay mit dem fluorogenen Substrat Cbz-FR-AMC**

Die Bestimmung der proteolytischen Aktivität von rekombinant exprimierter AtDEG15 wurde mit dem fluorogenen Dipeptid Cbz-Phe-Arg-AMC (Sigma) analysiert. Diese fluorogene Peptid wurde gewählt, da es mit dem Arginin eine spezifische Spaltstelle vieler Serin- und Cystein-Proteasen aufweist (Morita et al, 1977). Wird durch eine proteolytische Spaltung das Donor-Akzeptor-Paar (AMC-Gruppe) entkoppelt, kommt es zur Emission von Strahlung der Wellenlänge 460 nm. Die Anregungswellenlänge der AMC-Gruppe liegt bei 360 nm. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte in einem Perkin-Elmer *platereader* (HTS 7000 Plus), der über das Programm HT soft 2.0 angesteuert wird, in schwarzen 96-well Microtiterplatten. Es wurden jeweils 20 µl Probe und 80 µl der 1:500 verdünnten Substrat-Stammlösung in die Microtiterplatte gegeben und diese 30 min bei 30°C inkubiert. Die Endkonzentration des fluorogenen Peptids betrug damit 1,6 nM. Die akkumulierte Fluoreszenz wurde in RFU/30 min angegeben.

#### Substrat-Stammlösung

10 mM Cbz-Phe-Arg\_AMC in DMF

#### Verwendeter Puffer für die Substrat-Verdünnung

50 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,5



## 4.2 Yeast Two-Hybrid Interaktionsscreen

Die Entwicklung des *Yeast Two-Hybrid* Systems (Fields & Song, 1989) basiert auf der Entdeckung des Aufbaus eukaryotischer Transkriptionsfaktoren (Sadowski et al., 1988). Diese Transkriptionsfaktoren (z.B. Gal4 aus Hefe) besitzen zwei räumlich und funktionell voneinander unabhängige Domänen mit verschiedenen Untereinheiten für DNA-Bindung bzw. Aktivierung eines Reporter-Genes (Hope & Struhl, 1986; Keegan et al., 1986; Ma & Ptashne, 1987). Für die Funktionalität des Transkriptionsfaktors müssen diese beiden Domänen nicht notwendigerweise kovalent miteinander verknüpft sein (Ma & Ptashne, 1988), was im *Yeast Two-Hybrid* System genutzt wird. Die codierenden Sequenzen der zu überprüfenden Proteine bzw. Interaktionspartner werden mit den Binde- bzw. Aktivierungsdomänen fusioniert. Kommt es zu einer Interaktion der beiden getesteten Proteine bedingt dies eine räumliche Annäherung der Bindungs- und der Aktivierungsdomäne, was zu einer Transkription des Reporter-Genes führt.

### 4.2.1 Verwendete Hefe-Stämme und ihre Kultivierung

Die Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* (Stamm AH109) erfolgte bei 30°C im Vollmedium (YPD-Medium) bzw. im Minimalmedium (MS-Medium) mit Glucose als Kohlenstoff-Quelle. Das Minimalmedium mit der entsprechenden Dropout-Lösung wurde dabei zur Selektion von Transformanten verwendet. Die Flüssigkulturen wurden bei 200 rpm im Schüttler inkubiert.

Stamm	Genotyp	Quelle
AH109	MATa, trp1-109, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ	(James et al., 1996) Matchmaker Clontech

### YPD-Medium

10 g/l Hefeextrakt

20 g/l Pepton

15 g/l Agar für festes Medium

pH 6,5

autoklavieren; nach dem Abkühlen Zugabe von steriler 2% Glucose

### SD-Medium

100 ml/l 10x Makrosalze

1 ml/l 1000x Mikrosalze

15 g/l Agar für festes Medium

auf einen pH-Wert von 5,8 einstellen

autoklavieren

Zugabe von 2% Glucose und

100 ml/l 10x *Dropout*-Lösung

(beides steril)

### 10x Makrosalze für SD-Medium

10 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

10,24 g/l  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

1 g/l NaCl

1 g/l  $\text{CaCl}_2$

50 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

autoklavieren

### 1000x Mikrosalze für SD-Medium

2 mg/l Biotin

400 mg/l Ca-Pantothersäure

20 mg/l Folsäure

2 g/l myc-Inositol

400 mg/l Nicotinsäure

200 mg/l p-Aminobenzoessäure

400 mg/l Pyridoxin-HCl

200 mg/l Riboflavin

400 mg/l Thiamin-HCl

500 mg/l Borsäure

40 mg/l  $\text{Cu}_2\text{SO}_4$

100 mg/l KI

200 mg/l  $\text{FeCl}_3$

400 mg/l  $\text{MnSO}_4$

200 mg/l Na-Molybdat

400 mg/l  $\text{ZnSO}_4$

sterilfiltrieren, Lagerung bei  $-20^\circ\text{C}$

### 10x Dropout-Lösung

200 mg/l L-Adenin-Hemisulfat

200 mg/l L-Arginin-HCl

300 mg/l L-Isoleucin

300 mg/l L-Lysin-HCl

200 mg/l L-Methionin

500 mg/l L-Phenylalanin

200 mg/l L-Threonin

200 mg/l L-Tyrosin

200 mg/l L-Uracil

1500 mg/l L-Valin

200 mg/l L-Histidin-HCl x  $\text{H}_2\text{O}$

1000 mg/l L-Leucin

200 mg/l L-Tryptophan

Je nach Selektion wurden entsprechende Aminosäuren L-Histidin, L-Leucin oder L-Tryptophan der Dropout-Lösung nicht zugesetzt.

#### 4.2.2 Minipräparation genomischer DNA aus Hefe

Für die Präparation von DNA aus Hefe wurden die Zellen einer 4 ml-ÜN-Kultur verwendet, die durch Zentrifugation für 5 min bei 3500 xg geerntet und mit 1 ml mQ gewaschen wurden. Das Pellet wurde in 500 µl Lysepuffer aufgenommen und mit drei Spatelspitzen Glasperlen 1,5 min gevortext und anschließend auf Eis inkubiert, bis sich die Glasperlen abgesetzt hatten. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 275 µl 7 M Ammoniumacetat (pH 7,0) versetzt, 5 min lang bei 65°C und danach 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl Chloroform, gründlichem Homogenisieren und einer Zentrifugation für 2 min bei 13000 xg wurde der Überstand erneut in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 1 ml Isopropanol gefällt. Die Präzipitation der DNA erfolgte durch Zentrifugation bei 13000 xg für 10 min und 4°C. Nach Waschen des Pellets mit 70% Ethanol wurde es bei RT getrocknet und in 50 µl mQ-Wasser aufgenommen.

##### Lysepuffer

100 mM Tris/HCl pH= 8,0

50 mM EDTA

1 % SDS

#### 4.2.3 Transformation von *S.cerevisiae* mit rekombinanter DNA

Die Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* erfolgte nach dem Protokoll der „*High efficiency LiAc transformation*“ (Gietz & Woods, 2002; Gietz & Woods, 2006). Für die Einzeltransformation wurden die Hefestämme zuerst 3 Tage auf SD-Platten mit entsprechender *Dropout*-Lösung bei 30°C kultiviert, dann zunächst eine 1 ml-ÜN-Kultur in YPD-Medium angezogen, die in eine 30 ml-ÜN-Kultur überimpft wurde. Von dieser Kultur wurden wiederum 15 ml in eine 200 ml-Kultur überimpft und diese bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bei 30°C und 200 rpm inkubiert. Die Zellen wurden in einem sterilen Zentrifugationsbechern bei 1000 xg für 5 min bei 4°C abzentrifugiert und das Pellet mit eiskaltem sterilem mQ-Wasser gewaschen. Im Anschluss wurde erneut bei 1000 xg für 5 min bei 4°C zentrifugiert und das Zellpellet in 100 mM Lithiumacetat aufgenommen. Die erhaltene Suspension wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei 2500 rpm erneut für 15 Sekunden zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in 100 mM Lithiumacetat aufgenommen, wobei eine Zellzahl von ca.  $2 \times 10^9$  pro ml eingestellt wurde. Diese Zellsuspension wurde dann in 50 µl-Aliquots aufgeteilt, erneut für 15 Sekunden bei 2500

rpm zentrifugiert, das restliche LiAc abgenommen und dieses erhaltene Zellpellet für die Transformation eingesetzt.

Die bei -20°C gelagerte *carrier*-DNA wurde für 5 min bei 95°C aufgekocht und auf Eis abgekühlt.

Für die Transformation wurden folgende Komponenten zum Zellpellet gegeben:

240 µl 50% PEG 4000 (w/v)  
36 µl 1 M Lithiumacetat  
10 µl Einzelstrang-DNA (*carrier*-DNA, Konzentration 10 µg/ml)  
x µl zu transformierende Plasmid-DNA (500 ng)  
74 - x µl mQ-Wasser

Es ergab sich somit ein Transformationsansatz von 360 µl.

Zunächst wurde der Überstand durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vermischt und anschließend das Zellpellet resuspendiert. Die Zellen wurden bei 42°C im Wasserbad 40 min lang inkubiert, danach abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 100 µl mQ-Wasser aufgenommen und auf entsprechende Selektionsplatten (SD-Medium) ausplattiert.

#### **Herstellung der *carrier*-DNA:**

Um die DNA aus Lachssperma (Sigma) zu lösen, wurde sie mit einer Konzentration von 10 mg/ml in 1x TE (pH=7,5) aufgenommen und ca. 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die DNA für zweimal 30 s bei 100% Leistung ultraschallbehandelt, bevor sie mit Phenol (pH 8,0, TE gesättigt), mit Phenol:Chloroform (1:1) und sechsmal mit Chloroform extrahiert wurde. Durch Zugabe von 0,1x Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH = 6,0) und Zugabe von 2,5x Volumen Ethanol (100%, eisgekühlt) wurde die DNA gefällt. Das erhaltene Pellet wurde mit 75% Ethanol gewaschen und bei RT getrocknet. In einem letzten Schritt wurde die DNA in dem Ausgangsvolumen an 1x TE aufgenommen und für 20 min in kochendem Wasser denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Die *carrier*-DNA wurde in Aliquots bei -20°C gelagert.

#### 4.2.4 Bestimmung der Interaktion im Yeast Two-Hybrid Interaktionsscreen

In dem verwendeten *yeast-two-hybrid*-System von Clontech besitzt das Genom des Hefestammes AH109 vier Gal4-empfindliche Reporter-Gene (siehe: verwendete Hefestämme 4.4.1.), aufgrund deren Expression eine Interaktion der untersuchten Proteine getestet werden kann. Es wurden in den nachfolgenden Versuchen jeweils zwei der Reporter-Gene auf ihre Transkription hin untersucht, zum einen das HIS3-Reportergen, zum anderen das lacZ-Reportergen.

##### 4.2.4.1 Selektion und Bestimmung des Wachstumsphänotyps („Tüpfeltest“)

Die Selektion auf positive Transformanden erfolgte zunächst über Selektivmedium (SD) ohne entsprechende Aminosäuren (-Leu für pGAD-Konstrukte und -Trp für pBridge-Konstrukte bzw. beide bei der zweiten Transformation der Hefezelle -Leu/-Trp). Der Transformationsansatz wurde ausplattiert und für drei Tage bei 30°C inkubiert.

Zum Test positiver Transformanden auf Interaktion der beiden eingebrachten Proteine wurde ein Test auf die Expression der -His-Resistenz durchgeführt, indem unterschiedliche Verdünnungen einer im Selektivmedium (-Leu/-Trp) angezogenen Kultur mit Wasser verdünnt und auf SD-Platten ohne Histidin aufgebracht wurden. Bei einer  $OD_{600}$  von 1 liegen  $2 \times 10^7$  Zellen in der Kultur vor. Für den Tüpfeltests wurden die Kulturen so verdünnt, dass pro Tropfen (50  $\mu$ l) der jeweiligen Verdünnungen  $10^1$ - $10^6$  Zellen enthalten waren und diese auf Platten aus gebracht, die entweder -Leu/-Trp zur Kontrolle bzw. -Leu/-Trp/-His zum Test auf Interaktion enthielten.

##### 4.2.4.2 $\beta$ -Galactosidase-Assay

Der  $\beta$ -Galactosidase-Assay zur Überprüfung positiver Interaktion zweier Proteine im *Yeast Two-Hybrid* Screen wurde mit einer Kultur der  $OD_{600}$  von ca. 0,6 (genau notiert) durchgeführt. Um diese zu erhalten wurde aus einer 2 ml-ÜN-Kultur in Selektionsmedium 1 ml in 4 ml YPD-Medium (Vollmedium) überimpft und diese bis zu der angegebenen  $OD_{600}$  kultiviert. 1 ml dieser Kultur wurde abzentrifugiert (10000 xg, 30 Sekunden), der Überstand entfernt und 500  $\mu$ l Z-Puffer zugegeben. Nach Vortexen und erneuter Zentrifugation wurde

das Zellpellet in 100 µl Z-Puffer resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei 37°C im Wasserbad wieder aufgetaut. Dieser Schritt des Einfrierens und des Auftauens wurde viermal wiederholt, um die Hefezellen aufzuschließen. Zu den Proben wurde 700 µl Z-Puffer mit 270 µl β-Mercaptoethanol pro 100 ml gegeben und ab Zugabe von 160 µl ONPG (frisch hergestellt, 4 mg/ml ONPG (o-Nitrophenol-β-D-Galactopyranosid) in Z-Puffer pH 7,0) die Zeit t gestoppt, bis bei einer Inkubation im 30°C warmen Wasserbad die Positivkontrollen und positive Transformanden gelb gefärbt waren (bis zu zwei Stunden). Nach erfolgter Inkubation wurden 400 µl 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung zugegeben, um die Reaktion zu stoppen. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 10000 xg für 10 min präzipitiert und der Überstand wurde zur Bestimmung der OD bei 420 nm eingesetzt. Unter Einbeziehung der Ausgangs-OD<sub>600</sub> und der Zeit, die die Proben inkubiert wurden, kann anhand dieser OD<sub>420</sub> die Interaktion der beiden getesteten Proteine qualitativ bestimmt werden.

#### **4.2.5 Transformation von *P. pastoris* mit rekombinanter DNA**

Eine 10 ml YPD-Kultur wurde mit einer Einzelkolonie des entsprechenden *P. pastoris*-Stammes angeimpft und über Nacht bei 28°C bei 300 rpm im Schüttler inkubiert. Die Zellen dieser Übernacht-Kultur wurden mit YPD auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1-0,2 eingestellt und die Kultur weiter bei 28°C und 300 rpm inkubiert bis sie eine OD<sub>600</sub> von 0,6-1,0 erreicht hatten. Die Kulturen wurden bei 500 xg und RT 5 min abzentrifugiert, in 10 ml Lösung I (EasyComp Transformations Kit Invitrogen) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Zellpellet in 1 ml Lösung I resuspendiert und 200 µl Aliquots für die Transformation eingesetzt bzw. in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Transformation wurden zu den kompetenten Pichia-Zellen 3 µg linearisierte DNA gegeben und 1 ml der PEG-Lösung II (EasyComp Transformations Kit Invitrogen) zugegeben und der Ansatz 30 sec gevortext. Der Transformationsansatz wurde für 1h bei 30°C im Wasserbad inkubiert, wobei die Reaktionsgefäße aller 10 min gevortext wurden, um ein Absetzen der Pichia-Zellen zu vermeiden. Im Anschluss erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad für 10 min. Zu jedem Ansatz wurde 1 ml YPD gegeben und 1 h bei 30°C und 300 rpm im Schüttler inkubiert, um eine Ausbildung der Zeocinresistenz zu gewähr-

leisten. Die Zellen wurden nach erfolgter Inkubation 5 min lang bei 5000 xg abzentrifugiert, in 100 µl Lösung III (EasyComp Transformations Kit Invitrogen) aufgenommen und auf 100 µg/ml YPD-Platten ausplattiert.

Stammlösung Zeocin:  
100 mg/ml in sterilem H<sub>2</sub>O

## 4.3 Proteinbiochemische Methoden

### 4.3.1 Ermittlung der Expressionsbedingungen für eine optimale Proteinausbeute in *E.coli*

Die Expression rekombinanter Proteine erfolgte nach Animpfen einer 25 ml-Hauptkultur mit 250 µl einer ÜN-Vorkultur die aus Einzelkolonien angesetzt wurde, das LB-Medium wurde jeweils mit den entsprechenden Antibiotika versetzt. Die Hauptkultur wurde bei 200 rpm und 37°C im Schüttler inkubiert. Nach dem eine OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,6 erreicht wurde, wurden die Kulturen mit (Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid) mit einer Endkonzentration von 0,1-1 mM IPTG induziert. Je nach verwendetem Konstrukt und *E.coli*-Stamm für die Expression wurde 2 h, 4 h, 6 h oder ÜN bei 37°C oder 18°C exprimiert. Die entnommenen Proben wurden nach der Expressionszeit auf Eis abgekühlt, um den Metabolismus der Bakterien ab zu stoppen und Protease-Reaktionen zu minimieren. Die Zellen wurden im Anschluss bei 4000 rpm und 4°C 20 min lang zentrifugiert und entweder frisch zur Lyse eingesetzt oder bei -80°C ÜN gelagert.

Zur Optimierung der Expressionsbedingungen wurden Faktoren wie Temperatur, Expressionsstamm, Medium-Zusammensetzung, IPTG-Konzentration und Dauer der Expression verändert. Es wurden jeweils Rohextrakte bzw. Pellets von 1 ml-Hauptkultur nach erfolgter Lyse mit Lysozym und einem DNase-Verdau über SDS-PAGE untersucht.

IPTG-Lösung:  
Stammlösung 1 M in mQ-Wasser

### **4.3.2 Proteinexpression in *E.coli***

Nachdem die optimalen Expressionsbedingungen für das jeweilige Konstrukt in einer 25ml Kultur ermittelt wurden, wurde eine 400ml Kultur des Proteins mit 2 ml einer ÜN-Vorkultur die aus Einzelkolonien angesetzt wurde angeimpft und nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,6 bei entsprechender Temperatur und mit der ermittelten IPTG-Konzentration induziert. Nach erfolgter Expression des Proteins wurden die Zellen ebenfalls auf Eis abgekühlt und 4000 rpm und 4°C 20 min lang zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Zellpellet resuspendiert, die Zellen lysiert, ein DNase-Verdau durchgeführt und die erhaltene Lösung zur Trennung der löslichen und unlöslichen Proteine bei 25.000 rpm und 4°C für 1h zentrifugiert.

### **4.3.3 Herstellung eines Proteinrohextrakts (*E.coli*)**

Für den Zellaufschluss wurde pro g Zellfrischgewicht 3 ml Lysepuffer verwendet, die sedimentierten Zellen wurden darin auf Eis resuspendiert und Lysozym auf eine Endkonzentration von 1 mg/ml zugesetzt. Nach einer Lyse von 30 min auf Eis wurden die Zellen per Ultraschall 6 x 10 s (5 Zyklen) aufgeschlossen und anschließend 1 h bei 25000 rpm und 4°C zentrifugiert, das erhaltene klare Lysat wurde weiter zur Aufreinigung verwendet.

### **4.3.4 Proteinexpression in *P. pastoris***

Für eine Hauptkultur wurden 25 ml MGYH-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 300 rpm und 28°C im Schüttler inkubiert, bis die Kulturen eine OD<sub>600</sub> von 2 bis 6 erreicht hatten. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 3000 rpm für 5 min geerntet, das Zellpellet in MMH-, BMMY oder BMMH-Medium resuspendiert und auf eine OD<sub>600</sub> von 1 eingestellt. Zu der Zellkultur wurde eine entsprechende Menge 100% MeOH gegeben, so dass eine Endkonzentration von 0,5% erreicht wurde. Nach 24 h Expression wurde diese MeOH-Zugabe wiederholt, um die Induktion fortzusetzen. Es wurden nach 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60 h je 1 ml Kultur abgenommen, die Zellen abzentrifugiert und sowohl die Zellen nach erfolgter Zellyse, als auch der Überstand über SDS-PAGE analysiert.



#### MGYH-Medium

1,34 % YNB  
1 % Glycerin  
4 x 10<sup>-5</sup> % Biotin  
0,004 % Histidin

#### BMMH-Medium

100 mM Natriumphosphat (pH 6)  
1,34 % YNB  
4 x 10<sup>-5</sup> % Biotin  
0,5% MeOH

#### MMH-Medium

1,34 % YNB  
4 x 10<sup>-5</sup> % Biotin  
0,5% MeOH

#### BMMY-Medium

1 % Hefeextrakt  
2 % Peptone  
100 mM Natriumphosphat (pH 6)  
1,34 % YNB  
4 x 10<sup>-5</sup> % Biotin  
0,5% MeOH

### **4.3.5 Herstellung eines Proteinrohextrakts (*P.pastoris*)**

Zu den Zellen, die nach erfolgter Expression abzentrifugiert wurden, wurde pro ml verwendeter Kultur 100 µl Aufschluss-Puffer und gewaschene Glasbeads zugegeben. Die Proben wurden 30 sec gevortext und anschließend 30 sec auf Eis inkubiert. Diese Schritte wurden insgesamt 8mal wiederholt. Nach erfolgtem Aufschluss der Zellen wurden die Proben bei 12000 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für die weiteren Analysen z.B. über SDS-PAGE eingesetzt.

#### Aufschluss-Puffer

50 mM Natriumphosphat (pH 7,4)  
1 mM PMSF (Phenyl-methyl-sulfonyl-Fluorid)  
1 mM EDTA  
5 % Glycerin

### **4.3.6 Herstellung eines Proteinrohextrakts (*N.tabacuum*)**

Für die Herstellung eines Proteinextraktes aus *N. tabacuum* wurden Blattscheiben mit einem Durchmesser von 1 cm aus den transfektionierten Tabakblättern ausgestanzt und diese unter flüssigem Stickstoff gemörsert. Zu dem Blattmaterial wurden 200 µl Aufschluss-Puffer gegeben und die Probe homogenisiert. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation bei 20000 rpm und 4°C für 30 min. Der Überstand wurde über SDS-PAGE analysiert bzw. für weitere Analysen verwendet.

#### Aufschluss-Puffer

125 mM Tris/HCl pH 6,8  
1 % SDS (w/v)  
10 % Glycerin (v/v)  
50 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

### **4.3.7 Aufreinigung von nativen Proteinen mittels His-Tag**

Zur Aufreinigung der rekombinanten 6x Histidin-markierten Proteine wurden gepackte Protino<sup>®</sup> Ni-TED 2000 Säulen der Firma Macherey-Nagel verwendet, die Aufreinigung beruht dabei auf dem Prinzip der Immobilisierten Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC). An der mit Ni<sup>2+</sup>-geladenen Silica-Säule erfolgt die Bindung des Proteins zwischen den Histidinen des durch Klonierung angehängten 6xHis-Tags und den Ni<sup>2+</sup>-Ionen über den Metall-Chelat-Bildner TED (Triscarboxymethylethylendiamin). TED besetzt fünf der sechs Koordinationsstellen der Ni<sup>2+</sup>-Ionen, eine ist damit frei für Proteinbindung über Stickstoffatome der Histidine.

Die Säulen wurden vor der Reinigung des Proteinextraktes mit 4 ml Equilibrierungspuffer behandelt. Nach der Equilibrierung erfolgte das Laden des Lysats und das Waschen der Säule mit 8 ml Waschpuffer. Im Anschluss wurde das gereinigte Protein mit 1,5 bis 3 ml Elutionspuffer von der Säule eluiert. Je nach Grad der Aufreinigung wurde dem Waschpuffer schon eine geringe Konzentrationen (5-50 mM) an Imidazol zugesetzt, um eine bessere Verdrängung unspezifischer Begleitproteine zu gewährleisten und damit eine bessere Aufreinigung des rekombinanten Proteins zu erhalten. Um eine Selbstdegradation der DEG15 bzw. eine Degradation durch andere *E.coli*-Proteasen zu vermeiden wurden alle Arbeitsschritte der Reinigung im Kühlraum und auf Eis durchgeführt.

### **4.3.8 Aufreinigung von denaturierter DEG15 mittels His-Tag**

Die Aufreinigung denaturierter Proteine über 6 x His-Tag erfolgte nach Solubilisierung der *inclusion bodies* in 6 M Guanidinium-Hydrochlorid bzw. in 8 M Harnstoff. Für die Aufreinigung wurden wie für die nativen Proteine gepackte Protino<sup>®</sup> Ni-TED 2000 Säulen der Firma Macherey-Nagel verwendet. Den in dem Kit enthaltenen Puffern wurde je nach verwendetem Solubilisierungs-Reagenz 6 M Guanidinium-Hydrochlorid bzw. in 8 M Harnstoff zugesetzt und diese Konzentration während der gesamten Reinigung beibehalten. Da

die Solubilisierungs-Reagenzien bei niedrigen Temperaturen ausfallen und die rekombinanten Proteine in diesem Fall denaturiert vorlagen wurde die Reinigung bei RT durchgeführt.

#### **4.3.9 Rückfaltungsexperimente mit denaturierter DEG15**

Da E.coli die AtDEG15 in großen Mengen denaturiert exprimierte, wurde versucht, die gewaschenen und solubiliesierten *inclusion bodies* zu renaturieren. Es wurden verschiedene Ansätze zur Renaturierung verfolgt.

##### **4.3.9.1 Rückfaltung des an Ni-TED-Matrix gebundenen Proteins**

Die denaturierte AtDEG15 wurde in 8M Harnstoff solubilisiert, wobei die erhaltene Endkonzentration an Protein in der Lösung 10 mg/ml betrug. Diese Proteinlösung wurde über eine FPLC-Anlage mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 1 ml/min auf eine Ni-NTA-His-Trap-Säule (GE Healthcare) geladen. Die gebundene DEG15 wurde zunächst mit einem Puffer A gewaschen, bis kein Protein mehr von der Säule gewaschen wurde, der Schreiber also wieder die Basislinie anzeigt. Im nächsten Schritt wurde das an die Säule gebundene Protein mit 25 ml Puffer B (ohne Harnstoff) gewaschen, was zu einer Rückfaltung der DEG15 führen sollte. Um dem Protein genügend Zeit zu geben, sich in seine korrekte native Konformation zu falten, wurde die Säule nach diesem Waschschrift über Nacht bei 10°C in dem Puffer B inkubiert und das geladene Protein am nächsten Tag mit 25 ml Puffer C von der Säule eluiert. Die Wasch- und Elutionsschritte wurden jeweils mit einer Flussrate von 1 ml/min durchgeführt. Alle Schritte der Reinigung wurden sowohl über SDS-PAGE analysiert, als auch mittels des Aktivitäts-Assays auf ihre proteolytische Aktivität hin untersucht.

##### Puffer A

8 M Harnstoff  
100 mM Tris HCl pH 7,5  
250 mM NaCl

##### PufferB

100 mM Tris HCl pH 7,5  
250 mM NaCl

##### Puffer C

100 mM Tris HCl pH 7,5  
250 mM NaCl  
500 mM Imidazol

#### 4.3.9.2 Rückfaltung durch schnelles Verdünnen

Die Proteinkonzentration der zur Renaturierung verwendeten, solubilisierten *inclusion bodies* wurde auf 10 mg/ml eingestellt (siehe 4.5.17.2.), wobei der Anteil an DEG15 am Gesamtprotein bei etwa 90% lag. Der Verdünnungsfaktor, der für die Rückfaltung gewählt wurde, lag bei 1/1000, so dass eine Protein-Endkonzentration von 10µg/ml nach dem Verdünnungsschritt vorlag. Dabei wurde die Proteinmenge nicht auf einmal, sondern in drei Schritten zugegeben, so dass der eigentliche Verdünnungsfaktor bei jeder Zugabe der DEG15 1/3000 betrug. Zwischen den einzelnen Proteinzugaben lag eine Inkubationszeit von 2h, um dem Protein ausreichend Zeit zu geben, seine native Konformation einzunehmen. Nach der letzten Proteinzugabe wurden die Ansätze über Nacht bei 10°C inkubiert.

Um einen geeigneten Renaturierungspuffer für die Rückfaltung der AtDEG15 zu finden, wurden verschiedenste Pufferreagenzien (MES, MOPS, HEPES, TRIS, Phosphat) in unterschiedlichen Konzentrationen und bei unterschiedlichen pH-Werten getestet. Darüber hinaus wurden diese Puffer mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen versetzt (NaCl, KCl), es wurden verschiedene Zusätze wie Arginin, Glutamin, Glycin, Glycerin, PEG-4000 in unterschiedlichen Konzentrationen sowie, verschiedene Redoxreagenzien wie DTT, TCEP, Glutathion (oxidiert und reduziert) und mögliche Co-Faktoren wie Ca-, Zn-, Mg-, Cu-, Mn-Ionen bzw. EDTA getestet. Eine genaue Auflistung der verwendeten Puffer findet sich im Anhang 5.4.

Die solubilisierten DEG15 *inclusion bodies* wurden in diesen Puffern verdünnt und nach erfolgter Inkubation wurden 20µl der Probe wie unter 4.3.17. auf ihre proteolytische Aktivität hin untersucht.

#### 4.3.9.3 Ermittlung der optimalen Pufferzusammensetzung über Algorithmus

Über einen genetischen Algorithmus der am Lehrstuhl Buchner (TU München) etabliert wird, wurden iterative Serien an Experimenten ermittelt, die im Laufe dieser Versuchsreihe durchgeführt wurden. Dabei generierte der Algorithmus für jedes Experiment eine Sammlung an experimentellen Bedingungen (Generation) in diesem speziellen Fall an unterschiedlichen Pufferzusammensetzungen, die praktisch getestet und ausgewertet wurden. Die erste Generation enthielt vom Algorithmus zufällig ausgewählte experimentelle Bedingungen, auf die in den weiteren Generationen die Prinzipien der Evolution (genetischer

Algorithmus) angewendet wurden. Der genetische Algorithmus wählte die besten Bedingungen mit der höchsten Wahrscheinlichkeit in jedem Experiment anhand der ermittelten proteolytischen Aktivität aus und veränderte diese mit Hilfe eines *mutation operators*, um neue, mit den alten Experimenten in Beziehung stehende Bedingungen zu ermitteln. Anschließend wurden diese neu ermittelten Bedingungen in einem nächsten parallelen Experiment getestet und wiederum die proteolytische Aktivität für die einzelnen vorhergesagten Experimente ermittelt. Dieser Prozess wurde wiederholt und bis zur 4. Generation an Experimenten durchgeführt.

Die Proteinkonzentration der zur Renaturierung verwendeten, solubilisierten *inclusion bodies* wurde wie unter 4.5.17.2. beschrieben bestimmt und auf eine Endkonzentration von 10 mg/ml eingestellt, wobei der Anteil an DEG15 am Gesamtprotein bei etwa bei 90% lag. Der Verdünnungsfaktor, der für die Rückfaltung gewählt wurde, lag bei 1/1000, so dass eine Protein-Endkonzentration von 10µg/ml nach dem Verdünnungsschritt vorlag. Das Volumen an verwendetem Rückfaltungspuffer war durch die Verwendung der 96-well-Titerplatten auf 1,5ml beschränkt. Es wurden 1,48 ml des jeweils getesteten vorhergesagten Puffers vorgelegt und auf 10°C temperiert. Im Anschluss wurden 1,5µl der AtDEG15-Lösung zugegeben und über Nacht bei 10°C inkubiert.

#### **4.3.10 Aufreinigung der DEG15 über Säulenchromatographie (DEAE, Hydroxyapatit)**

Die rekombinant exprimierte DEG15 wurde nach erfolgter Zelllyse und Abzentrifugation der unlöslichen Proteine mit einer Flussrate von 1 ml/min auf eine DEAE-Sepharose-Hightrap-Säule (GE-Healthcare) geladen. Nachdem die Säule beladen wurde, wurde ebenfalls mit einer Flussrate von 1 ml/min bis zum Erreichen der Basislinie mit Puffer A gewaschen. Anschließend wurde ein linearer Gradient von 0-250 mM NaCl in 250 ml Gesamtvolumen gefahren (Puffer A – Puffer B). Bei ca. 80 mM NaCl wurde die Konzentration beibehalten bis zur vollständigen Elution des dort detektierten Proteins. Nach erneutem Erreichen der Basislinie wurde der Gradient fortgesetzt. Eine Verschleppung des eluierten Proteins und eine Durchmischung mit anderen Proteinen sollte durch diese „Streckung“ des Gradienten vermieden werden. In einem letzten Reinigungsschritt wurde die Säule mit 25 ml Puffer C gewaschen und somit letzte, noch an die Säule gebundene Proteine eluiert. Es

wurden die Waschschritte und 5 ml Fraktionen des NaCl-Gradienten getrennt gesammelt und anschließend an die Reinigung über SDS-PAGE analysiert.

Puffer A

10 mM Tris HCl pH 7,5  
2 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

PufferB

10 mM Tris HCl pH 7,5  
250 mM NaCl  
2 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

Puffer C

10 mM Tris HCl pH 7,5  
1 M NaCl  
2 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

Für die Reinigung über eine Hydroxyapatid-Säule wurde eine 5 ml CHT II-Säule (Biorad) verwendet. Das Protein wurde vor der Reinigung über NAP25-Säulen (Pharmacia) in Puffer A umgepuffert und mit einer Flussrate von 5 ml/min auf die Säule geladen. Im Anschluss wurde mit 25 ml Puffer A gewaschen, bis die Basislinie wieder erreicht wurde. Die Elution der Proteine erfolgte über einen linearen Gradienten von 10-400 mM Kaliumphosphat in 30 ml Gesamtvolumen. Es wurden während der Elution wie auch bei der DEAE-Reinigung Fraktionen von 5 ml gesammelt und diese, sowie die Waschschritte im Anschluss an die Reinigung über SDS-PAGE analysiert.

Puffer A

10 mM Kaliumphosphat pH 7,2  
2 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

PufferB

400 mM Kaliumphosphat pH 7,2  
2 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

#### **4.3.11 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese**

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen aufgrund ihres Molekulargewichts wurde die Methode der diskontinuierlichen, denaturierenden Elektrophorese nach Laemmli (1970) verwendet. Die Gelelektrophorese wurde in Elektrophorese-Einheiten (Mini-Protean II, Bio-Rad) mit einem 15%-igen Trenngel und einem 4%-igen Sammelgel durchgeführt. Vor dem Probenauftrag auf das polymerisierte Gel wurde Laemmli-Ladepuffer zur

Probe gegeben und für 5 min bei 95°C erhitzt. Der Gellauf erfolgte im Sammelgel bei 80 V und im Trenngel bei 200 V und 60 mA. Für die native, nicht denaturierende Gelelektrophorese ohne SDS und DTT in Gel und Probe (Proben nicht erhitzt) wurde ein Laufpuffer ohne SDS verwendet, die Gelelektrophorese erfolgte wie oben beschrieben.

<b>Stammlösungen</b>	<b>15% Trenngel</b>	<b>12,5% Trenngel</b>	<b>4% Sammelgel</b>
Acrylamidlösung	10 ml	8,3 ml	1,7 ml
mQ-H <sub>2</sub> O	6 ml	7,7 ml	6,9 ml
Trenngelpuffer	3,72 ml		-
Sammelgelpuffer	-		1,25 ml
10% SDS (w/v)	200 µl		100 µl
TEMED	6,7 µl		5 µl
APS	200 µl		150 µl
Gesamtvolumen	20 ml (4 Gele)		10 ml (4 Gele)

Acrylamidlösung

30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid (w/v)

Sammelgelpuffer

1,5 M Tris/HCl (pH 6,8)

APS-Lösung - Radikalbildner

10% Ammoniumperoxodisulfat (w/v)

5x Laemmli-Probenpuffer

0,3 M Tris/HCl, pH 6,8

10 % SDS (w/v)

30 % Glycerol (v/v)

0,1 % Bromphenolblau (w/v)

100 mM DTT

Trenngelpuffer

2 M Tris/HCl (pH 8,8)

TEMED - Vernetzer

Unverdünntes Tetramethylethyldiamin

Elektrodenlaufpuffer (1x)

25 mM Tris

192 mM Glycin

0,1 % SDS (w/v)

Verwendete Größenstandards (MBI Fermentas)

PageRuler™ Prestained Protein Ladder

PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus

### 4.3.12 Coomassie-Färbung

Die SDS-PAGE-Gele wurden nach der Gelelektrophorese in die Färbelösung gegeben und über Nacht in der Lösung inkubiert. Die Färbelösung wurde anschließend durch Entfärbelösung ersetzt und unter Schütteln mit Papier (zur Aufnahme des Farbstoffs) so lange inkubiert, bis der Hintergrund der Gele entfärbt und die mit Coomassie angefärbten Proteinbanden deutlich zu erkennen waren. Eine Gellagerung in Entfärbelösung ist möglich.

#### Färbelösung

25 % Isopropanol (v/v)  
10 % Essigsäure (v/v)  
0,05 % Coomassie Brilliant Blue R250 (w/v)

#### Entfärbelösung

10 % Essigsäure (v/v)

### 4.3.13 Silberfärbung (Blum, 1987)

Die Gele wurden 60 min in einer Fixierlösung zur Proteinbandenfixierung inkubiert, danach wurde dreimal 20 min lang mit 50% Ethanol (v/v) gewaschen. Eine Vorbehandlung erfolgte für 1 min in einer Natriumthiosulfat-Lösung, welche dreimal für jeweils 20 s wieder auf die Gele gegeben und wieder abgeschüttet wurde. Danach erfolgt die Inkubation mit Silbernitrat für 20 min unter Schütteln. Nach dreimaligem Waschen mit dH<sub>2</sub>O für jeweils 20 s wurden die Proteinbanden mit Entwicklerlösung detektiert, wobei die Dauer der Entwicklung von der jeweiligen Probe und der aufgetragenen Proteinmenge abhängt. Die Detektion erfolgte bis Färbung der Proteinbanden deutlich zu sehen war (5 bis 20 min), die Farbreaktion wird mit Entfärbelösung abgestoppt, bis die CO<sub>2</sub>-Entwicklung abgeklungen ist. Eine Lagerung der Gele in der verwendeten Entfärbelösung ist möglich.

#### Fixierlösung

50 % Methanol (v/v)  
12 % Essigsäure (v/v)  
0,5 ml/l Formaldehyd (37%)

#### Vorbehandlung

0,2 g/l Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> x 5 H<sub>2</sub>O  
Färbelösung  
2 g/l AgNO<sub>3</sub>

#### Entwickler

60 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
4 mg/l Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> x 5 H<sub>2</sub>O  
0,5 ml/l Formaldehyd (37%)

#### Entfärbelösung

35 % Methanol (v/v)  
10 % Essigsäure (v/v)



#### 4.3.14 Western Blot

Für den *Western Blot* wurden die Proteine nach der SDS-PAGE auf eine Nitrocellulose-Membran (Whatman, Schleicher&Schuell, Protran, Deutschland) über das Tank-Blotverfahren (Tank Transfer System, Bio-Rad) transferiert. Die Membran und zwei Lagen Filterpapier (Whatman®) wurden auf die Größe des SDS-Gels zugeschnitten und in zur Equilibrierung in den Transferpuffer gelegt. Es wurden luftblasenfrei zuerst eine Lage Filterpapier, die Membran, das Gel und abschließend wieder eine Lage Filterpapier aufeinander gelegt. Die Membran und das Gel wurden in die Apparatur gespannt und diese mit Elektronentransferpuffer und einem Kühlakku gefüllt. Der Transfer der Proteine erfolgte für 1 h bei 25 V und 200 mA.

##### Elektrotransferpuffer

25 mM Tris/HCl  
192 mM Glycin  
20 % Methanol (v/v)  
pH 8,3

#### 4.3.15 Immunologische Detektion

Nach dem Transfer der zu detektierenden Proteine auf eine Nitrocellulosemembran wurde die Membran 1 h bei RT oder ÜN bei 4°C in der Blockierungslösung inkubiert, um unspezifische Bindestellen des primären Antikörpers auf der Membran abzusättigen. Anschließend wurde dreimal für je 10 min mit TBST-Puffer und dreimal für je 10 min mit TBS-Puffer gewaschen. Auf diesen Waschschrift erfolgte die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper, der für 1 h bei RT unter Schütteln zugegeben wurde. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 min mit 1x TBST- und dreimaligem Waschen für jeweils 10 min mit 1x TBS-Puffer wurde die Membran für 1 h mit sekundären Antikörper inkubiert, bevor sie abschließend dreimal 10 min mit 1x TBST- und dreimal für je 10 min mit TBS-Puffer gewaschen wurde. Nach diesem Waschschrift wurde die Membran für 5 min in AP-Puffer inkubiert um vor der Detektion den pH-Wert zu erhöhen. Die Detektion erfolgte im Dunkeln und ohne Schwenken der Membran durch Zugabe der Fäbelösung. Die Membran wurde so lange mit der Fäbelösung inkubiert, bis ein Signal auf der Membran zu sehen war bzw. bis sich eine leichte Hintergrundfärbung zeigte (10 min-ÜN). Die Farbreaktion wurde durch Waschen der Membran mit destilliertem Wasser abgestoppt.

#### 10 x TBS

1,5 M NaCl  
0,2 M Tris/HCl pH 7,5

#### TBST

1 x TBS  
0,05 % Tween 20 (w/v)

#### Blockierungslösung

3 % Milchpulver in 1xTBST (w/v), gefiltert

#### AP-Puffer

100 mM Tris HCl (pH 9,5)  
100 mM NaCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>

#### NBT-Stammlösung

50 mg/ml NBT in 70 % DMF

#### BCIP-Stammlösung

50 mg/ml BCIP in 100 % DMF

#### Färbelösung

160 µl NBT-Stammlösung  
100 µl BCIP-Stammlösung  
40 ml AP-Puffer

### 4.3.16 Verwendete Antikörper

Art	Hersteller	Verdünnung in 1x TBST
<b>Primäre Antikörper</b>		
α-DEG15-Peptid-AK	-	1:1000
α-DEG15-AK	-	1:2000
α-gMDH-AK	-	1:1000
6 x His-Tag-AK	Quiagen	1:10000
Ni-NTA-Konjugat	Quiagen	1:10000
<b>Sekundäre Antikörper</b>		
Goat anti-Rabbit, AP- Konjugat	Millipore	1:10000
Goat anti-Mouse, AP- Konjugat	Pierce	1:10000

### 4.3.17 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um die Anreicherung eines Proteins während der Reinigung zu bestimmen bzw. um eine definierte Proteinmenge für weitere Analysen einsetzen zu können, wurde die Proteinmenge an nativen Proteinen über einen Bradford-Assay, die von denaturierten Proteinen über einen 2-D-Quant-Kit (GE-Healthcare) bestimmt.

#### **4.3.17.1 Bradford**

Die Proteinkonzentrationsbestimmung nativer Proteine erfolgte über Bradford-Assay (Bio-Rad DC-Protein-Assay) nach den Angaben des Herstellers, eine Eichgerade wurde mit BSA-Lösungen der Konzentrationen 1-25 µg/ml erstellt und für die Berechnung der Proteinkonzentration herangezogen.

#### **4.3.17.2 2-D-Quant-Kit (GE-Healthcare)**

Die Proteinkonzentrationsbestimmung denaturierter Proteine erfolgte über das 2-D-Quant-Kit (GE-Healthcare) nach den Angaben des Herstellers, da die verwendeten Solubilisierungs-Reagenzien einen Bradford-Assay stören. Der Assay beruht dabei auf einer spezifischen Bindung von Kupfer-Ionen an die zuvor gefällten Proteine einer Lösung. Nach erfolgter Reaktion werden die nicht gebundenen Kupfer-Ionen durch Zugabe eines Färbereagenzes gemessen. Eine Eichgerade wurde durch Einsetzen unterschiedlicher Mengen einer BSA-Standard-Lösung der Konzentrationen 2 mg/ml erstellt und für die Berechnung der Proteinkonzentration herangezogen.

#### **4.3.18 Bestimmung der proteolytischen Aktivität**

Für die Bestimmung der Aktivität der AtDEG15 wurde das fluorogene Dipeptid Cbz-Phe-Arg-AMC (Sigma) verwendet. Dieses fluorogene Peptid ist ein Substrat für zahlreiche Serin- und Cystein-Peptidasen, die eine Arg-Spezifität besitzen. Durch die proteolytische Spaltung des Dipeptids werden der Donor und der Akzeptor der fluorogenen Gruppe entkoppelt. Die Anregungs- und Emissionswellenlänge der AMC-Gruppe liegen bei 360nm bzw. 460 nm. Für den Aktivitätstest wurden in schwarzen 96-well Microtiterplatten jeweils 20 µl Probe mit 80µl Substrat-Lösung versetzt und die Fluoreszenz nach 30 min Inkubationszeit mittels eines Perkin-Elmer Plattenreaders (HTS 7000 Plus) bestimmt.

Als negative Kontrolle wurden 20µl des Puffers eingesetzt, in dem sich das gemessene Protein befand. Als positive Kontrolle diente Trypsin, wobei die Konzentration so gewählt wurde, dass sie in etwa der eingesetzten Proben-Konzentration entsprach.

#### Substrat-Stammlösung

10mM Cbz-FR-AMC in DMF

#### Substrat-Verdünnung:

1:500 in 50 mM Tris HCl pH 7,5

#### Positive Kontrolle

Trypsin in 50 mM Tris HCl pH 7,5

## 4.4 Chemikalien und Geräte

### 4.4.1 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Blotapparatur	Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad
Feinwaage	Handy	Sartorius analytic
Gelelektrophorese-Netzteil	EPS 200/301/EV231	Pharmacia Biotech
Inkubatoren	WTB Brutschrank	Binder
	Thermoshake	Gerhardt,
	Thermoshake	Infors AG
Kippschüttler	RotoShake Genie	Scientific Industries
Magnetrührer	Stuart-VWR	Bibby
Mikroplattenleser	Synergy 2	Biotek
	HT-Soft 7000 Plus Bioassay Reader	Perkin Elmer
Mikrowelle	R-239W-A	Sharp
NanoDrop-Photometer	NanoPhotometer 7122 V1.4	Implen
PCR-Cycler	Piko thermo cycler	Biozym
pH-Meter	pH 526	WTW
Photometer	Ultrospec 2000 UV/Visible Spectrometer	Pharmacia Biotech
SDS-Gelelektrophorese-Apparatur	PerfectBlue Doppelgelsystem Twin ExW S	Peqlab
	Mini Protean 3 System	Bio-Rad
Sterilbank	Laminar Flow Workstation	Microflow
Schüttler	Orbit LS	Labnet
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf AG
Ultraschall	Sonopuls HD2070	Bandelin
Vakuumpumpe	Membran-VP	Vacuubrand
Vakuumzentrifuge	Vacuum Concentrator	Bachofer
	UNIVAPO 150 ECH	Univapo

Vortexer	MS1	IKA
Waage	BP 3100 S	Sartorius
Zentrifugen	Avanti J-25	Beckmann Coulter
	Typ 5810	Eppendorf AG
	Typ 5415C	Eppendorf AG
	Typ 5415R (Kühlzentrifuge)	Eppendorf AG
	Universal 16	Hettich
	Minifuge GL	Heraeus Christ

#### 4.4.2 Chemikalien

Es wurden für diese Arbeit Chemikalien der Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland), Carl Roth GmbH + Co KG (Karlsruhe, Deutschland) und J.T. Baker (Deventer, Holland) verwendet. Wurden Chemikalien oder Lösungsmittel anderer Firmen verwendet wurde dies explizit angegeben.

#### 4.4.3 Enzyme

Enzym	Firma
T4-DNA-Ligase	Promega
Restriktionsendonucleasen	MBI Fermentas, New England Biolabs
Taq Polymerase	MBI Fermentas
Phire Polymerase	Biozym
Phusion Polymerase	Biozym
High fidelity Taq	Roche
RNAse	Roth
DNase	Roth
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs

**Tabelle 2: Verwendete Enzyme für molekularbiologische und biochemische Methoden.**

#### 4.5 Oligonukleotide

Alle für diese Arbeit verwendeten Oligonucleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Die Primer wurden lyophilisiert geliefert und

nach den Angaben des Herstellers mit H<sub>2</sub>O bidest. auf eine Endkonzentration von 100 pM eingestellt. Die Lagerung der Oligonucleotide erfolgte bei -20°C.

Primer	Sequenz	Verwendung
<b>Klonierung für Expression rekombinanter DEG15</b>		
pET 28 se	CATATGGCTAGCGATGTGTCTAAAGTTGTCAGCTTTCCCGG	Klonierung DEG15 in pET28
pET 28 as	CGATCGATCAGTGAATTCTCATAAATTGCTAGGGATCAC	Klonierung DEG15 in pET28
pET 24 se	CGATCGATCAGTGAATTCAACTTGCTAGGGATCACAATC	Klonierung DEG15 in pET24
pET 24 as	CGATCGATCAGTGAATTCTAACTTGCTAGGGATCACATC	Klonierung DEG15 in pET24
<b>Klonierung der Deletionskonstrukte in pET28 bzw. pCAMBIA 1301</b>		
A	CGA.TCG.ATC. <u>GAATTC</u> .TGGAT.GTG.TCT.AAA.GTT.GTC.AGC	Klonierung DEG15_pET28
B	CGA.TCG.ATC. <u>GAATTC</u> .AGT.AGT.AGT.ATC.TCT.CAG.GAT.CCGG	Klonierung DEG15Δ1/3N_pET28
C	CGA.TCG.ATC. <u>GAATTC</u> .GTC.CCC.TTA.AGT.TTA.CTG.GGT.CAA.CC	Klonierung DEG15Δ2/3N_pET28
D	CGA.TCG.ATC. <u>GAATTC</u> .TGG.GCT.TCT.GGT.ATT.ATT.CTT.AAC.G	Klonierung DEG15ΔN_pET28
E	CA.CCT.CAG. <u>GAGCTC</u> .CTC.AAG.CAG.GTG.AGC.ATT.TG	Klonierung DEG15ΔLoop_pET28
F	CGA.TCG.ATC. <u>GAGCTC</u> .GGG.CAT.AGA.GAC.ATA.CGT.GTG.CG	Klonierung DEG15ΔLoop_pET28
G	CT.CAG.CTC.GAG.TCA.TAA.CTT.GCT.ACA.TGG.GAT.GCT. GAA.GTT.GAG.ATG.CGG	Klonierung DEG15ΔC_pET28
H	CCT.TAG.CTC.GAGTCA.TAA.CTT.GCT.AGG.GAT.CAC.ATC.ACG	Klonierung DEG15_pET28
Se-Primer	CGA.TCG.ATC. <u>AGATCT</u> .ATG.GGC.AGC.AGC.CAT.CAT.CAT.C	Klonierung DEG15_pCAMBIA 1301
As-PimerH	CCT.CAG.CACGTGCTCGAGTCATAA.CTT.GCT.AGG.GATC	Klonierung DEG15_pCAMBIA 1301
As-PromerG	CCT.CAG.CACGTGCTCGAGTCATAA.CTT.GCT.ACA.TGG	Klonierung DEG15ΔC_pCAMBIA 1301
CML3-Bd-DEG15 se	ACTGACCATGGACATGGATGTGTCTAAAG	Klonierung CML3-BD in _pCAMBIA 1301
CML3-Bd-DEG15_pCAMBIA as	TCAGTAGATCTAACTTTGGATCAGGGCC	Klonierung CML3-BD in _pCAMBIA 1301
<b>Klonierung für Y2H</b>		
Delet -1/3N se	TCG.ATC GAATTCAGTAGTAGTATCTCTC	Klonierung DEG15Δ1/3N_pBridge bzw. pGAD
Delet -2/3N se	TCG.ATC GAATTCGTCGCCCTTAAGTTTAC	Klonierung DEG15Δ2/3N_pBridge bzw. pGAD
Delet -N se	TCG.ATCGAATTCGCACAAGTGGCTATTG	Klonierung DEG15ΔN_pBridge bzw. pGAD
Delet -C se	AGCTAGGTCGACTCAGGTGCCAAGACTGC	Klonierung DEG15ΔC_pBridge bzw. pGAD
DEG15-25AS se	GCATC GAATTC ATG TTGAAGATGAGGAAGCATGC	Klonierung DEG15Δ25AS_pBridge bzw. pGAD
DEG15-50AS se	GCATC GAATTC ATG CCAAGAGATATTTTTTTGAG	Klonierung DEG15Δ50AS_pBridge bzw. pGAD
DEG15-75AS se	GCATC GAATTC ATG TTGACCGTTGCATCTGTTG	Klonierung DEG15Δ75AS_pBridge bzw. pGAD

DEG15-100AS se	GCATC GAATTC ATG GTGAAGCTTATCCGGGTGC	Klonierung DEG15Δ100AS_pBridge bzw. pGAD
Y2HCAMse	ACGTACGAATTCATGGATCAAGCGGAGC	Klonierung CML3_pBridge bzw. pGAD
Y2HCAMas	TGCATGGTCGACTCCTAAGGCGGC	Klonierung CML3_pBridge bzw. pGAD
Y2HDEG15se	ACGTACGAATTCATGGATGTGTCAAAG	Klonierung DEG15_pBridge bzw. pGAD
Y2HDEG15as	TGCATCGTCGACAGGGATCACATC	Klonierung DEG15_pBridge bzw. pGAD
<b>Klonierung pPICZ/ α</b>		
pPICZse	CTGAATAGCCACGTGGATGGATGTGTCTAAAGTTG	Klonierung DEG15_pPICZ
pPICZas_mitSKL	GACTTATCGTCTAGAAATAACTTGCTAGGGATCAC	Klonierung DEG15_pPICZ
pPICZas_ohneSKL	GACTTATCGTCTAGAAAAGGGATCACATCACGGG	Klonierung DEG15_pPICZ
<b>Klonierung pTRAKc (transiente Expression in Nicotiana tabacum)</b>		
pTRAKc se	ACTGTTTCATGATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGC	Klonierung DEG15_pTRAKc-AH
ahpTRAKc as	CTATAGCGGCCGCAGGGATCACATCACGGGAAAGC	Klonierung DEG15_pTRAKc-AH
<b>Test der AtDEG15-KO-Mutanten auf Homozygotie</b>		
At1g28320-spez1	GGCAATGTTTGACTCTTCTGTCC	DEG15 spez Primer
At1g28320-spez2	GGGGACTCCTAGAATAGCCATTCG	DEG15 spez Primer
FLAGrb	TCACGGTTGGGGTTTCTACAGGA	Transposonspez. Primer FLAG-Linie
FLAGlb	CGTGTGCCAGGTGCCACGGAATAGT	Transposonspez. Primer FLAG-Linie
LBb	GCGTGGACCGCTTGCTGCAAC	Transposonspez. Primer SALK-Linie
<b>Test-Primer</b>		
Seq.se	CGAATGGTCTATTCTAGGAGT	DEG15 spez Primer für Sequenzierung
Seq.as	TTGGCAGTAATAGGTTGGAG	DEG15 spez Primer für Sequenzierung
Act8 fw	TCAGCACTTCCAGCAGATG	Kontrollprimer RT-PCR
Act8 rv	CTGTGGACAATGCCTGGAC	Kontrollprimer RT-PCR

**Tabelle 3: Primerliste.** Aufgeführt sind die für diese Arbeit verwendeten Primer mit den jeweiligen Benennungen, ihren Sequenzen und ihrer Verwendung.

#### 4.6 *In silico*-Analysen

Verwendet Programme bzw. Internetplattformen	Resultat
www.arabidopsis.org	Ermittlung von Arabidopsis-DNA-Sequenzen
www.ncbi.nlm.nih.gov (BLAST)	Homologiesuche von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen
www.ncbi.nlm.nih.gov(Aligne), www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html, Clone Manager, BioEdit,	Vergleiche von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen
www.expasy.ch/tools/dna.html	Übersetzung einer Nukleotidsequenz in eine Aminosäuresequenz
www.toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred, www.predictprotein.org, searchlauncher.bcm.tmc.edu, www.rcsb.org,	Vorhersagen über Proteinstrukturen / Veröffentlichte Proteinstrukturen
www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/	Erstellen von Alignments
BioEdit 7.0.5.3.	Erstellen von Alignments
RasMol 2.7.5	Darstellung von Proteinstrukturen
Tree-puzzle-5.2	Phylogenetische Analyse
Tree-viewer X	Darstellung von Kladogrammen
rna.lundberg.gu.se/cutter2	Vorhersage eines Restriktionsverdaus

**Tabelle 4: Durchgeführte *in silico* Untersuchungen:** Im Zuge dieser Arbeit wurden eine Reihe von *in silico* Untersuchungen der AtDEG15 durchgeführt. Die hierfür verwendeten Programme bzw. Plattformen und die jeweilige Datenausgabe wurden in Tabelle 4 zusammengefasst.



# 5 Anhang

## 5.1 Alignment der DEG-Proteasen für die phylogenetischen Analyse

150

```
Ath_DEG15 -----
Aly_DEG15 -----
Rco_DEG15 -----
Sly_DEG15 -----
Pozr_DEG15 -----
Pozr_DEG15 -----
Glaa_DEG15 -----
Migu_DEG15 -----
Frpe_DEG15 -----
Maes_DEG15 -----
Vvi_DEG15a -----
Vvi_DEG15b -----
Sobi_DEG15 -----
Zema_DEG15 -----
Sait_DEG15 -----
Erdi_DEG15 -----
Fopa_DEG15 -----
Fopa_DEG15 -----
Didi_DEG15 -----
Dare_DEG15 -----
Brr1_DEG15 -----
Hsari580D1 -----
Ath_DEG15 -----
Ath_DEG2 -----
Ath_DEG3 -----
Ath_DEG4 -----
Ath_DEG5 -----
AthDEG6 -----
Ath_DEG7 -----
Ath_DEG8 -----
Ath_DEG9 -----
Ath_DEG10 -----
Ath_DEG11 -----
Ath_DEG12 -----
Ath_DEG13 -----
Ath_DEG14 -----
Ath_DEG16 -----
1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....100.....110.....120.....130.....140.....150
MGNLWVWVVEEGGERWALNRSQGLIHVDCERILRLGVEGIGLDRGAGQPRFCIPARTGGKILGGLLISALGVNMLAGLGGQFANGHRVDELGGFFLIGNFVGVALGKFKGCEKRVACILKCIKSSCHCCGGLRSGCILA
```

Ath_DEG15	-----MDVSKVYFGRNFAYLVVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHQ
Aly_DEG15	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHQ
Rco_DEG15	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHX
Sly_DEG15	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHQ
Potr_DEG15	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHQ
Cusa_DEG15	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHQ
Gima_DEG15	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHQ
Migu_DEG15	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHY
Fpe_DEG15	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHY
Maes_DEG15	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHY
Vvi_DEG15a	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHY
Vvi_DEG15b	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHY
Sobi_DEG15	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHY
Zema_DEG15	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHY
Orsa_DEG15	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHY
Seit_DEG15	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHY
Brdi_DEG15	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHY
Fupa_DEG15	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHY
Popa_DEG15	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHY
Didi_DEG15	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHY
Daze_DEG15	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHY
Brdi_DEG15	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHY
HsatYSND1	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHY
Mmu_DEG15	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHY
Ath_DEG1	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHY
Ath_DEG2	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHY
Ath_DEG3	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHY
Ath_DEG4	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHY
Ath_DEG5	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHY
AthDEG6	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHY
Ath_DEG7	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHY
Ath_DEG8	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHY
Ath_DEG9	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHY
Ath_DEG10	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHY
Ath_DEG11	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHY
Ath_DEG12	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHY
Ath_DEG13	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHY
Ath_DEG14	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHY
Ath_DEG16	-----MGPPTEVDFARNFAYVYVYVYVYVYVGEF-----DPKGLKURRH-----AFPHY
.....160.....170.....180.....190.....200.....210.....220.....230.....240.....250.....260.....270.....280.....290.....300	
37	-----DPKGLKURRH-----AFPHQ
37	-----DPKGLKURRH-----AFPHQ
37	-----DPKGLKURRH-----AFPHX
37	-----DPKGLKURRH-----AFPHQ
37	-----DPKGLKURRH-----AFPHQ
37	-----DPKGLKURRH-----AFPHQ
37	-----DPKGLKURRH-----AFPHQ
37	-----DPKGLKURRH-----AFPHY
37	-----DPKGLKURRH-----AFPHY
37	-----DPKGLKURRH-----AFPHY
37	-----DPKGLKURRH-----AFPHY
37	-----DPKGLKURRH-----AFPHY
37	-----DPKGLKURRH-----AFPHY
37	-----DPKGLKURRH-----AFPHY
37	-----DPKGLKURRH-----AFPHY
37	-----DPKGLKURRH-----AFPHY
37	-----DPKGLKURRH-----AFPHY
37	-----DPKGLKURRH-----AFPHY
37	-----DPKGLKURRH-----AFPHY
71	-----DPKGLKURRH-----AFPHY
256	-----DPKGLKURRH-----AFPHY
61	-----DPKGLKURRH-----AFPHY
82	-----DPKGLKURRH-----AFPHY
25	-----DPKGLKURRH-----AFPHY
25	-----DPKGLKURRH-----AFPHY
30	-----DPKGLKURRH-----AFPHY
30	-----DPKGLKURRH-----AFPHY
21	-----DPKGLKURRH-----AFPHY
24	-----DPKGLKURRH-----AFPHY
21	-----DPKGLKURRH-----AFPHY
14	-----DPKGLKURRH-----AFPHY
20	-----DPKGLKURRH-----AFPHY
123	-----DPKGLKURRH-----AFPHY
26	-----DPKGLKURRH-----AFPHY
38	-----DPKGLKURRH-----AFPHY
22	-----DPKGLKURRH-----AFPHY
28	-----DPKGLKURRH-----AFPHY
11	-----DPKGLKURRH-----AFPHY
25	-----DPKGLKURRH-----AFPHY















Ath\_DEC15 WGAITAGSHLLLEFSEVGRKASQMGSEVLVSKSD-----ASIPQVALEKEMSEVCLII-----VNDGVAACGIIIEHG-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Aly\_DEC15 WGAITAGSHLLLEFSEVGRKASQMGSEVLSKSD-----TIPQVALEKEMSEVCLII-----VNDGVAACGIIIEHG-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Rco\_DEC15 WGAITAGCDLLKPEQNAEETAIKNKNNAVEN-----AYSHESQPTIYKHEHNSICLPLEVEKMASICLII-----VNDGVAACGIIIEHG-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Sly\_DEC15 WEAITAGASQIQERQITG-RKHFNNMNIISWKK-----ESSNSIQDPTNYTQHEHLSIPPLEVEKMASICLII-----VNDGVAACGIIIEHG-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Fozr\_DEC15 WEAITAGASDILLKPEQNAEETAIKNKNNAVEN-----AYSSSDQPTIYKHEHNSICLPLEVEKMASICLII-----VNDGVAACGIIIEHG-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Cusa\_DEC15 WGAITAGSCLLIG-CHVGERINDKNC-GAVGNN-----AVNEQLEGGTSTQESGCRPPFFKAKASICLII-----MDECVWACVLLKDC-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Glna\_DEC15 WDAIVTASGLIKRQEQNTQKGCNQENIYAAGSV-----PESDTEKLDVGRNKHHEHNSICLPLEVEKMASICLII-----VNDGVAACGIIIEHG-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Mtsu\_DEC15 WEAVATASDILLQDDHIS--KKIDNNGNNTVGN-----FLADSHSNQPTIHIQEHYKTCSPSHLEVEKMASICLII-----MDECVWACVLLKDC-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Fysu\_DEC15 WEAITAGSCLLIG-CHVGERINDKNC-GAVGNN-----AVNEQLEGGTSTQESGCRPPFFKAKASICLII-----MDECVWACVLLKDC-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Maes\_DEC15 WEAITAGSCLLIG-CHVGERINDKNC-GAVGNN-----AVNEQLEGGTSTQESGCRPPFFKAKASICLII-----MDECVWACVLLKDC-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Vwi\_DEC15 WEAITAGCDLLQKQVONEGEMKINRGNNAVCK-----WLSGHSDQPTNSMHOQDPCSPPLLEKAKASICLII-----MDECVWACVLLKDC-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Vwi\_DEC15 WEAITAGCDLLQKQVONEGEMKINRGNNAVCK-----WLSGHSDQPTNSMHOQDPCSPPLLEKAKASICLII-----MDECVWACVLLKDC-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Sobi\_DEC15 WDAICWENSKKLEIETGAPRELKPKNTDCKSMEL-----RHGYWGFVSMVKNKINQICSPPLLEKAKASICLII-----MDECVWACVLLKDC-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Zema\_DEC15 WDAICWENSKKLEIETGAPRELKPKNTDCKSMEL-----RHGYWGFVSMVKNKINQICSPPLLEKAKASICLII-----MDECVWACVLLKDC-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Orea\_DEC15 WDAICWENSKKLEIETGAPRELKPKNTDCKSMEL-----RHGYWGFVSMVKNKINQICSPPLLEKAKASICLII-----MDECVWACVLLKDC-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Seit\_DEC15 WDAICWENSKKLEIETGAPRELKPKNTDCKSMEL-----RHGYWGFVSMVKNKINQICSPPLLEKAKASICLII-----MDECVWACVLLKDC-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Seit\_DEC15 WDAICWENSKKLEIETGAPRELKPKNTDCKSMEL-----RHGYWGFVSMVKNKINQICSPPLLEKAKASICLII-----MDECVWACVLLKDC-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Brpa\_DEC15 WDAICWENSKKLEIETGAPRELKPKNTDCKSMEL-----RHGYWGFVSMVKNKINQICSPPLLEKAKASICLII-----MDECVWACVLLKDC-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Brpa\_DEC15 WDAICWENSKKLEIETGAPRELKPKNTDCKSMEL-----RHGYWGFVSMVKNKINQICSPPLLEKAKASICLII-----MDECVWACVLLKDC-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Pupa\_DEC15 HFVAMHMLVMDVLLVFLQVGINVVICNKSQDYLAPASAMEVLSSEFTQCRPGIESHSTYQAMVYPAVERAVTQVLLII-----KFDKDCGVLISNG-----MILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Pupa\_DEC15 HFVAMHMLVMDVLLVFLQVGINVVICNKSQDYLAPASAMEVLSSEFTQCRPGIESHSTYQAMVYPAVERAVTQVLLII-----KFDKDCGVLISNG-----MILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Didi\_DEC15 LPHSTLFRQESQIYV-----KYLISN-----VLSLQQLQGLSLLRQKHNVII-----KFDKDCGVLISNG-----MILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Daze\_DEC15 CSFVHLKMLNMQTESIKETLQVSSOLVING-----SLQAPL-HANGSGLLEIFGVVLI-----ETGNSWCVLLKDC-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Daze\_DEC15 CSFVHLKMLNMQTESIKETLQVSSOLVING-----SLQAPL-HANGSGLLEIFGVVLI-----ETGNSWCVLLKDC-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 HsatsyND1 CSFHAVLDSLAHVP-----WFLPAA-----AVHSIQEPPHLSQVRESIVMI-----EAGEICGCVVHVDEKVLICRHWIG-SS-KVVMWCHQ-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Mmu\_DEC15 CAAPLQARWALARLHPGASISVLIPLPP-----CAAPLQARWALARLHPGASISVLIPLPP-----DVSPTGGLPDLGPPAAAVLI-----ECGTVWCGVVAAPR-----LVVA-CRHWAPREARLVVHSATEK-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Ath\_DEC1 SHFLDYERNKKGIFCLVLLQKINPAAR-----SCASSG-----VGSISFVTVGGIVDQVRFQ-----KVTGCKVYNSGDLVR-----DASKVIEKGVIVSFID-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Ath\_DEC2 RHFANARESGEDVFSINLYQKMDNQLR-----RDEKMSDKMMGLINKINPLA-----DVHKVKRDDIILAIID-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Ath\_DEC3 RHFANARESGEDVFSINLYQKMDNQLR-----RDEKMSDKMMGLINKINPLA-----DVHKVKRDDIILAIID-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Ath\_DEC4 RHFANARESGEDVFSINLYQKMDNQLR-----RDEKMSDKMMGLINKINPLA-----DVHKVKRDDIILAIID-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Ath\_DEC5 RHFANARESGEDVFSINLYQKMDNQLR-----RDEKMSDKMMGLINKINPLA-----DVHKVKRDDIILAIID-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 AthDEC6 RHFANARESGEDVFSINLYQKMDNQLR-----RDEKMSDKMMGLINKINPLA-----DVHKVKRDDIILAIID-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Ath\_DEC7 GQGNDFSEAKRQVDESDSIAANGSIYGEFFKSDAMEGLVLRDFEGATALCAN-----ASLAFAEPALVAVFVFPVPSCLDGVHSCHFHFCGLIIVHGSNMGAVVDRKNVAISA-DVMI-FAAFVFIPOFVVIHEV-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Ath\_DEC8 KQDDYFVEKLRHVMEITNIVGENDQN-----QGFVFPPLPPLPFPVPSCLDGVHSCHFHFCGLIIVHGSNMGAVVDRKNVAISA-DVMI-FAAFVFIPOFVVIHEV-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Ath\_DEC9 VHFQDYKHKDGFVLEIWKQWENPDLR-----VHFQDYKHKDGFVLEIWKQWENPDLR-----KSMGESHQGVRIARIFPA-----PESQVLESDIILSFIG-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Ath\_DEC10 RHFINGVEGKVFVLSGMSVSCVPMENGLR-----RHFINGVEGKVFVLSGMSVSCVPMENGLR-----SGQMSSEMGLVGVKINPLA-----DAHKILKRDIIILAIID-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Ath\_DEC11 RHFIVQESRQVSCFGLSDIYQIENVOIR-----RHFIVQESRQVSCFGLSDIYQIENVOIR-----NHFKSMEMGLINKINPSS-----GAKILKRDIIILAIID-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Ath\_DEC12 RHFIVQESRQVSCFGLSDIYQIENVOIR-----RHFIVQESRQVSCFGLSDIYQIENVOIR-----NHFKSMEMGLINKINPSS-----GAKILKRDIIILAIID-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Ath\_DEC13 RHFIVQESRQVSCFGLSDIYQIENVOIR-----RHFIVQESRQVSCFGLSDIYQIENVOIR-----NHFKSMEMGLINKINPSS-----GAKILKRDIIILAIID-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Ath\_DEC14 RHFIVQESRQVSCFGLSDIYQIENVOIR-----RHFIVQESRQVSCFGLSDIYQIENVOIR-----NHFKSMEMGLINKINPSS-----GAKILKRDIIILAIID-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE  
 Ath\_DEC16 RHFIVQESRQVSCFGLSDIYQIENVOIR-----RHFIVQESRQVSCFGLSDIYQIENVOIR-----NHFKSMEMGLINKINPSS-----GAKILKRDIIILAIID-----LILNHAHLEPWFCHGCVYGEYCGE-----FPPVIGAE









```

Ath DEC15 LQTL--QPSKLSIHWALMPELSEKTE-----CQIPNFKLKIKNKK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
Aly DEC15 LQTL--QPSKLSIHWALMPELSEKTE-----CQIPNFKLKIKNKK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
Rly DEC15 LQVH--KSNMQLSVWALMPELSEKES-----PQINLSEKLEKNNK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
Sly DEC15 LQVH--KSNMQLSVWALMPELSEKES-----PQINLSEKLEKNNK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
Pozl DEC15 LQVH--KSNMQLSVWALMPELSEKES-----PQINLSEKLEKNNK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
Cuma DEC15 LQVH--KSNMQLSVWALMPELSEKES-----PQINLSEKLEKNNK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
Migu DEC15 LQVH--KSNMQLSVWALMPELSEKES-----PQINLSEKLEKNNK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
Raps DEC15 LQVH--KSNMQLSVWALMPELSEKES-----PQINLSEKLEKNNK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
Mars DEC15 LQVH--KSNMQLSVWALMPELSEKES-----PQINLSEKLEKNNK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
Vv1 DEC15a LQVH--KSNMQLSVWALMPELSEKES-----PQINLSEKLEKNNK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
Vv1 DEC15b LQVH--KSNMQLSVWALMPELSEKES-----PQINLSEKLEKNNK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
Zema DEC15 LQVH--KSNMQLSVWALMPELSEKES-----PQINLSEKLEKNNK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
Ozta DEC15 LQVH--KSNMQLSVWALMPELSEKES-----PQINLSEKLEKNNK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
Seit DEC15 LQVH--KSNMQLSVWALMPELSEKES-----PQINLSEKLEKNNK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
Brcl DEC15 LQVH--KSNMQLSVWALMPELSEKES-----PQINLSEKLEKNNK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
Papa DEC15 LQVH--KSNMQLSVWALMPELSEKES-----PQINLSEKLEKNNK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
Fopa DEC15 LQVH--KSNMQLSVWALMPELSEKES-----PQINLSEKLEKNNK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
Digi DEC15 LQVH--KSNMQLSVWALMPELSEKES-----PQINLSEKLEKNNK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
Date DEC15 LQVH--KSNMQLSVWALMPELSEKES-----PQINLSEKLEKNNK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
Brl DEC15 LQVH--KSNMQLSVWALMPELSEKES-----PQINLSEKLEKNNK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
HsatsND1 LQVH--KSNMQLSVWALMPELSEKES-----PQINLSEKLEKNNK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
Mmu DEC15 LQVH--KSNMQLSVWALMPELSEKES-----PQINLSEKLEKNNK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
Ath DEC1 LQVH--KSNMQLSVWALMPELSEKES-----PQINLSEKLEKNNK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
Ath DEC2 LQVH--KSNMQLSVWALMPELSEKES-----PQINLSEKLEKNNK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
Ath DEC3 LQVH--KSNMQLSVWALMPELSEKES-----PQINLSEKLEKNNK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
Ath DEC4 LQVH--KSNMQLSVWALMPELSEKES-----PQINLSEKLEKNNK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
Ath DEC5 LQVH--KSNMQLSVWALMPELSEKES-----PQINLSEKLEKNNK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
Ath DEC6 LQVH--KSNMQLSVWALMPELSEKES-----PQINLSEKLEKNNK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
Ath DEC7 LQVH--KSNMQLSVWALMPELSEKES-----PQINLSEKLEKNNK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
Ath DEC8 LQVH--KSNMQLSVWALMPELSEKES-----PQINLSEKLEKNNK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
Ath DEC9 LQVH--KSNMQLSVWALMPELSEKES-----PQINLSEKLEKNNK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
Ath DEC10 LQVH--KSNMQLSVWALMPELSEKES-----PQINLSEKLEKNNK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
Ath DEC11 LQVH--KSNMQLSVWALMPELSEKES-----PQINLSEKLEKNNK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
Ath DEC12 LQVH--KSNMQLSVWALMPELSEKES-----PQINLSEKLEKNNK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
Ath DEC13 LQVH--KSNMQLSVWALMPELSEKES-----PQINLSEKLEKNNK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
Ath DEC14 LQVH--KSNMQLSVWALMPELSEKES-----PQINLSEKLEKNNK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
Ath DEC16 LQVH--KSNMQLSVWALMPELSEKES-----PQINLSEKLEKNNK--KPKSOPAFATIAFOMHWKPK-----KLGRVIFPSKI
.....1210.....1220.....1230.....1240.....1250.....1260.....1270.....1280.....1290.....1300.....1310.....1320.....1330.....1340.....1350

```

Ath_DEG15	709
Aly_DEG15	713
Rco_DEG15	729
Slv_DEG15	753
Fotr_DEG15	752
Cusa_DEG15	747
Gima_DEG15	794
Migu_DEG15	614
Fpep_DEG15	755
Maes_DEG15	756
Vvi_DEG15a	798
Vvi_DEG15b	682
Sobi_DEG15	717
Zema_DEG15	722
Orsa_DEG15	736
Seit_DEG15	722
Erdf_DEG15	760
Phpa_DEG15	1068
Fopa_DEG15	662
Didi_DEG15	849
Dare_DEG15	521
Erfl_DEG15	569
HsatySND1	566
Hmu_DEG15	568
Ath_DEG1	381
Ath_DEG2	607
Ath_DEG3	559
Ath_DEG4	436
Ath_DEG5	323
AthDEG6	219
AthDEG7	1097
Ath_DEG8	507
Ath_DEG9	592
Ath_DEG10	586
Ath_DEG11	555
Ath_DEG12	491
Ath_DEG13	410
Ath_DEG14	429
Ath_DEG16	198
	.....

Abbildung 38: Aligement DEG15 von Monokotyledonen, Dikotyledonen, Moos und Pilzen und den DEG-Proteasen aus *Arabidopsis thaliana*. Verwendete Organismen siehe Tabelle 1.

## 5.2 Alignment pflanzlicher DEG15

DEG15\_dicot\_monocot\_moos\_alle\_full\_length Manihot combined  
 CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

      1          14
Ath_DEG15_709aa -----
Aly_DEG15_713aa -----
Rco_DEG15_729aa -----
Mes_DEG15_756aa -----
Ptr_DEG15_752aa -----
Vvi_DEG15_798aa -----
Ppe_DEG15_755aa -----
Csa_DEG15_747aa -----
Gma_DEG15_794aa -----
Sly_DEG15_753aa -----
Mgu_DEG15_614aa -----
Ppa_DEG15_1068aa MGNIIVVVVVEEEGGERWATELNSTQLIHVDCERILRDLGVVEGGIGLDRQAGCAERRCTPA
Sbi_DEG15_717aa -----
Zma_DEG15_722aa -----
Sit_DEG15_722aa -----
OsJ_DEG15_736aa -----
Bdi_DEG15_698aa -----

Ath_DEG15_709aa -----
Aly_DEG15_713aa -----
Rco_DEG15_729aa -----
Mes_DEG15_756aa -----
Ptr_DEG15_752aa -----
Vvi_DEG15_798aa -----
Ppe_DEG15_755aa -----
Csa_DEG15_747aa -----
Gma_DEG15_794aa -----
Sly_DEG15_753aa -----
Mgu_DEG15_614aa -----
Ppa_DEG15_1068aa RTNGGKTIAGQCLLSALGVIWNLAGLSGCQFARGHRVDGLSGFFFLICNFEVGVALEGRKG
Sbi_DEG15_717aa -----
Zma_DEG15_722aa -----
Sit_DEG15_722aa -----
OsJ_DEG15_736aa -----
Bdi_DEG15_698aa -----

Ath_DEG15_709aa -----
Aly_DEG15_713aa -----
Rco_DEG15_729aa -----
Mes_DEG15_756aa -----
Ptr_DEG15_752aa -----
Vvi_DEG15_798aa -----
Ppe_DEG15_755aa -----
Csa_DEG15_747aa -----
Gma_DEG15_794aa -----
Sly_DEG15_753aa -----
Mgu_DEG15_614aa -----
Ppa_DEG15_1068aa DGEKKVAGILRGKRSCEGNCCGLKSSGIDARDRSSVLFPRVIAGDIFRGGCSTQLSLFAAY
Sbi_DEG15_717aa -----
Zma_DEG15_722aa -----
Sit_DEG15_722aa -----
OsJ_DEG15_736aa -----
Bdi_DEG15_698aa -----

```

```

Ath_DEG15_709aa -----MDVSKVVSFSRNF1AVLVKVEG8
Aly_DEG15_713aa -----MDVSKVVSFSRNF1AVLVKVEG8
Rco_DEG15_729aa -----MGFPETVNFARNFAVMVRVHG14
Mes_DEG15_756aa -----MAFPETVDFARNFAVMVRVQG
Ptr_DEG15_752aa -----MGLPEIVDFARNFAVMVRIQG
Vvi_DEG15_798aa -----MGLPEIVDFARNFAVMVRVQG
Ppe_DEG15_755aa -----MGLPEIVDFARNLAVMVRVKG
Csa_DEG15_747aa -----MAKREIVDHARNFAIMVRVQG
Gma_DEG15_794aa -----MVLSDAVNFARNFAVMVRVRG
Sly_DEG15_753aa -----MGLPEVVDVARNYAVMVRIQG
Mgu_DEG15_614aa -----MGLPEAADFARNFAVMVRVQG
Ppa_DEG15_1068aa QRLGIAIALIDTDSYCKESGRVIVVEVTITMIRRRSLTAMA1AKAAMD8AARLA14AVMVRVHG
Sbi_DEG15_717aa -----METQEIAAAARHFSAMARIVG
Zma_DEG15_722aa -----MEAQEIAAAARHFCAMVRIVG
Sit_DEG15_722aa -----METQEIAAAARYFAAMARIVG
OsJ_DEG15_736aa -----MAPREVAAAARGFSAMARIVG
Bdi_DEG15_698aa -----MEPREIAAAARSFSAMARIVG
* * * * *

```

```

Ath_DEG15_709aa P-----DPKGLKMRKHAFHQYHSGNATLSAS
Aly_DEG15_713aa P-----DPKGLKMRKHAFHQYHSGNATLSAS
Rco_DEG15_729aa P-----DPKGLKMRNHAFHLYASGKTTLSAS
Mes_DEG15_756aa P-----DPKGLKMRKHAFHQYNSGKTTLSAS
Ptr_DEG15_752aa P-----DPKGLKMRKHAFHQYNSGKTTLSAS
Vvi_DEG15_798aa P-----DPKGLKMRKHAFHHYHSGKTTLSAS
Ppe_DEG15_755aa P-----DPKGLKMRNHAFHHYSGTTTISAS
Csa_DEG15_747aa P-----DPKGLKMQKHAFHQYHSGRTTLSAS
Gma_DEG15_794aa P-----DPKGLKMRNHAFHQYRSGETTLSAS
Sly_DEG15_753aa P-----DPKGLKMRKHAFHLYNSGKTTLSAS
Mgu_DEG15_614aa P-----DPKGLKMRNHAFHHYNSGKTMLSAS
Ppa_DEG15_1068aa P-----DPKGRKMRRHAFHFSHSGDTTLSAS
Sbi_DEG15_717aa P-----DPKAVKMRRHAFHLLHSGSTTLSAS
Zma_DEG15_722aa P-----DPKAVKMRRHAFHSHSGSTTLSAS
Sit_DEG15_722aa P-----DPKAVKMRRHAFHLLHSGSTTLSAS
OsJ_DEG15_736aa P-----DPKAFKMRRHAFHLLHSGSTTLSAS
Bdi_DEG15_698aa EVSFLPTSSPLPLEVTSSEISRNSATLPLCFLQDPKAVKMRRHAFHLLHSGSTTLSAS
* * * * *

```

```

Ath_DEG15_709aa GILLPRDIFLSCGEVAAKVLFEAG----QDMALVLTVASVVEPFLTLGHR1TSS-----
Aly_DEG15_713aa GILFERNILSGCEVTAKVLFEAG----QEMALVLTVASVVEPFLTLGHR1TSS-----
Rco_DEG15_729aa GMILPDTLPHSGLVKQILGSNGLEG---QVLVLVVTVASVVESFLSLQ1QRE-----
Mes_DEG15_756aa GMLLENTFYEA1GLAKRILGSSCKEG---QALALVVTVASIVESFLSEN8QRD-----
Ptr_DEG15_752aa GLLL1PDTLYDADLANRILEG---KS---QGLGLVVTVASVIEPFLSSKH1RE-----
Vvi_DEG15_798aa GMLLEDTLSDISAACKHIHNSNDRN---S--MLVVSVASILEPFLSLQH1RE-----
Ppe_DEG15_755aa GMLLENTLYDS1DVAQQLFGGDSERS----PALVVTVASIVEPFLSLQH1RE-----
Csa_DEG15_747aa GMILPETLYDTRAAKHLGN---YKD---QFATLVLTVSSIFEPFMPLO1HRD-----
Gma_DEG15_794aa GVLVPDTL1CDSQVATRLN---GDNC---EDRVLVVTVASVVEPFLSP1QRD-----
Sly_DEG15_753aa GMLLPSSFVNGSVSEQIQGESKLQSI---GGHLLVLTVASVIEPFV1VQQDTS-----
Mgu_DEG15_614aa GTIFPASNFCN-----LES---SDTVLVLTAA1SVIEPFLQ1QYRE-----
Ppa_DEG15_1068aa GFLVPCVMNMKPGSTALQADLYETTSSEPSVVVITCASIVEPFLAPKSHG1ISSREVCV
Sbi_DEG15_717aa ALLLPRGALAEPPPLLDHICAVHGH---VAGDVALTAASLVEPFLVAEQ1RNNS-----
Zma_DEG15_722aa ALLLPRGALAEPPPLLDHICSAHGH---AAGDVALTAASLVEPFLVAEQ1RNNS-----
Sit_DEG15_722aa ALLLPRGALAEPPPLLDRI1CAVHGH---AAGDVALTAASLVEPFLVAEQ1RNND-----
OsJ_DEG15_736aa ALLLPPGSLAEPPP-LLDRI1CAAHG---HAGGVALTSASLVEPFLVEEQ1RNSP-----
Bdi_DEG15_698aa AVLLPPGALAEPPPLGRVCAAHG---HTGGVALTSASLVEPFLVAEQ1RDSA-----
* * * * *

```



```

Ath_DEG15_709aa -----MDVSKVVSFSRNFAVLVKVEG
Aly_DEG15_713aa -----MDVSKVVSFSRNFAVLVKVEG
Rco_DEG15_729aa -----MGFPETVNFARNFAMVVRVHG
Mes_DEG15_756aa -----MAFPETVDFARNFAMVVRVQG
Ptr_DEG15_752aa -----MGLPEIVDFARNFAMVRIQG
Vvi_DEG15_798aa -----MGLPEIVDFARNFAMVVRVQG
Ppe_DEG15_755aa -----MGLPEIVDFARNLAVMVRVKG
Csa_DEG15_747aa -----MAKREIVDHARNFAIMVVRVQG
Gma_DEG15_794aa -----MVLSDAVNFARNFAMVVRVHG
Sly_DEG15_753aa -----MGLPEVVDVARNYAVMVRVQG
Mgu_DEG15_614aa -----MGLPEAADFARNFAMVVRVQG
Ppa_DEG15_1068aa QRLGIAIALIDTDSYCKESGRVIVYEVTTIMIRRRSLTAMAAKAAMDAARLAAVMVVRVHG
Sbi_DEG15_717aa -----METQEIAAAARHFSAMARIVG
Zma_DEG15_722aa -----MEAQEIAAAARHFCAMVRIQG
Sit_DEG15_722aa -----METQEIAAAARYFAAMARIVG
OsJ_DEG15_736aa -----MAPREVAAAARGFSAMARIVG
Bdi_DEG15_698aa -----MEPREIAAAARSFSAMARIVG
* * * * *

```

```

Ath_DEG15_709aa P-----DPKGLKMRKHAFHQYHSGNATLSAS
Aly_DEG15_713aa P-----DPKGLKMRKHAFHQYHSGNATLSAS
Rco_DEG15_729aa P-----DPKGLKMRNHAFHLYASGKTTLSAS
Mes_DEG15_756aa P-----DPKGLKMRKHAFHQYNSGKTTLSAS
Ptr_DEG15_752aa P-----DPKGLKMRKHAFHQYNSGKTTLSAS
Vvi_DEG15_798aa P-----DPKGLKMRKHAFHHYHSGKTTLSAS
Ppe_DEG15_755aa P-----DPKGLKMRNHAFHHYHSGTTTISAS
Csa_DEG15_747aa P-----DPKGLKMQKHAFHQYHSGRTTLSAS
Gma_DEG15_794aa P-----DPKGLKMRNHAFHQYRSGETTLSAS
Sly_DEG15_753aa P-----DPKGLKMRKHAFHLYNSGKTTLSAS
Mgu_DEG15_614aa P-----DPKGLKMRNHAFHHYNSGKTTLSAS
Ppa_DEG15_1068aa P-----DPKGRKMRRHAFHSESGETTLSAS
Sbi_DEG15_717aa P-----DPKAVKMRRHAFHLHSGSTTLSAS
Zma_DEG15_722aa P-----DPKAVKMRRHAFHHSGETTLSAS
Sit_DEG15_722aa P-----DPKAVKMRRHAFHLHSGSTTLSAS
OsJ_DEG15_736aa P-----DPKAFKMRRHAFHLHSGSTTLSAS
Bdi_DEG15_698aa PVSFSLPTSSPLPLEVTTSSREISRNSATLPLCFLQDPAKAVKMRRHAFHLHSGSTTLSAS
* * * * *

```

```

Ath_DEG15_709aa GILLERDIFLSGEVAAKVLFEG-----QDMALVLTVASVVEPFLTLGHRTSS-----
Aly_DEG15_713aa GILFFRNILSGGEVTAKVLFEG-----QEMALVLTVASVVEPFLTLGHRTSS-----
Rco_DEG15_729aa GMILPDTLFSGLVKQILGSLGLEG-----QVLVLTVASVVEPFLSLQQRD-----
Mes_DEG15_756aa GMLLNTFYEAGLAKRILGSSCKEG-----QALALVVTVASIVESFSLNQRD-----
Ptr_DEG15_752aa GLLLPDTLYADLANRILEG---KS-----QGLGLVVTVASVIEPFLSSKHRE-----
Vvi_DEG15_798aa GMLLPTLSDISAACKHIHSNDRN---S---MLVVSVASILEPFLSLQHRE-----
Ppe_DEG15_755aa GMLLNTLYDSDVAQQLFGGDSERS-----PALVVTVASIVEPFLSLQHRE-----
Csa_DEG15_747aa GMILPETLYDTRAAKHLGN---YKD---QFATLVLTVSSIFEPMFLQHRD-----
Gma_DEG15_794aa GVLVPTLDCDSQVATRLN---GDNC---EDRVLVVTVASVVEPFLSPQQRD-----
Sly_DEG15_753aa GMLLPSSFVNGSVSEIQGSKLQSI---GCHLLVLTVASVIEPFFVQDQTS-----
Mgu_DEG15_614aa GTIFPASNFCN-----LES---SDTVLVLTAAASVIEPFLSQQYRE-----
Ppa_DEG15_1068aa GFLVPCVMNMKKPGSTALGQADLYETTSSEPSVVVITCASIVEPFLAPKSHGISREVCV
Sbi_DEG15_717aa ALLLPRGALAEPPPLLDHICAVHGH---VAGDVALTAASLVEPFLVAEQRNNS-----
Zma_DEG15_722aa ALLLPRGALAEPPPLLDHICSAHGH---AAGDVALTAASLVEPFLVAEQRNNS-----
Sit_DEG15_722aa ALLLPRGALAEPPPLLDHICVAHGH---AAGDVALTAASLVEPFLVAEQRGNP-----
OsJ_DEG15_736aa ALLLPPGSLAEPPP-LLDRICAAHG---HAGGVALTSASLVEPFLVBEQRNSP-----
Bdi_DEG15_698aa AVLLPPGALAEPPPLLRVCAAHG---HTGGVALTSASLVEPFLVAEQRDSA-----
* * * * *

```

Ath\_DEG15\_709aa SISQDPVKLI PGAMIEIMVEGQLKSEKE-----APFWVPAQLLSLVDVP-----  
Aly\_DEG15\_713aa SISQDPVKLI PGARIEIMVEGQLKSGEE-----APFWVPAQLLSLVDVP-----  
Rco\_DEG15\_729aa -----SMYQERWGMERVAEGSLDKGTSYWHRTARLIRLVDVA-----  
Mes\_DEG15\_756aa GISQGRPEIIPGAQIDVMLEEKLCLEERDAEGSLDKGASSWFTAELIRLVDIP-----  
Ptr\_DEG15\_752aa SISQSRPELIPGAQIDVMAEGKSDLRNGADGGLDKGTSHWLRAQVIRLVDVP-----  
Vvi\_DEG15\_798aa NISQGSHPELIHG----VQIDVMVEENNSEEIDKKAPHWLPVQLLALVDVP-----  
Ppe\_DEG15\_755aa GLTQGRPEQLIPGVQIDIMVEDEMRFHKDSE-DLDKGGPPCWFQAQLLMLIDVP-----  
Csa\_DEG15\_747aa KIHKGKPELIPGVQIDIMVEG-----ISRDSVSKTFHWHAAHLLALYDIP-----  
Gma\_DEG15\_794aa NIPQVGAARFRTYLIAGVQIDVMTEETNEKS--NRGTPCWLLAQLLSLVDIP-----  
Sly\_DEG15\_753aa DISKDKFKLIPGAQIDILREGGEIKLQNDLKESKSEG-LNWLPAELLRVVDIP-----  
Mgu\_DEG15\_614aa NPSKDKFRLVPGVQIDILME-----DKSMDGNMEA-LPWLSAELLKMVNIIP-----  
Ppa\_DEG15\_1068aa VPEKDFPKLIRGAEVDILVEVFDLSEK-GSGYSGEHVCWLPQQLLAVVDVP-----  
Sbi\_DEG15\_717aa -GEELQFRLVPEVRLDVLVEGGS---AQDG---KSGPPRWLPARLLAMVDVP-----  
Zma\_DEG15\_722aa -GEELQFRLVPETRLDFVVEYELG-NAQDG---KSGPPRWLPARLLAMVDVP-----  
Sit\_DEG15\_722aa -GEEFRRLVPEARLDVLVEHETLGNTRDG---KSGPPQWLSARLLAMVDVP-----  
OsJ\_DEG15\_736aa -SQELQFRLVPEAHLVDLVEHEESRNIGGG---KTGAPRWLSARLLAILYFSQDSTVGL  
Bdi\_DEG15\_698aa -SEELQFRLLPETCLDVLVEHEELGNIIDG---DSGAPQWLSAQLLAMVDVAAS-----

\* .:. : ..

Ath\_DEG15\_709aa -----VSSAALQSLIEASSGSKDSGWDIGWSLVSAANGSQPSINIEHYSKP-----  
Aly\_DEG15\_713aa -----VSSAALQSLIEASSGSKDSGWDVIGWSLVSAANGSQPSTKIEHYSKP-----  
Rco\_DEG15\_729aa -----ESSLALQSLVESSLGSLDHGWEIGWSLASHDNCHRNSMDVIQTQVS-----  
Mes\_DEG15\_756aa -----LSSLAVQSLIESSSGLDHCWEVIGWSLASYDSGPRNFMGVTTQTQIE-----  
Ptr\_DEG15\_752aa -----LSSLALQSLVEASSGSMNHGWEVIGWSLASPENGSQSFMDVVQTQTE-----  
Vvi\_DEG15\_798aa -----AFSLAVQSIIEASSGSREQGWDVIGWSLASYTGDSHTLVDAIQTQLTGIFVKLK  
Ppe\_DEG15\_755aa -----ASAVALQSVIEEASLSSPDHCWEVIGWSLASHGNAPQTORFFVNLDLDCS-----  
Csa\_DEG15\_747aa -----TSATALQSVMDASIDSLHQRWEVIGWSLASYTNGSPSFRDRLRGQIEN-----  
Gma\_DEG15\_794aa -----ASSNCLQSLIEASLGLPEHEWESTRQSGPMRCSCFKCKGCFCEGSGGMLFIKL  
Sly\_DEG15\_753aa -----VSSAAVQSLIEGSSSIEHGWEVIGWSLAAYGNAHQSFINTKRRQVEQ-----  
Mgu\_DEG15\_614aa -----QSSAAVQSLIEASCGSLENSWEVIGWSLASHSRGPQNVLECSR-----  
Ppa\_DEG15\_1068aa -----AAGAAALQDLLDVHGGSVKGVWEVIGWALAPVEDNAQQLHSLLTSEILTETQLQE  
Sbi\_DEG15\_717aa -----TAADSALSLLR-HEEFIRRPDWDVIGWSLADANQKQVENDTR--CSLKS-----  
Zma\_DEG15\_722aa -----TAAVSALSLLRHDSFIRRPDWDVIGWSLADANQKQVSLFIESKSSLES-----  
Sit\_DEG15\_722aa -----TAADSVLSLKHDSFICRPSWDVIGWSLANVNEKQVENDIR--SSPAS-----  
OsJ\_DEG15\_736aa LVVDVQASADSVLSLLQHEGSLIRSSSWDVCWSLADVNQKQVDNDAR--YSLEC-----  
Bdi\_DEG15\_698aa -----AESILSLLTHDGSVFCSSSWDVGWPLADVNQKQVENCVR--SSLES-----  
.: . : \*:

Ath\_DEG15\_709aa -----LMQLDEPHNANFMAK  
Aly\_DEG15\_713aa -----LMQLDEPLNANFMAK  
Rco\_DEG15\_729aa -----KAQVCGESGNPTLVSK  
Mes\_DEG15\_756aa -----DGNISFIEGQRHLGCGESGNTSLMSK  
Ptr\_DEG15\_752aa -----HGNASIAESQRRARE-ESSNPSIMCK  
Vvi\_DEG15\_798aa AEADCLDFLDGF--RFSSGLKISLVYVEHQLEVDCAKSSIEGQRHFMVGDSSHPSLMGK  
Ppe\_DEG15\_755aa -----TSSVMNQVDSAVGQLGNSSLTGK  
Csa\_DEG15\_747aa -----EKRTSVCSQKFLDLEGSSKNND  
Gma\_DEG15\_794aa LFMGLYLMIHAFCKVVSRTKTLIVIMKDWLREDLAVQVLCNTNHLLEWQFLVFLYLSGYFLF  
Sly\_DEG15\_753aa -----MSFPQSQTPTVEAQSSLPVIGT  
Mgu\_DEG15\_614aa  
Ppa\_DEG15\_1068aa DVASQHDLKGDK-----RPVAHAVAGVSRGMAAAAATKIAVLSVCGSHGDSSALNTC  
Sbi\_DEG15\_717aa -----NRNNASIESVDPLMLSK  
Zma\_DEG15\_722aa -----NRNNSLESVDSLMLAK  
Sit\_DEG15\_722aa -----NRNHASVESMDPLMLAK  
OsJ\_DEG15\_736aa -----NRKNAYAESTEPPMLAK  
Bdi\_DEG15\_698aa -----NRKNAYAESIEPMLAK

Ath\_DEG15\_709aa SATRMAILGVPLSLLGQ-PSMNFASSSSKGD TLVALGSPFGILSPVNFNFSVSTGSIANS  
Aly\_DEG15\_713aa SATRMALLGVPLSLLGQ-PNMKFASSSSKGD TLVALGSPFGILSPVNFNFSVSTGSIANC  
Rco\_DEG15\_729aa TSTRIALLGVSLN-LKDLPIITISPSIIRGDSLLTVGSPFGVLSPVHFFNLSMGSVANC  
Mes\_DEG15\_756aa KTTRIAILGVFLS-LKVLNIEIPSSRRGVSLAVGSPFGVLSPVHFFNLSVGSIANC  
Ptr\_DEG15\_752aa STTRVAILGVFLH-LKDLNFEISASSRRGDFLLAVGSPFGVLSPVHFFNLSVGSIANC  
Vvi\_DEG15\_798aa STARIALLGVSSINSKDLNIAISPSNKRGDLLAMGSPFGVLSPVHFFNLSVGSIANC  
Ppe\_DEG15\_755aa STTRIAILGVSLIS-KDVNITISSTKKGDFLVAVGSPFGVLSPVHFFNLSMGSISNC  
Csa\_DEG15\_747aa LTIRIAILGVPSLS-KDMPNISISPSRQRGSFLLAVGSPFGVLSPVHFFNLSVGSISNC  
Gma\_DEG15\_794aa LFILFSLLGFLQLTVIDLLDSKVSAMNKRGD FLLAVGSPFGVLSPMHFFNLSVGSIANC  
Sly\_DEG15\_753aa STTRIALLRVPSNPYEDPPLKVPSPWSRRGDLLAMGSPFGILSPSHFFNLSVGTIANS  
Mgu\_DEG15\_614aa -----AQDQVEQSKSYGPI SDKNCPASNSFQIFLEFSEYFGGVSWQHLS-----  
Ppa\_DEG15\_1068aa LKKRHQLSKVSNGLSKMPTGHVIAEQKRRGDSLIAVGSPPFGALSPLHFQNSVSVGIVSNL  
Sbi\_DEG15\_717aa SATRIAAILGISTFNNDARCINVSVMQQRGDP LLIVGSPFGLMSPHFFNLSVGSIVANC  
Zma\_DEG15\_722aa SATRIAAILGISTSNLNDARRINVSVMQQRGDP LLIVGSPFGLMSPHFFNLSVGSIVANC  
Sit\_DEG15\_722aa SATRIAAILGISTVNSNNERQIDVSVMQHRGDP LLIAGSPFGLLSPHFFNLSVGSIVANF  
OsJ\_DEG15\_736aa SATRIAAILGVSNLNSNTRCINVSVMQQRGDSLLIMGSPFGILSPVHFFNLSVGSIVANC  
Bdi\_DEG15\_698aa SATRIAAILGVSSLTSSNEIHINVSAPQRGDSLLVVGSPFGILSPHFFNLSVGSIVANC

. :: .. \*\* :\* ::

Ath\_DEG15\_709aa YPSGSLKKS LMIADVRCLPGMEGAPVFAKNCHLIGILIRPLRQKNSGVEIQLVVPWGAIT  
Aly\_DEG15\_713aa YPSGSLKKS LMIADVRCLPGMEGAPVFDKNGHLIGILIRPLRQKNSGVEIQLVVPWGAIT  
Rco\_DEG15\_729aa YPARSSNVSLVMADIRCLPGMEGAPAFEGCDFIGILTRPLRQKSTGAEIQLVIPWEAIA  
Mes\_DEG15\_756aa YPARSSNVSLLMADIRCLPGMEGPPVFGDNAHFIGILIRPLRQKSSGAEIQLVIPWEAIA  
Ptr\_DEG15\_752aa YPPRSSDISLLMADIRCLPGMEGSPVFCENSNFIGILIRPLRQKSSGAEIQLVIPWEAIA  
Vvi\_DEG15\_798aa YTPSPSRSSLLMADIRCLPGMEGPPVFNEHAQLIGILTRPLRQKTGGAEIQLVIPWEAIA  
Ppe\_DEG15\_755aa YPPNSTYSSLLMADIRCLPGEGGPPVNEHAQLIGILIRPLRQKTSGAEIQLVIPWEAIA  
Csa\_DEG15\_747aa YPPSSLSKSLLMADMRCCLPGMEGCPVDFEKARLIGVLRPLRVHMYTGAIEQLLIPWGAI  
Gma\_DEG15\_794aa YPPHSSDGLLMADIRCLPGMEGSPVFEHAELIGVLRPLRQKAYGAEIQLVIPWDIAIV  
Sly\_DEG15\_753aa YPPNSLNLKALLIADIRCLPGMEGSPVLEHAELIGVLSRPLRQKATAAEIQVMVIPWEAIT  
Mgu\_DEG15\_614aa -----TKCLPGMEGSPVFEHARFIGLLTRPLRQKVSGETEVQMVIPWEAVA  
Ppa\_DEG15\_1068aa WPPTRGPPSLLMADVRCLPGMEGPPVDFERNLGVMLTRPLRQKGGAAEVQLLTQDVTHF  
Sbi\_DEG15\_717aa LPPCTVRSSLLMADIHCLPGMEGAPVFDNRNSCLVGLLMNPLRQKGSNIEVQLVITWDAIC  
Zma\_DEG15\_722aa LPPCTARSSLLMADMHCLPGMEGAPVFDQNSCLVGLLMNPLTQKGSNIEVQLVITWDAIC  
Sit\_DEG15\_722aa LPPCAVRCSSLLMADIQCLPGMEGAPVFDNRNSCLVGLLMNPLRQKGSSEVQLVITWDAIC  
OsJ\_DEG15\_736aa LPPCTARSSLLMADVHCLPGMEGAPVFDKNSCLVGLMLKPLRQKGSSTEVQLVITWDAIC  
Bdi\_DEG15\_698aa LPPGAVRSSLLMADIHCLPGMEGAPVFDKNSCLVGLMLKPLRQKGSISIQVQLVITWDGIC

:\*\*\*\* \*\* \*.: . :\*: \* .\*: : :\*::

Ath\_DEG15\_709aa TACSHLLLEEPSVEGK-----ASQWGESEVLSVKSDASIP-----  
Aly\_DEG15\_713aa TACSHLLLEEPSEAGK-----ASKWGESEALNVKSDTSIP-----  
Rco\_DEG15\_729aa TACGDLLEKPEQNAEE-----GIAINKENLNVAENAYSHE---SDG  
Mes\_DEG15\_756aa TACSDLLLEKPEQNAEK-----GTHINKENLNVAENAYSHE---SDG  
Ptr\_DEG15\_752aa LACSDLLLEKPEQNAEK-----GIHINKENLNVAENAYSSS---SDG  
Vvi\_DEG15\_798aa TACCDLLQKEVQNEGE-----MKHYNRGNLNAVGGKYLFSGHDSDG  
Ppe\_DEG15\_755aa TACSDLLQKEPRYA EK-----GIYDKRNLNAVGGKFLADSHDSNG  
Csa\_DEG15\_747aa TACSGLLLG-TCNVGE-----RIDNDNRICGAVGNMAVNKEQKLEG  
Gma\_DEG15\_794aa TASSGLLHKRPQNTQK-----GLCNQENLYAAGSVFSDTDKLDV  
Sly\_DEG15\_753aa SACASYLQEERQ-TGR-----KIHFNNGNLISVKKESSNS-IQDG  
Mgu\_DEG15\_614aa SACSDLLQDDLH-S-K-----KIDYNNGNLNTVGNMLSKDR-ILP-  
Ppa\_DEG15\_1068aa VANMHMQLVMTTDLVLLPVLQRVGINVGVLCNTKSPDVQLQPSASAMLVENSFETOFCRF  
Sbi\_DEG15\_717aa MEWNSKKLDEIGRAPR-----ELPNGKNTDSKSMELRHGVNYGR  
Zma\_DEG15\_722aa TEWNSKKLEIEIERPFR-----KLPNDKNTDSKSMELRHVYNYVR  
Sit\_DEG15\_722aa TGWNMMLKVEIEREPPS-----KLPNDKNEESKMMELKHPDNYGR  
OsJ\_DEG15\_736aa NAWNSDKLERIGHPPS-----ELVDDKSSDCKYKESCVADKHRR  
Bdi\_DEG15\_698aa TAWSSNKLEGIEQASN-----DLDDKNADSKMVEESCAMDNYRR



Ath\_DEG15\_709aa -----AQAIEKAMESVCLITVNDGVWASGIILNEHGLILTNA LLEPWRY  
Aly\_DEG15\_713aa -----AQAIEKAMESVCLITVNDGVWASGIILNEHGLILTNA LLEPWRY  
Rco\_DEG15\_729aa PFSYKYEHFNSHCSSSTLPVEKVMASVCLITIDEIGI WASGVLLNDQGLVLTNA LLEPWRF  
Mes\_DEG15\_756aa PLCFEYEPKTYCPSSLPVKVKASVCLITIDEIGI WASGVLLNDRGLILTNA LLEPWRF  
Ptr\_DEG15\_752aa PFLKHEHHISYCSSPPPVEKAMASICLITIDELVWASGVLLNDQGLILTNA LLEPWRF  
Vvi\_DEG15\_798aa PFNSMHQPPDCSSPPLSLIEKAMASICLVTIDDGVWASGVVLSQGLILTNA LLEPWRF  
Ppe\_DEG15\_755aa PITHIQEHLYSNCSSPSHIEKAIIGSVCLITMDDGVWASGVFLNKQGLILTNA LLEPWRF  
Csa\_DEG15\_747aa GFSSIQESSGCRPPFPFKIEKAVASVCLVTMGEIGI WASGVLLNSQGLILTNA LLEPWRF  
Gma\_DEG15\_794aa CSRNKHEHLYFGSSPLPIEKAMTSVCLVTIGDGVWASGVLLNSQGLILTNA LLEPWRF  
Sly\_DEG15\_753aa PINYQEHLLTGSVPSLIEKAMTSICLITVDDGAWASGVLLNKQGLILTNA LLEPWRF  
Mgu\_DEG15\_614aa -----QVSPIEDAMNSICLITSDDGSWASGVLLNKQGLVLTNA LLEPWRF  
Ppa\_DEG15\_1068aa GSIESHSTYQAMQYVPSAVERAVTSVVLITIGDGA WASGVILNKGLILTNA LLEPWRF  
Sbi\_DEG15\_717aa FVSSMVNKINQHCISPLLEAIAISAVVLTVDTS WASGIVLNRGLVLTNA LLEPWRF  
Zma\_DEG15\_722aa VFSSTDNKTNQHCISPLREIAISAVVLTVDTS WASGIVLNRGLVLTNA LLEPWRF  
Sit\_DEG15\_722aa FVSSTVNKINQYCISSPSIREIAISAVVLTVDSS WASGIVLNRGLVLTNA LLEPWRF  
OsJ\_DEG15\_736aa FVPNSANNLNQYDVS-PSLTEAISSVVLTVSETS WASGIILNKGLIMTNA LLEPWRF  
Bdi\_DEG15\_698aa SVSISANHHNQYRIP-ASLKEAISSVVLVKVGDTS WASGIVLNRGLILTNA LLEPWRF

: . : \* . : \* \* \* : \* \* \* : \* \* \* :

Ath\_DEG15\_709aa GKGGVYCEG---FKPYVLGAEEFSSTGS--KFWEQKSQTLPRKAPRNHYSSVGENIREY  
Aly\_DEG15\_713aa GKGGVYCEGNDAGLKPYPVLGADEFSSSTGG--KVWEQKSQTLPRKAPANLYSAVGENIREY  
Rco\_DEG15\_729aa GKTTINGGRNRTKSGALFLPPEGSVIPGHSNVDSYRGSQ-MPLNKAKIMDSSVFDQTKGD  
Mes\_DEG15\_756aa CKTTASGGRNCTNSEAVFLPEESSFHGYSHVDNHKKSLRFQPEAVKRMNSLVLDHSGKY  
Ptr\_DEG15\_752aa GKTTVNGGEDGTKLQDPFIPPEE--FPRYSEVDGHEKTORLPPKTLNIMNSSVADESKGY  
Vvi\_DEG15\_798aa GKTVARGGRCGAPEIPIFIPSEESVYCRDEGTYSHQKSDLLPKTLKTAGSSVMDGHHGY  
Ppe\_DEG15\_755aa GKRTASDGKHGNSSEALSDF--VSPRHSLEYGKQKGEFLPRIRNNADLFVDEYGGH  
Csa\_DEG15\_747aa GKTNVGGEKSIENAKLLQSHTEHSPCSMNNSVFGGQEIENIENPASKNGNILLHNQLEDN  
Gma\_DEG15\_794aa GKEHVNGGGYGTNSEKISSMLEGTAYVVN--RVESNQVQSSTPLKMPILYPPFAANEQGGY  
Sly\_DEG15\_753aa GKTSVNG--YNTKSDVVFVTTSNQSEHPGDDKFTIHRNRKYLQKELKTPQFLVNNQGSF  
Mgu\_DEG15\_614aa GKTAAN-----AGY  
Ppa\_DEG15\_1068aa GKP-----RMVPSPVNGSIPKDSGFP LSCDESQEDLALNQLQEEIISKGVSTSRSTSSW  
Sbi\_DEG15\_717aa GRTSPSD-----LQ---ASFTEGHELNAGENKSSQPE-GKFSNEDAVNHNVS  
Zma\_DEG15\_722aa GRTSPSD-----LQ---ASFAGEHLNAGENKSLQPOQGIENEDAVKHKVS  
Sit\_DEG15\_722aa GRTSPLG-----AQ---TSSAGEYLSARENRSRLOPQCKFSNDDAVKHEVS  
OsJ\_DEG15\_736aa GRTSPLG-----LQNKIASFS-ETHCGGENNLLQPOQCKVSNEDAVKHLS  
Bdi\_DEG15\_698aa GRTSPLG-----LQNETSLTGEHVREVENKLLQSQECKMSNQDAVKHEAP

\* :

Ath\_DEG15\_709aa KHNFLQTGHRDIRVRLCHLDSWTWCPANVVYICKEQL IALLQLEYVPGKLPITANFSS  
Aly\_DEG15\_713aa KHNFLQTGHRDIRVRLCHLDSWTWCTANVVYICKEQL IALLQLEYVPGKLPITANFSS  
Rco\_DEG15\_729aa QLSLSYSGHRNIRVRLDHFNPWIWCDAKVIYVSKGPLEVALLQLEYVDPQLCPKADYAC  
Mes\_DEG15\_756aa QLNLSYKGRNIRVRLDHVNPWIWCDAKVYVCKGPLEVALLQLEYVDPQLCPKIMDFAC  
Ptr\_DEG15\_752aa KLSLSYKGPNIIRVRLDHDHPWIWCDAKVHVCKGPLEVALLQLEHVPDQLFPTKVDFEC  
Vvi\_DEG15\_798aa KSSSTYRGRNIRVRLDHTDPIRWCDARVVYVSKGPLEIALLQLEFVPGQLCPIIMDFAC  
Ppe\_DEG15\_755aa KLSSTYRGRNIRVRLDHTDPIRWCDAKVYVCKGPLEVALLQLEHVPDQLFPTKVDFEC  
Csa\_DEG15\_747aa KLSFPNYGRRNLHVRLSHAEPWIWCDAKLLYICKGSPVALLQLEQIPEQLSPITMDCSC  
Gma\_DEG15\_794aa KSSPTYDNHRNIRVRLDHIKSWVWCDAKVYVCKGPLEVALLQLESVPDQLFPTKVDFEC  
Sly\_DEG15\_753aa RVNLANTSSRTIRVRLDFMDPWWVTNAEVVHVSRGPLEVALLQQLVDPDELCPITVDFMR  
Mgu\_DEG15\_614aa QLMCGHTNHRNIRVRLDFMDPMMWSDAKIYVYISKGPM IALLQLEIVPHQLCPVVDIDC  
Ppa\_DEG15\_1068aa PTDVVSQKNYQIRVRLDHRQPRSWHAARVYVVSQGPLEIALLQLESPPPGLHPITPDKEC  
Sbi\_DEG15\_717aa LFNLGFKREKRISVRLDHAERQIWCNASVVFISKGPLEVALLQIDKVPTELNTIRPEFVC  
Zma\_DEG15\_722aa SFNLGFKREKRISVRLDHAERQIWCNASVVFISKGPLEVALLQIEKVPTELNTIRPEFVC  
Sit\_DEG15\_722aa LFNLGFKREKRISVRLDHAERQVWCNASVVFISKGPLEVALLQMEVPTELNTIRPEFVC  
OsJ\_DEG15\_736aa LFNLGFKKDRASVRLDHGERKTWCNASVVFISKGPLEVALLQMEKTPTELCAIRPEFVC  
Bdi\_DEG15\_698aa LFNLGFKREKRISVRLDHGKRQTWCNASVVFISKGPLEVALLQLEMVAIELCAIRPEFIC

: \* \* . . \* \* : : : \* \* \* \* : . . \* . :



Ath\_DEG15\_709aa PPLGTTAHVVGHGLFGPRCGLSPSICSGVVAKVVHAKRRLNTQSIISQEVA----EFPAML  
Aly\_DEG15\_713aa PPLGTTAHVVGHGLFGPRCGLSPSICSGVVAKVVHAKRRLNTQSIISQEVA----EFPAML  
Rco\_DEG15\_729aa PILGSKAYVIGHGLFGPRCGFFPSICSGVIAKIVKVEAPTFYQSIQG-----DSHIPAML  
Mes\_DEG15\_756aa PILGSKVYVIGHGLFGPRCGFSPVCSGVVAKIVKAEAPPYYG-HKA-----DSHIPAML  
Ptr\_DEG15\_752aa SSLGSKAYVIGHGLFGPRCGFSPSICSGAVSKVVKAKAPSYCQSVQGG----YSHIPAML  
Vvi\_DEG15\_798aa PSAGSKAYVIGHGLFGPRCDFPSPVSVGEVAKVVKSKMPLSCQSSLQENI--LEDFPAML  
Ppe\_DEG15\_755aa PSVGSKAYVIGHGLFGPRCGFSPSICSGVVAKVVKAKFPLSYQPNQPGNT--QGHPVAML  
Csa\_DEG15\_747aa PTSGSKIHVIGHGLLGPKSLSPVCSGVVSNVVKAKIPSSYHKGDS-----LEYFPAML  
Gma\_DEG15\_794aa PSTGSQAFVIGHGLFGPKHGFPPVCSGVVAKVVEAKTPQSYLSVQPEHLHNHEHFPAML  
Sly\_DEG15\_753aa PSPGSKAYVIGHGLFGPRCDFLPSACVGAIAKVVEAKRPLLDQSCLOGG-----NFPAML  
Mgu\_DEG15\_614aa PSPGSKAYVIGHGLFGPRCDFRPSACLGVIAKVIKVEATRSPHNSSEQ-----FPAML  
Ppa\_DEG15\_1068aa PTPGSTAVVLGHGLFGPRSELRPSVSVAGVVARVVKAGSSPFLTIGIGRKE-GKASKAAML  
Sbi\_DEG15\_717aa PTAGSSVYVGHGLFGPRSGLSSSLSSGVVSKVVQIPSNQLSHLASELETD-NMDIPVML  
Zma\_DEG15\_722aa PTAGSPVYVGHGLFGPRSGLHSSLSSLYSGVVSQVQIPANQLSHLAREADN--MDIPVML  
Sit\_DEG15\_722aa PTAGSSVYVGHGLFGPRSGLSSSLSSGVVSKVVQIPSTQLSHPSGTVEAH--NMDMPVML  
OsJ\_DEG15\_736aa PTAGSSVYVGHGLLGPRLSGLSSSLSSGVVSKI VKIPSTQHSQSSSVVEVN--NMDIPVML  
Bdi\_DEG15\_698aa PTAGSSVYVGHGLLGPRLSGLSSSLSSGVVSKI VKIPSAQHSHLSSSLEAE-TMDTPVML

. \*: :\*:\*\*:\*: :.\* \* : : : : . . \*\*

Ath\_DEG15\_709aa ETAAVHPGSGGAVLNSSGHMI GLVTSNARHGAGTVI PHLNFSI PCAVLAPIFKFAEDM  
Aly\_DEG15\_713aa ETAAVHPGSGGAVLNSSGHMI GLVTSNARHGAGTVI PHLNFSI PCAVLAPIFKFAEDM  
Rco\_DEG15\_729aa ETAAVHPGSGGAVINSSGHMI GLVTSNARHGGGRVI PHLNFSI PCALLAPIFKFARM  
Mes\_DEG15\_756aa ETAAVHPGSGGAVINSEGHMI GLITSNARHGGGTVI PHLNFSI PCALLAPIFEFARM  
Ptr\_DEG15\_752aa ETAAVHPGSGGAVVNSEGHMI GLVTSNARHGGGTVI PHLNFSI PCAVLAPIPFDKDM  
Vvi\_DEG15\_798aa ETAAVHAGSGGAVVNSEGHMI GLITSNARHGGGTVI PHLNFSI PCAALQAVYKFSKDM  
Ppe\_DEG15\_755aa ETAAVHPGSGGAVINSSGHMI GLVTSNARHGGGTVI PHLNFSI PCAALLPIFKFARM  
Csa\_DEG15\_747aa ETAAVHPGSGGAVVNSEGHMI GLVTSNARHGRGVII PHLNFSI PCAALEPIHRFSKDM  
Gma\_DEG15\_794aa ETAAIHPGASGGAIINSDGHMI GLVTSNARHSGGAIIPQLNFSI PSAALAPIVNFASKAM  
Sly\_DEG15\_753aa ETAAVHPGSGGAVVNSEGHMIALVTSNARHGGGTVI PHLNFSI PCAALKPIFKFAEDM  
Mgu\_DEG15\_614aa ETAAVHPGSGGAVVNSGHMI GLVTSNARHGGGTVI PHLNFSI PCAALEPIFKFSKDM  
Ppa\_DEG15\_1068aa QTTAAVHPGSGGAVVSGEGHMI GLVTSNARHSGGTVI PFLNFSV PYAALVPVFEFASSA  
Sbi\_DEG15\_717aa QTTAAVHPGASGGVLVNSHGLMVGIITSNAKHGGGSTI PHLNFSI PCKLLVALFKYSAIG  
Zma\_DEG15\_722aa QTTAAVHPGASGGVLVNSHGLMVGIITSNAKHGGGSTI PHLNFSI PCKLLVAVFEYSANG  
Sit\_DEG15\_722aa QTTAAVHPGASGGMLVNSHGLMVGIITSNAKHGGGSTI PHLNFSI PCKSLEIPFKYSENE  
OsJ\_DEG15\_736aa QTTAAVHPGASGGVLLDSLGRMVGLITSNAKHGGGSTI PHLNFSI PCKSLEMVFKYSAGK  
Bdi\_DEG15\_698aa QTTAAVHPGASGGVLINSHGRMVGLITSNAKHGGGTTI PRLNFSI PCNSLEMVFKYSANE

:\*\*\*:\*.\*.\*\*\* :. : \* \* : : : : \* \* \* \* : \* \* : : :

Ath\_DEG15\_709aa Q-NTTILQTLDQPEELSSIWALMPSLSPKTEQSLPNLP-----KLLKDGNNKQTKGSQ  
Aly\_DEG15\_713aa Q-NMEILQTLDQPEELSSIWALMPSLSPKTEQSLPNLP-----KLLKDGNNKQTKGSQ  
Rco\_DEG15\_729aa K-DISLLQNLDRPNQQLSSVWALMPSLSHKPSPLSLNLP-----ESLLEDHEKQGRVSK  
Mes\_DEG15\_756aa Q-DISLLVNLDLNQHLSVWALMPSLSPKPSPHLLNLP-----FSLVEDNDKQEKGSK  
Ptr\_DEG15\_752aa R-DISLLQNLDRPNEHLSVWALMPPLSPKPSPLSLNLP-----ESILQDYEKQVKGSR  
Vvi\_DEG15\_798aa Q-QMSLLLDLDPNEHLSVWALMPPLSPKPGPSLPLNLP-----PQSLLEDNKQEKGSR  
Ppe\_DEG15\_755aa Q-DISLLQVLDQPNKYISSVWALMPVSPKPPPLPHMP-----ESLRQENNNQEKGSR  
Csa\_DEG15\_747aa E-DLSVVKVLDEPNQLSSIWALMSQRSKPSPPGLP-----QLLGEDHESKQKGSR  
Gma\_DEG15\_794aa E-DLSLLRILDEPNELSSVWALMRPSYDNPMPHMDPPQ-----SVTDNKSKEKGSR  
Sly\_DEG15\_753aa Q-DLLPLEYLDKPNQLSSVWALTPPLSSKQSPSLHLHP-----ILPRGDSNDDAKGSK  
Mgu\_DEG15\_614aa Q-DITILEELEKPNNEHLSVWALMPPLYPKPDPVFDIQK-----FPIEENIKCTTKGSR  
Ppa\_DEG15\_1068aa DSDWSRLEELDKNQDLAAVWALVPTPPRPSPPPPFRFRHPRVVSQIEDPKGVKPKGSR  
Sbi\_DEG15\_717aa K--LVILEQLDKPNEVLSSVWALAPSS--PFVSSSPEK-----GKEEKVLE  
Zma\_DEG15\_722aa N--LVVLEQLDKPNEVLSSVWALAPSS--PFVRSPEK-----GKEEKVLE  
Sit\_DEG15\_722aa E--DAILEQLDKPNEVLSSVWALAPSS--QFIDNPEK-----GGEKVME  
OsJ\_DEG15\_736aa D--FKILEQLDKPNEVLSSVWALAPSS--PFFSTSPEN-----GRGKVLE  
Bdi\_DEG15\_698aa D--STILEQLDKPNEVLSSVWALAPSLPFLSSSPGK-----SGEKKVLE

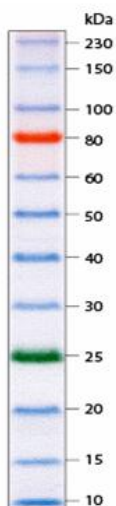
: \* : \* . : : : \* \* : : :



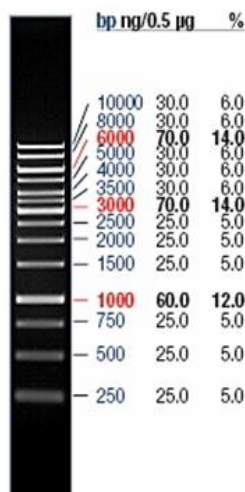
**Abbildung 39: Alignment DEG15 von Dikotyledonen, Monokotyledonen und Moos.** Ath: Arabidopsis thaliana, Aly: Arabidopsis lyrata; Rco: Ricinus communis; Mes: Manihot esculenta; Ptr: Populus trichocarpa; Vvi: Vitis vinifera; Ppe: Prunus persica; Csa: Cucumis sativus; Gma: Glycine max; Sly: Solanum lycopersicum; Mgu: Mimulus guttatus; Ppa: Physcomitrella patens; Sbi: Sorghum bicolor; Zma: Zea mays; Sit: Setaria italica; OsJ: Oryza sativa; Bdi: Brachypodium distachyon; Grau: Glycine und Proline; Gelb: Protease-Domäne; Grün: Pflanzen-spezifische loop; Rot: Aminosäuren der katalytischen Triade; Blau: PTS1; Hell-blau: Calmodulin-Bindungsdomäne;

### 5.3 Verwendete DNA- und Protein-Standarts

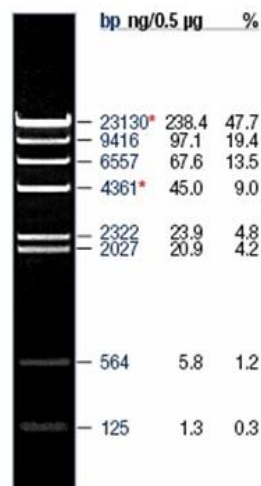
ColorPlus Prestained Protein Marker (NEB)



GeneRuler 1kb DNA ladder (Fermentas)



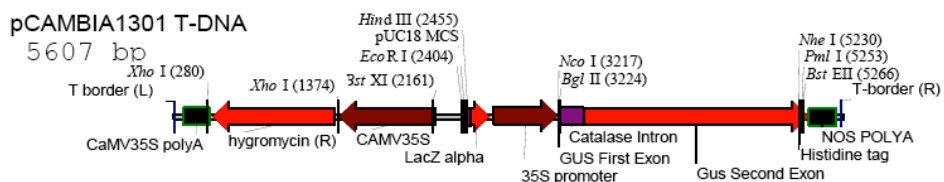
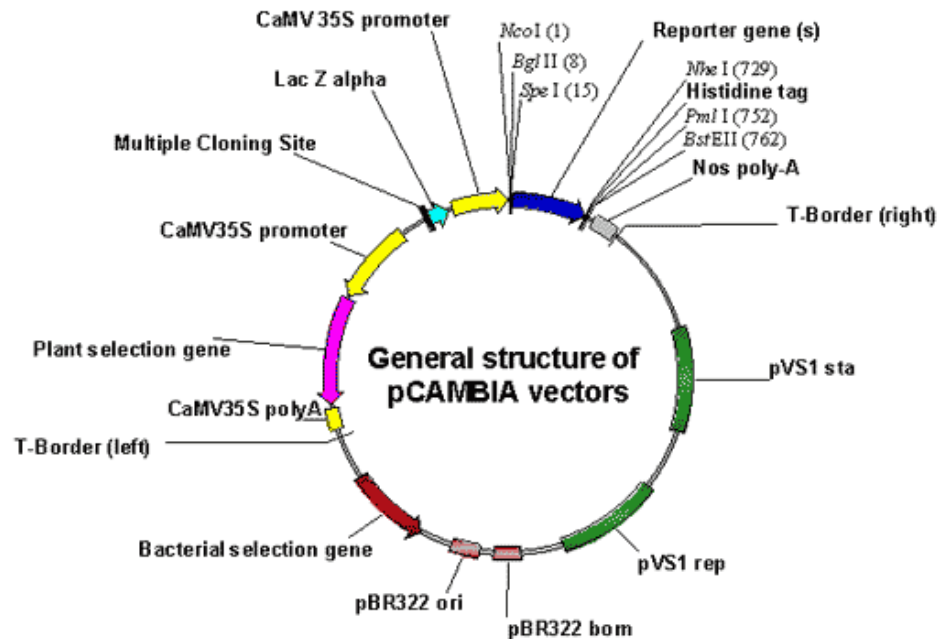
Lambda DNA/HindIII Marker 2 (Fermentas)



## 5.4 Klonierungsstrategien

### 5.4.1 DEG15 Volllänge und Deletionskonstrukte in planta

Deletionskonstrukte in pCAMBIA 1301:



Die DEG15 Volllängen-cDNA, sowie die Deletionskonstrukte werden mit den jeweils angegebenen Primern amplifiziert und zunächst mittels der Restriktionsschnittstellen *Eco*RI und *Xho*I in das Plasmid pET28 a (+) ligiert, um das später exprimierte Protein mit einem T7-Tag und einem His-Tag zu versehen.

Um das Deletionskonstrukt DEG15 $\Delta$ Loop zu erhalten werden mit Hilfe der Primern pET28se und PrimerE bzw. PrimerF und pET28as zwei Teile der cDNA amplifiziert. Zu-

sätzlich zu den für die übrigen Klonierungen verwendeten Restriktionsschnittstellen EcoRI und XhoI wurde eine SacI-Schnittstelle in beide amplifizierte cDNA-Stücke eingefügt und diese in einer Dreipunkt-Ligation in das Plasmid pET28a(+) ligiert.

Zur Expression in *A.thaliana* wurde in einem zweiten Schritt der Klonierung DEG15-T7-6xHis-Tag bzw. die Deletionskonstrukte mit den Primern Se-Primer und As-PrimerH bzw. As-PrimerG erneut amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen BglII und PmlI in das binäre Plasmid pCAMBIA1301 ligiert, wobei in dem Plasmid das GUS-Reportergen durch DEG15-T7-6xHis-Tag ersetzt wird.

Den N-terminal verkürzten Konstrukten wird zusätzlich nach erfolgter Klonierung in das pCAMBIA Plasmid die CML3-Bindedomäne eingefügt, um deren Fähigkeit zur Prozessierung der PTS2-Enzyme *in vivo* zu testen. Hierzu wird die CML3-Bindedomäne mit folgenden Primern amplifiziert: CML3-Bd-DEG15 se, CML3-Bd-DEG15\_pCAMBIA as und mittels der Restriktionsschnittstellen BglII und EcoRI in die schon vorhandenen N-terminal verkürzten Konstrukte in pCAMBIA 1301 ligiert.

Im Folgenden sind die cDNA-Sequenzen der DEG15-T7-6xHis-Tag (Volllänge) und deren Deletionskonstrukte, sowie das dazu gehörige *in silico*- Transcript aufgelistet:

cDNA-Sequenz von DEG15-T7-6xHis (Volllänge) 2257bp:

Verwendete Primer: PrimerA, PrimerH

```
AGATCTCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATAT
GGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTTCGCGGATCCGAATTCATGGATGTGTCTAAAGTTGTCAG
CTTTTCCCAGAAATTCGCCGTCTTGGTCAAAGTCAAGGCCCTGATCCAAAGGGATTGAAGATGAGGAA
GCATGCTTTTCATCAATACCATTCTGGCAATGCAACACTTTCAGCTTCTGGGATCTTGCTTCCAAGAGA
TATTTTTTTGAGTGGTGGAGGTCGCTGCTAAGGTTCTGTTTGAAGCTGGTCAGGACATGGCCCTGGTTTT
GACCGTTGCATCTGTTGTTGAGCCATTCTTAACATTAGGTCACAGAAGTACTAGTAGTATCTCTCAGGA
TCCGGTGAAGCTTATTCGGGTGCTATGATTGAGATTATGGTGGAGGGTCAGCTAAAGTCAGAAAAGGA
AGCTCCTTTTTGGGTTCTGCGCAACTTCTTTCGCTGGTTGATGTCCCTGTATCTTCTGCTGCACCTCA
ATCTCTTATTGAAGCTTCTTCTGGTTCGAAAGATTCTGGATGGGATATTGGTTGGTCTTTGGTTCTGC
TGCTAATGGTTCTCAGCCTTCAATCAATATTGAACATTACAGCAAGCCCTTGATGCAACTTGATGAGCC
ACACAACGCTAACTTCATGGCCAAGTCTGCCACTCGAATGGCTATTCTAGGAGTCCCCTTAAGTTTACT
GGGTCAACCAAGCATGAATTTTGCTTCATCAAGTAGCAAGGGTGATACACTTGTAGCACTAGGCTCTCC
CTTTGGAATCCTTTCACCTGTAACTTTTTTAAACAGCGTATCAACTGGTTCATTGCGAATAGCTATCC
TTCTGGATCCCTAAAGAAGTCACTGATGATAGCTGATGTTTCGATGTCTCCCTGGAATGGAAGGGGCTCC
GGTGTTTGCTAAGAATGGGCACCTAATTGGCATTTTGATTAGACCACTAAGGCAAAAGAATAGCGGCGT
TGAAATTCAGCTGGTGGTTCCATGGGGAGCAATCACAACCTGCTTGCAGCCACTTGCTGCTTGAGGAACC
ATCTGTAGAAGGAAAAGCAAGTCAGTGGGGGAGCGAAGTCCTAAGTGTAAATCAGATGCTAGTATTCC
TGCACAAGTGGCTATTGAGAAGGCGATGGAATCAGTTTTGTCTTATTACGGTCAATGATGGTGTTTGGGC
TTCTGGTATTATTCTTAACGAACATGGTCTCATACTAACAAATGCTCACCTGCTTGAGCCGTGGAGGTA
TGAAAAGGTGGTGTATATGGTGAAGGATTTAAACCCTATGTCTTAGGAGCCGAGGAATTTTCTTCCAC
GGGAAGTAAATTTTGGGAACAGAAGAGTCAAACATTGCCACGAAAGCTCCACGAAATCATTATTCGTC
TGTTGGAGAGAACATCAGGGAATACAAACACAATTTCTTCAGACTGGGCATAGAGACATACGTGTGCG
TTTGTGTCACCTAGATTCTTGGACTTGGTGTCTTGCACAAACGTGGTCTATATTTGCAAGGAACAATTAGA
TATTGCCTTACTGCAGCTAGAATATGTCCCTGGAAAGCTCCAACCTATTACTGCCAATTTTCTCTCC
TCCTTTGGGTACAACAGCGCATGTTGTTGGACATGGACTCTTCGGACCAAGATGTGGGCTTCTCTCTCC
TATTTGTTCTGGAGTTGTAGCAAAGGTAGTTCACGCAAAGAGGAGATTGAATACGCAATCCATTTCTCA
AGAAGTCGCAGAGTTCCCCGCTATGCTCGAAACAACAGCTGCTGTGCATCCTGGTGGCAGTGGTGGTGC
TGTTCTCAATTCAAGTGGCCATATGATTGGACTTGTACCAGCAACGCAAGACATGGAGCGGGGACTGT
TATACCGCATCTCAACTTCAGCATCCCATGTGCAGTCTTGGCACCAATCTTCAAGTTTGCAGAAGATAT
GCAGAACACAACGATCCTTCAAACACTTGATCAACCTAGCGAAGAAGTCTCATCCATTTGGGCTTTGAT
GCCATCACTATCACCAAAGACTGAGCAGTCTTACCCAATCTGCCTAAGTTACTCAAAGATGGTAATAA
CAAACAACGAAAGGATCTCAGTTTGCCAAGTTCATTGCAGAGACCCAAGACATGTTTGTAAAGCCGAC
CAAGCTTTCCCGTATGTGATCCCTAGCAAGTTATGACTCGAGCACGTG
```

Erklärung verwendeter Farbcodes: Restriktionsschnittstellen Klonierung pCAMBIA 1301, 6xHis-Tag, T7-Tag, DEG15-cDNA, Stop-codon, Restriktionsschnittstellen Klonierung in pET18a(+), SKL

Protein-Sequenz von DEG15-T7-6xHis (Volllänge):

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQMGREGSEFMDVSKVVSFSRNFAVLVKVEGPDPKGLKMRKH  
AFHQYHSGNATLSASGILLPRDIFLSGEVAAKVLFEAGQDMALVLTVASVVEPFLTTLGHRTSSSISQD  
PVKLI PGAMIEIMVEGQLKSEKEAPFWVPAQLLSLVDVPVSSAALQSLIEASSGSKDSGWDIGWSLVS  
AANGSQPSINIEHYSKPLMQLDEPHNANFMAKSATRMAILGVPLSLLGQPSMNFASSSSKGDTLVALG  
SPFGILSPVNFNSVSTGSIANSYPSGSLKKSMLIADVRCLPGMEGAPVFAKNHGLIGILIRPLRQKN  
SGVEIQLVVPWGAITTACSHLLLEEPSVEGKASQWGSEVLSVKS DASIPAQVAIEKAMESVCLITVND  
GVWASGIILNEHGLILTNAHLLPEWRYGKGGVYEGEFKPYVLGAEFSSSTGSKFWEQKSQTLPRKAPR  
NHYSVGENIREYKHNFLQTGHRDIRVRLCHLDSWTWC PANVVYICKEQLDIALLOLEYVPGKLPIT  
ANFSSPPLGTTAHVVGHGLFGPRCGLSPSICSGVVAKVVHAKRRLNTQSI SQEVAEF PAMLETTAAVH  
PGSGGAVLNSSGHMIGLVTSNARHGAGTVI PHLNFSIPCAVLAPIFKFAEDMQNTTILQTLDQPSEE  
LSSIWALMPSLSPKTEQSLPNLPKLLKDGNNKQTKGSQFAKFAETQDMFVKPTKLSRDVIPSKL-

Erklärung verwendeter Farbcode: 6xHis-Tag, T7-Tag, DEG15, Stop-codon, SKL

cDNA-Sequenz von DEG15Δ1/3N-Terminus-T7-6xHis (1971 bp):

Verwendete Primer: PrimerB, PrimerH

AGATCTCATGGGCAGCAGCATCATCATCATCATCAAGCAGCGGCCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATAT  
GGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTTCGCGGATCCGAATTCAGTAGTAGTATCTCTCAGGATCC  
GGTGAAGCTTATTCGGGTGCTATGATTGAGATTATGGTGGAGGGTCAGCTAAAGTCAGAAAAGGAAGC  
TCCTTTTTGGGTTCCTGCGCAACTTCTTTCGCTGGTTGATGTCCCTGTATCTTCTGCTGCACCTCAATC  
TCTTATTGAAGCTTCTTCTGGTTCGAAAGATTCTGGATGGGATATTGGTTGGTCTTTGGTTTTCTGCTGC  
TAATGGTTCTCAGCCTTCAATCAATATTGAACATTACAGCAAGCCCTTGATGCAACTTGATGAGCCACA  
CAACGCTAACTTCATGGCCAAGTCTGCCACTCGAATGGCTATTCTAGGAGTCCCTTAAAGTTTACTGGG  
TCAACCAAGCATGAATTTTGGCTTCATCAAGTAGCAAGGGTGATACACTTGTAGCAGTGGCTCTCCCTT  
TGGAATCCTTTCACCTGTTAACTTTTTTAAACAGCGTATCAACTGGTTCATTCGCAATAGCTATCCTTC  
TGGATCCCTAAAGAAGTCACTGATGATAGCTGATGTTTCGATGTCTCCCTGGAATGGAAGGGCTCCGGT  
GTTTGTCAAGAATGGGCACCTTAATTTGGCATTTTGGATTAGACCAC TAAGGCAAAAAGAATAGCGGCGTTGA  
AATTCAGCTGGTGGTTCATGGGGAGCAATCAAACTGCTTGCAGCCACTTGCCTGGAGAACCATC  
TGTAGAAGGAAAAGCAAGTCAGTGGGGGAGCAGTCCCTAAAGTGTAAATCAGATGCTATTTCCCTGC  
ACAAGTGGCTATTGAGAAGCGATGGAATCAGTTTGTCTTATTACGGTCAATGATGGTGTGGGCTTC  
TGGTATTATTCTTAACGAACATGGTCTCATACTAACAAATGCTCACCTGCTTGAGCCGTGGAGGTATGG  
AAAAGGTGGTGTATATGGTGAAGGATTTAAACCCATATGCTTTAGGAGCCGAGGAATTTCTTCCACGGG  
AAGTAAATTTTGGGAACAGAAAGAGTCAAAACATTTGCCACGGAAAGCTCCACGAAATCATTATTCGCTGT  
TGGAGAGAACATCAGGGAATACAAACACAATTTCCCTTCAGACTGGGCATAGAGACATACGTGTGCGTTT  
GTGTACCTAGATTCTTGGACTTGGTGTCTTGCAAACGTGGTCTATATTTGCAAGGAACAATTAGATAT  
TGCCTTACTGCAGCTAGAATATGTCCCTGGAAAGCTCCAACCTATTACTGCCAATTTTCTTCTCCTCC  
TTTGGGTACAACAGCGCATGTTGTTGGACATGGACTCTTCGGACCAAGATGTGGGCTTTCTCCTTCTAT  
TTGTCTGGAGTTGTAGCAAAGGTAGTTCACGCAAAGAGGAGATTGAATACGCAATCCATTTCTCAAGA  
AGTCGCAGAGTTCCCCGCTATGCTCGAAACAACAGCTGCTGTGCATCCTGGTGGCAGTGGTGGTGTGT  
TCTCAATTC AAGTGGCCATATGATTTGGACTTGTACCAGCAACGCAAGACATGGAGCGGGGACTGTTAT  
ACCGCATCTCAACTTCAGCATCCCATGTGCAGTCTTGGCACC AATCTTCAAGTTTGCAGAAGATATGCA  
GAACACAACGATCCTTCAAAACACTTGATCAACCTAGCGAAGAACCTCATCCATTTGGGCTTTGATGCC  
ATCACTATCACCAAAGACTGAGCAGTCTCTACCCAATCTGCCTAAGTTACTCAAAGATGGTAATAACAA  
ACAAACGAAAGGATCTCAGTTTGC AAGTTCAATGCAGAGACCCAAGACATGTTTGTAAAGCCGACCAA  
GCTTCCCGTGATGTGATCCCTAGCAAGTTATGACTCGAGCACGTG

Erklärung verwendeter Farbcode: Restriktionsschnittstellen Klonierung pCAMBIA 1301, 6xHis-Tag, T7-Tag, DEG15Δ1/3N -cDNA, Stop-codon, Restriktionsschnittstellen Klonierung in pET18a(+), SKL

Protein-Sequenz von DEG15Δ1/3N-Terminus -T7-6xHis :

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQMG RGSEFSSSISQDPVKLI PGAMIEIMVEGQLKSEKEAP  
FWVPAQLLSLVDVPVSSAALQSLIEASSGSKDSGWDIGWSLVSAANGSQPSINIEHYSKPLMQLDPEH  
NANFMAKSATRMAILGVPLSLLGQPSMNFASSSSKGDTLVALGSPFGILSPVNFNSVSTGSIANSYP  
SGSLKKSLMIADVRCPLPGMEGAPVFAKNGHLIGILIRPLRQKNSGVEIQLVVPWGAIITACSHLLLEE  
PSVEGKASQWGSEVL SVKSDASIPAQVAIEKAMESVCLITVNDGVWASGIILNEHGLILTNAHLLLEPW  
RYGKGGVYEGEFKPYVLGAEFFSSTGSKFWEQKSQTLPRKAPRNHYSSVGENIREYKHNFLQTGHRDI  
RVRLCHLDSWTWCPANVVYICKEQLDIALQLLEYVPGKLQPI TANFSSPPLGTTAHVVGHGLFGPRCG  
LSPSICSGVVAKVVHAKRRLNTQSI SQEVAEF PAMLETTAAVHPGGSGGAVLNSSGHMIGLVT SNARH  
GAGTVI PHLNFSIPCAVLAPIFKFAEDMQNTTILQTLDQPSSEELSSIWALMPSLSPKTEQSLPNLPKL  
LKDGNKQTKGSQFAKFAIETQDMFVKPTKLSRDVIP SKL

Erklärung verwendeter Farbcode: 6xHis-Tag, T7-Tag, DEG15Δ1/3N, Stop-codon, SKL

cDNA-Sequenz von DEG15 Δ2/3N-Terminus -T7-6xHis (1630 bp):

Verwendete Primer: PrimerC, PrimerH

AGATCTCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATAT  
GGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTTCGCGGATCCGAATTCGTCCCTTAAGTTTACTGGGTCA  
ACCAAGCATGAATTTTGCTTCATCAAGTAGCAAGGGTGATACACTTGTAGCACTAGGCTCTCCCTTTGG  
AATCCTTTACCTGTAACTTTTTTAACAGCGTATCAACTGGTTCATTGCGAATAGCTATCCTTCTGG  
ATCCCTAAAGAAGTCACTGATGATAGCTGATGTTTCGATGTCTCCCTGGAATGGAAGGGCTCCGGTGT  
TGCTAAGAATGGGCACTTAATTGGCATTTTGATTAGACCACTAAGGCAAAGAATAGCGGCGTTGAAAT  
TCAGCTGGTGGTTCATGGGGAGCAATCACAACCTGCTTGCAGCCACTTGTCTTGGAGGAACCATCTGT  
AGAAGGAAAAGCAAGTCAGTGGGGAGCGAAGTCCTAAGTGTAAATCAGATAGTATCCTGCACA  
AGTGGCTATTGAGAAGCGATGGAATCAGTTTGTCTTATTACGGTCAATGATGGTGTTTGGGCTTCTGG  
TATTATTCTTAACGAACATGGTCTCATACTAACAATGCTCACCTGCTTGGAGCCGTGGAGGTATGGAAA  
AGGTGGTGTATATGGTGAAGGATTTAAACCCCTATGTCTTAGGAGCCGAGGAATTTCTTCCACGGGAAG  
TAAATTTTGGGAACAGAAGAGTCAAACATTGCCACGGAAAGCTCCACGAAATCATTATTCGTCTGTTGG  
AGAGAACATCAGGGAATACAAACACAATTTCTTCAGACTGGGCATAGAGACATACGTGTGCGTTTGTG  
TCACCTAGATTCTTGGACTTGGTGTCTGCAAACGTGGTCTATATTTGCAAGGAACAATTAGATATTC  
CTTACTGCAGCTAGAATATGTCCCTGGAAAGCTCCAACCTATTACTGCCAATTTTTCTCTCCTCCTTT  
GGGTACAACAGCGCATGTTGTTGGACATGGACTCTTCGGACCAAGATGTGGGCTTCTCCTTCTATTTG  
TTCTGGAGTTGTAGCAAAGGTAGTTCACGCAAAGAGGAGATTGAATACGCAATCCATTTCTCAAGAAGT  
CGCAGAGTTCCCCGCTATGCTCGAAACAACAGCTGCTGTGCATCCTGGTGGCAGTGGTGGTGTCTTCT  
CAATTCAAGTGGCCATATGATTGGACTTGTACCAGCAACGCAAGACATGGAGCGGGGACTGTTATACC  
GCATCTCAACTTCAGCATCCCATGTGCAGTCTTGGCACCAATCTTCAAGTTTGCAGAAAGATATGCAGAA  
CACAACGATCCTTCAAACACTTGATCAACCTAGCGAAGAACTCTCATCCATTTGGGCTTTGATGCCATC  
ACTATCACCAAAGACTGAGCAGTCTTACCCAATCTGCCTAAGTTACTCAAAGATGGTAATAACAAACA  
AACGAAAGGATCTCAGTTTGCCAAGTTCATTGCAGAGACCCAAGACATGTTTGTAAAGCCGACCAAGCT  
TTCCCGTGTATGTATCCCTAGCAAGTTATGACTCGAGCACGTG

Erklärung verwendeter Farbcode: Restriktionsschnittstellen Klonierung pCAMBIA 1301, 6xHis-Tag, T7-Tag, DEG15Δ2/3N -cDNA, Stop-codon, Restriktionsschnittstellen Klonierung in pET18a(+), SKL

Protein-Sequenz von DEG15Δ2/3N-Terminus -T7-6xHis:

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSEFVPLSLLGQPSMNFASSSSKGDTLVALGSPFGI  
LSPVNFNSVSTGSIANSYPSGSLKKS LMIADVRCLPGMEGAPVFAKNGHLIGILIRPLRQKNSGVEI  
QLVVPWGAITTACSHLLLEEPSVEGKASQWGSEVLSVKSDASIPAQVAIEKAMESVCLITVNDGVWAS  
GIILNEHGLILTNAHLLLEPWRYGKGGVYGEFVKPYVLGAEFFSSTGSKFWEQKSQTLPRKAPRNHYSS  
VGENIREYKHNFLQTGHRDIRVRLCHLDSWTWCPANVVYICKEQLDIALQLLEYVPGKLQIPITANFSS  
PPLGTTAHVVGHGLFGPRCGLSPSICSGVVAKVVHAKRRLNTQSSISQEVAEFPAMLETTAAVHPGGSG  
GAVLNSSGHMIGLVTSNARHGAGTVIPHLNFSIPCAVLAPIFKFAEDMQNTTILQTLDQPSEELSSIW  
ALMPSLSPKTEQSLPNLPKLLKDGNNKQTKGSQFAKFAETQDMFVKPTKLSRDVIPSKL-

Erklärung verwendeter Farbcode: 6xHis-Tag, T7-Tag, DEG15Δ2/3N, Stop-codon, SKL

cDNA-Sequenz von DEG15ΔN-Terminus -T7-6xHis (1135 bp):

Verwendete Primer: PrimerD, PrimerH

AGATCTCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATAT  
GGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTTCGCGGATCCGAATTCGGGCTTCTGGTATTATTCTTAA  
CGAACATGGTCTCATACTAACAATGCTCACCTGCTTGTAGCCGTGGAGGTATGGAAAAGGTGGTGTATA  
TGGTGAAGGATTTAAACCCTATGTCTTAGGAGCCGAGGAATTTTCTTCCACGGGAAGTAAATTTTGGGA  
ACAGAAGAGTCAAAACATTTGCCACGGAAAAGCTCCACGAAATCATTTATTCGTCTGTGGAGAGAACATCAG  
GGAATACAAAACAATTTCTTCAGACTGGGCATAGAGACATACGTGTGCGTTTGTGTACCTTAGATTC  
TTGGACTTGGTGTCTTCAAAACGTGGTCTATATTTGCAAGGAACAATTAGATATTTGCCTTACTGCAGCT  
AGAATATGTCCCTGGAAAAGCTCCAACCTATTAAGTCCAAATTTTCTTCTCCTCCTTTGGGTACAACAGC  
GCATGTGTGGACATGGACTCTTCGGACCAAGATGTGGGCTTTCTCCTTCTATTTGTCTGGAGTTGT  
AGCAAAGGTAGTTACGCAAAAGAGGAGATTGAAATACGCAATCCATTTCTCAAGAAGTCGCAGAGTTCCC  
CGTATGCTCGAAAACAACAGCTGCTGTGCATCCTGGTGGCAGTGGTGGTGTCTGTCTCAATTCAGTGG  
CCATATGATTGGACTTGTATTACCAGCAACGCAAGACATGGAGCGGGACTGTTATACCGCATCTCAACTT  
CAGCATCCCATGTGCAGTCTTGGCACCAATCTTCAAGTTTGCAGAAGATATGCAGAACAACGATCCT  
TCAAAACACTTGATCAACCTAGCGAAGAACTCTCATCCATTTGGGCTTTGATGCCATCACTATCACCAAA  
GACTGAGCAGTCTCTACCCAATCTGCCTAAGTTACTCAAAGATGGTAATAACAAACAACGAAAGGATC  
TCAGTTTGCCAAAGTTTCAATTCAGAGACCCAAGACATGTTTGTAAAGCCGACCAAGCTTTCCCGTGATGT  
GATCCCTAGCAAGTATGACTCGAGCACGTG

Erklärung verwendeter Farbcode: Restriktionsschnittstellen Klonierung pCAMBIA 1301, 6xHis-Tag, T7-Tag, DEG15ΔN -cDNA, Stop-codon, Restriktionsschnittstellen Klonierung in pET18a(+), SKL

Protein-Sequenz von DEG15ΔN-Terminus -T7-6xHis:

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSEFWASGIILNEHGLILTNAHLLLEPWRYGKGGVY  
EGFKPYVLGAEFFSSTGSKFWEQKSQTLPRKAPRNHYSSVGENIREYKHNFLQTGHRDIRVRLCHLDS  
WTWCPANVVYICKEQLDIALQLLEYVPGKLQIPITANFSSPPLGTTAHVVGHGLFGPRCGLSPSICSGV  
VAKVVHAKRRLNTQSSISQEVAEFPAMLETTAAVHPGGSGGAVLNSSGHMIGLVTSNARHGAGTVIPHL  
NFSIPCAVLAPIFKFAEDMQNTTILQTLDQPSEELSSIWALMPSLSPKTEQSLPNLPKLLKDGNNKQT  
KGSQFAKFAETQDMFVKPTKLSRDVIPSKL-

Erklärung verwendeter Farbcode: 6xHis-Tag, T7-Tag, DEG15ΔN, Stop-codon, SKL



cDNA-Sequenz von DEG15ΔC-T7-6xHis (1987 bp):

Verwendete Primer: PrimerA, PrimerG

```
AGATCTCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATAT
GGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCATGGATGTGTCTAAAGTTGTCAG
CTTTTCCCAGAAATTTCCGCGTCTTGGTCAAAGTTCGAAGGCCCTGATCCAAAGGGATTGAAGATGAGGAA
GCATGCTTTTTCATCAATACCATTCTGGCAATGCAACACTTTCAGCTTCTGGGATCTTGCTTCCAAGAGA
TATTTTTTTGAGTGGTGAGGTGCGTGCTAAGGTTCTGTTTGAAGCTGGTCAGGACATGGCCCTGGTTTTT
GACCGTTGCATCTGTTGTTGAGCCATTCTTAACATTAGGTCACAGAACTAGTAGTAGTATCTCTCAGGA
TCCGGTGAAGCTTATTCGCGGTGCTATGATTGAGATTATGGTGGAGGGTCAGCTAAAAGTCAGAAAAGGA
AGCTCCTTTTGGGTTCCCTGCGCAACTTCTTTGCTGGTTGATGTCCCTGTATCTTCTGCTGCACCTTCA
ATCTCTTATTGAAGCTTCTTCTGGTTCGAAAGATTCTGGATGGGATATTGGTTGGTCTTTGGTTTCTGC
TGCTAATGGTTCTCAGCCTTCAATCAATATTGAACATTACAGCAAGCCCTTGATGCAACTTGATGAGCC
ACACAACGCTAACTTCATGGCCAAGTCTGCCACTCGAATGGCTATTCTAGGAGTCCCTTAAGTTTACT
GGGTCAACCAAGCATGAATTTTGTTCATCAAGTAGCAAGGGTGATACACTTGTAGCACTAGGCTCTCC
CTTTGGAATCCTTTCACCTGTTAACTTTTTTAAACAGCGTATCAACTGGTTCCATTGCGAATAGCTATCC
TTCTGGATCCCTAAAGAAGTCACCTGATGATAGCTGATGTTGATGTCTCCCTGGAATGGAAGGGGCTCC
GGTGTGTTGCTAAGAATGGGCACTTAATTGGCATTGTTGATTAGACCCTAAGGCAAAAAGAAATAGCGGCGT
TGAAATTCAGCTGGTGGTTCCATGGGGAGCAATCACAACCTGCTTGCAGCCACTTGTCTGCTTGAGGAACC
ATCTGTAGAAGGAAAAGCAAGTCAGTGGGGGAGCGAAGTCCTAAGTGTAAATCAGATGCTAGTATTC
TGCACAAGTGGCTATTGAGAAGGCGATGGAATCAGTTTGTCTTATTACGGTCAATGATGGTGTGTTGGGC
TTCTGGTATTATTCTTAACGAACATGGTCTCATACTAACAATGCTCACCTGCTTGAGCCGTGGAGGTA
TGGAAGGTTGGTGTATATGGTGAAGGATTTAAACCCCTATGTCTTAGGAGCCGAGGAATTTCTTCCAC
GGGAAGTAAATTTTGGGAACAGAAGAGTCAAACATTGCCACGGAAGCTCCACGAAATCATTTATTCGTC
TGTTGGAGAGAACATCAGGGAATACAAACACAATTTCCCTCAGACTGGGCATAGAGACATACGTGTGCG
TTTGTGTACCTAGATTCTTGGACTTGGTGTCTGCAAACGTGGTCTATATTTGCAAGGAACAATTAGA
TATTGCCTTACTGCAGCTAGAATATGTCCCTGGAAAGCTCCAACCTATTACTGCCAATTTTCTTCTCC
TCCTTTGGGTACAACAGCGCATGTTGTTGGACATGGACTCTTCGGACCAAGATGTGGGCTTTCTCCTTC
TATTTGTTCTGGAGTTGTAGCAAAGGTAGTTACAGCAAAGAGGAGATTGAATACGCAATCCATTTCTCA
AGAAGTCGCAGAGTTCCCCGCTATGCTCGAAACAACAGCTGCTGTGCATCCTGGTGGCAGTGGTGGTGC
TGTTCTCAATTCAGTGGCCATATGATTGGACTTGTACCAGCAACGCAAGACATGGAGCGGGGACTGT
TATACCGCATCTCAACTTCAGCATCCCATGTAGCAAGTTATGACTCGAGCACGTC
```

Erklärung verwendeter Farbcode: Restriktionsschnittstellen Klonierung pCAMBIA 1301, 6xHis-Tag, T7-Tag, DEG15ΔC -cDNA, Stop-codon, Restriktionsschnittstellen Klonierung in pET18a(+), SKL

Protein-Sequenz von DEG15ΔC -T7-6xHis:

```
MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQOMGRGSEFMDVSKVVSFSRNFAVLVKVEGPDPKGLKMRKH
AFHQYHSGNATLSASGILLPRDIFLSGEVAAKVLFEGQDMALVLTVASVVEPFLTGHRTSSSISQD
PVKLI PGAMIEIMVEGQLKSEKEAPFWVPAQLLSLVDVPVSSAALQSLIEASSGSKDSGWDIGWSLVS
AANGSQPSINIEHYSKPLMQLDEPHNANFMAKSATRMAILGVPLSLLGQPSMNFASSSSKGDTLVALG
SPFGILSPVNFNSVSTGSIANSYPSGLKSLMIADVRCLPGMEGAPVFAKNGHLIGILIRPLRQKN
SGVEIQLVVPWGAITTACSHLLLEEPSVEGKASQWGSEVLVSKSDASIPAQVAIEKAMESVCLITVND
GVWASGII LNEHGLI LTNALLLEPWRYGKGGVYGEFVKPYVLGAEFFSSTGSKFWEQKSQTLPRKAPR
NHYSVGENIREYKHNFLQTGHRDIRVRLCHLDSWTWCPANVVYICKEQLDIALQLLEYVPGKLQPIIT
ANFSSPPLGTTAHVVGHGLFGPRCGLSPSICSGVVAKVVHAKRRLNTQSISQEVAEFPAMLETTAAVH
PGGSGGAVLNSSGHMIGLVTSNARHGAGTVIPLNFSIPC SKL -
```

Erklärung verwendeter Farbcode: 6xHis-Tag, T7-Tag, DEG15ΔC, Stop-codon, SKL

cdNA-Sequenz von DEG15ΔLoop -T7-6xHis bp:

Verwendete Primer: siehe Text

```
AGATCTCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATA
TGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTTCGCGGATCCGAATTCATGGATGTGTCTAAAGTTGTC
AGCTTTTCCCGAATTTTCGCCGTCTTGGTCAAAGTCAAGGCCCTGATCCAAAGGGATTGAAGATGAG
GAAGCATGCTTTTCATCAATACCATTCCTGGCAATGCAACACTTTCAGCTTCTGGGATCTTGCCTCCAA
GAGATATTTTTTTGAGTGGTGAGGTCGCTGCTAAGGTTCTGTTTTGAAGCTGGTCAGGACATGGCCCTG
GTTTTGACCGTTGCATCTGTTGTTGAGCCATTCTTAACATTAGGTCACAGAACTAGTAGTAGTATCTC
TCAGGATCCGGTGAAGCTTATTCGGGTGCTATGATTGAGATTATGGTGGAGGGTCAGCTAAAGTCAG
AAAAGGAAGCTCCTTTTTGGGTTCTGCGCAACTTCTTTTCGCTGGTTGATGTCCCTGTATCTTCTGCT
GCACTTCAATCTCTTATTGAAGCTTCTTCTGGTTCGAAAGATTCTGGATGGGATATTGGTTGGTCTTT
GGTTTCTGCTGCTAATGGTTCTCAGCCTTCAATCAATATTGAACATTACAGCAAGCCCTTGATGCAAC
TTGATGAGCCACACAACGCTAACTTCATGGCCAAGTCTGCCACTCGAATGGCTATTCTAGGAGTCCCC
TTAAGTTTACTGGGTCAACCAAGCATGAATTTTGCCTTCATCAAGTAGCAAGGGTGATACACTTGTAGC
ACTAGGCTCTCCCTTTGGAATCCTTTCACCTGTTAACTTTTTTTAACAGCGTATCAACTGGTTCCATTG
CGAATAGCTATCCTTCTGGATCCCTAAAAGAAGTCACTGATGATAGCTGATGTTTCGATGTCTCCCTGGA
ATGGAAGGGGGCTCCGGTGTTTGCTAAGAAATGGGCACCTAATTGGCATTTTGTATTAGACCCTAAGGCA
AAAGAATAGCGGCGTTGAAATTCAGCTGGTGGTTCATGGGGAGCAATCACAAC TGCTTGCAGCCACT
TGCTGCTTGAGGAACCATCTGTAGAAGGAAAAGCAAGTCAGTGGGGGAGCGAAGTCCTAAGTGTAA
TCAGATGCTAGTATTCTTGCACAAGTGGCTATTGAGAAGGCGATGGAATCAGTTTGTCTTATTACGGT
CAATGATGGTGTTCAGCTGCAGTCTTGGCACCAATCTTCAAGTTTGCAGAAGATATGCAGAACACAA
CGATCCTTCAAACACTTGATCAACCTAGCGAAGAACTCTCATCCATTTGGGCTTTGATGCCATCACTA
TCACCAAAGACTGAGCAGTCTCTACCCAATCTGCCAAAGTTACTCAAAGATGGTAATAACAAACAAAC
GAAAGGATCTCAGTTTGCCTAAGTTCATTGCAGAGACCCAAGACATGTTTGTAAAGCCGACCAAGCTTT
CCCGTGATGTGATCCCTAGCAAGTTATGACTCGAGCACGTG
```

Erklärung verwendeter Farbcode: Restriktionsschnittstellen Klonierung pCAMBIA 1301, 6xHis-Tag, T7-Tag, DEG15ΔLoop -cDNA, Stop-codon, Restriktionsschnittstellen Klonierung in pET18a(+), SKL, eingefügte SacI-Schnittstelle

Protein-Sequenz von DEG15ΔLoop -T7-6xHis:

```
MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQMG RGSEFMDVSKVVSFSRNFAVLVKVEGPD PKGLKMRKH
AFHQYHSGNATLSASGILLPRDIFLSGEVAAKVLFEAGQDMALVLTVASVVEPFLTLGHRTSSSISQD
PVKLI PGAMIEIMVEGQLKSEKEAPFWVPAQLLSLVDVPVSSAALQSLIEASSGSKDSGWDIGWSLVS
AANGSQPSINIEHYSKPLMQLDEPHNANFMAKSATRMAILGVPLSLLGQPSMNFASSSSKGDTLVALG
SPFGILSPVNFNSVSTGSIANSYPSGSLKSLMIADVRC LPMEGAPVFAKNHGLIGILIRPLRQKN
SGVEIQLVVPWGAITTACSHLLLEEPSVEGKASQWGSEVLSVKSDASIPAQVAIEKAMESVCLITVND
GVELAVLAPIFKFAEDMQNTTILQTLDQPSEELSSIWALMPSLSPKTEQSLPNLPKLLKDGNNKQTKG
SQFAKFAIETQDMFVKPTKLSRDVIPSKL
```

Erklärung verwendeter Farbcode: 6xHis-Tag, T7-Tag, DEG15ΔLoop, Stop-codon, SKL

cDNA-Sequenz von DEG15 Δ1/3N-Terminus-CML3-Bd -T7-6xHis (1971 bp):

```
AGATCTCATGGATGTGTCTAAAGTTGTCAGCTTTTCCCAGGAATTTCCGCGTCTTGGTCAAAGTCGAAGG
CCCTGATCCAAAGGAATTCAGTAGTAGTATCTCTCAGGATCCGGTGAAGCTTATTCCGGGTGCTATGAT
TGAGATTATGGTGGAGGGTCAGCTAAAGTCAGAAAAGGAAGCTCCTTTTTGGGTTCCTGCGCAACTTCT
TTCGCTGGTTGATGTCCCTGTATCTTCTGCTGCACCTCAATCTCTTATTGAAGCTTCTTCTGGTTCGAA
AGATTCTGGATGGGATATTGGTTGGTCTTTGGTTTCTGCTGCTAATGGTTCTCAGCCTTCAATCAATAT
TGAACATTACAGCAAGCCCTTGATGCAACTTGATGAGCCACACAACGCTAACTTCATGGCCAAGTCTGC
CACTCGAATGGCTATTCTAGGAGTCCCCTTAAGTTTACTGGGTCAACCAAGCATGAATTTTGCTTCATC
AAGTAGCAAGGGTGATACACTTGTAGCACTAGGCTCTCCCTTTGGAATCCTTTCACCTGTTAACTTTTT
TAACAGCGTATCAACTGGTTCATTGCGAATAGCTATCCTTCTGGATCCCTAAAGAAGTCACTGATGAT
AGCTGATGTTTCGATGTCTCCCTGGAATGGAAGGGGCTCCGGTGTGTTGCTAAGAATGGGCACCTAATTTG
CATTTTGATTAGACCACTAAGGCAAAAGAATAGCGGCGTTGAAATTCAGCTGGTGGTTCATGGGGAGC
AATCACAACCTGCTTGCAGCCACTTGTCTGCTTGAGGAACCATCTGTAGAAGGAAAAGCAAGTCAGTGGG
GAGCGAAGTCCTAAGTGTAAATCAGATGCTAGTATTCTGCACAAGTGGCTATTGAGAAGCGATGGA
ATCAGTTTGTCTTATTACGGTCAATGATGGTGTGTTGGGCTTCTGGTATTATTCTTAACGAACATGGTCT
CATACTAACAAATGCTCACCTGCTTGAGCCGTGGAGGTATGGAAAAGGTGGTGTATATGGTGAAGGATT
TAAACCCTATGTCTTAGGAGCCGAGGAATTTTCTTCCACGGGAAGTAAATTTTGGGAACAGAAGAGTCA
AACATTGCCACGGAAAGCTCCACGAAATCATTATTTCGTCTGTTGGAGAGAACATCAGGGAATACAAACA
CAATTTCTTCAGACTGGGCATAGAGACATACGTGTGCGTGTGTCACCTAGATTCTTGGACTTGGTG
TCCTGCAAACGTGGTCTATATTTGCAAGGAACAATTAGATATTGCCTTACTGCAGCTAGAATATGTCC
TGGAAAGCTCCAACCTATTACTGCCAATTTTTCTTCTCCTCCTTTGGGTACAACAGCGCATGTTGTGG
ACATGGACTCTTCGGACCAAGATGTGGGCTTTCTCCTTCTATTTGTTCTGGAGTTGTAGCAAAGGTAGT
TCACGCAAAGAGGAGATTGAATACGCAATCCATTTCTCAAGAAGTCGCAGAGTTCCCCGCTATGCTCGA
AACAAACAGCTGCTGTGCATCCTGGTGGCAGTGGTGGTGTGTTCTCAATTCAAGTGGCCATATGATTGG
ACTTGTACCAGCAACGCAAGACATGGAGCGGGGACTGTTATACCGCATCTCAACTTCAGCATCCCATG
TGCAGTCTTGGCACCAATCTTCAAGTTTGCAGAAGATATGCAGAACACAACGATCCTTCAAAACACTTGA
TCAACCTAGCGAAGAACTCTCATCCATTTGGGCTTTGATGCCATCACTATCACCAAAGACTGAGCAGTC
TCTACCCAATCTGCCTAAGTTACTCAAAGATGGTAATAACAAACAAACGAAAGGATCTCAGTTTGCCAA
GTTTCAATGCAGAGACCCAAGACATGTTTGTAAAGCCGACCAAGCTTTCCCCTGATGTGATCCCTAGCAA
GTTATGACTCGAGCACGTG
```

Erklärung verwendeter Farbcode: Restriktionsschnittstellen Klonierung pCAMBIA 1301, DEG15Δ1/3N -cDNA, Stop-codon, Restriktionsschnittstellen Klonierung in pET18a(+), SKL, CML3-Bindedomäne

Protein-Sequenz von DEG15Δ1/3N-Terminus-CML3-Bd -T7-6xHis :

```
MDVSKVVSFSRNFVAVLVKVEGPDPKSSSISQDPVKLIPGAMIEIMVEGQLKSEKEAPFVWPAQLLSLV
DVPVSSAALQSLIEASSGSKDSGWDIGWLSLVAANGSQPSINIEHYSKPLMQLDEPHNANFMAKSATR
MAILGVPLSLLGQPSMNFASSSSKGDTLVALGSPFGILSPVNFNSVSTGSIANSYPSGSLKKSLMIA
DVRCLPGMEGAPVFAKNGHLIGILIRPLRQKNSGVEIQLVVPWGAIITACSHLLLEEPSVEGKASQWG
SEVLSVKSDASIPAQVAIEKAMESVCLITVNDGVWASGIILNEHGLILTNAHLLLEPWRYGKGGVYGE
FKPYVLGAEFFSSTGSKFWEQKSQTLPRKAPRNHYSSVGENIREYKHNFLQTGHRDIRVRLCHLDSWT
WCPANVVYICKEQLDIALQLLEYVPGKLQPIITANFSSPPLGTTAHVVGHGLFGPRCGLSPSICSGVVA
KVVHAKRRLNTQSIQSIEVAEFPAMLETTAAVHPGGSGGAVLNSSGHMIGLVTSNARHGAGTVIPLN
SIPCAVLAPIFKFAEDMQNTTILQTLQDQSEELSSIWALMPSLSPKTEQSLPNLPKLLKDGNNKQTKG
SQFAKFAIETQDMFVKPTKLSRDVIPSKL-
```

Erklärung verwendeter Farbcode: DEG15Δ1/3N, Stop-codon, SKL, CML3-Bindedomäne

cDNA-Sequenz von DEG15Δ2/3N-Terminus-CML3-Bd -T7-6xHis (1630 bp):

```
AGATCTCATGGATGTGTCTAAAGTTGTCTAGCTTTTCCCGGAATTTTCGCCGCTTTGGTCAAAGTCGAAGG
CCCTGATCCAAAGGAATTCGTCCCTTAAAGTTTACTGGGTCAACCAAGCATGAATTTTGCCTTCATCAAG
TAGCAAGGGTGATACACTTGTAGCACTAGGCTCTCCCTTTGGAATCCCTTTCACCTGTTAACTTTTTTAA
CAGCGTATCAACTGGTTCATTTGCGAATAGCTATCCCTTCTGGATCCCTAAAGAAGTCACCTGATGATAGC
TGATGTTTCGATGTCTCCCTGGAATGGAAGGGGCTCCGGTGTTCGCTAAGAATGGGCACCTAATTGGCAT
TTTGATTAGACCACTAAGGCAAAAAGAATAGCGGCGTTGAAATTCAGCTGGTGGTTCATGGGGAGCAAT
CACAACCTGCTTGCAGCCACTTGTCTGTGAGGAAACCATCTGTAGAAGGAAAAGCAAGTCAGTGGGGGAG
CGAAGTCCTAAGTGTAAATCAGATGCTAGTATTCCTGCACAAGTGGCTATTTGAGAAGGCGATGGAATC
AGTTTGTCTTATTACGGTCAATGATGGTGTTCCTGGGCTTCTGGTATTTATTCCTTAACGAACATGGTCTCAT
ACTAACAAATGCTCACCTGCTTGTAGCCGTGGAGGTATGGAAAAGGTGGTGTATATGGTGAAGGATTTAA
ACCTATGTCTTAGGAGCCGAGGAATTTTCTTCCACGGGAAGTAAATTTTGGGAACAGAAGAGTCAAAC
ATTGCCACGAAAGCTCCACGAAATCATTATTCGTCTGTTCGAGAGAACATCAGGGAATACAAACACAA
TTTCCCTTCAGACTGGGCATAGAGACATACGTGTGCGTTCCTGTCACCTAGATTCCTTGGACTTGGTGTCC
TGCAAACGTGGTCTATATTTGCAAGGAACAAATTAGATATTGCCCTTACTGCAGCTAGAATATGTCCCTGG
AAAGCTCCAACCTATTACTGCCAATTTTTCTTCTCCTCCTTTGGGTACAACAGCGCATGTTGTTGGACA
TGGACTCTTCGGACCAAGATGTGGGCTTTCCTCCTTCTATTGTTCTGGAGTTGTAGCAAAGGTAGTTCA
CGCAAAGAGGAGATTGAATACGCAATCCATTTCTCAAGAAGTCGCAGAGTTCCTCCGCTATGCTCGAAAC
AACAGCTGCTGTGCATCCTGGTGGCAGTGGTGGTGTCTGTTCTCAATTCAGTGGCCATATGATTTGGACT
TGTTACCAGCAACGCAAGACATGGAGCGGGACTGTTATACCGCATCTCAACTTCAGCATCCCATGTGC
AGTCTTGGACCAATCTTCAAGTTTGCAGAAGATATGCAGAACACAACGATCCTTCAAACACTTGATCA
ACCTAGCGAAGAAGTCTCATCCATTTGGGCTTTGATGCCATCACTATCACCAAAGACTGAGCAGTCTCT
ACCCAATCTGCCTAAGTTACTCAAAGATGGTAATAACAAACAAACGAAAGGATCTCAGTTTGC AAGTT
CATTGCAGAGACCCAAGACATGTTTGTAAAGCCGACCAAGCTTTCCCGTGATGTGATCCCTAGCAAGTT
ATGACTCGAGCACGTG
```

Erklärung verwendeter Farbcode: Restriktionsschnittstellen Klonierung pCAMBIA 1301, DEG15Δ2/3N -cDNA, Stop-codon, Restriktionsschnittstellen Klonierung in pET18a(+), SKL, CML3-Bindedomäne

Protein-Sequenz von DEG15Δ2/3N -Terminus-CML3-Bd -T7-6xHis:

```
MDVSKVVSFSRNFVAVLVKVEGPDPKVPLSLLGQPSMNFASSSSKGDTLVALGSPFGILSPVNFNSVSV
TGSIANSYPSGSLKSLMIADVRCCLPGMEGAPVFAKNHGLIGILIRPLRQKNSGVEIQLVVPWGAITT
ACSHLLLEEPSVEGKASQWGSEVLSVKSDASIPAQVAIEKAMESVCLITVNDGVWASGIILNEHGLIL
TNAHLLLEPWRYGKGGVYEGEFKPYVLGAEFSSTGSKFWEQKSQTLPRKAPRNHYSSVGENIREYKHN
FLQTGHRDIRVRLCHLDSWTWCPANVVYICKEQLDIALQLEYVPGKLQIPITANFSSPPLGTTAHVVG
HGLFGPRCGLSPSICSGVVAKVVHAKRRLNTQSSISQEVAEFPAMLETAAVHPGGSGGAVLNSSGHMI
GLVTSNARHGAGTVIPLNFSIPCAVLAPIFKFAEDMQNTTILQTLQDQSEELSSIWALMPSLSPKTE
QSLPNLPKLLKDGNNKQTKGSQFAKFAETQDMFVKPTKLSRDVIPSKL
```

Erklärung verwendeter Farbcode: DEG15Δ2/3N, Stop-codon, SKL, CML3-Bindedomäne

cDNA-Sequenz von DEG15ΔN-Terminus-CML3-Bd -T7-6xHis (1135 bp):

```
AGATCTCATGGATGTGTCTAAAGTTGTCAGCTTTTCCCGGAATTTGCGCGTCTTGGTCAAAGTCGAAGG
CCCTGATCCAAAGGAATTCGGGCTTCTGGTATTATTCTTAACGAACATGGTCTCATACTAACAAATGC
TCACCTGCTTGAGCCGTGGAGGTATGGAAAAGGTGGTGTATATGGTGAAGGATTTAAACCCATATGTCTT
AGGAGCCGAGGAATTTTCTTCCACGGGAAGTAAATTTTGGGAACAGAAGAGTCAAACATTTGCCACGGAA
AGCTCCACGAAATCATTATTCGTCTGTTGGAGAGAACATCAGGGAATACAAACACAATTTCCCTTCAGAC
TGGGCATAGAGACATACGTGTGCGTTTTGTGTACCTAGATTCTTGGACTTGGTGTCTTGCACAAACGTGGT
CTATATTTGCAAGGAACAATTAGATATTGCCTTACTGCAGCTAGAATATGTCCCTGGAAAAGCTCCAACC
TATTACTGCCAATTTTCTTCTCCTCCTTTGGGTACAACAGCGCATGTTGTTGGACATGGACTCTTCGG
ACCAAGATGTGGGCTTTCTCCTTCTATTTGTTCTGGAGTTGTAGCAAAGGTAGTTCACGCAAAGAGGAG
ATTGAATACGCAATCCATTTCTCAAGAAGTCGCAGAGTTCCCCGCTATGCTCGAAACAACAGCTGCTGT
GCATCCTGGTGGCAGTGGTGGTGTCTGTTCTCAATTCAGTGGCCATATGATTGGACTTGTACCAGCAA
CGCAAGACATGGAGCGGGGACTGTTATACCCGATCTCAACTTCAGCATCCCATGTCAGTCTTGGCACC
AATCTTCAAGTTTGCAGAAGATATGCAGAACACAACGATCCTTCAAACACTTGATCAACCTAGCGAAGA
ACTCTCATCCATTTGGGCTTTGATGCCATCACTATCACCAAAGACTGAGCAGTCTCTACCCAATCTGCC
TAAGTTACTCAAAGATGGTAATAACAAACAAACGAAAGGATCTCAGTTTGCCAAAGTTCATTCAGAGAC
CCAAGACATGTTGTAAAGCCGACCAAGCTTTCCCGTGATGTGATCCCTAGCAAGTTATGACTCGAGCA
CGTG
```

Erklärung verwendeter Farbcode: Restriktionsschnittstellen Klonierung pCAMBIA 1301, DEG15ΔN - cDNA, Stop-codon, Restriktionsschnittstellen Klonierung in pET18a(+), SKL, CML3-Bindedomäne

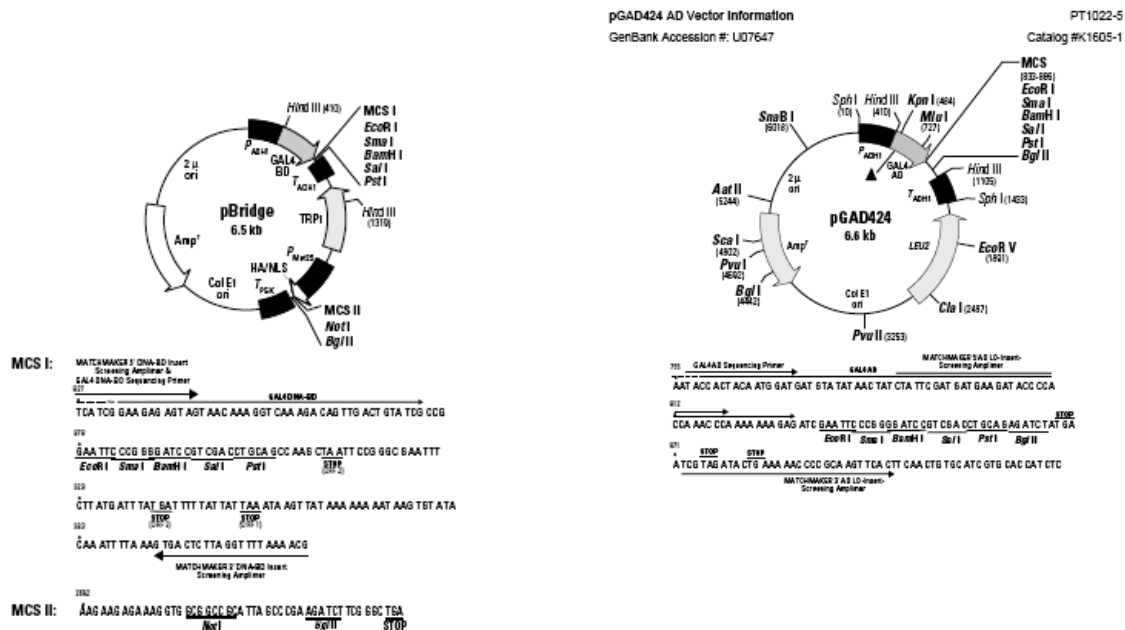
Protein-Sequenz von DEG15ΔN-Terminus-CML3-Bd -T7-6xHis:

```
MDVSKVVSFSRNFVAVLVKVEGPDPKWASGIILNEHGLILTNAHLLEPWRYGKGGVYGEFGKPYVLGAE
EFSSTGSKFWEQKSQTLPRKAPRNHYSSVGENIREYKHNFLQTGHRDIRVRLCHLDSWTWC PANVVYI
CKEQLDIALLLQLEYVPGKLQPI TANFSSPPLGTTAHVVGHGLFGPRCGLSPSICSGVVAKVVHAKRRL
NTQSI SQEVAEF PAMLETTAAVHPGGSGGAVLNSSGHMIGLVT SNARHGAGTVI PHLNFSI PCAVLAP
IFKFAEDMQNTTILQTLDQPSEELSSIWALMPSLSPKTEQSLPNLPKLLKDGNNKQTKGSQFAKFAE
TQDMFVKPTKLSRDVIPSKL-
```

Erklärung verwendeter Farbcode: DEG15ΔN, Stop-codon, SKL, CML3-Bindedomäne

## 5.4.2 DEG15 Volllänge und Deletionskonstrukte für *Yeast-Two-Hybrid* Interaktionsscreen

Deletionskonstrukte in pBridge und pGAD424AD:



Eine Dimerisierung der DEG15 sollte im Yeast-Two-Hybrid System „MATCHMARKER GAL4 Two Hybrid System“ (Clontech) gezeigt werden. Zu diesem Zwecke wurde die DEG15 Volllänge, sowie verkürzte Konstrukte der DEG15 in das Plasmid pBridge bzw. pGAD kloniert. Da die MCSs der beiden Plasmide identische Restriktionsschnittstellen aufweisen, konnten die mit folgenden Primern: Y2HDEG15se, Y2HDEG15as amplifizierten Produkte mittels der Restriktionsschnittstellen EcoRI und SalI sowohl in das pBridge, als auch in das pGAD424AD Plasmid ligiert werden.

Um das Deletionskonstrukt DEG15ΔLoop zu erhalten wurde für die PCR das Konstrukt pET28a(+)-DEG15ΔLoop -T7-6xHis, in dem der pflanzenspezifische Loop in der katalytischen Tasche der DEG15 durch eine Dreipunkt-Ligation bereits entfernt wurde, als Template eingesetzt.

Im Folgenden sind die cDNA-Sequenzen der DEG15 (Volllänge) und deren Deletionskonstrukte, sowie das dazu gehörige *in silico*- Transcript aufgelistet:

cDNA-Sequenz von DEG15 (Volllänge) pBridge:

```
TCATCGGAAGAGAGTAGTAACAAAGGTCAAAGAGGTCAAABACAGTTGACTATATCGCCGGAATTCAG
TGGATGTGTCTAAAGTTGTCAGCTTTTCCCAGGAATTTTCGCCGTCTTGGTCAAAGTCGAAGGCCCTGA
TCCAAAGGGATTGAAGATGAGGAAGCATGCTTTTCATCAATACCATTCTGGCAATGCAACACTTTCA
GCTTCTGGGATCTTGCTTCCAAGAGATATTTTTTTGAGTGGTGAGGTGCGTGTCTAAGGTTCTGTTTG
AAGCTGGTCAGGACATGGCCCTGGTTTTGACCGTTGCATCTGTTGTTGAGCCATTCTTAACATTAGG
TCACAGAAGTAGTAGTATCTCTCAGGATCCGGTGAAGCTTATTCGGGGTGTATGATTGAGATT
ATGGTGGAGGGTCAGCTAAAGTCAGAAAAGGAAGCTCCTTTTTGGGTTCTTGCGCAACTTCTTTTCGC
TGTTTGGATGTCCCTGTATCTTCTGCTGCACTTCAATCTCTTATTGAAGCTTCTTCTGGTTCGAAAAG
TTCTGGATGGGATATTGGTTGGTCTTTGGTTTTCTGCTGCTAATGGTTCTCAGCCTTCAATCAATATT
GAACATTACAGCAAGCCCTTGTATGCAACTTGTATGAGCCACACAACGCTAACTTCATGGCCAAGTCTG
CCACTCGAATGGCTATTCTAGGAGTCCCCTTAAGTTTACTGGGTCAACCAAGCATGAATTTGTCTTC
ATCAAGTAGCAAGGGTGATACACTTGTAGCATTAGGCTCTCCCTTTGGAATCCTTTACCTGTTAAC
TTTTTTAACAGCGTATCAACTGGTTCCATTGCGAATAGCTATCCTTCTGGATCCCTAAAGAAGTCAC
TGATGATAGCTGATGTTCCGATGTCTCCCTGGAATGGAAGGGGCTCCGGTGTTTGCTAAGAATGGGCA
CTTAATTGGCATTTTGATTAGACCACTAAGGCAAAAAGAATAGCGGCGTTGAAATTCAGCTGGTGGTT
CCATGGGGAGCAATCACAAGTCTTGCAGCCACTTGTGCTTGGAGAACCATCTGTAGAAGGAAAAG
CAAGTCAGTGGGGGAGCGAAGTCCTAAGTGTAAATCAGATGCTAGTATTCCTGCACAAGTGGCTAT
TGAGAAGGCGATGGAATCAGTTTGTCTTATTACGGTCAATGATGGTGTTTGGGCTTCTGGTATTATT
CTTAACGAACATGGTCTCATACTAACAAATGCTCACCTGCTTGGAGCCGTGGAGGTATGGAAAAGGTG
GTGTATATGGTGAAGGATTTAAACCTATGTCTTAGGAGCCGAGGAATTTTCTTCCACGGGAAGTAA
ATTTTGGGAACAGAAGAGTCAAACATTGCCACGGAAAGCTCCACGAAATCATTATTTCGTCTGTGGGA
GAGAACATCAGGGAATACAAACACAATTTCCCTCAGACTGGGCATAGAGACATACGTGTGCGTTTGT
GTCACCTAGATTCTTGGACTTGGTGTCCCTGCAAACGTGGTCTATATTTGCAAGGAACAATTAGATAT
TGCCTTACTGCAGCTAGAATATGTCCCTGGAAAGCTCCAACCTATTACTGCCAATTTTTCTTCTCCT
CCTTTGGGTACAACAGCGCATGTTGTTGGACATGGACTCTTCGGACCAAGATGTGGGCTTTCTCCTT
CTAATTGTTCTGGAGTTGTAGCAAAGGTAGTTTACGCAAGAGGAGATTGAATACGCAATCCATTTC
TCAAGGATCGCAGAGTTCCCCGTATGCTCGAAACAACAGCTGCTGTGCATCCTGGTGGCAGTGGT
GGTGTCTTCTCAATTCAAGTGGCCATATGATTGGACTTGTACCAGCAACGACATGGAGCGG
GGACTGTTATACCGCATCTCAACTTCAAGTATGCTGCAAGCAACAGCTGCTGTGCATCCTGGTGGCAGT
AGAAGATATGCAGAACACAACGATCCTTCAAACACTTGTATCAACCTAGCGAAGAAGTCTCATCCATT
TGGGCTTTGATGCCATCACTATCACCAAAGACTGAGCAGTCTTACCCAATCTGCCTAAGTTACTCA
AAGATGGTAATAACAAACAAACGAAAGGATCTCAGTTTGCCTAAGTTCAATTGCAGAGACCCAAGACAT
GTTTGTAAAGCCGACCAAGCTTTCCCCTGATGTGATCCCTGTCGAC
```

Erklärung verwendeter Farbcode: DEG15-cDNA, Stop-codon, Restriktionsschnittstellen Klonierung in pBridge, GAL4 DNA-Bindedomäne

Proteins-Sequenz von DEG15 (Volllänge) pBridge:

```
MKLLSSIEQACDICRLKCLKCSKEKPKCAKCLKNNWECRYSPKTKRSPLTRAHLTEVESRLERLEQL
FLLIFPREDLDMILKMDLQDIKALLTGLFVQDNVNKDAVTDRLASVETDMPPLTLRQHRISATSSSE
ESSNKGQRQLTVSPEFMDVSKVVSFSRNFAVLVKVEGPDPKGLKMRKHAFHQYHSGNATLSASGILL
PRDIFLSGEVAAKVLFEAGQDMALVLTVASVVEPFLTLGHRTSSSISQDPVKLIPGAMIEIMVEGQL
KSEKEAPFWVPAQLLSLVDVPVSSAALQSLIEASSGSKDSGWDIGWSLVSAAANGSQPSINIEHYSKP
LMQLDEPHNANFMAKSATRMAILGVPLSLGQPSMNFASSSSKGDTLVALGSPFGILSPVNFNSVS
TGSIANSYPSGLKSLMIADVRCLPGMEGAPVFAKNHGLIGILIRPLRQKNSGVEIQLVVPWGAIT
TACSHLLLEEPSVEGKASQWGSEVLSVKSDASIPAQVAIEKAMESVCLITVNDGVWASGIILNEHGL
ILTNAHLLEPWRYGKGGVYGEFVKPYVLGAEFFSSTGSKFWEQKSQLPRKAPRNHYSSVGENIREY
KHNFLQTGHRDIRVRLCHLDSWTWC PANVVIKCEQLDIALQLLEYVPGKLQPIANFSSPPLGTTA
HVVGHLFGPRCGLSPSICSGVVAKVVHAKRRLNTQSISQEVAEFPAMLETTAAVHPGGSGGAVLNS
SGHMIGLVTSNARHGAGTVIPLNFSIPCAVLAPIFKFAEDMQNTTILQTLDQPSEELSSIWALMPS
LSPKTEQSLPNLPKLLKDGNNKQTKGSQFAKFAETQDMFVKPTKLSRDVIP
```

Erklärung verwendeter Farbcode: DEG15-cDNA, GAL4 DNA-Bindedomäne

cDNA-Sequenz von DEG15 (Volllänge) pGAD424AD:

```
AAATCGACTACAATGGATGATGTATATAACTATCTATTTCGATGATGAAGATACGCCAGAATTCATGG
ATGTGTCTAAAGTTGTCAGCTTTTCCCAGAAATTCGCCGCTTTGGTCAAAGTCGAAGGCCCTGATCC
AAAGGGATGAAGATGAGGAAGCATGCTTTTCATCAATACCATTTCTGGCAATGCAACACTTTCAGCT
TCTGGGATCTTGCTTCCAAGAGATATTTTTTTTGGAGTGGTGAAGTTCGCTGCTAAGGTTCTGTTTGAAG
CTGGTCAGGACATGGCCCTGGTTTTGACCGTTGCATCTGTTGTTGAGCCATTCTTAACATTAGGTCA
CAGAACTAGTAGTAGTATCTCTCAGGATCCGGTGAAGCTTATTCGGGTGCTATGATTGAGATTATG
GTGGAGGGTCAGCTAAAAGTCAGAAAAGGAAGCTCCTTTTTTGGGTTCCTGCGCAACTTCTTTCGCTGG
TTGATGTCCCTGTATCTTCTGCTGCACCTCAATCTCTTATTGAAGCTTCTTCTGGTTCGAAAGATTCT
TGGATGGGATATTGGTTGGTCTTTGGTTCTGCTGCTAATGGTTCTCAGCCTTCAATCAATATTGAA
CATTACAGCAAGCCCTTGATGCAACTTGATGAGCCACACAACGCTAAC TTCATGGCCCAAGTTCGCCA
CTCGAATGGCTATTCTAGGAGTCCCTTAAAGTTTACTGGGTCAACCAAGCATGAATTTTGCCTTCAATC
AAGTAGCAAGGGTGATACACTTTGTAGCACTAGGCTCTCCCTTTGGAAATCCTTTCCACTGTTAACTTT
TTTAAACAGCGTATCAACTGGTTCATTTGCGAATAGCTATCCCTTCTGGATCCCTAAAGAAGTCACTGA
TGATAGCTGATGTTGATGTTCTCCCTGGAAATGGAAGGGGCTCCGGTGTTTGCTAAGAATGGGCACCTT
AATTGGCATTTTGATTAGACCCTAAGGCAAAAGAAATAGCGGCGTTGAAATTCAGCTGGTGGTTCCA
TGGGGAGCAATCACAACTGCTTGCAGCCACTTGCCTGCTTGGAGGAACCATCTGTAGAAGGAAAAGCAA
GTCAGTGGGGGAGCGAAGTCTTAAAGTGTAAATCAGATGCTAGTATTCCTGCACAAGTGGCTATTGA
GAAGGCGATGGAATCAGTTTGTCTTATTACGGTCAATGATGGTGTGGGCTTCTGGTATTATCTCTT
AACGAACATGGTCTCATACTAACAAATGCTCACCTGCTTGGAGCCGTGGAGGTATGGAAAAGGTGGTG
TATATGGTGAAGGATTTAAACCCTATGTCTTAGGAGCCGAGGAATTTTCTTCCACGGGAAGTAAATTT
TTGGGAACAGAAGAGTCAAACATTTGCCACGGAAAGCTCCACGAAATCATTATTCTGCTGTTGGAGAG
AACATCAGGGAATACAAAACAATTTCCCTTCAGACTGGGCATAGAGACATACGTGTGCGTTTGTGTC
ACCTAGATTCTTGGACTTGGTGTCTTGCAAAAGTGGTCTATATTTGCAAGGAACAATTAGATATTGC
CTTACTGCAGCTAGAAATATGTCCCTGGAAAAGTCCAACCTATTACTGCCAATTTTTCTTCTCTCTCT
TTGGGTACAACAGCGCATGTTGTTGGACATGGACTCTTTCGGACCAAGATGTGGGCTTTCTCTCTCTTA
TTTGTCTCTGGAGTTGTAGCAAAGGTAGTTTACGCAAAGAGGAGATTGAATACGCAATCCATTTCTCA
AGAAGTCTCAAGTTCCCGCTATGCTCGAAACAACAGCTGCTGTGCATCCCTGGTGGCAGTGGTGGT
GCTGTCTCAATTTCAAGTGGCCATATGATTGGACTTGTACCAGCAACGCAAGACATGGAGCGGGGA
CTGTTATACCGCATCTCAACTTCAGCATCCCATGTGCAGTCTTGGCACCAATCTTCAAGTTTGCAGA
AGATATGCAGAACACAACGATCCCTTCAAACACTTGATCAACCTAGCGAAGAACTCTCATCCATTTGG
GCTTTGATGCCATCACTATCACCAAAGACTGAGCAGTCTCTACCCAATCTGCCTAAGTTACTCAAAG
ATGGTAATAACAAAACAACGAAAGGATCTCAGTTTGGCAAAGTTCATTGCAGAGACCCAAGACATGTT
TGTAAGCCGACCAAGCTTTCCCGTGATGTGATCCCTGTCGAC
```

Erklärung verwendeter Farbcode: DEG15-cDNA, Stop-codon, Restriktionsschnittstellen Klonierung in pGAD, GAL4-Aktivierungsdomäne

Proteins-Sequenz von DEG15 (Volllänge) pGAD424AD:

```
MDKAELIPEPPKKRKRKVELGTAANFNQSGNIADSSLSFTFTNSNNGPNLITTTQTNQALSQPIASSN
VHDNFMNNEITASKIDDGNNSKPLSPGWTDQYNAFGITTTGMFNTTTTMDDVYNYLFDDEDTPPNPK
KEILELVDPPGCRNSWMCLKLSAFPGISPSWSKSKALIQRDGMVSKVVSFSRNFAVLVKVEGPDPK
GLKMRKHAFHQYHSGNATLSASGILLPRDIFLSGEVAAKVLFEAGQDMALVLTVASVVEPFLTLGHR
TSSSISQDPVKLIPGAMIEIMVEGQLKSEKEAPFWPAQLLSLVDVPVSSAALQSLIEASSGSKDSG
WDIGWSLVSAANGSQPSINIEHYSKPLMQLEPHNANFMAKSATRMALILGVPLSLLGQPSMNFASSS
SKGDTLVALGSPFGILSPVNFNSVSTGSIANSYPSGSLKKSMLIADVRCLPGMEGAPVFAKNGHLI
GILIRPLRQKNSGVEIQLVVPWGAITTACSHLLLEEPSVEGKASQWGSEVLSVKSDASIPAQVAIEK
AMESVCLITVNDGVWASGII LNEHGLILTNAHLLLEPWRYGKGVYEGEFKPYVLGAEFSSSTGSKFW
EQKSQTLPRKAPRNHYSSVGENIREYKHNFLQTGHRDIRVRLCHLDSWTWC PANVVYICKEQLDIAL
LQLEYVPGKLQPI TANFSSPPLGTTAHVVGHGLFGPRCGLSPSICSGVVAKVVHAKRRLNTQSISQE
VAEFPAMLETAAVHPGGSGGAVLNSSGHMI GLVTSNARHGAGTVI PHLNFSIPCAVLAPIFKFAED
MQNTTILQTL DQ PSEELSSI WALMP SLS PKTEQSLPNLPKLLKDGNNKQTKGSQFAKFAIETQDMFV
KPTKLSRDVIP
```

Erklärung verwendeter Farbcode: DEG15-cDNA, GAL4-Aktivierungsdomäne



cDNA-Sequenz von DEG15Δ1/3N-Terminus pBridge:

```
TCATCGGAAGAGAGTAGTAACAAAGGTCAAAGAGGTCAAABACAGTTGACTATATCGCCGGAATTCA
GTAGTAGTATCTCTCAGGATCCGGTGAAGCTTATTTCCGGGTGCTATGATTGAGATTATGGTGGAGGG
TCAGCTAAAGTCAGAAAAGGAAGCTCCTTTTTGGGTTTCTGCGCAACTTCTTTTCGCTGGTTGATGTC
CCTGTATCTTCTGCTGCACCTCAATCTCTTATTGAAGCTTCTTCTGGTTTCGAAAGATTCTGGATGGG
ATATTGGTTGGTCTTTGGTTTCTGCTGCTAATGGTTCTCAGCCTTCAATCAATATTGAACATTACAG
CAAGCCCTTGATGCAACTTGATGAGCCACACAACGCTAACTTCATGGCCAAGTCTGCCACTCGAATG
GCTATTCTAGGAGTCCCCTTAAGTTTACTGGGTCAACCAAGCATGAATTTTGCTTCATCAAGTAGCA
AGGGTGATACACTTGTAGCACTAGGCTCTCCCTTTGGAATCCTTTCACCTGTTAACTTTTTAACAG
CGTATCAACTGGTTCATTGCGAATAGCTATCCTTCTGGATCCCTAAAGAAGTCACTGATGATAGCT
GATGTTTCGATGTCTCCCTGGAATGGAAGGGGCTCCGGTGTGTTGCTAAGAATGGGCACTTAATTGGCA
TTTTGATTAGACCACTAAGGCAAAAGAATAGCGGCGTTGAAATTCAGCTGGTGGTTCCATGGGGAGC
AATCACAACTGCTTGCAGCCACTTGTGCTTGGAGGAACCATCTGTAGAAGGAAAAGCAAGTCAGTGG
GGGAGCGAAGTCCCTAAGTGTAAATCAGATGCTAGTATTCCTGCACAAGTGGCTATTGAGAAGGCGA
TGGAATCAGTTTGTCTTATTACGGTCAATGATGGTGTGTTGGGCTTCTGGTATTATTCTTAACGAACA
TGGTCTCATACTAACAAATGCTCACCTGCTTGAGCCGTGGAGGTATGGAAAAGGTGGTGTATATGGT
GAAGGATTTAAACCCTATGTCTTAGGAGCCGAGGAATTTTCTTCCACGGGAAGTAAATTTTGGGAAC
AGAAGAGTCAAACATTGCCACGGAAAGCTCCACGAAATCATTATTTCGTCTGTTGGAGAGAACATCAG
GGAATACAAACACAATTTCTTTCAGACTGGGCATAGAGACATACGTGTGCGTTTGTGTACCTTAGAT
TCTTTGGACTTGGTGTCTTGCACAAACGTGGTCTATATTTGCAAGGAACAATTAGATATTGCCCTTACTGC
AGCTAGAATATGTCCCTGGAAAGCTCCAACCTATTACTGCCAATTTTTCTTCTCCTTCTTTGGGTAC
AACAGCGCATGTTGTTGGACATGGACTCTTCGGACCAAGATGTGGGCTTCTCCTTCTATTGTTCT
GGAGTTGTAGCAAAGGTAGTTTACGCAAAGAGGAGATTGAATACGCAATCCATTTCTCAAGAAGTCG
CAGAGTTCCCCGCTATGCTCGAAACAACAGCTGCTGTGCATCCTGGTGGCAGTGGTGGTGTGTTCT
CAATTCAAGTGGCCATATGATTGGACTTGTACCAGCAACGCAAGACATGGAGCGGGGACTGTTATA
CCGCATCTCAACTTCAGCATCCCATGTGCAGTCTTGGCACCAATCTTCAAGTTTGCAGAAGATATGC
AGAACACAACGATCCTTCAAACACTTGATCAACCTAGCGAAGAACTCTCATCCATTTGGGCTTTGAT
GCCATCACTATCACCAAAGACTGAGCAGTCTTACCCAATCTGCCTAAGTTACTCAAAGATGGTAAT
AACAAACAACGAAAGGATCTCAGTTTGCCAAGTTCATTGCAGAGACCCAAGACATGTTTGTAAGC
CGACCAAGCTTTCCCGTGATGTGATCCCTGTCGAC -
```

Erklärung verwendeter Farbcode: DEG15Δ1/3N-Terminus -cDNA, Stop-codon, Restriktionsschnittstellen Klonierung in pBridge, GAL4 DNA-Bindedomäne

Proteins-Sequenz von DEG15Δ1/3N-Terminus pBridge:

```
MKLLSSIEQACDICRLKLLKCSKEKPKCAKCLKNNWECRYSPKTKRSPLTRAHLTEVESRLERLEQL
FLLIFPREDLDMILKMDLQDIKALLTGLFVQDNVNKDAVTDRLASVETDMLPLTLRQHRISATSSSE
ESSNKGQRQLTVSPEFSSSISQDPVKLI PGAMIEIMVEGQLKSEKEAPFWVPAQLLSLVDVPVSSAA
LQSLIEASSGSKD SGWDIGWLSVSAANGSQPSINIEHYSKPLMQLDEPHNANFMAKSATRMA ILGVP
LSLLGQPSMNFASSSSKGD TLVALGSPFGILSPVNFNSVSTGSIANSYPSGSLKKS LMIADVRCLP
GMEGAPVFAKNGHLIGILIRPLRQKNSGVEIQLVVPWGAITTACSHLLLEEPSVEGKASQWGSEVLS
VKSDASIPAQVAIEKAMESVCLITVNDGVWASGIILNEHGLILTNAHLLEPWRYGKGGVYGE GFKPY
VLGAE EFSSTGSKFWEQKSQTLPRKAPRNHYSSVGENIREYKHNFLQTGHRDIRVRLCHLD SWTWCP
ANVVYICKEQLDIAL LQLEYVPGKLQPI TANFSSPPLGTTAHVVGHGLFGPRCGLSPSICSGVVAKV
VHAKRRLNTQSI SQEVAEF PAMLETTAAVHPGGSGGAVLNSSGHMI GLVTSNARHGAGTVI PHLNFS
IPC AVLAPIFKFAEDMQNTTILQTL DQPSEELSSI WALMPSLSPKTEQSLPNLPKLLKDGNNKQTKG
SQFAK FIAETQDMFVKPTKLSRDVIP
```

Erklärung verwendeter Farbcode: DEG15-cDNA, GAL4 DNA-Bindedomäne

cDNA-Sequenz von DEG15Δ1/3N-Terminus pGAD424AD:

```
AAATCGACTACAATGGATGATGTATATAACTATCTATTTCGATGATGAAGATACGCCA GAATTCAGTA
GTAGTATCTCTCAGGATCCGGTGAAGCTTATTTCCGGGTGCTATGATTGAGATTATGGTGGAGGGTCA
GCTAAAGTCAGAAAAGGAAGCTCCTTTTTGGGTTCCTGCGCAACTTCTTTTCGCTGGTTGATGTCCCT
GTATCTTCTGCTGCACTTCAATCTCTTATTGAAGCTTCTTCTGGTTTCGAAAGATTCTGGATGGGATA
TTGGTTGGTCTTTGGTTTCTGCTGCTAATGGTTCTCAGCCTTCAATCAATATTGAACATTACAGCAA
GCCCTTGATGCAACTTGATGAGCCACACAACGCTAACTTCATGGCCAAGTCTGCCACTCGAATGGCT
ATTCTAGGAGTCCCCTTAAGTTTACTGGGTCAACCAAGCATGAATTTTGCCTTCATCAAGTAGCAAGG
GTGATACACTTGTAGCACTAGGCTCTCCCTTTGGAAATCCTTTCACCTGTTAACTTTTTTAACAGCGT
ATCAACTGGTTCCATTGCGAATAGCTATCCTTCTGGATCCCTAAAGAAGTCACTGATGATAGCTGAT
GTTTCGATGTCTCCCTGGAATGGAAGGGGCTCCGGTGTTTGCTAAGAATGGGCACCTAAATGGCATT
TGATTAGACCCTAAGGCAAAAAGAAATAGCGGCTTGAAATTCAGCTGGTGGTCCATGGGGAGCAAT
CACAACCTGCTGCAGCCACTTGTCTGCTTGTAGAACCACTCTGTAGAAGGAAAAGCAAGTGGGGG
AGCGAAGTCTTAAAGTTTAAATCAGATGCTAGTATTTCCCTGCACAAGTGGCTATTGAGAAGCGGATGG
AATCAGTTTGTCTTATTACGGTCAATGATGGTGTTTGGGCTTCTGGTATTATTCTTAAACGAACATGG
TCTCATACTAACAAATGCTCACCTGCTTGTAGCCGTGGAGGTATGGAAAAGGTGGTGTATATGGTGAA
GGATTTAAACCTTATGTCTTAGGAGCCGAGGAATTTTCTTCCACGGGAAGTAAATTTTGGGAACAGA
AGAGTCAAAACATTGCCACGAAAAGCTCCACGAAATCATTATTCGTCTGTGGAGAGAACATCAGGGA
ATACAAACACAATTTCTTTCAGACTGGGCATAGAGACATACGTGTGCGTTTGTGTCCCTAGATTCT
TGGACTTGGTGTCTTGC AAAACGTGGTCTATAATTTGCAAGGAACAATTAGATATTGCCCTTACTGCAGC
TAGAATATGTCCCTGAAAAGCTCCAACCTATTACTGCCAATTTTTCTTCTCCTCCTTTGGGTACAAC
AGCGCATGTTGTTGGACATGGACTCTTCGACCAAGATGTGGGCTTCTCCTTCTATTTGTTCTGGA
GTTGTAGCAAAGGTAGTTTACGCAAGAGGAGATTGAATACGCAATCCATTTCTCAAGAAGTGCAG
AGTTCCCCGCTATGCTCGAAAACAACAGCTGCTGTGCATCCTGGTGGCAGTGGTGGTGTCTTCTCAA
TTCAAGTGGCCATATGATTGGACTTGTACCAGCAACGCAAGACATGGAGCGGGGACTGTTATACCG
CATCTCAACTTCAGCATCCCATGTGCAGTCTTGGCACCAATCTTCAAGTTTGCAGAAGATATGCAGA
ACACAACGATCCTTCAAACACTTGATCAACCTAGCGAAGAATCTCATCCATTTGGGCTTTGATGCC
ATCACTATCACAAAAGACTGAGCAGTCTTACCCAATCTGCCTAAGTTACTCAAAGATGGTAATAAC
AAACAAACGAAAAGGATCTCAGTTTGC AAGTTCAATGCAGAGACCCAAGACATGTTTGTAAAGCCGA
CCAAGCTTTCCCGTGATGTGATCCCTGTCGAC
```

Erklärung verwendeter Farbcode: DEG15Δ1/3N-Terminus -cDNA, Stop-codon, Restriktionsschnittstellen Klonierung in pGAD, GAL4-Aktivierungsdomäne

Proteins-Sequenz von DEG15Δ1/3N-Terminus pGAD424AD:

```
MDKAELIPEPPKKRKRKVELGTAANFNQSGNIADSSLSFTFTNSSNGPNLITTTQTNQALSQPIASSN
VHDNFMNNEITASKIDDGNSKPLSPGWTDQAYNAFGITTMGMFNTTMDDVYNYLFDDEDTPPNPK
KEILELVDPPGCRNSWMCLKLSAFPGISPSWSKSKALIQRDGSSSISQDPVKLIPGAMIEIMVEGQL
KSEKEAPFWVPAQLLSLVDVPVSSAALQSLIEASSGSKDSGWDIGWLSLVAANGSQPSINIEHYSKP
LMQLDEPHNANFMAKSATRMALGVPLSLGQPSMNFASSSSKGDTLVALGSPFGILSPVNFNSVS
TGSIANSYPSGSLKSLMIADVRLPGMEGAPVFAKNHGLIGILIRPLRQKNSGVEIQLVVPWGAIT
TACSHLLLEEPSVEGKASQWGSEVLSVKSDASIPAQVAIEKAMESVCLITVNDGVWASGIILNEHGL
ILLTNAHLLLEPWRYGKGVYGEFGKPYVLGAEFFSSTGSKFWEQKSQTLPRKAPRNYSSVGENIREY
KHNFLQTGHRDIRVRLCHLDSWTWCPANVVYICKEQLDIALLQLEYVPGKLQIPITANFSSPPLGTTA
HVVGHGLFGPRCGLSPSICSGVVAKVVHAKRRLNTQSSISQEVAEFPAMLETAAVHPPGSGGAVLNS
SGHMIGLVTSNARHGAGTVIPLHNFSPICAVLAPIFKFAEDMQNTTILQTLDQPSEELSSIWALMPS
LSPKTEQSLPNLPKLLKDGNNKQTKGSQFAKFAETQDMFVKPTKLSRDVIP
```

Erklärung verwendeter Farbcode: DEG15-cDNA, GAL4-Aktivierungsdomäne

cDNA-Sequenz von DEG15Δ2/3N-Terminus pBridge:

```
TCATCGGAAGAGAGTAGTAACAAAGGTCAAAGAGGTCAAABACAGTTGACTATATCGCCGGAATTCG
TCCCCCTTAAGTTTACTGGGTCAACCAAGCATGAATTTTGGCTTCATCAAGTAGCAAGGGTGATACACT
TGTAGCACTAGGCTCTCCCTTTGGAATCCTTTTACCTGTAACTTTTTTAAACAGCGTATCAACTGGT
TCCATTGCGAATAGCTATCCTTCTGGATCCCTAAAGAAGTCACTGATGATAGCTGATGTTTCGATGTC
TCCCTGGAATGGAAGGGGCTCCGGTGTGCTAAGAATGGGCACTTAATTGGCATTGATGATAGACC
ACTAAGGCAAAAGAATAGCGGCGTTGAAATTCAGCTGGTGGTTCCATGGGGAGCAATCACAACTGCT
TGCAGCCACTTGCTGCTTGAGGAACCATCTGTAGAAGGAAAAGCAAGTCAGTGGGGGAGCGAAGTCC
TAAGTGTAAATCAGATGCTAGTATTCCTGCACAAGTGGCTATTGAGAAGGCGATGGAATCAGTTTG
TCTTATTACGGTCAATGATGGTGTGTTGGGCTTCTGGTATTATTCTTAAACGAACATGGTCTCATACTA
ACAAATGCTCACCTGCTTGAGCCGTGGAGGTATGGAAAAGGTGGTGTATATGGTGAAGGATTTAAAC
CCTATGTCTTAGGAGCCGAGGAATTTCTTCCACGGGAAGTAAATTTTGGGAACAGAAGAGTCAAAC
AATTGCCAGGAAAGCTCCACGAAATCATTATTCGTGTTGGAGAGAACATCAGGGAATACAAACAC
AATTTCCCTTTCAGACTGGGCATAGAGACATACGTGTGCGTTTGTGTCACCTAGATTCTTGGACTTGGT
GTCCTGCAAACGTGGTCTATATTTGCAAGGAACAATTAGATATTGCCTTACTGCAGCTAGAATATGT
CCCTGGAAAGCTCCAACCTATTACTGCCAATTTTTCTTCTCCTCCTTTGGGTACAACAGCGCATGTT
GTTGGACATGGACTCTTCGGACCAAGATGTGGGCTTTCTCCTTCTATTTGTTCTGGAGTTGTAGCAA
AGGTAGTTCACGCAAAGAGGAGATTGAATACGCAATCCATTTCTCAAGAAGTCGCAGAGTTCCCCGC
TATGCTCGAAACAACAGCTGCTGTGCATCCTGGTGGCAGTGGTGGTGTGCTGTTCTCAATTCAAGTGGC
CATATGATTGGACTTGTTACCAGCAACGCAAGACATGGAGCGGGGACTGTTATACCGCATCTCAACT
TCAGCATCCCATGTGCAGTCTTGGCACCAATCTTCAAGTTTGCAGAAGATATGCAGAACACAACGAT
CCTTCAAACACTTGATCAACCTAGCGAAGAAGTCTCATCCATTTGGGCTTTGATGCCATCACTATCA
CCAAAGACTGAGCAGTCTCTACCCAATCTGCCTAAGTTACTCAAAGATGGTAATAACAAACAAACGA
AAGGATCTCAGTTTGCCAAGTTCATTGCAGAGACCCAAGACATGTTTGTAAAGCCGACCAAGCTTTC
CCGTGATGTGATCCCTGTCGAC-
```

Erklärung verwendeter Farbcode: DEG15Δ2/3N-Terminus -cDNA, Stop-codon, Restriktionsschnittstellen Klonierung in pBridge, GAL4 DNA-Bindedomäne

Proteins-Sequenz von DEG15Δ2/3N-Terminus pBridge:

```
MKLLSSIEQACDICRLKLLKCSKEKPKCAKCLKNWECRYSPKTKRSPLTRAHLTEVESRLERLEQL
FLLIFPREDLDMILKMDSLQDIKALLTGLFVQDNVNKDAVTDRLASVETDMPLTLRQHRI SATSSSE
ESSNKGQRQLTVSPEFVPLSLLGQPSMNFASSSSKGDTLVALGSPFGILSPVNFNSVSTGSIANSY
PSGSLKKSMLIADVRCLPGMEGAPVFAKNGHLIGILIRPLRQKNSGVEIQLVVPWGAITTACSHLLL
EEPSVEGKASQWGSEVLSVKSDASIPAQVAIEKAMESVCLITVNDGVWASGIILNEHGLILTNAHLL
EPWRYGKGGVYGEFVKPYVLGAEFFSSTGSKFWEQKSQTLPRKAPRNHYSSVGENIREYKHNFLQTG
HRDIRVRLCHLDSWTWCPANVVYICKEQLDIALLOLEYVPGKLQPIITANFSSPPLGTTAHVVGHGLF
GPRCGLSPSICSGVVAKVVHAKRRLNTQSI SQEVAEFPAMLETTAAVHPGGSGGAVLNSSGHMIGLV
TSNARHGAGTVI PHLNFSIPCAVLAPIFKFAEDMQNTTILQTLDQPSEELSSIWALMPSLSPKTEQS
LPNLPKLLKDGNNKQTKGSQFAKFAETQDMFVKPTKLSRDVIP
```

Erklärung verwendeter Farbcode: DEG15-cDNA, GAL4 DNA-Bindedomäne

cDNA-Sequenz von DEG15Δ2/3N-Terminus pGAD424AD:

```
AATACGACTACAATGGATGATGTATATAACTATCTATTTCGATGATGAAGATACGCCA GAATTCGTCC
CCTTAAGTTTACTGGGTCAACCAAGCATGAATTTTGGCTTCATCAAGTAGCAAGGGTGATACACTTGT
AGCACTAGGCTCTCCCTTTGGAATCCTTTTACCTGTAACTTTTTTAAACAGCGTATCAACTGGTTCC
ATTGCGAATAGCTATCCTTCTGGATCCCTAAAGAAGTCACTGATGATAGCTGATGTTTCGATGTTCC
CTGGAATGGAAGGGGCTCCGGTGTGCTAAGAATGGGCACTTAATTGGCATTGATGATAGACCACT
```

AAGGCAAAAAGAAATAGCGGCGTTGAAAATTCAGCTGGTGGTTCCATGGGGAGCAATCACAACCTGCTTGC  
AGCCACTTGCTGCTTGAGGAACCATCTGTAGAAGGAAAAGCAAGTCAGTGGGGGAGCGAAGTCCTAA  
GTGTTAAATCAGATGCTAGTATTCCTGCACAAGTGGCTATTGAGAAGGCGATGGAATCAGTTTGTCT  
TATTACGGTCAATGATGGTGTGGGCTTCTGGTATTATTCTTAACGAACATGGTCTCATACTAACA  
AATGCTCACCTGCTTGAGCCGTGGAGGTATGGAAAAGGTGGTGTATATGGTGAAGGATTTAAACCCCT  
ATGTCTTAGGAGCCGAGGAATTTTCTTCCACGGGAAGTAAATTTTGGGAACAGAAGAGTCAAACATT  
GCCACGGAAAAGCTCCACGAAATCATTATTCGTCTGTTGGAGAGAACATCAGGGAATACAAAACAAT  
TTCCTTCAGACTGGGCATAGAGACATACGTGTGCGTTTGTGTACCTAGATTCTTGGACTTGGTGTG  
CTGCAAACGTGGTCTATATTTGCAAGGAACAATTAGATATTGCCTTACTGCAGCTAGAATATGTCCC  
TGGAAAAGCTCCAACCTATTACTGCCAATTTTTCTTCTCCTCCTTTGGGTACAACAGCGCATGTTGTT  
GGACATGGACTCTTCGGACCAAGATGTGGGCTTCTCCTTCTATTTGTTCTGGAGTTGTAGCAAAGG  
TAGTTACACGCAAAGAGGAGATTGAATACGCAATCCATTTCTCAAGAAGTCGCAGAGTTCCCCGCTAT  
GCTCGAAAACAACAGCTGCTGTGCATCCTGGTGGCAGTGGTGGTGTGTTCTCAATTCAAGTGGCCAT  
ATGATTGGACTTGTACCAGCAACGCAAGACATGGAGCGGGGACTGTTATACCGCATCTCAACTTCA  
GCATCCCATGTGCAGTCTTGGCACCAATCTTCAAGTTTGCAGAAGATATGCAGAACACAACGATCCT  
TCAAACACTTGATCAACCTAGCGAAGAACTCTCATCCATTTGGGCTTTGATGCCATCACTATACCA  
AAGACTGAGCAGTCTCTACCCAATCTGCCAAGTTACTCAAAGATGGTAATAACAAAACAAAACGAAAG  
GATCTCAGTTTGCCAAGTTCATTCAGAGACCCAAGACATGTTTGTAAAGCCGACCAAGCTTTCCCG  
TGATGTGATCCCTGTCGAC

Erklärung verwendeter Farbcode: DEG15Δ2/3N-Terminus -cDNA, Stop-codon, Restriktionsschnittstellen Klonierung in pGAD, GAL4-Aktivierungsdomäne

Proteins-Sequenz von DEG15Δ2/3N-Terminus pGAD424AD:

MDKAELIPEPPKKKRKVELGTAANFNQSGNIADSSLSFTFTNSNGPNLITTTQTN SQALSQPIASSN  
VHDNFMNEITASKIDDGNN SKPLSPGWTDQAYNAFGITTMGMFN TTMDDVYNYLFDDEDTPPNPK  
KEILELVDPPGCRNSWMCLKLSAFPGISPSWSKSKALIQRDGVPLSLLGQPSMNFASSSSKGDTLVA  
LGSPFGILSPVNFNSVSTGSIANSYPSGSLKSLMIADVRC LPMEGAPVFAKNH LIGILIRPLR  
QKNSGVEIQLVVPWGAIT TACSHLLLEEPSVEGKASQWGSEVLSVKSDASIPAQVAIEKAMESVCLI  
TVNDGVWASGIILNEHGLILTNAHLLLEPWRYGKGVYGE GFKPYVLGAEFFSSTGSKFWEQKSQTLR  
RKAPRNHYSSVGENIREYKHNFLQTGHRDIRVRLCHLDSWTWC PANVVYICKEQLDIALLOLEYVPG  
KLQPI TANFSSPPLGTTAHVVGHGLFGPRCGLSPSICSGVVAKVVHAKRRLNTQSISQEVAEF PAML  
ETTA AVHPGGSGGAVLNSSGHMIGLVT SNARHGAGTVI PHLNFSIPCAVLAPIFKFAEDMQNTTILQ  
TLDQPSEELSSIWALMPSLSPKTEQSLPNLPKLLKDGNNKQTKGSQFAKFAETQDMFVKPTKLSRD  
VIP

Erklärung verwendeter Farbcode: DEG15-cDNA, GAL4-Aktivierungsdomäne

cDNA-Sequenz von DEG15ΔN-Terminus pBridge:

```
TCATCGGAAGAGAGTAGTAACAAAGGTCAAAGAGGTCAAABACAGTTGACTATATCGCCGGAATTC  
GGGCTTCTGGTATTATTCTTAACGAACATGGTCTCATACTAACAAATGCTCACCTGCTTGAGCCGTG  
GAGGTATGGAAAAGGTGGTGTATATGGTGAAGGATTTAAACCCTATGTCTTAGGAGCCGAGGAATTT  
TCTTCCACGGGAAGTAAATTTTGGGAACAGAAGAGTCAAACATTGCCACGGAAAGCTCCACGAAATC  
ATTATTCGTCTGTTGGAGAGAACATCAGGGAATACAAACACAATTTCCCTTCAGACTGGGCATAGAGA  
CATACGTGTGCGTTTGTGTACCTAGATTCTTGGACTTGGTGTCTGCAAACGTGGTCTATATTTGC  
AAGGAACAATTAGATATTGCCTTACTGCAGCTAGAATATGTCCCTGGAAAGCTCCAACCTATTA  
CTG  
CCAATTTTTCTTCTCCTCCTTTGGGTACAACAGCGCATGTTGTTGGACATGGACTCTTCGGACCAAG  
ATGTGGGCTTTCTCCTTCTATTTGTTCTGGAGTTGTAGCAAAGGTAGTTCACGCAAAGAGGAGATTG  
AATACGCAATCCATTTCTCAAGAAGTCGCAGAGTTCCCCGCTATGCTCGAAACAACAGCTGCTGTGC  
ATCCTGGTGGCAGTGGTGGTGTCTGTTCTCAATTCAAGTGGCCATATGATTGGACTTGTACCAGCAA  
CGAAGACATGGAGCGGGGACTGTTATACCGCATCTCAACTTCAGCATCCCATGTGCAGCTTTGGCA  
CCAATCTTCAAGTTTGCAGAAGATATGCAGAACACAACGATCCTTCAAACACTTGTATCAACCTAGCG  
AAGAACTCTCATCCATTTGGGCTTTGATGCCATCACTATCACCAAAGACTGAGCAGTCTCTACCCAA  
TCTGCCTAAGTTACTCAAAGATGGTAATAACAAACAAACGAAAGGATCTCAGTTTGCCAAGTTCATT  
GCAGAGACCCAAGACATGTTTGTAAAGCCGACCAAGCTTTCCCGTGATGTGATCCCTGTCGAC-
```

Erklärung verwendeter Farbcode: DEG15ΔN-Terminus -cDNA, Stop-codon, Restriktionsschnittstellen  
Klonierung in pBridge, GAL4 DNA-Bindedomäne

Proteins-Sequenz von DEG15ΔN-Terminus pBridge:

```
MKLLSSIEQACDICRLKLLKCSKEKPKCAKCLKNNWECRYSPKTKRSPLTRAHLTEVESRLERLEQL  
FLLIFPREDLDMILKMDLQDIKALLTGLFVQDNVNKDAVTDRLASVETDMPLTLRQHRI SATSSSE  
ESSNKGQRQLTVSPEFWASGIILNEHGLILTNAHLLEPWRYGKGGVYEGEFKPYVLGAEFFSSTGSK  
FWEQKSQTLPRKAPRNHYSSVGENIREYKHNFLQTGHRDIRVRLCHLDSWTWCPANVVYICKEQLDI  
ALLQLEYVPGKLQPITANFSSPPLGTTAHVVGHLFGPRCGLSPSICSGVVAKVVHAKRRLNTQSSIS  
QEVAEFPAMLETTAAVHPGGSGGAVLNSSGHMIGLVTSNARHGAGTVIPLNFSIPCAVLAPIFKFA  
EDMQNTTILQTLQDQSEELSSIWALMPSLSPKTEQSLPNLPKLLKDGNNKQTKGSQFAKFAETQDM  
FVKPTKLSRDVIP
```

Erklärung verwendeter Farbcode: DEG15-cDNA, GAL4 DNA-Bindedomäne

cDNA-Sequenz von DEG15ΔN-Terminus pGAD424AD:

```
AAATCGACTACAATGGATGATGTATATAACTATCTATTTCGATGATGAAGATACGCCA GAATTC TGGG
CTTCTGGTATTATTCTTAACGAACATGGTCTCATACTAACAAATGCTCACCTGCCTTGAGCCGTGGAG
GTATGGAAAAGGTGGTGTATATGGTGAAGGATTTAAACCCATATGCTTTAGGAGCCGAGGAATTTTCT
TCCACGGGAAGTAAATTTTGGGAACAGAAGAGTCAAACATTGCCACGGAAAGCTCCACGAAATCATT
ATTTCGTCTGTGGAGAGAACATCAGGGAATACAAACACAATTTCCCTTCAGACTGGGCATAGAGACAT
ACGTGTGCGTTTTGTGTCAACCTAGATTCTTTGGACTTGGTGTCCCTGCAAACGTGGTCTATATTTGCAAG
GAACAATTAGATATTGCCCTTACTGCAGCTAGAATATGTCCCTGGAAAGCTCCAACCTATTACTGCCA
ATTTTTCTTCTCCTCCTTTGGGTACAACAGCGCATGTTGTTGGACATGGACTCTTCGGACCAAGATG
TGGGCTTTCTCCTTCTATTTGTTCTGGAGTTGTAGCAAAGGTAGTTACGCAAAGAGGAGATTGAAT
ACGCAATCCATTTCTCAAGAAGTCGCAGAGTTCCCCGCTATGCTCGAAACAACAGCTGCTGTGCATC
CTGGTGGCAGTGGTGGTGTCTTCTCAATTC AAGTGGCCATATGATTGGACTTGT TACCAGCAACGC
AAGCATGGAGCGGGACTGTTATACCGCATCTCAACTTCAGCATCCCATGTGCAGTCTTGCCACCA
ATCTTCAAGTTTGCAGAAGATATGCAGAACACAACGATCCCTTCAAACACTTGATCAACCTAGCGAAG
AACTCTCATCCATTTGGGCTTTGATGCCATCACTATCACCAAAGACTGAGCAGTCTCTACCCAATCT
GCCTAAGTTACTCAAAGATGGTAATAACAAACAAACGAAAGGATCTCAGTTTGCCAAGTTTCAATTGCA
GAGACCCAAGACATGTTTGTAAAGCCGACCAAGCTTTCCCGTGATGTGATCCCTGTCGAC -
```

Erklärung verwendeter Farbcode: DEG15ΔN-Terminus -cDNA, Stop-codon, Restriktionsschnittstellen  
Klonierung in pGAD, GAL4-Aktivierungsdomäne

Proteins-Sequenz von DEG15ΔN-Terminus pGAD424AD:

```
MDKAE L I P E P P K K R K V E L G T A A N F N Q S G N I A D S S L S F T F T N S S N G P N L I T T Q T N S Q A L S Q P I A S S N
V H D N F M N N E I T A S K I D D G N N S K P L S P G W T D Q T A Y N A F G I T T G M F N T T T M D D V Y N Y L F D D E D T P P N P K
K E I L E L V D P P G C R N S W M C L K L S A F P G I S P S W S K S K A L I Q R D G W A S G I I L N E H G L I L T N A H L L E P W R Y
G K G G V Y G E G F K P Y V L G A E E F S S T G S K F W E Q K S Q T L P R K A P R N H Y S S V G E N I R E Y K H N F L Q T G H R D I R
V R L C H L D S W T W C P A N V V Y I C K E Q L D I A L L Q L E Y V P G K L Q P I T A N F S S P P L G T T A H V V G H G L F G P R C G
L S P S I C S G V V A K V V H A K R R L N T Q S I S Q E V A E F P A M L E T T A A V H P G G S G G A V L N S S G H M I G L V T S N A R
H G A G T V I P H L N F S I P C A V L A P I F K F A E D M Q N T T I L Q T L D Q P S E E L S S I W A L M P S L S P K T E Q S L P N L P
K L L K D G N N K Q T K G S Q F A K F I A E T Q D M F V K P T K L S R D V I P
```

Erklärung verwendeter Farbcode: DEG15-cDNA, GAL4-Aktivierungsdomäne

cDNA-Sequenz von DEG15ΔC-Terminus pBridge:

```
TCATCGGAAGAGAGTAGTAACAAAGGTCAAAGAGGTCAAABACAGTTGACTATATCGCCGGAATTCATG
GATGTGTCTAAAGTTGTCAGCTTTTCCCAGAAATTTCCGCCGTCTTGGTCAAAGTTCGAAGGCCCTGATCCA
AAGGGATTGAAGATGAGGAAGCATGCTTTTCATCAATACCATTCTGGCAATGCAACACTTTCAGCTTCT
GGGATCTTGCTTCCAAGAGATATTTTTTTGAGTGGTGAGGTCGCTGCTAAGGTTCTGTTTGAAGCTGGT
CAGGACATGGCCCTGGTTTTGACCGTTGCATCTGTTGTTGAGCCATTCTTAACATTAGGTCACAGAACT
AGTAGTAGTATCTCTCAGGATCCGGTGAAGCTTATTTCCGGGTGCTATGATTGAGATTATGGTGGAGGGT
CAGCTAAAGTCAGAAAAGGAAGCTCCTTTTTGGGTTCCTGCGCAACTTCTTTTCGCTGGTTGATGTCCCT
GTATCTTCTGCTGCACTTCAATCTCTTATTGAAGCTTCTTCTGGTTCGAAAAGATTCTGGATGGGATATT
GGTTGGTCTTTGGTTTCTGCTGCTAATGGTTCTCAGCCTTCAATCAATATTGAACATTACAGCAAGCCC
TTGATGCAACTTGATGAGCCACACAACGCTAACTTCATGGCCAAGTCTGCCACTCGAATGGCTATTCTA
GGAGTCCCCTTAAGTTTACTGGGTCAACCAAGCATGAATTTTGTTCATCAAGTAGCAAGGGTGATACA
CTTGATGACTAGGCTCTCCCTTTGGAATCCTTTCACCTGTTAACTTTTTTAACAGCGTATCAACTGGT
TCCATTGCGAATAGCTATCCTTCTGGATCCCTAAAGAAGTCACTGATGATAGCTGATGTTTCGATGTCTC
CCTGGAATGGAAGGGGCTCCGGTGTGTTGCTAAGAATGGGCACTTAATTGGCATTTTGATTAGACCACTA
AGGCAAAAGAATAGCGGCGTTGAAATTCAGCTGGTGGTTCCATGGGGAGCAATCACAACTGCTTGCAGC
CACTTGCTGCTTGAGGAACCATCTGTAGAAGGAAAAGCAAGTCAGTGGGGGAGCGAAGTCCCTAAGTGT
AAATCAGATGCTAGTATTCTGCACAAGTGGCTATTGAGAAGGCGATGGAATCAGTTTTGTCTTATTACG
GTCAATGATGGTGTGTTGGGCTTCTGGTATTATTCTTAACGAACATGGTCTCATACTAACAAATGCTCAC
CTGCTTGAGCCGTGGAGGTATGGAAAAGGTGGTGTATATGGTGAAGGATTTAAACCCTATGTCTTAGGA
GCCGAGGAATTTCTTCCACGGGAAGTAAATTTTGGGAACAGAAGAGTCAAACATTGCCACGGAAAGCT
CCACGAAATCATTATTCTGCTGTTGGAGAGAACATCAGGGAATACAAACACAATTTCTTTCAGACTGGG
CATAGAGACATACGTGTGCGTTTTGTGTCACCTAGATTCTTGGACTTGGTGTCTGCAAACGTGGTCTAT
ATTTGCAAGGAACAATTAGATATTGCCTTACTGCAGCTAGAATATGTCCCTGGAAAAGCTCCAACCTATT
ACTGCCAATTTTTCTTCTCCTCCTTTGGGTACAACAGCGCATGTTGTTGGACATGGACTCTTCGGACCA
AGATGTGGGCTTTCTCCTTCTATTTGTTCTGGAGTTGTAGCAAAGGTAGTTTACGCAAAGAGGAGATTG
AATACGCAATCCATTTCTCAAGAAGTCGCAGAGTTCCCCGCTATGCTCGAAAACAACAGCTGCTGTGCAT
CCTGGTGGCAGTGGTGGTGTCTTCTCAATTCAAGTGGCCATATGATTGGACTTGTACCAGCAACGCA
AGACATGGAGCGGGGACTGTTATACCGCATCTCAACTTCAGCATCCCATGTGTCGAC
```

Erklärung verwendeter Farbcode: DEG15ΔC-Terminus -cDNA, Stop-codon, Restriktionsschnittstellen  
Klonierung in pBridge, GAL4 DNA-Bindedomäne

Proteins-Sequenz von DEG15ΔC-Terminus pBridge:

```
MKLLSSIEQACDICRLKCLKSKEKPKCAKCLKNNWECRYSPKTKRSPLTRAHLTEVESRLERLEQL
FLLIFPREDLDMILKMDLQDIKALLTGLFVQDNVNKDAVTDRLASVETDMPPLTRQHRISATSSSE
ESSNKGQRQLTVSPEFMDVSKVVSFSRNFAVLVKVEGPDPKGLKMRKHAFHQYHSGNATLSASGILL
PRDIFLSGEVAAKVLFEAGQDMALVLTVASVVEPFLTLGHRTSSSISQDPVKLIPGAMIEIMVEGQL
KSEKEAPFWVPAQLLSLVDVPVSSAALQSLIEASSGSKDSGWDIGWSLVSAAANGSQPSINIEHYSKP
LMQLDEPHNANFMAKSATRMAILGVPLSLLGQPSMNFASSSSKGDTLVALGSPFGILSPVNFNSVS
TGSIANSYPSGLKSLMIADVRCPLPMEGAPVFAKNGHLIGILIRPLRQKNSGVEIQLVVPWGAIT
TACSHLLLEEPSVEGKASQWGSEVLSVKSDASIPAQVAIEKAMESVCLITVNDGVWASGII LNEHGL
ILTNAHLLEPWRYGKGGVYGEFVKPYVLGAEFSSSTGSKFWEQKSQTLPRKAPRNHYSSVGENIREY
KHNFLQTGHRDIRVRLCHLDSWTWC PANVVYICKEQLDIALLQLEYVPGKLQPI TANFSSPPLGTTA
HVVGHGLFGPRCGLSPSICSGVVAKVVHAKRRLNTQSISQEVAEFPAMLET TAAVHPGGSGGAVLNS
SGHMIGLVT SNARHGAGTVI PHLNFSIPC
```

Erklärung verwendeter Farbcode: DEG15-cDNA, GAL4 DNA-Bindedomäne

cDNA-Sequenz von DEG15ΔC-Terminus pGAD424AD:

```
AAATCGACTACAATGGATGATGTATATAACTATCTATTTCGATGATGAAGATACGCCA GAATTC ATGGAT
GTGTCTAAAGTTGTCAGCTTTTCCCGGAATTTTCGCCGCTTTGGTCAAAGTCGAAGGCCCTGATCCAAAG
GGATTGAAGATGAGGAAGCATGCTTTTCATCAATACCATTCTGGCAATGCAACACTTTCAGCTTCTGGG
ATCTTGCTTCCAAGAGATATTTTTTTGAGTGGTGGTTCGCTGCTAAGGTTCTGTTTGAAGCTGGTCAG
GACATGGCCCTGGTTTTGACCGTTGCATCTGTTGTTGAGCCATTCTTAACATTAGGTCACAGAAC TAGT
AGTAGTATCTCTCAGGATCCGGTGAAGCTTATTCGGGTGCTATGATTGAGATTATGGTGGAGGGTCAG
CTAAAGTCAGAAAAGGAAGCTCCTTTTTGGGTTCCTGCGCAACTTCTTTTCGCTGGTTGATGTCCCTGTA
TCTTCTGCTGCACTTCAATCTCTTATTTGAAGCTTCTTCTGGTTCGAAAAGATTCTGGATGGGATATGGT
TGGTCTTTGGTTTCTGCTGCTAATGGTTCTCAGCCTTCAATCAATATTTGAACATTACAGCAAGCCCTTG
ATGCAACTTGATGAGCCACACAACGCTAACCTTCATGGCCAAGTCTGCCACTCGAATGGCTATTTCTAGGA
GTCCCTTAAGTTTACTGGGTCAACCAAGCATGAAATTTTGCCTCATCAAGTAGCAAGGGTGATACACTT
GTAGACATAGCTCTCCCTTTGGAATCCTTTTACCTGTTAACTTTTAAACAGCGTATCAACTGGTTCC
ATTGCGAATAGCTATCCCTTCTGGATCCCTAAAGAAGTCACTGATGATAGCTGATGTTTCGATGTCTCCCT
GGAATGGAAGGGCTCCGGTGTGTTGCTAAGAAATGGGCACTTAATTGGCATTGTTGATTAGACCAC TAAGG
CAAAAAGAATAGCGGCGTTGAAAATTCAGCTGGTGGTTCCATGGGGAGCAATCACAAC TGTTCAGCCAC
TTGCTGCTTGAGGAACCATCTGTAGAAGGAAAAGCAAGTCAAGTGGGGGAGCGAAGTCC TAAGTGTAAA
TCAGATGCTAGTATTCCTGCACAAGTGGCTATTTGAGAAGGCGATGGAATCAGTTTGTCTTATACGGTC
AATGATGGTGTGTTGGGCTTCTGGTATTAATCTTAAACGAACATGGTCTCATACTAACAAATGCTCACCTG
CTTGAGCCGTGGAGGTATGGAAGGTTGGTGTATATGGTGAAGGATTTAAACCC TATGTCTTAGGAGCC
GAGGAATTTTCTTCCACGGGAAGTAAATTTTGGGAACAGAAGAGTCAAACATTGCCACGGAAAGCTCCA
CGAAATCATTATTCGCTGTGTTGGAGAGAACATCAGGGAATACAAACACAATTTCC TTCAGACTGGGCAT
AGAGACATACGTGTGCGTTTTGTGTCACCTAGATTCTTTGGACTTGGTGTCC TCGAAACGTGGTCTATATT
TGCAAGGAACAATTAGATATTCCTTACTGCAGCTAGAATATGTCCCTGGAAAGCTCCAACCTATTACT
GCCAATTTTCTTCTCCTCCTTTGGGTACAACAGCGCATGTTGTTGGACATGGACTCTTCGGACCAAGA
TGTGGGCTTTCTCCTTCTATTTGTTCTGGAGTTGTAGCAAAGGTAGTTCACGCAAAGAGGAGATTGAAT
ACGCAATCCATTTCTCAAGAAGTCGCAGAGTTCCCCGCTATGCTCGAAACAACAGCTGCTGTGCATCCT
GGTGGCAGTGGTGGTGTGTTCTCAATTC AAGTGGCCATATGATTGGACTTGT TACCAGCAACGCAAGA
CATGGAGCGGGGACTGTTATACCGCATCTCAACTTCAGCATCCCATGT GTCGAC
```

Erklärung verwendeter Farbcode: DEG15ΔC-Terminus -cDNA, Stop-codon, Restriktionsschnittstellen  
Klonierung in pGAD, GAL4-Aktivierungsdomäne

Proteins-Sequenz von DEG15ΔC-Terminus pGAD424AD:

```
MDKAELIPEPPKKKRKVELGTAANFNQSGNIADSSLSFTFTNSNGPNLITTTQTN SQALSQPIASSN
VHDNFMNNEITASKIDDGNSKPLSPGWTDQAYNAFGITTMGMFNTTMDDVYNYLFDDEDTPPNPK
KEILELVDPPGCRNSWMCLKLSAFPGISPSWSKSKALIQRDGMDVSKVVSFSRNFAVLVKVEGPDPK
GLKMRKHAFHQYHSGNATLSASGILLPRDIFLSGEVAAKVLFEAGQDMALVLTVA SVVEPFLT LGHR
TSSSISQDPVKLIPGAMIEIMVEGQLKSEKEAPFWPAQLLSLVDVPVSSAALQSLIEASSGSKDSG
WDIGWSLVSAANGSQPSINIEHYSKPLMQLDEPHNANFMAKSATRMALGVPLSLLGQPSMNFASS
SKGDTLVALGSPFGILSPVNFNSVSTGSIANSYPSGSLKSLMIADVRCLPGMEGAPVFAKNHGLI
GILIRPLRQKNSGVEIQLVVPWGAITTACSHLLLEEPSVEGKASQWGSEVLSVKSDASIPAQVAIEK
AMESVCLITVNDGVWASGIILNEHGLILLTNAHLLLEPWRYGKGGVYEGGFKPYVLGAE EFSSTGSKFW
EQKSQTLPRKAPRNHYSSVGENIREYKHNFLQTGHRDIRVRLCHLDSWTWC PANVVYICKEQLDIAL
LQLEYVPGKLQPI TANFSSPPLGTTAHVVGHGLFGPRCGLSPSICSGVVAKVVHAKRRLNTQSISQE
VAEFPAMLETAAVHPGGSGGAVLNSSGHMIGLVTSNARHGAGTVI PHLNFSIPC
```

Erklärung verwendeter Farbcode: DEG15-cDNA, GAL4-Aktivierungsdomäne



cDNA-Sequenz von DEG15ΔLoop pBridge:

```
TCATCGGAAGAGAGTAGTAACAAAGGTCAAAGAGGTCAAABACAGTTGACTATATCGCCGGAATTCATG
GATGTGTCTAAAGTTGTCAGCTTTTCCCAGGAATTTTCGCCGTCTTGGTCAAAGTTCGAAGGCCCTGATCCA
AAGGGATTGAAGATGAGGAAGCATGCTTTTCATCAATACCATTCTGGCAATGCAACACTTTCAGCTTCT
GGGATCTTGCTTCCAAGAGATATTTTTTTGAGTGGTGAGGTCGCTGCTAAGGTTCTGTTTGAAGCTGGT
CAGGACATGGCCCTGGTTTTGACCGTTGCATCTGTTGTTGAGCCATTCTTAACATTAGGTACAGAACT
AGTAGTAGTATCTCTCAGGATCCGGTGAAGCTTATTCCGGGTGCTATGATTGAGATTATGGTGGAGGGT
CAGCTAAAGTCAGAAAAGGAAGCTCCTTTTTGGGTTCCTGCGCAACTTCTTTTCGCTGGTTGATGTCCCT
GTATCTTCTGCTGCACTTCAATCTCTTATTGAAGCTTCTTCTGGTTCGAAAAGATTCTGGATGGGATATT
GGTTGGTCTTTGGTTTCTGCTGCTAATGGTTCTCAGCCTTCAATCAATATTGAACATTACAGCAAGCCC
TTGATGCAACTTGATGAGCCACACAACGCTAACTTCATGGCCAAGTCTGCCACTCGAATGGCTATTCTA
GGAGTCCCCTTAAGTTTACTGGGTCAACCAAGCATGAATTTTGTTCATCAAGTAGCAAGGGTGATACA
CTTGTAGCACTAGGCTCTCCCTTTGGAATCCTTTACACCTGTTAACTTTTTTAACAGCGTATCAACTGGT
TCCATTGCGAATAGCTATCCTTCTGGATCCCTAAAGAAGTCACTGATGATAGCTGATGTTTCGATGTCTC
CCTGGAATGGAAGGGGCTCCGGTGTGTTGCTAAGAATGGGCACTTAATTGGCATTTTGATTAGACCACTA
AGGCAAAAGAATAGCGGCGTTGAAATTCAGCTGGTGGTTCCATGGGGAGCAATCACAACTGCTTGCAGC
CACTTGCTGCTTGAGGAACCATCTGTAGAAGGAAAAGCAAGTCAGTGGGGGAGCGAAGTCTTAAGTGT
AAATCAGATGCTAGTATTCTGCACAAGTGGCTATTGAGAAGGCGATGGAATCAGTTTGTCTTATTACG
GTCAATGATGGTGTGAGCTCGCAGTCTTGGCACCAATCTTCAAGTTTGCAGAAGATATGCAGAACACA
ACGATCCTTCAAACACTTGATCAACCTAGCGAAGAACTCTCATCCATTTGGGCTTTGATGCCATCACTA
TCACCAAAGACTGAGCAGTCTCTACCCAATCTGCCTAAGTTACTCAAAGATGGTAATAACAAACAAACG
AAAGGATCTCAGTTTGCCAAGTTCATTGCAGAGACCCAAGACATGTTTGTAAAGCCGACCAAGCTTCC
CGTGATGTGATCCCTGTCGAC-
```

Erklärung verwendeter Farbcode: DEG15ΔLoop -cDNA, Stop-codon, Restriktionsschnittstellen Klonierung in pBridge, GAL4 DNA-Bindedomäne, eingefügte SacI-Schnittstelle

Proteins-Sequenz von DEG15 (Volllänge) pBridge:

```
MKLLSSIEQACDICRLKLLKCSKEKPKCAKCLKNNWECRYSPKTKRSPLTRAHLTEVESRLERLEQL
FLLIFPREDLDMILKMDSLQDIKALLTGLFVQDNVNKDAVTDRLASVETDMPLTLRQHRI SATSSSE
ESSNKGQRQLTVSPEFMDVSKVVVFSRNFAVLVKVEGPDPKGLKMRKHAFHQYHSGNATLSASGILL
PRDIFLSGEVAAKVLFEAGQDMALVLTVASVVEPFLTLGHRTSSSISQDPVKLI PGAMIEIMVEGQL
KSEKEAPFWVPAQLLSLVDVPVSSAALQSLIEASSGSKDSGWDIGWSLVSAANGSQPSINIEHYSK
LMQLDEPHNANFMAKSATRMAILGVPLSLLGQPSMNFASSSSKGDTLVALGSPFGILSPVNFNSVS
TGSIANSYPSGSLKKSLMIADVRCPLPGMEGAPVFAKNGHLIGILIRPLRQKNSGVEIQLVVPWGAIT
TACSHLLLEEPSVEGKASQWGSEVLSVKSDASIPAQVAIEKAMESVCLITVNDGVELAVLAPIFKFA
EDMQNTTILQTLQDQPSSEELSSIWALMPSLSPKTEQSLPNLPKLLKDGNNKQTKGSQFAKFAETQDM
FVKPTKLSRDVIP
```

Erklärung verwendeter Farbcode: DEG15-cDNA, GAL4 DNA-Bindedomäne

cDNA-Sequenz von DEG15ΔLoop pGAD424AD:

```
AAATCGACTACAATGGATGATGTATATAACTATCTATTTCGATGATGAAGATACGCCA GAATTC ATGGAT
GTGTCTAAAGTTGTCAGCTTTTCCCGGAATTTTCGCCGTCCTTGGTCAAAGTCGAAGGCCCTGATCCAAAG
GGATTGAAGATGAGGAAGCATGCTTTTCATCAATACCAATCTGGCAATGCAACACTTTCAGCTTCTGGG
ATCTTGCTTCCAAGAGATATTTTTTTGAGTGGTGGTTCGCTGCTAAGGTTCTGTTTTGAAGCTGGTCAG
GACATGGCCCTGGTTTTGACCGTTGCATCTGTTGTTGAGCCATTCCTTAACATTAGGTCACAGAAC TAGT
AGTAGTATCTCTCAGGATCCGGTGAAGCTTATTCGGGGTGCATGATTGAGATTATGGTGGAGGGTTCAG
CTAAAGTCAGAAAAGGAAGCTCCTTTTTGGGGTTCCTGCGCAACTTCTTTTCGCTGGTTGATGTCCCTGTA
TCTTCTGCTGCACCTCAATCTCTTATTTGAAGCTTCTTCTGGTTCGAAAAGATTCTGGATGGGATATGGT
TGGTCTTTGGTTCTGCTGCTAATGGTTCTCAGCCTTCAATCAATATTTGAACATTACAGCAAGCCCTTG
ATGCAACTTGATGAGCCACACAACGCTAACCTTCATGGCCAAGTCTGCCACTCGAATGGCTATTTCTAGGA
GTCCCTTAAGTTTACTGGGTCAACCAAGCATGAAATTTTGCTTCATCAAGTAGCAAGGGTGATACACTT
GTAGCAATAGGCTCTCCCTTTGGAATCCCTTTCACCTGTTAACTTTTTTAACAGCGTATCAACTGGTTCC
ATTGCGAATAGCTATCCTTCTGGATCCCTAAAGAAGTCACTGATGATAGCTGATGTTTCGATGTCTCCCT
GGAATGGAAGGGGCTCCGGTGTGTTGCTAAGAATGGGCACCTTAATTGGCATTGATTAGACCAC TAAGG
CAAAAAGAAATAGCGGCGTTGAAAATTCAGCTGGTGGTTCCATGGGGAGCAATCACAAC TGTTCAGCCAC
TTGCTGCTTGAGGAACCATCTGTAGAAGGAAAAGCAAGTCAAGTGGGGGAGCGAAGTCC TAAGTGTAAA
TCAGATGCTAGTATTCCTGCACAAGTGGCTATTTGAGAAGGCGATGGAATCAGTTTGTCTTATACGGTC
AATGATGGTGTTSAGCTG GCAGTCTTGGCACCAATCTTCAAGTTTGCAGAAGATATGCAGAACACAACG
ATCCTTCAAACACTTGATCAACCTAGCGAAGAATCTCATCCATTTGGGCTTTGATGCCATCACTATCA
CCAAAGACTGAGCAGTCTCTACCCAATCTGCCTAAGTTACTCAAAGATGGTAATAACAAAACAAACGAAA
GGATCTCAGTTTGC AAGTTCATTGCAGAGACCCAAGACATGTTTGTAAAGCCGACCAAGCTTTCCCGT
GATGTGATCCCTGTTCGAC
```

Erklärung verwendeter Farbcode: DEG15ΔLoop-cDNA, Stop-codon, Restriktionsschnittstellen Klonierung in pGAD, GAL4-Aktivierungsdomäne, eingefügte SacI-Schnittstelle

Proteins-Sequenz von DEG15 (Volllänge) pGAD424AD:

```
MDKAELIPEPPKKRKRKVELGTAANFNQSGNIADSSLSFTFTNSNGPNLIITQTNSQALSQPIASSN
VHDNFMNNEITASKIDDGNNSKPLSPGWTDQTAYNAGFITTMGMFNTTMDDVYNYLFDEDEDTPPNPK
KEILELVDPPGCRNSWMCLKLSAFPGISPSWSKSKALIQRDGMDVSKVVSFSRNFVAVLVKVEGPDPK
GLKMRKHAFHQYHSGNATLSASGILLPRDIFLSGEVAAKVLFEAGQDMALVLTVASVVEPFLT LGHR
TSSSI SQDPVKLIPGAMIEIMVEGQLKSEKEAPFWVPAQLLSLVDVPVSSAALQSLIEASSGKDSG
WDIGWSLVSAANGSQPSINIEHYSKPLMQLD EPHNANFMAKSATRMAILGVPLSLLGQPSMNFASSS
SKGDTLVALGSPFGILSPVNFNSVSTGSIANSYPSGSLKSLMIADVRC LPMEGAPVFAKNHGLI
GILIRPLRQKNSGVEIQLVVPWGAITTACSHLLL EEPSVEGKASQWGSEVLSVKSDASIPAQVAIEK
AMESVCLITVNDGVELAVLAPIFKFAEDMQNTTILQTL DQPSEELSSIWALMPSLSPKTEQSLPNLP
KLLKDGNNKQTKGSQFAKFAETQDMFVKPTKLSRDVIP
```

Erklärung verwendeter Farbcode: DEG15-cDNA, GAL4-Aktivierungsdomäne

### 5.4.3 DEG15-T7-6xHis-Tag und DEG15-6xHis-Tag zur Überexpression in *E.coli*

Klonierung DEG15-T7-6xHis-Tag:

Die DEG15-cDNA wird mit den folgenden Primern: pET28se, pET28as amplifiziert und mittels der Restriktionsschnittstellen EcoRI und XhoI in das Plasmid pET28 a (+) ligiert, um das später exprimierte Protein mit einem T7-Tag und einem His-Tag zu versehen.

```
ATGGGCAGCAGC CATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCAT ATGGCTAGC
ATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCC GAATTCATGGATGTGTCTAAAGTTGTCAGCTTTTCC
CGGAATTTTCGCCGTCTTGGTCAAAGTCGAAGGCCCTGATCCAAAGGGATTGAAGATGAGGAAGCATGCT
TTTCATCAATACCATTCTGGCAATGCAACACTTTCAGCTTCTGGGATCTTGCTTCCAAGAGATATTTT
TTGAGTGGTGAGGTCGCTGCTAAGGTTCTGTTTGAAGCTGGTCAGGACATGGCCCTGGTTTTGACCGTT
GCATCTGTTGTTGAGCCATTCTTAACATTAGGTCACAGAAGTCTAGTAGTATCTCTCAGGATCCGGTG
AAGCTTATTCGGGTGCTATGATTGAGATTATGGTGGAGGGTCAGCTAAAAGTCAGAAAAGGAAGCTCCT
TTTTGGGTTCCCTGCGCAACTTCTTTCGCTGGTTGATGTCCCTGTATCTTCTGCTGCACTTCAATCTCTT
ATTGAAGCTTCTTCTGGTTCGAAAGATTCTGGATGGGATATTGGTTGGTCTTTGGTTTCTGCTGCTAAT
GGTTCTCAGCCTTCAATCAATATTGAACATTACAGCAAGCCCTTGATGCAACTTGATGAGCCACACAAC
GCTAACTTCATGGCCAAGTCTGCCACTCGAATGGCTATTCTAGGAGTCCCCTTAAGTTACTGGGTCAA
CCAAGCATGAATTTTGCTTCATCAAGTAGCAAGGGTGATACACTTGTAGCACTAGGCTCTCCCTTTGGA
ATCCTTTCACCTGTTAACTTTTTTAACAGCGTATCAACTGGTTCCATTGCGAATAGCTATCCTTCTGGA
TCCCTAAAGAAGTCACTGATGATAGCTGATGTTTCGATGTCTCCCTGGAATGGAAGGGGCTCCGGTGT
GCTAAGAATGGGCACCTAATTGGCATTTTGATTAGACCACTAAGGCAAAAAGAATAGCGGCGTTGAAATT
CAGCTGGTGGTTCATGGGGAGCAATCACAACCTGCTTGCGAGCCACTTGCTGCTTGAGGAACCATCTGTA
GAAGGAAAAGCAAGTCAGTGGGGGAGCGAAGTCCTAAGTGTAAATCAGATGCTAGTATTCCTGCACAA
GTGGCTATTGAGAAGGCGATGGAATCAGTTTGTCTTATTACGGTCAATGATGGTGTGTTGGGCTTCTGGT
ATTATCTTAAACGAACATGGTCTCATACTAACAATGCTCACCTGCTTGAGCCGTGGAGGTATGAAAA
GGTGGTGTATGTTGAAGGATTTAAACCCCTATGTCTTAGGAGCCGAGGAATTTCTTCCACGGGAAGT
AAATTTTGGAACAGAAGAGTCAAACATTGCCACGGAAAGCTCCACGAAATCATTATTCGTCGTGTGGA
GAGAACATCAGGGAATACAAACACAATTTCTTTCAGACTGGGCATAGAGACATACGTGTGCGTTTGTGT
CACCTAGATTCTTGGACTTGGTGTCTGCAACGTGGTCTATATTTGCAAGGAACAATTAGATATTGCC
TACTGCAGCTAGAATATGTCCCTGGAAAGCTCCAACCTATTACTGCCAATTTTCTTCTCCTCCTTTG
GGTACAACAGCGCATGTTGTTGGACATGGACTCTTCGGACCAAGATGTGGGCTTTCTCCTTCTATTTGT
TCTGGAGTTGTAGCAAAGGTAGTTCACGCAAAGAGGAGATTGAATACGCAATCCATTTCTCAAGAAGTC
GCAGAGTTCCTCCGCTATGCTCGAAACAACAGCTGCTGTGCATCCTGGTGGCAGTGGTGGTGTCTTCTC
AATTC AAGTGGCCATATGATTGGACTTGTACCAGCAACGCAAGACATGGAGCGGGGACTGTTATACCG
CATCTCAACTTCAGCATCCCATGTGCAGTCTTGGCACCAATCTTCAAGTTTGCAGAAGATATGCAGAAC
ACAACGATCCTTCAAACACTTGATCAACCTAGCGAAGAAGTCTCATCCATTTGGGCTTTGATGCCATCA
CTATCACC AAAGACTGAGCAGTCTCTACCCAATCTGCCTAAGTTACTCAAAGATGGTAATAACAAACAA
ACGAAAGGATCTCAGTTTGCCAAGTTCATTGCAGAGACCCAAGACATGTTTGTAAAGCCGACCAAGCTT
TCCCGTGTATGTGATCCCT AGCAAGTTATGACTCGAG
```

Erklärung verwendeter Farbcode: **6xHis-Tag**, **T7-Tag**, **DEG15-cDNA**, **Stop-codon**, **Restriktionsschnittstellen Klonierung in pET18a(+)**, **SKL**

Protein-Sequenz von DEG15-T7-6xHis:

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSEFMDVSKVVSFSRNFAVLVKVEGPDPKGLKMRKH  
AFHQYHSGNATLSASGILLPRDIFLSGEVAAKVLFEAGQDMALVLTVASVVEPFLTLGHRTSSSISQD  
PVKLI PGAMIEIMVEGQLKSEKEAPFWVPAQLLSLVDVPVSSAALQSLIEASSGSKDSGWDIGWSLVS  
AANGSQPSINIEHYSKPLMQLDEPHNANFMAKSATRMAILGVPLSLLGQPSMNFASSSSKGDTLVALG  
SPFGILSPVNFNSVSTGSIANSYPSGSLKSLMIADVRLPGMEGAPVFAKNHGLIGILIRPLRQKN  
SGVEIQLVVPWGAITTACSHLLLEEPSVEGKASQWGSEVLSVKSDASIPAQVAIEKAMESVCLITVND  
GVWASGIILNEHGLILTNAHLLLEPWRYGKGGVYEGEFKPYVLGAEFSSSTGSKFWEQKSQTLPRKAPR  
NHYSVGENIREYKHNFLQTGHRDIRVRLCHLDSWTWC PANVVYICKEQLDIALQLLEYVPGKLPIT  
ANFSSPPLGTTAHVVGHGLFGPRCGLSPSICSGVAVKVVHAKRRLNTQSI SQEVAEF PAMLETAAVH  
PGSGGAVLNSSGHMIGLVTSNARHGAGTVI PHLNFSIPCAVLAPIFKFAEDMQNTTILQTLDPSEE  
LSSIWALMPSLSPKTEQSLPNLPKLLKDGNNKQTKGSQFAKFAETQDMFVKPTKLSRDVIPSKL

Erklärung verwendeter Farbcode: 6xHis-Tag, T7-Tag, DEG15, Stop-codon, SKL

Um neben dem oben beschriebenen Protein eine Variante mit C-terminalen His-Tag zu erhalten, wurde die DEG15-cDNA den folgenden Primern: pET24se, pET24as amplifiziert und mittels der Restriktionsschnittstellen EcoRI und XhoI in das Plasmid pET24 a (+) ligiert.

ATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTTCGCGGATCCGAATTCATGGATGTGTCTAAAGTTGTC  
AGCTTTTCCCGAATTTTCGCCGTCTTGGTCAAAGTCGAAGGCCCTGATCCAAAGGGATTGAAGATGAGG  
AAGCATGCTTTTTCATCAATACCATTCTGGCAATGCAACACTTTCAGCTTCTGGGATCTTGCTTCCAAGA  
GATATTTTTTGGAGTGGTGAGGTCGCTGCTAAGGTTCTGTTTTGAAGCTGGTCAGGACATGGCCCTGGTT  
TTGACCGTTGCATCTGTTGTTGAGCCATTCTTAACATTAGGTCACAGAACTAGTAGTAGTATCTCTCAG  
GATCCGGTGAAGCTTATTCCGGGTGCTATGATTGAGATTATGGTGGAGGGTCAGCTAAAGTCAGAAAAG  
GAAGCTCCTTTTTGGGTTCCTGCGCAACTTCTTTTCGCTGGTTGATGTCCCTGTATCTTCTGCTGCACTT  
CAATCTCTTATTGAAGCTTCTTCTGGTTCGAAAGATTCTGGATGGGATATTGGTTGGTCTTTGGTTTCT  
GCTGCTAATGGTTCTCAGCCTTCAATCAATATTGAACATTACAGCAAGCCCTTGATGCAACTTGATGAG  
CCACACAACGCTAACTTCATGGCCAAGTCTGCCACTCGAATGGCTATTCTAGGAGTCCCTTAAGTTTA  
CTGGGTCAACCAAGCATGAATTTTGTTCATCAAGTAGCAAGGGTGATACACTTGTAGCAC TAGGCTCT  
CCCTTTGGAATCCTTTACCTGTTAACTTTTTTAACAGCGTATCAACTGGTTCATTGCGAATAGCTAT  
CCTTCTGGATCCCTAAAGAAGTCACTGATGATAGCTGATGTTTCGATGTCTCCCTGGAATGGAAGGGGCT  
CCGGTGTTTGCTAAGAATGGGCACCTTAATTGGCATTTTTGATTAGACCCTAAGGCAAAAGAATAGCGGC  
GTTGAAATTCAGCTGGTGGTTCCATGGGGAGCAATCACAACTGCTTGCAGCCACTTGCTGCTTGAGGAA  
CCATCTGTAGAAGGAAAAGCAAGTCAGTGGGGGAGCGAAGTCCTAAGTGTAAATCAGATGCTAGTATT  
CCTGCACAAGTGGCTATTGAGAAGGCGATGGAATCAGTTTTGTCTTATTACGGTCAATGATGGTGTTTGG  
GCTTCTGGTATTATTCTTAACGAACATGGTCTCATACTAACAAATGCTCACCTGCTTGAGCCGTGGAGG  
TATGAAAAGGTGGTGTATATGGTGAAGGATTTAAACCTATGTCTTAGGAGCCGAGGAATTTTCTTCC  
ACGGGAAGTAAATTTTGGGAACAGAAGAGTCAAACATTGCCACGAAAGCTCCACGAAATCATTATTCCG  
TCTGTTGGAGAGAACATCAGGGAATACAAACACAAATTTCTTCAGACTGGGCATAGAGACATACGTGTG  
CGTTTTGTGTCACCTAGATTCTTGGACTTGGTGTCCTGCAAACGTGGTCTATATTTGCAAGGAACAATTA  
GATATTGCCTTACTGCAGCTAGAATATGTCCCTGGAAAGCTCCAACCTATTACTGCCAATTTTTCTTCT  
CCTCCTTTGGGTACAACAGCGCATGTTGTTGGACATGGACTCTTCGGACCAAGATGTGGGCTTTCTCCT  
TCTATTTGTTCTGGAGTTGTAGCAAAGGTAGTTACGCAAAGAGGAGATTGAATACGCAATCCATTTCT  
CAAGAAGTCGCAGAGTTCCCGCTATGCTCGAAACAACAGCTGCTGTGCATCCGGTGGCAGTGGTGGT  
GCTGTTCTCAATTCAGTGGCCATATGATTGGACTTGTACCAGCAACGCAAGACATGGAGCGGGGACT  
GTTATACCGCATCTCAACTTCAGCATCCATGTGCAGTCTTGGCACC AATCTTCAAGTTTGCAGAAGAT  
ATGCAGAACAACGATCCTTCAAACACTTGATCAACCTAGCGAAGAACTCTCATCCATTTGGGCTTTG

ATGCCATCACTATCACCAAAGACTGAGCAGTCTCTACCCAATCTGCCTAAGTTACTCAAAGATGGTAAT  
AACAAACAAACGAAAGGATCTCAGTTTGCCAAGTTCATTGCAGAGACCCAAGACATGTTTGTAAGCCG  
ACCAAGCTTCCCGTGATGTGATCCCTAGCAAGTTACTCGAGCACCACCACCACCACCAC TGA

Erklärung verwendeter Farbcode: 6xHis-Tag, T7-Tag, DEG15-cDNA, Stop-codon, Restriktions-  
schnittstellen Klonierung in pET18a(+), SKL

Protein-Sequenz von DEG15-T7-6xHis:

MASMTGGQQMGRGSEFMDVSKVVVFSRNFAVLVKVEGPDPKGLKMRKHAFHQYHSGNATLSASGILLP  
RDIFLSGEVAAKVLFEAGQDMALVLTVASVVEPFLT LGHRTSSSISQDPVKLI PGAMIEIMVEGQLKS  
EKEAPFWVPAQLLSLVDVPVSSAALQSLIEASSGSKDSGWDIGWSLVSAANGSQPSINIEHYSKPLMQ  
LDEPHNANFMAKSATRMAILGVPLSLGQPSMNFASSSSKGD TLVALGSPFGILSPVNFNFSVSTGSI  
ANSYPSGSLKKSLMIADVRCLPGMEGAPVFAKNGHLIGILIRPLRQKNSGVEIQLVVPWGAIITACSH  
LLEEPSVEGKASQWGSEVLSVKSDASIPAQVAIEKAMESVCLITVNDGVWASGIILNEHGLILTNAH  
LLEPWRYGKGGVYGEFVKPYVLGAEFFSSTGSKFWEQKSQTLPRKAPRNHYSSVGENIREYKHNFLQT  
GHRDIRVRLCHLDSWTWCPANVVYICKEQLDIALLOLEYVPGKLPITANFSSPPLGTTAHVVGHGLF  
GPRCGLSPSICSGVVAKVVHAKRRLNTQSI SQEVAEFPAMLETTAAVHPGGSGGAVLNSSGHMIGLVT  
SNARHGAGTVI PHLNFSIPCAVLAPIFKFAEDMQNTTILQTLDQPSEELSSIWALMPSLSPKTEQSLP  
NLPKLLKDGNNKQTKGSQFAKFAETQDMFVKPTKLSRDVIPSKLHHHHHH-

Erklärung verwendeter Farbcode: 6xHis-Tag, T7-Tag, DEG15, Stop-codon, SKL

## 5.5 Verwendete Rückfaltungspuffer

Getestete Puffer:

	pH6	pH6,5	pH7	pH7,5	pH8	pH8,5	pH9	pH9,5
Phosphat-Puffer	20mM	20mM	-	-	-	-	-	-
	40mM	40mM	-	-	-	-	-	-
	100mM	100mM	-	-	-	-	-	-
MOPS	50mM	50mM	50mM	50mM	50mM	50mM	-	-
	100mM	100mM	100mM	100mM	100mM	100mM	-	-
HEPES	-	-	-	-	-	20mM	20mM	20mM
	-	-	-	-	-	40mM	40mM	40mM
	-	-	-	-	-	100mM	100mM	100mM
Tris-HCl	-	-	20mM	20mM	20mM	20mM	20mM	-
	-	-	50mM	50mM	50mM	50mM	50mM	-
	-	-	100mM	100mM	100mM	100mM	100mM	-
	-	-	200mM	200mM	200mM	200mM	200mM	-
	-	-	500mM	500mM	500mM	500mM	500mM	-
	-	-	750mM	750mM	750mM	750mM	750mM	-
	-	-	1000mM	1000mM	1000mM	1000mM	1000mM	-
	-	-	1250mM	1250mM	1250mM	1250mM	1250mM	-

Folgende Substanzen (einzeln und in Kombination) wurden den einzelnen Puffern zugesetzt, um die Faltung des Proteins zu begünstigen:

		Verwendete Konzentrationen							
Salze	NaCl	0mM	50mM	100mM	150mM	200mM	250mM	300mM	350mM
	KCl	0mM	20mM	-	-	-	-	-	-
Mehrwertige Alkohole	Glycerin	0%	5%	10%	15%	-	-	-	-
Polyether	PEG-4000	0%	0,05%	0,1%	0,15%	0,2%	-	-	-
Aminosäuren	Arginin	0mM	50mM	100mM	250mM	500mM	750mM	-	-
	Glutamin	0mM	50mM	100mM	-	-	-	-	-
	Glycin	0mM	25mM	50mM	200mM	-	-	-	-
Detergenzien	CHAPS	0mM	2,5mM	5mM	10mM	-	-	-	-
	NDSB201 <sup>1)</sup>	0mM	500mM	1000mM	1500mM	-	-	-	-
	Zwittergent 3-12 <sup>2)</sup>	0mM	1mM	2mM	3mM	4mM	-	-	-
	Tween	0mM	0,02mM	0,06mM	0,08mM	-	-	-	-
	Triton-X 100	0mM	0,2mM	0,6mM	0,8mM	-	-	-	-
	SDS	0mM	3mM	9mM	12mM	-	-	-	-
	Natriumcholat	0mM	2mM	6mM	8mM	-	-	-	-
Brij	0mM	0,03mM	0,09mM	0,12mM	-	-	-	-	
oxidierende bzw. reduzierende Reagenzien	DTT	0mM	1,25mM	2,5mM	3,75mM	5mM	6,25mM	7,5mM	10mM
	TCEP <sup>3)</sup>	0mM	1,25mM	2,5mM	3,75mM	5mM	6,25mM	7,5mM	10mM
	Gluthation red.	0mM	0,5mM	1mM	5mM	-	-	-	-
	Gluthation ox.	0mM	0,5mM	1mM	5mM	-	-	-	-
weitere Reagenzien:	EDTA	0mM	2mM	5mM	10mM	20mM	-	-	-
	Cu/Zn/Mg/Mn	200mM	-	-	-	-	-	-	-

- 1) NDSB201: 3-(1-Pyridino)-1-propansulfonat
- 2) Zwittergent 3-12: n-Dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-propansulfonat
- 3) TCEP: *Tris*(2-carboxyethyl)-phosphine

## 6 Literaturverzeichnis

**Adam Z.** (2000) Chloroplast proteases: possible regulators of gene expression? *Biochimie*. 82(6-7):647-54.

**Adam Z., Ostersetzer O.** (2001) Degradation of unassembled and damaged thylakoid proteins. *Biochem Soc Trans*. 29(Pt 4):427-30.

**Alexander KA, Wakim BT, Doyle GS, Walsh KA, Storm DR.** (1988) Identification and characterization of the calmodulin-binding domain of neuromodulin, a neurospecific calmodulin-binding protein. *J Biol Chem*. 263(16):7544-9.

**Anastasi A, Knight CG, Barrett AJ.** (1993) Characterization of the bacterial metalloendopeptidase pitrilysin by use of a continuous fluorescence assay. *Biochem J*. 290 ( Pt 2):601-7.

**Andrews TJ, Lorimer GH, Tolbert NE.** (1971) Incorporation of molecular oxygen into glycine and serine during photorespiration in spinach leaves. *Biochemistry*. 10(25):4777-82.

**Ansorge S, Bohley P, Kirschke H, Langner J, Wiederanders B.** (1984) The insulin and glucagon degrading proteinase of rat liver: a metal-dependent enzyme. *Biomed Biochim Acta*. 43(1):39-46.

**Arazi T, Kaplan B, Sunkar R, Fromm H.** (2000) Cyclic-nucleotide- and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-regulated channels in plants: targets for manipulating heavy-metal tolerance, and possible physiological roles. *Biochem Soc Trans*. 28(4):471-5.

**Aviles FJ, Chapman GE, Kneale GG, Crane-Robinson C, Bradbury EM.** (1978) The conformation of histone H5. Isolation and characterisation of the globular segment. *Eur J Biochem*. 88(2):363-71.

**Babu YS, Bugg CE, Cook WJ.** (1988) Structure of calmodulin refined at 2.2 Å resolution. *J Mol Biol*. 204(1):191-204.

**Babu YS, Sack JS, Greenhough TJ, Bugg CE, Means AR, Cook WJ.** (1985) Three-dimensional structure of calmodulin. *Nature*. 315(6014):37-4

**Bähler M, Rhoads A.** (2002) Calmodulin signaling via the IQ motif. *EBS Lett*. 513(1):107-13. Review.

**Barbato G, Ikura M, Kay LE, Pastor RW, Bax A.** (1992) Backbone dynamics of calmodulin studied by <sup>15</sup>N relaxation using inverse detected two-dimensional NMR spectroscopy: the central helix is flexible. *Biochemistry*. 31(23):5269-78.



- Barrett AJ, Rawlings ND.** (2001) Evolutionary lines of cysteine peptidases. *Biol Chem.* 382(5):727-33.
- Baudhuin P, Mueller M, Poole B, Deduve C.** (1965) Non-mitochondrial oxidizing particles (Microbodies) in rat liver and kidney and in tetrahymena pyriformis. *Biochem Biophys Res Commun.* 20:53-9.
- Baum G, Lev-Yadun S, Fridmann Y, Arazi T, Katsnelson H, Zik M, Fromm H.** (1996) Calmodulin binding to glutamate decarboxylase is required for regulation of glutamate and GABA metabolism and normal development in plants. *EMBO J.* 15(12):2988-96.
- Bechtold, N., Ellis, J., and Pelletier, G.** (1993). In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C R Acad Sci Paris, Life Sciences* 316, 1194-1199.
- Becker AB, Roth RA.** (1992) An unusual active site identified in a family of zinc metalloendopeptidases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(9):3835-9.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD.** (2000) Signal transduction. The calcium entry pas de deux. *Science.* 287(5458):1604-5
- Besche H, Zwickl P.** (2004) The *Thermoplasma acidophilum* Lon protease has a Ser-Lys dyad active site. *Eur J Biochem.* 271(22):4361-5.
- Biardi L, Krisans SK.** (1996) Compartmentalization of cholesterol biosynthesis. Conversion of mevalonate to farnesyl diphosphate occurs in the peroxisomes. *J Biol Chem.* 271(3):1784-8
- Biegert A, Mayer C, Remmert M, Söding J and Lupas A.** (2006) The MPI Toolkit for protein sequence analysis *Nucleic Acids Res.* **34**, W335-339
- Birnboim HC, Doly J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7(6):1513-23.
- Blum, H., Beier, H., and Gross, HJ.** (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99.
- Bois P, Jeffreys AJ.** (1999) Minisatellite instability and germline mutation. *Cell Mol Life Sci.* 55(12):1636-48.
- Bosco CD, Lezhneva L, Biehl A, Leister D, Strotmann H, Wanner G, Meurer J.** (2004) Inactivation of the chloroplast ATP synthase gamma subunit results in high non-photochemical fluorescence quenching and altered nuclear gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem.* 279(2):1060-9. Epub 2003 Oct 23
- Bouché N, Yellin A, Snedden WA, Fromm H.** (2005) Plant-specific calmodulin-binding proteins. *Annu Rev Plant Biol.* 56:435-66.

- Breidenbach RW, Beevers H.** (1967) Association of the glyoxylate cycle enzymes in a novel subcellular particle from castor bean endosperm. *Biochem Biophys Res Commun.* 27(4):462-9
- Breidenbach RW, Kahn A, Beevers H.** (1968) Characterization of glyoxysomes from castor bean endosperm. *Plant Physiol.* 43(5):705-13.
- Brocard C, Hartig A.** (2006) Peroxisome targeting signal 1: is it really a simple tripeptide? *Biochim Biophys Acta.* 1763(12):1565-73.
- Buchanan-Wollaston V, Ainsworth C.** (1997) Leaf senescence in *Brassica napus*: cloning of senescence related genes by subtractive hybridisation. *Plant Mol Biol.* 997 Mar;33(5):821-34.
- Bueno P, Varela J, Giménez-Gallego G, del Río LA.** (1995) Peroxisomal copper, zinc superoxide dismutase. Characterization of the isoenzyme from watermelon cotyledons. *Plant Physiol.* 108(3):1151-60.
- Bunkelmann JR, Trelease RN.** (1996) Ascorbate peroxidase. A prominent membrane protein in oilseed glyoxysomes. *Plant Physiol.* 110(2):589-98
- 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(12):3285-303. Epub 2004 Nov 11.
- Chassin Y, Kapri-Pardes E, Sinvany G, Arad T, Adam Z.** (2002) Expression and characterization of the thylakoid lumen protease DegP1 from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 130(2):857-64
- Chiti F, Taddei N, Webster P, Hamada D, Fiaschi T, Ramponi G, Dobson CM.** (1999) Acceleration of the folding of acylphosphatase by stabilization of local secondary structure. *Nat Struct Biol.* 6(4):380-7
- Chung C, Goldberg A.** (2004) Endopeptidase La. *Handbook of proteolytic enzymes*, 2. Aufl. Barrett A, Rawlings N, Woessner J, London, Elsevier, 1998-2002
- Clapham DE.** (2007) Calcium signaling. *Cell.* 131(6):1047-58.
- Clausen T, Southan C, Ehrmann M.** (2002) The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate. *Mol Cell.* 10(3):443-55.
- Clough, S.J., & Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16, 735-743.
- Corpas FJ, Barroso JB, del Río LA.** (2001) Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci.* 6(4):145-50.

- Costa A, Drago I, Behera S, Zottini M, Pizzo P, Schroeder JI, Pozzan T, Schiavo FL.** (2010) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plant peroxisomes: an in vivo analysis uncovers a Ca(2+)-dependent scavenging system. *Plant J.* 62(5):760-72
- Cox CJ, Dutta K, Petri ET, Hwang WC, Lin Y, Pascal SM, Basavappa R.** (2002) The regions of securin and cyclin B proteins recognized by the ubiquitination machinery are natively unfolded. *FEBS Lett.* 527(1-3):303-8.
- Crivici A, Ikura M.** (1995) Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 24:85-116.
- Davis TN, Urdea MS, Masiarz FR, Thorner J.** (1986) Isolation of the yeast calmodulin gene: calmodulin is an essential protein. *Cell.* 47(3):423-31.
- De Duve C, Baudhuin P.** (1966) Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev.* 46(2):323-57.
- del Rio LA, Pastori GM, Palma JM, Sandalio LM, Sevilla F, Corpas FJ, Jimenez A, Lopez-Huertas E, Hernandez JA.** (1998) The activated oxygen role of peroxisomes in senescence *Plant Physiol.* 116(4):1195-200.
- del Río LA, Sandalio LM, Palma JM, Bueno P, Corpas FJ.** (1992) Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Radic Biol Med.* 13(5):557-80.
- DeMaria CD, Soong TW, Alseikhan BA, Alvania RS, Yue DT.** (2001) Calmodulin bifurcates the local Ca<sup>2+</sup> signal that modulates P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels. *ature.* 411(6836):484-9.
- Desvergne B, Wahli W.** (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev.* 1999 Oct;20(5):649-88
- Dobson CM.** (1999) Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem Sci.* 24(9):329-32.
- Dobson CM.** (2003) Protein folding and misfolding. *Nature.* 426(6968):884-90.
- Donaldson RP, Fang TK.** (1987) beta-Oxidation and Glyoxylate Cycle Coupled to NADH: Cytochrome c and Ferricyanide Reductases in Glyoxysomes. *Plant Physiol.* 85(3):792-5
- Dong H, Kirsebom LA, Nilsson L.** (1996) Growth rate regulation of 4.5 S RNA and M1 RNA the catalytic subunit of Escherichia coli RNase P. *Mol Biol.* 261(3):303-8.
- Drum CL, Yan SZ, Bard J, Shen YQ, Lu D, Soelaiman S, Grabarek Z, Bohm A, Tang WJ.** (2002) Structural basis for the activation of anthrax adenyl cyclase exotoxin by calmodulin. *Nature.* 415(6870):396-402
- Dunker AK, Brown CJ, Lawson JD, Iakoucheva LM, Obradović Z.** (2002) Intrinsic disorder and protein function. *Biochemistry.* 41(21):6573-82. No abstract available.

- Dunker AK, Brown CJ, Obradovic Z.** (2002) Identification and functions of usefully disordered proteins. *Adv Protein Chem.* 62:25-49.
- Dunker AK, Cortese MS, Romero P, Iakoucheva LM, Uversky VN.** (2005) Flexible nets. The roles of intrinsic disorder in protein interaction networks. *FEBS J.* 272(20):5129-48.
- Dunker AK, Lawson JD, Brown CJ, Williams RM, Romero P, Oh JS, Oldfield CJ, Campen AM, Ratliff CM, Hipps KW, Ausio J, Nissen MS, Reeves R, Kang C, Kissinger CR, Bailey RW, Griswold MD, Chiu W, Garner EC, Obradovic Z.** (2001) Intrinsically disordered protein. *J Mol Graph Model.* 19(1):26-59.
- Dyson HJ, Wright PE.** (2005) Elucidation of the protein folding landscape by NMR. *Methods Enzymol.* 394:299-321.
- Dyson HJ, Wright PE.** (2001) Nuclear magnetic resonance methods for elucidation of structure and dynamics in disordered states. *Methods Enzymol.* 339:258-70.
- Eastmond PJ, Hooks M, Graham IA.** (2000) The Arabidopsis acyl-CoA oxidase gene family. *Biochem Soc Trans.* (6):755-7
- Ebrahim A, Hamel FG, Bennett RG, Duckworth WC.** (1991) Identification of the metal associated with the insulin degrading enzyme. *Biochem Biophys Res Commun.* 181(3):1398-406.
- Eisenberg D, Weiss RM, Terwilliger TC.** (1982) The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature.* 299(5881):371-4.
- Eubel H, Meyer EH, Taylor NL, Bussell JD, O'Toole N, Heazlewood JL, Castleden I, Small ID, Smith SM, Millar AH.** (2008) Novel proteins, putative membrane transporters, and an integrated metabolic network are revealed by quantitative proteomic analysis of Arabidopsis cell culture peroxisomes. *Plant Physiol.* 148(4):1809-29. Epub 2008 Oct 17.
- Feussner I, Wasternack C.** (2002) The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol.* 53:275-97.
- Fields S, Song O.** (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature.* 340(6230):245-6.
- Friedberg F, Rhoads AR.** (2002) Multiple calmodulin genes in fish. *Mol Biol Rep.* 29(4):377-82.
- Fujiki Y, Lazarow PB.** (1985) Post-translational import of fatty acyl-CoA oxidase and catalase into peroxisomes of rat liver in vitro. *J Biol Chem.* 260(9):5603-9.
- García-Lorenzo M, Sjödin A, Jansson S, Funk C.** (2006) Protease gene families in *Populus* and *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol.* 6:30.

- Gast K, Damaschun H, Eckert K, Schulze-Forster K, Maurer HR, Müller-Frohne M, Zirwer D, Czarnecki J, Damaschun G.** (1995) Prothymosin alpha: a biologically active protein with random coil conformation. *Biochemistry*. 34(40):13211-8.
- Gerstein M, Krebs W.** (1998) A database of macromolecular motions. *Nucleic Acids Res*. 26(18):4280-90.
- Gietl C, Faber KN, van der Klei IJ, Veenhuis M.** (1994) Mutational analysis of the N-terminal topogenic signal of watermelon glyoxysomal malate dehydrogenase using the heterologous host *Hansenula polymorpha*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 12;91(8):3151-5
- Gietl C.** (1992) Malate dehydrogenase isoenzymes: cellular locations and role in the flow of metabolites between the cytoplasm and cell organelles. *Biochim Biophys Acta*. 1100(3):217-34.
- Gietz, R.D., & Woods, R.A.** (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* 350, 87-96.
- Gietz, R.D., & Woods, R.A.** (2006). Yeast transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG method. *Methods Mol Biol* 313, 107-120.
- Gifford JL, Walsh MP, Vogel HJ.** (2007) Structures and metal-ion-binding properties of the Ca<sup>2+</sup>-binding helix-loop-helix EF-hand motifs. *Biochem J*. 405(2):199-221.
- Goff SA, Goldberg AL.** (1985) Production of abnormal proteins in *E. coli* stimulates transcription of *lon* and other heat shock genes. *Cell*. 41(2):587-95
- Gould SJ, Keller GA, Hosken N, Wilkinson J, Subramani S.** (1989) A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J Cell Biol*. 108(5):1657-64.
- Gould SJ, Keller GA, Schneider M, Howell SH, Garrard LJ, Goodman JM, Distel B, Tabak H, Subramani S.** (1990) Peroxisomal protein import is conserved between yeast, plants, insects and mammals. *EMBO J*. 9(1):85-90.
- Gouveia AM, Reguenga C, Oliveira ME, Sa-Miranda C, Azevedo JE.** (2000) Characterization of peroxisomal Pex5p from rat liver. Pex5p in the Pex5p-Pex14p membrane complex is a transmembrane protein. *J Biol Chem*. 275(42):32444-51
- Grininger M, Ravelli RB, Heider U, Zeth K.** (2004) Expression, crystallization and crystallographic analysis of DegS, a stress sensor of the bacterial periplasm. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2004 Aug;60(Pt 8):1429-31.
- Gut H, Dominici P, Pilati S, Astegno A, Petoukhov MV, Svergun DI, Grütter MG, Capitani G.** (2009) A common structural basis for pH- and calmodulin-mediated regulation in plant glutamate decarboxylase. *J Mol Biol*. 392(2):334-51.

- Hajra AK, Bishop JE.** (1982) Glycerolipid biosynthesis in peroxisomes via the acyl dihydroxyacetone phosphate pathway. *Ann N Y Acad Sci.* 386:170-82.
- Halperin T, Zheng B, Itzhaki H, Clarke AK, Adam Z.** (2001) Plant mitochondria contain proteolytic and regulatory subunits of the ATP-dependent Clp protease. *Plant Mol Biol.* 45(4):461-8.
- Hammond C, Helenius A.** (1995) Quality control in the secretory pathway. *Curr Opin Cell Biol.* 1995 Aug;7(4):523-9.
- Hasenbein S, Meltzer M, Hauske P, Kaiser M, Huber R, Clausen T, Ehrmann M.** (2010) Conversion of a regulatory into a degradative protease. *J Mol Biol.* 397(4):957-66.
- Hauske P, Mamant N, Hasenbein S, Nickel S, Ottmann C, Clausen T, Ehrmann M, Kaiser M.** (2009) Peptidic small molecule activators of the stress sensor DegS. *Mol Biosyst.* 5(9):980-5.
- Hauske P, Meltzer M, Ottmann C, Krojer T, Clausen T, Ehrmann M, Kaiser M.** (2009) Selectivity profiling of DegP substrates and inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 17(7):2920-4.
- Haussühl K, Andersson B, Adamska I.** (2001) A chloroplast DegP2 protease performs the primary cleavage of the photodamaged D1 protein in plant photosystem II. *EMBO J.* 20(4):713-22
- Hellermann GR, Solomonson LP.** (1997) Calmodulin promotes dimerization of the oxygenase domain of human endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 272(18):12030-4.
- Helm M, Lück C, Prestele J, Hierl G, Huesgen PF, Fröhlich T, Arnold GJ, Adamska I, Görg A, Lottspeich F, Gietl C.** (2007) Dual specificities of the glyoxysomal/peroxisomal processing protease Deg15 in higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(27):11501-6.
- Hetherington AM, Brownlee C.** (2004) The generation of Ca(2+) signals in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 55:401-27.
- Higgins,D.G. and Sharp,P.M.** (1988). CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene*, 73, 237-244
- Hijikata M, Ishii N, Kagamiyama H, Osumi T, Hashimoto T.** (1987) Structural analysis of cDNA for rat peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase. *J Biol Chem.* 262(17):8151-8.
- Hochuli E.** (1990) Purification of recombinant proteins with metal chelate adsorbent. *Genet Eng (N Y).* 12:87-98. Review. No abstract available.
- Hoeflich KP, Ikura M.** (2002) Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms. *Cell.* 108(6):739-42.

- Hope, I.A., & Struhl, K.** (1986). Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell* 46, 885-894.
- Hua W, Liang S, Lu YT.** (2003) A tobacco (*Nicotiana tabacum*) calmodulin-binding protein kinase, NtCBK2, is regulated differentially by calmodulin isoforms. *Biochem J.* 376(Pt 1):291-302.
- Hua W, Zhang L, Liang S, Jones RL, Lu YT.** (2004) A tobacco calcium/calmodulin-binding protein kinase functions as a negative regulator of flowering. *Biol Chem*279(30):31483-94
- Huang A, Trelease R, Moore T.** (1983) Plant peroxisomes. Academic press, New York
- Huang AH.** (1996) Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. *Plant Physiol.* 110(4):1055-61.
- Huber D, Bukau B.** (2008) DegP: a Protein "Death Star". *Structure.* 16(7):989-90.
- Huesgen P, Schuhmann H, Adamska I.** (2005) The family of Deg proteases in cyanobacteria and chloroplasts of higher plants, *Physiol. Plant.* 123: 413-420
- Huesgen PF, Miranda H, Lam XT, Perthold M, Schuhmann H, Adamska I, Funk C.** (2011) Recombinant Deg/HtrA proteases from *Synechocystis* sp. PCC 6803 differ in substrate specificity, biochemical characteristics and mechanism. *Biochem J.*
- Iakoucheva LM, Kimzey AL, Masselon CD, Bruce JE, Garner EC, Brown CJ, Dunker AK, Smith RD, Ackerman EJ.** (2001) Identification of intrinsic order and disorder in the DNA repair protein XPA. *Protein Sci.* 10(3):560-71.
- Ikura M, Ames JB.** (2006) Genetic polymorphism and protein conformational plasticity in the calmodulin superfamily: two ways to promote multifunctionality. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(5):1159-64.
- Ikura M, Barbato G, Klee CB, Bax A.** (1992) Solution structure of calmodulin and its complex with a myosin light chain kinase fragment. *Cell Calcium.* 13(6-7):391-400.
- James, P., Halladay, J., & Craig, E.A.** (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144, 1425-1436.
- Jedd G, Chua NH.** (2000) A new self-assembled peroxisomal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane. *Nat Cell Biol.* 2(4):226-31
- Kamada T, Nito K, Hayashi H, Mano S, Hayashi M, Nishimura M.** (2003) Functional differentiation of peroxisomes revealed by expression profiles of peroxisomal genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 44(12):1275-89.
- Kane JF.** (1995) Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol.* 6(5):494-500.

- Karush F, Sonenberg M.** (1949) Interaction of homologous alkyl sulfates with bovine serum albumin. *J Am Chem Soc.* 71(4):1369-76.
- Kato A, Hayashi M, Kondo M, Nishimura M.** (1996) Targeting and processing of a chimeric protein with the N-terminal presequence of the precursor to glyoxysomal citrate synthase. *Plant Cell.* 8(9):1601-11.
- Kaufmann SH.** (2002) Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Ann Rheum Dis.* 61 Suppl 2:ii54-8.
- Kavanagh TA, Thanh ND, Lao NT, McGrath N, Peter SO, Horváth EM, Dix PJ, Medgyesy P.** (1999) Homeologous plastid DNA transformation in tobacco is mediated by multiple recombination events. *Genetics.* 152(3):1111-22.
- Keegan, L., Gill, G., & Ptashne, M.** (1986). Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* 231, 699-704.
- Kersten S, Mandard S, Tan NS, Escher P, Metzger D, Chambon P, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W.** (2000) Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferator-activated receptor target gene. *J Biol Chem.* 275(37):28488-93.
- Kim DY, Kim KK.** (2005) Structure and function of HtrA family proteins, the key players in protein quality control. *J Biochem Mol Biol.*38(3):266-74
- Klein-Seetharaman J, Oikawa M, Grimshaw SB, Wirmer J, Duchardt E, Ueda T, Imoto T, Smith LJ, Dobson CM, Schwalbe H.** (2002) Long-range interactions within a nonnative protein. *Science.* 295(5560):1719-22.
- Kley J, Schmidt B, Boyanov B, Stolt-Bergner PC, Kirk R, Ehrmann M, Knopf RR, Naveh L, Adam Z, Clausen T.** (2011) Structural adaptation of the plant protease Deg1 to repair photosystem II during light exposure. *Nat Struct Mol Biol.*
- Köhler D, Struchholz S, Bähler M.** (2005) The two IQ-motifs and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin regulate the rat myosin 1d ATPase activity. *FEBS J.* 272(9):2189-97.
- Koshland De.** (1954) A physical organic approach to enzymatic mechanisms. *Trans N Y Acad Sci.*;16(3):110-3.
- Krause KH, Milos M, Luan-Rilliet Y, Lew DP, Cox JA.** (1991) Thermodynamics of cation binding to rabbit skeletal muscle calsequestrin. Evidence for distinct Ca(2+)- and Mg(2+)-binding sites. *J Biol Chem.* 266(15):9453-9.



- Kriwacki RW, Hengst L, Tennant L, Reed SI, Wright PE.** (1996) Structural studies of p21Waf1/Cip1/Sdi1 in the free and Cdk2-bound state: conformational disorder mediates binding diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(21):11504-9.
- Krojer T, Garrido-Franco M, Huber R, Ehrmann M, Clausen T.** (2002) Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine. *Nature.* 416(6879):455-9. Erratum in: *Nature* 417(6884):102.
- Krojer T, Sawa J, Schäfer E, Saibil HR, Ehrmann M, Clausen T.** (2008) Structural basis for the regulated protease and chaperone function of DegP. *Nature.* 2008 Jun 12;453(7197):885-90. Epub 2008 May 21.
- Kurochkin IV, Mizuno Y, Konagaya A, Sakaki Y, Schönbach C, Okazaki Y.** (2007) Novel peroxisomal protease Tysnd1 processes PTS1- and PTS2-containing enzymes involved in beta-oxidation of fatty acids. *EMBO J.* 26(3):835-45.
- Kurochkin IV.** (2001) Insulin-degrading enzyme: embarking on amyloid destruction. *Trends Biochem Sci.* 26(7):421-5.
- Ladant D.** (1988) Interaction of Bordetella pertussis adenylate cyclase with calmodulin. Identification of two separated calmodulin-binding domains. *J Biol Chem.* 263(6):2612-8.
- Lange PR, Eastmond PJ, Madagan K, Graham IA.** (2004) An Arabidopsis mutant disrupted in valine catabolism is also compromised in peroxisomal fatty acid beta-oxidation. *FEBS Lett.* 571(1-3):147-53
- Lazarow PB, Fujiki Y.** (1985) Biogenesis of peroxisomes. *Annu Rev Cell Biol.*;1:489-530.
- Lazarow PB.** (2006) The import receptor Pex7p and the PTS2 targeting sequence. *Biochim Biophys Acta.* 1763(12):1599-604.
- Leclerc E, Vetter S.** (1998) Characterization of a calcium-dependent calmodulin-binding domain in the 135-kD human protein 4.1 isoform. *Eur J Biochem.* 258(2):567-71.
- Lee I, Suzuki CK.** (2008) Functional mechanics of the ATP-dependent Lon protease- lessons from endogenous protein and synthetic peptide substrates. *Biochim Biophys Acta.* 1784(5):727-35.
- Lee SH, Johnson JD, Walsh MP, Van Lierop JE, Sutherland C, Xu A, Snedden WA, Kosk-Kosicka D, Fromm H, Narayanan N, Cho MJ.** (2000) Differential regulation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent enzymes by plant calmodulin isoforms and free Ca<sup>2+</sup> concentration. *Biochem J.* 350 Pt 1:299-306.
- Leenders F, Husen B, Thole HH, Adamski J.** (1994) The sequence of porcine 80 kDa 17 beta-estradiol dehydrogenase reveals similarities to the short chain alcohol dehydrogenase family, to actin binding motifs and to sterol carrier protein 2. *Mol Cell Endocrinol.* 104(2):127-31.

- Lennartz K, Plücken H, Seidler A, Westhoff P, Bechtold N, Meierhoff K.** (2001) HCF164 encodes a thioredoxin-like protein involved in the biogenesis of the cytochrome b(6)f complex in Arabidopsis. *Plant Cell*. 13(11):2539-51.
- Lindahl M, Spetea C, Hundal T, Oppenheim AB, Adam Z, Andersson B.** (2000) The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. *Plant Cell*. 12(3):419-31.
- Lingard MJ, Bartel B.** (2009) Arabidopsis LON2 is necessary for peroxisomal function and sustained matrix protein import. *Plant Physiol*. 151(3):1354-65.
- Liz MA, Sousa MM.** (2005) Deciphering cryptic proteases. *Cell Mol Life Sci*. 62(9):989-1002.
- Lopez-Huertas E, Charlton WL, Johnson B, Graham IA, Baker A.** (2000) Stress induces peroxisome biogenesis genes. *EMBO J*. 2000 Dec 15;19(24):6770-7
- Luan S, Kudla J, Rodriguez-Concepcion M, Yalovsky S, Gruissem W.** (2002) Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *Plant Cell*. 14 Suppl:S389-400. Review. No abstract available.
- Lynch WP, Riseman VM, Bretscher A.** (1987) Smooth muscle caldesmon is an extended flexible monomeric protein in solution that can readily undergo reversible intra- and intermolecular sulfhydryl cross-linking. A mechanism for caldesmon's F-actin bundling activity. *J Biol Chem*. 262(15):7429-37
- Ma L, Xu X, Cui S, Sun D.** (1999) The presence of a heterotrimeric G protein and its role in signal transduction of extracellular calmodulin in pollen germination and tube growth *Plant Cell*. 11(7):1351-64
- Ma, J., & Ptashne, M.** (1987). Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments. *Cell* 48, 847-853.
- Ma, J., & Ptashne, M.** (1988). Converting a eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator. *Cell* 55, 443-446.
- Marzioch M, Erdmann R, Veenhuis M, Kunau WH.** (1994) PAS7 encodes a novel yeast member of the WD-40 protein family essential for import of 3-oxoacyl-CoA thiolase, a PTS2-containing protein, into peroxisomes. *EMBO J*. 1994 Oct 17;13(20):4908-18.
- Mäser P, Thomine S, Schroeder JI, Ward JM, Hirschi K, Sze H, Talke IN, Amtmann A, Maathuis FJ, Sanders D, Harper JF, Tchieu J, Gribskov M, Persans MW, Salt DE, Kim SA, Guerinot ML.** (2001) Phylogenetic relationships within cation transporter families of Arabidopsis. *Plant Physiol*. 126(4):1646-67.

- Mayor M, Büschel M, Fromm KM, Lehn JM, Daub J.** (2002) Electron transfer through bridging molecular structures. *Ann N Y Acad Sci.* 960:16-28.
- McAinsh MR, Pittman JK.** (2009) Shaping the calcium signature. *New Phytol.* 2009 Jan;181(2):275-94.
- McClung CR.** (1997) Regulation of catalases in Arabidopsis. *Free Radic Biol Med.* 23(3):489-96.
- McCormack E, Tsai YC, Braam J.** (2005) Handling calcium signaling: Arabidopsis CaMs and CMLs. *Trends Plant Sci.* 10(8):383-9.
- McNew JA, Goodman JM.** (1994) An oligomeric protein is imported into peroxisomes in vivo. *J Cell Biol.* 127(5):1245-57.
- McNew JA, Goodman JM.** (1996) The targeting and assembly of peroxisomal proteins: some old rules do not apply. *Trends Biochem Sci.* 21(2):54-8.
- Meador WE, Means AR, Quijcho FA.** (1992) Target enzyme recognition by calmodulin: 2.4 A structure of a calmodulin-peptide complex. *Science.* 1992 Aug 28;257(5074):1251-5.
- Medda R, Padiglia A, Pedersen JZ, Lorrain A, Floris G.** (1996) Substrate specificity of lentil seedling amine oxidase. *Biochem Mol Biol Int.* 40(3):629-37.
- Meinecke M, Cizmowski C, Schliebs W, Krüger V, Beck S, Wagner R, Erdmann R.** (2010) The peroxisomal importomer constitutes a large and highly dynamic pore. *Nat Cell Biol.* 12(3):273-7.
- Meltzer M, Hasenbein S, Hauske P, Kucz N, Merdanovic M, Grau S, Beil A, Jones D, Krojer T, Clausen T, Ehrmann M, Kaiser M.** (2008) Allosteric activation of HtrA protease DegP by stress signals during bacterial protein quality control. *Angew Chem Int Ed Engl.* 47(7):1332-4.
- Meltzer M, Hasenbein S, Mamant N, Merdanovic M, Poepsel S, Hauske P, Kaiser M, Huber R, Krojer T, Clausen T, Ehrmann M.** (2009) Structure, function and regulation of the conserved serine proteases DegP and DegS of Escherichia coli. *Res Microbiol.* 160(9):660-6.
- Mizusawa N, Tomo T, Satoh K, Miyao M.** (2003) Degradation of the D1 protein of photosystem II under illumination in vivo: two different pathways involving cleavage or intermolecular cross-linking. *Biochemistry.* 42(33):10034-44.
- Moberg P, Ståhl A, Bhushan S, Wright SJ, Eriksson A, Bruce BD, Glaser E.** (2003) Characterization of a novel zinc metalloprotease involved in degrading targeting peptides in mitochondria and chloroplasts. *Plant J.* 36(5):616-28.

**Morar AS, Olteanu A, Young GB, Pielak GJ.** (2001) Solvent-induced collapse of alpha-synuclein and acid-denatured cytochrome c. *Protein Sci.* 2001 Nov;10(11):2195-9.

**Mori H, Takeda-Yoshikawa Y, Hara-Nishimura I, Nishimura M.** (1991) Pumpkin malate synthase. Cloning and sequencing of the cDNA and northern blot analysis. *Eur J Biochem.* 197(2):331-6.

**Morita T, Kato H, Iwanaga S, Takada K, Kimura T.** (1977) New fluorogenic substrates for alpha-thrombin, factor Xa, kallikreins, and urokinase. *J Biochem.* 82(5):1495-8.

**Motley AM, Hettema EH, Ketting R, Plasterk R, Tabak HF.** (2000) *Caenorhabditis elegans* has a single pathway to target matrix proteins to peroxisomes. *EMBO Rep.* 1(1):40-6.

**Müller WH, van der Krift TP, Krouwer AJ, Wösten HA, van der Voort LH, Smaal EB, Verkleij AJ.** (1991) Localization of the pathway of the penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *EMBO J.* 10(2):489-95

**Murashige T and Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3): 473-497

**Nunnari J, Walter P.** (1996) Regulation of organelle biogenesis. *Cell.* Feb 9;84(3):389-94.

**Ogura T, Wilkinson AJ.** (2001) AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. *Genes Cells.* 6(7):575-97.

**Olsen LJ.** (1998) The surprising complexity of peroxisome biogenesis. *Plant Mol Biol.* 38(1-2):163-89

**Ostersetzer O, Kato Y, Adam Z, Sakamoto W.** (2007) Multiple intracellular locations of Lon protease in *Arabidopsis*: evidence for the localization of AtLon4 to chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 48(6):881-5.

**Otera H, Nishimura M, Setoguchi K, Mori T, Fujiki Y.** (2001) Biogenesis of nonspecific lipid transfer protein and sterol carrier protein x: studies using peroxisome assembly-defective pex cell mutants. *J Biol Chem.* 276(4):2858-64.

**Padmanabhan N, Fichtner L, Dickmanns A, Ficner R, Schulz JB, Braus GH.** (2009) The yeast HtrA orthologue Ynm3 is a protease with chaperone activity that aids survival under heat stress. *Mol Biol Cell.* 20(1):68-77.

- Pearce G, Johnson S, Ryan CA.** (1993) Structure-activity of deleted and substituted systemin, an 18-amino acid polypeptide inducer of plant defensive genes. *J Biol Chem.* 268(1):212-6.
- Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G.** (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature.* 258(5536):598-9.
- Prilusky J, Felder CE, Zeev-Ben-Mordehai T, Rydberg EH, Man O, Beckmann JS, Silman I, Sussman JL.** (2005) FoldIndex: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded. *Bioinformatics.* 21(16):3435-8. Epub 2005 Jun 14.
- Rawlings ND, Morton FR, Kok CY, Kong J, Barrett AJ.** (2008) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 36(Database issue):D320-5.
- Rawlings ND, O'Brien E, Barrett AJ.** (2002) MEROPS: the protease database. *Nucleic Acids Res.* 30(1):343-6.
- Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ.** (2004) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.*;32
- Reddy VS, Ali GS, Reddy AS.** (2003) Characterization of a pathogen-induced calmodulin-binding protein: mapping of four Ca<sup>2+</sup>-dependent calmodulin-binding domains. *Plant Mol Biol.* 52(1):143-59
- Reddy VS, Reddy AS.** (2004) Proteomics of calcium-signaling components in plants. *Phytochemistry.* 65(12):1745-76.
- Reumann S, Ma C, Lemke S, Babujee L.** (2004) AraPeroX. A database of putative Arabidopsis proteins from plant peroxisomes. *Plant Physiol.* 2004 Sep;136(1):2587-608.
- Reumann S, Quan S, Aung K, Yang P, Manandhar-Shrestha K, Holbrook D, Linka N, Switzenberg R, Wilkerson CG, Weber AP, Olsen LJ, Hu J.** (2009) In-depth proteome analysis of Arabidopsis leaf peroxisomes combined with in vivo subcellular targeting verification indicates novel metabolic and regulatory functions of peroxisomes. *Plant Physiol.* 150(1):125-43.
- Rhoads AR, Friedberg F.** (1997) Sequence motifs for calmodulin recognition. *FASEB J.* 11(5):331-40.
- Richter S, Lamppa GK.** (2003) Structural properties of the chloroplast stromal processing peptidase required for its function in transit peptide removal. *J Biol Chem* 278(41):39497-502. Epub 2003 Jul 29.
- Robinson LL, Sznajder NA, Riley SC, Anderson RA.** (2001) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human fetal testis and ovary. *Mol Hum Reprod.* 7(7):641-8.

- Rogers, S., & Bendich, A.** (1994). Extraction of Total Cellular DNA from Plants, Algae and Fungi. In *Plant Molecular Biology Manual* (Dodrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Press)
- Romero P, Obradovic Z, Kissinger CR, Villafranca JE, Garner E, Guillot S, Dunker AK.** (1998) Thousands of proteins likely to have long disordered regions. *Pac Symp Bio-comput.* 437-48.
- Roth R,** (2004) Insulysin. In: *The handbook of proteolytic enzymes*, 2. Aufl. Barrett A, Rawlings N, Woessner J, London, Elsevier, 1998-2002
- Ruiz N, Silhavy TJ.** (2005) Sensing external stress: watchdogs of the *Escherichia coli* cell envelope. *Curr Opin Microbiol.* 8(2):122-6. Review
- Ryan MP, Duckworth WC.** (1983) Partial characterization of an endogenous inhibitor of a calcium-dependent form of insulin protease. *Biochem Biophys Res Commun.* 116(1):195-203.
- Ryan MP, Gifford JD, Solomon SS, Duckworth WC.** (1985) The calcium dependence of insulin degradation by rat skeletal muscle. *Endocrinology.* 117(4):1693-8.
- Sadowski I, Ma J, Triezenberg S, Ptashne M.** (1988) GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature.* 335(6190):563-4.
- Sautter C.** (1986) In vivo uptake of mitochondrial malate dehydrogenase from watermelon by mitochondria of *Xenopus laevis* oocytes. *Eur J Cell Biol.* 41(2):263-9.
- Schaller A.** (2004) A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta.* 220(2):183-97
- Schubert K.** (1986) Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport and metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37: 539-574
- Schuhmann H, Huesgen PF, Gietl C, Adamska I.** (2008) The DEG15 serine protease cleaves peroxisomal targeting signal 2-containing proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 148(4):1847-56.
- Schuhmann H, Mogg U, Adamska I.** (2011) A new principle of oligomerization of plant DEG7 protease based on interactions of degenerated protease domains. *Biochem J.* 435(1):167-74.
- Schumacher MA, Rivard AF, Bächinger HP, Adelman JP.** (2001) Structure of the gating domain of a Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel complexed with Ca<sup>2+</sup>/calmodulin. *Nature.* 410(6832):1120-4.
- Shimaoka T, Ohnishi M, Sazuka T, Mitsuhashi N, Hara-Nishimura I, Shimazaki K, Maeshima M, Yokota A, Tomizawa K, Mimura T.** (2004) Isolation of intact vacuoles and proteomic analysis of tonoplast from suspension-cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 45(6):672-83

- Shoemaker BA, Portman JJ, Wolynes PG.** (2000) Speeding molecular recognition by using the folding funnel: the fly-casting mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(16):8868-73.
- Small GM, Santos MJ, Imanaka T, Poulos A, Danks DM, Moser HW, Lazarow PB.** (1988) Peroxisomal integral membrane proteins in livers of patients with Zellweger syndrome, infantile Refsum's disease and X-linked adrenoleukodystrophy. *J Inher Metab Dis.* 11(4):358-71.
- Söding J.** (2005) Protein homology detection by HMM-HMM comparison. *Bioinformatics* 21, 951-960. doi:10.1093/bioinformatics/bti125.
- Söding J, Biegert A, and Lupas AN.** (2005) The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Research* 33
- Sohn J, Grant RA, Sauer RT.** (2010) Allostery is an intrinsic property of the protease domain of DegS: implications for enzyme function and evolution. *J Biol Chem.* 285(44):34039-47.
- Spieß C, Beil A, Ehrmann M.** (1999) A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell.* 97(3):339-47.
- 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.* 2000 Sep 12;97(19)
- Strassner J, Schaller F, Frick UB, Howe GA, Weiler EW, Amrhein N, Macheroux P, Schaller A.** (2002) Characterization and cDNA-microarray expression analysis of 12-oxophytodienoate reductases reveals differential roles for octadecanoid biosynthesis in the local versus the systemic wound response. *Plant J.* 32(4):585-601.
- Strimmer K, von Haeseler A.** (1997) Likelihood-mapping: a simple method to visualize phylogenetic content of a sequence alignment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(13):6815-9
- Sun X, Fu T, Chen N, Guo J, Ma J, Zou M, Lu C, Zhang L.** (2010) The stromal chloroplast Deg7 protease participates in the repair of photosystem II after photoinhibition in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 152(3):1263-73. Epub 2010 Jan 20.
- Szostkiewicz I, Richter K, Kepka M, Demmel S, Ma Y, Korte A, Assaad FF, Christmann A, Grill E.** (2010) Closely related receptor complexes differ in their ABA selectivity and sensitivity. *Plant J.* 61(1):25-35.
- Teter SA, Klionsky DJ.** (1999) How to get a folded protein across a membrane. *Trends Cell Biol.* 9(11):428-31.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG.** (1997) The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25(24):4876-82.





- Titorenko VI, Nicaud JM, Wang H, Chan H, Rachubinski RA.** (2002) Acyl-CoA oxidase is imported as a heteropentameric, cofactor-containing complex into peroxisomes of *Yarrowia lipolytica*. *J Cell Biol.* 156(3):481-94.
- Titus DE, Becker WM.** (1985) Investigation of the glyoxysome-peroxisome transition in germinating cucumber cotyledons using double-label immunoelectron microscopy. *J Cell Biol.* 101(4):1288-99.
- Tompa P.** (2003) Intrinsically unstructured proteins evolve by repeat expansion. *Bioessays.* 25(9):847-55.
- Tompa P.** (2005) The interplay between structure and function in intrinsically unstructured proteins. *FEBS Lett.* 579(15):3346-54. Epub 2005 Apr 8.
- Toutenhoofd SL, Strehler EE.** (2000) The calmodulin multigene family as a unique case of genetic redundancy: multiple levels of regulation to provide spatial and temporal control of calmodulin pools? *Cell Calcium.* 28(2):83-96.
- Uversky VN, Fink AL.** (2002) The chicken-egg scenario of protein folding revisited. *FEBS Lett* 515(1-3):79-83.
- Van den Bosch, H. Schutgens RB, Wanders RJ, Tager JM.** (1992) Biochemistry of peroxisomes. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 157–197
- Van der Klei I, Veenhuis M.** (2002) Peroxisomes: flexible and dynamic organelles. *Curr Opin Cell Biol.* 14(4):500-5.
- Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R.A., & Schell, J.** (1974). Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* 252, 169-170.
- Van Melder L, Gottesman S.** (1999) Substrate sequestration by a proteolytically inactive Lon mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(11):6064-71.
- Van Melder L, Thi MH, Lecchi P, Gottesman S, Couturier M, Maurizi MR.** (1996) ATP-dependent degradation of CcdA by Lon protease. Effects of secondary structure and heterologous subunit interactions. *J Biol Chem.* 271(44):27730-8
- Vergnaud G, Denoeud F.** (2000) Minisatellites: mutability and genome architecture. *Genome Res.* 10(7):899-907

- Walsh NP, Alba BM, Bose B, Gross CA, Sauer RT.** (2003) OMP peptide signals initiate the envelope-stress response by activating DegS protease via relief of inhibition mediated by its PDZ domain. *Cell*. 113(1):61-71.
- Weickert MJ, Doherty DH, Best EA, Olins PO.** (1996) Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*. 7(5):494-9.
- Weinberg RL, Freund SM, Veprintsev DB, Bycroft M, Fersht AR.** (2004) Regulation of DNA binding of p53 by its C-terminal domain. *J Mol Biol*. 342(3):801-11.
- Weinreb PH, Zhen W, Poon AW, Conway KA, Lansbury PT Jr.** (1996) NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry*. 35(43):13709-15.
- Wickner S, Gottesman S, Skowyra D, Hoskins J, McKenney K, Maurizi MR.** (1994) A molecular chaperone, ClpA, functions like DnaK and DnaJ. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(25):12218-22.
- Wickner S, Maurizi MR.** (1999) Here's the hook: similar substrate binding sites in the chaperone domains of Clp and Lon. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(15):8318-20.
- Wickner W, Schekman R.** (2005) Protein translocation across biological membranes. *science*. 310(5753):1452-6. Review.
- Wilken C, Kitzing K, Kurzbauer R, Ehrmann M, Clausen T.** (2004) Crystal structure of the DegS stress sensor: How a PDZ domain recognizes misfolded protein and activates a protease. *Cell*. 117(4):483-94.
- Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W.** (1997) Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C3 plants. *EMBO J*. 16(16):4806-16
- Williamson RA, Bartels H, Murphy G, Freedman RB.** (1994) Folding and stability of the active N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and -2. *Protein Eng*. 7(8):1035-40.
- Wirmer J, Schlörb C, Klein-Seetharaman J, Hirano R, Ueda T, Imoto T, Schwalbe H.** (2004) Modulation of compactness and long-range interactions of unfolded lysozyme by single point mutations. *Angew Chem Int Ed Engl*. 43(43):5780-5.
- Wood NT, Allan AC, Haley A, Viry-Moussaïd M, Trewavas AJ.** (2000) The characterization of differential calcium signalling in tobacco guard cells. *Plant J*. 24(3):335-44.
- Wood NT, Haley A, Viry-Moussaïd M, Johnson CH, van der Luit AH, Trewavas AJ.** (2001) The calcium rhythms of different cell types oscillate with different circadian phases. *Plant Physiol*. 125(2):787-96

- Wotton D, Ghysdael J, Wang S, Speck NA, Owen MJ.** (1994) Cooperative binding of Ets-1 and core binding factor to DNA. *Mol Cell Biol.* 14(1):840-50.
- Wright PE, Dyson HJ.** (1999) Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J Mol Biol.* 293(2):321-31.
- Xia C, Misra I, Iyanagi T, Kim JJ.** (2009) Regulation of interdomain interactions by calmodulin in inducible nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 284(44):30708-17.
- Yang T, Poovaiah BW.** (2000) Arabidopsis chloroplast chaperonin 10 is a calmodulin-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 275(2):601-7.
- Yang T, Poovaiah BW.** (2002) Hydrogen peroxide homeostasis: activation of plant catalase by calcium/calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(6):4097-102.
- Yang T, Poovaiah BW.** (2003) Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends Plant Sci.* 8(10):505-12.
- Yang Z.R., Thomson R., McMeil P. and Esnouf R.M.** (2005) RONN: the bio-basis function neural network technique applied to the detection of natively disordered regions in proteins *Bioinformatics* 21: 3369-3376
- Yap KL, Ames JB, Swindells MB, Ikura M.** (1999) Diversity of conformational states and changes within the EF-hand protein superfamily. *Proteins.* 37(3):499-507.
- Yap KL, Kim J, Truong K, Sherman M, Yuan T, Ikura M.** (2000) Calmodulin target database. *Struct Funct Genomics.* 1(1):8-14.
- Yap KL, Yuan T, Mal TK, Vogel HJ, Ikura M.** (2003) Structural basis for simultaneous binding of two carboxy-terminal peptides of plant glutamate decarboxylase to calmodulin. *J Mol Biol.* 328(1):193-204.
- Zolman BK, Monroe-Augustus M, Thompson B, Hawes JW, Krukenberg KA, Matsuda SP, Bartel B.** (2001) chy1, an Arabidopsis mutant with impaired beta-oxidation, is defective in a peroxisomal beta-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase. *J Biol Chem.* 276(33):31037-46.
- Zühlke RD, Pitt GS, Deisseroth K, Tsien RW, Reuter H.** (1999) Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature.* 399(6732):159-62.
- Peroxisomaler Importkanal für Proteine kann sich bis 9nm weit öffnen** (URL: <http://www.organische-chemie.ch/chemie/2010/mae/peroxisomen.shtml>)

## Danksagung

In erster Linie gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Christine Gietl für die Möglichkeit, am Lehrstuhl für Botanik zu promovieren. Ich möchte Ihr für die Überlassung und Betreuung des spannenden Projektes danken, für das stete Interesse an meiner Arbeit, die ständige Diskussionsbereitschaft und die Unterstützung während der gesamten Dauer der Arbeit. Darüber hinaus war Prof. Dr. Christine Gietl immer bemüht ihren Doktoranden auch über die Arbeit hinaus einige Dinge mit auf den Weg zu geben, sei es bei Kongressen, bei Veranstaltungen aller Art oder bei einem Besuch der Albertina in Wien, auch dafür vielen Dank.

Prof. Dr. Ute Vothknecht möchte ich dafür danken, dass sie uns auf den Calmodulin-Pfad gebracht hat. Die Zusammenarbeit mit Prof. Vothknecht war geprägt von anregenden Diskussion und vielen tollen Ideen, die das Projekt sehr bereichert haben. Ich möchte auch der ganzen Arbeitsgruppe und besonders Dr. Fatima Chigri für ihre Hilfe und die herzliche Aufnahme im Labor danken.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich Prof. Dr. Michael Ehrmann aussprechen, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand, wenn es um die Proteinexpression und –reinigung ging und sich viel Zeit für Diskussionen und Gespräche genommen hat. Danke für eine tolle Zeit in Essen und für die unglaublich offene und nette Atmosphäre in der Arbeitsgruppe. Natürlich möchte ich mich bei ihm auch für die Erstellung der Strukturvorhersagen bedanken, die sich so gut in unser Bild der DEG15 einfügen.

Prof. Erwin Grill, dem Ordinarius dieses Lehrstuhls möchte ich für seine stete Unterstützung und die anregenden Gespräche und Diskussionen während der Mittwochsseminaren und darüber hinaus danken.

Prof. Dr. Klaus Lenzen möchte ich dafür danken, dass er mich auf den Weg gebracht hat, den ich die letzten vier Jahre gegangen bin. Ohne ihn wäre ich wahrscheinlich nie auf die Idee gekommen in der Botanik zu promovieren.

Weiter möchte ich unseren Arbeits-Gruppen-Leitern Dr. Farhah Assaad, Dr. Alexander Christmann und Prof. Dr. Kay Schneitz danken, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und mit denen man stets wertvolle Diskussionen führen konnte. Dr. Farhah Assaad möchte ich darüber hinaus für die Korrektur so manchen englischen Textes danken.

Meinen Arbeitskollegen Dr. Georg Hierl und Timo Höwing möchte ich für die tolle Zusammenarbeit im Labor, die Unterstützung und den Zuspruch danken. Georg möchte ich ganz besonders danken, weil er mir in den letzten Jahren immer den Rücken frei gehalten

hat und mir immer mit Rat und viel Tat zur Seite stand. Danke für alles Georg! Ach ja und natürlich sind wir das einzig wahre heavy-metal-Labor.

Danken möchte ich allen Doktoranden aus der ABA-Gruppe:

Besonders Simone Demmel, für die viele Hilfe, den Beistand und die aufbauenden Worte, während des Studiums und der Promotion. Ich bin wirklich froh dich während der letzten Jahre an meiner Seite gewusst zu haben, ohne dich wäre ich nie soweit gekommen, danke Simone!

Michal Kepka möchte ich für so manchen hochprozentigen „Nerven-Beruhiger“, diverse Wochenend-Dienste und die gute Stimmung danken.

Natürlich möchte ich auch meiner ewigen zweiten Wahl Christian Wellmann danken, Stefan Fuchs und unseren „Ehemaligen“ Dr. Athur Korthe, Dr. Danièle Moes und Dr. Jana Wünschmann. Ohne euch wäre der Labor-Alltag trist und grau gewesen.

Der Schneitz-Gruppe möchte ich für die freundliche Aufnahme im 1. Stock danken und für Rat und Tat und eine tolle Zusammenarbeit. Besonders meinen beiden Sonnenscheinen Christine Skornia und Maxi Oelschner. Danke für eure lieben Worte, die stetige Zuversicht, für die viele Hilfe in allen Lebenslagen, die schönen Mittagspausen und liebe Christine: Danke für alle Therapiemaßnahmen.

Allen Kollegen und Mitarbeitern am Lehrstuhl für Botanik, möchte ich herzlich für die gute Zusammenarbeit danken:

Unseren Gärtnern Caroline Klaus, Lisa Held und Michael Schmidt dafür, dass sie mir so viel Arbeit abgenommen haben und sich immer um meine Pflänzchen gekümmert haben. Caroline möchte ich darüber hinaus für den Zuspruch und Erweiterung meines kulinarischen Horizontes danken.

Unseren TAs möchte ich für ihre Hilfe im Labor und häufigen Rat danken, besonders Christian Kornbauer alias Kornl und Claudia Eltschig für die Hilfe beim Klonieren, Johanna Berger und Christoph Heidersberger für die Sicherung des Nachschubs.

Besonders Danken möchte ich Josef Reischenbeck, der fast alles wieder zum Laufen bringt und wenn nicht, irgendwo Ersatz her organisiert. Dank ihm haben wir uns viel Zeit, Geld und vor allem Nerven gespart. Danke Sepp, dass du dir immer Zeit für uns genommen hast. Und last but not least möchte ich unseren beiden Sekretärinnen Beate Seeliger und Ulrike Schubert für die Hilfe bei der Bewältigung der Bürokratie danken.