

**Identifizierung und Charakterisierung neuer Substrate
des *N-end rule pathways* in *Arabidopsis thaliana***

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Christin Naumann

geb. am 20.11.1986 in Frankfurt (Oder)

Tag der öffentlichen Verteidigung

8. Mai 2017

Gutachter

1. Prof. Dr. Bettina Hause, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2. Prof. Dr. Milton Stubbs, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
3. Prof. Dr. Andreas Bachmair, Universität Wien

Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis	10
II.	Ein- und Drei-Buchstaben-Code der Aminosäuren.....	13
III.	Kurzzusammenfassung.....	14
1.	Einleitung.....	16
1.1.	Der <i>N-end rule pathway</i> als Teil des Ubiquitin-26S-Proteasomsystems	16
1.2.	Deamidasen NTAN1 und NTAQ1	20
1.3.	Arginyltransferasen ATE1 und ATE2	21
1.4.	N-Rekognine und putative E3-Ligasen PRT6 und PRT1.....	23
1.5.	Bekannte <i>N-end rule</i> -Substrate <i>in planta</i> : ETHYLENE RESPONSE FACTORS (ERFs) Klasse VII	24
1.6.	RPM1 INTERACTING PROTEIN (RIN4)	25
1.7.	Cysteinprotease RD21a	28
1.8.	Zielsetzung der Arbeit	30
2.	Material und Methoden	32
2.1.	Material.....	32
2.1.1.	Verwendete Vektoren und Primer.....	32
2.1.2.	Verwendete Bakterienstämme	32
2.1.3.	Verwendete Pflanzenlinien.....	33
2.1.4.	Verwendete Antibiotika	33
2.1.5.	Verwendete Antikörper.....	34
2.2.	Molekularbiologische Methoden.....	34
2.2.1.	Herstellung Rubidiumchlorid kompetenter <i>E-coli</i> - Zellen	34
2.2.2.	Transformation von <i>E. coli</i> und Selektion rekombinanter Klone	35
2.2.3.	Herstellung elektrokompenter <i>A. tumefaciens</i> -Zellen	35
2.2.4.	Transformation von elektrokompenten <i>A. tumefaciens</i>	36
2.2.5.	Herstellung chemokompenter <i>A. tumefaciens</i> -Zellen	36

2.2.6. Transformation chemokompetenter <i>A. tumefaciens</i> -Zellen	36
2.2.7. Quick Check	36
2.2.8. Plasmidisolierung aus Bakterien.....	37
2.2.9. Restriktionsverdau von Plasmiden und Auftrennung mittels Gelelektrophorese	37
2.2.10. DNA-Gelextraktion und Reinigung	37
2.2.11. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
2.2.12. RNA Isolation aus Pflanzenmaterial	38
2.2.13. cDNA-Synthese	38
2.2.14. Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)	38
2.2.15. Single-Gateway-Klonierung.....	39
2.2.16. Gerichtete Mutagenese	40
2.2.17. Samensterilisation	40
2.2.18. Anzucht von Pflanzen	40
2.2.19. Genotypisierung	41
2.2.20. Transformation von Mesophyllprotoplasten	41
2.3. Proteinchemische Methoden	43
2.3.1. Proteinüberexpression in <i>E.coli</i> und Zellaufschluss mittels French Press	43
2.3.2. Proteinreinigung	44
2.3.2.1. Proteinreinigung mittels Nickel-Agarose.....	44
2.3.2.2. Proteinreinigung mittels Amylose-Harz	44
2.3.3. Spaltung rekombinant exprimierter Proteine mittels TEV-Protease.....	44
2.3.4. Gesamtproteinextraktion aus Pflanzenmaterial.....	45
2.3.4.1. TCA- basierte Proteomfällung	45
2.3.4.2. TCA-freie Proteomreinigung.....	46
2.3.4.3. Schnelltest zur Überprüfung der Proteinexpression in pflanzlichen Material	46
2.3.5. Proteinkonzentrationsbestimmung	47
2.3.5.1. Bradford-Assay	47

2.3.5.2. BCA-Assay	47
2.3.5.3. Direct Detect.....	47
2.3.6. 2D Gelelektrophorese	47
2.3.6.1. Markierung	47
2.3.6.2. Auftrennung nach Ladung (Isoelektrische Fokussierung (IEF-PAGE))	48
2.3.6.3. Auftrennung nach Masse (SDS-PAGE)	48
2.3.6.4. Detektion	49
2.3.6.5. Isolation spezifischer Proteine aus 2D-Gel	49
2.3.6.6. Trypsin-Verdau	49
2.3.6.7. Massenspektrometrie und spektrale Datenanalyse	50
2.3.7. Shotgun-Analyse.....	50
2.3.7.1. In-Lösung Verdau.....	50
2.3.7.2. Massenspektrometrie und spektrale Datenanalyse	50
2.3.8. Polyacrylamid-Gelelektrophorese	51
2.3.9. Coomassie-Blue-Färbung und Geltrocknung.....	52
2.3.10. Westernblotanalyse.....	52
2.3.11. <i>In vitro</i> Proteinexpression und Stabilitätsuntersuchung	53
2.3.12. <i>In vitro</i> Markierung von rekombinant exprimierten RD21a mit MV151	53
2.3.13. <i>In vitro</i> Interaktion von rekombinant exprimierten Protein mit endogenem RD21a	53
2.3.14. <i>In vitro</i> Arginylierung	54
2.3.15. Ubiquitylierungsversuch mit Pflanzenextrakt und rekombinanten RD21a	55
2.3.17. <i>In vitro</i> Deamidierung	56
2.3.18. <i>In vivo</i> Markierung von endogenem RD21a mittels DCG-04.....	57
2.4. Mikroskopische Methoden	58
2.4.1. Mikroskopische Detektion und Datenauswertung von Protoplasten.....	58
2.4.2. Einbettung von Pflanzenmaterial in PEG 1500.....	59
2.4.3. Immunmarkierung von PEG-Schnitten	60

2.4.4.	Mikroskopie von PEG eingebetteten Schnitten	60
3.	Ergebnisse	61
3.1.	Rpm Interacting Protein (RIN4) als <i>N-end rule</i> Substrat	61
3.1.1.	Stabilität von X-RIN4 im zellfreien System	61
3.1.2.	Stabilität von N-RIN4 in Protoplasten verschiedener <i>N-end rule pathway</i> -Mutanten	62
3.1.3.	Interaktion von N-RIN4 und NTAQ1 <i>in vitro</i>	63
3.1.4.	<i>In vitro</i> Arginylierung von X-RIN4	64
3.2.	Identifizierung neuer potentieller <i>N-end rule</i> Substrate mittels vergleichender Proteomik	65
3.2.1.	Vergleichende Proteomik mittels 2-Dimensionaler Gelelektrophorese (DIGE)	65
3.2.1.1.	Proteomanalyse nach TCA-Fällung	66
3.2.1.2.	Proteomanalyse nach TCA-freier Proteinfällung	67
3.2.2.	Vergleichende Proteomik mittels Shotgun-Analyse	68
3.2.3.	Vergleich der Proteomikdaten von DIGE und Shotgun	69
3.3.	Proteinstabilität von ausgewählten potentiellen <i>N-end rule pathway</i> Substraten <i>in vitro</i>	70
3.3.1.	Proteinstabilität von TGG2 im zellfreien System	71
3.3.2.	Proteinstabilität von RD21a im zellfreien Kaninchenretikulozytenlysat	71
3.3.3.	Interaktion von RD21a und ATE1 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	72
3.3.3.1.	Interaktion von rekombinanter ATE1 mit endogenem RD21a	73
3.3.3.2.	<i>In vitro</i> Arginylierung von mRD21a durch ATE1	74
3.3.3.3.	Interaktion von ATE1 und RD21a <i>in vivo</i> mittels Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation	75
3.3.4.	Proteinabundanz von RD21a in den verschiedenen <i>N-end rule</i> -Mutanten	78
3.3.5.	Aktivitätsprofilung von RD21a in <i>N-end rule pathway</i> -Mutanten	81
3.3.6.	Proteinstabilität im Protoplastensystem	82
3.3.6.1.	N-terminale Abhängigkeit der Proteinstabilität von RD21a <i>in vivo</i>	82
3.3.6.2.	N-terminale Abhängigkeit der Proteinstabilität von TGG2 <i>in vivo</i>	88
3.3.7.	Interaktion von endogenem RD21a mit der rekombinanten UBR-Domäne von PRT6	91

3.3.8.	Ubiquitylierung von rekombinantem RD21a in Pflanzenextrakt.....	92
3.3.9.	Ubiquitylierung von endogenem RD21a	95
4.	Diskussion	97
4.1.	RIN4 als bona fide Substrat des N-end rule pathways	97
4.2.	Identifizierung von potentiellen <i>N-end rule pathway</i> Substraten durch komparative Proteomik	101
4.3.	TGG2 als <i>N-end rule pathway</i> Substrat	104
4.4.	RD21a als <i>N-end rule pathway</i> Substrat.....	106
5.	Zusammenfassung.....	120
6.	Ausblick	121
7.	Danksagung	124
IV.	Abbildungsverzeichnis	126
8.	Literaturverzeichnis	129
9.	Anhang	145
	Selbstständigkeits- und Einmaligkeitserklärung.....	180

I. Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APS ((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATE1/2	Arginyl -tRNA-Proteintransferase
BiFC	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
BSA	Rinderserumalbumin (engl. bovine serum albumin)
CaCl ₂	Calciumchlorid
carb	Carbamycilin
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonia]-1-Propanesulfonat (C ₃₂ H ₅₈ N ₂ O ₇ S)
Chl	Chloramphenicol
CHX	Cycloheximid
C-Terminus	Carboxyterminus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure bzw. Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
ERF	Ethylen Response Faktor
HA-Tag	Hemagglutinin-Tag
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His-Tag	6x Histidin-Tag
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kan	Kanamycin
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
LSM	Laser Scanning Mikroskop
MBP-Tag	Maltose bindendes Protein-Tag

MeOH	Methanol
MES-KOH (C ₆ H ₁₃ NO ₄ S)	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure-Kaliumhydroxid
MG132	N-Benzoyloxycarbonyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Mouse-IgG	Anti-Maus Immunglobulin G
MS	Murashige und Scroogh
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NTAN1	Asn-spezifische N-terminale Amidase
NTAQ1	Gln-spezifische N-terminale Amidase
OD	Optische Dichte
OT	Objekträger
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEG	Polyethylenglycol
PR-619	2,6-Diamino-3,5-dithiocyanopyridin
PRT1/6	Proteolysis 1/6
PVDF-Membran	Polyvinylidenfluorid-Membran
ROX	6-Carboxy-X-rhodamin
rpm	rounds per minute
rif	Rifampicin
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfat)
sek	Sekunde
strep	Streptomycin
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TBST- Puffer	Tris buffered saline, Tween
TFB-Puffer	Transformation buffer
TEMED (C ₆ H ₁₆ N ₂)	Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
1 U	1 Unit
UBQ	Ubiquitin
UPS	Ubiquitin-Proteasomsystem
v/v	Volumen pro Volumen
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
YEB-Medium	Yeast Extract Beaf Medium

II. Ein- und Drei-Buchstaben-Code der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

III. Kurzzusammenfassung

Proteine spielen eine zentrale Rolle in jedem Organismus, daher ist ihre Regulation von großer Bedeutung für die Gesamthomöostase der Zelle. Fehlgefaltete oder nicht länger benötigte Proteine werden über das Ubiquitin-Proteasomsystem (UPS) abgebaut. Der *N-end rule pathway* korreliert die *in vivo* Halbwertszeit direkt mit dem präsentierten N-Terminus des Proteins und ist ein Teil des UPS. Bisher sind in Pflanzen nur wenige, über den *N-end rule pathway* regulierte Proteine bekannt. Diese spielen eine Rolle in der Regulation von Überflutungsstress.

In dieser Arbeit war es möglich, mit Hilfe von vergleichender Proteomik, ein neues Substrat des *N-end rule pathways* zu identifizieren und nachfolgend biochemisch zu charakterisieren. Zudem konnten über 50 Proteine gefunden werden, welche höher abundant in Mutanten des *N-end rule pathways* waren im Vergleich zum Wildtyp. Des Weiteren konnte hier gezeigt werden, dass das Protein RIN4, welches als *N-end rule* Substrat in gängigen Datenbanken zu finden ist, wahrscheinlich kein Substrat darstellt. Es wird nicht N-terminal abhängig *in vitro* degradiert und auch Experimente anderer Forschungsgruppen (Emmanuelle Graciet, persönliche Mitteilung) untermauern diese These, wohingegen die Stabilisierung von N-RIN4₁₁₋₁₅₂ in *ate1 ate2*- und *prt6-1*-Protoplasten im Vergleich zum Wildtyp wiederum für die Rolle des Proteins als ein Substrat des *N-end rule pathway* spricht. Die *in vitro* Deamidierungsexperimenten mit der NTAQ1 zeigten, dass N-RIN4 kein Substrat dieses Proteins darstellt.

Die Untersuchungen zu TGG2 in diesem Zusammenhang legen die Vermutung nahe, dass dieses Protein kein Substrat des *N-end rule* darstellt. Es wurde in der vergleichenden Proteomik als hochreguliert in den Mutanten des Abbauweges entdeckt und der destabilisierende N-Terminus erneut validiert, jedoch konnte keine N-terminal abhängige Destabilisierung *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zur Untersuchung von RD21a zeigen, dass es sich hierbei um das erste identifizierte Substrat des *N-end rule pathways* handelt, welches nicht mit MC beginnt. Es wurde als hochreguliert in der vergleichenden Proteomik entdeckt und zeigt eine N-terminale Destabilisierung *in vitro* als auch *in vivo*. Des Weiteren konnte sowohl die Interaktion mit der ATE1 *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen, sowie in einem Arginylierungsversuch der Umsatz von D-RD21a zu RD-RD21a nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass RD21a in den Mutanten des *N-end rule* abundanter ist als im Wildtyp und dass dies nicht auf eine erhöhte Transkription des Gens unter diesen Bedingungen zurückzuführen ist. Auch konnten Hinweise darauf gefunden werden, dass RD21a *in vivo* ein Substrat des N-Rekognin PRT6 darstellt. So wird rekombinant

exprimiertes D-RD21a/RD-RD21a in Pflanzenextrakt von Col-0 im Gegensatz zu *prt6-1* eindeutig ubiquitinyliert und auch endogen ubiquitinyliertes RD21a konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden.

1. Einleitung

Proteine spielen eine wichtige Rolle in jedem lebenden Organismus. So sind sie als Strukturbausteine am Aufbau der Zelle beteiligt, dienen als Enzyme der Regulation und Katalyse biochemischer Stoffwechselprozesse und tragen in ihrer Funktion als Speicherproteine zur energetischen Homöostase der Zelle bei (Alberts 2011). Als Transkriptionsfaktoren regulieren sie zum Beispiel das An- und Abschalten bestimmter Gene, zur Anpassung des Organismus an seine Umwelt. Da Pflanzen als sessile Lebewesen an ihren Standort gebunden sind, unterliegen sie vielen biotischen und abiotischen Umwelteinflüssen. So zählen zum Beispiel der Befall durch Schädlinge und Frassfeinde zu den biotischen Einflüssen, während Temperaturänderungen, Überflutung oder Dürre sowie Sonneneinstrahlung zu den abiotischen Faktoren zählen. Die Regulation von Abundanz und Abbau aller Proteine ist von entscheidender Bedeutung. Sind Proteine fehlgefaltet oder wird ihre Funktion nicht länger benötigt, ist ein schneller Abbau erforderlich.

1.1. Der N-end rule pathway als Teil des Ubiquitin-26S-Proteasomsystems

Fehlgefaltete oder nicht mehr benötigte Proteine werden durch E3-Ubiquitin-Ligasen erkannt und an internen Lysinresten mit dem kleinen Protein Ubiquitin (UBQ) verknüpft (Smalle und Vierstra 2004; Vierstra 2009; Pickart 2001)). Nach Polyubiquitinylierung erfolgt der Abbau des Proteins im 26S-Proteasom, wobei das UBQ vorher abgespaltet und erneut benutzt wird (Alberts 2011). Die Aktivierung von UBQ durch eine E1 (UBQ-aktivierendes Enzym) erfolgt in einer ATP-abhängigen Reaktion, wobei dieses erst an E1 bindet und anschließend auf eine E2 (UBQ-konjugierendes Enzym) übertragen wird (Pickart 2001; Vierstra 2009). Abhängig von der E3 Ligase wird nun das UBQ direkt von E2 auf das zu ubiquitinierende Protein übertragen, oder es wird zuerst an E3 und dann an das Substrat gebunden (Smalle und Vierstra 2004; Vierstra 2009) (Abbildung 1).

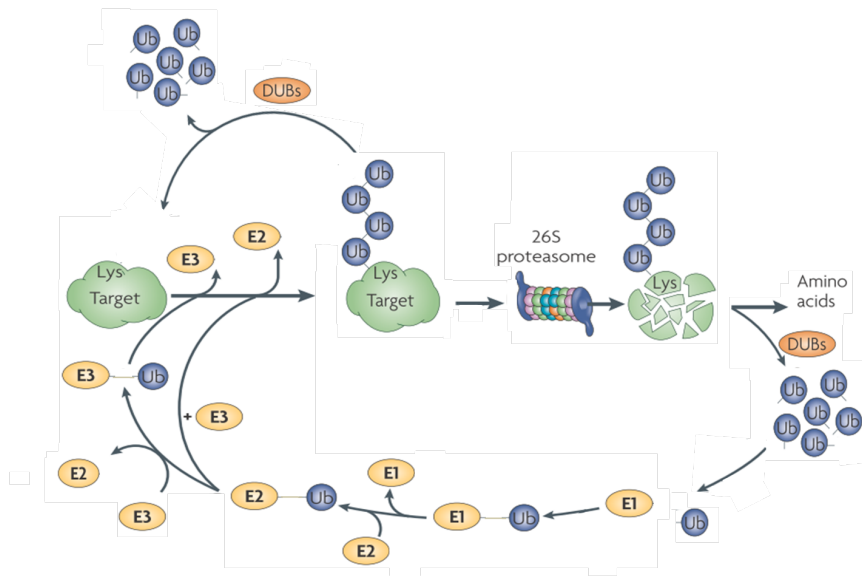


Abbildung 1: Kreislauf des Ubiquitin-Proteasomsystems (UPS). UbQ (blau) wird über eine Thioesterbindung an ein UbQ-aktivierendes Enzym (E1) gebunden und an ein UbQ-konjugierendes Enzym (E2) übertragen. E2-UbQ interagiert mit dem Komplex aus Zielprotein und der UbQ-Ligase (E3) und wird auf eine Lysinseitenkette übertragen. Es erfolgt eine Polyubiquitinierung welche durch Deubiquitinierende Enzyme (DUBs) entfernt werden kann. Das Polyubiquitinsignal bewirkt im UPS die Degradierung des Proteins über das 26S-Proteasom. Modifiziert nach Vierstra 2009.

Der *N-end rule pathway* ist ein spezieller Teil des UPS. Er korreliert die *in vivo* Halbwertszeit eines Proteins direkt mit der Identität seines N-Terminus (Varshavsky et al. 1987) und ist hierarchisch aufgebaut. Für einige Substrate bedeutet dies eine Kaskade mehrfacher biochemischer Modifikationen, welche durch hochspezifische proteinmodifizierende Enzyme katalysiert wird (Varshavsky 2011; Gibbs et al. 2014a; Gibbs et al. 2016). Er ist konserviert in Pro- und Eukaryoten wobei der Mechanismus der Proteolyse durch die Enzyme des eukaryotischen UPS, der bakteriellen und organellenspezifischen Proteasen variiert (Dogan et al. 2010; Graciet und Wellmer 2010; Varshavsky 2011; Tasaki et al. 2012; Gibbs et al. 2014a; Gibbs et al. 2016). Neben dem arginylierungsabhängigen *N-end rule* gibt es auch den acetylierungsabhängigen Teil (Hwang et al. 2010) (Abbildung 2).

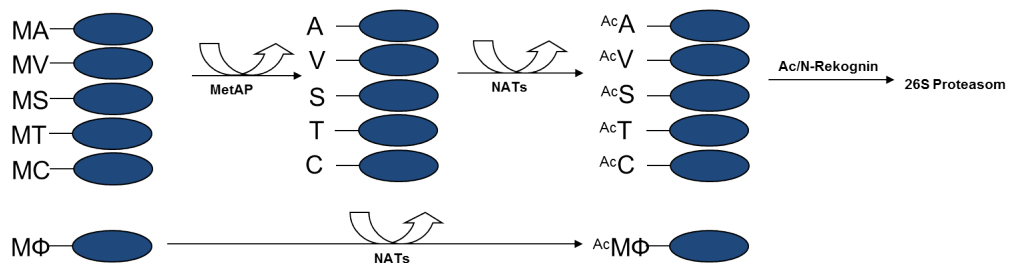


Abbildung 2: Schematische Darstellung des *Ac-N-end rule pathways* in Hefe. N-terminale acetyliertes M wird degradiert, wenn die zweite AS dem TypII-Degron entspricht. Die Acetylierung von Alanin (A), Valin (V), Serin (S), Threonin (T) und Cystein (C) findet nach Abspaltung des ersten Methionins (M) durch MetAPs statt. Modifiziert nach Gibbs et al. 2014a.

Bis zu 90% der gesamten Proteine werden kotranslational durch die Übertragung einer Acylgruppe vom Co-Enzym A auf die N-terminale α -Aminogruppe, katalysiert durch Nt-Acetyltransferasen (NATs) am N-Terminus modifiziert (Arnesen et al. 2009; Shemorry et al. 2013). Es wurde gezeigt, dass die E3-Ligase DOA10 (Degradation Of Alpha 10) N-terminal acetyliertes C als Substrat in *S. cerevisiae* erkennt und die Degradation einleitet (Hwang et al. 2010; Shemorry et al. 2013). Hierzu muss jedoch die Abspaltung der ersten AS durch sogenannte Met-Aminopeptidasen (MetAPs) vorangegangen sein. Weitere Studien zeigten zudem, dass eine zweite E3-Ligase NOT4 (Negative Regulator Of Transcription 4) ebenfalls als Ac/N-Rekognin fungiert und die N-terminale Acetylierung von M (gefolgt von einer großen hydrophoben AS wie F), A, V, S und T katalysiert (Kim et al. 2014). Die Entdeckung, dass COG1 (Untereinheit des oligomeren Golgi-Komplexes) und HCN1 (High Copy Supressor For Cut Nine 1, Untereinheit) über diesen Teil des *N-end rule* degradiert werden, unterstreicht dessen physiologische Wichtigkeit. In dieser Arbeit wird speziell auf den Arginylierungspart des *N-end rule* eingegangen (im weiteren Verlauf nur als *N-end rule pathway* bezeichnet, siehe Abbildung 3).

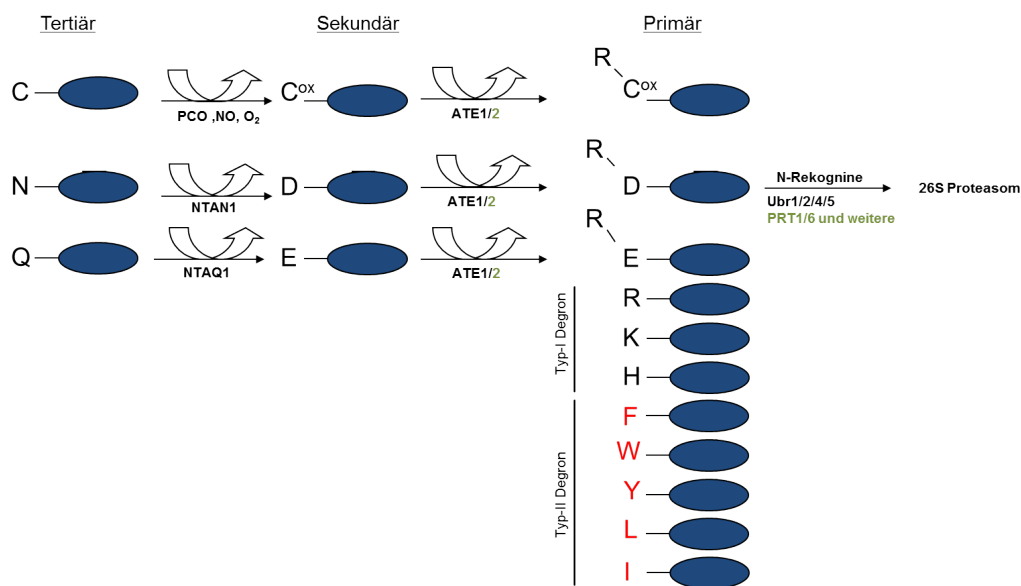


Abbildung 3: Schematische Darstellung des *Arg-N-end rule pathways*. Proteine können nach Spaltung durch eine Protease tertiäre, sekundäre oder primäre destabilisierende N-Termini präsentieren. Tertiär stabile AS wie C, Asparagin (N), Glutamin (Q) können durch Oxidation (C) oder Deamidation (N, Q) zu sekundär destabilisierenden AS umgewandelt werden. Diese werden durch ATE erkannt und arginyliert, was zur Generierung eines primär destabilisierenden N-Terminus Arginin (R) führt. Typ-I Degrone umfasst die basischen AS R, Lysin (K) und Histidin (H), während große und/oder hydrophobe AS wie Phenylalanin (F), Tryptophan (W), Tyrosin (Y), Leucin (L) und Isoleucin (I) zum Typ-II Degrone zählen (rot). Diese können von N-Rekogninen erkannt und dem 26S-Proteasom zum Abbau zugeführt werden. Die pflanzenspezifischen Komponenten sind mit grüner Schrift kenntlich gemacht. Modifiziert nach Gibbs et al. 2014a.

N-terminal präsentierte Aminosäuren (AS) können in stabilisierende und destabilisierende hinsichtlich der Proteinhalbwertszeit unterteilt werden (Varshavsky 1997; Giglione et al. 2003). Die destabilen AS an einem flexiblen N-terminus mit einem Lysin in sterischer Nähe werden als N-Degrone (Varshavsky 1991) bezeichnet (Bachmair et al. 1986; Varshavsky

1997). Zu den stabilisierenden AS zählen zum Beispiel G und M, während sich die destabilisierenden in tertiär, sekundär und primär destabilisierenden AS unterteilen (Giglione et al. 2003; Varshavsky 2011; Tasaki et al. 2012; Gibbs et al. 2014a, Abbildung 3). Zu den tertiären gehören N, Q und C (Tasaki et al. 2012). N und Q werden von sogenannten Deamidasen (NTAs) zu den sekundär destabilisierenden Aminosäuren D und E metabolisiert (Stewart et al. 1994; Grigoryev et al. 1996; Wang et al. 2009), während C in Pflanzen durch Stickstoffmonoxid (Gibbs et al. 2014b) oder eine pflanzliche Cysteinyldioxygenase unter Sauerstoffverbrauch zum sekundär destabilen Cys^{ox} umgewandelt wird (Weits et al. 2014). Im tierischen System ist bisher nur die Oxidation durch Stickstoffmonoxid bekannt (Hu et al. 2005). Die sekundär destabilisierenden Aminosäuren D, Q und Cys^{ox} können von Arginyl-tRNA-Transferasen (ATEs) erkannt werden (Ciechanover et al. 1988). Diese Enzyme konjugieren N-terminal die AS R an das Protein. R zählt neben K und H zu den basischen Typ I Degrons, während L, F, W, Y und I zu den hydrophoben Typ II Degrons zählen (Varshavsky 1996, Abbildung 3). Diese Degrons werden in Tieren und Hefen durch funktionelle Homologe der Hefe-Ubr1-E3 Ligase erkannt, ubiquitinyliert und dem 26S-Proteasom zugeführt (Varshavsky 2011; Tasaki et al. 2012; Gibbs et al. 2014b). Es handelt sich bei diesen Enzymen um so genannte N-Rekognine (E3-UBQ-Ligasen des *N-end rule pathways*) (Varshavsky 1991). Im tierischen System wurden bereits verschiedene N-Rekognine wie Ubr1 (Sultana et al. 2012), Ubr 2 (An et al. 2012), Ubr 4 (Tasaki et al. 2013a) und Ubr5 (Tasaki et al. 2005), identifiziert. Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Substratspezifität, wohingegen die Ubr1 aus *S. cerevisiae* sowohl Typ I als auch Typ II Degrons erkennt (Tasaki et al. 2005). In Pflanzen sind bisher zwei potentielle N-Rekognine identifiziert worden. PROTEOLYSIS (PRT) 1 (Potuschak et al. 1998; Sary et al. 2003) und 6 (Garzón et al. 2007). PRT1 ist ein Funktionshomolog der Hefe-Ubr1, während PRT6 aufgrund seiner Sequenzhomologie zu diesem entdeckt wurde. Ein Reporterprotein beginnend mit F als N-Terminus ist in *prt1*-Mutanten stabilisiert, während es in mit PRT1 komplementierten, *ubr1*-defizienten Hefezellen destabilisiert ist (Potuschak et al. 1998; Sary et al. 2003). In *prt6*-Mutanten sind im Gegensatz dazu Reporterkonstrukte beginnend mit R und K destabilisiert (Garzón et al. 2007). Es sind zwei pflanzliche Gene der ATE in *Arabidopsis thaliana* identifiziert worden (Graciet et al. 2009), wohingegen es nur eine im tierischen System gibt (Graciet et al. 2006). Neuere Studien haben einen möglichen Zusammenhang zwischen dem *N-end rule pathway* und Autophagie offengelegt, wobei es drei Varianten der Autophagie gibt. In der Makroautophagie werden zytosolische Komponenten von einer Doppelmembranstruktur umgeben, welche das Autophagosom formen. Nach Fusion mit dem Lysosom (oder im pflanzlichen Gewebe auch mit der Vakuole) werden die Proteine durch die in diesem Kompartimenten enthaltenen Hydrolasen abgebaut. Im Gegensatz dazu werden die zytosolischen Komponenten in der Mikroautophagie direkt von der Vakuolenmembran aufgenommen (Cuervo 2004). Eine dritte Variante bietet die Chaperon-abhängige Autophagie. Hier erkennen Helferproteine (Chaperone) bestimmte

Signalsequenzen, binden und transportieren das Zielprotein daraufhin zum Lysosom. Im tierischen System konnte gezeigt werden, dass ein Verlust der Ubr4 zu multiplen Missregulationen im autophagischen Weg führt (Kim et al. 2013a). Des Weiteren konnte auch gezeigt werden, dass die N-terminale Arginylierung ebenfalls als autophagisches Degradationssignal wirkt (Cha-Molstad et al. 2015a; Cha-Molstad et al. 2015b; Cha-Molstad et al. 2016).

1.2. Deamidasen NTAN1 und NTAQ1

Die Deamidierung der tertiär destabilisierenden AS N und Q ist der erste Schritt in der Hierarchie des *N-end rule pathways*. In *S. cerevisiae* wurde ein Gen identifiziert, dessen Produkt schwach exprimiert ist und N und Q am N-Terminus eines Referenzproteins gleichermaßen deamidieren kann (Baker und Varshavsky 1995). Das Enzym weist eine schwache Sequenzhomologie zu bekannten aliphatischen Amidasen aus Bakterien auf, diese besteht hauptsächlich im aktiven Zentrum, wo ein hochkonserviertes C die Substratspezifität ausmacht. Die Kristallstruktur der humanen Ntaq1 half die hochkonservierte katalytische Triade C-H-D anhand eines modellierten Reaktionsmechanismus zu beschreiben (Park et al. 2014). Im Gegensatz dazu besteht keine Homologie zu der Ntan1 aus Säugetieren (Stewart et al. 1994; Grigoryev et al. 1996). Mit Hilfe von Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, dass die NTA die einzige Deamidase in *S. cerevisiae* ist (Baker und Varshavsky 1995). Es wird postuliert, dass die NTA einen *multi-targeting*-Komplex mit Ate bilden könnte, welcher wiederum mit Ubr1 in der Nähe der Typ I-Degronbindestelle assoziiert wäre (Baker und Varshavsky 1995).

Im tierischen und pflanzlichen System gibt es zwei jeweils für N und Q spezifische NTAs (Grigoryev et al. 1996; Wang et al. 2009). Erstmals gereinigt wurde die Ntan1 von Stewart et al. 1994 aus der Leber von Schweinen. Es weist eine Substratspezifität für N, jedoch nicht für Q auf und kann durch Co^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} gehemmt werden (Stewart et al. 1994, 1995). Die Maus-Ntan1 ist zu 88% ähnlich dem Enzym aus Schweinen und zu 92% identisch zu der humanen Variante. Zudem ist es möglich, in Δnta -Hefen die Deamidierung von N, jedoch nicht von Q mit der Maus-Ntan1 wiederherzustellen. Ntan1^{-/-}-Mäuse zeigen ein verringertes Sozial- und Lernverhalten im Vergleich zu Ntan1^{+/+}-Mäusen (Kwon et al. 2000). Mittels eines direkten Isolationsansatzes aus Zellextrakt konnte auch die Ntaq1 in Mäusen identifiziert und erfolgreich gereinigt werden (Wang et al. 2009). Die Sequenz ist hochkonserviert und eine Kristallstruktur der humanen Ntaq1 ist unter dem Code 3C9Q in der pdb-Datenbank einsehbar. Lokalisationsexperimente zeigen das Protein im Nukleus und Zytoplasma. Komplementationversuche in Δnta -Hefen führten zur Deamidierung von Peptiden, welche ein Q, jedoch nicht von Peptiden mit einem N am N-Terminus präsentierten.

Mittels Homologierecherchen konnte für *Arabidopsis* und die Alge *Thalassiosira pseudonana* Orthologe zu den bekannten Säuger-NTAs gefunden werden. Die enzymatische Funktion wurde durch Reportertests bestätigt (Graciet et al. 2010).

1.3. Arginyltransferasen ATE1 und ATE2

Die Arginylierung der sekundär destabilisierenden N-Termini D, E und C^{ox} an der α -Aminogruppe bewirkt, dass ein Protein nun einen primär destabilisierenden N-Terminus präsentiert (Wang et al. 2014). Diese Reaktion wird von ATEs katalysiert. Bis jetzt wurden über 200 Proteine als Substrate der N-terminalen Arginylierung vorausgesagt (Piatkov et al. 2012a; Piatkov et al. 2012b; Crawford et al. 2013; Piatkov et al. 2014; Liu et al. 2016). In Hefen (Savage et al. 1983) und Säugetieren gibt es jeweils ein Ate-Gen (Wang et al. 2011). Während der *Knockout* der Hefe-Ate (Balzi et al. 1990) zu keiner sichtbaren Veränderung führt, gibt es in Säugetieren sechs Isoformen dieses Gens (Kwon et al. 1999; Wang et al. 2011). Die Deletion führt in Mausembryonen zu einer Missbildung des Herzens durch fehlende Aktin-Arginylierung, was eine embryonale Letalität nach sich zieht (Kwon et al. 2002; Rai et al. 2008). *Knockdown*-Mäuse, in denen nur noch eine geringe Ate-Expression stattfindet, zeigen eine stark reduzierte männliche Fruchtbarkeit. Dies konnte auf den Arest der Spermatozyten in der Meiose I und nachfolgender Apoptose der Zellen durch die fehlende Arginylierung zurückgeführt werden. Die Vermutungen gehen dahin, dass ein Separase-erzeugtes Fragment der Cohesin-Untereinheit Rac8 nicht mehr abgebaut werden kann und daher der Schritt in die Telophase I fehlschlägt (Liu et al. 2016). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass Ates als Tumorsuppressor aktiv sein könnte, da in bestimmten Krebsarten die Proteinkonzentration im Tumor stark reduziert ist (Rai et al. 2015). Auch sind die Isoformen Ate1-1 und Ate1-2 aus Maus spezifisch für N-terminal präsentierte D und E, wohingegen Ate1-3 und Ate1-4 diese N-Termini nicht arginylieren können. Alle vier Isoformen sind in der Lage C als Substrat zu erkennen (Rai und Kashina 2005). Ebenfalls im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym unabhängig von der entsprechenden Arg-tRNA-Synthetase und ATP arbeitet und sich zudem in Abwesenheit von Substraten selbst arginyliert (Wang et al. 2011). Obwohl Kofaktorbinding scheinbar nicht essentiell für die Aktivität ist, erhöht sich diese durch die Interaktion von Ate1 mit Liat1 (Ligand Of Ate 1), wobei dieses nicht arginyliert wird (Brower et al. 2014). Neben Aktin sind auch RGS4, RGS5, RGS16 (Lee et al. 2005; Saha et al. 2012), welche als erste physiologische *N-end rule*-Substrate im tierischen System identifiziert wurden (Hu et al. 2006), sowie GRP78 und PDI als putative Substrate der Maus-Ate bekannt. Eine Studie zur Identifizierung neuer Substrate der Ate mittels 2D Gelelektrophorese hat zudem ergeben, dass N-terminale Arginylierungen nicht nur auf die AS D, E und C^{ox} beschränkt ist. So konnte gezeigt werden, dass die leichte Kette des Dyneins am ersten M einen Argininrest trägt. Weitere *N-end rule pathway* unabhängige Substrate sind zudem Tubulin β 6, ARP3 (Actin Related Protein 3) und die Pyruvatdehydrogenase E1 α 1 (Wong et al. 2007). Es wurde

ebenfalls gezeigt, dass arginylierte Proteine im Maussystem auch stabilisiert werden können (Karakozova et al. 2006). Deletionsmutanten aus *S. cerevisiae* können durch die Ate1-1 und Ate1-2 Isoform komplementiert werden. Die Arginylierung von E kann bewirken, dass in tierischen Zellkulturen Proteine via p62-Bindung zur Autophagie-medierten Degradation geführt werden (Cha-Molstad et al. 2015b). Des Weiteren ist auch bekannt, dass die tierische Ate1 durchaus in der Lage ist, interne Carboxylgruppen der E- und D-Seitenketten *in vivo* zu arginylieren. Diese Entdeckung unterstreicht die Möglichkeit, dass posttranslationale Arginylierung nicht automatisch zur Degradation des entsprechenden Proteins führt (Wang et al. 2014).

In dem Moos *Physcomitrella patens* konnten durch Homologierecherchen zwei potentielle Gene für die ATE identifiziert werden. Nur eines davon führt zu einem Protein. Dieses scheint mit einem Hitzeschockprotein (PpsHSP17.2a) zu interagieren, wobei es hier zu keiner Arginylierung kommt. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass auch in Pflanzen eine Interaktion von ATE mit anderen Proteinen die Arginylierungsreaktion beeinflusst (Hoernstein et al. 2016). Nullmutanten zeigen eine stark verlangsamte Entwicklung mit morphologisch veränderten Chloroplasten und Blättern. Die Behandlung dieser Mutanten mit Auxin und Abscisinsäure (ABA) bewirkt einen moderaten (Auxin) bis starken (ABA) Anstieg des Proteinlevels in diesem Organismus. Neben diesen entwicklungsbiologischen Effekten konnte auch eine davon unabhängige Überakkumulation von Stärke in den Plastiden detektiert werden. Daher wird diskutiert, ob nicht der *N-end rule pathway* in Pflanzen ebenfalls eine Rolle im Energiemetabolismus darstellt (Schuessele et al. 2016). Über Pull-down Experimente konnten bisher vier potentielle Substrate identifiziert werden. Dazu gehören PpAARE (Acylamino-acid Releasing Enzyme), PpATAD3.1 (putative AAA-Type ATPase), PpABC20 (ABC-Transporter Family Protein) und ein uncharakterisiertes Protein, wobei für PpATAD3.1 die N-terminale Arginylierung massenspektrometrisch nachgewiesen werden konnte (Hoernstein et al. 2016).

In *Arabidopsis* gibt es zwei Gene, welche für ATE1 und ATE2 kodieren. Eine Deletion im ATE1-Gen führt zu einer verzögerten Blattsenesenz, wobei nicht die Initiation sondern viel mehr die Geschwindigkeit der Blattalterung in *ate1*-Mutanten beeinflusst wird (Yoshida et al. 2002). Doppelknockout *ate1 ate2*-Pflanzen zeigen eine verlangsamte Keimung, Blatt- und Seneszenzentwicklung (Graciet et al. 2009), was als Auxin-unabhängig identifiziert wurde. Zudem konnte gezeigt werden, dass in den Wurzeln dieser Mutanten Ölkörperchen eingelagert werden und sie hypersensitiv auf ABA reagieren (Holman et al. 2009). Dies ist nicht auf eine Unterbrechung der β -Oxidation zurückzuführen. Neuere Studien zeigen, dass Pathogenabwehrgene in *ate1 ate2*-Pflanzen herunterreguliert sind im Vergleich zum Wildtyp und dass sie eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber *B. cinerea*, *E. cruciferarum* und *P. syringae* zeigen. Zudem ist der Glucosinolat- und Jasmonsäuregehalt ebenfalls reduziert (de Marchi et al. 2016). Beide Gene von ATE1/2 sind zu 58% identisch, jedoch konnte gezeigt werden,

dass ATE1 das aktivere und höher exprimierte Protein in *Arabidopsis* darstellt (Graciet et al. 2009). Beide Gene werden in nahezu allen Geweben exprimiert, wobei nur die ATE2 in den Pollensäcken von *Arabidopsis* vorkommt (Graciet et al. 2009). Die 2011 veröffentlichten Substrate des *N-end rule* (ERF VII, siehe 1.6) sollten nach der Oxidation des N-terminalen Cs arginyliert werden, um anschließend PRT6-mediert degradiert werden zu können (Gibbs et al. 2011; Licausi et al. 2011; Licausi 2013).

1.4. N-Rekognitive PRT6 und PRT1

Die Ubiquitylierung ist der letzte Schritt, um ein Protein über das UPS dem 26S-Proteasom zuzuführen. Hierfür sind die sogenannten E3-UBQ-Ligasen zuständig, denn sie vermitteln je nach Funktionsweise die Übertragung des aktivierten UBQs auf das abzubauen Substrat (Smalle und Vierstra 2004). Im *N-end rule pathway* gibt es zwei Typen von N-Degrone. Typ 1 besteht aus geladenen AS wie R, H und K. Typ 2 wird durch hydrophobe AS wie F, W, I, L und Y dargestellt (Varshavsky 2011, siehe Abbildung 3). In *S.cerevisiae* ist die Ubr1 die E3-Ligase des *N-end rule pathways* (Bachmair et al. 1986; Bartel et al. 1990). Sie besitzt zwei Erkennungszentren, jeweils für Typ 1 und Typ 2 und *Knockout*-Linien sind nicht in der Lage Modellsubstrate mit den destabilen N-Termini R und F abzubauen. Dieses Protein gehört zu den RING-E3-UBQ-Ligasen (Really Interesting New Gene) (Freemont et al. 1991) und hat eine konservierte UBR-Domäne (UBiquitin Recognin, Tasaki et al. 2005; Xia et al. 2008; Tasaki et al. 2009; Matta-Camacho et al. 2010; Kaur und Subramanian 2015). Nach der Bindung des Substratproteins wird UBQ durch die RING-Domäne auf einen internen K-Rest übertragen. Ein Substrat der Ubr1 in Hefe ist zum Beispiel die Untereinheit des Cohesinkomplexes Scc1 (Rao et al. 2001). Durch Homologierecherche konnten in Tieren insgesamt sieben UBR-Box enthaltende Proteine identifiziert werden, von denen vier eine Rolle im *N-end rule pathway* spielen (Tasaki et al. 2009). Ubr1, 2 und 3 besitzen ebenfalls eine konserviert RING-Domäne und eine UBR-Box welche im Falle von Ubr1 und 2 wichtig zur Erkennung von Typ 1-Degrone sowie eine N-Domäne, diese ist zur Erkennung von Typ 2-Degrone essentiell. Ubr1 und 2 sind funktionell redundant, da sie sowohl Typ 1 als auch Typ 2 Degrone erkennen und ubiquitylieren (Tasaki et al. 2009; An et al. 2012). Bei der autosomal rezessiven Gehirnkrankheit, dem sogenannten Johanson-Blizzard-Syndrom, ist die Aktivität der Ubr1 gestört (Zenker et al. 2005). Ubr3, 6 und 7 gehören nicht zu den N-Rekogninen, Ubr4 und 5 erkennen Typ 1, aber nicht Typ 2-Degrone (Tasaki et al. 2005; Tasaki et al. 2013a). Ubr1, 2, 4 und 5 sind durch das Dipeptid Arg-Ala inhibierbar (Tasaki et al. 2005; Tasaki et al. 2013a). In Maus-Zellkulturen mit Ubr4-Deletion konnte gezeigt werden, dass der Autophagiemetabolismus gestört ist und es zu einer Anhäufung autophagischer Vakuolen kommt (Kim et al. 2013a). Auch ist die Deletion für Mäuse embryonal-letal. Ein bekanntes Substrat von Ubr2 ist das Histon H2A (An et al. 2010). Die Kristallstrukturen der Ubr1 und 2 sind in der Proteindatenbank pdb unter den Nummern 3NY1 und 3NY2 hinterlegt (Matta-Camacho et al. 2010).

In Pflanzen sind bisher zwei N-Rekognine und potentielle E3-UBQ-Ligasen des *N-end rule pathways* bekannt, PRT 1 (PROTEOLYSIS) (Potuschak et al. 1998; Stary et al. 2003) und 6 (Garzón et al. 2007). PRT1 weist keine Sequenzhomologie zur Ubr1 aus Hefe auf. Dennoch ist es in der Lage $\Delta ubr1$ -Hefe im Hinblick auf die Degradation von F-Substraten zu komplementieren (Potuschak et al. 1998) und stellt somit ein Funktionshomolog dar. Strukturell besitzt PRT1 zwei RING-Finger Domänen und eine ZZ-Domäne, welche als potenzielle Zn^{2+} -Bindestelle angesehen wird (Kaur und Subramanian 2015). In *prt1*-Mutanten ist der Abbau von F-Substraten inhibiert, jedoch werden Proteine mit Typ 1-Degron weiterhin abgebaut. PRT1 ist somit wahrscheinlich für die Erkennung von voluminösen AS zuständig (Stary et al. 2003). PRT6 hingegen ist ein Sequenzhomolog zur Ubr1 in Hefe (Garzón et al. 2007). Untersuchungen mit *prt6*-Pflanzen haben ergeben, dass ein Referenzprotein mit Typ 1-Degron dort im Vergleich zum Wildtyp stabilisiert ist. Potentielle Substrate von PRT6 sind unter anderem ein Teil der Proteine der Gruppe 7 der ERFs (Ethylene Response Factors) in *Arabidopsis* und Gerste (Gibbs et al. 2011; Licausi et al. 2011; Licausi et al. 2013; Gibbs et al. 2014b; Mendiondo et al. 2015; Gibbs et al. 2016). *Prt6*-Pflanzen zeichnen sich durch eine erhöhte Sensitivität gegenüber von ABA aus, sowie durch eine erhöhte Wasserstresstoleranz (Gibbs et al. 2011). Auch in Gerste konnte gezeigt werden, dass der *Knockdown* des PRT6-Gens eine erhöhte Expression von ADH (Alkoholdehydrogenase) und PDC (Pyruvatdecarboxylase) aufweist (Mendiondo et al. 2015). Zudem sind Hypoxie-induzierte Gene wie die Saccharose Synthasen 1 und 4 (SUS1/4) in *prt6*-Mutanten hochexprimiert (Riber et al. 2015). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es sich bei *ged1* (Greening After Extended Darkness 1) ebenfalls um eine Mutante von *prt6* handelt. *Prt6*-Mutanten beinhalten nach einer mehrtägigen Dunkelperiode und zwei Tagen Licht mehr Chlorophyll als der dazugehörige Wildtyp. Messungen nach 24 Stunden Dunkelheit und Stickstoffatmosphäre zeigten zudem, dass die Stärkekonzentration in *prt6*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp stark erhöht ist.

1.5. Bekannte N-end rule-Substrate in planta: ETHYLENE RESPONSE FACTORS (ERFs) Klasse VII

In Pflanzen sind bisher nur wenige Proteine, welche über den *N-end rule pathway* reguliert werden bekannt. Hierzu zählen unter anderem die Proteine der ERF VII (Gibbs et al. 2011; Licausi et al. 2011). Alle ERFs zeigen die gleiche DNA-Bindedomäne und sind als Transkriptionsfaktoren beschrieben (Bailey-Serres et al. 2012). Die Gruppe VII beinhaltet fünf Proteine: RAP2.12, RAP2.2, RAP2.3, HRE1 und HRE2. Alle beginnen mit dem gleichen N-Terminus MC (Licausi et al. 2011; Gibbs et al. 2011; Gibbs et al. 2014b). Für RAP2.12. konnte gezeigt werden, dass es unter normoxischen Bedingungen im Zytosol membranständig lokalisiert ist. Mit Hilfe von bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC) konnte die Interaktion von RAP2.12. mit dem membranbindenden Proteinen ACBP1 und 2 nachgewiesen werden. Kommt es in der Pflanze aufgrund von Überflutung zu

Sauerstoffmangel, gelangt RAP2.12. in den Zellkern und induziert dort die Translation Hypoxie-responsiver Gene (Licausi et al. 2011; Licausi et al. 2013). Es wurde festgestellt, dass in den *N-end rule*-Mutanten *prt6* und *ate 1 ate2* die hypoxieassoziierten Proteine ADH1 SUS4 und PDC1 konstitutiv exprimiert werden, wohingegen sie im Wildtyp erst nach Hypoxie zu detektieren waren (Gibbs et al. 2011). Auch die Keimung der Samen von *prt6* und *ate 1 ate2* unter Sauerstoffmangel ist im Vergleich besser als die des Wildtyps. Durch Experimente mit dem Proteasominhibitor MG132 und Dipeptiden wie Arg-Ala konnten HRE1 und 2 als potentielle Substrate des *N-end rule pathway*s identifiziert werden. Ihre Stabilität ist in den entsprechenden Mutanten signifikant erhöht und entspricht der von mit MG132 behandelten wildtypischen Pflanzen (Gibbs et al. 2011). Stabilitätsuntersuchungen an RAP2.12 erbrachten die gleichen Ergebnisse wie für HRE1 und 2 (Licausi et al. 2011). Durch Met-Aminopeptidasen sollte das erste M der ERFs entfernt und der N-Terminus durch ein C repräsentiert werden. Unter Normoxia könnte dieses durch die PCO (Plant Cysteine Oxidase) (Weits et al. 2014) mit molekularem Sauerstoff oxidiert, durch die ATE arginyliert und anschließend durch PRT6 ubiquitinyliert werden. Daher sind sie unter normoxischen Bedingungen nicht detektierbar (Sasidharan und Mustroph 2011). Sind die Pflanzen durch Überflutung von Wasser umgeben, verlieren sie O₂ aus den Wurzeln. Dieser Sauerstoffmangel wird in Reis zum Beispiel durch SUB1A erkannt (Bailey-Serres et al. 2012). In *Arabidopsis* steigt der Ethylengehalt und aktiviert die ERF-Transkription (Licausi 2013). Neben der Genaktivierung werden nun auch die bereits synthetisierten ERFs stabilisiert, da eine Oxidation des N-terminalen C nicht mehr möglich ist. RAP2.12. wird vom Zytosol in den Kern transportiert und aktiviert dort die Hypoxie-responsiven Gene. Erreicht die Pflanze wieder den ursprünglichen O₂- Gehalt wird RAP2.12. im Nukleus degradiert. Das Gerstenprotein BERF1 (Barley ERF1), welches die höchste Analogie zu RAP2.12 aufweist, wird ebenfalls über den *N-end rule pathway* reguliert (Mendondo et al. 2015). Die N-terminale Konsensussequenz MCGGAIL wird durch das PRT6 der Gerste erkannt und ist unter normoxischen Bedingungen nicht detektierbar. Bei anoxischen Bedingungen hingegen wird es stabilisiert. *Knockdown*-Linien zeigen einen vergleichbaren Phänotyp wie *prt6*-Mutanten von *Arabidopsis*, wodurch die Rolle des *N-end rule* im Sauerstoff-Sensing untermauert wird (Mendondo et al. 2015).

1.6. RPM1 INTERACTING PROTEIN (RIN4)

Pflanzen sind einer Vielzahl von Pathogenen ausgesetzt und haben zwei ineinandergreifende Abwehrmechanismen entwickelt. Der erste beinhaltet die Erkennung von Bakterienproteinen (Pathogene Associated Molecular Pattern, PAMP) über spezifische Rezeptoren an der Membran. So wird zum Beispiel das Epitop von Flagellin erkannt und eine Signalkaskade zur Abwehr des Pathogens aktiviert. Dies bezeichnet man als PTI (PAMP-Triggerted Immunity, Spoel und Dong 2012). Um diese erste Immunantwort zu unterdrücken, sekretieren viele Pathogene Virulenzfaktoren in das Innere der Zelle. Diese

werden wiederum durch spezifische Abwehrproteine der Pflanze erkannt und es kommt zu der sogenannten ETI (Effector Triggered Immunity, Boller und He 2009). RIN4 (RPM1 Interacting Protein 4, At3g5070) ist in dieser Abwehrreaktion als Schutzprotein involviert und reguliert negativ die PTI (Kim et al. 2005b). Überexpressionslinien zeigen eine dickere Zellwand und *Knockout*-Linien *rin4 rps2* haben eine leicht erhöhte PTI Antwort (Kim et al. 2005b). Es ist durch Acylierung konservierter C und F-Reste an der Membran lokalisiert (Takemoto und Jones 2005) und bildet unter anderem einen Komplex mit zwei weiteren Proteinen RPS2 (Resistance To *Pseudomonas Syringae* 2) (Day et al. 2005) und RPM1 (Resistance To *Pseudomonas Syringae* Pv *Maculicola* 1) (Kim et al. 2005a). RIN4-Homologe aus Salat (Jeuken, Marieke J W et al. 2009), Soja (Selote und Kachroo 2010) und Tomate (Luo et al. 2009) sind ebenfalls Mediatoren der Immunantwort. Innerhalb der Zelle phosphoryliert die RIPK (RPM1-Induced Protein Kinase) RIN4 an den Resten T21, S160 und T166 (Liu et al. 2011a). Das Protein wird von vier verschiedenen Effektorproteinen aus *Pseudomonas syringae* modifiziert (Deslandes und Rivas 2012). Dabei bewirkt die Phosphorylierung an dem konservierten T166 durch AvrB und AvrRpm1 die Aktivierung der ETI durch RPM1 (Mackey et al. 2002; Chung et al. 2011; Liu et al. 2011a). Es konnte gezeigt werden, dass das Cyclophilin ROC1 P149 isomerisiert und dies zur Aktivierung von RPM1 führen kann. Die Phosphorylierung an T166 inhibiert die ROC1-RIN4-Interaktion, jedoch kann auch RIN4 Δ P149 die RPM1-b Immunantwort aktivieren (Li et al. 2014). Die Spaltung an zwei konservierten Stellen durch die Cysteinprotease AvrRpt2 (Axtell et al. 2003) führt zur Aktivierung der ETI durch RPS2 (Chisholm et al. 2005; Kim et al. 2005a). Hierbei erkennt der Immunrezeptor RPS2 die Abwesenheit von RIN4 und in Folge dessen kommt es zur Hypersensitiven Reaktion (Deslandes und Rivas 2012). Daher ist der *Knockout rin4* nur überlebensfähig, wenn gleichzeitig RPS2 inaktiv ist, da RIN4 die Aktivität des Rezeptors inhibiert (Axtell und Staskawicz 2003; Mackey et al. 2003). Welchen Effekt die Interaktion von HopF2 (Robert-Seilaniantz et al. 2006) mit RIN4 hat ist noch nicht geklärt. Die Isolierung von nativem RIN4 hat ergeben, dass das Protein nicht nur mit RIPK, RPM1 und RPS2 assoziiert, sondern ebenfalls direkt mit der C-terminalen regulatorischen Domäne der Plasmamembran H^+ -ATPasen AHA1 und 2 interagiert. Dies führt zur Aktivierung der Protonenpumpen und damit zur Initiation eines elektrochemischen Gradienten, der unter anderem Wasserimport und Stomataöffnung zur Folge hat (Elmore und Coaker 2011). Es konnte gezeigt werden, dass die RIPK-vermittelte Phosphorylierung hierbei eine zentrale Rolle spielt (Lee et al. 2015a). *Rin4*- und *ripk*-Pflanzen zeigen eine verminderte Stomataöffnung nach Coronatinbehandlung. Dies impliziert eine wichtige Rolle des phosphorylierten RIN4s in der Immunantwort der Schließzellen (Liu et al. 2009; Lee et al. 2015a). In weiterführenden Experimenten konnte durch Immunoprecipitation die Interaktion von RIN4 und FLS2 nachgewiesen werden (Chung et al. 2014; Macho und Zipfel 2014). Die Spaltsequenz von AvrRpt2 ist PX_1FGX_2W , wobei X_1 als variabel gilt und X_2 den N-Terminus des neu entstanden Fragments widerspiegelt (Chisholm et al. 2005; Takemoto und Jones

2005). Es entstehen drei Fragmente: ein 10 AS-langes Peptid (N-Terminus, AS1-10), das Mittelstück (AS11-152, neuer N-Terminus ist N) und der C-terminale Teil des Proteins, welcher an der Membran assoziiert bleibt (AS153-211, neuer N-Terminus ist D). Das N-terminale Peptid sowie das Mittelstück bewirken im Cytosol die Aktivierung der RPS2-ETI (Kim et al. 2005a; Day et al. 2005). Die Spaltung durch AvrRpt2 aktiviert zwar die ETI, jedoch sind die Fragmente von RIN4 starke PTI-Suppressoren (Afzal et al. 2011). Sowohl das Mittelstück als auch das membranassoziierte C-terminale Fragment besitzen eine sogenannte NOI-Domäne (NO-Induced Domain). Diese ist in verschiedenen Pflanzenspezies konserviert und für die Inhibierung der PTI nötig (Afzal et al. 2011). Durch die Spaltung von RIN4 entstehen zwei neue N-Termini, welche im *N-end rule pathway* als destabilisierend gelten (Abbildung 4). Aufgrund von Untersuchungen RIN4₁₋₃₀-GFP (RIN4:AS1-30) in *N. benthamiana* wurde die Hypothese aufgestellt, dass es ein Substrat des *N-end rule* sei (Takemoto und Jones 2005). Es konnte beobachtet werden, dass ein Austausch der N11G innerhalb der ersten Spaltsequenz zu einer Stabilisierung des Fusionsproteins im Vergleich zur nativen Proteinsequenz führt (TAIR, The Arabidopsis Information Resource, www.arabidopsis.info; Locus: AT3G25070). Untersuchungen des Vollängen RIN4 konnten diese Ergebnisse stützen. Hier wurden in verschiedenen Experimenten die Spaltstellen von AvrRpt2 mutiert, sodass eine Spaltung nicht möglich war. Auch hier konnte beobachtet werden, dass die Fragmente entsprechend ihres N-Terminus stabilisiert (G am N-Terminus) bzw. destabilisiert (N am N-Terminus) waren (Chisholm et al. 2005). Experimente in *Arabidopsis*-Pflanzen widerlegten die Ergebnisse aus *N. benthamiana*, denn hier konnte keine Destabilisierung von RIN4 in Abhängigkeit des N-Terminus beobachtet werden (Kim et al. 2005a; Day et al. 2005). Trotzdem wird RIN4 als Substrat des pflanzlichen *N-end rule pathways* in der Datenbank TAIR (www.arabidopsis.org) angeführt.

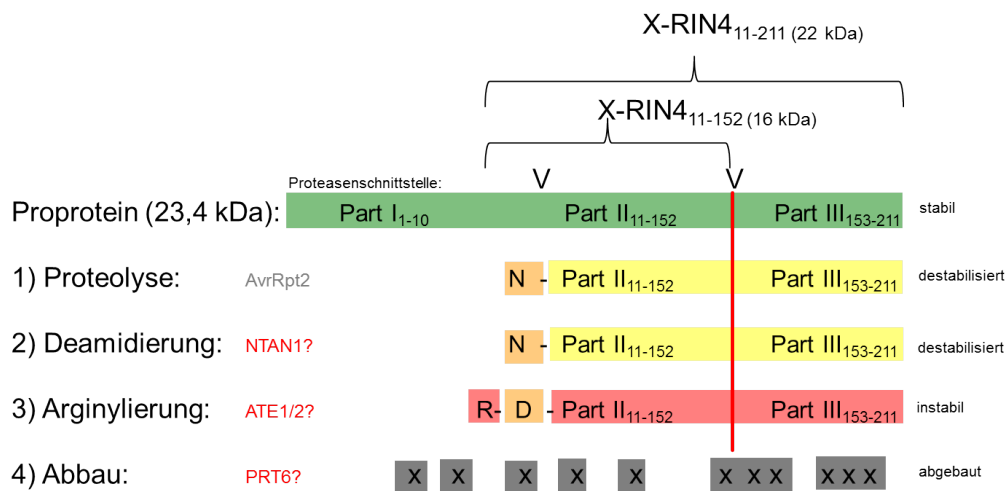


Abbildung 4: Schematische Darstellung der potentiellen Prozessierungsschritte des *N-end rule pathways* für RIN4. Das Proprotein von RIN4 (grün, errechnetes MW: 23,4 kDa) wird durch AvrRpt2 geschnitten (V). Der neu generierte N-Terminus wird durch ein N dargestellt (1), welches in den Prozessierungsschritten des *N-end rule* durch NTAN1 zu D deamidiert (2) und durch ATE arginyliert (3) werden könnte. Durch die PRT6-vermittelte Ubiquitylierung würde RIN4 dem 26S-Proteasom zum Abbau zugeführt werden(4). Die in der Abbildung angegebenen MW entsprechen den theoretisch errechneten MW, das Proprotein zeigt ein MW von ca. 36,6 kDa, X-RIN4¹¹⁻²¹¹ zeigt ein MW von ca 33 kDa und X-RIN4¹¹⁻¹⁵² zeigt ein MW von ca 32 kDa (nach (Chisholm et al. 2005)).

1.7. Cysteinprotease RD21a

Proteasen spielen eine wichtige Rolle in Stressreaktionen und Entwicklungsprozessen (Koizumi et al. 1993). Die Cysteinprotease RD21a (Responsive To Dessication-21) wird durch Trocken- und Salzstress (Koizumi et al. 1993) in Pflanzen induziert und ist in ER-Körperchen (Hayashi et al. 2001), im mittleren Golgi und der Vakuole lokalisiert (Carter et al. 2004; Gu et al. 2010; Lampl et al. 2013). In *Arabidopsis* gibt es zwei RD21 Proteine, RD21a (At1g47128) und RD21b (At5g43060), wobei RD21a höher abundant auf Proteinebene ist (Yamada et al. 2001). Beide Gene sind in der Pflanzenwelt konserviert (Shindo et al. 2012). Homologe aus Mais, Tomate und Kartoffel sind bereits identifiziert und untersucht worden (Avrova et al. 1999; Yamada et al. 2000; Shindo et al. 2012). RD21 wird durch posttranslationale Modifikation zur reifen Form prozessiert (Koizumi et al. 1993; Yamada et al. 2001; Gu et al. 2012). Die katalytische Triade wird durch die AS C161, H297 und N317 im aktiven Zentrum des Enzyms aufgebaut, wobei das katalytische C deprotoniert wird. Dies wiederum führt zum nukleophilen Angriff auf das Carbonyl-C-Atom des Peptidsubstrates. Es konnte zudem gezeigt werden, dass das Enzym durch SDS aktivierbar und in der Lage ist, die RuBisCO zu degradieren. Eine Punktmutation des katalytischen Cs zu A (C161A) führt zu einem inaktiven Protein (Gu et al. 2012). N-terminal besitzt es eine Signalsequenz sowie einen Petidaseinhibitor (Abbildung 5). Erst nach Abspaltung dieser N-terminalen Sequenz kann RD21 als aktive Cysteinprotease agieren (Yamada et al. 2001). C-terminal befinden sich eine prolinreiche Domäne, welche zumindest partiell für die Aktivität von RD21 vorhanden sein muss (Gu et al. 2012) sowie eine Granulin-ähnlich Domäne. Diese weist eine Homologie zu den Granulinen im tierischen System auf (Koizumi et al. 1993) und ist im reifen Protein nicht vorhanden (Abbildung 5). RD21 wird zu den Papain-ähnlichen Cysteinproteasen gezählt (Koizumi et al. 1993) und stabilisiert sich in der Vakuole über die C-terminale Domäne (Gu et al. 2012). *Pulse Chase*-Experimente haben ergeben, dass die Abspaltung dieser Domäne mehrere Stunden in Anspruch nimmt (Yamada et al. 2001) und entweder autokatalytisch oder durch eine bisher unbekannte Protease durchgeführt wird (Yamada et al. 2001; Gu et al. 2012).

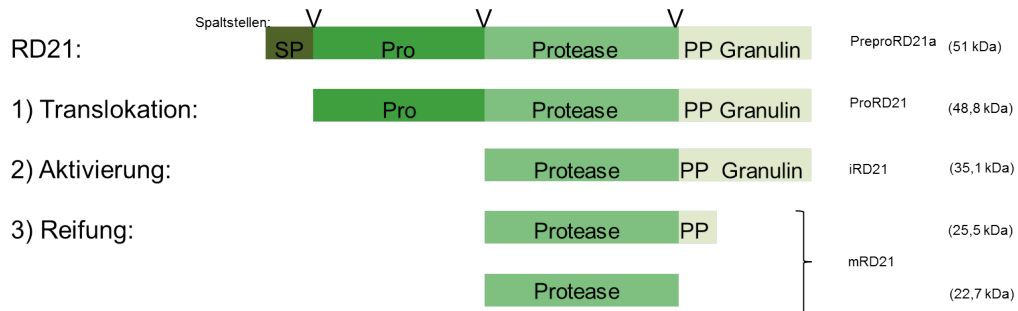


Abbildung 5: Schema zur RD21a-Prozessierung. RD21a wird als Preproprotein mit einem Signalpeptid (SP, dunkelgrün) zur Lokalisation in die Vakuole und einer Prodomäne (Pro), welche auch als Inhibitor fungiert. Nach Abspaltung dieser Domäne gibt es RD21a in zwei aktiven Formen: Das intermediären iRD21a mit C-terminaler prolinreiche Region (PP) sowie Granulin-Domäne (Granulin) (hellgrün) und das reife mRD21a (grün), welches mit und ohne die prolinreiche Domäne vorkommen kann. Die theoretischen MW sind in Klammern angegeben. Modifiziert nach Gu et al. 2012.

In vivo kommen sowohl das reife Protein als auch ein Intermediat (iRD21), welches noch die C-terminale Granulin-Domäne besitzt vor (Yamada et al. 2001; Gu et al. 2012). MS-Analysen konnten zeigen, dass der N-Terminus des reifen sowie des iRD21 heterogen ist und entweder mit AS G134, D135 oder L137 beginnt (Gu et al. 2012). Drei endogene Inhibitoren konnten bisher identifiziert werden. Zum einen bindet das zytoplasmatische SERPIN1 als Selbstmordinhibitor an RD21a, komplexiert und inaktiviert es irreversibel (Lampl et al. 2010; Lampl et al. 2013; Koh et al. 2016). Dies könnte verhindern, dass irrtümlich in das Zytosol gelangtes Protein dort Schaden anrichtet, durch zum Beispiel zu frühe Induktion des programmierten Zelltods. Zum anderen bindet und koloalisiert PDI5 (Protein Disulfide Isomerase 5) mit RD21a und leitet es über das ER und den Golgi in die lytische Vakuole (Andème Ondzighi et al. 2008). Der dritte Interaktionspartner ist WSCP (Water-Soluble Chlorophyll Protein). Dieses wird während der Samenkeimung zeitgleich mit RD21 exprimiert und ist ebenfalls in den gleichen Kompartimenten lokalisiert. Diese Interaktion wird dahingehend diskutiert, dass zu früh aktiviertes RD21 (durch Abspaltung der N-terminalen Inhibitorsequenz) die Entwicklung des Keimlings stört und so durch die reversible Inhibierung durch WSCP dies verhindert werden kann. Weitere Studien konnten zeigen, dass diese Interaktion ebenfalls wichtig für die korrekte Blütenentwicklung ist (Boex-Fontvieille et al. 2015a; Boex-Fontvieille et al. 2015b). Das RD21 Homolog aus Mais (CPPIC) wurde als Komplex mit Cystatin gefunden. Dieses wird durch Behandlung mit SDS denaturiert und gibt so die aktive Protease frei (Yamada et al. 2000; Gu et al. 2012). Dahingehend wird diskutiert, dass die Aktivierbarkeit von RD21 mittels SDS durch das Ablösen eines Inhibitors erklärbar ist (Gu et al. 2012). Ein Homolog von RD21, C14 aus Tomate ist bekannt, eine Rolle in der Abwehr von pathogenen Pilzen zu spielen (Shindo et al. 2012). In *Arabidopsis* hingegen ist dies bisher unklar. Einerseits konnte gezeigt werden, dass das Wachstum des nekrotrophen Pilzes *Botrytis cinerea* in *rd21*-Nullmutanten im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist (Shindo et al. 2012). Andererseits wurde in einem zweiten experimentellen Ansatz gezeigt, dass *rd21*-Nullmutanten resistenter gegenüber den

nekrotrophen Pathogenen *B. cinerea* und *S. sclerotiorum* zu sein scheinen (Lampl et al. 2013). Trotz dieser entgegengesetzten Daten wird RD21 eine Rolle in der Immunabwehr zugesprochen, da es unter Stresssituationen wie dem programmierten Zelltod eine Rolle im Recycling von Zellinhalten spielt (Hayashi et al. 2001; Lampl et al. 2013; Koh et al. 2016). In Proteomuntersuchungen wurde entdeckt, dass RD21a in *ate1 ate2* sowie *prt6*-Mutanten höher abundant ist als im Wildtyp (Majovsky et al. 2014).

1.8. Zielsetzung der Arbeit

Der *N-end rule pathway* ist hochkonserviert in Bakterien, Pilzen, Tieren und Pflanzen. Obwohl mehrere Substrate dieses speziellen Teils des 26S-Proteasomsystems in den letzten Jahren im menschlichen Organismus identifiziert und charakterisiert wurden, ist über das pflanzliche System wenig bekannt. Bisher sind nur wenige Proteine als Substrate in *Arabidopsis* entdeckt worden. Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe von Literaturrecherchen sowie vergleichender Proteomik wie die 2-D Gelelektrophorese, Shotgun-Analyse und ChaFRADIC neue potentielle Substrate des *N-end rule pathways* in den Mutantenlinien *ate1 ate2*, *prt6-3* und *prt1-1* zu identifizieren. Diese sollten dann hinsichtlich ihres N-Terminus *in silico* untersucht und eingestuft werden. Die biochemische Charakterisierung von potentiellen Kandidaten sollte dann durch die Entwicklung und Etablierung von *in vitro* Deamidationsversuchen, Arginylierungs- sowie Ubiquitylierungsassays, unter Verwendung rekombinant erzeugter *N-end rule pathway*-Komponenten (NTAN1/NTAQ1, ATE1/2, PRT1/6) durchgeführt werden. Mittels Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation und unter Verwendung der Ubiquitin-Fusionstechnik (UFT) von Substrat und Komponente sowie Stabilitätsuntersuchungen von YFP-Fusionsproteinen in Mesophyllprotoplasten von *Arabidopsis* sollte *in vivo* die Charakteristik des potentiellen Substrates hinsichtlich seiner Interaktion und Stabilisation innerhalb der *N-end rule* studiert werden. Die UFT wurde entwickelt, um die Proteinstabilität in Abhängigkeit zum N-Terminus studieren zu können (Bachmair et al. 1986). Im Laufe der Jahre wurde diese Methode erfolgreich genutzt, um *N-end rule*-Substrate und enzymatische Komponenten zu charakterisieren (Varshavsky 2000; Varshavsky 2005). Die UFT basiert auf dem natürlichen Vorkommen des UBQs, welches als Polymer synthetisiert (Finley et al. 1987) und anschließend durch sogenannte deubiquitylierende Enzyme (DUBs) nach dem G76 des UBQs in einzelne Ubiquitinproteine gespalten wird (Baker 1996; Gilchrist et al. 1997). In dieser Arbeit soll die UFT genutzt werden, um kotranslational UBQ von UBQ-X-POI Fusionsproteinen abzuspalten und so den gewünschten N-Terminus (X) *in vivo* zu generieren. Das resultierende C-Terminale Fragment stellt das zu untersuchende Protein mit dem generierten N-Terminus dar. Durch die Kombination von *in vitro* und *in vivo* Studien zur Ubiquitylierung und Stabilitätsuntersuchungen im zellfreien System sollte die genaue Einordnung von potentiellen *N-end rule pathway*-Substraten aus den initialen Experimenten durchgeführt werden. Diese im Kontext eines biologisch beschreibbaren Phänotypes einzuordnen und zu

untersuchen sollte dann einen genaueren Einblick hinsichtlich der Position des hockonservierten Abbauweges ermöglichen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Serva (Heidelberg), Roth (Karlsruhe), Applichem (Darmstadt), Sarstedt (Nümbrecht), Sigma (München), ThermoScientific (Dreieich), Qiagen (Hilden).

2.1.1. Verwendete Vektoren und Primer

Eine Liste der verwendeten Vektoren und Primer ist im Anhang unter Tabelle A1 bis A5 zu finden.

2.1.2. Verwendete Bakterienstämme

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme, wichtige Charakteristika, Genotyp und Herkunft

Stamm	Organismus	Wichtige Charakteristika	Genotyp	Herkunft
BL21	<i>E. coli</i>			Stratagene
BL21-CodonPLUS (DE3)-RIL	<i>E. coli</i>	Chl, Tetracyclinresistenz, T7-Expressionssystem mit lac-Operon, tRNA-Gene für in <i>E. coli</i> seltene Codons (nach WOLSCHNER et. al. (2009)): AGG/AGA (Arg), AUA (Ile), CUA (Leu),	<i>E. coli</i> F- ompT hsdS(rB-mB-) dcm+ Tetr gal λ(DE3) end Hte [argU ileY leuW Camr] pRIL, ein Derivat des pACYC184	Stratagene
BL21-Rosetta2 pRARE2	<i>E. coli</i>	Chl, beinhaltet tRNA-Gene für in <i>E. coli</i> seltene Codons (nach DAN et al. (2009)): AUA (Ile), AGG/AGA/CGG (Arg), CUA (Leu) CCC (Pro) GGA (Gly)	<i>E. coli</i> F- ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm pRARE2 (CamR)	Novagen
<i>Dh5 alpha</i>	<i>E. coli</i>	Nalidixinsäureresistenz, lac-Operon enthaltend	<i>E. coli</i> F- (φ80lacZΔM15) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (rK-,mK+) supE44 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF)U169	Invitrogen
Mach1	<i>E. coli</i>	Derivat des <i>E. coli</i> W-Stammes, schnellstwachsenden Zellen	ΔrecA1398 endA1 tonA φ80ΔlacM15 ΔlacX74 hsdR(rK-	Invitrogen

Top10	<i>E. coli</i>	Streptomycinresistenz, Leucinauxotroph	mK+) F- mcrA Δ(mrr- hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-	Invitro gen
GV3101::pMp90R K	<i>A. tumefaciens</i>	Rifampicillin-, Gentamycin- und Kanamycinresistenz	C58, pMP90RK (pTiC58DT-DNA)	(Koncz C. and Schell J. 1986)
GV3101::pMp90	<i>A. tumefaciens</i>	Rifampicillin- und Gentamycinresistenz	C58, pMP90 (pTiC58DT-DNA)	(Koncz C. and Schell J. 1986)

2.1.3. Verwendete Pflanzenlinien

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Pflanzenlinien mit genetischem Hintergrund, Resistenz, Eigenschaften und Referenz

Name	Genetischer Hintergrund	Resistenzmarker	Eigenschaft	Referenz
Col-0	Col-0			
<i>ate1ate2</i> (SALK_023492 SALK_040788)	Col-0	Kanamycin (nicht funktional)	SALK-tDNA- Insertionslinie Deletionsdoppelmutante ATE1 und ATE2	(Graciet et al. 2009)
<i>prt1-1</i>	Col-0	-	EMS-Mutante Deletionsmutante PRT1	(Potuschak et al. 1998)
<i>prt6-1</i> (SAIL_1278_H11)	Col-0	BASTA	SAIL-tDNA- Insertionslinie Deletionsmutante PRT6	(Garzón et al. 2007)
<i>prt6-2</i> (SALK_051088)	Col-0	Kanamycin	SALK-tDNA- Insertionslinie Deletionsmutante PRT6	(Graciet et al. 2009)
<i>pPrt6-3</i> (GABI_270G04)	Col-0	Sulfadiazin	Gabi-Kat-tDNA- Insertionslinie Deletionsmutante PRT6	(Garzón et al. 2007)
<i>rd21-1</i> (SALK_090550)	Col-0	Kanamycin	SALK-tDNA- Insertionslinie Deletionsmutante PRT6	(Gu et al. 2012)

2.1.4. Verwendete Antibiotika

Tabelle 3: Verwendete Antibiotika Konzentration der Stammlösung und Endkonzentration im Medium

Antibiotika	Konzentration Stammlösung mg/mL	in	Endkonzentration im Medium in µg/mL
Carbenicillin	50	in H ₂ O	50
Chloramphenicol	34	in EtOH	34
Kanamycin	50	in H ₂ O	50
Gentamycin	25	in H ₂ O	25
Rifampicillin	50	in DMSO	50
Streptomycin	50	in H ₂ O	50
Sulfadiazin	5,25	in H ₂ O	5,25
Hygromycin	400	in H ₂ O	20

2.1.5. Verwendete Antikörper

Tabelle 4: In dieser Arbeit in entsprechender Verdünnung verwendete Antikörper und Herkunft

Antikörper	Verwendung	Herkunft/Referenz
α-GFP-Rabbit (sc-8334, Santa Cruz)	Anti-GFP-Kaninchen-IgG polyklonal (Verdünnung 1:200)	(Vatine et al. 2013)
α-HA-Mouse (MMS-101R, COVANCE)	Anti-HA-Maus-IgG1 monoklonal (Verdünnung 1:1000)	(Pecot und Malhotra 2004)
α-His-Mouse (27471001, GE)	Anti-His- Maus IgG ₂ (Verdünnung 1:3000)	GE Healthcare
α-MBP-Mouse (E8030S, NEB,)	Anti-MBP-Kaninchen IgG polyklonal (Verdünnung 1:5000)	New England Biolabs
α-TGG2-Rabbit	Anti-TGG2, polyclonal (Verdünnung 1:5000)	(Ueda et al. 2006)
α-Rd21-sheep	Anti-RD21a polyklonal (Verdünnung 1:1000)	(Wang et al. 2008b)
α-Rd21a-rabbit	Anti-RD21a (Verdünnung 1:5000)	(Yamada et al. 2001)
α-Streptavidin-HRP (GERPN1231, Sigma Aldrich)	Streptavidin-HRP gekoppelt, (Verdünnung 1:3000)	GE Healthcare
α-Ub-mouse (sc-8017, Santa Cruz)	Anti-UBQ-Maus-IgG ₁ Monoklonal (Verdünnung 1:5000)	(Lutz et al. 2012)
α-Mouse-HRP (200431430, Thermo Scientific)	Maus-HRP-Konjugat, (Verdünnung 1:5000)	Pierce (ThermoScientific)
α-Rabbit-HRP (sc-2004, Santa Cruz)	Kaninchen-HRP-Konjugat, stabilisiert in Ziege (Verdünnung 1:2500)	Santa Cruz Biotechnology
α-Goat-HRP (sc-2768, Santa Cruz)	Ziegen-HRP-Konjugat, stabilisiert in Kaninchen (Verdünnung 1:2500)	Santa Cruz Biotechnology
α-Sheep-Alexa Fluor 488 (A-11015, Thermo Scientific)	Schaf-Alexa 488-Konjugat, stabilisiert in Esel (Verdünnung 1:500)	Thermo Scientific

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Herstellung Rubidiumchlorid kompetenter *E-coli*- Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte nach der Rubidiumchlorid-Methode (Bast 2001). Eine Vorkultur (3 mL, 37° C, 400 g, 12 h) des zu transformierenden Stammes wurde in 100 mL LB-Medium (Luria-Bertani) verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,4 weiter bei 37 °C kultiviert. Nach mindestes 10 min auf Eis wurde zur Sedimentation zentrifugiert (10 min, 4°C, 5000 g) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 15 mL kaltem TFB1 (TransFormation Buffer) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 2 mL TFB2 aufgenommen und aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

TFB1

30mM KAc
100 mM RbCl
10 mM CaCl₂
50 mM MnCl₂
15% Glycerin
pH 5,8 mit CH₃COOH

TFB2

10 mM HEPES
75 mM CaCl₂
10 mM RbCl
15% Glycerin
pH 6,5 mit KOH

2.2.2. Transformation von *E. coli* und Selektion rekombinanter Klone

Die Transformation von DNA-Material wurde nach Sambrook 1989 durchgeführt. Chemisch kompetente Zellen (50 µL) wurden mit 1 µL DNA gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock (90 sek, 42°C) mit darauffolgender Inkubation auf Eis (2 min). Der Ansatz wurde mit LB-Medium versetzt (200µL) und mindestens 45 min bei 37° C und 850 rpm im Schüttler inkubiert. Nach Ausplattierung von 80-100 µL auf Selektivagar wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

LB-Medium (1 Liter)

10 g Tryptone
5 g NaCl
5 g Hefeextrakt
pH 7,2

McConkey-Agar (0818, DIFCO Laboratories)

40 g/L (H₂O)

2.2.3. Herstellung elektrokompetenter *A. tumefaciens*-Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter *A. tumefaciens* Zellen wurde eine Vorkultur des Stammes (3 mL) in frisches, mit Antibiotikum versetztes YEB-Medium (Yeast Extract Beef) (50 mL) überführt (0,03 v/v) und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,6 bei 28 °C und 300 rpm inkubiert. Nach Abkühlen auf Eis (15 min) wurden die Zellen (10 min, 4 °C, 3000 g) abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet folgendermaßen gewaschen:

1. 25 mL 1 mM HEPES (pH 7,5)
2. 12,5 mL 1 mM HEPES (pH7,5)
3. 10 ml 10% (w/v) Glycerin, 1 mM Hepes (pH 7,5)
4. 5 ml 10% (w/v) Glycerin, 1 mM Hepes (pH 7,5)
5. 2 ml 10% (w/v) Glycerin
6. 1 ml 10% (w/v) Glycerin

Die Zellen wurden in Aliquots bei – 80°C bis zur Verwendung gelagert.

YEB-Medium (pH 7)

0,5 %	Rinderextrakt
0,5 %	Pepton
0,5 %	Saccharose
0,1 %	Hefeextrakt

2.2.4. Transformation von elektrokompetenten *A. tumefaciens*

Die kompetenten Zellen wurden mit 1-3 μL DNA versetzt, 30 min auf Eis inkubiert und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Nach erfolgter Elektroporation nach Tabelle 5 wurde sofort 600 μL YEB-Medium zugeführt, und die Zellen in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Nach 3 h Inkubation bei 28 °C und 200 rpm wurden die Zellen auf Selektivagar ausplattiert (20-80 μL) und für 1-2 Tage bei 28 °C inkubiert.

Tabelle 5: Daten zur Geräteeinstellung bei der Elektroporation

Größe	Einstellung
Küvettenpalt	0.1 cm
Spannung	2,5 kV
Feldstärke	12,5 kV/cm
Kondensator	25 μF
Widerstand	400 Ω
Zeit	3,8 msec

2.2.5. Herstellung chemokompetenter *A. tumefaciens*-Zellen

Zur Herstellung chemokompetenter *A. tumefaciens*-Zellen wurde 1 mL einer Vorkultur (3 mL) in 100 mL frisches YEB-Medium mit Antibiotika überführt und bei 28° C, 200 rpm im Schüttler bis zu einer OD_{600} von 0,5-1 inkubiert. Die Zellen wurden mindestens 10 min auf Eis abgekühlt und dann abzentrifugiert (20 min, 4° C, 2700 g). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 5 mL eiskaltem TE-Puffer (Tris-EDTA) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nun wurden die Zellen in 1 mL eisgekühlter 20 mM CaCl_2 -Lösung resuspendiert, 30 min auf Eis gekühlt und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 mL YEB mit 10% Glycerin aufgenommen und in 200 μL aliquotiert.

TE-Puffer (pH 8)

10 mM Tris-Cl
1 mM EDTA

2.2.6. Transformation chemokompetenter *A. tumefaciens*-Zellen

Ein Aliquot chemokompetenter *A. tumefaciens*-Zellen (200 μL) wurde 30 min auf Eis aufgetaut und anschließend mit 1-10 μL DNA versetzt. Nach erneuter Inkubation auf Eis (30 min) wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren (Kälteschock) und sofort für 2 min bei 37° C aufgetaut. Nach Zugabe von 300 μL YEB erfolgte eine Regeneration für 2-4 h bei 28° C und 850 rpm auf dem Schüttler, 80-100 μL wurden auf Selektivmedium ausgebracht und zwei Tage bei 28° C inkubiert.

2.2.7. Quick Check

Zur schnellen Überprüfung einer erfolgreichen Transformation wurden 100 μL Kultur mit 50 μL Phenol/Chloroform (1:1) und 10 μL Ladepuffer versetzt und 25 s gevortext. Nach

Zentrifugation (5 min, 14000 g) wurden 30 µL des wässrigen Überstandes auf ein 1%iges TAE Gel aufgetragen.

Ladepuffer (10x)

0,35 mM	SDS
100 mM	EDTA
0,01 % (w/v)	Bromphenolblau
40 %	Glycerin (v/v)

TAE-Puffer pH 8 (50x)

2 M	Tris-Acetat
50 mM	EDTA
pH 8 (Essigsäure)	

2.2.8. Plasmidisolation aus Bakterien

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus 4 mL Ansätzen wurde das Isolations-Kit GeneJet Plasmid Miniprep Kit (K0503, Thermo Scientific) verwendet. Zur Isolation aus größeren Kulturmengen (50 - 5000 mL) wurde das NucleoBond PC 500 Kit (740574, Macherey & Nagel) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.2.9. Restriktionsverdau von Plasmiden und Auftrennung mittels Gelelektrophorese

Die Plasmidspaltung erfolgte in 1-20 (analytisch) µL Volumen, wobei die Enzymkonzentration bei ca. 5 U pro µg DNA. Es wurden die Enzyme der Firmen Thermo Fisher und New England Biolabs (NEB) entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

Anschließend erfolgte die Auftrennung der Fragmente in einem 1%igen Agarosegel, 1x TAE-Puffer bei 120-140 V entsprechend der Gelgröße. Zur Detektion wurde dem Gel der SERVA DNA Stain G (39803, Serva) in der vom Hersteller vorgeschriebenen Konzentration zugegeben. Die Größe der Fragmente wurde anhand des DNA-Markers GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (SM1343, Thermo Scientific) ermittelt.

2.2.10. DNA-Gelextraktion und Reinigung

Die entsprechenden DNA-Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem JETquick Gel Extraction Kit (420250, Genomed) entsprechend der Herstellerangaben isoliert.

2.2.11. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wird zur DNA-Amplifikation, Genotypisierung oder zur Kontrolle durch Transformation erzeugter Klone genutzt.

Es wurde dazu die Taq-Polymerase (Lawyer et al. 1993) (ohne 3'-5' Exonukleasefunktion) aus eigener Herstellung mit 3'-5' Exonukleasefunktion nach folgendem Ansatz und Hot-Start Programm im Applied Biosystems Veriti™ 96-Well Thermal Cycler verwendet:

Tabelle 6: Zusammensetzung eines 20 µL Phusionreaktionsansatzes, die bestehenden Konzentrationen und das PCR-Programm

20 µL Reaktionsansatz (Phusion)	Endkonzentration	Programm
1 µL Template DNA		
1 µL Primer 1	1 pmol	1. 30 s 98° C
1 µL Primer 2	1 pmol	2. 10 s 98° C
0,4 µL 10 mM dNTP's	je 200 µM	3. 30 s x° C
10 µL 5x Phusion HF Buffer	1x	4. 15 - 30 s/kb 72° C
0,2 µL Enzym	1 U	25 - 35 Zyklen der Schritte 2-4
12,4 µL steriles H ₂ O		5. 5 min 72° C
		6. Pause 4° C

Tabelle 7: Zusammensetzung eines 50 µL Taqreaktionsansatzes, die bestehenden Konzentrationen und das PCR-Programm

50 µL Reaktionsansatz (self-made Taq)	Endkonzentration	Programm
1 µL Template DNA		
0,5 µL Primer 1	0,5 pmol	1. 30 s 96° C
0,5 µL Primer 2	0,5 pmol	2. 10 s 96° C
0,5 µL 10 mM dNTP's	je 100 µM	3. 30 s x° C
5 µL 10x Buffer	1x	4. 60 s/kb 72° C
0,5-1 µL Enzym	1 U	25 - 35 Zyklen der Schritte 2-4
42 µL steriles H ₂ O		5. 10 min 72° C
		6. Pause 4° C

Das Temperaturprotokoll variierte je nach eingesetzten Primern (Annealingtemperatur), eingesetzter Polymerase und Template-DNA (Dauer der Extension).

2.2.12. RNA Isolation aus Pflanzenmaterial

Die Extraktion von RNA aus Pflanzenmaterial wurde unter Verwendung der Herstellerangaben mittels des Kits RNeasy Plant Mini Kit (74904, Qiagen) durchgeführt.

2.2.13. cDNA-Synthese

Das RevertAid RT Kit (K1691, Thermo Scientific) wurde nach Herstellerangaben verwendet, um isolierte RNA in cDNA zu transkribieren. Ein zuvor durchgeführter DNase Verdau sollte die gereinigte RNA von möglichen genomischen DNA-Kontaminationen befreien. Hierbei wurden 2 µg RNA mit 1 U DNaseI (EN0523, Thermo Scientific) und 1 X-Puffer versetzt und für 30 min bei 37° C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend für 10 min bei 65° C abgestoppt und der gesamte Ansatz für die cDNA-Synthese verwendet.

2.2.14. Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR erfolgte in einem 10 µL Ansatz mittels Brilliant II SYBR Green QPCR (K0252, Thermo Scientific). Je Probe und Gen erfolgte eine Doppelbestimmung. Wobei neben dem Zielgen auch das konstitutiv exprimierte Housekeeping-Gen der PP2A als Referenz

eingesetzt wurde. Die cDNA wurde wie in 2.2.9. beschrieben synthetisiert und 1:10 verdünnt eingesetzt. Zu jedem Gen wurde ein eigener MasterMix nach folgenden Angaben zusammengestellt, bei einer Vielzahl von Reaktionen wurden 10% mehr an MasterMix angesetzt als berechnet:

Tabelle 8: Zusammensetzung einer 10 µL qRT-PCR Reaktion

Komponente	µL je Probe	Programm
Brilliant II SYBR Green QPCR MasterMix (2x)	5	1. 10 min 95° C 2. 30 s 95° C
6-Carboxy-X-rhodamin (ROX) (1:500 in H ₂ O verdünnt)	0,15	3. 40 s 64° C 40 Zyklen der Schritte 2-3
Primer 1 (100 pmol in H ₂ O)	0,009	4. 1 min 95° C
Primer 2 (100 pmol in H ₂ O)	0,009	5. 1 min 55-95° C
Add H ₂ O	3,332	

1,5 µL der cDNA wurde in den Reaktionsgefäßen vorgelegt und 8,5 µL MasterMix hinzugefügt. Die Reaktion und Messung erfolgte an Mx3000P bzw. Mx3005P (Stratagen Agilent) und die Auswertung erfolgte mittels der Software MxPro. Als zu vermessende Fluoreszenz wurde in der Geräteeinstellung SYBR Green genutzt und als Referenzfluoreszenz ROX angegeben. Die Reaktion wurde nach dem Temperaturprotokoll in Tabelle 8 durchgeführt.

Die Auswertung der qRT-PCR wurde anhand der ΔCt (cycle threshold)-Methode durchgeführt. Hierbei ist der Ct-Wert das Maß der Quantifizierung, da er die Anzahl der PCR-Zyklen angibt die nötig sind, um die Hintergrund-Fluoreszenz (threshold) zu überschreiten und die exponentielle Phase der PCR-Reaktion zu erreichen. Die Normalisierung der zu untersuchenden Gene (ZG) mit dem Referenzgen (RG) erfolgt nach folgender Formel:

$$\Delta Ct = Ct(ZG) - Ct(RG)$$

Durch diese Berechnung erhält man für jede Probe die relative Transkriptmenge bezogen auf die Transkriptmenge des Referenzgens. Die logarithmischen Werte können anschließend wie folgt in eine vielfache Expression des Zielgens im Vergleich zum Referenzgen umgerechnet werden, wobei eine Primereffizienz von 100% vorausgesetzt wird. Dies entspricht einer Verdopplung des templates mit jedem PCR-Zyklus:

$$n\text{-fache Expression (ZG zu RG)} = 2^{\Delta Ct}$$

Die Zusammenfassung der Werte und die grafische Darstellung erfolgte mit Microsoft Excel.

2.2.15. Single-Gateway-Klonierung

Das Einbringen von Inserts in einen Vektor wurde mit Hilfe des Gateway-Verfahrens (Hartley et al. 2000; Karimi et al. 2005, Invitrogen) durchgeführt. Die BP-Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 2,5 µL (1,5 µL PCR-Fragment, 0,5 µL DONOR-Vektor, 0,5µL BP-Klonase) und wurde 1 h oder über Nacht bei 22 °C inkubiert. Anschließend wurden zum

Beenden der Reaktion 0,3 µL Proteinase K hinzugegeben und bei 37° C für 10 min auf dem Heizblock inkubiert. Der Ansatz der BP-Reaktion wurde in einen entsprechenden Bakterienstamm transformiert und auf Selektivmedium ausplattiert. Die anschließende LR-Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 1,75 µL über Nacht bei 25°C durchgeführt (0,5 µL H₂O, 0,5 µL ENTRY-Vektor, 0,5 µL DESTINATION-Vektor, 0,25 µL LR-Klonase). Zum Beenden der Reaktion wurde dem Ansatz 0,6 µL Proteinase K hinzugegeben und bei 37° C auf dem Heizblock inkubiert. Der Ansatz der LR-Reaktion wurde in einen entsprechenden Bakterienstamm transformiert und auf Selektivmedium ausplattiert.

2.2.16. Gerichtete Mutagenese

Der Basenaustausch in einem DNA-Plasmid wurde mit Hilfe gerichteter Mutagenese durchgeführt. Hierzu wurden mit Hilfe des QuickChange Primer Design (Agilent Technologies, Inc., <http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp>) die Primer ermittelt, welche die gewünschten Basenveränderung komplementär aufweisen. Als Template wurden ENTRY-Klone verwendet. Die Reaktion erfolgte nach folgendem Protokoll:

Tabelle 9: Zusammensetzung eines 50 µL Reaktionsansatzes, die bestehenden Konzentrationen und das PCR-Programm

Ansatz: 50 µl	Endkonzentration	Programm
10 µL 5x HF-Puffer	1 x	
1 µL 10 mM dNTPs	Je 200 µM	1. 30 s 98° C
1,5 µL 10 µM. Primer 1	30 pM	2. 10 s 98° C
1,5 µL 10 µM. Primer 1	30 pM	3. 30 s 55° C
2 µL Template DNA		4. x s 72° C
0,5 µL µLPhusion	1 U	14 Zyklen der Schritte 2-4
		5. 10 min 72° C
		6. Pause 4° C

2.2.17. Samensterilisation

Die Samensterilisation erfolgte unter ClO₂-gasatmosphäre. Hierzu wurde in einem Vakuumexsikator 20 mL NaClO-Lösung mit 10 mL 37%iger HCl versetzt. Die Samen wurden für 3–4 h sterilisiert und anschließend auf 0,5 x MS-Agar (T. Murashige and F. Skoog 1962) Selektionsplatten ausplattiert.

0,5 MS-Agar (1 Liter)

2,16 g MS-Salz (M0301, Duchefa)
 5 g Saccharose
 8 g Phytoagar (P1003, Duchefa)
 pH 5,8 mit KOH

2.2.18. Anzucht von Pflanzen

Die Anzucht erfolgte unter Kurztagsbedingungen (8 Stunden Licht (22 °C), 16 Stunden Dunkelheit (18°C), Luftfeuchtigkeit 60%) oder Langtagsbedingungen (16 Stunden Licht (22 °C, 8 Stunden Dunkelheit (18 °C), 60% Luftfeuchtigkeit) in der Phytokammer (Johnson

Climatics). Die sterile Anzucht erfolgte auf 0,5x-MS-Agar-Platten. Die Kultivation auf Einheitserde (Weißtorf 45%, Ton 20%, Sodentorf 15%, Kokosfaser 20%, Balster Einheitserdewerk) erfolgte analog. Nach 6-8 Wochen wurden die Pflanzen unter Langtagsbedingungen bei 22 °C bis zum Ende ihres Lebenszyklus kultiviert.

2.2.19. Genotypisierung

Zur Verifizierung der verschiedenen T-DNA-Insertionslinien wurde ein Blatt pro Pflanze in 96-well-Collectorboxes, welche mit je einer Metallkugel (75306, Mühlmeier) pro Well gefüllt waren gesammelt und mit 500 µL Magic Puffer versetzt (Dissmeyer und Schnittger 2011). Das Material wurde mit der Kugelmühle 2 min bei 25 Hz aufgeschlossen und anschließend die Blatteile (10min, 4° C, 2000 g) abzentrifugiert. Die Probe wurde entweder bei -20°C gelagert oder sofort zur PCR eingesetzt.

Tabelle 10: Zusammensetzung eines 25 µL Reaktionsansatzes, die bestehenden Konzentrationen und das PCR-Programm

25 µL Reaktionsansatz (self-made Taq)	Endkonzentration	Programm
1,5 µL Template DNA		
1 µL Primer 1	1 pmol	1. 30 s 95° C
1 µL Primer 2	1 pmol	2. 30 s 95° C
0,45 µL 10 mM dNTP's	je 100 µM	3. 60 s 58° C
2,5 µL 10x PCR-Puffer	1x	4. 2 min 72° C
0,5 µL Enzym	1 U	35 Zyklen der Schritte 2-4
18,8 µL steriles H ₂ O		5. 10 min 72° C
		6. Pause 15° C

Magic-Puffer pH 7,5

50 mM	Tris-Cl
300 mM	NaCl
300 mM	Saccharose

10x PCR-Puffer pH 8,7

200 mM	Tris-Cl
500 mM	KCl
20 mM	MgCl ₂
1,5 g/L	Xylencyanol
1,5 g/L	Orange G

2.2.20. Transformation von Mesophyllprotoplasten

Die Herstellung und Transformation von Protoplasten wurde mit 6 Wochen alten Blättern von *Arabidopsis* nach Yoo et al. (2007) durchgeführt. Das Pflanzenmaterial wurde mit Hilfe einer Rasierklinge geerntet, das obere Drittel des Blattes verworfen, das zweite Drittel in feine Streifen geschnitten und in 2,5 mL Enzymlösung (frisch hergestellt) untergetaucht. Die Streifen inkubierten 30 min unter Vakuum im Exsikkator, um Gase möglichst vollständig zu entfernen. Anschließend erfolgte eine Dunkel-Inkubation für 4 h bei 19° C. Nach Zugabe von 2 mL W5 (gekühlt) bewirkte 5 minütiges Schwenken der Petrischalen die Freisetzung der Protoplasten. Filtern der Lösung durch ein 35-75 µm Nygonsieb trennt das unverdaute Blattmaterial von der Protoplastenlösung ab. Zur Isolation der Protoplasten wurde die Lösung 1 min bei 200×g und 19 °C zentrifugiert, das Pellet anschließend in 2 ml W5 (gekühlt) aufgenommen und durch vorsichtiges Invertieren gelöst. Anschließend erfolgte

eine Dunkel-Inkubation für 40 min auf Eis. Der Überstand wurde abgenommen, erneut in 2 mL gekühlter W5 aufgenommen und wie zuvor für 40 min im Dunkeln inkubiert. Darauffolgend wurden die Zellen in kalter MMG-Lösung (Volumen entsprechend Protoplastenmenge) aufgenommen. Die Intaktheit der Zellen wurde unter dem Mikroskop kontrolliert.

Zur Transformation wurden pro 100 µL Protoplastensuspension 10-15 µg DNA eingesetzt und das 1,1 fache Volumen an PEG-Lösung zugegeben und 3-4 min invertiert. Danach erfolgte die Zugabe von 4,4fachem Volumen an W5-Lösung, leichtes Schwenken der Suspension und anschließendes Abzentrifugieren (1 min, 200 g, 4°C) der Protoplasten. Das Pellet wurde in einfachem Volumen W1 Lösung aufgenommen und über Nacht bei RT in horizontaler Lage inkubiert.

Tabelle 11: Verwendete Puffer zur Mesophyllprotoplastentransformation

Enzymlösung (2,5 mL)		Endkonzentration
1,25 mL	0,8 M Mannitol	0,4 M
0,5 mL	0,1 M KCl	0,02 M
0,25 mL	0,2 M MES (pH 5,7)	0,02 M
0,475 mL	H ₂ O	
27,5 mg	Cellulase Onozuka R-10 (CAS 9012-54-8, SERVA)	1,5 %
10 mg	Macerozyme R-10 (CAS 9032-75-1, SERVA)	0,4 %
0 min 55°C Inkubation zur Inaktivierung von Proteasen, anschließend abkühlen auf Eis		
0,025 mL	1 M CaCl ₂	0,01 M
2,5 mg	BSA	0,1 %
PEG-Lösung (5 mL)		
2 g	PEG	40 % (v/v)
1,25 mL	0,8 M Mannitol	0,2 M
0,5 mL	1 M CaCl ₂	0,1 M
1,5 mL	H ₂ O	
W5-Lösung (50 mL)		
1,54 mL	5 M NaCl	0,154 M
6,25 mL	1 M CaCl ₂	0,125 M
2,5 mL	0,1 M KCl	0,005 M
1 mL	0,2 M MES (pH 5,7)	0,002 M
39,21 mL	H ₂ O	
MMG-Lösung (20 mL)		
10 mL	0,8 M Mannitol	0,4 M
2 mL	0,15 M MgCl ₂	0,015 M

0,4 mL	0,2 M MES (pH 5,7)	0,004 M
7,6 mL	H ₂ O	
W1-Lösung (10 mL)		
6,3 mL	0,8 M Mannitol	0,0005 M
1 mL	0,1 M KCl	0,02 M
0,2 mL	0,2 M MES (pH 5,7)	0,004 M
1,5 mL	H ₂ O	

2.3. Proteinchemische Methoden

2.3.1. Proteinüberexpression in *E.coli* und Zellaufschluss mittels French Press

Zur Proteinsynthese wurde das Lac-Operon Expressionssystem verwendet. Nach Zugabe von IPTG wird die Expression des zu analysierenden Proteins induziert. Eine Vorkultur (4 mL) wurde in 200 mL (analytisch) bis 5 L (präparativ) überführt und für 3 h bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Danach erfolgte die Induktion durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM). Nach 16 h Inkubation bei 20° C wurden die Zellen durch Zentrifugieren (10 min, 4° C, 4000 g) vom Medium abgetrennt, in Puffer A resuspendiert und bei -80°C gelagert (Naumann et al. 2016).

Zum Aufschluss der Zellen und Proteinreinigung wurden zu 10 mL (40 mL) resuspendierten Zellen 250 µL (1 mL) einer 40 mg/mL Lysozymlösung hinzugegeben und 1 h auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte am TS 0.75 der Firma Constant Systems Ltd. nach folgendem Programm:

Tabelle 12: Vorgang des Zellaufschlusses mittels French-Press, verwendete Puffer, entsprechender Druck

Schritt	Puffer	Druck
1. Waschen	50 - -100 mL dest. H ₂ O	2 kbar
2. Waschen	50 – 100 mL 0,2 M NaOH	1 kbar
3. Waschen	50 - -100 mL dest. H ₂ O	1 kbar
4. Equilibrieren	50 - -100 mL Puffer A	1 kbar
5. Lyse	15 – 20 mL <i>E.coli</i> Kultur	1,3 kbar
6. Nachspülen	15 mL Puffer A	1,3 kbar
7. Säubern	50 – 100 mL 0,2 M NaOH	2 kbar
8. Säubern	50 - -100 mL dest. H ₂ O	1 kbar

Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (30 min, 4 °C, 12000 g), der Überstand mit dem Protein abgenommen und zu weiteren Untersuchungen verwendet.

Puffer A

20 mM	Tris-Cl (pH7,4)
0,2 M	NaCl
1 mM	EDTA

2.3.2. Proteinreinigung

2.3.2.1. Proteinreinigung mittels Nickel-Agarose

Die Säule (34964, Qiagen) wurde mit Ni-Puffer gespült und alle Luftblasen entfernt. Als Säulenmaterial wurde 1 mL Nickel-NTA-Agarose Lösung (30210, Qiagen) verwendet. Nach Absenken der Agarose-Kügelchen wurde die zweite Fritte, welche zuvor im Vakuum mit Ni-Puffer vorinkubiert wurde aufgesetzt, die Säule mit Ni-Puffer sowie anschließend mit 20%igen EtOH gespült und bis zur Verwendung in 20% EtOH bei 4° C gelagert. Die Herstellung einer Amylosesäule erfolgte analog, hierzu wurden Amylose-Harz (E8021S, NEB) und Puffer A verwendet.

Zur Proteinreinigung wurde die Säule mit 10 mL Ni-Puffer equilibriert, nachdem dann die Proteinlösung zugegeben wurde. Der Durchfluss wurde aufgefangen und zur Analyse bei -20° C gelagert. Die Säule wurde dann zweimal mit 10 mL Puffer gewaschen. Die Proteinelution erfolgte mit 400 mM Imidazol in Ni-Puffer und fünf Schritten zu 500 µL Elutionsvolumen. Anschließend wurde die Säule zweimal mit 10 mL Puffer und einmal mit 20% EtOH gereinigt.

Ni-Puffer

100 mM	Tris-Cl pH 8,0
300 mM	NaCl
0, 25%	Tween 20
10%	Glycerin

2.3.2.2. Proteinreinigung mittels Amylose-Harz

Zur Proteinreinigung wurde die Säule mit 10 mL Puffer A equilibriert und nachfolgend die Proteinlösung zugegeben. Der Durchfluss wurde aufgefangen und zur Analyse bei -20° C gelagert. Die Säule wurde dann zweimal mit 10 mL Puffer A gewaschen und die Proteinelution erfolgte mit 10 mM Maltose im Säulenpuffer in fünf Schritten zu 500 µL Elutionsvolumen. Anschließend wurde die Säule mit 3 mL H₂O, 3 mL 0,1% SDS-Lösung, 1 mL H₂O, 5 mL Säulenpuffer gesäubert. Die Lagerung erfolgte in 20% EtOH.

Das Protein wurde bei -20° C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.3.3. Spaltung rekombinant exprimierter Proteine mittels TEV-Protease

Rekombinant exprimierte Fusions-Proteine in dieser Arbeit sind nach folgender Struktur aufgebaut (Naumann et al. 2016):



Zur Verwendung der Proteine in den Versuchen war es nötig den N-terminalen Reinigungstag mit Hilfe der *Tobacco-etch-virus* (TEV)-Protease zu entfernen (Kapust und Waugh 2000). Ein Protokoll der Reinigung und Expression der Protease ist in Naumann et al. 2016 angegeben, das verwendete Plasmid ist RIL/pRK793 His:TEV^{S219V}:Arg. Diese Protease erkennt die Aminosäuresequenz ENLYFQX und spaltet das Protein zwischen Q und X. Die Reaktion erfolgte bei 4° C über Nacht.

Tabelle 13: Reaktionsansatz der TEV-Spaltung und entsprechende Endkonzentration

Reaktionsansatz (600 µL)	Endkonzentration
60 µL 10 x Puffer (500 mM Tris-Cl, pH 8; 5 mM EDTA)	1 x
1,2 µL 0,5 M DTT	1 mM
5 µL TEV	1,7 µg/mL
533,8 µL Proteinlösung	

2.3.4. Gesamtproteinextraktion aus Pflanzenmaterial

2.3.4.1. TCA- basierte Proteomfällung

Drei Wochen alte, auf 0,5 MS (Langtagsbedingungen) angezogene Pflanzen wurden geerntet und in flüssigen Stickstoff gemörsert. Nach Einwaage des Materials wurde das 2,5 fache Volumen an eiskaltem Aceton hinzugegeben, die Probe für 30 sek gevortext und anschließend bei 4° C, 5000 g für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und der erste Schritt wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 2,5 Volumen 10% TCA/Acetonlösung (m/v) resuspendiert und für 10 min im Ultraschallbad (max. Power) aufgeschlossen. Danach erfolgte ein TCA-Reinigungsprotokoll: (2,5 faches Volumen)

- a) 2x Waschen mit eiskalter 10% TCA/Acetonlösung (m/v) bis die Lösung entfärbt ist
- b) 1x Waschen mit eiskalter 20% TCA
- c) 2x Waschen mit 80%igem eiskaltem Aceton

Das Material wurde zwischen jedem Schritt wie oben beschrieben abzentrifugiert. Nach dem letzten Waschschritt wurde die Probe für 5 min bei 12000 g sedimentiert und bei RT getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 4-fachem Volumen dense- SDS resuspendiert und mit dem gleichen Volumen Phenol (50734, Biomol) versetzt. Nach erneutem vortexen (30 sek) wurde die Probe bei 12000 g für 5 min abzentrifugiert. Die obere phenolische Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem 5-fachen Volumen an Fällungsreagenz versetzt. Die Präzipitation erfolgte über Nacht bei -20° C.

Zur Sedimentation des Proteinpellets wurde der Fällungsansatz zentrifugiert (5 min, 4° C, 12000 g), das Proteinpellet wurde daraufhin zweimal mit eiskaltem frischem

Fällungsreagenz und zweimal mit eiskalten 80%igen Aceton gewaschen und sedimentiert (5 min, 4° C, 5000 g). Das Proteom wurde bis zur weiteren Verwendung in 80% Aceton bei -20°C gelagert.

20% TCA

200 µL einer 10g TCA in 4,54 mL H₂O
Add 1 mL steriles H₂O

Fällungsreagenz

100 mM NH₄Ac in MeOH

dichtes-SDS

100 mM Tris-Cl (pH8)
30% (w/v) Saccharose
2% (w/v) SDS
5% (v/v) β-Mercaptoethanol

2.3.4.2. TCA-freie Proteomreinigung

Die TCA-freie Fällungsmethode wurde nach Lassowskat et al. (2014) durchgeführt. Drei Wochen alte, auf 0,5 MS (Langtagbedingungen) angezogene Pflanzen wurden geerntet und in flüssigen Stickstoff gemörsert. Nach Einwaage des Materials wurde das 3-fache Volumen an Extraktionspuffer hinzugegeben und die Probe zweimal für 20 sek gevortext. Anschließend wurde die Probe 20 min bei 4° C geschüttelt und danach für 15 min bei 4° C und 5000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Der Überstand wurde dann gefiltert (0,45 µm Zellulosemischester, 6783-1304, Roth), um sämtliche Blattreste zu entfernen. Nach Zugabe an gleichem Volumen Phenol (Rotiphenol, A156.1, Roth) wurde der gesamte Ansatz 1 min gevortext und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (15 min, 4°C, 5000 g) wurde die untere (phenolische) Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit gleichem Volumen Reextraktionspuffer versetzt, erneut für 1 min gevortext und abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Die untere Phase wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem 5-fachen Volumen an Fällungsreagenz versetzt. Die Fällung erfolgte über Nacht bei -20° C. Zur Sedimentation des Proteinpellets wurde für 12 min zentrifugiert (4°C, 5000 g). Das Pellet wurde einmal mit eiskaltem Fällungsreagenz und zweimal mit eiskaltem 80%igen Aceton gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C in 80% Aceton gelagert.

Lysis-Puffer

30 mM Tris-Cl pH 8,5
7 M Harnstoff
2 M Thioharnstoff
4% (w/v) CHAPS

Extraktionspuffer

100mM HEPES-KOH pH 7,5
5% (v/v) Glycerin
5mM EDTA
0,1% (v/v) β-Mercaptoethanol

Reextraktionspuffer

100 mM Tris-Cl pH 8,4
20 mM KCl
10 mM EDTA
0,4% (v/v) β-Mercaptoethanol
1%(v/v) Proteinaseinhibitor (P9599, Sigma)

2.3.4.3. Schnelltest zur Überprüfung der Proteinexpression in pflanzlichen Material

Zur Überprüfung der Expression von Fusionsproteinen in Mesophyllprotoplasten bzw. stabil transformierten *Arabidopsis*-Pflanzen wurde ein Schnellprotokoll verwendet. Hierzu wurden

300 µL Protoplasten/ ein gemörsertes Blatt mit 12 µL/ 200 µL Lyse&Load Puffer versetzt, 10 min bei 96 °C gekocht und anschließend direkt auf ein SDS-Gel aufgetragen.

Lyse & Load

8 M	Harnstoff
30 %	Glycerin
4 %(w/v)	SDS
50 mM	Tris-Cl (pH 6,8)
100 mM	DTT (frisch)

2.3.5. Proteinkonzentrationsbestimmung

2.3.5.1. Bradford-Assay

Die Proteinkonzentrationsbestimmung für die 2D Gelelektrophorese erfolgte nach (Bradford 1976) (500-0006, BioRad). Das Proteinpellet wurde in Lysis-Buffer aufgenommen und es wurden 1:10 und 1:100 Verdünnungsreihen angefertigt. 10 µL Proteinprobe wurden mit 200 µL einer 1:5 Farbstofflösung inkubiert. Die Messung der Extinktion bei 595 nm erfolgte nach 8 min Inkubation. Die Konzentration wurde anhand einer parallel gemessenen Kalibrierungsgerade ermittelt.

2.3.5.2. BCA-Assay

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Proteinaufreinigung wurde mit Hilfe des BCA Assay Kits (23225, Thermo Scientific) entsprechend des Protokolls und einer erstellten Kalibrierungsgeraden am Gerät Infinite F200 pro (Tecan) zusammen mit dem Programm Tecan i-control durchgeführt.

2.3.5.3. Direct Detect

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Pflanzenextrakt, wurde mit Hilfe des Gerätes Direct Detect (Merck) durchgeführt. Hierbei wurde Methode 3 der Konzentrationsbestimmung angewendet.

2.3.6. 2D Gelelektrophorese

2.3.6.1. Markierung

50 µg Proteom in Lysis-Puffer wurde mit 400 pmol (in DMF) Farbstoff des Kits „Refraction-2D™“ (PR08, NH DyeAGNOSTICS) in einem lichtundurchlässigen Reaktionsgefäß gemischt und für 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Die Markierungsreaktion wurde durch Zugabe von 1 µL Lysinlösung (10 mM, pH 9) abgestoppt. Nach erneuter Inkubation auf Eis im Dunkeln (10 min) wurden die Proben bei -20° C gelagert oder in die Isoelektrische Fokussierung eingesetzt.

2.3.6.2. Auftrennung nach Ladung (Isoelektrische Fokussierung (IEF-PAGE))

Proteine weisen in einem bestimmten pH-Milieu entsprechend ihres Anteils an basischen und sauren AS eine definierte Ladung auf (positiv oder negativ). Die Summe aller Ladungen eines Proteins und somit seine Beweglichkeit in einem elektrischen Feld ist gleich Null bei einem bestimmten pH (Isoelektrischer Punkt pI). Dies wird in der IEF genutzt um auf einem IPG-Streifen mit steigendem pH-Gradienten durch Anlegen eines elektrischen Feldes Proteine an ihrem pI zu fixieren (Bannister und Wood 1970; Lewin 1970). Hierbei handelt es sich um die erste Dimension der DIGE, Trennung nach Ladung.

Die Proteinproben wurden in gleichem Volumen 2X Probenpuffer aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte die Vereinigung der Proben, welche auf ein Gel geladen wurden (bei markierten Proteinproben: 3 Proben je Gel, G-Dye100 (IS), G-Dye200, G-Dye300). Anschließend wurde die Probe auf ein Volumen von 450 µL mit Rehydrationspuffer aufgefüllt und dann in einem Keramikschiffchen gleichmäßig aufgetragen und mit der Gelseite nach unten die IPG-Streifen (pH3-10, 17-6002-45, GE) aufgelegt. Zur Verhinderung der Verdunstung wurden die Streifen mit Butanol überschichtet und die Reaktion im IPGphor3 (Amersham) nach folgendem Programm durchgeführt.

1. 500 V	1 Stunde
2. 1000 V	2 Stunden
3. 50 V	12 Stunden
4. 200 V	1 Stunde
5. 500 V	1 Stunde
6. 1000 V	1 Stunde
7. 8000 V (Gradient)	1,5 Stunden
8. 8000 V	9 Stunden

Die Streifen wurden anschließend durch Schwenken in destilliertem H₂O vom Butanol befreit und bis zur weiteren Verwendung bei -20° C gelagert.

2x Probenpuffer

7 M	Harnstoff
2 M	Thioharnstoff
130 mM	DTT (frisch)
4 %(w/v)	CHAPS
2 %	IPG-Puffer (GE,17-6000-88)

Rehydrationspuffer

7 M	Harnstoff
2 M	Thioharnstoff
13 mM	DTT(frisch)
4 %(w/v)	CHAPS
1 %	IPG-Puffer
0,01 %	Bromphenolblau

2.3.6.3. Auftrennung nach Masse (SDS-PAGE)

Die zweite Dimension der DIGE ist die Auftrennung nach Molekulargewicht. Hierzu wurden die IPG-Streifen 15 min in Äquilibrationpuffer mit 1% DTT und anschließend erneut 15 min in Äquilibrationpuffer mit 2,5 % Iodacetamid unter Schütteln inkubiert. Der Streifen wurde dann mit 0,5% Agarose (w/v) auf einem 12,5 prozentigen SDS-Gel fixiert. Die Trennung der Proteine erfolgte mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach folgendem Protokoll bei 15° C:

2 h 20 V
18 h 90 V

Äquilibriumspuffer

50 mM Tris-Cl pH 8.8
6 M Harnstoff
30% (v/v) Glycerin
2% (w/v) SDS
0,002% (w/v) Bromphenolblau

2.3.6.4. Detektion

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele anschließend am Typhoon-Scanner 9410 (GE) mit entsprechenden Einstellungen gescannt:

Tabelle 14: Auflistung der Verwendeten G-Dyes, verwendete Laseranregung und Emissionsfilter sowie angelegte Spannung

Farbstoff	Laser	Emissionsfilter	Spannung in V
G-Dye100	488 nm	520 BP 40	600-650
G-Dye200	532 nm	580 BP 30	540-580
G-Dye300	366 nm	670 BP 30	510-545

Die Spannung wurde für jeden Kanal angepasst und auf die Intensität der RuBisCO normalisiert.

2.3.6.5. Isolation spezifischer Proteine aus 2D-Gel

Zur Analyse der identifizierten Proteine wurde eine präparative 2D-Gelelektrophorese (650 µg Protein insgesamt, je ein Viertel der Menge aus jedem verwendeten Genotyp) durchgeführt. Dieses wurde in Fixierlösung (50% EtOH, 10% Essigsäure) über Nacht inkubiert und anschließend mit frischer Ammoniumsilbernitratlösung nach Tabelle 15 gefärbt. Die identifizierten Proteine gepickt und zur weiteren MS-Analyse an Ines Lassowskat, Petra Majovski und Wolfgang Hoehenwarter übergeben und wie folgt von ihnen weiter bearbeitet.

Tabelle 15: Protokoll der MS-kompatiblen Silberfärbung von SDS Gelen

Schritt	Zeit	Menge für 1 Gel (250 mL)
Fixierung	2 x 20 min	100 mL MeOH, 25 mL Essigsäure, 125 mL H ₂ O
Voinkubation	30 min	50 mg NaS ₂ O ₃ , 17 g Natriumacetat, 75 mL MeOH, 165 mL H ₂ O
Waschen	3 x 5 min	250 mL H ₂ O
Silberfärbung	20 min	500 mg AgNO ₃ , 250 mL H ₂ O
Waschen	2 x 1 min	250 mL H ₂ O
Entwicklung	max. 5 min	6,25 g NaCO ₃ , 100 µL HCHO, 250 mL H ₂ O
Abstoppen	10 min	3,65 g EDTA, 250 mL H ₂ O
Waschen	2 x 10 min	250 mL H ₂ O
Konservierung	über Nacht und länger	62,5 mL EtOH, 7,5 mL Glycerin, 180 mL H ₂ O

2.3.6.6. Trypsin-Verdau

Die Proteinspots wurden im Gel mit Trypsin verdaut, anschließend 1 h reduziert (100 mM DTT, 100 mM Tris-HCl, pH 7.8) und nachfolgend 1 h alkyliert (200 mM Iodoacetamid, 100 mM Tris-HCl, pH 7.8). Die Peptide wurden auf einer C18-Säule (PepCleanTM, Thermo Scientific) unter Anwendung eines 30 min Gradienten von 5-40% ACN in 1% Ameisensäure.

2.3.6.7. Massenspektrometrie und spektrale Datenanalyse

Die Peptide wurden ionisiert und direkt über Elektrospray (1,9 kV; Kapillarentemperatur 275 °C; S-lens RF Level 50%; Multipole offset 7 V) in das Orbitrap Velos Pro Massenspektrometer (Thermo Fisher) überführt. Die Messung erfolgte anhand einer datenabhängigen Analyse-Scanstrategie (DDA) und das Vorstufenscanning wurde mit einer Auflösung von 30000 im Orbitrap Massenanalysator durchgeführt. Bis zu 20 datenabhängigen (DDA) MS/MS-Scans wurden zu den höchstabundanten Vorstufenionen durch CID Messung im Linear Trap Quadrupole Mass Analyzer (LTQ) angefertigt (Minimum Signalintensität 500), wobei Die dynamische Ausschlussdauer 10 sek mit einer Ausschlussmasse von +/- 10 ppm (Kalibrierung m/z 445,120024) betrug. Ein Signal zu Rauschen-Schwellenwert von 1,5 wurde genutzt um Ionen-Signalpeaks aus den MS-Scans zu filtern. Peptidspektrenmatches (PSM) wurden gegen eine *Arabidopsis*-Proteindatenbank basierend auf TAIR10 (www.arabidopsis.org) unter Verwendung eines In-House-Mascot Servers (Parameter: Vorstufen-Massetoleranz: 7 ppm, Fragment-Massetoleranz: 0.8 Da, fehlende Spaltung: 2; mögliche Carbamidomethylierung von Cystein) verlinkt zu Proteome Discoverer v1.3 (PD) (Thermo Fisher) gesucht. Die PSM-Fehlerrate wurde über die False-discovery-rate (FDR/q-Values) unter Verwendung des Target/Decoy Datenbankmodells für erwartete falsch positive PSM mit dem Targetdecoy PSM Validierungsmodul im PD kontrolliert.

2.3.7. Shotgun-Analyse

Zur Untersuchung von Proteinen, welche in den Mutanten *ate1 ate2*, *prt6-3* und *prt1-1* im Vergleich zu Col-0 höher- bzw. weniger abundant sind, wurde Pflanzenmaterial der genannten Genotypen an Ines Lassowskat, Petra Majowski und Wolfgang Hoehenwarter abgegeben und die Probenaufbereitung sowie die Auswertung der Daten wie folgt beschrieben von ihnen durchgeführt.

2.3.7.1. In-Lösung Verdau

Die Proteinkonzentration mittels 2-D Quant Kit nach Herstellerangaben ermittelt, die Proteine wurden reduziert (100 mM DTT, 100 mM Tris-HCl, pH 7.8, für 1 h) und alkyliert (200 mM Iodoacetamid, 100 mM Tris-HCl, pH 7.8, für 1 h). Die Lösung wurde zu einer Endkonzentration von 0,5 M Harnstoff mit 50 mM NH₄HCO₃ (pH 8) verdünnt und über Nacht bei 37 °C mit Trypsin (1:50). Die Peptide wurden auf einer C18-Säule (PepClean™, Thermo Scientific) entsprechend den Herstellerangaben entsalzt und in 5% ACN, 0,1% TFA rekonstituiert.

2.3.7.2. Massenspektrometrie und spektrale Datenanalyse

Der Verdau wurde mittels LC-MS mit Nano-LC (Easy-nLC II, Thermo Scientific) gekoppelt an ein Hybrid-FT-Massenspektrometer (LTQ Orbitrap Velos Pro, Thermo Scientific) analysiert.

Die Peptidseparation fand auf einer C18 Säule (EASY column; 10 cm, ID 75 µm, Partikeldurchmesser 3 µm) bei einer Flussrate von 300 nL/min und einem linearen Gradienten von 5-40% B in 300 min (A: 0.1% Ameisensäure in Wasser, B: 0.1% Ameisensäure in ACN) statt. Eine Spannung von +1,9 kV wurde angelegt, um die Peptide via Elektrospray zu ionisieren. Die Kapillarentemperatur von 275 °C und eine Lock-mass von 445,120024 m/z wurden für den Peptidtransfer verwendet. Das Vorstufenscanning von 400-1850 m/z wurde in der Orbitrap mit einer Auflösung von 30000 durchgeführt und die 20 höchststabilen Ionen zur CID-Fragmentation im Linear Trap Quadrupole Mass Analyzer (LTQ) selektiert. Einfach geladene Ionen wurden aus der Fragmentation ausgeschlossen und die dynamische Selektion wurde durchgeführt (Repeat Count: 1, Repeat Duration: 30 sek, Exclusion List Size: 500, Exclusion Duration: 90 sek). Jede Probe (Genotyp) basiert auf drei biologischen Replikaten. Die resultierenden MS Rohdaten wurden mit der Progenesis LC-MS Software (Nonlinear Dynamics Limited) analysiert. Nach dem Alignment und der Featurredetektion wurde die Normalisierung automatisch auf alle Features entsprechend der Software angewandt. Die resultierenden Features wurden für einen ANOVA p-Wert von <0.05 und fold-change von >2.0 (zwischen den Genotypen) gefiltert. Verfügbare MS-Spektren mit Rang 10 und besser wurden gegen eine *Arabidopsis* Proteindatenbank basierend auf TAIR10 (www.arabidopsis.org) unter Verwendung eines In-House-Mascot Servers (Parameter: Vorstufen-Massetoleranz: 7 ppm, Fragment-Massetoleranz: 0.8 Da, fehlende Spaltung: 2) gesucht. Carbamidomethylierung von Cystein wurde als statische Modifikation eingefügt sowie die variablen Modifikationen wie Oxidation, Azetylierung von N-Termini, Deamidierung, und Phosphorylierung an den entsprechenden Aminosäuren berücksichtigt. Peptide mit einem Mascotwert unter 20 wurden verworfen.

2.3.8. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese wurde nach (Laemmli 1970) durchgeführt. 10-20 µL Proteinprobe wurden mit 5 X-SDS-Probenpuffer versetzt (Endkonzentration 1 X), 5 min bei 96 °C gekocht und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte zuerst für 15 min bei 85 V und danach 45 min bei 135 V. Die Größe der Proteinbanden wurde anhand des Proteinmarkers PageRuler PLUS Prestained Protein Ladder (SM1811, Thermo Scientific) ermittelt.

Tabelle 16: Zusammensetzung SDS-Gel und Konzentration

Sammelgel (5 %) (2 mL)	Endkonzentration
1,4 mL H ₂ O	
0,31 mL Rotiphorese®Gel 30 (37,5:1)	5 %
0,25 mL 1 M Tris-Cl (pH 6,5)	0,11 M
0,02 mL 10 % (w/v) SDS	0,1 %
0,02 mL 10 % (w/v) APS	0,1 %
0,002 mL TEMED	
Trenngel (12%) (10 mL)	
3,3 mL H ₂ O	
4 mL Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	12 %

2,5 mL 1,5 M Tris-Cl (pH 8,8)	0,375 M
0,1 mL 10 % (w/v) SDS	0,1 %
0,1 mL 10 % (w/v) APS	0,1 %
0,004 mL TEMED	

Towbin-Puffer (10x)

144 g/L Glycin
30 g/L Tris
10 g/L SDS

5 X-SDS-Probenpuffer

0,35 M Tris-Cl (pH 6,8)
30 % (v/v) Glycerin
10 % (w/v) SDS
0,6 M DTT
0,012 % (W/v) Bromphenolblau

2.3.9. Coomassie-Blue-Färbung und Geltrocknung

Zum Anfärben der Proteinbanden wurde das Gel zwei Stunden oder über Nacht in Coomassie Blue Färbelösung (3074.1, Roth) inkubiert und so lange in Entfärber inkubiert bis die Proteinbanden klar zu erkennen waren.

Entfärber

50% Methanol
10% Essigsäure

2.3.10. Westernblotanalyse

Zum Western Blot (Towbin et al. 1979) wurde Filterpapier (1703969, BIO-RAD) sowie eine PVDF-Membran (IPVH00010, Roth) entsprechend der Gelmaße zurechtgeschnitten. Die Membran wurde in reinem Methanol für 5 min, das Filterpapier sowie das Gel in Blot-Puffer vorinkubiert. Der Aufbau war: Filterpapier, PVDF-Membran, Gel, Filterpapier. Geblottet wurde eine Stunde im SD Semi-Dry Transfer Cell-Blotter (BioRad) bei 1 mA pro cm² PVDF-Membran, danach wurde die Membran kurz mit destilliertem Wasser gespült und eine Stunde auf dem Schüttler (oder bei 4 °C über Nacht) in 10 mL Blocklösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal 10 min in 10 mL 1x TBST Puffer gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation für eine Stunde (oder bei 4 °C über Nacht) mit dem primären Antikörper (Tabelle 4). Die Membran wurde erneut gewaschen und anschließend eine Stunde mit dem sekundären Antikörper (entsprechend Tabelle 4) inkubiert. Um ungebundenen Antikörper zu entfernen und ein möglichst spezifisches Signal zu erhalten, wurde danach 5 x 10 min gewaschen. Zur Detektion wurde die Membran mit Detektionslösung behandelt.

Blot-Puffer

25 mM Tris
192 mM Glycin
20% Methanol

1x TBST-Lösung

150 mM NaCl
10 mM Tris-Cl (pH 8)
1 % (v/v) Tween-90

Blocklösung

1x TBST
3% Milchpulver

Detektion mittels Chemolumineszenz

Die Detektion des Westernblots erfolgt mittels Chemolumineszenz. Hierzu wurde ECL-Lösung (Pico oder Femto, Thermo Scientific) entsprechend den Herstellerangaben vorbereitet und auf die Membran gegeben. Diese Lumineszenz wird mit Hilfe von Fujifilm Super RX-Film (RF12, Hartenstein) detektiert.

2.3.11. *In vitro* Proteinexpression und Stabilitätsuntersuchung

Die Untersuchung der Proteinestabilität wurde mit Hilfe des TNT T7 Kaninchenretikulozytenlysatsystems (L4610, Promega) nach Herstellerangaben durchgeführt (Naumann et al. 2016). Jedoch wurde die angegebene Reaktionsgröße auf ein Viertel reduziert: 2,25 μ L DNA (Vektor: pOLNETE), 0,25 μ L Methionin und 10 μ L Retikulozytenlysat wurden für 30 min zur Proteinsynthese bei 30° C inkubiert. Nach Entnahme einer 5 μ L Probe (Zeitpunkt Null) erfolgte die Zugabe von Cycloheximid (CHX) (1mM in Reaktion) und eine Inkubation von 90 min bei gleicher Temperatur. Die Probe wurde mit SDS-Ladepuffer versetzt und in flüssigem Stickstoff gelagert bis zur Entnahme der zweiten Probe nach 90 min. Nach Denaturieren (15 min bei 65° C) wurde die Proteinabundanz auf dem Western Blot überprüft.

2.3.12. *In vitro* Markierung von rekombinant exprimierten RD21a mit MV151

Zur Validierung, dass es sich bei dem in *E.coli* exprimierten RD21a-Varianten um korrekt gefaltetes Protein handelt, wurde das aktive Zentrum mittels MV151 markiert. Dieses bindet kovalent an das katalytische Cystein der Protease und emittiert ein Signal bei 580 nm nach Anregung bei 532 nm (Gu et al. 2010). 20 μ g rekombinant exprimiertes Protein wurden mit 1 μ L (100 mM) MV151 bzw. 1 μ L DMSO für 5 h im Dunkeln bei RT unter Rotation inkubiert (50 mM Tris-Cl, pH 7,4; 1 mM DTT). Die Reaktion wurde durch Hinzufügen des doppelten Volumens an eiskaltem Aceton gestoppt, das Protein pelletiert (5 min, 4° C, 20000 g), in SDS-Ladepuffer aufgenommen und auf einem Gel separiert. Dieses wurde am Typhoon FLA 9500 bei einer Wellenlänge von 532 nm angeregt und die Emission von 580 nm detektiert. Anschließend erfolgte ein Western Blot.

2.3.13. *In vitro* Interaktion von rekombinant exprimierten Protein mit endogenem RD21a

Die Proteine ATE1, ATE2 sowie die UBR-Domäne von PRT6 wurden wie oben beschrieben als His-MBP-tev-POI-Fusionsproteine exprimiert und aufgeschlossen. Nach Reinigung mittels Ni-NTA wurde die Elution direkt auf eine vor-äquilibrierte Amylosesäule geladen und nicht gebundenes Protein Amylosepuffer (15 mL) heruntergewaschen. Unter Langtag-

bedingungen auf 0,5x-MS-Platten angezogene Keimlinge von *ate1 ate2* (Interaktion mit den ATEs) und *prt6-1* (Interaktion mit der UBR-Domäne) wurden nach 11 Tagen geerntet und gemörsertes Pflanzenmaterial 1 h bei 4° C unter Rotation mit IP-Puffer extrahiert (Dissmeyer und Schnittger 2011). Das Pflanzenmaterial wurde zentrifugiert (10 min bei 4° C, 12000 g) und der Überstand dreimal auf die beladene Amylosesäule gegeben. Nach dreimal Waschen (15 mL Amylosepuffer) wurde das rekombinante Protein mit 3 mL Amylose-Elutionspuffer (Amylosepuffer + 10mM Maltose) eluiert, mit Hilfe von AMICON-Säulen (AMICON-Ultra-0.5, 10 kDa Ausschlussgröße) aufkonzentriert und mittels SDS-Page und Western Blot überprüft. Die Detektion erfolgte zum einen mittels His-AK zur Detektion des rekombinanten Proteins und zum anderen mittels RD21a-AK. Eine schematische Übersicht ist des experimentellen Verlaufs, ist im Anhang gezeigt (Abbildung A1).

IP-Puffer

25 mM	Tris-Cl pH7.6
15 mM	MgCl ₂
85 M	NaCl
2.5 mM	NaF
15 mM	EGTA
5mM	DTT
1 mM	PMSF
0.1% (v/v)	Nonidet P40
0.1% (v/v)	Tween 20
15 mM	Dinatriumnitrophenylphosphat
60 mM	Dinatrium-β-glycerophosphat

2.3.14. *In vitro* Arginylierung

Zur Überprüfung der Aktivität und Spezifität der Arginyltransferasen ATE1 und 2 wurde ein Arginylierungsassay durchgeführt (Wang et al. 2011). Nachdem alle Komponenten des Versuches vorgelegt waren wurde die Reaktion durch Zugabe der beiden Enzyme RRS und ATE bei 37° C gestartet und 60 min inkubiert. Nach Zugabe von SDS-Ladepuffer und Erhitzen für 5 min bei 96° C stoppte die Reaktion ab. Zur Analyse wurden anschließend eine SDS-Gelelektrophorese und ein Westernblot durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch die Auflage eines Röntgenfilms und eine anschließende Inkubation von drei Wochen bei – 80° C.

Tabelle 17: Pipettierschema Arginylierungsversuch mit Konzentrationsangaben

Substanz	Konzentration (Stammlsg)	Eingesetzte µL	Konzentration in Reaktion
Puffer	10x	5	1x
ATP (P0756S, NEB)	10mM	12,5	2,5 mM
tRNA (R1753, Sigma)	2,55 mg/mL	11,76	0,6 mg/mL
DTT	2M	2,5	100 mM
RRS (A3646, Sigma)	2,7 µg/µL	0,72	2 µg
Substrat Ovolactalbumin/ RIN4/ X-mRD21a	X- 12,5 µg/µL, X	5/x	62,5 µg
ATE	Entspr. Reinigung	entsprechend Reinigung	9,43 µg
¹⁴ C-Arg.(MC-1243,	0,1 µCi/µL	2	0,2µCi

Hartmann Analytic)			
H ₂ O		Add 50µL	

10x Reaktionspuffer

500 mM Hepes pH 7,5
250 mM KCl
150 mM MgCl₂

2.3.15. Ubiquitylierungsversuch mit Pflanzenextrakt und rekombinanten RD21a

Die Ubiquitylierung von rekombinant exprimierten RD21a entsprechend des N-Terminus erfolgte nach der Abspaltung des His-MBP-Tags durch die TEV-Protease. 11 Tage alte Keimlinge von Col-0 und *prt6-1* (Langtag, 0,5x MS-Agar) wurden in flüssigem Stickstoff geerntet und 3 min bei 30 Hz am Tissue Lyser aufgeschlossen und das Material 5 min bei 4° C und 21000 x g zentrifugiert. Die Konzentration wurde auf 1µg/µL eingestellt. 1 µg rekombinantes X-RD21a-HA (X=D,R,G) wurde zu 300 µL Pflanzenextrakt zugegeben und 3 h bei 30° C und 350 rpm inkubiert. Es wurde 50µM MG132 bzw. DMSO als Nullprobe zu dem Ansatz hinzugegeben. Anschließend wurden 30 µL mit Puffer vorequilibrierte (3x 300µL, 30s, 4° C, 4000 g) HA-Agarose (A2096, Sigma) dazugegeben und 2 h bei Raumtemperatur unter Rotation inkubiert. Die HA-Agarose wurden wie zuvor abzentrifugiert und dreimal mit Puffer (500µL) gewaschen. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte durch Zugabe von 50 µL 3xSDS-Ladepuffer und Inkubation bei 96° C für 12 min. Nach Zentrifugation (25° C, 5 min, 21000 g) wurde der Überstand auf ein SDS-Gel aufgetragen und auf dem Western Blot nach Inkubation mit den entsprechenden primären und sekundären AKs detektiert.

Extraktionspuffer

25 mM Tris-Cl pH 7,5
10 mM MgCl₂
5 mM DTT
10 mM NaCl
0,1% Triton-X

2.3.16. Tandem Ubiquitin Bindungseinheit (TUBE)

Zur Bindung von endogenem ubiquityliertem RD21A wurde das *Tandem ubiquitin binding entity 2* (TUBE2, UM402, LifeSensors) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Pflanzenmaterial (7 Tage, Kurztagsbedingungen, 0,5x-MS-Agar) wurde in flüssigem Stickstoff geerntet, am Tissue Lyser wie bereits beschrieben in Extraktionspuffer (siehe 2.3.17.) mit (Extraktionspuffer mit 50 µM MG132, 50µM PR-616, 5 mM 1,10 Phenanthrolin) und ohne Proteasom- (MG132) und DUB-Inhibitor (PR-616, 1,10 Phenanthrolin) aufgeschlossen und eine Proteinkonzentration von 1 µg/µL eingestellt (Empfehlung des Herstellers). 20 µL TUBE2-Agarosebeads (vorequilibriert mit Puffer, 3 x 4° C, 2000 g, 30 sek) wurden zu einem mL Pflanzenextrakt hinzugegeben und eine Stunde bei 4° C unter

Rotation inkubiert. Anschließend wurde das Material zentrifugiert (4° C, 2000 g, 30 sek), dreimal mit Puffer gewaschen und die Proteine durch Zugabe von 20µL 2-fach SDS-Ladepuffer und Ausheizen für 5 min bei 96 °C eluiert. Die Proben wurden auf einem SDS-Gel separiert und die Detektion erfolgte mittels Western Blot.

2.3.17. In vitro Deamidierung

Zur Überprüfung der Aktivität und Spezifität der Deamidasen NTAN1 und NTAQ1 wurde ein Deamidierungsversuch durchgeführt (Wang et al. 2009). Hierzu wurde das Ammonia (Rapid)-Kit (K-AMIAR, Megazyme) verwendet. Bei diesem Test handelt es sich um einen indirekten Enzymtest, bei dem die Umsetzung von NADPH zu NADP spektroskopisch bei 340 nm verfolgt wird. Die durch die Deamidierung frei gewordenen Ammonium-Ionen reagieren nach Abbildung 6 mit 2-Oxoglutarat und unter Katalyse der Glutamatdehydrogenase (GDH) zu L-Glutamat und Wasser. Als Co-Faktor wird während dieser Reaktion NADPH zu NADP oxidiert. Da der im Kit enthaltene Puffer einen pH von 8 aufweist, handelt es sich hierbei um eine basenkatalysierte Reaktion. Alle Messungen wurden in Greiner 96 Flat Bottom Transparent Polystyrol – Mikrotiterplatten mit dem Gerät infinite F200 pro zusammen mit dem Programm Tecan i-control durchgeführt.

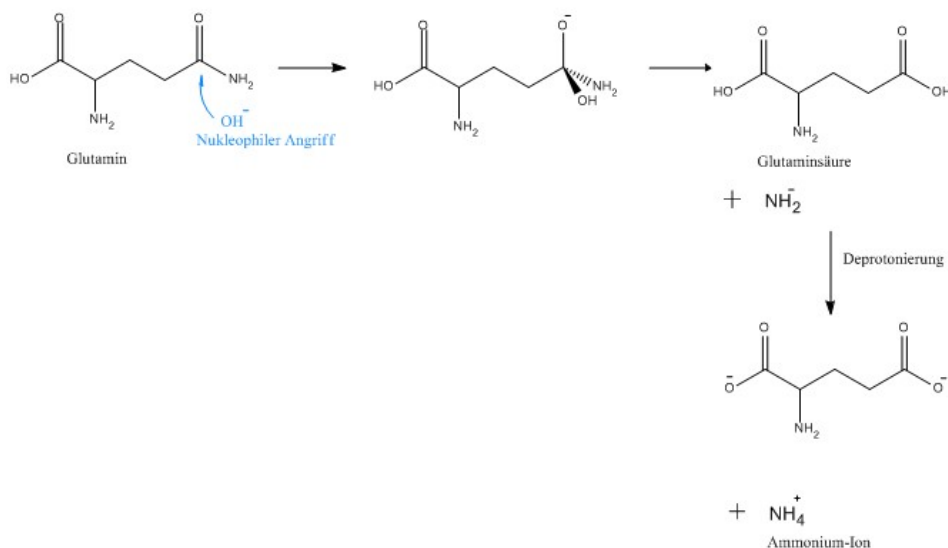


Abbildung 6: Reaktionsmechanismus der basenkatalysierten Deamidierung. Entnommen aus (Kind 2013).

Die Menge an freigesetzten Ammonium-Ionen ist stöchiometrisch 1:1 der Menge an gebildeten NADP⁺.

Der Reaktionsansatz wurde entsprechend Tabelle 18 und Tabelle 19 pipettiert wobei Tabelle 18 das Pipettierschema der Kalibrierungsgerade darstellt und Tabelle 19 den Deamidierungsversuch.

Tabelle 18: Pipettierschema Eichgerade, entnommen aus (Kind 2013)

gewünschte Ammoniakkonzentration in µg/ml	blank	0,05	0,125	0,25	0,5	1	2
H ₂ O in µL	210	206,72	201,81	193,62	177,25	144,5	79
Lösungspuffer (Flasche 1) in µL	30	30	30	30	30	30	30
NH ₄ ⁺ -Stock in µL	0	0,328	0,819	1,638	3,275	6,55	13,1
240 µl pro Well vorlegen, nun hintereinander das NADPH zugeben und die Zeit messen							
NADPH in µL	20	20	20	20	20	20	20
Inkubation bei RT, nach 25, 30, 35 min: A1 messen bei 340 nm							
GDH in µL	2	2	2	2	2	2	2
Inkubation bei RT, nach 3 h: A2 messen bei 340 nm							

Tabelle 19: Pipettierschema Deamidierungsversuch NTAN1/NTAQ1 mit Peptidsubstrat, nach (Kind 2013)

Substratkonzentration 0,1 mM	blank	NK mit NTAN	QK mit NTAQ
10 mM DTT in µL	26,2	26,2	26,2
NTAN (3,8 mg/mL)/ NTAQ (4,6 mg/mL) (1:100) in µL	0	11,7	9,5
Peptidsubstrat des 2,62 mM Stocks in µL	10	10	10
Lösungspuffer (Flasche1) in µL	30	30	30
H ₂ O in µL	Add zu 240	Add zu 240	Add zu 240
NADPH zugeben und die Zeit messen			
NADPH in µL	20	20	20
Inkubation bei RT, nach 25, 30, 35 min: A1 messen bei 340 nm			
GDH in µL	2	2	2
Inkubation bei RT, nach 3 h: A2 messen bei 340 nm			

Auswertung

Anhand der Messwerte ($\Delta A = A2 - A1$) und den bekannten Konzentrationen aus Tabelle 18 wurde eine Kalibrierungsgerade der Formel $y = mx$ erstellt. Die nun ermittelten ΔA -Werte des Enzymtests wurden für y eingesetzt und so die Menge an gebildeten NH₄⁺ ermittelt.

2.3.18. In vivo Markierung von endogenem RD21a mittels DCG-04

Proteasenaktivitätsprofiling basiert meist auf biotinylierten oder anderweitig markierten Inhibitoren, welche die Protease mechanistisch, jedoch nicht strukturell hemmen (Campbell und Szardenings 2003). RD21a gehört zu den Papain-ähnlichen Cysteinproteasen, welche mit DCG-04, einem biotinyliertem Derivat des Selbstmord-Inhibitors E64 (E3132, Sigma) markiert werden können (van der Hoorn et al. 2004; Gu et al. 2012). Eine aktive Cysteinprotease spaltet ihr Substrat über einen kovalenten Zwischenschritt, vermittelt durch das katalytische Cystein (Otto und Schirmeister 1997). Dieser Zustand wird durch DCG-04 aufrecht erhalten. Das biotinylierte Protein kann via Streptavidin-HRP Antikörper auf einem Western Blot nachgewiesen werden.

Für die Markierung mittels DCG-04 wurde Pflanzenextrakt aus 7 Tage alten Keimlingen (Kurztagsbedingungen, ½ MS-Medium), wie bereits beschrieben, erstellt. 100 µg Protein wurden mit 0,2 µM DCG-04 oder DMSO (Mock) im Reaktionspuffer versetzt. Proben, welche mit E64 als Negativkontrolle behandelt wurden, wurden mit 100 µM E64 für 30 min unter Rotation bei RT inkubiert, bevor die Sonde wie beschrieben zugegeben wurde. Nach 5 h

Inkubation unter Rotation wurde die Reaktion durch Zugabe des Doppelten an Reaktionsvolumen an eiskaltem Aceton abgestoppt und die Proteine 5 min bei 4° C und 21000 g präzipitiert. Das Pellet wurde anschließend in 50 µL 2-fach SDS-Ladepuffer aufgenommen. Es wurden 4 µg Gesamtprotein zur Analyse aufgetragen. Detektiert wurde das biotinylierte Protein mittels Streptavidin-HRP, die Detektion von Gesamt-RD21a erfolgte mit α-RD21a- (Tabelle 4, Yamada et al. 2001).

Extraktionspuffer

10 mM Tris-Cl pH 8
5 mM DTT

Reaktionspuffer

100 mM Na-Acetat pH 6
1 mM DTT

2.4. Mikroskopische Methoden

2.4.1. Mikroskopische Detektion und Datenauswertung von Protoplasten

Alle Bilder von transfizierten Protoplasten wurden mit dem LSM 710 (Zeiss) entsprechend Tabelle 20 aufgenommen und mit der dazugehörigen Software (LSM Imaging Browser) bearbeitet und ausgewertet. Das Fluoreszenzsignal wurde anhand des λ-Scans überprüft. In diesem wird die Fluoreszenzintensität bei verschiedenen Emmissionswellenlängen und das resultierende Fluoreszenzspektrum bestimmt. Die Transformationseffizienz der Mesophyllprotoplasten wurde durch die Anzahl mit mCherry transformierter Protoplasten im Verhältnis zur Gesamtprotoplastenzahl ermittelt. Die Stabilität der Fusionskonstrukte wurde anhand des Verhältnisses YFP/mCherry ermittelt.

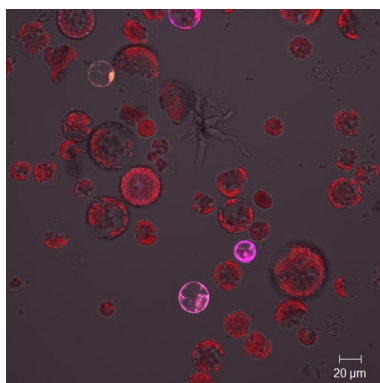


Abbildung 7: Mit mCherry und YFP transformierte Mesophyllprotoplasten

Tabelle 20: Aufnahmeeinstellung am LSM 710

Variable	Einstellung Protoplasten
Scan Zoom	0,6
Objektiv	LD C-Apochromat 40x/1,1 W Korr M27
Pinhole	39 µm
Beam Splitter	MBS 458/514/594 DBS1: Mirror FW1: Rear
Wellenlänge	594 nm 62,1 % 514 nm 5 %

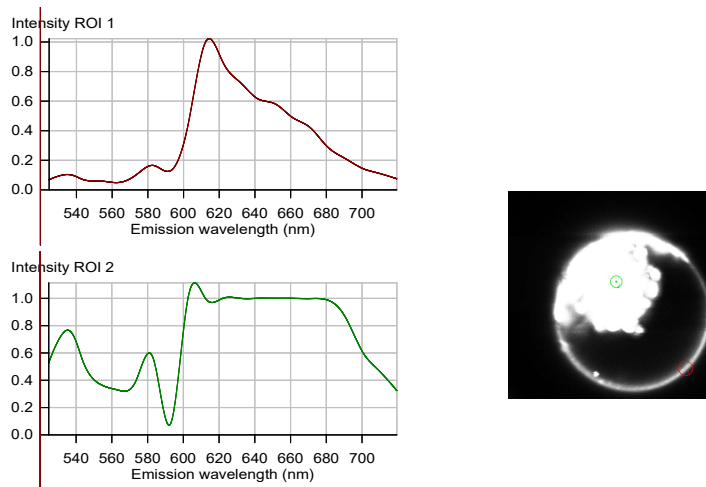


Abbildung 8: Emissionsspektrum des markierten Protoplasten und Intensitätsbilder bei 534 und 610 nm.

Die Spektren zeigen ein Maximum bei 610 und 532 nm, dies ist charakteristisch für mCherry und YFP.

2.4.2. Einbettung von Pflanzenmaterial in PEG 1500

Die Einbettung von Pflanzenmaterial wurde nach Hause et al. 1996 und Isayenkov et al. 2005 durchgeführt. Hierbei wurden Blätter von *Arabidopsis* (6 Wochen, Kurztag) direkt in der Fixierlösung zu 4 x 4 mm großen Stücken mit einer Rasierklinge geschnitten und in 5 mL Lösung für 3 x 5 min unter Vakuum mit der Fixierlösung infiltriert. Es folgte eine Inkubation von zwei Stunden bei Raumtemperatur unter Rotation. Nach zwei aufeinanderfolgenden Waschschritten für 15 min in TBST erfolgte das Dehydrieren mittels einer EtOH-Reihe wie in Tabelle 21 angegeben. Anschließend erfolgte die Infiltration mit PEG 1500 in vier Schritten bei 55° C.

- 60 min 3:1 (EtOH: PEG)
- 60 min 1:1 (EtOH:PEG)
- 60 min 1:3 (EtOH:PEG)
- 60 min 100% PEG

Eine weitere Stunde wurden die Proben mit offenem Deckel inkubiert. Die nun vollständig mit PEG infiltrierten Blattstücken wurden eingebettet und über Nacht zum Aushärten bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Tabelle 21: EtOH-Reihe zur Dehydrierung von einzubettenden Pflanzenmaterial sowie Dauer und Temperatur

EtOH in %	Zeit in min	Temperatur in ° C
10	30	23
30	60	23
50	60	23
70	Über Nacht	23
90	30	23
100	30	23
100	30	55

PBS (Phosphate Buffered Saline):

135 mM NaCl
3 mM KCl
1.5 mM KH₂PO₄
8 mM Na₂HPO₄
pH 7.0-7.2

Fixierlösung:

PBS
4% (w/v) Paraformaldehyd
0,1% (v/v) Triton-X 100

2.4.3. Immunmarkierung von PEG-Schnitten

Von den in PEG eingebetteten Blattproben wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt und mittels hängendem Tropfen in 45%iger PEG 6000-Lösung auf einen Poly-Lysin-beschichteten Objektträger (eigene Herstellung, OT) aufgebracht. Zum Herauslösen des PEG wurde der OT für 10 min in PBS inkubiert und zur Blockierung der freien Aldehydgruppen für 5 min in PBS mit 0,1 M NH₄Cl eingestellt. Es erfolgte eine Inkubation für 30 min in 5% BSA in PBS, gefolgt von der Inkubation des ersten Antikörpers (1:250 in PBS mit 5% BSA) über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Nach mehrmaligem Waschen (3x 10 min PBS mit 0,1% BSA; 1x 10 min PBS mit 1% BSA) erfolgte die Inkubation des zweiten Antikörpers (1:1000 in PBS mit 1% BSA) für 90 min bei 37° C in einer feuchten Kammer. Die folgenden vier Waschschriffe (10 min PBS) wurden in einer dunklen Küvette durchgeführt. Zur Visualisierung der Zellkerne erfolgte eine 15 minütige Gegenfärbung mittels DAPI (1µg/mL in PBS). Der OT wurde erneut zweimal für 10 min in PBS gewaschen und die Schnitte anschließend mit Citifluor eingeschlossen. Es erfolgte die Detektion am Mikroskop (Axioplan 2 Imaging, Zeiss).

2.4.4. Mikroskopie von PEG eingebetteten Schnitten

Alle Bilder der Immunmarkierung von in PEG-eingebettetem Blattmaterial wurden am „Axioplan 2 Imaging“ (Zeiss) aufgenommen. Hierbei wurde das 40 x Objektiv zur Visualisierung verwendet. Die Detektion des Alexa 488 gekoppelten Antikörpers erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 495 nm bei 519 nm, die Detektion von DAPI-gefärbten Zellteilen erfolgte bei 470 nm nach der Anregung bei 358 nm.

3. Ergebnisse

3.1. Rpm Interacting Protein (RIN4) als N-end rule Substrat

RIN4 ist ein membranlokalisiertes Protein und bekannt dafür, bei Pathogenbefall von *P. syringae* die ETI zu aktivieren (Mackey et al. 2002; Chung et al. 2011). Es wird nach Spaltung durch z.B. AvrRpt2 zum mobilen N-RIN4₁₁₋₁₅₂ prozessiert und ins Zytosol entlassen, wo es die Abwehrreaktion der Pflanzen auf das Pathogen *P. syringae* über verschiedene Proteininteraktionen aktiviert (Day et al. 2005; Kim et al. 2005b; Kim et al. 2005a; Axtell et al. 2003; Takemoto und Jones 2005). Aufgrund von Untersuchungen in *N. benthamiana* wurde RIN4 als Substrat des *N-end rule pathways* beschrieben, da der neu generierte N-Terminus nach mit N einen tertiär destabilisierenden Rest darstellt (Takemoto und Jones 2005), jedoch fehlt die biochemische Charakterisierung bis heute. Daher wurde in einem ersten Ansatz RIN4 als *bona fide* Substrat des *N-end rule* ausgewählt, um die biochemische Prozessierung untersuchen zu können.

Nach Spaltung durch die pathogene Protease AvrRpt2 zeigen das mobile Fragment RIN4₁₁₋₁₅₂ sowie das an der Membran gebundene größere RIN4₁₁₋₂₁₁ ein N als neuen N-Terminus. Dieser würde im ersten Schritt des Abbauweges zu D deamidiert und im Anschluss durch die ATE arginyliert werden. Die mögliche Ubiquitynylierung durch PRT6 führt das Protein dem 26S-Proteasom zum Abbau zu (Abbildung 4). Im Folgenden sind die Untersuchungen von RIN4 als *N-end rule pathway*-Substrat dargestellt.

3.1.1. Stabilität von X-RIN4 im zellfreien System

Die Stabilität von RIN4 in Abhängigkeit von allen N-Termini, welche in der Prozessierungskaskade des *N-end rule* auftreten (Abbildung 4), wurde *in vitro* unter Verwendung des Kaninchenretikulozytenextrakts getestet. Alle Varianten des Proteins wurden exprimiert und die Proteinabundanz 90 min nach Cycloheximidbehandlung (CHX) auf dem Western Blot überprüft. Hierbei wurde das X-RIN4₁₁₋₁₅₂-Fragment ausgewählt, da dieses im natürlichen Kontext nach der Spaltung durch die Protease AvrRpt2 frei im Zytosol vorhanden ist. Die Proteine wurden unter Verwendung der UFT (Bachmair et al. 1986; Varshavsky 2000; Varshavsky 2005) als UBQ^{K29RK48R}:X-RIN4₁₁₋₁₅₂:StreptII Fusionsproteine exprimiert (X = N, D, RD, G), sodass nach Abspaltung des UBQ^{K29RK48R}s durch DUBs X-RIN4₁₁₋₁₅₂:StreptII vorlag. Das verwendete UBQ hat einen Doppelaustausch von K29R und K48R. Diese Mutation wurde verwendet um zu verhindern, dass dieses UBQ selbst weiter im System ubiquitynyliert werden kann und somit das eingebrachte Fusionsprotein so dem Proteasom zuführt.

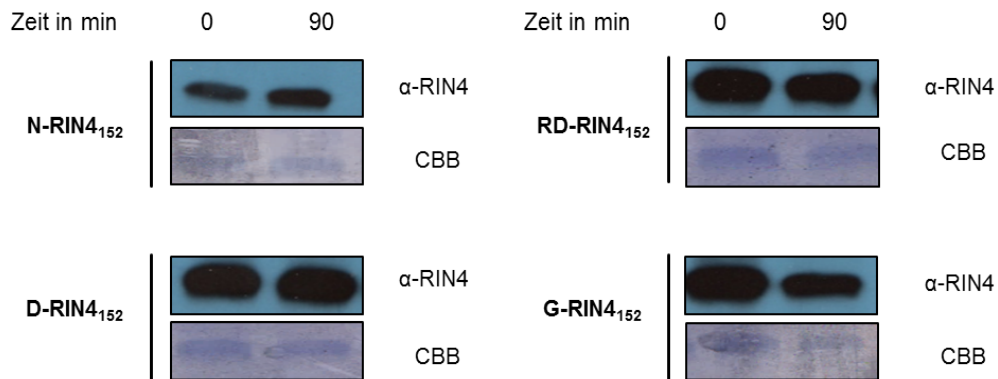


Abbildung 9: Stabilität von X-RIN4₁₁₋₁₅₂ *in vitro*. Dargestellt sind Western Blots von X-RIN4 (X= N, D, R, G) vor (0 min) und nach (90 min) CHX-Behandlung (200 µM). Detektiert wurde mittels α-RIN4-AK (1:200, sc-27369), Pico-ECL, 90 sek. und die Ladekontrolle erfolgte durch Coomassiefärbung (CBB), n = 3.

Die N-Termini N, D und RD von X-RIN4₁₁₋₁₅₂ stellen hier die möglichen Prozessierungsstufen des Proteins im Verlaufe des *N-end rule pathway* dar, wohingegen G keine destabile Aminosäure des N-terminal abhängigen Abbauegtes ist (Giglione et al. 2003). Es und fungiert daher als Negativkontrolle. Es wurde erwartet, sollte RIN4 ein Substrat des *N-end rule* sein, dass die Abundanz von N-, D- und RD-RIN4 90 min nach CHX-Behandlung geringer ist als die des G-RIN4. Zu erkennen ist, dass alle vier Proteinvarianten zu Beginn des Versuches im Lysat in annähernd gleichen Mengen vorhanden sind, wobei die Bande des N-RIN4₁₁₋₁₅₂ schmaler ist als die der anderen Proteinvarianten zum Zeitpunkt 0. 90 min nach CHX-Behandlung und damit Blockierung der Proteinbiosynthese ist zu erkennen, dass N-, D- und RD-RIN4₁₁₋₁₅₂ weiterhin in gleichen Mengen wie vor der Behandlung vorhanden sind. Lediglich die Bande von G-RIN4₁₁₋₁₅₂ ist schmaler geworden, was einen geringen Abbau indiziert (Abbildung 9). Somit zeigen diese Daten dass N-, D- sowie RD-RIN4 im Retikulozytenlysat nicht N-terminal destabilisiert sind.

3.1.2. Stabilität von N-RIN4 in Protoplasten verschiedener *N-end rule pathway*-Mutanten

Das mobile Fragment RIN4₁₁₋₁₅₂ wurde hinsichtlich seiner Stabilität in Mesophyllprotoplasten des Wildtyps Col-0 sowie der *N-end rule*-Mutanten *ate1 ate2* (Kreuzung der beiden T-DNA-Insertionslinien für ATE1 und ATE2, demnach keine Arginylierung von sekundär destabilen AS) und *prt6-1* (T-DNA-Insertionslinie des N-Rekognins, welches N-terminal präsentierte Typ-I Degrons erkennt) untersucht. Es wurde erneut mit Hilfe der UFT sichergestellt, dass das Protein nach der Translation den gewünschten N-Terminus in den Zellen exponiert. Es wurde als UBQ^{K29RK48R}:N-RIN4₁₁₋₁₅₂:StrepII Fusionsproteine exprimiert, sodass im System nach Abspaltung des UBQ^{K29RK48R}s durch die DUBs, N-RIN4₁₁₋₁₅₂:StrepII vorlag. Unter Kontrolle des UBQ10-Promotors wurde dieses Fusionskonstrukt mit C-terminalen YFP in die verschiedenen Genotypen mit mCherry als stabiles Transformationssignal kotransformiert.

Es wurde erwartet, dass N-RIN4 in *ate1 ate2* sowie *prt6-1* stabiler ist, im Vergleich zum Wildtyp.

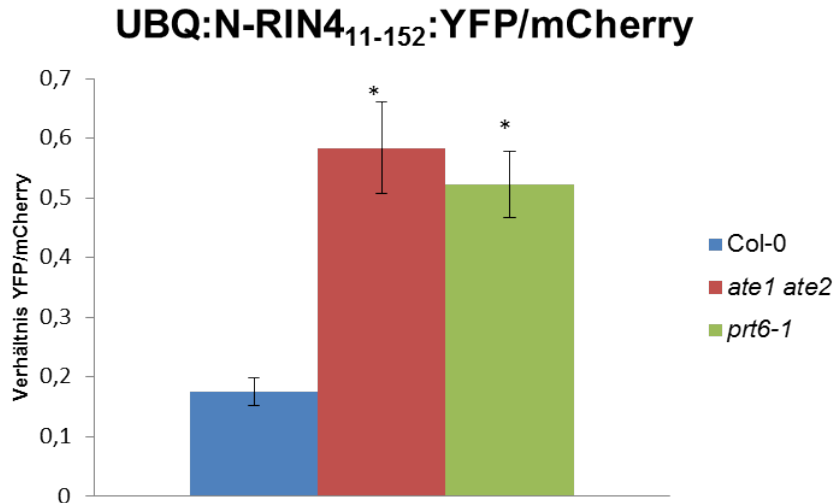


Abbildung 10: Stabilität von N-RIN4₁₁₋₁₅₂ in Protoplasten von *Arabidopsis*. Transformation von UBQ:N-RIN4₁₁₋₁₅₂:StreptII:YFP im Verhältnis zu mCherry. Die Ordinate zeigt das Verhältnis transformierter Protoplasten mit YFP- und mCherry-Signal zu allen mit mCherry transformierten Protoplasten an. Auf der Abszissen sind die für dieses Experiment verwendeten Genotypen Col-0 (blau), *ate1 ate2* (rot), *prt6-1* (grün) aufgezeigt, n = 3, zweiseitiger T-Test, * ≤ 0.01.

Das Säulendiagramm in Abbildung 10 zeigt die Stabilität von N-RIN4₁₁₋₁₅₂ in den Genotypen Col-0, *ate1 ate2* und *prt6-1*. Es wurde dabei das Verhältnis von Protoplasten, welche ein YFP- und ein mCherry-Signal zeigen im Verhältnis zu allen mit mCherry transfizierten Protoplasten ermittelt. Die Signale von mCherry und YFP waren gut im Zytoplasma zu erkennen. Das Protein N-RIN4₁₁₋₁₅₂ mit der tertiär destabilen AS N am N-Terminus ist in den Mutanten des *N-end rule pathways* signifikant stabiler als im Wildtyp. In diesen Pflanzen gibt es dreimal so viele YFP und mCherry kotransformierte Protoplasten wie in Col-0. Die Daten konnten mit Hilfe von Western Blots bestätigt werden (siehe Anhang, Abbildung A2). Die Erwartung, dass N-RIN4 im Wildtyp aufgrund seines N-Terminus destabilisiert ist, im Vergleich zu *ate1 ate2* und *prt6-1*, konnte bestätigt werden.

3.1.3. Interaktion von N-RIN4 und NTAQ1 in vitro

In *Arabidopsis* gibt es zwei putative Deamidasen des *N-end rule pathways* NATQ1 und NTAN1. Hierbei wird postuliert, dass NTAN1 für die Umwandlung von N zu D verantwortlich ist, wohingegen NTAQ1 die Deamidierung von Q zu E katalysieren soll.

RIN4 präsentiert im natürlichen Kontext nach der Spaltung durch AvrRpt2 ein N als neuen N-Terminus, welches im Zuge des *N-end rule* zu D deamidiert werden sollte. Im Zuge der Bachelorarbeit von Frau Anne Kind wurden beide Proteine kloniert und exprimiert sowie

hinsichtlich ihrer Funktionalität in einem *in vitro* Deamidierungsversuch getestet (Wang et al. 2009; Kind 2013). Da nur die NTAQ1 als funktionelles Protein gereinigt werden konnte, wurde eine mögliche Deamidierung von N-RIN4₁₁₋₂₁₁ durch die NTAQ1 getestet, da die genaue Spezifität von NTAQ1 und NTAN1 aus *Arabidopsis* hinsichtlich der Substrate noch nicht genauer untersucht wurde.

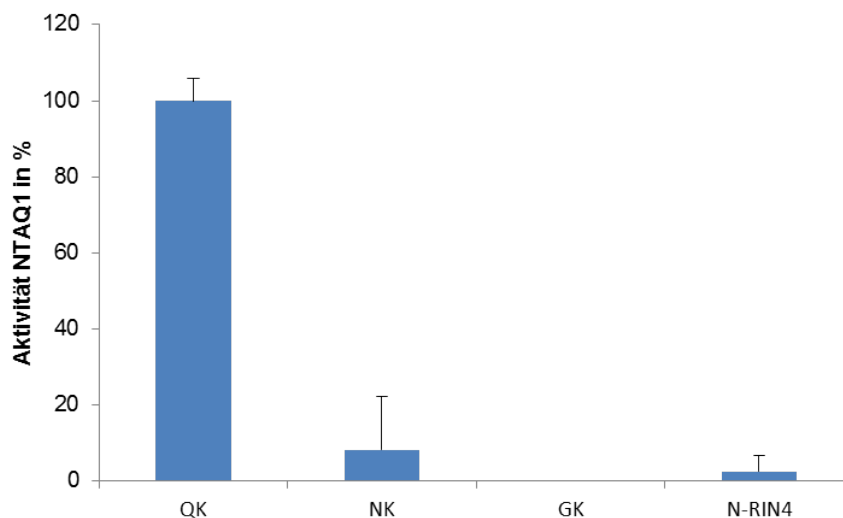


Abbildung 11: Deamidierungsversuch der NTAQ mit den Peptiden XY-GSGAW (XY=QK, NK, GK, auf Abszisse angegeben) und rekombinantem N-RIN4₁₁₋₂₁₁:Strep. Die Ordinate zeigt die Aktivität der rekombinanten NTAQ in % wobei die Deamidierung des Peptides QK-GSGAW auf 100 % gesetzt wurde. Auf der Abszisse sind die eingesetzten Deamidierungssubstrate und deren Umsatz dargestellt, n = 3..

Die Aktivität der NTAQ1 wurde mit dem Peptid QKGSGAW auf 100% festgelegt (Abbildung 11). Zu erkennen ist, dass das Enzym mit dem Peptid NKGSGAW eine Aktivität von rund 10% aufweist, wohingegen bei dem Peptid GKGSGAW keine Enzymaktivität gemessen werden konnte. Das gleiche gilt auch für die Reaktion von N-RIN4₁₁₋₂₁₁ als Substrat der NTAQ1. Demnach scheint die NTAQ1 spezifisch Q zu E umzusetzen, jedoch N und damit N-RIN4₁₁₋₂₁₁ nicht als Substrat zu erkennen. Daher kann keine Deamidierung gemessen werden.

3.1.4. *In vitro* Arginylierung von X-RIN4

Der nächste Schritt nach der Deamidierung von N-RIN4 zu D-RIN4 wäre die N-terminale Arginylierung zu RD-RIN4 (Abbildung 4). In einem *in vitro* Arginylierungsversuch mit ¹⁴C-markiertem Arginin durch die rekombinant gereinigten ATEs wurde dies anhand des rekombinant exprimierten D-RIN4 und G-RIN4 überprüft (Wang et al. 2011). Erwartet wurde eine Arginylierung von D- jedoch nicht für G-RIN4₁₁₋₂₁₁ durch mindestens eine der beiden verwendeten ATEs.

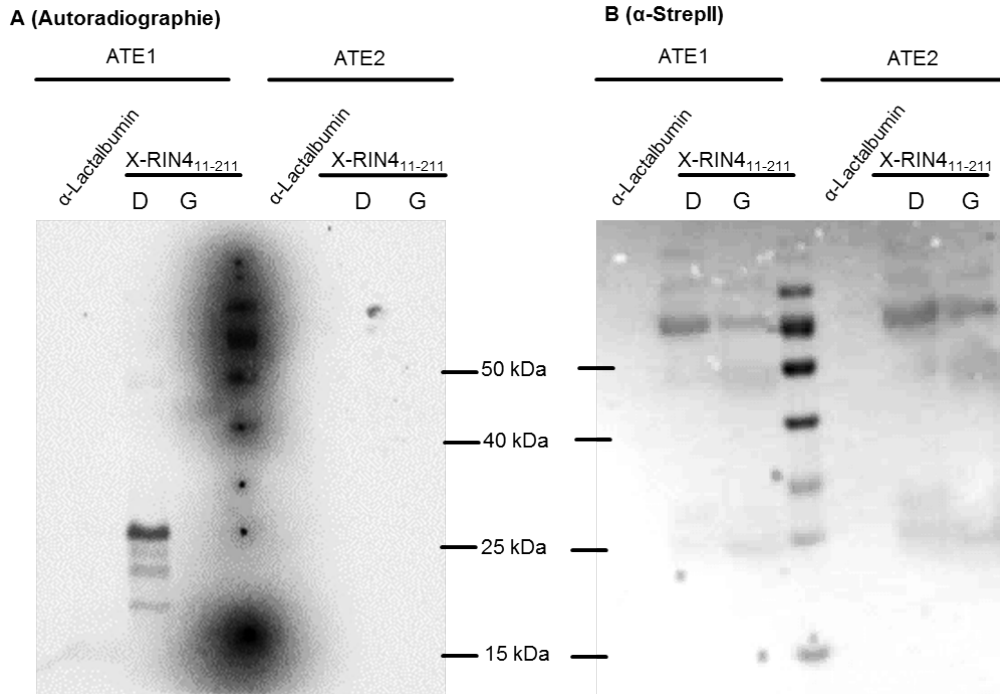


Abbildung 12: N-terminal abhängige Arginylierung von X-RIN4 (X = D, G). Die Detektion des ^{14}C -markierten Proteins erfolgte mittels Autoradiographie (A) und WB (B). α -Lactalbumin wurde als Positivkontrolle verwendet, Anti-Strep-HRP-AK, 1:3000, Pico-Detektion, Belichtung 30 sek, n = 3.

Als Positivkontrolle und zur Funktionsüberprüfung der ATEs wurde α -Lactalbumin (12 kDa) (Abbildung 12) verwendet, da die Arginylierung durch die Maus-ATE1 bereits gezeigt werden konnte (Wang et al. 2011). Es ist ^{14}C -markiertes Protein nach der Reaktion mit ATE1 aber nicht nach der Reaktion mit ATE2 detektierbar. Dies zeigt, dass die eingesetzte ATE2 wahrscheinlich nicht funktionell ist. Nach der Reaktion von D-RIN4₁₁₋₂₁₁ mit ATE1 ist in der Autoradiographie eine Bande bei 25 kDa zu erkennen (Abbildung 12). Hierbei handelt es sich um ^{14}C -markiertes Protein, welches eindeutig als RIN4 durch die Detektion mittels Strep-AK identifiziert werden konnte. Keine Arginylierung ist bei der Reaktion von X-RIN4₁₁₋₂₁₁ mit der ATE2 sowie G-RIN4₁₁₋₂₁₁ mit der ATE1 zu detektieren. Somit kann gesagt werden, dass RIN4 N-terminal spezifisch durch die ATE1 *in vitro* arginyliert werden kann.

3.2. Identifizierung neuer potentieller N-end rule Substrate mittels vergleichender Proteomik

3.2.1. Vergleichende Proteomik mittels 2-Dimensionaler Gelelektrophorese (DIGE)

Zum Vergleich der Proteome von Col-0, *prt6-3*, *prt1-1* und *ate1 ate2* wurde die DIGE-Technik, unter Verwendung zweier unterschiedlicher Fällungsprotokolle angewendet (Unlü et al. 1997; Lilley und Friedman 2004). Pflanzenmaterial jedes Genotyps wurde dreimal unabhängig aufgearbeitet, das Proteom gefällt und auf einem 2D-Gel nach Ladung und

Masse aufgetrennt. Die verschiedenen Fällungsprotokolle wurden hierbei getrennt voneinander behandelt. Die 12 einzelnen Fluoreszenzscans der 12 Gele eines Fällungsprotokolls (je Gel 2 verschiedene Genotypen, je Genotyp drei Replikate) wurden anhand des internen Standards zu einem Fusionsgel zusammengelegt (Abbildung 13 und Abbildung 14) und es erfolgte anschließend die Detektion hochregulierter Proteine in den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp mittels Software. Die identifizierten Proteinspots wurden dann von einem präparativen 2D-Gel gepickt und zur Identifizierung mittels Massenspektrometrie von Frau Petra Majovski analysiert. Die Zuordnung der erhaltenen Daten erfolgte anhand der gefundenen Peptidsequenz und der Lokalisation des Proteins entsprechend seines Molekulargewichtes im 2D-Gel.

3.2.1.1. Proteomanalyse nach TCA-Fällung

Insgesamt wurden über 1900 Proteine auf dem Gel identifiziert, welche in Abbildung 13 als dünn-umrandete Spots markiert sind. Hierbei wurden Proteine, deren Abundanz im Verhältnis zum Wildtyp 1,5 (persönliche Festlegung) mal und höher ist, als hochreguliert angesehen. Die Varianz der Proteinabundanz beträgt weniger als 10%. Es konnten 54 Proteine als höher abundant identifiziert und 46 davon aus dem Gel isoliert werden (Abbildung 13, Tabelle A7). Die genaue Zuordnung zum Genotypen, die Spot-Nummer auf dem Fusionsgel, die Menge gefundener Peptidfragmente in der Massenspektrometrie sowie die Identität nach Massenspektrometrie der Proteine sind in Tabelle A7 im Anhang zu finden. Das Fusionsbild in Abbildung 13 zeigt, dass 37 Proteine oberhalb der 55 kDa der großen Untereinheit der RuBisCO lokalisiert sind und nur 17 im niedriger molekularen Bereich (blaue Markierung).

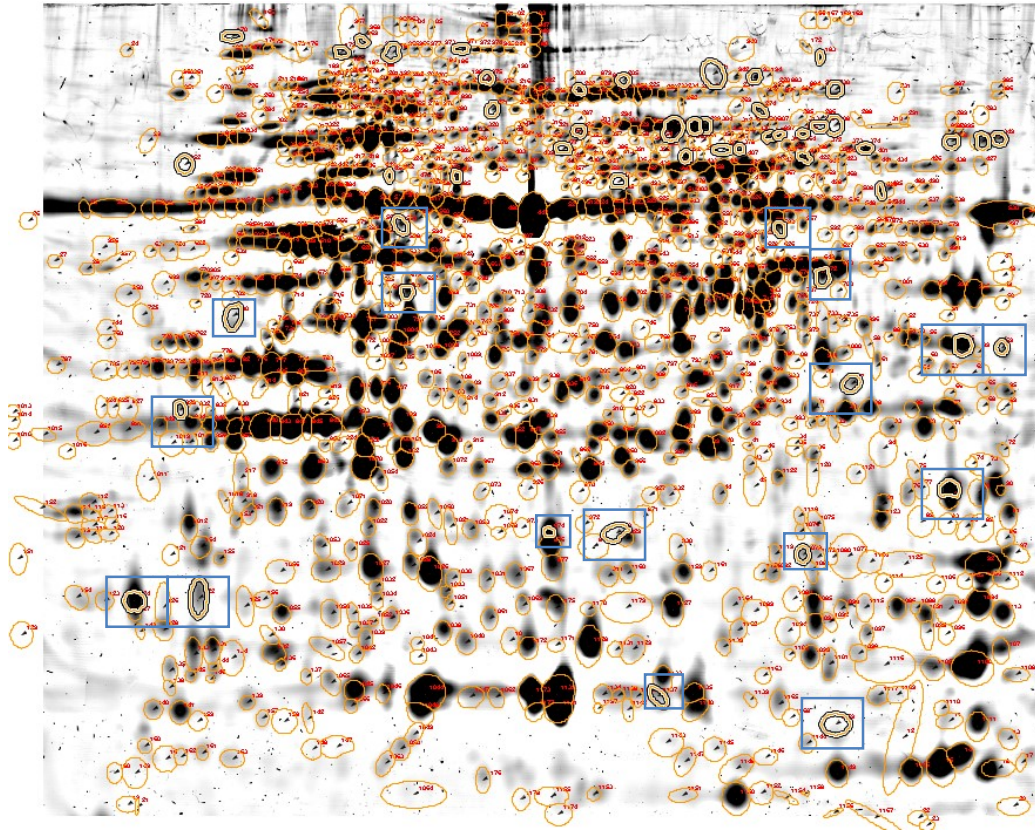


Abbildung 13: Fusioniertes Gelbild aller DIGE-Gele nach TCA-Fällung. Alle Proteinspots sind nummeriert und mit einer dünnen Linie umrandet, hochregulierte Proteine in den Mutanten im Verhältnis zum WT hochreguliert sind dick umrandet. Blau hervorgehoben sind Proteine mit einem MW unterhalb von 55 kDa. Die verwendete Software ist Delta2D, Varianz innerhalb der Proteinabundanz $\leq 10\%$.

3.2.1.2. Proteomanalyse nach TCA-freier Proteinfällung

Insgesamt wurden über 1900 Einzelproteine identifiziert, welche auf der Abbildung 14 als umrandete Spots dargestellt sind. Als hochreguliert wurden im TCA-freien Fällungsprotokoll Proteine definiert, deren Auftreten mindestens das Doppelte in der Mutante im Verhältnis zu Col-0 beträgt. Im Falle von *ate1 ate 2* wurden Proteine deren Abundanz 1,5 im Verhältnis zum Wildtyp betrug als hochreguliert angesehen, da nur 2 Proteine doppelt so hoch abundant waren. Alle 29 identifizierten Proteine in Abbildung 14 konnten aus dem Gel isoliert werden. Eine Auflistung aller hochregulierten Proteine der TCA-freien Fällung ist in Tabelle A6 im Anhang gezeigt. Ebenso wie die genaue Zuordnung zum Genotypen, die Spot-Nummer auf dem Fusionsgel, die Menge gefundener Peptidfragmente in der Massenspektrometrie sowie die Identität nach Massenspektrometrie der Proteine in dieser Tabelle zu finden sind. Die Gesamtheit aller hochregulierten Proteine in Abbildung 14 verteilt sich im gesamten Gel. Nach der TCA-freien Fällung sind zehn der hochregulierten Proteine größer als die große Untereinheit der RuBisCO und 19 sind im niedrigmolekularen Bereich angesiedelt (blaue Markierung).

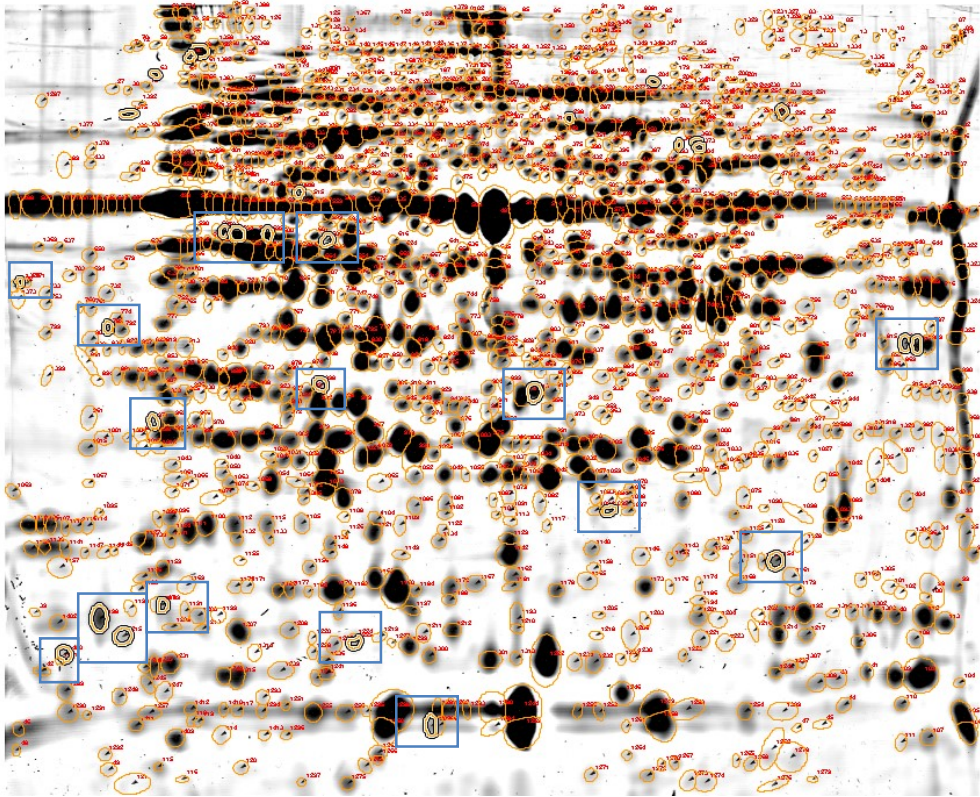


Abbildung 14: Fusioniertes Gelbild aller DIGE-Gele der TCA-freien Fällung. Alle Proteinspots sind nummeriert und mit einer dünnen Linie umrandet, hochregulierte Proteine sind in den Mutanten im Verhältnis zum WT sind dick umrandet. Blau hervorgehoben sind Proteine mit einem MW unterhalb von 55 kDa. Die verwendete Software ist Delta2D. Varianz innerhalb der Proteinabundanz $\leq 10\%$.

3.2.2. Vergleichende Proteomik mittels Shotgun-Analyse

Mittels Shotgun sollten ebenfalls die Proteome von Col-0, *prt6-3*, *prt1-1* und *ate1 ate2* verglichen werden. Abbildung 15 zeigt ein Venn-Diagramm der hochregulierten Proteine im Shotgun. Insgesamt sind in allen drei Genotypen 460 Proteine hochreguliert. In *prt1-1* sind 252 individuelle Proteine hochreguliert, 35 Proteinen sind in *prt1-1* und *ate1 ate2* hochreguliert und es können 11 Proteine identifiziert werden, welche in *prt6-3* und *prt1-1* gleichmaßen erhöht vorliegen. In *ate1 ate2* sind 64 Einzelproteine erhöht und es gibt weitere 13 Proteine welche auch in *prt6-3* erhöht vorliegen. In *prt6-3* sind 51 Einzelproteine erhöht im Verhältnis zu Col-0. In allen drei Genotypen gibt es insgesamt 34 gemeinsam hochregulierte Proteine.

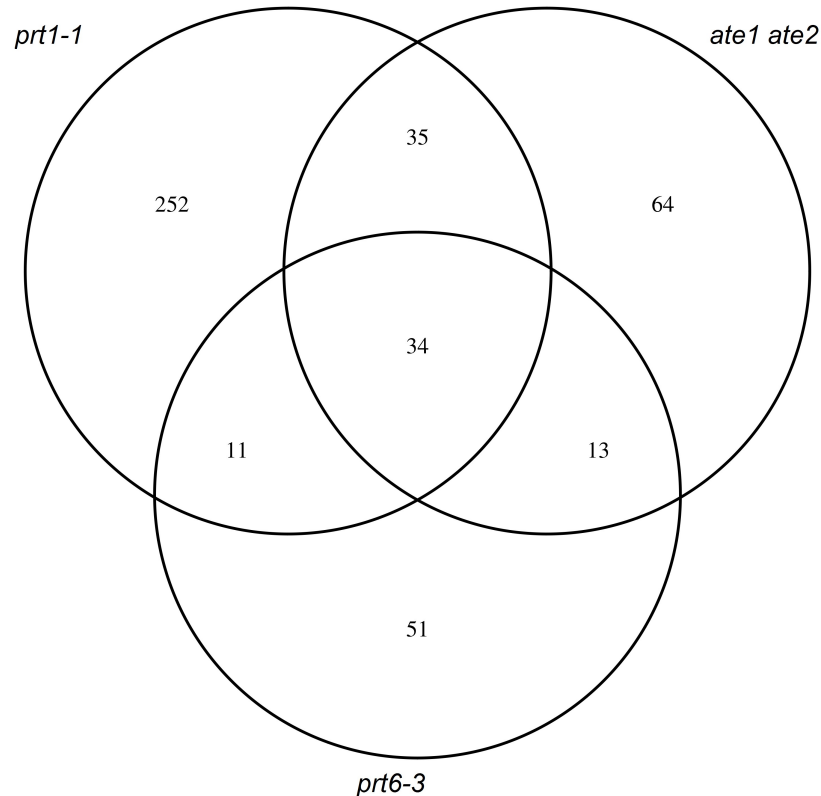


Abbildung 15: Unterschiede in der Proteinzusammensetzung der hochregulierten Proteine in den Mutanten des *N-end rule pathways* im Vergleich zum Wildtyp. Das dreifach Venn-Diagramm spiegelt den Schnitt an Proteinen in den verschiedenen verwendeten Genotypen wider. Die Anzahl an Proteinen stammt aus der Summe der biologischen Replikate sowie der zwei Messungen pro Replikat. Als hochreguliert wurden alle Proteine gewertet welche mindestens zweifach erhöht im Vergleich zum WT waren, bei einem p-Wert $\leq 0,05$.

3.2.3. Vergleich der Proteomikdaten von DIGE und Shotgun

Durch eine vergleichende Analyse der Ergebnisse aus Shotgun und 2DIGE sollten Proteine identifiziert werden, welche valide als hochregulierte Proteine angesehen werden konnten und somit potentielle *N-end rule pathway*-Substrate darstellen. Hierzu wurden die Rohdaten des Shotgun (497 hochregulierte Proteine) und DIGE (248 und 156 hochregulierte Proteine) miteinander verglichen. Proteine, welche in beiden experimentellen Ansätzen als hochreguliert erschienen sind wurden dahingehend überprüft, ob ihr molekulares Gewicht ihrer Position auf dem 2D-Gel entspricht. Anschließend wurden diese Proteine hinsichtlich einer Proteaseschnittstelle oder eines möglichen Transitsignals näher untersucht. Hierzu wurde die Online-Datenbank Uniprot (www.uniprot.org) verwendet. In Tabelle A8 im Anhang sind die Ergebnisse aufgelistet. Ein Jahr nach Erstellung dieser Liste wurde eine Kooperation mit Frau Saskia Venne und Herrn Dr. Réne Zahedi am ISAS in Dortmund geschlossen. In dieser Zusammenarbeit wurden Proteomproben von Col-0, *prt1-1*, *ate1 ate2* und *prt6-3* mit der dort entwickelten ChaFRADIC-Methode (Venne et al. 2013; Venne et al. 2015) untersucht. Hierbei handelt es sich um die gezielte Anreicherung von Proteinen entsprechend ihres N-Terminus. Die Proteine RD21a und TGG2, welche bereits im Shotgun

und DIGE als hochreguliert identifiziert wurden, konnten ebenfalls mit dieser Methode gefunden und ihr N-Terminus validiert werden (Abbildung A14, Anhang).

3.3. Proteinstabilität von ausgewählten potentiellen *N-end rule pathway* Substraten *in vitro*

Nach Analyse der Daten aus Tabelle A (Abbildung A14 im Anhang) und der Validierung der N-Termini wurden TGG2 (AT5G25980) und RD21a (AT1G47128) als Kandidaten zur näheren Analyse hinsichtlich ihrer Stabilität in Abhängigkeit des N-Terminus ausgewählt. TGG2 zeigt ein Lysin als neuen N-Terminus (Ueda et al. 2006), welches eine primär destabilisierende AS im *N-end rule pathway* darstellt. Nach der Erkennung und Ubiquitinylierung durch PRT6 sollte es dem 26S-Proteasom zugeführt werden. RD21a hingegen exponiert ein D und somit einen sekundär destabilisierenden N-Terminus. Im Folgenden ist die Charakterisierung beider Proteine hinsichtlich ihrer Identität als potentielle *N-end rule pathway*-Substrate gezeigt.

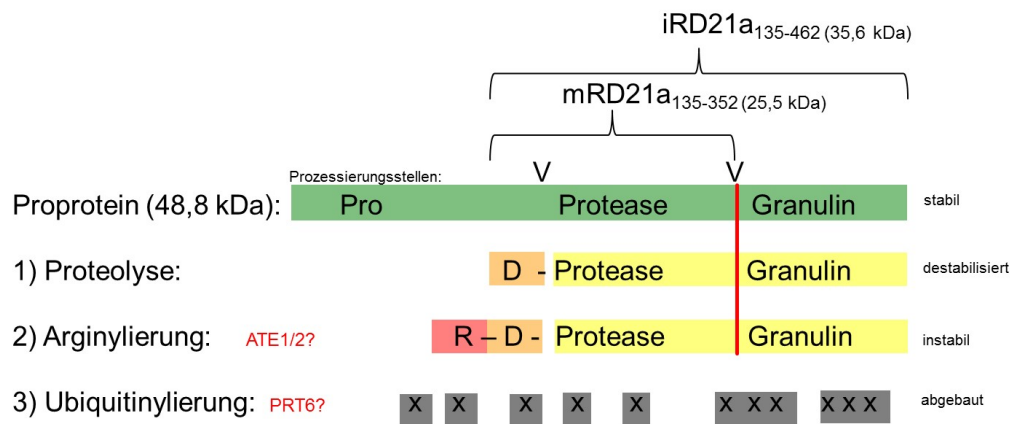


Abbildung 16: Schematische Darstellung von RD21a in den Prozessierungsschritten des *N-end rule pathway*s. Die angegebenen MW entsprechen den theoretisch errechneten MW (Gu et al. 2012). Das Propeptid von RD21a (grün) wird durch bisher unbekannte Protease nach der Translokation in die Vakuole N-terminal prozessiert (1) und präsentiert dann ein D als N-Terminus. Das unreife iRD21a (AS 135-462, MW [experimentell] ca 40 kDa) besitzt C-terminal eine Granulin-ähnliche Domäne (Granulin) welche im reifen mRD21a (AS135-352, MW [experimentell] ca 35 kDa) fehlt. Sobald iRD21a bzw. mRD21a in das Zytoplasma freigesetzt werden, könnte der N-Terminus durch ATE arginyliert (2) und anschließend durch PRT6 (3) ubiquitinyliert und das Protein so dem 26S-Proteasom zum Abbau zugeführt werden.

RD21a wird als Propeptid translatiert und zeigt nach dem Transport in die Vakuole durch die Abspaltung der Signalsequenz die sekundär destabilisierende AS D als neuen N-Terminus. Das Protein ist in der Vakuole hauptsächlich als iRD21a mit einer C-terminalen Granulin-ähnlichen Domäne vorhanden (Yamada et al. 2001; Gu et al. 2012). Eine Abspaltung dieser Domäne führt zum reifen mRD21a. Sobald dieses Protein im Zytoplasma präsent ist, würde nach einer Arginylierung durch eine Arginyltransferase ATE1/2 am präsentierten N-Terminus, RD21a von PRT6 als Substrat erkannt und dem 26S-Proteasom zum Abbau zugeführt werden.

TGG2 ist ebenfalls in der Vakuole lokalisiert (Agee et al. 2010b) und präsentiert dort nach Abspaltung der Signalsequenz (AS 1-28) ein K als neuen N-Terminus (siehe Tabelle A8 im Anhang). Dieses ist eine primär destabilisierende AS im *N-end rule pathway* und das Protein könnte nach seiner Freisetzung in das Zytosol direkt von PRT6 erkannt, ubiquitinyliert und durch das 26S-Proteasom abgebaut werden.

3.3.1. Proteinstabilität von TGG2 im zellfreien System

Mit Hilfe der UFT wurden K29-TGG2-StrepII und G29-TGG2-StrepII im Kaninchenreticulozytenlysat exprimiert und ihre Abundanz 90 min nach CHX-Behandlung auf dem Western Blot verfolgt. Erwartet wurde, sollte TGG2 ein Substrat des *N-end rule* darstellen, dass K29-TGG2 durch die CHX-bedingte Inhibierung der Proteinbiosynthese destabilisiert im Vergleich zu G29-TGG2 ist. Auch hier wurde das UBQ^{K29RK48R} aus dem bereits beschriebenen Grund verwendet.

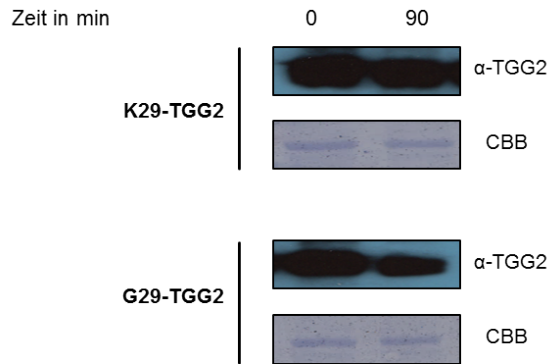


Abbildung 17: Stabilität von TGG2 *in vitro*. Dargestellt sind die Western Blots von X-TGG2 (X= K, G) vor (0) und nach (90 min) CHX-Behandlung (200µM). Detektiert wurde mittels α-TGG2-AK (1:5000), Detektion mittels Pico-ECL 30 sek. Die Ladekontrolle erfolgte durch Coomassiefärbung (CBB), n = 3.

K29-TGG2 spiegelt den N-Terminus nach Abspaltung der Signalsequenz wider, G hingegen ist keine destabilisierende AS im *N-end rule* und G29-TGG2 sollte somit über die Zeit stabil bleiben. Beide Proteine sind zum Zeitpunkt 0 in gleichen Mengen vorhanden. Es ist keine Veränderung der Bandenstärke 90 min nach CHX-Behandlung bei K-TGG2 zu erkennen. Die Bandenintensität von G-TGG2 scheint in geringem Maße weniger zu sein (Abbildung 17). K-TGG2 scheint nicht destabilisiert zu sein, was seine Identität als potentielles *N-end rule*-Substrat in Frage stellt.

3.3.2. Proteinstabilität von RD21a im zellfreien Kaninchenreticulozytenlysat

Die Stabilität von RD21a sollte ebenfalls sowohl in der unreifen (iRD21a) als auch in der reifen (mRD21a) Version überprüft werden. Dies geschah analog zu 3.3.1. Hierbei wird mit Hilfe der UFT UBQ^{K29R/K48R}:X-i/mRD21a (X= D, RD, G) exprimiert und die Abundanz 90 min nach Inhibierung der Proteinbiosynthese durch CHX mittels Western Blot überprüft. Erwartet

wurde, dass die Varianten von RD21 mit destabilisierenden N-Termini (X = D, RD) über das 26S-Proteasom abgebaut werden, wohingegen die Variante mit G als N-Terminus als Negativkontrolle stabil bleiben sollte.

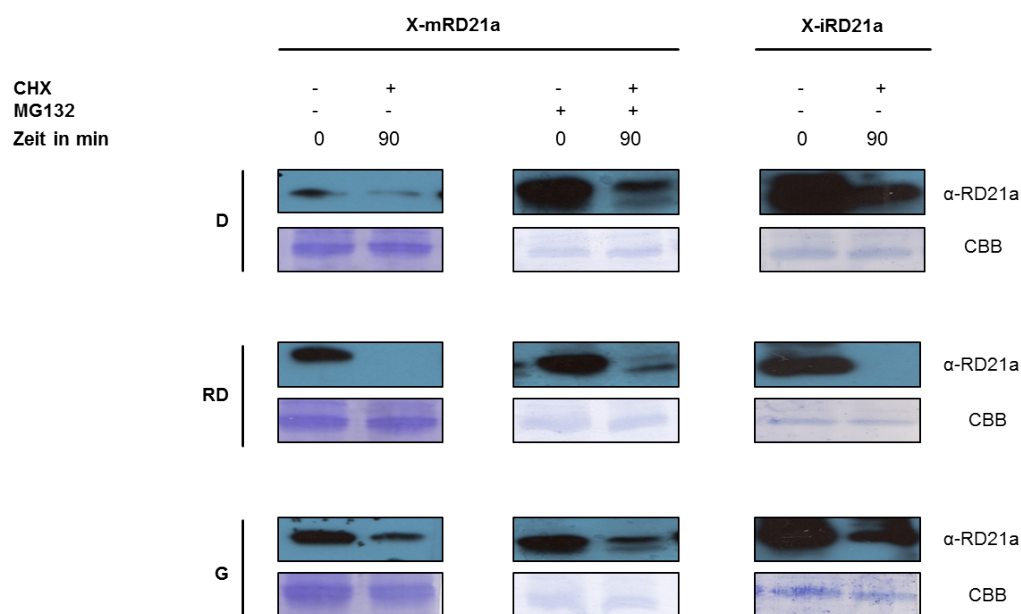


Abbildung 18: Stabilität von X-mRD21a und X-iRD21a *in vitro* mit und ohne Proteasominhibitor MG132 (200 μ M). Dargestellt sind Western Blots von X-i/mRD21a (X= D, RD, G) vor (0 min) und nach (90 min) CHX-Behandlung (200 μ M). Detektiert wurde mittels α -RD21a-AK (1:1000), Detektion 90 sek mittels Pico-ECL, Ladekontrolle erfolgte durch Coomassiefärbung (CBB), n = 3 für alle gezeigten Ansätze.

Alle Proteine sind zum Zeitpunkt 0 in vergleichbaren Mengen vorhanden. Die Banden für D-mRD21a und RD-mRD2a sind nach der CHX-Behandlung nahezu verschwunden. Bei D-mRD21a ist noch eine sehr schwache Bande zu erkennen. Die Proteinbande für G-mRD21a ist 90 min nach der Blockierung der Proteinbiosynthese schwächer ausgeprägt als vor der Behandlung. Bei Addition des Proteasominhibitors MG132 ist zu erkennen, dass sowohl D- als auch R-mRD21a stabilisiert werden, wohingegen es bei G-mRD21a keine Veränderung in der Bandenstärke im Vergleich zur Behandlung ohne MG132 gibt (Abbildung 18). Die Proteine X-iRD21a (X = D, RD, G) sind zum Zeitpunkt 0 in größeren Mengen vorhanden als X-mRD21a. 90 min nach Blockierung der Proteinbiosynthese durch CHX ist jedoch ebenfalls eine starke Abnahme der Bande für D-iRD21a zu erkennen. RD-iRD21a ist wie RD-mRD21a verschwunden, wohingegen nur eine leichte Abnahme der Bandenintensität für G-iRD21a zu beobachten ist (Abbildung 18). Somit kann gesagt werden, dass sowohl iRD21a als auch mRD21a *in vitro* entsprechend des *N-end rule pathways* N-terminal abhängig destabilisiert sind.

3.3.3. Interaktion von RD21a und ATE1 *in vitro* und *in vivo*

Nachdem ein Abbau von X-iRD21a sowie X-mRD21a im Kaninchenretikulozytenextrakt beobachtet werden konnte, sollte nun die Prozessierung von RD21a als *N-end rule pathway*-

Substrat biochemisch verfolgt werden. Hierbei ist der erste Schritt die Arginylierung von D-m/iRD21a zu RD-m/iRD21a durch eine oder beide Arginyltransferasen ATE1/2 (Abbildung 16).

3.3.3.1. Interaktion von rekombinanter ATE1 mit endogenem RD21a

Zur Überprüfung der Hypothese, ob endogenes RD21a mit ATE interagieren kann, wurde ein *in vitro* Versuch etabliert, in welchem ATE1 und ATE2 als N-terminales His-MBP-Fusionsprotein (mit einer TEV-Spaltungsstelle nach dem MBP-Tag) an Amylose-Harz gekoppelt und mit Pflanzenextrakt aus *ate1 ate2*-Mutanten (siehe Material und Methoden 2.3.13) inkubiert wurde. Zur Überprüfung auf endogenes RD21a wurde die Elutionsfraktion auf zwei getrennte Gele aufgetragen und diese zum Einen mit His-AK (Detektion des Fusionsproteins) und zum Anderen mit RD21a-AK (Detektion RD21a) untersucht. Eine schematische Übersicht des Experiments ist im Anhang gezeigt (Abbildung A1).

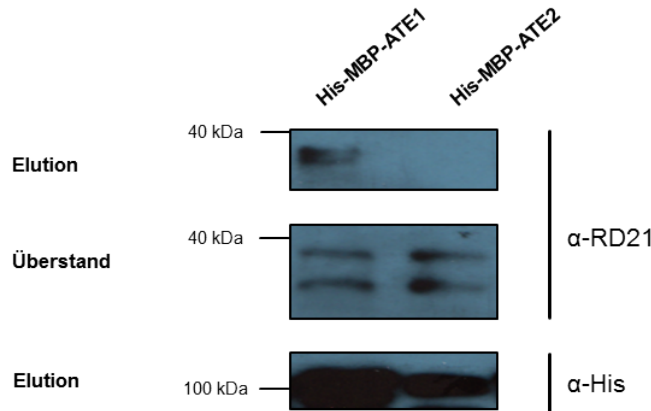


Abbildung 19: Interaktion von rekombinanter His-MBP-tev-ATE1 und His-MBP-tev-ATE2 mit endogenem RD21a. Zu sehen sind die Western Blots nach Kopplung von rekombinant exprimierter ATE1/2 an Amylose-Harz und nachfolgender Inkubation mit Pflanzenextrakt. Detektiert wurde mit α -RD21a-AK (1:1000) sowie α -His-AK (1:3000), Pico-ECL, 30 sek, n = 3. Die erste Spalte entspricht den Proben der ATE1-Säule, die Zweite Spalte entspricht den Proben der ATE2-Säule. Erste und dritte Reihe: Eluat, zweite Reihe ungebundene Überstand Pflanzenextrakt (ungebundenes Protein).

Mit dem Antikörper gegen RD21a kann in der Elutionsfraktion der ATE1-Säule ein Signal knapp unterhalb der 40 kDa Markerbande detektiert werden. Dieses fehlt im Eluat der ATE2-Säule. Im Überstand nach der Inkubation kann mit dem RD21a-AK eine Doppelbande in beiden Experimenten (ATE1/ATE2) wahrgenommen werden. Die obere Bande entspricht der Höhe des Signals im ATE1 Eluat mit dem gleichen Antikörper, die Bande darunter ist ca. 10 kDa kleiner. Hierbei handelt es sich um die endogenen mRD21a- und iRD21a-Proteine. Der Western Blot der Elutionsfraktion mit dem His-AK zeigt ein starkes Signal auf Höhe der 100 kDa Bande, welches zeigt, dass das Säulenmaterial mit rekombinantem His-getaggt Protein beladen ist (Abbildung 19). Mit diesem Experiment kann gezeigt werden, dass endogenes iRD21a mit der ATE1, jedoch nicht mit der ATE2 interagieren kann. Die Identität

von ATE1/2 wurde mittels MS-Analysen überprüft und Darstellungen der identifizierten Peptide sind in Abbildung A3 und Abbildung A4 im Anhang gezeigt.

3.3.3.2. In vitro Arginylierung von mRD21a durch ATE1

Nachdem eine Interaktion mit rekombinanter ATE1 und endogenem RD21a gezeigt werden konnte, sollte in einem *in vitro* Arginylierungsversuch die Reaktion zwischen ATE1 und rekombinatem X-mRD21a:HA (X = D, RD, G) untersucht werden (Wang et al. 2011).

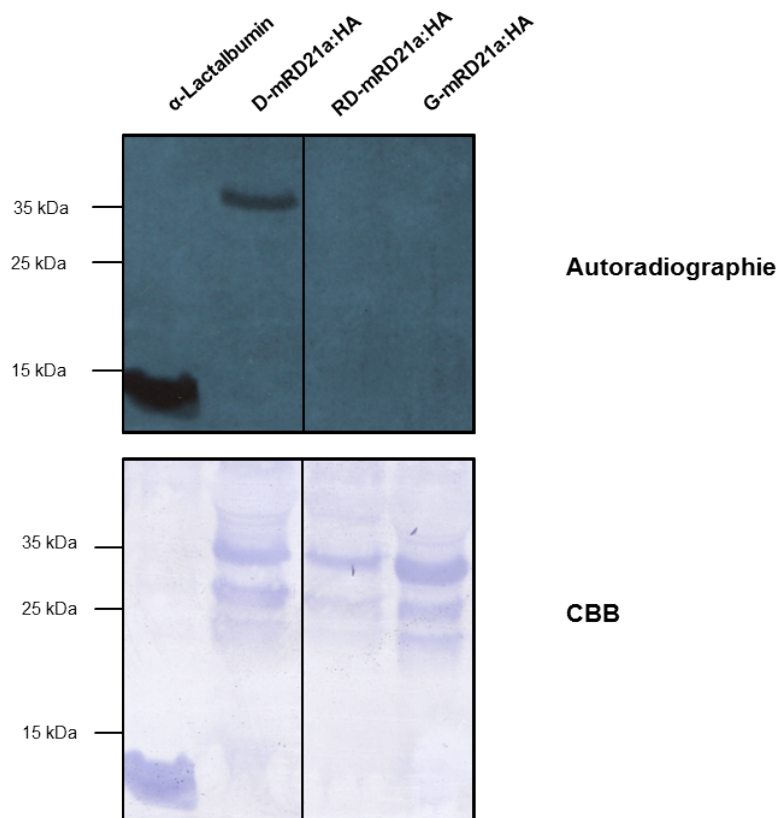


Abbildung 20: Arginylierung von rekombinatem mRD21a mit ^{14}C -markiertem L-Arginin durch ATE1. Dargestellt sind das Autoradiogramm der Arginylierung von α -Lactalbumin und X-mRD21a-HA (X = D, RD, G) durch die ATE1 mittels ^{14}C -markiertem L-Arginin. Gezeigt ist das Autoradiogramm, die Ladekontrolle erfolgte mittels Coomassiefärbung (CBB), n = 3. Zur besseren Auflösung wurde zwischen D-mRD21a und RD-mRD21a eine Spur freigelassen, welche in der Darstellung entfernt wurde.

Das 12 kDa große α -Lactalbumin ist als Substrat der ATE1 aus der Maus bekannt (Wang et al. 2011) und wurde als Positivkontrolle verwendet. Man erkennt eine Bande in der Autoradiographie knapp unterhalb der 15 kDa Markerbande für diese Kontrollreaktion. Dies bedeutet, dass ^{14}C -markiertes Arginin auf α -Lactalbumin durch die ATE1 übertragen wurde. Die Ladekontrolle mittels CBB zeigt die Bande für das Protein knapp unterhalb der 15 kDa Markerbande. Die Proteinvarianten von X-mRD21a:HA (X = D, RD, G) sind in dieser Reihenfolge in den folgenden Spuren aufgetragen. Klar zu erkennen ist eine Bande bei ca. 35 kDa für D-mRD21a:HA, wohingegen die Spuren von RD-mRD21a:HA und G-

mRD21a:HA leer sind. Alle Proteinvarianten sind jedoch auf der CBB-Färbung auf Höhe der 35 kDa Markerbande klar zu erkennen (Abbildung 20). Dieses Experiment zeigt, dass D-mRD21a nicht nur mit der ATE1 interagiert, sondern dass die ATE1 N-terminal spezifisch D-mRD21a *in vitro* arginyliert.

3.3.3.3. Interaktion von ATE1 und RD21a *in vivo* mittels Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation

Zur Überprüfung der Interaktion von RD21a mit den Arginyltransferasen ATE1 und ATE2 *in vivo* wurde die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (Split-YFP) in Mesophyllprotoplasten von Col-0 angewendet (Bracha-Drori et al. 2004). Dabei werden die Zielproteine jeweils mit dem N- bzw. C-Terminus (n/cYFP) des YFP fusioniert und in die Protoplasten eingebracht. Wenn die Proteine miteinander interagieren kommen die beiden YFP-Hälften in räumliche Nähe zueinander und bilden ein intaktes YFP, welches bei einer Anregungswellenlänge von 514 nm Licht bei 532 nm emittiert. Zur Gewährleistung, dass der präsentierte N-Terminus im Zytosol dem gewünschten entspricht, wurden alle Varianten des zu untersuchenden Zielproteins (m/iRD21a) als UFT-Fusionsproteine wie bereits beschrieben, exprimiert. Erneut wurde UBQ^{K29RK48R} verwendet, sodass das N-terminal fusionierte UBQ das zu untersuchende Protein nicht durch mögliche Polyubiquitinierung dem Proteasom zum Abbau zuführt.

ATE1:cYFP + UBQ^{K29R/K48R}:X-m/iRD21a:nYFP

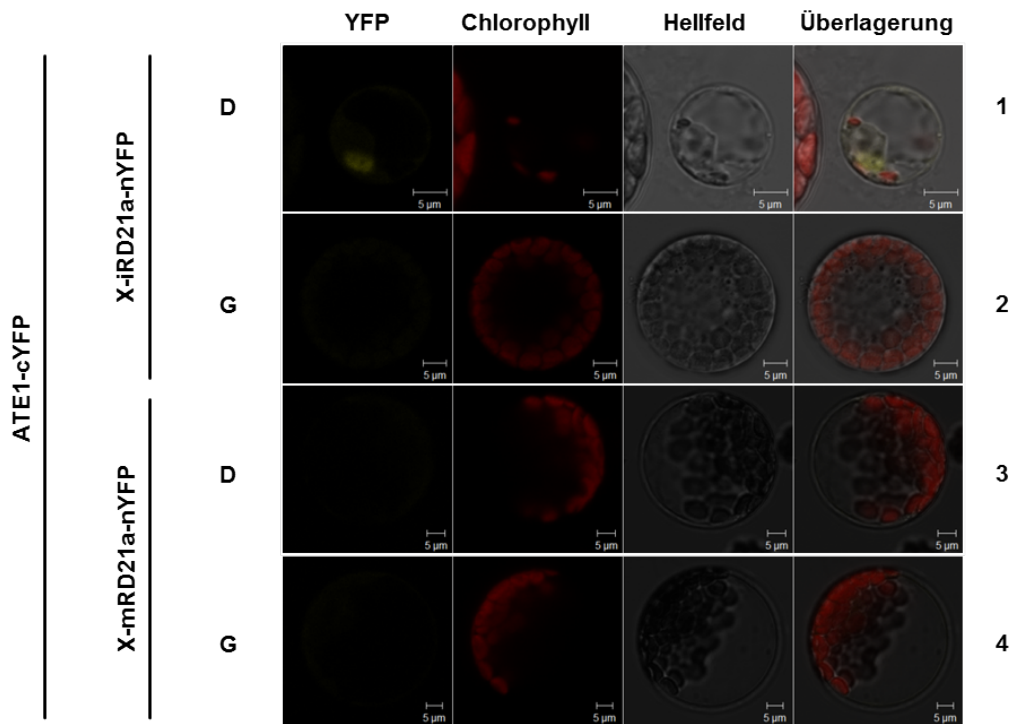


Abbildung 21: Interaktion von ATE1 und X-i/mRD21a *in vivo* mittels Split-YFP. Col-0 Protoplasten transformiert mit pUBC::ATE1:cYFP und pUBC::UBQ^{K29R/K48R}:X-i/mRD21a:nYFP (X = D, G). Betrachtet wurden der YFP-Kanal bei 518-562 nm, der Chlorophyll-Kanal bei 651-677 nm sowie das Hellfeld, Maßstab = 5 µm, n = 3.

Die Überprüfung der Interaktion *in vivo* zwischen der ATE1 und X-i/mRD21 (X = D, G) ergab folgendes Bild: Ein Protoplast transformiert mit ATE1:cYFP und D-iRD21a:nYFP zeigt ein eindeutiges YFP-Signal im Zytoplasma, welches sich von der Autofluoreszenz des Chlorophylls abgrenzt (Abbildung 21). Die Zeile darunter zeigt exemplarisch einen Protoplasten der Ko-Transformation von ATE1:cYFP und G-iRD21a:nYFP. Hierbei ist die präsentierte N-terminale AS von RD21a nach kotranslationaler Abspaltung des UBQs durch deubiquitylierende Enzyme (DUBs) ein G. Es ist kein Signal im YFP-Kanal zu erkennen, trotzdem sind die Chloroplasten gut erkennbar.

In der dritten Zeile von Abbildung 21 ist der gezeigte Protoplast mit ATE1:cYFP und D-mRD21a:nYFP transformiert worden. Auch hier wird als N-Terminus des mit n-YFP fusionierten RD21a D präsentiert. Es kann kein YFP-Signal detektiert werden, jedoch ist hier die Autofluoreszenz der Chloroplasten gut zu erkennen. In der letzten Zeile ist die Transformation von ATE1:cYFP und G-mRD21a:nYFP gezeigt. Das Erscheinungsbild der vier verschiedenen Kanäle entspricht dem der zweiten Zeile der Abbildung. Der Unterschied der beiden RD21a-Proteine ist hierbei das Fehlen der C-terminalen Granulin-ähnlichen Domäne des Konstruktes in Zeile 2. Erneut kann man kein Signal für YFP detektieren. Es

konnte somit nur eine Interaktion zwischen der ATE1 und D-iRD21a mittels Split-YFP detektiert werden.

ATE2:cYFP + UBQ^{K29R/K48R}:X-m/iRD21a:nYFP

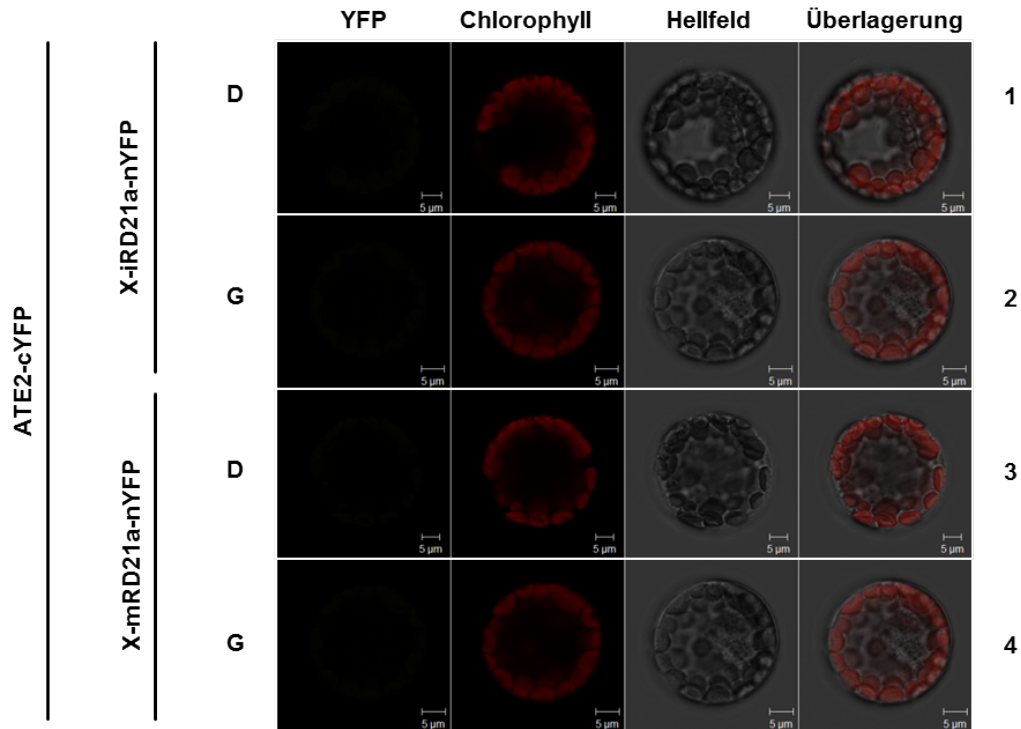


Abbildung 22: Interaktion von ATE2 und X-i/mRD21a *in vivo* mittels Split-YFP. Col-0 Protoplasten transformiert mit pUC::ATE2:HA:cYFP und pUC::UBQ^{K29R/K48R}:X-i/mRD21a:HA:nYFP (X = D, G). Betrachtet wurden der YFP-Kanal bei 518-562 nm, der Chlorophyll-Kanal bei 651-677 nm sowie das Hellfeld, Maßstab = 5 µm, n = 3.

Die Interaktion zwischen ATE2 und X-i/mRD21a (X = D, G) in Mesophyllprotoplasten von Col-0 ist in Abbildung 22 gezeigt. In den vier experimentellen Ansätzen wurde jedes Mal ATE2:cYFP mit UBQ^{K29R/K48R}:X-i/mRD21a:nYFP transformiert. In 1 wurde DiRD21a:nYFP kotransformiert. Gut zu erkennen ist die Autofluoreszenz des Chlorophylls, welche in allen vier Zeilen auf die Chloroplasten verteilt ist. Es konnte kein Singal für YFP detektiert werden. Ebenso verhält es sich in der zweiten Zeile in welcher die Transformation von ATE2:cYFP und GiRD21a:nYFP zu sehen ist. Hierbei wird G als N-Terminus des iRD21a nach Abspaltung des UBQ^{K29R/K48R} exponiert. Im dritten Ansatz wurde ATE2 zusammen mit D-mRD21a:nYFP transformiert. Auch hier konnte kein Protoplast gefunden werden, welcher ein YFP-Signal zeigt. Wie bereits in Zeile zwei, konnte auch bei der Kotransformation von ATE2: cYFP und G-mRD21a:nYFP kein YFP-Fluoreszenzsignal detektiert werden. Die Chlorophyllfluoreszenz ist jedoch bei 651-677 nm gut zu erkennen. Somit kann abschließend gesagt werden, dass weder X-iRD21a noch X-mRD21a (X = D, G) mit der ATE2 in Mesophyllprotoplasten von Col-0 interagieren können.

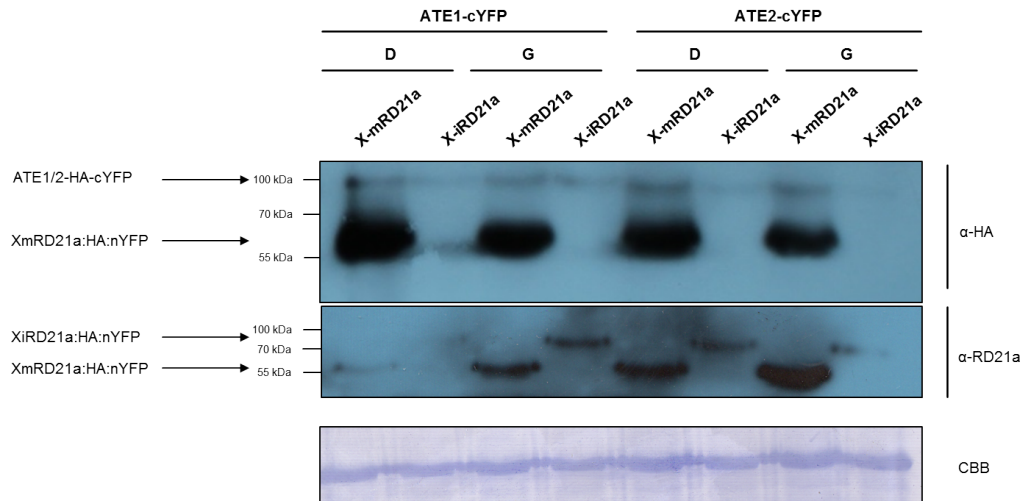


Abbildung 23: Interaktion von ATE1/2 und X-i/mRD21a *in vivo* mittels Split-YFP. Transformation von Col-0 Mesophyllprotoplasten mit pUC::ATE1/2-cYFP und pUBC::UBQ^{K29R/K48R}:X-i/mRD21a-nYFP (X = D, G). Die Detektion erfolgte mittels α -HA-AK (1:1000), Pico-ECL 2 min und mittels α -RD21a-AK (1:1000), Femto-ECL 30 sek, n = 2.

Die Präsenz aller Fusionsproteine der in Abbildung 21 und Abbildung 22 gezeigten Fluoreszenzbildern wurde mittels Western Blot überprüft. Die ATE-Proteine sowie die verschiedenen mRD21a-nYFP Proteine exponieren C-terminal einen HA-Tag, wohingegen die iRD21a-nYFP Proteine mittels des RD21a-Antikörpers detektiert wurden. In allen acht Ansätzen kann man eine Bande auf Höhe der 100 kDa Markerbande mittels des HA-AK detektieren, welche der Größe der ATE1/2-Fusionsproteinen entspricht sowie einer Bande bei ca. 55 kDa, welche dem X-mRD21a-Fusionsprotein zugeordnet werden kann. Die Detektion mit dem RD21a-Antikörper zeigt diese Bande ebenfalls und zudem eine Bande kurz überhalb der 70 kDa Markerbande, welche die erwartete Größe von X-iRD21a-nYFP aufweist. Obwohl die Banden in den acht experimentellen Ansätzen die Anwesenheit aller zu untersuchenden Proteine zeigt, konnten keine Fluoreszenzsignale für diese Experimente detektiert werden. Die fehlende Interaktion von ATE2 mit X-i/mRD21a-nYFP (X = D, G) scheint daher nicht auf mangelnde Proteinexpression eines der beiden Fusionsproteine zurückzuführen zu sein.

3.3.4. Proteinabundanz von RD21a in den verschiedenen *N-end rule*-Mutanten

Die Proteinabundanz von RD21a wurde in den *N-end rule*-Mutanten *ate1 ate2*, *prt6-1*, *prt6-2* sowie *prt6-3* mittels des Antikörpers gegen RD21a auf einem Western Blot überprüft. Bei dem Pflanzenmaterial handelt es sich um 7 Tage alte Keimlinge, welche unter Kurz- oder Langtagsbedingungen steril aufgezogen wurden. Erwartet wurde, sollte RD21a ein Substrat des Abbauweges darstellen, dass es in den Mutanten höher abundant als im Wildtyp ist

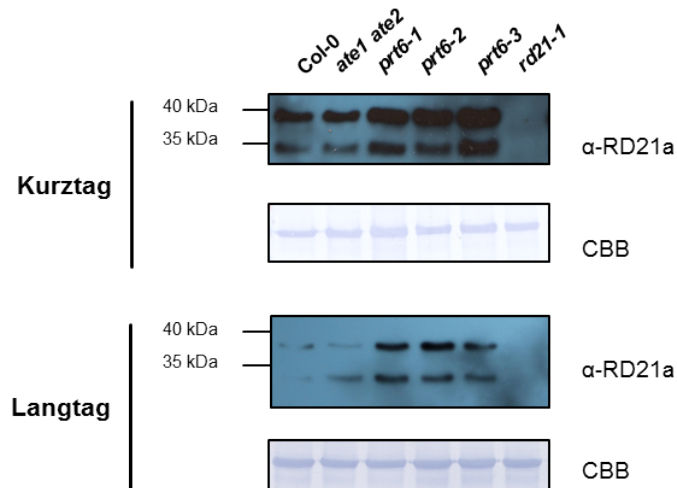


Abbildung 24: Abundanz von RD21a in Pflanzen unter Kurz- und Langtagsbedingungen. Dargestellt sind die Western Blots von Pflanzenextrakt aus Keimlinge (7 Tage alt, 10 µg Gesamtprotein geladen) von Col-0, *ate1 ate2*, *prt6-1*, *prt6-2*, *prt6-3* sowie *rd21-1*, welche auf ½ MS-Medium unter Kurz- oder Langtagsbedingungen aufgezogen wurden. Detektiert wurde mittels α-RD21-AK (1:1000), Pico-ECL 2 min, die Ladekontrolle erfolgte durch Coomassiefärbung (CBB), n = 3.

Alle Genotypen, ausgenommen *rd21-1* zeigen bei gleicher Proteinladungsmenge eine Bande auf Höhe der 35 kDa Markerbande (mRD21a) sowie eine zweite Bande auf Höhe der 40 kDa Markerbande (iRD21a). Unter Kurztagsbedingungen ist die obere Bande bei Col-0 im Vergleich zu den *N-end rule*-Mutanten am schwächsten ausgeprägt. Die leichtere Proteinbande ist in den *prt6*-Allelen sehr viel stärker als bei Col-0 und *ate1 ate2*.

Im zweiten Teil der Abbildung 24 sind die Western Blots der Keimlinge gezeigt, welche sieben Tage unter Langtags-Wachstumsbedingungen angezogen wurden. Erneut kann mit dem Antikörper gegen endogenes RD21a keine Bande in der Linie *rd21-1* detektiert werden, jedoch ist die Bande für mRD21a in *ate1 ate2* stärker als in Col-0. Die iRD21a Bande ist in diesen beiden Genotypen gleich stark vorhanden. Gut zu erkennen ist, dass beide Banden in allen drei PRT6-Linien stärker ausgeprägt sind, was auf eine erhöhte Abundanz schließen lässt. Die Transkriptmengen von RD21a wurden mittels einer quantitativen Realtime PCR überprüft (Abbildung 25, Abbildung 26).

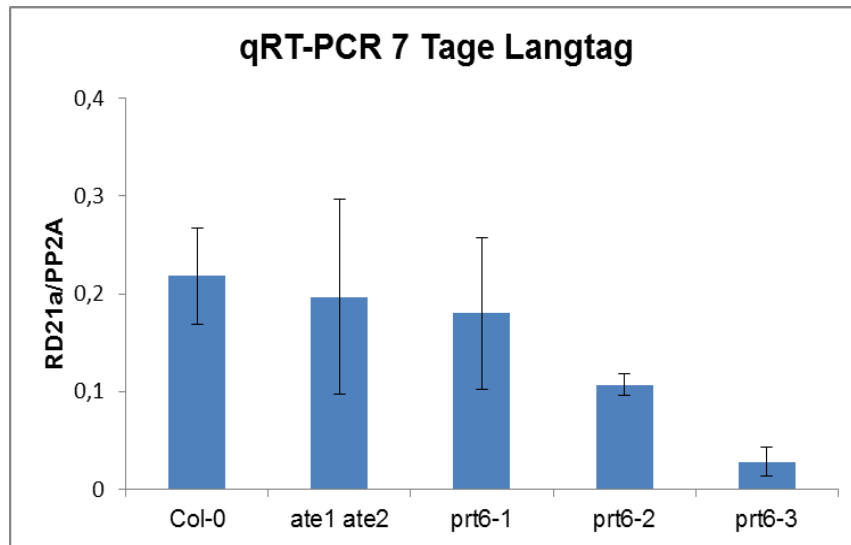


Abbildung 25: Überprüfung der relativen Transkriptmenge von RD21a in Pflanzenmaterial von Col-0, *ate1 ate2*, *prt6-1*, *prt6-2*, *prt6-3*, *rd21-1* nach Anzucht 7 Tage Langtag. Dargestellt ist das Ergebnis der qRT-PCR für RD21a-Transkript des in Abbildung 24 gezeigten Western Blots.

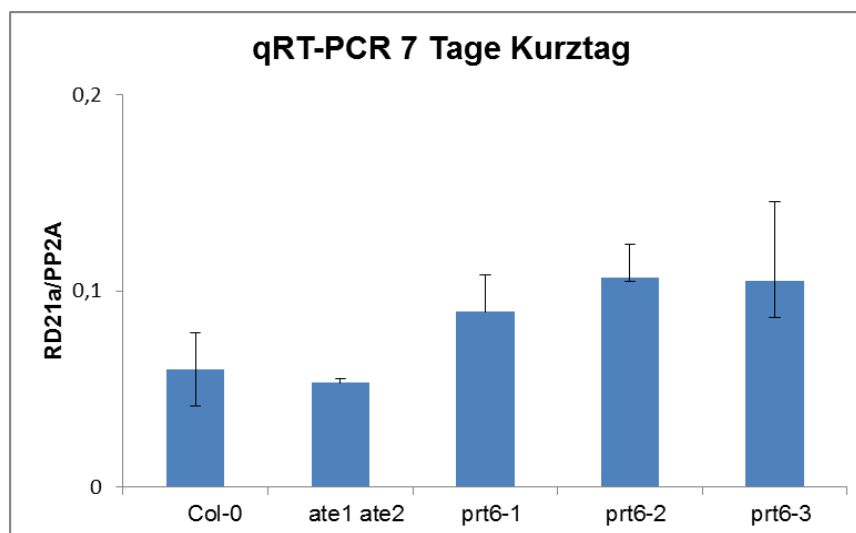


Abbildung 26: Überprüfung der relativen Transkriptmenge von RD21a in Pflanzenmaterial von Col-0, *ate1 ate2*, *prt6-1*, *prt6-2*, *prt6-3*, *rd21-1* nach Anzucht 7 Tage Kurztag. Dargestellt ist das Ergebnis der qRT-PCR für RD21a-Transkript des in Abbildung 24 gezeigten Western Blots.

Es kann keine Hochregulation des Gens in den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp gemessen werden. In der Anzucht unter Langtagsbedingungen ist ein Trend zur transkriptionellen Herabregulation von RD21a in den *N-end rule pathway*-Mutanten im Vergleich zu Col-0 zu erkennen (Abbildung 25). In den Keimlingen, welche sieben Tage unter Kurztagsbedingungen angezogen wurden ist die transkriptionelle Regulation in den PRT6-Mutanten und *ate1 ate2* genauso wie im Wildtyp (Abbildung 26). Als Referenzgen wurde die Phosphatase 2A (PP2A) verwendet (Zhu et al. 2013). Auch im verwendeten Pflanzenmaterial der Proteomik wurde die transkriptionelle Regulation von RD21a mittels qRT-PCR überprüft (Abbildung A5 im Anhang) und es konnte ebenfalls keine Hochregulation

detektiert werden. Somit konnte gezeigt werden, dass bei gleicher transkriptioneller Regulation die Proteinmenge von RD21a in den Mutanten des *N-end rule pathway* erhöht im Vergleich zum Wildtyp ist.

3.3.5. Aktivitätsprofiling von RD21a in *N-end rule pathway*-Mutanten

Nach dem erfolgreichen Nachweis, dass RD21a in den *N-end rule*-Mutanten höher abundant ist, sollte überprüft werden, ob es sich hierbei um aktives Protein handelt. Zur Bestimmung dessen eignete sich ein Aktivitätsprofiling (Gu et al. 2012). Hierbei wurde DCG-04, eine biotinylierte Variante des Proteaseninhibitors E-64, zur Markierung verwendet. E-64 weist in seiner Struktur einen Epoxidring auf, welcher an das Cystein im aktiven Zentrum der Protease kovalent bindet und diese somit inhibiert. Dadurch ist gewährleistet, dass nur aktives Protein markiert wird, welches über den Biotinanker des DCG-04 mittels Streptavidin-Antikörper nachgewiesen werden kann (Gu et al. 2012).

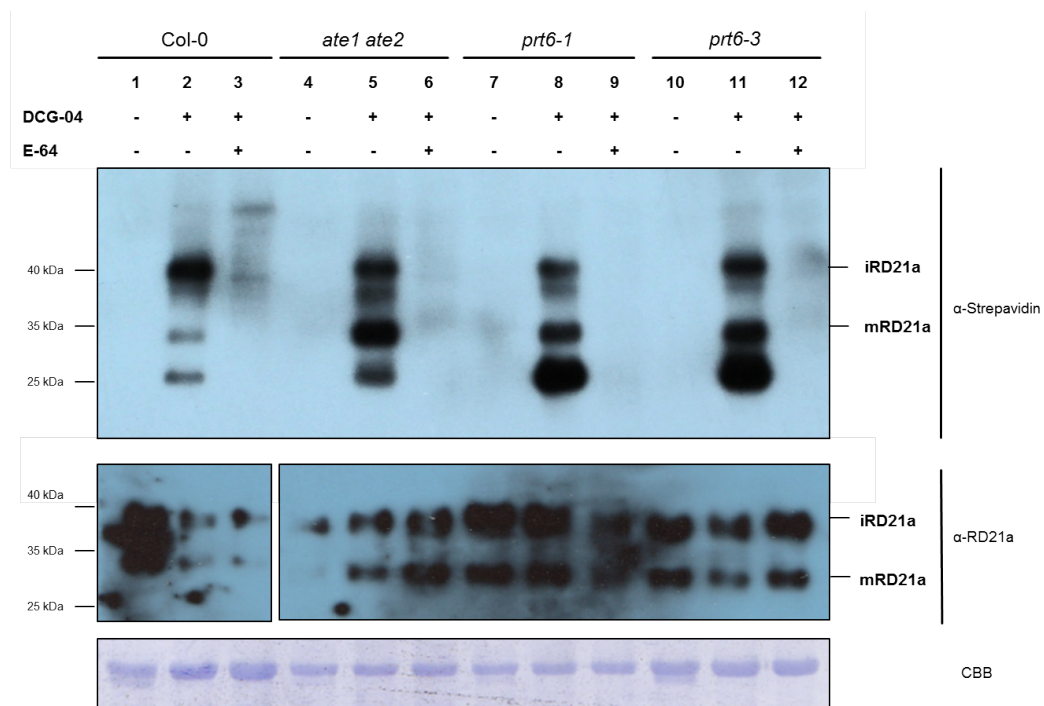


Abbildung 27: Aktivitätsmarkierung und Abundanz von endogenem RD21a in *Col-0*, *ate1 ate2*, *prt6-1* und *prt6-3*. Pflanzenextrakt der verschiedenen Genotypen wurde 4 h mit 0,2 μ M DCG-04 inkubiert. Gezeigt sind 2 unabhängige Western Blots der Experimente mit Pflanzenextrakt von *Col-0* (Spur 1-3), *ate1 ate2* (Spur 4-6), *prt6-1* (Spur 7-9) und *prt6-3* (Spur 10-12) ohne Sonde (Spur 1, 4, 7, 10), des mit DCG-04 markierten Pflanzenextraktes (Spur 2, 5, 8, 11), sowie mit E-64 und DCG-04 inkubierten Materials (Spur 3, 6, 9, 12), Ladungsmenge 10 μ g Gesamtprotein. Detektiert wurde mittels Streptavidin-HRP (1:3000, oberer WB) Pico-ECL 90 sek und RD21a-rabbit-AK (1:1000), Fento-ECL 30 sek, die Ladekontrolle erfolgte mittels CBB, n = 5.

Im oberen Teil der Abbildung sind bei *Col-0* in Spur 2 drei Banden zu erkennen. Eine auf Höhe der 25 kDa Markerbande, eine entsprechend der 35 kDa Markerbande (mRD21a) und die stärkste Bande ist bei ca. 40 kDa (iRD21a) zu erkennen. In Spur 3 ist eine schwache Bande, ebenfalls bei 40 kDa zu sehen, des Weiteren erkennt man noch eine Bande oberhalb

dieser Bande. Die drei Banden aus Spur 2 finden sich ebenfalls in den Spuren 5, 8 und 11 wieder, wobei in Spur 5 die Stärke der iRD21a-Bande äquivalent zu der Bande in Spur 2 ist, die beiden kleineren Proteinbanden sind stärker ausgeprägt. Das gleiche ist in den Spuren 8 und 11 zu erkennen, wobei hier die Intensität der 25 kDa Bande am stärksten ist. Hierbei handelt es sich um die AALP (Aleuron-Like Protease, Gu et al. 2012), welche ebenfalls durch E-64 inhibierbar und somit durch DCG-04 markierbar ist. Es ist zusätzlich zu Spur 2 noch eine weitere Bande knapp unterhalb der 40 kDa Markerbande in den Proben von *ate1 ate2*, *prt6-1* und *prt6-3* zu erkennen. Keine Banden sind in den Spuren 4, 6, 7, 9, 10, 12 detektierbar (Abbildung 27). Betrachtet man den unteren Teil der Abbildung, wo die Proben mittels RD21a-AK (Yamada et al. 2001) detektiert wurden, sieht man bei Col-0 in jeder Spur zwei schwache Banden jeweils auf Höhe der 35 kDa Markerbande sowie der 40 kDa Markerbande. Diese beiden Proteinbanden sind auch in den Genotypen von *ate1 ate2*, *prt6-1* und *prt6-3* zu sehen, jedoch ist die Intensität beider Banden dort stärker als in Col-0. Sowohl in der Doppelmutante als auch in den Mutanten von PRT6 ist die obere Bande etwas stärker als die mRD21a-Bande. Das schwache Signal für RD21a in Spur 4 wird auf ECL-Substratverbrauch zurückgeführt. Dieses Experiment konnte zeigen, dass durch die höhere Abundanz von RD21a auch mehr aktives Protein vorhanden ist.

3.3.6. Proteinstabilität im Protoplastensystem

3.3.6.1. N-terminale Abhängigkeit der Proteinstabilität von RD21a *in vivo*

Die Stabilität von RD21a wurde *in vivo* in Mesophyllprotoplasten untersucht. Hierzu wurde das Vollängenprotein unter Kontrolle des UBQ10-Promotors mit C-terminalen YFP in die verschiedenen Genotypen mit mCherry als stabiles Transformationssignal kotransformiert. Ein weiterer Ansatz bestand darin, die verschiedenen Etappen und somit die mögliche Prozessierung von RD21a (Abbildung 16) im Verlaufe des *N-end rule pathways* zu simulieren. Hierzu wurden die Proteinvarianten X-iRD21a und X-mRD21a (reifen Proteine nach Abspaltung der Signalsequenzen und entsprechend ihres N-Terminus im *N-end rule*, X = D, RD, G) mit einem C-terminalen YFP und mit Hilfe der UBQ-Fusionstechnik kloniert und ebenfalls mit mCherry als interne Kontrolle zusammen transformiert. Als Kontrolle diente das Protein mit einem G am N-Terminus, da diese Aminosäure als stabil im Sinne des *N-end rule* diskutiert wird (Giglione et al. 2003). Erwartet wurde, dass D-i/mRD21a-YFP und das Vollängenprotein in *ate1 ate2* und *prt6-1* stabilisiert ist im Vergleich zum Wildtyp. RD-i/mRD21a-YFP wiederum sollte in Col-0 und *ate1 ate2* destabilisiert im Vergleich zu *prt6-1* sein. G-i/mRD21a-YFP sollte durch die stabilisierende AS am N-Terminus in allen drei Genotypen die gleiche Abundanz aufweisen.

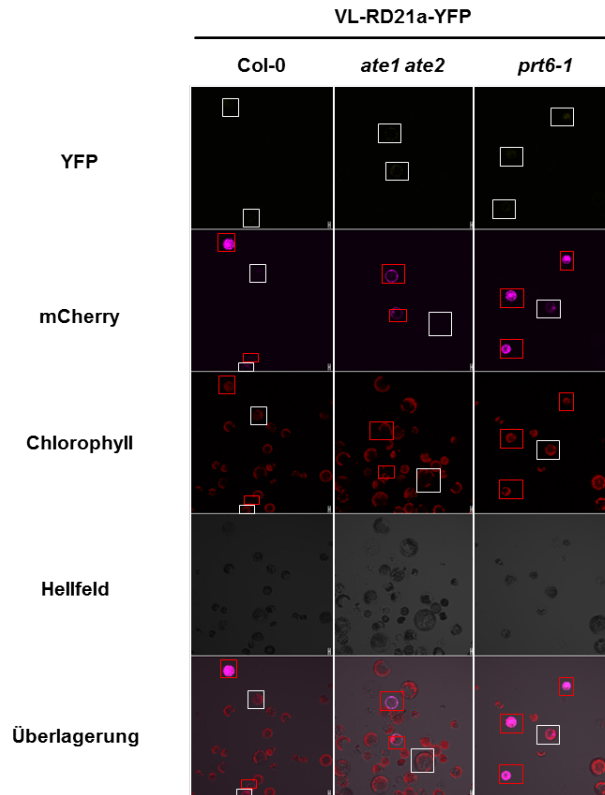


Abbildung 28: Stabilität von VL-RD21a-YFP in Mesophyllprotoplasten von WT und *N-end rule pathway*-Mutanten. Transformation von Col-0, *ate1 ate2* und *prt6-1* mit pUBC::RD21a:YFP und mCherry. Fluoreszenzbild, . YFP-Kanal (518-562 nm), mCherry-Kanal (598-646 nm), Chlorophyll-Kanal (651-677 nm), sowie Hellfeld und Überlagerung. Der Maßstabsbalken = 5 µm. Weiß umrandet sind jeweils Protoplasten welche ein Signal im entsprechenden Kanal aufweisen, rot umrandete sind solche die neben einem mCherry-Signal ebenfalls ein YFP-Signal aufweisen, n = 3.

Die Stabilitätsuntersuchungen des Vollängen-RD21a-YFP sind in Abbildung 28 gezeigt. Das YFP-Signal ist zusammen mit dem mCherry-Signal im Zytoplasma gut zu erkennen, da es sich von der Autofluoreszenz des Chlorophylls abhebt. Im WT kann man zwei von vier mCherry exprimierende Protoplasten detektieren, welche zusätzlich ein Signal bei 518-562 nm zeigen (rot markiert). Betrachtet man den experimentellen Ansatz in *ate1 ate2*, so sind hier ebenfalls zwei Protoplasten welche ein Signal für beide Fluoreszenzproteine zeigen, wohingegen noch ein dritter nur mit einem mCherry-Signal zu sehen ist. Auch in *prt6-1* sieht man einen Protoplasten, welcher nur ein Signal bei 598-646 nm zeigt, wohingegen drei mit einem zusätzlichen YFP-Signal zu erkennen sind (Abbildung 28).

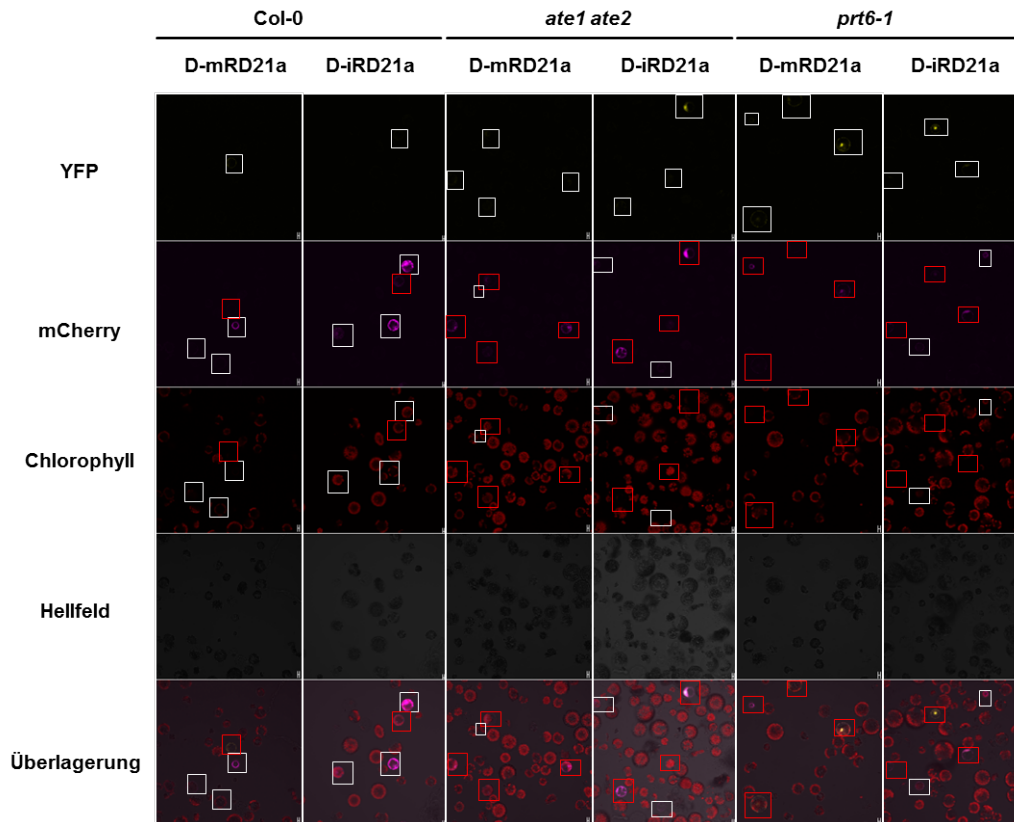


Abbildung 29: Stabilität von D-i/mRD21a-YFP in Mesophyllprotoplasten von WT und *N-end rule pathway*-Mutanten. Transformation von Col-0, *ate1 ate2* und *prt6-1* mit pUBC::UBQ^{K29R/K48R}:D-m/iRD21a:YFP und mCherry. Fluoreszenzbild, . YFP-Kanal (518-562 nm), mCherry-Kanal (598-646 nm), Chlorophyll-Kanal (651-677 nm), sowie Hellfeld und Überlagerung. Der Maßstabsbalken = 5 µm. Weiß umrandet sind jeweils Protoplasten welche ein Signal im entsprechenden Kanal aufweisen, rot umrandete sind solche die neben einem mCherry-Signal ebenfalls ein YFP-Signal aufweisen, n = 3.

Für das Experiment mit D-i/mRD21a-YFP kotransformiert mit mCherry in den Genotypen von Col-0, *ate1 ate2* und *prt6-1* (Abbildung 29) zeigt sich, dass im Falle von Col-0 bei vier mit mCherry transformierte Protoplasten sowohl für D-iRD21a (mit Granulin-ähnlicher Domäne) als auch für D-mRD21a-YFP nur ein Protoplast in dem Übersichtsbild ein Signal für YFP im Zytoplasma aufweist (rot markiert). Nach der Abspaltung des UBQ^{K29R/K48R} präsentiert das YFP-Fusionsprotein ein D als neuen N-Terminus. Im Vergleich dazu zeigen im Genotyp der Doppelmutante *ate1 ate2* fünf mit mCherry transformierten Protoplasten vier (iRD21a) bzw. drei (iRD21a) Protoplasten zusätzlich ein Signal für YFP. In der Mutante *prt6-1* zeigen im Experiment mit D-mRD21a alle mCherry-transformierten Protoplasten ebenfalls ein Signal bei 532 nm und in dem Versuch mit D-iRD21a, von sechs mit dem Kontrollkonstrukt transformierten Protoplasten, die Hälfte ebenfalls ein Signal für YFP. Die Autofluoreszenz des Chlorophylls hebt sich gut von den zytoplasmatischen Signalen ab.

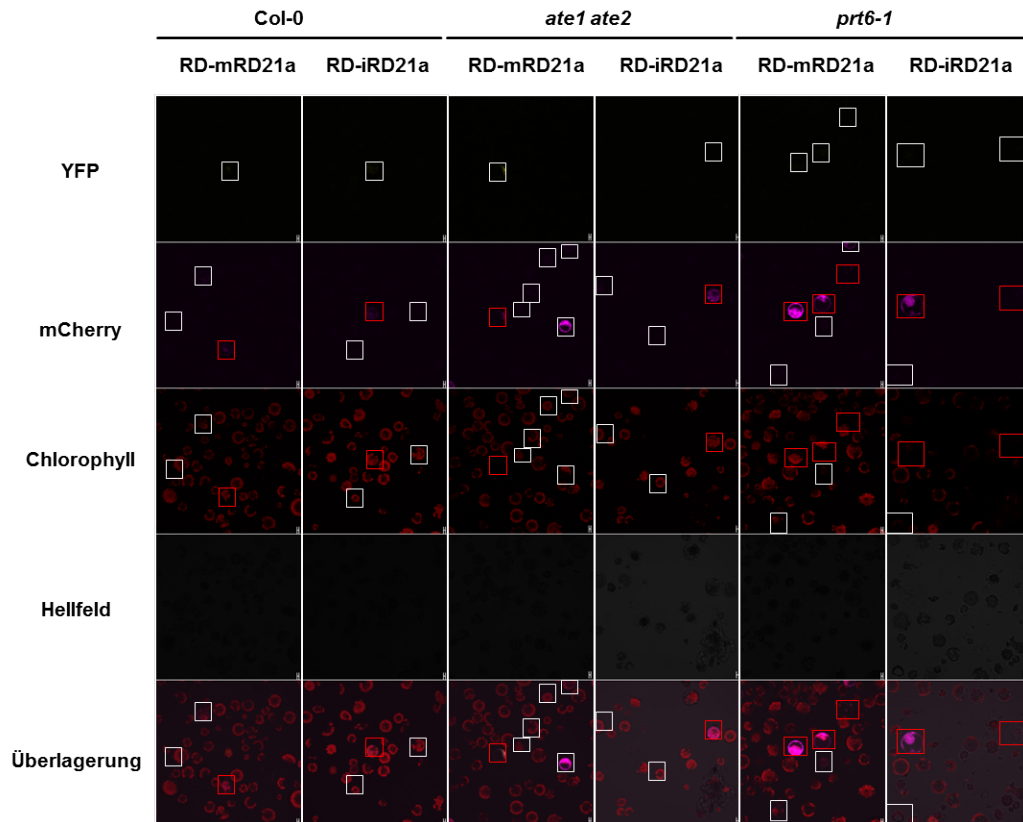


Abbildung 30: Stabilität von RD-i/mRD21a-YFP in Mesophyllprotoplasten von WT und *N-end rule pathway*-Mutanten. Transformation von Col-0, *ate1 ate2* und *prt6-1* mit pUBC::UBQ^{K29R/K48R}:RD-m/iRD21a:YFP und mCherry. Fluoreszenzbild, . YFP-Kanal (518-562 nm), mCherry-Kanal (598-646 nm), Chlorophyll-Kanal (651-677 nm), sowie Hellfeld und Überlagerung. Der Maßstabsbalken = 5 µm. Weiß umrandet sind jeweils Protoplasten welche ein Signal im entsprechenden Kanal aufweisen, rot umrandete sind solche die neben einem mCherry-Signal ebenfalls ein YFP-Signal aufweisen, n = 3.

Sollte RD21a ein Substrat *des N-end rule pathways* darstellen, müsste es nach der Abspaltung der N-terminalen Signalsequenz durch ATE1/2 *in vivo* arginyliert werden. Die Stabilität der potentiell arginylierten i/mRD21a-Varianten wurde durch die Transformation von UBQ^{K29R/K48R}:RD-i/mRD21a-YFP Fusionsproteinen in Mesophyllprotoplasten des entsprechenden Genotypen untersucht (Abbildung 30). Gut zu sehen ist, dass in Col-0 unabhängig von der transformierten RD21a-Variante nur ein Drittel der mit mCherry transformierten Protoplasten ebenfalls ein Signal bei 532 nm im Zytoplasma zeigt. Auch in der Doppelmutante *ate1 ate2* ist dies für das Konstrukt RD-iRD21a-YFP der Fall. In der gezeigten Abbildung 30 für die Kotransformation von mCherry zusammen mit RD-mRD21a-YFP weist, von acht Protoplasten mit einem Signal bei 598-646 nm, nur einer ebenfalls ein YFP-Signal auf (rot markiert). Die Experimente mit den Konstrukten für RD-i/mRD21a-YFP in Protoplasten von *prt6-1* zeigen ein anderes Bild. Im Falle von RD-mRD21a zeigen 50 % der Protoplasten, welche eine mCherry-Signal aufweisen, ebenfalls ein Signal für YFP und in dem Versuch mit RD-iRD21a-YFP kann man sogar in zwei von drei Protoplasten ein Fluoreszenzsignal sowohl bei 518-562 nm als auch bei 598-646 nm detektieren. Erneut sind

die Chloroplasten durch die Autofluoreszenz des Chlorophylls bei 651-677 nm gut zu erkennen.

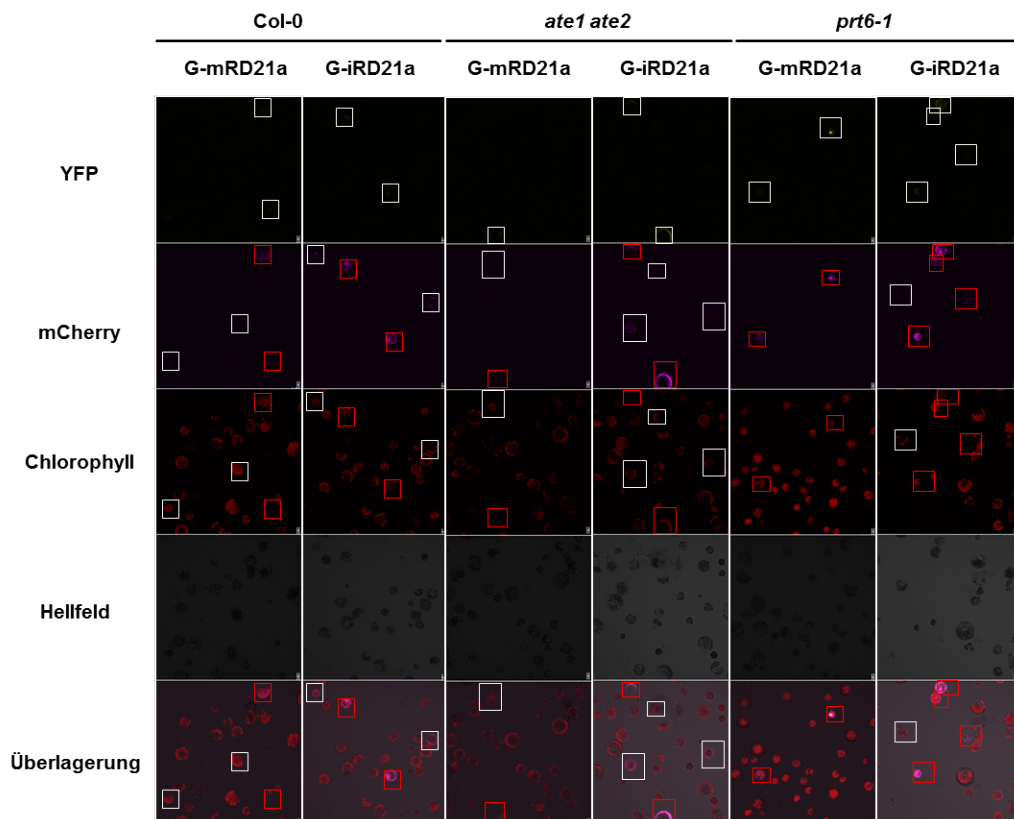


Abbildung 31: Stabilität von G-i/mRD21a-YFP in Mesophyllprotoplasten von WT und *N-end rule pathway*-Mutanten. Transformation von Col-0, *ate1 ate2* und *prt6-1* mit pUBC::UBC^{K29R/K48R}-G-m/iRD21a:YFP und mCherry. Fluoreszenzbild, . YFP-Kanal (518-562 nm), mCherry-Kanal (598-646 nm), Chlorophyll-Kanal (651-677 nm), sowie Hellfeld und Überlagerung. Der Maßstabsbalken = 5 µm. Weiß umrandet sind jeweils Protoplasten welche ein Signal im entsprechenden Kanal aufweisen, rot umrandete sind solche die neben einem mCherry-Signal ebenfalls ein YFP-Signal aufweisen, n = 3.

Die intakten Protoplasten sind durch ihre runde Form und Abgegrenztheit zum umliegenden Milieu gut erkennbar und die Chloroplasten sind durch die Autofluoreszenz des Chlorophylls ebenfalls gut zu sehen. Abbildung 31 zeigt die Experimente der Kotransformation von mCherry zusammen mit G-i/mRD21a-YFP. Von vier Protoplasten des Wildtyps transformiert mit G-i/mRD21a-YFP, welche ein Signal bei 598-646 nm zeigen, weisen ebenfalls zwei ein Signal im YFP-Kanal auf (rot markiert). Ein ähnliches Bild zeigt sich für die Transformation von G-mRD21a-YFP in Protoplasten von *ate1 ate2* (dritte Spalte). Im Experiment mit der C-terminal längeren iRD21a-Variante zeigen zwei von fünf Protoplasten mit einem mCherry-Signal zusätzlich ein Fluoreszenzsignal für YFP. In den Protoplasten von *prt6-1* zeigen für G-mRD21a alle Protoplasten im YFP-Kanal ebenfalls ein Signal bei 598-646 nm, welches im Zytoplasma lokalisiert ist. Auch bei der Kotransformation von mCherry und G-iRD21a in diesem Genotyp zeigen von fünf Protoplasten mit mCherry-Signal vier ebenfalls ein Fluoreszenzsignal bei 518-562 nm.

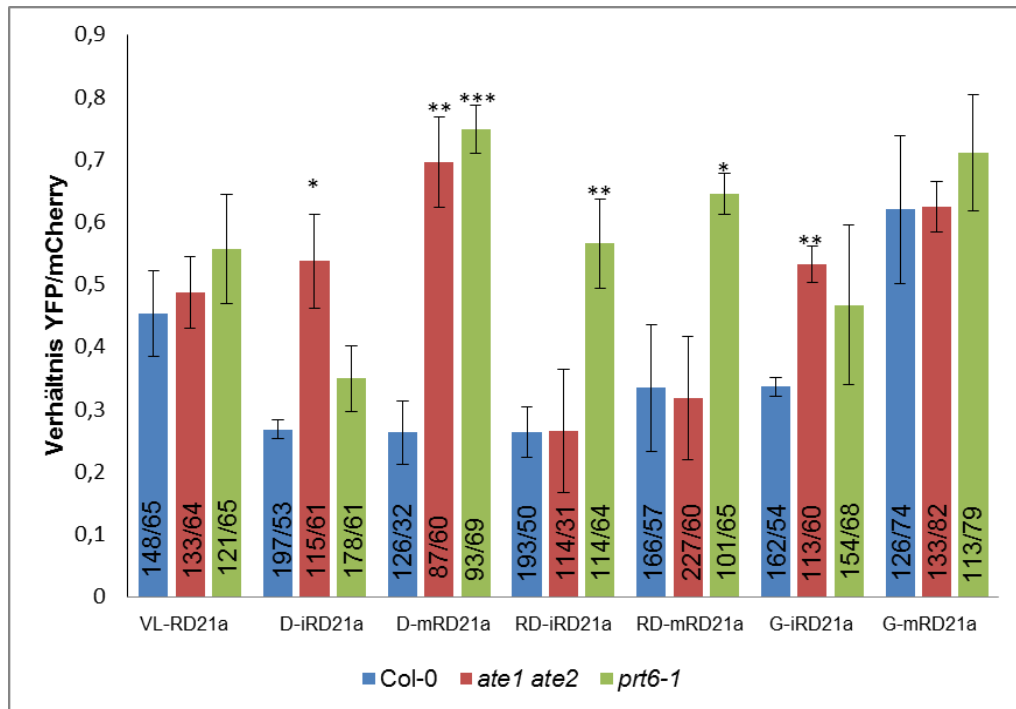


Abbildung 32: Säulendiagramm zur Auswertung der Transformation von UBQ:X-iRD21a:StreptII:YFP und UBQ:X-mRD21a:3HA:YFP (X = D, RD, G) im Verhältnis zu mCherry. Die Ordinate zeigt das Verhältnis transformierter Protoplasten mit YFP- und mCherry-Signal zu allen mit mCherry transformierten Protoplasten an. Auf der Abszissen sind die für dieses Experiment verwendeten RD21a-Varianten in den entsprechend verwendeten Genotypen aufgezeigt (Col-0 (blau), *ate1 ate2* (rot), *prt6-1* (grün)). In den Balken ist jeweils die Anzahl der Protoplasten mit mCherry Signal (x) zur Anzahl der Protoplasten mit beiden Fluoreszenzsignalen(y) angegeben (x/y), die Daten ergeben sich aus jeweils drei unabhängigen Transformationsexperimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem Students-TTtest: * $t \leq 0,02$; ** $t \leq 0,002$; *** $t \leq 0,0002$.

In allen Experimenten wurde kein Protoplast gefunden, welcher nur ein YFP-Signal ohne mCherry zeigte. Für die Experimente mit X-mRD21a:HA:YFP konnte das Ergebnis der statistischen Auswertung ebenfalls auf dem Western Blot gezeigt werden (siehe Abbildung A8 im Anhang). Es wurden insgesamt pro Ansatz über 1000 Protoplasten ausgezählt. Die in den Balken angegebenen Zahlen (X/y) beziehen sich auf die Protoplasten mit mCherry- und YFP-Signal (y) im Verhältnis zu den Protoplasten, welche nur ein Signal für mCherry gezeigt haben.

Die ersten drei Balken in Abbildung 32 zeigen die Zusammenfassung der Transformation von pUBC::RD21A:StreptII:YFP in Col-0, *ate1 ate2* und *prt6-1*. Zu erkennen ist eine leichte Tendenz zur Stabilisierung dieses Proteins in den *N-end rule*-Mutanten, jedoch ist diese nicht statistisch signifikant. Die Ergebnisse der Transformationen von D-i/mRD21a-YFP zeigen ein anderes Bild. Im zweiten Block der Abbildung 32 ist die unreife RD21a (iRD21a) dargestellt. In diesem Falle besitzt das eingebrachte Protein noch seine Granulin-ähnliche Domäne und entspricht dem Status, in welchem das native RD21a in der Vakuole gelagert wird. D-mRD21a ist 106 AS kürzer und stellt das reife RD21a dar. In beiden Konstrukten fehlt die Vakuolenlokalisationssequenz. Gut zu erkennen ist (Abbildung 32), dass beide Fusionsproteine die gleiche Stabilität in Col-0 zeigen. In *ate1 ate2* und *prt6-1* sind sowohl D-

iRD21a als auch D-mRD21a sehr viel stabiler als im Wildtyp. Zu bemerken ist, dass die Stabilität von D-mRD21a:YFP in den beiden Mutanten nahezu identisch ist, wohingegen D-iRD21a in *ate1 ate2* wesentlich stabiler ist als in *prt6-1*. Die Fluoreszenzbilder zu diesen Experimenten sind in Abbildung 29 gezeigt. Als nächstes zeigt Abbildung 32 die dem *N-end rule pathway* entsprechenden nächsten Prozessierungsschritt von RD21a (Abbildung 16) nach Arginylierung durch eine der beiden ATEs. Erneut ist als ersten iRD21a gefolgt von mRD21a dargestellt. Die Fusionsproteine UBQ^{K29R/K48R}:R₁₃₄-RD21a₁₃₄₋₄₆₂:StreptII:YFP und UBQ^{K29R/K48R}:R₁₃₄-RD21a₁₃₄₋₃₅₆:HA:YFP zeigen nach UBQ^{K29R/K48R}-Abspaltung ein R am N-Terminus. Zu sehen ist, dass diese Proteine in Col-0 und *ate1 ate2* annähernd gleich abundant sind, wohingegen es in *prt6-1* signifikant stabiler im Vergleich dazu ist. Diese Balken entsprechen den statistischen Auswertungen der Abbildung 30. Die letzten beiden Dreierblöcke zeigen die Konstrukte, welche in Abbildung 31 dargestellt sind. Die Fusionsproteine präsentieren hier ein G am N-Terminus. Der vorletzte Dreierblock entspricht erneut dem 106 AS-längeren iRD21a. In Col-0 zeigt G-iRD21a eine Stabilität von 0,3 relativen Einheiten, wohingegen es im Genotyp *ate1 ate 2* eine Stabilität von 0,5 Einheiten hat. Auch in *prt6-1* ist G-iRD21a stabiler als im WT, wobei hier eine hohe Standardabweichung zu erkennen ist. G-mRD21a zeigt in allen drei Genotypen in etwa eine relative Stabilität von 0,6-0,7 und ist damit genauso stabil wie das Protein UBQ^{K29R/K48R}:D₁₃₅-RD21a₁₃₅₋₃₅₆:HA:YFP in den Genotypen *ate1 ate2* und *prt6-1*. Somit konnte durch die statistische Auswertung der Daten gezeigt werden, dass RD21a entsprechend des *N-end rule pathways* N-terminal-abhängig stabilisiert bzw. destabilisiert ist.

3.3.6.2. N-terminale Abhängigkeit der Proteinstabilität von TGG2 *in vivo*

Auch die Stabilität von TGG2 wurde *in vivo* in Mesophyllprotoplasten untersucht. Hierzu wurde erneut das Vollängenprotein TGG2 unter Kontrolle des UBQ10-Promotors mit C-terminalen YFP in die Genotypen Col-0 und *prt6-1* mit mCherry als stabiles Transformationssignal kotransformiert. Es wurde untersucht, ob nach der Prozessierung des Proteins eine Stabilitätsänderung entsprechend des *N-end rule pathways* stattfindet. TGG2 präsentiert nach Abspaltung einer Signalsequenz K29 als neuen N-Terminus. Dieses konnte mittels ChaFRADIC (siehe Tabelle A im Anhang) in Pflanzenmaterial von *prt1-1* erneut nachgewiesen werden. Die Proteinvarianten K29-TGG2 sowie G29-TGG2 wurden dahingehend unter zu Hilfenahme der UFT untersucht. Sollte TGG2 ein Substrat des N-terminal-abhängigen Degradationsweg darstellen, müsste K29-TGG2 in Col-0 destabilisiert sein im Vergleich zu *prt6-1*.

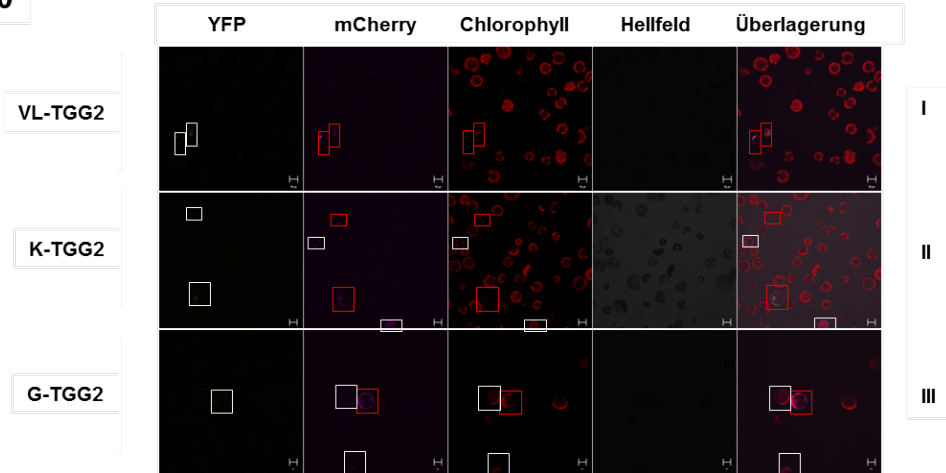
Col-0

Abbildung 33: Stabilität von X-TGG2 (X = K, G) in Col-0. Transformation von Col-0 mit pUBC::UBQ^{K29R/K48R}:X-TGG2:YFP und mCherry. Fluoreszenzbild, Spalte 1: YFP-Kanal (518-562 nm), Spalte 2: mCherry-Kanal (598-646 nm), Spalte 3: Chlorophyll-Kanal (651-677 nm), Spalte 4: Hellfeld, Spalte 5: Überlagerung. I: Vollängen (VL)-TGG2; II: K-TGG2:YFP; III: G-TGG2:YFP. Der Maßstabsbalken = 5 µm. Weiß umrandet sind jeweils Protoplasten welche ein Signal im entsprechenden Kanal aufweisen, rot umrandete sind solche die neben einem mCherry-Signal ebenfalls ein YFP-Signal aufweisen.

Die erste Reihe zeigt die Transformation von mCherry und pUBC::TGG2:StrepII:YFP. Von den insgesamt 16 intakten Protoplasten, welche im Hellfeld zu erkennen sind, zeigen zwei für beide Fluoreszenzproteine ein Signal (Abbildung 33, rot markiert). Wohingegen von den insgesamt 31 Protoplasten in der zweiten Reihe, vier ein Signal im mCherry-Kanal aufweisen und zwei von diesen ein zusätzliches Signal bei 518-562 nm zeigen. Hier wurde das Konstrukt K-TGG2:YFP eingebracht, in welchem K als N-Terminus exponiert wird. Gut zu erkennen ist, dass das YFP-Signal im Zytoplasma lokalisiert ist. In der dritten Reihe wurde G-TGG2:YFP zusammen mit mCherry in die Protoplasten eingebracht. Es ist ein Protoplast zu sehen, welcher sowohl im YFP-als auch im mCherry-Kanal zu erkennen ist (Abbildung 33).

prt6-1

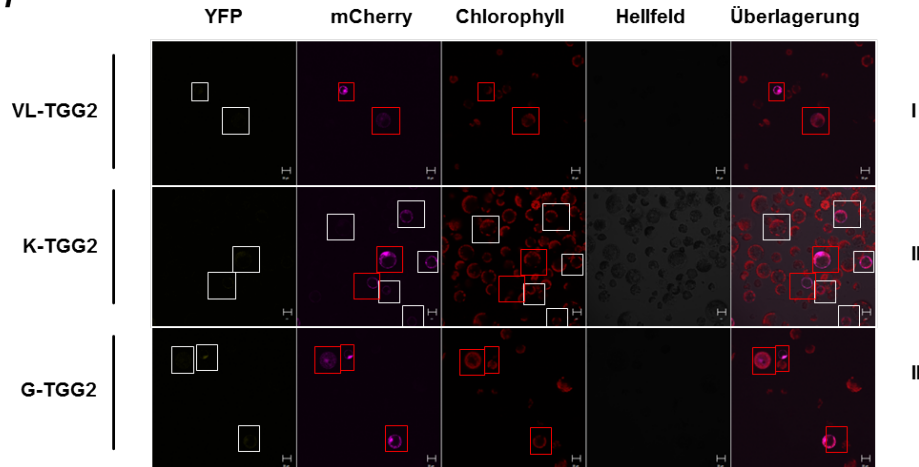


Abbildung 34: Stabilität von X-TGG2 (X = K, G) in *prt6-1*. Transformation von *prt6-1* mit pUBC::UBQ^{K29R/K48R}-X-TGG2:YFP und mCherry. Fluoreszenzbild, Spalte 1: YFP-Kanal (518-562 nm), Spalte 2: mCherry-Kanal (598-646 nm), Spalte 3: Chlorophyll-Kanal (651-677 nm), Spalte 4: Hellfeld, Spalte 5: Überlagerung. I: Vollängen (VL)-TGG2; II: K-TGG2:YFP; III: G-TGG2:YFP. Der Maßstabsbalken = 5 μm. Weiß umrandet sind jeweils Protoplasten welche ein Signal im entsprechenden Kanal aufweisen, rot umrandete sind solche die neben einem mCherry-Signal ebenfalls ein YFP-Signal aufweisen.

Die Experimente von Abbildung 33 wurden ebenfalls im Genotyp *prt6-1* durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Übersichtsbilder exemplarisch für jeden Ansatz in Abbildung 34 gezeigt. In der ersten Reihe sieht man die Bilder für die Transformation von Vollängen-TGG2:YFP zusammen mit mCherry. Beide mit mCherry transformierten Protoplasten zeigen zudem ein YFP-Signal (rot markiert). In der zweiten Zeile ist die Transformation von K-TGG2:YFP dargestellt. Von insgesamt 35 Protoplasten zeigen sieben ein Signal bei 598-646 nm und in zwei dieser Protoplasten ist im YFP-Kanal ebenfalls ein Signal zu erkennen. Die letzte Zeile zeigt die Kotransformation von mCherry und G-TGG2:YFP. Alle mit mCherry transformierten Protoplasten zeigen ebenfalls ein Signal bei 518-562 nm. Die Autofluoreszenz des Chlorophylls ist in allen Zeilen gut erkennbar (Abbildung 34) und das YFP-Signal ist in allen Experimenten zusammen mit dem mCherry-Signal im Zytoplasma lokalisiert.

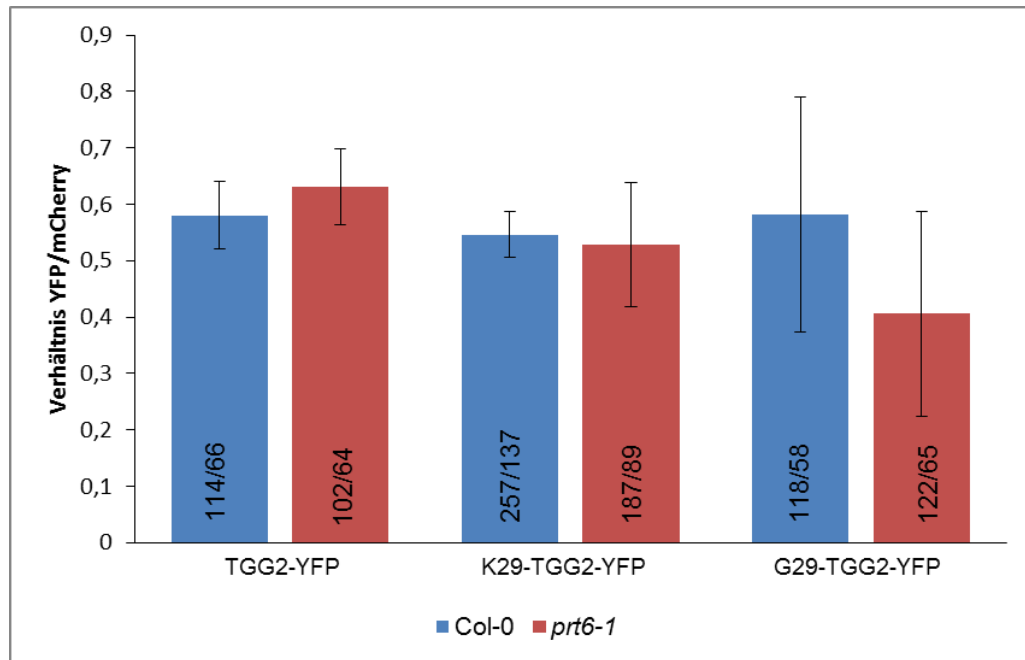


Abbildung 35: Säulendiagramm zur Auswertung der Transformation von pUBC::TGG2:YFP, K29-TGG2:YFP und G-TGG2:YFP im Verhältnis zu mCherry. Die Ordinate zeigt das Verhältnis transformierter Protoplasten mit YFP- und mCherry-Signal zu allen mit mCherry transformierten Protoplasten an. Auf der Abszissen sind die für dieses Experiment verwendeten Genotypen aufgezeigt (Col-0 (blau), *prt6-1* (rot)). In den Balken ist jeweils die Anzahl der Protoplasten mit mCherry Signal zur Anzahl der Protoplasten mit beiden Fluoreszenzsignalen angegeben, die Daten ergeben sich aus jeweils drei unabhängigen Transformationsexperimenten. Die erste Zahl im Balken (x) ist die Anzahl der Protoplasten mit mCherry-Signal, die Zahl nach dem Bruchstrich (y) ist die Anzahl an Protoplasten mit beiden Fluoreszenzsignalen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem Students-T-Test: * $t \leq 0,02$; ** $t \leq 0,002$; *** $t \leq 0,0002$.

In Abbildung 35 ist die Zusammenfassung der Daten aus den Transformationen von mCherry zusammen mit pUBC::UBQ^{K29R/K48R}:TGG2:StrepII:YFP, pUBC::UBQ^{K29R/K48R}:K29-TGG2₂₉₋₅₄₇:StrepII:YFP sowie pUBC::UBQ^{K29R/K48R}:G29-TGG2₂₉₋₅₄₇:StrepII:YFP zu sehen. Es wurden für jeden experimentellen Ansatz über 1000 Protoplasten ausgezählt. In den Balken ist jeweils das Verhältnis (x/y) von Protoplasten mit beiden Fluoreszenzsignalen (y) zu Protoplasten mit mCherry-Signal (x) dargestellt. Ein Western Blot dieser Experimente ist in Abbildung A9 im Anhang gezeigt. Die statistische Auswertung zeigt, dass im Falle von TGG2-YFP und K-TGG2-YFP kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen Col-0 und *prt6-1* festzustellen ist. Die Fusionsproteine sind unabhängig vom Genotyp der Protoplasten gleich stabil. G-TGG2-YFP ist in Col-0 um 0,2 Einheiten stabiler als in *prt6-1*. Jedoch ist dieser Unterschied nicht statistisch signifikant. Die Abbildung zeigt, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Konstrukten in unterschiedlichen genotypischen Hintergründen besteht.

3.3.7. Interaktion von endogenem RD21a mit der rekombinanten UBR-Domäne von PRT6

Entsprechend Abbildung 16 folgt nach der möglichen Arginylierung von RD21a, die Ubiquitylierung durch eine E3-Ligase. In *Arabidopsis* ist PRT6 (Garzón et al. 2007) als N-

Rekognin bekannt, da in Mutanten arginylierte Proteine stabilisiert sind im Vergleich zum Wildtyp. Die annotierte UBR-Domäne (TAIR, www.arabidopsis.org) von PRT6 wurde daher rekombinant als His-MBP-Fusionsprotein exprimiert, an eine Amylose-Säule gekoppelt und mit Pflanzenextrakt von *prt6-1* inkubiert. Das gebundene Protein wurde eluiert und diese Fraktion nach Aufkonzentration auf endogenes RD21a mittels des spezifischen Antikörpers überprüft (Abbildung 36). Eine schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus ist im Anhang enthalten (Abbildung A1).

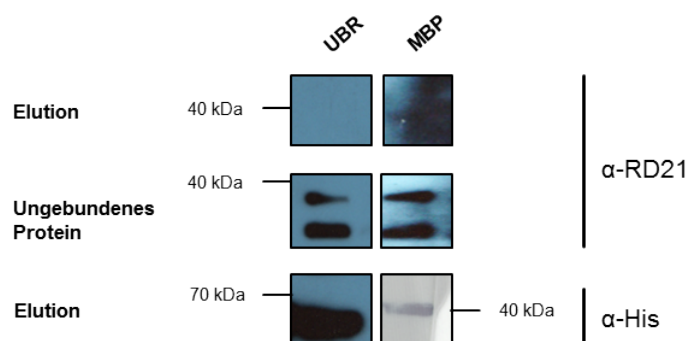


Abbildung 36: Interaktion von rekombinanter His-MBP-UBR-Domäne (PRT6) mit endogenem RD21a. Zu sehen ist die Darstellung der Western Blots nach Kopplung von rekombinant exprimierter UBR-Domäne bzw. freiem MBP an Amylose-Harz und folgender Inkubation mit Pflanzenextrakt von *prt6-1*. Detektiert wurde mit α-RD21a-AK (1:1000, Pico-ECL, 1 min) sowie α-His-AK (1:3000, chromogenes Substrat, 5 min). Die erste Spalte entspricht den Proben der UBR-Säule, die zweite Spalte entspricht den Proben der MBP-Säule. Erste und dritte Reihe: Eluat, zweite Reihe ungebundene Überstand Pflanzenextrakt (ungebundenes Protein), n = 3.

Nach Inkubation des beladenen Säulenmaterials mit Pflanzenextrakt von *prt6-1* kann weder von der immobilisierten UBR-Domäne, noch von der Negativkontrolle (MBP) RD21a eluiert werden (Elutionsfraktion mit RD21a-AK). Im Überstand des verwendeten Extraktes sind jedoch die Banden für iRD21a und mRD21a sehr gut zu erkennen und auch die Kontrolle auf das rekombinante Fusionsprotein zeigt klar eine Bande für das jeweils immobilisierte Protein. Der His-AK detektiert im Falle des Fusionsproteins His-MBP-UBR eine Bande knapp unterhalb der 70 kDa Markerbande, im Falle des Proteins His-MBP ist eine klare Bande auf Höhe der 40 kDa Markerbande zu erkennen (Abbildung 36). Es konnte somit keine Interaktion der rekombinanten UBR-Domäne von PRT6 mit endogenem RD21a nachgewiesen werden.

3.3.8. Ubiquitylierung von rekombinantem RD21a in Pflanzenextrakt

Zur weiteren Überprüfung ob RD21a in Abhängigkeit seines präsentierten N-Terminus von PRT6 erkannt und ubiquityliert werden kann, wurde rekombinant exprimiertes X-mRD21a:HA (X = D, RD, G) an HA-Agarose gekoppelt, mit Pflanzenextrakt von Col-0 oder *prt6-1* inkubiert und die Ubiquitylierung via UBQ-AK untersucht.

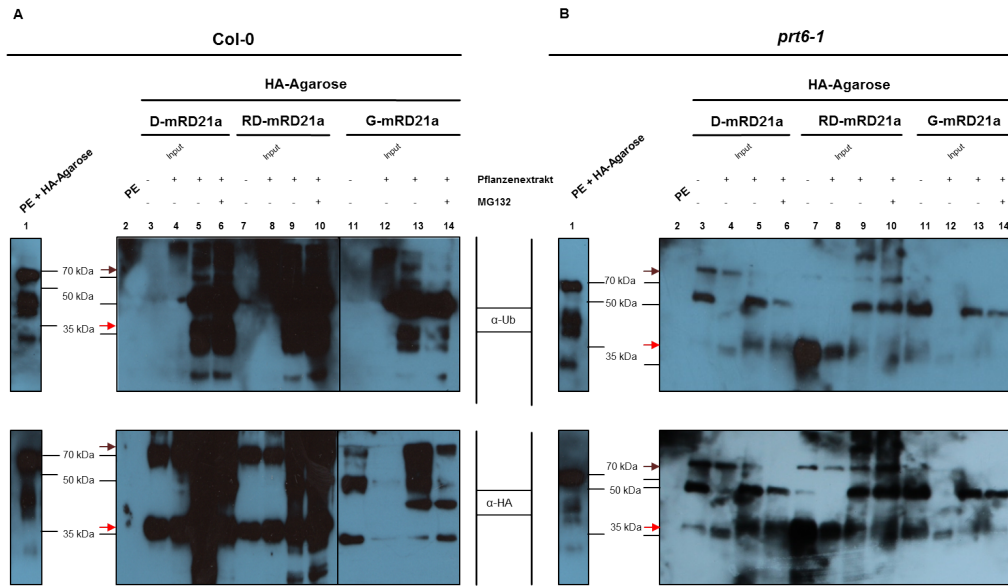


Abbildung 37: Ubiquitinylierung von X-mRD21a:HA in Pflanzenextrakt von Col-0 und *prt6-1*. Gezeigt sind die Western Blots, nach UBQ-AK-Detektion (1:3000, Femto-ECL 30 sek, oben) bzw. HA-AK Detektion (1:1000, Pico-ECL, 1 min, unten) als Ladekontrolle der Experimente mit PE von Col-0 (A) und *prt6-1* (B). 1 zeigt jeweils die Pflanzenextrakte nach Inkubation mit HA-Agarose, 2 den Pflanzenextrakt vor der Reaktion, Spur 3-6, 7-10 und 11-14 zeigen die Proteine X-mRD21a:HA (X = D, RD, G) nach Inkubation im Puffer (Spur 3, 7, 11), Input (Spur 4, 8, 12) Elution nach 3 h Inkubation in Pflanzenextrakt (Spur 5, 9, 13) sowie Inkubation in Pflanzenextrakt mit MG132 (Spur 6, 10, 14), n = 3. Der hellrote Pfeil zeigt die Lage des X-mRD21a:HA Proteins an (ca. 35 kDa), der dunkelrote Pfeil die Lage des ungespaltenen His-MBP-tev-X-mRD21a:HA (ca. 70 kDa). 1 µg rekombinantes Protein je Ansatz eingesetzt.

Der eingesetzte Pflanzenextrakt nach Inkubation mit der HA-Agarose ohne rekombinant gekoppeltes Protein (1 µg) von Col-0 bzw. *prt6-1* ist in der ersten Spur von A und B in Abbildung 37 zu sehen. Es ist kein Unterschied im Bandenmuster zwischen den beiden Genotypen zu erkennen. Mit dem UBQ-AK können jeweils vier Banden detektiert werden. Eine unterhalb der 35 kDa Markerbande, eine Doppelbande zwischen 35 kDa und 50 kDa sowie eine Bande knapp unterhalb der 70 kDa Markerbande. Diese Banden sind auch in allen Ansätzen des Experiments zu erkennen. Bei der größten und der kleinsten Bande handelt es sich wahrscheinlich um die schwere und die leichte Kette des an die Agarosegekoppelten HA-AKs, da diese Banden ebenfalls mit dem HA-AK in beiden Genotypen zu detektieren sind (Pecot und Malhotra 2004). Auch die Doppelbande ist im HA-WB in beiden Genotypen zu erkennen. Der Pflanzenextrakt vor der Zugabe der HA-Agarose ist in Spur 2 für den entsprechenden Genotyp gezeigt. Mit dem UBQ-AK ist eine Schwärzung oberhalb von der 70 kDa Markerbande zu erkennen, welche im Col-0 WB (Abbildung 37 A) stärker ausgeprägt ist. Mittels des HA-AKs ist in diesem Ansatz nichts zu detektieren. D-mRD21a:HA welches an HA-Agarose gekoppelt und für die Dauer des Experiments im Puffer des PEs inkubiert wurde ist in der Spur daneben gezeigt (3). Die siebte Spur zeigt dies für den Ansatz mit dem Protein RD-mRD21a:HA und die elfte Spur mit dem Protein G-mRD21a:HA. In beiden Western Blots, detektiert mit UBQ-AK ist keine Bande zu erkennen, wohingegen beide HA-WBs jeweils in Spur 3 und 7 zwei Banden, in Spur 11 drei Banden

zeigen. In allen drei Ansätzen ist die unterste Bande auf Höhe der 35 kDa Markerbande (X-mRD21a-HA) und die höchste Spur knapp überhalb der 70 kDa-Markerbande. Hierbei handelt es sich um ungespaltenes His-MBP-tev-X-mRD21a:HA Protein. Die Generierung der Substrate ist im Material- und Methodenteil sowie in Naumann et al. 2016 beschrieben. Das Fehlen von His-MBP-tev-GmRD21a:HA ist darauf zurückzuführen, dass G als neuer N-Terminus die ideale Spaltsequenz der TEV-Protease widerspiegelt und daher nur noch ein geringer Anteil an N-terminalen Fusionsprotein vorlag. In Spur 11 in beiden WBs ist jeweils noch eine Bande unterhalb der 70 kDa Markerbande zu erkennen, welche ebenfalls in den Spuren 12-14 zu erkennen ist. Diese entspricht der bereits beschriebenen Bande aus der Inkubation der HA-Agarose mit Pflanzenextrakt von Col-0 bzw. *prt6-1*. In der vierten, achten und zwölften Spur ist die Input Fraktion für die entsprechenden Proteine zu sehen (4: D-mRD21a:HA, 8: RD-mRD21a:HA, 12: G-mRD21a:HA). Im Bild des HA-AKs sind die gleichen Banden zu sehen wie in dem Ansatz, in welchem das rekombinante Protein mit Puffer inkubiert wurde. Der UBQ-AK detektiert erneut ein höhermolekulares Signal. In Spur 5 und 6 ist die Elution der HA-Agarose beladen mit D-mRD21a:HA nach dreistündiger Inkubation mit dem entsprechenden Pflanzenextrakt mit (Spur 6) und ohne (Spur 5) Proteasominhibitor (Abbildung 37) gezeigt. Im Falle von DmRD21a:HA in Pflanzenextrakt von Col-0 erkennt man, sowohl mit UBQ-AK als auch mit HA-AK ein Signal in der Spur, beginnend auf Höhe der 35 kDa Markerbande. Nach Inkubation von DmRD21a:HA in *prt6-1*-Pflanzenextrakt ist mittels des UBQ-AKs ein Signal von ca. 35 kDa bis ca. 50 kDa zu erkennen, danach zeigt der UBQ-AK eine Bandenleiter, deren Intensität in Gegenwart von MG132 zunimmt. Dieses Signal ist jedoch nicht im HA-AK erkennbar. Hier sieht man jeweils eine Bande auf Höhe der 35 kDa Markerbande, gefolgt von einer Bande bei ca. 50 kDa und einer kurz überhalb der 70 kDa Markerbande. Die Elutionsfraktion des Experimentes von rekombinant exprimierten RD-mRD21a:HA nach Inkubation mit PE mit (Spur 10) und ohne (Spur 9) MG132 sind in den Spuren 9 und 10 gezeigt. Die Ansätze zeigen auf dem Western Blot von Col-0 (A) das gleiche Bild und sind in diesem Falle identisch zu den Spuren 5 und 6 für beide Antikörper-Detektionen. Die HA-markierten Proteine unterscheiden sich darin, dass RD-mRD21a:HA N-terminal eine AS (R) mehr besitzt. Ein ähnliches Bild zeigt sich nach der Inkubation in *prt6-1*-Pflanzenextrakt. Auch hier unterscheiden sich die Ansätze Fünf und Sechs optisch nicht von den Ansätzen in den Spuren 9 und 10. In Spur 10 ist nach Detektion mittels UBQ-AK eine Verstärkung des höhermolekularen Signals zu erkennen. Auch ist nach der Detektion mittels HA-AK eine Leiterbildung der Banden erkennbar. Nach der Inkubation von RD-mRD21a:HA sieht man dort die bereits erwähnten Banden bei 35 kDa, 50 kDa und oberhalb von 70 kDa, danach ist jedoch im Gegensatz zur Inkubation von DmRD21a:HA in *prt6-1* ein Signal des WBs im höhermolekularen Bereich zu erkennen, ähnlich wie bei den Spuren 9 und 10 nach Inkubation in Pflanzenextrakt von Col-0, wobei diese eine sehr viel stärkere Intensität aufweisen. Die Elutionsfraktion des Proteins G-mRD21a:HA nach Inkubation in Pflanzenextrakt von WT bzw. *prt6-1* ist in den letzten beiden Spuren der WBs gezeigt

(13,14). Im Ansatz des Wildtyps ist ein Signal von 35 kDa bis ca 50 kDa mit Hilfe des UBQ-AKs zu erkennen, ähnlich den Ansätzen mit DmD21a-HA (Abbildung 37B: 5,6) und RD-mRD21a-HA (Abbildung 37B: 9,10) des *prt6-1*-Extraktes. Oberhalb von 70 kDa ist eine schwache Bandenleiter zu erkennen, wobei die Anwesenheit von MG132 keinen sichtbaren Effekt hat. In diesen Spuren sind mittels HA-AK drei Banden sichtbar. Die erste ist auf Höhe der 35 kDa Markerbande, die zweite kurz darüber und die dritte kurz oberhalb der 70 kDa Markerbande. Im Ansatz ohne Inhibitor ist zudem ein kontinuierliches Signal zwischen der ersten und der letzten Bande zu sehen. Im Experiment nach Inkubation von G-mRD21a:HA in Pflanzenextrakt von *prt6-1* sind unabhängig von MG132-Zugabe mittels UBQ-AK drei Banden zu erkennen. Eine Doppelbande bei ca. 35 kDa und eine Bande bei ca. 50 kDa. Zwei Banden der Größe 35 kDa und 50 kDa sind ebenfalls unter Verwendung des HA-AKs detektierbar. Auch hier hat der Einsatz von Proteasominhibitor keinen sichtbaren Effekt. Insgesamt entspricht der Ansatz von G-mRD21a-HA in beiden Genotypen dem Bild des entsprechenden Pflanzenextraktes ohne rekombinantes Protein (Spur 1). Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass rekombinantes D-mRD21a-HA als auch RD-mRD21a-HA im Pflanzenextrakt von Col-0 ubiquitinyliert wird. Im Gegensatz dazu ist dies nicht für G-mRD21a-HA sowohl in Col-0 als auch in *prt6-1* zu beobachten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass lediglich RD-mRD21a-HA in Pflanzenextrakt von *prt6-1* in geringerem Maße als in Col-0 ubiquitinyliert wird.

3.3.9. Ubiquitinylierung von endogenem RD21a

Nachdem gezeigt werden konnte, dass rekombinantes RD21a in Col-0 N-terminal spezifisch ubiquitinyliert wird, sollte die Ubiquitinylierung von endogenem RD21a in Col-0 sowie den *N-end rule pathway*-Mutanten *ate1 ate2* und *prt6-1* untersucht werden. Endogen ubiquitinylierte Proteine können mit Hilfe von Tandem Ubiquitin Binding Entities (TUBE) aus Pflanzenextrakt isoliert und auf einem Western Blot visualisiert werden (Hjerpe et al. 2009; Lopitz-Otsoa et al. 2012; Aillet et al. 2012).

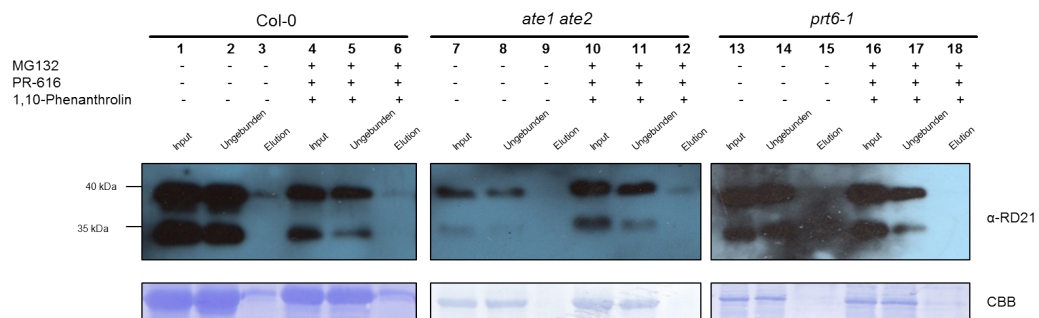


Abbildung 38: Ubiquitinylierung von endogenem RD21a in Pflanzenextrakt von Col-0, *ate1 ate2* und *prt6-1*. Dargestellt sind die Western Blots der TUBE-Versuche in Col-0 ohne (Spur 1-3) und mit MG132 und DUB-Inhibitoren (Spur 4-6), in *ate1 ate2* ohne (Spur 7-9) und mit MG132 und DUB-Inhibitoren (Spur 10-12) und in *prt6-1* ohne (Spur 13-15) und mit MG 132 und DUB-Inhibitoren (Spur 16-18). WB α-RD21a (1:1000, Pico-ECL, 90 sek), WB α-UBQ (1:3000, Femto-ECL, 30 sek) Die Ladekontrolle erfolgte mittels Coomassiefärbung (CBB), n (je Genotyp) = 3.

Die Experimente zum Pull-down von ubiquitinyliertem endogenen RD21a wurden in Pflanzenextrakt ohne Inhibitoren und in Anwesenheit von MG132, sowie den DUB-Inhibitoren PR-619 und 1,10-Phenanthrolin zur Anreicherung polyubiquitinylierter Proteine parallel durchgeführt (Abbildung 38). Die Input Fraktionen des Col-0-Pflanzenextrakts zeigen zwei Banden auf Höhe der 35 kDa Markerbande sowie der 40 kDa Markerbande. Hierbei handelt es sich um die Banden für mRD21a und iRD21a. Die Fraktion der ungebundenen Proteine nach der Inkubation mit TUBE ist in Spur zwei und fünf zu sehen. Erneut sind die beiden Banden für die endogenen RD21a-Varianten sichtbar. Die Elutionsfraktionen hingegen zeigen für Col-0 beide eine Bande auf Höhe der 40 kDa Markerbande (entspricht iRD21a) unabhängig von Ab- und Anwesenheit der Inhibitoren.

Im Genotyp der *ate1 ate2* Doppelmutanten zeigt der Western Blot ein anderes Bild. Erneut zeigt der WB des Pflanzenextrakts die beiden spezifischen Banden für iRD21a und mRD21a (Spur 7 und 10). Hierbei ist zu sehen, dass die Intensität von iRD21a stärker ist im Vergleich zu mRD21a, ein experimenteller Fehler (Verbrauch ECL-Substrat) kann hier nicht ausgeschlossen werden. Dies zeigt sich auch in der Fraktion der ungebundenen Proteine (Spur 8 und 11). Es sind keine Banden für RD21a in der Elutionsfraktion ohne Inhibitoren zu sehen (Spur 9), die Spur ist leer, wohingegen eine Bande bei ca. 40 kDa in der Elutionsfraktion des Pflanzenextraktes zu sehen ist, welcher mit Proteasom- und DUB-Inhibitoren behandelt wurde (Abbildung 38, Spur 12).

Auch im Pflanzenextrakt von *prt6-1* sieht man im Input zwei Banden entsprechend der zuvor erwähnten Größe (Spur 13 und 16). Auch hier ist iRD21a (40 kDa) im Verhältnis zu mRD21a (35 kDa) höher abundant. Die Fraktion der ungebundenen Proteine (Spur 14 und 17 in Abbildung 38) zeigt nach Detektion mittels RD21a-AK diese beiden Proteinbanden. Wie bereits im Genotyp der *ate1 ate2* Doppelmutanten, kann in der Elutionsfraktion ohne Inhibitoren keine Proteinbande detektiert werden (Spur 15). In Anwesenheit von MG132, PR-619 und 1,10-Phenanthrolin ist nach Elution des TUBE-Materials eine schwache Bande auf Höhe der 40 kDa Markerbande detektierbar (Spur 18). So konnte gezeigt werden, dass RD21a in allen drei Genotypen *in vivo* ubiquitinyliert wird, dies jedoch in den Mutanten des *N-end rule pathways* stark reduziert ist, im Vergleich zum Wildtyp. Exemplarisch wurde ein Versuch mit dem Genotyp der Mutante *rd21-1* durchgeführt (Abbildung A10, siehe Anhang). Es konnte keine Bande in der Elutionsfraktion mittels des RD21a-AKs detektiert werden.

4. Diskussion

Mittels Literaturrecherchen und komparativer Proteomik war es möglich eine Liste neuer, potentieller Substrate des *N-end rule pathways* in *Arabidopsis* zu erstellen und durch Etablierung neuer innovativer Enzymassays, diese biochemisch näher zu charakterisieren. Im Folgenden findet die Diskussion der Ergebnisse zu den Proteinen RIN4, TGG2 und RD21a hinsichtlich ihrer möglichen Rolle als *N-end rule*-Substrat, sowie die Einordnung der Methodik und die biologische Relevanz der erhaltenen Ergebnisse statt.

4.1. RIN4 als bona fide Substrat des N-end rule pathways

Aus Literaturrecherchen ergab sich RIN4 als erstes potentielles Substrat des *N-end rule pathways* (Chisholm et al. 2005; Day et al. 2005; Kim et al. 2005a; Kim et al. 2005b; Takemoto und Jones 2005; Varshavsky 2011; Gibbs et al. 2016). Dieses Protein ist mit seinem C-Terminus an der Zellmembran verankert und mit der Abwehrreaktion nach Pathogenbefall von *P. syringae* assoziiert (Kim et al. 2005b). Unter anderem wird es durch die Protease AvrRpt2 von *P. syringae* an zwei konservierten Schnittstellen (PX₁FGX₂W) gespalten, wobei X₁ variabel ist und X₂ den N-end rule relevanten N-Terminus widerspiegelt (Chisholm et al. 2005; Takemoto und Jones 2005). Die Spaltung des Proteins N- und C-terminal führt zu einem zur Generation eines neuen N-Terminus (AS11 = X₂ der ersten Schnittstelle), zum anderen, durch die Abspaltung des Membranankers (zweite Spaltstelle nach AS152), zur Freisetzung des Proteins von der Membran in das Zytosol der Zelle. Dieses mobile Fragment RIN4₁₁₋₁₅₂ aktiviert anschließend die ETI (Kim et al. 2005a; Day et al. 2005). Verschiedene Studien an Peptiden sowie dem Vollängenprotein RIN4 in Blättern von *N. benthamiana* legten die Vermutung nahe, dass RIN4 ein Substrat des *N-end rule pathways* darstellen könnte (Chisholm et al. 2005), wohingegen Studien an diesem Protein in *Arabidopsis* dagegen argumentieren, da hier keine Stabilisierung bzw. Destabilisierung in Abhängigkeit des *N-end rule pathways* gezeigt werden konnte (Kim et al. 2005a; Day et al. 2005). Trotz dieser widersprüchlichen Ergebnisse wird RIN4 als *N-end rule pathway* Substrat angesehen (Varshavsky 2011; Gibbs et al. 2016, TAIR, www.arabidopsis.org). Die Ergebnisse dieser Arbeit und einer 2013 betreuten Masterarbeit (Mai 2013) zeigen den Versuch der biochemischen Charakterisierung von RIN4 als *N-end rule* Substrat und somit die mögliche Einordnung als solches.

Nach Prozessierung durch AvrRpt2 präsentiert das mobile Fragment von RIN4 (AS11-152) ein N als neuen N-Terminus im Zytosol. Diese AS ist tertiär destabilisierend im *N-end rule pathway*, was bedeutet, dass das Protein in einem ersten Schritt N-terminal zu D deamidiert werden müsste. So könnte anschließend durch die N-terminale Arginylierung, katalysiert

durch ATE1/2, die primär destabile AS R in der Zelle präsentiert werden. Diese würde durch die potentielle E3-Ligase PRT6 in *Arabidopsis* erkannt und das Protein nach Ubiquitylierung dem 26S-Proteasom zugeführt werden (Garzón et al. 2007; Gibbs et al. 2014a). Abbildung 4 zeigt diese mögliche Prozessierung des Fragments RIN4₁₁₋₁₅₂ schematisch. Die Stabilität des natürlich auftretenden Fragments N-RIN4₁₁₋₁₅₂ wurde sowohl *in vivo* in Protoplasten als auch *in vitro* im zellfreien Kanincheretikulozytenlysat untersucht. Hierbei traten entgegengesetzte Ergebnisse auf. Zum einen kann eindeutig eine Stabilisierung von N-RIN4₁₁₋₁₅₂:YFP in Protoplasten von *ate1 ate2* sowie *prt6-1* im Vergleich zu Col-0 Protoplasten gezeigt werden (Abbildung 10). Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich bei RIN4 um ein Substrat des *N-end rule pathways* handeln könnte und auch die WBs (Abbildung A2, Anhang) zeigen die Stabilisierung des Fragments in den Mutanten im Vergleich zu Col-0. Im Wildtyp könnte das eingebrachte Protein entsprechend Abbildung 4 prozessiert werden, wohingegen es in der *ate1 ate2*-Mutante nach der Deamidierung nicht arginyliert werden kann. In der *prt6-1* Mutante sollte keine Ubiquitylierung stattfinden (Graciet und Wellmer 2010). Zum anderen konnte jedoch keine Destabilisierung von X-RIN4₁₁₋₁₅₂ (X = N, D, RD, G) in Abhängigkeit des N-Terminus *in vitro* observiert werden (Abbildung 9). Die Stabilisierung bzw. Destabilisierung pflanzlicher Proteine kann im Lysat von Kaninchenretikulozyten gezeigt werden, da der *N-end rule pathway* in Pflanzen und Tieren hochkonserviert ist (Gibbs et al. 2014a) und bereits die *N-end rule pathway*-Substrate der ERFVII-Gruppe erfolgreich hinsichtlich ihrer Stabilität in diesem System untersucht wurden (Gibbs et al. 2011). Der kommerziell erhältliche Weizenkeimextrakt ist nicht anwendbar, da hier kein aktives Proteasom vorhanden ist (Anderson et al. 1983). Die Proteine X-RIN4₁₁₋₁₅₂ (X = N, D, RD, G) wurden vor der Behandlung mit CHX in gleichen Mengen im Kaninchenretikulozytenlysat exprimiert. 90 min nach Blockierung der Proteinbiosynthese durch Zugabe von CHX ist die Abundanz aller Proteinvarianten nahezu unverändert. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass das Protein unabhängig seines präsentierten N-Terminus stabil zu sein scheint und nicht abgebaut werden kann. In der Masterarbeit von Frau Carolin Mai wurde das gleiche Experiment einmalig mit ³⁵S-markiertem Methionin durchgeführt. Hierbei wurde der Abbau mittels Autoradiographie verfolgt, welche durch die Intensitätsmessungen sensitiver als die Western Blot Analyse ist. Die Ergebnisse aus dieser Arbeit zeigen eine Tendenz zur Degradation von X-RIN4₁₁₋₂₁₁ in Abhängigkeit seines präsentierten N-Terminus. Jedoch unterliegen die Messungen starken Schwankungen und sind aufgrund der Einmaligkeit des Experiments vorsichtig zu betrachten. Auch sollte berücksichtigt werden, dass das betrachtete Fragment der Masterarbeit RIN4₁₁₋₂₁₁ nicht dem nativ vorkommenden Fragment RIN4₁₁₋₁₅₂ entspricht. Die Einordnung von RIN4 als *N-end rule*-Substrat basiert auf Stabilitätsuntersuchungen einer nicht-natürlich vorkommenden 30 AS langen Proteinsequenz (21 AS nach Spaltung durch AvrRpt2) in *N. benthamiana* (Takemoto und Jones 2005). Unabhängige Untersuchungen zeigten zudem, dass die Membranlokalisation von RIN4 ebenfalls eine wichtige Funktion

hinsichtlich seiner Stabilität spielt (Kim et al. 2005b). Dies legt die Vermutung nahe, dass RIN4 unabhängig seines präsentierten N-Terminus abgebaut werden kann. Daher ist die Betrachtung des nativ im Zytoplasma vorkommenden RIN4₁₁₋₁₅₂ wichtig für dessen Einordnung hinsichtlich der N-terminal abhängigen Degradation.

Die erste biochemische Reaktion gemäß der *N-end rule* wäre die Deamidierung von N-RIN4₁₁₋₁₅₂ zu D-RIN4₁₁₋₁₅₂. In *Arabidopsis* wurden mittels Homologierecherche zu den bekannten Säuger-NTAs zwei putative Deamidasen NTAN1 und NTAQ1 identifiziert und hinsichtlich ihrer Substratspezifität im Zuge einer Bachelorarbeit charakterisiert (Graciet et al. 2010; Kind 2013). Die Ergebnisse der Bachelorarbeit von Frau Anne Kind zeigen, dass NTAQ1 spezifisch Q-Peptide als Substrate erkennt und somit die Deamidierung von Q zu E katalysiert. Dennoch konnte ebenfalls ein geringer Umsatz von N zu D durch dieses Enzym gemessen werden (Kind 2013). Da eine Expression und Reinigung einer katalytisch aktiven NTAN1 in verschiedenen Organismen nicht möglich war, wurde untersucht, ob NTAQ1 in der Lage ist N-RIN4 zu D-RIN4 umzusetzen. In Abbildung 11 ist klar zu erkennen, dass dies nicht zutrifft. Sollte N-RIN4₁₁₋₁₅₂ ein Substrat des *N-end rule pathways* darstellen, wird es möglicherweise durch NTAN1 deamidiert (Graciet et al. 2010). Es konnte bisher jedoch nicht gezeigt werden, dass NTAN1 die einzige Deamidase in *Arabidopsis* für N darstellt. Es ist daher ebenfalls denkbar, dass RIN4 durch eine bisher unbekannte Deamidase umgesetzt wird.

Der zweite Schritt der Prozessierung von RIN4₁₁₋₁₅₂ ist die Arginylierung von D-RIN4 zu RD-RIN4 entsprechend Abbildung 4. Abbildung 12 zeigt die Arginylierung von D-RIN4 zu RD-RIN4, katalysiert durch ATE1 aber nicht durch ATE2. Die Reaktion ist N-terminal spezifisch, da das Protein G-RIN4 ebenfalls nicht von ATE1 arginyliert wurde. Daher kann vermutet werden, dass bei natürlichem Vorkommen von D-RIN4₁₁₋₁₅₂ dieses durch ATE1 zu RD-RIN4 arginyliert werden kann. Die rekombinante ATE2 scheint enzymatisch inaktiv zu sein, da auch keine Arginylierung der Positivkontrolle beobachtet werden konnte. Es ist daher nicht auszuschließen, dass RIN4 *in vivo* nicht auch durch dieses Enzym arginyliert werden kann.

Fasst man alle Ergebnisse der Untersuchungen von RIN4 als *N-end rule* Substratkandidaten zusammen, ergibt sich kein klares Bild. Die Stabilisierung von N-RIN4₁₁₋₁₅₂ in den Protoplasten der *N-end rule*-Mutanten legt einen N-terminal abhängigen Abbauweg nahe, gestützt wird dies durch die eindeutige Arginylierung von D-RIN4 zu RD-RIN4 *in vitro* und den bereits publizierten Untersuchungen (Takemoto und Jones 2005). Jedoch war es nicht möglich, die Deamidierung des nativ auftretenden Fragments N-RIN4 zu zeigen, da das dafür vermutlich nötige Enzym nicht funktionell exprimiert werden konnte (Kind 2013). Dies wäre ein Schlüsselexperiment, denn nur die Umsetzung von N-RIN4 zu D-RIN4 würde diese auftretende Variante des RIN4 *in vivo* generieren. Die Arginylierung von D-RIN4 *in vitro* durch die ATE1 zeigt, dass es ein Substrat des Abbauweges sein könnte. Sollte D-RIN4 *in vivo* nicht vorkommen, so kann vermutet werden, dass ATE1 die N-terminal präsentierte

sekundär instabile AS unabhängig von der Proteinidentität arginyliert. Auch die Untersuchungen von Frau Carolin Mai hinsichtlich der Stabilität verschiedener X-RIN4₁₁₋₂₁₁:YFP Fusionsproteine im Wildtyp (X = N, D, RD, G) und in den Mutanten des *N-end rule* (*ate1 ate2*, *prt6-1*) lassen keinen eindeutigen Schluss zu (Mai 2013). Es gibt Hinweise darauf, dass RIN4 ein Substrat des *N-end rule* pathways darstellt. Hierzu zählen die Destabilisierung von N-RIN4₁₁₋₁₅₂ in Wildtypprotoplasten im Vergleich zu *ate1 ate2* und *prt6-1* (Abbildung 10), die Arginylierung von D-RIN4 durch ATE1 *in vitro* (Abbildung 12), sowie die Tendenz zur Destabilisierung im Retikulozytenlysat. Dagegen sprechen die Beobachtungen von Chisholm et al. 2005, sowie der fehlende Nachweis von D-RIN4 und RD-RIN4 *in vivo* und die fehlende Destabilisierung von X-RIN4₁₁₋₁₅₂ im Kaninchenretikulozytenlysat (Abbildung 9). Auch ist es nicht möglich die beiden anderen wichtigen Parameter, neben der instabilen N-terminalen AS, eines *N-end rule*-Substrates in einer Struktur von RIN4 zu validieren. Daher kann keine eindeutige Aussage über die Flexibilität des N-Terminus sowie die strukturelle Nähe ubiquitylierbarer Lysinseitenketten getroffen werden. Die verfügbare Kristallstruktur (PDB-Code: 2NUD) umfasst lediglich das mit AvrB kokristallisierte Peptid von AS 142-176 und das Modell in der Protein Model Datenbank (<http://www.proteinmodelportal.org>) ist unzureichend validiert. RIN4 ist ein intrinsisch ungeordnetes Protein und diese Flexibilität wird durch Phosphorylierung noch erhöht. Im Gegensatz dazu führt die Interaktion mit einem anderen Protein zur Stabilisierung (Lee et al. 2015a). Untersuchungen *in vivo* zeigen eine *N-end rule*-unabhängige Destabilisierung von RIN4 (Dr. Emmanuelle Graciet, persönliche Mitteilung). Zudem wurde RIN4 nicht in den Proteomikexperimenten (Shotgun und DIGE) als hochreguliert in den Mutanten *ate1 ate2* und *prt6-3* detektiert (siehe Tabellen A6, A7, A8 im Anhang). Dies könnte an der zu geringen Abundanz liegen, jedoch ist auch zu beachten, dass, sollte RIN4 nur über diesen Proteindegradationsweg abgebaut werden, es in den *N-end rule*-Mutanten zu einem Überschuss an RIN4 kommen müsste. RIN4 interagiert mit verschiedenen Proteinen der Pathogenabwehr wie zum Beispiel RPM1, RPS2, HopF2 und RIPK (Deslandes und Rivas 2012). Sollte RIN4 nur über den *N-end rule* pathway abgebaut werden, würde es bei dessen Ausfall zu einer Verschiebung des durch RIN4 mediierten Gleichgewichts führen und die Pflanzen durch Aktivierung der PTI energetisch negativ beeinflussen. Die *N-end rule* pathway-Pflanzen sollten dann einen ähnlichen, wenn auch abgeschwächten Phänotyp wie die RIN4-Überexpressionslinien zeigen (Kim et al. 2005a). Daher ist durchaus denkbar, dass RIN4 auch über weitere Degradationswege erkannt und abgebaut wird (Kim et al. 2005a). Eine höhere Abundanz von RIN4 in der Zelle würde zu einer verbesserten PTI führen, da diese erhöht bzw. reduziert in RIN4-Überexpressionen bzw. Nullmutanten ist (Kim et al. 2005b). Des Weiteren wäre ein erhöhter Pool an phosphoryliertem RIN4 im Zytosol zu finden (durch RPK), was eine schnellere bzw. bessere Aktivierung der ETI zu Folge haben müsste (Liu et al. 2011b; Deslandes und Rivas 2012). Dies ist jedoch nicht der Fall, im

Gegensatz dazu konnte bisher kein veränderter Phänotyp in den Mutanten nach Infektion mit *P. syringae* beobachtet werden (Dr. Emmanuelle Graciet, persönliche Kommunikation).

4.2. Identifizierung von potentiellen *N-end rule* pathway Substraten durch komparative Proteomik

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene proteomische Ansätze gewählt, um neue potentielle Substrate des *N-end rule* pathways zu identifizieren. Der Grundgedanke war hier, dass Proteine, welche über diesen Degradationsweg abgebaut werden, in den Mutanten, in welchen Schlüsselkomponenten deletiert sind, im Vergleich zum Wildtyp angereichert sein sollten. In der Doppelmutante *ate1 ate2* sind die beiden potentiellen Arginyltransferasen ATE1 und ATE2 deletiert (Yoshida et al. 2002; Graciet et al. 2009), was zu einer Anreicherung von Proteinen mit sekundär und tertiär destabilen N-Termini (N, Q, C, D, E, C^{ox}) führen könnte, da diese nicht weiter prozessiert werden sollten. In der Mutante *prt6-3* ist das Gen der potentiellen Ubiquitin E3-Ligase PRT6 durch eine T-DNA-Insertion unterbrochen. Es wird diskutiert, dass PRT6 R als primär destabilisierende AS erkennt (Garzón et al. 2007) und dem Abbau zuführt. In der *prt1-1* Mutante ist die mögliche E3-Ubiquitin Ligase, welche F als primär instabile AS erkennen sollte, durch ein vorzeitiges Stopcodon mutiert, sodass Proteine mit einem Typ 2-Degron am N-Terminus stabilisiert sein sollten (Potuschak et al. 1998; Sary et al. 2003). In *prt6-3* sollten daher Proteine mit tertiär, sekundär und mit R und K als primär destabilen N-Terminus angereichert sein und in *prt1-1* Typ 2-Degron-präsentierende Proteine (F, W, Y).

Die DIGE ist von den angewendeten Methoden die insensitivste, da hier zumeist nur ca. 1000 Proteine auf einem Gel visualisiert werden können, wobei es sich um die am höchsten abundanten handelt (Petra et al. 2008). Sie ist relativ schnell und kostengünstig, zudem erlaubt sie nach Detektion die Korrelation von Molekulargewicht (MW) und pI der identifizierten Proteine (Unlü et al. 1997; Lilley und Friedman 2004). In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Proteinfällungsprotokolle angewendet und die resultierenden Proteome mittels DIGE untersucht, da in einem Vorversuch gezeigt wurde, dass unter Verwendung beider Protokolle unterschiedliche Proteine gefällt werden konnten. Somit sollte ein größerer Überblick über das Gesamtproteom erhalten werden. Insgesamt sind in beiden experimentellen Ansätzen über 1900 Proteine auf dem Gel detektiert worden (Abbildung 13, Abbildung 14). Bei der TCA-abhängigen Fällung wurden insgesamt 49 Proteinspots als hochreguliert im Vergleich zum Wildtyp entdeckt (Tabelle A7 im Anhang) und 27 Spots in der TCA-freien Fällung (Tabelle A6, Anhang). Nur zwei dieser Proteinspots waren identisch auf beiden Gelen (CN30/CN142 sowie CN36/CN149). Dies bestätigt den Einsatz der unterschiedlichen Fällungsprotokolle. Die TCA-Fällung wird als sehr effizient und gut zur Visualisierung hochmolekularer Proteine beschrieben (Wongpia et al. 2015), besitzt aber den Nachteil, dass die Proteine mit Beginn der Fällung denaturiert vorliegen und nicht alle Proteine präzipitiert werden (Koontz 2014). Die Fällung ohne Verwendung von TCA erhält

den nativen Zustand der Proteine bis zur Phenolextraktion und ist somit geeignet, Proteine mit geringerem Molekulargewicht zu präzipitieren (Koontz 2014). Dies kann man auf den beiden Abbildungen 13 und 14 sehr gut erkennen (Fulgentini et al. 2008; Wang et al. 2008a; Wongpia et al. 2015). So befindet sich über die Hälfte der als hochreguliert identifizierten Proteine nach TCA-abhängiger Präzipitation (Abbildung 13) oberhalb der großen Untereinheit der RuBisCO mit 55 kDa (Andersson und Backlund 2008), wohingegen in der TCA-freien Fällung die Verteilung der Proteine über das gesamte Gel erfolgt (Abbildung 14). Hier ist die Proteinanzahl jedoch wesentlich geringer. Drei Proteine, welche als hochreguliert in den fluoreszenzgescannten Gelen identifiziert werden konnten (nach TCA-Fällung), waren auf dem anschließend silberfärbten Gel nicht visualisierbar und konnten daher nicht isoliert und identifiziert werden. Dies zeigt die Diskrepanz zwischen der hochsensitiven Markierung durch die verwendeten G-Dyes (NH DyeAGNOSTICS) und dem menschlichen Auge. Proteine wurden als hochreguliert angesehen, wenn sie 1,5-fach erhöht zu ihrer Abundanz im Wildtyp waren. Daher konnten diese drei Proteine nicht gepickt werden, da ihre Gesamtabundanz wahrscheinlich so gering war, dass sie nicht mit der Silberfärbung detektierbar waren. Nach der MS-Analyse der extrahierten Proteine, ergab sich eine Summe von insgesamt 248 identifizierten Peptidfragmenten aus den Spots der TCA-Fällung und 156 identifizierte Proteine aus der TCA-freien Fällung. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die gefundenen Peptide in den einzelnen Spots verschiedenen Proteinen zugeordnet werden können, bzw. dass in einem Spot durchaus mehr als ein Protein vertreten sein kann. In den Tabellen A6 und A7 im Anhang sind diejenigen Proteine aufgeführt, welche die höchste Peptidkorrelation im Spot aufwiesen. So ist zum Beispiel die RuBisCO in mehreren Proben detektierbar, dies ist bereits bekannt und wird als Nebeneffekt der DIGE diskutiert (Bindschedler und Cramer 2011).

Die Detektion von hochregulierten Proteinen in den *N-end rule pathway* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp mittels Shotgun ist im Vergleich zur DIGE eine sensitivere Methode, welche es ebenfalls erlaubt stark hydrophobe sowie sehr kleine bzw. sehr große Proteine zu quantifizieren (Mathy und Sluse 2008). In *ate1 ate2* sind insgesamt 146 hochregulierte Proteine identifiziert worden, in *prt6-3* sind es insgesamt 109 und 332 in *prt1-1*. Somit konnten mittels Shotgun wesentlich mehr Proteine detektiert werden, als mittels DIGE. 64 Einzelproteine waren allein in der *ate1 ate2* Doppelmutante angereichert (Abbildung 15). Hier könnte es sich um Proteine handeln, welche eine tertiär oder sekundär instabile AS nach Prozessierung präsentieren (Gibbs et al. 2014a). 51 Proteine waren ausschließlich in der *prt6-3*-Mutante erhöht. Hierbei könnte es sich um Substrate des *N-end rule pathways* handeln, welche ein R, H oder ein K als N-Terminus präsentieren (Gibbs et al. 2014a). 13 Proteine waren in beiden *ate1 ate2* und *prt6-3* verglichen zum Wildtyp hochreguliert (Abbildung 15). Hierbei könnte es sich um Proteine handeln, welche erst arginyliert und anschließend durch PRT6 ubiquitinyliert werden. In Tabelle A8 im Anhang sind einige dieser Proteine aufgelistet. Nach Recherchen in den Datenbanken UniProt (www.uniprot.org) und

TAIR (www.arabidopsis.org) konnten für die Kandidaten jedoch keine bestätigten N-Termini in dieser Richtung identifiziert werden. Mit 252 hochregulierten Einzelproteinen stellt *prt1-1* den größten Pool dar. PRT1 bindet als N-Recognin AS des Typ 2-Degron (F, W, Y) (Potuschak et al. 1998; Stary et al. 2003; Gibbs et al. 2014a). In dieser Linie waren zudem 35 Proteine hochreguliert, welche ebenfalls in *ate1 ate2* gefunden wurden und 11, welche ebenfalls in *prt6-3* identifiziert werden konnten (Abbildung 15). Bei diesen kann es sich um Proteine handeln, welche indirekt durch den *Knockout* der *N-end rule pathway* Komponenten betroffen sind, da klar gezeigt werden konnte, dass PRT1 keine Typ 1-Degrone erkennt und PRT6 als N-Recognin für eben diese beschrieben wurde (Garzón et al. 2007; Stary et al. 2003). Dies wäre auch eine Erklärung für die 34 Proteine, welche in allen drei Mutanten hochreguliert waren. Hierbei handelt es sich zum Beispiel um Proteine des allgemeinen Stoffwechsels wie die Gluthathion-S-transferasen 6, 7 und 8, die Glutamatsynthase 2, die Phenylalaninammoniumlyase, die Phosphoenolpyruvatcarboxylase 3, sowie bisher uncharakterisierte Proteine. Denkbar wäre, dass zum Beispiel ein Transkriptionsfaktor (TF), über den *N-end rule pathway* abgebaut wird. Würde die Transkription nicht mehr negativ durch den Abbau des TFs reguliert werden, wäre das Genprodukt, welches in seiner Abundanz erhöht, was eine erhöhte Proteintranslation zur Folge haben würde. Dadurch wären alle nachfolgenden Prozesse ebenfalls beeinflusst, wie es zum Beispiel anhand der TFs AtCBF1-3 und MYB96 mittels Überexpressionslinien gezeigt wurde (Yamasaki und Randall 2016; Lee et al. 2015b). So sind in MYB96-Überexpressionslinien alle getesteten Gene stärker exprimiert als im Wildtyp. Somit kann es durch die Stabilisierung eines Proteins über einen Arm des *N-end rule pathways* (PRT6 oder PRT1) zur Hochregulation von Proteinen kommen, welche selbst keine Substrate des Abbauweges darstellen.

Vergleicht man die Rohdaten beider experimenteller Ansätze und validiert die gefundenen Proteine über das MW anhand der 2D-Gelelektrophorese, können 53 Proteine als hochreguliert identifiziert werden (Tabelle A8, Anhang). Nach Überprüfung der bereits erwähnten Datenbanken, sowie www.webexpasy.org hinsichtlich einer N-terminalen Prozessierung, wurden sechs Kandidaten als potentielle *N-end rule pathway*-Substrate ausgewählt. Hierbei handelt es sich um das mitochondriale NAD-abhängige Malatenzym 2 (NAD_ME2) welches nach Abspaltung einer Signalsequenz ein Cystein als neuen N-Terminus präsentieren könnte (Tronconi et al. 2010b; Tronconi et al. 2010a; Tronconi et al. 2012). Dieser ist jedoch nicht durch MS-Messungen validiert. Die Untereinheit der in den Chloroplasten lokalisierten Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (Chan et al. 2001) und TGG2 (Barth und Jander 2006; Islam et al. 2009; Liebming et al. 2012; Kim et al. 2013c) präsentieren beide ein K als neuen N-Terminus nach Abspaltung der N-terminalen Sequenz. Des Weiteren wurde im Genotyp *prt6-3* die Methylesterase PCR A (Bethke et al. 2014) identifiziert, diese präsentiert nach Abspaltung eines Signalpeptides ein F als neuen N-Terminus. Da F als Typ 2-Degron von PRT6 vermutlich nicht erkannt wird, wurde dieses Protein aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Zwei Proteine präsentieren nach

Prozessierung ein D als neuen N-Terminus. Zum Einen handelt es sich um die ER-lokalisierte β -Glukosidase 23 (Siemens et al. 2011), welche jedoch in allen drei Mutanten hochreguliert ist (Tabelle A8, Abbildung A14 Anhang). Zum Anderen um die apoplastische Cystein-Protease RD21a (Gu et al. 2012). Zusammenfassend betrachtet war es durch die Kombination zweier unterschiedlicher proteomischen Ansätze (DIGE und Shotgun) möglich mehrere potentielle Substratkandidaten zu identifizieren. Der Vorteil dieser Herangehensweise ist die Validierung der gefundenen Proteine durch die jeweils andere Methode. Die Ergebnisse der Studien zu TGG2 und RD21a als *N-end rule* Substrate werden im Folgenden diskutiert.

4.3. TGG2 als *N-end rule pathway* Substrat

Wie bereits unter 4.2. erwähnt, wurde die Myrosinase TGG2 in den vergleichenden Proteomikexperimenten in den *N-end rule pathway*-Mutanten als hochreguliert identifiziert. In *Arabidopsis* ist der Begriff „Myrosinase“ ein Synonym für Thioglukosid-Glukohydrolase (TGG) (Xue et al. 1992; Chadchawan et al. 1993) und das Glucosinolat-Myrosinase System ist die Hauptkomponente der chemischen Abwehr gegen Pilze, Insekten und Bakterien. Glucosinolate sind sekundäre Metabolite, die durch Spaltung von AS durch Myrosinasen entstehen (Bones et al. 2001). Da die Aktivität der Myrosinasen bei geringer Substratspezifität (Barth und Jander 2006) sehr hoch ist, sind Substrat und Enzym entweder in unterschiedlichen Zellen oder Zellkompartimenten lokalisiert. (Koroleva et al. 2000; Thangstad et al. 2004). Bei Zerstörung der Kompartimente durch z. B. Frassbefall kommen Enzym und Substrat zueinander und führen die Entstehung toxischer Nebenprodukte wie Isothiocyanaten, Nitrilen und Thiocyanaten (Wittstock und Halkier 2002) herbei. In *Arabidopsis* kodiert eine Genfamilie, die sechs Gene verzeichnet, für verschiedene Myrosinasen (TGG1-6) (Xu et al. 2004). TGG 1 (At5g26000) und TGG 2 (At5g25980) konnten hierbei als Hauptbestandteil der Myrosinaseaktivität identifiziert werden (Barth und Jander 2006) und sind im ER, in den ER-Körperchen als auch in der Vakuole lokalisiert (Agee et al. 2010b). Besonders abundant sind sie in den sogenannten Myrosinzellen, die an der Epidermis und in Phloemnähe lokalisiert sind. Es konnte gezeigt werden, dass TGG1 und 2 stabil im pH-Bereich von 3-8 und eine erhöhte Aktivität in Anwesenheit von Ascorbat als Kofaktor zeigen. Dies ist einzigartig für pflanzliche Myrosinasen. Beide Enzyme arbeiten redundant wobei TGG1 aktiver ist (Zhou et al. 2012). In der Mutante *tgg1 tgg2* ist die Gesamtmyrosinaseaktivität auf 1% reduziert (Barth und Jander 2006). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Spaltung von Indolglucosinolaten durch TGG wichtig in der Abwehrreaktion von nekrotrophen Organismen ist. Der durch das Pathogen induzierte Zelltod kann durch die Produkte der TGG-abhängigen Indolglucosinolatspaltung inhibiert und so das Wachstum des Eindringlings reduziert werden. Es konnte nur TGG2 nach der TCA-abhängigen Fällung in Spot CN 134 im Genotyp *prt6-3* entdeckt werden (Tabelle A7 im Anhang) und war im Shotgun in den Mutanten *ate1 ate2* und *prt1-1* im Vergleich zum

Wildtyp hochreguliert (Tabelle A8 im Anhang). Mit einem Molekulargewicht von 63 kDa liegt es oberhalb der großen Untereinheit der RuBisCO. Schwer erklärbar ist das Auftauchen von hochreguliertem TGG2 in der *prt1-1* Mutante. Möglich wäre, dass es in diesem Falle durch einen sekundären Effekt in dieser Mutante vermehrt auftritt. Das Inaktivieren einzelner Komponenten des *N-end rule pathways* scheint sich auf die Gesamthomöostase der Pflanze auszuwirken (Tabellen A6, A7, A8 im Anhang). TGG2 ist eine im ER und im Tonoplasten lokalisierte Glukosidase, deren Aktivität durch die Bildung von Glukosinolaten unter anderem das Schließen der Stomatazelle (Islam et al. 2009) und eine Pathogenabwehrantwort (Barth und Jander 2006) bewirkt. Die Störung der Zellhomöostase könnte daher eine erhöhte Expression von TGG2 zur Folge haben (Barth und Jander 2006). Um in die Vakuole transportiert zu werden, zeigt TGG2 nach der Translation ein N-terminales Signalpeptid, welches AS1-28 (www.uniprot.org) umfasst. Nach dessen Abspaltung würde dies zur Generierung eines Lysins als neuen N-Terminus führen. Dieses Peptid wurde *in vivo* bereits identifiziert (Ueda et al. 2006). In einer Kooperation mit Dr. René Zahedi und Frau Saskia Venne am ISAS in Dortmund wurde ebenfalls eine vergleichende Proteomik mit den bereits erwähnten Genotypen durchgeführt. Mit Hilfe der ChaFRADIC-Methode (Venne et al. 2013; Venne et al. 2015), sollten spezifisch die N-Termini aller Proteine in den Pflanzen von Col-0, *ate1 ate2*, *prt6-3* und *prt1-1* angereichert und dann hinsichtlich ihrer Abundanz in den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp untersucht werden. Die Menge an angereicherten Proteinen war sehr gering, sodass diese Methode nicht in die qualitative Auswertung der vergleichenden Proteomik aufgenommen wurde. Jedoch war es in dieser Kooperation möglich, den N-Terminus von TGG2 in dem Material von *prt1-1* und *ate1 ate2* erneut nachzuweisen (Tabelle A8, Anhang) In beiden Proben wurde das N-terminale Peptid KPEEEITCEENVPFTCSQTDR identifiziert. Da es im Genotyp *prt6-3* als hochreguliert entdeckt wurde, kann die Glukosinodase TGG2 durchaus ein *N-end rule*-Substrat darstellen. In dieser Mutante sind mit K, als primär instabile AS, beginnende Peptide stabiler als im Wildtyp (Garzón et al. 2007), was einen fehlenden Abbau und damit eine Hochregulation auf Proteinebene zur Folge haben würde.

Die *in vitro* Stabilitätsuntersuchungen im Kanincheretikulozytenlysate zeigen keine N-terminal abhängige Destabilisierung von X29-TGG2 (Abbildung 17). Da bereits unter Punkt 4.1. die mögliche Limitierung dieses Systems diskutiert wurde, wurde die Stabilität des Vollängenproteins sowie der möglicherweise nativ vorkommenden N-terminal prozessierten Variante K-TGG2 im Vergleich zu einer *N-end rule pathway*-abhängig stabilisierten Version G-TGG2 (Giglione et al. 2003), unter erneuter Verwendung der UFT, als C-terminale YFP-Fusionsproteine *in vivo* in Mesophyllprotoplasten von *Arabidopsis* untersucht (Abbildung 33, Abbildung 34, Abbildung 35). Es wurde erwartet, sollte TGG2 nach der Abspaltung dieser Signalsequenz ein Substrat des *N-end rule pathways* darstellen, dass K-TGG2 im Wildtyp destabilisiert ist im Vergleich zu G-TGG2. Dieser Effekt sollte nicht in der Mutante *prt6-1* auftreten. Das Vollängenprotein, welches noch die native Signalsequenz besitzt, war

zytosolisch detektierbar, was vorherigen Untersuchungen in stabil transformierten Pflanzen entspricht (Agee et al. 2010a). Jedoch ist keines der drei Fusionsproteine in *prt6-1*, bezogen auf den Wildtyp, stabilisiert (Abbildung 35). Sowohl das Volllängenprotein als auch die beiden N-terminal prozessierten Varianten sind in beiden Genotypen nahezu exakt in gleichen Mengen vorhanden. Dieses Ergebnis lässt mehrere Schlussfolgerungen zu. Bisher ist keine Kristallstruktur des Proteins bekannt, jedoch ist ein Modell von AS33-522 in der Protein Model Datenbank (<http://www.proteinmodelportal.org>) vorhanden. Dort ist erkennbar, dass der N-Terminus an der Proteinoberfläche und damit gut zugänglich für die Komponenten des *N-end rule pathways* ist. In direkter Nachbarschaft sind drei Lysinseitenketten lokalisiert, welche durch PRT6 ubiquitinyliert werden könnten (K465, K470, K512; rot markiert in der AS-Sequenz, siehe Anhang). TGG2 hat somit durchaus das Potential ein *N-end rule*-Substrat darzustellen, da sämtliche strukturell notwendigen Anhaltspunkte (destabile AS an einem flexiblen N-Terminus, Lysin in sterischer Nähe) gegeben sind. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus Abbildung 17 besteht die Möglichkeit, dass TGG2 kein Substrat des *N-end rule pathways* darstellt. Es konnte keine Stabilisierung des Volllängenproteins im Genotyp *prt6-1* im Vergleich zum Wildtyp *in vivo* beobachtet werden. Hier sollte der native N-Terminus korrekt prozessiert werden, unabhängig jeder Annotation, und dennoch ist die Stabilität des Fusionsproteins in den beiden Genotypen nahezu gleich (Abbildung 35). Auch der Western Blot in Abbildung A9 (Anhang) zeigte keine Stabilisierung von VL-TGG2 in *prt6-1*. Das Protein wurde zudem in der vergleichenden Proteomik in allen drei Genotypen als angereichert gefunden, was einen Hinweis darauf gibt, dass die Hochregulation eventuell nur ein nachfolgender Effekt in den Mutanten ist. Auch Western Blot Analysen auf Pflanzenmaterial von Col-0, *ate1 ate2* und *prt6-3* Mutanten mit dem Antikörper gegen das endogene Protein konnten keinen Unterschied vom Wildtyp zu den Mutanten zeigen (Daten nicht gezeigt). Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich bei diesem Protein nicht um ein direktes Substrat des *N-end rule pathways* handelt.

4.4. RD21a als N-end rule pathway Substrat

Das zweite potentielle Substrat, welches sich aus der vergleichenden Proteomik ergab, war die Papain-ähnliche Cysteinprotease RD21a. Hierbei handelt es sich um ein vakuolenlokalisiertes Protein, welches nach der Translation sowohl N- als auch C-terminal prozessiert wird (Shindo et al. 2012). Die schematische Darstellung ist in Abbildung 5 gezeigt. Homologe Proteine wurden ebenfalls in Mais und Tomate identifiziert (siehe Abbildung A16, Anhang). Es wurde in der TCA-freien Fällung im Genotyp *prt1-1* als hochreguliert im Vergleich zum Wildtyp detektiert (Tabelle A6, Anhang) und im Shotgun in der Doppelmutante *ate1 ate2*. Wie bereits im Falle von TGG2 ist das Auftauchen von RD21a im Genotyp von *prt1-1* schwer erklärbar. Wenn man die Tabellen A6 und A7 im Anhang, sowie das Venn-Diagramm in Abbildung 15 genauer betrachtet, fällt jedoch auf, dass der

Großteil der hochregulierten Proteine in diesem Genotyp zu finden war. PRT1 erkennt N-Degrone vom Typ 2 (Stary et al. 2003), zu denen insgesamt drei verschiedene AS gehören. Durch den Aktivitätsverlust dieses Proteins kann es demnach zur Akkumulation verschiedenster Proteine kommen, was wiederum zu den bereits in 4.2. diskutierten vermehrten sekundären Effekten, beispielsweise durch Missregulation von TFs, führen kann. Daher ist es durchaus möglich, dass RD21a, welches mit Pathogenabwehr und der Antwort auf Salzstress assoziiert ist (Koizumi et al. 1993; Shindo et al. 2012; Kim und Kim 2013; Misas-Villamil et al. 2016), durch eben solch einen sekundären Effekt in *prt1-1* erhöht vorliegt. Die Tatsache dass RD2a im Genotyp *ate1 ate2* hochreguliert ist, ist dadurch erklärbar, dass es, sollte es ein Substrat des *N-end rule pathways* darstellen, in diesen Pflanzen nicht N-terminal arginyliert werden könnte und somit in der Doppelmutante höher abundant sein müsste. Die beiden N-terminal prozessierten Varianten sind zum einen iRD21a mit einem MW von 35 kDa und zum anderen mRD21a mit einem MW von 22 kDa. Die Identität des N-Terminus beider Proteinvarianten ist bekannt, wobei hier drei potentielle N-Termini detektiert wurden (D135, G134, L136) (Gu et al. 2012). In der Kooperation mit Dr. René Zahedi und Frau Saskia Venne konnte das N-terminale Peptid DELPESIDWR in dem Genotyp von *ate1 ate2* identifiziert und damit der N-Terminus D135 von i/mRD21a unabhängig validiert werden (Abbildung A14 im Anhang). Bisher ist noch keine Kristallstruktur des Proteins bekannt, jedoch gibt es ein Modell von RD21a₄₂₋₃₅₇ im Protein Model Portal. Strukturell betrachtet ist der N-Terminus leicht zugänglich und die Lysine K260/K261 (Abbildung A14, rot markiert) liegen an der Proteinoberfläche direkt in räumlicher Nähe dazu, sodass durchaus alle notwendigen Bedingungen eines *N-end rule*-Substrates gegeben sind. Durch eine qRT-PCR auf der DNA des eingesetzten Pflanzenmaterials wurde zudem bestätigt, dass RD21a transkriptionell nicht erhöht war und somit die höhere Proteinabundanz auf eine Stabilisierung dessen (Abbildung A5, Anhang) in den Mutanten zurückzuführen ist.

Unter Verwendung des Kaninchenretikulozyotenlysats wurde als erstes die Stabilität von X-i/mRD21a in Abhängigkeit der N-terminal präsentierten AS überprüft. Zum Zeitpunkt 0 sind alle Proteine in nahezu gleichen Leveln vertreten, wobei die Bande für D-mRD21a recht schwach ist. Die Intensität der Banden für die iRD21a-Proteinvarianten ist zudem sehr viel stärker, als die Banden der korrespondierenden mRD21a-Proteine, mit Ausnahme von RD-i/mRD21a (Abbildung 18). 90 min nach Blockierung der Proteinsynthese war keine Bande mehr für RD-mRD21a und nur noch eine sehr schwache für D-mRD21a zu detektieren, wohingegen die Bande für G-mRD21a nur leicht an Intensität verloren hat. Ein ähnliches Bild zeichnet sich für die iRD21a-Proteine ab (Abbildung 18). *In vivo* ist der Großteil von RD21a als iRD21a in der Vakuole lokalisiert, in welcher es sich wahrscheinlich durch Aggregation über die Granulin-ähnliche Domäne stabilisiert. Nur ein geringer Anteil an löslichem mRD21a kann dort gefunden werden (Yamada et al. 2001; Gu et al. 2012). Diese Lokalisation konnte mittels Immunolokalisation in Schnitten von Col-0, *ate1 ate2* und *prt6-1* auf zellulärer Ebene

bestätigt werden (Abb A13, siehe Anhang). Gelangt es durch die Zerstörung der Vakuole oder einen bisher unbekanntem Mechanismus in das Zytoplasma, findet wahrscheinlich durch die Abspaltung der Granulin-ähnlichen Domäne durch eine bisher unbekannte Protease die Konvertierung vom unreifen zum reifen Protein statt, sodass das monomere mRD21a als aktives Protein vorhanden ist (Yamada et al. 2001). Proteine mit primär destabilisierenden N-Termini werden sehr schnell abgebaut (Varshavsky 2005; Garzón et al. 2007; Piatkov et al. 2014)). Da D-RD21a bevor es abgebaut werden kann, noch arginyliert werden muss, dauert der Abbau von dieser Proteinvariante wahrscheinlich länger (Brower et al. 2013). G wiederum ist eine stabilisierende AS in der *N-end rule* (Giglione et al. 2003), und sollte daher keinen Abbau des Proteins vermitteln. Zur Überprüfung der Frage, ob der Abbau der X-mRD21a-Proteinvarianten abhängig vom 26S-Proteasom ist, wurde ein Versuch mit gleichzeitiger Zugabe von CHX und MG132 durchgeführt. Hierbei ist der Abbau durch das Proteasom nicht mehr möglich, da MG132 mit der katalytischen 20S-Untereinheit des Proteasoms interagiert und so dessen Aktivität inhibiert (Yu et al. 2003; Guo und Peng 2013). Klar zu erkennen ist die Stabilisierung von D- und RD-mRD21a unter der Verwendung des Inhibitors, wohingegen die Bande für G-mRD21a erneut ein wenig an Intensität verliert (Abbildung 18). Daraus ist zu schließen, dass der Abbau von G-mRD21a nicht über das 26S-Proteasom erfolgt, sondern beispielsweise über Autophagie durchgeführt werden könnte (Appelqvist et al. 2013). Die Daten aus Abbildung 18 legen die Vermutung nahe, dass RD21a Proteasom-unabhängig im verwendeten Kanincheretikulozytenlysat abgebaut werden kann. Es ist möglich, dass es sich hierbei um ein Artefakt durch das Einbringen eines pflanzlichen Proteins in das tierische System handelt. Die Tatsache, dass die Banden nach 90 min CHX-Behandlung nicht die gleiche Stärke aufweisen wie zuvor, kann zwei Gründe haben. Zum einen ist es möglich, dass auch die D- und RD-RD21a-Proteine, wie im Falle von G-RD21a, nicht nur über das 26S-Proteasom degradiert werden. Zum anderen kann es sein, dass die Wirkung von MG132 nicht schnell genug ist und die Inhibierung des Proteasoms nicht sofort beginnt. So besteht durchaus die Möglichkeit, dass sehr instabile Proteine anfangs noch degradiert werden. Dieses Experiment unterstreicht, dass RD21a ein potentiell *N-end rule*-Substrat darstellen könnte, da es in Abhängigkeit seines N-Terminus abgebaut, bzw. stabilisiert wird, wobei die C-terminale Granulin-ähnliche Domäne darauf keinen Einfluss zu haben scheint. Jedoch kann der stabilisierende Effekt dieser Domäne (Yamada et al. 2001; Gu et al. 2012) anhand der Mengen an Protein durchaus bestätigt werden, da die Intensität der Banden für iRD21a sehr viel stärker sind als für mRD21a.

Nachdem die N-terminale Signalsequenz abgespalten wurde, präsentiert RD21a ein D als neuen N-Terminus, welcher nach Freisetzung ins Zytosol in einem ersten Schritt von ATE1 oder ATE2 erkannt und arginyliert werden könnte, um anschließend als Substrat der putativen E3-Ligase PRT6 nach der Bindung ubiquitinyliert und dem 26S-Proteasom zugeführt werden würde (Abbildung 16). Der erste biochemisch wichtige Schritt wäre demnach die Erkennung und anschließende Arginylierung durch eine oder beide ATEs in

Arabidopsis. Zur Überprüfung, ob und welche ATE mit RD21a interagieren kann, wurden zunächst *in vitro* exprimierte His:MBP:tev:ATE1 und His:MBP:tev:ATE2 an Amylose-Harz gekoppelt und anschließend mit Pflanzenextrakt von *ate1 ate2*-Pflanzen inkubiert, da hier keine endogenen ATEs vorhanden sind (Graciet et al. 2009). Proteine, welche mit ATE interagieren, sollten dort angereichert sein (Abbildung 19). Beide Proteinvarianten von RD21a sind im Pflanzenextrakt detektierbar, was anhand der Banden im Überstand deutlich zu erkennen ist. Nach der Elution konnte in der Fraktion der ATE1, jedoch nicht in der ATE2-Fraktion, eine Bande für iRD21a, aber nicht für mRD21a detektiert werden. Dies könnte daran liegen, dass mRD21a in sehr viel geringeren Konzentrationen im Vergleich zu iRD21a vorhanden ist (Wang et al. 2008b). Zudem findet die Konvertierung von iRD21a zu mRD21a wahrscheinlich hauptsächlich im Zytosol statt, da nur ein geringer Teil von löslichem mRD21a in der Vakuole detektiert werden kann (Yamada et al. 2001). In diesem Experiment wurde Pflanzenextrakt aus Keimlingen verwendet, daher stammt der Hauptteil des zu sehenden RD21a aus der Vakuole und es kann sein, dass nach Aufschluss des Materials die physiologisch notwendigen Bedingungen zur Prozessierung der unreifen Version zum reifen Protein nicht gegeben sind. Zudem ist bereits bekannt, dass mRD21a nach Freisetzung in das Zytoplasma durch die Interaktion von SERPIN1 inhibiert wird (Lampl et al. 2010; Lampl et al. 2013). Durch den Aufschluss des Pflanzenmaterials wurden die Kompartimente der Zelle zerstört und SERPIN1 kann mit dem bereits in der Vakuole vorliegenden mRD21a interagieren. Es besteht durchaus die Möglichkeit, dass dieser Komplex anschließend nicht mehr mit ATE1 interagieren kann, was darauf schließen lassen würde, dass nicht nur der *N-end rule* allein die Degradation von RD21a mediiert. Eine weitere Option besteht darin, dass die Interaktion von RD21a und ATE1 der einer Enzym-Substrat-Interaktion entspricht. Hierbei würde das Substrat (RD21a) nach der Reaktion von der ATE1 dissoziieren. Eventuell ist diese Dissoziation durch die Aggregation von iRD21a verlangsamt und daher nur diese Variante an der rekombinanten ATE1 gebunden. Es scheint auch, dass die ATE2 nicht mit RD21a interagiert. Es könnte daran liegen, dass eventuell fehlende eukaryotische posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung und Glykosylierung zur Generierung eines aktiven Enzyms notwendig sind (Voet et al. 2002; Alberts 2011; Strasser 2016), um Substrate zu erkennen und umzusetzen. Bereits in Abbildung 12 wurde gezeigt, dass das in Bakterien exprimierte Protein keine Arginylierungsaktivität besitzt. Es wäre auch denkbar, dass RD21a kein Substrat der ATE2 darstellt. Dieses Enzym ist zu 80% homolog zur ATE1 und katalysiert 20% der Arginylierungen *in vivo* (Graciet et al. 2009). Daher wäre es möglich, dass ATE1 und ATE2 unterschiedliche Substrate arginylieren. Unterstützt wird diese These durch die Interaktionsversuche *in vivo* mittels BiFC in Protoplasten von *Arabidopsis* (Abbildung 21, Abbildung 22). Abbildung 21 zeigt die Ergebnisse der Interaktion von ATE1 mit den Varianten D-i/mRD21a sowie den Negativkontrollen G-i/mRD21a in Col-0. Das Fusionsprotein wird durch die fehlende Lokalisationsequenz im Zytosol exprimiert. In

Abbildung 22 sind die gleichen Versuche mit ATE2 gezeigt. Nur bei der Kombination von ATE1 und D-iRD21a kann ein YFP-Signal im Zytoplasma detektiert werden (Abbildung 21), obwohl in allen Proben die eingebrachten Proteine in gleichen Mengen vorhanden waren (Western Blot, siehe Abbildung 23). Dies validiert die Beobachtung aus Abbildung 19 hinsichtlich zweier Fakten. Zum Einen scheint ATE2 RD21a nicht als Substrat zu erkennen und zum Anderen kann anhand der Ergebnisse in Abbildung 21 gezeigt werden, dass ATE1 scheinbar spezifisch mit iRD21a und nicht mit mRD21a interagiert. Ein YFP-Signal bei der Expression von ATE1 und D-mRD21a konnte nicht detektiert werden, obwohl die Menge an Fusionsprotein in beiden Fällen annähernd identisch war (Abbildung 23). Die mögliche Interaktion mit endogenem SERPIN1 sollte auf diese Ergebnisse keinen Einfluss haben, da durch die Überexpression des Proteins im Zytoplasma SERPIN1 herausverdünnt werden müsste.

Um ein *N-end rule*-Substrat darstellen zu können, muss RD21a jedoch nicht nur von ATE1 erkannt, sondern auch zu RD-RD21a umgesetzt werden. In einem *in vitro* Experiment wurde dies anhand von X-mRD21a (X = D, RD, G) und der rekombinanten ATE1 autoradiographisch überprüft. Die Ergebnisse der Interaktion zeigen zwar eine Spezifität von ATE1 für iRD21a, jedoch war es nicht möglich das Protein X-iRD21a rekombinant zu reinigen. Um den gewünschten N-Terminus sicherzustellen, wurden die Proteine wie unter 2.3.11 gezeigt als His:MBP:tev:X-i/mRD21a-Fusionsproteine exprimiert. Wie in Naumann et al. 2016 beschrieben, kann unter Abspaltung des N-terminalen Tags durch die TEV-Protease der jeweils gewünschte N-Terminus an einem rekombinanten Protein generiert werden (Kapust et al. 2001; Phan et al. 2002). Im Falle von His:MBP:tev:X-mRD21a:HA war die Abspaltung des Reinigungstags möglich, jedoch nicht für die Fusionsproteine His:MBP:tev:X-iRD21a:StrepII. Ein Grund hierfür wäre die auch schon zuvor beobachtete Aggregation von rekombinant exprimiertem iRD21a über die Granulin-ähnliche Domäne (Gu et al. 2012). Somit könnte es sein, dass die TEV-Protease keinen strukturellen Zugang zu der Spaltungssequenz hatte und daher die Spaltung des Fusionsproteins nicht möglich war. Das rekombinant exprimierte mRD21a wurde hinsichtlich seiner korrekten Faltung mittels MV151-Markierung überprüft (Abbildung A11 im Anhang). Hierbei handelt es sich um eine Sonde, welche spezifisch kovalent an das C im aktiven Zentrum des RD21a bindet, wobei dies eigentlich nur die Nebenreaktion ist. MV151 wurde ursprünglich dazu entwickelt, die Untereinheiten des Proteasoms zu markieren (Gu et al. 2010). Die Behandlung der rekombinant exprimierten Proteine (nach Abspaltung des N-terminalen Reinigungstags) mit dieser Sonde (Abbildung A12 im Anhang), zeigt zwei Banden bei 532 nm. Hierbei handelt es sich um das N-terminal freie Protein X-mRD21a:HA (X = D, RD, G), sowie die ungespaltene Variante His:MBP:tev:X-mRD21a:HA. Da MV 151 nur binden kann, wenn das aktive Zentrum von RD21a die korrekte Struktur besitzt, kann davon ausgegangen werden, dass die in dieser Arbeit eingesetzten rekombinanten Proteinvarianten von RD21a aktives Enzym beinhalten. Nach der Arginylierungsreaktion ist deutlich ein Signal in der Spalte von D-

mRD21a, jedoch nicht in den Spalten von RD- und G-mRD21a zu erkennen, welches exakt auf der Höhe des rekombinanten Proteins liegt (Abbildung 20). Somit kann festgestellt werden, dass RD21a in Abhängigkeit seines N-Terminus nicht nur mit ATE1 interagiert (Abbildung 19, Abbildung 21), sondern auch durch diese spezifisch am D135 arginyliert wird (Abbildung 20). Dieser Versuch zeigt jedoch auch, dass die ATE1 ebenfalls mRD21a erkennen kann. Es ist daher denkbar, dass *in vivo* Mediatorproteine existieren, welche die Unterscheidung von iRD21a und mRD21a ermöglichen. Ein Kandidat dafür wäre das bereits erwähnte SERPIN1 (Lampl et al. 2010; Lampl et al. 2013).

RD21a akkumuliert in *Arabidopsis* mit zunehmendem Alter der Pflanze, sodass in 15 Tage-altem Pflanzenmaterial (Col-0) kaum noch unterschiedliche Mengen von iRD21a und mRD21a mittels Western Blot detektierbar sind (Yamada et al. 2001, Abbildung A12). RD21a wurde in der vergleichenden Proteomik im Genotyp *ate1 ate2* als hochreguliert identifiziert. Sollte es ein Substrat des *N-end rule* sein, so müsste es zudem aber ebenfalls in PRT6-Mutanten höher abundant sein als im Wildtyp, da der Abbau durch das Fehlen des N-Rekognins gestört ist (Abbildung 16). Dies wurde auf einem Western Blot von sieben Tage-altem Pflanzenmaterial der Genotypen *ate1 ate2*, *prt6-1*, *prt6-2*, *prt6-3* und dem *Knockout rd21-1* überprüft (Abbildung 24) und ist bereits publiziert (Majovsky et al. 2014). Entsprechend der Literatur ist es in diesem frühen Entwicklungsstadium der Pflanze noch gut möglich die unterschiedlichen Mengen der RD21a-Proteinvarianten zu detektieren (Yamada et al. 2001). Die transkriptionelle und auch post-transkriptionelle Regulation des Gens im Material wurde mittels qRT-PCR kontrolliert (Abbildung 25, Abbildung 26) und zeigt, dass es transkriptionell nicht hochreguliert ist, sondern unter Kurztagbedingungen eher herunterreguliert in den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp ist. Die Abundanz von RD21a in Keimlingen unter Langtag-sowie Kurztagwachstumsbedingungen wurde mittels WB überprüft (Abbildung 24). Dieser Vergleich wurde gewählt, da *ate1 ate2* sowie die PRT6-Mutanten einen veränderten Phänotyp unter Kurztagbedingungen zeigen (Graciet et al. 2009). Das Protein ist in seinen beiden Varianten (i/mRD21a) in den unterschiedlichen Genotypen vorhanden, wobei die Bande für iRD21a stärker ausgeprägt ist, als für mRD21a. Es handelt sich hier um unbehandeltes Pflanzenmaterial, daher war dies zu erwarten, da der Hauptanteil von RD21a aus der Vakuole stammt und zum Großteil durch iRD21a in den Keimlingen repräsentiert wird (Yamada et al. 2001). Es ist aber bereits unter Langtagbedingungen klar zu erkennen, dass die Menge beider Varianten in den Mutanten höher ist als in Col-0. Besser erkennbar ist es unter Kurztagbedingungen. Sowohl in *ate1 ate2* als auch in allen drei *prt6*-Allelen ist die Bande für iRD21a sehr viel stärker als in Col-0, was impliziert dass diese Proteinvariante höher abundant in den Mutanten vorliegt. Auch die Intensität der mRD21a-Bande ist in den Mutanten stärker, jedoch ist der Unterschied nicht so stark wie im Falle des unreifen Proteins (Abbildung 24). Unter Berücksichtigung der WBs der drei *prt6*-Allele wurde mit der Mutante *prt6-2* nicht mehr weitergearbeitet, da alle drei Linien publizierte PRT6-Mutanten-Linien darstellen.

Wenn mehr RD21a in den *N-end rule pathway*-Mutanten zu detektieren ist, ist dieses Protein dann auch aktiv? Mit Hilfe der Sonde DCG-04 sollte dies überprüft werden. Papain-ähnliche Cysteinproteasen sind durch E-64 inhibierbar, da dieses Molekül wie ein Substrat an das katalytische C im aktiven Zentrum bindet. Diese Bindung ist kovalent, was zu einer Inhibierung der Protease führt (van der Hoorn et al. 2004; Gu et al. 2012). DCG-04 ist ein biotinyliertes Derivat dieses Selbstmordinhibitors (van der Hoorn et al. 2004) und bindet in *Arabidopsis* spezifisch die zwei Proteasen RD21a und AALP (Ahmed et al. 2000), was eine Detektion von katalytisch aktivem RD21a mittels Streptavidin-Antikörper nach der Markierungsreaktion erlaubt (van der Hoorn et al. 2004). Ein Alignment der durch DCG-04 detektierbaren Cysteinproteasen ist im Anhang (Abbildung A15) entsprechend van der Hoorn et al. 2004 angegeben. Dieses Aktivitätsprofil von RD21a wurde für den Wildtyp und die Mutanten *ate1 ate2*, *prt6-1* sowie *prt6-3* durchgeführt. Erneut ist hier die unterschiedliche Abundanz wie bereits in Abbildung 24 zu erkennen. Für alle verwendeten Genotypen wurde eine Bande bei ca. 25 kDa sichtbar, welche nicht mit dem RD21a-AK detektiert werden kann. Hierbei handelt es sich um die bereits erwähnte AALP (Abbildung 27). Es scheint, dass dieses Protein in den *N-end rule pathway*-Mutanten ebenfalls aktiver als im Wildtyp ist und diese Aktivität am höchsten in den *prt6*-Pflanzen ist. Es wurden jedoch keinerlei Untersuchungen hinsichtlich des N-Terminus und der Abundanz dieser Protease durchgeführt. Diese höhere Aktivität kann direkt durch das Inaktivieren der *N-end rule pathway* Komponenten bedingt sein, dann wäre es ebenfalls ein potentiell Substrat (nicht in der vergleichenden Proteomik als hochreguliert identifiziert). Alternativ könnte es sich um einen sekundären Effekt handeln. Es wäre möglich, dass die Stabilisierung von unbekannt Substraten in den Mutanten eine erhöhte Aktivität von AALP zur Folge hat. Aktives iRD21a als auch mRD21a konnte in Col-0 mittels DCG-04 markiert werden, wobei bei Vorinkubation mit E-64 bereits der gesamte RD21a-Gehalt inhibiert vorliegt und somit keine Markierung mehr möglich ist. Hierbei ist zu erkennen, dass mehr aktives iRD21a in dem Pflanzenmaterial vorhanden vorliegt. Auch in *ate1 ate2*, *prt6-1* und *prt6-3* sind beide Proteinvarianten aktiv, wobei hier eine Verschiebung zu beobachten ist. Insgesamt scheint die Menge an aktivem iRD21a in den Mutanten in etwa denen im Wildtyp zu entsprechen, jedoch ist der Anteil an aktivem mRD21a stärker als in Col-0 (Abbildung 27). Es scheint also eine verstärkte Umwandlung von iRD21a zu mRD21a in den Mutanten vorzuliegen. Da iRD21a die Vorstufe zu mRD21a darstellt und in den Ergebnissen zuvor gezeigt wurde, dass ATE1 bevorzugt mit iRD21a zu interagieren scheint, ergibt diese Beobachtung durchaus Sinn. Durch eine Stabilisierung von iRD21a wird das Gleichgewicht der Reaktion von iRD21a zu mRD21a zugunsten des Ausgangsproteins verschoben. Somit kann mehr iRD21a zu mRD21a umgesetzt werden, was eine erhöhte Aktivität von mRD21a bei einer ebenfalls erhöhten Abundanz von beiden Proteinvarianten erklären würde. Daraus kann gefolgert werden, dass RD21a höher abundant in den *N-end rule pathway*-Mutanten und daraus resultierend auch mehr Aktivität vorhanden ist.

Die bisher diskutierten Ergebnisse, lassen vermuten, dass RD21a ein Substrat des *N-end rule pathway* darstellen könnte. Die N-terminal abhängige Destabilisierung *in vitro* (Abbildung 18) und die erhöhte Abundanz der beiden Proteinvarianten in den Nullmutanten (Abbildung 24) wurden in einem *in vivo* Versuch in Protoplasten von *Arabidopsis* untersucht. Hierzu wurde die N-terminal abhängige Stabilität von X-iRD21a:YFP- und X-mRD21a:YFP-Fusionsproteinen (X = D, RD, G) in den drei Genotypen Col-0, *ate1 ate2* sowie *prt6-1* im Verhältnis von kotransformiertem freiem mCherry untersucht. Es wurde erwartet, dass D-i/mRD21a im Vergleich zu G-i/mRD21a im Wildtyp destabilisiert vorliegt, wohingegen es in *ate1 ate2* und *prt6-1* durch die jeweils durch T-DNA-Insertionen inaktivierten *N-end rule pathway*-Komponenten stabilisiert sein sollte. RD-i/mRD21a:YFP sollte sich in Col-0 und *prt6-1* wie das D-i/mRD21a:YFP-Protein verhalten, da es in Col-0 durch den dort intakten *N-end rule* degradiert werden kann, wohingegen dies in *prt6-1* durch die fehlende putative E3-Ligase nicht möglich sein sollte. In der Mutante der Arginyltransferasen wiederum sollte RD-21a:YFP wie auch im WT destabilisiert sein, da die N-terminale Arginylierung bereits vorhanden ist. G-i/mRD21a:YFP sollte in allen Genotypen stabilisiert sein, da diese AS nicht zu den N-Degrans gehört (Varshavsky 2011). Auch wurde das RD21a-Volllängenprotein als YFP-Fusion in die Protoplasten transfektiert. Dieses sollte, sofern es korrekt prozessiert und anschließend ins Zytosol freigesetzt wird, ein „D“ als N-Terminus präsentieren und daher in den *N-end rule pathway*-Mutanten stabiler als im Wildtyp sein. Die erste Beobachtung in diesem experimentellen Ansatz ist die Lokalisation des YFP-Signals im Zytosol (Abbildung 28, Abbildung 29, Abbildung 30, Abbildung 31). Im Falle der X-i/mRD21a:YFP-Proteine ist dies nicht verwunderlich, da diese wie bereits in den BiFC-Experimenten als N-terminale Ubiquitininfusionsproteine (unter Verwendung der UFT) eingebracht wurden und dort somit die Lokalisationssequenz zur Vakuole fehlt. Jedoch ist auch das Signal für das Volllängenprotein im Zytosol zu erkennen. YFP zeigt kein Fluoreszenzsignal im sauren pH der Vakuole, da es dort partiell denaturiert vorliegt (Zhou et al. 2005). Daher handelt es sich bei dem detektierten YFP-Fusionsprotein entweder um RD21a-Varianten, die im Zytoplasma mislokalisiert sind, um freies (abgespaltenes) YFP oder aber um i/mRD21a, welches nach der kompletten Prozession von proRD21a über die Vakuole erneut in das Zytosol gelangt ist (Abbildung 5). Western Blot-Analysen mit α -GFP-AK konnten jedoch keine Bande für das freie YFP detektieren (Daten nicht gezeigt). Im letzten Falle würde das Protein D135 als N-Terminus präsentieren. Das Volllängen RD21a:YFP-Fusionsprotein ist in den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp nicht signifikant erhöht, jedoch lässt sich ein Trend zur Stabilisierung erkennen (Abbildung 32). Es können also beide postulierten Situationen vorliegen. Ein Teil des Fusionsproteins wird korrekt prozessiert, in das Zytosol freigesetzt, und kann nicht über den *N-end rule pathway* in *ate1 ate2* und *prt6-1* abgebaut werden. Es ist möglich, dass ein Teil der Fusionsproteine durch Fehllokalisierung in das Zytoplasma gelangt, bevor es N-terminal prozessiert werden kann, da durch die Verwendung des Ubiquitinpromotors eine konstitutive Überexpression der Fusionsproteine induziert wird (Grefen et al. 2010).

Normalerweise werden solche Proteine sofort über Chaperone zurückgeführt, bzw. als mislokalisiert erkannt und abgebaut (Fu und Gao 2014; Fujiuchi et al. 2016). Diese Proteine zeigen dann wahrscheinlich keinen destabilisierenden N-Terminus im Sinne des *N-end rule pathways* und sind somit in ihrer Stabilität nicht vom *N-end rule pathway* abhängig. D-mRD21a:YFP ist signifikant stabiler in den Protoplasten der *N-end rule pathway*-Mutanten als im Wildtyp. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen von G-mRD21a:YFP, so sieht man keinen Unterschied im Signal für *ate1 ate2* und *prt6-1*, was bedeutet, dass D-mRD21a:YFP in diesen beiden Mutanten genauso stabil ist wie G-mRD21a:YFP (Abbildung 32). D-iRD21a:YFP ist in Col-0 und *ate1 ate2* genauso destabilisiert wie die mRD21a:YFP-Variante, wohingegen es in *prt6-1* nur eine leichte Stabilisierung anzeigt. Auch sind die G-iRD21a:YFP Proteine in Col-0 und *prt6-1* weniger stabilisiert als ihre korrespondierenden mRD21a-Varianten. Lediglich in *ate1 ate2* ist die Stabilisierung von G-i/mRD21a:YFP nahezu gleich (Abbildung 32). Eine Möglichkeit hierfür wäre, dass es noch einen ATE-abhängigen, aber PRT6-unabhängigen Degradationsweg für iRD21a gibt. Es wäre zum Beispiel möglich, dass die Arginylierung von iRD21a eine andere Funktion hat als die Arginylierung von mRD21a. Erst kürzlich konnte die potentielle Verknüpfung von Autophagie und N-terminaler Arginylierung hergestellt werden (Cha-Molstad et al. 2015a; Cha-Molstad et al. 2015b). Die Rolle von RD21a ist jedoch dahingehend nicht klar, da diese Protease bisher nicht mit Autophagie in Zusammenhang gebracht werden konnte. Hierbei werden zytosolische Proteine in die Vakuole oder das Lysosom zur Ubiquitin-abhängigen oder -unabhängigen Degradation aufgenommen (Kraft et al. 2010). Es gibt drei Möglichkeiten: Die Makroautophagie, wobei zytosolische Komponenten von einer Doppelmembranstruktur umgeben werden, welche das Autophagosom formt. Dieses fusioniert anschließend mit der Vakuole (im tierischen System mit dem Lysosom) und die Proteine werden über vakuoläre (lysosomale) Hydrolasen degradiert. Bei der Mikroautophagie werden die Proteine direkt von der Vakuolenmembran aufgenommen (Cuervo 2004). Die dritte Form ist die Chaperon-abhängige Autophagie, bei welcher Chaperone anhand bestimmter Signalsequenzen das betreffende Protein binden und dem Lysosom zuführen. Dieser Teil der Autophagie konnte jedoch bisher nur in Tieren nachgewiesen werden, in Pflanzen sind nur die beiden zuvor erwähnten Möglichkeiten der Autophagie bekannt und in *Arabidopsis* kann dies unter anderem nach oxidativem Stress beobachtet werden (Xiong et al. 2007). Sowohl in Col-0 als auch in *prt6-1* sind beide ATEs vorhanden und so könnte es sein, dass durch diese Modifikation die Spaltung der Granulin-ähnlichen Domäne nicht mehr korrekt durchgeführt werden kann (Yamada et al. 2001; Gu et al. 2012). Eine andere Erklärung wäre, dass PRT6 nicht die einzige potentielle E3-Ligase des *N-end rule* in Pflanzen darstellt, welche R als primär destabilisierende AS erkennt. Somit wäre es möglich dass in den *prt6-1*-Protoplasten ein anderes N-Rekognin das arginylierte iRD21a erkennt und dem Abbau zuführt. Diese redundante Funktion ist bei den N-Rekogninen im tierischen System bereits beschrieben (Varshavsky 2011; Tasaki et al. 2012). Es würde dazu führen, dass D-iRD21a:YFP in

Protoplasten von *prt6-1* nicht so stark stabilisiert wird wie in *ate1 ate2*-Protoplasten. Da aber auch G-iRD21a:YFP weniger stabil ist als G-mRD21a:YFP in WT und in *prt6-1*, ist die vielversprechendste Erklärung, dass dieses Protein im Zytoplasma durch andere Mediatoren erkannt und dem Abbau zugeführt wird, welche eventuell durch Arginylierung aktiviert werden. Dies würde den Unterschied der Stabilisierung von G-i/mRD21a:YFP in *ate1 ate2* gegenüber den beiden anderen Genotypen erklären. Dass es unabhängig der N-terminalen Arginylierung ist, zeigen die Ergebnisse der Stabilisierung von RD-i/mRD21a:YFP (Abbildung 32). Erneut ist hier genau das erwartete Ergebnis zu beobachten. RD-i/mRD21a:YFP ist sowohl in Col-0 als auch in *ate1 ate2* aufgrund des intakten *N-end rule pathways* destabilisiert, weil für dieses Konstrukt keine Arginylierungsaktivität zur Generierung des destabilisierenden N-Terminus notwendig ist. Die Ubiquitylierung dieses Proteins kann in *ate1 ate2* im Gegensatz zu *prt6-1* geschehen was zu einer Stabilisierung von RD-i/mRD21a:YFP in *prt6-1* im Vergleich zu Col-0 und *ate1 ate2* führt. Ist RD21a erst einmal N-terminal arginyliert, scheint es über den *N-end rule pathway* abgebaut zu werden. Im Anhang (Abbildung A8) ist ein WB zu den Experimenten von X-mRD21a:YFP (X = D, RD, G) gezeigt. Auch ist erkennbar, dass D- und RD-mRD21a in Col-0 destabilischer als G-mRD21a sind, wohingegen in *prt6-1* kein Unterschied zwischen den Intensitäten der Banden zu sehen ist. In *ate1 ate2* ist die Bande für RD-mRD21a:YFP schwächer als die anderen beiden Varianten. Dieses Experiment validiert die Stabilitätsuntersuchungen *in vitro* (Abbildung 17) und erneut konnte beobachtet werden, dass RD21a in Abhängigkeit seines präsentierten N-Terminus destabilisiert vorliegt. Es kann eine direkte Verbindung zum pflanzlichen *N-end rule pathway* gezogen werden, da hier die Mutanten der Komponenten verwendet wurden. Außerdem liegt die Vermutung nahe, dass die höhere Abundanz und daraus resultierende Aktivität von endogenem RD21a, darauf zurückzuführen ist, dass es sich hierbei um ein Substrat des *N-end rule pathways* handelt.

Der letzte und entscheidende Schritt zur Einordnung von RD21a als erstes mögliches pflanzliches *N-end rule pathway* Substrat, welches nicht mit MC beginnt (Licausi et al. 2013), ist die Ubiquitylierung von RD-i/mRD21a durch die entsprechende E3-Ligase. Es war trotz vieler Versuche nicht möglich PRT6 bakteriell zu exprimieren. Es ist auch noch nicht bekannt, wo die Erkennung von N-Rekogninen stattfindet und ob PRT6 tatsächlich eine E3-Ubiquitin Ligase darstellt. Die konservierte UBR-Box des Proteins wird als Erkennungsmotiv postuliert (Garzón et al. 2007; Varshavsky 2011; Gibbs et al. 2014a). Diese wurde als His:MBP-Fusion von Herrn Pavel Reichman zur Verfügung gestellt und wie zuvor ATE1/2 an Amylose-Harz gekoppelt und mit Pflanzenextrakt von *prt6-1* inkubiert. Als Negativkontrolle wurde in diesem Fall freies His-MBP eingesetzt, um so unspezifische Bindungen detektieren zu können. Es konnte keine Bande im Eluat mit der UBR-Domäne detektiert werden (Abbildung 36). Die Ergebnisse in den verschiedenen experimentellen Ansätzen mit PRT6-Mutanten lassen dennoch vermuten, dass RD21a in *prt6* stabilisiert ist. Möglich wäre, dass der Anteil an arginyliertem i/mRD21a zu klein ist, um auf dem WB detektiert zu werden. Die

annotierte UBR-Domäne von PRT6 könnte auch nicht für die Erkennung von R-Degrans zuständig sein oder aber die Annotation in der Datenbank falsch und diese Domäne eventuell größer sein, als das verwendete rekombinante Protein. Es wäre auch möglich, dass durch die alleinige Expression dieser einzelnen Domäne die Struktur nicht mehr der nativen Faltung entspricht und somit die Funktionalität nicht gegeben ist. Andere strukturelle Elemente des Vollängenproteins könnten zur korrekten Erkennung essentiell sein. Dies konnte bereits für die E3-Ubiquitin-Ligase COP1 gezeigt werden (Uljon et al. 2016). Um eine bessere Beurteilung zur Ubiquitylierung von RD21a in Abhängigkeit seines präsentierten N-Terminus treffen zu können, wurde ein *in vitro* Ubiquitylierungsversuch von rekombinanten X-mRD21a:HA (X = D, RD, G) in Pflanzenextrakt von Col-0 und *prt6-1* durchgeführt (Abbildung 37). Sowohl mit HA- als auch mit UBQ-AK sind einige Banden verschiedener Größen zu erkennen, was auf eine unspezifische Bindung von Proteine aus dem Pflanzenextrakt an die verwendete HA-Agarose zeigt. Nach 1,5 h Inkubation in Col-0-Pflanzenmaterial mit den Proteinen D- und RD-mRD21a:HA detektiert man mittels UBQ-AK ein starkes Signal, welches auf Höhe der 35 kDa Markerbande beginnt und sich bis in den höhermolekularen Bereich erstreckt. Die Intensität ist in den Ansätzen des Pflanzenextrakts mit Proteasominhibitor noch stärker als ohne MG132 (Abbildung 37). Dieses Signal fehlt in den Proben, in denen G-mRD21a:HA inkubiert wurde. Auch bei Betrachtung des korrespondierenden WBs detektiert mit HA-AK sieht man in den Ansätzen von D-mRD21a:HA und RD-mRD21a:HA mit ohne ohne Proteasominhibitor eine Leiterbildung, welche auf die Polyubiquitylierung zurückzuführen ist. Dies zeigt deutlich, dass D- und RD-mRD21a:HA in Col-0 ubiquityliert werden können. Die Versuche mit Pflanzenextrakt von *prt6-1* zeigen zudem, dass es sich hier um eine PRT6-abhängige Polyubiquitylierung handelt, denn es ist durchgezogenes Signal ab 35 kDa für die Ubiquitylierung von D-mRD21a:HA (Spur 5 und 6, Abbildung 37) zu sehen. Jedoch kann mit dem UBQ-AK eine starke Bande auf Höhe der 35 kDa-Markerbande detektiert werden, welche mit der Bande für das Fusionsprotein D-mRD21a:HA in ihrer Größe korrespondiert. Möglich wäre, dass hier eine Monoubiquitylierung vorliegt, welche nicht auf PRT6 zurückzuführen ist. Für das Protein RD-mRD21a:HA kann auch in *prt6-1*-Pflanzenmaterial nach der Inkubation eine Polyubiquitylierung beobachtet werden, jedoch ist diese nicht so stark wie im Wildtyp. Dies suggeriert, dass RD-mRD21a:HA durch andere E3-Ligasen erkannt und ubiquityliert werden könnte. Eine dieser Ligasen ist bereits bekannt. Es handelt sich hierbei um das salzinduzierte LOG2 (Kim und Kim 2013). Diese könnte auch für die Monoubiquitylierung von D-mRD21a:HA verantwortlich sein. Die Beteiligung einer anderen *N-end rule pathway*-E3-Ligase wäre ebenfalls denkbar. G-mRD21a:HA wird auch in *prt6-1* nicht ubiquityliert. Dieses Experiment ist in seinem Aufbau sehr artifiziell, da es rekombinant in *E. coli* exprimiertes Protein mit Pflanzenextrakt kombiniert. Um diese so gewonnenen Ergebnisse zu validieren, wurde in einem *in vivo* Experiment der Status an endogen ubiquitylierten RD21a unter Verwendung von TUBE-Material überprüft. Hierbei ist die Ubiquitin-bindende

assoziierte Domäne des Proteins UBA1 an Agarose gekoppelt, welches ubiquitinylierte Proteine erkennt und bindet. Dieses wurde mit Pflanzenextrakt von Col-0, *ate1 ate2* und *prt6-1* inkubiert und anschließend eluiert. Ubiquitin wird in der Zelle von DUBs zu Recyclingzwecken von den degradierten Proteinen wieder abgespalten. Dadurch unterliegt allerdings das sogenannte Ubiquitom einer dynamischen Variation (Suresh et al. 2016). Um diese besser untersuchen zu können, wurden die Versuche daher auch in Anwesenheit von DUB- und Proteasominhibitoren durchgeführt (Abbildung 38). Die Eluate wurden zuerst mittels RD21a-AK auf die Anwesenheit von endogenem RD21a überprüft und der Hauptteil des Proteins ist auch nach der Inkubation mit TUBE im Überstand zu finden. Jedoch zeigen die WBs deutlich, dass iRD21a nach der Elution im WT detektierbar ist. Dies bedeutet, dass ein Teil des Proteins ubiquitinyliert vorliegt. Diese Bande ist bereits ohne den Einsatz von Inhibitoren zu sehen. Auch nach Inkubation mit DUB- und Proteasominhibitor kann eine Bande auf der Höhe der iRD21a-Bande von der Agarose eluiert werden. Nur unter Zugabe der genannten Inhibitoren ist es möglich eine Bande für iRD21a in *ate1 ate2* zu detektieren, wohingegen kein RD21a mittels TUBE aus dem *prt6-1*-Pflanzenextrakt eluiert werden kann. Somit konnte die *in vitro* beobachtete N-terminal abhängige Ubiquitinylierung (Abbildung 37) durch die Ubiquitinylierung von endogenem RD21a abgesichert werden.

Zusammengefasst lassen die Ergebnisse dieser Arbeit zu RD21a als potentiell *N-end rule pathway*-Substrat nur einen Schluss zu. Es konnte gezeigt werden, dass iRD21a mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Substrat des *N-end rule pathways* in *Arabidopsis* darstellt. Dieses Protein ist als hochreguliert in *ate1 ate2* in der vergleichenden Proteomik identifiziert worden. Der publizierte N-Terminus wurde unabhängig noch einmal validiert. Zudem kann eine höhere Proteinabundanz und daraus resultierende erhöhte Menge an aktivem Protein detektiert werden. Die Interaktion von iRD21a mit ATE1 aber nicht mit ATE2 konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, wobei die ATE1 mRD21a N-terminal spezifisch argininyliert. Die Stabilität des Proteins ist *in vitro* und *in vivo* N-terminal-abhängig. Trotz der fehlenden Interaktion von endogenem RD21a und der UBR-Domäne von PRT6 konnte eine PRT6-abhängige Degradation bzw. Ubiquitinylierung gezeigt werden. Trotz dieser biochemischen Charakterisierung konnte kein sichtbar veränderter Phänotyp, neben der erhöhten Proteinabundanz und –aktivität, gefunden werden. Es wird angenommen, dass RD21a als vakuoläre Cysteinprotease nach Freisetzung in das Zytosol eventuell pathogene Proteine spaltet und so zur Immunabwehr der Pflanze beiträgt. Ein erhöhter Proteinanteil an RD21a in den Mutanten des *N-end rule*, sollte dementsprechend eine erhöhte Resistenz gegen verschiedene pathogene Organismen wie den nekrotrophen Pilz *Botrytis cinerea* oder aber *Pseudomonas syringae* als Hemibiotroph aufweisen. Es wurde gezeigt, dass die *Knockout*-Mutante von RD21a eine erhöhte Empfänglichkeit für *B. cinerea* aufweist (Shindo et al. 2012). Dies konnte nicht reproduziert werden und entspricht anderen Experimenten, wo ebenfalls kein Effekt in dieser Mutante gezeigt wurde (Lampl et al. 2013). Auch die erhöhte Anfälligkeit der *N-end rule*-Mutanten gegenüber diesem nekrotrophen Organismus (Marchi

et al. 2016) konnte nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt, Versuche mit *B. cinerea* B05.10 durchgeführt in Kooperation mit Dr. Lennart Eschen-Lippold und Dr. Justin Lee). Infektionsversuche mit *Pseudomonas syringae* zeigten entsprechend vorangegangener Experimente (Shindo et al. 2012; Lampl et al. 2013) ebenfalls keine Unterschiede zwischen RD21a, dem Wildtyp und den *N-end rule pathway*-Mutanten. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass RD21a nicht allein diese Funktion im Zytosol ausübt und daher die Anreicherung in den Mutanten keinen Effekt auf die Gesamtreaktion der Pflanze hat. Das pflanzliche Genom kodiert über 100 verschiedene Cysteinproteasen welche im Zytosol, ER und im Apoplasten vorkommen (García-Lorenzo et al. 2006; Lu et al. 2015). Das Ausschalten einer einzelnen Protease kann daher durchaus durch eine andere Protease kompensiert werden. Außerdem würde die Anreicherung in den *N-end rule*-Mutanten dahingehend kompensiert werden, dass betreffende andere Proteasen transkriptionell herunterreguliert werden.

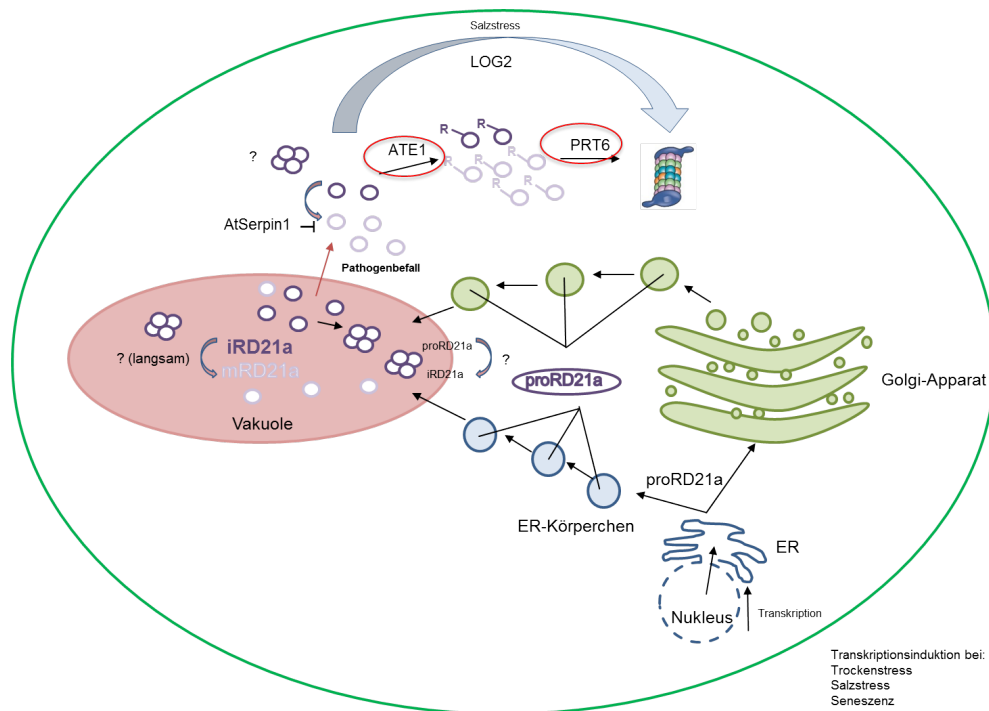


Abbildung 39: Schematische Darstellung der Prozessierung und des Abbaus von RD21a.

Für RD21a als *N-end rule*-Substrat kann folgendes Schema postuliert werden (Abbildung 39): Es wird als proRD21a translatiert und entweder über ER Körperchen (Hayashi et al. 2001) oder aber über den Golgi-Apparat (Yamada et al. 2001) zur Vakuole transportiert. Dort findet über eine noch unbekannte Protease (Yamada et al. 2001) die Abspaltung der N-terminalen Signalsequenz statt und iRD21a wird in die Vakuole aufgenommen, in der es über seine Granulin-ähnliche Domäne durch Aggregation stabilisiert wird (Gu et al. 2012). In der Vakuole findet zum Teil bereits die Abspaltung dieser Domäne statt, da ebenfalls mRD21a als lösliches Monomer in dem Kompartiment vorgefunden werden kann (Yamada

et al. 2001). In der seneszenten Zelle, aber auch nach Pathogenbefall, kommt es zur Freisetzung beider katalytisch aktiver RD21a-Proteinvarianten in das Zytoplasma, wo zum Einen die vollständige Umwandlung von iRD21a zu mRD21a über einen unbekanntem Mechanismus auftritt (Hayashi et al. 2001). Zum Anderen kann das Protein dort als Protease aktiv werden, wobei jedoch bisher noch keine Substrate bekannt sind. Es konnte bereits gezeigt werden, dass in *Arabidopsis* SERPIN1 im Zytoplasma mit mRD21a interagiert und dieses katalytisch hemmt, um so eventuell fälschlicherweise im Zytosol auftretendes Protein zu inaktivieren (Lampl et al. 2010; Lampl et al. 2013). Die bereits bekannte E3-Ligase (LOG2) welche mit RD21a interagiert, wird durch Salzstress induziert, was bedeutet, dass der LOG2 vermittelte Abbau von RD21a nicht unter ungestressten Bedingungen induziert ist (Kim und Kim 2013). Das Modell zeigt die Möglichkeit, dass im Zytosol auftretendes iRD21a von der ATE1 erkannt und arginyliert wird, sodass es ein Substrat der putativen E3-Ligase PRT6 darstellt und dem 26S-Proteasom zugeführt werden kann. Vorstellbar ist, dass der Proteinkomplex aus RD21a und SERPIN1 N-terminal unabhängig abgebaut werden kann. Auch das bereits bekannte Substrat Rap2.12 kann über einen *N-end rule*-unabhängigen Weg degradiert werden (Giuntoli et al. 2014; Papdi et al. 2015), zumal der Abbau von Rap2.12 im *N-end rule* relativ langsam ist (Kosmacz et al. 2014). Der *N-end rule pathway* könnte ein zweites Sicherheitsnetz zur effektiveren Proteindegradation und somit Aufrechterhaltung der Gesamthomöostase der Zelle darstellen. Studien im Maussystem legen bereits die Vermutung nahe, dass dieser Proteindegradationsweg dazu dienen könnte, Peptide und Proteine aus der Zelle zu entfernen, um die Zelle so vor Selbsttoxikation durch zu hohe Proteinkonzentration zu schützen (Jiang et al. 2014). Es wird bereits ein Zusammenhang von *N-end rule* und Autophagie vermutet, was diese These durchaus stärkt (Tasaki et al. 2013b; Kim et al. 2013b; Cha-Molstad et al. 2015a; Cha-Molstad et al. 2016).

5. Zusammenfassung

Mit Hilfe von vergleichender Proteomik war es möglich, ein neues Substrat des *N-end rule pathways* zu identifizieren und nachfolgend biochemisch zu charakterisieren. Es konnten 53 Proteine identifiziert werden, welche in beiden experimentellen Ansätzen hochreguliert auf Proteinebene in den Mutanten auftauchten. Fünf von ihnen zeigen einen zum Teil noch nicht validierten, destabilen N-Terminus nach Prozessierung (nach Datenbankrecherche) und nur zwei wurden in dieser Arbeit genauer untersucht. Des Weiteren konnte hier gezeigt werden, dass das Protein RIN4, welches als *N-end rule* Substrat in gängigen Datenbanken zu finden ist, wahrscheinlich kein Substrat darstellt. Es wird nicht N-terminal abhängig *in vitro* degradiert und auch Experimente anderer Forschungsgruppen untermauern diese These, wohingegen die Stabilisierung von N-RIN4₁₁₋₁₅₂ in *ate1 ate2*- und *prt6-1*-Protoplasten im Vergleich zum Wildtyp wiederum für die Rolle des Proteins als ein Substrat des *N-end rule pathway* sprechen. Die *in vitro* Deamidierungsexperimenten mit der NTAQ1 zeigten, dass N-RIN4 kein Substrat der NTAQ1 darstellt.

Die Untersuchungen zu TGG2 legen die Vermutung nahe, dass dieses Protein kein Substrat des *N-end rule* darstellt. Es wurde zwar in der vergleichenden Proteomik als hochreguliert in den Mutanten des Abbauweges entdeckt und der potentiell destabilisierende N-Terminus validiert, jedoch konnte keine N-terminal abhängige Destabilisierung *in vitro* (Retikulozyten) und *in vivo* (Mesophyllprotoplasten) nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zur Untersuchung von RD21a zeigen, dass es sich hierbei um das erste identifizierte Substrat des *N-end rule pathways* handelt, welches nicht mit MC beginnt. Es wurde als hochreguliert in der vergleichenden Proteomik entdeckt und zeigt eine N-terminale Destabilisierung *in vitro* (Kaninchenretikulozyten) als auch *in vivo* (Mesophyllprotoplasten). Des Weiteren konnte sowohl die Interaktion mit der ATE1 *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen, sowie in einem Arginylierungsversuch der Umsatz von D-RD21a zu RD-RD21a gezeigt werden. In dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass RD21a in den Mutanten des *N-end rule* abundanter ist als im Wildtyp und das dies nicht auf eine erhöhte Transkription des Gens unter diesen Bedingungen zurückzuführen ist. Auch konnten Hinweise darauf gefunden werden, dass RD21a *in vivo* ein Substrat der putativen E3-Ligase PRT6 darstellt. So wird rekombinant exprimiertes D-RD21a/RD-RD21a in Pflanzenextrakt von Col-0 eindeutig ubiquitinyliert, während dies nicht der Fall bei *prt6-1*-Extrakt ist. Des Weiteren konnte eindeutig endogen ubiquitinyliertes RD21a in WT detektiert werden, was in den Mutanten *ate1 ate2* sowie *prt6* der nicht Fall war.

6. Ausblick

Es konnten über 53 Proteine als hochreguliert in der vergleichenden Proteomik identifiziert werden. Von vielen ist der in den Datenbanken angegebene N-Terminus lediglich postuliert und somit nicht validiert. Weiterführend sollten also diese Proteine hinsichtlich ihres Potentials als Substrat des Proteinabbaues näher betrachtet werden. Berücksichtigt man die Tatsache dass sowohl *ate1 ate2* als auch *prt6*-Pflanzen einen sichtbar veränderten Phänotyp unter Kurztagbedingungen im Vergleich zum Wildtyp zeigen, so wäre es durchaus sinnvoll DIGE- und Shotgun-Experimente mit Pflanzen, welche unter diesen Bedingungen angezogen wurden, durchzuführen. Auch sollten Mutanten wie *ntan1*, *ntaq1* und Tripelmutanten *ate1 ate2 prt6* mit einbezogen werden. Ein anderer experimenteller Ansatz wäre, diese Genotypen unter verschiedenen Stressen proteomisch zu vergleichen. Anbieten würde sich hier in einem ersten Experiment der Vergleich unter Wasserstress. Hier sollten als Positivkontrolle die Proteine der ERFVII als stabilisiert in den Mutanten auftreten.

Da die *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse zu RIN4 widersprüchlich hinsichtlich seiner Rolle als *N-end rule pathway*-Substrat sind, wäre es angebracht diese Stabilitätsuntersuchungen *in vivo* auch noch einmal mit den anderen Varianten X-RIN4₁₁₋₁₅₂:YFP (X = D, RD, G) in Mesophyllprotoplasten von Col-0, *ate1 ate2* und *prt6-1* durchzuführen. Auch sollte das Vollängenprotein hinsichtlich seiner Stabilität in diesen Genotypen untersucht werden. Des Weiteren gäbe es die Möglichkeit RIN4 in induzierbaren Linien mit der pathogenen Protease AvrRpt2 zu untersuchen. Dazu müsste das Konstrukt in die Mutanten des *N-end rule pathways* gekreuzt werden und nach Induktion der Protease müsste man dann die Abundanz des endogenen RIN4 über eine bestimmte Zeit verfolgen. Es wäre zu erwarten, dass RIN4 im Wildtyp schneller abgebaut wird als in den Mutanten-Linien. Des Weiteren sollte die Deamidase NTAN1 rekombinant aktiv exprimiert werden, um mit diesem Enzym die Umwandlung von N-RIN4 zu D-RIN4 zu untersuchen. Die Arginylierung durch die ATE1 konnte *in vitro* gezeigt werden, allerdings sollte dies auch *in vivo* nachgewiesen werden. Hierzu müsste man Überexpressionslinien von N-RIN4 in *prt6* erzeugen und nachfolgend das Protein mittels des C-terminalen YFPs isolieren, um dann den N-Terminus mit Hilfe der ChaFRADIC-Methode als arginyliert nachzuweisen.

Die bisher durchgeführten Experimente zur Charakterisierung von TGG2 als Substrat des *N-end rule pathways* zeigen keinen N-terminal abhängigen Abbau des Proteins. Zur weiteren Klärung sollten TUBE-Versuche analog zu den bereits für RD21a beschriebenen durchgeführt werden. Hierbei könnte man einen genaueren Einblick in die *in vivo* Ubiquitylierung des Proteins bekommen. Zudem sollte man auch die Transkriptmenge von TGG2 in dem eingesetzten Pflanzenmaterial in DIGE und Shotgun überprüfen. Eventuell

handelt es sich bei der Hochregulation in der vergleichenden Proteomik nicht um eine Stabilisierung auf Proteinebene, sondern um eine erhöhte Transkription, welche durch die Stabilisierung eines Tfs zustande kommt. Ein *in vitro* Ubiquitylierungsversuch mit rekombinantem PRT6 würde Klarheit geben, ob K-TGG2 ein Substrat der E3-Ligase darstellt und ob PRT6 tatsächlich diese Funktion erfüllt. Dazu müsste die E3-Ligase gereinigt werden. Sollte TGG2 dennoch ein Substrat des *N-end rule* sein, so müssten *ate1 ate2* und *prt6* einen myrosinaseabhängigen veränderten Phänotyp zeigen. Zur Reduktion der redundanten Funktion von TGG1 sollten zuvor *tgg1 ate1 ate2* sowie *tgg1 prt6*-Knockoutmutanten gekreuzt werden.

Aufgrund der in dieser Arbeit erzeugten Daten, kann gesagt werden, dass es sich bei RD21a um das erste nachgewiesene pflanzliche Substrat des *N-end rule pathways* handelt, welches nicht mit MC beginnt. Da die Stabilitätsuntersuchungen des Vollängenfusionsproteins RD21a:YFP *in vivo* nicht eindeutig waren, wäre es nötig, dieses Protein unter einem schwächeren Promotor zu untersuchen. Auch wäre der Nachweis des arginylierten RD21a-Fragments *in vivo* der finale Beweis dass es sich um ein Substrat des Abbauweges handelt. Hierzu gibt es zwei Möglichkeiten. Zum Einen kann man D-RD21a:YFP in Protoplasten von *prt6-1* exprimieren, über eine GFP-Trap reinigen und anschließend zur MS-Analyse verwenden. Die andere Möglichkeit besteht darin, das endogene RD21a aus *prt6*-Mutanten mittels DCG-04 zu markieren und dann anhand der Sonde aus dem Material isolieren, um es danach einer massenspektrometrischen Analyse zuzuführen. Das arginylierte Protein sollte identifiziert werden können, da es nicht durch PRT6 abgebaut werden sollte und zudem in dieser Mutante höher abundant ist. Die erhöhte Abundanz der Cysteinprotease sollte sich auch in einem sichtbar veränderten Phänotyp widerspiegeln. Bisher waren die durchgeführten Experimente nicht erfolgreich. Daher wäre es sinnvoll, weitere biotische (zum Beispiel streng biotrophe Pathogene) und abiotische (Starklicht, Zuckermangel) Situationen zu testen, um einen Effekt, welcher auf RD21a zurückzuführen ist, zu beschreiben. Die PRT6-abhängige Ubiquitylierung konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden. Allerdings würde ein *in vitro* Ubiquitylierungsversuch mit PRT6 diese Ergebnisse untermauern, da bisher nicht gezeigt werden konnte, dass es sich hierbei um eine E3-Ubiquitin-Ligase handelt. Des Weiteren sollten die Interaktionsexperimente mit rekombinanten Domänen von PRT6 weitergeführt werden. Hierzu sollte die UBR-Domäne mit anderen Domänen zusammen exprimiert werden, um zu untersuchen, ob ein größeres Protein evtl. die Bindung von RD21a stabilisiert. Auch ist zu überlegen, einen SPOT-Assay mit den N-terminalen Peptiden und der UBR-Box durchzuführen. Dieser sollte ein gutes Ergebnis hinsichtlich der Spezifität von PRT6 zum N-Terminus von RD21a liefern. Zur besseren Beschreibung von RD21a wäre eine Kristallisation des Proteins angeraten. So könnte man anschließend fundierte Aussagen über die Flexibilität und Angreifbarkeit des N-Terminus treffen und zudem eventuell physiologische Substrate der Protease in *Arabidopsis*

durch *docking*-Experimente identifizieren. Dies würde wiederum die Suche nach einem sichtbaren Phänotypen und nach der biologischen Relevanz sehr erleichtern.

7. Danksagung

Ich möchte mich bei allen Personen ganz herzlich bedanke, die mich in meiner Promotionsphase unterstützt habe.

Ich danke Dr. Nico Dissmeyer für die Möglichkeit an diesem hochinteressanten und umfangreichen Projekt wirken zu dürfen. Nico verfügt über die Fähigkeit, schnell zu organisieren was man für ein gutes Experiment benötigt. Er ist offen für neue Ideen und hat mir viele experimentelle Freiheiten während meiner Promotionsphase ermöglicht. Des Weiteren war er mir eine große Hilfe bei der Interpretation der Ergebnisse und der Korrektur dieser Dissertationsschrift.

Ich möchte mich beim Land Sachsen-Anhalt bedanken. Durch die Möglichkeit der Graduiertenförderung konnten drei Jahre meiner Promotion finanziert werden.

Auch bei Frau Prof. Dr. Bettina Hause möchte ich mich ganz herzlich bedanken. Sie war mir als Mentorin in allen Bereichen eine große Unterstützung. Einen großen Teil meiner persönlichen Motivation habe ich aus Gesprächen mit ihr gezogen und sie hatte immer ein offenes Ohr. Sie hat dafür gesorgt, dass ich den „roten Faden“ nicht verliere. Zudem war sie mir eine große Unterstützung bei den Experimenten zu Immunlokalisation.

Ein großer Dank gebührt Dr. Wolfgang Hoehenwarter, Dr. Ines Lassowskat und Frau Petra Majovski für die Durchführung der Shotgun-Experimente, MS-Analyse der Spots und die Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der DIGE-Experimente. Ohne Ihre Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Auch Dr. René Zahedi und Frau Saskia Venne gebührt der Dank für die Durchführung der Pflanzenmaterialanalyse mittels Ihrer ChaFRADIC-, die Validierung der N-Termini der in dieser Arbeit besprochenen Proteine und die Darstellung des RD21a-N-terminalen Peptids.

Frau Dr. Carol MacKintosh möchte ich für das Bereitstellen des RD21a-AKs danken und Prof. Dr. Renier van der Hoorn für die große Hilfe und das nötige Material bei der Durchführung des Aktivitätsprofilings sowie die *rd21* Mutante.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Lennart Eschen-Lippold und Herrn Dr. Justin Lee für die vielen Pathogenversuche auf den Mutantenlinien des *N-end rule pathways*.

Des Weiteren möchte ich mich bei meiner Masterstudentin Carolin Mai und meiner Bachelorstudentin Frau Anne Kind bedanken. Durch ihre Arbeiten zu RIN4 und den Deamidasen konnte das Projekt in seiner Tiefe weiter bearbeitet werden.

Danke sage ich auch zu meinen Kollegen Frederik Faden, Maria Klecker und Pavel Reichman für die wissenschaftlichen und weniger wissenschaftlichen Diskussion und Gespräche im Labor, Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit, Bereitstellung von Proteinen und im Besonderen Frederik für die Weiterführung meines Projektes während meines Mutterschutzes und der folgenden Elternzeit.

Hagen Stellmach war mir eine große Hilfe bei der Immunlokalisation und war immer bereit für wissenschaftliche Gespräche.

Ich bedanke mich auch bei Herrn Prof. Dr. Renier van der Hoorn für die Hilfe und das Material zur Aktivitätsmarkierung von RD21a in Pflanzenmaterial sowie Frau Dr. Emmanuelle Graciet für die Erlaubnis der Erwähnung ihrer unpublizierten Daten im Rahmen dieser Arbeit.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meinem Mann Volker für die akribische sprachliche Korrektur des Manuskripts und die Unterstützung während meiner Promotionszeit. Ebenso danke ich meinem Bruder Florian und meinen Eltern für die Unterstützung in allen Lebenslagen.

IV. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kreislauf des UBQ-Proteasomsystems (UPS).....	17
Abbildung 2: Schematische Darstellung des <i>Ac-N-end rule pathways</i> in Hefe.....	17
Abbildung 3: Schematische Darstellung des <i>Arg-N-end rule pathways</i>	18
Abbildung 4: Schematische Darstellung der potentiellen Prozessierungsschritte des <i>N-end rule pathways</i> für RIN4.....	28
Abbildung 5: Schema zur RD21a-Prozessierung.....	295
Abbildung 6: Reaktionsmechanismus der basenkatalysierten Deamidierung.....	56
Abbildung 7: Mit mCherry und YFP transformierte Mesophyllprotoplasten.....	58
Abbildung 8: Emissionsspektrum des markierten Protoplasten und Intensitätsbilder bei 534 und 610 nm.....	59
Abbildung 9: Stabilität von X-RIN4 ₁₁₋₁₅₂ <i>in vitro</i>	62
Abbildung 10: Stabilität von N-RIN4 ₁₁₋₁₅₂ in Protoplasten von <i>Arabidopsis</i>	59
Abbildung 11: Deamidierungsversuch der NTAQ mit den Peptiden XY-GSGAW (XY=QK, NK, GK, auf Abszisse angegeben) und rekombinantem N-RIN4 ₁₁₋₂₁₁ :Strep.....	60
Abbildung 12: N-terminal abhängige Arginylierung von X-RIN4 (X = D, G).....	65
Abbildung 13: Fusioniertes Gelbild aller DIGE-Gele nach TCA-Fällung.....	67
Abbildung 14: Fusioniertes Gelbild aller DIGE-Gele der TCA-freien Fällung.....	68
Abbildung 15: Unterschiede in der Proteinzusammensetzung der hochregulierten Proteine in den Mutanten des <i>N-end rule pathways</i> im Vergleich zum Wildtyp.....	69
Abbildung 16: Schematische Darstellung von RD21a in den Prozessierungsschritten des <i>N-end rule pathways</i>	70
Abbildung 17: Stabilität von TGG2 <i>in vitro</i>	71
Abbildung 18: Stabilität von X-mRD21a und X-iRD21a <i>in vitro</i> mit und ohne Proteasominhibitor MG132 (200 µM).....	72
Abbildung 19: Interaktion von rekombinanter His-MBP-tev-ATE1 und His-MBP-tev-ATE2 mit endogenem RD21a.....	69
Abbildung 20: Arginylierung von rekombinantem mRD21a mit ¹⁴ C-markiertem L-Arginin durch ATE1.....	70
Abbildung 21: Interaktion von ATE1 und X-i/mRD21a <i>in vivo</i> mittels Split-YFP.....	76
Abbildung 22: Interaktion von ATE2 und X-i/mRD21a <i>in vivo</i> mittels Split-YFP.....	77
Abbildung 23: Interaktion von ATE1/2 und X-i/mRD21a <i>in vivo</i> mittels Split-YFP.....	78

Abbildung 24: Abundanz von RD21a in Pflanzen unter Kurz-und Langtagbedingungen.....	79
Abbildung 25: Überprüfung der relativen Transkriptmenge von RD21a in Pflanzenmaterial von Col-0, <i>ate1 ate2, prt6-1, prt6-2, prt6-3, rd21-1</i> nach Anzucht 7 Tage Langtag.....	80
Abbildung 26: Überprüfung der relativen Transkriptmenge von RD21a in Pflanzenmaterial von Col-0, <i>ate1 ate2, prt6-1, prt6-2, prt6-3, rd21-1</i> nach Anzucht 7 Tage Kurztag.	80
Abbildung 27: Aktivitätsmarkierung und Abundanz von endogenem RD21a in <i>Col-0, ate1 ate2, prt6-1</i> und <i>prt6-3</i>	81
Abbildung 28: Stabilität von VL-RD21a-YFP in Mesophyllprotoplasten von WT und <i>N-end rule pathway</i> -Mutanten.....	79
Abbildung 29: Stabilität von D-i/mRD21a-YFP in Mesophyllprotoplasten von WT und <i>N-end rule pathway</i> -Mutanten.....	80
Abbildung 30: Stabilität von RD-i/mRD21a-YFP in Mesophyllprotoplasten von WT und <i>N-end rule pathway</i> -Mutanten.....	81
Abbildung 31: Stabilität von G-i/mRD21a-YFP in Mesophyllprotoplasten von WT und <i>N-end rule pathway</i> -Mutanten.....	86
Abbildung 32: Säulendiagramm zur Auswertung der Transformation von UBQ:X-iRD21a:StrepII:YFP und UBQ:X-mRD21a:3HA:YFP (X = D, RD, G) im Verhältnis zu mCherry.	87
Abbildung 33: Stabilität von X-TGG2 (X = K, G) in Col-0.	89
Abbildung 34: Stabilität von X-TGG2 (X = K, G) in <i>prt6-1</i>	90
Abbildung 35: Säulendiagramm zur Auswertung der Transformation von pUBC::TGG2:YFP, K29-TGG2:YFP und G-TGG2:YFP im Verhältnis zu mCherry.	91
Abbildung 36: Interaktion von rekombinanter His-MBP-UBR-Domäne (PRT6) mit endogenem RD21a.	92
Abbildung 37: Ubiquitynylierung von X-mRD21a:HA in Pflanzenextrakt von Col-0 und <i>prt6-1</i>	89
Abbildung 38: Ubiquitynylierung von endogenem RD21a in Pflanzenextrakt von Col-0, <i>ate1 ate2</i> und <i>prt6-1</i>	91
Abbildung 39: Schematische Darstellung der Prozessierung und des Abbaus von RD21a.	118
Abbildung A1: Experimenteller Ablauf der Interaktion rekombinanter Komponenten mit endogenem RD21a	155
Abbildung A2: Stabilität von N-RIN4:YFP in Protoplasten von Col-0, <i>ate1 ate2</i> sowie <i>prt6-1</i>	159
Abbildung A3: MS-Analyse der an Amylose-Harz gekoppelten His-MBP-tev-ATE1.....	168
Abbildung A4: MS-Analyse der an Amylose-Harz gekoppelten His-MBP-tev-ATE2.....	168
Abbildung A5: Relative Transkriptmenge von RD21a in Pflanzenmaterial von Col-0, <i>ate1 ate2, prt6-3, prt1-1</i> nach Anzucht 3 Wochen Langtag.....	169

Abbildung A6: Aktivitätsmarkierung und Abundanz von endogenem RD21a in <i>Col-0</i> , <i>ate1</i> <i>ate2</i> , <i>prt6-1</i> und <i>rd21-1</i>	169
Abbildung A7: Western Blot der Transformation von Mesophyllprotoplasten von <i>Col-0</i> , <i>ate1</i> <i>ate2</i> und <i>prt6-1</i> mit pUBC::UBQ ^{K29R/K48R} :X-mRD21A ₁₃₅₋₃₅₂ :HA:YFP (X = D, RD, G).....	170
Abbildung A8: Western Blot der Transformation von Mesophyllprotoplasten von <i>Col-0</i> und <i>prt6-1</i> mit pUBC::UBQ ^{K29R/K48R} :X-TGG2:YFP (X = K, G).....	170
Abbildung A9: Ubiquitylierung von endogenem RD21a in Pflanzenextrakt von <i>rd21-1</i>	171
Abbildung A10: MV151 Markierung rekombinant exprimierten X-mRD21a:HA (X = D, RD, G).	171
Abbildung A11: Heatmap Proteinabundanz von RD21a in <i>Arabidopsis</i>	172
Abbildung A12: Lokalisation von RD21a in Rosettenblättern von <i>Col-0</i> , <i>ate1</i> <i>ate2</i> , <i>prt6-1</i> und <i>rd21-1</i>	173
Abbildung A13: Darstellung der AS-Sequenzen der Proteine RIN4, TGG2 und RD21a.....	174
Abbildung A14: Massenspektrum des N-Terminus von RD21a mittels ChaFRADIC..	175
Abbildung A15: Alignment von RD21a und anderen Cysteinproteasen aus <i>Arabidopsis</i>	176
Abbildung A16: Alignment von RD21a und anderen Cysteinproteasen aus Mais und Tomate.....	177

8. Literaturverzeichnis

- Afzal, A. J.; da Cunha, L.; Mackey, D. (2011): Separable fragments and membrane tethering of Arabidopsis RIN4 regulate its suppression of PAMP-triggered immunity. In: *Plant Cell* 23 (10), S. 3798–3811.
- Agee, A. E.; Surpin, M.; Sohn, E. J.; Girke, T.; Rosado, A.; Kram, B. W. et al. (2010a): MODIFIED VACUOLE PHENOTYPE1 is an Arabidopsis myrosinase-associated protein involved in endomembrane protein trafficking. In: *Plant Physiol.* 152 (1), S. 120–132.
- Agee, A. E.; Surpin, M.; Sohn, E. J.; Girke, T.; Rosado, A.; Kram, B. W. et al. (2010b): MODIFIED VACUOLE PHENOTYPE1 is an Arabidopsis myrosinase-associated protein involved in endomembrane protein trafficking. In: *Plant physiology* 152 (1), S. 120–132.
- Ahmed, S. U.; Rojo, E.; Kovaleva, V.; Venkataraman, S.; Dombrowski, J. E.; Matsuoka, K.; Raikhel, N. V. (2000): The plant vacuolar sorting receptor AtELP is involved in transport of NH(2)-terminal propeptide-containing vacuolar proteins in Arabidopsis thaliana. In: *The Journal of cell biology* 149 (7), S. 1335–1344.
- Aillet, F.; Lopitz-Otsoa, F.; Hjerpe, R.; Torres-Ramos, M.; Lang, V.; Rodríguez, M. S. (2012): Isolation of ubiquitylated proteins using tandem ubiquitin-binding entities. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 832, S. 173–183.
- Alberts, B. (2011): Molekularbiologie der Zelle. [mit "Molecular Biology of the Cell" ; LEHR-Programm gemäß § 14 JuSchG]. 5. Aufl. Hg. v. Ulrich Schäfer. Weinheim: Wiley-VCH Verl.
- An, J. Y.; Kim, E.; Zakrzewska, A.; Yoo, Y. D.; Jang, Jun M.; Han, D. H. et al. (2012): UBR2 of the N-end rule pathway is required for chromosome stability via histone ubiquitylation in spermatocytes and somatic cells. In: *PLoS ONE* 7 (5), S. e37414. DOI: 10.1371/journal.pone.0037414.
- An, J. Y.; Kim, E.; Jiang, Y.; Zakrzewska, A.; Kim, D. E.; Lee, M. J. et al. (2010): UBR2 mediates transcriptional silencing during spermatogenesis via histone ubiquitination. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107 (5), S. 1912–1917.
- Andème O., Christine; C., David A.; Cho, E. J.; Chang, S-C.; Staehelin, L. A. (2008): Arabidopsis protein disulfide isomerase-5 inhibits cysteine proteases during trafficking to vacuoles before programmed cell death of the endothelium in developing seeds. In: *The Plant cell* 20 (8), S. 2205–2220.
- Anderson, C. W.; Straus, J. W.; Dudock, B. S. (1983): Preparation of a cell-free protein-synthesizing system from wheat germ. In: *Methods in enzymology* 101, S. 635–644.
- Andersson, I.; Backlund, A. (2008): Structure and function of Rubisco. In: *Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale* 46 (3), S. 275–291.
- Appelqvist, H.; Wäster, P.; Kågedal, K.; Öllinger, K. (2013): The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target. In: *Journal of molecular cell biology* 5 (4), S. 214–226.
- Arnesen, T.; van Damme, P.; Polevoda, B.; Helsens, K.; Evjenth, R.; Colaert, N. et al. (2009): Proteomics analyses reveal the evolutionary conservation and divergence of N-terminal acetyltransferases from yeast and humans. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (20), S. 8157–8162.

- Avrova, A. O.; Stewart, H. E.; De Jong, W D; Heilbronn, J.; Lyon, G. D.; Birch, P. R. (1999): A cysteine protease gene is expressed early in resistant potato interactions with *Phytophthora infestans*. In: *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 12 (12), S. 1114–1119.
- Axtell, M. J.; Chisholm, S. T.; Dahlbeck, D.; Staskawicz, B. J. (2003): Genetic and molecular evidence that the *Pseudomonas syringae* type III effector protein AvrRpt2 is a cysteine protease. In: *Mol. Microbiol.* 49 (6), S. 1537–1546.
- Axtell, M. J.; Staskawicz, B. J. (2003): Initiation of RPS2-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. In: *Cell* 112 (3), S. 369–377.
- Bachmair, A.; Finley, D.; Varshavsky, A. (1986): In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. In: *Science* 234 (4773), S. 179–186.
- Bailey-Serres, J.; Fukao, T.; Gibbs, D. J.; Holdsworth, M. J.; Lee, S. C.; Licausi, F. et al. (2012): Making sense of low oxygen sensing. In: *Trends Plant Sci.* 17 (3), S. 129–138.
- Baker, R. T. (1996): Protein expression using ubiquitin fusion and cleavage. In: *Current opinion in biotechnology* 7 (5), S. 541–546.
- Baker, R. T.; Varshavsky, A. (1995): Yeast N-terminal amidase. A new enzyme and component of the N-end rule pathway. In: *J. Biol. Chem.* 270 (20), S. 12065–12074.
- Balzi, E.; Choder, M.; Chen, W. N.; Varshavsky, A.; Goffeau, A. (1990): Cloning and functional analysis of the arginyl-tRNA-protein transferase gene ATE1 of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *J. Biol. Chem.* 265 (13), S. 7464–7471.
- Bannister, W. H.; Wood, E. J. (1970): Isoelectric focussing and acrylamide gel electrophoresis of human erythrocyte. In: *Life Sci.* 9 (4), S. 229–233.
- Bartel, B.; Wüning, I.; Varshavsky, A. (1990): The recognition component of the N-end rule pathway. In: *EMBO J.* 9 (10), S. 3179–3189.
- Barth, C.; Jander, G. (2006): *Arabidopsis* myrosinases TGG1 and TGG2 have redundant function in glucosinolate breakdown and insect defense. In: *Plant J.* 46 (4), S. 549–562.
- Bast, E. (2001): Mikrobiologische Methoden. Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken. 2. durchges. u. korr. Aufl. Heidelberg u.a: Spektrum Akad. Verl.
- Bethke, G.; Grundman, R. E.; Sreekanta, S.; Truman, W.; Katagiri, F.; Glazebrook, J. (2014): *Arabidopsis* PECTIN METHYLESTERASEs contribute to immunity against *Pseudomonas syringae*. In: *Plant physiology* 164 (2), S. 1093–1107.
- Bindschedler, L. V.; Cramer, R. (2011): Quantitative plant proteomics. In: *Proteomics* 11 (4), S. 756–775.
- Boex-Fontvieille, E.; Rustgi, S.; Reinbothe, S.; Reinbothe, C. (2015a): A Kunitz-type protease inhibitor regulates programmed cell death during flower development in *Arabidopsis thaliana*. In: *Journal of experimental botany* 66 (20), S. 6119–6135.
- Boex-Fontvieille, E.; Rustgi, S.; Wettstein, D. v.; Reinbothe, S.; Reinbothe, C. (2015b): Water-soluble chlorophyll protein is involved in herbivore resistance activation during greening of *Arabidopsis thaliana*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (23), S. 7303–7308.
- Boller, T.; He, S. Y. (2009): Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. In: *Science* 324 (5928), S. 742–744.

- Bones, A.M. and Rossiter, J.T.: The myrosinase–glucosinolate system, its organisation and biochemistry. In: *Physiol Plant* (97), S. 194–208.
- Bracha-Drori, K.; Shichrur, K.; Katz, A.; Oliva, M.; Angelovici, R.; Yalovsky, S.; Ohad, N. (2004): Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. In: *Plant J.* 40 (3), S. 419–427.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Anal. Biochem.* 72, S. 248–254.
- Brower, C. S.; Piatkov, K. I.; Varshavsky, A. (2013): Neurodegeneration-associated protein fragments as short-lived substrates of the N-end rule pathway. In: *Molecular cell* 50 (2), S. 161–171.
- Brower, C. S.; Rosen, C. E.; Jones, R. H.; Wadas, B. C.; Piatkov, K. I.; Varshavsky, A. (2014): Liat1, an arginyltransferase-binding protein whose evolution among primates involved changes in the numbers of its 10-residue repeats. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (46), S. E4936–45.
- Campbell, D. A.; Szardenings, A. K. (2003): Functional profiling of the proteome with affinity labels. In: *Current opinion in chemical biology* 7 (2), S. 296–303.
- Carter, C.; Pan, S.; Zouhar, J.; Avila, E. L.; Girke, T.; Raikhel, N. V. (2004): The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. In: *The Plant cell* 16 (12), S. 3285–3303.
- Chadchawan, S.; Bishop, J.; Thangstad, O. P.; Bones, A. M.; Mitchell-Olds, T.; Bradley, D. (1993): *Arabidopsis* cDNA sequence encoding myrosinase. In: *Plant physiology* 103 (2), S. 671.
- Cha-Molstad, H.; Kwon, Y. T.; Kim, B. Y. (2015a): Amino-terminal arginylation as a degradation signal for selective autophagy. In: *BMB reports* 48 (9), S. 487–488.
- Cha-Molstad, H.; Sung, K. S.; Hwang, J.; Kim, K. A.; Yu, J. E.; Yoo, Y. D. et al. (2015b): Amino-terminal arginylation targets endoplasmic reticulum chaperone BiP for autophagy through p62 binding. In: *Nature cell biology* 17 (7), S. 917–929.
- Cha-Molstad, H.; Yu, J. E.; Lee, S. H.; Kim, J. G.; Sung, K. S.; Hwang, J. et al. (2016): Modulation of SQSTM1/p62 activity by N-terminal arginylation of the endoplasmic reticulum chaperone HSPA5/GRP78/BiP. In: *Autophagy* 12 (2), S. 426–428.
- Chan, C. S.; Guo, L.; Shih, M. C. (2001): Promoter analysis of the nuclear gene encoding the chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B subunit of *Arabidopsis thaliana*. In: *Plant molecular biology* 46 (2), S. 131–141.
- Chisholm, S. T.; Dahlbeck, D.; Krishnamurthy, N.; Day, B.; Sjolander, K.; Staskawicz, B. J. (2005): Molecular characterization of proteolytic cleavage sites of the *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (6), S. 2087–2092.
- Chung, E-H.; da Cunha, L.; Wu, A-J.; Gao, Z.; Cherkis, K.; Afzal, A. J. et al. (2011): Specific threonine phosphorylation of a host target by two unrelated type III effectors activates a host innate immune receptor in plants. In: *Cell Host Microbe* 9 (2), S. 125–136.
- Chung, E-H.; El-Kasmi, F.; He, Y.; Loehr, A.; Dangl, J. L. (2014): A plant phosphoswitch platform repeatedly targeted by type III effector proteins regulates the output of both tiers of plant immune receptors. In: *Cell host & microbe* 16 (4), S. 484–494.
- Ciechanover, A.; Ferber, S.; Ganoth, D.; Elias, S.; Hershko, A.; Arfin, S. (1988): Purification and characterization of arginyl-tRNA-protein transferase from rabbit reticulocytes. Its

- involvement in post-translational modification and degradation of acidic NH₂ termini substrates of the ubiquitin pathway. In: *J. Biol. Chem.* 263 (23), S. 11155–11167.
- Crawford, E. D.; Seaman, J. E.; Agard, N.; Hsu, G. W.; Julien, O.; Mahrus, S. et al. (2013): The DegraBase: a database of proteolysis in healthy and apoptotic human cells. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 12 (3), S. 813–824.
- Cuervo, A. M. (2004): Autophagy: in sickness and in health. In: *Trends in cell biology* 14 (2), S. 70–77.
- Day, B.; Dahlbeck, D.; Huang, J.; Chisholm, S. T.; Li, D.; Staskawicz, B. J. (2005): Molecular basis for the RIN4 negative regulation of RPS2 disease resistance. In: *Plant Cell* 17 (4), S. 1292–1305.
- Deslandes, L.; Rivas, S. (2012): Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets. In: *Trends Plant Sci.* 17 (11), S. 644–655. DOI: 10.1016/j.tplants.2012.06.011.
- Dissmeyer, N.; Schnittger, A. (2011): Guide to the book Plant Kinases. In: *Methods Mol. Biol.* 779.
- Dougan, D. A.; Truscott, K. N.; Zeth, K. (2010): The bacterial N-end rule pathway: expect the unexpected. In: *Molecular microbiology* 76 (3), S. 545–558.
- Elmore, James Mitch; Coaker, Gitta (2011): The role of the plasma membrane H⁺-ATPase in plant-microbe interactions. In: *Molecular plant* 4 (3), S. 416–427.
- Finley, D.; Ozkaynak, E.; Varshavsky, A. (1987): The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. In: *Cell* 48 (6), S. 1035–1046.
- Freemont, P. S.; Hanson, I. M.; Trowsdale, J. (1991): A novel cysteine-rich sequence motif. In: *Cell* 64 (3), S. 483–484.
- Fu, X. L.; Gao, D. S. (2014): Endoplasmic reticulum proteins quality control and the unfolded protein response: the regulative mechanism of organisms against stress injuries. In: *BioFactors (Oxford, England)* 40 (6), S. 569–585.
- Fujiuchi, N.; Matoba, N.; Matsuda, R. (2016): Environment Control to Improve Recombinant Protein Yields in Plants Based on Agrobacterium-Mediated Transient Gene Expression. In: *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 4, S. 23.
- Fulgentini, L.; Marangoni, R.; Colombetti, G. (2008): Optimizing soluble protein extraction and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis quality for extremophile ciliates. In: *Electrophoresis* 29 (11), S. 2411–2412.
- García-Lorenzo, M.; Sjödin, A.; Jansson, S.; Funk, C. (2006): Protease gene families in *Populus* and *Arabidopsis*. In: *BMC plant biology* 6, S. 30.
- Garzón, M.; Eifler, K.; Faust, A.; Scheel, H.; Hofmann, K.; Koncz, C. et al. (2007): PRT6/At5g02310 encodes an *Arabidopsis* ubiquitin ligase of the N-end rule pathway with arginine specificity and is not the CER3 locus. In: *FEBS Lett.* 581 (17), S. 3189–3196.
- Gibbs, D. J.; Bacardit, J.; Bachmair, A.; Holdsworth, M. J. (2014a): The eukaryotic N-end rule pathway: conserved mechanisms and diverse functions. In: *Trends in cell biology* 24 (10), S. 603–611.
- Gibbs, D. J.; Bailey, M.; Tedds, H. M.; Holdsworth, M. J. (2016): From start to finish: amino-terminal protein modifications as degradation signals in plants. In: *The New phytologist* 211 (4), S. 1188–1194.

- Gibbs, D. J.; Lee, S. C.; Isa, N. Md; Gramuglia, S.; Fukao, T.; Bassel, G. W. et al. (2011): Homeostatic response to hypoxia is regulated by the N-end rule pathway in plants. In: *Nature* 479 (7373), S. 415–418.
- Gibbs, D. J.; Md Isa, N.; Movahedi, M.; Lozano-Juste, J.; Mendiondo, G. M.; Berckhan, S. et al. (2014b): Nitric Oxide Sensing in Plants Is Mediated by Proteolytic Control of Group VII ERF Transcription Factors. In: *Mol. Cell* 53 (3), S. 369–379.
- Giglione, C.; Vallon, O.; Meinnel, T. (2003): Control of protein life-span by N-terminal methionine excision. In: *The EMBO journal* 22 (1), S. 13–23.
- Gilchrist, C. A.; Gray, D. A.; Baker, R. T. (1997): A ubiquitin-specific protease that efficiently cleaves the ubiquitin-proline bond. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (51), S. 32280–32285.
- Giuntoli, B.; Lee, S. C.; Licausi, F.; Kosmacz, M.; Oosumi, T.; van Dongen, J. T et al. (2014): A trihelix DNA binding protein counterbalances hypoxia-responsive transcriptional activation in Arabidopsis. In: *PLoS biology* 12 (9), S. e1001950. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001950.
- Graciet, E.; Hu, R-G.; Piatkov, K.; Rhee, J. H.; Schwarz, E. M.; Varshavsky, A. (2006): Aminoacyl-transferases and the N-end rule pathway of prokaryotic/eukaryotic specificity in a human pathogen. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (9), S. 3078–3083.
- Graciet, E.; Mesiti, F.; Wellmer, F. (2010): Structure and evolutionary conservation of the plant N-end rule pathway. In: *Plant J.* 61 (5), S. 741–751.
- Graciet, E.; Walter, F.; Ó'Maoiléidigh, D. S.; Pollmann, S.; Meyerowitz, E. M.; Varshavsky, A.; Wellmer, F. (2009): The N-end rule pathway controls multiple functions during Arabidopsis shoot and leaf development. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (32), S. 13618–13623.
- Graciet, E.; Wellmer, F. (2010): The plant N-end rule pathway: structure and functions. In: *Trends Plant Sci.* 15 (8), S. 447–453.
- Grefen, C.; Donald, N.; Hashimoto, K.; Kudla, J.; Schumacher, K.; Blatt, M. R. (2010): A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 64 (2), S. 355–365.
- Grigoryev, S.; Stewart, A. E.; Kwon, Y. T.; Arfin, S. M.; Bradshaw, R. A.; Jenkins, N. A. et al. (1996): A mouse amidase specific for N-terminal asparagine. The gene, the enzyme, and their function in the N-end rule pathway. In: *J. Biol. Chem.* 271 (45), S. 28521–28532.
- Gu, C.; Kolodziejek, I.; Misas-Villamil, J.; Shindo, T.; Colby, T.; Verdoes, M. et al. (2010): Proteasome activity profiling: a simple, robust and versatile method revealing subunit-selective inhibitors and cytoplasmic, defense-induced proteasome activities. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 62 (1), S. 160–170.
- Gu, C.; Shabab, M.; Strasser, R.; Wolters, P. J.; Shindo, T.; Niemer, M. et al. (2012): Post-translational regulation and trafficking of the granulin-containing protease RD21 of Arabidopsis thaliana. In: *PLoS ONE* 7 (3), S. e32422. DOI: 10.1371/journal.pone.0032422.
- Guo, N.; Peng, Z. (2013): MG132, a proteasome inhibitor, induces apoptosis in tumor cells. In: *Asia-Pacific journal of clinical oncology* 9 (1), S. 6–11.
- Hartley, J. L.; Temple, G. F.; Brasch, M. A. (2000): DNA cloning using in vitro site-specific recombination. In: *Genome research* 10 (11), S. 1788–1795.

- Hause, B.; Demus, U.; Teichmann, C.; Parthier, B.; Wasternack, C. (1996): Developmental and tissue-specific expression of JIP-23, a jasmonate-inducible protein of barley. In: *Plant & cell physiology* 37 (5), S. 641–649.
- Hayashi, Y.; Yamada, K.; Shimada, T.; Matsushima, R.; Nishizawa, N. K.; Nishimura, M.; Hara-Nishimura, I. (2001): A proteinase-storing body that prepares for cell death or stresses in the epidermal cells of Arabidopsis. In: *Plant & cell physiology* 42 (9), S. 894–899.
- Hjerpe, R.; Aillet, F.; Lopitz-Otsoa, F.; Lang, V.; England, P.; Rodriguez, M. S. (2009): Efficient protection and isolation of ubiquitylated proteins using tandem ubiquitin-binding entities. In: *EMBO reports* 10 (11), S. 1250–1258.
- Hoernstein, S. N W; Mueller, S. J.; Fiedler, K.; Schuelke, M.; Vanselow, J. T.; Schuessle, C. et al. (2016): Identification of targets and interaction partners of arginyl-tRNA protein transferase in the moss *Physcomitrella patens*. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP*. DOI: 10.1074/mcp.M115.057190.
- Holman, T. J.; Jones, P. D.; Russell, L.; Medhurst, A.; Ubeda T., S.; Talloji, P. et al. (2009): The N-end rule pathway promotes seed germination and establishment through removal of ABA sensitivity in Arabidopsis. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (11), S. 4549–4554.
- Hu, R-G.; Brower, C. S.; Wang, H.; Davydov, I. V.; Sheng, J.; Zhou, J. et al. (2006): Arginyltransferase, its specificity, putative substrates, bidirectional promoter, and splicing-derived isoforms. In: *J. Biol. Chem.* 281 (43), S. 32559–32573.
- Hu, R-G.; Sheng, J.; Qi, X.; Xu, Z.; Takahashi, T. T.; Varshavsky, A. (2005): The N-end rule pathway as a nitric oxide sensor controlling the levels of multiple regulators. In: *Nature* 437 (7061), S. 981–986.
- Hwang, C-S.; Shemorry, A.; Varshavsky, A. (2010): N-terminal acetylation of cellular proteins creates specific degradation signals. In: *Science* 327 (5968), S. 973–977.
- Isayenkov, S.; Mrosk, C.; Stenzel, I.; Strack, D.; Hause, B. (2005): Suppression of allene oxide cyclase in hairy roots of *Medicago truncatula* reduces jasmonate levels and the degree of mycorrhization with *Glomus intraradices*. In: *Plant physiology* 139 (3), S. 1401–1410.
- Islam, M. M.; Tani, C.; Watanabe-Sugimoto, M.; Uraji, M.; Jahan, Md S.; Masuda, C. et al. (2009): Myrosinases, TGG1 and TGG2, redundantly function in ABA and MeJA signaling in Arabidopsis guard cells. In: *Plant Cell Physiol.* 50 (6), S. 1171–1175.
- Jeuken, M. J W; Zhang, N. W.; McHale, L. K.; Pelgrom, K.; den Boer, E.; Lindhout, P. et al. (2009): Rin4 causes hybrid necrosis and race-specific resistance in an interspecific lettuce hybrid. In: *Plant Cell* 21 (10), S. 3368–3378.
- Jiang, Y.; Choi, Won H.; Lee, J. H.; Han, D. H.; Kim, J. H.; Chung, Y-S. et al. (2014): A neurostimulant para-chloroamphetamine inhibits the arginylation branch of the N-end rule pathway. In: *Scientific reports* 4, S. 6344.
- Kapust, R. B.; Tözsér, J.; Fox, J. D.; Anderson, D. E.; Cherry, S.; Copeland, T. D.; Waugh, D. S. (2001): Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency. In: *Protein engineering* 14 (12), S. 993–1000.
- Kapust, R. B.; Waugh, D. S. (2000): Controlled intracellular processing of fusion proteins by TEV protease. In: *Protein Expr. Purif.* 19 (2), S. 312–318.
- Karakozova, M.; Kozak, M.; Wong, C. C L; Bailey, A. O.; Yates, J. R.; Mogilner, A. et al. (2006): Arginylation of beta-actin regulates actin cytoskeleton and cell motility. In: *Science (New York, N.Y.)* 313 (5784), S. 192–196.

- Karimi, M.; Meyer, B. d; Hilson, P. (2005): Modular cloning in plant cells. In: *Trends Plant Sci.* 10 (3), S. 103–105.
- Kaur, G.; Subramanian, S. (2015): The UBR-box and its relationship to binuclear RING-like treble clef zinc fingers. In: *Biology direct* 10, S. 36. DOI: 10.1186/s13062-015-0066-5.
- Kim, H-S.; Desveaux, D.; Singer, A. U.; Patel, P.; Sondek, J.; Dangl, J. L. (2005a): The *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2 cleaves its C-terminally acylated target, RIN4, from *Arabidopsis* membranes to block RPM1 activation. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (18), S. 6496–6501.
- Kim, H-K.; Kim, R-R.; Oh, J-H.; Cho, H.; Varshavsky, A.; Hwang, C-S. (2014): The N-terminal methionine of cellular proteins as a degradation signal. In: *Cell* 156 (1-2), S. 158–169.
- Kim, J. H.; Kim, W. T. (2013): The *Arabidopsis* RING E3 ubiquitin ligase AtAIRP3/LOG2 participates in positive regulation of high-salt and drought stress responses. In: *Plant Physiol.* 162 (3), S. 1733–1749.
- Kim, M. G.; da Cunha, L.; McFall, A. J.; Belkhadir, Y.; DebRoy, S.; Dangl, J. L.; Mackey, D. (2005b): Two *Pseudomonas syringae* type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in *Arabidopsis*. In: *Cell* 121 (5), S. 749–759.
- Kim, S. T.; Tasaki, T.; Zakrzewska, A.; Yoo, Y. D.; Sa S., Ki, K., S-H. et al. (2013a): The N-end rule proteolytic system in autophagy. In: *Autophagy* 9 (7), S. 1100–1103.
- Kim, S. T.; Tasaki, T.; Zakrzewska, A.; Yoo, Y. D.; Sa S., Ki, K., S-H. et al. (2013b): The N-end rule proteolytic system in autophagy. In: *Autophagy* 9 (7), S. 1100–1103.
- Kim, Y-C.; Jahren, N.; Stone, M. D.; Udeshi, N. D.; Markowski, T. W.; Witthuhn, B. A. et al. (2013c): Identification and origin of N-linked β -D-N-acetylglucosamine monosaccharide modifications on *Arabidopsis* proteins. In: *Plant physiology* 161 (1), S. 455–464.
- Kind A (2013): Charakterisierung der NTAN1 und NTAQ1 in *Arabidopsis thaliana*. Martin-Luther Universität. Institut für Biochemie.
- Koh, E.; Carmieli, R.; Mor, A.; Fluhr, R. (2016): Singlet oxygen induced membrane disruption and serpin-protease balance in vacuolar driven cell death in *Arabidopsis thaliana*. In: *Plant physiology*. DOI: 10.1104/pp.15.02026.
- Koizumi, M.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Tsuji, H.; Shinozaki, K. (1993): Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana*. In: *Gene* 129 (2), S. 175–182.
- Koncz C. and Schell J. (1986): The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. In: *Mol. Gen. Genet.* (204), S. 383–396.
- Koontz L. (2014): TCA Precipitation. In: *Methods in enzymology* (541), S. 3–10.
- Koroleva, O. A.; Davies, A.; Deeken, R.; Thorpe, M. R.; Tomos, A. D.; Hedrich, R. (2000): Identification of a new glucosinolate-rich cell type in *Arabidopsis* flower stalk. In: *Plant Physiol.* 124 (2), S. 599–608.
- Kosmacz, M.; Parlanti, S.; Schwarzländer, M.; Kragler, F.; Licausi, F.; van Dongen, J. T (2014): The stability and nuclear localization of the transcription factor RAP2.12 are dynamically regulated by oxygen concentration. In: *Plant, cell & environment*. DOI: 10.1111/pce.12493.

- Kraft, C.; Peter, M.; Hofmann, K. (2010): Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond. In: *Nature cell biology* 12 (9), S. 836–841.
- Kwon, Y. T.; Balogh, S. A.; Davydov, I. V.; Kashina, A. S.; Yoon, J. K.; Xie, Y. et al. (2000): Altered activity, social behavior, and spatial memory in mice lacking the NTAN1p amidase and the asparagine branch of the N-end rule pathway. In: *Mol. Cell. Biol.* 20 (11), S. 4135–4148.
- Kwon, Y. T.; Kashina, A. S.; Varshavsky, A. (1999): Alternative splicing results in differential expression, activity, and localization of the two forms of arginyl-tRNA-protein transferase, a component of the N-end rule pathway. In: *Mol. Cell. Biol.* 19 (1), S. 182–193.
- Kwon, Y. T.; Kashina, A. S.; Davydov, I. V.; Hu, R-G.; An, J. Y.; Seo, J. W. et al. (2002): An essential role of N-terminal arginylation in cardiovascular development. In: *Science* 297 (5578), S. 96–99.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685.
- Lampl, N.; Alkan, N.; Davydov, O.; Fluhr, R. (2013): Set-point control of RD21 protease activity by AtSerp1 controls cell death in Arabidopsis. In: *Plant J.* 74 (3), S. 498–510.
- Lampl, N.; Budai-Hadrian, O.; Davydov, O.; Joss, T. V.; Harrop, S. J.; Curmi, P. M G et al. (2010): Arabidopsis AtSerp1, crystal structure and in vivo interaction with its target protease RESPONSIVE TO DESICCATION-21 (RD21). In: *The Journal of biological chemistry* 285 (18), S. 13550–13560.
- Lassowskat, I.; Böttcher, C.; Eschen-Lippold, L.; Scheel, D.; Lee, J. (2014): Sustained mitogen-activated protein kinase activation reprograms defense metabolism and phosphoprotein profile in Arabidopsis thaliana. In: *Frontiers in plant science* 5, S. 554. DOI: 10.3389/fpls.2014.00554.
- Lawyer, F. C.; Stoffel, S.; Saiki, R. K.; Chang, S. Y.; Landre, P. A.; Abramson, R. D.; Gelfand, D. H. (1993): High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. In: *PCR methods and applications* 2 (4), S. 275–287.
- Lee, DH.; Bourdais, G.; Yu, G.; Robatzek, S.; Coaker, G. (2015a): Phosphorylation of the Plant Immune Regulator RPM1-INTERACTING PROTEIN4 Enhances Plant Plasma Membrane H⁺-ATPase Activity and Inhibits Flagellin-Triggered Immune Responses in Arabidopsis. In: *The Plant cell* 27 (7), S. 2042–2056.
- Lee, K.; Lee, H. G.; Yoon, S.; Kim, H. U.; Seo, P. J. (2015b): The Arabidopsis MYB96 Transcription Factor Is a Positive Regulator of ABSCISIC ACID-INSENSITIVE4 in the Control of Seed Germination. In: *Plant physiology* 168 (2), S. 677–689.
- Lee, M. J.; Tasaki, T.; Moroi, K.; An, J. Y.; Kimura, S.; Davydov, I. V.; Kwon, Y. T. (2005): RGS4 and RGS5 are in vivo substrates of the N-end rule pathway. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (42), S. 15030–15035.
- Lewin, S. (1970): Effect of pH placing of sample in isoelectric focussing of proteins. In: *Biochem. J.* 117 (2), S. 41P.
- Li, M.; Ma, X.; Chiang, Y-H.; Yadeta, K. A.; Ding, P.; Dong, L. et al. (2014): Proline isomerization of the immune receptor-interacting protein RIN4 by a cyclophilin inhibits effector-triggered immunity in Arabidopsis. In: *Cell host & microbe* 16 (4), S. 473–483.
- Licausi, F. (2013): Molecular elements of low-oxygen signaling in plants. In: *Physiol Plant* 148 (1), S. 1–8.

- Licausi, F.; Kosmacz, M.; Weits, D. A.; Giuntoli, B.; Giorgi, F. M.; Voesenek, L. A C J et al. (2011): Oxygen sensing in plants is mediated by an N-end rule pathway for protein destabilization. In: *Nature* 479 (7373), S. 419–422.
- Licausi, F.; Pucciariello, C.; Perata, P. (2013): New role for an old rule: N-end rule-mediated degradation of ethylene responsive factor proteins governs low oxygen response in plants(F). In: *J Integr Plant Biol* 55 (1), S. 31–39.
- Liebmingner, E.; Grass, J.; Jez, J.; Neumann, L.; Altmann, F.; Strasser, R. (2012): Myrosinases TGG1 and TGG2 from *Arabidopsis thaliana* contain exclusively oligomannosidic N-glycans. In: *Phytochemistry* 84, S. 24–30.
- Lilley, K. S.; Friedman, D. B. (2004): All about DIGE: quantification technology for differential-display 2D-gel proteomics. In: *Expert review of proteomics* 1 (4), S. 401–409.
- Liu, J.; Elmore, J. M.; Fuglsang, A. T.; Palmgren, M. G.; Staskawicz, B. J.; Coaker, G. (2009): RIN4 functions with plasma membrane H⁺-ATPases to regulate stomatal apertures during pathogen attack. In: *PLoS biology* 7 (6), S. e1000139. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000139.
- Liu, J.; Elmore, J. M.; Lin, Z-J. D.; Coaker, G. (2011a): A receptor-like cytoplasmic kinase phosphorylates the host target RIN4, leading to the activation of a plant innate immune receptor. In: *Cell host & microbe* 9 (2), S. 137–146.
- Liu, J.; Elmore, J. M.; Lin, Z-J. D.; Coaker, G. (2011b): A receptor-like cytoplasmic kinase phosphorylates the host target RIN4, leading to the activation of a plant innate immune receptor. In: *Cell host & microbe* 9 (2), S. 137–146.
- Liu, Y-J.; Liu, C.; Chang, Z.; Wadas, B.; Brower, C. S.; Song, Z-H. et al. (2016): Degradation of the Separase-cleaved Rec8, a Meiotic Cohesin Subunit, by the N-end Rule Pathway. In: *The Journal of biological chemistry* 291 (14), S. 7426–7438.
- Lopitz-Otsoa, F.; Rodriguez-Suarez, E.; Aillet, F.; Casado-Vela, J.; Lang, V.; Matthiesen, R. et al. (2012): Integrative analysis of the ubiquitin proteome isolated using Tandem Ubiquitin Binding Entities (TUBEs). In: *Journal of proteomics* 75 (10), S. 2998–3014.
- Lu, H.; Chandrasekar, B.; Oeljeklaus, J.; Misas-Villamil, J. C.; Wang, Z.; Shindo, T. et al. (2015): Subfamily-Specific Fluorescent Probes for Cysteine Proteases Display Dynamic Protease Activities during Seed Germination. In: *Plant physiology* 168 (4), S. 1462–1475.
- Luo, Y.; Caldwell, K. S.; Wroblewski, T.; Wright, M. E.; Michelmore, R. W. (2009): Proteolysis of a negative regulator of innate immunity is dependent on resistance genes in tomato and *Nicotiana benthamiana* and induced by multiple bacterial effectors. In: *Plant Cell* 21 (8), S. 2458–2472.
- Lutz, D.; Wolters-Eisfeld, G.; Joshi, G.; Djogo, N.; Jakovcevski, I.; Schachner, M.; Kleene, R. (2012): Generation and nuclear translocation of sumoylated transmembrane fragment of cell adhesion molecule L1. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (21), S. 17161–17175.
- Macho, Alberto P.; Zipfel, Cyril (2014): Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. In: *Molecular cell* 54 (2), S. 263–272.
- Mackey, D.; Belkhadir, Y.; Alonso, J. M.; Ecker, J. R.; Dangl, J. L. (2003): *Arabidopsis* RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. In: *Cell* 112 (3), S. 379–389.
- Mackey, D.; Holt, B. F.; Wiig, A.; Dangl, J. L. (2002): RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. In: *Cell* 108 (6), S. 743–754.

- Majovsky, P.; Naumann, C.; Lee, C-W.; Lassowskat, I.; Trujillo, M.; Dissmeyer, N.; Hoehenwarter, W. (2014): Targeted proteomics analysis of protein degradation in plant signaling on an LTQ-Orbitrap mass spectrometer. In: *Journal of proteome research* 13 (10), S. 4246–4258.
- Marchi, R. de; Sorel, M.; Mooney, B.; Fudal, I.; Goslin, K.; Kwaśniewska, K. et al. (2016): The N-end rule pathway regulates pathogen responses in plants. In: *Scientific reports* 6, S. 26020. DOI: 10.1038/srep26020.
- Mathy, G.; Sluse, F. E. (2008): Mitochondrial comparative proteomics: strengths and pitfalls. In: *Biochimica et biophysica acta* 1777 (7-8), S. 1072–1077.
- Matta-Camacho, E.; Kozlov, G.; Li, F. F.; Gehring, K. (2010): Structural basis of substrate recognition and specificity in the N-end rule pathway. In: *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17 (10), S. 1182–1187.
- Mai C. (2013): Stabilitätsuntersuchung des RPM1-INTERACTING PROTEIN 4 (RIN4) als bona fide-Substrat der N-Ende-Regel in Arabidopsis. Masterarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale). Institut für Biochemie und Biotechnologie.
- Mendiondo, G. M.; Gibbs, D. J.; Szurman-Zubrzycka, M.; Korn, A.; Marquez, J.; Szarejko, I. et al. (2015): Enhanced waterlogging tolerance in barley by manipulation of expression of the N-end rule pathway E3 ligase PROTEOLYSIS6. In: *Plant biotechnology journal*. DOI: 10.1111/pbi.12334.
- Misas-Villamil, J. C.; van der Hoorn, R. A L; Doehlemann, G. (2016): Papain-like cysteine proteases as hubs in plant immunity. In: *The New phytologist*. DOI: 10.1111/nph.14117.
- Naumann, C.; Mot, A. C.; Dissmeyer, N. (2016): Generation of Artificial N-end Rule Substrate Proteins In Vivo and In Vitro. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1450, S. 55–83.
- Otto, H-H.; Schirmeister, T. (1997): Cysteine Proteases and Their Inhibitors. In: *Chemical reviews* 97 (1), S. 133–172.
- Papdi, C.; Pérez-Salamó, I.; Joseph, M. P.; Giuntoli, B.; Bögre, L.; Koncz, C.; Szabados, L. (2015): The low oxygen, oxidative and osmotic stress responses synergistically act through the ethylene response factor VII genes RAP2.12, RAP2.2 and RAP2.3. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 82 (5), S. 772–784.
- Park, M. S.; Bitto, E.; Kim, K. R.; Bingman, C. A.; Miller, M. D.; Kim, H-J. et al. (2014): Crystal structure of human protein N-terminal glutamine amidohydrolase, an initial component of the N-end rule pathway. In: *PloS one* 9 (10), S. e111142. DOI: 10.1371/journal.pone.0111142.
- Pecot, M. Y.; Malhotra, V. (2004): Golgi membranes remain segregated from the endoplasmic reticulum during mitosis in mammalian cells. In: *Cell* 116 (1), S. 99–107.
- Petrak, J.; Ivanek, R.; Toman, O.; Cmejla, R.; Cmejlova, J.; Vyoral, D. et al. (2008): Déjà vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. In: *Proteomics* 8 (9), S. 1744–1749.
- Phan, J.; Zdanov, A.; Evdokimov, A. G.; Tropea, J. E.; Peters, H. K.; Kapust, R. B. et al. (2002): Structural basis for the substrate specificity of tobacco etch virus protease. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (52), S. 50564–50572.
- Piatkov, K. I.; Brower, C. S.; Varshavsky, A. (2012a): The N-end rule pathway counteracts cell death by destroying proapoptotic protein fragments. In: *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America* 109 (27), S. E1839-47. DOI: 10.1073/pnas.1207786109.
- Piatkov, K. I.; Colnaghi, L.; Békés, M.; Varshavsky, A.; Huang, T. T. (2012b): The auto-generated fragment of the Usp1 deubiquitylase is a physiological substrate of the N-end rule pathway. In: *Molecular cell* 48 (6), S. 926–933.
- Piatkov, K. I.; Oh, J-H.; Liu, Y.; Varshavsky, A. (2014): Calpain-generated natural protein fragments as short-lived substrates of the N-end rule pathway. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* DOI: 10.1073/pnas.1401639111.
- Pickart, C. M. (2001): Mechanisms underlying ubiquitination. In: *Annu. Rev. Biochem.* 70, S. 503–533.
- Potuschak, T.; Sary, S.; Schlögelhofer, P.; Becker, F.; Nejnskaia, V.; Bachmair, A. (1998): PRT1 of *Arabidopsis thaliana* encodes a component of the plant N-end rule pathway. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (14), S. 7904–7908.
- Rai, R.; Zhang, F.; Colavita, K.; Leu, N. A.; Kurosaka, S.; Kumar, A. et al. (2015): Arginyltransferase suppresses cell tumorigenic potential and inversely correlates with metastases in human cancers. In: *Oncogene*. DOI: 10.1038/onc.2015.473.
- Rai, R.; Kashina, A. (2005): Identification of mammalian arginyltransferases that modify a specific subset of protein substrates. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (29), S. 10123–10128.
- Rai, R.; Wong, C. C L; Xu, T.; Leu, N. A.; Dong, D. W.; Guo, C. et al. (2008): Arginyltransferase regulates alpha cardiac actin function, myofibril formation and contractility during heart development. In: *Development* 135 (23), S. 3881–3889.
- Rao, H.; Uhlmann, F.; Nasmyth, K.; Varshavsky, A. (2001): Degradation of a cohesin subunit by the N-end rule pathway is essential for chromosome stability. In: *Nature* 410 (6831), S. 955–959.
- Raybould, A. F.; Moyes, C. L. (2001): The ecological genetics of aliphatic glucosinolates. In: *Heredity (Edinb)* 87 (Pt 4), S. 383–391.
- Riber, W.; Müller, J. T.; Visser, E. J W; Sasidharan, R.; Voeselek, L. A C J; Mustroph, A. (2015): The greening after extended darkness 1 is an N-end rule pathway mutant with high tolerance to submergence and starvation. In: *Plant physiology*. DOI: 10.1104/pp.114.253088.
- Robert-Seilaniantz, A.; Shan, L.; Zhou, J-M.; Tang, X. (2006): The *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 type III effector HopF2 has a putative myristoylation site required for its avirulence and virulence functions. In: *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 19 (2), S. 130–138.
- Saha, S.; Wang, J.; Buckley, B.; Wang, Q.; Lilly, B.; Chernov, M.; Kashina, A. (2012): Small molecule inhibitors of arginyltransferase regulate arginylation-dependent protein degradation, cell motility, and angiogenesis. In: *Biochem. Pharmacol.* 83 (7), S. 866–873.
- Sambrook, J. (1989): Molecular cloning: A Laboratory Manual. In: *Cold Spring Harbor Laboratory Press* (2nd ed., vol. 2nd Edition).
- Sasidharan, R.; Mustroph, A. (2011): Plant oxygen sensing is mediated by the N-end rule pathway: a milestone in plant anaerobiosis. In: *Plant Cell* 23 (12), S. 4173–4183.
- Savage, M.; Soffer, R. L.; Leibowitz, M. J. (1983): A mutant of *Saccharomyces cerevisiae* defective in arginyl-tRNA-protein transferase. In: *Curr. Genet.* 7 (4), S. 285–288.

- Schuessele, C.; Hoernstein, S. N W; Mueller, S. J.; Rodriguez-Franco, M.; Lorenz, T.; Lang, D. et al. (2016): Spatio-temporal patterning of arginyl-tRNA protein transferase (ATE) contributes to gametophytic development in a moss. In: *The New phytologist* 209 (3), S. 1014–1027. DOI:
- Selote, D.; Kachroo, A. (2010): RIN4-like proteins mediate resistance protein-derived soybean defense against *Pseudomonas syringae*. In: *Plant Signal Behav* 5 (11), S. 1453–1456.
- Shemorry, A.; Hwang, C-S.; Varshavsky, A. (2013): Control of protein quality and stoichiometries by N-terminal acetylation and the N-end rule pathway. In: *Mol. Cell* 50 (4), S. 540–551. DOI:
- Shindo, T.; Misas-Villamil, J. C.; Hörger, A. C.; Song, J.; van der Hoorn, R. A L (2012): A role in immunity for Arabidopsis cysteine protease RD21, the ortholog of the tomato immune protease C14. In: *PLoS ONE* 7 (1), S. e29317. DOI: 10.1371/journal.pone.0029317.
- Siemens, J.; González, M-C.; Wolf, S.; Hofmann, C.; Greiner, S.; DU, Y. et al. (2011): Extracellular invertase is involved in the regulation of clubroot disease in Arabidopsis thaliana. In: *Molecular plant pathology* 12 (3), S. 247–262.
- Smalle, J.; Vierstra, R. D. (2004): The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. In: *Annu Rev Plant Biol* 55, S. 555–590.
- Spoel, S. H.; Dong, X. (2012): How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. In: *Nature reviews. Immunology* 12 (2), S. 89–100.
- Stary, S.; Yin, X-j.; Potuschak, T.; Schlögelhofer, P.; Nizhynska, V.; Bachmair, A. (2003): PRT1 of Arabidopsis is a ubiquitin protein ligase of the plant N-end rule pathway with specificity for aromatic amino-terminal residues. In: *Plant Physiol.* 133 (3), S. 1360–1366.
- Stegmann, M.; Anderson, R. G.; Westphal, L.; Rosahl, S.; McDowell, J. M.; Trujillo, M. (2013): The exocyst subunit Exo70B1 is involved in the immune response of Arabidopsis thaliana to different pathogens and cell death. In: *Plant signaling & behavior* 8 (12), S. e27421. DOI: 10.4161/psb.27421.
- Stewart, A. E.; Arfin, S. M.; Bradshaw, R. A. (1994): Protein NH₂-terminal asparagine deamidase. Isolation and characterization of a new enzyme. In: *J. Biol. Chem.* 269 (38), S. 23509–23517.
- Stewart, A. E.; Arfin, S. M.; Bradshaw, R. A. (1995): The sequence of porcine protein NH₂-terminal asparagine amidohydrolase. A new component of the N-end Rule pathway. In: *J. Biol. Chem.* 270 (1), S. 25–28.
- Strasser, R. (2016): Plant protein glycosylation. In: *Glycobiology*. DOI: 10.1093/glycob/cww023.
- Sultana, R.; Theodoraki, M. A.; Caplan, A. J. (2012): UBR1 promotes protein kinase quality control and sensitizes cells to Hsp90 inhibition. In: *Exp. Cell Res.* 318 (1), S. 53–60.
- Suresh, B.; Lee, J.; Kim, K-S.; Ramakrishna, S. (2016): The Importance of Ubiquitination and Deubiquitination in Cellular Reprogramming. In: *Stem cells international* 2016, S. 6705927. DOI: 10.1155/2016/6705927.
- T. Murashige and F. Skoog (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. In: *Plant Physiol.* (15 (3)), S. 473–497.
- Takemoto, D.; Jones, D. A. (2005): Membrane release and destabilization of Arabidopsis RIN4 following cleavage by *Pseudomonas syringae* AvrRpt2. In: *Mol. Plant Microbe Interact.* 18 (12), S. 1258–1268.

- Tasaki, T.; Kim, S. T.; Zakrzewska, A.; Lee, B. E.; Kang, M. J.; Yoo, Y. D. et al. (2013a): UBR box N-recogin-4 (UBR4), an N-recogin of the N-end rule pathway, and its role in yolk sac vascular development and autophagy. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110 (10), S. 3800–3805.
- Tasaki, T.; Kim, S. T.; Zakrzewska, A.; Lee, B. E.; Kang, M. J.; Yoo, Y. D. et al. (2013b): UBR box N-recogin-4 (UBR4), an N-recogin of the N-end rule pathway, and its role in yolk sac vascular development and autophagy. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (10), S. 3800–3805.
- Tasaki, T.; Mulder, L. C F; Iwamatsu, A.; Lee, M. J.; Davydov, I. V.; Varshavsky, A. et al. (2005): A family of mammalian E3 ubiquitin ligases that contain the UBR box motif and recognize N-degrons. In: *Mol. Cell. Biol.* 25 (16), S. 7120–7136.
- Tasaki, T.; Sriram, S. M.; Park, K. S.; Kwon, Y. T. (2012): The N-end rule pathway. In: *Annu. Rev. Biochem.* 81, S. 261–289.
- Tasaki, T.; Zakrzewska, A.; Dudgeon, D. D.; Jiang, Y.; Lazo, J. S.; Kwon, Y. T. (2009): The substrate recognition domains of the N-end rule pathway. In: *J. Biol. Chem.* 284 (3), S. 1884–1895.
- Thangstad, O. P.; Gilde, B.; Chadchawan, S.; Seem, M.; Husebye, H.; Bradley, D.; Bones, A. M. (2004): Cell specific, cross-species expression of myrosinases in *Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum*. In: *Plant Mol. Biol.* 54 (4), S. 597–611.
- Thao, S.; Zhao, Q.; Kimball, T.; Steffen, E.; Blommel, P. G.; Ritters, M. et al. (2004): Results from high-throughput DNA cloning of *Arabidopsis thaliana* target genes using site-specific recombination. In: *Journal of structural and functional genomics* 5 (4), S. 267–276.
- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76 (9), S. 4350–4354.
- Tronconi, M. A.; Wheeler, M. C; Drincovich, M. F.; Andreo, C. S. (2012): Differential fumarate binding to *Arabidopsis* NAD⁺-malic enzymes 1 and -2 produces an opposite activity modulation. In: *Biochimie* 94 (6), S. 1421–1430.
- Tronconi, M. A.; Wheeler, M. C; Maurino, V. G.; Drincovich, M. F.; Andreo, C. S. (2010a): NAD-malic enzymes of *Arabidopsis thaliana* display distinct kinetic mechanisms that support differences in physiological control. In: *The Biochemical journal* 430 (2), S. 295–303.
- Tronconi, M. A.; Maurino, V. G.; Andreo, C.s S.; Drincovich, M. F. (2010b): Three different and tissue-specific NAD-malic enzymes generated by alternative subunit association in *Arabidopsis thaliana*. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (16), S. 11870–11879.
- Ueda, H.; Nishiyama, C.; Shimada, T.; Koumoto, Y.; Hayashi, Y.; Kondo, M. et al. (2006): AtVAM3 is required for normal specification of idioblasts, myrosin cells. In: *Plant Cell Physiol.* 47 (1), S. 164–175.
- Uljon, S.; Xu, X.; Durzynska, I.; Stein, S.; Adelmant, G.; Marto, J. A. et al. (2016): Structural Basis for Substrate Selectivity of the E3 Ligase COP1. In: *Structure (London, England : 1993)*. DOI: 10.1016/j.str.2016.03.002.
- Unlü, M.; Morgan, M. E.; Minden, J. S. (1997): Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. In: *Electrophoresis* 18 (11), S. 2071–2077.
- van der Hoorn, R. A L; Leeuwenburgh, M. A.; Bogyo, M.; Joosten, M. H A J; Peck, S. C. (2004): Activity profiling of papain-like cysteine proteases in plants. In: *Plant physiology* 135 (3), S. 1170–1178.

- Varshavsky, A. (1991): Naming a targeting signal. In: *Cell* 64 (1), S. 13–15.
- Varshavsky, A. (1992): The N-end rule. In: *Cell* 69 (5), S. 725–735.
- Varshavsky, A. (1996): The N-end rule: functions, mysteries, uses. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (22), S. 12142–12149.
- Varshavsky, A. (1997): The N-end rule pathway of protein degradation. In: *Genes Cells* 2 (1), S. 13–28.
- Varshavsky, A. (2000): Ubiquitin fusion technique and its descendants. In: *Methods in enzymology* 327, S. 578–593.
- Varshavsky, A.; Bachmair, A.; Finley, D. (1987): The N-end rule of selective protein turnover: mechanistic aspects and functional implications. In: *Biochem. Soc. Trans.* 15 (5), S. 815–816.
- Varshavsky, A. (2005): Ubiquitin fusion technique and related methods. In: *Methods in enzymology* 399, S. 777–799.
- Varshavsky, A. (2011): The N-end rule pathway and regulation by proteolysis. In: *Protein Sci.* DOI: 10.1002/pro.666.
- Vatine, G. D.; Zada, D.; Lerer-Goldshtein, T.; Tovin, A.; Malkinson, G.; Yaniv, K.; Appelbaum, L. (2013): Zebrafish as a model for monocarboxyl transporter 8-deficiency. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (1), S. 169–180.
- Venne, A. S.; Solari, F. A.; Faden, F.; Paretti, T.; Dissmeyer, N.; Zahedi, R. P. (2015): An improved workflow for quantitative N-terminal charge-based fractional diagonal chromatography (ChaFRADIC) to study proteolytic events in *Arabidopsis thaliana*. In: *Proteomics* 15 (14), S. 2458–2469.
- Venne, A. S.; Vögtle, F.-N.; Meisinger, C.; Sickmann, A.; Zahedi, R. P. (2013): Novel highly sensitive, specific, and straightforward strategy for comprehensive N-terminal proteomics reveals unknown substrates of the mitochondrial peptidase Icp55. In: *J. Proteome Res.* 12 (9), S. 3823–3830.
- Vierstra, R. D. (2009): The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10 (6), S. 385–397.
- Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W. (2002): *Lehrbuch der Biochemie*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Walter, M.; Chaban, C.; Schütze, K.; Batistic, O.; Weckermann, K.; Näke, C. et al. (2004): Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 40 (3), S. 428–438.
- Wang, H.; Piatkov, K. I.; Brower, C. S.; Varshavsky, A. (2009): Glutamine-specific N-terminal amidase, a component of the N-end rule pathway. In: *Mol. Cell* 34 (6), S. 686–695.
- Wang, J.; Han, X.; Saha, S.; Xu, T.; Rai, R.; Zhang, F. et al. (2011): Arginyltransferase is an ATP-independent self-regulating enzyme that forms distinct functional complexes in vivo. In: *Chem. Biol.* 18 (1), S. 121–130.
- Wang, J.; Han, X.; Wong, C. C L; Cheng, H.; Aslanian, A.; Xu, T. et al. (2014): Arginyltransferase ATE1 catalyzes midchain arginylation of proteins at side chain carboxylates in vivo. In: *Chemistry & biology* 21 (3), S. 331–337.
- Wang, W.; Tai, F.; Chen, S. (2008a): Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis. In: *Journal of separation science* 31 (11), S. 2032–2039.

- Wang, Z.; Gu, C.; Colby, T.; Shindo, T.; Balamurugan, R.; Waldmann, H. et al. (2008b): Beta-lactone probes identify a papain-like peptide ligase in *Arabidopsis thaliana*. In: *Nature chemical biology* 4 (9), S. 557–563.
- Weits, D. A.; Giuntoli, B.; Kosmacz, M.; Parlanti, S.; Hubberten, H.-M.; Riegler, H. et al. (2014): Plant cysteine oxidases control the oxygen-dependent branch of the N-end-rule pathway. In: *Nat Commun* 5, S. 3425. DOI: 10.1038/ncomms4425.
- Wittstock, U.; Halkier, B. A. (2002): Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era. In: *Trends Plant Sci.* 7 (6), S. 263–270.
- Wong, C. C L; Xu, T.; Rai, R.; Bailey, A. O.; Yates, J. R.; Wolf, Y. I. et al. (2007): Global analysis of posttranslational protein arginylation. In: *PLoS Biol.* 5 (10), S. e258. DOI: 10.1371/journal.pbio.0050258.
- Wongpia, A.; Mahatheeranont, S.; Lomthaisong, K.; Niamsup, H. (2015): Evaluation of sample preparation methods from rice seeds and seedlings suitable for two-dimensional gel electrophoresis. In: *Applied biochemistry and biotechnology* 175 (2), S. 1035–1051.
- Xia, Z.; Webster, A.; Du, F.; Piatkov, K.; Ghislain, M.; Varshavsky, A. (2008): Substrate-binding sites of UBR1, the ubiquitin ligase of the N-end rule pathway. In: *J. Biol. Chem.* 283 (35), S. 24011–24028.
- Xiong, Y.; Contento, A. L.; Nguyen, P. Q.; Bassham, D. C. (2007): Degradation of oxidized proteins by autophagy during oxidative stress in *Arabidopsis*. In: *Plant physiology* 143 (1), S. 291–299.
- Xu, Z.; Escamilla-Treviño, L.; Zeng, L.; Lalgondar, M.; Bevan, D.; Winkel, B. et al. (2004): Functional genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* glycoside hydrolase family 1. In: *Plant Mol. Biol.* 55 (3), S. 343–367.
- Xue, J. P.; Lenman, M.; Falk, A.; Rask, L. (1992): The glucosinolate-degrading enzyme myrosinase in Brassicaceae is encoded by a gene family. In: *Plant molecular biology* 18 (2), S. 387–398.
- Yamada, K.; Matsushima, R.; Nishimura, M.; Hara-Nishimura, I. (2001): A slow maturation of a cysteine protease with a granulin domain in the vacuoles of senescing *Arabidopsis* leaves. In: *Plant Physiol.* 127 (4), S. 1626–1634.
- Yamada, T.; Ohta, H.; Shinohara, A.; Iwamatsu, A.; Shimada, H.; Tsuchiya, T. et al. (2000): A cysteine protease from maize isolated in a complex with cystatin. In: *Plant & cell physiology* 41 (2), S. 185–191.
- Yamasaki, Y.; Randall, S. K. (2016): Functionality of soybean CBF/DREB1 transcription factors. In: *Plant science : an international journal of experimental plant biology* 246, S. 80–90.
- Yoo, S.-D.; Cho, Y.-H.; Sheen, J. (2007): *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. In: *Nature protocols* 2 (7), S. 1565–1572.
- Yoshida, S.; Ito, M.; Callis, J.; Nishida, I.; Watanabe, A. (2002): A delayed leaf senescence mutant is defective in arginyl-tRNA:protein arginyltransferase, a component of the N-end rule pathway in *Arabidopsis*. In: *Plant J.* 32 (1), S. 129–137.
- Yu, C.; Rahmani, M.; Conrad, D.; Subler, M.; Dent, P.; Grant, S. (2003): The proteasome inhibitor bortezomib interacts synergistically with histone deacetylase inhibitors to induce apoptosis in Bcr/Abl+ cells sensitive and resistant to STI571. In: *Blood* 102 (10), S. 3765–3774.

Zenker, M.; Mayerle, J.; Lerch, M. M.; Tagariello, A.; Zerres, K.; Durie, P. R. et al. (2005): Deficiency of UBR1, a ubiquitin ligase of the N-end rule pathway, causes pancreatic dysfunction, malformations and mental retardation (Johanson-Blizzard syndrome). In: *Nat. Genet.* 37 (12), S. 1345–1350.

Zhou, C.; Tokuhisa, J. G.; Bevan, D. R.; Esen, A. (2012): Properties of β -thioglucoside hydrolases (TGG1 and TGG2) from leaves of *Arabidopsis thaliana*. In: *Plant science : an international journal of experimental plant biology* 191-192, S. 82–92.

Zhou, X.; Carranco, R.; Vitha, S.; Hall, T. C. (2005): The dark side of green fluorescent protein. In: *The New phytologist* 168 (2), S. 313–322.

Zhu, J.; Zhang, L.; Li, W.; Han, S.; Yang, W.; Qi, L. (2013): Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in *Caragana intermedia* under different abiotic stress conditions. In: *PloS one* 8 (1), S. e53196. DOI: 10.1371/journal.pone.0053196.

9. Anhang

1. Verwendete Vektoren

In den folgenden Tabellen sind die verwendeten Vektoren, ihre Herkunft und ihr Verwendungszweck angegeben.

1.1. Donor-Vektoren

Tabelle A1: Verwendete Donor-Vektoren mit Resistenz und Referenz

Vektor	Resistenz	Referenz
pDONR201	Kanamycin, Chloramphenicol	Invitrogen

1.2. Destinations-Vektoren

Tabelle A22: Verwendete Destination-Vektoren mit Resistenz, Struktur und Referenz

Vektor	Resistenz	Struktur	Referenz
pOLENTE	Carbenicillin	Gateway. Destination vector (attR1/R2) für gekoppelte Transcription/Translation, basierend auf pTNT (Promega).	Dr. Nico Dissmeyer
pUBC-cYFP-Dest	Streptomycin, Chloramphenicol, BASTA (Pflanze)	Pr _{UBQ10} :GW:cYFP:T35	(Grefen et al. 2010)
pUBC-nYFP-Dest	Streptomycin, Chloramphenicol, BASTA (Pflanze)	Pr _{UBQ10} :GW:nYFP:T35	(Grefen et al. 2010)
pUBC-YFP	Streptomycin, Chloramphenicol, BASTA (Pflanze)	Pr _{UBQ10} :GW:YFP:T35	(Grefen et al. 2010)
pUBN-cYFP-Dest	Streptomycin, Chloramphenicol, BASTA (Pflanze)	Pr _{UBQ10} :cYFP:GW:T35	(Grefen et al. 2010)
pUBN-nYFP-Dest	Streptomycin, Chloramphenicol, BASTA (Pflanze)	Pr _{UBQ10} :nYFP:GW:T35	(Grefen et al. 2010)
pVp16	Carbenicillin, Chloramphenicol	Pr ₀₇₅ :8xHis:MBP:GW Lac-Operon	(Thao et al. 2004)
pUC-SPYCE	Carbenicillin	Pr _{035S} :GW:HA:cYFP	(Walter et al. 2004)
pUC-SPYNE	Carbenicillin	Pr _{035S} :GW:HA:nYFP	(Walter et al. 2004)

1.3. Entry-Vektoren

Tabelle A3: Verwendete Entry-Vektoren mit Resistenz, Plasmidrückgrat, Merkmalen und Herkunft

Name	Resistenz	Plasmidrückgrat	Merkmal	Herkunft
pDONR201 ATE1_o.s.	Kanamycin	pDONR201	Kein Stopcodon	Diese Arbeit
pDONR201 tev:ATE1	Kanamycin	pDONR201	n-terminale	Diese

			TEV-Spaltstelle	Arbeit
pDONR201 ATE2_o.s.	Kanamycin	pDONR201	Kein Stopcodon	Diese Arbeit
pDONR201 tev:ATE2	Kanamycin	pDONR201	n-terminale TEV-Spaltstelle	Diese Arbeit
pDONR201 tev:NTAN1	Kanamycin	pDONR201	n-terminale TEV-Spaltstelle	Anne Kind
pDONR201 tev:NTAQ1	Kanamycin	pDONR201	n-terminale TEV-Spaltstelle	Anne Kind
pDONR201 tev:N11-RIN4 ₁₁₋₂₁₁ :StrepII	Kanamycin	pDONR201	n-terminale TEV-Spaltstelle, ohne 1. 10 AS, C-terminaler Strep-Tag	Diese Arbeit
pDONR201 tev:D11-RIN4 ₁₁₋₂₁₁ :StrepII	Kanamycin	pDONR201	N11D ->AAC/GAC, n-terminale TEV-Spaltstelle, C-terminaler Strep-Tag	Diese Arbeit
pDONR201 tev:R10/D11-RIN4 ₁₀₋₂₁₁ :StrepII	Kanamycin	pDONR201	R10 -> AGA N11D ->AAC/GAC, n-terminale TEV-Spaltstelle, C-terminaler Strep-Tag	Diese Arbeit
pDONR201 tev:G11-RIN4 ₁₁₋₂₁₁ :StrepII	Kanamycin	pDONR201	N11G ->AAC/GGA, n-terminale TEV-Spaltstelle, C-terminaler Strep-Tag	Diese Arbeit
pEN::UBQ ^{K29R/K48R} :N11-RIN4 ₁₁₋₁₅₂ :Strep_o.s.	Kanamycin	pDONR201	N-Terminale Fusion mit UBQ ^{K29R/K48R} , kein Stopcodon, C-terminaler Strep-Tag, AS 11-152	Diese Arbeit
pDONR201 UBQ ^{K29R/K48R} :N11-RIN4 ₁₁₋₁₅₂ :Strep	Kanamycin	pDONR201	N-Terminale Fusion mit UBQ ^{K29R/K48R} , C-terminaler Strep-Tag, AS 11-152	Diese Arbeit
pDONR201 UBQ ^{K29R/K48R} :D11-RIN4 ₁₁₋₁₅₂ :Strep_o.s.	Kanamycin	pDONR201	N11D ->AAC/GAC N-Terminale Fusion mit UBQ ^{K29R/K48R} , kein Stopcodon, C-terminaler Strep-Tag, AS 11-152	Diese Arbeit
pDONR201 UBQ ^{K29R/K48R} :D11-RIN4 ₁₁₋₁₅₂ :Strep	Kanamycin	pDONR201	N11D ->AAC/GAC N-Terminale Fusion mit UBQ ^{K29R/K48R} , C-terminaler Strep-Tag, AS	Diese Arbeit

pDONR201 UBQ ^{K29R/K48R} :R10-RIN4 ₁₀₋₁₅₂ :Strep_o.s.	Kanamycin	pDONR201	11-152 R10 -> AGA N11D ->AAC/GAC N-Terminale Fusion mit UBQ ^{K29R/K48R} , kein Stopcodon, C- terminaler Strep-Tag, AS 10-152	Diese Arbeit
pDONR201 UBQ ^{K29R/K48R} :R10-RIN4 ₁₀₋₁₅₂ :Strep	Kanamycin	pDONR201	R10 -> AGA N11D ->AAC/GAC N-Terminale Fusion mit UBQ ^{K29R/K48R} , C-terminaler Strep-Tag, AS 10-152	Diese Arbeit
pDONR201 UBQ ^{K29R/K48R} :G11-RIN4 ₁₁₋₁₅₂ :Strep_o.s.	Kanamycin	pDONR201	N11G ->AAC/GGA N-Terminale Fusion mit UBQ ^{K29R/K48R} , kein Stopcodon, C- terminaler Strep-Tag, AS 11-152	Diese Arbeit
pDONR201 UBQ ^{K29R/K48R} :G11-RIN4 ₁₁₋₁₅₂ :Strep	Kanamycin	pDONR201	N11G ->AAC/GGA N-Terminale Fusion mit UBQ ^{K29R/K48R} , C-terminaler Strep-Tag, AS 11-152	Diese Arbeit
pDONR201 RD21a.:StrepII_o.s	Kanamycin	pDONR201	Kein Stopcodon, C- terminaler Strep-Tag	Diese Arbeit
pDONR201 tev: D135-iRD21a ₁₃₅₋₄₆₂ :StrepII	Kanamycin	pDONR201	N-terminale TEV- Spaltstelle, C- terminaler Strep-Tag, AS 135-462	Diese Arbeit
pDONR201 tev: D135-mRD21a ₁₃₅₋₃₅₂ :HA	Kanamycin	pDONR201	N-terminale TEV- Spaltstelle, C- terminaler HA- Tag, AS 135- 352	Diese Arbeit
pDONR201 UBQ ^{K29R/K48R} :D135-iRD21a ₁₃₅₋₄₆₂ :StrepII_o.s.	Kanamycin	pDONR201	N-Terminale Fusion mit UBQ ^{K29R/K48R} , kein Stopcodon, C- terminaler Strep-Tag, AS 135-462	Diese Arbeit
pDONR201 UBQ ^{K29R/K48R} :D135-mRD21a ₁₃₅₋₃₅₂ :HA_o.s.	Kanamycin	pDONR201	N-Terminale Fusion mit	Diese Arbeit

			UBQ ^{K29R/K48R} , kein Stopcodon, C- terminaler HA- Tag, AS 135- 352	
pDONR201 UBQ ^{K29R/K48R} :D135- mRD21a ₁₃₅₋₃₅₂ :HA	Kanamycin	pDONR201	N-Terminale Fusion mit UBQ ^{K29R/K48R} , C-terminaler HA-Tag, AS 135-352	Diese Arbeit
pDONR201 tev:R134/D135- iRD21a ₁₃₄₋₄₆₂ :StrepII	Kanamycin	pDONR201	R134-> AGA N-terminale TEV- Spaltstelle, C- terminaler Strep-Tag, AS 134-462	Diese Arbeit
pDONR201 tev:R134/D135- mRD21a ₁₃₄₋₃₅₂ :HA	Kanamycin	pDONR201	R134-> AGA N-terminale TEV- Spaltstelle, C- terminaler HA- Tag, AS 134- 352	Diese Arbeit
pDONR201 UBQ ^{K29R/K48R} :R134/D135- iRD21a ₁₃₄₋₄₆₂ :StrepII_o.s.	Kanamycin	pDONR201	R134-> AGA N-Terminale Fusion mit UBQ ^{K29R/K48R} , kein Stopcodon, C- terminaler Strep-Tag, AS 134-462	Diese Arbeit
pDONR201 UBQ ^{K29R/K48R} :R134/D135- mRD21a ₁₃₄₋₃₅₂ :HA_o.s.	Kanamycin	pDONR201	R134-> AGA N-Terminale Fusion mit UBQ ^{K29R/K48R} , kein Stopcodon, C- terminaler HA- Tag, AS 134- 352	Diese Arbeit
pDONR201 UBQ ^{K29R/K48R} :R134/D135- mRD21a ₁₃₄₋₃₅₂ :HA	Kanamycin	pDONR201	R134-> AGA N-Terminale Fusion mit UBQ ^{K29R} , C- terminaler HA- Tag, AS 134- 352	Diese Arbeit
pDONR201 tev: G135- iRD21a ^{D135G} ₁₃₅₋₄₆₂ :StrepII	Kanamycin	pDONR201	D135G -> GAT/GGG N-terminale TEV- Spaltstelle, C- terminaler Strep-Tag, AS 135-462	Diese Arbeit
pDONR201 tev: G135- mRD21a ^{D135G} ₁₃₅₋₃₅₂ :HA	Kanamycin	pDONR201	D135G -> GAT/GGG N-terminale TEV- Spaltstelle, C- terminaler HA-	Diese Arbeit

			Tag, AS 135-352	
pDONR201 UBQ ^{K29R/K48R} :G135-iRD21A ^{D135G} ₁₃₅₋₄₆₂ :StrepII_o.s.	Kanamycin	pDONR201	D135G -> GAT/GGG N-Terminale Fusion mit UBQ ^{K29R/K48R} , kein Stopcodon, C- terminaler Strep-Tag, AS 135-462	Diese Arbeit
pDONR201 UBQ ^{K29R/K48R} :G135-mRD21a ^{D135G} ₁₃₅₋₃₅₂ :HA_o.s.	Kanamycin	pDONR201	D135G -> GAT/GGG N-Terminale Fusion mit UBQ ^{K29R/K48R} , kein Stopcodon, C- terminaler HA- Tag, AS 135- 352	Diese Arbeit
pDONR201 UBQ ^{K29R/K48R} :G135-mRD21a ^{D135G} ₁₃₅₋₃₅₂ :HA	Kanamycin	pDONR201	D135G -> GAT/GGG N-Terminale Fusion mit UBQ ^{K29R/K48R} , C-terminaler HA-Tag, AS 135-352	Diese Arbeit
pDONR201 TGG2:StrepII_o.s.	Kanamycin	pDONR201	Kein Stopcodon, C- terminaler Strep-Tag	Diese Arbeit
pDONR201 UBQ ^{K29R/K48R} :K29-TGG2 ₂₉₋₅₄₇ :StrepII_o.s.	Kanamycin	pDONR201	N-Terminale Fusion mit UBQ ^{K29R/K48R} , kein Stopcodon, C- terminaler Strep-Tag, AS 29-547	Diese Arbeit
pDONR201 UBQ ^{K29R/K48R} :K29-TGG2 ₂₉₋₅₄₇ :StrepII	Kanamycin	pDONR201	N-Terminale Fusion mit UBQ ^{K29R/K48R} , C-terminaler Strep-Tag, AS 29-547	Diese Arbeit
pDONR201 UBQ ^{K29R/K48R} :G29-TGG2 ^{K29G} ₂₉₋₅₄₇ :StrepII_o.s.	Kanamycin	pDONR201	K29G -> AAA/GGA N-Terminale Fusion mit UBQ ^{K29R/K48R} , kein Stopcodon, C- terminaler Strep-Tag, AS 29-547	Diese Arbeit
pDONR201 UBQ ^{K29R/K48R} :G29-TGG2 ^{K29G} ₂₉₋₅₄₇ :StrepII	Kanamycin	pDONR201	K29G -> AAA/GGA N-Terminale Fusion mit UBQ ^{K29R/K48R} , C-terminaler Strep-Tag, AS	Diese Arbeit

Alle *Entry*-Vektoren wurden mittels Sequenzierung auf das richtige *Insert* überprüft. Die Sequenzierungsprimer SelA und SelB sind in Tabelle A, angegeben. Die Sequenzierung wurde von den Firmen GATC Biotech (Konstanz) und Eurofins Genomics (Hamburg) durchgeführt.

1.4. Expressions-Vektoren

Tabelle A4: Verwendete Expressions-Vektoren mit Resistenz, Plasmidrückgrat, Herkunft und Verwendung in dieser Arbeit

Vektor	Resistenz	Plasmidrückgrat	Verwendung	Herkunft
pTAQ	Carbenicillin		Expressionsplasmid mit Taq-Polymerase	Dr. Nico Dissmeyer
RIL/pRK793 His:TEV ^{S219V} :Arg	Carbenicillin, Chloramphenicol	RIL/pRK793	Expressionsvektor mit N-terminal His-getaggtter TEV	Dr. Nico Dissmeyer
pEX::mCherry	Carbenicillin		Cytoplasmatisches mCherry zur Quantifikation von Protoplastentransformation	(Stegmann et al. 2013)
pVp16 8xHis:MBP:tev:ATE1	Carbenicillin	pVp16	Proteinexpression	Diese Arbeit
pVp16 8xHis:MBP:tev:ATE2	Carbenicillin	pVp16	Proteinexpression	Diese Arbeit
pVp16 8xHis:MBP:tev:NTA Q1	Carbenicillin	pVp16	Proteinexpression	Anne Kind
pVp16 8xHis:MBP:tev:N11- RIN4 ₁₁₋₂₁₁ :Strepll	Carbenicillin	pVp16	Proteinexpression	Diese Arbeit
pVp16 8xHis:MBP:tev:D11- RIN4 ₁₁₋₂₁₁ :Strepll	Carbenicillin	pVp16	Proteinexpression	Diese Arbeit
pVp16 8xHis:MBP:tev:R10D 11-RIN4 ₁₀₋₂₁₁ :Strepll	Carbenicillin	pVp16	Proteinexpression	Diese Arbeit
pVp16 8xHis:MBP:tev:G11- RIN4 ₁₁₋₂₁₁ :Strepll	Carbenicillin	pVp16	Proteinexpression	Diese Arbeit
pVp16 8xHis:MBP:tev:D135- iRD21a ₁₃₅₋₄₆₂ :Strepll	Carbenicillin	pVp16	Proteinexpression	Diese Arbeit
pVp16 ::8xHis:MBP:tev:D135- mRD21a ₁₃₅₋₃₅₂ :HA	Carbenicillin	pVp16	Proteinexpression	Diese Arbeit
pVp16 8xHis:MBP:tev:R134/ D135- iRD21a ₁₃₄₋₄₆₂ :Strepll	Carbenicillin	pVp16	Proteinexpression	Diese Arbeit
pVp16 8xHis:MBP:tev:R134/ D135- mRD21a ₁₃₄₋₃₅₂ :Strepll	Carbenicillin	pVp16	Proteinexpression	Diese Arbeit
pVp16 8xHis:MBP:tev:G135- iRD21a ^{D135G} ₁₃₅₋₄₆₂ :Strepll	Carbenicillin	pVp16	Proteinexpression	Diese Arbeit
pVp16 8xHis:MBP:tev:G135- mRD21a ^{D135G} ₁₃₅₋	Carbenicillin	pVp16	Proteinexpression	Diese Arbeit

352:Strepll				
pVp16 8xHis:MBP:tev:K29- TGG2 ₂₉₋₅₄₇ :Strepll	Carbenicillin	pVp16	Proteinexpression	Diese Arbeit
pVp16 8xHis:MBP:tev:G29- TGG2 ₂₉₋₅₄₇ :Strepll	Carbenicillin	pVp16	Proteinexpression	Diese Arbeit
pOLENTE UBQ ^{K29R/K48R} :N11- RIN4 ^{N11D} ₁₁₋₁₅₂ :Strepll	Carbenicillin	pOLENTE	Stabilitätsuntersuchung in Kaninchenretikulozytenlysats	Diese Arbeit
pOLENTE UBQ ^{K29R/K48R} :D11- RIN4 ^{N11D} ₁₁₋₁₅₂ :Strepll	Carbenicillin	pOLENTE	Stabilitätsuntersuchung in Kaninchenretikulozytenlysats	Diese Arbeit
pOLENTE UBQ ^{K29R/K48R} :R10- RIN4 ^{N11D} ₁₀₋₁₅₂ :Strepll	Carbenicillin	pOLENTE	Stabilitätsuntersuchung in Kaninchenretikulozytenlysats	Diese Arbeit
pOLENTE UBQ ^{K29R/K48R} :G11- RIN4 ^{N11G} ₁₁₋₁₅₂ :Strepll	Carbenicillin	pOLENTE	Stabilitätsuntersuchung in Kaninchenretikulozytenlysats	Diese Arbeit
pOLENTE UBQ ^{K29R/K48R} :D135- iRD21A ₁₃₅₋₄₆₂ :Strepll	Carbenicillin	pOLENTE	Stabilitätsuntersuchung in Kaninchenretikulozytenlysats	Diese Arbeit
pOLENTE UBQ ^{K29R/K48R} :D135- mRD21A ₁₃₅₋₅₂₂ :HA	Carbenicillin	pOLENTE	Stabilitätsuntersuchung in Kaninchenretikulozytenlysats	Diese Arbeit
pOLENTE UBQ ^{K29R/K48R} :R134/D 135-iRD21A ₁₃₄₋₄₆₂ :Strepll:nYFP	Carbenicillin	pOLENTE	Stabilitätsuntersuchung in Kaninchenretikulozytenlysats	Diese Arbeit
pOLENTE UBQ ^{K29R/K48R} :R134/D 135-mRD21A ₁₃₄₋₃₅₂ :HA:nYFP	Carbenicillin	pOLENTE	Stabilitätsuntersuchung in Kaninchenretikulozytenlysats	Diese Arbeit
pOLENTE UBQ ^{K29R/K48R} :G135- iRD21A ^{D135G} ₁₃₅₋₄₆₂ :Strepll	Carbenicillin	pOLENTE	Stabilitätsuntersuchung in Kaninchenretikulozytenlysats	Diese Arbeit
pOLENTE UBQ ^{K29R/K48R} :G135- mRD21A ^{D135G} ₁₃₅₋₃₅₂ :HA	Carbenicillin	pOLENTE	Stabilitätsuntersuchung in Kaninchenretikulozytenlysats	Diese Arbeit
pOLENTE UBQ ^{K29R/K48R} :K29- TGG2 ₂₉₋₅₄₇ :Strepll	Carbenicillin	pOLENTE	Stabilitätsuntersuchung in Kaninchenretikulozytenlysats	Diese Arbeit
pOLENTE UBQ ^{K29R/K48R} :G29- TGG2 ^{K29G} ₂₉₋₅₄₇ :Strepll	Carbenicillin	pOLENTE	Stabilitätsuntersuchung in Kaninchenretikulozytenlysats	Diese Arbeit
pUBC::ATE1:cYFP	Streptomycin	pUBC-cYFP-DEST	BiFC	Diese Arbeit
pUBC::ATE1:nYFP	Streptomycin	pUBC-nYFP-DEST	BiFC	Diese Arbeit
pUC- SPYCE::ATE1:HA:cYFP	Carbenicillin	pUC-SPYCE	BiFC	Diese Arbeit
pUBC::ATE2:cYFP	Streptomycin	pUBC-cYFP-DEST	BiFC	Diese Arbeit
pUBC::ATE2:nYFP	Streptomycin	pUBC-nYFP-DEST	BiFC	Diese

pUC-SPYCE::ATE2:HA:cYFP	Carbenicillin	pUC-SPYCE	BiFC	Arbeit Diese Arbeit
pUBC::UBQ ^{K29R/K48R} :D135-iRD21A ₁₃₅₋₄₆₂ :StrepII:nYFP	Streptomycin	pUBC-nYFP-DEST	BiFC	Arbeit Diese Arbeit
pUBC::UBQ ^{K29R/K48R} :D135-mRD21A ₁₃₅₋₃₅₂ :HA:nYFP	Streptomycin	pUBC-nYFP-DEST	BiFC	Arbeit Diese Arbeit
pUBC::UBQ ^{K29R/K48R} :R134/D135-iRD21A ₁₃₄₋₄₆₂ :StrepII:nYFP	Streptomycin	pUBC-nYFP-DEST	BiFC	Arbeit Diese Arbeit
pUBC::UBQ ^{K29R/K48R} :R134/D135-mRD21A ₁₃₄₋₃₅₂ :HA:nYFP	Streptomycin	pUBC-nYFP-DEST	BiFC	Arbeit Diese Arbeit
pUBC::UBQ ^{K29R/K48R} :G135-iRD21A ^{D135G} ₁₃₅₋₄₆₂ :StrepII:nYFP	Streptomycin	pUBC-nYFP-DEST	BiFC	Arbeit Diese Arbeit
pUBC::UBQ ^{K29R/K48R} :G135-mRD21A ^{D135G} ₁₃₅₋₃₅₂ :HA:nYFP	Streptomycin	pUBC-nYFP-DEST	BiFC	Arbeit Diese Arbeit
pUBC::UBQ ^{K29R/K48R} :N11-RIN4 ₁₁₋₁₅₂ :YFP	Streptomycin	pUBC-YFP-DEST	Stabilitätsuntersuchung in Protoplasten	Arbeit Diese Arbeit
pUBC::RD21A:StrepII:YFP	Streptomycin	pUBC-YFP-DEST	Stabilitätsuntersuchung in Protoplasten	Arbeit Diese Arbeit
pUBC::UBQ ^{K29R/K48R} :D135-iRD21A ₁₃₅₋₄₆₂ :StrepII:YFP	Streptomycin	pUBC-YFP-DEST	Stabilitätsuntersuchung in Protoplasten	Arbeit Diese Arbeit
pUBC::UBQ ^{K29R/K48R} :D135-mRD21A ₁₃₅₋₃₅₂ :HA:YFP	Streptomycin	pUBC-YFP-DEST	Stabilitätsuntersuchung in Protoplasten	Arbeit Diese Arbeit
pUBC::UBQ ^{K29R/K48R} :R134/D135-iRD21A ₁₃₄₋₄₆₂ :StrepII:YFP	Streptomycin	pUBC-YFP-DEST	Stabilitätsuntersuchung in Protoplasten	Arbeit Diese Arbeit
pUBC::UBQ ^{K29R/K48R} :R134/D135-mRD21A ₁₃₄₋₃₅₂ :HA:YFP	Streptomycin	pUBC-YFP-DEST	Stabilitätsuntersuchung in Protoplasten	Arbeit Diese Arbeit
pUBC::UBQ ^{K29R/K48R} :G135-iRD21A ^{D135G} ₁₃₅₋₄₆₂ :StrepII:YFP	Streptomycin	pUBC-YFP-DEST	Stabilitätsuntersuchung in Protoplasten	Arbeit Diese Arbeit
pUBC::UBQ ^{K29R/K48R} :G135-mRD21A ^{D135G} ₁₃₅₋₃₅₂ :HA:YFP	Streptomycin	pUBC-YFP-DEST	Stabilitätsuntersuchung in Protoplasten	Arbeit Diese Arbeit
pUBC::TGG2:StrepII:YFP	Streptomycin	pUBC-YFP-DEST	Stabilitätsuntersuchung in Protoplasten	Arbeit Diese Arbeit
pUBC::UBQ ^{K29R/K48R} :K29-TGG ₂₉₋₅₄₇ :StrepII:YFP	Streptomycin	pUBC-YFP-DEST	Stabilitätsuntersuchung in Protoplasten	Arbeit Diese Arbeit
pUBC::UBQ ^{K29R/K48R} :G29-TGG ^{K29G} ₂₉₋₅₄₇ :StrepII:YFP	Streptomycin	pUBC-YFP-DEST	Stabilitätsuntersuchung in Protoplasten	Arbeit Diese Arbeit

Die Expressionsvektoren wurden mittels dreifachem unabhängigen Restriktionsverdau und anschließender Agarose-Gelelektrophorese auf ihre Richtigkeit überprüft.

2. Verwendete Primer

Tabelle A5: In dieser Arbeit verwendete Primersequenzen mit Orientierung, Annealingtemperatur und Verwendungszweck

Name	Sequenz	Orientierung	Annealingtemperatur in °C	Verwendungszweck
ND61	gcgtggaccgctgctgcaactctctcagg	as	74,1	Salk_tDNA-Genotypisierung
SelA	tcgctgaacgctagcatggatctc	ss	64,6	Sequenzierprimer pENTR
SelB	gtaacatcagagatttgagacac	as	58,6	Sequenzierprimer pENTR
M15 modified	atggatgtttccagtcacgacg	ss	62,7	Sequenzierprimer pENTR
pUBC_ss	atttgagtttgcgaataattactctcg	ss	62,1	Sequenzierprimer pUBC-Dest
GK_FW	gggtacactgaattggtagctc	ss	62,4	Gabi-Kat_tDNA Genotypisierung
LB2_seq	ccaaactggaacaacactcaaccctatctc	as	66,8	Salk_tDNA-Genotypisierung
N289	gcctttcagaaatggataaatagccttgcttc	as	67,1	SAIL tDNA Genotypisierung
Geno_RP_a1-1	aagagggtcttctcctctgg	ss	59,8	Genotypisierung <i>ate1</i>
Geno_LP_a1-1	ctggaacacaactccgagtg	as	59,8	Genotypisierung <i>ate1</i>
At3_seq	gcgaagccgagtgagcagacaga	ss	60,9	Genotypisierung <i>ate2</i>
At4-2	ccacaaagaggaatctttctcatcatcat	as	57,2	Genotypisierung <i>ate2</i>
N130	cagaggaagagcaagaacgagaat	ss	61	Genotypisierung <i>prt1-1</i>
N131	ccacctctgtttatctacac	as	55,9	Genotypisierung <i>prt1-1</i>
At120	aaaattgatcctttccatgcc	ss	54	Genotypisierungsprimer <i>prt6-1</i> , <i>prt6-2</i>
At121_seq	caacataagaatctgcgggag	as	57,9	Genotypisierungsprimer <i>prt6-1</i> , <i>prt6-2</i>
At231	tgtggaagtttgtttctccc	ss	57,9	Genotypisierungsprimer <i>prt6-3</i>
At232	tcattgggatgtttatcgacc	as	55,9	Genotypisierungsprimer <i>prt6-3</i>
qPCR_rd21 ss	ggctgaggtcaaagatcagg	ss	60	qRT-PCR
qPCR_rd21 as	ctccggttacgatctggttt	as	60	qRT-PCR
PP2A_5	gaccggagccaactaggac	ss	60	qRT-PCR
PP2A_3	aaaacttgtaactttccagca	as	60	qRT-PCR
ATE1_tev_ss	gcttagagaatctttatttcaggggatgtctttgaaaacgatgcgagt	ss	71,9	Klonierungsprimer ATE1 mit TEV-Spaltsequenz, Überhang zu attB1
ATE1_as	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtatcagttgatttcatacaccattctctc	as	>75	Klonierungsprimer ATE1 mit Stopcodon, und attB2

ATE1_pos2_ss	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggctaatgt cttgaaaaacgatgcgagt	ss	73,9	Klonierungspri mer ATE1 mit attB1
ATE1new_as	ggggaccactttgtacaagaagctgggtagttgat ttcataccattctctctga	as	>75	Klonierungspri mer ATE1 ohne Stopcodon, und attB2
ate2_tev_ss	cttagagaatctttatcttcaggggatgctgcgaaga aagcgaag	ss	72,1	Klonierungspri mer ATE2 mit TEV- Spaltsequenz, Überhang zu attB1
ate2_as	ggggaccactttgtacaagaagctgggtattacc ggagttcataccattatc	as	>75	Klonierungspri mer ATE2 mit Stopcodon, und attB2
ate2_pos2_ss	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggctaatgt cgtcgaagaaagcgaag	ss	74,9	Klonierungspri mer ATE1 mit attB1
ATE2new_as	ggggaccactttgtacaagaagctgggtaccgg agttcataccattatctc	as	>75	Klonierungspri mer ATE2 ohne Stopcodon, und attB2
Adapter	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggcttagag aatctttatctcagggg	ss	73,4	Adapter für Klonierung von attB1-Sequenz mit N-terminaler TEV- Spaltsequenz von ATE1; ATE2
adapter_tev	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggcttagaa aacctgtatcttcaggaatg	ss	73,9	Adapter für Klonierung von attB1-Sequenz mit N-terminaler TEV- Spaltsequenz von NTAQ1
ss_ntaq1_T EV	ttagaaaacctgtatcttcaggggaatgcccgcgca cctcg	ss	73,3	Klonierungspri mer NTAQ1 mit TEV- Spaltsequenz, Überhang zu attB1
as_ntaq_g w	ggggaccactttgtacaagaagctgggtactaag gaagcttgggaagagatcc	as		Klonierungspri mer NTAQ1 mit Stopcodon, und attB2
ss_RIN4wt _TEV	caggcttagagaatctttatcttcaggggatgacg ttcgaatgtacaaaat	ss	74	Klonierungspri mer RIN4 mit TEV- Spaltsequenz, Überhang zu attB1
ss_RIN4_T EV_N	caggcttagagaatctttatcttcagaactggaagc tgaggagaatg	ss	72,8	Klonierungspri mer N11- RIN4 ¹¹⁻²¹¹ mit TEV- Spaltsequenz, Überhang zu attB1
ss_RIN4_T EV_D	caggcttagagaatctttatcttcaggactggaagc tgaggagaatg	ss	73,7	Klonierungspri mer D11- RIN4 ^{N11D, 11-211}

				mit TEV-Spaltsequenz, Überhang zu attB1
ss_RIN4_T EV_RD	caggcttagagaatctttatttcagagagactggga agctgaggagaatg	ss	74,2	Klonierungsprimer R10/D11-RIN4 ^{N11D} ₁₀₋₂₁₁ mit TEV-Spaltsequenz, Überhang zu attB1
ss_RIN4_T EV_G	caggcttagagaatctttatttcagggtgggaagc tgaggagaatg	ss	74,6	Klonierungsprimer G11-RIN4 ^{N11G} ₁₁₋₂₁₁ mit TEV-Spaltsequenz, Überhang zu attB1
adapter_RI N4_TEV	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttagag aatctttatttcag	ss	71,1	Adapter für Klonierung von attB1-Sequenz mit N-terminaler TEV-Spaltsequenz von RIN4, e ^K
RIN4_Pos2 _ss	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttaatg gcacgttcgaatga	ss	73,6	Klonierungsprimer RIN4 mit attB1
RIN4_Pos2 _as	ggggaccactttgtacaagaagctgggtatcattt cctccaaagcc	as	>75	Klonierungsprimer RIN4 mit Stopcodon, und attB2
N11Dss	cgttcgaatgtacaaaaatttgagactgggaagct ga	ss	70,5	Gerichtete Mutagenese Primer für RIN4 ^{N11D}
N11Das	tcagctcccagctcctccaaatttggatcattcgaacg	as	70,5	Gerichtete Mutagenese Primer für RIN4 ^{N11D}
N11Rss	acgttcgaatgtacaaaaatttgaagatgggaag ctgagga	ss	71,4	Gerichtete Mutagenese Primer für RIN4 ^{N11R}
N11Ras	tcctcagctcccatctccaaatttggatcattcgaacg cgt	as	71,4	Gerichtete Mutagenese Primer für RIN4 ^{N11R}
N11Gss	gttcgaatgtacaaaaatttggaggatgggaagct gaggaga	ss	72,4	Gerichtete Mutagenese Primer für RIN4 ^{N11G}
N11Gas	tctctcagctcccatcctccaaatttggatcattcgaac aac	as	72,4	Gerichtete Mutagenese Primer für RIN4 ^{N11G}
RIN4new_a s	ggggaccactttgtacaagaagctgggtatttctc ccaaagccaaagc	as	>75	Klonierungsprimer RIN4 ohne Stopcodon, und attB2
as_RIN4_S trep1	gaactcgggtggctccaagctgaaccgcctcca cctttcctccaaagccaaagc	as	>75	Klonierungsprimer RIN4 ohne Stopcodon, C-terminaler StreptII-Tag

as_RIN4_S trep2	ggggaccactttgtacaagaagctgggtatcattt tcgaactgcgggtggctcc	as	>75	Adapterprimer für C- terminalen StrepII-Tag und attB2
ss_DELP_ Com	ggggacaagttgtacaaaaagcaggctaatg gggtccttaagcca	ss	51	Klonierungsprim er RAD21A mit attB1
as_ELP_os _Strep	ctgcgggtggctccaagctgaaccgctccaccg gcaatgttctttctgcc	as	>75	Klonierungsprim er RD21A ohne Stopcodon,C- terminaler StrepII-Tag
as_UB_EL P_Strep_os 2	ggggaccactttgtacaagaagctgggtattttcg aactgcgggtggctccaagctgaaccgctcc	as	>75	Adapterprimer RD21A ohne Stopcodon,C- terminaler StrepII-Tag und attB1
adapter_tev _ELP	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttagaa aacctgtattttcag	ss	71,9	Adapter für Klonierung von attB1-Sequenz mit N-terminaler TEV- Spaltsequenz von RD21A und TGG2
ss_DELP_t ev	gcttagaaaacctgtattttcaggatgagctaccgg agtctatt	ss	71,3	Klonierungsprim er D135- RD21A ¹³⁵⁻⁴⁶² mit TEV- Spaltsequenz, Überhang zu attB1
ss_RDELP _teV	gcttagaaaacctgtattttcagagatgagctac cggagtctatt	ss	72	Klonierungsprim er R134/D135- RD21A ¹³⁴⁻⁴⁶² mit TEV- Spaltsequenz, Überhang zu attB1
ss_GELP_t ev	gcttagaaaacctgtattttcaggggagctaccgg agtctattgac	ss	74,7	Klonierungsprim er G135- RD21A ^{D135G} _{135- 462} mit TEV- Spaltsequenz, Überhang zu attB1
ss_UB_DE LP	gtggggatgagctaccggagtctattga	ss	68	Klonierungsprim er D135- RD21A ¹³⁵⁻⁴⁶² mit Überhang zu UBQ ^{K29R/K48R}
ss_UB_RD ELP	ggagatgagctaccggagtctattga	ss	66,6	Klonierungsprim er R134D135- RD21A ¹³⁴⁻⁴⁶² mit Überhang zu UBQ ^{K29R/K48R}
ss_UB_GE LP	gtgggggggagctaccggagtctattga	ss	71	Klonierungsprim er G135- RD21A ^{D135G} _{135- 462} mit Überhang zu

ss_bridge_UBQ-attB1	accatgcagatcttctcaagacgtaac	ss	56,9	UBQ ^{K29R/K48R} Klonierungsprimer von UBQ ^{K29R/K48R} mit Überhang zu attB1
ss_attB1-UBQ	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttagccgccaccatgcagatcttctcaag	ss	51	Adapterprimer für Klonierung von attB1-Sequenz und UBQ ^{K29R/K48R}
as_UBQ_D ELP	ctcatccccacctctaagtcttaagacaagatgt	as	68,3	Klonierungsprimer für UBQ ^{K29R/K48R} mit Überhang zu D135-RAD21A ₁₃₅₋₄₆₂
as_UBQ_R DELP	atctctccacctctaagtcttaagacaagatgt	as	67,1	Klonierungsprimer für UBQ ^{K29R/K48R} mit Überhang zu R134/D135-RAD21A ₁₃₄₋₄₆₂
as_UB-RDELPII	ccggtagctcatctctccacctctaagtcttaa	as	70	Verlängerter Klonierungsprimer für UBQ ^{K29R/K48R} mit Überhang zu R134/D135-RAD21A ₁₃₄₋₄₆₂
as_UBQ_G ELP	ctccccccacctctaagtcttaagacaagatgt	as	70,7	Klonierungsprimer für UBQ ^{K29R/K48R} mit Überhang zu G135-RAD21A ^{D135G} ₁₃₅₋₄₆₂
ss_KP_com	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttaatgc aacacaacacatacatctaca	ss	50	Klonierungsprimer TGG2 mit attB1
ss_KP_tev	gcttagaaaacctgtatttcagaaacctgaagaag agattacttg	ss	69,4	Klonierungsprimer K29-TGG2 ₂₉₋₅₄₇ mit TEV-Spaltsequenz, Überhang zu attB1
ss_GP_tev	gcttagaaaacctgtatttcaggacctgaagaag agattacttg	ss	71,2	Klonierungsprimer G29-TGG2 ^{K29G} ₂₉₋₅₄₇ mit TEV-Spaltsequenz, Überhang zu attB1
as_KP_os Strepl	ctgcggtggctccaagctgaaccgctccaccttgatggccttgcg	as	>75	Klonierungsprimer TGG2 ohne Stopcodon, C-terminaler Strepl-Tag
ss_UB_KP	gtgggaaacctgaagaagagattactg	ss	65,3	Klonierungsprimer K29-TGG2 ₂₉₋₅₄₇ mit Überhang zu UBQ ^{K29R/K48R}

ss_ub_GP	gtgggggacctgaagaagagattacttgc	ss	68,1	Klonierungspri mer G29- TGG2 ^{K29G} ₂₉₋₅₄₇ mit Überhang zu UBQ ^{K29R/K48R}
as_UBQ_K P	tcaggttcccacctctaagtcttaagacaagatgt	as	68,3	Klonierungspri mer für UBQ ^{K29R/K48R} mit Überhang zu K29-TGG2 ₂₉₋₅₄₇
as_UBQ_G P	tcaggtccccacctctaagtcttaagacaagatgt	as	70,6	Klonierungspri mer für UBQ ^{K29R/K48R} mit Überhang zu G29- TGG2 ^{K29G} ₂₉₋₅₄₇
as_mRD21 a_HAT	gatagcccgcatagtcaggaacatcgtatgggtag gatcccattcgccattctttatcg	as	63,2	Klonierungspri mer für mRD21A mit Überhang zu HA-Tag
as_HA_os	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC TGGGTAAGCACCCAGCACCCAGCGTA ATC	as	>75	Klonierungspri mer für HA- TAG ohne stopcodon mit attB2
as_HA_sto p	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC TGGGTATCAAGCACCCAGCACCCAGC GTAATC	as	>75	Klonierungspri mer für HA- TAG mit stopcodon mit attB2

3. Schema: Interaktion rekombinante *N-end rule pathway* Komponente mit endogenem RD21a

Expression von ATE1, ATE2 und PRT6-UBR-Domäne als MBP-Fusionsprotein in *E. coli*

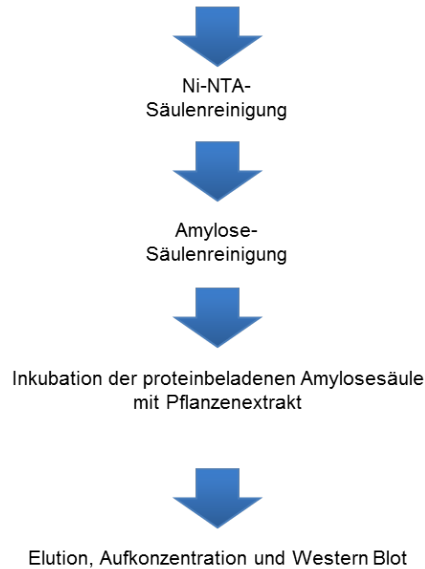


Abbildung A1: Experimenteller Ablauf der Interaktion rekombinanter Komponenten mit endogenem RD21a. Die Proteine wurden nach Aufschluss mittels Ultraschall erst über eine Nickel-NTA-Säule (Qiagen) gereinigt, eluiert mit 400 mM Imidazol und anschließend auf AmyloseHarz (NEB) gekoppelt. Anschließend wurden 10 mL PE mit dem Säulenmaterial inkubiert, 3 x gewaschen und mittels 10 mM Maltose der Proteinkomplex eluiert. Die Konzentration erfolgte mittels Amicon-15.

Zu 3.1.1. Stabilität von N-RIN4 in Protoplasten verschiedener Mutanten

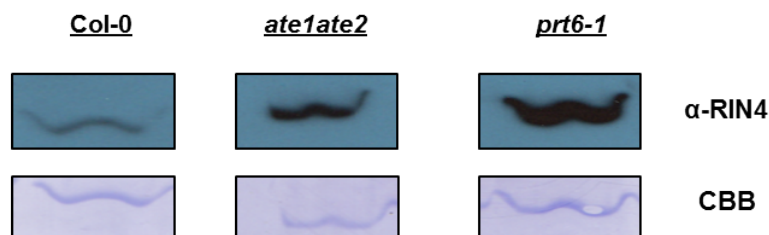


Abbildung A2: Stabilität von N-RIN4:YFP in Protoplasten von Col-0, *ate1 ate2* und *prt6-1*. Gezeigt sind die Western Blots der Transformation von Col-0, *ate1 ate2* und *prt6-1* mit pUBC::UBQ^{K29R/K48R}:N11-RIN4₁₁₋₁₅₂:YFP und mCherry. Detektiert wurde mittels α-RIN4-AK (sc -27369, 1:200), Ladekontrolle durch CBB-Färbung.

Zu 3.1.2.1.

Tabelle A6: Auflistung der angereicherten Proteine nach TCA-freier-Fällung mit Spot-Nummer im Gel, Anzahl der gefundene Fragmente (Hits), Proteinbezeichnung, ATG-Nummer

Gefunden in	Spot-Nummer	Hits	Protein	ATG-Nummer
<i>prt6-3/ate1</i>	CN13	19	PUR4	AT1G74260.1

<i>ate2</i>				
		9	LINC4	AT5G65770.1 (+2)
<i>prt6-3/ate1ate2</i>	CN14	4	GLDP1	AT4G33010.1
		4	AK-HSDH	AT4G19710.2
<i>ate1ate2</i>	CN15	9	WEB1	AT2G26570.1
<i>ate1ate2/prt1-1</i>	CN16	4	ATXYL1, XYL1, TRG1	AT1G68560.1
<i>prt6-3</i>	CN17	11	Putative Glycosyl Hydrolase unbekannter Funktion (DUF1680)	AT5G12950.1
<i>ate1ate2</i>	CN18			
<i>prt6-3</i>	CN19	1	Putative Glycosyl Hydrolase unbekannter Funktion (DUF1680)	AT5G12950.1
<i>prt6-3</i>	CN20	9	Putative Glycosyl Hydrolase unbekannter Funktion (DUF1680)	AT5G12950.1
<i>ate1ate2</i>	CN21	5	SIR	AT5G04590.1
		18	Phosphofruktokinase family protein	AT1G20950.1
<i>ate1ate2</i>	CN22	3	AlaAT1	AT1G17290.1
		4	ATPB, PB	ATCG00480.1
<i>prt6-3</i>	CN23	21	RCA	AT2G39730.1
		6	FTSZ2-1, ATFTSZ2-1	AT2G36250.1
<i>prt6-3</i>	CN24	20	RCA	AT2G39730.1
		6	HCF109, ATPRFB	AT5G36170.1 (+1)
<i>prt6-3</i>	CN25	17	RCA	AT2G39730.1
		6	PGK1	AT3G12780.1
		2	GT, UGT74F2, ATSAGT1, SGT1, SAGT1	AT2G43820.1
<i>prt1-1</i>	CN26	7	ATRAB8D, ATRABE1B, RABE1b	AT4G20360.1
		5	ATMLP-470, NSP1, ATNSP1	AT3G16400.1
<i>prt6-3</i>	CN27	10	PGK1	AT3G12780.1
<i>prt1-1</i>	CN28	7	FBA2	AT4G38970.1
		2	RD21A	AT1G47128.1
<i>prt1-1</i>	CN29	9	Ribosomales Protein L1p/L10e family	AT3G63490.1
<i>prt1-1</i>	CN30	25	Ribosomales Protein L1p/L10e family	AT3G63490.1
		2	Aldolase-type TIM barrel family protein	AT3G14420.1 (+3)
<i>ate1ate2</i>	CN31	6	CA2, CA18, BETA CA2	AT5G14740.1 (+4)
<i>prt6-3</i>	CN32	15	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	AT5G02240.1
<i>prt1-1</i>	CN33	16	GRF6, AFT1, 14-3-3lambda	AT5G10450.1 (+3)
		11	GRF8, 14-3-3KAPPA, GF14 KAPPA	AT5G65430.1 (+2)
<i>ate1</i>	CN34	4	PBD2	AT4G14800.1

<i>ate2</i>				(+1)
<i>prt1-1</i>	CN35	19	RRF, HFP108, cpRRF, AtcpRRF	AT3G63190.1
<i>prt1-1</i>	CN36	4	ATGRP7, CCR2, GR-RBP7, GRP7	AT2G21660.1
<i>prt1-1</i>	CN37	8	AlG2-like (Avirulenz induziertes Gen) family protein	AT3G28940.1
		5	ATGRX4, GRX4	AT3G15660.1
<i>prt1-1</i>	CN38	7	ATGRP7, CCR2, GR-RBP7, GRP7	AT2G21660.1
<i>prt1-1</i>	CN39	7	ATGRP7, CCR2, GR-RBP7, GRP7	AT2G21660.1
<i>prt6-3</i>	CN40	4	Polyketide Zyklase/Dehydrase und Lipidtransport superfamily protein	AT4G23670.1
		4	CCR1, ATGRP8, GR-RBP8, GRP8	AT4G39260.1 (+2)
		7	CP12-1, CP12	AT2G47400.1

Tabelle A7: Auflistung der angereicherten Proteine nach TCA-Fällung mit Spot-Nummer im Gel, gefundene Fragmente (Hits), Proteinbezeichnung, ATG-Nummer

Gefunden in	Spot-Nummer	Hits	Protein	ATG-Nummer
<i>prt6-3</i>	CN108	34	AGY1, AtcpSecA, SECA1	AT4G01800.1
<i>prt6-3</i>	CN109	27	Tudor1, AtTudor1, TSN1	AT5G07350.1 (+1)
		12	Tudor2, AtTudor2, TSN2	AT5G61780.1
		3	FUG1	AT1G17220.1
<i>prt1-1</i>	CN110	53	Tudor1, AtTudor1, TSN1	AT5G07350.1 (+1)
<i>prt1-1</i>	CN111	18	AtGLDP1, GLDP1	AT4G33010.1
		7	ACO3	AT2G05710.1
<i>prt1-1</i>	CN112	33	Tudor2, AtTudor2, TSN2	AT5G61780.1
		10	polyribonucleotide nucleotidyltransferase, putative	AT5G14580.1
<i>prt1-1</i>	CN113	12	AtGLDP1, GLDP1	AT4G33010.1
		46	EMB2753	AT1G80410.1 (+1)
		7	emb2746	AT5G63420.1
<i>prt6-3</i>	CN114	11	AtGLDP2, GLDP2	AT2G26080.1
		7	AK-HSDH I, AK-HSDH	AT1G31230.1
<i>prt1-1</i>	CN115	28	methionine--tRNA ligase, putative / methionyl-tRNA synthetase, putative / MetRS, putative	AT4G13780.1
		7	Nucleoporin interacting component (Nup93/Nic96-like) family protein	AT3G57350.1
<i>prt6-3</i>	CN116	14	glycyl-tRNA synthetase / glycine--tRNA ligase	AT1G29880.1
		10	EMB1467, CI76	AT5G37510.1 (+1)

		10	P5CS1, ATP5CS	AT2G39800 .1 (+1)
<i>prt1-1</i>	CN117	35	ATMS2, MS2	AT3G03780 .1
		50	ATCIMS, ATMETS, ATMS1	AT5G17920 .1
<i>prt1-1</i>	CN118	24	ATMS2, MS2	AT3G03780 .1
		40	ATCIMS, ATMETS, ATMS1	AT5G17920 .1
<i>prt1-1</i>	CN119	21	ATMS2, MS2	AT3G03780 .1
		33	ATCIMS, ATMETS, ATMS1	AT5G17920 .1
		10	emb1138	AT5G26742 .1
<i>prt1-1</i>	CN120	21	PCK1, PEPCK	AT4G37870 .1
<i>prt1-1/prt6-3</i>	CN121	19	GYRB2	AT5G04130 .1
<i>ate1 ate2</i>	CN122	7	RHM1, ROL1, ATRHM1	AT1G78570 .1
		5	SRP72 RNA-binding domain	AT1G67680 .1
<i>prt6-3</i>	CN123	20	RNA helicase family protein	AT3G62310 .1
		15	RNA helicase family protein	AT2G47250 .1
<i>prt6-3</i>	CN124	14	Transketolase	AT3G60750 .1 (+1)
		18	ARA12	AT5G67360 .1
<i>prt6-3</i>	CN125	18	BXL1, ATBXL1	AT5G49360 .1
		5	RPOC1	ATCG0018 0.1
<i>prt6-3</i>	CN126	14	MFP2, ATMFP2	AT3G06860 .1
		14	DPP6 N-terminal domain-like protein (AT1G21670 .1
<i>prt6-3</i>	CN127	13	Enoyl-CoA hydratase/isomerase family	AT4G29010 .1
		10	PRH75	AT5G62190 .1
<i>prt1-1</i>	CN128			
<i>prt1-1</i>	CN129	3	MTHFR2	AT2G44160 .1
<i>prt1-1</i>	CN130	7	NIR1, NIR, ATHNIR	AT2G15620 .1
<i>prt1-1</i>	CN131	10	Hop1	AT1G12270 .1
		8	Hop2	AT1G62740 .1
<i>prt1-1</i>	CN132	31	NAD-ME2	AT4G00570

				.1
<i>prt1-1</i>	CN133	9	Phosphofructokinase family protein	AT1G20950 .1
<i>prt6-3</i>	CN134	10	TGG2, BGLU37	AT5G25980 .2
<i>prt1-1</i>	CN135	9	SIR	AT5G04590 .1
		7	Phosphofructokinase family protein	AT1G76550 .1
<i>prt1-1</i>	CN136	5	: sks5	AT1G76160 .1
<i>prt1-1</i>	CN137	13	EIF4A-2	AT1G54270 .1
<i>prt1-1</i>	CN138	28	Mannose-binding lectin superfamily protein	AT1G52100 .1
<i>prt1-1</i>	CN139			
<i>prt6-3</i>	CN140	10	Aldolase superfamily protein	AT4G26530 .1
<i>prt1-1</i>	CN141	8	SPDS1	AT1G23820 .1
		6	ATPC1	AT4G04640 .1
<i>prt1-1</i>	CN142	15	CaS	AT5G23060 .1
		11	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein	AT1G29670 .1
		34	Ribosomal protein L1p/L10e family	AT3G63490 .1
<i>prt6-3</i>	CN143	14	ATPME3, PME3	AT3G14310 .1
		10	TOC34, ATTOC34, OEP34	AT5G05000 .2
		27	Ribosomal protein S3 family protein	AT2G31610 .1
		25	Ribosomal protein S3 family protein	AT5G35530 .1
		26	Ribosomal protein S3 family protein	AT3G53870 .1
<i>prt6-3</i>	CN144	6	PETA	ATCG0054 0.1
<i>prt6-3/ ate1 ate2</i>	CN145	5	CLPP4, NCLPP4	AT5G45390 .1
		8	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	AT2G37220 .1
		7	GRF6, AFT1, 14-3-3lambda	AT5G10450 .1 (+3)
<i>prt1-1</i>	CN146	2	Mog1/PsbP/DUF1795-like photosystem II reaction center PsbP family protein	AT1G77090 .1
<i>prt6-3</i>	CN147	3	PSBP-1, OEE2, PSII-P, OE23	AT1G06680 .1 (+1)
<i>prt6-3</i>	CN148	4	unknown protein	AT1G51100 .1
		4	GLP3, GLP3A, GLP3B, ATGER3, GER3	AT5G20630 .1

<i>prt1-1</i>	CN149			
<i>prt1-1</i>	CN150	4	RPL12-A, RPL12	AT3G27830 .1 (+1)
<i>ate1</i> <i>ate2</i>	CN151	16	Ribulose biphosphate carboxylase (small chain) family protein	AT5G38410 .1 (+3)
<i>prt6-3</i>	CN152			
<i>prt1-1</i>	CN153	15 3	CLPP6, NCLPP1, NCLPP6	AT1G11750 .1 (+1)

Zu 3.2.3. Vergleichende Proteomik

Tabelle A8: Hochregulierte Proteine aus Shotgun und DIGE-Experimenten. Angegeben sind die Uniprot-ID, Gen-ID, Molekulargewicht, Genotyp in dem sie hochreguliert waren, potenzielle Signalsequenzen/Schnittstellen, N-Terminus des reifen Proteins, gefundenes N-terminales Fragment in CHAFRADIC. Farblich hervorgehoben sind destabilisierende N-Termini entsprechend des *N-end rule pathway* sowie die in dieser Arbeit näher untersuchten Proteine RD21a und TGG2.

Protein	Uniprot-ID	Gen-ID	Hochreguliert in	MW in kDa	Signalsequenz/Peptidaseschnittstelle	N-Terminus	N-terminales Peptid ChaFRADIC
RRF, HFP108, cpRRF, AtcpRRF	Q9M1X0	AT3G63190.1	Prt1-1	30	AS 1-82 (Chloroplast)	AT	
Putative glycosyl hydrolase	Q9LXU4	AT5G12950.1	Prt1-1	96		MK	
ATMLP-470, NSP1, ATNSP1	Q9SDM9	AT3G16400.1	Prt1-1	52		MA	
GAPB	P25857	AT1G42970.1	Prt1-1	48	AS 1-80 (Chloroplast)	KL	GIVKGTMT TTHSYTGD QR
FBA2	Q944G9	AT4G38970.1	Prt1-1	43	AS 1-46 (Chloroplast)	AA	
CA2, CA18, BETA CA2	F4K874	AT5G14740.1	Prt1-1/runter prt6-3	37		MV	
Aldolase-type TIM barrel family protein	Q9LYR4	AT5G13420.1	Prt1-1, ate1 ate2	48		MA	
AlaAT1	F4I710	AT1G17290.1	Prt1-1	60	AS 1-47 (Mitochondrium)	SS	
alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	Q9SJI7	AT2G42690.1	Prt1-1	46		MA	

SHM1, STM, SHMT1	Q9SZJ5	AT4G37930.1	Prt1-1	57	AS 1-30 (Mitochondrium)	SL	
PBD2	F4JIF9	AT4G14800.1	Prt1-1	22		ME	
PTAC16	Q9STF2	AT3G46780.1	Ate1 ate2	54		MA	
PYK10, PSR3.1, BGLU23, LEB	Q9SR37	AT3G09260.1	Prt1-1, prt6-3, ate1 ate2	unbekannt	AS 1-24 (ER)	DG	
ATPMEP CRA, PMEPC RA	Q1JPL7	AT1G11580.1	Prt6-3	62	AS 1-34	FF	
FBA1	Q9SJU4	AT2G21330.1	Prt1-1/runter prt6-3	43	AS 1-10 (Chloroplast)	AS	
THFS	Q9SPK5	AT1G50480.1	Prt1-1	68		MS	
ATPase, V1 complex, subunit B protein	Q8W4E2	AT1G20260.1	Prt1-1	54		MV	
SBP1	O23264	AT4G14030.1	Ate1 ate2/runter prt1-1	54		MA	
Aldolase -type TIM barrel family protein	Q9LRR9	AT3G14420.1	Prt1-1/ runter ate1 ate2	40		ME	
CA1, ATBCA1, SABP3, ATSABP3	P27140-3	AT3G01500.1	Prt1-1/ runter ate1 ate2	30	AS 1-113 (Chloroplast)	AL	
Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein	Q94K71	AT3G48420.1	Prt1-1	34		MA	
GT, UGT74F2, ATSAGT1, SGT1, SAGT1	O22822	AT2G43820.1	Prt1-1	51		ME	
ATP synthase alpha/beta family protein	D7M1G8	AT5G08670.1	Prt1-1	60		MA	

GHBDH, ATGHB DH, GLYR1, GR1	Q9LSV0	AT3G2 5530.1	Prt1-1	31		ME	
AIG2-like (avirulence induced gene) family protein	Q9MBH2	AT3G2 8940.1	Prt1-1, ate1 ate2	19		MT	
CARA	Q9LVW7	AT3G2 7740.1	Prt1-1	47		MA	
Cytosol aminopeptidase family protein	Q944P7	AT4G3 0920.1	Prt1-1	61	AS 1-70 (Chloroplast)	AN	
AT-HF, HSN4 HIS HF	Q9SZ30	AT4G2 6900.1	Prt1-1	64	AS 1-? (Chloroplast)		
RD21, RD21A	P43297	AT1G4 7128.1	Ate1 ate2	51	AS 1-21 (Signal); 22-134 (Propetid)	DE	DELPESID WR
TUF, emb244 8, TUFF, VHA-E1	Q39258	AT4G1 1150.1	Prt1-1	26		MN	
CR88, EMB195 6, HSP90.5, Hsp88.1, AtHsp90.5	Q9SIF2	AT2G0 4030.1	Prt1-1	89		MA	
NPQ1, AVDE1	Q39249	AT1G0 8550.1	Prt1-1	52	AS1-? (Chloroplast), ?-113(Thylakoid)	VD	
NAD-dependent epimerase/dehydratase family protein	F4IKM1	AT2G2 9340.1	Ate1 ate2	33		MD	
CCR1, ATGRP8, GR-RBP8, GRP8	Q03251	AT4G3 9260.1	Prt1-1	17		MS	
Transketolase	Q8RWV0	AT3G6 0750.1	Prt1-1	80		MA	
HSP60-2	Q8L7B5	AT2G3 3210.1	Prt1-1, ate1 ate2	62	AS1-32 (Mitochondrium)	AA	

NAD-ME2	Q8L7K9	AT4G0570.1	Ate1 ate2	67	AS 1-32 (Mitochondrium)	CI	
TGG2, BGLU37	Q9C5C2	AT5G25980.2	Prt1-1, ate1 ate2	63	AS 1-28	KP	KPEEEITCE ENVPFTCS QTDR
MTHFR1	Q9SE60	AT3G59970.3	Prt1-1	66		MK	
FUM1	P93033	AT2G47510.1	Ate1 ate2	53	AS 1-28 (Mitochondrium)	ST	
2-oxoglutarate dehydrogenase, E1 component	F4IWW2	AT3G55410.1	Ate1 ate2, prt6-3	115		MV	
acylaminoacyl-peptidase-related	Q84LM4	AT4G14570.1	Prt1-1	84		MD	
HSP60-3A	Q93ZM7	AT3G13860.1	Prt6-3	60	AS 1-31 (Mitochondrium)	AA	
UBP6, ATUBP6	Q949Y0	AT1G51710.1	Prt6-3	54		MP	
ACO3	Q9SIB9	AT2G05710.1	Prt1-1, ate1 ate2	108	AS 1-78 (Mitochondrium)	VS	
mtLPD1	Q9M5K3	AT1G48030.1	Prt1-1	54	AS 1-36 (Mitochondrium)	AS	
HSP60, HSP60-3B	P29197	AT3G23990.1	Prt1-1	61	AS 1-31 (Mitochondrium)	AA	AAKEIKFGV EAR
ATPC1	Q01908	AT4G04640.1	Prt1-1	41	AS 1-50 (Chloroplast)	AS	TQkITEAMK LVAAAKVR
Phosphofruktokinase family protein	Q8W4M5	AT1G12000.1	Ate1 ate2, prt6-3	61		MA	
HEXO1, ATHEX2	A7WM73	AT3G55260.1	Prt1-1	61		MS	
ATLFNR2, FNR2	Q8W493	AT1G20020.1	Prt1-1/runter ate1 ate2	41	AS 1-57 (Chloroplast)	IT	
vacuolar ATP synthase subunit D (VATD)	Q9XGM1	AT3G58730.1	Ate1 ate2	29		MA	
PSBP-1, OEE2, PSII-P, OE23	Q42029	AT1G06680.1	Prt1-1	28	AS 1-? (Chloroplast); ?-77 (Thylakoid)	AY	

Zu 3.3.3.1. Interaktion von rekombinanter ATE1 mit endogenem RD21a

ATE1

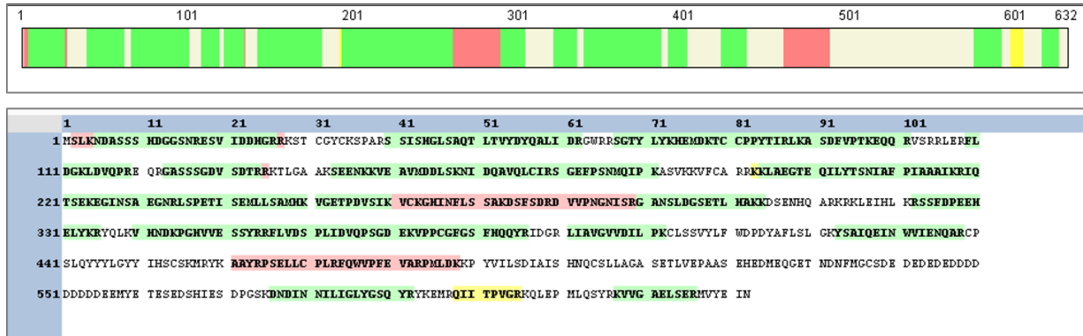


Abbildung A3: MS-Analyse der an Amylose-Harz gekoppelten His-MBP-tev-ATE1. Die ATE1 ist schematisch als Rechteck dargestellt, wobei alle farblich markierten Felder identifizierten Peptiden entspricht. Es konnten 65 % der ATE1-Peptide identifiziert und zugeordnet werden, ihre Identität ist im unteren Teil im Ein-Buchstabencode, grün (1 % falsch positiv), rot (5 % falsch positiv), gelb (>5 % falsch positiv) dargestellt.

ATE2

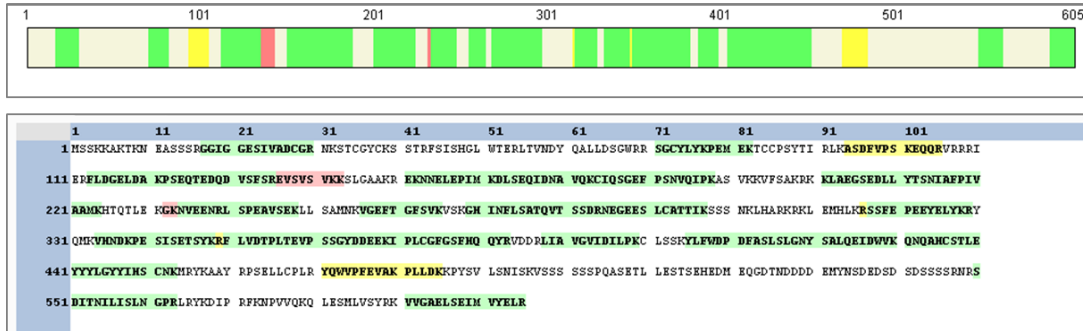


Abbildung A4: MS-Analyse der an Amylose-Harz gekoppelten His-MBP-tev-ATE2. Die ATE2 ist schematisch als Rechteck dargestellt, wobei alle farblich markierten Felder identifizierten Peptiden entspricht. Es konnten 59 % der ATE2-Peptide identifiziert und zugeordnet werden, ihre Identität ist im unteren Teil im Ein-Buchstabencode grün (1 % falsch positiv), gelb (5 % falsch positiv), rot (>5 % falsch positiv) dargestellt.

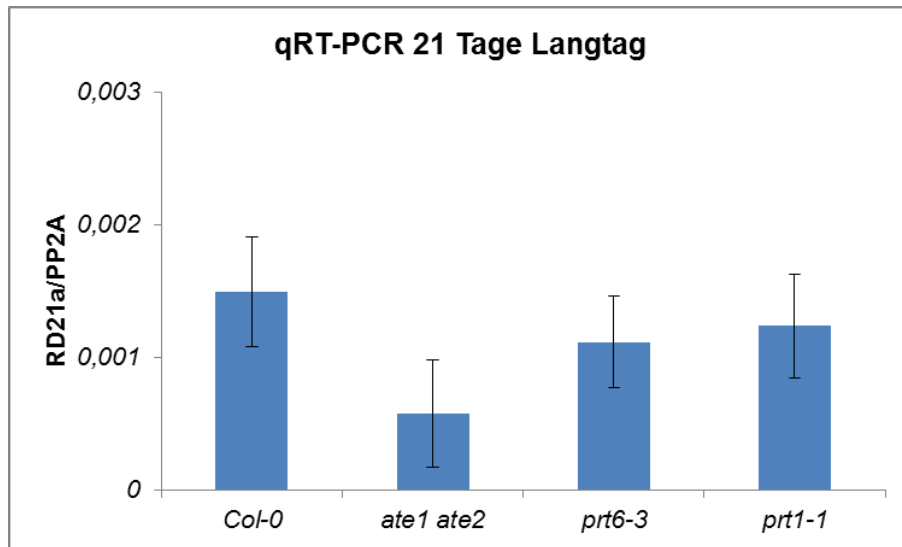


Abbildung A5: Relative Transkriptmenge von RD21a in Pflanzenmaterial von Col-0, *ate1 ate2*, *prt6-3*, *prt1-1* nach Anzucht 3 Wochen Langtag. Dargestellt ist das Ergebnis der qRT-PCR für RD21a-Transkript des in DIGE und Shotgun verwendeten Pflanzenmaterials.

Zu 3.6. Aktivitätsprofilung von RD21a in *N-end rule* Mutanten

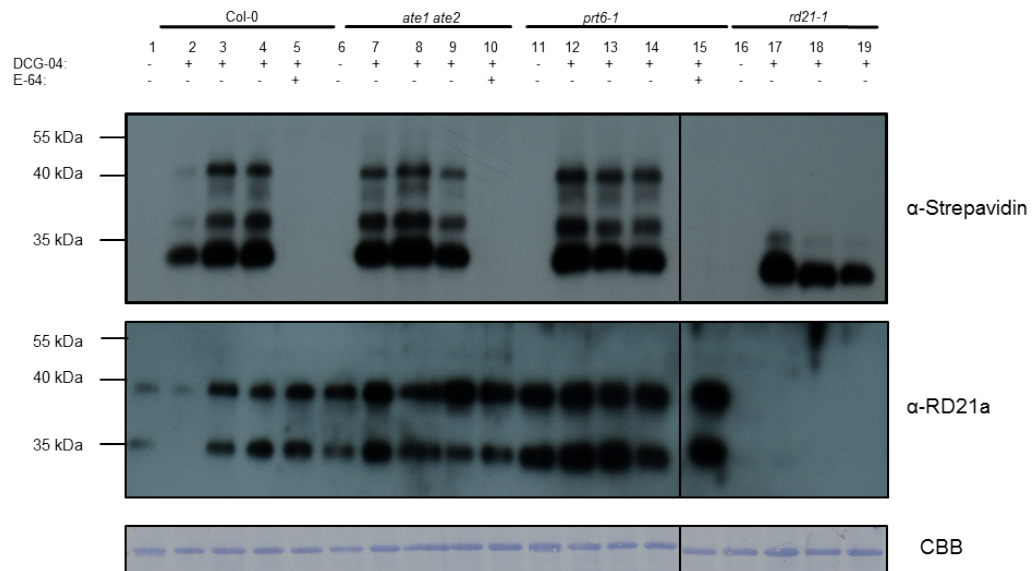


Abbildung A6: Aktivitätsmarkierung und Abundanz von endogenem RD21a in Col-0, *ate1 ate2*, *prt6-1* und *rd21-1*. Pflanzenextrakt der verschiedenen Genotypen wurde 4 h mit 0,2 μ M DCG-04 inkubiert. Gezeigt ist der Western Blot der Experimente mit PE von Col-0 (Spur 1-5), *ate1ate2* (Spur 6-10), *prt6-1* (Spur 11-15) und *prt6-3* (Spur 16-19) ohne Sonde (Spur 1, 6, 11, 16), des mit DCG-04 markierten PE (Spur 2-4, 7-9, 12-14, 17-19), sowie mit E-64 und DCG-04 inkubierten Materials (Spur 5, 10, 15). Detektiert wurde mittels Streptavidin-HRP (oberer WB, 1:3000) und α -RD21a (1:1000), die Ladekontrolle erfolgte mittels Coomassiefärbung.

Zu 3.7.1. N-terminale Abhängigkeit der Stabilität von RD21a *in vivo*

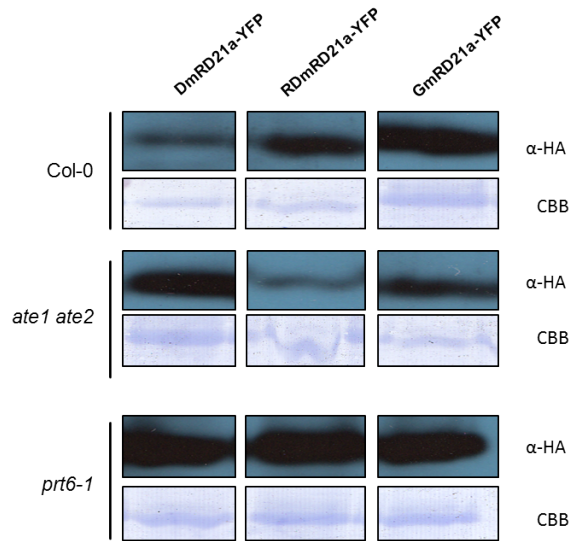


Abbildung A7: Western Blot der Transformation von Mesophyllprotoplasten von Col-0, *ate1 ate2* und *prt6-1* mit pUBC::UBQ^{K29R/K48R}:X-mRD21A₁₃₅₋₃₅₂:HA:YFP (X = D, RD, G). Detektiert wurde mittels α -HA-AK (1:1000), Ladekontrolle erfolgte durch Coomassiefärbung.

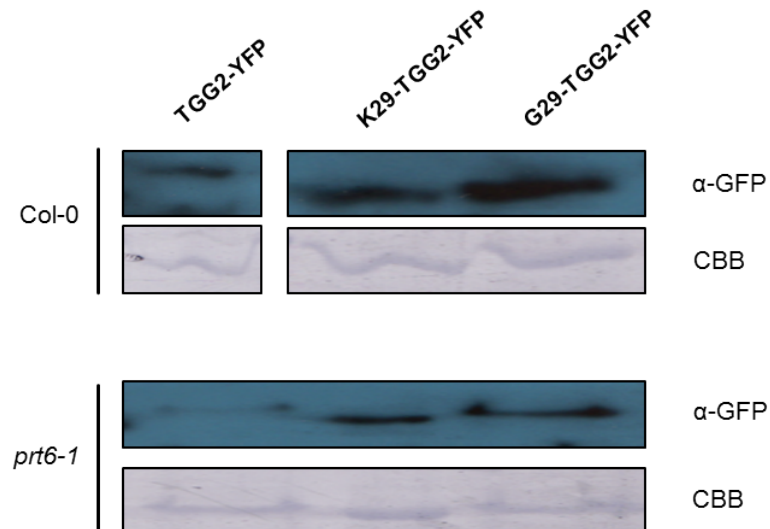


Abbildung A8: Western Blot der Transformation von Mesophyllprotoplasten von Col-0 und *prt6-1* mit pUBC::UBQ^{K29R/K48R}:X-TGG2:YFP (X = K, G). Detektiert wurde mittels α -GFP-AK (1:200), Ladekontrolle erfolgte durch Coomassiefärbung.

Zu 3.3.9. Ubiquitylierung von endogenem RD21a

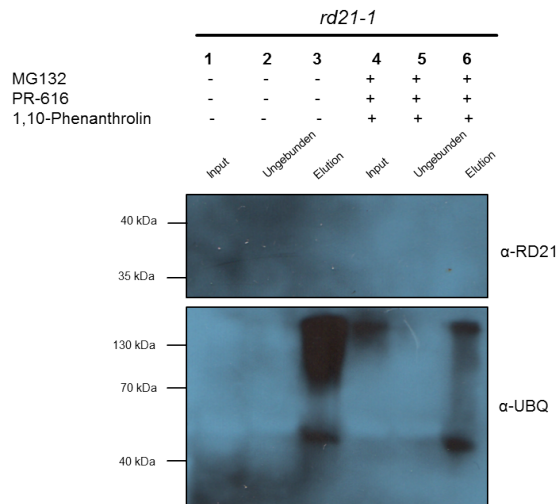


Abbildung A9: Ubiquitylierung von endogenem RD21a in Pflanzenextrakt von *rd21-1*. Dargestellt sind die Western Blots der TUBE-Versuche ohne (Spur 1-3) und mit MG132 und DUB-Inhibitoren (Spur 4-6. WB α -RD21a (1:1000, ECL-Pico, 90 s), WB α -UBQ (1:3000, ECL-Femto, 30 sek) Alle drei experimentellen Ansätze wurden gleichzeitig durchgeführt. n = 1.

4. RD21a als N-end rule pathway Substrat

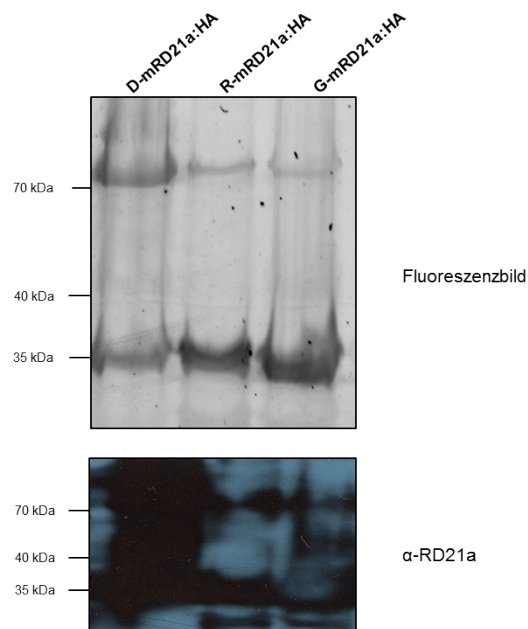


Abbildung A10: MV151 Markierung rekombinant exprimierten X-mRD21a:HA (X = D, RD, G). Dargestellt ist das Fluoreszenzbild bei 532 nm, von rekombinarem D-mRD21a:HA, RD-mRD21a:HA, G-mRD21a:HA nach Abspaltung des N-terminalen His-MBP-Tags. Im unteren Part ist der Western Blot mittels RD21a-AK (1:1000) gezeigt, n = 3.

At1g4712B 245803_at RD21

Arabidopsis eFP Browser at bar.utoronto.ca
Winter et al., 2007. PLoS One 2(8): e718

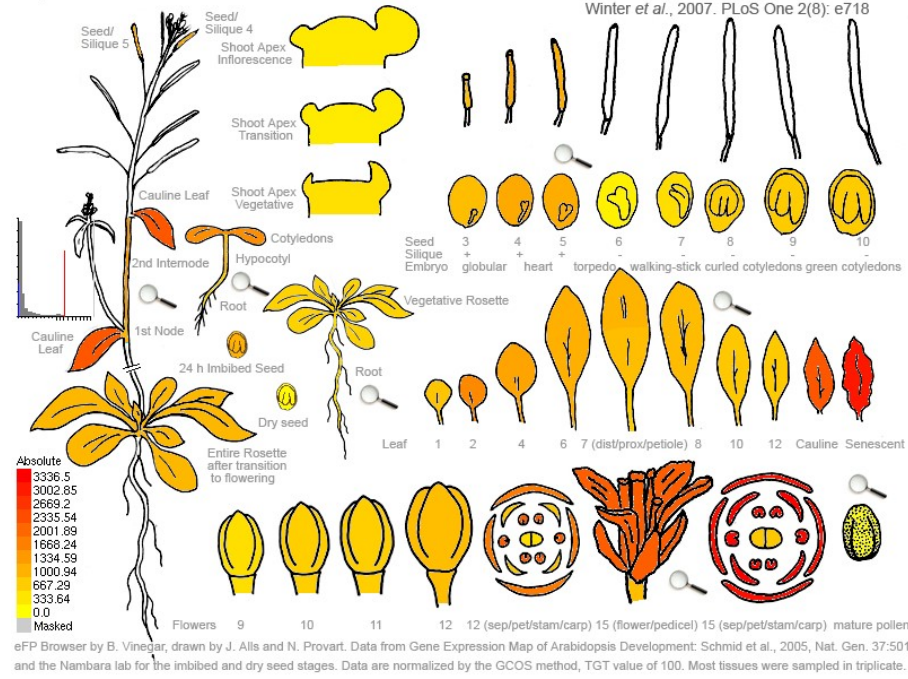


Abbildung A11: Heatmap Proteinabundanz von RD21a in *Arabidopsis*. (eFP-Browser, <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>)

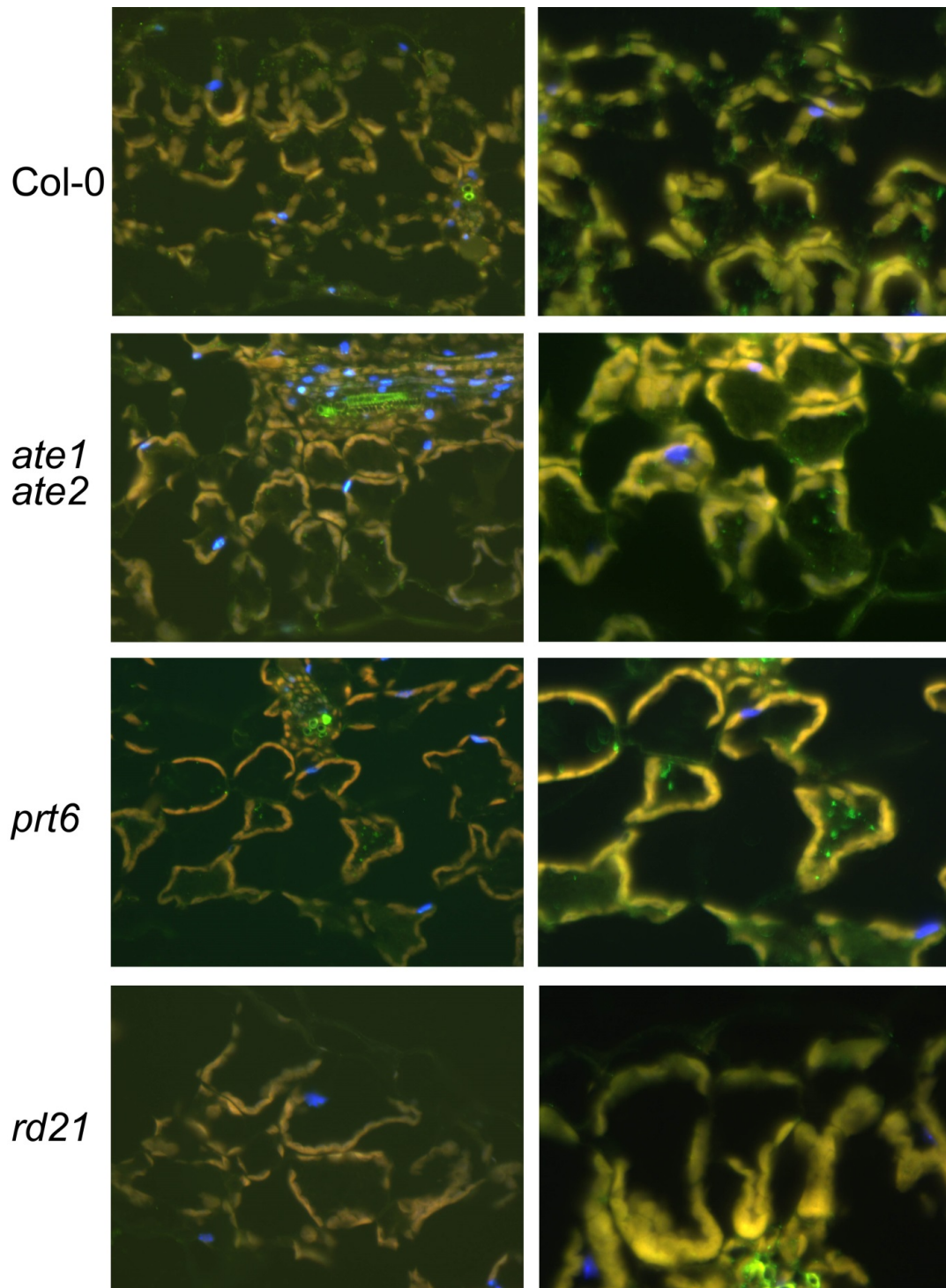


Abbildung A12: Lokalisation von RD21a in Rosettenblättern von Col-0, *ate1 ate2*, *prt6-1* und *rd21-1*. Zu sehen sind die Aufnahmen von 4 µm dicken Schnitten von in PEG-eingebettetem Blattmaterial (6 Wochen Kurztag). Die Immunlokalisation von RD21a wurde mittels Alex 488 detektiert, die Zellkerne mittels DAPI-Färbung visualisiert.

Aminosäuresequenz der untersuchten Proteine

RIN4

MARSNVPKFGNWEAEENVPYAYFDKARKTRAPGSKIMNPNDPEYNSDSQSQAPPHPPS
S
RTKPEQVDTVRRSREHMRSREESELKQFGDAGGSSNEAANKRQGRASQNNNSYDNKSPLH
K
NSYDGTGKSRPKPTNLRADESPEKVTVPKFGDWDENNPSSADGYTHIFNKVREERSSGA
NVSGSSRTPTHQSSRNPNNTSSCCCFGFGGK

TGG2

MQHNTYIYILTMKLLGFALAILLVVATCKPEEEITCEENVPFTCSQTDRFNKQDFESDFI
FGVASSAYQIEGGRGRGLNVWDGFTHRYPEKGGADLGNNGDTTCDSYRTWQKDLDMVEEL
G
VKGYRFSFAWSRILPKGKRSRGINEDGINYYSGLIDGLIARNITPFVTLFHWDLQPQLQD
EYEGFLDRITIDDFKDYADLCFERFGDRVKHWITINQLFTVPTRGYALGTDAPGRCSQWV
DKRCYGGDSSTEPYIVAHNQLLAHATVVDLYRTRYKYQGGKIGPVMITRWFLPYDDTLES
KQATWRAKEFFLGFMEPLTKGKYPYIMRKLVGNRLPKFNSTEARLLKGSYDFLGLNYYV
TQYAHALDPSPEKLTAMTDSLANTSLDANGQPPGPPFSKGSYYHPRGMLNVMEHFCTK
YGDPLIYVTENGFSTSGGPIPFTEAFHDYNRIDYLCSHLCFLRKAIKEKRVNVKGYFVWS
LGDNYEFCNGYTVRFGLSYVDFNNTADRDLKASGLWYQSFLRDTTKNQDILRSSLPFKN
GDRKSLT

RD21a

MGFLKPTMAILFLAMVAVSSAVDMSIISYDEKHGVSTTGGRSEAEVMSIYEAWLVKHGKA
QSQNSLVEKDRRFEIFKDNLRVDEHNEKNLSYRLGLTRFADLTNDEYRSKYLGAKEKK
GERRTSLRYEARVGDPELPEIDWRKKGAVAEVKDQGGCGSCWAFSTIGAVEGINQIVTGD
LITLSEQELVDCDTSYNEGCNGGLMDYAFEFIKNGGIDTDKDYPYKGVDTCDQIRKNA
KVVTIDSYEDVPTYSEESLKKAVAHQPISIAIEAGGRAFLYDSGIFDGSCGTQLDHGVV
AVGYGTENGKDYWIVRNSWGKSWGESGYLRMARNIASSSGKCGIAIEPSYPIKNGENPPN
PGPSPSPPIKPPTQCDSYYTCPESENTCCCLFEYGKYCFAWGCCPLEAATCCDDNYSCCPH
EYPVCDLDQGTCLLSKNPFSVKALKRKPATPFWWSQGRKNIA

Abbildung A13: Darstellung der AS-Sequenzen der Proteine RIN4, TGG2 und RD21a. Gelb Markiert sind die abgespaltenen Peptide entsprechend ihrer Annotation in der Datenbank UNIPROT (www.uniprot.org), der präsentierte N-Terminus des jeweiligen Proteins ist blau markiert und die potentiellen Lysine zur Ubiquitinylierung in rot hervorgehoben.

Identifikation des N-Terminales Peptides von RD21a

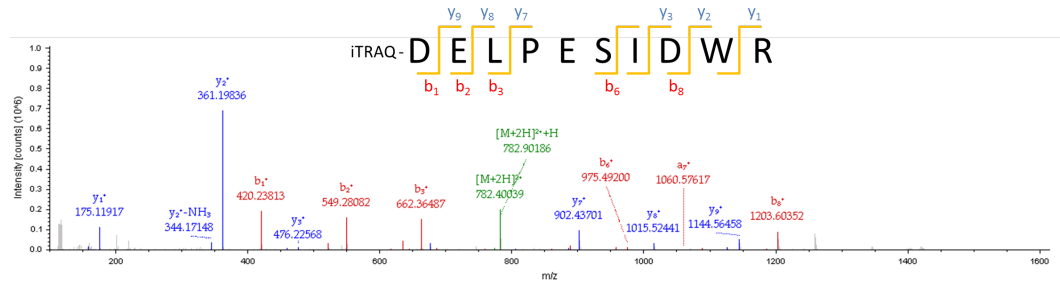


Abbildung A14: Massenspektrum des N-Terminus von RD21a mittels ChaFRADIC. Die Peptidsequenz ist über dem Spektrum angegeben. Die Zuordnung erfolgte mittels einer Suche in MASCOT, Ionen-Score 29 und einer Fragmenttoleranz von 0,001 Da.

Alignment von RD21a und ähnlichen Cysteinproteasen aus *Arabidopsis*

		Section 1				
	(1)	10	20	30	49	
RD21a	(1)	MGFLKPT	MAIIFLAMVAVSSAVDMSII	SYDEKKGVSTTIGGRSEAEVMS		
AALP	(1)	-MSAKTILSSVVLVVLVAASAAANIGFDESNPIRMVSDGIREVEESVSO				
Aleurain-ähnlich	(1)	-MSVKLNLSSSILLILFAAAASKEIGFDESNPIKRVSDNLEHELEDTVVO				
CatB	(1)	-----MAVYNTKLCCLASVFILLGLILLAFDLKGIETAESLTKQKLDISK				
TPE4A-ähnlich	(1)	-----MLNVLRNSNLTIAVLICFVLIASKLCSVDSSVYDPHKTLKO				
XCP2	(1)	MALSSPSRLLCFALALSAASLSLFSASSHDYSIVGYSPEDLESHDKLIE				
Consensus	(1)	K	MAVVLL L AASAAL IGIL A	IKGVS L E EDTVIQ		
		Section 2				
	(50)	60	70	80	98	
RD21a	(49)	IY-----EAWLVKHGKAQSONS	IIVEKDRRFEIFKDNLRFVDEHNE			
AALP	(49)	ILGOSRHVLSFARFTHRYGKKY--	ONVEEMKLRFSIFKENLDLIRSTNK			
Aleurain-ähnlich	(49)	ILGOSRHVLSFARFTHRYGKKY--	OSVEEMKLRFSVFKENLDLIRSTNK			
CatB	(42)	IL-----ODEIVKKNEN-----	PNAGWKAIND			
TPE4A-ähnlich	(42)	RF-----EKWLKTHSKLYG--	GRDEWMLRFGIYQSNVQLIDYINS			
XCP2	(50)	IF-----ENWISNFEKAY--	ETVEEKFLRFVFKDNLKHIDETNK			
Consensus	(50)	IL	ERWI KHGK Y OSVEE LRF IFKDNL LIDSTNK			
		Section 3				
	(99)	99	110	120	130	147
RD21a	(89)	KNLSYRLGLTRFADLTNDEVR	SKVLGAK--MEKKGERRTSLRYEARVGD			
AALP	(96)	KGLSYKLGVNOFADLTWQEFORTKLGAA-----	ONCSATLKGSHKVTEA			
Aleurain-ähnlich	(96)	KGLSYKLSLNOFADLTWQEFORYKLGAA-----	ONCSATLKGSHKITEA			
CatB	(66)	HFSNATVVEFRLLGVKPTPKKHLGVP-----	IVSHDPSLKLPK			
TPE4A-ähnlich	(80)	LHLPEKLDNRFADMTNSEFKAHFLGLN---	TSSRLRHKKORPVCDPAG			
XCP2	(88)	KGKSYWLGLENFADLSHEEFKMYLGLKTDIVRRDEERS	SYAEFAYRDVE			
Consensus	(99)	KGLSYKGLNRFADLT	EFKKHLGA		T	R A
		Section 4				
	(148)	148	160	170	180	198
RD21a	(136)	ELPESIDWRKKGAVAEVKDQGGCGS	CWAFSTIGAVEGINQIVIGDLITL			
AALP	(140)	ALPETKDWREDGIVSPVKDOGGCGS	CWTFSTIGALEAAYHOAFGKGISL			
Aleurain-ähnlich	(140)	TVPDTKDWREDGIVSPVKEQGHCGS	CWTFSTIGALEAAYHOAFGKGISL			
CatB	(106)	AFDARTAWPOCTSIGNILDOGH	CGSCWAFGAVESLSDRFCIOFGMNISL			
TPE4A-ähnlich	(126)	NVPDAVDWRTIQGAVTPIRNQKCGG	CWAFSAVAIEGINIKITGNLVSL			
XCP2	(137)	AVPKSVDWRKKGAVAEVKNQGS	CGSCWAFSTVAAVEGINKIVIGNLITL			
Consensus	(148)	AVPDSVDWR	GAVAPVKDOG CGSCWAFSIVGALEGIN I IG LISL			
		Section 5				
	(197)	197	210	220	230	245
RD21a	(185)	SEOELVDCDT-SYNEGCNGGLM	YAFEEIKNGGIDTDKD			
AALP	(189)	SEQQLVDCAGAFNNYGCNGGL	SQAFEYIKSNGGLDTEKA			
Aleurain-ähnlich	(189)	SEOOLVDCAGTFNFFGCHGGL	SOAFEYIKYNGGLDTEEA			
CatB	(155)	SVNDLLACCGFRCGDGCDGGYH	IAANQYFSYSGVVTEEC	DPYFDNTGCS		
TPE4A-ähnlich	(175)	SEOOLIDCVGTYNKGCSSGGL	MTAFEEIKTNGGLATETD			
XCP2	(186)	SEOELVDCDT-TYNNGCNGGLM	YAFEYIVKNGGLRKEED			
Consensus	(197)	SEOOLVDCDG TYN GCNGGLPD	AFEYIK NGGLDTE D			

Abbildung A15: Alignment von RD21a und anderen Cysteinproteasen aus *Arabidopsis*. Gezeigt ist das Alignment der Proteinsequenz von RD21a und AALP (At5g60360), Aleurain-ähnlich (At3g45310), CatB (At4g01610), TPE4A-ähnlich (At1g06260) und XCP2 (At1g20850). Entsprechend van der Hoorn et al. 2004 sind diese Cysteinproteasen mittels DCG-04 detektierbar. Gelb hervorgehoben sind konservierte AS, blau unterlegt solche, welche eine hohe Ähnlichkeit in den untersuchten Proteinen zeigen, grün unterlegt sind AS welche in zwei oder mehreren Proteinen identisch sind

Alignment von RD21a und ähnlichen Cysteinproteasen aus Tomate und Mais

		Section 1										
	(1)	1	10	20	30	40	50				60	
RD21a	(1)	---	MGFIKPTMA	ILFIAMVA	VSSAVDMSI	IISYDEKH	GVSTIGGRS	EA	EV	VM		
Cl4 (Tomate)	(1)	MAAHS	STLTITSL	LMILIFST	LSSASDMSI	IISYDETH	----	IHHR	SD	EV	S	
CIP1A (Mais)	(1)	MAASTT	AAAAALL	LLLLSL	AAAAADMSI	VS	YGE	-----	RSX	EA	R	
Consensus	(1)	MAAS	T	AA	LLLL	LLLL	SLSS	AA	DMSI	IISYDE	H	RS
		Section 2										
	(51)	51	60	70	80	90	100				110	
RD21a	(48)	SIYEAW	LVKHGKA	OSNSLVEK	DRRFEI	FKDNLRE	WDEHN	EKNLS	---	Y		
Cl4 (Tomate)	(47)	AIYESW	LIEHG--	RSYNAL	GEKDR	RFQIF	FKDNL	KYIDE	QNSV	PNQ	---	
CIP1A (Mais)	(39)	RMVYAE	WMAAHG	--RTYNA	VGEE	ERRVQV	FRDNL	RYIDA	HNA	AA	GVH	
Consensus	(51)	AIYEAW	LI	HG	KSYNAL	GEKDR	RFQIF	FKDNL	RYIDE	HNA	A	
		Section 3										
	(101)	101	110	120	130	140	150				160	
RD21a	(94)	RLGLTR	FADLTN	DEYRS	SKYLGAKM	---	EKKGER	RTSLR	YE	AR	V	
Cl4 (Tomate)	(92)	RLGLTR	FADLTN	DEYRS	IYLGTK	SGD	RRKLS	KNKSD	RYL	PK	V	
CIP1A (Mais)	(87)	RLGLNR	FADLTN	DEYRA	TYLGART	---	RPORER	LGARY	H	AA	D	
Consensus	(101)	RLGLTR	FADLTN	DEYRS	YLGAKS		RKK	ERK	S	RY	AKV	
		Section 4										
	(151)	151	160	170	180	190	200				210	
RD21a	(141)	VDWRK	KGAVAE	VKDQGG	CGSCWAF	STIGAVE	GINQIV	TGDLI	TL	SE	Q	
Cl4 (Tomate)	(142)	VDWRD	KGVLIV	GVKDOG	SCGSCWAF	SAVAAME	SINAIV	TGNLI	SL	SE	O	
CIP1A (Mais)	(134)	VDWRA	KGAVAE	VKDQGG	CGSCWAF	STIAAVE	GINQIV	TGDLI	SL	SE	O	
Consensus	(151)	VDWR	KGAVAE	VKDQGG	CGSCWAF	STIAAVE	GINQIV	TGDLI	SL	SE	Q	
		Section 5										
	(201)	201	210	220	230	240	250				260	
RD21a	(191)	DCDTS	YNEGCN	GGLMDY	AFFETI	IKNGG	IDTKDY	PYKGV	DGT	CD	O	
Cl4 (Tomate)	(192)	DCDKS	YNEGCN	GGLMDY	AFFETI	INNGG	IDTEEDY	PYKER	NDV	CD	O	
CIP1A (Mais)	(184)	DCDTS	YNEGCN	GGLMDY	AFFETI	INNGG	IDTEKDY	PYKGD	GR	CD	V	
Consensus	(201)	DCDTS	YNEGCN	GGLMDY	AFFETI	INNGG	IDTEKDY	PYKG	DG	CD	O	
		Section 6										
	(251)	251	260	270	280	290	300				310	
RD21a	(241)	KVVTI	DSYEDV	PITYSE	EESLKK	VAHQP	TSIAIE	AGGRA	FOLY	D	S	
Cl4 (Tomate)	(242)	KVVKI	DSYEDV	PVNNK	ALOKA	VAHQP	VSIAIE	AGGR	DLOH	YK	S	
CIP1A (Mais)	(234)	KVVTI	DSYEDV	PANDEK	SLOKA	VAHQP	VSVAIE	AGTA	FOLY	S	S	
Consensus	(251)	KVVTI	DSYEDV	P	N	EKSLO	KVAHQP	VSIAIE	AGGRA	FOLY	S	
		Section 7										
	(301)	301	310	320	330	340	350				360	
RD21a	(291)	CGTAL	DHGVVA	VG	YGTENG	KDYW	IVRNS	WGS	SWGE	SGYLR	MARN	
Cl4 (Tomate)	(292)	CGTAV	DHGVVA	AG	YGS	ENGMDY	WIVRNS	WGA	AKWGE	KGYLR	WORN	
CIP1A (Mais)	(284)	CGTAL	DHGVTA	VG	YGTENG	KDYW	IVRNS	WGS	SWGE	SGYLR	MERN	
Consensus	(301)	CGTAL	DHGVVA	VG	YGTENG	KDYW	IVRNS	WGS	SWGE	SGYLR	MARN	

Abbildung A16: Alignment von RD21a und anderen Cysteinproteasen aus Mais und Tomate. Gezeigt ist das Alignment der Proteinsequenz von RD21a, C14 (Tomate) und CIP1A (Mais). Gelb hervorgehoben sind konservierte AS, blau unterlegt solche, welche eine hohe Ähnlichkeit in den untersuchten Proteinen zeigen, grün unterlegt sind AS welche in zwei oder mehreren Proteinen identisch sind.

Anhang CD: -Vektorkarten

- Rohdaten

Lebenslauf

Christin Naumann geb. Sperling

Max-Nenke Straße 6

06120 Halle (Saale)

Geboren am 20.11.1986 in Frankfurt (Oder),

verheiratet mit Dr. Volker Naumann



Schulische / Akademische Ausbildung

09.2011 – heute	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie (IPB) Halle (Saale) in der Nachwuchsgruppe von Nico Dissmeyer „Proteinerkennung und -abbau“ Dissertation: in der Nachwuchsgruppe von Nico Dissmeyer (IPB) „Identifizierung und Charakterisierung von neuen Substraten des <i>N-end rule pathways</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i> “
02.2014-12.2014	Mutterschutz und Elternzeit
10.2006 – 07.2011	Studium Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Schwerpunktpraktika: Pflanzenphysiologie, Pathobiochemie Diplomarbeit in der AG Bettina Hause (IPB): „Untersuchung zur Trimerisierung der Allenoxidzyklase 2 in <i>Arabidopsis thaliana</i> “
09.1999 – 06.2006	Karl-Liebknecht Gymnasium Frankfurt (Oder) Abschluss mit Allgemeiner Hochschulreife

Konferenzteilnahmen

04.2016	Plant Proteases 2016, Oxford (Posterpräsentation)
07.2015	SEB-Prague Annual meeting, Prag (Posterpräsentation)
10.2013	SciXtalks, Amsterdam (Vortrag)

11.2013 3rd International Meeting "Conformational transitions in macromolecular interactions", Halle (Posterpräsentation)

Auszeichnungen und Stipendien

04.2016 1. Platz Posterpreis "Plant Proteases 2016"

04.2016 Stipendium zur Konferenzteilnahme der GSK-Stiftung

11.2013 2. Platz Posterpreis: 3rd International Meeting "Conformational transitions in macromolecular interactions"

02.2012-03.2014 Mitglied im GRK 1026 "Conformational transitions in macromolecular interactions"

10.2011-06.2015 Graduiertenstipendium des Landes Sachsen-Anhalt

Publikationen

2017:

Dong H, Dumenil J, Lu FH, Na L, Vanhaeren H, **Naumann C**, Klecker M, Prior R, Smith C, McKenzie N, Saalbach G, Chen L, Xia T, Gonzalez N, Seguela M, Inze D, Dissmeyer N, Li Y, Bevan MW. Ubiquitylation activates a peptidase that promotes cleavage and destabilization of its activating E3 ligases and diverse growth regulatory proteins to limit cell proliferation in Arabidopsis. **Genes and Development**, doi: 10.1101/gad.292235.116.

Mot AC, Prell E, Klecker M, **Naumann C**, Faden F, Westermann B, Dissmeyer N. Real-time detection of N-end rule-mediated ubiquitination via fluorescently labeled substrate probes. **New Phytologist**, doi: 10.1111/nph.14497.

White M, Klecker M, Hopkins R, Weits D, Mueller C, **Naumann C**, O'Neill R, Wickens J, Grossmann T, Dissmeyer N, Flashman E. Plant Cysteine Oxidases are Dioxygenases that Directly Enable Arginylation of N-End Rule Targets. **Nature Plants**, doi: 10.1038/ncomms14690.

2016:

Otto M, **Naumann C**, Brandt W, Wasternack C, Hause B. Activity regulation by heteromerization of Arabidopsis ALLENE OXIDE CYCLASE (AOC) family members. **Plants**, doi: 10.3390/plants5010003.

Naumann C, Mot A, Dissmeyer N. Generation of artificial N-end rule substrate proteins in vivo and in vitro. **Methods in molecular biology**, 1450:55-83.

2014:

Majovsky P, **Naumann C**, Lee CW, Lassowskat I, Trujillo M, Dissmeyer N, Hoehenwarter W. Targeted Proteomics Analysis of Protein Degradation in Plant Signaling on an LTQ-Orbitrap Mass Spectrometer. **Journal of Proteome Research**, 2014 Oct 3;13(10):4246-58.

Selbstständigkeits- und Einmaligkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.