



HEINRICH HEINE  
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Biochemische Charakterisierung der  
Komponenten des ERECTA-Signalweges

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades  
Der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vorgelegt von:  
**Alexander Hofmann**  
aus Karl-Marx-Stadt, jetzt Chemnitz

Düsseldorf, Januar 2018

Aus dem Institut für Biochemische Pflanzenphysiologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Georg Groth
2. Prof. Dr. Rüdiger Simon

Tag der mündlichen Prüfung:

26.02.2018

## Zusammenfassung

ERECTA, ERL1 und ERL2 sind Rezeptorproteine mit cytosolischer Kinasedomäne (*receptor-like-kinases*, RLKs), die an einer Vielzahl von entwicklungsbiologischen Prozessen beteiligt sind. So führt ein Fehlen funktioneller Formen dieser Proteine zu verminderter Wuchshöhe und gestauchten Blütenständen im Modellorganismus *Arabidopsis thaliana*. Auch die Entwicklung von Spaltöffnungen wird durch sie reguliert. In direkter Interaktion mit TMM, einem Korezeptor ohne Kinasedomäne, werden von ERECTA, ERL1 und ERL2 Peptidsignale wahrgenommen, die entweder zur Entwicklung von Stomata aus noch nicht differenziertem Blattgewebe führen oder dies verhindern. EPFL9 ist ein Peptidsignal, das die Stomataentwicklung anregt und bereits umfangreich physiologisch und strukturell charakterisiert wurde. Ein weniger gut charakterisiertes Peptidsignal ist EPFL2. Darüber hinaus wird BAK1 als Korezeptor im ERECTA-Signalweg postuliert.

Die Gewinnung dieser Proteine und Peptide für biochemische Analysen ist bisher sehr aufwendig, da posttranslationale Modifikationen wie Disulfidbrückenbindungen und N-Glykosylierung an ihnen erreicht werden müssen.

In der vorliegenden Arbeit wird ein System etabliert Proteine und Peptide in ausreichenden Mengen und Reinheit für biochemische Analysen zu gewinnen. Hierbei wird für ERECTA, ERL1, ERL2, TMM und BAK1 die N-Glykosylierung und Ausbildung korrekter Disulfidbrücken vernachlässigt und eine Expression im Wirtssystem *Escherichia coli* mit anschließender Affinitätschromatographie durchgeführt.

Die Gewinnung von heterolog exprimiertem EPFL9 aus *E. coli* und die durch *redox shuffling* erzielte Ausprägung von funktionsimmanenten Disulfidbrücken wird reproduziert und auf EPFL2 angewandt.

Mit den gewonnenen Komponenten wurde gezeigt, dass die heterolog exprimierten Rezeptoren EPFL9 und EPLF2 binden. Es konnten Dissoziationskonstanten zur Interaktion mit EPFL9 und EPFL2 bestimmt und verglichen werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Korezeptor TMM scheinbar ohne zusätzliches Rezeptorprotein EPFL2 binden kann.

Die Bindung von EPFL2 an TMM, zwei Komponenten, die noch nicht alleinstehend charakterisiert wurden, konnte über Größenausschlusschromatographie Evidenz gesammelt werden.

Es wurde im Versuch an *Arabidopsis thaliana* gezeigt, dass das gewonnene Peptid EPFL2 Bioaktivität aufweist und negativ regulatorisch auf die Stomataentwicklung in Pflanzen wirkt.

In Strukturbindungsmodellen wird ein Bindungsmodus von BAK1 an die RLKs postuliert, der sich von dem des Korezeptors TMM unterscheidet.

---

## Abstract

ERECTA, ERL1 and ERL2 are receptor proteins with a cytosolic kinase domain, so called receptor-like kinases (RLKs). They are involved in numerous developmental processes. In the case of plants with deficiencies in these proteins reduced growth height and compressed floral architecture occur in the model organism *Arabidopsis thaliana*. The formation of stomatal complexes is also regulated by ERECTA, ERL1 and ERL2. In direct interaction with the co-receptor TMM, which lacks a cytosolic kinase domain, peptide signals are perceived leading either to the development of stomata from progenitor cells or the development of stomata is inhibited. EPFL9 is a peptide signal, which propagates stomatal development and has been characterized as well physiologically as structurally. As less well characterized peptide signal is found in EPFL2. Additionally BAK1 is hypothesized as a potential co-receptor in the ERECTA signaling way.

Production of these proteins and peptides is complex and difficult, since posttranslational modifications such as N-glycosylation and the formation of disulfide bonds have to be secured.

This work introduces a system to produce proteins and peptides in sufficient quantity and purity for biochemical analysis. For ERECTA, ERL1, ERL2, TMM and BAK1 the introduction of disulfide bond and N-glycosylation is neglected, since they have not been shown to be relevant parameters for protein-peptide interactions. Therefore, expression and purification from the bacterial host *Escherichia coli* is performed.

The production of EPFL9 heterologously produced EPFL9 from *E. coli* and the introduction of correct disulfide bonds via redox shuffling is replicated and also applied to EPFL2.

With the yielded components binding of EPFL9 and EPFL2 to the heterologously produced receptors was shown. Dissociation constants were acquired for the interaction with EPFL9 and EPFL2. Furthermore an interaction of TMM with EPFL2 could be demonstrated in the absence of a receptor protein.

The binding of EPFL2 to TMM, which has not been characterized so far, was verified via size exclusion chromatography.

With the application of the peptides to *Arabidopsis plants*, a negative regulatory role of EPFL in stomatal development was demonstrated.

With computational protein-protein docking a mode of binding of BAK1 to the RLKs, differing from that of TMM, was postulated.

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	II
Abstract.....	III
Inhaltsverzeichnis .....	IV
Abbildungsverzeichnis .....	VII
Tabellenverzeichnis .....	VII
Widmung.....	X
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>- 1 -</b>
1.1 Bedeutung und Komponenten des ERECTA-Signalweges .....	- 1 -
1.2 Entwicklung des Spaltöffnungsapparates.....	- 5 -
1.3 Räumliche und zeitliche Dimension des ERECTA-Signalweges.....	- 7 -
1.4 Strukturelle Charakteristika der <i>receptor-like kinases</i> .....	- 9 -
1.5 Strukturelle Charakteristika der Cystein-reichen Peptide .....	- 11 -
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	- 14 -
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>- 16 -</b>
2.1 Chemikalien und Materialien .....	- 16 -
2.1.1 Verwendete bakterielle Stämme und Pflanzenlinien .....	- 16 -
2.1.2 Verwendete Plasmide.....	- 16 -
2.1.3 Verwendete Oligonukleotide und erstellte Konstrukte .....	- 18 -
2.1.4 Erstellte Konstrukte .....	- 18 -
2.2 Molekular- und mikrobiologische Methoden.....	- 19 -
2.2.1 DNA-Arbeiten, Klonierung und Transformation .....	- 19 -
2.3 Medien, Zellanzucht, Expression und Zellaufschluss.....	- 21 -
2.3.1 Zelllagerung .....	- 22 -
2.4 Proteinextraktion.....	- 22 -
2.4.1 Nickel-Affinitätschromatographie .....	- 22 -
2.4.2 GST-Affinitätschromatographie .....	- 23 -
2.4.3 Umkehrphasenchromatographie .....	- 24 -
2.4.4 Peptidrückfaltung .....	- 25 -
2.5 Biochemische/Biophysikalische Analytik.....	- 25 -
2.5.1 Proteinkonzentrationsbestimmung.....	- 25 -

---

2.5.2	SDS-PAGE, Gelfärbung .....	- 26 -
2.5.3	Westernblot .....	- 27 -
2.5.4	Größenausschlusschromatographie .....	- 28 -
2.5.5	Isothermale Titrationskalorimetrie.....	- 28 -
2.5.6	CD-Spektroskopie .....	- 29 -
2.6	Peptid-Bioassay.....	- 29 -
2.7	Bioinformatische Methoden.....	- 30 -
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>- 31 -</b>
3.1	Expression und Reinigung der Signalwegkomponenten .....	- 31 -
3.1.1	ERCETA, ERL1, ERL2, TMM und BAK1 .....	- 31 -
3.1.2	EPFL2 und EPFL9 .....	- 34 -
3.2	Rückfaltung der cysteinreichen Peptide .....	- 36 -
3.2.1	CD-Spektroskopie .....	- 40 -
3.3	Isothermale Titrationskalorimetrie.....	- 44 -
3.3.1	Dissoziationskonstanten zu ERECTA <sup>LRR</sup> .....	- 45 -
3.3.2	Dissoziationskonstanten zu ERL1 <sup>LRR</sup> .....	- 46 -
3.3.3	Dissoziationskonstanten zu ERL2 <sup>LRR</sup> .....	- 48 -
3.3.4	Dissoziationskonstanten zu TMM <sup>LRR</sup> .....	- 49 -
3.3.5	Dissoziationskonstanten zu BAK1 <sup>LRR</sup> .....	- 51 -
3.3.6	Zusammenfassung der thermodynamischen Parameter .....	- 52 -
3.4	Größenausschlusschromatographie .....	- 53 -
3.5	Peptid-Bioassay.....	- 57 -
3.6	Strukturmodelle.....	- 59 -
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>- 63 -</b>
4.1	Proteinreinigung .....	- 63 -
4.2	Peptidreinigung.....	- 63 -
4.3	Peptidrückfaltung .....	- 63 -
4.4	Bindungsaffinität von ERECTA <sup>LRR</sup> zu den EPFL-Peptiden.....	- 64 -
4.5	Bindungsaffinität von ERL1 <sup>LRR</sup> zu den EPFL-Peptiden .....	- 65 -
4.6	Bindungsaffinität von ERL2 <sup>LRR</sup> zu den EPFL-Peptiden .....	- 65 -
4.7	Bindungsaffinität von TMM <sup>LRR</sup> zu den EPFL-Peptiden .....	- 66 -
4.8	Bindungsaffinität von BAK1 <sup>LRR</sup> zu den EPFL-Peptiden.....	- 66 -
4.9	TMM <sup>LRR</sup> bindet EPFL2, BAK1 <sup>LRR</sup> bindet EPFL2 nicht.....	- 66 -

---

4.10	EPFL2 wirkt negativ regulatorisch auf die Stomatogenese .....	- 67 -
4.11	BAK1 als putativer Korezeptor .....	- 68 -
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>- 70 -</b>
	<b>Anhänge .....</b>	<b>- 78 -</b>
	Anhang 1 .....	- 78 -
	Anhang 2 .....	- 79 -
	Anhang 3 .....	- 81 -
	Anhang 4 .....	- 81 -
	Anhang 5 .....	- 82 -
	Anhang 6 .....	- 82 -
	Anhang 7 .....	- 83 -
	Anhang 8 .....	- 85 -
	Anhang 9 .....	- 87 -
	<b>Danksagung .....</b>	<b>- 88 -</b>
	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>- 89 -</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phänotypische Effekte von <i>ERECTA</i> -Mutanten	1
Abbildung 2: Regulation der Stomatadichte durch EPFL9 und die <i>ERF</i> -Gene	3
Abbildung 3: Graphische Darstellung des <i>ERECTA</i> -Signalweges	7
Abbildung 4: Kristallstruktur von TMM <sup>LRR</sup> -ERL1 <sup>LRR</sup>	10
Abbildung 5: Kristallstruktur von FLS2 <sup>LRR</sup> und BAK1 <sup>LRR</sup> im Komplex mit flg22	11
Abbildung 6: NMR-Struktur von EPFL9 in Lösung	12
Abbildung 7: Aminosäure- <i>alignment</i> der EPF/EPFL-Familie aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	13
Abbildung 8: Chromatogramm der Nickel-Affinitätschromatographie für <i>ERECTA</i> <sup>LRR</sup>	31
Abbildung 9: Westernblot der gereinigten Rezeptoren	32
Abbildung 10: Coomassie gefärbter SDS-PAGE der gereinigten Rezeptoren	33
Abbildung 11: Chromatogramm der GST-Affinitätschromatographie für GST-EPFL2	34
Abbildung 12: SDS-PAGE EPFL2 und EPFL2C>S vor der Rückfaltung	35
Abbildung 13: SDS-PAGE EPFL9 vor der Rückfaltung	35
Abbildung 14: Umkehrphasen-HPLC Chromatogramme von EPFL2	37
Abbildung 15: Umkehrphasen-HPLC Chromatogramme von EPFL9	38
Abbildung 16: Umkehrphasen-HPLC Chromatogramme von EPFL2C>S	39
Abbildung 17: CD-Spektrum von EPFL9, EPFL2 und EPFL2C>S	40
Abbildung 18: CD-Spektrum von EPFL9, EPFL2 und EPFL2C>S nach TCEP-Zugabe	41
Abbildung 19: Thermogramm von <i>ERECTA</i> mit EPFL2 und EPFL9	45
Abbildung 20: Thermogramm von <i>ERECTA</i> mit EPFL2C>S	46
Abbildung 21: Thermogramm von ERL1 mit EPFL2 und EPFL9	47
Abbildung 22: Thermogramm von ERL1 mit EPFL2C>S	47
Abbildung 23: Thermogramm von ERL2 mit EPFL2 und EPFL9	48
Abbildung 24: Thermogramm von ERL2 mit EPFL2C>S	49
Abbildung 25: Thermogramm von TMM mit EPFL2 und EPFL9	50
Abbildung 26: Thermogramm von TMM mit EPFL2C>S	50
Abbildung 27: Thermogramm von BAK1 mit EPFL2 und EPFL9	51
Abbildung 28: Thermogramm von BAK1 mit EPFL2C>S	52
Abbildung 29: Elutions Profil von EPFL2	54
Abbildung 30: Elutions Profil von TMM <sup>LRR</sup> und TMM <sup>LRR</sup> mit EPFL2	55
Abbildung 31: Elutions Profil von BAK1 <sup>LRR</sup> und BAK1 <sup>LRR</sup> mit EPFL2	56
Abbildung 32: Stomataindizes für Col-0 und Col-0 <i>tmm</i> nach Peptidbehandlung	57
Abbildung 33: Relative räumliche Position der Peptide am Rezeptorprotein	59
Abbildung 34: Vergleich der dreidimensionalen Strukturen der Peptide	60
Abbildung 35: <i>Docking</i> von BAK1 <sup>LRR</sup> mit ERL2 <sup>LRR</sup> im Vergleich zu BAK1 <sup>LRR</sup> -FLS2 <sup>LRR</sup>	62
Abbildung A1: <i>Multiple cloning site</i> von pETEV16b	XI
Abbildung A2: Aminosäure- <i>alignment</i> von <i>ERECTA</i> <sup>LRR</sup> , ERL1 <sup>LRR</sup> und ERL2 <sup>LRR</sup>	XII-XIII
Abbildung A3: Aminosäuresequenz von TMM <sup>LRR</sup>	XIV
Abbildung A4: Aminosäuresequenz von BAK1 <sup>LRR</sup>	XIV
Abbildung A5: Aminosäure- <i>alignment</i> von GST-EPFL2 und GST-EPFL2C>S	XV
Abbildung A6: Aminosäuresequenz von GST-EPFL9	XV
Abbildung A7: Plasmidkarten der <i>ERF</i> -LRRs in pETEV16b	XVI-XVII
Abbildung A8: Plasmidkarten von TMM <sup>LRR</sup> und BAK1 <sup>LRR</sup> in pETEV16b	XVIII-XIX
Abbildung A9: Plasmidkarten von EPFL2, EPFL2C>S und EPFL9	XX

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide mit Nukleotidsequenz	18
Tabelle 2: Liste der erstellten Konstrukte	19
Tabelle 3: Theoretisches Molekulargewicht und molarer Extinktionskoeffizient der Ektodomänen	20
Tabelle 4: Prozentualer Anteil an Sekundärstrukturelementen der CD-Spektren	43
Tabelle 5: Dissoziationskonstanten der Peptidliganden zu den betrachteten Ektodomänen	53
Tabelle 6: Elutionsmaxima und der Größenausschlusschromatographie	56
Tabelle 7: Signifikanzwerte der Stomataindizes nach Tukey-Test und Dunnett-Test	58
Abkürzungsverzeichnis	

Die Abkürzung für Aminosäuren Peptide (IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983 1984) sowie für spezifizierte und unspezifizierte Basen in Nukleinsäuren (Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences. Recommendations 1984. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB) 1986) richten sich nach den Empfehlungen der IUPAC-IUB Kommission für die biochemische Nomenklatur.

AA	<i>amino acid</i> , Aminosäure
ACN	Acetonitril
BSA	bovines Serumalbumin
c	Konzentration
CD	Circulardichroismus
d	Durchmesser, optische Weglänge
deg	<i>degree</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Deoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
e	Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gramm
G	freie Enthalpie
GST	Glutathion-S-Transferase
H	Enthalpie
His	Histidin, hier synonym für Polyhistidin- <i>tags</i> benutzt
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i> , Hochdruckflüssigchromatographie
IMAC	Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie
K	Geschwindigkeitskonstante
cal	Kalorien
kJ	Kilojoule, $10^3$ Joule
M	Molar, Mol pro Liter
mdeg	Millidegree
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
ml	Milliliter, $10^{-3}$ Liter
$\mu$ l	Mikroliter, $10^{-6}$ Liter
mM	Millimolar, $10^{-3}$ Mol pro Liter
$\mu$ M	Mikromolar, $10^{-6}$ Mol pro Liter
min	Minute
mol	Mol
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidiert)
nm	Nanometer, $10^{-9}$ Meter
nM	Nanomolar, $10^{-9}$ Mol pro Liter
<i>p</i>	<i>probability</i> , Wahrscheinlichkeit
<i>p.a.</i>	<i>pro analysis</i> , Stoffreinheitsklasse „zur Ananalyse“
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration

---

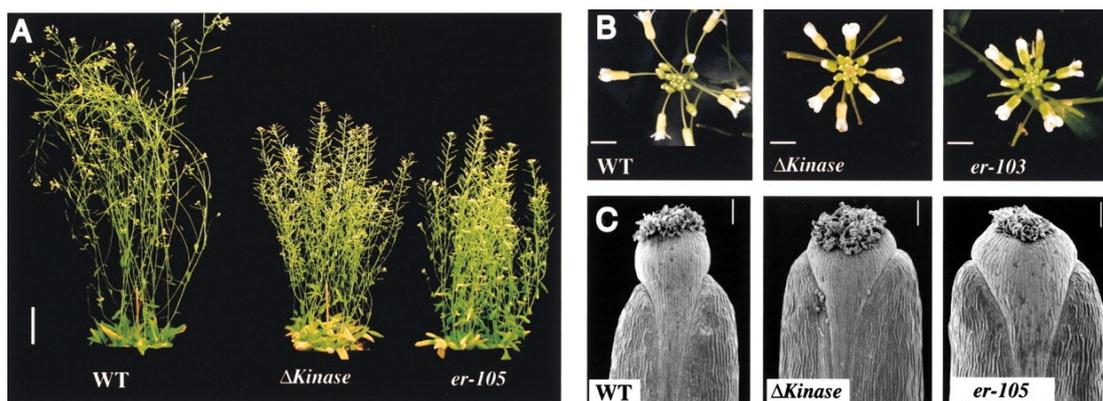
pI	pH-Wert, bei dem die Summe aller Ladungen eines Moleküls gleich Null ist
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POI	<i>protein of interest</i> , Zielprotein
q	Elliptizität
RMSD	<i>root-mean-square deviation</i> , Wurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung
RP	<i>reversed phase</i> , Umkehrphase
rpm	<i>rotations per minute</i> , Rotationen pro Minute
s	Sekunde
S	Entropie
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
t	Zeit
T	Temperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i> , Tabakätzvirus, Quellgenom der TEV-Proteasesequenz
TFA	Trifluoressigsäure
BisTris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
U	<i>unit</i> , Enzymmenge welche bei 25°C 1µmol Substrat min <sup>-1</sup> umsetzt
UV	Ultraviolett
v	Geschwindigkeit
VIS	<i>visible</i> , sichtbar
Vmax	Maximalgeschwindigkeit der enzymkatalysierten Reaktion
Vol.	Volumen

Meinem Sohn und meinem Großvater

# 1 Einleitung

## 1.1 Bedeutung und Komponenten des ERECTA-Signalweges

Seit der Erstbeschreibung des Gens *ERECTA* (At2g26330) als Schlüsselkomponente der Ausprägung pleiotroper Effekte (Torii et al. 1996), konnten bis heute zahlreiche Details des komplexen Hintergrundes dieser Effekte aufgeklärt werden. *ERECTA* kodiert für ein Rezeptorprotein mit cytosolischer Serin/Threonin-Kinasedomäne, einer Juxtamembran-Domäne, einer Transmembrandomäne und einer LRR-Rezeptordomäne (Torii et al. 1996). LRR steht für das Strukturmotiv der *leucine-rich repeats* (Leucin-reiche Wiederholungen). Damit stellen sie eine *receptor-like kinase* (RLK) dar. Ein Funktionsverlust dieses Gens führt makroskopisch in *Arabidopsis thaliana* zu verkürzten und gestauchten Blütenständen, komprimierten Schoten, verkürzten Petiolen und allgemein reduziertem Wachstum. Dieser Phänotyp war namensgebend für den *A. th.* „Wildtyp“ Landsberg erecta (Ler-0), (lat.: *erectus* aufrecht), da die ausgewachsenen Pflanzen im Vergleich zum Columbia Wildtyp aufrecht stehen (siehe Abb. 1). Hierbei handelt es sich nicht um eine Wildtyplinie im eigentlichen Sinne. Die Pflanzen gehen zurück auf ein Individuum aus einer Population (La-1) die Röntgenstrahlen-Mutagenese unterzogen wurde (Rédei 1993) und häufig wegen ihres kompakten und homogenen Wuchses Anwendung findet. Exakt diese Linie trägt eine *missense*-Mutation in der Kinasedomäne- kodierenden Region des Gens (Torii et al. 1996). Eine starke Expression von *ERECTA* im Sprossapikalmeristem, Blattprimordien und in juvenilen Geweben setzt *ERECTA* in den Kontext der Kontrolle von Wachstumsvorgängen im Bildungsgewebe (Yokoyama et al. 1998).



**Abbildung 1:** Phänotypische Effekte von *ERECTA*-Mutanten aus Shpak, 2003. **A** Pflanzenwuchs der Wildtyps Col-0 einer Kinasedomänendeletionsmutante und der Mutante *er-105* mit einem Nullallel für *ERECTA*. Die beiden Mutanten zeigen deutlich reduziertes Größenwachstum und aufrechten Wuchs. **B** Blütenstände der drei Pflanzen mit stark komprimierter Infloreszenz und verkürzten Petiolen. **C** Rasterelektronenmikroskopaufnahme der Schotenspitzen mit gestauchtem, verdicktem Wachstum im Fall der beiden Mutantenlinien.

Im Zuge verbesserter Genomannotierung im Bereich der Pflanzenforschung konnten zwei weitere funktionelle Paraloge identifiziert werden, die in einem synergistischen Zusammenspiel

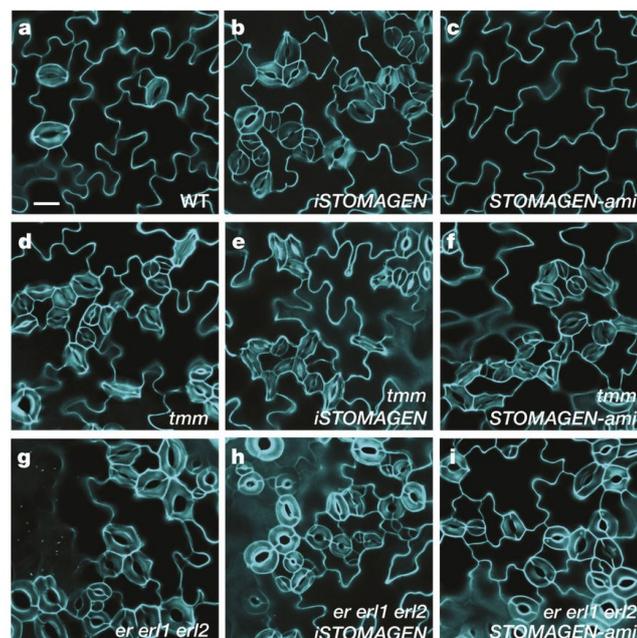
mit *ERECTA* stehen, *ERECTA-like 1* (*ERL1*, At5g62230) und *ERECTA-like 2* (*ERL2*, At5g07180). Die Mutanten *erl1* und *erl2* weisen einzeln keinen dezidierten Phänotyp auf, in Kombination mit *erecta* führen sie jedoch zu einer Verstärkung des *erecta*-Phänotyps (Shpak et al. 2004).

Ebenfalls zeigten sich vergleichbare Expressionsmuster, sowohl mit verstärkter Expression in Meristemen als auch mit niedrigerer Expression in differenzierten Geweben. Zudem verursachen diese Mutanten, mikroskopisch betrachtet, einen negativen Effekt auf die Zellproliferation während der Organogenese (Shpak et al. 2004). Der mikroskopische Phänotyp der *loss of function*-Mutanten stellte sich als großer Schritt beim Entschlüsseln des Signalweges heraus. So weisen die abaxialen Epidermisgewebe von *Arabidopsis* in Einzel- wie Mehrfachmutanten der Gene der *ERECTA*-Familie eine erhöhte Anzahl an Stomata auf (Shpak et al. 2005) und damit verbunden auch eine erhöhte Transpirationseffizienz (Masle et al. 2005). Der Effekt ist kumulativ, je mehr Gene betroffen sind desto intensiver der Effekt. Zudem wird die Musterbildung der natürlichen Stomataanordnung, bei der jedes Stomapaar von mindestens einer Epithelzelle getrennt vorliegt, gestört. Bis zum Zeitpunkt dieser Erkenntnis waren lediglich zwei Mutanten bekannt, die einen ähnlichen Phänotyp aufweisen: *four lips* und *tmm* (Yang und Sack 1995). *TMM* (*too many mouths*, At1g80080) kodiert für ein *receptor-like protein* (RLP) des LRR-Typs und konnte aufgrund seiner stöchiometrisch mit den ERF-Proteinen (*ERECTA-family*, *ERECTA*, *ERL1* und *ERL2*) korrelierenden phänotypischen Effekten, im weiteren Verlauf auch mittels *pull-down assay* verifiziert, als Korezeptor für die ERF-Proteine identifiziert werden (Lee et al. 2012). Mit diesem umfangreichen Satz an Rezeptoren mit redundanten Funktionen kamen die Fragen nach den extrazellulären Signalen, den tatsächlichen Interaktionen der Rezeptoren und nach den intrazellulären Komponenten zur Signalweitergabe auf.

Die Beschreibung der Cystein-reichen Peptide EPF1 (*epidermal patterning factor 1*, At2g20875), EPF2 (*epidermal patterning factor 2*, At1g34245) und STOMAGEN, auch als EPFL9 bezeichnet (*epidermal patterning factor like 9*, At4g12970) stellte hier den ersten Durchbruch dar (Hara et al. 2007; Hara et al. 2009; Sugano et al. 2010). Es handelt sich um posttranslational prozessierte Peptide, die einen oder mehrere proteolytische Reifungsschritte sowie die Ausprägung mehrerer Disulfidbrücken absolvieren, bevor sie in den Apoplasten sekretiert werden (Ohki et al. 2011; Hara et al. 2007).

*EPFL9* wird ausschließlich in den Zellen des Mesophylls, der direkten Nachbarzellschicht der unteren Blattepidermis (Hara et al. 2007), exprimiert. In *Arabidopsis* wird das reife Peptid während der Blattentwicklung in der L2 Zellschicht (aus der später das Mesophyll hervorgeht) gebildet und vom Protoderm (L1), die spätere Epidermis, perzipiert. Es handelt sich hier um Zellen, welche noch keine Differenzierung erfahren haben und durch diese Signalkaskade, die

mit EPFL9 beginnt, die Entwicklungsbahn meristemoider Schließzellenmutterzellen der Stomalinie einschlagen (Hara et al. 2007). Aus dieser pflanzlichen „Stammzelllinie“ werden im späteren Verlauf die Stomata und ihre Nebenzellen entstehen. Deletionsmutanten von *EPFL9* weisen ein Fehlen jeglicher Spaltöffnung der unteren Blattepidermis auf. Überexpressionslinien hingegen zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie *tmm*, *erecta*, *erl1* und *erl2*. EPF1, EPF2 und EPFL9 gehören zu einer Familie von Peptiden mit elf Vertretern, EPF1 und EPF2, sowie EPFL1 bis EPFL9. Alle Peptide dieser Familie erfahren die posttranslationalen Modifikationen der Disulfidbrückenbildung an strukturelevanten Cysteinresten und der proteolytischen Reifung sowie Sekretion. EPF1 und EPF2 konnten als putative Liganden der ERF-Proteine mit negativ regulatorischem Effekt charakterisiert werden. Das dahinterliegende Genexpressionsmuster und der phänotypische Effekt unterscheiden sich jedoch deutlich von EPFL9. Die Expression von *EPF1* ist auf differenzierte Stomata und deren direkte Vorläuferzellen beschränkt (Hara et al. 2007). Die Expression von EPF2 findet zu früheren entwicklungsbiologischen Punkten der Blatentwicklung statt, nämlich in juvenilen Blättern und der vegetativen Sprossspitze (Hunt und Gray 2009). Die *loss of function*-Mutanten dieser Gene zeigen jedoch vergleichbare Phänotypen ähnlich denen von *tmm*, *erecta*, *erl1* und *erl2*, mit Beeinträchtigung der Abstandsregulation zwischen den Stomata und der Stomatadichte (Hara et al. 2009) bzw. erhöhter Teilungsraten der stomatärer Vorläuferzellen (Pillitteri und Dong 2013). Nach derzeitigem Wissensstand binden alle drei Peptide an alle drei Hauptrezeptoren. Bindungsspezifität scheint durch die Rekrutierung von TMM als Korezeptor erreicht zu werden (Lin et al. 2017).



**Abbildung 2:** Regulation der Stomatadichte durch EPFL9 und die *ERF*-Gene aus Lee et al., 2015. Mit **a** normaler Stomatadichte im Wildtyp, **b** erhöhter Dichte bei EPFL9 Überexpression, **c** komplettem Fehlen von Stomata bei EPFL9 micro-RNA Kosuppression und sehr hohen Stomataindices mit Bruch der Abstandsregel bei **d** *tmm*, **e** *tmm* mit EPFL9 Überexpression, **f** *tmm* und EPFL9 micro-RNA Kosuppression und den in a-c gezeigten EPFL9-Variationen in der *ERF*-Dreifachmutante **g-h**.

So konnte gezeigt werden, dass die Affinität von EPFL9 zu ERL1 im heterodimeren Komplex mit TMM um einen Faktor 10 höher ist als die Affinität von EPFL9 zum monomeren ERL1 Rezeptor. Für ERL1 und ERL2 zeigte sich ein gegenteiliges Bild, so erniedrigte TMM als ERL1-Korezeptor die Affinität um ein Zehnfaches im Vergleich zum ERL1 Monomer. Diese Affinitätsunterschiede zeigen sich auch in einer kompetitiven Hemmung der Bindung von EPF1 und EPF2 durch EPFL9 an der ERL1-TMM-Komplex (Lin et al. 2017).

Wenn auch einige Komponenten sicher identifiziert werden konnten, so ist über das intrazelluläre Geschehen nach Ligandenbindung wenig bekannt. Es konnten noch keine Auto- oder Transphosphorylierungsaktivitäten der jeweiligen Kinasedomänen aufgezeigt werden. Die nachgeschaltete MAP-Kinase (*mitogen-activated protein kinase*, MPK) Kaskade konnte jedoch auf YODA (YDA, At1g63700) (Bergmann et al. 2004), MPK3 (At3g45640) und MPK6 (At2g43790) eingengt werden (Meng et al. 2012). Zusätzlich identifiziert wurden MKK4 (At1g51660) und MKK5 (*mitogen-activated protein kinase kinase 4 und 5* respektive, At1g51660, At3g21220). Ebenso sind mehrere bHLH (*basic helix-loop-helix*) Transkriptionsfaktoren ausführlich beschrieben, welche entweder negativ regulatorisch in die Stomatogenese eingreifen wie FAMA (At3g24140) (Bergmann et al. 2004; Ohashi-Ito und Bergmann 2006), FLP (FOUR LIPS, At1g14350), SCREAM (At3g26744), SCREAM2 (At1g12860) (Kanaoka et al. 2008) und R2R3 MYB (*myeloblastosis*, MYB88 At2g02820) (Lai et al. 2005) oder positiv wie SPECHLESS (SPCH, At5g53210) und MUTE (At3g06120) (MacAlister et al. 2007). Die bHLHs können einander jedoch nicht funktionell ersetzen und stehen in einer Folgebeziehung zueinander anstatt in einer redundanten, wie die Rezeptoren (MacAlister et al. 2007; MacAlister und Bergmann 2011).

Zudem konnten vergleichende QTL-Analysen (*quantitative trait analysis*) zwischen Ler-0 und Cvi (Cape Verde Islands) Populationen die MAP Kinasen MEKK1 (At4g08500), MKK2 (At4g29810) und die WRRK Transkriptionsfaktoren 6, 15, 25, 33, und 46 (At1g62300, At2g23320, At2g30250, At2g38470, At2g46400) als putativ dem ERECTA-Signalweg nachgeschaltene Elemente identifizieren (Terpstra et al. 2010).

Mittels *pull-down assay* konnte eine zusätzlich Komponente im Netzwerk identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um BAK1 (SERK3, At4g33430), ebenfalls eine *receptor-like kinase*. BAK1 stellte sich hierbei als möglicher Korezeptor für ERECTA dar und zeigt in Deletionsmutanten ebenfalls einen Stomatadichte-erhöhenden Phänotyp. Anders als das *receptor-like protein* TMM, besitzt BAK1 eine Kinasedomäne und stellt somit einen Kandidaten zur Transphosphorylierung im ersten Schritt der Phosphorellesystem des ERECTA-Signalweges dar (Jordá et al. 2016).

Die Betrachtung der Stomatogenese ist aufgrund ihrer klaren Phänotypen ein gutes Werkzeug zur Aufklärung der Interaktion einzelner Komponenten des ERECTA-Signalweges, jedoch vermag sie nicht das vollständige Bild der Bedeutung im Kontext der pleiotropen Effekte zu erklären. So konnte zum Beispiel eine Abhängigkeit der pflanzlichen Resistenz gegen den nekrotrophen Pilz *Plectosphaerella cucumerina* nachgewiesen werden (Llorente et al. 2005) sowie Beteiligung an der Gefäßbildung im Spross und Blütenstand (Uchida et al. 2012; Uchida und Tasaka 2013). In diesem Kontext wurden die Stomata-beeinflussende Funktionen zweier weiterer Peptidhormone der EPFL-Familie, EPFL4 (At4g14723) und CHALLAH/EPFL6 (CHAL, At2g30370) im Hypokotyl und Spross, identifiziert werden (Uchida und Tasaka 2013; Huang et al. 2014). In Verbindung mit dem Peptidhormon EPFL2 als Liganden für alle drei Rezeptoren (ERECTA, ERL1 und ERL2) konnte darüber hinaus ein regulatorischer Einfluss auf die Blattmorphogenese aufgezeigt werden, wobei die Interaktion aus Ligand und Rezeptor positiv regulatorisch zur Ausprägung der Blattrandzahnung in *Arabidopsis* beiträgt (Tameshige et al. 2016). EPFL5 (At3g22820) weist wiederum eine dezidierte Funktion in der Stomatogenese auf, bzw. wurde als Faktor postuliert, der die Differenzierung von Meristemoiden zu Epithelzellen bewirkt (Niwa et al. 2013).

Dennoch erweist sich die Betrachtung von stomatalen Phänotypen als ein verhältnismäßig einfaches System zur Klassifikation der Hormonrezeptorinteraktionen, auch jenseits der abaxialen Epidermis. Betrachtet man beispielsweise *tmm*, zeigen sich inverse Muster der Spaltöffnungsausprägung am Hypokotyl und am Sprossgewebe von *Arabidopsis* (Bhave et al. 2009). Aus diesem Grund und um die komplexen Interaktionen der hier genannten Komponenten zu beleuchten, wird im nächsten Kapitel die Stomatogenese im Lichte des ERECTA-Signalweges, mit Fokus auf die involvierten Rezeptoren und Peptide, genauer geschildert.

## 1.2 Entwicklung des Spaltöffnungsapparates

Die Stomatogenese wird hier am mesogenen Beispiel im dikotyledonen Blatt abgehandelt. Das heißt, dass alle Neben- bzw. Nachbarzellen ontogenetisch mit den Schließzellen in Verbindung stehen. Die Entwicklung von Stomata verläuft im dikotyledonen Blatt nicht basipetal. Somit liegen im noch jungen Blatt verschiedene Entwicklungsstadien der Spaltöffnungen vor. Den Beginn stellt eine asymmetrische antikline Teilung einer Protodermzelle dar. Die ungleichgroßen Tochterzellen stellen das Meristemoid (MMC, *meristemoid mother cell*) dar. Die Nebenzellmutterzellen (SLGC, *stomatal lineage ground cell*) und Schließmutterzellen (GMC, *guard mother cell*) entstehen aus zwei weiteren inäqualen Teilungen des Meristemoids. Nebenzellmutterzellen können eine irreversible Differenzierung zu Epidermiszellen, also den späteren Nebenzellen, durchlaufen, oder aber in erneute asymmetrische Teilung eintreten und ein Satellitenmeristemoid bilden, das dem bestehenden Spaltöffnungsvorläuferkomplex

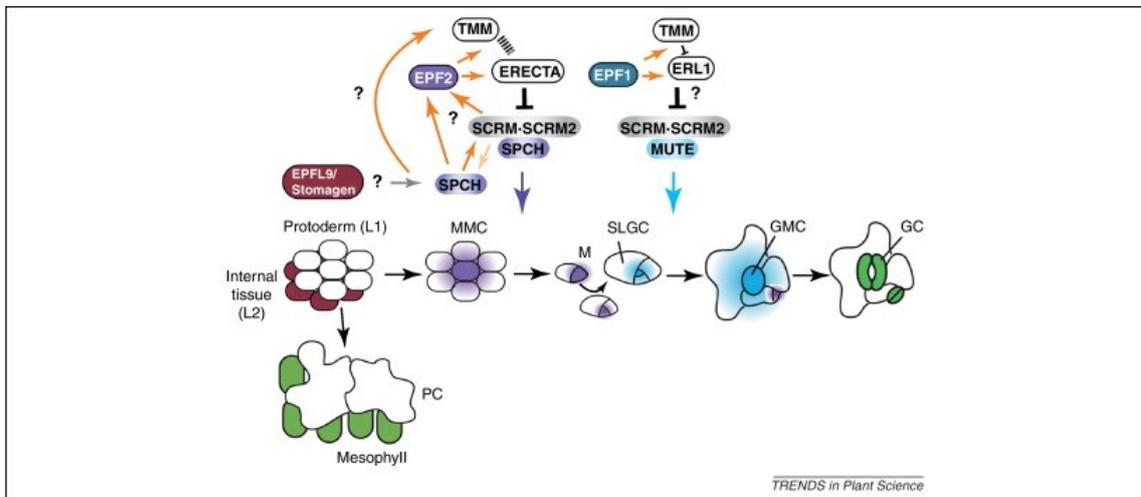
abgewandt ist (Pillitteri und Torii 2012). Die finale äquale Teilung der Schließmutterzelle bringt die spiegelsymmetrischen Schließzellen mit anisocystischen Nebenzellen hervor. Die erwähnte Orientierung von Satellitenmeristemen, abgewandt von den Ursprungsmeristemzellen, legt eine Signalweitergabe von Zelle zu Zelle zu nahe.

*EPF2* Promotoranalysen zeigten eine auf frühe Meristemoide begrenzte Expression. Die Deletion von *EPF2* führt zu einer erhöhten Anzahl an Stomata aber auch an kleineren, nicht-stomatalen Zellen. Zudem führt die Überexpression zu einer Epidermis ohne Schließzellen, genau wie *SPCH* Überexpression (Hara et al. 2009; MacAlister et al. 2007; Pillitteri et al. 2007b). Es liegt ein negativer *feedback loop* der beiden Komponenten vor. *SPCH* induziert die *EPF2* Expression, welches sekretiert wird und an der Nachbarzelle durch die ERf -Rezeptoren im Komplex mit TMM perzipiert wird. Die Folge ist eine Suppression von *EPF2* in dieser Zelle und die irreversible Differenzierung zur Epithelzelle (MacAlister et al. 2007; Pillitteri und Torii 2012). Somit wird die definierte Musterbildung von mindestens einer Epithelzelle zwischen zwei Stomata umgesetzt.

EPF1 wiederum wird von Schließmutterzellen sekretiert. Die *loss-of-function* Mutanten weisen starke Stomatahäufung und ein Brechen der Abstandsregel auf (Hara et al. 2007) und die Überexpression gleicht *tmm erecta erl2* (Hara et al. 2007; Pillitteri und Torii 2012). EPF1 stellt sich damit als interzelluläres Signal dar, das die späte Schließzellendifferenzierung aus Schließmutterzellen inhibiert und dadurch die Abstandsregel durchsetzt.

EPFL9 steht dem invers als positiver Regulator gegenüber. Als Phänotyp der Überexpression zeigen sich stark gehäufte und aneinander angrenzende Spaltöffnungsapparate und im Fall von Gen-*silencing* eine reduzierte Spaltöffnungsichte (siehe Abbildung 2). Dieses Signal wird kontinuierlich von Mesophyllzellen emittiert und von den ERf-Rezeptoren und TMM der jungen Epidermis perzipiert. Die Folge ist die Einleitung eines Entwicklungsprogrammes hin zur Schließzellbildung (Kondo et al. 2010; Sugano et al. 2010). Biochip-Analysen und ektopische Applikation der einzelnen Peptide auf Rezeptormutanten stellten heraus, dass *ERECTA*-defiziente Pflanzen nicht auf EPF2 Behandlung, wohl aber auf EPF1 Behandlung ansprachen, dass *ERL1*-defiziente Pflanzen nicht auf EPF1 aber auf EPF2 ansprachen und, dass TMM-Defizienz keinen ausgeprägten Effekt aufwies (Lee et al. 2012). Es ergibt sich also das Bild der ERf -Rezeptoren als Primärrezeptoren, wobei *ERECTA* für die EPF2-Signalkette und *ERL1* für die EPF1-Signalkette Spezifität aufweisen. TMM stellt sich als essentieller Signalmodulator dar. Anhand struktureller und kinetischer Studien konnte gezeigt werden, dass TMM durch höhere Affinität zu den positiv regulatorischen Peptiden einen apoplastischen Überschuss an EPFL9 austitrieren kann. Somit wird bevorzugt die EPF1 und EPF2 induzierte Stomata-unterdrückende Kaskade in Gang setzt. Dies geschieht wahrscheinlich durch eine

„Inaktivierung“ der ERF-Rezeptoren, da das RLP TMM ohne Kinasedomäne keine intrazelluläre Signalweitergabe leisten kann.



**Abbildung 3:** Graphische Darstellung des ERECTA-Signalweges aus Torii, 2012.

Ein weiteres Peptidsignal, CHALLAH/EPFL6, gibt Evidenz zur Unterstützung dieser Pufferhypothese. *CHAL loss-of-function* hebt den *tmm* Phänotyp im Bereich des Sprosses und des Hypokotyls teilweise auf. Zudem zeigt *tmm chal* einen vergleichbaren Phänotyp zu *tmm erl1*, bei dem jedwede Stomata auf Spross und Hypokotyl fehlen (Abrash und Bergmann 2010; Geisler et al. 2000). Diese Beobachtung legt nahe, dass einerseits TMM die relativ höhere Verfügbarkeit des positiv regulatorischen Peptids (EPFL9) puffert, andererseits, dass auch unter den Funktionen der cysteinreichen Peptide eine gewisse Redundanz besteht (Pillitteri und Torii 2012).

### 1.3 Räumliche und zeitliche Dimension des ERECTA-Signalweges

So wie sich die Expressionsmuster der Peptidgene in der räumlichen Trennung innerhalb des Blattgewebes und im zeitlichen Verlauf der Blattentwicklung funktionsabhängig unterscheiden, stellt sich die Expression der Gene aller Komponenten im gesamt-pflanzlichen Blick und allen Gewebsaltern dar. Alle Rezeptorgene und *TMM* zeigen fast keine Expression im Wurzelgewebe (Yokoyama et al. 1998; Nadeau und Sack 2002; Shpak et al. 2004). *BAK1* hingegen wird in hohem Maße in Wurzelgewebe exprimiert (Li et al. 2002). Jedoch ist *BAK1* nicht nur putativer Korezeptor für *ERECTA*, sondern wurde bereits als heterodimerer Komplex mit der LRR-RLK *BRI1* (*brassinosteroid-insensitive1*, At4g39400) im Kontext von Brassinosteroidwahrnehmung beschrieben (Nam und Li 2002) und die Röntgenkristallstruktur dieses Komplexes konnte aufgelöst werden (Chai et al. 2013a). Zudem fungiert *BAK1* als Korezeptor der LRR-RLK

FLS2 (*flaggelin-sensitive 2*) in der Pathogenantwort durch Flaggelinperzeption und konnte auch in diesem Komplex strukturell gelöst werden (Chai et al. 2013b).

*ERECTA* und die Paraloge *ERL1* und *ERL2* sind in überirdischen sich im Wachstum befindlichen Geweben, während vegetativer Wachstumsphasen stark exprimiert. *ERL1*- und *ERL2*-Promotor GUS-Reporterassays zeigen starke Expression im Sprossapikalmeristem, jungen Blättern und Blütenprimordien. Im reproduktiven Gewebe zeigt sich Expression von *ERECTA* und *ERL2* bis hin zum Blütenentwicklungsstadium 12 (also bis zu dem Punkt an welchem sich die Kelchblätter öffnen) für *ERL1* bis 15 (der Zeitpunkt, an welchem das Stigma die Antheren überragt) (Alvarez-Buylla et al. 2010; Shpak et al. 2004). Im Bereich der sich bildenden Frucht kann *ERECTA* räumlich dem Bereich des Mesokarps und *ERL1* dem Bereich der Samenanlage zugeordnet werden. *ERL2* Expression findet hauptsächlich im Stylus und in geringerem Maße in den Samenanlagen statt (Shpak et al. 2004).

Im Bereich der Stammzellen des Sprossapikalmeristems ist postuliert, dass die Rezeptoren den Einfluss von Zytokinen auf die *WUSCHEL*-Expression (*WUS*, At2g17950) dämpfen und so den negativen *feedback-loop* zwischen *WUS* und *CLV3* (*CLAVATA3*, At2g27250) stabilisieren, der die Zellzahl der Stammzellnische am Apikalmeristem konstant hält (Uchida et al. 2013; Brand 2000).

Agronomische Relevanz erlangte der *ERECTA*-Signalweg durch die Erkenntnis, dass *ERECTA* im Zusammenspiel mit dem *homeobox*-Gen *KNATI* (At4g08150) die Pedikellänge und Chlorenchymanordnung an der Basis lateraler Organe beeinflussen (Douglas et al. 2002). Ebenfalls relevant für mögliche landwirtschaftliche Applikationen ist der Fakt, dass der Verlust von *ERECTA* und *ERL1* keinen Einfluss auf die Fertilität des Gynoeceums hat, additiv jedoch der Verlust von *ERL2* zur Sterilität führt (Pillitteri et al. 2007a).

Abgesehen von der bereits erwähnten räumlichen Trennung der Aktivität von *EPF1*, *EPF2* und *EPFL9* in Stomata, Meristemoidzellen und Mesophyllzellen, zeigen weitere Vertreter der EPF-Familie spezielle Expressionsmuster. *EPFL2* zeigt im GUS-Promotorassay eine inverse Korrelation zu *ERL2* und einem Auxinreporter. Die Expression beider Gene wird durch die lokale Auxinkonzentration koreguliert und konzentriert sich im Falle von *ERL2* auf die Blattgefäße und die Spitzen der Blätterzähne. *EPFL2* Expression findet in den Spitzen der Blätterzähne nicht statt (Tameshige et al. 2016).

In dieser zusätzlichen Ebene an Komplexität, neben der Vielzahl an involvierten Komponenten, spiegelt sich die Bedeutung der *ERECTA*-Signalkaskade wider und macht verständlich, wie solch funktionelle Vielfalt erreicht werden kann. Die Betrachtung der Proteinstrukturen der Rezeptoren und Liganden verspricht hier mehr Aufschluss über Spezifität einzelner Interaktionen in ihrem biologischen Kontext zu geben. Im Folgenden soll auf diese eingegangen

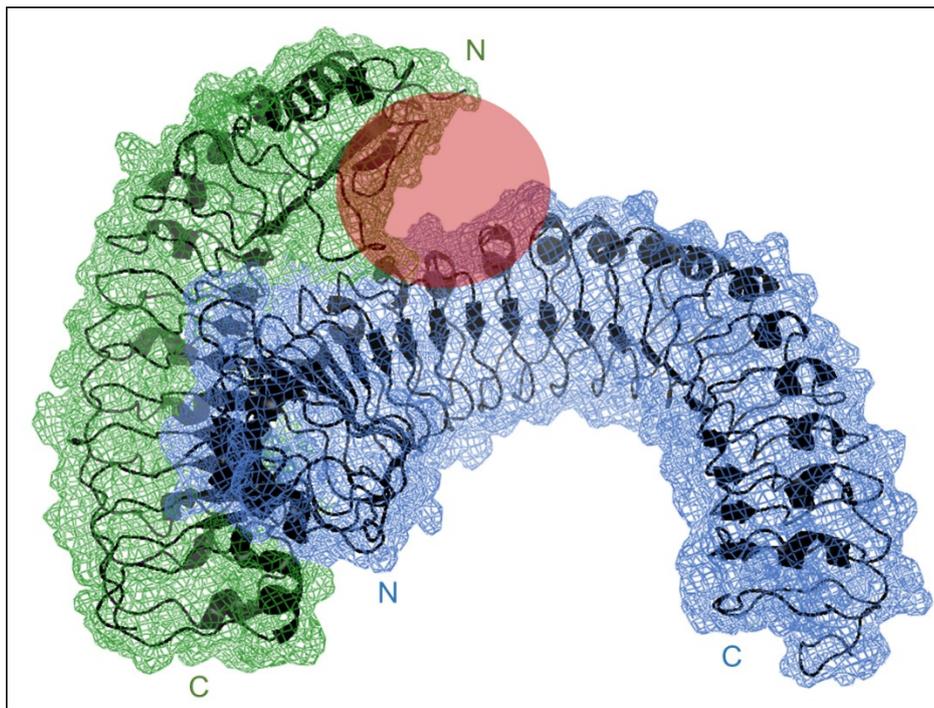
werden, wobei der Fokus auf die extrazelluläre Signalperzeption und nicht die intrazelluläre Signalweitergabe gesetzt wird.

## 1.4 Strukturelle Charakteristika der *receptor-like kinases*

Im *Arabidopsis*-Genom finden sich über 600 Sequenzen, die für putative RLKs kodieren. Dies macht 2,5% des Gesamtgenoms aus (Shiu und Bleecker 2001). Ihre vielfältigen Funktionen etwa in Hormonperzeption, Pathogenabwehr und Entwicklungsprozessen sowie funktionelle Teilredundanz, oft erreicht durch Genduplikationen, machen diese hohe Genzahl notwendig. ERCTA, ERL1, ERL2 und BAK1 sind vier dieser RLKs mit LRR-Ektodomänen vom LRR Typ II. Etwa 50% aller *Arabidopsis*-RLKs haben LRR-Ektodomänen. TMM ist ein RLP, das ebenfalls die LRR-Ektodomäne aufweist. Es gibt 14 Klassen von LRR-RLKs in *Arabidopsis* die sich nach Anzahl und Länge der einzelnen LRR-Segmente aufschlüsseln. LRR-Segmente besitzen die Konsensussequenz  $LxxLxLxx^N/cxL$  wobei x für eine beliebige Aminosäure steht und L für einen Isoleucinrest, Valin oder Phenylalanin stehen kann (Kobe 2001). Ein Segment kann zwischen 20 und 29 Aminosäuren lang sein. Aneinandergereiht nehmen sie eine charakteristische hufeisenförmige bzw. solenoide Sekundärstruktur an, bei welcher die konvexe Seite von Helices gebildet wird und die konkave Seite ist von  $\beta$ -Strängen geprägt, die ein paralleles  $\beta$ -Faltblatt bilden. In den C- und N-terminalen Regionen des Solenoids sind meist Cysteinreste, die durch Disulfidbrückenbildung sogenannte *caps* ausprägen (Kobe 2001). Häufig weisen die LRR-Domänen N-Glykosylierungsmotive auf. ERCTA, ERL1 und ERL2 besitzen je 20 LRR-Segmente mit dem Konsensusmotiv  $PxxLGxLxxLxxLxLxxNxLxGxI$ . Jeder einzelne *repeat* wird durch ein eigenes Exon kodiert (Torii et al. 1996). Im Gegensatz zu manchen LRR-RLKs besitzen diese Rezeptoren keine *island-domain*, ein unstrukturierter Bereich zwischen zwei LRR-Segmenten, wie zum Beispiel BRI1. Bei BRI1 ist dieser essentiell für die Funktionalität (Li und Chory 1997). Bei TMM finden sich 10 LRRs und ebenfalls keine *island-domain*. Die kürzeste Ektodomäne weist BAK1 auf, mit lediglich 4 LRRs und keiner *island-domain*.

Von allen Proteinen außer ERCTA liegen bisher veröffentlichte Kristallstrukturen vor (Lin et al. 2017; Chai et al. 2013a; Chai et al. 2013b). ERL1 und ERL2 weisen jedoch jeweils 67% und 68% Sequenzidentität im Bereich der LRR-Domäne zu ERCTA. auf und 89% zueinander. In diesen gelösten Strukturen zeigt sich die typische Solenoidform in jedem Komplex mit einem weiteren Rezeptor oder Liganden. Bisher konnte kein spezifisches Sequenzmotiv identifiziert werden, das für die Ligandenkoordination ausschlaggebend ist. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass ERCTA<sup>LRR</sup> (in diesem Fall anhand von Gelfiltrationsdaten) und ERL1<sup>LRR</sup>, ohne TMM<sup>LRR</sup> als Korezeptor, nicht vermögen EPF1 und EPF2 zu binden. In Anwesenheit von TMM<sup>LRR</sup> bilden beide Rezeptoren jedoch eine „Vertiefung“ in ihrer elektrostatischen Oberfläche, in der die Peptide binden. Hierbei bindet nahezu die komplette konkave Seite von

TMM<sup>LRR</sup> an die dorsale konvexe Seite von ERL1<sup>LRR</sup>, wobei sich die Oberflächenladungen der beiden Rezeptoren komplementär paaren. Zudem wird die Interaktion über Van-der-Waals-Kräfte der elektrisch neutralen Aminosäurereste stabilisiert, zumal sie eine Fläche von 1614 Å<sup>2</sup> umfasst. In der Zentralregion der Interaktionsfläche prägen sich zwei Wasserstoffbrückenbindungen aus und in den peripheren Regionen finden sich hydrophobe Interaktionspunkte (Lin et al. 2017).



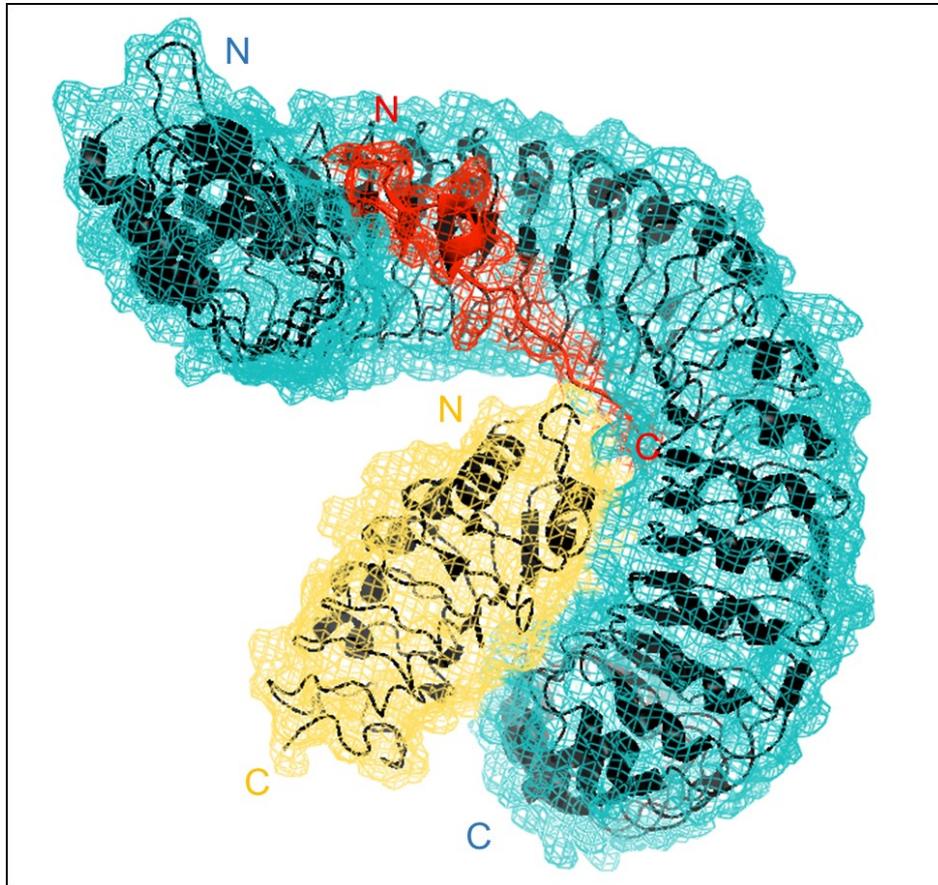
**Abbildung 4:** Kristallstruktur von TMM<sup>LRR</sup>-ERL1<sup>LRR</sup> 5XJX. TMM<sup>LRR</sup> (grün) und ERL1<sup>LRR</sup> (blau), wobei TMM<sup>LRR</sup> am N-terminalen Teil von ERL1<sup>LRR</sup> bindet und im Komplex die Bindegastasche (in rot) für die Peptidliganden bildet. N und C kennzeichnen jeweils die Orientierung des N- bzw. C-Terminus der LRR-Domänen.

Der Ligand EPFL9 kann ohne Assoziation von TMM<sup>LRR</sup> komplexiert werden. In Anwesenheit von TMM<sup>LRR</sup> erhöht sich die Affinität zu diesem um ein Zehnfaches. Die Bildung eines ligandenfreien Rezeptor-Korezeptorkomplexes spricht für einen vorgeformten Rezeptorkomplex, dessen Assemblierung nicht von der Ligandenbindung abhängig ist (Lin et al. 2017).

Die Bindung zwischen ERF-Rezeptordomänen und BAK1<sup>LRR</sup> konnte bisher nur mittels Koimmunpräzipitation nachgewiesen werden, jedoch liegt eine gelöste Kristallstruktur mit der RLK FLS2<sup>LRR</sup> vor, die 36% Sequenzidentität zu ERL1<sup>LRR</sup> aufweist. In dieser Interaktion findet die Bindung der deutlich kürzeren LRR-Domäne von BAK1 in der konkaven Seite von FLS2<sup>LRR</sup> statt. In diesem Rezeptorpaar aber ist die Ligandenbindung Voraussetzung für die Bildung eines Heterodimers der LRR-Domänen (Schulze et al. 2010). Der C-Terminus des Liganden flg22 wird zwischen der N-terminalen Spitze von BAK1<sup>LRR</sup> und dem C-terminalen Teil der superhelikalen FLS2-Ektodomäne umschlossen. Diverse Wasserstoffbrückenbindungen und

hydrophobe Interaktionen prägen die Bindung zwischen dem „freien“ Segment von flg22 und FLS2<sup>LRR</sup>.

Die Interaktionen zwischen BAK1<sup>LRR</sup> und FLS2<sup>LRR</sup> finden über hydrophobe Interaktionen statt. Die involvierten Aminosäuren sind phylogenetisch stark konserviert (Sun et al. 2013).



**Abbildung 5:** Kristallstruktur von FLS2<sup>LRR</sup> und BAK1<sup>LRR</sup> im Komplex mit flg22, 4MN8. Elektrostatische Oberfläche als Netz dargestellt von BAK1<sup>LRR</sup> (gelb) gebunden am C-terminalen Teil von FLS2<sup>LRR</sup> (blau) mit gebundenem Liganden flg22 (rot). Die Sekundärstrukturelemente sind in schwarz dargestellt. N und C kennzeichnen jeweils die Orientierung des N- bzw. C-Terminus der Proteine bzw. Proteinsegmente.

Eine Neigung zur Homodimerisierung von BAK1, abhängig vom Redoxpotential des umgebenden Milieus, wurde auch beschrieben (Bender et al. 2015). Ebenso liegt FLS2 in Abwesenheit von flg22 als Homodimer vor (Yamaguchi et al. 2014).

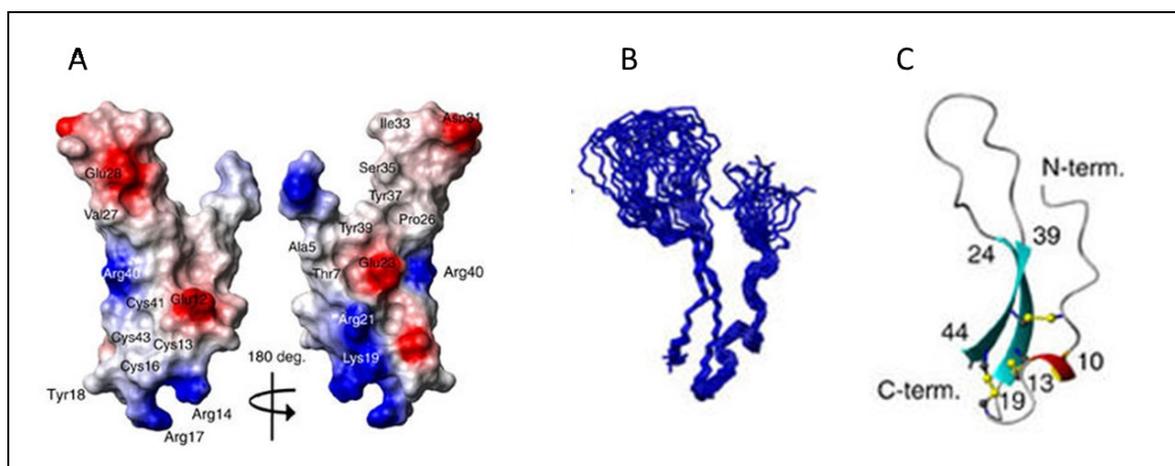
Homodimerisation konnte *in vitro* mittels Koimmunpräzipitation auch für die ERf-Proteine und TMM gezeigt werden (Lee et al. 2012), bislang fehlt jedoch strukturelle sowie funktionelle Evidenz.

## 1.5 Strukturelle Charakteristika der Cystein-reichen Peptide

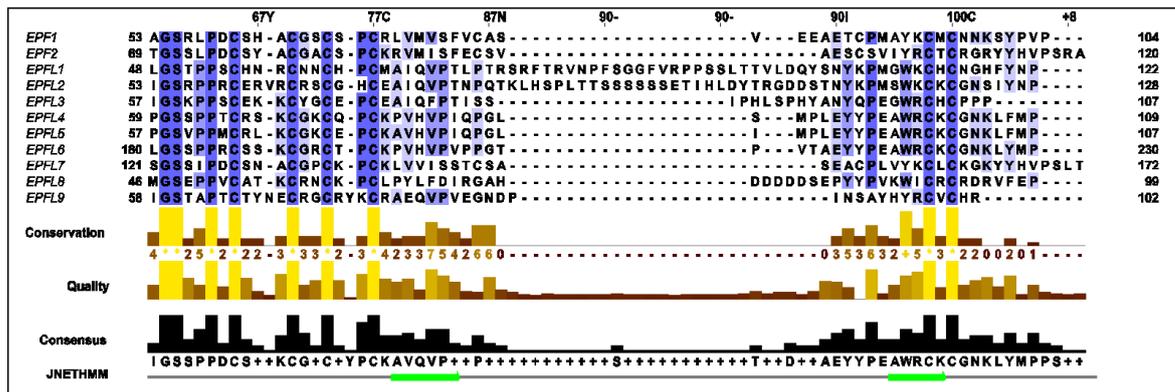
Die Familie der EPF-Peptide stellt sich als eine Peptidgruppe dar, die vermutlich mit den ersten Landpflanzen vor 450 Millionen Jahren entstand. Es konnten Homologe in den basalen Bryophyten, wie *Physcomitrell patens* identifiziert werden, jedoch nicht in Grünalgen wie *Chlamydomonas reinhardtii* und *Osteococcus tauri* (Takata et al. 2013). *Physcomitrell patens*

besitzt eines der Gene, welche für EPFs kodieren und dieses steht in näherer phylogenetischer Verwandtschaft zu den negativ regulatorischen Elementen EPF1 und EPF2 als zu EPFL9. Der Moosfarn *Sellaginella moellendorffii* weist jedoch bereits Homologe auf, die mit EPF1/2 und EPFL9 in monophyletischem Verhältnis stehen (Rychel et al. 2010). Alle identifizierten EPF/EPFL Gene bestehen aus mehreren Introns und Exons und kodieren für ein Propeptid, das erst prozessiert werden muss, bevor es Bioaktivität besitzt. Hierfür fungiert ein N-terminales Transitpeptid als Exportsignal. Zudem werden die Peptide proteolytisch prozessiert. Als putative Protease für diesen Vorgang wurde SDD1 (*Subtilisin-like protease*, At1g04110) gehandelt, die in Deletionsmutanten ebenfalls zum *clustern* von Stomata (also Stomata, welche direkt an weitere Stomata grenzen und nicht durch Epithelzellen getrennt sind) führt, sowie zu einer vierfachen Erhöhung der Stomataanzahl, also negativ regulatorisch von Belang ist (Groll et al. 2002). Spätere Experimente mit Überexpressionslinien der einzelnen Peptidgene zeigten jedoch keine Notwendigkeit für funktionelle SDD1, um prozessiert zu werden (Hunt et al. 2010; Hara et al. 2007), sodass die Beschreibung des EPF/EPFL-prozessierenden Enzyms noch aussteht.

Die tatsächliche Aminosäuresequenz des reifen Peptids ist nur von EPFL9 experimentell verifiziert und für alle weiteren Peptide vom Grad an Konservierung der Primärstruktur abgeleitet. Mit Edman-Abbau sequenzierte EPFL9-Peptide, welche in *Arabidopsis* mit Affinitäts-tag überexprimiert und *in planta* prozessiert wurden, konnten die 45 bioaktiven Aminosäurereste des reifen Peptids aus den 106 Aminosäureresten des Propeptids bestimmt werden (Sugano et al. 2010). Abgeleitet vom *alignment* zeigen die reifen Peptide eine Länge von 45 AA (EPFL9) bis 75 AA (EPFL2).



**Abbildung 6:** NMR-Struktur von EPFL9 in Lösung modifiziert aus Ohki et al. 2011. **A** Die elektrostatische Oberfläche einer in der NMR-Messung bestimmten Konformation von EPFL9 in zwei um 180° rotierten Ansichten. Die Aminosäure mit negativer Ladung (rot), positiver Ladung (blau) und hydrophobem Charakter (weiß) sind farblich hervorgehoben. **B** Stilisierte Darstellung der EPFL9 Hauptkette in 20 übereinander gelegten Konformationen, die hohe Freiheitsgrade im Bereich des *hairpin-loops* und des N-terminalen *loops* zeigen. **C** Stilisierte Darstellung der Sekundärstrukturelemente mit  $\beta$ -Strängen in blau, Helix in rot und Disulfidbrücken in gelb. Die an den Disulfidbindungen beteiligten Cysteine sind mit der jeweiligen Positionsnummer markiert.



**Abbildung 7:** Aminosäure-alignment der reifen Sequenzen der EPF/EPFL-Familie aus *Arabidopsis thaliana*. Aminosäuren mit einer Konservierung von über 50% sind von dunkelblau bis hellblau (mit absteigendem Grad an Konservierung, je heller der Farbton) gekennzeichnet. Die Anzahl der Vertreter mit dem jeweiligen konservierten Rest ist unter den Balken der Zeile „Conservation“ angezeigt. Unterhalb der schwarzen Balken der Zeile „Consensus“ ist die Konsensussequenz aufgeführt. Die Zeile „JNETHMM“ stellt die mit JNETHMM (ein *Hidden Markov Model* basierter Algorithmus zu Sekundärstruktur vorhergesagte) vorhergesagte Sekundärstruktur dar, wobei grau ungeordnete Bereiche anzeigt und grün  $\beta$ -Stränge.

Neben einem hochkonservierten GS-Motiv an Stelle 2 und 3 der reifen Sequenz, definieren 6 oder 8 konservierte Cysteinreste die Gruppen EPFL und EPF respektive. Die Ausprägung von Disulfidbrücken zwischen diesen Resten konnte in der Strukturlösung mittels NMR von EPFL9 nachgewiesen werden (Ohki et al. 2011). Im Fall der EPFL Peptide finden sich drei Disulfidbrücken die zwei antiparallele  $\beta$ -Stränge und eine N-terminale unstrukturierte Region stabilisieren. Zwischen den  $\beta$ -Strängen befindet sich eine ungeordnete *loop*-Stuktur. Die Disulfidbrücken konnten als essentiell für Peptidbioaktivität beschrieben werden (Ohki et al. 2011). Die EPF-Peptide besitzen ein weiteres Paar Cysteine, welches im *loop* eine Disulfidbrücke bildet. Durch Austausch der Sequenzen der *loop*-Regionen konnte gezeigt werden, dass diese die Spezifität des Signals ausmacht, also ob positive oder negative Regulation vorliegt. Ektopische Applikation von Peptiden, welche nur die Aminosäuren der *loop*-Region beinhalteten zeigten jedoch keine Bioaktivität und unterstreichen somit die Notwendigkeit des  $\beta$ -Faltblattgerüsts für die Funtionalität (Ohki et al. 2011).

Zudem zeigt die NMR-Struktur von EPFL9 eine Vielzahl verschiedener Konformationen der N-terminalen Region und des *loops*. In der Kristallstrukturlösung der Peptidliganden EPF1, EPF2 und EPFL2 im Komplex mit den Rezeptoren spiegelt sich die hohe Flexibilität dieser Regionen darin wider, dass keine definierte Elektronendichten für sie gemessen werden konnte und somit keine Aussage über eine feste Konformation getroffen werden kann (Lin et al. 2017).

Die Koordination des Liganden EPF1 am Rezeptorkomplex ERL1<sup>LRR</sup>-TMM<sup>LRR</sup> erfolgt an drei Stellen. Die N-terminale Peptidregion fügt sich zwischen zwei aufeinanderfolgende LRR-Segmente mit hauptsächlich polaren Interaktionen. Der Aminosäurerest Ser3 in diesem N-terminalen Segment prägt zusätzlich eine Wasserstoffbrückenbindung mit den LRR-Resten Leu284, Gln286, und Ala287 aus. Gly2 aus EPF1 bildet eine weitere Wasserstoffbrücke Gln263.

Die beiden EPF1 Aminosäuren Gly2 und Ser3 kennzeichnen ein „GS“-Motiv, welches in allen Vertretern der EPF/EPFL-Familie konserviert ist und sich in Mutageneseexperimenten als essentiell für die Bindung erwies (Lin et al. 2017). Die Bindung an den Korezeptor TMM<sup>LRR</sup> erfolgt über meist hydrophobe Interaktion des Peptid-N-Terminus. Der in den EPF-Peptiden konservierte Rest Ala11 stellte sich hierbei als kritisch dar. Bei den EPFL-Peptiden mit Ausnahme von EPFL7 und EPFL9 ist er durch die größeren basischen Reste Arginin und Lysin ersetzt, die ein sterisches Hindernis für die TMM<sup>LRR</sup>-Bindung darstellen (Lin et al. 2017). Anhand der Kristallstruktur von ERL2<sup>LRR</sup>-EPFL4 wird deutlich, dass die Bindungsstelle unter den Rezeptoren und Peptiden, in An- und Abwesenheit von TMM nahezu identisch ist, wenn auch EPFL4 eine größere Interaktionsfläche bedeckt. Es handelt sich um 468,0 Å<sup>2</sup> im Vergleich zu 291,0 Å<sup>2</sup> bei ERL1<sup>LRR</sup>-EPF1 (Lin et al. 2017).

Auffällig an der Primärstruktur der Peptidfamilie ist zudem die Länge des *hairpin-loop*-Segmentes von EPFL2, das jeweils 24 Aminosäuren länger ist als das von EPF1 und keinerlei Konservierung aufweist, dafür aber sechs aufeinander folgende Serine. Da die *loop*-Region, wie bereits erwähnt, funktionsgebend ist und spekuliert wird, dass sie für die mögliche Rekrutierung von weiteren Korezeptoren verantwortlich ist (Lin et al. 2017), ist diese von besonderem Interesse.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Aufklärung des ERECTA-Signalweges konnte bisher große Fortschritte erzielen. Hierbei komplementieren sich genetische und biochemische Methoden und zeichnen ein immer dichter werdendes Bild von den extra- und intrazellulären Prozessen, die zu den beschriebenen morphologischen Ausprägungen führen. Die biochemische Untersuchung birgt ihre spezifischen Schwierigkeiten. So konnten die Rezeptortodomänen zwar strukturell aufgeklärt werden, jedoch barg dies die Notwendigkeit der Expression im eukaryotischen *Sf*-System (*Spodoptera frugiperda*) mit Bakulovirusinfektion. Denn es können posttranslationale Modifikationen wie N-Glykosylierung und die korrekte Ausbildung von Disulfidbrücken im prokaryotischen System nicht erreicht werden. Dennoch kann auch in diesem System kein pflanzliches Glykosylierungsmuster imitiert werden. Gleiches gilt für die EPF/EPFL-Peptide, die teils aus Pflanzenmaterial isoliert werden mussten.

In Hinblick auf die Ligandenbindung in Pflanzen, zeigten bisher jedoch weder die Rezeptorglykosylierung von LRR-Ektodomänen, wie ERL1, ERL1, BRI1 oder HAESA (At4g28490), noch N- wie C-terminale Disulfidbrücken der *capping*-Strukturen Bedeutung (Santiago et al. 2016; Hothorn et al. 2011; Lin et al. 2017). Ein Ziel dieser Arbeit ist es, ein zugänglicheres und ertragreicheres Expressionssystem zur Gewinnung heterolog exprimierter

Ektodomänen von ERECTA, ERL1, ERL2, TMM und BAK1 zu etablieren. Dies soll über die Verwendung von *E. coli* BL21 (DE3) und Nickelaffinitätschromatographie erreicht werden.

Für EPFL9, EPF1 und EPF2 konnte bereits gezeigt werden, dass eine *in vitro* Rückfaltung zur Ausprägung der korrekten Disulfidbrücken möglich ist (Kondo et al. 2010; Jewaria et al. 2013; Qi et al. 2017). Dieses Verfahren soll auf ein bisher noch nicht *in vitro* charakterisiertes Peptid, EPFL2, angewandt werden.

Mit den so gewonnenen Komponenten sollen die Dissoziationskonstanten der fünf Rezeptoren zu EPFL2 mittels isothermaler Titrationskalorimetrie bestimmt werden. Die Interaktion von EPFL2 mit ERECTA, ERL1 und ERL2 konnte bereits mittels Koimmunpräzipitation gezeigt werden (Tameshige et al. 2016). Über Größenausschlusschromatographie soll die Interaktion der zwei potentiellen Korzeptoren BAK1 und TMM analysiert werden.

In einem Peptid-Bioassay soll die Bioaktivität der rückgefalteten Peptide bestätigt werden und die physiologische Wirkung auf die Stomatadichte evaluiert werden.

Schließlich sollen anhand von computergenerierten Strukturmodellen der mögliche Bindungsmodus von BAK1 zu den ERf-Proteinen und mögliche Peptidinteraktionen diskutiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Materialien

Chemikalien wurden alle in analytischer Qualität (p.a.) eingesetzt. Bezugsquellen waren, wenn nicht anders angegeben Sigma-Aldrich, Darmstadt, Aplichem (Darmstadt), Fluka Chemikalien (München) und Carl Roth (Karlsruhe). Wasser für die Versuche wurde mit einer Milli-Q<sup>®</sup> Gradient Anlage aus vollentsalztem Leitungswasser filtriert.

Enzyme wie Restriktionsendonukleasen und Polymerase wurden von New England Biolabs (Ipswich, MA) genutzt, wenn nicht anders angegeben.

#### 2.1.1 Verwendete bakterielle Stämme und Pflanzenlinien

*E. coli* XL1-Blue: Stratagene, La Jolla, CA

Genotyp: F' *proA*<sup>+</sup>*B*<sup>+</sup> *lacI*<sup>q</sup> Δ(*lacZ*)*M15* *zzf::Tn10* (Tet<sup>R</sup>) / *fhuA2*Δ(*argF-lacZ*)*U169* *phoA* *glnV44* Φ80Δ(*lacZ*)*M15* *gyrA96* *recA1* *relA1* *endA1* *thi-1* *hsdR17*

*E. coli* BL21: New England Biolabs inc., Ipswich, MA

Genotyp: *fhuA2* [*lon*] *ompT* *gal* (λ *DE3*) [*dcm*] Δ*hsdS*

λ *DE3* = λ *sBamHI* Δ*EcoRI-B* *int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21* Δ*nin5*

*Arabidopsis thaliana* Columbia Col-0

*Arabidopsis thaliana* Columbia Col-0 *tmm* (SALK\_011958), (Hara et al. 2007)

#### 2.1.2 Verwendete Plasmide

pTEV16b:

pET16b (Novagen jetzt Merck, Darmstadt) Derivat mit TEV-Proteasebindestelle anstatt Faktor Xa Bindestelle. Die Sequenz der modifizierten Schnittstelle und *multiple cloning site* ist im Anhang 1 hinterlegt. Das Plasmid wurde für die heterologe Expression der Ektodomänen von ERECTA, ERL1, ERL2, TMM und BAK1 genutzt. Ein N-terminaler Dekahistidin-tag mit TEV-Proteaseerkennungssequenz wurde damit eingeführt. Die T7-Polymerase abhängige Expression unter IPTG-Induktion kann von diesem Plasmid durchgeführt werden. Eine Ampicillinresistenzkassette liegt als Selektions-marker vor.

pGEX-4a: Amersham, Little Chalfont, GB

Das Plasmid wurde für die heterologe Expression der reifen Peptide EPFL2 und EPFL2C>S genutzt. Hiermit wurde eine N-terminale GST-Hexa-Histidin-*tag*-Fusion der Peptide erreicht. Zwischen GST-Hexa-Histidin-*tag* und POI wurde die Faktor Xa Schnittstelle durch eine TEV-Proteaseschnittstelle substituiert. C-terminal besitzen die Expressionsprodukte von EPFL2 und EPFL2C>S einen weiteren Okta-Histidin-*tag*. Diese beiden Konstrukte wurden bereitgestellt von Nozomi Kawamoto und sie besitzen eine Kanamycinresistenzkassette als Selektions-*marker* und sind ebenfalls durch IPTG induzierbar.

pGEX-4T-1: Amersham, Little Chalfont, GB

Das Plasmid wurde für die heterologe Expression des reifen Peptids EPFL9 verwendet. Hiermit wurde eine N-terminale GST-*tag*-Fusion der Peptide erreicht. Zwischen GST-*tag* und POI wurde die Faktor Xa Schnittstelle durch eine TEV-Proteaseschnittstelle substituiert. Eine Ampicillinresistenzkassette diente als Selektions-*marker*. Das Plasmid besitzt ebenfalls einen T7 Promotor.

### 2.1.3 Verwendete Oligonukleotide und erstellte Konstrukte

Oligonukleotide wurden bei Sigma-Aldrich (Steinheim) im 25 µmol Maßstab, entschützt und entsalzt in Auftrag gegeben. Es wurden, mit Ausnahme der TMM *primer*, ausschließlich *primer* zum sequenz- und ligationsunabhängigen Klonieren nach Gibson (Gibson et al. 2009) verwendet. Die Linearisierung des Plasmids vor Assemblierung wurde mit NdeI durchgeführt. Die Klonierung der TMM Ectodomäne wurde über konventionellen Verdau mit zwei Restriktionsendonukleasen (NdeI und XhoI) verwirklicht.

**Tabelle 1:** Auflistung der verwendeten Oligonukleotide mit Nukleotidsequenz in 5'-3' Orientierung

<i>Primer-Bezeichnung</i>	<i>Nukleotidsequenz</i>
ERECTA Ectodomäne <i>forward</i>	CATGAAAACCTGTATTTTCAGGGACATATGGAGGAGG GAGCAACGTTGC
ERECTA Ectodomäne <i>reverse</i>	GGCTTTGTTAGCAGCCGGATCCTCGAGCATCTACTCACTGTT CTGAGAAATAAC
ERL1 Ectodomäne <i>forward</i>	TGTATTTTCAGGGACATATGAACAACGAAGGGAAAGCTCTGATG GCCA
ERL1 Ectodomäne <i>reverse</i>	TTAGCAGCCGGATCCTTATCTGGAGAATACTCGAGATTTCCGGT AAAGG
ERL2 Ectodomäne <i>forward</i>	CGGCCATGAAAACCTGTATTTTCAGGGACATATG AACAACGAAGGAAAAGC
ERL2 Ectodomäne <i>reverse</i>	TTAGCAGCCGGATCCTTATCTGGTGAATACTTGTGACTTAGG TAAAGATGG
TMM Ectodomäne <i>forward</i>	TTCATATGTTCACTGTGATCACCTC
TMM Ectodomäne <i>reverse</i>	GGATCCAGACTTGGAAGTGCTTGAC
BAK1 Ectodomäne <i>forward</i>	CATGAAAACCTGTATTTTCAGGGACATATGAACGCCGAAGGTG ATGCTC
BAK1 Ectodomäne <i>reverse</i>	GGCTTTGTTAGCAGCCGGATCCTCGAGCATTTATCCAGTAATT CTATTAC
EPFL9 <i>forward</i>	CCTCCAAAATCGGATCATGAAAACCTGTATTTTCAGGGACATA TGATAGGGTCGACAGCACCACCTTGATC
EPFL9 <i>reverse</i>	GTGCTTATCATTATAGATGTGTTTGTGCATAGATGAAATTC CCGGGTCGACTCGAGCGGCCGCATCGTGA
T7 <i>forward</i> (Sequenzier- <i>primer</i> )	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 <i>reverse</i> (Sequenzier- <i>primer</i> )	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

### 2.1.4 Erstellte Konstrukte

Die finalen Konstrukte zur Proteinexpression sind im Folgenden aufgelistet und die betreffenden Vektorkarten sind im Anhang (Anhang 7-9) vermerkt. Die Sequenzen der LRR-Domänen der Rezeptoren wurden so gewählt, dass die N-terminalen Signalpeptide nicht im finalen Konstrukt enthalten sind. Es wurden folgende Bereiche aus der kompletten Proteinsequenz genutzt:

ERECTA: E25-R580; ERL1: M26-R582; ERL2: M28-R585, TMM: F24-G475, BAK1: N26-G225

Die Sequenzen für die Peptide EPFL2, EPFL2C>S und EPFL9 beinhalten folgende Abschnitte des Propetids:

EPFL9: I58-R102; EPFL2: I53-P128; EPFL2C>S: wie EPFL2 und alle Cysteinreste substituiert durch Serinreste.

Die alignierten Proteinsequenzen mit His/GST-*tag* und TEV-Schnittstelle sind in den Anhängen 2-6 verzeichnet.

**Tabelle 2:** Liste der erstellten Konstrukte

Konstruktbezeichnung	Eigenschaften
pTEV16b-ERECTA-Ektodomäne	ERECTA-Ektodomäne mit N-terminalem Dekahistidin- <i>tag</i> und TEV-Proteaseschnittstelle
pTEV16b-ERL1-Ektodomäne	ERL1-Ektodomäne mit N-terminalem Dekahistidin- <i>tag</i> und TEV-Proteaseschnittstelle
pTEV16b-ERL2-Ektodomäne	ERL2-Ektodomäne mit N-terminalem Dekahistidin- <i>tag</i> und TEV-Proteaseschnittstelle
pTEV16b-TMM-Ektodomäne	TMM-Ektodomäne mit N-terminalem Dekahistidin- <i>tag</i> und TEV-Proteaseschnittstelle
pTEV16b-BAK1-Ektodomäne	BAK1-Ektodomäne mit N-terminalem Dekahistidin- <i>tag</i> und TEV-Proteaseschnittstelle
pGEX-4a-EPFL2	reifes EPFL2 Peptid mit N-terminalem GST- <i>tag</i> , Hexahistidin- <i>tag</i> , TEV-Proteaseschnittstelle und C-terminalem Okta-Histidin- <i>tag</i>
pGEX-4a-EPFL2C>S	reifes EPFL2C>S Peptid mit N-terminalem GST- <i>tag</i> , Hexahistidin- <i>tag</i> , TEV-Proteaseschnittstelle und C-terminalem Okta-Histidin- <i>tag</i>
pGEX-4T-1-EPFL9	reifes EPFL9 Peptid mit N-terminalem GST- <i>tag</i> , TEV-Proteaseschnittstelle

## 2.2 Molekular- und mikrobiologische Methoden

### 2.2.1 DNA-Arbeiten, Klonierung und Transformation

Polymerasekettenreaktionen zur Amplifikation der Zielsequenzen wurden jeweils entsprechend der Herstellerangaben (Q5 Polymerase, New England Biolabs Ipswich, MA) durchgeführt. Aufgrund der Schmelztemperaturen über 72°C wurde auf eine *annealing*-Phase verzichtet und die entsprechende Elongationszeit um den zeitlichen Betrag der *annealing*-Phase verlängert. Der PCR-Erfolg wurde im 1%igen Agarosegel mit TAE-Puffer und Ethidiumbromid unter

UV-Illumination überprüft und mit einem BioDocAnalyse System (Analytik Jena, Jena) dokumentiert.

TEA-Puffer:

EDTA	1 mM
Eisessig	20 mM
Tris	40 mM

DNA-Verdaue mit Restriktionsendonukleasen wurden ebenfalls nach Herstellerangaben (New England Biolabs Ipswich, MA) durchgeführt und gelelektrophoretisch überprüft.

PCR-Reaktionsansätze und aus Agarosegelen excisierte DNA-Banden wurde mit einem GFX™ PCR DNA und Gel Band Purification Kit (GE, Sigma-Aldrich, Darmstadt) aufgereinigt. Die DNA-Gewinnung aus *E. coli* XL1 *blue* Kulturen wurde mit einem Monarch® Nucleic Acid Purification Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA) durchgeführt.

Nukleinsäurekonzentrationen wurden mit 2 µl Probe an einem Tecan M200Pro™ vermessen und mit der Tecan iControl™ Software nach der Absorption bei 260 nm und 280 nm ausgewertet.

Für den Gibson-*assembly* wurden zwischen 1 und 50 ng linearisierte Plasmid-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:3 zur *insert*-DNA in einem Gesamtvolumen von 2,5 µl eingesetzt und mit 7,5 µl Gibson-*assembly-mix* versetzt. Anschließend wurde der Ansatz für 60min bei 50°C inkubiert.

Gibson-*assembly-mix*:

PEG8000	5% v/v
Tris-HCl pH 7,5	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
DTT	10 mM
NAD <sup>+</sup>	1 mM
dNTPs, je	200 µM
T5 Exonuklease	0,064 U/µl
Phusion HF DNA Polymerase	0,004 U/µl
<i>Taq</i> DNA-Ligase	6,4 U/µl

10 µl dieses Ansatzes wurden mit 50 µl chemisch kompetenten Zellen versetzt und 15min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Erhitzen auf 42°C für 90s gefolgt von 1min Lagerung auf Eis. Dieser Transformationsansatz wurde auf 2YT-Agarplatten ausgestrichen (siehe 2.3 „Medien, Zellanzucht, Expression und Zellaufschluss“) und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Erhaltene Einzelkolonien wurden in 5 ml Kulturmedium, mit entsprechendem Antibiotikum, über Nacht bei 37°C vermehrt, Plasmid-DNA isoliert und zum Sequenzieren nach Sanger an Seqlab (Göttingen) übersendet.

## 2.3 Medien, Zellanzucht, Expression und Zellaufschluss

Als Anzuchtmedium und Grundmedium sowie in Agarplatten wurde für alle *E. coli* Stämme 2xYT-Medium verwendet.

### 2xYT-Medium:

Hefeextrakt	10 g l <sup>-1</sup>
Bacto Peptone™	16 g l <sup>-1</sup>
NaCl	5 g l <sup>-1</sup>
	ad 1 l ddH <sub>2</sub> O

### Für Agarplatten:

Agar-Agar	7,5 g l <sup>-1</sup> 2xYT Medium
-----------	-----------------------------------

Alle Kulturen wurden bei 37°C, schüttelnd mit 180 rpm angezogen. Zur Zielgenexpression wurden die betreffenden Konstrukte in BL21 (DE3) transformiert und eine 5 ml Vorkultur entweder mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte oder Zellen aus einem Glycerin-*stock* inokuliert und über Nacht angezogen. Aus dieser Vorkultur wurden je 500 ml Hauptkultur auf eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,05-0,1 angeimpft. Ab einer OD<sub>600</sub> von 0,8 wurde mit 0,1 mM IPTG induziert und die Expression für ca. 16 h bei 37°C und 180 rpm vollzogen.

OD<sub>600</sub> Bestimmungen wurden an einem Biosciences Ultrospec 3100 Pro UV/Visible Spectrophotometer Amersham (Little Chalfont, GB) vorgenommen.

Die Zellernte fand durch Zentrifugation bei 7000xg (Avanti J-26XP, Beckman Coulter, Krefeld), 4°C für 30min statt. Geerntete Zellpellets wurden entweder sofort weiterverarbeitet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C verwahrt.

Der Zellaufschluss wurde mit 2,5 ml Lysepuffer g Zellen<sup>-1</sup> in einem maximalen Volumen von 30ml durchgeführt. Die Suspension wurde mittels einer Aminco French Press, Thermo-Fischer Scientific (Oberhausen) bei 104 Bar Maschinendruck mit einem Durchgang aufgeschlossen und der Überstand nach Zentrifugation bei 14000xg (Zentrifuge 5702, Eppendorf, Hamburg) gewonnen und weiterverwertet.

Lysepuffer Ektodomänen:

Tris-HCl, pH 8	25 mM
NaCl	150 mM
Glycerin	10% v/v
DNase I	~10 µg/ml
complete™, EDTA-freier Protease Inhibitor Cocktail	1 Tablette/25 ml
PMSF	0,002% v/v

Lysepuffer Peptide:

10xPBS, pH 8	10% v/v
Glycerin	10% v/v
DNase I	~10 µg/ml
complete™, EDTA-freier Protease Inhibitor Cocktail	1 Tablette/25 ml

10xPBS:

NaCl	1,37 M
KCl	27 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	100 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	18 mM

**2.3.1 Zelllagerung**

Zellpellets nach einer Expression sowie chemisch kompetente Zellen wurden bei -80°C bis zur Verwendung gelagert. Glycerin-*stocks* wurden zum Inokulieren von Vorkulturen genutzt und nach folgendem Protokoll hergestellt:

Die betreffende Zellkultur wurde über Nacht bei 37°C in 2xYT Medium angezogen und am Folgetag eine 5 ml Kultur 2xYT Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,01 mit dieser inokuliert und bei 37°C inkubiert bis eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,5 erreicht war. 500 µl dieser Kultur wurden mit 500 µl Glycerin 90% v/v versetzt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte ebenfalls bei -80°C.

**2.4 Proteinextraktion**

Gewonnenes Zelllysate (siehe 2.3) wurde bei 150000xg zentrifugiert (Optima XPN, Beckman Coulter, Krefeld). Dieser lösliche Überstand wurde auf die entsprechenden Affinitätschromatographiesäulen appliziert.

**2.4.1 Nickel-Affinitätschromatographie**

Die Ektodomänen der fünf Rezeptorproteine wurden, da sie mit einem Dekahistidin-*tag* versehen waren einer Nickel-Affinitätschromatographie unterzogen. Die Reinigung fand bei 4°C statt, alle Puffer und Proben wurden auf Eis gehalten. Als Säule wurden 5 ml HisTrap HP (GE, Sigma-Aldrich, Darmstadt) an einem ÄKTA Prime Plus FPLC-System (GE, Sigma-

Aldrich, Darmstadt) verwendet. Die in Puffer A äquilibrierten Säulen wurden bei einer Flussrate von  $2 \text{ ml min}^{-1}$  mit löslichem Proteinüberstand beladen. Anschließend wurde die Säule mit Puffer A gespült bis die Absorption bei 280 nm die Nulllinie wiedererreicht hatte. Bei einer Flussrate von  $1 \text{ ml min}^{-1}$  und 10% Puffer B wurden unspezifisch an das Säulenmaterial bindende Proteine entfernt. Die Proteinelution fand bei einer Flussrate von  $1 \text{ ml min}^{-1}$  und 100% Puffer B statt.

Puffer A:

BisTris-HCl, pH 8	25 mM
NaCl	150 mM

Puffer B:

BisTris-HCl, pH 8	25 mM
NaCl	150 mM
Imidazol	250 mM
L-Arginin	50 mM
L-Glutaminsäure	50 mM

Das Eluat wurde auf 2,5 ml eingengt (Ultra-4 and -15 Centrifugal Filter Units – 3,000 NMWL, Amicon jetzt Merck, Darmstadt) und im Anschluss über eine PD-10 Entsalzungssäule (GE, Sigma-Aldrich, Darmstadt) in den Analysepuffer umgepuffert. Von den 3,5 ml Eluat wurden die Proteinkonzentrationen bestimmt und SDS-PAGES sowie Westernblots angefertigt zur Reinheitskontrolle.

Analysepuffer:

BisTris-HCl, pH 6	25 mM
NaCl	150 mM
l-Arginin	50 mM
L-Glutaminsäure	50 mM

## 2.4.2 GST-Affinitätschromatographie

Die analysierten Peptide EPFL9, EPFL2 und EPFL2 C>S wurden als Fusionskonstrukte mit N-terminalem GST-*tag* exprimiert und über GST-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Reinigung fand bei Raumtemperatur statt.

Die löslichen Überstände wurden mit einer Flussrate von  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$  auf eine in PBS, pH8 äquilibrierte GSTrap™ 4B Säule (GE, Sigma-Aldrich, Darmstadt) aufgetragen. Anschließend wurde die Säule bei einer Flussrate von  $1 \text{ ml min}^{-1}$  mit PBS, pH8 gespült bis die Absorption bei 280 nm die Nulllinie wiedererreicht hatte. Bei einer Flussrate von  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$  wurde das Zielprotein mit Elutionspuffer eluiert und aufgefangen.

Elutionspuffer:

10xPBS, pH8	10% (v/v)
L-Glutathion, reduziert	20 mM

Das Eluat wurde dreimal auf ein Zehntel seines Volumens eingengt und wieder mit PBS, pH8 aufgefüllt um eine ausreichende Verdünnung der L-Glutathionkonzentration zu erzielen. Im Anschluss wurde TEV-Protease (~1 mg 100 mg Zielprotein<sup>-1</sup>) zugesetzt und der Ansatz 20h bei 4°C inkubiert.

### 2.4.3 Umkehrphasenchromatographie

Zur Trennung freien GSTs, TEV-Protease und der Peptide wurden 5 ml des Eluats mit TEV-Protease auf eine SUPELCO<sup>TM</sup> LC-18 HPLC Säule (Merk, Darmstadt) aufgetragen, die in HPLC-Puffer A äquilibriert war. Es wurde mit HPLC mobiler Phase A gespült, bis die Absorption bei 220 nm und 280 nm ihre Grundlinie wieder erreicht hatte. Im Anschluss wurde ein Gradient von 0 auf 100% HPLC-Puffer B über 100min durchgeführt und die Fraktionen entsprechend ihrer Retentionszeit gesammelt.

HPLC mobile Phase A:

H <sub>2</sub> O	99,9% (v/v)
TFA	0,1% (v/v)

HPLC mobile Phase B:

Acetonitril	99,9% (v/v)
TFA	0,1% (v/v)

Die Proben der entsprechenden Retentionszeiten, die die Zielpeptide enthielten wurden vereinigt und mit Aceton gefällt. Hierfür wurden 5 Volumina eiskalter Aceton (100%) auf 1 Volumen Probe gegeben und 90min bei -20°C inkubiert. Es wurde bei 15000xg zentrifugiert (Zentrifuge 5702, Eppendorf, Hamburg) und der Überstand vorsichtig entfernt. Das verbleibende Aceton wurde bei Raumtemperatur abgedampft. Das erhaltene *pellet* wurde der Rückfaltung unterzogen (siehe 2.4.4.) und abermals mittels Umkehrphasenchromatographie separiert. Die Fraktionen, die Peptid enthielten, wurden vereinigt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und die mobile Phase über Evaporation entfernt (Speedvac Concentrator Sc110, Savant, Hicksvill, NY). Die erhaltenen Peptid-*pellets* wurden entweder sofort weiterverwendet oder bei -80°C gelagert.

Peptide, die für ITC-Messungen oder CD-Spektroskopie eingesetzt wurden, konnten nicht nach Reinigung mit TFA verwendet, da dieses nicht rückstandslos entfernt werden konnte. In diesen Fällen wurde 0,1% v/v TFA durch 0,5% v/v Methansäure ersetzt.

## 2.4.4 Peptidrückfaltung

Zur Rückfaltung der denaturierend gefällten Proteine und zur Rekonstitution der in der Literatur beschriebenen Disulfidbrücken wurde eine Rückfaltung nach Katayama (Katayama et al. 2001) durchgeführt.

Peptid-*pellets* wurden hierfür in 8 M Harnstoff auf eine Peptidkonzentration von  $\sim 50 \mu\text{g ml}^{-1}$  gelöst. Der Ansatz wurde auf Eis mit 5 Volumina Verdünnungspuffer mit reduziertem Glutathion (GSH) versetzt und 10min auf Eis bei sanfter Agitation inkubiert. Nach 10min wurde oxidiertes Glutathion (GSSG) zu einer finalen Konzentration von 1 mM beigeetzt. Diese Lösung wurde 40h bei sanfter Agitation und  $4^\circ\text{C}$  inkubiert.

Nach diesem Ablauf wurden die rückgefalteten Peptide mittels Umkehrphasenchromatographie gewonnen (siehe 2.4.3).

### Verdünnungspuffer:

Glycerin	9,6% v/v
10xPBS, pH8	10% v/v
L-Glutathion, reduziert	2,7 mM

## 2.5 Biochemische/Biophysikalische Analytik

### 2.5.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationen der Ektodomänen wurden spektrophotometrisch über die Absorption 280 nm an einem Tecan M200Pro<sup>TM</sup> ermittelt. Hierfür wurden das theoretische Molekulargewicht und der molare Extinktionskoeffizient (unter der Annahme, dass alle Cysteinreste reduziert vorliegen) anhand der Proteinsequenzen eingesetzt.

$$c = \frac{E}{\epsilon * d}$$

c= Konzentration

E= Absorption

$\epsilon$ = molarer Extinktionskoeffizient

d= Schichtdicke

**Tabelle 3:** Theoretisches Molekulargewicht und molarer Extinktionskoeffizient der Ektodomänen

Protein	theoretisches Molekulargewicht ( $\text{g mol}^{-1}$ )	molarer Extinktionskoeffizient ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ bei 280 nm)
ERECTA <sup>LRR</sup>	63660,07	42400
ERL1 <sup>LRR</sup>	63567,74	41410
ERL2 <sup>LRR</sup>	63654,75	42400
TMM <sup>LRR</sup>	52024,7	26930
BAK1 <sup>LRR</sup>	23255,25	15470

Peptidkonzentrationen wurden an einem Direct Detect® Infrarot Spektrometer (Merck, Darmstadt) gemessen und die Messkarten zur Reevaluation verwahrt.

### 2.5.2 SDS-PAGE, Gelfärbung

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von allen Proteinen wurden Acrylamidgele mit 15% Acrylamid genutzt. Proben wurden mit jeweils 0,25 Volumina 4xProbenpuffer nach Laemmli (Laemmli 1970) versetzt und bis maximal 100  $\mu\text{g}$  Protein pro Gelspur geladen. Die Elektrophorese wurde bei 25 mA  $\text{Gel}^{-1}$  durchgeführt, bis die Bromphenolblaulauffront das untere Ende des Gels erreicht hat. Das folgende Pipettierschema gilt für die Herstellung eines Gels mit den Maßen 6 x 8 cm und einer Stärke von 1,5 mm:

#### Sammelgel:

H <sub>2</sub> O	2,7 ml
30% Acrylamidlösung	0,7 ml
Tris HCl, pH 6,8; 1 M	0,5 ml
10% (w/v) APS	0,04 ml
10% (w/v) SDS	0,04 ml
TEMED	0,004 ml

#### Trenngel:

H <sub>2</sub> O	2,3 ml
30% Acrylamidlösung	6 ml
Tris HCl, pH 8,8; 1,5 M	2,6 ml
10% (w/v) APS	0,1 ml
10% (w/v) SDS	0,1 ml
TEMED	0,004 ml

#### 4xProbenpuffer:

Tris HCl, pH 6,8	227,8 mM
SDS	2,1% (w/v)
$\beta$ -Mercaptoethanol	4% (v/v)
Bromphenolblau	0,05% (w/v)
Glycerin	20% (v/v)

Elektrophoresepuffer:

Tris HCl	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,05% (w/v)

Zum Anfärben von Proteinen im SDS-Gel wurde ausschließlich eine kolloidale Coomassie-Färbelösung modifiziert nach Kang (Kang et al. 2002) verwendet. SDS-Gele wurden hierfür nach der Elektrophorese 10min in Wasser geschwenkt, anschließend mit der kolloidalen Coomassie-Färbelösung überschichtet. Nach ca. 2h wurde das gefärbte Gel wiederum in Wasser überführt, um den Hintergrund zu entfärben und anschließend photographisch dokumentiert.

Kolloidale Coomassie-Färbelösung:

Coomassie <i>brilliant blue</i> G250	0,02% (w/v)
Aluminiumsulfat-14-Hydrat	5% (w/v)
Ethanol (96 %)	10% (v/v)
ortho-Phosphorsäure	2% (v/v)

### 2.5.3 Westernblot

Western-Blots wurden, modifiziert nach dem *semi-dry*-Verfahren von Towbin, durchgeführt (Towbin et al. 1979). Für Westernblot-Analysen wurden die SDS-Gele nach der Elektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran, die vorher in Transferpuffer inkubiert wurde, übertragen. Auf einem Owl Semi-Dry Blotter (Thermo-Fischer Scientific, Oberhausen) wurden drei Lagen Whatman-Filterpapier, getränkt in Transferpuffer aufgelegt. Auf diese wurde die Nitrozellulosemembran gelegt und wiederum darauf das SDS-GEL. Abschließend wurden drei Lagen Whatman-Filterpapier, getränkt in Transferpuffer aufgelegt.

Transferpuffer:

Tris HCl	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,05% (w/v)
Methanol	10% (v/v)

Der Transfer wurde mit  $1 \text{ mA cm}^{-2}$  für 90min durchgeführt.

Nach vollendetem Transfer wurde die Membran für 1h in Blockierlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Blockieren wurde ein Anti-His-HRP-Antikörperkonjugat (Qiagen, Hilden) der Lösung, mit einer finalen Konzentration von 1:10000 zugesetzt und 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Antikörperinkubation wurde die Membran zweimal mit PBS-T für jeweils 10min gewaschen und einmal für 10min mit PBS inkubiert. Zur ECL-Detektion wurden Detektionslösungen A und B (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und auf die Membran appliziert. Die ECL-Detektion und Dokumentation erfolgte

an einem ImageQuant LAS 4000 Mini (GE-Healthcare, Solingen) mit automatischer Messung der Belichtungszeit.

#### 2.5.4 Größenausschlusschromatographie

Zur analytischen Separation der einzelnen Proteine wurden diese auf einer Superdex® 200 Increase 10/150 GL (GE-Healthcare, Solingen) chromatographisch getrennt. Die FPLC erfolgte an einer ÄKTA Prime Plus (GE, Sigma-Aldrich, Darmstadt) bei einer Flussrate von 0,1 ml min<sup>-1</sup> bei Raumtemperatur. Die Säule wurde mit 5 Säulenvolumina Analysepuﬀer äquibriert. Es wurden je 100 µl Proteinlösung (~5 µM, im Falle von Peptid-Korezeptor-Kochromatographie: 5 µM Protein und 5 µM Peptid, bzw. 5 µM Peptid zur Evaluation des Elutionsvolumens für EPFL2) 30min bei 100000xg zentrifugiert und der Überstand über eine 100 µl Probenschleife auf die Säule aufgetragen. Die einzelnen Fraktionen wurden pro 0,1 ml aufgefangen und zu weiteren Verarbeitung benutzt oder verworfen.

Als Größenstandards, aus dem Gel Filtration Molecular Markers Kit (Sigma-Aldrich, Darmstadt) dienen:

BSA	66 kDa	1 mg ml <sup>-1</sup>
Thyroglobulin	669 kDa	10 mg ml <sup>-1</sup>
Apoferritin	443 kDa	10 mg ml <sup>-1</sup>
Alkoholdehydrogenase	150 kDa	5 mg ml <sup>-1</sup>
Karbonische Anhydrase	29 kDa	3 mg ml <sup>-1</sup>

Die Elutionsvolumina der Eichproteine wurden gegen das theoretische Molekulargewicht aufgetragen und eine nicht-lineare Regression durchgeführt. Anhand der erhaltenen Formel wurden die apparenten Molekulargewichte der Zielproteine bestimmt:

$$y \text{ (in kDa)} = 68941 * e^{-3,334x}$$

Das Ausschlussvolumen wurde mit Dextranblau bei  $V_0=0,45$  ml ermittelt.

#### 2.5.5 Isothermale Titrationskalorimetrie

Isothermale Titrationskalorimetrie Experimente wurden an einem MicroCal iTC200 (Malvern, Malvern GB) vorgenommen. Es wurden 280 µl Proteinlösung mit einer Konzentration von 5 µM in die Messzelle gegeben und 40 µl Titrant mit einer Konzentration von 50 µM in die Injektionsspritze gefüllt. Bei veränderten Konzentrationen ist dies am jeweiligen Experiment angezeigt. Zur Referenzmessung wurde Peptid in Puffer titriert und diese Referenzmessung von den Messungen mit Rezeptor subtrahiert.

Die Messungen wurden bei 25°C, einer Referenzleistung von 10 µcal s<sup>-1</sup> (2,39 µJ s<sup>-1</sup>), 750 rpm Rühren und der Einstellung *siganl gain low* durchgeführt. Es wurden 19 Injektionen vorgenommen. Eine Injektion zu 0,5 µl über eine Dauer von 1s und 18 Injektionen zu 2 µl über

einen Zeitraum von 4s. Die Injektionen lagen je 150s auseinander. Die Datenanalyse wurde mit Origin7 und der implementierten ITC-Suite von Malvern vorgenommen.  $K_D$ -Werte wurden durch die Bildung des Reziproken der von der Software angegebenen  $K_A$ -Werte gebildet und in kJ konvertiert. Der  $\Delta G$ -Wert wurde nach folgender Formel ausgerechnet:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Wobei  $\Delta H$  (Enthalpieänderung) und  $\Delta S$  (Entropieänderung) durch die Software angegeben wurden und  $T$  die Temperatur ist (298,15 K).

Die Messungen wurden in zwei technischen Replikaten ausgeführt und die Mittelwerte der  $K_D$ -Werte gebildet.

### 2.5.6 CD-Spektroskopie

Für Messungen des Circular dichroismus wurden Peptidkonzentrationen von 500  $\mu\text{M}$  in 25 mM Kaliumphosphatpuffer bei pH6 eingesetzt.

#### Kaliumphosphatpuffer pH6:

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 M	87,7% (v/v)
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 M	12,3% (v/v)

Die Messungen wurden an einem Jasco J-715 CD Spectrometer (Jasco, Easton, MD) vorgenommen. Es wurden einerseits Spektren zwischen 195 nm und 260 nm aufgenommen, sowie Spektren unter Zugabe von 10 mM TCEP zwischen 200 nm und 260 nm. Es wurden 10 Spektren akkumuliert und gemittelt.

Die erhaltenen Elliptizitätswerte ( $m^\circ$  in mdeg) wurden um die Pufferkontrolle bereinigt und in die molare Elliptizität ( $[\theta]$ ) konvertiert.

$$[\theta] = m^\circ * \frac{M}{10 * d * c}$$

$c$ = Konzentration

$M$ = mittleres Molekulargewicht ( $\text{g mol}^{-1}$ )

$d$ = Schichtdicke (in cm)

## 2.6 Peptid-Bioassay

Zur *in vivo* Evaluation der Peptidbioaktivität wurde in Anlehnung an bereits publizierte Studien vorgegangen (Lee et al. 2012). Samen von *A. th.* Col-0 und Col-0 *tmm* wurden sterilisiert und in Murashige & Skoog (MS) Medium mit 1% Saccharose (w/v) gegeben. Über drei Tage wurde bei 4°C und Lichtausschluss die Keimung induziert. Ab dem Punkt der Keimungsbehandlung wurden die Samen in eine Pflanzenkammer überführt und zwei bis drei Tage bei 22°C und kontinuierlichem Licht gehalten. Ab dem Zeitpunkt der Keimung wurden die Pflanzen in 1 ml

flüssigem MS Medium mit 1% (w/v) Saccharose und den zu evaluierenden Peptiden in einer Konzentration von 5  $\mu$ M umgesetzt. Hierfür wurde eine Lösung von 250 mM in MES-Puffer, pH 5,7 angefertigt, von der 50  $\mu$ l eingesetzt wurden. Als negative Kontrolle wurden Pflanzen mit 50  $\mu$ l MES-Puffer, pH 5,7 behandelt. Nach der Peptidzugabe wurden die Pflanzen fünf weitere Tage in der Pflanzenkammer inkubiert. Nach fünf Tagen wurden Kotyledonen der Pflanzen geerntet und zum Anfärben der Zellmembranen 1min mit 1 mM Propidiumiodid behandelt. Hiernach wurden sie 1min in H<sub>2</sub>O gewaschen und mikroskopisch ausgewertet. Bei den verwendeten Konfokalmikroskopen handelte es sich um ein Zeiss LSM710, Zeiss LSM780 (Carl Zeiss, Jena) bzw. Leica TCS SP8 STED 3X (Leica, Wetzlar). Bei 200facher Vergrößerung wurden Bilder von 1024 x 1024 Pixel aufgenommen (in einigen Messungen 400fach, dies wurde jedoch innerhalb des Experiments einheitlich gehalten) und die Stomata ausgezählt. Die Pflanzenanzucht, Mikroskopie und Quantifizierung sowie die nachfolgende statistische Analyse wurden von Nozomi Kawamoto durchgeführt.

## 2.7 Bioinformatische Methoden

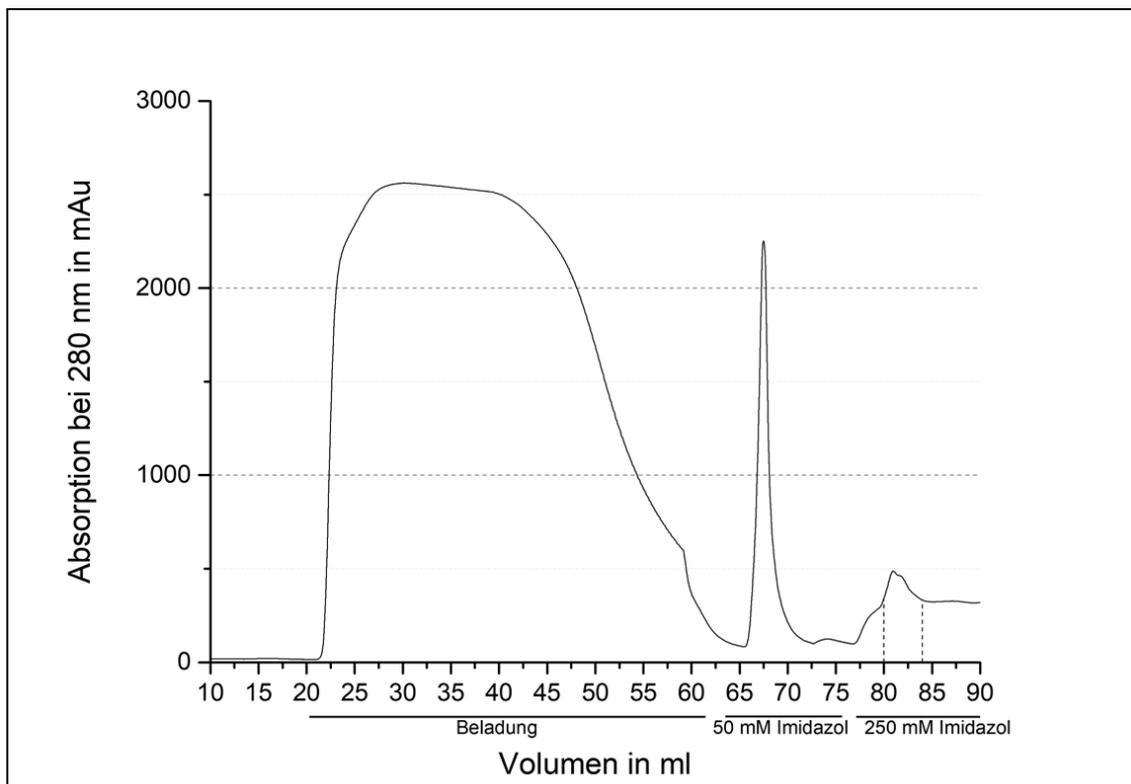
Die Analyse von Proteinsequenzen und deren *alignment* wurden in Jalview (Waterhouse et al. 2009) mit dem Clustal Omega Algorithmus (Sievers et al. 2011) bei *default settings* mit der Blossum62 Substitutionsmatrix vorgenommen. Die Evaluation von DNA-Sequenzierungschromatogrammen erfolgte mit FinchTV und die Erstellung von Vektorkarten und Sequenzdarstellung mit Serial Cloner. Die Bearbeitung und Darstellung von 3D Proteinstrukturen, Berechnung von elektrostatischen Oberflächen, deren Volumen und Fläche wurden mit Chimera (Pettersen et al. 2004) und Sekundärstrukturvergleiche mit Berechnung der RMSD-Werte in PyMol (Delano 2002) durchgeführt. Das EPFL2 Homologiemodell wurde mit MODELLER (Eswar et al. 2007) und EPF1 (5XJO), EPF2 (5XKN), EPFL4 (5XKN) und EPFL9 (2LIY) als *multi template* erstellt und die *hairpin-loop*-Region mit *loop refinement* nachmodelliert. Protein-Protein *docking* zwischen ERL2<sup>LRR</sup> und BAK1<sup>LRR</sup> wurde auf dem ClusPro 2.0 Webserver durchgeführt (Comeau et al. 2004; Kozakov et al. 2017). Wobei als Matrize für ERL2<sup>LRR</sup> die ERL2-Kette von 5XKN verwendet wurde und für BAK1<sup>LRR</sup> 5XKN die BAK1-Kette. Die Berechnung der Sekundärstrukturanteile anhand von CD-Messdaten erfolgte über die CDPro *suite* (Sreerama und Woody 2000) und den K2D3 Algorithmus (Louis-Jeune et al. 2012). Simulierte CD-Spektren anhand von Kristallstrukturdaten aus der PDB wurden von DichroCalc (Bulheller und Hirst 2009) berechnet. Die von der Primärstruktur abgeleiteten Vergleichswerte für den prozentualen Anteil von Sekundärstrukturelementen wurden mit SOPMA errechnet (Combet et al. 2000). Die Darstellung von Diagrammen und die statistische Auswertung erfolgte mit Origin9 bzw. Origin7 für ITC-Daten, für die Stomatainidizes mit R (durchgeführt von Nozomi Kawamoto).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Expression und Reinigung der Signalwegkomponenten

##### 3.1.1 ERCETA, ERL1, ERL2, TMM und BAK1

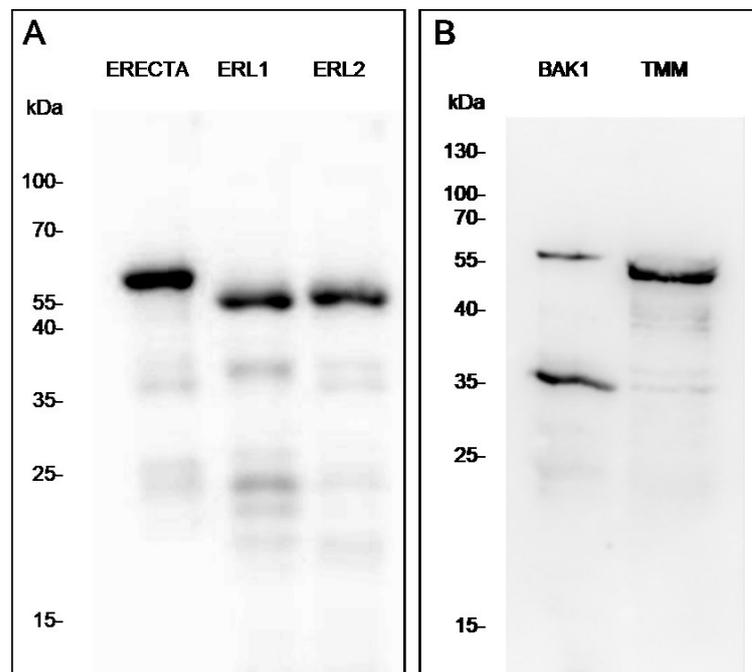
Die Nickelaffinitätschromatographie der Ektodomänen nach Übernachtexpression stellt im Coomassiegel und im Westernblot ein homogenes Bild dar. Alle fünf Proteine können bei 250 mM Imidazol im Elutionspuffer eluiert werden, nachdem unspezifisch gebundenes Protein bei 50 mM von der Säule entfernt wurde. Im Chromatogramm zeigt sich ein hohes Absorptionsmaximum für unspezifisch gebundene Proteine bei allen Konstrukten und ein breiter etwa 200 mAu hohes Absorptionsmaximum über 4 ml für die Elutionsfraktion (hier exemplarisch an ERECTA<sup>LRR</sup> aufgeführt, siehe Abbildung 8). Im Zuge der ansteigenden Imidazolkonzentration findet ein Grundlinienanstieg um ca. 300 mAu statt. Das Elutionsmaximum setzt sich jedoch deutlich von diesem ab und konnte aufgefangen werden.



**Abbildung 8:** Exemplarisches Chromatogramm der Nickel-Affinitätschromatographie für ERECTA<sup>LRR</sup> mit der Absorptionskurve bei 280 nm und den jeweiligen Volumina. Die Säulenbeladungsphase, Elution unspezifisch gebundener Spezies (50 mM Imidazol) und die Elutionsphase (250 mM Imidazol) sind durch schwarze Balken unterhalb der Abszissenachse. Das fraktionierte Volumen ist mit gepunkteten Vertikalbalken gekennzeichnet.

Im Westernblot mit Anti-Histidin-HRP-Konjugat zeigen sich Signale zwischen 55 und 65 kDa für ERECTA<sup>LRR</sup>, ERL1<sup>LRR</sup> und ERL2<sup>LRR</sup>. Bei theoretischen Molekulargewichten von je 64 kDa, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Signalen um die Zielproteine handelt. Zusätzlich werden mehrere schwach ausgeprägte Signale niedrigeren Molekulargewichtes detektiert, welche auf das Antikörperkonjugat ansprechen. Dies legt nahe, dass es sich um N-terminale Degradationsprodukte oder unvollständige Translationsprodukte handelt. Für BAK1<sup>LRR</sup> zeigten sich definierte Signale. Eines um ca. 35 kDa und eines um ca. 55 kDa. Das theoretische Molekulargewicht von BAK1<sup>LRR</sup> beträgt jedoch 23 kDa, wobei es durch beispielsweise Ladungsmaskierungen zu solch einer Verschiebung der elektrophoretischen Mobilität kommen kann. Bei dem Signal höheren Molekulargewichtes, kann es sich um ein Homodimer handeln. Das Volllänge BAK1 Proteins bildet beschriebene Homodimere, welche denaturierungsresistent im SDS-PAGE sind.

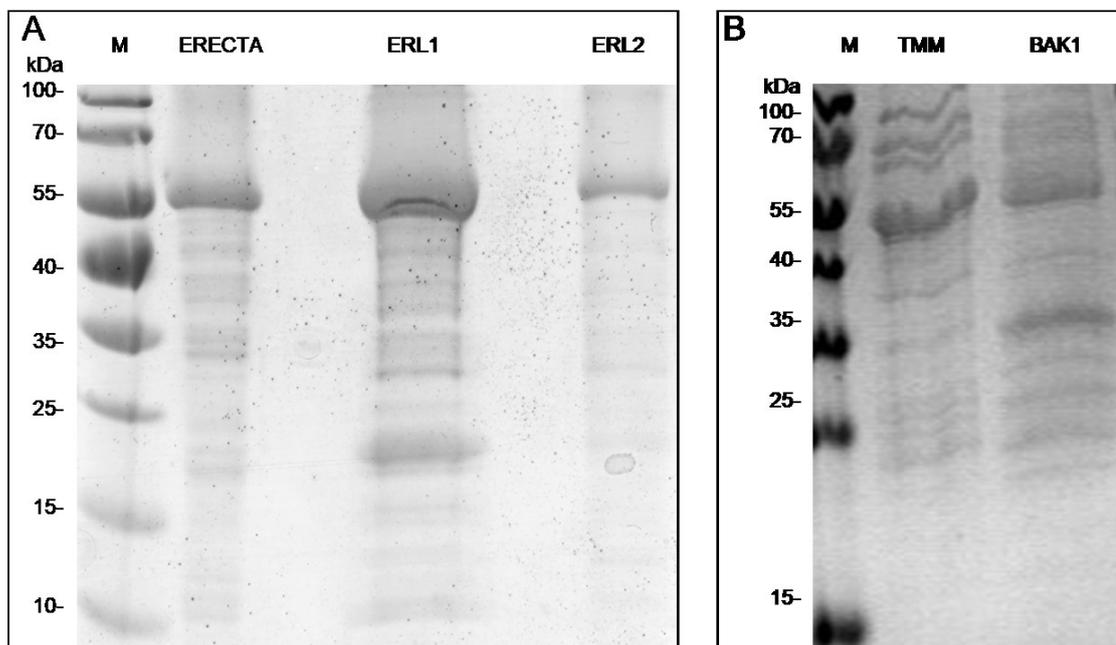
Das Westernblotsignal von TMM<sup>LRR</sup> stellt sich bei etwas weniger als 55 kDa dar, was dem theoretischen Molekulargewicht von 52 kDa sehr nahekommt. Auch hier zeigen sich schwache Signale niedrigeren Molekulargewichtes.



**Abbildung 9:** Westernblot der eluierten Proteine **A** ERECTA<sup>LRR</sup>, ERL<sup>LRR</sup> und ERL2<sup>LRR</sup> sowie **B** BAK1<sup>LRR</sup> und TMM<sup>LRR</sup>. Es wurden jeweils 10 µl Probe mit Laemmlipuffer versetzt und im 15%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Belichtungszeit beträgt 8s.

Im Coomassie gefärbten Gel der Proteinreinigungen, stellt sich ein vergleichbares Bild dar. Für ERECTA<sup>LRR</sup>, ERL1<sup>LRR</sup> und ERL2<sup>LRR</sup> sind markante Banden mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 bis 60 kDa sichtbar. Es zeichnen sich zudem mehrere Abbaubanden,

bzw. Banden niedrigeren Molekulargewichtes ab, deren Intensität jedoch wesentlich geringer ist als die der Banden des korrekten Molekulargewichtes. Die Intensität dieser Banden korreliert mit der Konzentration an Protein korrekten Molekulargewichts, was wiederum die Annahme stützt, dass es sich um Degradationsprodukte handelt. Im Fall von ERL1<sup>LRR</sup> zeigt sich eine prominente Bande mit apparentem Molekulargewicht von ca. 20 kDa, welche auch ein Westernblotsignal liefert. Für BAK1<sup>LRR</sup> stellen sich prominente Banden in Korrelation zu den beschriebenen Westernblotsignalen dar sowie eine zusätzliche Doppelbande bei ca. 25 kDa. Da diese nicht im Westernblot anspricht liegt ein C-terminales Degradationsprodukt oder eine Kontamination nahe. Für TMM<sup>LRR</sup> ist eine starke Bande auf Höhe von 55 bis 60 kDa sichtbar, sowie eine weitere prominente Bande mit apparentem Molekulargewicht von ca. 30 kDa, die auch im Westernblot ein Signal gibt, also Degradationsprodukt darstellt. Es finden sich weitere hintergründige Banden sehr schwacher Intensität.

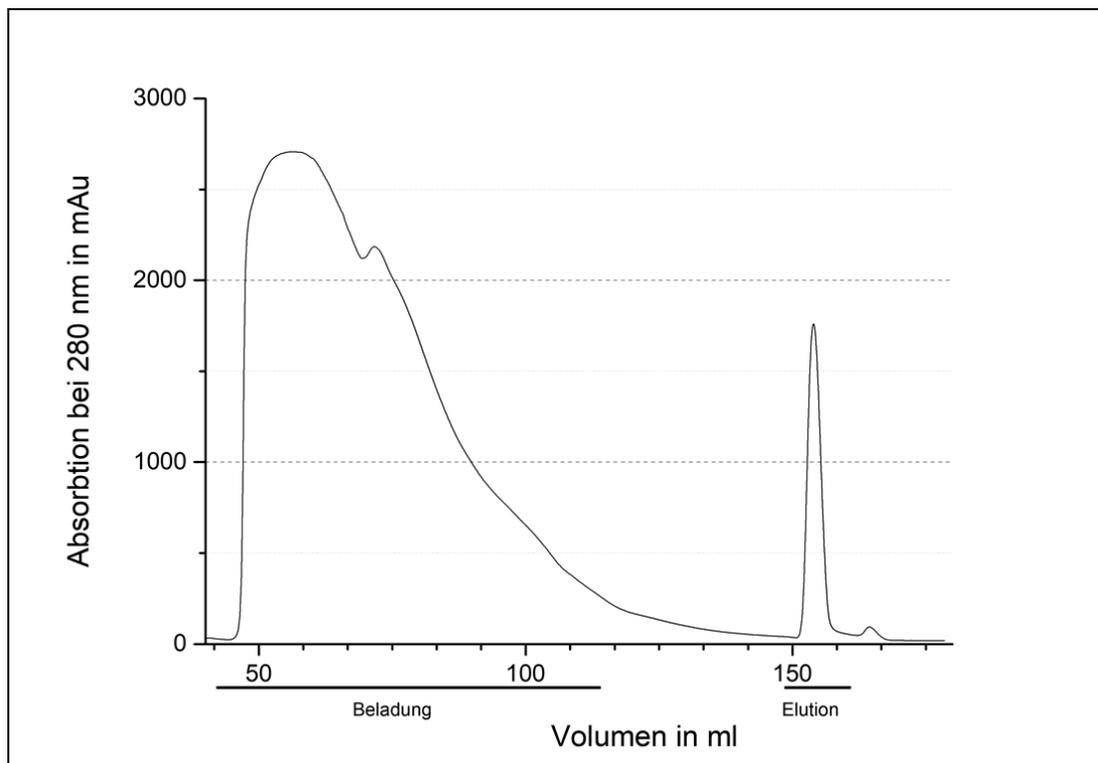


**Abbildung 10:** Coomassie gefärbter SDS-PAGE der eluierten Proteine **A** ERECTA<sup>LRR</sup>, ERL<sup>LRR</sup> und ERL2<sup>LRR</sup> sowie **B** BAK1<sup>LRR</sup> und TMM<sup>LRR</sup>. Es wurden jeweils 10 µl Probe mit Laemmli-puffer versetzt und im 15%igen SDS-PAGE aufgetrennt. M= PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo-Fischer Scientific, Oberhausen)

Die Proteinkonzentrationsbestimmung, nach Entfernen des Imidazols, ergab Konzentrationen von 0,45 mg ml<sup>-1</sup> (7,6 µM) für ERECTA<sup>LRR</sup>, 0,53 mg ml<sup>-1</sup> (8,7 µM) für ERL1<sup>LRR</sup>, 0,29 mg ml<sup>-1</sup> (4,5 µM) für ERL2<sup>LRR</sup>, 0,19 mg ml<sup>-1</sup> (8,2 µM) für BAK1<sup>LRR</sup> und 1,21 mg ml<sup>-1</sup> (23,1 µM) für TMM<sup>LRR</sup> in je 3,5 ml. Die Quantifizierung der Banden, welche nicht dem theoretischen Molekulargewicht entsprechen wurde anhand der Gelbilder mit ImageJ vorgenommen. Es ergaben sich folgende Werte: ERECTA<sup>LRR</sup> 0,9%, ERL1<sup>LRR</sup> 7,2%, ERL2<sup>LRR</sup> 3,2%, BAK1<sup>LRR</sup> 5,6% (wobei die Dimerbande nicht mit berücksichtigt wurde) und TMM<sup>LRR</sup> 4,6%.

### 3.1.2 EPFL2 und EPFL9

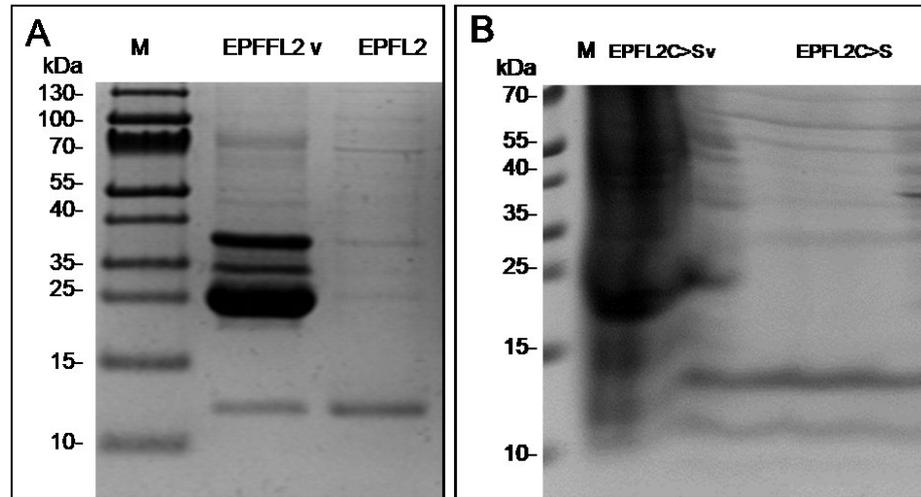
Die Beladung der GST-Trap-Säule, die mit geringer Flussrate auf Grund der langsamen Bindungskinetik erfolgte, ergibt ein Absorptionssignal welches, für alle drei Konstrukte, aus einem ausgedehnten Hauptabsorptionsmaximum und einer kleineren Schulter dieses Maximums besteht (siehe Abbildung 11). Bei einer Konzentration von 20 mM reduziertem Glutathion im Puffer zeigt sich ein schmaler, hohes Elutionsmaximum über ein Volumen von 10 ml.



**Abbildung 11:** Exemplarisches Chromatogramm der GST-Affinitätschromatographie für GST-EPFL2 mit der Absorptionskurve bei 280 nm und den jeweiligen Volumina. Die Säulenbeladungsphase und die Elutionsphase sind durch schwarze Balken unterhalb der Abszissenachse gekennzeichnet.

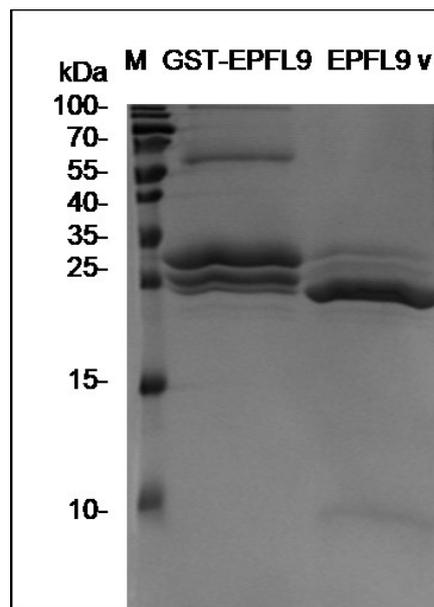
Die über Nacht mit TEV-Protease versetzte und wie unter 4.3.2 aufgeführt verdünnte, Elutionsfraktion zeigt im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE vier deutliche Banden. Die intensivste Bande zeigt ein apparentes Molekulargewicht von 25 kDa. Intensität und Molekulargewicht sprechen dafür, dass es sich um TEV-Protease handelt bzw. um freies GST (theoretisches Molekulargewicht von 26 kDa). Die Bande mit apparentem Molekulargewicht von ca. 37 kDa entspricht dem theoretischen Molekulargewicht von GST-EPFL2/EPFL2C>S mit 37,5 kDa bzw 36 kDa. Um 35 kDa findet sich eine Bande für die keine Zuordnung getroffen werden kann. Bei ca. 12 kDa ist eine deutliche Bande entsprechend dem Molekulargewicht von EPFL2 sichtbar. Nach der ersten Umkehrphasenchromatographie stellt sich diese Bande als

einzigste prominente Bande dar. Es sind schwache Hintergrundbanden höheren Molekulargewichtes zu verzeichnen die mit Banden aus dem TEV-Protease-Verdauansatz



**Abbildung 12:** Coomassie gefärbter SDS-PAGE des **A** TEV-Protease-Verdauansatzes (EPFL2 v) und von EPFL2 nach der ersten Umkehrphasenchromatographie und **B** TEV-Protease-Verdauansatz (EPFL2C>S v) und von EPFL2C>S nach der ersten Umkehrphasenchromatographie. Es wurden jeweils 10  $\mu$ l Probe mit Laemmlipuffer versetzt und im 15%igen SDS-PAGE aufgetrennt. M= PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo-Fischer Scientific, Oberhausen)

korrelieren. Im Verdauansatz von EPFL2C>S sind aufgrund der Überladung der Spur, wenige distinkte Banden zu erkennen, jedoch tritt die TEV-Bande bei 25 kDa deutlich hervor. Im Gel nach der ersten HPLC zeigt sich eine Bande um ca. 13 kDa und eine schwächere Bande um ca. 11 kDa, welche beide als EPFL2C>S in Frage kommen.

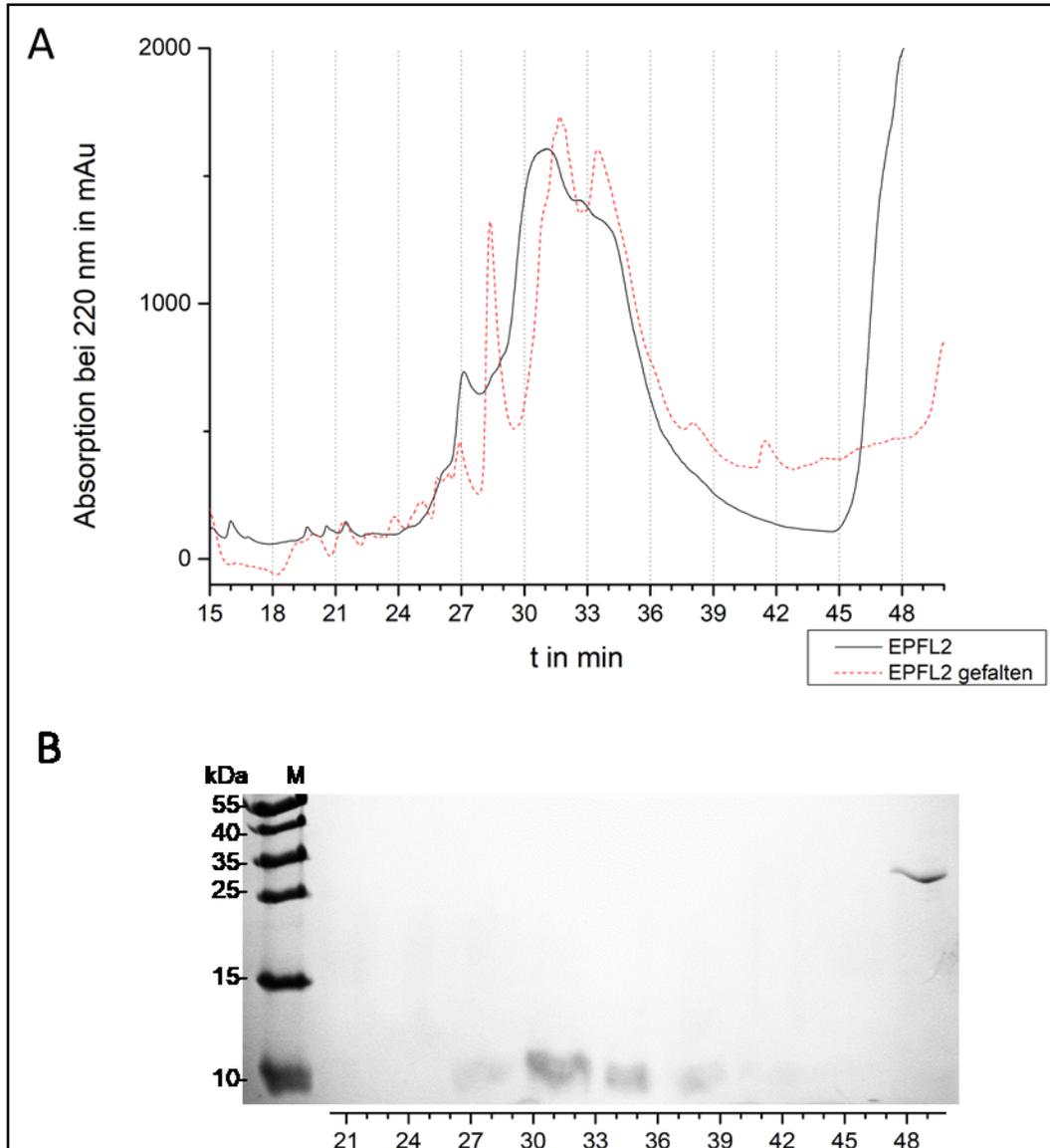


**Abbildung 13:** Coomassie-gefärbter SDS-PAGE von der Elutionsfraktion von GST-EPFL9 und des TEV-Protease-Verdauansatzes (EPFL9 v). Es wurden jeweils 10  $\mu$ l Probe mit Laemmlipuffer versetzt und im 15%igen SDS-PAGE aufgetrennt. M= PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo-Fischer Scientific, Oberhausen)

Für EPFL9 stellt sich ein ähnliches Bild dar. Es sind Banden zu verzeichnen welche mit dem theoretischen Molekulargewicht von GST-EPFL9, TEV-Protease, freiem GST und EPFL9 (theoretisches Molekulargewicht von 5 kDa) korrelieren. Trotz einiger Hintergrundbanden kann von einem erfolgreichen TEV-Proteaseverdau ausgegangen werden und einem erfolgreichen Aufreinigen mit der ersten Umkehrphasenchromatographie. Die vereinten Fraktionen nach der Umkehrphasenchromatographie der entsprechenden Retentionszeit (siehe 3.2) wurden der Rückfaltung (siehe 2.4.4) unterzogen.

### 3.2 Rückfaltung der cysteinreichen Peptide

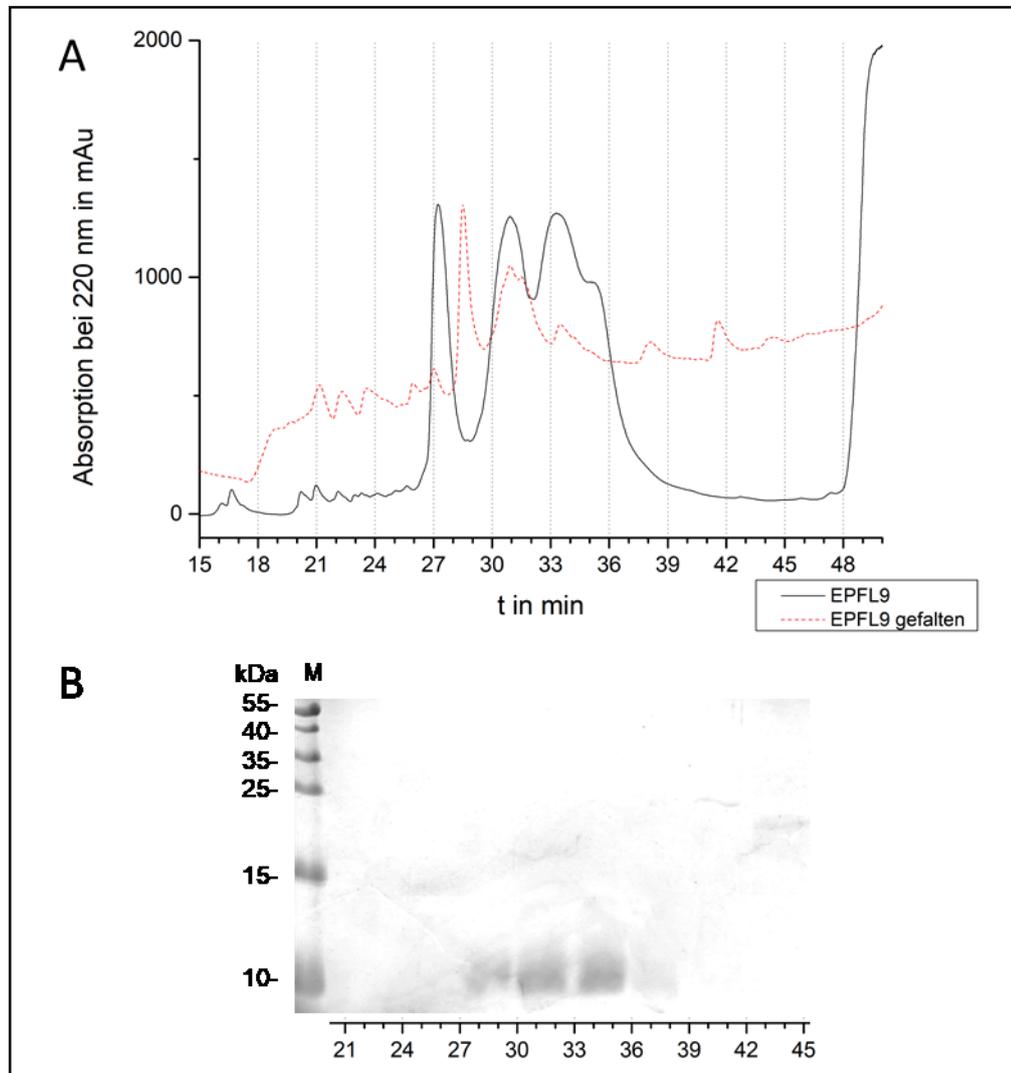
Im vergleichenden Blick auf die Umkehrphasenchromatographie zeigt sich eine leichte Verschiebung der Retentionszeiten für EPFL2. Vor der Rückfaltung zeigen sich zwei Absorptionsmaxima (bei 27 und 31 min) wobei das letzte mit einer breiten Schulter abfällt. Ab 45 min steigt die Absorption bei 220 nm bis zur Detektorsättigung an (nicht vollständig im Chromatogramm Abbildung 14 aufgezeigt). Ab diesem Punkt eluieren Proteine höheren Molekulargewichtes, wie TEV-Protease, freies GST und nicht prozessiertes GST-EPFL2. Für die Rückfaltung wurden die Fraktionen zwischen 29 und 36 min gesammelt und weiterverwertet. Der Rückfaltungsansatz wurde wiederum auf die C-18-Säule aufgetragen und mit einem Acetonitrilgradienten eluiert. Es zeigt sich eine schärfere Abgrenzung der zuvor beobachteten *peaks* sowie eine Maximaverschiebung um ca. 1 min Retentionszeit. Zudem sind verschiedene Minima kleinerer Amplitude zu verzeichnen und ein genereller Grundlinienanstieg bis bei ca. 49 min ein weiteres Maximum ansteigt (nicht vollständig im Chromatogramm Abbildung 14 aufgezeigt). Die Fraktion dieses starken Anstiegs zeigte eine distinkte Bande um 25 kDa. Aufgrund der starken Intensität und der Tatsache, dass ein Großteil der Kontaminanten bereits durch eine erste HPLC abgeschieden wurde, lässt den Verdacht zu, dass es sich Homodimere mit inkorrekt Faltung handelt, bei welchen eventuell Cystein intermolekulare Disulfidbrückenbindungen eingegangen sein können. Im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE spiegelt sich der Grundlinienanstieg nicht wider. Es sind jedoch in drei Fraktionen diffuse Banden mit apparentem Molekulargewicht um 12 kDa sichtbar, welche sich den drei Absorptionsmaxima zuordnen lassen und EPFL2 entsprechen. In den drei Fraktionen ist kein signifikanter Unterschied im SDS-PAGE zu erkennen und die Peptidentität konnte massenspektrometrisch geklärt werden, wobei sich keine Peptide anderer Proteine im LC-MS/MS-Spektrum fanden (Daten nicht aufgeführt, Messungen wurden im Institut für Biologie der Universität Köln an einem QTRAP 5500 per ESI-TOF durchgeführt). Die Unschärfe der Banden kann im niedrigen Molekulargewicht, auf einen SDS-PAGE Überladungseffekt oder residualem Acetonitril in den Proben zurückzuführen sein. Es ist auch nicht auszuschließen, dass es sich um eine Mischpopulation mit ungefalteten Peptiden handelt und die unzureichende Fokussierung daher rührt.



**Abbildung 14:** **A** Umkehrphasen-HPLC Chromatogramm mit Absorptionskurve bei 220 nm und Retentionszeiten von 15 bis 50 min. Es wurden die Chromatogramme von aufgetragenem EPFL2 vor der Rückfaltung (schwarz) und nach der Rückfaltung (rot gepunktet) überlagert. **B** Coomassie-gefärbter SDS-PAGE der *reversed-phase* HPLC-Fractionen von gefalteten EPFL2, wobei sich eine Fraktion über eine Retentionszeit von 3 min erstreckt. Es wurden 5  $\mu$ l Probe mit SDS-Probenpuffer versetzt und aufgetragen. M= PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo-Fischer Scientific, Oberhausen).

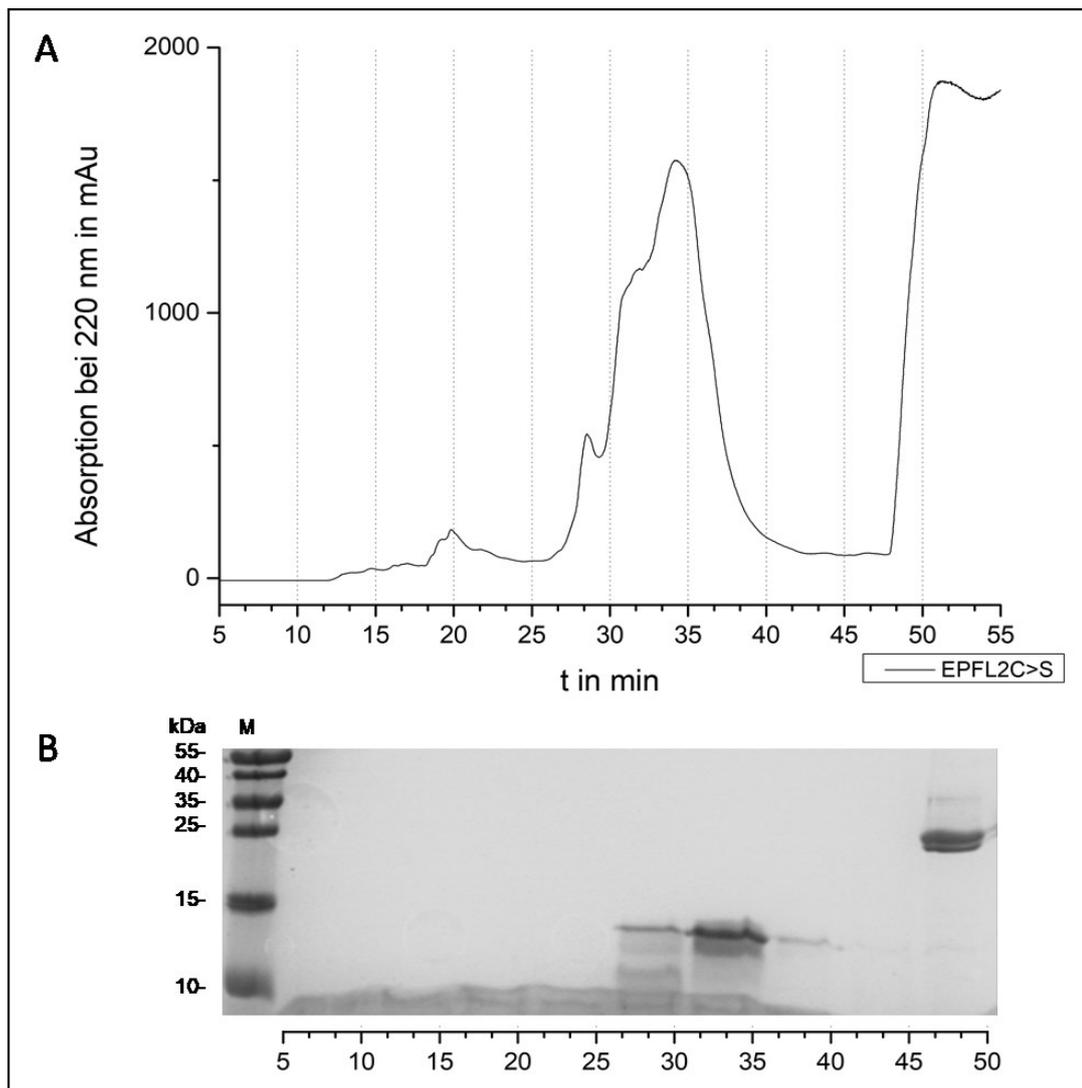
Für EPFL9 stellt sich ein vergleichbares Bild dar. Zwischen einer Retentionszeit von 26 min und 38 min zeigen sich für die Chromatographie des ungefalteten Peptids drei Maxima von welchen das letzte eine Schulter besitzt. Ab Minute 48 erhebt sich ebenfalls ein starkes Signal (nicht vollständig im Chromatogramm Abbildung 15 aufgezeigt). Das Chromatogramm nach Rückfaltung zeigt im Gesamtverlauf ebenfalls einen Grundlinienanstieg und neben zahlreichen kleineren Maxima zeigen sich zwei Hauptmaxima, von welchen das letzte wiederum geschultert ist. Es ist eine beträchtliche Verschiebung der Retentionszeit von 27,5 min auf 28,5 min für das

erste Maximum deutlich. Das zweite Maximum spiegelt das zweite des Chromatogramms vor der Rückfaltung wider und fällt zusätzlich mit einer Schulter ab. Dem dritten Maximum vor Rückfaltung entspricht ein Maximum niedriger Amplitude nach der Rückfaltung.



**Abbildung 15:** A *reversed-phase* HPLC Chromatogramm mit Absorptionskurve bei 220 nm und Retentionszeiten von 15 bis 50 min. Es wurden die Chromatogramme von aufgetragenem EPFL9 vor der Rückfaltung (schwarz) und nach der Rückfaltung (rot gepunktet) überlagert. **B** Coomassie-gefärbter SDS-PAGE der *reversed-phase* HPLC-Fractionen von gefalteten EPFL9, wobei sich eine Fraktion über eine Retentionszeit von 3 min erstreckt. Es wurden 5  $\mu$ l Probe mit SDS-Probenpuffer versetzt und aufgetragen. M= PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo-Fischer Scientific, Oberhausen).

Für alle drei aufgeführten Maxima zeigen sich Banden im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE mit apparentem Molekulargewicht um 10 kDa. Auch hier können Mischpopulationen nicht ausgeschlossen werden. Zusätzlich zeigen sich bei Retentionszeiten über 40 min schwache höhermolekulare Banden, welche nicht weiterverwertet wurden. Die Fraktionen mit den SDS-PAGE Banden um 10 kDa konnten massenspektrometrisch EPFL9 zugeordnet werden und wurden für spätere Versuche eingesetzt.



**Abbildung 16:** A Coomassie gefärbter SDS-PAGE der *reversed-phase* HPLC-Fractionen von gefalteten EPFL2C>S, wobei sich eine Fraktion über eine Retentionszeit von 5 min erstreckt. Es wurden 5  $\mu$ l Probe mit SDS-Probenpuffer versetzt und aufgetragen. M= PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo-Fischer Scientific, Oberhausen). B *reversed-phase* HPLC Chromatogramm mit Absorptionskurve bei 220 nm und Retentionszeiten von 5 bis 55 min. Es wurden die Chromatogramme von aufgetragenem EPFL2 C>S vor der Rückfaltung (schwarz) und nach der Rückfaltung (rot gepunktet) überlagert.

Für EPFL2C>S sind im Chromatogramm zwei ineinanderlaufende Maxima zu beobachten. Diese beginnen ab Minute 26 und verlaufen bis Minute 39. Das größere der beiden trägt eine ausgeprägte Schulter. Im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE zeigt der erste eine prominente Bande um 13 kDa und eine schwächere um 11 kDa. Das zweite Maximum zeigt nur die Bande bei 13 kDa. Diese konnte massenspektrometrisch als EPFL2C>S identifiziert (Daten nicht aufgeführt) werden und wurde weiterverwertet. Ein intensives Maximum steigt ab Minute 46 an und zeigt im SDS-PAGE eine Doppelbande um 24 kDa.

Es ergaben sich folgende Mengenausbeuten für die Peptide als Feststoff: EPFL9 2,3 mg, EPFL2 2,2 mg und EPFL2C>S 3,14 mg.

### 3.2.1 CD-Spektroskopie

Zur Untersuchung auf erfolgreiche Rückfaltung wurden Peptidlösungen mit einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  eingesetzt und in einem Wellenlängenbereich zwischen 200 und 260 nm gemessen. Bei der CD-Spektroskopie, also der Messung des Circular dichroismus, wird die Absorption polarisierten Lichtes eines definierten Wellenlängenspektrums an chiralen Chromophoren gemessen. Für Proteinlösungen wird dies im Bereich des fernen UV-Spektrums gemessen, in dem die Carbonylbindung der Peptide das dominante chirale Chromophor darstellt. Durch spezifische Absorptionseigenschaften strukturierter Bereiche, lassen diese Absorptionsspektren Rückschlüsse auf die Verteilung von Sekundärstrukturelementen zu. Die Peptide nach der Rückfaltung zeigen einen ähnlichen Kurvenverlauf im CD-Spektrum. Alle analysierten Peptide weisen einen Kurvenverlauf auf, in dem sich mehrere Strukturelemente überlagern. Der für unstrukturierte Bereiche charakteristische Wendepunkt bei 230 nm zeigte sich nicht klar, wobei dieser bei EPFL9 noch am deutlichsten hervortritt. Das Doppelminimum bei 222 nm und 208 nm, das  $\alpha$ -Helices kennzeichnet, zeichnet sich bei EPFL2 und EPFL2C>S schwach ab, verliert sich aber in einem starken Abfall des Kurvenverlaufes nach 218 nm.

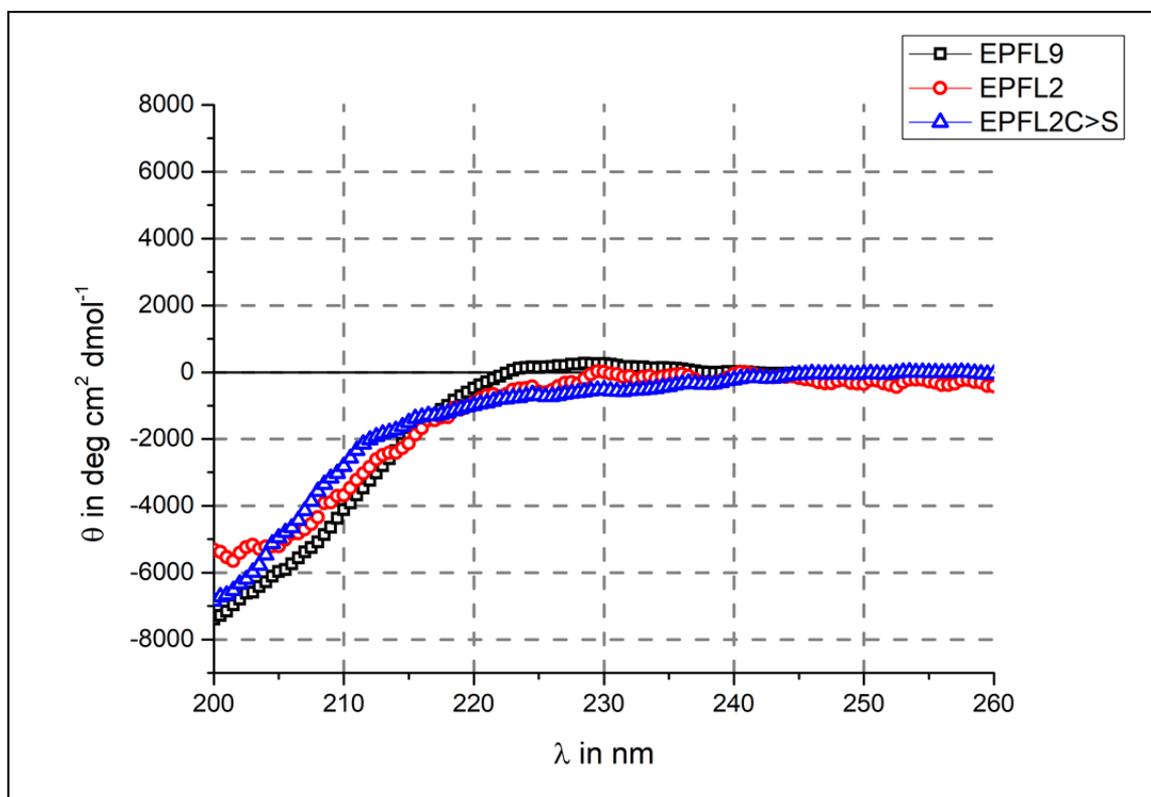


Abbildung 17: CD-Spektrum von EPFL9 (schwarz), EPFL2 (rot) und EPFL2C>S (blau)

Dieser Abfall nach 218 nm ist ein Indikator für antiparallele  $\beta$ -Faltblätter und ist bei allen drei Peptiden zu verzeichnen. Die mit den zwei CDPro-Algorithmen berechneten Werte spiegeln dies wider. In den gemessenen Peptidlösungen zeigen sich  $\beta$ -Stränge und  $\beta$ -Schleifen als dominante Sekundärstrukturanteile und es liegen zwischen 30 und 40% unstrukturierte Bereiche vor. Die Vorhersage der Sekundärstrukturanteile mit dem SOPMA-Algorithmus deckt sich mit diesen Messungen größtenteils. Hauptunterschied zwischen den, von Messungen abgeleiteten, Werten und der Vorhersage ist ein höherer Anteil unstrukturierter Bereiche in den Vorhersagewerten. Für EPFL9, konnten anhand der NMR-Struktur (2LIY) die Sekundärstrukturanteile aus der PDB (*protein database*) extrahiert werden. Sie zeigen gute Übereinstimmung mit den gemessenen Werten.

Für die Peptide nach TCEP-Behandlung (ein Reduktionsmittel zur reduktiven Spaltung der Disulfidbrücken) divergieren die Kurvenverläufe stark (Abbildung 18). Die Cysteindeletionsmutante, EPFL2C>S zeigt keine starke Abweichung vom Kurvenverlauf vor TCEP-Behandlung. Auch die errechneten Werte in Tabelle 4 zeigen kaum Abweichungen zueinander. Bei EPFL9 gehen nahezu alle charakteristischen Wendepunkte in eine leicht abfallende Kurve über. Unter 240 nm liegt diese unterhalb der Nulllinie.

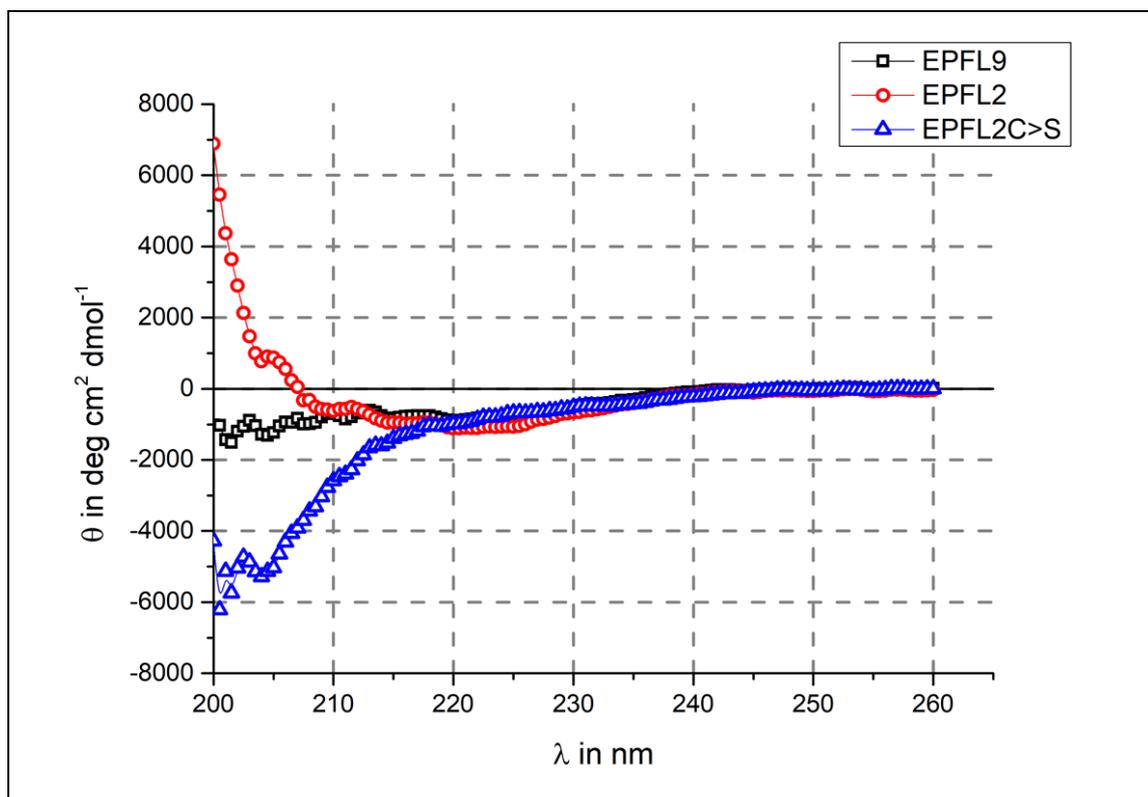


Abbildung 18: CD-Spektrum von EPFL9 (schwarz), EPFL2 (rot) und EPFL2C>S (blau) nach TCEP-Zugabe

Ein solches Abflachen der Kurve kann bei der Denaturierung durch Disulfidbrückenspaltung einiger Proteine beobachtet werden (Abaskharon und Gai 2016), wenn auch der Kurvenverlauf kein charakteristischer für *random-coils* ist. Ein schwaches, aber spezifisches, Charakteristikum von Disulfidbrücken im CD-Spektrum stellt ein Wendepunkt, im Kurvenverlauf knapp oberhalb der Nulllinie bei 235 nm, dar (Pierce et al. 1976) Dieser ist hier nicht zu sehen, konnte aber vor der Reduktionsmittelbehandlung gemessen werden. Die Werte aus der CDPro-Berechnung zeigten jedoch kaum Abweichungen. Der CDSSTR-Algorithmus konnte jedoch keine Werte liefern, da im Trainingsset keine Übereinstimmung mit den gemessenen Werten oberhalb der Ausschlussgrenze gefunden wurde. EPFL2 zeigt nach TCEP-Behandlung die drastischste Veränderung im CD-Spektrum. Der Kurvenverlauf zeigt Minima zwischen 225 nm und 210 nm, einen Schnitt der Nulllinie bei 205 nm gefolgt von einem hohen Maximum. Auch hier ist der kleine Wendepunkt bei 235 nm nicht mehr zu detektieren. Die errechneten Anteile an Sekundärstruktur verschieben sich zugunsten helikaler und  $\beta$ -Strang-geprägter Strukturen, wobei der Anteil an *random-coil* sinkt. Für die Messung im reduzierenden und nicht reduzierenden Milieu ergeben sich niedrigere Werte für den Anteil unstrukturierten Peptids, als die Vorhersage anhand der Primärstruktur angibt.

Tabelle 4: Prozentualer Anteil an Sekundärstrukturelementen der CD-Spektren.

		$\alpha$ -Helix	$\beta$ -Strang	$\beta$ -Schleife	unstrukturiert
<b>EPFL2C&gt;S</b>	CDSSTR	5	28,6	14,8	50,9
	CONTINLL	3,7	35,9	14,6	45,8
	SOPMA	0	21	5,26	73,68
<b>EPFL2C&gt;S red.</b>	CDSSTR	3,1	35,6	20,5	39,5
	CONTINLL	3,5	31,5	14	51,1
	SOPMA	0	21	5,26	73,68
<b>EPFL9</b>	CDSSTR	3,5	34	17	45,3
	CONTINLL	3,4	33	18,4	45,2
	SOPMA	2,2	20	13,3	64,4
	PDB	8	35	0	57
<b>EPFL9 red.</b>	CDSSTR	-	-	-	-
	CONTINLL	3	35,1	11,6	45,2
	SOPMA	2,2	20	13,3	64,4
	PDB	8	35	0	57
<b>EPFL2</b>	CDSSTR	2,5	30,3	20	45,7
	CONTINLL	3,8	37,9	12,7	41,8
	SOPMA	0	22,37	6,58	71,05
<b>EPFL2 red.</b>	CDSSTR	4,5	36,8	23,7	33,2
	CONTINLL	4,6	47,3	17,4	30,7
	SOPMA	0	22,37	6,58	71,05

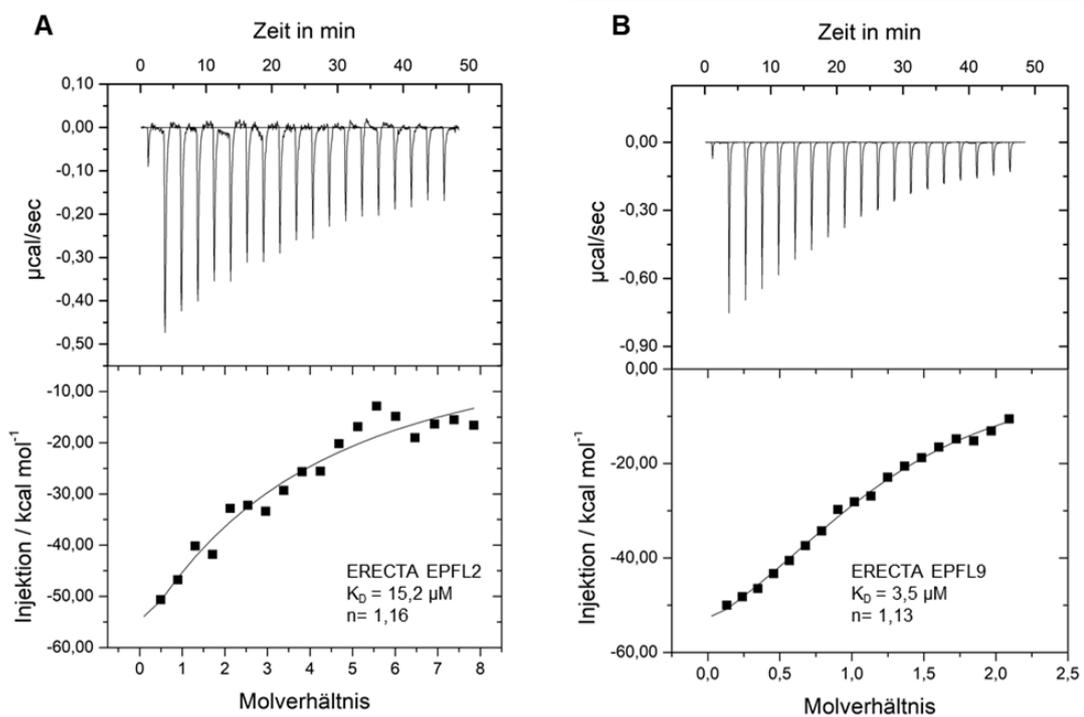
### 3.3 Isothermale Titrationskalorimetrie

Zur Bestimmung der Affinität der untersuchten Peptide zu den jeweiligen LRR-Domänen der putativen Rezeptoren wurden isothermale Titrationskalorimetriemessungen (ITC) durchgeführt. In einem solchen Versuchsaufbau wird eine Zelle mit definiertem Volumen (280  $\mu\text{l}$ ) mit Proteinlösung (50  $\mu\text{M}$ ) befüllt. Mit einer Injektionskanüle (40  $\mu\text{l}$ ) werden Einzelinjektionen, zu je 2  $\mu\text{l}$ , des Liganden (500  $\mu\text{M}$ , sofern nicht anders angegeben) unter Rühren in die Suspension vorgenommen. Eine zweite Zelle, die Referenzzelle, ist mit einer Flüssigkeit befüllt, welche eine vergleichbare Wärmekapazität zum Puffer mit Proteinlösung besitzt ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Die Zellen werden kontinuierlich auf der gleichen Temperatur (25°C) gehalten. Die Temperaturänderung in der Messzelle nach jeder Injektion wird über die nötige Zufuhr elektrischen Stroms zum Erreichen der Isothermie bestimmt. Das Integral dieser Energie, über den Zeitraum bis der Zustand vor Injektion wieder erreicht ist, zeigt an wieviel  $\text{kJ mol}^{-1}$  Injektion $^{-1}$  freigesetzt werden, bzw. benötigt werden. Mit zunehmender Ligandenkonzentration in der Messzelle findet eine Veränderung der Amplitude der Temperaturänderung  $\text{s}^{-1}$  statt. Über nicht-lineare Regression wird ermittelt mit welcher Funktion sich die Messpunkte am besten beschreiben lassen. Anhand dieser Funktion können Rückschlüsse über Bindungsparameter wie  $K_A$  (Bindungskonstante) bzw. dessen Reziprok der  $K_D$  (Dissoziationskonstante) gezogen werden. Für Protein-Protein-Interaktionen sind  $K_D$ -Werte vom femtomolaren Bereich (Wallis et al. 1995) bis hin zum dreistelligen mikromolaren Bereich möglich (Pornillos et al. 2002). Der Median aller  $K_D$ -Werte für wildtypische Protein-Protein-Interaktionen in der SKEMPI-Datenbank (die umfangreichste Datenbank für von Protein-Protein-Interaktionen, [https://life.bsc.es/pid/mutation\\_database/database.html](https://life.bsc.es/pid/mutation_database/database.html)) liegt um  $10^{-10}$  M. Peptid-LRR-Interaktion wurden bisher mit  $K_D$ -Werten von 0,8 bis 100  $\mu\text{M}$  gemessen (Santiago et al. 2016; Lin et al. 2017). Es kann zudem eine Einschätzung der Stöchiometrie vorgenommen werden. Als weitere Parameter zur Evaluation der Protein-Peptid-Bindung werden  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  und somit auch  $\Delta G$  errechnet. Je negativer der  $\Delta G$ -Wert, desto stabiler ist die Protein-Protein-Interaktion, bzw. desto höher ist die Affinität der Interaktionspartner zu einander. Am Vorzeichen des  $\Delta H$ -Wertes ( $\Delta H$  in  $\text{kJ s}^{-1}$ ), also der Enthalpieänderung, lässt sich ablesen, ob eine exotherme Reaktion (negative Enthalpieänderung) oder endotherme Reaktion (positive Enthalpieänderung) vorliegt. Eine negative Enthalpieänderung ist ein Indiz dafür, dass energetisch stabilere, nichtkovalente, intermolekulare Bindungen auftreten. Es bleibt jedoch zu beachten, dass diese Enthalpieänderung die des gesamten Systems darstellt und nicht nur der Peptid-Protein-Interaktion. So sind, in aller Regel, in der Enthalpieänderung auch Aufbau und Auflösung von nichtkovalenten Bindungen mit dem Lösungsmittel und dem Peptid bzw. Protein und dem Lösungsmittel und der Bindungsfläche von Ligand und Rezeptor eingeschlossen.

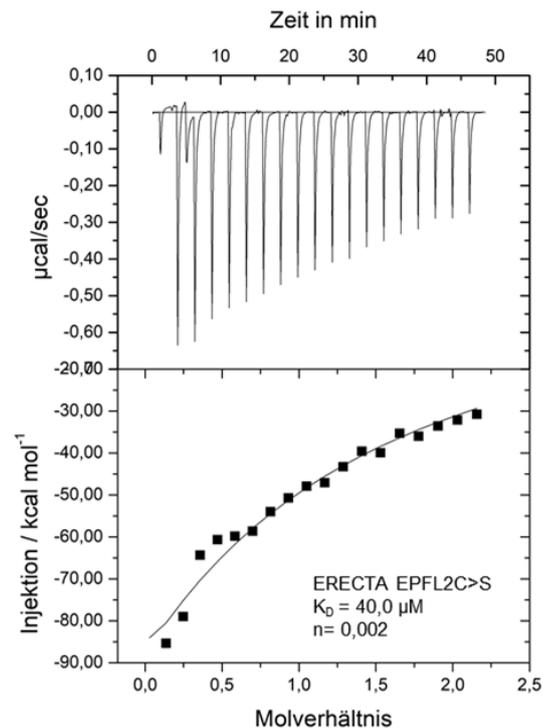
### 3.3.1 Dissoziationskonstanten zu ERECTA<sup>LRR</sup>

Im ITC-Experiment mit der ERECTA<sup>LRR</sup>-Domäne zeigen sich für alle Peptide, auch die Cysteinsubstitutionsmutante, Bindungskurven. Die höchste Affinität der untersuchten Peptide zeigt EPFL9 zu ERECTA<sup>LRR</sup> mit einem  $K_D$  von  $3,5 \pm 0,4 \mu\text{M}$ . EPFL2 zeigt ebenfalls hohe Affinität zur ERECTA<sup>LRR</sup> mit  $15,2 \pm 3 \mu\text{M}$ . Auch das Peptid, welches keine Disulfidbrücken ausbildet und demzufolge auch nicht bioaktiv ist, zeigte eine Affinität zur Rezeptordomäne von  $40 \pm 19 \mu\text{M}$ . Die abgeleitete Stöchiometrie beläuft sich für EPFL9 und EPFL2 auf Werte nahe 1. Für EPFL2C>S ergibt sich ein extrem niedriger Wert von  $n=0,002$ , also 500 Peptidmoleküle pro Rezeptormolekül. Alle drei Reaktionen zeigen exothermen Charakter.

Die freie Enthalpie  $\Delta G$  beträgt  $-1,41 \text{ kJ mol}^{-1}$  (ERECTA<sup>LRR</sup> EPFL2),  $-2,15 \text{ kcal mol}^{-1}$  (ERECTA<sup>LRR</sup> EPFL2) und  $-34,42 \text{ kcal mol}^{-1}$  für ERECTA<sup>LRR</sup> EPFL2C>S). Dem Wert für die letzte Messung liegt jedoch ein hoher Fehlerwert für  $\Delta H$  inne ( $-5,146 \times 10^7 \pm 6,781 \times 10^{10} \text{ J mol}^{-1}$ ), welcher sich in  $\Delta G$  widerspiegelt.



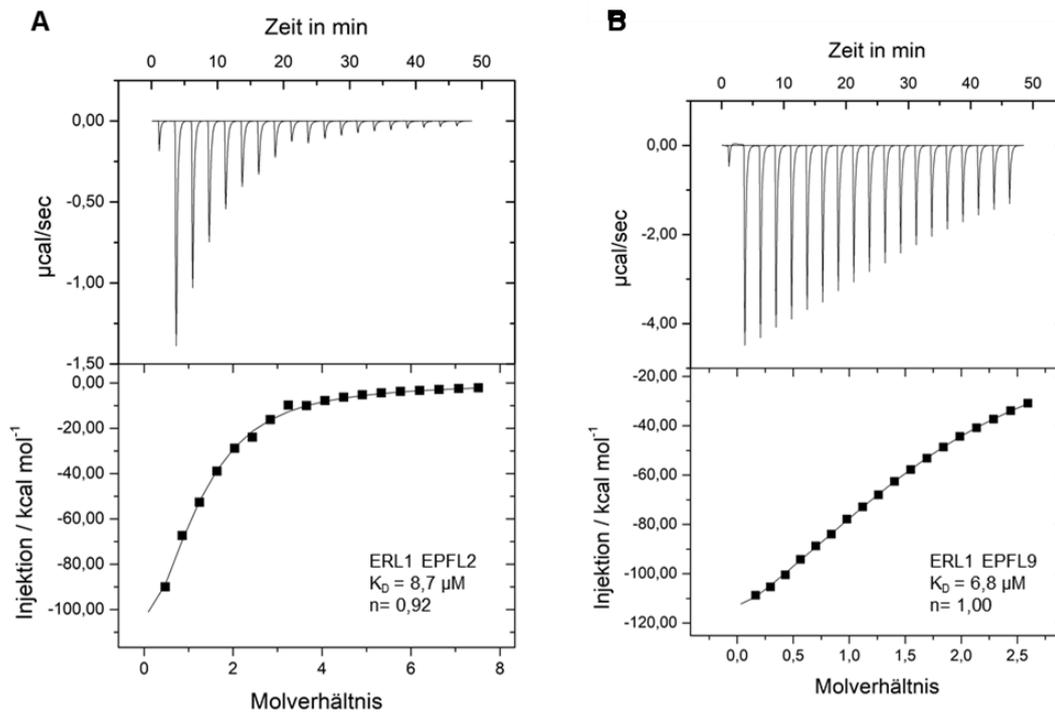
**Abbildung 19:** Thermogramm von ERECTA mit EPFL2 und EPFL9. Das obere Diagramm zeigt die gemessenen Rohdaten in  $\mu\text{cal s}^{-1}$  und das untere die jeweiligen *peak*-Integrale mit angepasster Kurvenfunktion. Der  $K_D$ -Wert und die theoretische Stöchiometrie der jeweiligen Messung sind als Text eingefügt.



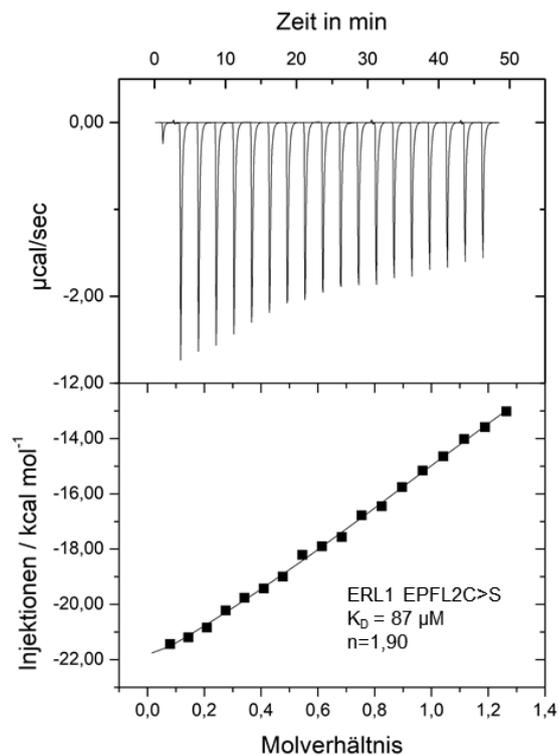
**Abbildung 20:** Thermogramm von ERECTA mit EPFL2C>S. Das obere Diagramm zeigt die gemessenen Rohdaten in  $\mu\text{cal s}^{-1}$  und das untere die jeweiligen *peak*-Integrale mit angepasster Kurvenfunktion. Der  $K_D$ -Wert und die theoretische Stöchiometrie der jeweiligen Messung sind als Text eingefügt.

### 3.3.2 Dissoziationskonstanten zu ERL1<sup>LRR</sup>

ERL1<sup>LRR</sup> zeigt mit  $8,7 \pm 0,6 \mu\text{M}$  im ITC-Experiment eine niedrigere Dissoziationskonstante und somit eine höhere Affinität zu EPFL2 als ERECTA<sup>LRR</sup>. Zu EPFL9 wird eine vergleichbar hohe Affinität gemessen, mit einem  $K_D$ -Wert von  $6,8 \pm 0,04 \text{ mM}$ . Die Bindung zu EPFL2C>S zeigt einen zehnfach höheren  $K_D$ -Wert als die zu EPFL2. EPFL9 und EPFL2 zeigen ein stöchiometrisches Verhältnis von ca. 1:1 und EPFL2C>S von ca. 1:2 (Rezeptormolekül : Ligand). Zur Bindung von EPFL9 an ERL1<sup>LRR</sup> liegen Vergleichsdaten vor, welche einen  $K_D$ -Wert von  $40 \mu\text{M}$  bei einer Stöchiometrie von  $n=0,78$  zeigen (Lin et al. 2017). Die hier gemessene Affinität ist ca. fünffach höher. Die  $\Delta G$ -Werte betragen  $-1,54 \text{ kJ mol}^{-1}$ ,  $-1,86 \text{ kJ mol}^{-1}$  und  $-1,35 \text{ kJ mol}^{-1}$  (EPFL2, EPFL9 und EPFL2C>S). Alle Reaktionen zeigen exothermen Charakter.



**Abbildung 21:** Thermogramm von ERL1 mit EPFL2 und EPFL9. Das obere Diagramm zeigt die gemessenen Rohdaten in  $\mu\text{cal s}^{-1}$  und das untere die jeweiligen *peak*-Integrale mit angepasster Kurvenfunktion. Der  $K_D$ -Wert und die theoretische Stöchiometrie der jeweiligen Messung sind als Text eingefügt.

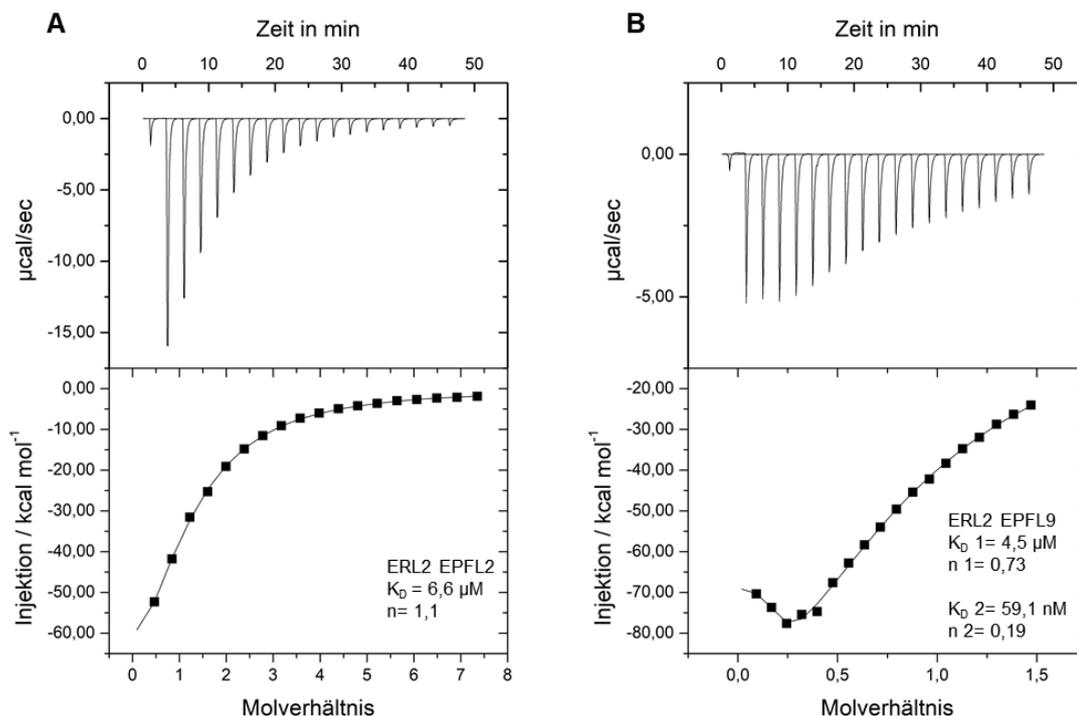


**Abbildung 22:** Thermogramm von ERL1 mit EPFL2C>S. Das obere Diagramm zeigt die gemessenen Rohdaten in  $\mu\text{cal s}^{-1}$  und das untere die jeweiligen *peak*-Integrale mit angepasster Kurvenfunktion. Der  $K_D$ -Wert und die theoretische Stöchiometrie der jeweiligen Messung sind als Text eingefügt.

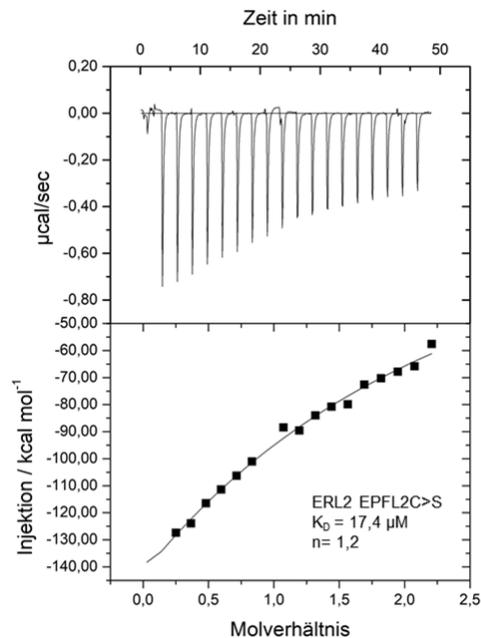
### 3.3.3 Dissoziationskonstanten zu ERL2<sup>LRR</sup>

ERL2 zeigt eine vergleichbare Affinität zu EPFL2 wie ERL1 und liegt auch in einer Stöchiometrie von 1:1 mit dem Liganden vor. Bei der Bindung von EPFL9 zeigt sich eine bimodale Bindungskurve. Eines der beiden Bindungsereignisse weist einen sehr niedrigen  $K_D$ -Wert, von  $59,1 \pm 6$  nM mit einer Stöchiometrie von  $n=0,2$  auf. Das zweite Bindungsereignis ist am vergleichbarsten mit bisher gemessenen Werten für EPFL9. Es handelt sich um  $4,5 \pm 0,3$   $\mu$ M mit einer Stöchiometrie von  $n=0,73$ . Ob es sich um eine Bindung mit zwei unterschiedlichen Bindungsereignissen handelt oder um ein Artefakt, etwa durch Kontaminanten aus der Proteinpräparation von ERL2<sup>LRR</sup> kann schwerlich unterschieden werden. Die Bindung zur Cysteinsubstitutionsmutante zeigt eine deutlich höhere Dissoziationskonstante als zu EPFL2, unter den bisher betrachteten Ektodomänen zeigt es jedoch den niedrigsten  $K_D$ -Wert. Auch in diesen drei Fällen liegen exotherme Reaktionsabläufe vor.

Die  $\Delta G$ -Werte betragen  $-1,53$   $\text{kJ mol}^{-1}$ ,  $-0,62$   $\text{kJ mol}^{-1}$  (Reaktionsschritt 1 mit  $K_D=59,1$  nM),  $-0,44$   $\text{kJ mol}^{-1}$  (Reaktionsschritt 2 mit  $K_D=4,5$   $\mu$ M) und  $-1,93$   $\text{kcal mol}^{-1}$  (EPFL2, EPFL9 Reaktionsschritt 1 und 2 und EPFL2C>S).



**Abbildung 23:** Thermogramm von ERL2 mit EPFL2 und EPFL9. Das obere Diagramm zeigt die gemessenen Rohdaten in  $\mu\text{cal s}^{-1}$  und das untere die jeweiligen *peak*-Integrale mit angepasster Kurvenfunktion. Der  $K_D$ -Wert und die theoretische Stöchiometrie der jeweiligen Messung sind als Text eingefügt.

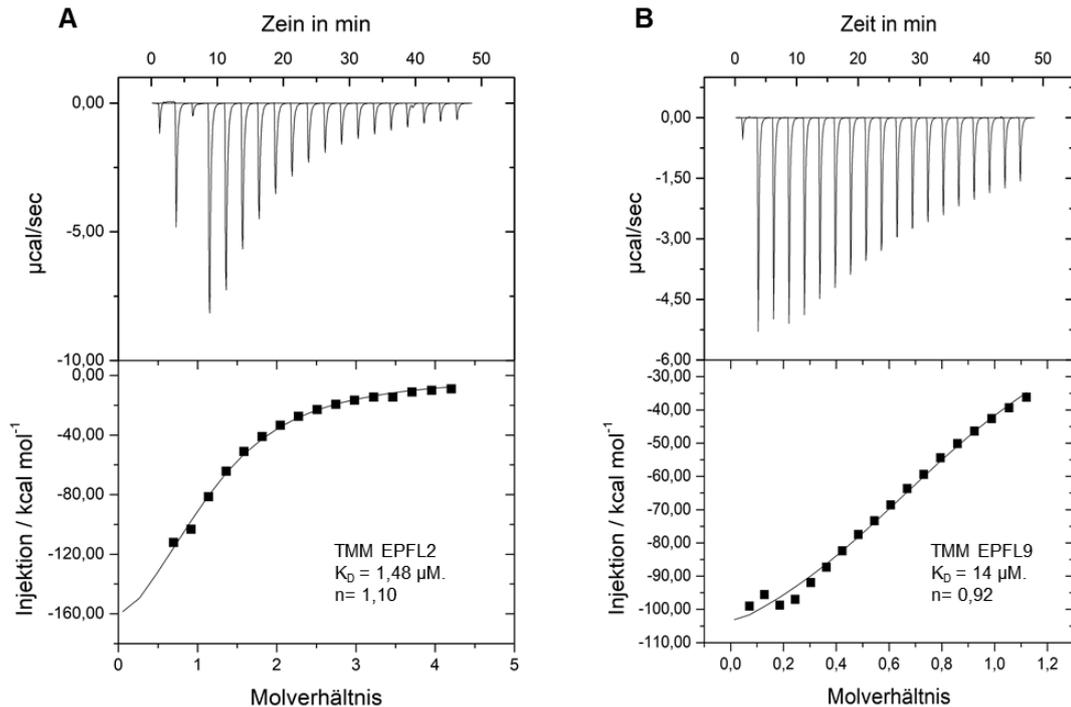


**Abbildung 24:** Thermogramm von ERL2 mit EPFL2C>S. Das obere Diagramm zeigt die gemessenen Rohdaten in  $\mu\text{cal s}^{-1}$  und das untere die jeweiligen *peak*-Integrale mit angepasster Kurvenfunktion. Der  $K_D$ -Wert und die theoretische Stöchiometrie der jeweiligen Messung sind als Text eingefügt.

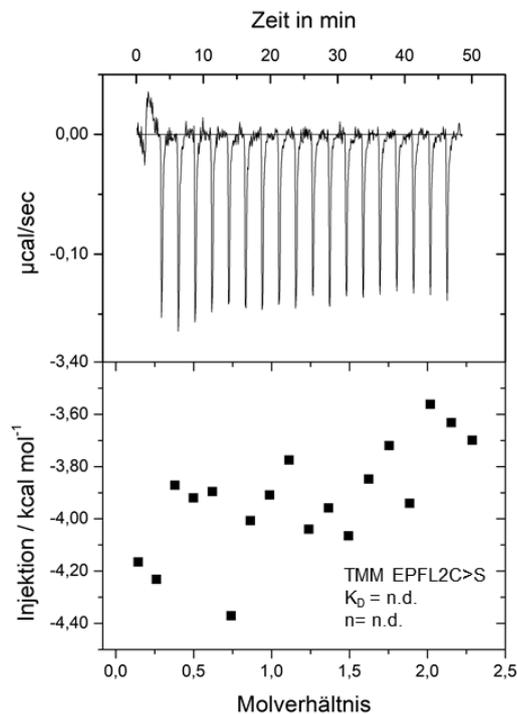
### 3.3.4 Dissoziationskonstanten zu $\text{TMM}^{\text{LRR}}$

$\text{TMM}^{\text{LRR}}$  der Korezeptor zu ERECTA, ERL1 und ERL2, nötig für die Komplexierung von EPF1 und EPF2, zeigt die höchste Affinität und damit die niedrigste Dissoziationskonstante zu EPFL2 mit  $1,48 \pm 0,2 \mu\text{M}$ . Die Stöchiometrie zeigt auch hier einen Wert nahe 1. Im Fall von EPFL9 liegt eine Dissoziationskonstante von  $14 \pm 1,8 \mu\text{M}$  vor mit einer Stöchiometrie von 1:1. Die Interaktion von EPFL9 und  $\text{TMM}^{\text{LRR}}$  ist bereits anhand von Kristallstrukturdaten belegt, jedoch konnte bisher keine kinetische Analyse vorgenommen werden, da die Expression von  $\text{TMM}^{\text{LRR}}$  ohne ERF-Protein nicht realisiert werden konnte (Lin et al. 2017). Die Affinität zu EPFL2C>S kann nicht bestimmt werden, da das Thermogramm der Messung keine konzentrationsabhängige Signalvariation zeigt, was auf nicht interagierende Komponenten schließen lässt. Wieder handelte es sich um rein exotherme Reaktionen.

Die  $\Delta G$ -Werte betragen  $-1,58 \text{ kJ mol}^{-1}$  und  $-2,35 \text{ kJ mol}^{-1}$  (EPFL2 und EPFL2C>S).



**Abbildung 25:** Thermogramm von TMM mit EPFL2 und EPFL9. Das obere Diagramm zeigt die gemessenen Rohdaten in  $\mu\text{cal s}^{-1}$  und das untere die jeweiligen *peak*-Integrale mit angepasster Kurvenfunktion. Der  $K_D$ -Wert und die theoretische Stöchiometrie der jeweiligen Messung sind als Text eingefügt.

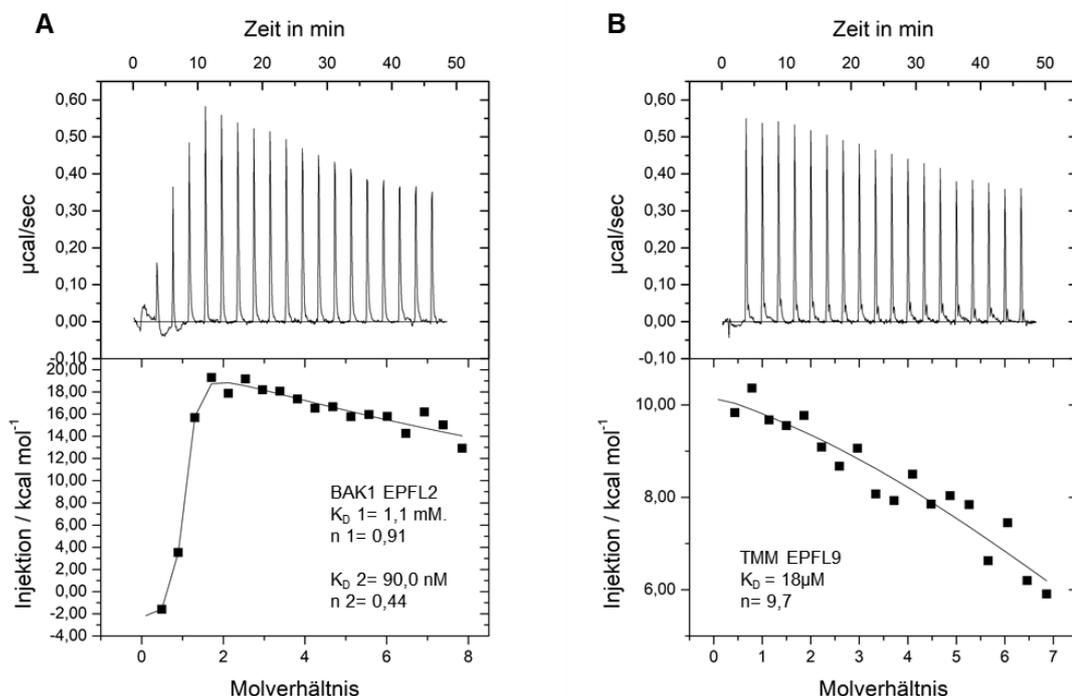


**Abbildung 26:** Thermogramm von TMM mit EPFL2C>S. Das obere Diagramm zeigt die gemessenen Rohdaten in  $\mu\text{cal s}^{-1}$  und das untere die jeweiligen *peak*-Integrale mit angepasster Kurvenfunktion. Der  $K_D$ -Wert und die theoretische Stöchiometrie der jeweiligen Messung sind als Text eingefügt.

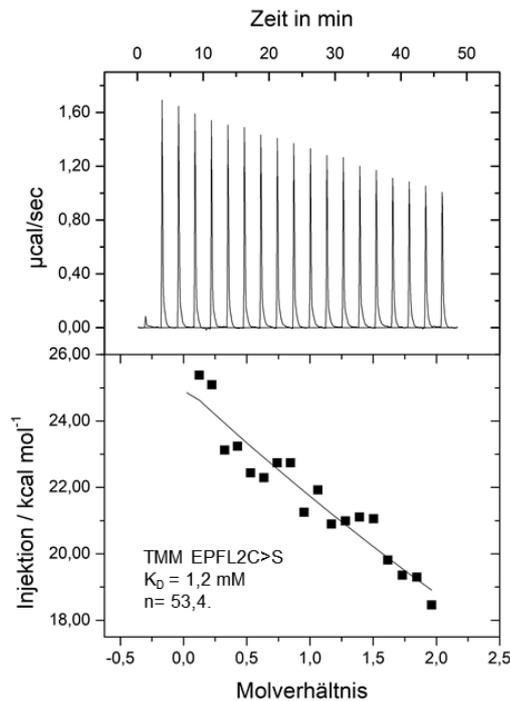
### 3.3.5 Dissoziationskonstanten zu BAK1<sup>LRR</sup>

BAK1 wurde bisher noch nicht im Kontext mit Peptiden der EPF/EPFL Peptide untersucht. Die ITC-Daten zeigen deutlich andere Werte, im Vergleich zu den bereits analysierten Proteininteraktoren. In allen Messungen mit BAK1 werden endotherme Signale des Gesamtsystems beobachtet, bisher zeigten die in dieser Arbeit und der vorliegenden Literatur (Lin et al. 2017; Santiago et al. 2016) vermessenen Peptid-Rezeptorinteraktionen exotherme Abläufe. Die Bindungskurve EPFL2-BAK1<sup>LRR</sup> stellt sich als Zwei-Bindestellen-Kurve dar. Die erste weist eine Stöchiometrie von ca. 1:2 (Rezeptor zu Peptid) auf und zeigt einen  $K_D$ -Wert von  $90 \pm 32$  nM. Die zweite zeigt eine deutlich niedrigere Affinität von 1 mM bzw. eine Dissoziationskonstante von  $1,1 \pm 2$  mM und ein Molverhältnis 1:0,91. Die ebenfalls endotherme Signale liefernde Messung mit EPFL9 zeigt einen  $K_D$ -Wert von 18  $\mu$ M und ein Verhältnis von 1:9,7. EPFL2C>S zeigt mit  $1,2 \pm 11$  mM den höchsten  $K_D$  aller vorgenommenen Messungen bei  $n=53,4$ .

Die  $\Delta G$ -Werte betragen  $-2,29$  kJ mol<sup>-1</sup> (Reaktion 1 mit  $K_D=90$  nM),  $-0,22$  kJ mol<sup>-1</sup> (Reaktion 2 mit  $K_D=1,1$  mM),  $-1,54$  kJ mol<sup>-1</sup> und  $-0,58$  kJ mol<sup>-1</sup> (EPFL2 Reaktionen 1 und 2, EPFL9 und EPFL2C>S).



**Abbildung 27:** Thermogramm von BAK1 mit EPFL2 und EPFL9. Das obere Diagramm zeigt die gemessenen Rohdaten in  $\mu$ cal s<sup>-1</sup> und das untere die jeweiligen *peak*-Integrale mit angepasster Kurvenfunktion. Der  $K_D$ -Wert und die theoretische Stöchiometrie der jeweiligen Messung sind als Text eingefügt.



**Abbildung 28:** Thermogramm von BAK1 mit EPFL2C>S. Das obere Diagramm zeigt die gemessenen Rohdaten in  $\mu\text{cal s}^{-1}$  und das untere die jeweiligen *peak*-Integrale mit angepasster Kurvenfunktion. Der  $K_D$ -Wert und die theoretische Stöchiometrie der jeweiligen Messung sind als Text eingefügt.

### 3.3.6 Zusammenfassung der thermodynamischen Parameter

$\Delta H$  und  $\Delta S$  sind in allen Messungen, mit Ausnahme von BAK1<sup>LRR</sup> negative Werte und zeigen somit an, dass es sich um exergone Reaktionen handelt, also Reaktionen die bei 25°C bevorzugt in Richtung der Produktbildung ablaufen. Die positiven  $\Delta H$ - und  $\Delta S$ -Werte im Falle der BAK1 Messungen ergeben meist (mit Ausnahme von BAK1<sup>LRR</sup> EPFL9) nur knappe negative  $\Delta G$  Werte und sind nur knapp exergon.

Im gesamt Überblick (Tabelle 5) wird ersichtlich, dass ERL2 die höchste Affinität zu EPFL9 zeigt, aber alle drei Rezeptoren (ERECTA, ERL1 und ERL2) in der gleichen Größenordnung liegen. Die höchste Affinität zu EPFL2 weist TMM auf, vernachlässigt man das bimodale Bindungsereignis von BAK1. Von den Hauptrezeptoren zeigt ERL2 die niedrigste Dissoziationskonstante gepaart mit den niedrigsten  $\Delta G$ -Werten. Die Bindung von EPFL2C>S zeigt im besten Falle (wiederum ERL2) zweistellige  $\mu\text{M}$  Werte, bis hin zu mM Werten. Zudem zeigen sich erratische Sprünge in der Stöchiometrie von Rezeptor zu Rezeptor, nur knapp Produktbegünstigende thermodynamische Bedingungen und endotherme Reaktionsverläufe.

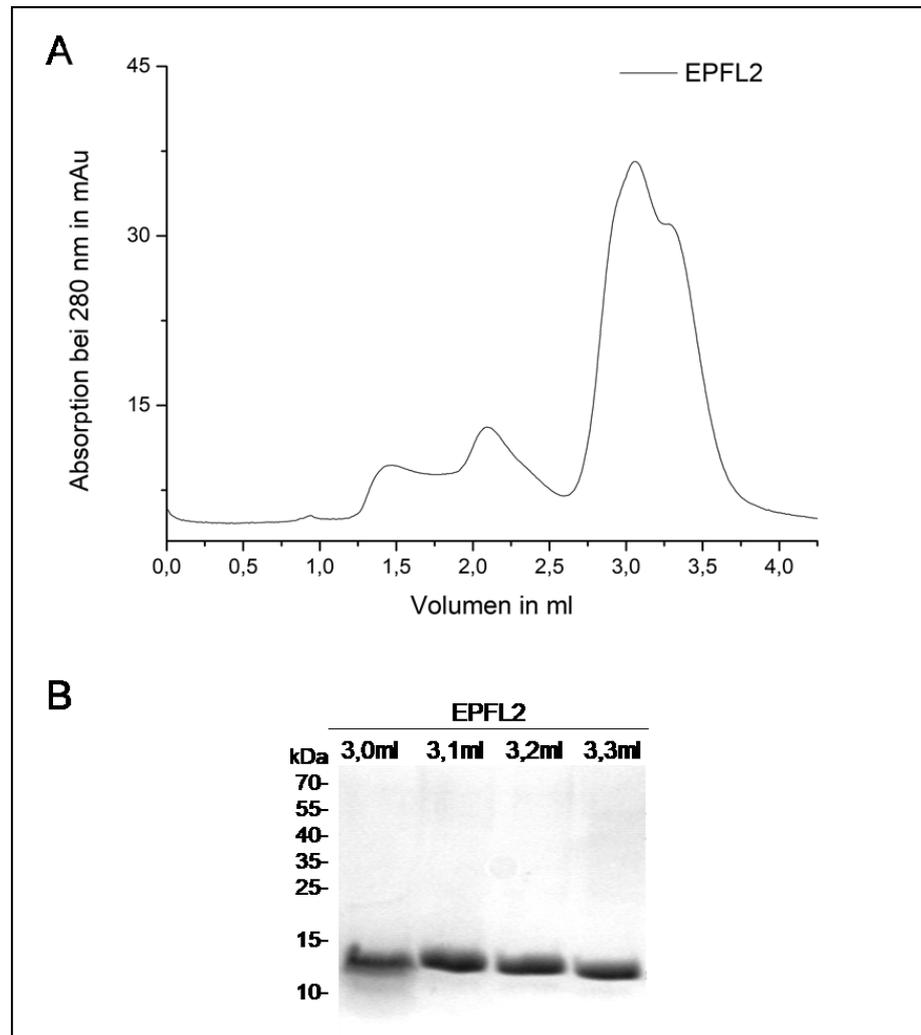
**Tabelle 5:** Dissoziationskonstanten der Peptidliganden zu den betrachteten Ektodomänen.

	<b>EPFL9 K<sub>D</sub></b>	<b>EPFL9 ΔG</b>	<b>Stöchiometrie</b>
ERECTA <sup>LRR</sup>	3,5 ± 0,4 μM	-2,15 kJ mol <sup>-1</sup>	1,13 ± 0,08
ERL1 <sup>LRR</sup>	6,8 ± 0,04 μM	-1,85 kJ mol <sup>-1</sup>	1,01 ± 0,006
ERL2 <sup>LRR</sup>	59,1 ± 6 nM / 4,5 ± 0,3 μM	-2,59 / -1,86 kJ mol <sup>-1</sup>	0,19 ± 0,02 / 0,73 ± 0,08
TMM <sup>LRR</sup>	14,0 ± 1,8 μM	-1,58 kJ mol <sup>-1</sup>	0,92 ± 0,02
BAK1 <sup>LRR</sup>	18 ± 11 μM	-1,59 kJ mol <sup>-1</sup>	9,70 ± 1,4
	<b>EPFL2 K<sub>D</sub></b>	<b>EPFL2 ΔG</b>	<b>Stöchiometrie</b>
ERECTA <sup>LRR</sup>	15,2 ± 3 μM	-1,41 kJ mol <sup>-1</sup>	1,16 ± 0,2
ERL1 <sup>LRR</sup>	8,7 ± 0,6 μM	-1,54 kJ mol <sup>-1</sup>	0,92 ± 0,05
ERL2 <sup>LRR</sup>	6,6 ± 0,03 μM	-1,95 kJ mol <sup>-1</sup>	1,10 ± 0,003
TMM <sup>LRR</sup>	1,48 ± 0,2 μM	-2,34 kJ mol <sup>-1</sup>	1,10 ± 0,09
BAK1 <sup>LRR</sup>	90,0 ± 32 nM / 1,1 ± 2 mM	-2,29 / -0,22 kJ mol <sup>-1</sup>	0,44 ± 0,03 / 0,91 ± 20
	<b>EPFL2C&gt;S K<sub>D</sub></b>	<b>EPFL2C&gt;S ΔG</b>	<b>Stöchiometrie</b>
ERECTA <sup>LRR</sup>	40,0 ± 19 μM	-34,42 kJ mol <sup>-1</sup>	0,002 ± 3
ERL1 <sup>LRR</sup>	87,0 ± 12 μM	-1,35 kJ mol <sup>-1</sup>	1,90 ± 2,8
ERL2 <sup>LRR</sup>	17,4 ± 7 μM	-1,93 kJ mol <sup>-1</sup>	1,20 ± 1,05
TMM <sup>LRR</sup>	n.d.	n.d.	n.d.
BAK1 <sup>LRR</sup>	1,2 ± 11 mM	-0,57 kJ mol <sup>-1</sup>	53,4 ± 138

### 3.4 Größenausschlusschromatographie

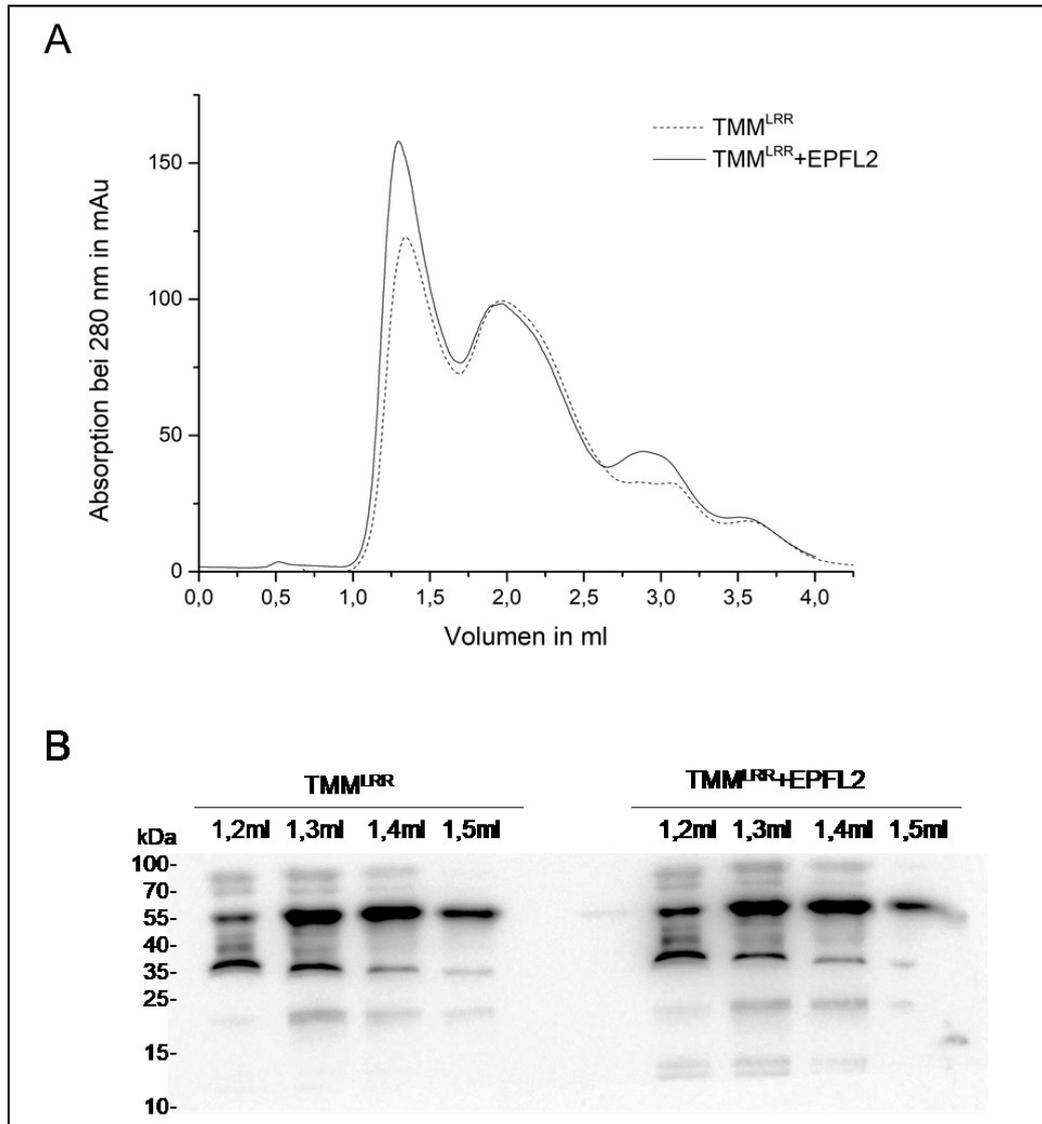
Bei der Größenausschlusschromatographie werden die zu untersuchenden Proteinlösungen auf eine Säule mit einer porösen stationären Phase (in diesem Fall Sephadex<sup>®</sup>) appliziert. Moleküle mit einem größeren hydrodynamischen Volumen interagieren in geringerem Maße mit der stationären Phase und eluieren demzufolge zuerst. Im späteren Verlauf eluieren Moleküle mit kleinerem hydrodynamischem Volumen. Somit findet eine Auftrennung korrelierend mit dem Molekulargewicht statt. Alle hier betrachteten Proteine zeigen sich in der Größenausschlusschromatographie polydispers. Es zeigen sich mehrere prägnante Absorptionsmaxima. In allen Fällen stellt das Maximum mit der höchsten Amplitude die Fraktionen dar, welche das Zielprotein enthielt. Dies konnte jeweils mittels Westernblot verifiziert werden. Jeder putative Korezeptor wurde mit und ohne Zugabe von EPFL2 analysiert

sowie nur EPFL2. Neben zwei kleineren Maxima und einer Schulter, eluierte EPFL2 bei 2,75 bis 3,25 ml und konnte immunologisch nachgewiesen werden.



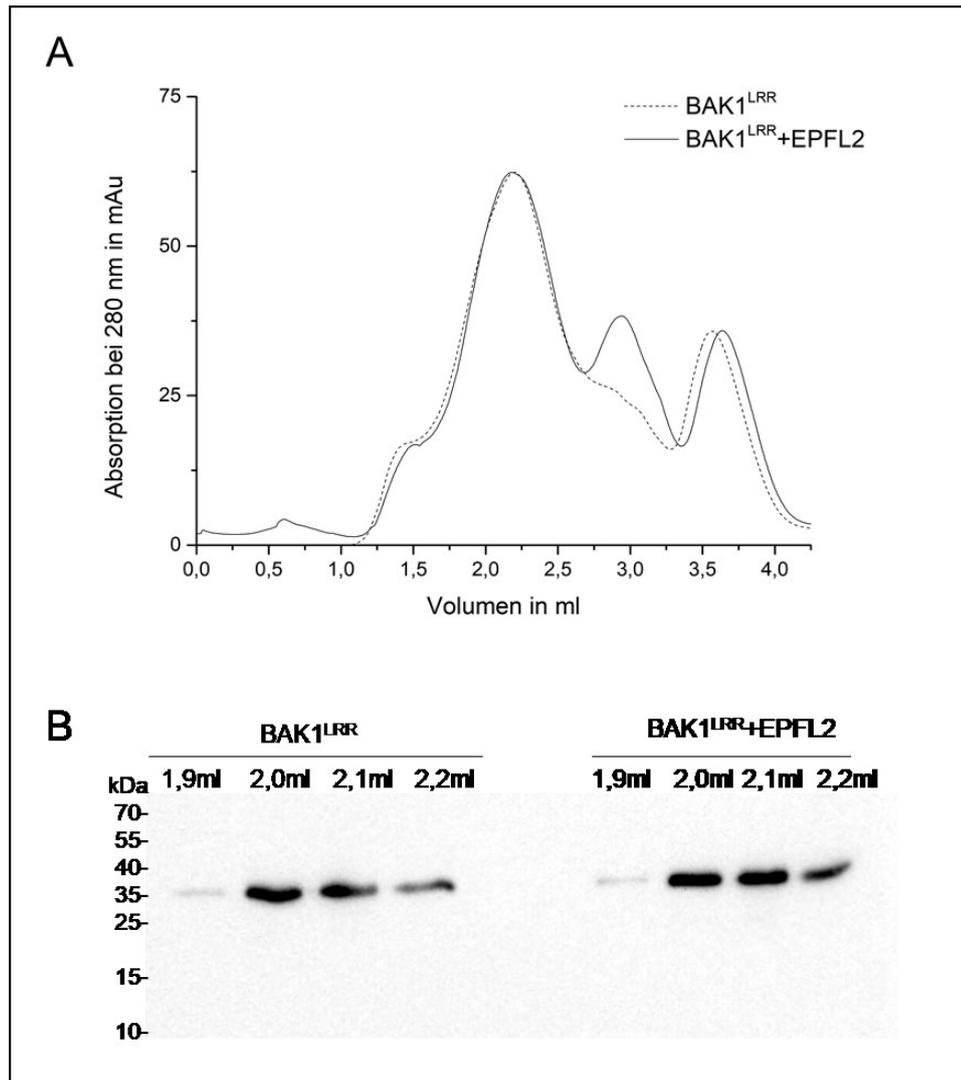
**Abbildung 29:** Elutionsprofil von EPFL2 in der Größenausschlusschromatographie. **A** Chromatogramm mit der Absorption bei 280 nm und dem Elutionsvolumen. **B** Immunologischer polyHistidin-Nachweis nach SDS-PAGE der gekennzeichneten Fraktionen. 100  $\mu$ l Probe wurden mit Aceton gefällt und in 20  $\mu$ l Laemmli-Probenpuffer resuspendiert. Die gesamten 20  $\mu$ l wurden aufgetragen. Die Belichtungszeit betrug 120s.

TMM stellt sich in der Größenausschlusschromatographie ebenfalls polydispers dar. Unter Zugabe von EPFL2 findet sich ein Anstieg des Hauptmaximums, der mit dem schwachen, immunologischen Nachweis von EPFL2 korreliert. Dazu ist ein Maximum bei 2,9 ml sichtbar. Trotz schwachen Signals im Westernblot für EPFL2 liegt ein Anhaltspunkt für die mögliche Bindung von EPFL2 durch BAK1<sup>LRR</sup> vor. Ein Degradationsprodukt als Artefakt kann aber nicht vollständig ausgeschlossen werden. Augenscheinlich sind zudem die immunoreponsiven Signale um 35 kDa. Hier liegen Degradationsprodukte nahe und zeigen eine Instabilität der gereinigten Proteine an. Kritisch ist das niedrige Elutionsvolumen zu betrachten, das mit 1,42 ml einem Molekulargewicht von 530 kDa entspricht, jedoch weit nach dem dem Ausschlussvolumen  $V_0$  liegt.



**Abbildung 30:** Elutions Profil von TMM<sup>LRR</sup> und TMM<sup>LRR</sup> mit EPFL2 in der Größenausschlusschromatographie. **A** Chromatogramm mit der Absorption bei 280 nm und dem Elutionsvolumen. **B** Immunologischer polyHistidin-Nachweis nach SDS-PAGE der gekennzeichneten Fraktionen. 100 µl Probe wurden mit Aceton gefällt und in 20 µl Laemmli-Probenpuffer resuspendiert. Die gesamten 20 µl wurden aufgetragen. Die Belichtungszeit betrug 8s.

BAK1<sup>LRR</sup> zeigt im Vergleich zu BAK1<sup>LRR</sup>+EPFL2 kein signifikant anderes Bild. Zwar zeigt sich auch hier ein polydisperses Chromatogramm, doch die Zugabe von EPFL2 führt zu keiner Absorptionzunahme des Hauptmaximums. Das Maximum bei einem Elutionsvolumen von 2,9 ml (ungebundenes EPFL2) ist dennoch zu vernehmen. Anhand des Westernblots lässt sich kein mit EPFL2 korrespondierendes Signal ablesen. Ein Signal auf Höhe von ca. 35 kDa, was dem bisher detektierten Signal von BAK1<sup>LRR</sup> entspricht, ist sichtbar. Es zeigt sich kein Signal des putativen Homodimers. Westernblot wie Chromatogramm liefern keine Evidenz für eine Interaktion zwischen BAK1<sup>LRR</sup> und EPFL2.



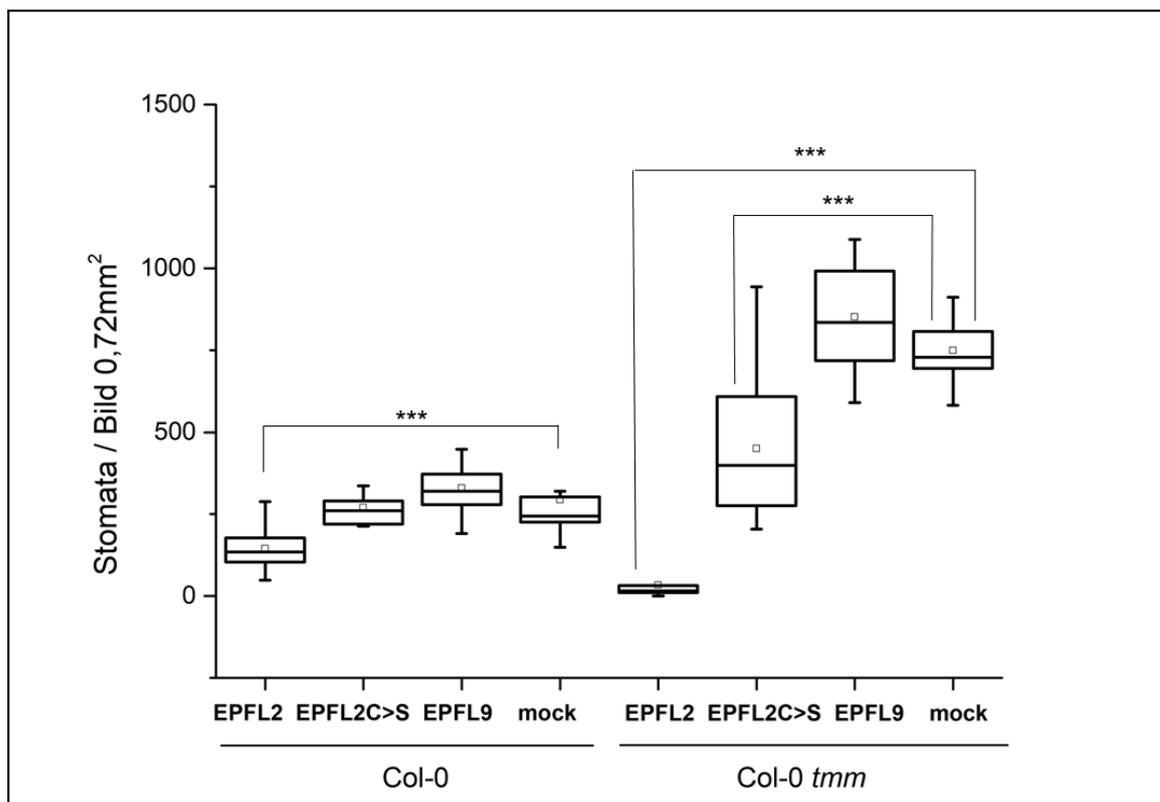
**Abbildung 31:** Elutions Profil von BAK1<sup>LRR</sup> und BAK1<sup>LRR</sup> mit EPFL2 in der Größenausschlusschromatographie. **A** Chromatogramm mit der Absorption bei 280 nm und dem Elutionsvolumen. **B** Immunologischer polyHistidin-Nachweis nach SDS-PAGE der gekennzeichneten Fraktionen. 100 µl Probe wurden mit Aceton gefällt und in 20 µl Laemmli-Probenpuffer resuspendiert. Die gesamten 20 µl wurden aufgetragen. Die Belichtungszeit betrug 60s.

**Tabelle 6:** Elutionsmaxima und apparentes Molekulargewicht nach Größenausschlusschromatographie im Vergleich zum theoretischen Molekulargewicht.

	Elutionsmaximum	Apparentes Molekulargewicht	Theoretisches Molekulargewicht
TMM <sup>LRR</sup>	1,42 ml	530,3 kDa	52,02 kDa
BAK1 <sup>LRR</sup>	2,17 ml	49,8 kDa	23,26 kDa
EPFL2	3,04 ml	5,9 kDa	3,12 kDa

### 3.5 Peptid-Bioassay

Zur Evaluation der rückgefalteten Peptide und ihrer Bioaktivität wurden diese, wie unter 2.6 beschrieben, auf *Arabidopsis* Keimlinge appliziert. Pflanzen der *Arabidopsis*-Linien Columbia-0 und *tmm* im Col-0 Hintergrund wurden, wie ebenfalls unter 2.6 erläutert, mikroskopiert und die Stomataindizes erhoben und statistisch ausgewertet. Einerseits wurde eine Signifikanzanalyse über einen Tukey Test durchgeführt, wobei es sich um eine Varianzanalyse von Gruppenmittelwerten handelt, die verglichen werden und nach Signifikanzniveau unterschieden gewertet werden. Im zweiten Signifikanztest, dem Dunnett-Test, werden die Messmittelwerte mit einer einzigen Kontrolle verglichen (mit dem *mock treatment*, also MES-Puffer ohne Peptid) und auf Signifikanz analysiert. Die vollständigen Signifikanzwerte, ausgedrückt im  $p$ -Wert, sind in Tabelle 7 aufgeführt. In Abbildung 32 finden sich die Signifikanzwerte des Dunnett-Tests graphisch dargestellt.



**Abbildung 32:** Stomataindizes für Col-0 und Col-0 *tmm* nach Peptidbehandlung. Im Whisker-Boxplot dargestellt, der jeweilige Maximalwert (oberer Whisker) und Minimalwert (unterer Whisker). Unausgefüllte Punkte bezeichnen den Median und der mittlere Balken innerhalb der Box den Mittelwert. Hochsignifikante Unterschiede sind mit \*\*\* gekennzeichnet und entsprechen einem  $p$ -Wert von  $<0,001$  im Dunnett-Test.

Im wildtypischen Hintergrund kann anhand der Mittelwerte eine jeweilige Tendenz der Peptidwirkung abgelesen werden. Für EPFL9 zeigen sich mehr Stomata, pro ausgewerteter Flächeneinheit, als in der unbehandelten Kontrolle. Die Analyse auf Signifikanz ergibt hier jedoch keine statistische Signifikanz. Das bereits ausgiebig studierte EPFL9 wurde als

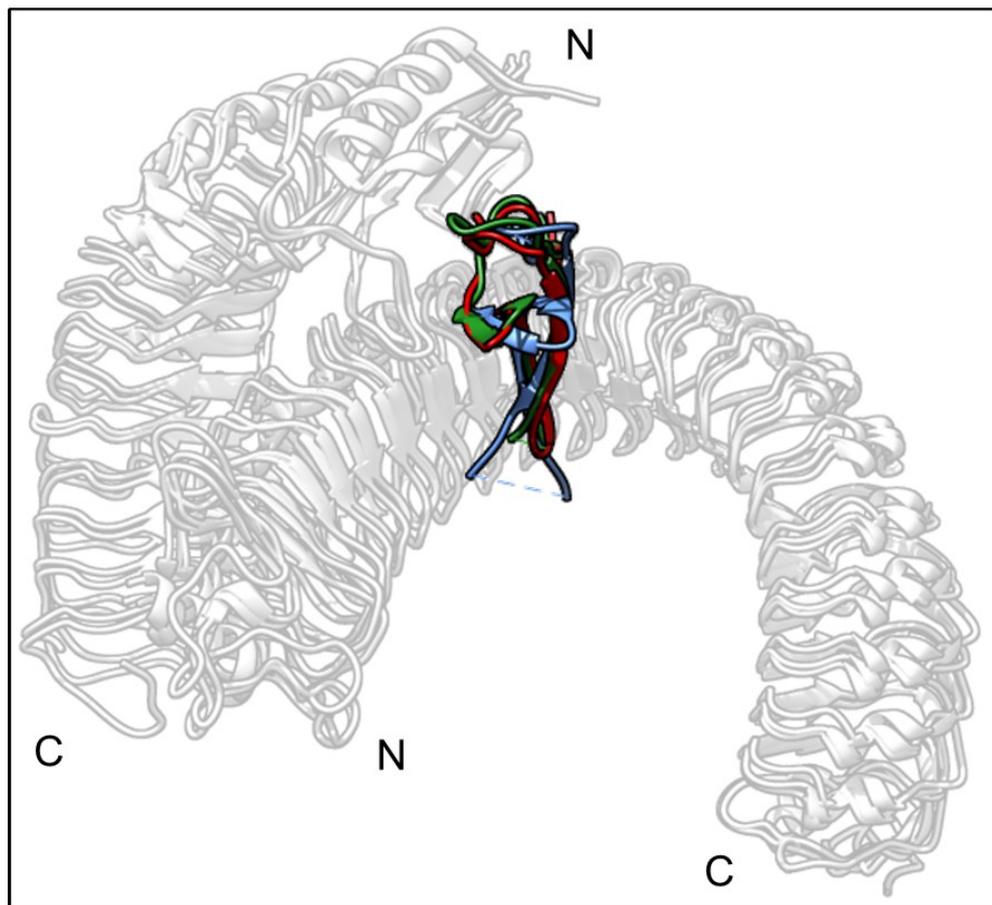
funktionelle Kontrolle für diesen Versuch mitgeführt. Auch im *tmm*-Hintergrund lässt sich lediglich ein Trend zu einem höheren Stomataindex erkennen. Der, zwar nicht signifikante, *p*-Wert halbierte sich aber in beiden statistischen Analysen von Col-0 zu *tmm*. Die Negativkontrolle der Cysteinsubstitutionsmutante verhält sich in Col-0 identisch mit dem Wildtyp. Im *tmm*-Hintergrund zeigt sie aber eine signifikante Reduktion des Stomataindex. Es liegt in Abwesenheit eines funktionellen TMM-Proteins also, auch ohne korrekte Faltung, eine stomatainhibierende Wirkung vor. EPFL2 zeigt in beiden Linien signifikante Reduktionen der Stomatadichte, dies kann durch beide statistischen Analysen verifiziert werden. Zudem stellt sich der gemessene Effekt als deutlich stärker dar, als nach Applikation von EPFL2C>S. Selbst der direkte Vergleich zwischen EPFL2 und EPFL2C>S im Tukey-Test weist in beiden Pflanzenlinien Signifikanz auf. Korrekt gefaltetes EPFL2 zeigt also bei ektopischer Applikation eine negativ regulatorische Wirkung auf die Stomatogenese.

**Tabelle 7:** Signifikanzwerte der Änderung der Stomataindizes nach Behandlung mit EPFL2, EPFL2C>S und EPFL9 errechnet mittels Tukey-Test und Dunnett-Test.

<b>Col-0</b>	<b>Tukey-Test angepasster p-Wert</b>	<b>Dunnett-Test p-Wert</b>
<i>mock</i> -EPFL2	0,0001422	<0,001
<i>mock</i> -EPFL2C>S	0,9071013	0,834
<i>mock</i> -EPFL9	0,6357751	0,489
EPFL2-EPFL2C>S	0,0026988	
EPFL9-EPFL2	0,0000002	
<b>Col-0 <i>tmm</i></b>	<b>Tukey-Test angepasster p-Wert</b>	<b>Dunnett-Test p-Wert</b>
<i>mock</i> -EPFL2	0,0000000	<0,001
<i>mock</i> -EPFL2C>S	0,0000390	<0,001
<i>mock</i> -EPFL9	0,2600096	0,176
EPFL2-EPFL2C>S	0,0000003	
EPFL9-EPFL2	0,0000000	

### 3.6 Strukturmodelle

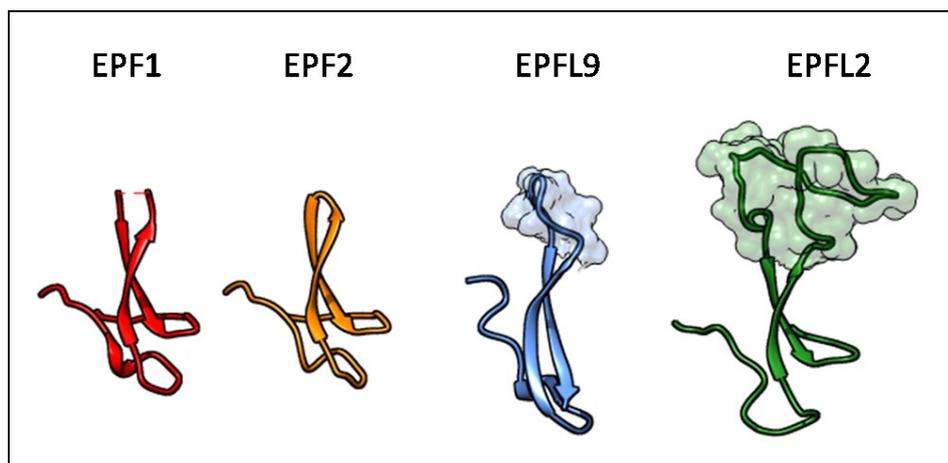
Für die *in silico* Betrachtung der untersuchten Komponenten wurde zuerst ein Sequenzgeleitetes Struktur-*alignment* mit Matchmaker (Meng et al. 2006) in Chimera durchgeführt. Hierfür wurden die Kristallstrukturen von TMM<sup>LRR</sup>-ERL1<sup>LRR</sup>-EPF1, ERL2<sup>LRR</sup>-EPFL4 sowie TMM<sup>LRR</sup>-ERL2<sup>LRR</sup>-EPF2 als Ausgangsdaten benutzt und die Ketten ERL1<sup>LRR</sup> mit ERL2<sup>LRR</sup> überlagert. Es ergibt sich ein sehr niedriger RMSD-Wert von 1,73 Å (TMM<sup>LRR</sup>-ERL1<sup>LRR</sup>-EPF1 : ERL2<sup>LRR</sup>-EPFL4) und 0,89 Å (TMM<sup>LRR</sup>-ERL1<sup>LRR</sup>-EPF1 : TMM<sup>LRR</sup>-ERL2<sup>LRR</sup>-EPF2). Die Peptidbindestellen zeigen sich identisch. Hierbei sind die Bindung von TMM<sup>LRR</sup> sowie die Peptidspezies (EPFL4, EPF2 oder EPF1) für die Positionierung irrelevant, da auch in Abwesenheit von TMM<sup>LRR</sup> die gleiche Stelle am Hauptrezeptor von allen Peptiden besetzt wird. Die Orientierung der *loop*-Regionen richtet sich in allen Fällen in die innere, konkave Seite des Solenoids. Unter der Annahme, dass EPFL2 die gleiche Bindestelle am Rezeptor besetzt, käme es hier zur Exposition einer weitaus größeren Struktur in die Solenoid Innenseite.



**Abbildung 33:** 5XJO, TMM<sup>LRR</sup>-ERL1<sup>LRR</sup>-EPF1 (EPF1 in grün) 5XKJ, TMM<sup>LRR</sup>-ERL2<sup>LRR</sup>-EPF2 (EPF2 in rot) und 5XKN, ERL2<sup>LRR</sup>-EPFL4 (EPFL4 in blau) überlagert mit einem RMSD Wert von 1,73 Å für die Ketten ERL1<sup>LRR</sup>-EPF1 und ERL2<sup>LRR</sup>-EPFL4 und 0,89 für die Ketten ERL1<sup>LRR</sup>-EPF1 und ERL2<sup>LRR</sup>-EPF2. In weiß und semitransparent die LRR-Domänen der Rezeptoren. N und C kennzeichnen jeweils die Orientierung des N- bzw. C-Terminus der LRR-Domänen.

Die NMR-gelöste Struktur von zeigt (2LIY), dass eine Vielzahl an Konformationen für die *loop*-Region von EPFL9 möglich ist. Für EPF1 und EPFL4 konnte keine Elektronendichte für die betreffende Region detektiert werden und bei EPF2 umfasst sie lediglich 2 Aminosäuren. Zur Darstellung der Größenverhältnisse wurde die Sekundärstruktur von EPFL2 auf die existierenden Peptidstrukturen, welche in MODELLER als *multi template* verwendet wurden, modelliert. Aus den 10 resultierenden Modellen, wurde ein *loop-refinement* auf die Struktur mit dem höchsten GA341-Wert (1,0) und dem niedrigsten zDOPE-Wert (0,47) angewandt. GA431 ist ein von statistischen Potentialen abgeleiteter Wert, bei welchem Werte über 0,7 eine Wahrscheinlichkeit von >95% für korrekte Faltung anzeigt. zDOPE ist die normalisierte diskrete, optimisierte Proteinenergie (*normalized discrete optimized protein energy*), wobei negative Werte bessere Modelle kennzeichnen. Nach dem *loop-refinement* ergeben sich Werte von GA341 1,0 und zDOPE -0,19.

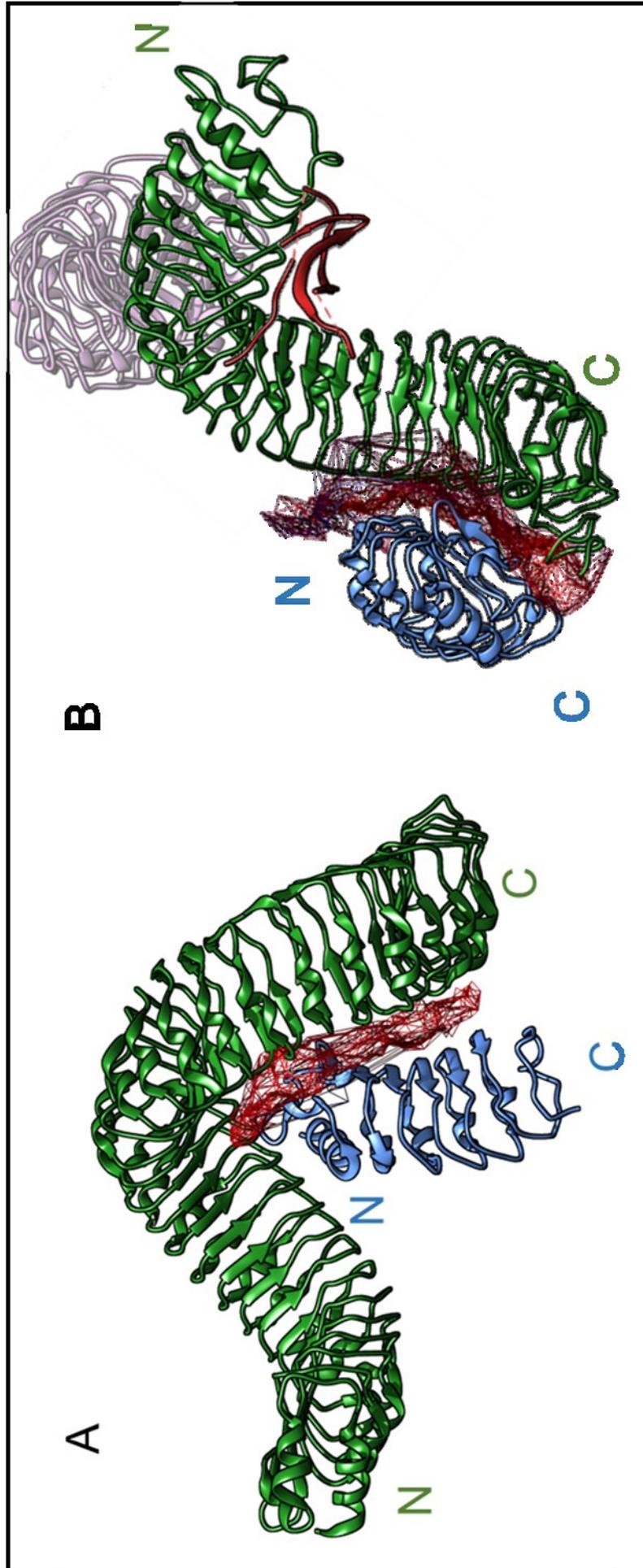
Die Fläche und das Volumen der elektrostatischen Oberfläche des *hairpin-loops* von EPFL2 ergeben 4984 Å<sup>2</sup> und 8273 Å<sup>3</sup>. Im direkten Vergleich bemisst EPFL9 3030 Å<sup>2</sup> und 4930 Å<sup>3</sup>.



**Abbildung 34:** EPF1 in rot (5XJO), EPF2 in orange (5XKJ), EPFL9 in blau (2LIY) und EPFL2 Homologiemodell in grün. Das berechnete Oberflächenvolumen ist für EPFL9 und EPFL2 in semitransparent dargestellt.

Im Folgenden soll veranschaulicht werden, welche räumliche Orientierung ERL2<sup>LRR</sup> und BAK1<sup>LRR</sup>, in dem postulierten Rezeptor-Korezeptor-Komplex, zu einander einnehmen können. ERL2<sup>LRR</sup> wird als *docking*-Partner verwendet, da Interaktionen zwischen allen drei ERF-Proteinen postuliert sind, doch liegen für ERL2<sup>LRR</sup> Kristallstrukturen mit Peptidligand sowohl mit, als auch ohne TMM<sup>LRR</sup> als Korezeptor vor. Somit können alle potentiellen Kombinationen an einem Beispiel diskutiert werden. Bei der Modellierung des putativen ERL2<sup>LRR</sup>-BAK1<sup>LRR</sup> Komplexes mit ClusPro werden für den Liganden (BAK1<sup>LRR</sup>) 70000 Rotationen simuliert, welche jeweils in x-, y- und z-Richtung translatiert werden. Die Translationen werden für jede Rotation nach energetischer Wichtung geordnet. Von den 70000 Rotations/Translations-

Kombinationen werden 1000 einem *greedy clustering* Algorithmus mit einem RMSD von 9 Å um das  $\alpha$ -Kohlenstoffatom unterzogen. Dadurch wird der Ligand mit den meisten Aminosäureresten in seiner lokalen Umgebung als *cluster*-Zentrum definiert. Die nachfolgend gewerteten Kombinationen werden zu diesem *cluster* hinzugefügt. Auf Grund der hohen Anzahl an Permutationen sind die energetischen Wichtungen, welche mit PIPER (Kozakov et al. 2006) erstellt werden, der einzelnen Modelle nicht aussagekräftig. Stattdessen wird die *cluster*-Größe als Referenz herangezogen. Der Vollständigkeit halber werden sie dennoch aufgelistet. Die Modelle können nach „elektrostatische Interaktionen favorisierend“ und „hydrophobe Interaktionen favorisierend“ sowie „ausgeglichen“ gewichtet werden und die 10 größten *cluster* werden als Struktur präsentiert. Für 9 von 10 *clustern* der „elektrostatische Interaktionen favorisierende“ Gruppe, wurde eine Bindung von BAK1<sup>LRR</sup> an den C-terminalen Teil von ERL2<sup>LRR</sup> vorhergesagt. Das größte *cluster* umfasst 99 Modelle (der beste Energiewert wird für dieses *cluster* liegt bei -957.9, wobei niedrigere Werte energetisch favorisierte Zustände aufzeigen). Für die Modelle der hydrophoben Interaktionsgruppe sind 10 von 10 *clustern* durch eine Bindung von BAK1<sup>LRR</sup> an den C-Terminus von ERL2<sup>LRR</sup> gekennzeichnet (größtes *cluster*: 159 Modelle, niedrigster gewichteter Energiewert -1326.7). Da die Interaktion von FLS2<sup>LRR</sup> und BAK1<sup>LRR</sup> hauptsächlich hydrophober Natur ist und im C-terminalen Segment stattfindet, wurde das zentrale Modell des größten *clusters* dieser Gruppe ausgewählt. Der Vergleich der Interaktionsflächen zwischen FL2<sup>LRR</sup>- BAK1<sup>LRR</sup> und ERL2<sup>LRR</sup> -BAK1<sup>LRR</sup> ergab vergleichbare Größen von 1818 Å<sup>2</sup> zu 1497 Å<sup>2</sup>. Die Bindung eines Peptidliganden wurde für das *docking* vernachlässigt. In der nachfolgenden Abbildung ist dieser jedoch eingeblendet (hierbei handelt es sich um das EPFL4 Molekül aus der Kristallstruktur ERL2<sup>LRR</sup>-EPFL4, 5XKJ) um die relative Position aller Komponenten zu einander zu veranschaulichen. Auch TMM<sup>LRR</sup> wird lediglich zur Demonstration der Position abgebildet und war nicht Bestandteil der *docking*-Matrize.



**Abbildung 35:** Darstellung der Interaktionsflächen, als rotes Gitternetz, von A FLS2<sup>LRR</sup>-BAK1<sup>LRR</sup> (FLS2<sup>LRR</sup> in grün und BAK1<sup>LRR</sup> in blau, 4MN8) und B ERL2<sup>LRR</sup>-BAK1<sup>LRR</sup> (ERL2<sup>LRR</sup> in grün und BAK1<sup>LRR</sup> in blau). Der Ligand EPFL4 ist in rot gezeigt. Das nicht beim *docking* im *template* enthaltene TMM<sup>LRR</sup> ist zur Verdeutlichung der Position in violett, semitransparent dargestellt. N und C kennzeichnen jeweils die Orientierung des N- bzw. C-Terminus des Proteins der gleichen Farbe.

## 4 Diskussion

### 4.1 Proteinreinigung

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die drei Ektodomänen der ERF-Proteine erfolgreich exprimiert und gereinigt werden. Es konnten absolute Mengen von 0,8 bis 2 mg erzielt werden. Im gefärbten SDS-PAGE zeigte sich, dass keine monodisperse Proteinlösung vorliegt. Der Grad an Kontaminanten macht die Proben ungeeignet für kristallographische Untersuchungen. Hierfür bestünde die Notwendigkeit zusätzlicher Reinigungsschritte. Für die Messung der Bindungseigenschaften per ITC lag aber ausreichende Proteinmenge im Verhältnis zu Verunreinigungen vor. Die Proteinidentität konnte immunologisch verifiziert werden. Da jedoch einige Signale niedrigeren Molekulargewichtes verzeichnet wurden, werden entweder unvollständig translatierte Proteine bei der Reinigung mitgetragen oder es findet proteolytische Degradation statt.

### 4.2 Peptidreinigung

Die drei analysierten Peptide konnten als GST-Fusionsprodukte in großer Menge aus dem Lysat gereinigt werden. Durch TEV-Proteaseverdau und Umkehrphasenchromatographie konnten Kontaminationen und durch den Verdau entstandenes freies GST, sowie schlussendlich die TEV-Protease, abgetrennt werden und hochreine Peptide lagen vor. Diese Peptide wurden über Rückfaltung weiterverarbeitet. Die Reinheit und Identität der Peptide wurde massenspektrometrisch nachgewiesen. Mit einer Peptidextraktion aus 10 g Zellernte konnten zwischen 2 und 3 mg bioaktiven Peptids gewonnen.

### 4.3 Peptidrückfaltung

Die gewonnenen Peptide wurden mittels kompletter Denaturierung durch 8 M Urea (siehe 2.4.4) und anschließender Zugabe von reduziertem und oxidiertem Glutathion rückgefaltet. Das dynamische Redoxmilieu, das durch die Zugabe von GSSG in einem Verhältnis von 1:2,7 zu GSH entstand, ermöglicht die Ausbildung der nativen Disulfidbrücken. Als *disulfide bond suffling* bezeichnet, konnte dieses Konzept bereits *in vitro* und *in silico* als wirkungsvoll beschrieben und optimiert werden (Katayama et al. 2001; Lu und Liu 2008). Auf EPFL2 wurde es hier zum erstenmal angewandt. In der Umkehrphasenchromatographie konnte nach der Behandlung eine Verschiebung der Retentionszeiten beobachten werden. Durch Konformationsänderungen, wie bei dem Ausbilden von Disulfidbrücken, verändert sich die Anzahl der Aminosäurereste bzw. deren Seitenketten die der mobilen Phase exponiert sind. Durch die Bildung einer Disulfidbrücke wird auch der polare Charakter der freien Thiolgruppen am Cystein vermindert. Dies kann die Elution zu späterer Retentionszeit, bei einem höheren Anteil unpolaren Lösungsmittels, teilweise erklären. Deutlich wurde jedoch die Veränderung

der Retentionszeiten von behandeltem zu unbehandeltem EPFL2 und EPFL9, was ein erstes Indiz für Strukturänderungen der Peptide ist. Die Peptide im CD-Spektrum bestätigten dies. So zeigten sich zwar homogene Spektren zwischen EPFL2C>S und den beiden Peptiden EPFL9 und EPFL2 nach der Rückfaltung, aber unter reduzierenden Bedingungen variierten die Kurvenverläufe. Für EPFL2C>S ergab sich keine Veränderung nach Behandlung mit reduzierendem Agens. Da alle Cysteine durch Serine ersetzt wurden besteht keine Möglichkeit der Ausbildung von Disulfidbrücken, die reduziert werden könnten. Die vergleichbaren Kurvenverläufe bestätigten dies. Bei EPFL9 zeigten sich eine Reduktion der  $\beta$ -Schleifen-Strukturanteile und ein Anstieg von  $\beta$ -Strang-Elementen. Bei der Reduktion von Disulfidbrücken die das  $\beta$ -Faltblatt stabilisieren, aus dem sich der *hairpin-loop* ergibt, ist eine solche Verschiebung der gemessenen Strukturanteile plausibel. Der Vergleich mit dem Anteil von Sekundärstrukturelementen aus der NMR-Struktur von EPFL9 zeigte gute Übereinstimmung mit den Werten der CD-Spektroskopie. Die Kurvenverläufe von EPFL2 vor und nach Zugabe von TCEP zeigten den drastischsten Unterschied. Auch hier zeigte sich bei Berechnung der Sekundärstrukturanteile mit dem CONTILL-Algorithmus eine Verschiebung von  $\beta$ -Schleife zu  $\beta$ -Faltblatt und eine Zunahme an *random-coil*. Wieder lässt sich dies durch die stabilisierende Wirkung der Disulfidbrücken auf das  $\beta$ -Faltblatt zurückführen.

In der Gesamtbetrachtung bestätigen die CD-Spektren die Faltung der Peptide durch *disulfide bond shuffling*, dass signifikante Veränderungen der Sekundärstruktur vorlagen, wenn ein reduzierendes Milieu geschaffen wurde.

#### 4.4 Bindungsaffinität von ERECTA<sup>LRR</sup> zu den EPFL-Peptiden

Die isothermale Titrationskalorimetrie mit ERECTA<sup>LRR</sup> als Rezeptor und EPFL9 als Ligand zeigte, dass das gewonnene Protein im Stande war das in *E. coli* produzierte und rückgefaltete Peptid EPFL9 zu binden. Mit einem  $K_D$ -Wert von  $3,5 \pm 0,4 \mu\text{M}$  liegen Werte einer spezifischen Bindung vor.

Der Vergleich der Dissoziationskonstanten von EPFL9 und EPFL2 zeigt, dass EPFL2 mit dreifach niedrigerer Affinität,  $15,2 \pm 3 \mu\text{M}$ , an ERECTA<sup>LRR</sup> bindet als EPFL9. Beide Peptide wurden in einem Verhältnis von 1:1 gebunden, was ebenfalls den Literaturwerten aller bisher gemessenen EPF/EPFL-Peptide mit ERf-Rezeptoren entspricht (Lin et al. 2017). Somit konnte der bereits beschriebenen Interaktion von ERECTA<sup>LRR</sup> mit EPFL2 eine Affinität zugeordnet werden.

Die Interaktion mit EPFL2C>S zeigte deutlich niedrigere Affinität,  $K_D = 40,0 \pm 19 \mu\text{M}$  und unplausible Stöchiometrien. Diese Werte können einerseits in den schlechten *fit*-Parametern der Kurvenanpassung liegen, oder aber es liegt eine unspezifische Interaktion vor, die gemessen wurde. In jedem Fall liegt eine signifikant niedrigere Affinität vor, als im Fall von EPFL9 und

EPFL2. Die  $\Delta G$ -Werte von  $-2,15 \text{ kJ mol}^{-1}$  (EPFL9) und  $-1,41 \text{ kJ mol}^{-1}$  (EPFL2) unterstützen die Tatsache, dass es sich um spezifische Interaktionen handeln kann.

#### 4.5 Bindungsaffinität von ERL1<sup>LRR</sup> zu den EPFL-Peptiden

ERL1<sup>LRR</sup> zeigte Dissoziationskonstanten der gleichen Größenordnung zu EPFL9 und EPFL2 wie ERECTA<sup>LRR</sup>. Mit  $K_D = 6,8 \pm 0,04 \text{ }\mu\text{M}$  bei einem  $\Delta G$ -Wert von  $-1,85 \text{ kJ mol}^{-1}$  für EPFL9, liegt dieser Wert um etwa einen Faktor 5 unter dem Literaturwert von  $40 \pm 1 \text{ }\mu\text{M}$  (Lin et al. 2017). Diese Diskrepanz kann in den unterschiedlichen Expressionssystemen für Rezeptoren und Peptide begründet sein. Die ITC-Bedingungen in Bezug auf Puffer und Temperatur waren identisch. Die hohe Affinität zeigt, dass funktionell intakte Rezeptordomänen gereinigt werden konnten, die imstande sind bereits beschriebene Peptid-Rezeptor-Interaktion auszubilden.

Die Bindung von EPFL2 zeigt in etwa gleiche Affinität bzw. Dissoziationskonstanten mit  $8,7 \pm 0,6 \text{ }\mu\text{M}$  und einem leicht niedrigeren  $\Delta G$ -Wert von  $-1,85 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Auch ERL1<sup>LRR</sup> bindet EPFL2 spezifisch.

Die Dissoziationskonstanten zu EPFL2C>S, sowie Stöchiometrie deuten auch bei ERL1 auf eine unspezifische Bindung.

#### 4.6 Bindungsaffinität von ERL2<sup>LRR</sup> zu den EPFL-Peptiden

ERL2<sup>LRR</sup> zeigte einen zweigeteilten Bindungsmodus zu EPFL9. Es zeichnete sich ein hochaffines Bindungsereignis ab ( $K_D = 59,1 \pm 6 \text{ nM}$ ) und eines mit niedrigerer Affinität ( $K_D = 4,5 \pm 0,3 \text{ }\mu\text{M}$ ). Beide Werte waren die niedrigsten, die für Peptid-Rezeptorinteraktionen gemessen werden konnten. Da EPFL9 sowohl elektrostatische als auch hydrophobe Interaktionen mit ERL1 eingeht, ist dies auch für ERL2 zu vermuten. Beide Bindungsereignisse weisen ihre eigene Enthalpieänderungssignatur auf. Aufgrund der höheren Affinitäten in den vorliegenden Messungen, ist es möglich, dass die Bindung mit der niedrigeren Enthalpieänderung den Detektionsschwellenwert überschreitet und messbar wird. Die niedrigen Dissoziationskonstanten beider Messungen schließen eine unspezifische Bindung, etwa durch Kontaminationen aus der Reinigung, weitestgehend aus.

Für EPFL2 zeigte ERL2 die niedrigsten Dissoziationskonstanten unter den ERF-Rezeptoren ( $6,6 \pm 0,03 \text{ }\mu\text{M}$ ). So bindet anscheinend auch ERL2<sup>LRR</sup> EPFL2 mit hoher Spezifität, was durch den  $\Delta G$ -Wert von  $-1,95 \text{ kJ mol}^{-1}$  unterstrichen wird.

EPFL2C>S zeigte zu ERL2<sup>LRR</sup> die stärkste Bindung. In diesem Fall sind  $K_D$ -Wert und Stöchiometrie im Bereich einer spezifischen Bindung ( $17,4 \pm 7 \text{ }\mu\text{M}$  und  $1,20 \pm 1,05$ ). Doch auch dieser Messung liegen die Standardfehler zwischen 40% ( $K_D$ ) und 88% (Stöchiometrie). Da bislang noch keine ITC-Messungen mit Cysteinsubstitutionsmutanten vorliegen, lässt sich

nicht ausschließen, dass eine Bindung an den Rezeptor durch EPFL2C>S vorliegt. Einerseits ist das GS-Motiv, das die Bindung mitvermittelt in diesem Konstrukt nicht beeinträchtigt, andererseits sind auch hydrophobe Interaktionen möglich. Die veränderte Sekundärstruktur, durch das Fehlen der unterstützenden Disulfidbrücken, könnte die Bindungsaffinität beeinflussen, indem interagierende Reste vom Peptid selbst abgeschirmt werden oder die nötige Interaktionsoberfläche nicht stabil ist.

#### 4.7 Bindungsaffinität von TMM<sup>LRR</sup> zu den EPFL-Peptiden

Für TMM konnte gezeigt werden, dass eine Interaktion mit EPFL9 auch ohne einen der ERF-Rezeptoren stattfindet. Bisher konnte TMM nicht allein heterolog hergestellt und gereinigt werden. So zeigte sich eine Dissoziationskonstante von  $14,0 \pm 1,8 \mu\text{M}$  mit einem Verhältnis von nahezu 1:1 zwischen TMM<sup>LRR</sup> und EPFL9. Die Werte sind sehr ähnlich denen aus den ERF-Rezeptormessungen. Die physiologische Relevanz dieses Sachverhaltes ist unklar, da nicht bekannt ist ob, und wenn ja in welcher Menge, unkomplexiertes TMM in der Membran von Pflanzen vorliegt. Für *in vitro* Messungen stellt dies aber eine wichtige Tatsache dar. Nämlich, dass beschriebene und putative Liganden und ihre Affinität zu TMM näher charakterisiert werden können ohne ein zweites Rezeptorprotein zu benötigen.

EPFL2 hatte einen  $K_D$ -Wert von  $1,48 \pm 0,2 \mu\text{M}$  im Experiment mit TMM<sup>LRR</sup>. Bei einem  $\Delta G$ -Wert von  $-2,34 \text{ kJ mol}^{-1}$  und einer Stöchiometrie von fast 1:1 stellt sich eine hochaffine Bindung dar. Bisher wurde diese Interaktion nicht beschrieben und sie bedurfte noch einer Verifizierung durch Größenausschlusschromatographie.

Zu EPFL2C>S konnte TMM<sup>LRR</sup> keinerlei Affinität nachgewiesen werden.

#### 4.8 Bindungsaffinität von BAK1<sup>LRR</sup> zu den EPFL-Peptiden

BAK1<sup>LRR</sup> zeigte hohe Dissoziationskonstanten zu EPFL9 und EPFL2C>S. Im Lichte der niedrigen Affinitäten mit sehr hohen Standardfehlern, den erratischen Stöchiometrien und den  $\Delta G$ -Werten nahe 0, konnte keine Interaktion zwischen EPFL9 gezeigt werden.

Die bimodale Bindungskurve im ITC-Experiment zeigt eine Affinität zu EPFL2, insbesondere in dem Bindungsereignis das einen  $K_D$ -Wert von  $90,0 \pm 32 \text{ nM}$  zeigt. Ob tatsächlich eine Bindung von EPFL2 durch BAK1<sup>LRR</sup> vorliegt galt es zu verifizieren.

#### 4.9 TMM<sup>LRR</sup> bindet EPFL2, BAK1<sup>LRR</sup> bindet EPFL2 nicht

In der Größenausschlusschromatographie konnten BAK1<sup>LRR</sup> und TMM<sup>LRR</sup> jeweils nach Molekulargewicht aufgetrennt werden und in ausreichenden Mengen für Westernblotanalysen zurückgewonnen werden. Für die Spitze des Elutionsmaximums von BAK1<sup>LRR</sup> errechnete sich

ein apparentes Molekulargewicht von ca. 50 kDa. Dies entspricht dem theoretischen Molekulargewicht eines BAK1<sup>LRR</sup>-Dimers. Bei Zugabe von EPFL2 zeigte sich keine Zunahme der Amplitude dieses Maximums. Das Maximum um 2,8 ml Elutionsvolumen, im Chromatogramm von BAK1<sup>LRR</sup> (Abbildung 31) mit Zugabe von EPFL2 entspricht dem Elutionsvolumen von EPFL2, das ungebunden eluiert. Die potentielle Bindung zu EPFL2, die die ITC-Daten nahe legen, konnte nicht verifiziert werden. Mit Blick auf die Fehlerwerte der ITC und das Ergebnis der Größenausschlusschromatographie ist eine Interaktion zwischen BAK1<sup>LRR</sup> und EPFL2 unwahrscheinlich.

TMM<sup>LRR</sup> eluierte mit und ohne Zugabe von EPFL2 bei einem apparenten Molekulargewicht von 530 kDa. Dies entspricht ca. 10 monomeren Ektodomänen. Jedoch zeigte der Kurven-*fit* der Kalibrierkurve im Bereich höheren Molekulargewichts die stärkste Abweichung von den Messpunkten. Für monomeres TMM<sup>LRR</sup> müsste jedoch ein Elutionsvolumen von 2,16 ml vorliegen. Da die Elution weit nach dem Ausschlussvolumen lag, handelt es sich wahrscheinlich nicht um Aggregate, auch wenn dies nicht ausgeschlossen werden kann. Putative Dimere würden bei einem Volumen von 1,95 ml eluieren. Ein höherer oligomerer Komplex ist ebenfalls nicht ausgeschlossen. Augenscheinlich ist jedoch die relative Steigerung des diskutierten Maximums nach EPFL2 Zugabe. Und auch in diesem ist das zusätzliche Maximum bei ca. 3 ml sichtbar, entsprechend freiem EPFL2. Im Westernblot zeigte sich einerseits, dass TMM<sup>LRR</sup> viele Abbaubanden aufweist. Zum anderen zeigte sich aber, dass bei ca. 12 kDa ein Signal detektiert werden kann, das dem Molekulargewicht von EPFL2 entspricht. Es kann aber auch nicht komplett ausgeschlossen werden, dass es sich um proteolytische Fragmente handelt. Doch zusammen mit der Amplitudenerhöhung dieses Maximums und dem Westernblot sowie den Ergebnissen der isothermalen Titrationskalorimetrie kann davon ausgegangen werden, dass TMM<sup>LRR</sup> *in vitro* EPFL2 bindet.

#### **4.10 EPFL2 wirkt negativ regulatorisch auf die Stomatogenese**

Bei der ektopischen Applikation der Peptide auf *Arabidopsis thaliana* Keimlinge konnte die Bioaktivität der rückgefalteten Peptide bestätigt werden. EPFL9 zeigte in Col-0 sowie in Col-0 *tmm* eine Tendenz zu einer erhöhten Stomatadichte. Signifikant waren diese Messungen jedoch nicht. Die Wirkung von ektopisch appliziertem STOMAGEN konnte bereits gezeigt werden (Ohki et al. 2011) und galt hier im Kontext einer Positivkontrolle. Dass die erzielten Werte keine Signifikanz erreichten, kann in der Herstellung der eingesetzten Peptide begründet sein. Während Ohki et al. synthetisierte Peptide der Rückfaltung unterzogen, wurden hier aus *E. coli* gewonnene eingesetzt. Die Möglichkeit besteht, dass ein gewisser Anteil an erhaltenem Peptid bereits im Wirtsorganismus nicht-native Disulfidbrücken gebildet hat und diese Fraktion mitgetragen wurde. Es kann also eine Mischpopulation an Peptiden vorliegen, die nicht zu

100% korrekt gefaltet ist. In Col-0 *tmm* wäre jedoch ohnehin kein Effekt zu vermuten gewesen, da *tmm* ebenso wie *EPFL9* Überexpression zur Erhöhung der Stomatadichte führen (Lee et al. 2012).

EPFL2 zeigte eine drastische Minderung der Stomatadichte in beiden Linien, nach ektopischer Applikation. In *tmm* wird dieser Effekt am deutlichsten sichtbar. Die unterschiedliche Ausprägung dieses Effektes ist in der generell erhöhten Anzahl an Stomata in *tmm* zu suchen. Eine Inhibierung der Stomatogenese fällt hier stärker ins Gewicht als in wildtypischen Pflanzen. Zudem zeigt sich, dass EPFL2 unabhängig von TMM wirken kann. Die Anwesenheit von TMM ist für die negativ regulatorischen Peptide EPF1 und EPF2 essentiell, um mit ERF-Proteinen und einem noch unbekanntem Korezeptor ihre Funktion erfüllen (Lin et al. 2017; Meng et al. 2015). Die negative Signalweitergabe ist somit unterbunden. Dass eine Reduktion der stomatalen Dichte in der Blattepidermis ohne funktionelles TMM durch ein EPFL-Peptid möglich ist, wurde bisher noch nicht beschrieben. Eine Erklärung liefert die spezifische Expression von *tmm* in der Blattepidermis. In Hypokotyl und Spross wo keine *TMM*-Expression stattfindet, tragen die Peptide EPFL4 und EPFL6 zur negativen Regulation der Stomatogenese ohne TMM bei (Abrash und Bergmann 2010; Uchida et al. 2013). Phylogenetisch stehen diese Peptide EPFL2 am nächsten, was auch einen ähnlichen Wirkungsmechanismus bedeuten kann. Ausser der Auxin-abhängigen Expression im Blatt, sind keine Details über das Expressionsmuster von *EPFL2* bekannt. Dass EPFL2 jedoch in anderen Geweben TMM unabhängige Funktionen trägt ist möglich.

Die residuale Aktivität von EPFL2C>S im Peptid-Bioassay wird getragen von den ITC-Daten. Auch in diesen Experimenten zeigten, mit Ausnahme von TMM, alle Rezeptoren zumindest niedrigaffine Bindung von EPFL2 C>S. Ausser im Komplex von Peptid-ERF-TMM, spielt die korrekt ausgeprägte Sekundärstruktur in der Bindungsregion eine untergeordnete Rolle für die Peptidbindung. Funktionsverlust durch Cysteinsubstitution wurde bisher nur an EPFL9 demonstriert nicht aber an den TMM-unabhängigen Peptiden EPFL4 und EPFL6.

#### 4.11 BAK1 als putativer Korezeptor

Für BAK1 und andere Proteine der SERK-Familie als Korezeptor der ERF-Proteine gibt es zunehmende Evidenz (Meng et al. 2015; Lin et al. 2017). Wenn auch EPFL2 als potenziell in einer Bindung zu BAK1 involviert, anhand der vorliegenden Daten, ausscheidet lohnt sich eine Betrachtung der räumlichen Orientierung beider Strukturen. Das Protein-*docking* von ERL2 und BAK1<sup>LRR</sup> deutet auf eine Bindung von BAK1<sup>LRR</sup> am C-terminalen LRR-Bereich von ERL2. Bei einem solchen Bindungsmodus ist eine Kokomplexierung von TMM nicht ausgeschlossen, da dieses am N-terminalen Apex bindet. Das RLP TMM besitzt keine cytoplasmatische Kinasedomäne und kann somit nicht an einer Phosphotransfer-medierten Signalweitergabe

beteiligt sein. BAK1 besitzt eine solche Domäne und bei C-terminaler Interaktion wäre eine geringere Distanz zwischen den beiden Kinasedomänen, als bei einer N-terminalen Bindung, zu überbrücken. Die Distanz im Solenoid zwischen dem ersten N-terminalen Rest und dem letzten C-terminalen beträgt bei ERL2 (5XKN) immerhin über 84 Å. Die Interaktionsflächen von gelöster Struktur (4MN8, FLS2-BAK1) und Computermodell (ERL2-BAK1) haben eine ähnliche Ausdehnung und stützen diese Hypothese. Zu einem ähnlichen Schluss gelangten auch Lin et al. Bei dem strukturbasierten *alignment* von ERL1<sup>LRR</sup>-EPF1-TMM<sup>LRR</sup> mit PXY<sup>LRR</sup>-CLE41-SERK2<sup>LRR</sup> (5GQR). SERK2, aus der gleichen Proteinfamilie wie SERK3, bindet am C-terminalen Ende von PXY (Zhang et al. 2016). Diese Struktur lässt sich mit ERL1<sup>LRR</sup>-EPF1-TMM<sup>LRR</sup> übereinbringen und zeigt, auch hier läge C-terminale Komplexierung des SERKf-Korezeptors vor (Lin et al. 2017, Suppl.). Die Positionierung der Peptide die, unabhängig von TMM invariabel scheint, lässt hier Spekulationen über eine eventuelle Rekrutierung von Korezeptoren zu. Besonders im Fall von EPFL2 liegt, bei gleicher Bindestelle und Orientierung, eine ausladende *loop*-Struktur in das Innere des Solenoids gewandt ist, vor. Abhängig von der Konformation dieser Region sind die Bindung sowie Verdrängung potentieller Korezeptoren möglich.

Da die vorliegenden Daten keine Evidenz für eine Interaktion von BAK1 und EPFL2 liefern, kommt eben die mögliche Verdrängung von BAK1 am Rezeptor-Peptidkomplex in Frage oder die Rekrutierung eines bisher unbekanntem Korezeptors.

Für die genaue Untersuchung der beteiligten Proteine, die die hier beschriebene Effekte von EPFL2, sowie die räumliche und entwicklungsbiologische Dimension der EPFL2 Aktivität, werden weiter genetische wie biochemische Studien nötig sein.

## 5 Literaturverzeichnis

- Abaskharon, Rachel M.; Gai, Feng (2016): Direct measurement of the tryptophan-mediated photocleavage kinetics of a protein disulfide bond. In: *Physical chemistry chemical physics : PCCP* 18 (14), S. 9602–9607. DOI: 10.1039/c6cp00865h.
- Abrash, Emily B.; Bergmann, Dominique C. (2010): Regional specification of stomatal production by the putative ligand CHALLAH. In: *Development (Cambridge, England)* 137 (3), S. 447–455. DOI: 10.1242/dev.040931.
- Alvarez-Buylla, Elena R.; Benítez, Mariana; Corvera-Poiré, Adriana; Chaos Cador, Alvaro; Folter, Stefan de; Gamboa de Buen, Alicia et al. (2010): Flower development. In: *The Arabidopsis book* 8, e0127. DOI: 10.1199/tab.0127.
- Bender, Kyle W.; Wang, Xuejun; Cheng, George B.; Kim, Hyoung Seok; Zielinski, Raymond E.; Huber, Steven C. (2015): Glutaredoxin AtGRXC2 catalyses inhibitory glutathionylation of Arabidopsis BRI1-associated receptor-like kinase 1 (BAK1) in vitro. In: *The Biochemical journal* 467 (3), S. 399–413. DOI: 10.1042/BJ20141403.
- Bergmann, Dominique C.; Lukowitz, Wolfgang; Somerville, Chris R. (2004): Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK kinase. In: *Science (New York, N.Y.)* 304 (5676), S. 1494–1497. DOI: 10.1126/science.1096014.
- Bhave, Neela S.; Veley, Kira M.; Nadeau, Jeanette A.; Lucas, Jessica R.; Bhave, Sanjay L.; Sack, Fred D. (2009): TOO MANY MOUTHS promotes cell fate progression in stomatal development of Arabidopsis stems. In: *Planta* 229 (2), S. 357–367. DOI: 10.1007/s00425-008-0835-9.
- Brand, U. (2000): Dependence of Stem Cell Fate in Arabidopsis on a Feedback Loop Regulated by CLV3 Activity. In: *Science* 289 (5479), S. 617–619. DOI: 10.1126/science.289.5479.617.
- Bulheller, Benjamin M.; Hirst, Jonathan D. (2009): DichroCalc--circular and linear dichroism online. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 25 (4), S. 539–540. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp016.
- Chai, J.; Han, Z.; Sun, Y. (2013a): Structural insight into BL-induced activation of the BRI1-BAK1 complex.
- Chai, J.; Sun, Y.; Han, Z. (2013b): Crystal structure of flg22 in complex with the FLS2 and BAK1 ectodomains.
- Combet, C.; Blanchet, C.; Geourjon, C.; Deléage, G. (2000): NPS@. Network Protein Sequence Analysis. In: *Trends in Biochemical Sciences* 25 (3), S. 147–150. DOI: 10.1016/S0968-0004(99)01540-6.
- Comeau, Stephen R.; Gatchell, David W.; Vajda, Sandor; Camacho, Carlos J. (2004): ClusPro. A fully automated algorithm for protein-protein docking. In: *Nucleic acids research* 32 (Web Server issue), W96-9. DOI: 10.1093/nar/gkh354.
- Delano, W. L. (2002): The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA. Online verfügbar unter <http://www.pymol.org>.

- Douglas, Scott J.; Chuck, George; Dengler, Ronald E.; Pelecanda, Lakshmi; Riggs, C. Daniel (2002): KNAT1 and ERECTA Regulate Inflorescence Architecture in Arabidopsis. In: *The Plant Cell* 14 (3), S. 547–558. DOI: 10.1105/tpc.010391.
- Eswar, Narayanan; Webb, Ben; Marti-Renom, Marc A.; Madhusudhan, M. S.; Eramian, David; Shen, Min-Yi et al. (2007): Comparative protein structure modeling using MODELLER. In: *Current protocols in protein science* Chapter 2, Unit 2.9. DOI: 10.1002/0471140864.ps0209s50.
- Geisler, M.; Nadeau, J.; Sack, F. D. (2000): Oriented asymmetric divisions that generate the stomatal spacing pattern in Arabidopsis are disrupted by the too many mouths mutation. In: *The Plant Cell* 12 (11), S. 2075–2086.
- Gibson, Daniel G.; Young, Lei; Chuang, Ray-Yuan; Venter, J. Craig; Hutchison, Clyde A.; Smith, Hamilton O. (2009): Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. In: *Nature methods* 6 (5), S. 343–345. DOI: 10.1038/nmeth.1318.
- Groll, Uritza von; Berger, Dieter; Altmann, Thomas (2002): The subtilisin-like serine protease SDD1 mediates cell-to-cell signaling during Arabidopsis stomatal development. In: *The Plant Cell* 14 (7), S. 1527–1539.
- Hara, Kenta; Kajita, Ryoko; Torii, Keiko U.; Bergmann, Dominique C.; Kakimoto, Tatsuo (2007): The secretory peptide gene EPF1 enforces the stomatal one-cell-spacing rule. In: *Genes & development* 21 (14), S. 1720–1725. DOI: 10.1101/gad.1550707.
- Hara, Kenta; Yokoo, Toshiya; Kajita, Ryoko; Onishi, Takaaki; Yahata, Saiko; Peterson, Kylee M. et al. (2009): Epidermal cell density is autoregulated via a secretory peptide, EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 2 in Arabidopsis leaves. In: *Plant & cell physiology* 50 (6), S. 1019–1031. DOI: 10.1093/pcp/pcp068.
- Hothorn, Michael; Belkhadir, Youssef; Dreux, Marlene; Dabi, Tsegaye; Noel, Joseph P.; Wilson, Ian A.; Chory, Joanne (2011): Structural basis of steroid hormone perception by the receptor kinase BRI1. In: *Nature* 474 (7352), S. 467–471. DOI: 10.1038/nature10153.
- Huang, Yi; Tao, Zhangsheng; Liu, Qiong; Wang, Xinfu; Yu, Jingyin; Liu, Guihua; Wang, Hanzhong (2014): BnEPFL6, an EPIDERMAL PATTERNING FACTOR-LIKE (EPFL) secreted peptide gene, is required for filament elongation in Brassica napus. In: *Plant molecular biology* 85 (4-5), S. 505–517. DOI: 10.1007/s11103-014-0200-2.
- Hunt, Lee; Bailey, Karen J.; Gray, Julie E. (2010): The signalling peptide EPFL9 is a positive regulator of stomatal development. In: *The New phytologist* 186 (3), S. 609–614. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2010.03200.x.
- Hunt, Lee; Gray, Julie E. (2009): The signaling peptide EPF2 controls asymmetric cell divisions during stomatal development. In: *Current biology : CB* 19 (10), S. 864–869. DOI: 10.1016/j.cub.2009.03.069.
- IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983 (1984). In: *Biochem. J.* 219 (2), S. 345–373.
- Jewaria, Pawan Kumar; Hara, Toshiaki; Tanaka, Hirokazu; Kondo, Tatsuhiko; Betsuyaku, Shigeyuki; Sawa, Shinichiro et al. (2013): Differential effects of the peptides Stomagen, EPF1

- and EPF2 on activation of MAP kinase MPK6 and the SPCH protein level. In: *Plant & cell physiology* 54 (8), S. 1253–1262. DOI: 10.1093/pcp/pct076.
- Jordá, Lucía; Sopena-Torres, Sara; Escudero, Viviana; Nuñez-Corcuera, Beatriz; Delgado-Cerezo, Magdalena; Torii, Keiko U.; Molina, Antonio (2016): ERECTA and BAK1 Receptor Like Kinases Interact to Regulate Immune Responses in Arabidopsis. In: *Frontiers in plant science* 7, S. 897. DOI: 10.3389/fpls.2016.00897.
- Kanaoka, Masahiro M.; Pillitteri, Lynn Jo; Fujii, Hiroaki; Yoshida, Yuki; Bogenschutz, Naomi L.; Takabayashi, Junji et al. (2008): SCREAM/ICE1 and SCREAM2 specify three cell-state transitional steps leading to arabidopsis stomatal differentiation. In: *The Plant Cell* 20 (7), S. 1775–1785. DOI: 10.1105/tpc.108.060848.
- Kang, Dong-Hoon; Gho, Yong-Song; Suh, Myung-Koo; Kang, Chul-Hun (2002): Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. In: *Bulletin of the Korean Chemical Society* 23 (11), S. 1511–1512. DOI: 10.5012/bkcs.2002.23.11.1511.
- Katayama, H.; Ohira, T.; Nagata, K.; Nagasawa, H. (2001): A recombinant molt-inhibiting hormone of the kuruma prawn has a similar secondary structure to a native hormone. Determination of disulfide bond arrangement and measurements of circular dichroism spectra. In: *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 65 (8), S. 1832–1839. DOI: 10.1271/bbb.65.1832.
- Kobe, B. (2001): The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. In: *Current Opinion in Structural Biology* 11 (6), S. 725–732. DOI: 10.1016/S0959-440X(01)00266-4.
- Kondo, Tatsuhiko; Kajita, Ryoko; Miyazaki, Aya; Hokoyama, Mayumi; Nakamura-Miura, Touko; Mizuno, Satoko et al. (2010): Stomatal density is controlled by a mesophyll-derived signaling molecule. In: *Plant & cell physiology* 51 (1), S. 1–8. DOI: 10.1093/pcp/pcp180.
- Kozakov, Dima; Brenke, Ryan; Comeau, Stephen R.; Vajda, Sandor (2006): PIPER. An FFT-based protein docking program with pairwise potentials. In: *Proteins* 65 (2), S. 392–406. DOI: 10.1002/prot.21117.
- Kozakov, Dima; Hall, David R.; Xia, Bing; Porter, Kathryn A.; Padhorny, Dzmitry; Yueh, Christine et al. (2017): The ClusPro web server for protein-protein docking. In: *Nature protocols* 12 (2), S. 255–278. DOI: 10.1038/nprot.2016.169.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685. DOI: 10.1038/227680a0.
- Lai, Lien B.; Nadeau, Jeanette A.; Lucas, Jessica; Lee, Eun-Kyoung; Nakagawa, Tsuyoshi; Zhao, Liming et al. (2005): The Arabidopsis R2R3 MYB proteins FOUR LIPS and MYB88 restrict divisions late in the stomatal cell lineage. In: *The Plant Cell* 17 (10), S. 2754–2767. DOI: 10.1105/tpc.105.034116.
- Lee, Jin Suk; Hnilova, Marketa; Maes, Michal; Lin, Ya-Chen Lisa; Putarjunan, Aarthi; Han, Soon-Ki et al. (2015): Competitive binding of antagonistic peptides fine-tunes stomatal patterning. In: *Nature* 522 (7557), S. 439–443. DOI: 10.1038/nature14561.
- Lee, Jin Suk; Kuroha, Takeshi; Hnilova, Marketa; Khatayevich, Dmitriy; Kanaoka, Masahiro M.; McAbee, Jessica M. et al. (2012): Direct interaction of ligand-receptor pairs specifying

stomatal patterning. In: *Genes & development* 26 (2), S. 126–136. DOI: 10.1101/gad.179895.111.

Li, Jia; Wen, Jiangqi; Lease, Kevin A.; Doke, Jason T.; Tax, Frans E.; Walker, John C. (2002): BAK1, an Arabidopsis LRR Receptor-like Protein Kinase, Interacts with BRI1 and Modulates Brassinosteroid Signaling. In: *Cell* 110 (2), S. 213–222. DOI: 10.1016/S0092-8674(02)00812-7.

Li, Jianming; Chory, Joanne (1997): A Putative Leucine-Rich Repeat Receptor Kinase Involved in Brassinosteroid Signal Transduction. In: *Cell* 90 (5), S. 929–938. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80357-8.

Lin, Guangzhong; Zhang, Liang; Han, Zhifu; Yang, Xinru; Liu, Weijia; Li, Ertong et al. (2017): A receptor-like protein acts as a specificity switch for the regulation of stomatal development. In: *Genes & development* 31 (9), S. 927–938. DOI: 10.1101/gad.297580.117.

Llorente, Francisco; Alonso-Blanco, Carlos; Sánchez-Rodríguez, Clara; Jorda, Lucía; Molina, Antonio (2005): ERECTA receptor-like kinase and heterotrimeric G protein from Arabidopsis are required for resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*. In: *The Plant Journal* 43 (2), S. 165–180. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2005.02440.x.

Louis-Jeune, Caroline; Andrade-Navarro, Miguel A.; Perez-Iratxeta, Carol (2012): Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. In: *Proteins* 80 (2), S. 374–381. DOI: 10.1002/prot.23188.

Lu, Diannan; Liu, Zheng (2008): Dynamic redox environment-intensified disulfide bond shuffling for protein refolding in vitro. Molecular simulation and experimental validation. In: *The journal of physical chemistry. B* 112 (47), S. 15127–15133. DOI: 10.1021/jp804649g.

MacAlister, Cora A.; Bergmann, Dominique C. (2011): Sequence and function of basic helix-loop-helix proteins required for stomatal development in Arabidopsis are deeply conserved in land plants. In: *Evolution & development* 13 (2), S. 182–192. DOI: 10.1111/j.1525-142X.2011.00468.x.

MacAlister, Cora A.; Ohashi-Ito, Kyoko; Bergmann, Dominique C. (2007): Transcription factor control of asymmetric cell divisions that establish the stomatal lineage. In: *Nature* 445 (7127), S. 537–540. DOI: 10.1038/nature05491.

Masle, Josette; Gilmore, Scott R.; Farquhar, Graham D. (2005): The ERECTA gene regulates plant transpiration efficiency in Arabidopsis. In: *Nature* 436 (7052), S. 866–870. DOI: 10.1038/nature03835.

Meng, Elaine C.; Pettersen, Eric F.; Couch, Gregory S.; Huang, Conrad C.; Ferrin, Thomas E. (2006): Tools for integrated sequence-structure analysis with UCSF Chimera. In: *BMC bioinformatics* 7, S. 339. DOI: 10.1186/1471-2105-7-339.

Meng, Xiangzong; Chen, Xin; Mang, Hyunggon; Liu, Chenglong; Yu, Xiao; Gao, Xiquan et al. (2015): Differential Function of Arabidopsis SERK Family Receptor-like Kinases in Stomatal Patterning. In: *Current biology : CB* 25 (18), S. 2361–2372. DOI: 10.1016/j.cub.2015.07.068.

Meng, Xiangzong; Wang, Huachun; He, Yunxia; Liu, Yidong; Walker, John C.; Torii, Keiko U.; Zhang, Shuqun (2012): A MAPK cascade downstream of ERECTA receptor-like protein kinase regulates Arabidopsis inflorescence architecture by promoting localized cell proliferation. In: *The Plant Cell* 24 (12), S. 4948–4960. DOI: 10.1105/tpc.112.104695.

Nadeau, Jeanette A.; Sack, Fred D. (2002): Control of stomatal distribution on the Arabidopsis leaf surface. In: *Science (New York, N.Y.)* 296 (5573), S. 1697–1700. DOI: 10.1126/science.1069596.

Nam, Kyoung Hee; Li, Jianming (2002): BRI1/BAK1, a Receptor Kinase Pair Mediating Brassinosteroid Signaling. In: *Cell* 110 (2), S. 203–212. DOI: 10.1016/S0092-8674(02)00814-0.

Niwa, Tomoko; Kondo, Tatsuhiko; Nishizawa, Michi; Kajita, Ryoko; Kakimoto, Tatsuo; Ishiguro, Sumie (2013): EPIDERMAL PATTERNING FACTOR LIKE5 peptide represses stomatal development by inhibiting meristemoid maintenance in Arabidopsis thaliana. In: *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 77 (6), S. 1287–1295. DOI: 10.1271/bbb.130145.

Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences. Recommendations 1984. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB) (1986). In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (1), S. 4–8.

Ohashi-Ito, Kyoko; Bergmann, Dominique C. (2006): Arabidopsis FAMA controls the final proliferation/differentiation switch during stomatal development. In: *The Plant Cell* 18 (10), S. 2493–2505. DOI: 10.1105/tpc.106.046136.

Ohki, Shinya; Takeuchi, Makoto; Mori, Masashi (2011): The NMR structure of stomagen reveals the basis of stomatal density regulation by plant peptide hormones. In: *Nature communications* 2, S. 512. DOI: 10.1038/ncomms1520.

Pettersen, Eric F.; Goddard, Thomas D.; Huang, Conrad C.; Couch, Gregory S.; Greenblatt, Daniel M.; Meng, Elaine C.; Ferrin, Thomas E. (2004): UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. In: *Journal of computational chemistry* 25 (13), S. 1605–1612. DOI: 10.1002/jcc.20084.

Pierce, J. G.; Giudice, L. C.; Reeve, J. R. (1976): Studies on the disulfide bonds of glycoprotein hormones. Course of reduction of bovine luteinizing hormone, bovine thyroid-stimulating hormone, and their subunits. In: *The Journal of biological chemistry* 251 (20), S. 6388–6391.

Pillitteri, Lynn Jo; Bemis, Shannon M.; Shpak, Elena D.; Torii, Keiko U. (2007a): Haploinsufficiency after successive loss of signaling reveals a role for ERECTA-family genes in Arabidopsis ovule development. In: *Development* 134 (17), S. 3099–3109. DOI: 10.1242/dev.004788.

Pillitteri, Lynn Jo; Dong, Juan (2013): Stomatal development in Arabidopsis. In: *The Arabidopsis book* 11, e0162. DOI: 10.1199/tab.0162.

Pillitteri, Lynn Jo; Sloan, Daniel B.; Bogenschutz, Naomi L.; Torii, Keiko U. (2007b): Termination of asymmetric cell division and differentiation of stomata. In: *Nature* 445 (7127), S. 501–505. DOI: 10.1038/nature05467.

Pillitteri, Lynn Jo; Torii, Keiko U. (2012): Mechanisms of stomatal development. In: *Annual review of plant biology* 63, S. 591–614. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042811-105451.

Pornillos, Owen; Alam, Steven L.; Rich, Rebecca L.; Myszka, David G.; Davis, Darrell R.; Sundquist, Wesley I. (2002): Structure and functional interactions of the Tsg101 UEV domain. In: *The EMBO journal* 21 (10), S. 2397–2406. DOI: 10.1093/emboj/21.10.2397.

Qi, Xingyun; Han, Soon-Ki; Dang, Jonathan H.; Garrick, Jacqueline M.; Ito, Masaki; Hofstetter, Alex K.; Torii, Keiko U. (2017): Autocrine regulation of stomatal differentiation potential by EPF1 and ERECTA-LIKE1 ligand-receptor signaling. In: *eLife* 6. DOI: 10.7554/eLife.24102.

Rédei, George P. (1993): A heuristic glance at the past of Arabidopsis genetics. In: Csaba Koncz (Hg.): *Methods in Arabidopsis research*. [Nachdr.]. Singapore [u.a.]: WORLD SCIENTIFIC, S. 1–15.

Rychel, Amanda L.; Peterson, Kylee M.; Torii, Keiko U. (2010): Plant twitter. Ligands under 140 amino acids enforcing stomatal patterning. In: *Journal of plant research* 123 (3), S. 275–280. DOI: 10.1007/s10265-010-0330-9.

Santiago, Julia; Brandt, Benjamin; Wildhagen, Mari; Hohmann, Ulrich; Hothorn, Ludwig A.; Butenko, Melinka A.; Hothorn, Michael (2016): Mechanistic insight into a peptide hormone signaling complex mediating floral organ abscission. In: *eLife* 5. DOI: 10.7554/eLife.15075.

Schulze, Birgit; Mentzel, Tobias; Jehle, Anna K.; Mueller, Katharina; Beeler, Seraina; Boller, Thomas et al. (2010): Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (13), S. 9444–9451. DOI: 10.1074/jbc.M109.096842.

Shiu, S. H.; Bleecker, A. B. (2001): Plant receptor-like kinase gene family. Diversity, function, and signaling. In: *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2001 (113), re22. DOI: 10.1126/stke.2001.113.re22.

Shpak, E. D. (2003): Dominant-Negative Receptor Uncovers Redundancy in the Arabidopsis ERECTA Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinase Signaling Pathway That Regulates Organ Shape. In: *THE PLANT CELL ONLINE* 15 (5), S. 1095–1110. DOI: 10.1105/tpc.010413.

Shpak, Elena D.; Berthiaume, Chris T.; Hill, Emi J.; Torii, Keiko U. (2004): Synergistic interaction of three ERECTA-family receptor-like kinases controls Arabidopsis organ growth and flower development by promoting cell proliferation. In: *Development* 131 (7), S. 1491–1501. DOI: 10.1242/dev.01028.

Shpak, Elena D.; McAbee, Jessica Messmer; Pillitteri, Lynn Jo; Torii, Keiko U. (2005): Stomatal patterning and differentiation by synergistic interactions of receptor kinases. In: *Science (New York, N.Y.)* 309 (5732), S. 290–293. DOI: 10.1126/science.1109710.

Sievers, Fabian; Wilm, Andreas; Dineen, David; Gibson, Toby J.; Karplus, Kevin; Li, Weizhong et al. (2011): Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. In: *Molecular systems biology* 7, S. 539. DOI: 10.1038/msb.2011.75.

Sreerama, N.; Woody, R. W. (2000): Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra. Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. In: *Analytical biochemistry* 287 (2), S. 252–260. DOI: 10.1006/abio.2000.4880.

Sugano, Shigeo S.; Shimada, Tomoo; Imai, Yu; Okawa, Katsuya; Tamai, Atsushi; Mori, Masashi; Hara-Nishimura, Ikuko (2010): Stomagen positively regulates stomatal density in Arabidopsis. In: *Nature* 463 (7278), S. 241–244. DOI: 10.1038/nature08682.

- Sun, Yadong; Li, Lei; Macho, Alberto P.; Han, Zhifu; Hu, Zehan; Zipfel, Cyril et al. (2013): Structural basis for flg22-induced activation of the Arabidopsis FLS2-BAK1 immune complex. In: *Science (New York, N.Y.)* 342 (6158), S. 624–628. DOI: 10.1126/science.1243825.
- Takata, Naoki; Yokota, Kiyonobu; Ohki, Shinya; Mori, Masashi; Taniguchi, Toru; Kurita, Manabu (2013): Evolutionary relationship and structural characterization of the EPF/EPFL gene family. In: *PLoS one* 8 (6), e65183. DOI: 10.1371/journal.pone.0065183.
- Tameshige, Toshiaki; Okamoto, Satoshi; Lee, Jin Suk; Aida, Mitsuhiko; Tasaka, Masao; Torii, Keiko U.; Uchida, Naoyuki (2016): A Secreted Peptide and Its Receptors Shape the Auxin Response Pattern and Leaf Margin Morphogenesis. In: *Current biology : CB* 26 (18), S. 2478–2485. DOI: 10.1016/j.cub.2016.07.014.
- Terpstra, Inez R.; Snoek, L. Basten; Keurentjes, Joost J.B.; Peeters, Anton J.M.; van den Ackerveken, Guido (2010): Regulatory Network Identification by Genetical Genomics. Signaling Downstream of the Arabidopsis Receptor-Like Kinase ERECTA. In: *Plant physiology* 154 (3), S. 1067–1078. DOI: 10.1104/pp.110.159996.
- Torii, K. U.; Mitsukawa, N.; Oosumi, T.; Matsuura, Y.; Yokoyama, R.; Whittier, R. F.; Komeda, Y. (1996): The Arabidopsis ERECTA gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. In: *The Plant Cell* 8 (4), S. 735. DOI: 10.1105/tpc.8.4.735.
- Torii, Keiko U. (2012): Mix-and-match. Ligand-receptor pairs in stomatal development and beyond. In: *Trends in plant science* 17 (12), S. 711–719. DOI: 10.1016/j.tplants.2012.06.013.
- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (9), S. 4350–4354.
- Uchida, Naoyuki; Lee, Jin Suk; Horst, Robin J.; Lai, Hung-Hsueh; Kajita, Ryoko; Kakimoto, Tatsuo et al. (2012): Regulation of inflorescence architecture by intertissue layer ligand-receptor communication between endodermis and phloem. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (16), S. 6337–6342. DOI: 10.1073/pnas.1117537109.
- Uchida, Naoyuki; Shimada, Masanori; Tasaka, Masao (2013): ERECTA-family receptor kinases regulate stem cell homeostasis via buffering its cytokinin responsiveness in the shoot apical meristem. In: *Plant & cell physiology* 54 (3), S. 343–351. DOI: 10.1093/pcp/pcs109.
- Uchida, Naoyuki; Tasaka, Masao (2013): Regulation of plant vascular stem cells by endodermis-derived EPFL-family peptide hormones and phloem-expressed ERECTA-family receptor kinases. In: *Journal of experimental botany* 64 (17), S. 5335–5343. DOI: 10.1093/jxb/ert196.
- Wallis, R.; Moore, G. R.; James, R.; Kleanthous, C. (1995): Protein-protein interactions in colicin E9 DNase-immunity protein complexes. 1. Diffusion-controlled association and femtomolar binding for the cognate complex. In: *Biochemistry* 34 (42), S. 13743–13750.
- Waterhouse, Andrew M.; Procter, James B.; Martin, David M. A.; Clamp, Michèle; Barton, Geoffrey J. (2009): Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 25 (9), S. 1189–1191. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp033.

- Yamaguchi, Koji; Yamada, Kenta; Kawasaki, Tsutomu (2014): Receptor-like cytoplasmic kinases are pivotal components in pattern recognition receptor-mediated signaling in plant immunity. In: *Plant Signaling & Behavior* 8 (10), e25662. DOI: 10.4161/psb.25662.
- Yang, M.; Sack, F. D. (1995): The too many mouths and four lips mutations affect stomatal production in Arabidopsis. In: *The Plant Cell* 7 (12), S. 2227–2239. DOI: 10.1105/tpc.7.12.2227.
- Yokoyama, Ryusuke; Takahashi, Taku; Kato, Atsushi; Torii, Keiko U.; Komeda, Yoshibumi (1998): The Arabidopsis ERECTA gene is expressed in the shoot apical meristem and organ primordia. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 15 (3), S. 301–310. DOI: 10.1046/j.1365-313X.1998.00203.x.
- Zhang, Heqiao; Lin, Xiaoya; Han, Zhifu; Wang, Jizong; Qu, Li-Jia; Chai, Jijie (2016): SERK Family Receptor-like Kinases Function as Co-receptors with PXY for Plant Vascular Development. In: *Molecular plant* 9 (10), S. 1406–1414. DOI: 10.1016/j.molp.2016.07.004.

# Anhänge

## Anhang 1

```

          NcoI
          Bsp19I
          |
agg aga tat acc atg ggc cat cat cat cat cat cat cat cat cat cac agc a
R  R  Y  T  M  G  H  H  H  H  H  H  H  H  H  H  H  S  S
tcc tct ata tgg tac ccg gta tcg t

          SciI
          XhoI
          PaeR7I
          StrI
          NdeI   SlaI
          FauNDI Sfr274I
          PspXI  BamHI
          >TEV site
          |
gc ggc cat gaa aac ctg tat ttt cag gga cat atg ctc gag gat ccg gct gc
G  H  E  N  L  Y  F  Q  G  H  M  L  E  D  P  A  A
cg ccg gta ctt ttg gac ata aaa gtc cct gta tac gag ctc cta ggc cga cg

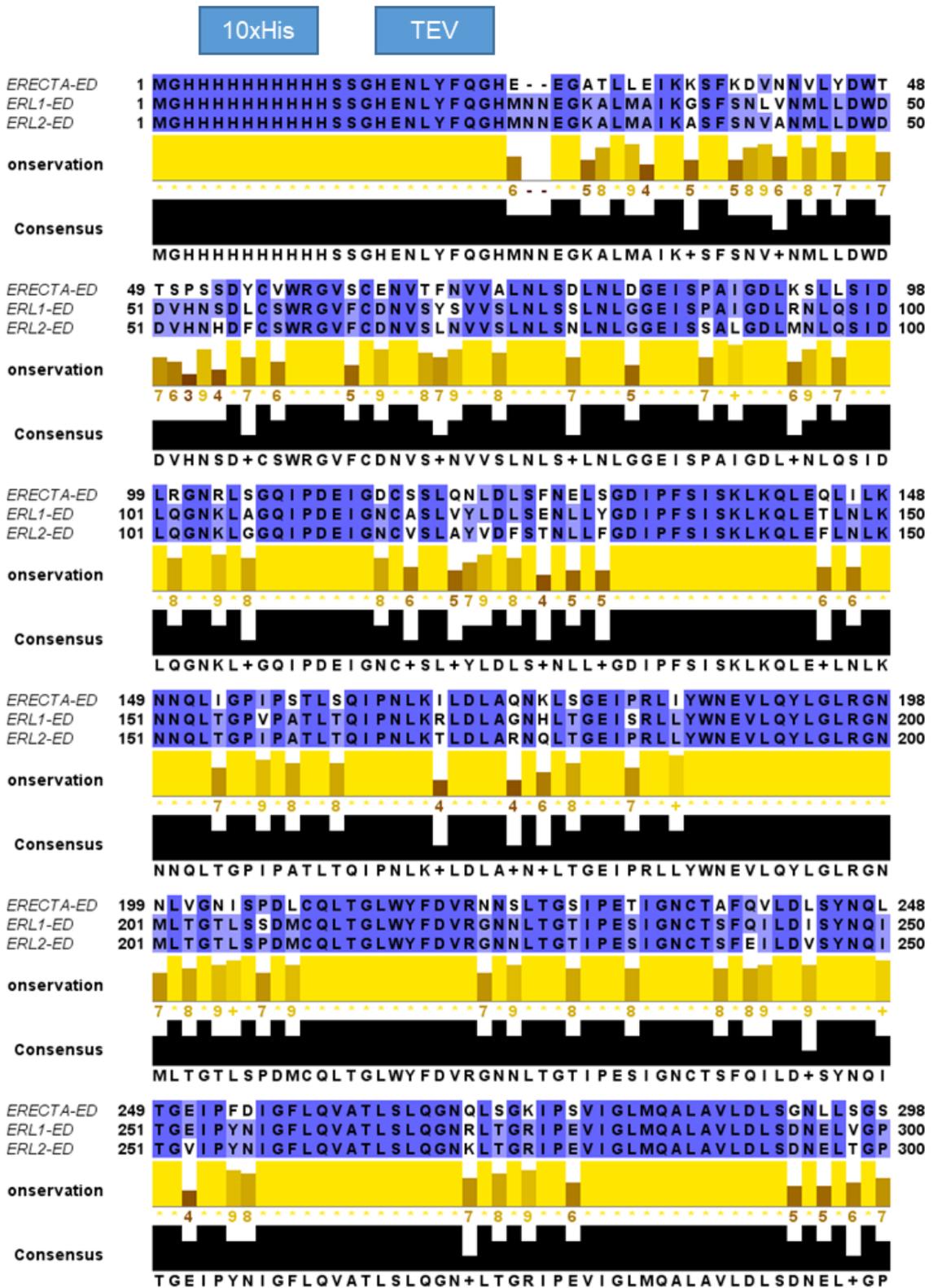
          CeiII
          Bpu1102I
          Bsp1720I
          EspI
          BlpI
          |
t aac aaa gcc cga aag gaa gct gag ttg gct gct gcc acc gct gag caa taa
N  K  A  R  K  E  A  E  L  A  A  A  T  A  E  Q  *
a ttg ttt ccg gct ttc ctt cga ctc aac cga cga cgg tgg cga ctc gtt att

          <CchIII
          |
cta gca taa ccc ctt ggg gcc tct aaa cgg gtc ttg agg ggt ttt ttg ctg
L  A  *  P  L  G  A  S  K  R  V  L  R  G  F  L  L
gat cgt att ggg gaa ccc cgg aga ttt gcc cag aac tcc cca aaa aac gac

```

Abbildung A1: pETEV16b multiple cloning site

# Anhang 2



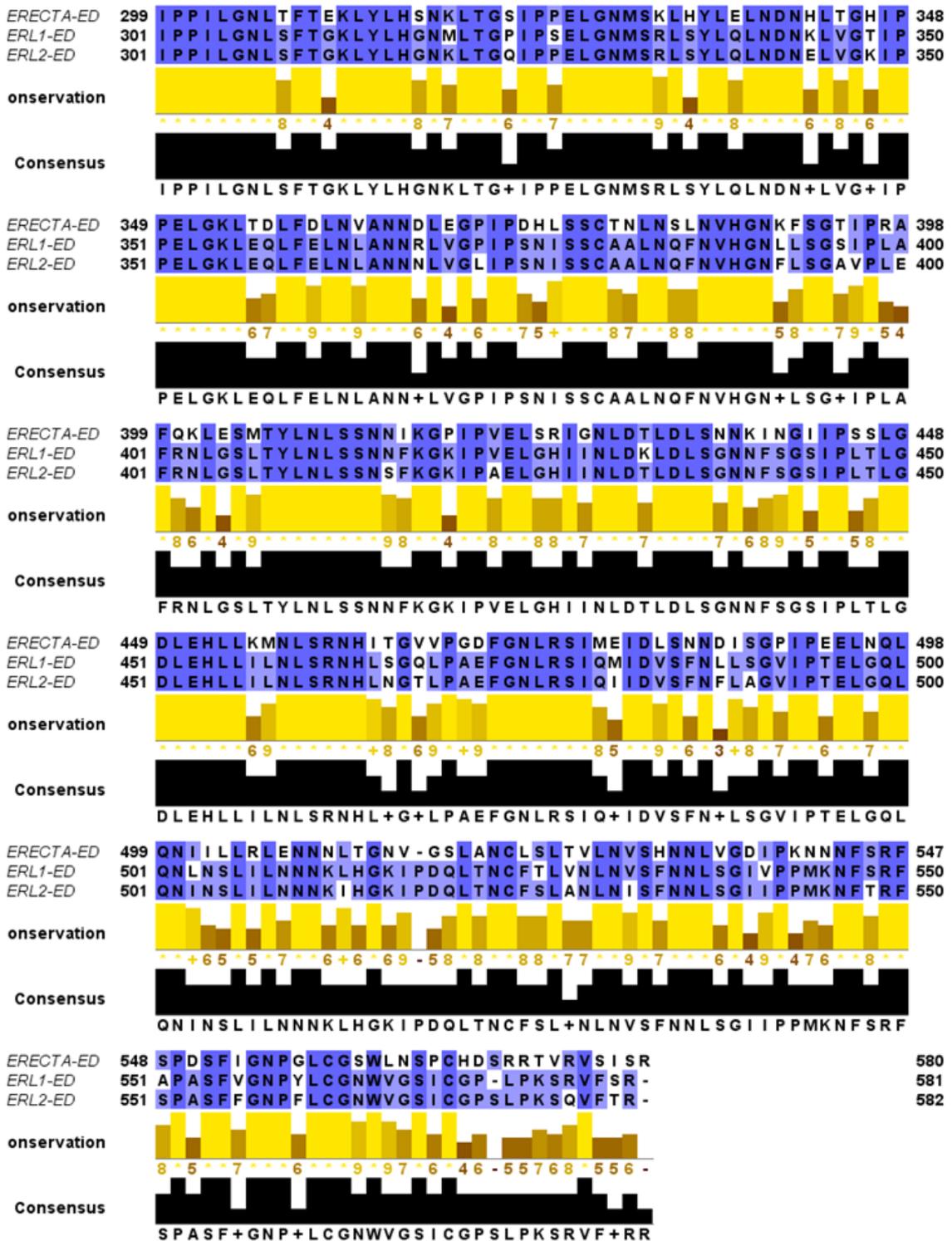


Abbildung A2: Aminosäure-alignment von ERECTA<sup>LRR</sup>, ERL1<sup>LRR</sup> und ERL2<sup>LRR</sup>

## Anhang 3

10xHis
TEV

*TMM-ED/1-476* 1 MGH<sup>10xHis</sup>HHHHHHHHSSGHENLYFQGHFTVITSDSTAP<sup>TEV</sup>SALIDGPQTGFMTN 50  
*TMM-ED/1-476* 51 DGARTEPDEQDAVYDIMRATGNDWAAAI<sup>TEV</sup>PDVCRGRWHGIECMPDQDNVYH 100  
*TMM-ED/1-476* 101 VVSL<sup>10xHis</sup>SFGALSDDTAFPTCDPQRSYVSESLTRLKHLKALFFYRCLGRAPQR 150  
*TMM-ED/1-476* 151 I<sup>10xHis</sup>PAFLGRLGSSSLQTLV<sup>TEV</sup>LTRENGFLGPI<sup>TEV</sup>PDELGNLTNLKVLDLHKNHLNGSI 200  
*TMM-ED/1-476* 201 PLSFNRFSGLRSLDLSGNRLTGSIPGFVLPALSVLDLNQNLLTGPVPPTL 250  
*TMM-ED/1-476* 251 TSCGSLIKIDLSRNRVTGPI<sup>TEV</sup>PESINRLNQLVLLDLSYNRLSGPPFSSLQG 300  
*TMM-ED/1-476* 301 LNSLQALMLKGNTKFSTTIPENAFKGLKNLMILVLSNTNIQGSIPKSLTR 350  
*TMM-ED/1-476* 351 LNSLRVLHLEGNNLTGEI<sup>TEV</sup>PLEFRDVKHLSELRLNDNSLTGPVPPERDTVW 400  
*TMM-ED/1-476* 401 RMRKLRLYNNAGLCVNRDSDLD<sup>TEV</sup>DAFGSKSGSTVRLCDAETSRPAPSGTV 450  
*TMM-ED/1-476* 451 QHLSREEDGALPDGATDVSSTSKSLG 476

**Abbildung A3:** Aminosäuresequenz von TMM<sup>LRR</sup>

## Anhang 4

10xHis
TEV

*BAK-ED/1-224* 1 MGH<sup>10xHis</sup>HHHHHHHHHHSSGHENLYFQGHNAEGDAL<sup>TEV</sup>SALKNSLADPNKVLQSWDA 50  
*BAK-ED/1-224* 51 TLVTPCTWFHVTCNSDNSVTRVDLGNANLSGQLVMQLGQLPNLQYLELYS 100  
*BAK-ED/1-224* 101 NNITGTIPEQLGNLTELVS<sup>TEV</sup>LDLYLNNLSGPI<sup>TEV</sup>PSTLGR<sup>TEV</sup>LKKLRF<sup>TEV</sup>LRLNNNS 150  
*BAK-ED/1-224* 151 LSGEIPRSLTAVLTLQVLDLSNNPLTGDIPVNGSFSLFTPI<sup>TEV</sup>SFANTKLTP 200  
*BAK-ED/1-224* 201 LPASPPPI<sup>TEV</sup>SPTPPSPAGSNRITG 224

**Abbildung A4:** Aminosäuresequenz von BAK1<sup>LRR</sup>

## Anhang 5

	GST		
GST-EPFL2/1-330	1 MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGL	50	
GST-EPFL2 C>S	1 MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGL	50	
	GST		
GST-EPFL2/1-330	51 EFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVL	100	
GST-EPFL2 C>S	51 EFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVL	100	
	GST		
GST-EPFL2/1-330	101 DIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTH	150	
GST-EPFL2 C>S	101 DIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTH	150	
	GST		
GST-EPFL2/1-330	151 PDFMLYDALDVVLYMDPMC LDAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIA	200	
GST-EPFL2 C>S	151 PDFMLYDALDVVLYMDPMC LDAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIA	200	
	GST	6xHis	TEV
GST-EPFL2/1-330	201 WPLQGQWQATFGGGDHPPKSDGSTSGSGHHHHHSGHENLYFQGHIGSRPP	250	
GST-EPFL2 C>S	201 WPLQGQWQATFGGGDHPPKSDGSTSGSGHHHHHSGHENLYFQGHIGSRPP	250	
GST-EPFL2/1-330	251 RCERVRCRSCGHCEAIQVPTNPQTKLHSP LTTSSSSSSSETIHLDYTRGDD	300	
GST-EPFL2 C>S	251 RSERVRSRSGHSEAIQVPTNPQTKLHSP LTTSSSSSSSETIHLDYTRGDD	300	
		8xHis	
GST-EPFL2/1-330	301 STNYKPM SWKCKCGNSIYNPLEHHHHHHHH	330	
GST-EPFL2 C>S	301 STNYKPM SWKSKSGNSIYNPLEHHHHHHHH	330	

Abbildung A5: Aminosäure-alignment von GST-EPFL2 und GST-EPFL2C>S

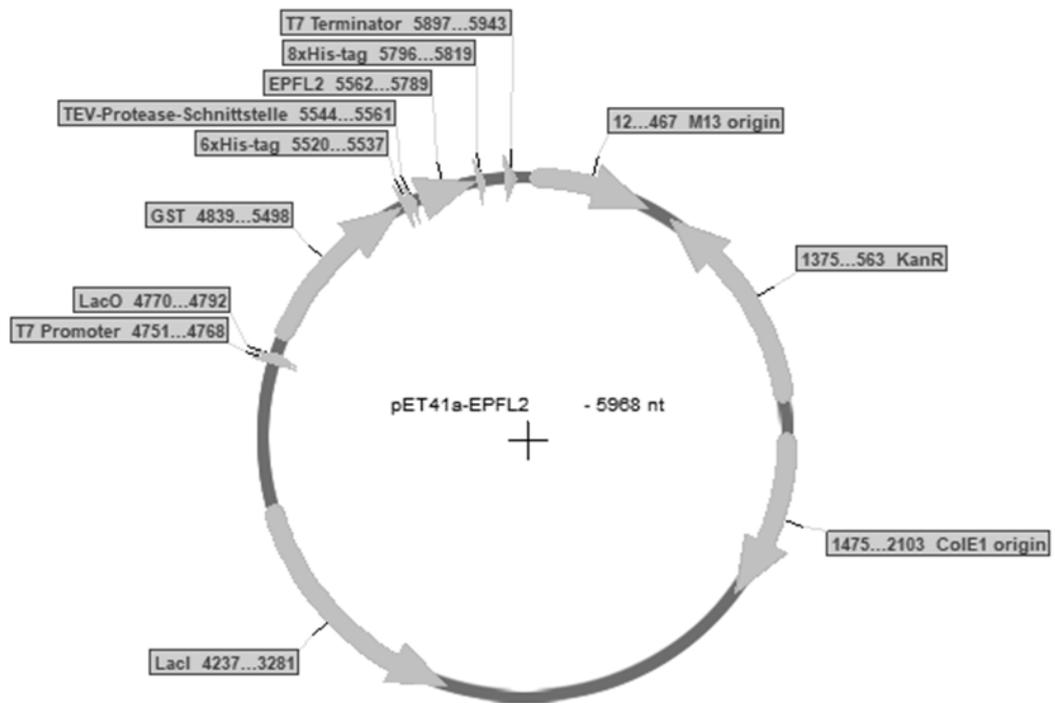
## Anhang 6

	GST	
GST-EPFL9/1-280	1 MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGL	50
	GST	
GST-EPFL9/1-280	51 EFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVL	100
	GST	
GST-EPFL9/1-280	101 DIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTH	150
	GST	
GST-EPFL9/1-280	151 PDFMLYDALDVVLYMDPMC LDAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIA	200
	GST	TEV
GST-EPFL9/1-280	201 WPLQGQWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSHENLYFQGHIGSTAPTCTYNECRG	250
GST-EPFL9/1-280	251 CRYKCRAEQVPVEGNDPINSAYHYRCVCHR	280

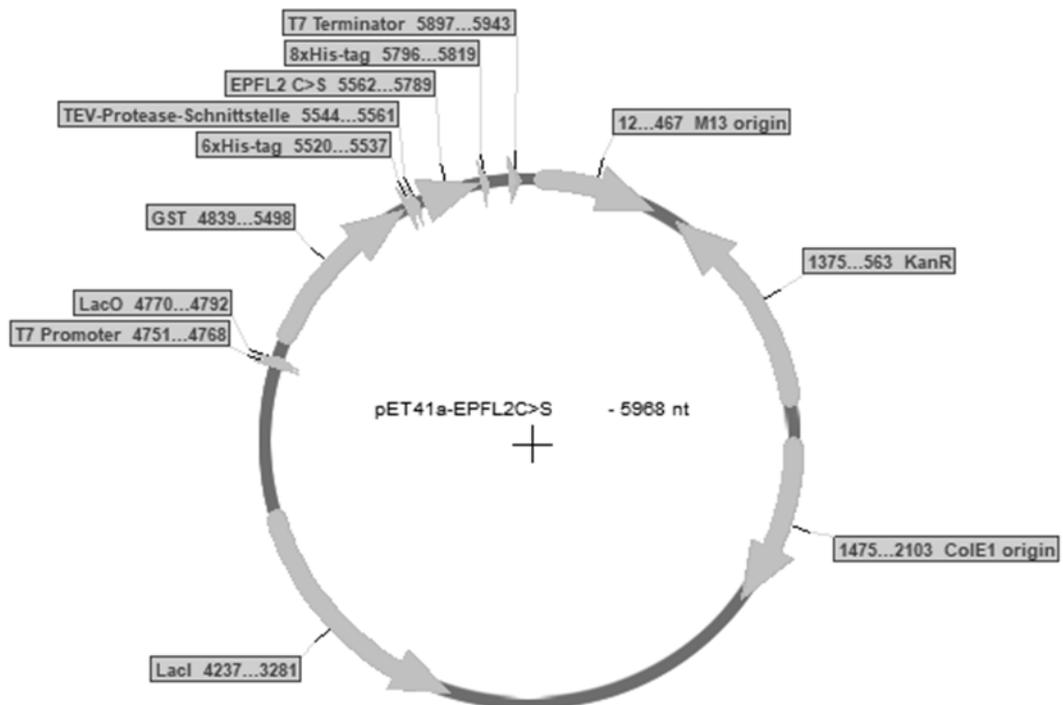
Abbildung A6: Aminosäuresequenz von GST-EPFL9

## Anhang 7

A



B



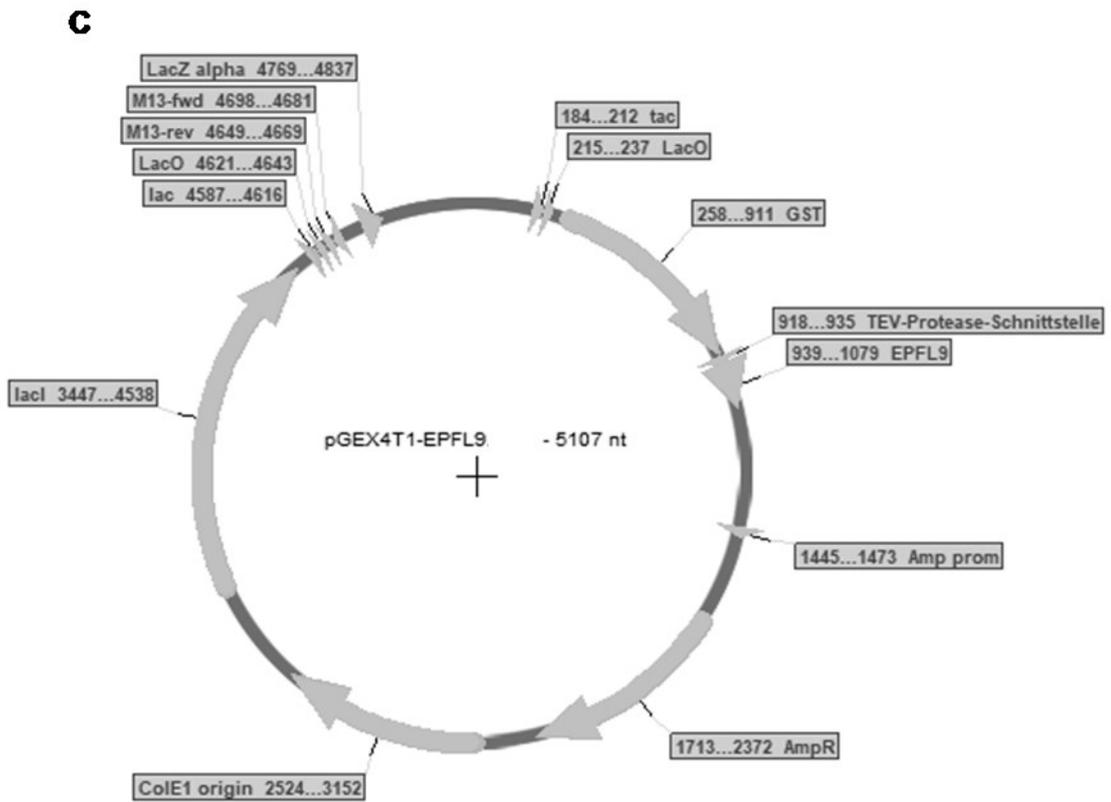
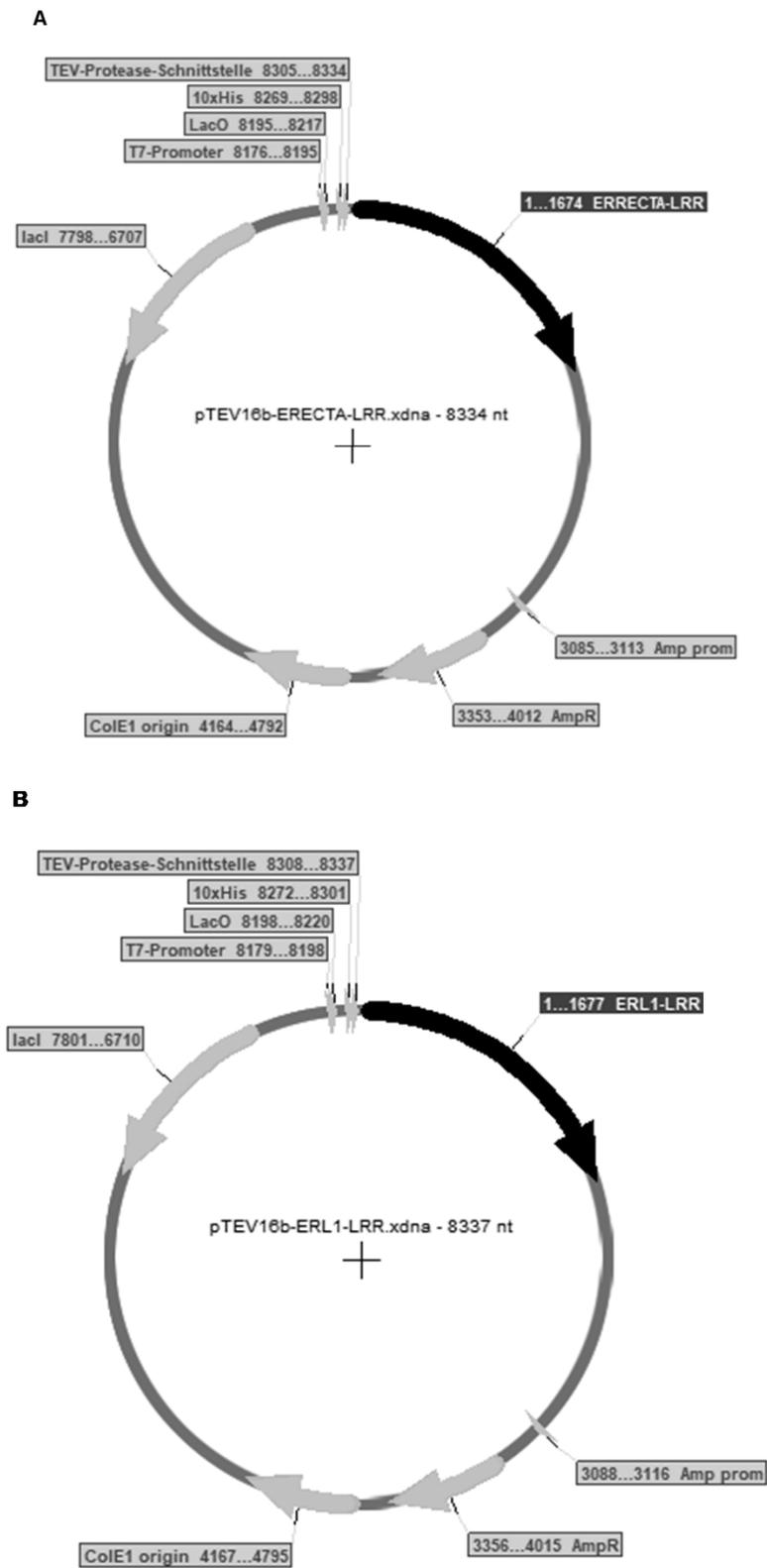
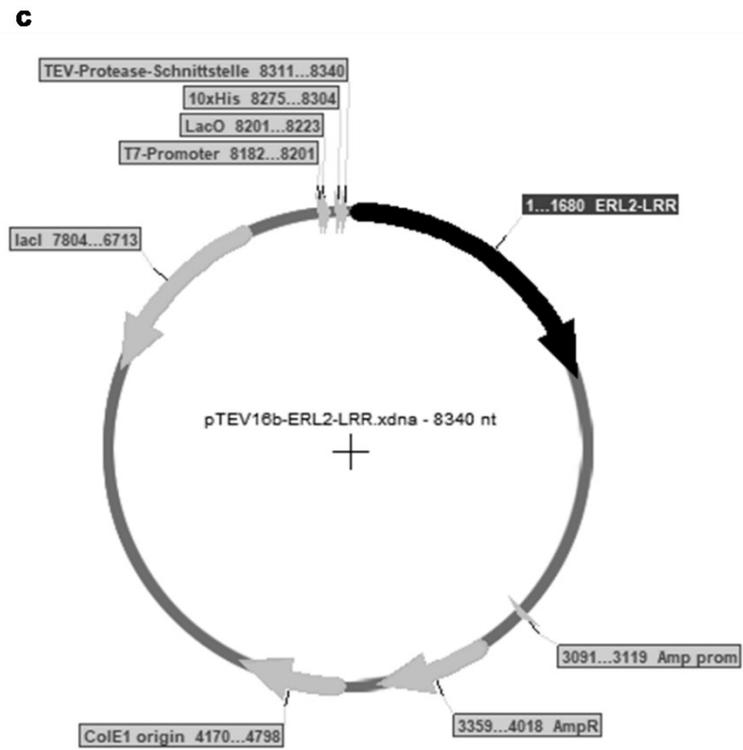


Abbildung A7: Plasmidkarten der ERF-LRRs in pETEV16b

## Anhang 8





**Abbildung A8:** Plasmidkarten von TMM<sup>LRR</sup> und BAK1<sup>LRR</sup> in pTEV16b

## Anhang 9

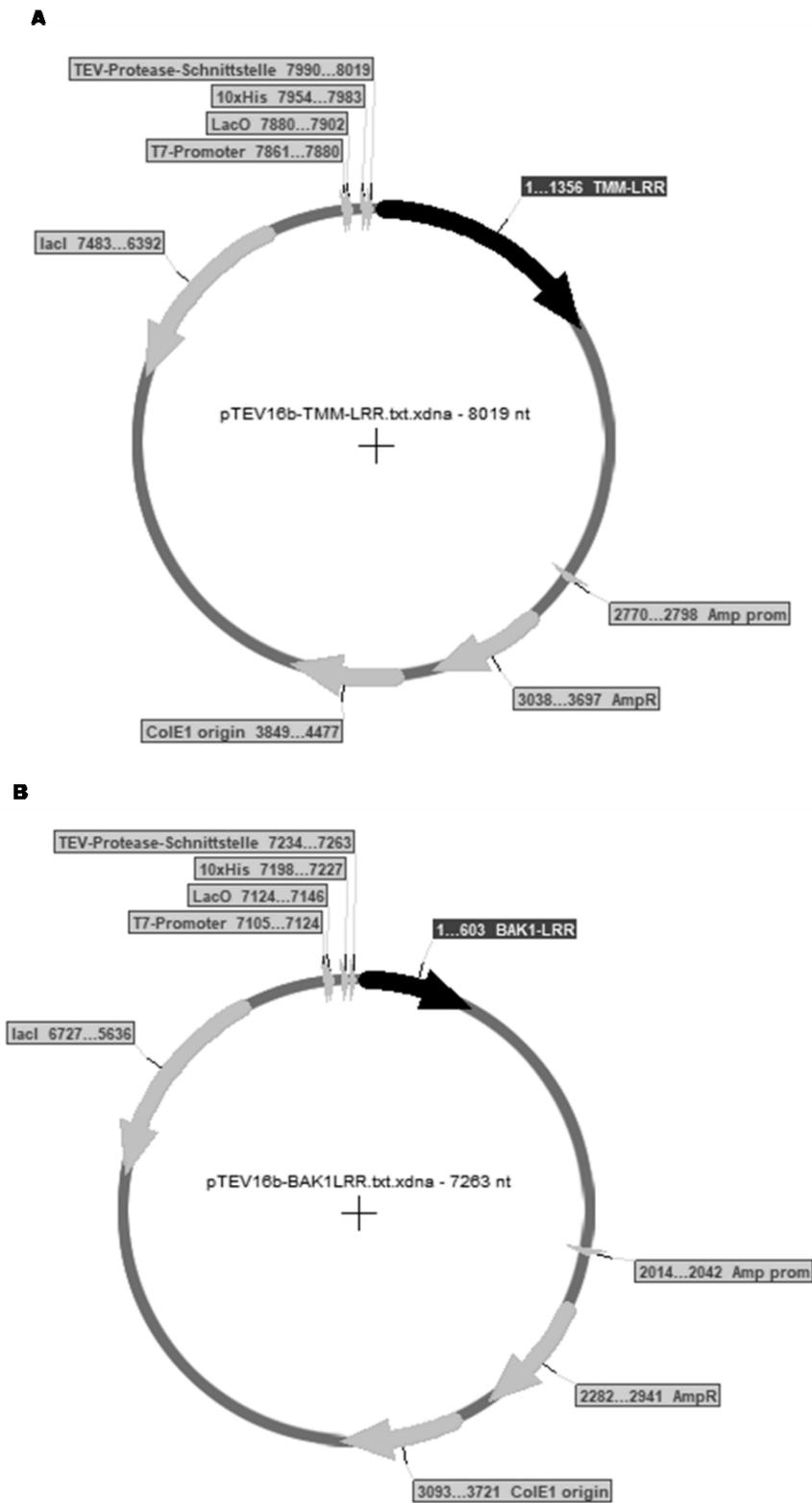


Abbildung A9: Plasmidkarten von EPFL2, EPFL2C&gt;S und EPFL9Eidesstattliche Versicherung

## Danksagung

Ganz besonderer Dank gilt an dieser Stelle natürlich Prof. Dr. Georg Gorth. Zum einen für die Bereitstellung dieses Themas und das entgegengebrachte Vertrauen, die spannenden Gespräche und den lehrreichen Input. Aber auch für die angenehme Atmosphäre im Institut und die Geduld, möchte ich dir danken.

Prof. Dr. Rüdiger Simon danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats, und die netten Gespräche und ebenfalls die Geduld.

Nozomi sei tausendfach gedankt. Für die Hilfe, die Freundschaft und den Sake.

Der gesamten AG Groth möchte ich natürlich auch danken. Nicole und Kerstin für die offenen Ohren und das angenehme Plauschen. Und würde ich alle laborrelevanten Sachen aufzählen, für die ich danken möchte und zu danken habe, bliebe kein Platz mehr für die anderen.

Mareike, Lena und Claudia, es ist ein Vergnügen, mit euch zu arbeiten. Danke für den Kaffee, die Unterhaltung und die konstruktive Kritik.

Alex vielen Dank für die Aufforderung zum regelmäßigen Rehydrieren und dem Hoffen auf eine lange stabile Ära. Wissenschaftlich wie zwischenmenschlich eine große Bereicherung.

Danke auch an Steffi und Astrid für die Unterstützung und die Antworten, auch bei blöden Fragen.

Natürlich möchte ich auch meiner Familie danken, die mich fortwährend unterstützt hat und mir bei Problemen bedingungslos zu Seite steht.

Die beiden Menschen, denen und für die ich am dankbarsten bin, wissen dies sicherlich bereits.

## Eidesstattliche Versicherung

Alexander Matthias Hofmann

Geboren am 16.09.1985 in Karl-Marx-Stadt, jetzt Chemnitz

Wohnhaft in Düsseldorf

Hiermit erkläre ich, dass ich die beigefügte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Alexander Hofmann

Düsseldorf, den 15.01.2018