

Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Bio- und Geowissenschaften
IBOC – Bioorganische Chemie

Biochemische Charakterisierung von modularen dirigierenden Proteinen

Nikolai Huwa

Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität
im Forschungszentrum Jülich

Band 47

ISBN 978-3-95806-745-5

Biochemische Charakterisierung von modularen dirigierenden Proteinen

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Nikolai Huwa
aus Tschernomolgan (Kas.)

Düsseldorf, Mai 2023

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek.
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der
Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte Bibliografische Daten
sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

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

Referent: Prof. Dr. Jörg Pietruszka

Korreferent: Prof. Dr. Ulrich Schaffrath

Tag der mdl. Prüfung: 12.05.2023

Herausgeber: Prof. Jörg Pietruszka

Umschlaggestaltung: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Druck: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Copyright: Forschungszentrum Jülich 2024

Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
im Forschungszentrum Jülich, Band 47

D 61 (Diss. Düsseldorf, Univ., 2023)

ISBN 978-3-95806-745-5

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachdrucks, des Vortrags, der Entnahme von Abbildungen und Tabellen, der Funksendung, der Mikroverfilmung oder der Vervielfältigung auf anderen Wegen und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten. Eine Vervielfältigung dieses Werkes oder von Teilen dieses Werkes ist auch im Einzelfall nur in den Grenzen der gesetzlichen Bestimmungen des Urheberrechtsgesetzes der Bundesrepublik Deutschland vom 9. September 1965 in der jeweils gültigen Fassung zulässig. Sie ist grundsätzlich vergütungspflichtig. Zuwiderhandlungen unterliegen den Strafbestimmungen des Urheberrechtsgesetzes.

Teile dieser Arbeit wurden in wissenschaftlichen Fachzeitschriften veröffentlicht oder auf wissenschaftlichen Konferenzen vorgestellt.

Publikationen

Huwa, N., Weiergräber, O. H., Fejzagić, A.V., Kirsch, C., Schaffrath, U., & Classen, T. (2022). The Crystal Structure of the Defense Conferring Rice Protein *OsJAC1* Reveals a Carbohydrate Binding Site on the Dirigent-like Domain. *Biomolecules*, 12(8), 1126.

Huwa, N., Weiergräber, O. H., Kirsch, C., Schaffrath, U., & Classen, T. (2021). Biochemical and Initial Structural Characterization of the Monocot Chimeric Jacalin *OsJAC1*. *International journal of molecular sciences*, 22(11), 5639.

Übersichtsartikel

Huwa, N., Fejzagić, A. V., Gebauer, J., & Classen, T. (2019). Halogenating enzymes for active agent synthesis: first steps are done and many have to follow. *Molecules*, 24(21), 4008.

Konferenzteilnahmen und Vorträge

EFB2021 - European Federation of Biotechnology, 10.-14. May 2021, virtual conference; Nikolai Huwa, Christian Kirsch, Oliver H. Weiergräber, Ulrich Schaffrath and Thomas Classen, »Interaction study of a rice protein conferring pathogen defense – *OsJAC1*«. (Vortrag und Poster)

14th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations (BioTrans 2019), 07.–11. July 2019, Groningen, Netherlands; Nikolai Huwa, Thomas Classen, Christian Kirsch, Ulrich Schaffrath, »Biochemical Characterization of a Monocot Chimeric Lectin - *OsJAC1*«. (Poster)

Biochemische Charakterisierung von modularen dirigierenden Proteinen

In den Teilen:

- A. Studien zur heterologen Expression der Dirigent-Proteine *AtDIR6* aus *Arabidopsis thaliana* und *FiDIR1* aus *Forsythia x intermedia*
- B. Biochemische Charakterisierung des Reisproteins *OsJAC1*

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
ZUSAMMENFASSUNG	VII
ABSTRACT	IX
A. STUDIEN ZUR HETEROLOGEN PRODUKTION DER DIRIGENT-PROTEINE ATDIR6 AUS ARABIDOPSIS THALIANA UND FIDIR1 AUS FORSYTHIA X INTERMEDIA	1
A.1 Einführung in die Thematik	2
A.1.1 Dirigent- (DIR-) Proteine	4
A.1.2 Unterfamilien von DIR-Proteinen	4
A.1.2.1 DIR-a verantwortlich für enantioselektive phenolische Kopplungsreaktionen	5
A.1.2.2 DIR-b/d beteiligt in Stress- und Abwehrreaktionen	9
A.1.2.3 DIR-c kommen nur in einkeimblättrigen Pflanzen vor	12
A.1.2.4 DIR-e treten vermehrt in der Wurzel auf	13
A.1.2.5 DIR-f/g/h/i – bisher wenig untersucht	15
A.1.3 Proteinstruktur	16
A.1.4 Phenolische Naturstoffe – Sekundärmetaboliten	18
A.1.4.1 Lignan und Neolignan	18
A.1.4.2 Terpenoide	20
A.1.4.3 Flavonoide	21
A.2 Projektbeschreibung	22
A.3 Ergebnisse und Diskussion	23
A.3.1 Löslichkeitsstudien von heterolog produzierten DIR-Proteinen	23
A.3.1.1 Fusionsprotein aus einem Löslichkeits-Tag und einem DIR-Protein	24
A.3.1.2 Einfluss von co-exprimierten Chaperonen	25
A.3.1.3 Proteinextraktion aus <i>inclusion bodies</i>	26
A.3.1.4 Einfluss des Zellkulturadditivs - Ethanol	28
A.3.1.5 Zusammenfassung der Löslichkeitsstudien	30
A.3.1.6 Proteinisolation von heterolog produzierten DIR-Proteinen	31
A.3.2 Pinoresinol Assay	33
A.3.2.1 Assay-Optimierung mittels <i>Design of Experiment</i> (DoE)	33
A.3.2.2 Enantioselektivität von heterolog produzierten DIR-Proteinen	34
A.4 Ausblick	36
A.4.1 Löslichkeit der rekombinanten DIR-Proteine	37
A.4.2 Enantioselektivität von rekombinanten DIR-Proteinen	40
A.4.3 Untersuchung von putativen pinoresinolbildenden DIR-Proteinen	40
B. BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DES REISPROTEINS OSJAC1	45
B.1 Einleitung in die Thematik	46
B.1.1 Lektine – mehr als kohlenhydratbindende Proteine	48
B.1.1.1 Die Vielseitigkeit der Jacalin-ähnlichen Lektine (JRL)	50
B.1.1.2 Monocot chimäre Lektine (MCJ) bestehen aus zwei Domänen	52
Unterteilung und Funktionen von MCJs in der Pflanze	52
Zuckeraffinität der JRL-Domäne in MCJs	55
Dirigent-Domäne in MCJ – wenige physiologische Funktionen sind bekannt	60
B.2 Projektbeschreibung	61

Inhaltsverzeichnis

B.3	Ergebnisse und Diskussion	64
B.3.1	Klonierung und Konstruktdesign	64
B.3.2	Heterologe Produktion und Isolation von <i>OsJAC1</i> und der Einzeldomänen (DIR und JRL) aus <i>E. coli</i>	66
B.3.2.1	Beobachtete Schwierigkeiten im Handling der Proteine	67
	Expressionsprobleme zurückzuführen auf kryokonservierte <i>E. coli</i> Kulturen	67
	Wahl des Isolations-Tags: Strep-Tag® oder His-Tag	68
	Doppelbanden im SDS-PAGE aufgrund der Probenvorbereitung	70
	Verfärbung der Proteinlösung von <i>OsJAC1</i> und der individuellen DIR-Domäne	71
	Identifizierung der Proteinverunreinigung in <i>OsJAC1</i> -Proben	73
	Zusammenfassung der optimierten Expressionsbedingungen	74
B.3.2.2	Größenausschlusschromatographie von <i>OsJAC1</i> und seinen zwei Domänen	74
B.3.3	Biochemische und strukturelle Charakterisierung	80
B.3.3.1	Schmelzpunktbestimmung als Maß der Proteinstabilität	80
B.3.3.2	Pinoresinol Assay	86
B.3.3.3	Erstes Modell für das Volllängenprotein <i>OsJAC1</i>	87
B.3.3.4	Strukturbestimmung	88
	Fern-UV-Zirkulardichroismus-Spektroskopie zur Bestimmung des Sekundärstrukturgehalts	88
	Röntgenkristallographie – Proteinstrukturbestimmung	89
B.3.3.5	Untersuchung der Oligomerisierung von <i>OsJAC1</i>	106
	Bestimmung der apparenten Molekularmasse mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS)	106
	Protein-Protein Docking der Einzeldomänen von <i>OsJAC1</i>	107
B.3.4	Interaktionsanalyse	113
B.3.4.1	<i>Protein-Liganden-Interaktionsbestimmung mittels DSF</i>	113
B.3.4.2	Nah Zirkular-Dichroismus (CD) Spektroskopie	120
B.3.4.3	Hämagglutinations-Assay	122
B.3.4.4	Docking von Laminaribiose an der <i>OsJAC1</i> -JRL	126
B.3.4.5	Co-Kristallisation von Galactobiose und der DIR-Domäne	131
B.3.4.6	<i>Pull-down-Assay</i> als Nachweis für Protein-Protein-Interaktionen (PPI)	134
B.4	Ausblick	139
B.4.1	Die DIR-Domäne von <i>OsJAC1</i>	139
B.4.2	Die JRL-Domäne von <i>OsJAC1</i>	141
B.4.3	Das Volllängenprotein <i>OsJAC1</i>	143
C.	EXPERIMENTALTEIL	150
C.1	Allgemeines	151
C.1.1	Geräte	151
C.1.2	Software	153
C.2	Materialien	153
C.2.1	Verbrauchsmaterialien	153
C.2.2	Nährmedien und Puffer	154
C.2.3	Stammlösungen und Standards.	155
C.2.4	Zuckerverbindungen	155
C.2.5	Plasmide und Mikroorganismen	156
C.2.6	Oligonukleotide	157
C.3	Methoden	158
C.3.1	Molekularbiologische Methoden	158
C.3.1.1	Konstrukte und Klonierung	158
	<i>Round-the-horn</i> PCR	158
	<i>Gibson-Assembly</i>	160
C.3.1.2	Plasmid-Isolation und Sequenzierung	162
C.3.1.3	Agarose-Gelelektrophorese	162
C.3.2	Mikrobiologische Methoden	163
C.3.2.1	Kultivierung von Vorkulturen und Anfertigung der Glycerinkulturen	163

Inhaltsverzeichnis

C.3.2.2	Herstellung chemischer kompetenter <i>E. coli</i> -Stämme	163
C.3.2.3	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> -Stämmen	164
C.3.2.4	Heterologe Expression	164
	Allgemeine Expressionsbedingung	164
	Optimierte Expressionsbedingungen	166
C.3.3	Proteinbiochemische Methoden	166
C.3.3.1	Zellaufschluss	167
C.3.3.2	Affinitätschromatographie für die Proteinisolation	167
	Isolation mittels StrepTactin®-Affinitätschromatographie	167
	Isolationsbedingung mittels IMAC	168
C.3.3.3	Größenausschlusschromatographie	168
C.3.3.4	Konzentrierung von Proteinfractionen und Pufferaustausch	168
C.3.3.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	169
C.3.3.6	Proteinkonzentrationsbestimmung	170
C.3.3.7	Proteolytischer Verdau	170
	Spaltung des Fusionsproteins	170
	Spaltung des Affinitäts-Tags (His ₆)	170
	Proteom-Verdau	171
C.3.3.8	Proteinextraktion aus <i>inclusion bodies</i>	171
C.3.4	Pinoresinol Assay	171
C.3.5	Interaktionsanalysen	172
C.3.5.1	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	172
C.3.5.2	Differential Scanning Fluorimetrie (DSF)	172
C.3.5.3	Hämagglutinations-Assay	173
C.3.5.4	<i>Pull-down-Assay</i>	173
C.3.6	Strukturbiologische Methoden	175
C.3.6.1	Zirkulardichroismus- (CD) Spektroskopie	175
C.3.6.2	Kristallisation, <i>Soaking</i> -Experimente und Datensammlung	177
C.3.6.3	Strukturbestimmung und -verfeinerung	178
C.3.6.4	Liganden-Protein und Protein-Protein-Docking	178
C.3.7	Analytische Methoden	178
C.3.7.1	Photometer	178
C.3.7.2	Chirale-LC	179
C.3.7.3	MALDI-ToF-MS Analyse	180
D.	ANHANG	182
D.1	Studien zur heterologen Produktion der Dirigent-Proteine AtDIR6 aus <i>A. thaliana</i> und FiDIR1 aus <i>F. intermedia</i>	183
D.1.1	Pinoresinol Assay	185
D.1.2	MALDI-ToF-MS Analyse	187
D.2	Biochemische Charakterisierung des Reisproteins OsJAC1	188
D.2.1	DLS-Daten	188
D.2.2	DSF-Daten	191
D.2.3	<i>In silico</i> Daten	193
D.2.4	Hämagglutinations-Assay	195
D.3	Vektorkarten, Nukleotid- und Aminosäuresequenzen	196
D.3.1	Expressionsvektoren	196
D.3.1.1	Vektorkarten – Pflanzliche DIR-Proteine im pET51b(+) Vektor	198
D.3.1.2	Vektorkarten – OsJAC1 und die Einzeldomänen (DIR und JRL)	205
	EIGENANTEILE AN DEN VERÖFFENTLICHTEN PUBLIKATIONEN	213
	LITERATURVERZEICHNIS	215

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNG	233
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	235

Abkürzungsverzeichnis

Alkoholdehydrogenase	ADH	Mannose	Man
Ampecillinresistenzgen	AmpR	Maltose-Bindeprotein	MBP
<i>Absorption unit</i>	AU	Monokotyl chimäre Jacalin	MCJ
β -Glucosidase-Aggregationsfaktor	BGAF	<i>Minimum inhibitory concentration</i>	MIC
<i>Bimolecular fluorescence complementation</i>	BiFC	Mannose spezifisches JRL	mJRL
<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	BLAST	2-Methyl-2,4-pentandiol	MPD
Biolumineszenz-			
Resonanzenergietransfer	BRET	<i>Mean residue weight</i>	MRW
Zirkulardichroismus	CD	Massenspektrometrie	MS
<i>Column volume</i>	CV	Molekulare Masse	MW
Dirigend	DIR	<i>Molecular weightcut-off</i>	MWCO
Dynamische Lichtstreuung	DLS	Nitrilotriessigsäure	NTA
7,2'-Dihydroxy-4'-methoxyisoflavanol	DMI	Optische Dichte	OD
<i>Design of Experiment</i>	DoE	Polyacrylamidgelelektrophorese	PAGE
<i>Differential scanning fluorimetry</i>	DSF	<i>Protein-fragment complementation assay</i>	PCA
Dithiothreitol	DTT	<i>Polymerase chain reaction</i>	PCR
Durchfluss	DF	<i>Protein data bank</i>	PDB
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i>	Isoelektrischen Punkt	pI
<i>Enantiomer excess</i>	ee	Protein-Protein-Interaktion	PPI
Fluoreszenzresonanz-Energietransfer	FRET	Rohextrakt	RE
<i>Forward</i>	fw	<i>Round-the-horn</i>	RH
Galaktose	Gal	<i>Root mean square deviation</i>	RMSD
N-Acetylgalaktosamin	GalNAc	Reaktive Sauerstoffspezies	ROS
Galaktose spezifisches JRL	gJRL	Raumtemperatur	RT
Glucose	Glc	<i>Reverse</i>	rv
Glutathion-S-Transferase	GST	<i>Sodiumdodecylsulfat</i>	SDS
Wasserstoff-Deuterium-Austausch	HDX	<i>Size exclusion chromatography</i>	SEC
Immobilized metal ion affinity chromatography	IMAC	<i>Terrific-broth</i>	TB
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	IPTG	<i>Time of Flight</i>	TOF
Jacalin-ähnlichen Lektin	JRL	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid	TRIS
Kaliumphosphatpuffer	KPi	<i>ultraviolet and visible</i>	UV-VIS
Laktose	Lac	Vereinigte Lösung	VL
Laminaribiose	Lam	<i>Yellow fluorescent protein</i>	YFP
<i>Lysogenic broth</i>	LB	Zellfreier Extrakt	ZFE
Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation	MALDI		

Aminosäuren-Buchstaben-Code

Aminosäure	3 Buchstaben	1 Buchstabe
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Zusammenfassung

Dirigent- (DIR-) Proteine werden in unterschiedlichen Proteinuntergruppen (DIR-a bis DIR-i) eingeordnet. Sie werden vorwiegend im Pflanzenreich gefunden, dabei werden sie mit unterschiedlichen adaptiven Reaktionen auf (a)biotische Stressfaktoren in Verbindung gebracht. Die ersten charakterisierten Mitglieder zeigten keine enzymatische Aktivität, konnten jedoch eine radikalische Dimerisierung (nach einer oxidativen Aktivierung) mit einer hohen Regio- und Enantioselektivität steuern. Trotz der Fähigkeit von DIR-Proteinen, pharmazeutisch relevante chirale Ausgangsstoffe zu produzieren, sind bisher kaum Anwendungsbeispiele etabliert.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Unterfamilien von DIR-Proteinen näher charakterisiert. Im ersten Teil wurden unterschiedliche Strategien angewendet, um die beiden DIR-a-Proteine (AtDIR6 und FiDIR1) heterolog und löslich in *Escherichia coli* (*E. coli*) zu produzieren. Demzufolge ergab die Kombination aus der Co-Expression von Chaperonen, niedrigen Temperaturen (15 °C) während der Überexpression und der Zugabe von 2 % Ethanol in das Kulturmedium die höchste Löslichkeit für die rekombinanten DIR-Proteine. Dadurch konnten zum ersten Mal lösliche rekombinante AtDIR6- und FiDIR1-Proteine hergestellt werden. Jedoch wiesen die Proteinfractionen nach der Isolation eine hohe Verunreinigung mit Chaperonen und eine geringe Stabilität auf. Diese beiden Hindernisse müssten in weiteren Studien bearbeitet werden, um rekombinanten DIR-Proteine in der selektiven Kopplung von Lignan zu nutzen zu können.

Der Fokus dieser Arbeit lag in der biochemischen Charakterisierung eines chimären Jacalins OsJAC1 aus der monokotylen (einkeimblättrigen) Pflanze Reis (*Oryza sativa*). Dieses Protein ist modular aufgebaut aus einer Dirigent- (DIR-) und einer Jacalin-ähnlichen Lektin- (JRL-) Domäne. Das entsprechende Gen wird in Reaktion auf verschiedene abiotische und biotische Stimuli exprimiert. Durch die erfolgreiche heterologe Expression in *E. coli* mit hohen Ausbeuten für das Volllängenprotein OsJAC1 sowie seine einzelnen Domänenproteine (DIR und JRL) konnten die Proteine systematisch untersucht werden hinsichtlich der Struktur, der biochemischen Eigenschaften und der putativen Interaktionspartner. Dieser Ansatz ermöglichte es, verschiedene Analysemethoden anzuwenden, um neue spezifische Kohlenhydrat-Interaktionspartner für die beiden Domänen zu ermitteln. Es konnte gezeigt werden, dass die JRL-Domäne eine hohe Selektivität für Mannose und Glukose aufweist. Für

Zusammenfassung

die DIR-Domäne konnte zum ersten Mal eine Selektivität für Galaktose nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte durch die Kristallisation des DIR-Domänenproteins im Komplex mit Galactobiose das neue Kohlenhydratbindemotiv ergründet werden. Durch unterschiedliche *in silico* (Protein-Protein-Docking) Untersuchungen, kombiniert mit weiteren biochemischen Untersuchungen (Schmelzpunkt, apparente Molekularmasse etc.) konnte ein erstes Modell für das Volllängenprotein erstellt werden. Die Ergebnisse in dieser Arbeit bieten Einblicke in die Strukturen und Bindungseigenschaften von OsJAC1 und seiner möglichen Funktion bei der Pathogenresistenz. Das Verständnis solcher Resistenzmechanismen gegen biotische Stressfaktoren und ihre Übertragung in moderne Züchtungsprogramme könnte den Weg zu einer umweltfreundlicheren Landwirtschaft unterstützen.

Abstract

Dirigent- (DIR-) proteins are divided into different protein subgroups (DIR-a to DIR-i) that are mainly found in the plant kingdom. They are associated with different adaptive responses to (a)biotic stresses. The first members of DIR proteins characterised showed no enzymatic activity but were able to control radical dimerization (after oxidative activation) with high regio- and stereoactivity. Despite the ability of DIR proteins to produce pharmaceutically relevant chiral precursors, only few examples of their application have been described.

In the present work, two subfamilies of DIR proteins were examined in detail. In the first part, different strategies were used to produce two DIR-a proteins (*At*DIR6 and *Fi*DIR1) heterologous and soluble in *Escherichia coli* (*E. coli*). In this regard, the combination of chaperone co-expression, low temperatures (15 °C) during overexpression and the addition of 2% ethanol to the culture medium resulted in the highest solubility for the recombinant DIR proteins. This allowed the production of soluble recombinant *At*DIR6 and *Fi*DIR1 proteins for the first time. However, after isolation, the protein fractions showed high contamination with chaperones and low stability. These two obstacles would need to be addressed in further studies in order to use recombinant DIR proteins in the selective coupling of lignans.

The focus of this work was the biochemical characterisation of the monocot chimeric jacalin (MCJ) *Os*JAC1 from *Oryza sativa*. This protein has a modular structure consisting of a dirigent (DIR) and a jacalin-like lectin (JRL) domain. The corresponding gene is expressed in response to various abiotic and biotic stimuli. Successful heterologous expression in *E. coli* with high yields for the full-length protein *Os*JAC1 and its individual domain proteins (DIR and JRL), allowed the proteins to be systematically studied in terms of structure, biochemical properties, and putative interaction partners. This approach made it possible to apply different analytical methods to identify new specific carbohydrate interaction partners for the two domains. The JRL domain was shown to be selective for mannose and glucose and, for the first time, galactose selectivity was demonstrated for the DIR domain. In addition, crystallisation of the DIR domain protein in complex with galactobiose allowed the new carbohydrate-binding motif to be explored. Through different *in silico* (protein-protein docking) investigations combined with further biochemical investigations (melting point, apparent molecular mass, etc.), a first model for the full-length protein could be established. The results in this work provide insights into the structures and binding properties of *Os*JAC1

Abstract

and its possible function in the pathogen resistance mechanism. Understanding such resistance mechanisms against biotic stress factors and transferring them into modern breeding programmes could support the development of a more environmentally benign agriculture sector.

**A. Studien zur heterologen Produktion der
Dirigent-Proteine *AtDIR6* aus
Arabidopsis thaliana und *FiDIR1* aus
*Forsythia x intermedia***

A.1 Einführung in die Thematik

Phenolische Verbindungen wie Lignin, Lignan, Neolignan und Flavonoide (für Strukturbeispiele siehe Verbindungen 1-8 in Abb. 1) sind wichtige und im Pflanzenreich weit verbreitete Sekundärmetaboliten.^[1-3] Phenolische Verbindungen spielen unter anderem eine wichtige Rolle in der Pflanzenabwehr oder in der Resistenz gegenüber Umwelteinflüssen.^[4, 5] Zusätzlich weisen sie verschiedene klinisch wichtige biologische Aktivitäten auf, wie es in unterschiedlichen Übersichtsartikeln und den dort vorgestellten Quellen verdeutlicht wird.^[6-8] Pinoresinol (**1**) zum Beispiel ist ein biosynthetischer Ausgangspunkt für viele 8,8'-verknüpfte bioaktive Lignane und Naturwirkstoffe wie das Podophyllotoxin (**2**).^[9] Seine Derivate Etopsid (**3**) und Teniposid (**4**) werden in unterschiedlichen Krebstherapien eingesetzt.^[10, 11] Entscheidend für die Herstellung solcher Wirkstoffe ist die regio- und enantioselektive Dimerisierung von Coniferylalkohol (**5**) durch pflanzliche Dirigent- (DIR-) Proteine, um das chirale Pinoresinol (**1**) mit einer C_2 -Symmetrie als Zwischenprodukt zu bilden. Bislang konnte gezeigt werden, dass diese Proteinfamilie Zugang zu unterschiedlichen phenolischen Stoffwechselklassen ermöglicht (s. A.1.4, S. 18).

Trotz der Fähigkeit von DIR-Proteinen, pharmazeutisch relevante chirale Ausgangsstoffe zu produzieren, sind bisher kaum Anwendungsbeispiele bekannt.^[12] Erschwert wird die Erforschung von beispielsweise pinoresinolbildenden DIR-Proteinen durch ihre Glykosylierung, die eventuell notwendig für ihre Löslichkeit und Aktivität ist.^[13] Daher werden sie hauptsächlich in Hefen oder Pflanzen produziert.^[12-14] Diese Herstellungsmethoden sind jedoch aufwendig, kostenintensiv und ermöglichen meistens nicht die Produktion der DIR-Proteine in großen Mengen. Um das Verständnis von DIR-Proteinen zu erhöhen und ihre Übertragung in biotechnologischen Anwendungen zu ermöglichen, werden kostengünstigere Herstellungsmöglichkeiten und höhere Proteinausbeuten benötigt. Im folgenden Abschnitt wird zunächst die Vielfältigkeit von DIR-Proteinen beschrieben und anschließend die unterschiedlichen durchgeführten Ansätze zur Produktion von rekombinanten DIR-Proteinen erläutert (A.3, S. 23).

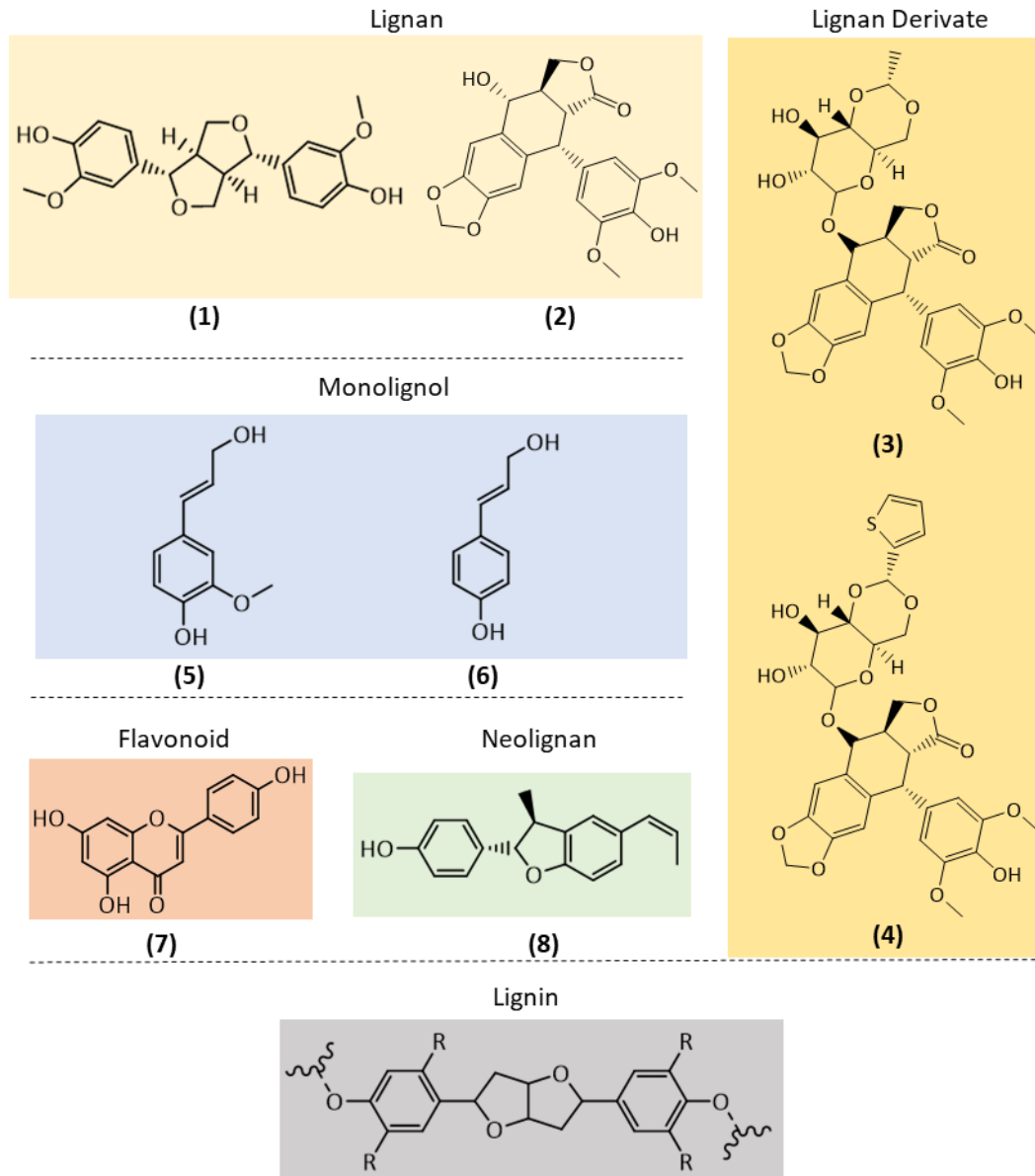


Abbildung 1: Übersicht von verschiedene phenolische Verbindungen pflanzlichen Ursprungs. Monolignole wie z.B. Coniferylalkohol (5) oder Cumarylalkohol (6), dienen als Grundbausteine für die Synthese von Lignanen, Neolignanen und Ligninen. Lignane wie Pinoresinol (1) oder Podophyllotoxin (2) wurden durch Dimerisierung (8-8' Verknüpfung) von Monolignole gebildet. Etoposid (3) und Teniposid (4) sind synthetische Derivate von Podophyllotoxin (2). Apigenin (7) gehört zu den Flavonoiden. Dimerisierung von Monolignole mit einer Abweichende Verknüpfung zu Lignanen (z. Bsp. 8-5') führt zu Conocarpin (7), das zu den Neolignanen gehört. Lignine sind Biopolymere bestehend aus Monolignol-Einheiten mit hoher Komplexität; dargestellt ist ein Ligninstrukturmotiv.

A.1.1 Dirigent- (DIR-) Proteine

Die erste biochemische Charakterisierung eines DIR-Proteins aus *Forsythia x intermedia* erfolgte 1997.^[15] Es wird als Hilfsenzym bezeichnet, welches *in vitro* eine enantioselektive Radikalkopplung eines phenolischen Naturstoffs [Coniferylalkohol (5)] bewirkt, allerdings selbst keine katalytische Aktivität aufweist.^[15] Der Name leitet sich aus dem lateinischen Wort *dirigere* (ausrichten oder führen) ab.^[15] Mittlerweile wurden zahlreiche DIR-Proteine über genomweite Analysen in unterschiedlichen Arten wie Flachs (*Linum usitatissimum*)^[16], Paprika (*Capsicum annuum*)^[17] oder kürzlich in Bakterien^[18] identifiziert. Durch die zunehmende Anzahl an DIR-Proteinen wurde mittels phylogenetischer Analysen die Proteinklasse in verschiedene Unterfamilien aufgeteilt.^[19]

A.1.2 Unterfamilien von DIR-Proteinen

Ursprünglich wurden DIR-Proteine anhand von phylogenetischen Analysen in fünf verschiedenen Unterfamilien (DIR-a bis DIR-e) gezählt.^[20] Diese Einteilung wird weiterhin beibehalten und fortlaufend durch weitere Unterfamilien (DIR-f bis DIR-i) ergänzt.^[21] Mittlerweile werden die zuvor getrennten Unterfamilien DIR-b und -d aufgrund von Clusteranalysen zusammengefasst (DIR-b/d).^[19] Abbildung 2 zeigt den phylogenetischen Baum von pflanzlichen DIR-Proteinen. Anfänglich waren die biochemischen Funktionen außerhalb der Unterfamilie DIR-a nicht bekannt, dementsprechend werden alle anderen Mitglieder der DIR-Familie als DIR-ähnlich bezeichnet.^[20]

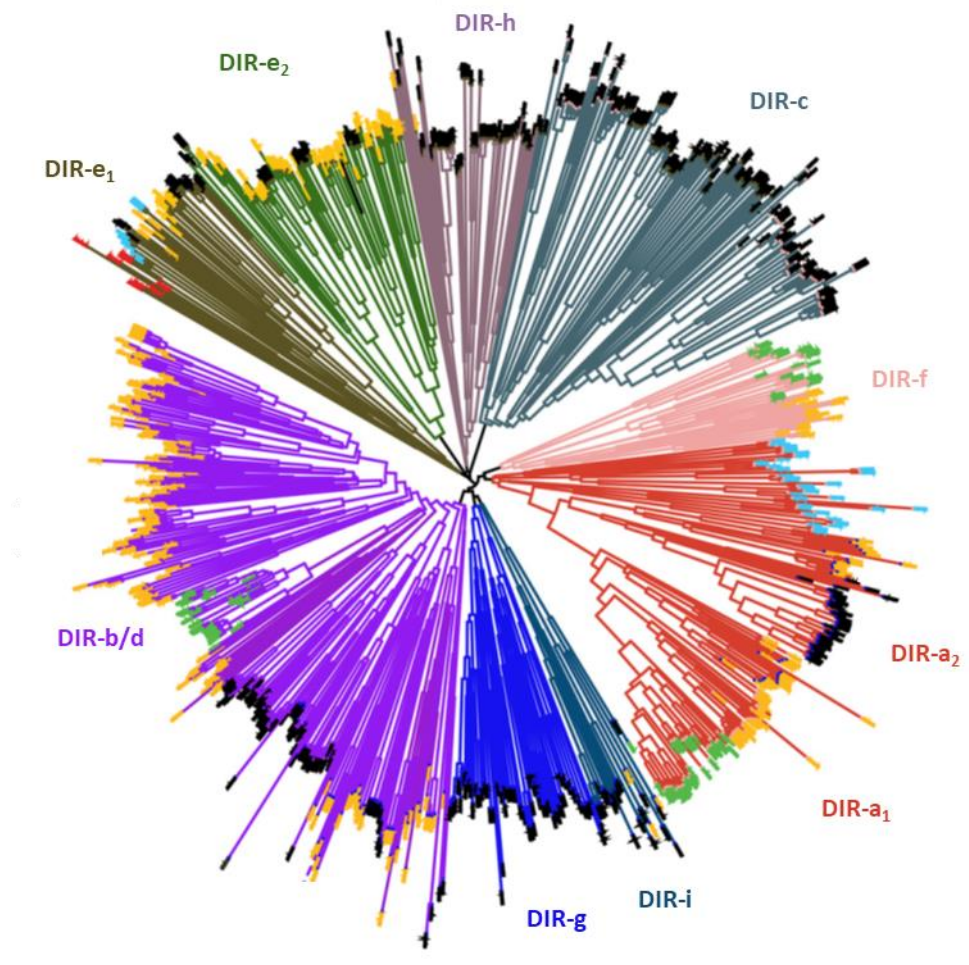


Abbildung 2: Phylogenetischer Baum von DIR-Proteinen aus *Meng et al.* (2020; creative common Lizenz (CC BY 4.0)).^[22]

A.1.2.1 DIR-a verantwortlich für enantioselektive phenolische Kopplungsreaktionen

Die Gene dieser Proteinunterfamilie sind weit verbreitet in unterschiedlichen Pflanzenklassen, insbesondere in vaskulären Pflanzen wie zweikeimblättrigen,^[23] einkeimblättrigen^[24] und nacktsamigen^[20] Pflanzen. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der literaturbekannten Vertreter und die Anzahl der ermittelten *DIR-a* Gene in den unterschiedlichen Pflanzenarten auf sowie die theoretische molekulare Masse (MW) der putativen DIR-a Proteine. Dabei handelt es sich bei den aufgelisteten MW um nicht prozessierte Proteine, die zum Beispiel in Flachs eine theoretisch spaltbare Signalsequenz am N-Terminus von 2 bis 3 kDa haben.^[16]

Studien zur heterologen Produktion der Dirigent-Proteine AtDIR6 aus *Arabidopsis thaliana* und FiDIR1 aus *Forsythia x intermedia*

Tabelle 1: Identifizierte putative *DIR-a* Gene, sowie die molekulare Masse (MW) der resultierenden Proteine. Sortiert nach vaskulärer Pflanzenklassen: zweikeimblättrigen, einkeimblättrigen Pflanzen und Nacktsamer.

Pflanzenklasse	Herkunft	Anzahl <i>DIR-a</i> Gene	MW [Da]	Referenz
Zweikeimblättrige	<i>Capsicum annuum</i>	5	17,5 – 21,2	[17]
	<i>Citrullus lanatus</i>	3	20,5 – 21,2	[23]
	<i>Cucumis melo</i>	2	21,0 – 21,4	[23]
	<i>Cucumis sativus</i>	3	21,5 – 27,4	[23]
	<i>Glycine max</i>	4	19,2 – 27,2	[25]
	<i>Gossypium barbadense</i>	8	15,7 – 21,1	[26]
	<i>Gossypium hirsutum</i>	7	19,6 – 21,1	[26]
	<i>Isatis indigotica</i>	4	20,8 – 21,6	[27]
	<i>Linum usitatissimum</i>	6	20,8 – 22,9	[16]
	<i>Medicago truncatula</i>	2	20,6 – 21,5	[28]
	<i>Populus trichocarpa</i>	8	20,3 – 24,5	[29]
	<i>Pyrus bretschneideri</i>	2	20,5 – 20,9	[30]
Einkeimblättrige	<i>Vigna radiata</i>	2	20,4 – 21,3	[31]
	<i>Oryza sativa</i>	7	16,8 – 22,4	[24]
Nacktsamer	<i>Picea</i> spp.	12	21,5 – 25,3	[19, 20]

Bisher charakterisierte Mitglieder der *DIR-a* Unterfamilie weisen hauptsächlich die enantioselektiven phenolischen Kopplungsreaktionen zur Bildung des Naturstoffs Pinoresinol (siehe Tabelle 2) auf, der zur Stoffgruppe der Lignane gehört.

In *A. thaliana* wurden Lignane und Neolignane in den Blättern^[32, 33] und Wurzeln,^[33, 34] sowie Neolignane in den Samen identifiziert.^[33] Burlat et al. berichteten über einen Zusammenhang zwischen Lignan bildenden Pflanzenzellen und dem Vorkommen von *DIR*-Proteinen.^[35] Dieser Zusammenhang wurde durch weitere Studien, die *DIR-a* Proteine in Samen (*A. thaliana*^[36] und *L. usitatissimum*^[37]), Wurzel (*A. thaliana*^[14] und *Thuja plicata*^[38]) und Blätter (*A. thaliana*) identifiziert haben, bestätigt.

Tabelle 2: Übersicht der charakterisierten DIR-a Proteine und ihre Produkte. Sortiert nach vaskulärer Pflanzenklassen: zweikeimblättrige, einkeimblättrige Pflanzen und Nacktsamer.

Pflanzenklasse	Herkunft	Protein	Produkte	Literatur
Zweikeimblättrige	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtDIR5/6	(-)-Pinoresinol	[13, 14, 39-41]
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtDIR12	Neolignan	[36]
	<i>Forsythia intermedia</i>	FiDIR1	(+)-Pinoresinol	[15, 42]
	<i>Glycine max</i>	GmPdh1	unbekannt	[43]
	<i>Glycine max</i>	GmDIR27	unbekannt	[25]
	<i>Linum usitatissimum</i>	LuDIR5/6	(-)-Pinoresinol	[16, 37]
	<i>Linum usitatissimum</i>	LuDIR1	(+)-Pinoresinol	[16, 37]
	<i>Podophyllum hexandrum</i>	PhDIR	(+)-Pinoresinol	[12]
	<i>Pisum sativum</i>	PsDRR206	(+)-Pinoresinol	[44-46]
Einkeimblättrige	<i>Schizandra chinensis</i>	ScDIR1	(+)-Pinoresinol	[14]
	<i>Triticum aestivum</i>	TaDIR13	(+)-Pinoresinol	[47]
Nacktsamer	<i>Thuja plicata</i>	TpDIR5/8	(+)-Pinoresinol	[38]

Die bisher charakterisierten DIR-a Proteine (siehe Tabelle 2) verdeutlichen, dass diese Proteinunterfamilie für die Produktion eines Pinoresinol-Enantiomers in unterschiedlichen Pflanzenklassen zuständig ist. Die Dimerisierung von Coniferylalkohol (**5**) zu Pinoresinol (**1**) wird in Abschnitt A.1.4.1 beschrieben (S. 18). Damit die selektive Dimerisierung zunächst stattfinden kann, muss zunächst das Substrat oxidativ aktiviert werden.^[20] Um die anfängliche Oxidation von Coniferylalkohol (**5**) zu katalysieren, werden anorganische Reagenzien oder Enzyme benötigt.^[20, 37, 42, 48] Hierbei weisen pinoresinolbildende DIR-Proteine eine enge Substratspezifität auf.^[15] In einer aktuellen Publikation (2021) konnte zum ersten Mal die Heterokupplung eines Coniferylalkohol-Monomers mit nicht natürlichen Coniferylalkohol-Analoga durchgeführt werden.^[12]

AtDIR12 ist der erste nachgewiesene Vertreter von neolignanbildenden DIR-Proteinen und zeigt die Fähigkeit, größere Substrate im Vergleich zu den pinoresinolbildenden DIR-Proteinen umzusetzen.^[36] Darüber hinaus sind keine weiteren Produkte von DIR-a Proteinen bekannt, jedoch wurden unterschiedliche physiologische Funktionen von *DIR-a* Genen beschrieben. Zum Beispiel wurde gezeigt, dass die Überexpression von bestimmten *DIR-a* Genen in der Sojabohne (*Glycine max*) zu einer Zunahme der Dehiszenz (Zertrümmerung der

Studien zur heterologen Produktion der Dirigent-Proteine AtDIR6 aus *Arabidopsis thaliana* und FiDIR1 aus *Forsythia x intermedia*

Pflanzenschote) führt.^[25, 43] Transkriptanalysen von der Rinde der Sitka-Fichte (*Picea sitchensis*) während des Befalls von Rüsselkäfern (*Pissodes strobi*) zeigten eine schnelle und hohe Aktivität von *DIR-a* Genen in der Stammrinde und Xylem.^[19, 20] Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *DIR-a* Gene eine Abwehrfunktion gegen Schädlinge besitzen. Zusätzlich wurde gezeigt, dass DIR-a Proteine eine Pathogenresistenz gegenüber Bakterien^[47] und Pilzen^[46, 47] in der Pflanze vermitteln können. Darunter waren pinoresinolproduzierende DIR-a Proteine wie PsDRR206 in Erbsen (*P. sativum*)^[45] und TaDIR13 in Weizen (*T. aestivum*).^[47] TaDIR13 ist bisher der einzige Vertreter von DIR-a Proteinen, welcher heterolog in *Escherichia coli* (*E. coli*) produziert und isoliert wurde.^[47]

AtDIR6 weist an Asparagin-Resten *N*-Glykosylierungen auf^[41] und für die DIR-a Proteine aus Tabelle 1 (S. 6) wurde in den meisten Fällen eine *N*-Glykosylierung prognostiziert (siehe Quellenangaben in Tabelle 1). Aus diesem Grund wurden DIR-a Proteine hauptsächlich entweder in Pflanzen,^[12, 14] Insektenzellen (*Spodoptera Sf9*^[49] und *Drosophila S2*^[38]) oder in Hefen (*Pichia pastoris*)^[13] produziert. Eine heterologe Produktion von löslichen DIR-a Proteinen in Prokaryoten war bisher im Fall von AtDIR6 nicht erfolgreich.^[13] Anhand von AtDIR6 wurde gezeigt, dass die Glykosylierung notwendig für die Struktur, Löslichkeit und Funktion des Proteins ist.^[13] Dementsprechend führte die Entfernung der Zuckerreste zu einem Verlust der Aktivität und Proteinaggregation.^[13]

A.1.2.2 DIR-b/d beteiligt in Stress- und Abwehrreaktionen

Durch die gestiegene Anzahl von identifizierten putativen *DIR*-Genen konnte festgestellt werden, dass die Proteinunterfamilien DIR-b und -d ein gemeinsames Cluster bilden und dementsprechend mittlerweile zusammengefasst werden.^[19, 27] DIR-b/d Proteine wurden insbesondere in ein- und zweikeimblättrigen Pflanzen gefunden sowie vereinzelt in *Gymnospermen* (Nacktsamer).^[20, 22] In zweikeimblättrigen Pflanzen kommen DIR-b/d Proteine hauptsächlich gemeinsam mit DIR-a und DIR-e vor (s. Tabelle 1 und 5). In dieser Pflanzenklasse bildet DIR-b/d die größte DIR-Unterfamilie. Am Beispiel von Reis^[24] (*Oryza sativa*; einkeimblättrig) und Fichte^[19] (*Picea sitchensis*; Nacktsamer) bilden DIR-b/d mit den ebenfalls auftretenden Unterfamilien DIR-c und DIR-f, eine etwa gleich große Anzahl an putativen DIR-Proteinen.

Tabelle 3 listet die Anzahl der ermittelten *DIR-b/d* Gene in den unterschiedlichen Pflanzenarten auf sowie die resultierenden MW der putativen DIR-b/d Proteine. Dabei handelt es sich bei den aufgelisteten MW, wie bereits zuvor in Tabelle 1, um nicht prozessierte Proteine.

Tabelle 3: Identifizierte putative *DIR-b/d* Gene, sowie die molekulare Masse (MW) der resultierenden Proteine. Sortiert nach zweikeimblättrigen, einkeimblättrigen Pflanzen und Nacktsamer.

Pflanzenklasse	Herkunft	Anzahl <i>DIR-b/d</i> Gene	MW [Da]	Literatur
Zweikeimblättrige	<i>Capsicum annuum</i>	12	11,6 – 21,3	[17]
	<i>Citrullus lanatus</i>	9	17,3 – 22,5	[23]
	<i>Cucumis melo</i>	10	17,0 – 22,4	[23]
	<i>Cucumis sativus</i>	9	18,3 – 41,4	[23]
	<i>Glycine max</i>	25	15,9 – 26,7	[25]
	<i>Gossypium arbadense</i>	81	10,6 – 22,7	[26]
	<i>Gossypium hirsutum</i>	82	11,9 – 22,7	[26]
	<i>Isatis indigotica</i>	8	20,2 – 21,1	[27]
	<i>Linum usitatissimum</i>	25	8,0 – 29,9	[16]
	<i>Medicago truncatula</i>	26	11,2 – 24,0	[28]
	<i>Populus trichocarpa</i>	21	8,4 – 22,6	[29]
	<i>Pyrus bretschneideri</i>	18	9,4 – 22,4	[30]
Einkeimblättrige	<i>Vigna radiata</i>	20	20,2 – 24,0	[31]
	<i>Oryza sativa</i>	10	17,4 – 20,0	[24]
Nacktsamer	<i>Picea sitchensis</i>	12	19,3 – 20,8	[19, 20]

Studien zur heterologen Produktion der Dirigent-Proteine AtDIR6 aus *Arabidopsis thaliana* und FiDIR1 aus *Forsythia x intermedia*

In einigen Fällen sind die theoretischen MW zu niedrig, um alle Elemente der Sekundärstruktur von putativen DIR-Proteinen (acht β -Stränge; s. Abschnitt A.1.3, S. 16) abzubilden. Eventuell handelt es sich hierbei um Genfragmente oder Fehler in der Sequenzierung.^[16] Dennoch wurden alle Daten wie publiziert aufgeführt. Zusätzlich sollte beachtet werden, dass die phylogenetische Auswertung abhängig von den gewählten Parametern ist. Beispielsweise wurden die beiden DIR-Proteine GhDIR1&2 zunächst in die DIR-e Unterfamilie eingeordnet^[50] und in anderen Studien als Vertreter der Unterfamilie von DIR-b/d bestätigt.^[26, 30] Unabhängig davon konnte gezeigt werden, dass DIR-b/d weniger konservierte Sequenzen enthalten als DIR-a und somit eine höhere genetische Varianz aufweisen.^[19, 47] Liu *et al.* (2021) verglichen phylogenetisch *DIR-b/d* Gene aus acht zweikeimblättrigen Pflanzenarten und zeigten eine mögliche Unterteilung von DIR-b/d in drei weitere Unterstämme.^[26] Der erste Unterstamm (DIR-b/d-I) konnte in allen acht untersuchten Pflanzenarten gefunden werden, während DIR-b/d-II abwesend in Sojabohne (*G. max*) und Weinrebe (*Vitis vinifera*) war und DIR-b/d-III nur in Baumwolle (*G. hirsutum*) vorhanden war.^[26] Diese hohe genetische Varianz spiegelt sich in den unterschiedlichen Funktionen und Produkten wieder. Tabelle 4 listet die nachgewiesenen DIR-b/d Proteine aus den unterschiedlichen Pflanzenarten auf.

Tabelle 4: Übersicht der charakterisierten DIR-b/d Proteine und ihrer Produkte. Sortiert nach vaskulären Pflanzenklassen: zweikeimblättrige und eikeimblättrige Pflanzen.

Pflanzenklasse	Herkunft	Protein	Produkte	Literatur
Zweikeimblättrige	<i>Boea hygrometrica</i>	BhDIR1	unbekannt	[51]
	<i>Cucumis sativus</i>	CsDIR16	unbekannt	[52]
	<i>Glycine max</i>	GmDIR22	(+)-Pinoresinol	[25, 53]
	<i>Glycyrrhiza echinata</i>	GePTS1	Medicarpin	[22, 54]
	<i>Gossypium arboreum</i>	GaDIR1	(+)-Gossypol	[55]
	<i>Gossypium barbadense</i>	GbDIR1	unbekannt	[55, 56]
		GbDIR2	(+)-Gossypol	[55-57]
		GbDIR78	unbekannt	[26]
	<i>Gossypium hirsutum</i>	GhDIR1/2	unbekannt	[50]
		GhDIR3	(+)-Gossypol	[57]
		GhDIR4	(+)-Gossypol	[55]
	<i>Pisum sativum</i>	PsPTS1	Medicarpin	[22]
Eikeimblättrige	<i>Saccharum hybrid cultivar</i>	ScDIR	unbekannt	[58]
	<i>Triticum aestivum</i>	TaDIR4	unbekannt	[47]

Das erste DIR-b/d Mitglied wurde in Baumwolle (*G. hirsutum* var. *marie-galante*) charakterisiert, wo es die enantioselektive Kupplungsreaktion von Hemigossypol zu (+)-Gossypol (**10**) vermittelt (Reaktionsbeschreibung in Abschnitt A.1.4.2, S. 20).^[59] Vergleichbar zu den zuvor beschriebenen DIR-a Proteinen (*FiDIR1*^[15] und *AtDIR6*^[39]) fehlte den gossypolbildenden DIR-Proteinen eine eigene oxidierende Aktivität. Sie sind somit ebenfalls auf ein oxidierendes System angewiesen.^[55, 57, 59] Gossypol ist ein Abwehrstoff in Baumwollpflanzen zum Schutz gegen Schädlinge und Krankheitserreger.^[60, 61] Dementsprechend werden gossypolbildende *DIR-b/d* Gene nach einem Pilzbefall von *Verticillium dahliae* stark induziert.^[56] *GmDIR22* aus der Sojabohne ist zurzeit das einzige nachgewiesene DIR-b/d Protein, welches vergleichbar zu DIR-a Proteinen Pinoresinol bildet.^[53] Die Überexpression von *GmDIR22* in transgenen Sojapflanzen führte zu einer erhöhten Lignan Bildung und einer verbesserten Resistenz gegen *Phytophthora sojae* (Pilzpathogen).^[53] *GhDIR1* und *GhDIR2* weisen ebenfalls eine erhöhte Akkumulation von Lignin in Baumwolle auf, wodurch die Ausbreitung von *V. dahliae* verzögert wird.^[50] Allerdings ist nicht bekannt, welche Produkte die beiden Proteine bilden.

Studien zur heterologen Produktion der Dirigent-Proteine AtDIR6 aus *Arabidopsis thaliana* und FiDIR1 aus *Forsythia x intermedia*

Zusätzlich wurde ein Zusammenhang zwischen der *DIR-b/d* Expression und unterschiedlichen abiotischen Stressfaktoren wie Trockenheit, Salzgehalt und oxidativem Stress aufgezeigt.^[51, 58] Im Fall von ScDIR wurde das Protein heterolog in *E. coli* Rosetta (DE3) produziert und vermittelte im Wirtsorganismus ebenfalls eine erhöhte abiotische Stresstoleranz.^[58] Eine weitere Stressreaktion konnte in Gurken gezeigt werden, wo die Überexpression von CsDIR16 zu einem schnelleren Abbau eines Fungizids im Vergleich zur Kontrollgruppe führte.^[52]

Allgemein wurden bisher mehr DIR-b/d Proteine heterolog produziert (*GePTS1*,^[22, 54] *GmDIR22*,^[53] *PsPTS1*,^[22] *ScDIR*^[58] und *TaDIR4*^[47]) als DIR-a Proteine (*TaDIR13*^[47]). Die erfolgreiche heterologe Expression von DIR-b/d verdeutlicht den Unterschied zu DIR-a Proteinen hinsichtlich der posttranslationalen Modifikation. Im Vergleich zu AtDIR6 weisen Gossypol-bildende DIR-Proteine zwar konservierte Glykosylierung auf, doch ist diese nicht essenziell für die Aktivität der DIR-Proteine.^[13, 57]

Wie in Tabelle 4 aufgelistet, können DIR-b/d Proteine unterschiedliche natürliche Produkte bilden und die sogenannten Pterocarpansynthasen (*GePTS1* und *PsPTS1*) sind die ersten DIR-Proteine mit nachgewiesener enzymatischer Aktivität (näheres in Abschnitt A.1.4.3, S. 21).^[22, 54]

A.1.2.3 DIR-c kommen nur in einkeimblättrigen Pflanzen vor

Die DIR-c Unterfamilie wurde ausschließlich in einkeimblättrigen Pflanzen identifiziert.^[19] Die Proteine bestehen aus zwei Domänen, eine DIR- am N-Terminus und eine Lektin- (JRL-) Domäne am C-Terminus.^[19] Entsprechend wird diese Untergruppe phylogenetisch entweder den DIR-Proteinen oder den Lektinen zugeordnet.^[20, 62] Ausführlich wird diese Proteingruppe in Abschnitt B.1.1.2 (S. 52) beschrieben.

A.1.2.4 DIR-e treten vermehrt in der Wurzel auf

DIR-e Proteine kommen in ein- und zweikeimblättrigen Pflanzen immer gemeinsam mit DIR-a und DIR-b/d vor, dies ist allerdings nicht der Fall in Nacktsamern.^[19, 26] Tabelle 5 listet die Anzahl der ermittelten *DIR-e* Gene in den unterschiedlichen Pflanzenarten auf sowie die resultierenden MW der putativen DIR-e Proteine. Dabei handelt es sich bei den aufgelisteten MW, wie bereits zuvor in den Tabellen für DIR-a und -b/d, um nicht prozessierte Proteine.

Tabelle 5: Identifizierte putative *DIR-e* Gene, sowie die molekulare Masse (MW) der resultierenden Proteine. Sortiert nach zweikeimblättrigen und einkeimblättrigen Pflanzen.

Pflanzenklasse	Herkunft	Anzahl <i>DIR-e</i> Gene	MW [Da]	Literatur
Zweikeimblättrig	<i>Capsicum annuum</i>	7	17,8 – 33,0	[17]
	<i>Citrullus lanatus</i>	4	25,6 – 41,5	[23]
	<i>Cucumis melo</i>	5	25,3 – 41,2	[23]
	<i>Cucumis sativus</i>	2	21,0 – 27,8	[23]
	<i>Glycine max</i>	15	20,0 – 41,3	[25]
	<i>Gossypium barbadense</i>	13	25,1 – 39,6	[26]
	<i>Gossypium hirsutum</i>	14	25,1 – 37,9	[26]
	<i>Isatis indigotica</i>	7	23,0 – 40,0	[27]
	<i>Linum usitatissimum</i>	5	12,8 – 29,7	[16]
	<i>Medicago truncatula</i>	13	19,3 – 40,1	[28]
	<i>Vigna radiata</i>	11	13,8 – 41,1	[31]
	<i>Populus trichocarpa</i>	11	21,0 – 41,2	[29]
	<i>Pyrus bretschneideri</i>	12	23,8 – 40,4	[30]
Einkeimblättrige	<i>Oryza sativa</i>	3	18,4 – 33,2	[24]

Wie aus der Tabelle 5 ersichtlich, haben Mitglieder der Unterfamilie DIR-e längere Aminosäuresequenzen als der Unterfamilien DIR-a und -b/d (Vergleich Tabelle 1 und 3). Jedoch weisen DIR-c aus einkeimblättrigen Pflanzen durch ihren Zwei-Domänenaufbau eine vergleichbare Größe auf (s. Tabelle 9, S. 52). Einige DIR-e Proteine aus der Mungbohne (*V. radiata*) machten weniger als die Hälfte des Volllängenproteins aus, was ebenfalls für ein Multidomänenaufbau spricht.^[31] Tabelle 6 listet die nachgewiesenen DIR-e Proteine aus den unterschiedlichen Pflanzenarten auf.

Studien zur heterologen Produktion der Dirigent-Proteine AtDIR6 aus *Arabidopsis thaliana* und FiDIR1 aus *Forsythia x intermedia*

Tabelle 6: Übersicht der charakterisierten DIR-e Proteine und ihre physiologische Funktion nach ihrer Herkunft.

Herkunft	Protein	Funktion	Literatur
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtDIR10 / ESB1	Casparische Streifen Bildung	[14, 63, 64]
<i>Capsicum annuum</i>	CaDIR7/23	Putativer Pathogen- und Stresstoleranz	[17]
<i>Linum usitatissimum</i>	LuDIR30	unbekannt	[16]

Bisher sind keine physiologischen Substrate von DIR-e Proteinen bekannt und nur sehr wenige charakterisiert. Zum Beispiel zeigte heterolog produziertes AtDIR10 in Insektenzellen (*Drosophila* Schneider2) keine Umsetzung von Coniferylalkohol.^[14] Jedoch wurde nachgewiesen, dass AtDIR10 an der Bildung von Casparischen Streifen des Wurzelgewebes beteiligt ist.^[63] Mitglieder dieser Unterklasse sind entsprechend vermehrt in der Wurzel aktiv wie AtDIR10^[14, 63], LuDIR30^[16] und DIR-e Gene in *I. indigotica*^[27] und *P. trichocarpa*^[29]. Darüber hinaus können DIR-e Gene ebenfalls in anderen Pflanzenorganen vorkommen wie in den Blättern, Sprossen und der Blüte.^[17] In der Paprikapflanze (*C. annuum*) wurde gezeigt, dass Pflanzen mit inaktivem CaDIR7-Gen anfälliger gegenüber abiotischen Stressfaktoren und Pathogenen (*Phytophthora capsici*) waren.^[17]

A.1.2.5 DIR-f/g/h/i – bisher wenig untersucht

Die Mitglieder der DIR-Unterfamilien von f bis i sind am wenigsten untersucht. Für sie wurde bisher noch keine physiologische Funktion beschrieben. DIR-f Proteine wurden bisher in *Gymnospermen*^[19, 20] und mittlerweile vermehrt in *Dicotyledoneae* (siehe Tabelle 7) identifiziert.

Tabelle 7: Identifizierte putative *DIR-f/g* Gene, sowie die molekulare Masse (MW) der resultierenden Proteine. Sortiert nach zweikeimblättrigen, einkeimblättrigen Pflanzen und Nacktsamer.

Pflanzenklasse	Herkunft	Unterfamilie	Anzahl	MW [Da]	Literatur
Zweikeimblättrig	<i>Citrullus lanatus</i>	DIR-f	3	18,4 – 20,0	[23]
	<i>Cucumis melo</i>	DIR-f	3	18,2 – 19,9	[23]
	<i>Cucumis sativus</i>	DIR-f	2	21,3 – 15,5	[23]
	<i>Glycine max</i>	DIR-f	10	17,4 – 22,7	[25]
	<i>Gossypium barbadense</i>	DIR-f	5	19,6 – 20,2	[26]
	<i>Gossypium hirsutum</i>	DIR-f	4	19,6 – 20,2	[26]
	<i>Linum usitatissimum</i>	DIR-g	3	11,7 – 19,8	[16]
	<i>Linum usitatissimum</i>	DIR-f	2	19,7	[16]
	<i>Vigna radiata</i>	DIR-f	4	18,6 – 20,1	[31]
	<i>Pyrus bretschneideri</i>	DIR-g	3	14,6 – 20,5	[30]
Einkeimblättrige	<i>Oryza sativa</i>	DIR-g*	16	17,5 – 38,7	[24]
Nacktsamer	<i>Picea sitchensis</i>	DIR-f	11	17,4 – 19,1	[19, 20]

*Zusammengesetzt aus DIR-g₁ und -g₂

Abhängig von der Anzahl und Herkunft der gewählten *DIR*-Gene für die phylogenetischen Analysen können Unterschiede in der Zuordnung der Unterfamilien auftreten. Beispielsweise wurde die DIR-g Unterfamilie ähnlich zur DIR-c als spezifisch für einkeimblättrige Pflanzen bezeichnet,^[19, 26] jedoch, wie in Tabelle 7 zu sehen, gibt es Beispiele für *Dicotyledoneae* DIR-Proteine in dieser Unterfamilie. Eventuell wird die Zuordnung durch die hohe Sequenzdivergenz in dieser Unterfamilie erschwert.^[16, 19] Aus diesem Grund wurden DIR-Proteine, die nicht den bekannten Unterfamilien (DIR-a bis -f) zugeordnet werden konnten, als artspezifische Gruppe in DIR-g klassifiziert.^[16, 23]

Nobile et al. (2017) zeigten, dass sich DIR-g eindeutig in zwei Unterfamilien aufteilen lassen (DIR-g und -h)^[21], jedoch in der Studie für *O. sativa* wurden die Untergruppen als DIR-

g_1 und $-g_2$ bezeichnet.^[24] Zusätzlich wurde die Untergruppe DIR-i eingeführt, die aus Proteinen bestehen, die DIR-Domänen enthalten.^[21]

A.1.3 Proteinstruktur

Pickel *et al.* zeigten zuerst, dass AtDIR6 und FiDIR1 hauptsächlich aus β -Faltblatt-Strukturen bestehen und postulierte mittels Homologie-Modellierung ein erstes Modell für AtDIR6.^[40] Demnach haben DIR-Proteine eine achtsträngigen antiparallele β -barrel-Architektur mit einer hydrophilen Proteinoberfläche.^[40] Die vorgeschlagene Topologie konnte in allen zwischenzeitlich publizierten Strukturen (PsDRR206^[44], AtDIR6^[41], GePTS1^[22] und PsPTS1^[22]) bestätigt werden (s. Abb. 3). PsDRR206 und AtDIR6 sind dabei Vertreter der DIR-a Unterfamilie (A.1.2.1, S. 5) und Ge/PsPTS1 Mitglieder der DIR-b/d Unterfamilie (A.1.2.2, S. 9). Die Strukturen von anderen DIR-Unterfamilien sind nach wie vor nicht bekannt.

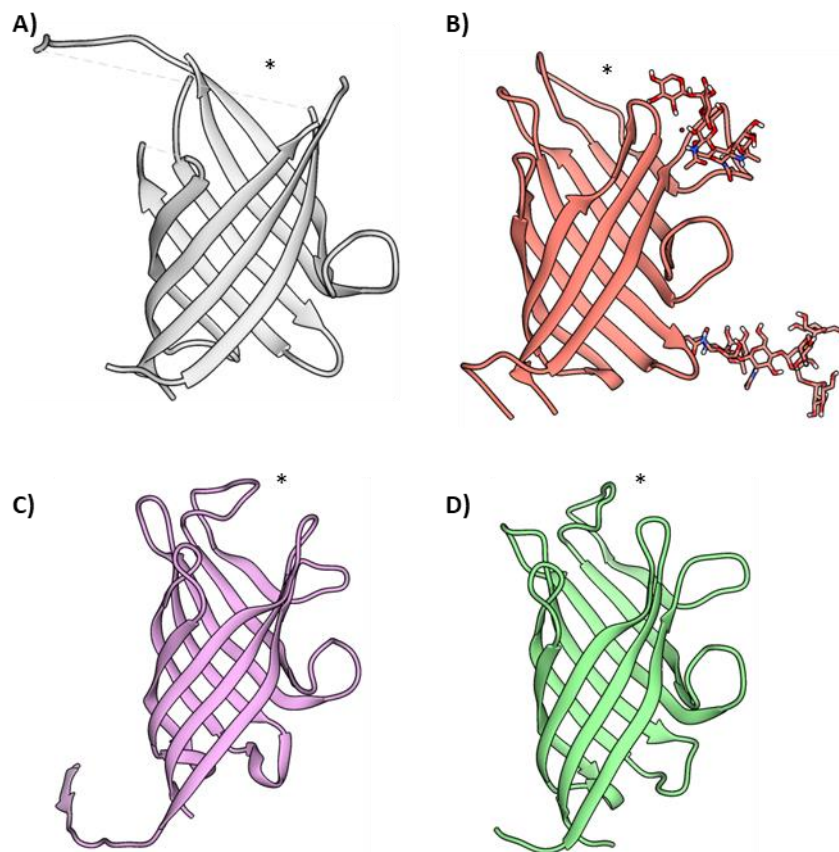


Abbildung 3: Dreidimensionale Strukturen von bisher bekannten DIR-Proteinen. **A)** Kette B von PsDRR206 (PDB-Eintrag: 4REV). **B)** Kette B von AtDIR6 (PDB-Eintrag: 5LAL). **C)** Kette C von GePTS1 (PDB-Eintrag: 6OOC). **D)** Kette A von PsPTS1 (PDB-Eintrag: 6OOD). Der Eingang des putativen aktiven Zentrums/Bindebereichs wurde mit einem * markiert und befindet sich im Protein auf der gegenüberliegenden Seite des N- und C-Terminus.

In PsDRR206 (PDB Eintrag: 4REV) konnten die Schleifen um den putativen Bindebereich (markiert mit einem * in Abb. 3) nicht aufgelöst werden, während alle anderen charakterisierten DIR-Strukturen vollständig sind.^[22, 41, 44] Neben einem ähnlichen Aufbau, bilden die DIR-

Proteine aus Abbildung 3 jeweils einen Trimer in der kristallographischen asymmetrischen Einheit aus.^[22, 41] Die beiden medicarpinbildenden DIR-Proteine (*Ge/PsPTS1*) haben jeweils sechs eigenständige DIR-Monomere in der kristallographischen asymmetrischen Einheit, die als Dimer von Trimeren angeordnet sind.^[22] Die Bildung des Trimers wurde mittels SEC-Analyse bestätigt.^[22]

Die Bindestelle des putativen aktiven Zentrums von *GePTS1* und *PsPTS1* wird als schmal, 18 Å tief und parallel zur Symmetrieachse des Trimers beschrieben.^[22] Wohingegen die Bindestellen von *AtDIR6* breiter, flacher und stärker nach außen gerichtet sind und zwei voneinander getrennte Hohlräume bilden.^[41]

A.1.4 Phenolische Naturstoffe – Sekundärmetaboliten

Phenolische Verbindungen wie Lignine, Lignane, Neolignane und Flavonoide sind wichtige pflanzliche Sekundärmetaboliten.^[1, 2] Diese Metaboliten stammen aus dem Phenylpropanoid-Stoffwechsel und sind im Pflanzenreich weit verbreitet.^[3, 65] Phenolverbindungen nehmen unterschiedliche Funktionen in der Pflanze ein, wie unter anderem in der Verteidigung oder der Stresstoleranz gegenüber Umwelteinflüssen.^[4, 5] Im Folgenden werden die phenolischen Sekundärmetaboliten vorgestellt, an denen DIR-Proteine beteiligt sind.

A.1.4.1 Lignan und Neolignan

Lignane sind Dimere aus zwei Phenylpropanoid-Einheiten (8-8' Verknüpfung) mit unterschiedlichen Oxidationsgraden und Substitutionsmustern an den aromatischen Resten (für Strukturbeispiele s. Abb. 1, S. 3).^[66] Alle anderen Formen von Verknüpfungen (z. Bsp. 8-5') werden als Neolignan bezeichnet.^[67] Bisher konnten unterschiedliche pflanzenabwehrbezogene physiologische Funktionen für die Stoffklasse nachgewiesen werden, so beispielsweise antimykotische und antibakterielle Eigenschaften sowie Antifraß.^[68, 69]

Die ersten charakterisierten DIR-Proteine (aus der Untergruppe DIR-a; S. 5) bildeten selektiv (+)- oder (-)-Pinoresinol (**1a/1b**) ausgehend von Coniferylalkohol (**5**).^[15, 38] Damit die selektive Dimerisierung stattfinden kann, muss zunächst das Substrat durch ein anderes System oxidativ aktiviert werden.^[20] Hierfür können anorganische Reagenzien (z. Bsp. Ammoniumperoxodisulfat) oder Enzyme (z. Bsp. Laccase) verwendet werden.^[20, 37, 42, 48] In Abwesenheit der DIR-Proteine findet die Phenoxyradikal-Kupplung nicht regiospezifisch und nicht enantioselektiv statt und es entstehen entsprechend unterschiedliche Nebenprodukte.^[70] Es wird davon ausgegangen, dass die DIR-Proteine in der Lage sind, die Radikale zu stabilisieren und anschließend die Kupplung selektiv zu lenken.^[41, 71] Je nach DIR-Protein einer bestimmten Pflanzenart (s. Tabelle 2, S. 7) können die unterschiedlichen Pinoresinol-Enantiomere erzeugt werden (s. Abb. 4).

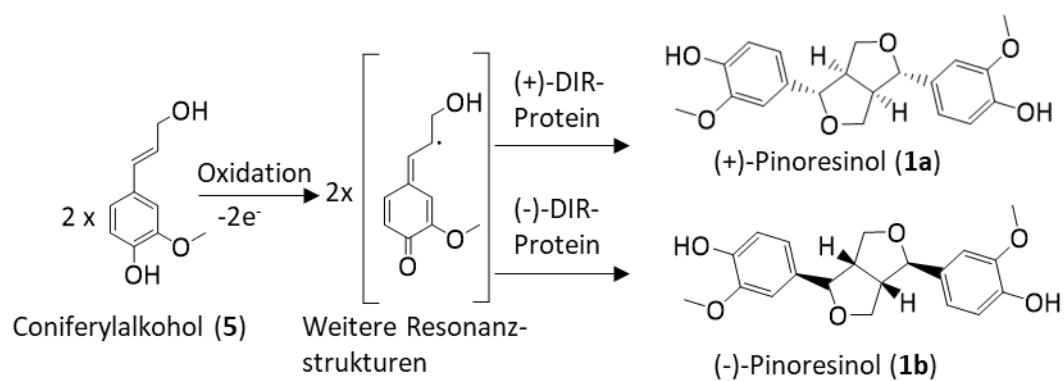


Abbildung 4: Schematische Darstellung von der Bildung der beiden Pinoresinol-Enantiomere (**1a/b**) ausgehend von Coniferylalkohol (**5**). Zunächst werden durch Oxidation freie Coniferylalkohol-Radikale gebildet. Die Radikale binden an das putative Zentrum der DIR-Proteine und werden stabilisiert. Anschließend findet eine radikalische Kopplung statt. Nach intramolekularer Zyklisierung wird in Abhängigkeit vom DIR-Protein selektiv (+)- oder (-)-Pinoresinol gebildet.^[22, 44]

A.1.4.2 Terpenoide

Terpenoide sind als Phytoalexine (antimikrobiell wirkende Substanzen) bei der direkten Verteidigung oder als Signalstoffe bei indirekten Verteidigungsreaktionen in der Pflanze beteiligt.^[72] Gossypol gehört zu den Terpenoiden und entsteht durch eine C-C-Kopplung von zwei Hemigossypol-Radikalen (s. Abb. 5).^[73] In dem resultierenden tetra-*ortho*-substituierten Biarylsystem ist die Rotation um die zentrale kovalente Einfachbindung sterisch eingeschränkt, so dass zwei Atropisomere von Gossypol existieren.^[74] Beide Isomere könnten als Abwehrstoff in der Baumwollpflanze gegen Schadinsekten eingesetzt werden.^[60, 75] Jedoch weist nur (-)-Gossypol pharmakologisch relevante Aktivitäten auf und könnte zur Behandlung verschiedener Krebsarten verwendet werden.^[76, 77] Jedoch ist (-)-Gossypol ebenfalls für Nutztiere toxisch und dadurch wird die Verwendung von Baumwollsamensöl und Baumwollsamensproteine für Lebens- und Futtermittel eingeschränkt.^[78] Vergleichbar zu den pinoresinolbildenden DIR-Proteinen (*FiDIR1*^[15] und *AtDIR6*^[39]) fehlt den gossypolbildenden DIR-Proteinen ebenfalls eine eigene oxidierende Aktivität und somit sind sie auf ein oxidierendes System angewiesen.^[55, 57, 59]

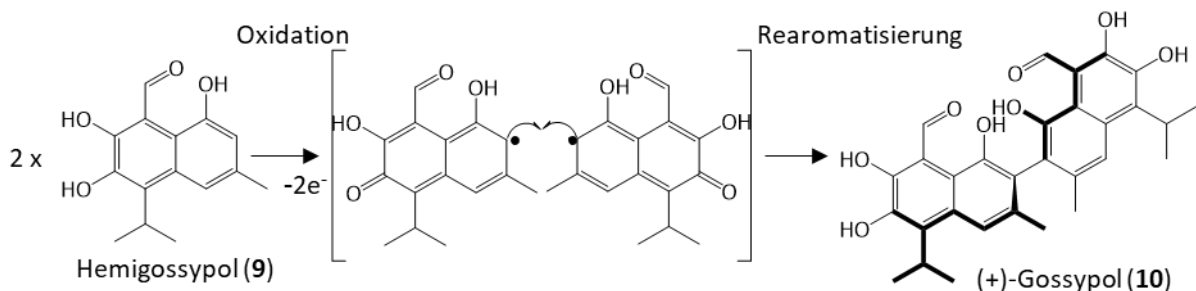


Abbildung 5: Reaktionsschema von (+)-gossypolbildenden DIR-Proteinen. Durch enantioselektive Kopplung der beiden Hemigossypol-Radikale entsteht das Bis-Chinonmethid-Derivat, dessen Rearomatisierung (+)-Gossypol (10) ergibt.

A.1.4.3 Flavonoide

Flavonoide sind eine große Gruppe von Naturstoffen mit etwa 20.000 bekannten Flavonoid-Verbindungen.^[79] Sie können nach ihrem biosynthetischen Ursprung klassifiziert werden und in unterschiedlichen Unterklassen aufgespalten werden.^[79] Pterocapane werden aus Isoflavonoiden durch die vor kurzem charakterisierten DIR-Proteine (*GePTS1* und *PsPTS1*) gebildet und enthalten ein tetrazyklisches Ringsystem.^[22, 54] Im Gegensatz zu den anderen bekannten DIR-Proteinen weisen medicarpinbildende DIR-Proteine eine eigene enzymatische Aktivität auf, die nicht von einem oxidierenden System abhängig ist.^[22] Bisher wurde die Reaktion von (3*R*,4*R*)-7,2'-Dihydroxy-4'-methoxyisoflavanol (DMI; **11a**) und (3*S*,4*R*)-DMI (**11b**) zu (–)- und (+)-Medicarpin (**12a/12b**) beschrieben (s. Abb. 6).^[22]

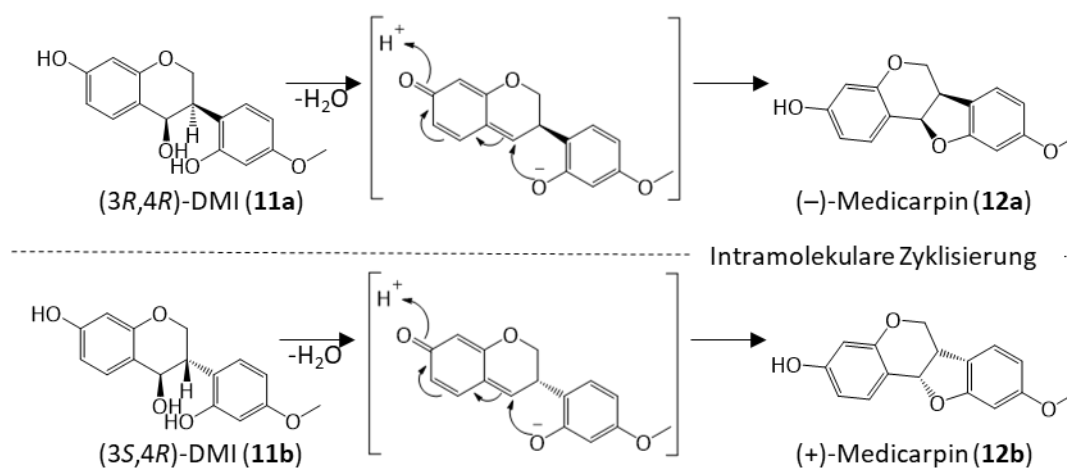


Abbildung 6: Der vorgeschlagene biochemische Mechanismus von medicarpinbildenden DIR-Proteinen beinhaltet die Bildung von Mono-Chinonmethid und eine intramolekulare Zyklisierung nach Dehydratation von chiralen Isoflavonoidsubstraten (3*R*,4*R*)-DMI (**11a**) und (3*S*,4*R*)-DMI (**11b**).^[22]

A.2 Projektbeschreibung

Seit der ersten Beschreibung von *Davin et al.* (1997) eines pinoresinolbildenden DIR-Proteins (*FiDIR1*) ist bisher eine überschaubare Anzahl weiterer DIR-a Proteine entdeckt worden (s. Tabelle 2, S. 7). Dabei wird Pinoresinol eine wichtige Rolle beim Schutz vor dem Ausbruch verschiedener Krebsarten zugeschrieben.^[80-82] Zusätzlich ist es der biosynthetische Ausgangspunkt für viele 8-8'-verknüpfte bioaktive Lignane und Naturwirkstoffe, wie das Podophyllotoxin (**2**).^[9] Seine Derivate Etoposid (**3**) und Teniposid (**4**) (s. Abb. 1, S. 3) werden in unterschiedlichen Krebstherapien eingesetzt.^[10, 11] Entscheidend für die Herstellung solcher Wirkstoffe ist die selektive Dimerisierung von Coniferylalkohol (**5**) durch pflanzliche DIR-Proteine, um das chirale Pinoresinol (**1a/1b**) mit einer C_2 -Symmetrie als Zwischenprodukt zu bilden. Trotz der Fähigkeit von DIR-Proteinen, pharmazeutisch relevante chirale Naturstoffe zu produzieren, haben DIR-Proteine bisher ein Nischendasein in der Forschung mit wenigen bekannten dreidimensionalen Strukturen (s. Abb. 3, S. 16) und kaum Anwendungsbeispiele.^[12]

Diese Diskrepanz hat eine wesentliche Ursache: Für biochemische Charakterisierungen und biotechnologische Anwendungen werden die Proteine in großen Mengen benötigt. Eine heterologe Produktion von löslichen DIR-a Proteinen in Prokaryoten war jedoch im Fall von *AtDIR6* nicht erfolgreich.^[13] Anhand von *AtDIR6* wurde gezeigt, dass die Glykosylierung notwendig für die Struktur, Löslichkeit und Funktion des Proteins ist.^[13] Dementsprechend führte die Entfernung der Zuckerreste zu einem Verlust der Aktivität und zu Proteinaggregation.^[13] Aus diesem Grund wurden DIR-a Proteine hauptsächlich entweder in Pflanzen^[12, 14], Insektenzellen (*Spodoptera Sf9*^[49] and *Drosophila S2*^[38]) oder in Hefe (*Pichia pastoris*)^[13] produziert. Diese Herstellungsmethoden sind jedoch aufwendig, kostenintensiv und ermöglichen nicht die Produktion von DIR-Proteinen in großen Mengen.

Die vorliegende Arbeit sollte Strategien zur löslichen heterologen Produktion pflanzlicher Dirigent-Proteine in *E. coli* erarbeiten. Hierfür sollten unterschiedliche Expressionsmethoden wie die Co-Expression von Chaperonen oder die Expression eines Fusionsproteins (DIR-Protein mit Löslichkeits-Tag) verfolgt werden. Zusätzlich sollte ein Pinoresinol Assay etabliert werden, um die Funktionalität der potenziell heterolog produzierten DIR-Proteine nachweisen zu können.

A.3 Ergebnisse und Diskussion

Durch vorhergehende Arbeiten von *J. Rosengarten* in der Arbeitsgruppe *Classen* waren bereits unterschiedliche Konstrukte für die heterologen Produktionsstudien der DIR-Proteine *AtDIR6* aus *A. thaliana* und *FiDIR1* aus *F. intermedia* zur Verfügung gestellt worden. Ebenfalls wurden erste Löslichkeitsstudien von *J. Rosengarten* durchgeführt. Ihre erarbeiteten Expressionsbedingungen (C.3.2.4, S. 164) wurden zunächst übernommen und ihre Ergebnisse reproduziert. Es konnte eine heterologe Genexpression für die beiden DIR-Proteine erreicht werden, jedoch befanden sich die Proteine nach dem Zellaufschluss in der Zellpellet-Fraktion (s. Abbildung 76, S. 183) und lagen nicht löslich vor. Eine heterologe Produktion von unlöslichen *AtDIR6* wurde ebenfalls von *Kazenwadel et al.* (2013) beobachtet.^[13] Die Autoren führten die Unlöslichkeit auf die fehlende Glykosylierung zurück.^[13]

Die Überexpression vieler rekombinanter Proteine in *E. coli* kann zur Bildung von unlöslichen Proteinaggregaten führen, die als *inclusion bodies* bezeichnet werden. Die Entstehungsgründe für *inclusion bodies*, die im Wesentlichen aus fehlgefalteten Proteinen bestehen, sind vielfältig. Unter anderem kann die Expression unter hohen Temperaturen, einer hohen Konzentration des Induktors und bei Expression unter starken Promotorsystemen zu einer hohen Translationsrate des gewünschten Proteins führen.^[83] Dies erschöpft jedoch das bakterielle Protein-Qualitätskontrollsystem und führt gegebenenfalls zu teilweise gefalteten oder fehlgefalteten Proteinen, die anschließend aggregieren und somit *inclusion bodies* bilden.^[84] Ebenfalls kann das Fehlen von eukaryotischen posttranslationalen Modifikationen, Fehlen von Chaperonen und falsch gebildeten Disulfidbrückenbindungen (nach dem Zellaufschluss) zur Proteinaggregation führen.^[85, 86]

A.3.1 Löslichkeitsstudien von heterolog produzierten DIR-Proteinen

Da *inclusion bodies* in den meisten Fällen keine Aktivität aufweisen, werden große Anstrengungen unternommen, um ihre Bildung zu verhindern oder zumindest teilweise zu reduzieren.^{[87-89](Quellen inkl.)} Im folgenden Abschnitt werden die unterschiedlich durchgeführten Strategien zur Erhöhung der Löslichkeit von *AtDIR6* und *FiDIR1* beschrieben.

A.3.1.1 Fusionsprotein aus einem Löslichkeits-Tag und einem DIR-Protein

Schlecht lösliche Proteine können mit anderen Proteinen fusioniert werden, um eine Verbesserung der Expressionseffizienz oder Löslichkeit zu erhalten.^[90] Als Löslichkeits-Tag wurde das 42 kDa große Maltose-Binde-Protein (MBP) verwendet. MBP ist als Fusions-Tag nicht nur für seine fördernde Löslichkeit geeignet, es kann ebenfalls passiv am Faltungsprozess beteiligt sein.^[91] Abbildung 7A zeigt ein Beispiel für die heterologe Expression des *Fi*DIR1-MBP-Fusionsproteins (MW: 60 kDa) und die anschließende Proteinisolation mittels StrepTactin®-Affinitätschromatographie. Da der Löslichkeits-Tag eventuell einen negativen Einfluss auf die Aktivität und Struktur des Zielproteins haben kann, ist die Entfernung des Tags eventuell notwendig.^[92] Die beiden hergestellten Fusionsproteine hatten jeweils eine Spaltstelle für die TEV-Protease und ihre Spaltung wurde mittels SDS-PAGE geprüft (Abb. 7B).

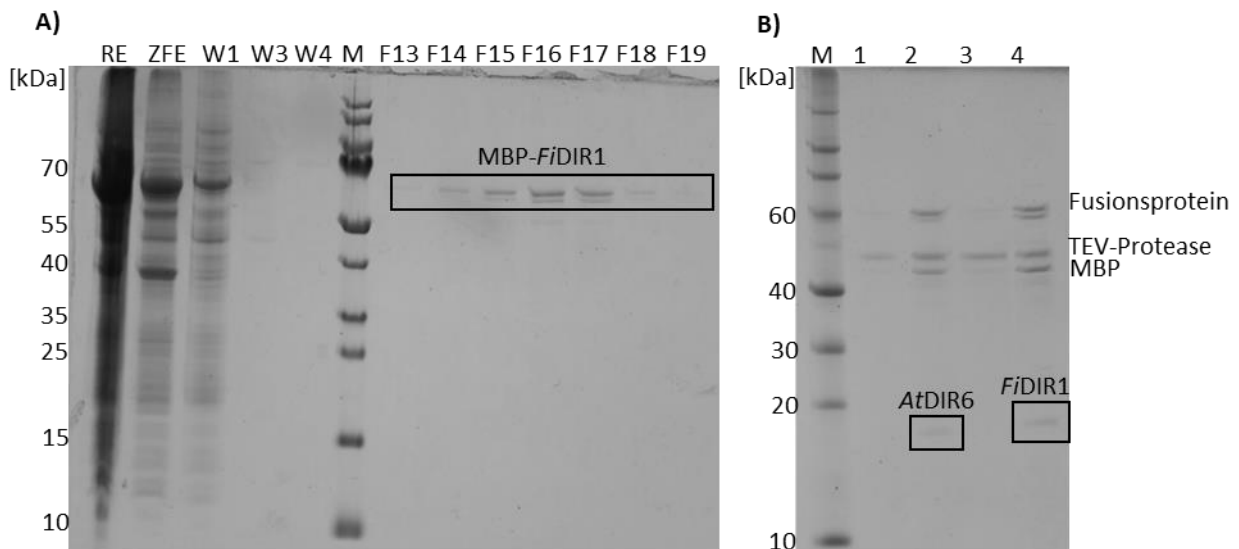


Abbildung 7: Coomassiegefärbte SDS-PAGE (10 %). **A)** Überexpression und Proteinisolation von MBP-*Fi*DIR1-Fusionsprotein (60 kDa) mittels StrepTactin®-Affinitätschromatographie. **B)** TEV-Protease-Verdau der beiden hergestellten Fusionsproteine (MBP-*At*DIR6 bzw. -*Fi*DIR1). M = Marker; RE = Rohextrakt; ZFE = zellfreier Extrakt; W# = Waschfraktion; F# = Elutionsfraktion; 1 und 3 = Verdau von etwa 100 µg FP; 2 und 4 = Verdau von etwa 500 µg FP. Die Hydrolyse des Fusionsproteins erfolgte nach den Angaben in C.3.3.7 (s. S. 170).

Die heterologe Produktion und anschließende Proteinisolation der Fusionsproteine ergab eine ausreichende Ausbeute an löslichem Protein und eine hohe Reinheit (s. Abb. 7A und Abb. 77, S. 183). Die Spaltung des MBP-Tags war erfolgreich, jedoch war die Effizienz sehr gering. Da der Strep®-Tag für die Affinitätschromatographie sich am MBP befand, wurde versucht, durch eine Umkehrchromatographie die aufgespalteten Proteine zu trennen. Hierbei sollte sich der MBP-Tag nach der Hydrolyse an die Säule binden und das entsprechende DIR-Protein würde mit der Waschfraktion eluieren. Jedoch konnte in der

Durchflussfraktion kein DIR-Protein ermittelt werden. Möglicherweise war die Wechselwirkung der DIR-Proteine mit der Säule oder dem immobilisierten MBP-Protein zu stark.

A.3.1.2 Einfluss von co-exprimierten Chaperonen

Eine allgemeine Strategie zur Verbesserung der nativen Faltung und Löslichkeit von rekombinanten Proteinen besteht darin, die zelluläre Konzentration von Chaperonen während der Expression zu erhöhen.^[87] Hierfür wurde ein Plasmid-System verwendet, das die gleichzeitige Produktion von drei Chaperonen [DnaK (70 kDa), DnaJ (40 kDa) und GrpE (35 kDa)] ermöglicht, in Kombination mit einem weiteren Plasmid für die heterologe Expression (C.3.2.1, S. 163). Die drei Chaperone sind bei der Stabilisierung von ungefalteten Proteinen (DnaK und DnaJ) und in der aktiven Faltung (GrpE) beteiligt.^[93] Abbildung 8 zeigt die Expression der drei Chaperonen und dem rekombinanten *FiDIR1*-Protein mit anschließender Proteinisolation mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) (C.3.3.2, S. 167).

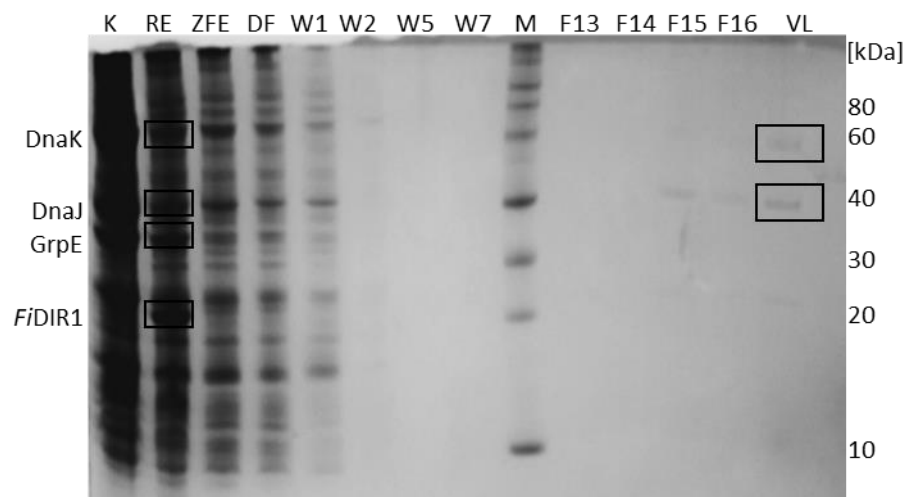


Abbildung 8: Coomassiegefärbte SDS-PAGE (10 %) der Expression von *FiDIR1* und den drei Chaperonen (DnaK, DnaJ und GrpE) mit anschließender Proteinisolation mittels IMAC. K = Kontrolle (Expression ohne *FiDIR1*); RE = Rohextrakt; ZFE = zellfreier Extrakt; DF = Durchfluss; W# = Waschfraktion mit 100 % Puffer A (20 mM Imidazol); M = Marker; F# = Elutionsfraktion mit 100 % Puffer B (250 mM Imidazol); VL = Vereinigte Lösung aller Elutionsfraktionen. Bei den eingerahmten Proteinbanden in VL könnte es sich um die co-exprimierten Chaperonen handeln, die unspezifisch an die Säule binden und dadurch isoliert wurden. Der Bildkontrast wurde erhöht, um die Banden besser hervorzuheben.

Die simultane Expression der Chaperonen und des heterologen DIR-Proteins führten zu keiner Steigerung der Löslichkeit des heterologen Proteins unter der angewendeten Expressionsbedingung (C.3.2.1, S. 163). Wie in Abbildung 8 zu sehen ist, befindet sich das heterolog produzierte DIR-Protein nach dem Zellaufschluss und anschließender Zentrifugation nicht in der löslichen Fraktion (ZFE) und somit hauptsächlich im unlöslichen Zelltrümmer-Anteil.

Studien zur heterologen Produktion der Dirigent-Proteine AtDIR6 aus *Arabidopsis thaliana* und FiDIR1 aus *Forsythia x intermedia*

Ein vergleichbares (Negativ-) Ergebnis wurde nach der heterologen Überexpression in *E. coli* ArcticExpress (DE3) beobachtet. Der Expressionsstamm *E. coli* ArcticExpress (DE3) enthält kälteangepasste Chaperonine [Cpn60 (MW: 60 kDa) und Cpn10 (MW: 10 kDa)], die jeweils aktiv an der Proteinfaltung beteiligt sind.^[94] Dadurch kann die heterologe Expression bei niedrigeren Temperaturen (< 15 °C) durchgeführt werden, was zusätzlich zu den Chaperoninen einen positiven Effekt auf die Löslichkeit von heterolog produzierten Proteinen haben könnte.^[87]

A.3.1.3 Proteinextraktion aus *inclusion bodies*

Es konnte gezeigt werden, dass *inclusion bodies* in einigen Fällen nicht vollständig aus falsch gefalteten Proteinen bestehen und aktive Enzyme enthalten können.^[95] Aus diesem Grund wurde in dieser Experimentreihe die Möglichkeit, die heterologen DIR-Proteine aus den *inclusion bodies* zu extrahieren, ergründet (s. Abb. 9).

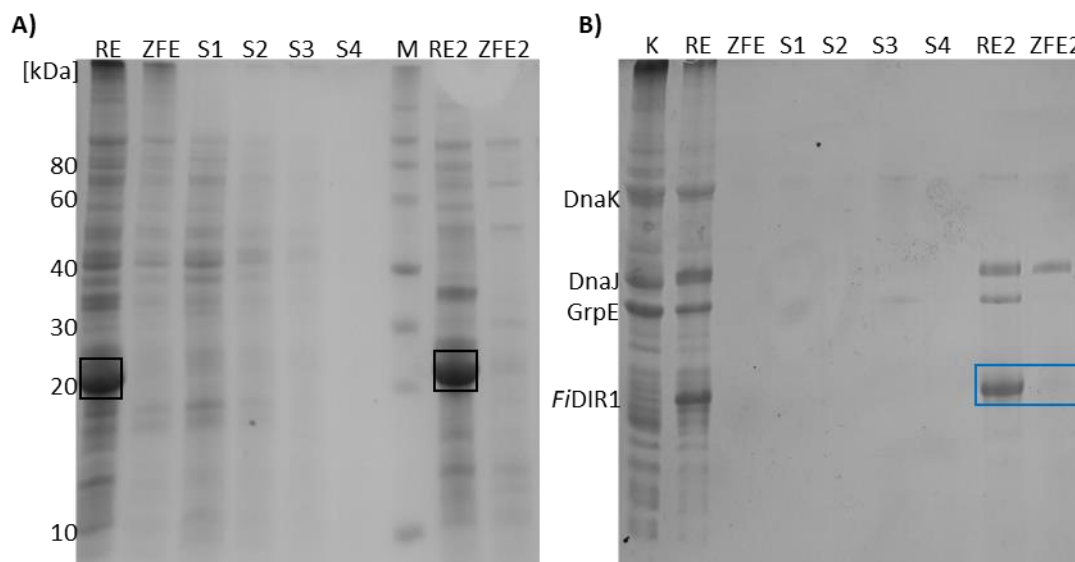


Abbildung 9: Coomassiegefärbte SDS-PAGE (10 %) von heterolog produzierten *FiDIR1*-Proteinen in *E. coli* BL21 (DE3) und anschließender Extraktion aus *inclusion bodies* (C.3.3.8, S. 171). **A)** Es konnte kein lösliches heterologes Protein nach der Extraktion beobachtet werden und *FiDIR1* befand sich im Zellpellet (schwarz umrandet). **B)** Co-Expression von Chaperonen und *FiDIR1*. Nach der Proteinextraktion aus *inclusion bodies* konnte zum ersten Mal eine schwache Bande in der löslichen Fraktion in Höhe des heterolog produzierten Proteins beobachtet werden (ZFE2; blau umrandet). K = Kontrolle (Expression ohne *FiDIR1*); RE = Rohextrakt; ZFE = zellfreier Extrakt; S# = Überstand nach Zellpellet-Waschschritt ; M = Marker; RE2 = Rohextrakt nach Proteinextraktion; ZFE2 = zellfreier Extrakt nach Proteinextraktion.

Für die Proteinextraktion wurde das Protokoll von *Palmer et al.* (2012) modifiziert angewendet.^[96] Die Waschschriffe erfolgten nach der Vorgehensweise von *Palmer et al.* (2012) und für die anschließende Extraktion wurde ein mildes Proteinextraktionsverfahren mit 1 M L-Arginin verwendet (C.3.3.8, S. 171). Eventuell entstehen die DIR-*inclusion bodies* aufgrund von lösemittel-exponierten hydrophoben Bereichen auf der Oberfläche der rekombinanten

DIR-Proteine. Durch die Zugabe von Arginin können Proteine mit einem hohen hydrophoben Charakter (Membranproteine) in Lösung stabilisiert werden.^[97] Diese milde Extraktionsmethode wurde für die rekombinanten DIR-Proteine getestet.

Aus den *inclusion bodies* von heterolog produziertem FiDIR1-Protein konnte keine lösliche Fraktion nach der Proteinextraktion erhalten werden (s. Abb. 9A). Jedoch konnte eine schwache Bande in der löslichen Fraktion beobachtet werden, wenn die Extraktion aus *inclusion bodies* erfolgte von FiDIR1, das gemeinsam mit Chaperonen produziert wurde (s. Abb. 9B). Eventuell waren die Chaperonen für die richtige Faltung der rekombinanten Proteine notwendig oder wurden benötigt, um das rekombinante DIR-Protein in der Lösung zu stabilisieren (DnaJ war ebenfalls im löslichen Überstand zu sehen). Hierbei ist zu erwähnen, dass die Auflösung des SDS-Gels in Abbildung 9B gering ist und ein weiteres Beispiel für eine erfolgreiche Extraktion in Abbildung 11 (S. 30) zu sehen ist.

A.3.1.4 Einfluss des Zellkulturadditivs - Ethanol

Eine weitere Strategie, um die Löslichkeit von rekombinanten Proteinen zu erhöhen, ist die Zugabe von Zusatzstoffen in das Kulturmedium.^[98] Hierfür wurde der Ansatz von *Chhetri et al.* (2015) verwendet und Ethanol (2 % v/v) in das Kulturmedium hinzugegeben.^[99] Abbildung 10 zeigt die SDS-PAGE Gele der durchgeführten Löslichkeitstests (C.3.3.5, S. 169).

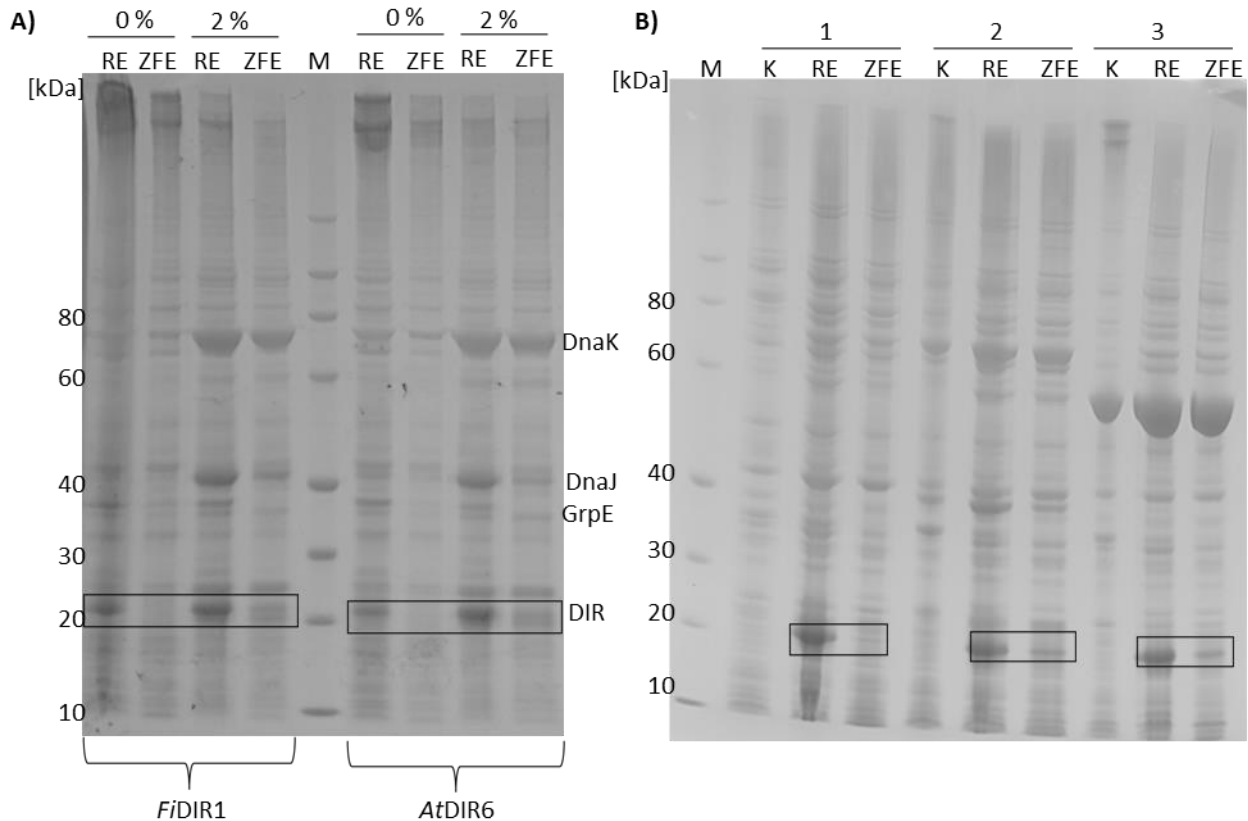


Abbildung 10: Coomassiegefärbte SDS-PAGE (10 %) der Löslichkeitstests von heterolog produzierten DIR-Proteinen. Außer den Kontrollen (K) waren alle Banden OD-normierter (OD₆₀₀ von 2). **A)** Vergleich der Produktion (Chaperonen und DIR-Proteine) in Anwesenheit von Ethanol (2 % v/v) und ohne (0 %). **B)** Heterologe Produktion (mit 2 % Ethanol) von AtDIR6 in (1) *E. coli* BL21 (DE3), (2) *E. coli* BL21 (DE3) und Chaperonen-System (DnaK, DnaJ und GrpE) und (3) in *E. coli* ArcticExpress (DE3). RE = Rohextrakt; ZFE = zellfreier Extrakt; M = Marker; K = Kontrolle.

Abbildung 10A zeigt einen Vergleich der heterologen Produktion der beiden DIR-Proteine mit und ohne Zugabe von Ethanol in das Kulturmedium. Zunächst fällt besonders die höhere Menge an produzierten Chaperonen auf, wenn Ethanol hinzugefügt wurde. Eine erhöhte Induktion von nativen Chaperonen in *E. coli* durch Ethanol wurde bereits beobachtet^[100] und könnte eventuell ebenfalls die Induktion des verwendeten Chaperon-System positiv beeinflussen. Zusätzlich ist eine etwas höhere Expression der rekombinanten DIR-Proteine durch die Zugabe von Ethanol zu sehen. Darüber hinaus konnte zum ersten Mal eine stärker ausgeprägte Bande auf der Höhe der DIR-Proteine in der löslichen Fraktion (ZFE) beobachtet werden.

Ergebnisse und Diskussion

Ob die gesteigerte Löslichkeit der rekombinanten DIR-Proteine mit der Zugabe von Ethanol oder mit der höheren Chaperonkonzentration zusammenhängt, wurde im Experiment zu Abbildung 10B ergründet. Hierbei erfolgte die rekombinante Produktion von AtDIR6 zum einen ohne die Co-Expression von Chaperonen in *E. coli* BL21 (DE3) (Abb. 10B (1)) und zum anderem mit der Co-Expression von Chaperonen entweder in *E. coli* BL21 (DE3) mit dem vektorbasierten Chaperonsystem [DnaK, DnaJ und GrpE; Abb. 10B (2)] oder in *E. coli* ArcticExpress (DE3) (Abb. 10B (3)). Nur in den beiden Fällen, in denen die Chaperonkonzentration durch die Zugabe von Ethanol erhöht wurde, konnte gleichzeitig ein positiver Einfluss auf die Löslichkeit der rekombinanten DIR-Proteine beobachtet werden. Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass die Zugabe von Ethanol die Chaperonkonzentration im Zytosol erhöht und dies einen positiven Einfluss auf die Löslichkeit der rekombinanten DIR-Proteine hat.

A.3.1.5 Zusammenfassung der Löslichkeitsstudien

Abbildung 11 zeigt zusammenfassend die unterschiedlichen durchgeführten Ansätze, um lösliche rekombinante DIR-Proteine herzustellen.

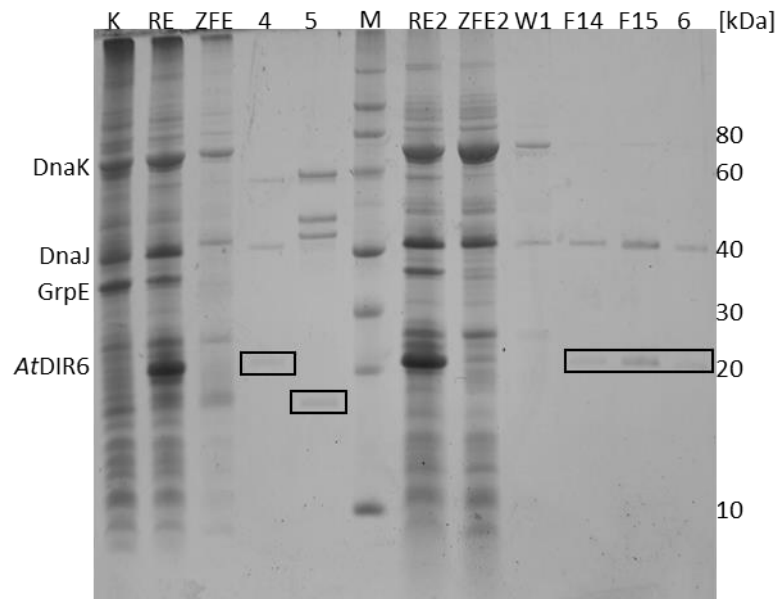


Abbildung 11: Coomassiegefärbte SDS-PAGE (10 %) der Löslichkeitsstrategien für das rekombinante AtDIR6-Protein. Eine Löslichkeitssteigerung konnte durch die Zugabe von Ethanol (2 %) in das Kulturmedium und der Co-Expression von Chaperonen erreicht werden. Dadurch konnte zum ersten Mal rekombinantes DIR-Protein isoliert werden (4). In Spur 5 konnte gezeigt werden, dass durch die heterologe Produktion eines Fusionsproteins (MBP-DIR) und anschließender Spaltung des Tags, lösliches DIR-Protein hergestellt wurde. Proteinextraktion aus *inclusion bodies* konnte nur nach der Co-Expression von Chaperonen erreicht werden (RE2 und ZFE2). Die Proteinisolation war ebenfalls erfolgreich aus dem Extrakt der *inclusion bodies* (6). K = Kontrolle; RE = Rohextrakt; ZFE = zellfreier Extrakt; M = Marker; W# = Waschfraktion der Proteinisolation. F# = Elutionsfraktion der Proteinisolation.

Für die beiden untersuchten rekombinanten DIR-Proteine (AtDIR6 und FiDIR1) wird bioinformatisch eine geringe Löslichkeit vorhergesagt (40 % und 30 % durch DeepLoc – 1.0).^[101] Die allgemein geringe Löslichkeit konnte im Lauf dieses Projekts bestätigt werden. Jedoch konnte durch unterschiedliche Maßnahmen, wie in Abbildung 11 zu sehen ist, die Löslichkeit gesteigert werden. Zum einem konnten durch optimierte Expressionsbedingungen lösliche rekombinante DIR-Proteine hergestellt werden oder zum anderem durch die Co-Expression von Chaperonen, DIR-Proteine aus *inclusion bodies* extrahiert werden. Eine weitere erfolgreiche Methode war die Spaltung eines Fusionsproteins, bestehend aus einem Löslichkeits-Tag (MBP) und einem DIR-Protein. In Abschnitt A.3.2.2 (S. 34) wird der Frage nachgegangen, ob die rekombinanten DIR-Proteine eine enantiovermittelnde Aktivität haben.

A.3.1.6 Proteinisolation von heterolog produzierten DIR-Proteinen

Durch die optimierte Expressionsbedingung (C.3.2.1, S. 163) konnten zum ersten Mal lösliche rekombinante AtDIR6- und FiDIR1-Proteine hergestellt werden. Für die anschließende Proteinisolation standen zwei unterschiedliche Affinitäts-Tags (Strep® und His₆) zur Verfügung (C.3.3.2, S. 167). Abbildung 12 zeigt den Vergleich der beiden Methoden anhand der Proteinisolation von FiDIR1 aus *E. coli* ArcticExpress (DE3).

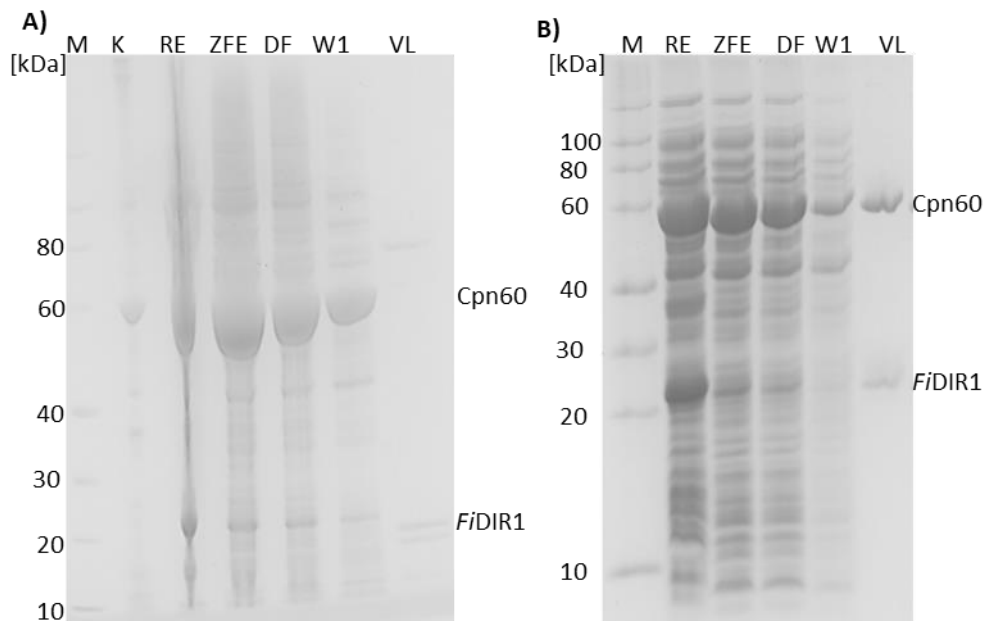


Abbildung 12: Coomassiegefärbte SDS-PAGE (10 %) von heterolog produziertem FiDIR1-Protein in *E. coli* ArcticExpress (DE3) und anschließender Proteinisolation. **A)** Isolation mittels Strep-Tag®. **B)** Isolation mittels His₆-Tag. M = Marker; K = Kontrolle; RE = Rohextrakt; ZFE = zellfreier Extrakt; DF = Durchfluss; W# = Waschfraktion; VL = Vereinigte Lösung aller Elutionsfraktionen.

Die StrepTactin®-Affinitätschromatographie weist eine hohe Selektivität zu rekombinanten Proteinen mit einem Strep-Tag® auf. Dadurch können die Proteine mit einem hohen Reinheitsgrad isoliert werden.^[102] In dem entsprechenden SDS-PAGE Gel für die Proteinisolation von FiDIR1 (Abb. 12A) sind jedoch unterschiedliche Banden nach der Elution zu erkennen (VL in Abb. 12A). Eine Doppelbande in der Höhe von FiDIR1 und eine weitere Bande bei etwa 70 kDa. Zusätzlich ist gut zu erkennen, dass sich eine ausgeprägte Bande auf der Höhe von FiDIR1 (etwa 20 kDa) sowohl in der Durchfluss- als auch in der Waschfraktion befindet. Dies deutet darauf hin, dass ein Großteil des rekombinanten Proteins nicht an das Säulenmaterial bindet. Dies würde die geringe Proteinausbeute von 190 µg·mL⁻¹ nach der Isolation erklären. Die Proteinkonzentration bezieht sich auf die vereinigte Lösung aller Elutionsfraktionen, die auf ein Volumen von 3 mL konzentriert wurde.

Studien zur heterologen Produktion der Dirigent-Proteine AtDIR6 aus *Arabidopsis thaliana* und FiDIR1 aus *Forsythia x intermedia*

Daraufhin wurde die Proteinisolation über die IMAC-Methode angestrebt (s. Abb. 12B). Da jedoch von einer Verunreinigung mit Chaperonen ausgegangen werden kann, wurde als Waschschrift die Vorgehensweise von *Belval et al.* (2015) angewendet (C.3.2.1, S. 163). Die Autoren zeigten, dass durch die Verwendung von Harnstoff in einer subdenaturierenden Konzentration (2 M) die Verunreinigungen von Chaperonen entfernt werden konnten.^[103] Zunächst fällt in Abbildung 12B auf, dass auf der Höhe des rekombinanten Proteins eine ausgeprägte Bande in der Durchflussfraktion zu erkennen ist. Ähnlich zu der Proteinisolation mittels Strep-Tag (Abb. 12A) könnte hier ebenfalls das Protein nicht vollständig an das Säulenmaterial binden. Aufgrund der höheren Proteinkapazität von IMAC-Systemen konnte trotzdem eine höhere Proteinausbeute erreicht werden. Jedoch konnte die Verunreinigung von Chaperonen (Cpn60) nicht vollständig verhindert werden. Sie lag in einem größeren Verhältnis am Ende vor als das rekombinante DIR-Protein (s. Abb. 12B, Spur VL).

Nach dem Wechsel in den Pinoresinol Assay Puffer (50 mM KPi, pH 6,0) konnte eine sofortige Trübung der Proteinlösung beobachtet werden. Die Proteinkonzentration des klaren Überstands, nach einer Zentrifugation, lag bei $1,04 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Nach Lagerung der Lösung bei 4°C über Nacht konnte eine wiederholte Trübung der Proteinlösung beobachtet werden und die Konzentration (nach Zentrifugation) hatte sich auf $280 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ reduziert. Durch die höhere erzielte Proteinausbeute in diesem Versuch wurde zum ersten Mal die geringe Proteinstabilität von rekombinanten DIR-Proteinen festgestellt, was eine große Herausforderung für biotechnologische Anwendungen darstellt. Einen direkten Nachweis, dass es sich um rekombinantes *FiDIR1* handelt, konnte durch MALDI-ToF (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation-Time of Flight) Analysen ermittelt werden (s. Abb. 79, S. 187).

A.3.2 Pinoresinol Assay

A.3.2.1 Assay-Optimierung mittels *Design of Experiment* (DoE)

Die katalysierte radikalische Kopplungsreaktion des Monolignols Coniferylalkohol (**5**) führt hauptsächlich zur Bildung von drei racemischen Dimerisierungsprodukten (s. Abb. 13).^[15, 39] Pflanzliche DIR-Proteine sind in der Lage, diese Reaktion enantio- und regioselektiv zu beeinflussen. Beispielsweise lenkt *FiDIR1* die Dimerisierung bevorzugt in Richtung zu (+)-Pinoresinol (**1a**) und durch *AtDIR6* entsteht bevorzugt (–)-Pinoresinol (**1b**).^[15, 39]

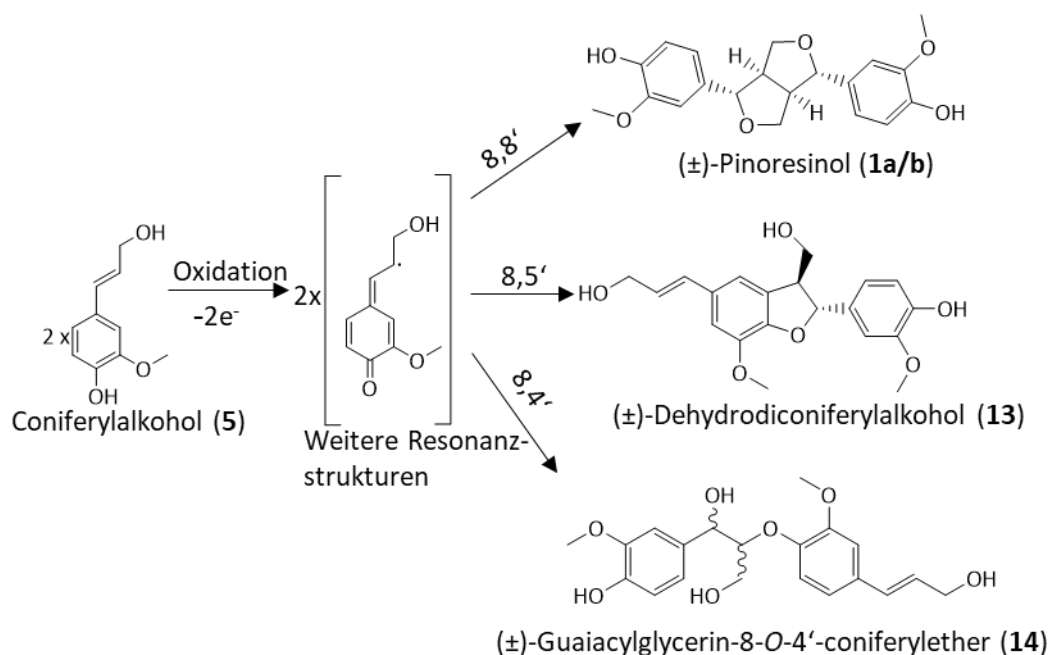


Abbildung 13: Nicht selektive radikale Kopplungsreaktion von Coniferylalkohol (**5**) führt hauptsächlich zu der Bildung von racemischen Kopplungsprodukte wie z. B. 8,8'- (Pinoresinol (**1a/b**)), 8,5'- (Dehydrodiconiferylalkohol (**13**)) und 8,4' (Guaiacylglycerin-8-O-4'-coniferylether (**14**)).

Aus vorausgegangenen Arbeiten von *J. Rosengarten* wurde bereits ein erstes Protokoll für die Durchführung der Dimerisierung von Coniferylalkohol (**5**) über eine Laccasereaktion erarbeitet. Jedoch konnte kein vollständiger Umsatz des Edukts erreicht werden. Zusätzlich war die Bildung von Pinoresinol im Vergleich zu den anderen Kopplungsprodukten sehr gering. Daraufhin sollte systematisch der Einfluss verschiedener Bedingungen auf den Umsatz des Edukts und die Bildung von Pinoresinol (**1a/b**) getestet werden. Hierfür wurde das Konzept des *Design of Experiment* (DoE) angewendet, das mittels eines Ursachen-Wirkungs-Modells die relevanten Einflussfaktoren der Reaktion ermittelt. Die Konzipierung der Versuchsplanung und anschließende Auswertung erfolgte mittels der Software *Design-Expert®* (*Stat-Ease*) in Zusammenarbeit mit *Dr. T. Classen*. Die Ergebnisse und Ausgangsbedingungen für die Parameteroptimierung mittels DoE sind in Tabelle 44 und Tabelle 45 (s. Anhang, S. 185)

zusammengefasst. Die optimierten Reaktionsbedingungen für den Pinoresinol Assay (C.3.4, S. 171) wurden im nächsten Schritt mit den rekombinanten DIR-Proteinen und den folgenden Parametern durchgeführt:

Zu dem Reaktionspuffer (50 mM KPi, pH 5,0) wurde 3,87 mM von **5** (finale Konzentration) hinzugegeben. Laccase aus *A. bisporus* wurde mit einer Aktivität von 8,75 U zu der Reaktionsmischung hinzugefügt. Die Reaktion erfolgte 3,87 h bei konstanten 30 °C und 300 rpm.

A.3.2.2 Enantioselektivität von heterolog produzierten DIR-Proteinen

Als Vergleichsgröße, um eine mögliche Enantioselektivität zu identifizieren, wurde der Enantiomerenüberschuss (*engl. enantiomer excess, ee*) verwendet. Dieser Wert beschreibt, ob ein bestimmtes Enantiomer im Überschuss zu dem anderen vorliegt. Demnach beschreibt ein *ee* von 0 %, dass beide Enantiomere in einem Verhältnis von 1:1 vorliegen (racemisches Gemisch). Es wurden unterschiedliche Proteinkonzentrationen für alle in Tabelle 8 erwähnten rekombinanten DIR-Proteine getestet. Jedoch waren die Ergebnisse nicht reproduzierbar und eine Proteinkonzentrationsabhängigkeit konnte nicht beobachtet werden. In der folgenden Tabelle ist eine repräsentative Auswahl der Ergebnisse dargestellt.

Tabelle 8: Vergleich der erhaltenen Enantiomerenüberschusswerte (*ee*) für (+)-Pinoresinol (**1a**) und (–)-Pinoresinol (**1b**) nach dem Pinoresinol Assay unter Verwendung der unterschiedlich hergestellten rekombinanten DIR-Proteine. Ein negativer *ee*-Wert entspricht dem Überschuss an **1b** und ein positiver Wert entsprechend dem Überschuss an **1a**. Die Proteinkonzentration bezieht sich auf die zu testenden Proteine (Maltose-Binde-Protein (MBP) und die unterschiedlich hergestellten DIR-Proteine). Alle weiteren Reaktionsparameter wurden unter den optimierten Reaktionsbedingungen durchgeführt (3,87 mM von **5** und Laccase aus *A. bisporus* mit einer Aktivität von 8,75 U für 3,87 h bei 30 °C).

Protein	Herstellungsmethode der DIR-Proteine	Proteinkonzentration [μM]	ee (Abweichung) [%]
-			0,0 (0,5)
MBP	Kontrolle	12	0,0 (1,4)
MBP-AtDIR6	Fusionsprotein (s. A.3.1.1)	12	-1,6 (0,7)
MBP-FiDIR1		12	0,2 (1,6)
MBP/AtDIR6	Nach Spaltung von FP (s. A.3.1.1)	100	2,0 (2,8)
MBP-FiDIR1		100	0,3 (1,1)
AtDI6	Extraktion aus IB (s. A.3.1.3)	60	-0,7 (2,6)
FiDIR1		50	6,4 (1,3)
FiDIR1	Optimierte Expressionsbedingung (s. A.3.1.6)	100	2,9 (0,8)
FiDIR1		1000	11,7 (1,5)

Allgemein konnte festgestellt werden, dass die Fusionsproteine keine Enantioselektivität zeigten. Ob die DIR-Proteine im Fusionsprotein eine falsche Faltung aufweisen oder ob der

Löslichkeits-Tag einen negativen Einfluss auf die Kopplung hat, kann zu diesem Zeitpunkt nicht beantwortet werden, da die Spaltung und Trennung des Fusionsproteins nicht vollständig bzw. nicht erfolgreich war (A.3.1.1, S. 24). Nach der Proteinextraktion oder der löslichen Produktion durch die optimierte Expressionsbedingung waren die erhaltenen rekombinanten DIR-Proteine in unterschiedlichem Maße mit Chaperonen verunreinigt. Dadurch sind die eingesetzten DIR-Proteinkonzentrationen nicht miteinander vergleichbar. Dies hatte entsprechend einen großen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der Assays. Generell konnte beobachtet werden, dass das rekombinante *F/DIR1*-Protein öfters einen Enantiomerenüberschuss des erwarteten Produkts erbrachte. Jedoch waren die Werte im Vergleich zur Literatur (*ee* bis zu 99 %)^[15] sehr gering trotz vergleichbaren molaren Verhältnis zwischen DIR-Protein und Substrat. Da die Chaperonen ähnlich wie der Löslichkeits-Tag einen negativen Einfluss auf die Dimerisierung haben könnte, muss der Fokus für weitere Experimente auf die Reduzierung der Verunreinigung und die Erhöhung der DIR-Stabilität gelegt werden.

A.4 Ausblick

Pinoresinol ist ein biosynthetischer Ausgangspunkt für viele 8-8'-verknüpfte bioaktive Lignane und Naturwirkstoffe, wie z.B. das Podophyllotoxin.^[9] Seine Derivate werden in unterschiedlichen Krebstherapien eingesetzt.^[10, 11] Entscheidend für die Herstellung solcher Wirkstoffe ist die selektive Dimerisierung von Coniferylalkohol (**5**), um das chirale Pinoresinol (**1a/b**) mit einer C₂-Symmetrie als Zwischenprodukt zu bilden. Pflanzliche DIR-Proteine sind in der Lage, eine solche radikalische Dimerisierung mit einer hohen Regio- und Enantioselektivität zu steuern.^[70] Trotz der Fähigkeit von DIR-Proteinen, pharmazeutisch relevante chirale Ausgangsstoffe zu produzieren, sind bisher kaum Anwendungsbeispiele etabliert.^[12] Aufgrund ihres eukaryotischen Ursprungs und ihrer Glykosylierung werden sie hauptsächlich in Hefen oder Pflanzen produziert.^[12-14] Diese Herstellungsmethoden sind jedoch aufwendig, kostenintensiv und ermöglichen meistens nicht die Produktion der DIR-Proteine in großen Mengen.

In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Strategien angewendet, um die beiden DIR-Proteine (AtDIR6 und FiDIR1) heterolog in *E. coli* zu produzieren. Jedoch konnte bereits für AtDIR6 gezeigt werden, dass eine solche heterologe Produktion zu unlöslichen Proteinen führt.^[13] Aus diesen Grund wurden unterschiedliche Methoden untersucht, um die Löslichkeit der beiden rekombinanten DIR-Proteine systematisch zu erhöhen. Die Entwicklung umfasste mehrere Versuchsreihen, in denen der Einfluss der Co-Expression von Chaperonen sowie der Expression mittels Löslichkeits-Tags (MBP) untersucht wurde. Im Folgenden werden die erworbenen Erkenntnisse zusammengefasst und skizziert, welche weiteren Maßnahmen getroffen werden können.

A.4.1 Löslichkeit der rekombinanten DIR-Proteine

Die zu Beginn verwendete Expressionsbedingung (C.3.2.1, S. 163) führte zur Bildung von Proteinaggregaten (*inclusion bodies*; A.3, S. 23). Die Proteinextraktion aus *inclusion bodies* konnte nur erfolgen, wenn zuvor Chaperonen co-exprimiert wurden (A.3.1.3, S. 26). Jedoch war die Gewinnung aus den *inclusion bodies* arbeitsintensiv und die Proteinqualität (Reinheit und Ausbeute) gering. Die Kombination aus Co-Expression von Chaperonen, niedrige Temperaturen (15 °C) während der Überexpression und der Zugabe von 2 % Ethanol in das Kulturmedium ergab die höchste Löslichkeit für die rekombinanten DIR-Proteine. Weitere Maßnahmen zur Steigerung der Löslichkeit und Ausbeute könnten getroffen werden, wie die weitere Reduzierung der Temperatur auf 10 °C und die gleichzeitige Verlängerung der Kultivierungsdauer (über 3 Tage).^[104]

Jedoch bevor solche Maßnahmen getroffen werden, müssten zuvor Methoden zur Stabilisierung der Proteine etabliert werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die verwendete Pufferbedingung (50 mM KPi, pH 6,0) das FiDIR1 nicht über einen längeren Zeitraum stabil in Lösung vorlag (A.3.1.6, S. 31). Ein saurer pH-Bereich (4 - 6) während des Pinoresinol Assays ist jedoch laut *Halls et al.* (2004) Voraussetzung für eine enantioselektive Kopplung.^[42] Weitere Studien mit AtDIR6 zeigten, dass die Kopplung über eine reversibel Protonierung stattfinden könnte und deswegen eine saure Umgebung benötigt wird.^[41] Dementsprechend müssen Maßnahmen getroffen werden, um die rekombinanten Proteine in diesem pH-Bereich stabil in Lösung zu halten. Eventuell wird der pH-Wert durch die PD-10 Säule (C.3.3.3, S. 168) zu schnell ausgetauscht. Hierbei wird der theoretische isoelektrische Punkt (pI von 6,5, berechnet durch ExPASy Server)^[105] von FiDIR1 unterschritten. Das schnelle Wechseln des pH-Werts kann gegebenenfalls das Protein destabilisieren. Aus diesem Grunde könnten langsamere und mildere Methoden für den Pufferaustausch wie zum Beispiel die Dialyse bei niedrigen Temperaturen (4 °C) getestet werden.

Die Entstehung von *inclusion bodies* kann neben der falschen Faltung des Proteins ebenfalls aus einer hohen Hydrophobizität des Proteins resultieren.^[106] Abbildung 14 zeigt die dreidimensionale Oberflächenansicht von AtDIR6 als Monomer (PDB Eintrag: 5LAL) aus zwei Perspektiven sowie den Grad der Hydrophobizität.

Studien zur heterologen Produktion der Dirigent-Proteine AtDIR6 aus *Arabidopsis thaliana* und FiDIR1 aus *Forsythia x intermedia*

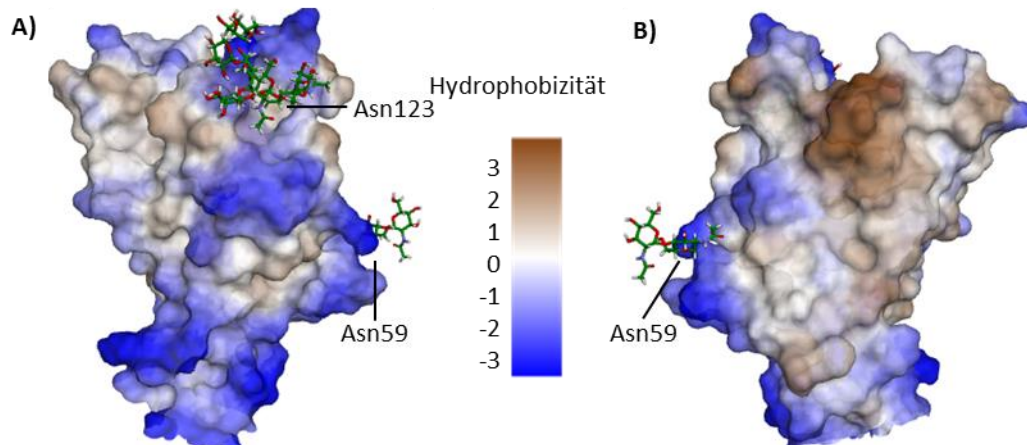


Abbildung 14: Dreidimensionale Oberflächenansicht von AtDIR6 als Monomer (PDB-Eintrag: 5LAL) aus zwei Perspektiven. Die Färbung der Oberfläche erfolgte nach dem Grad ihrer Hydrophobizität durch die Software Discovery Studio 2021 Client. Entsprechend repräsentieren blaue hervorgehobene Bereiche eine geringe bzw. keine Hydrophobizität und braune hervorgehobene Flächen eine hohe Hydrophobizität in diesem Bereich. Die Glykosylierung an Asparagin (59 und 123) sind mit grünen Stäbchen hervorgehoben. **A)** Seitliche Orientierung von AtDIR6. Lösungsmittlexponierter Bereich des nativen Proteins im Trimer. **B)** Seitenansicht wie in A) um 180° gedreht. Interaktionsoberfläche zwischen den Monomeren im nativen Trimer.

Natives AtDIR6 bildet ein Trimer und die Interaktion zwischen den Monomeren findet über viele hydrophobe Wechselwirkungen statt.^[41] In einem besonders hohen hydrophoben Bereich (braune Oberfläche in Abb. 14B) befinden sich in unmittelbarer Nähe vier Phenylalanin-Reste (F76, F79, F103 und F105) und ein Tryptophan (W115). Dieser Bereich ist im nativen Protein durch die Interaktion der Monomere im Trimer von dem Lösungsmittel abgeschirmt. Jedoch könnten durch die heterologe Expression und eine entsprechende fehlende Glykosylierung einige Bereiche des Proteins eine Fehlfaltung aufweisen und dadurch könnte eventuell die ursprüngliche Interaktion zwischen den Monomeren nicht gewährleistet sein. In diesem Fall könnten hydrophobe Bereiche exponiert werden. Dies würde die geringe Löslichkeit und hohe Aggregation des Proteins erklären. Dadurch könnte ebenfalls die beobachtete hohe Interaktion bzw. Verunreinigung mit Chaperonen begründet werden, da Chaperonen an hydrophobe Bereiche eines Proteins binden und auf diese Weise das Protein stabilisieren.^[93] Eine Möglichkeit, um die Stabilität von heterologen DIR-Proteinen zu erhöhen und dadurch die Interaktion mit Chaperonen zu unterbinden, ist die Verwendung von Pufferzusatzstoffen. Es konnte zum Beispiel bereits gezeigt werden, dass durch Arginin heterologes DIR-Protein aus *inclusion bodies* extrahiert werden konnte (A.3.1.3, S. 26). Weitere Zusatzstoffe wie die Verwendung von Tensiden, Zuckern oder unterschiedlichen Salzen (Kosmotrope) müssten individuell getestet werden.^[106] Jedoch ist zu beachten, dass Pufferzusätze wie Tenside eventuell einen negativen Einfluss auf die Aktivität des Proteins haben könnten oder mit der anschließenden Chromatographie interferieren könnten.

Bisher konnte gezeigt werden, dass die Glykosylierung von AtDIR6 (Asn59 und Asn123) notwendig für die Löslichkeit und ihre Funktion ist.^[13] Jedoch ist der genaue Zusammenhang und der Mechanismus noch nicht vollständig geklärt.^[107] Eine Möglichkeit könnte sein, dass die Glykosylierung in der Interaktion zwischen den Monomeren im Trimer beteiligt ist (s. Abb. 15).

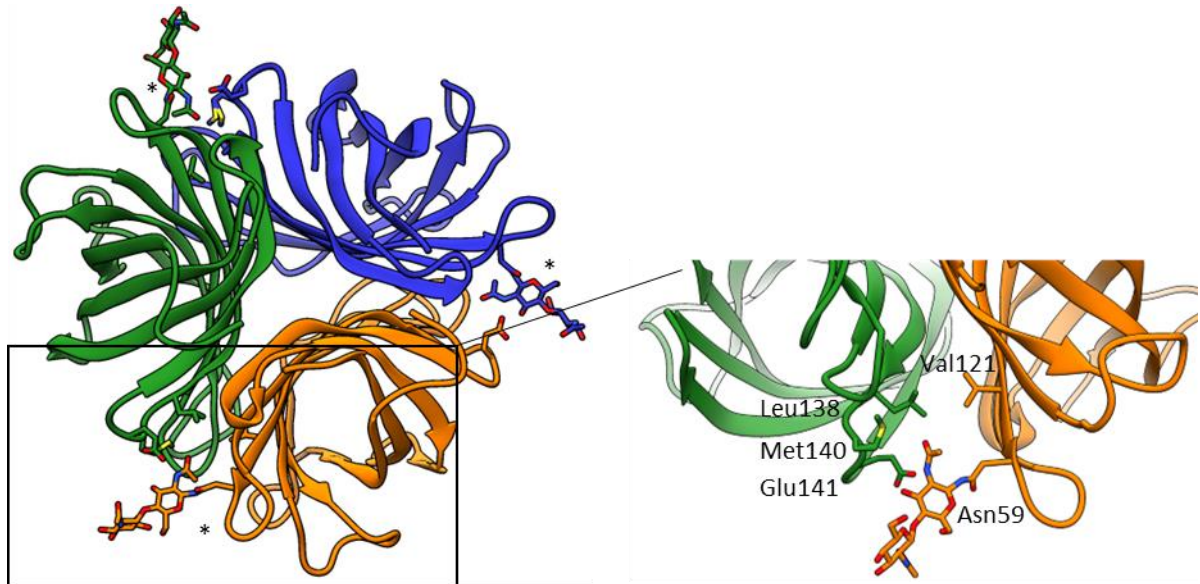


Abbildung 15: Dreidimensionales AtDIR6-Strukturmodell (PDB-Eintrag: 5LAL). Die Ketten im Trimer sind farblich unterschiedlich hervorgehoben. Die N-Glykosylierung (Stäbchen) an Asn59 ist mit einem * markiert.

Wie in Abbildung 15 zu sehen ist, könnte das N-Glykosylierungsmuster an der Position Asn59 (markiert mit *) eines DIR-Monomers mit einer anderen Kette des Trimers interagieren (über Wasserstoffbrückenbindungen mit Glu141). Dadurch könnte die Trimeranordnung stabilisiert werden. Zusätzlich könnten hydrophobe Reste, die sich in unmittelbarer Nähe der Glykosylierung befinden (Val121, Leu138 und Met140) abgeschirmt werden. In den rekombinanten DIR-Proteinen fehlen die Glykosylierungen und dementsprechend könnte eine solche Interaktion und Abschirmung nicht erfolgen. Um dies zu ermöglichen bzw. einen ähnlichen Effekt zu erreichen, könnten die beiden hydrophoben Reste Val121 und Leu138 mit polaren Resten wie Serin, Threonin oder Histidin ersetzt werden.

A.4.2 Enantioselektivität von rekombinanten DIR-Proteinen

Eine erhöhte Löslichkeit der rekombinanten DIR-Proteine war nicht in allen Fällen mit einer Enantio- und Regioselektivität in der Kupplung von Coniferylalkohol (**3**) gleichgesetzt. Die Expression des Fusionsproteins ergab eine ausreichende Ausbeute an löslichen Proteinen mit hoher Reinheit. Allerdings war die Trennung der Spaltprodukte unzureichend und die resultierenden DIR-Proteine wiesen keine Enantioselektivität auf (A.3.2, S. 33).

In allen durchgeführten Pinoresinol Assays zeigte nur das heterolog produzierte FiDIR1 eine allgemeine Tendenz zum erwarteten Produkt ((+)-Pinoresinol (**1a**) von bis zu 12 % ee). Jedoch waren die Ergebnisse nicht reproduzierbar. Da alle DIR-Proteinlösungen unterschiedliche Grade an Verunreinigung mit Chaperonen aufwiesen, könnte dies eine Erklärung für die geringe Reproduzierbarkeit haben. Ebenfalls kann die geringe Proteinstabilität der rekombinanten DIR-Proteine einen Einfluss auf das Ergebnis des Assays haben. Wie bereits oben diskutiert, müssen zunächst Maßnahmen zur Proteinstabilisierung der rekombinanten DIR-Proteine getroffen werden, um die Verunreinigung mit Chaperonen zu minimieren und dadurch die Qualität der Kopplungsreaktion zu erhöhen.

A.4.3 Untersuchung von putativen pinoresinolbildenden DIR-Proteinen

Es konnte gezeigt werden, dass die zuverlässige Produktion der beiden rekombinanten DIR-Proteine (FiDIR1 und AtDIR6) eine große Herausforderung darstellt. Jedoch um strukturelle und biochemische Charakterisierungen zu ermöglichen, werden die Proteine in großen Mengen und einer hohen Reinheit benötigt. Alternativ könnten putative Homologe der beiden pinoresinolbildenden DIR-Proteine untersucht werden, die geeigneter für eine rekombinante Produktion sind. Beispielsweise berichtete *Ma et al.* (2015) von einem DIR-Protein (*TaDIR13*) aus Weizen, dass heterolog in *E. coli* produziert werden konnte und selektiv die Kopplung zu (+)-Pinoresinol (**1a**) lenkt.^[47]

Die Arbeitshypothese für diesen Ausblick war, ob weitere putative pinoresinolbildende DIR-Proteine gefunden werden können, die für eine heterologe Produktion geeignet sind. Hierfür wurde alle Sequenzen von putativen DIR-Proteinen aus Süßgräsern (*Poales*), die im Pfam-Server (PF03018) hinterlegt waren, entnommen.^[108] Der Fokus auf Süßgräser wurde gesetzt, da alle bisherigen DIR-a-Proteine aus einkeimblättrigen Pflanzen (s. Tabelle 2, S. 7) im Vergleich zu *TaDIR13* (Weizen gehört zu den Süßgräser) nicht heterolog in *E. coli* produziert werden konnte. Anschließend wurde ein Sequenz-Alignment aus den 1288 erhaltenen Sequenzen (20 Pflanzenarten) mit den beiden DIR-Sequenzen (FiDIR1 und AtDIR6) mittels

Clustal Omega durchgeführt.^[109] Die Darstellung des Phylogenetischen Baums erfolgte über iTOL.^[110] Hierfür werden nur die putativen Homologe von *FiDIR1* und *AtDIR6* aufgefächert angezeigt (s. Abbildung 16).

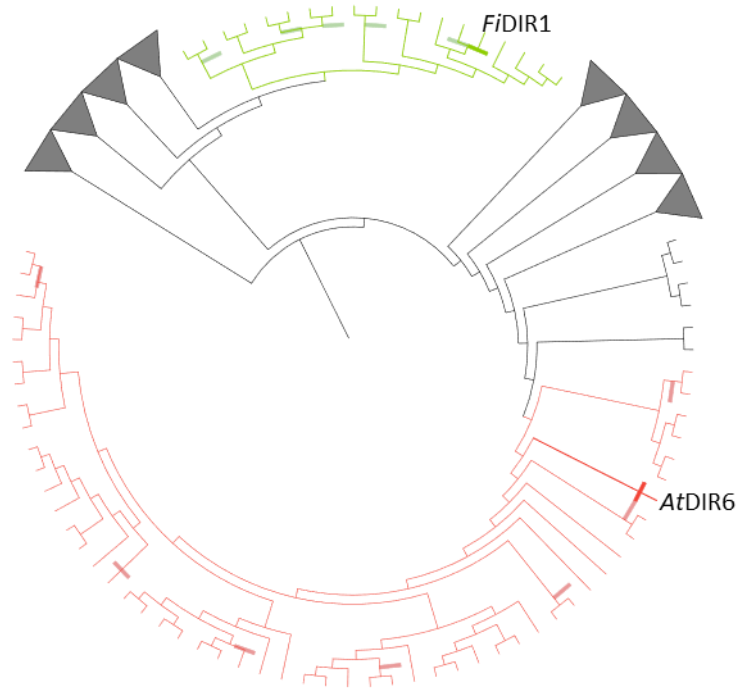


Abbildung 16: Phylogenetischer Baum der putativen DIR-a Proteinunterfamilie aus Süßgräsern (Einkeimblättrigen Pflanzen) und den beiden DIR-Proteinen (*FiDIR1* und *AtDIR6*) aus zweikeimblättrigen Pflanzen. Putative Homologe von *FiDIR1* und *AtDIR6* wurden jeweils farblich hervorgehoben (grün und rot).

Die phylogenetische Analyse von putativen DIR-Proteinen aus Süßgräsern zeigt eine Aufspaltung innerhalb der DIR-a Unterfamilie auf. In den beiden gebildeten Ästen befinden sich jeweils die pinoresinolbildenden DIR-Proteine (*FiDIR1* und *AtDIR6*). Zur Beurteilung, ob es sich bei den Homologen um putative pinoresinolbildende DIR-Proteine handelt, wurden die beschriebenen Sequenzbereiche von *AtDIR6* für die potenziellen Bindetaschen, N-Glykosylierung und intramolekulare Disulfidbrückenbindung miteinander in einem Sequenz-Alignment verglichen. Für *AtDIR6* konnten nach diesem Muster putative Homologe identifiziert werden (s. Abbildung 78, S. 184). Jedoch weisen diese Homologe die Position für eine mögliche Glykosylierung und Bildung einer Disulfidbrückenbindung auf. Dementsprechend könnten diese Homologe ebenfalls erschwert rekombinant produziert werden. Hingegen zeigen die zugeordneten Homologe von *FiDIR1* ein ähnliches Muster für die putativen Bindetaschen (schwarz eingerahmte Reste) auf, jedoch keine Asparagin- und Cystein-Reste für eine notwendige Glykosylierung und Disulfidbrückenbindung in den eingerahmten Bereichen (rot und gelb, s. Abbildung 17). Selbstverständlich ist dies nur eine kleine Auswahl und weitere Analysen und Sequenzvergleiche z.B. aus anderen Pflanzenarten sind notwendig, um

Studien zur heterologen Produktion der Dirigent-Proteine AtDIR6 aus *Arabidopsis thaliana* und FiDIR1 aus *Forsythia x intermedia*

geeignete Homologe zu identifizieren. Jedoch sollte dies auch verdeutlichen, dass durch die große Anzahl an bekannten Sequenzen es ein großes Potenzial gibt, geeignete DIR-Proteine zu finden.

<i>FiDIR1</i>	1	- - - M V S K T Q I V A L - - - - F L C F L T S T S S A T Y G R K P R P R R P C K E L	36
<i>AtDIR6</i>	1	M A F L V E K Q L F K A L F S F F L L V L L F S D T V L S F R K T I D Q K K P C K H F	43
<i>AQA0E0B2F3.1</i>	65	- M N S I - F - - - S N L L L A V A T L Q - - - - - - - - - - - - - - - L L T T S R R V	88
<i>AQA199VIP9.1</i>	38	M A T S - - K R V Q T L R L L A F F V C V F A H R F P A L G A H P L L G A E K L T K V	78
<i>G9C2V6.1</i>	26	- M A A A R F P P L V L C L L P I I I C S F - - - - - - - - - - - - - - - V D A E L T H L	54
<i>AQA5J9TZ56.1</i>	31	M A F A A R C P S H V L A L L V L A S C S A A S - - - - - - - - - - - - - - - A A A D E K L T H L	64
<i>AQA3L6Q384.1</i>	29	M A N - I - K R G T V Q L Q L V L I S M A L A G - - - - - - - - - - - - - - - A A A T T T T T H L	60
<i>FiDIR1</i>	37	V F Y F H D V L F K G N N Y H N A T S A I V G S P Q W G N K T A M A V P F N Y G D L V	79
<i>AtDIR6</i>	44	S F Y F H D I L Y D G D N V A N A T S A A I V S P P G - - - - - L G N F K F G K F V	80
<i>AQA0E0B2F3.1</i>	89	Q W R R R S S S R S T C T S T C - - - T T W S P A R A P R R R R S S K A R A H G G G G	128
<i>AQA199VIP9.1</i>	79	H F F L H D T L S G S K P S A V - - - L I A - H R E N H T G - V P N D P T P F G T A F	116
<i>G9C2V6.1</i>	55	Q F Y F H E V D A G T P N A T V - - - V N V A S - - - - - L H R N S S T F G D V N	87
<i>AQA5J9TZ56.1</i>	65	H F Y F H E V E A G A A N A T V - - - V N V A S - - - - - L H K N A S T F G D V N	97
<i>AQA3L6Q384.1</i>	61	R F Y M H D T V T A S P G S P A - - - T A V P V A R G T T P L P G D P T T R F G D M Y	100
<i>FiDIR1</i>	80	V F D D P I T L D N N - L H S P P V G R A Q G M Y F Y D Q K N T Y N A W L G F - - - S	118
<i>AtDIR6</i>	81	I F D G P I T M D K N - Y L S K P V A R A Q G F Y F Y D M K M D F N S W F S Y - - - T	119
<i>AQA0E0B2F3.1</i>	129	V - - - - V R E G G G H G R P A D R G R A Q G L Y V F A T L D A D A P A L L F S I N N	167
<i>AQA199VIP9.1</i>	117	V I D D P L T A G P E - L D S G V V G N A Q G L Y V S S G R T L S R R - - - - -	150
<i>G9C2V6.1</i>	88	V F D N A L R E G P D - P A S R L I G R A H G L A V H A S L D E T G G L - - T A I - N	126
<i>AQA5J9TZ56.1</i>	98	V F D N A L R E G P D - P A S R L I G R A Q G L A V H A S L D E S G G L - - T A I - N	136
<i>AQA3L6Q384.1</i>	101	V V D D P L T E G P G - A A S P A V E R A Q G F Y L F A A Q H E V A V M - - N C L - T	139
<i>FiDIR1</i>	119	F L F N S - T K Y V - G T L N F A G A D P L L N K T R D I S V I G G T G D F F M A R G	159
<i>AtDIR6</i>	120	L V F N S - T E H K - G T L N I M G A D L M M E P T R D L S V V G G T G D F F M A R G	160
<i>AQA0E0B2F3.1</i>	168	V V L A V G T P Y G G S M V A V M G R D D F - - - V R L P V V G G T G R F R M A R G	206
<i>AQA199VIP9.1</i>	151	- - - - - A L Q R S S F - - - - - - - - - - - V V L E K P L A V V G G R G A F R L A R G	178
<i>G9C2V6.1</i>	127	F V F S D Y G A Y S G S T L A T Q G H L N - A S G P S E R S I V G G T G K L R F A R G	168
<i>AQA5J9TZ56.1</i>	137	F V F S D Y G E Y S G S A L A T L G H I S - A S G P S E R A I V G G T G K L R F A R G	178
<i>AQA3L6Q384.1</i>	140	M V F T A - G R H N G S Y V V V Q G R D A V P D K V R E L P V V G G A G R F R G D R V	181
<i>FiDIR1</i>	160	V A T L M T D A F E G D V Y - F R L R V D I N L Y E - C W - - - - -	186
<i>AtDIR6</i>	161	I A T F V T D L F Q G A K Y - F R V K M D I K L Y E - C Y - - - - -	187
<i>AQA0E0B2F3.1</i>	207	Y A L V R T A S E H G K N A V L E I D I C L T S F - - - - -	231
<i>AQA199VIP9.1</i>	179	F A Q L R T H Y L N T T N G D A V I E Y D V T L L H Y - - - - -	205
<i>G9C2V6.1</i>	169	Y M T S K L L S S T D T A I V V V F D M Y F T L D H - - - - -	194
<i>AQA5J9TZ56.1</i>	179	Y M T S N L L S S T D T A I V V V F D M Y F T L A H - - - - -	204
<i>AQA3L6Q384.1</i>	182	P A A A V L P S S G P S N V - L P L A T R A T V A G V P W E G A L I G T P A S E	220

Abbildung 17: Sequenz-Alignment von *FiDIR1* mit *AtDIR6* und putativen pinoretinolbildende DIR-Homologe aus Süßgräsern. Schwarz eingerahmte Reste repräsentieren die putativen Reste in den Bindetaschen von *AtDIR6*, rote die Position der Glykosylierung und die Cystein-Reste in *AtDIR6* (gelb eingerahmt) bilden die intramolekulare Disulfidbrückenbindung aus.^[41] Konservierte Regionen (>50 % Identität) sind blau schattiert. Die Annotation der Homologe sind die jeweiligen UniProt-Einträge.^[111]

B. Biochemische Charakterisierung des Reisproteins *OsJAC1*

B.1 Einleitung in die Thematik

Reis (*Oryza sativa*) ist eine der wichtigsten Getreidepflanzen weltweit und die Hauptnahrungsquelle für mehr als die Hälfte der Weltbevölkerung.^[112, 113] Prognosen zufolge muss die allgemeine landwirtschaftliche Produktion bis 2050 um 60 % gesteigert werden, um den globalen Nahrungsmittelbedarf zu decken.^[114] Insbesondere abiotische und biotische Umweltfaktoren (s. Abbildung 18) spielen für den Ernteertrag von landwirtschaftliche Nutzpflanzen eine wichtige Rolle. Der Einfluss von Umweltfaktoren auf den weltweiten Ernteverlust von Weizen und Reis wurde auf 29 % beziehungsweise 40 % geschätzt.^[115]

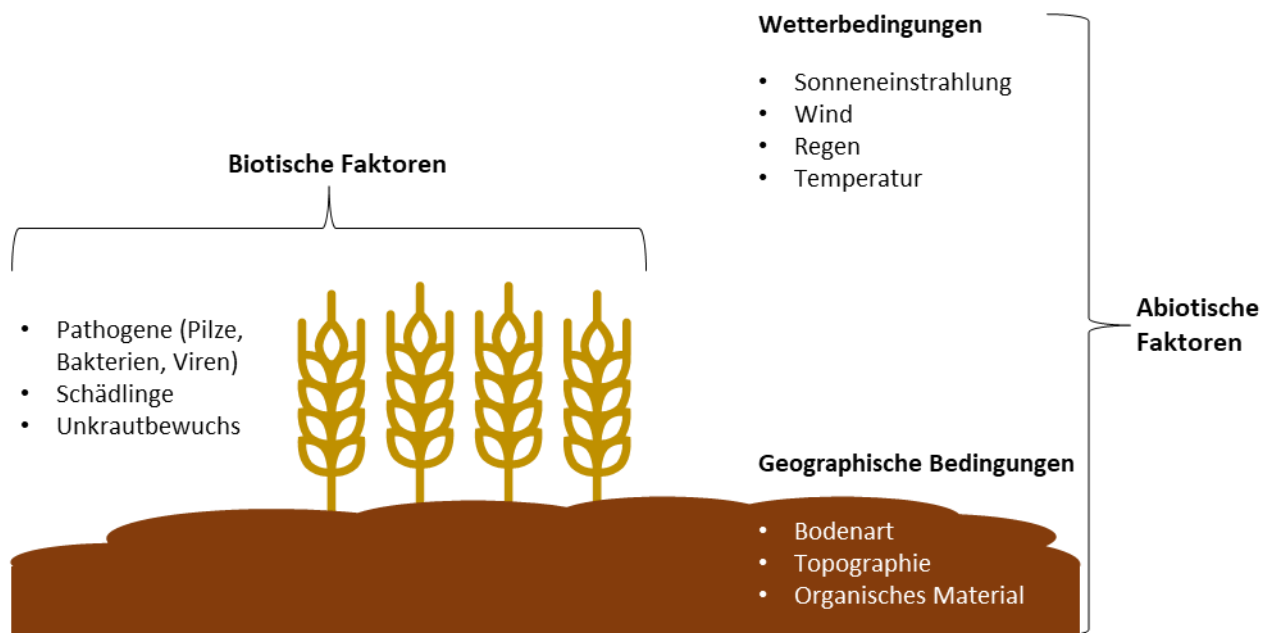


Abbildung 18: Schematische Darstellung von biotischen und abiotischen (Wetterbedingungen und geographische Bedingungen) Umweltfaktoren auf Nutzpflanzen.

Der Klimawandel könnte durch weitere Veränderung der abiotischen Umweltfaktoren (Temperatur, Niederschlag, Feuchtigkeit etc.) einen erhöhten negativen Effekt auf die Qualität und Quantität der landwirtschaftlichen Produktion haben.^[116, 117] Zusätzlich können klimatische Veränderungen die Ausbreitung und den Ausbruch von Pathogenen, Schädlingen und Unkraut begünstigen, wie es ausführlich in den zitierten Übersichtsartikeln erläutert wird.^[118-120] Ein allgemeiner Anstieg der Ernteverluste durch Krankheitserreger an Reis, Weizen und Rebe wird für die nächsten Jahrzehnte in Europa vorausgesagt.^[121]

Um Ernteverluste zu vermeiden bzw. zu minimieren, werden Bewässerungssysteme, Düngemittel und Pflanzenschutzmittel eingesetzt. Diese Praktiken sind kostenintensiv und haben durch ihre potenziell negativen Auswirkungen auf die Umwelt (besonders beim Einsatz von Düngemitteln und Pflanzenschutzmitteln) in den letzten Jahren eine gesellschaftliche

Debatte ausgelöst. Diese Debatten thematisieren neben den Auswirkungen eine Reduktion oder sogar den Ersatz der konventionellen Maßnahmen.

Im Laufe der Evolution haben Pflanzen verschiedene Abwehrstrategien entwickelt, um sich gegen Angriffe ihrer Umwelt zu wehren. Um das Eindringen und das Wachstum von Pathogenen im Wirtsgewebe zu verhindern, werden in den Pflanzenzellen unterschiedliche induzierbare Abwehrreaktionen ausgelöst.^{[122](Quellen inkl.)} Zu den induzierbaren Abwehrreaktionen der Pflanze gehört die Synthese von Signalmolekülen (Botenstoffe wie Ethylen und Jasmonsäure), die sich dann auf die Genexpression auswirken und zur Synthese von Abwehrmolekülen, wie beispielsweise reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Sekundärmetaboliten (Abwehrstoffe wie Phytoalexine) führen können.^{[122, 123](Quellen inkl.)}

In Zusammenhang mit Abwehrreaktion von Pflanzen werden ebenfalls sogenannte stressinduzierbare Lektine, wie beispielsweise die *monocotylen-chimären Jacaline* (MCJ), diskutiert.^[62] Für diese Proteinfamilie ist ihre modularer Domänenaufbau und ihre begrenzte taxonomische Verbreitung charakteristisch.^[62] Mitglieder dieser Proteinfamilie vermitteln sowohl bei abiotischen als auch bei biotischen Stressreaktionen eine höhere Resistenz in der Pflanze.^[62] Das Verständnis solcher Resistenzmechanismen gegen abiotische und biotische Stressfaktoren und ihre Übertragung in moderne Züchtungsprogramme könnte den Weg zu einer umweltfreundlicheren Landwirtschaft unterstützen.

B.1.1 Lektine – mehr als kohlenhydratbindende Proteine

Seit der Entdeckung des ersten Lektins (*Ricin*) aus *Ricinus communis* vor mehr als 130 Jahren^[124] wurden zahlreiche weitere Pflanzenlektine identifiziert und charakterisiert, wie es im Übersichtsartikel von *E. J. Van Damme et al.* mit den dort vorgestellten Quellen verdeutlicht wird.^[125] Nicht alle Lektine sind giftig,^[126] wie es zunächst für *Ricin* beschrieben wurde.^[124] Eine weitere charakteristische Eigenschaft der Lektine ist die Fähigkeit, rote Blutkörperchen (Erythrozyten) zu verklumpen. Dieses Phänomen wurde später als Agglutination bezeichnet und führte zur Einführung der Bezeichnung *Agglutinin*.^[127] Durch die Beobachtung, dass einige pflanzliche Agglutinine in der Lage sind, zwischen Erythrozyten verschiedener Blutgruppen zu unterscheiden, wurde der Name Lektin als systematische Bezeichnung für die gesamte Proteinfamilie vorgeschlagen, der sich von dem lateinischen Wort *legere* ableitet (Bedeutung: herausfiltern oder auswählen).^[128] Die Hämagglutination der Erythrozyten durch Lektine wird ausgelöst durch die spezifische Lektin-Interaktion mit Kohlenhydratstrukturen auf der Oberfläche der Erythrozyten. Diese Interaktion ist reversibel durch Zugabe von bestimmten Kohlenhydratverbindungen.^[129] Da nicht alle Lektine in der Lage sind, Zellen zu agglutinieren, hat sich die Bezeichnung Lektine anstelle von Agglutinine über die Zeit durchgesetzt, wie beschrieben in verschiedenen *Reviews*.^[130, 131] Mittlerweile werden Proteine als Lektine definiert, wenn sie spezifisch Kohlenhydratstrukturen erkennen und reversibel binden können (nicht kovalent) und dabei keine enzymatische Aktivität aufweisen.^[132-134] Dadurch unterscheiden sich Lektine von kohlenhydrataktiven Enzymen mit katalytischer Aktivität, wie z.B. Glykosyltransferasen und Glykosylhydrolasen.^[135]

Pflanzenlektine besitzen eine oder mehrere Kohlenhydratbindestellen, die entweder auf endogene (pflanzeneigen), exogene (fremde, nicht von Pflanzen stammende) oder auf beide Glykanstrukturen reagieren.^[136, 137] Diese Eigenschaft ermöglicht es ihnen, mit Mono- oder Disacchariden, Polysacchariden und komplexeren Kohlenhydratstrukturen von Glykokongugate (Glykoproteine oder Glykolipide) zu interagieren.^[138, 139] Viele Jahre der Forschung von Lektin-Kohlenhydrat-Interaktionen zeigten, dass insbesondere Glykokongugate die natürlichen Liganden für die meisten Lektine bilden (Erkenntnisse werden in ausführlichen *Reviews* dargestellt).^[130, 140]

Kohlenhydrate und Polysaccharide sind wichtige Biomoleküle, die in lebenden Systemen reichlich vorhanden sind. Pflanzen akkumulieren freie Saccharide, insbesondere die Disaccharide Saccharose und Maltose sowie die Monosaccharide Glukose und Fruktose.^[141] Allerdings

sind die meisten pflanzlichen Kohlenhydrate Teil komplexerer Strukturen, darunter z.B. Speicherpolysaccharide (Stärke und Fructane), Zellwandkomponenten, Glykoproteine und Glykolipide.^[141] Entsprechend wurden Lektine aus verschiedenen Pflanzengeweben isoliert, die solche Zuckerverbindungen aufweisen wie aus Speichergeweben (Rinde und Blumenzwiebel) und Samenkörnern.^[142-144] So können Lektine beispielsweise in Zwiebeln und Knollen 10 – 40 % des gesamten löslichen Proteingehalts ausmachen.^[145, 146] Diese abundanten Lektine befinden sich hauptsächlich in der Vakuole, entweder in individueller Form oder als Teil eines Proteinkomplexes.^[147, 148]

Stressinduzierbare Lektine

Die Arbeitsgruppe von *Van Damme* war die erste, die über stressinduzierbare Lektine berichtete, darunter das durch Salzstress induzierbare Lektin in Reis (*Oryza sativa* L.)^[149] und das durch Jasmonsäure induzierbare Lektin in Tabakblättern (*Nicotiana tabacum* L.).^[150] Im letzteren Fall konnte unter normalen Wachstumsbedingungen das Lektin nur in sehr geringen Mengen exprimiert werden, was zu kaum nachweisbaren Mengen führte.^[150] Die Lektin-expression wurde jedoch hochreguliert, wenn die Pflanze Stress ausgesetzt war.^[150] Es konnte nachgewiesen werden, dass solche entsprechend niedrig abundanten Lektine ohne ein Signalpeptid synthetisiert werden und sich dabei hauptsächlich im Zytoplasma befinden.^{[151](Quellen inkl.)} Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass einige niedrig abundante Lektine in den Zellkern gelangen.^{[152](Quellen inkl.)} Im Gegensatz dazu werden hoch abundante Lektine (zum Beispiel isoliert aus der Vakuole; s. oben) mit einem Signalpeptid synthetisiert und folgen daher dem sekretorischen Weg vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat und schließlich in die Vakuole, die Plasmamembran oder sie werden in die Zellwand und in den extrazellulären Raum sezerniert.^{[153](Quellen inkl.)} Lektine repräsentieren somit eine heterogene Gruppe von Proteinen, die durch biotischen und abiotischen Stress induziert werden können.^[136] Im folgenden Abschnitt wird auf eine Untergruppe der Stress-induzierbaren Lektine näher eingegangen.

B.1.1.1 Die Vielseitigkeit der Jacalin-ähnlichen Lektine (JRL)

Derzeit werden zwölf pflanzliche Lektinfamilien anhand des Vorhandenseins einer charakteristischen Lektindomäne unterschieden, wie unter anderem das Jacalin-ähnliche Lektin (JRL).^[154] JRLs ist eine Gruppe pflanzlicher Lektine mit mindestens einer Domäne, die homolog zum *Jacalin*-Protein ist,^[155] das erstmals in den Samen der Jackfrucht (*Artocarpus integrifolia* L.) isoliert wurde.^[156] *Jacalin* selbst ist ein hoch abundantes, Galaktose bindendes Lektin, welches sich in der Vakuole befindet.^[157] *Jacalin* und weitere Galaktose spezifische JRLs bilden eine kleine Gruppe von Lektinen, die in wenigen Pflanzenfamilien wie z.B. dem Maulbeergewächs (*Moraceae*) verbreitet sind.^[157-159] Dagegen sind Mannose spezifische JRLs weiter verbreitet und wurden unter anderem in Reis (*Oryza sativa*),^[149] Banane (*Musa paradisiaca*),^[160] *A. thaliana*^[161] und außerhalb des Pflanzenreichs (bspw. in Säugetieren)^[162] identifiziert. Entsprechend ihrer Kohlenhydratbindespezifität wurde die pflanzliche JRL-Familie in zwei Unterfamilien unterteilt: Galaktose-spezifische (gJRLs) und Mannose-spezifische JRLs (mJRLs).^[143] Obwohl beide JRL-Unterfamilien eine hohe Sequenzähnlichkeit aufweisen, unterscheiden sie sich in ihrer molekularen Struktur.^[163] Die gJRLs durchlaufen posttranslationale Modifikationen, die zu einer proteolytischen Spaltung führen, zu einer kurzen β -Kette (2 kDa) und einer langen α -Kette (13 kDa),^[164] während mJRLs ein vollständiges Protomer enthalten.^[158] Beide JRL-Untergruppen (gJRL und mJRL) weisen eine ähnliche dreidimensionale Struktur auf,^[158, 165] wurden jedoch in verschiedenen Kompartimenten der Pflanzenzelle lokalisiert (gJRL in der Vakuole und mJRL im Zytoplasma).^[157]

JRLs werden entsprechend ihrer Lokalisierung mit unterschiedlichen physiologischen Funktionen in der Pflanze in Verbindung gebracht.^[151] (Quellen inkl.) Die physiologische Funktion der gJRL in der Vakuole ist nach wie vor unbekannt. Bisher wurden unterschiedliche Hypothesen aufgestellt über allgemeine Funktionen der Lektine in der Vakuole, wie es in aktuellen *Reviews* erläutert wurde.^[151, 166] Die mögliche Bindung von gJRLs an komplexe Kohlenhydratstrukturen liegt sehr nahe, da bereits die Interaktion von Moriga-G (gJRL aus *Morus nigra*) mit leukämischen Jurkat-Zellen gezeigt werden konnte.^[167]

Hingegen konnten für mJRLs unterschiedliche physiologische Funktionen beobachtet werden. Zum Beispiel wurde in Reis die Expression von putativen mJRLs durch verschiedene Stressfaktoren hochreguliert, wie Trockenheit, Salzstress und Pathogenangriffe (z.B. *Magnaporthe oryzae*).^[155, 168] He et al. (2017) zeigten, dass OsJRL in Reis und *E. coli* die

Resistenz gegenüber Salzstress erhöhte.^[169] Weitere Eigenschaften von mJRL umfassen unter anderem antivirale und antifugale Aktivitäten.^[160, 170]

Alle zuvor erwähnten Eigenschaften sind auf individuelle JRL-Proteine zurückzuführen. Mit weiteren erforschten Pflanzenarten wurde die Vielfalt der Lektine und insbesondere der JRL-Proteinfamilie deutlich. So konnten durch Sequenzanalysen unterschiedlicher Lektine bzw. von gezielten JRL-Domänen in unterschiedlichen Pflanzen gezeigt werden, dass JRL Teil von Proteinen mit Multidomänen-Anordnungen sind.^[171-174] Auf Grundlage der molekularen Struktur der Pflanzenlektine können sie in vier Klassen eingeteilt werden, die als *Merolektine*, *Hololektine*, *Chimerolektine* und *Superlektine* bezeichnet werden.^[166] *Merolektine* sind individuelle Lektine.^[134] Im Gegensatz dazu enthalten *Hololektine* und *Superlektine* mehrere Lektindomänen, entweder mit ähnlicher oder unterschiedlicher Spezifität für Kohlenhydratverbindungen.^[134, 166] *Chimerolektine* enthalten neben Lektindomänen eine oder mehrere Proteindomänen mit einer anderen Funktionalität.^[134] Weitere Angaben zu den unterschiedlichen Domänen und Funktionen von chimären Lektinen in Pflanzen finden sich in aktuellen *Reviews* und den darin enthaltenen Referenzen.^[62, 175]

B.1.1.2 Monocot chimäre Lektine (MCJ) bestehen aus zwei Domänen

Eine spezielle *Chimerolektin* Untergruppe mit einem modularen Domänenaufbau und einer begrenzten taxonomischen Verbreitung wird als *monocotyle-chimäre Jacalin* (MCJ) bezeichnet.^[62] Es gibt vermehrt Hinweise, dass Mitglieder dieser Proteinfamilie sowohl während biotischen als auch bei abiotischen Stressreaktionen eine wichtige Rolle spielen.^[62, 175, 176] Ihre verschiedenen physiologischen Funktionen und ihr Domänenaufbau sind der Fokus des folgenden Abschnitts.

Unterteilung und Funktionen von MCJs in der Pflanze

MCJ wurden bisher ausschließlich in der Familie der *Poaceae* (Süßgräser) identifiziert, die zu den einkeimblättrigen Pflanzen (Monokotyledonen) gehören.^[62, 175] Das Protein ist aus zwei Domänen aufgebaut: Die Dirigent- (DIR-) Domäne, welche sich am N-Terminus befindet und die Jacalin-ähnliche Lektin- (JRL-) Domäne, die sich am C-Terminus befindet (s. Abbildung 19).^[62]



Abbildung 19: Schematischer Aufbau von MCJs. Die Dirigent-Domäne (grau) befindet sich am N-Terminus und die Jacalin-ähnliche Lektin-(JRL-) Domäne (grün) am C-Terminus. Beide Domänen sind über einen Sequenzabschnitt (orange) miteinander verbunden.

Wie im *Review* von *Ma et al.* (2014) beschrieben, waren vor einigen Jahren lediglich neun MCJs bekannt.^[62] Aufgrund des zunehmenden Interesses wurden seitdem weitere Vertreter dieser Proteinfamilie entdeckt. Jedoch ist zu erwähnen, dass die meisten 172 MCJ-Mitglieder (Stand 2017) mittels Sequenzanalysen identifiziert wurden und weitestgehend unbekannt sind.^[175] Tabelle 9 listet bisherige Erkenntnisse aus genomweiten Analysen auf.

Tabelle 9: Identifizierte putative *MCJ*-Gene, sowie die molekulare Masse (MW) der resultierenden Proteine.

Herkunft	Anzahl <i>MCJ</i> -Gene	MW [Da]	Literatur
<i>Phyllostachys edulis</i>	4	32,4 – 37,6	^[177]
<i>Triticum aestivum</i>	46		^[176]
<i>Oryza sativa</i>	4	27,9 – 33,3	^[155]
<i>O. sativa</i> spp. japonica sowie indica	4		^[178]

Bisher wurden wenige genomweite Analysen spezifisch für *MCJ*-Gene durchgeführt. In einer Studie wurden putative DIR-Proteine in Reis (*O. sativa*) gesucht, die entsprechenden MCJs wurden daraufhin als DIR-c bezeichnet/gruppiert.^[24] Je nach verwendeten Kriterien

können sich die Bewertungen der Proteinunterfamilien unterscheiden, so wurde beispielsweise in anderen phylogenetischen Analysen drei bzw. vier *MCJ*-Gene in Reis identifiziert^[176-178] anstelle von 13 putativen *DIR-c*-Genen.^[24] Die weiteren putativen DIR-Unterfamilien wurden ausführlich im ersten Abschnitt A.1.2 (S. 4) erläutert.

Ma und *Han* (2021) identifizierten 46 putative MCJ aus dem Weizengenom (*T. aestivum*) und unterteilten die Proteinfamilie in drei Untergruppen (MCJ1, MCJ2 und MCJ3).^[176] Ihre Ergebnisse zeigten die funktionelle Vielfalt von MCJ, die auf verschiedene biotische und abiotische Stressfaktoren reagieren können.^[176] Sowohl im Weizen- wie auch in Bambusprossen (*P. edulis*) sind die entsprechenden *MCJ*-Gene über Hormone und abiotischen Stress induzierbar.^[176, 177] In beiden Pflanzenarten wurde beobachtet, dass bestimmte *MCJ*-Gene gewebespezifisch (Blätter und Wurzel) exprimiert werden.^[176, 177] Jedoch sind weitere genomweite Analysen von *MCJ*-Genen in anderen einkeimblättrigen Pflanzen notwendig, um Korrelationen zwischen Expressionsort und physiologischer Funktion herzuleiten. Der Fokus der bisherigen Forschung lag in der Beschreibung physiologischer Funktionen von einzelnen MCJs, Tabelle 10 listet die Herkunft, Funktion und ihre entsprechende Referenz auf.

Tabelle 10: Übersicht der Herkunft, Funktion und Literaturstelle von verschiedenen MCJ-Proteinen.

Protein	Herkunft	Funktion	Literatur
<i>AsCrs-1</i>	<i>Agrostis stolonifera</i>	Unbekannt	[179]
<i>SbSL</i>	<i>Sorghum bicolor</i>	<i>ZmBGAF</i> Homolog	[180, 181]
<i>ShDJ</i>	<i>Saccharum hybrid</i>	Trockenresistenz	[182]
<i>TaHFR1</i>	<i>Triticum aestivum</i>	Schädlingsresistenz	[183, 184]
<i>TaJA1/TaMCJ1</i>	<i>Triticum aestivum</i>	Pathogenabwehr	[47, 176, 185-187]
<i>TaMCJ3</i>	<i>Triticum aestivum</i>	Trockenresistenz	[176]
<i>TaVer2</i>	<i>Triticum aestivum</i>	Vernalisation	[188-190]
<i>OsJAC1</i>	<i>Oryza sativa</i>	Pathogenabwehr	[191-194]
<i>ZmBGAF</i>	<i>Zea mays</i>	Bindet und agglutiniert β -Glucosidase	[181, 195-198]

Bevor *Ma* (2014) mit der systematischen Bezeichnung *monocot chimeric jacalin* zu arbeiten begann, wurden einige Proteine nicht als Mitglieder dieser Familie identifiziert.^[62] So wird beispielsweise das in Mais vorkommende MCJ als β -Glucosidase-Aggregationsfaktor (BGAF) bezeichnet, da das Protein spezifisch an β -Glucosidase bindet und anschließend einen unlöslichen quaternären Komplex bildet.^[196] Hierbei wird die Aktivität der β -Glucosidase

durch die Interaktion mit *ZmBGAF* nicht beeinträchtigt^[196] und die Interaktion wird auf die JRL-Domäne von *ZmBGAF* zurückgeführt.^[195] Die Interaktion findet jedoch nicht über Glykosylierungsmuster auf der Oberfläche von β -Glucosidase statt, sondern über eine spezifische geformte Oberflächenregion der β -Glucosidase.^[197, 198] Diese spezifische Interaktion wurde bisher für keine weiteren MCJ beobachtet, beispielsweise auch nicht für das *ZmBGAF* Homolog *SbSL*.^[180] Damit bleibt die physiologische Funktion der Protein-Protein-Interaktion von *ZmBGAF* weiterhin ungeklärt.

Unter Mitgliedern der Unterklasse MCJ1 konnte die Breitbandresistenz gegen verschiedene Pflanzenpathogene als physiologische Eigenschaft in Weizen und Reis beobachtet werden.^[176, 186, 192] Für *TaMCJ2* (Mitglied der MCJ2 Unterklasse) wurde bisher keine physiologische Funktion beschrieben.^[176] Ein Vertreter der Unterklasse MCJ3 (*TaMCJ3*) war in der Lage, die Resistenz gegen Bodentrockenheit zu erhöhen.^[176] Ein vergleichbarer Effekt wurde im Zuckerrohr (*S. hybrid*) durch das Homolog *ShDJ* nachgewiesen, welches zusätzlich die Biomasseproduktion erhöhte und die Verzuckerung steigerte.^[182]

Studien zu *TaVER2* legten nahe, dass das Protein eine wichtige Rolle in der Vernalisation (Blüteinduktion nach einer längeren Kältephase) in Weizen spielt und dass es in diesem Prozess phosphoryliert wird und anschließend eine Protein-Protein-Interaktion mit einem RNA-bindenden Protein im Nukleus eingeht.^[188-190]

Weizenpflanzen, die *TaHFR1* produzierten, zeigten eine erhöhte Resistenz gegen Schädlingsbefall wie z.B. gegen die Larven von *Mayetiola destructor*.^[183]

Hierbei stellt sich die Frage, ob die beobachteten physiologischen Eigenschaften auf eine spezifische MCJ-Domäne zurückzuführen sind oder die Kombination aus beiden Domänen für die Funktionalität benötigt wird. Im Folgenden wird der Kenntnisstand zu den einzelnen MCJ-Domänen beschrieben.

Zuckeraffinität der JRL-Domäne in MCJs

Im Vergleich zwischen beiden MCJ-Domänen ist die JRL-Domäne besser charakterisiert, insbesondere hinsichtlich ihrer Kohlenhydratbindespezifität (s. Tabelle 11).

Tabelle 11: Zucker Spezifität von charakterisierten MCJs.

Protein	Zucker Spezifität	Literatur
<i>SbSL</i>	Mannose und <i>N</i> -Acetylgalaktosamin	[180, 181]
<i>TaHFR1</i>	Mannose	[183]
<i>TaMCJ1</i>	Mannose	[176, 186, 187]
<i>TaMCJ2</i>	Mannose und Galaktose	[176]
<i>TaMCJ3</i>	Mannose und Galaktose	[176]
<i>TaVer2</i>	<i>N</i> -Acetylglucosamin und Galaktose	[189]
<i>OsJAC1</i>	Mannose	[194]
<i>ZmBGAF</i>	Mannose, Galaktose, Laktose und Glykoprotein	[181, 195]

Klassische pflanzliche JRLs (*Merolektin*) werden anhand ihrer Zuckerspezifität in zwei Untergruppen (gJRL und mJRL) unterteilt.^[143] Es gibt jedoch zunehmend Hinweise, dass MCJs einen höheren Grad an Vielfalt in ihren Bindungsmustern aufweisen als ihre klassischen Vertreter.^[62] Wie der Tabelle 11 zu entnehmen ist, weisen die meisten charakterisierten MCJs eine Mannose Spezifität auf, jedoch mit unterschiedlicher Affinität. *Ma et al.* (2021) zeigten, dass die jeweiligen Vertreter der drei MCJ-Unterklassen (*TaMCJ1-3*) grundsätzlich in der Lage waren, Mannose zu binden. Allerdings zeigte *TaMCJ2* ebenso eine vergleichbare Affinität zu Galaktose und *TaMCJ3* sogar eine höhere Affinität zu Galaktose als zu Mannose.^[176] Vergleichbar zu *TaMCJ3* wies *ZmBGAF* aus Mais ebenfalls eine höhere Affinität zu Galaktose als zu Mannose auf.^[195] Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass bestimmte Glykoproteine eine um 6000-fache höhere Affinität im Vergleich zu Galaktose aufzeigten.^[195] Die Autoren leiteten die höhere Affinität auf die Saccharidstrukturen der Glykoproteine zurück und schlussfolgerten, dass Glykanketten mit terminalen *N*-Acetylglucosamin-Resten für die erhöhte Präferenz verantwortlich sind.^[195] Das BGAF-Homolog aus *S. bicolor* (*SbSL*) zeigte ebenfalls eine sehr hohe Affinität zu den gleichen Glykoproteine wie für *ZmBGAF*, jedoch war die Präferenz zu Galaktose kaum ersichtlich, stattdessen zeigte *N*-Acetylgalaktosamin (GalNAc) die höchste

Wirkung der getesteten Monosacchariden.^[180] Jedoch ist zu erwähnen, dass für die individuellen JRL-Domänenproteine von *ZmBGAF* und *SbSL* nach dem Entfernen der DIR-Domäne keine Zuckeraffinität für Galaktose und GalNAc mehr nachgewiesen werden konnte.^[181]

TaVer2 aus Weizen ist bisher das einzige bekannte MCJ, das keine Spezifität für Mannose, stattdessen eine hohe Präferenz für *N*-Acetylglucosamin und Galaktose aufweist.^[189] Um die Interaktion der JRL-Domänen mit den unterschiedlichen Zuckern besser zu verstehen, sind Kenntnisse über die JRL-Faltung, -Anordnung und den JRL-Bindebereich notwendig.

JRL-Strukturen – Eine Grundstruktur mit unterschiedlicher Anordnung

Bisher sind kristallographische Strukturen weder für Vollängen-MCJ noch für getrennte einzelne MCJ-Domänen (DIR oder JRL) bekannt. Da die Domänenklassifizierung (nach Pfam) auf der entsprechenden Sequenz beruht, kann von einer ähnlichen Faltung ausgegangen werden.^[199] Im Fall von JRL sind einige Strukturen bekannt, wie unter anderem für gJRL aus den Samen des Brotfruchtbaums (*Artocarpus incisa*)^[200] und der Jackfrucht (*A. integrifolia*)^[158, 201] sowie für mJRL aus Ananas (*Ananas comosus*)^[202] und Brotfruchtbaum (*A. incisa*)^[203] (weitere Beispiele in Abbildung 21). Sowohl gJRL wie auch mJRL weisen die gleiche β -Prisma-I-Faltung auf, trotz posttranslationaler proteolytischer Spaltung im Fall von gJRL.^[163] Der β -Prisma-I-Aufbau besteht aus drei Blättern mit vier antiparallelen β -Strängen, die drei kanonische griechische Schlüsselmotive (Abbildung 20A) 1, 2 und 3 bilden und entlang einer Längsachse zu einer β -Prismen-Struktur angeordnet sind.^[158] Im Fall von *Banlec* [mJRL aus Banane (*Musa acuminata*)] werden zwei Blätter als kanonische griechische Schlüsselmotive geformt und das Dritte bildet ein pseudogriechisches Schlüsselmotiv aus (Abbildung 20B).^[204] Trotz vergleichbarer Faltung können JRL unterschiedlich organisiert sein (s. Abb. 21). Hierbei ist zu erwähnen, dass in diesem Abschnitt ausschließlich JRL-Anordnungen aus dem Pflanzenreich beschrieben werden, JRL-Quartärstrukturen außerhalb des Pflanzenreichs wie beispielsweise das monomere JRL aus Säugetieren (PDB-Eintrag: 3WOC)^[205] werden nicht dargestellt.

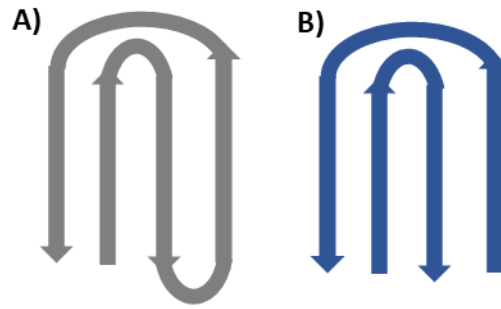


Abbildung 20: Schematische Darstellung eines griechischen Schlüsselmotivs. **A)** Die innere und äußere β -Stränge sind durch Schleifen verbunden. **B)** Im pseudogriechischen Schlüsselmotiv ist das innere Segment nicht mit dem äußeren Segment verbunden.

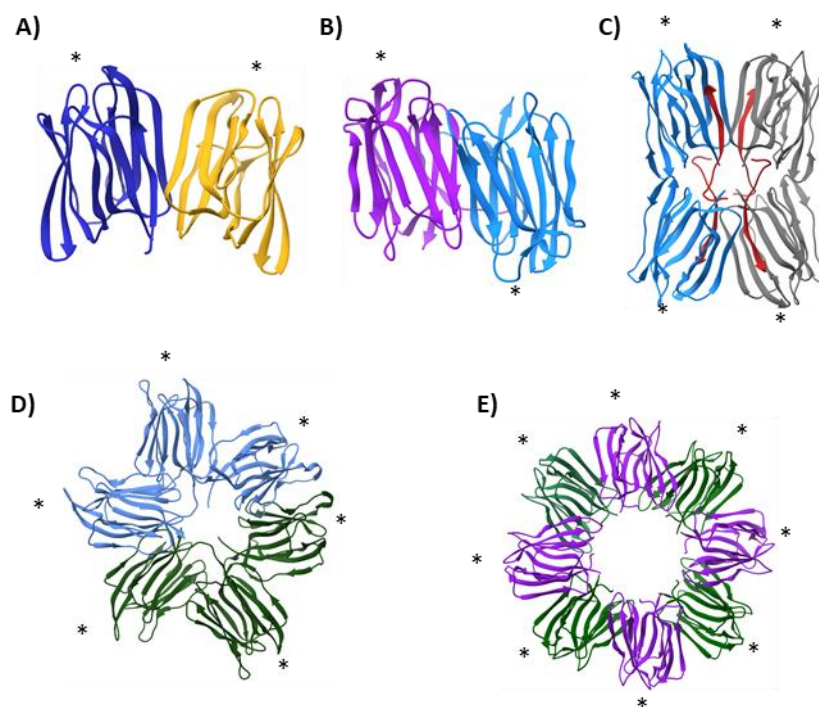


Abbildung 21: Dreidimensionale Strukturen von unterschiedlichen pflanzlichen JRLs. Die putative Liganden-Interaktion wird durch Schleifen auf der Oberseite eines der griechischen Schlüsselmotive gebildet (markiert mit einem *). **A)** *Banlec* als Dimer (PDB Eintrag: 3MIU)^[206], **B)** *Calsepa* als Dimer (PDB Eintrag: 1OUW)^[207], **C)** *Morniga-G* als Tetramer (PDB Eintrag: 1UGW)^[208], **D)** *PPL* als Pseudo-Hexamer (1ZGS)^[209] und **E)** *Heltuba* als Oktamer (PDB Eintrag: 1C3K)^[210].

JRL-*Merolektine* können anhand ihrer Quartärstrukturen in vier Untergruppen eingeordnet werden.^[204] Die ersten beiden Untergruppen bilden stabile Dimere aus, entweder mit einer asymmetrischen *tail-to-tail* (s. Abb. 21 A) oder mit einer *tail-to-head* Dimer Konfiguration (s. Abb. 21 B).^[204, 207] Zur dritten Untergruppe gehören sowohl gJRL wie auch mJRL, die in Lösung und in Kristallform als Tetramer vorliegen (s. Abb. 21 C).^[158, 203, 211-213] *Heltuba*, ein mJRL aus der Pflanze Topinambur (*Helianthus tuberosus*), kristallisiert als Oktamer, das um eine zentrale Achse eine abgeflachte sternförmige Architektur bildet (s. Abb. 21 E), jedoch als Tetramer in Lösung vorliegt.^[210] Das abgebildete mJRL-*Hololektin* (Abb. 21 D) aus

Parkia platycephala (PPL) nimmt eine Sonderform in der Betrachtung von JRL-Quartärstrukturen ein. Es ist aus drei modularen JRL-Domänen zusammengesetzt und kristallisiert als Dimer (wird als Pseudo-Hexamer bezeichnet) in einer ringförmigen Anordnung.^[209]

Charakteristische Interaktion von mJRL mit Kohlenstoffhydratverbindungen

Um ein besseres Verständnis der unterschiedlichen physiologischen Eigenschaften (B.1.1.1, S. 50) von mJRL zu erhalten, ist ein detaillierter Kenntnisstand über die Interaktion mit unterschiedlichen Kohlenstoffhydratverbindungen an den Bindestellen unerlässlich. So wurden mJRLs im Komplex mit unterschiedlichen Monosacchariden (Mannose, Glukose und ihre Derivate),^[203, 206, 209, 212-214] Disacchariden (Laminaribiose, Mannobiose etc.)^[204, 206, 210] und komplexen Glykanverbindungen^[215, 216] kristallisiert. Unter anderem zeigten diese Studien, dass die erste Bindestelle hoch konserviert ist und sich auf der Oberseite des ersten griechischen Schlüsselmotivs zwischen zwei Schleifen befindet.^[217] Die anderen Schleifenregionen auf der Oberseite des zweiten und dritten griechischen Schlüsselmotivs weisen eine höhere Variabilität auf, bei der bisher lediglich für zwei mJRLs eine zusätzliche Bindestelle nachgewiesen wurde.^[202, 217] Die Bindestellen von mJRLs können in unterschiedliche Ebenen gegliedert werden. Die erste Ebene bildet eine kleine Bindetasche, in der ein Mannose-Monosaccharid (bzw. ein Derivat oder Glukose) spezifisch interagieren kann (s. Abb. 22).^[166] Mannose und Glucose haben dabei ein ähnliches Interaktionsmuster, bei dem die Lektine die äquatoriale Position der 4-Hydroxylgruppe erkennen, im Gegensatz zur axialen 4-Hydroxylgruppe in Galaktose.^[218] Die Monosaccharid-Bindestelle von mJRLs wird aus einer Schleife mit zwei Gly-Resten gebildet und die zweite Schleife weist das charakteristische Gly-X₃-Asp Bindemuster auf.^[204] Die zweite Bindestelle in *Banlec* und *AcmJRL* weist ein vergleichbares Bindeprofil mit der ersten Bindestelle auf.^[202, 204]

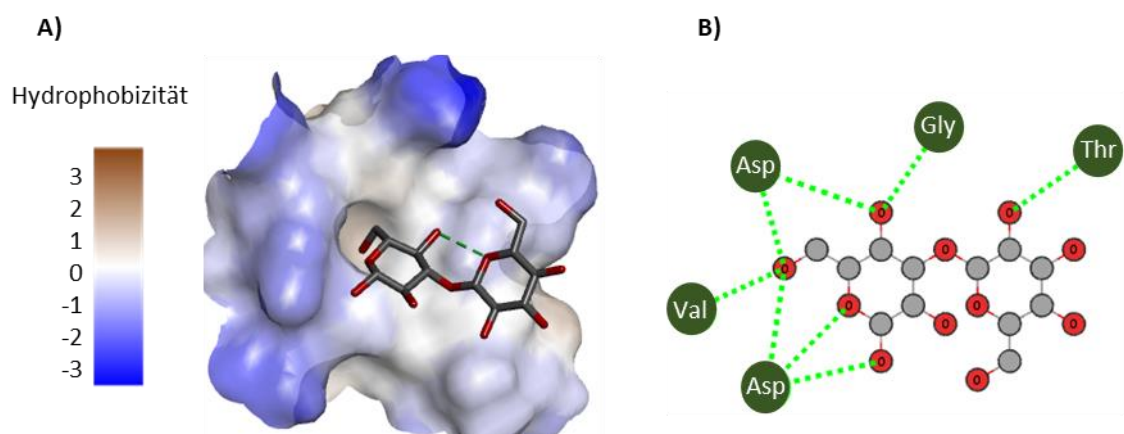


Abbildung 22: Disaccharid-Interaktion (Laminaribiose, graue Stäbchen) mit *Banlec* (PDB-Eintrag: 2BN0).^[204] **A)** Dreidimensionale Oberflächenansicht der Binderegion. Die Färbung der Oberfläche erfolgte nach dem Grad ihrer Hydrophobizität. Entsprechend repräsentieren blaue hervorgehobene Bereiche eine geringe bzw. keine Hydrophobizität und braune hervorgehobene Flächen eine hohe Hydrophobizität in diesem Bereich. **B)** Liganden-Interaktionsschema (Wasserstoffbrückenbindungen) der beteiligten Reste an Bindestelle 1. ^[204] Darstellung erfolgte durch *Discovery Studio 2021 Client*.

Die Bindestelle der Monosaccharide ist umgeben von einem erweiterten Bindebereich, der für die spezifische Erkennung größerer mannosehaltiger Oligosaccharide oder *N*-Glykanketten verantwortlich ist.^[166]

Dirigent-Domäne in MCJ – wenige physiologische Funktionen sind bekannt

Aufgrund der beiden MCJ-Domänen (DIR und JRL) wird das Volllängenprotein phylogenetisch entweder den DIR-Proteinen oder den Pflanzenlektinen zugeordnet.^[20, 62] In Abschnitt A.1 wurde detailliert die DIR-Proteinfamilie beschrieben. Mitglieder dieser Proteinfamilie sind unter anderem im Sekundärmetabolismus von unterschiedlichen phenolischen Zwischenprodukten involviert, wie etwa in der Synthese von Lignanen,^[42] aromatischen Terpenoiden^[55] sowie Pterocarpanen.^[22] Darüber hinaus sind DIR-Proteine an biotischen und abiotischen Stressreaktionen beteiligt.^[17, 58] Jedoch sind nur wenige physiologische Eigenschaften der DIR-Domäne in MCJs bekannt.

Bisher konnte kein Zusammenhang von MCJs in der Regulierung bzw. Beteiligung im Lignin-Metabolismus nachgewiesen werden.^[47, 176, 182] Unterschiedliche Studien zeigten, dass nach dem Entfernen der DIR-Domäne die Agglutinationsaktivität von *ZmBGAF* aufgehoben wurde^[195], die Zuckerbindung der JRL-Domäne verändert wurde^[181] und die Resistenz gegen Krankheitserreger verloren ging.^[192] Jedoch führte das Entfernen der DIR-Domäne in *TaJA1* aus Weizen zu keiner Veränderung der Zuckerspezifität und die Pathogenresistenz wurde nicht auf die DIR-Domäne zurückgeführt.^[187] Dies verdeutlicht die Dringlichkeit für weitere Untersuchungen der DIR-Domäne in MCJs, um ein besseres Verständnis ihrer Funktion zu erhalten.

B.2 Projektbeschreibung

Ein Mitglied der MCJ-Proteinfamilie ist das *OsJAC1* (Gen-ID: Os12g0247700) aus *O. sativa* (Reis). Die Genexpression von *OsJAC1* wird in Reaktion auf biotische und abiotische Stressfaktoren gesteigert.^[192, 193] Abbildung 23 zeigt eine Übersicht der bisherigen Kenntnisse über beobachtete physiologische Eigenschaften und ihre Zuckerspezifität.

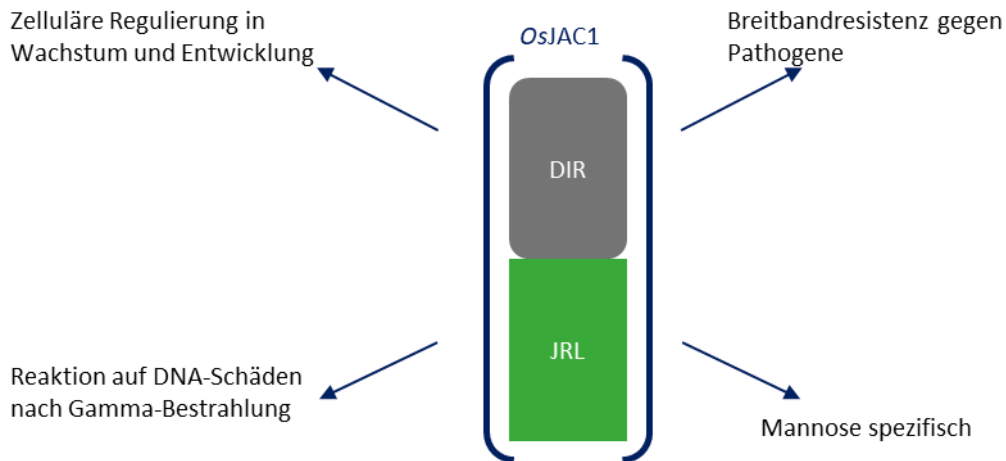


Abbildung 23: Schematische Übersicht von physiologischen Eigenschaften von *OsJAC1*. Das modular aufgebaute *OsJAC1* (Volllängenprotein in blauer Klammer) besteht aus einer Dirigent- Domäne (DIR in grau) und einer Jacalin-ähnlichen Lektin-Domäne (JRL in grün). Die Mannose-Zuckerspezifität wird auf die JRL-Domäne zurückgeführt^[194] und alle weiteren abgebildeten physiologische Eigenschaften auf das Volllängenprotein *OsJAC1*.

In Reis ist die *OsJAC1*-Genexpression insbesondere in Blättern sehr hoch und kann durch das Stresshormon Methyljasmonat induziert werden.^[194] Die konstitutive Überexpression von *OsJAC1* in Reis hat einen negativen Einfluss auf das Pflanzenwachstum und führt zu kürzeren Koleoptilen.^[191] Die Autoren *Jiang et al.* argumentierten daher, dass *OsJAC1* eventuell eine regulatorische Funktion in der Zelle hinsichtlich der Pflanzenentwicklung hat.^[191] Dass *OsJAC1* in der Lage ist, die Genexpression zu regulieren und somit sich unter anderem im Zellkern befinden kann, zeigten *Jung et al.* (2019).^[193] Hierbei wurde gezeigt, dass die Überexpression von *OsJAC1* in transgener *A. thaliana* zu einer Hyperresistenz gegen DNA-Schäden nach Gammabestrahlung führt und somit das Protein eine wichtige regulatorische Funktion in der Wahrnehmung von DNA-Schäden besitzt.^[193]

Eine weitere interessante physiologische Funktion des Proteins ist seine Breitbandresistenz vermittelnde Eigenschaft gegen verschiedene bakterielle und pilzliche Pflanzopathogene, wenn es konstitutiv in Reis, Weizen und Gerste exprimiert wird.^[192] Zusätzlich konnte folgendes gezeigt werden: (I) Die Akkumulation des Volllängenproteins an dem Ort des Pathogenangriffs, (II) die JRL-Domäne ist für die Pathogenlokalisierung verantwortlich, (III) die Interaktion zwischen den getrennten individuellen Domänenproteinen, (IV) beide Domänen

sind für die Pathogenresistenz notwendig und (V) eine antimikrobielle Wirkung transgener Pflanzenextrakte.^[192] Die Autoren schlussfolgerten, dass die JRL-Domäne für die Pathogenerkennung und die DIR-Domäne für die Pathogenabwehr verantwortlich sind.^[192]

Jedoch fehlt trotz der vielen beschriebenen physiologischen Funktionen von *OsJAC1* bisher ein grundlegendes mechanistisches Verständnis des Volllängenproteins und die Funktionen der einzelnen Domänen. Zwar wurde die JRL-Domäne von *OsJAC1* als Mannose-spezifisches Lektin beschrieben, jedoch erfolgte die Bestimmung mittels eines Fusionsproteins der JRL-Domäne mit einem Glutathion-S-Transferase-Tag (GST-Tag).^[194] Wie im vorigen Abschnitt (S. 55) beschrieben, kann sich die Zuckerspezifität von MCJs ändern, nachdem die DIR-Domäne entfernt wurde.^[181] Damit ist es unabdingbar, die Zuckeraffinität systematisch für das Volllängenprotein sowie für die beiden Domänenproteine zu untersuchen.

Die vorliegende Arbeit wurde durchgeführt, um das Volllängenprotein *OsJAC1* und dessen beiden Einzeldomänenproteine systematisch hinsichtlich ihrer biochemischen und strukturellen Eigenschaften zu erforschen. Abbildung 24 beschreibt die zum Beginn des Projekts aufgestellten Arbeitspakete, die Grundlage waren für die durchgeführten Studien in dieser Arbeit.

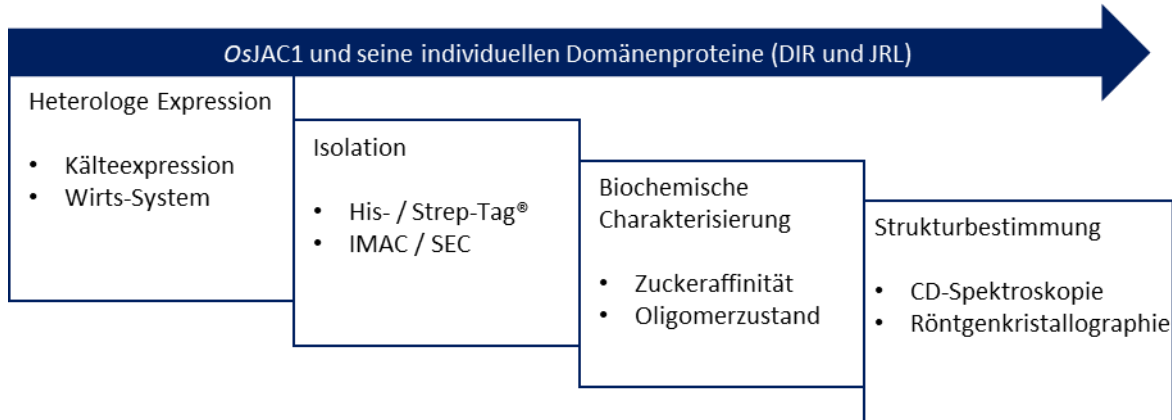


Abbildung 24: Übersicht der Arbeitspakete zu Beginn des Projekts und deren Hauptbestandteile.

Als wichtiger Meilenstein wurde die heterologe Produktion von *OsJAC1* und den beiden Einzeldomänenproteinen in *E. coli* definiert. Die lösliche Produktion und anschließende Isolation der Proteine war Voraussetzung für weitere Studien hinsichtlich biochemischer und struktureller Eigenschaften. Hierfür konnte auf Kenntnisse und Methodenentwicklung vorhergehender Abschlussarbeiten in der Arbeitsgruppe *Classen* zurückgegriffen werden.^[219-221] Basierend auf diesen Vorarbeiten waren die Ausbeute und die Reinheit des Volllängenproteins nicht ausreichend.^[220, 221] Auf dieser Grundlage sollten unterschiedliche Optimierungsansätze

für die Expression in dieser Arbeit angestrebt werden. Anschließend sollte die bisherige etablierte Isolationsmethode evaluiert werden, die mittels eines Strep-Tags® einen hohen Reinheitsgrad lieferte, allerdings mit einer geringen Ausbeute.^[221] Ziel war es, einen robusten Arbeitsablauf vom Gen zum Protein zu etablieren mit einer Kombination aus hoher Reinheit und Ausbeute, um anschließend unterschiedliche biochemische Untersuchungen durchführen zu können.

Im Rahmen der Bachelorarbeit von A.V. *Fejzagic* konnten erste Kristallstrukturen für die JRL-Domäne von *OsJAC1* generiert werden.^[219] Allerdings erfolgte damals noch keine Beschreibung und kein Vergleich der Domänenstruktur mit anderen Mitgliedern der JRL-Familie. Diese Einordnung ist Bestandteil dieser Arbeit. Zusätzlich sollten Kristallisationsversuche für das Volllängenprotein und das DIR-Domänenprotein durchgeführt werden. Kenntnis über die Struktur der beiden Domänen bzw. des Volllängenproteins könnte zur Aufklärung der relevanten Funktion der Pathogenresistenz von *OsJAC1* und anderen Vertretern seiner Familie von entscheidender Bedeutung sein. Langfristig sollte dies potenzielle Bindungspartner von *OsJAC1* offenbaren, welche entweder von den Pathogenen oder von der Pflanze als Reaktion auf die Infektion stammen.

B.3 Ergebnisse und Diskussion

B.3.1 Klonierung und Konstruktdesign

Durch vorhergehende Abschlussarbeiten in der Arbeitsgruppe Classen waren bereits Plasmide für das Volllängenprotein OsJAC1 und dessen zwei getrennte Domänen (DIR und JRL) verfügbar.^[219-221] Basierend auf diesen Vorarbeiten hat sich die Expression bei niedrigen Temperaturen (10 °C) als erfolgversprechendster Ansatz herausgestellt. Dennoch waren die Ausbeute und Reinheit des Volllängenproteins nicht ausreichend.^[221] Auf dieser Grundlage wurden die aus Teil A (A.3.1, S. 23) bereits erarbeiteten Optimierungsansätze für die Kaltexpression von DIR-Proteinen übernommen, wie der Einsatz von Additiven (2 % Ethanol).

Im Fall des Volllängenkonstrukts (OsJAC1) wurde der Expressionsvektor vom ursprünglichen pET15b hin zu einem pCold™ (Takara Bio inc.) Vektorsystem getauscht; letzteres führte in einigen Fällen zu einer erhöhten Löslichkeit und Ausbeute von Proteinen nach der Kaltexpression.^[222] Der Vektoraustausch wurde erfolgreich über die *Gibson Assembly* Methode für das Volllängenprotein durchgeführt (C.3.1.1, S. 158).

Ermittlung der Sequenzabgrenzungen der Domänen von OsJAC1

Je nach verwendeten Datenbanken können die Sequenzabgrenzungen der einzelnen Domänen für das gleiche Protein sehr unterschiedlich definiert sein.^[223] Die zur Verfügung gestellten Konstrukte für die zwei OsJAC1-Domänen (DIR und JRL) weisen jeweils eine Sequenzüberschneidung von 10 Aminosäuren auf (s. Abb. 25 A). Um eine Übersicht über die Lage dieser Sequenz im Volllängenprotein zu erhalten, wurde anhand des webbasierten Programms RaptorX^[224] ein *in silico* Modell von OsJAC1 erstellt (s. Abb. 25 B). Der mit Template basierte Server verwendet für die Modellierung von Proteinstrukturen bereits strukturbekannte Homologe aus der *Protein Data Bank* (PDB)^[225] für die Berechnung des *in silico* Modells.^[224]

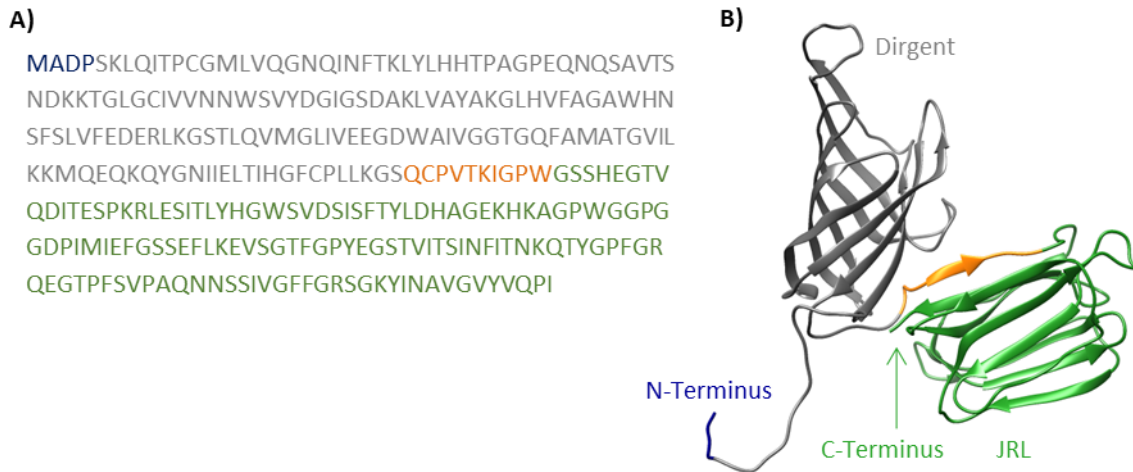


Abbildung 25: A) Proteinsequenz von *OsJAC1*, einschließlich der DIR-Domäne (grau hervorgehoben), der JRL-Domäne (grün hervorgehoben) sowie die Sequenzüberschneidung der zur Verfügung gestellten Konstrukte zwischen den beiden Domänen (orange hervorgehoben). **B)** Erstelltes *OsJAC1*-Modell mittels des webbasierten Programm RaptorX^[224] mit der DIR-Domäne (grau eingefärbt) und der JRL-Domäne (grün eingefärbt). Die Sequenzüberschneidung der beiden individuellen Domänen ist orange hervorgehoben. Der N-terminale Bereich der *OsJAC1*-Sequenz (blau hervorgehoben) ist nicht Teil der individuellen DIR-Domänensequenz.

Die Qualität des *in silico* Modells ist von den eingesetzten Vorlagen, sogenannten „Templates“ abhängig. Tabelle 50 (S. 194) listet die eingesetzten Templates und Ergebnisse auf, die für die Erstellung des Modells durch RaptorX verwendet wurden. Die Ergebnisse zeigen zwei unterschiedliche Qualitätsmerkmale für die beiden Domänen. Besonders auffällig ist der nicht modellierte Sequenzbereich am N-Terminus der DIR-Domäne (Abb. 25 B). Bisher sind vier DIR-Homologe strukturell beschrieben und sie weisen in einigen Fällen keine Strängerweiterung in diesem Bereich auf (A.1.3, S. 16), dementsprechend kann RaptorX diesen Bereich nicht modellieren. Jedoch sind zahlreiche JRL-Homologe-Strukturen bekannt (B.1.1.2, S. 52), wodurch das Modell aussagekräftiger ist für die JRL-Domäne von *OsJAC1*.

Bei den orange markierten Aminosäuren des Volllängenproteins *OsJAC1* in Abbildung 25 handelt es sich um die Sequenzüberschneidung der Konstrukte für die beiden individuellen Domänen. Das *in silico* Modell (Abb. 25 B) zeigt, dass dieser Bereich Teil der β -Prismen-Faltung der JRL-Domäne ist und die Sequenz der individuellen DIR-Domäne dadurch verlängert wird. Da dieser Bereich keine strukturelle Funktion in der Domäne ausübt, wurde ein Entfernen dieses Sequenzabschnittes aus der DIR-Domäne angestrebt. Mit dem sogenannten *round-the-horn-PCR* Ansatz konnte erfolgreich eine kürzere Variante der DIR-Domäne (DIR-RH) erstellt werden. Beide Varianten hatten keinen erwähnenswerten Unterschied in ihrem Schmelzpunkt- oder Interaktionsverhalten. Deshalb werden, sofern nichts anderes genannt wird, beide Varianten in dieser Arbeit nicht unterschieden.

B.3.2 Heterologe Produktion und Isolation von OsJAC1 und der Einzeldomänen (DIR und JRL) aus *E. coli*

In vorherigen Studien wurde OsJAC1 im Zytosol lokalisiert ohne Hinweise auf eine Sekretion.^[192] Durchgeführte *in silico* Auswertungen bestätigen dies. Mittels SignalP – 5.0 wurde das Vorkommen von Signalpeptiden in OsJAC1 auf 0,1 % geschätzt.^[226] Unter Anwendung von DeepLoc – 1.0 konnte vorhergesagt werden, dass das Protein sich im Zytosol (94,6 %; s. Abb. 26) befindet und zu 96 % löslich ist.^[101]

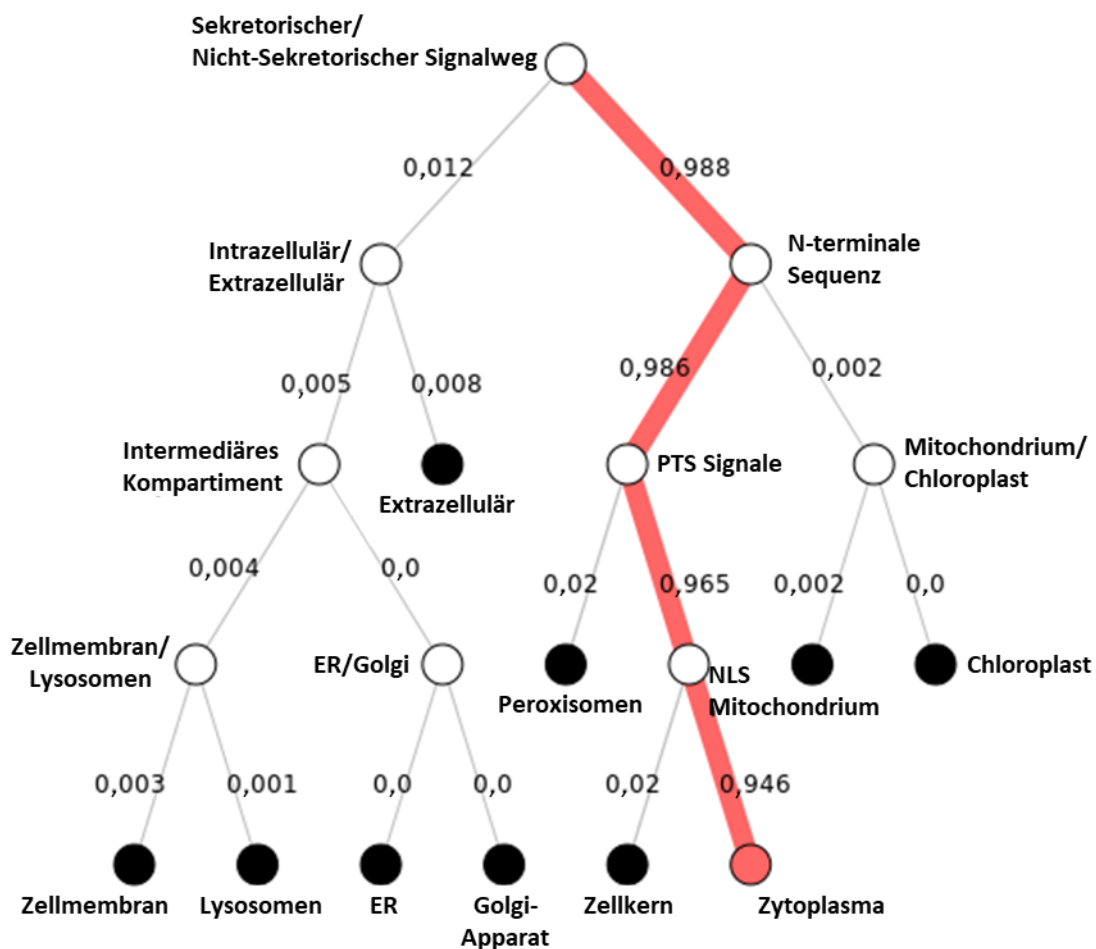


Abbildung 26: DeepLoc – 1.0^[101] Vorhersage über die subzelluläre Lokalisierung von OsJAC1 in der Pflanzenzelle. Zehn verschiedene Kompartimente in der Zelle sind abgebildet: Zellkern, Zytoplasma, Extrazellulärraum, Mitochondrium, Zellmembran, endoplasmatisches Retikulum (ER), Chloroplast, Golgi-Apparat, Peroxisomen und Lysosomen.

Basierend auf diesen Erkenntnissen kann angenommen werden, dass das Protein nicht durch Glykosylierung modifiziert wird und somit in *E. coli* heterolog produziert werden kann. Nach dem Screening verschiedener Expressionsbedingungen wurden OsJAC1 und seine beiden separaten Domänen (JRL und DIR) mit Hilfe eines Kaltexpressionsprotokolls (3,5 Tage bei 10 °C) hergestellt.

B.3.2.1 Beobachtete Schwierigkeiten im Handling der Proteine

Expressionsprobleme zurückzuführen auf kryokonservierte *E. coli* Kulturen

Es wurde ein Rückgang der Expressionseffizienz von kryokonservierten Glycerinkulturen, primär von *OsJAC1* und DIR-Domänenproteine produzierenden Stämmen, festgestellt. Abbildung 27 zeigt eine Testexpression von zeitgleich hergestellten Kryokulturen von *OsJAC1* produzierenden Stämmen. Darunter waren Stämme, die nach ihrer Erstellung nicht verwendet wurden und als *back-ups* dienten.

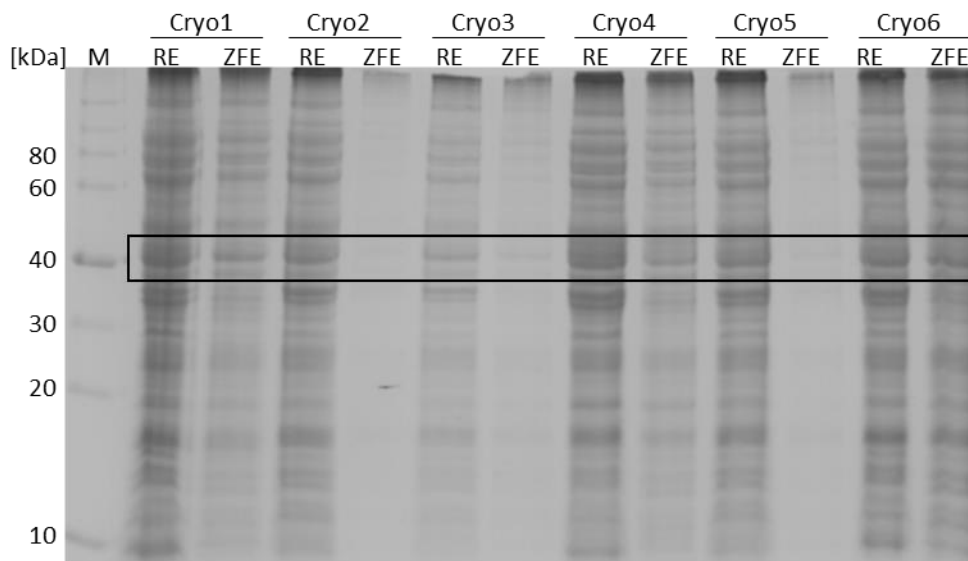


Abbildung 27: Coomassiegefärbte SDS-PAGE (12 %) von Expressionstest unterschiedlicher kryokonservierter *E. coli* Kulturen (Cryo1-6) mit einem pCold IV_*OsJAC1* Vektorsystem. Es wurde keine Überexpression von *OsJAC1* festgestellt. Die Abkürzungen in der Abbildung stehen für: M = Marker; RE = Rohextrakt; ZFE = Zellfreier Rohextrakt.

Bei allen getesteten kryokonservierten *E. coli* Kulturen mit einem pCold IV_*OsJAC1* Vektorsystem wurde keine Überexpression, im schwarz eingerahmten Bereich, beobachtet. Ebenso bei Stämmen, die zuvor nicht verwendet wurden und als *back-ups* dienten. Um den Expressionsunterschied besser zu verdeutlichen, wird als Beispiel für eine erfolgreiche Überexpression auf Abbildung 29 A (S. 70) verwiesen.

Ein wachstumshemmender Effekt wurde für *OsJAC1* produzierende *E. coli* Stämme, anhand von Wachstumskurven, festgestellt.^[192] Da bereits eine geringe basale Expression von leicht toxischen Proteinen eine negative Auswirkung auf die Stabilität von Plasmiden haben kann,^[227] ist eventuell die Plasmidstabilität in den verwendeten kryokonservierten *E. coli* BL21 (DE3) Stämmen nicht gewährleistet. Aus diesem Grund wurde in regelmäßigen Abständen eine neue Transformation durchgeführt. Dabei wurde auf eine Kryolagerung von etwa einem halben Jahr geachtet.

Wahl des Isolations-Tags: Strep-Tag® oder His-Tag

In vorausgegangenen Arbeiten konnten die Einzeldomänenproteine von *OsJAC1* mit einem hohen Reinheitsgrad mittels der StrepTactin®-Affinitätschromatographie isoliert werden. [220, 221] Abbildung 28 zeigt coomassiegefärbte SDS-PAGE Gele zu der in dieser Arbeit durchgeführten Proteinisolation der Einzeldomänenproteine mit einem Strep-Tag®. Tabelle 12 listet die Expressionsbedingungen und Isolationsergebnisse auf.

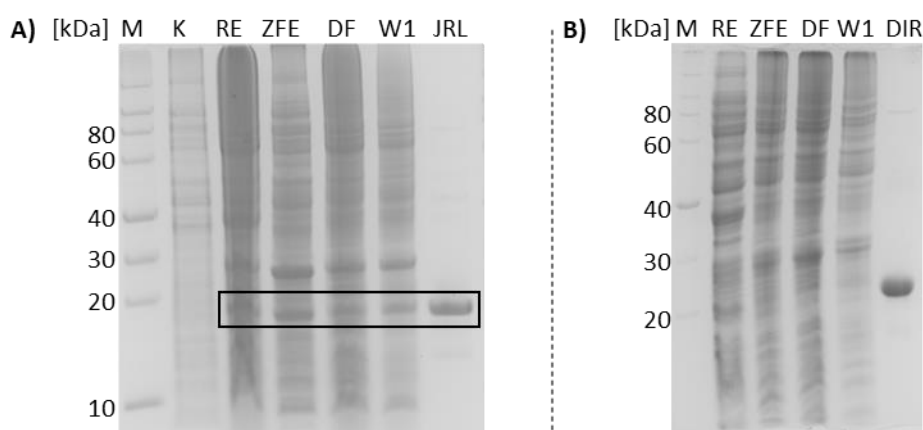


Abbildung 28: Coomassiegefärbte SDS-PAGE (12 %) der heterologen Produktion und Isolierung von **A)** JRL-Domäne mit einem Strep-Tag® **B)** DIR-Domäne mit einem Strep-Tag®. M = Marker; K = Kontrolle; RE = Rohextrakt; ZFE = zellfreier Extrakt; DF = Durchfluss; W1 = Waschfraktion mit 100 % Puffer W. Elution der Proteine (JRL und DIR) erfolgte mit 100 % Puffer E.

Tabelle 12: Überblick über die Expressionsbedingungen und Ergebnisse der Isolierung durch StrepTactin®-Affinitätschromatographie von den individuellen *OsJAC1*-Domänenproteinen (DIR und JRL).

	JRL	DIR
Plasmid	pET15b	pET15b
Wirtssystem	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)
Expressionsbedingung	15 °C für 3,5 Tage	15 °C für 3,5 Tage
MW [kDa]	18,6	21,2
Reinheit ¹ [%]	>95	>95
Ausbeute [mg mL ⁻¹]	1,0	2,8
V _{Proteinlösung} [mL]	1,0	1,0
Pellet Größe [g]	13,0	9,1
Kulturgröße [mL]	500	500

¹Geschätzt über die Banden in der SDS-PAGE

Die hohe Isolationseffizienz der beiden Einzeldomänenproteine konnte reproduziert werden jedoch mit niedriger Ausbeute. Im Fall des JRL-Domänenproteins (s. Abb. 28 A) konnte beobachtet werden, dass sich ungebundenes Protein in allen beobachteten Fraktionen befindet. Folglich entstand ein hoher Ausbeuteverlust während der Isolation. Eventuell ist der Strep-Tag® an der JRL-Domäne im Vergleich zu der DIR-Domäne schwer für das Säulenmaterial zugänglich. Daraufhin wurde die Proteinisolation mittels IMAC angestrebt. Durch ein

optimiertes Isolationsprotokoll (C.3.3.2, S. 167) konnte ebenfalls ein hoher Reinheitsgrad erreicht werden, gleichzeitig eine höhere Proteinausbeute, wie es in Tabelle 14 (S. 74) zu sehen ist. Hierbei ist zu erwähnen, dass sich beide Isolations-Tags am C-terminalen Ende befanden.

Doppelbanden im SDS-PAGE aufgrund der Probenvorbereitung

Für das Volllängenprotein *OsJAC1* und die individuelle Domäne *OsJAC1*-DIR sind vermehrt Doppelbanden im SDS-PAGE beobachtet worden (s. Abb. 29 A), jedoch nicht für die *OsJAC1*-JRL-Domäne (Abb. 29 A). Eine proteolytische Abspaltung konnte zunächst nicht ausgeschlossen werden. Eine weitere Erklärung für die übereinander laufenden Doppelbanden im SDS-PAGE ist die Bildung von intramolekularen Disulfidbrücken während der Probenvorbereitung.^[228] Daraufhin wurde die Probenvorbereitung für die SDS-PAGE durch Temperaturreduzierung von 90 °C auf 70 °C angepasst (s. Abb. 29 B).

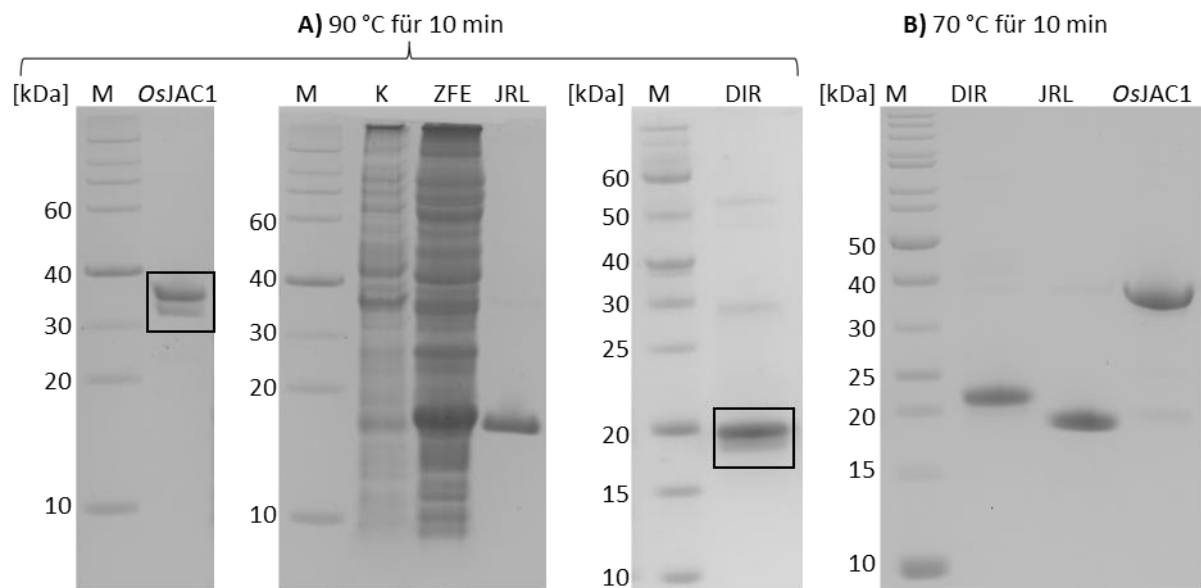


Abbildung 29: A) Coomassiegefärbte SDS-PAGE (12 %) nach der Probenbehandlung bei 90 °C für 10 min von isolierten *OsJAC1*-, JRL-Domänen- und DIR-Domänenproteinlösungen mittels IMAC. Eingerahmt wurden die entsprechenden Doppelbanden von *OsJAC1* und der DIR-Domäne. **B)** Coomassiegefärbte SDS-PAGE (12 %) nach der Probenbehandlung bei 70 °C für 10 min von isoliertem *OsJAC1* und den beiden individuellen Domänen DIR und JRL. Die Abkürzungen in der Abbildung stehen für: M = Marker; K = Kontrolle (pET15b_Leervektor); ZFE = Zellfreier Rohextrakt.

Durch das Anpassen der Methode konnten die Doppelbanden von *OsJAC1* und der DIR-Domäne verhindert werden. Die zusätzlich zu erkennenden Banden bei etwa 30 und 50 kDa in der DIR-Domäne (s. Abb. 29 A) wurden auf nicht vollständig aufgespaltene Oligomerzustände zurückgeführt. Durch Zugabe von frisch hergestelltem Reduktionsmittel (DTT) in die SDS-Pufferlösung konnten diese Banden verhindert werden (s. auch Abbildung 44, S. 90).

Verfärbung der Proteinlösung von *OsJAC1* und der individuellen DIR-Domäne

Nach der Proteinisolation des Vollängenproteins *OsJAC1* und der DIR-Domäne konnte eine leichte rot/gelbliche Verfärbung der Proteinlösung festgestellt werden. Dies deckt sich mit der Beobachtung für das DIR-Domänenprotein in der Arbeit von *T. El Harrar*.^[221] Abbildung 30 zeigt dokumentierte Beispiele anhand der DIR-Proteinlösung. Diese Verfärbung war allerdings nicht für die individuelle JRL-Proteinlösung (Abb. 27 B) zu erkennen.

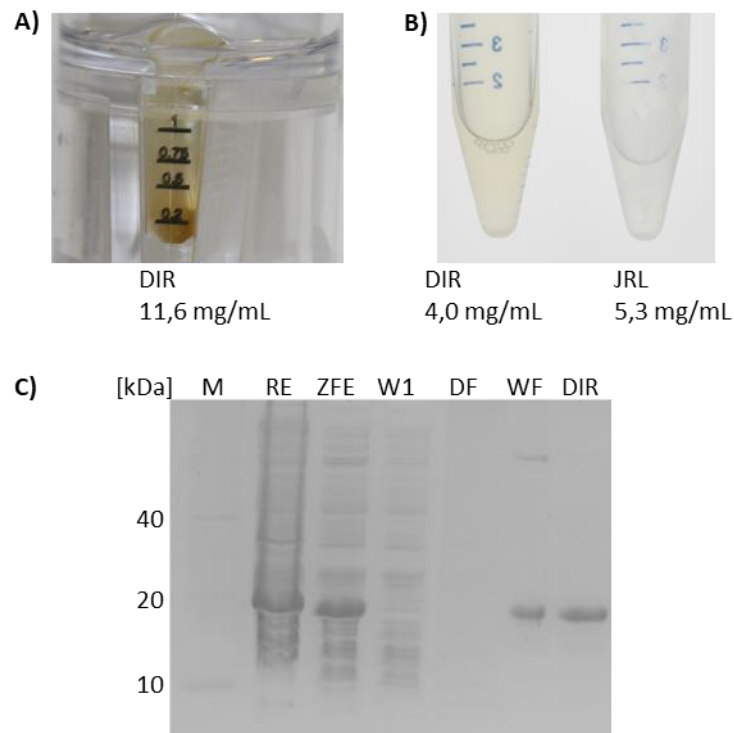


Abbildung 30: **A)** DIR-Proteinlösung (11,6 mg/mL) nach Zentrifugalkonzentration im Ultrakonzentrator (MWCO=10 kDa). **B)** Vergleich der DIR- und JRL-Proteinlösung nach der Proteinisolation (50 mM KPi-Puffer, pH 7,4). **C)** Coomassiegefärbte SDS-PAGE (12 %) der heterologen Produktion und Isolierung der individuellen DIR-Domäne. Die DIR-Bande entspricht der Proteinlösung aus A (11.6 mg/mL). M = Marker; K = Kontrolle; RE = Rohextrakt; ZFE = zellfreier Rohextrakt; DF = Durchfluss; W1 = Waschfraktion mit 100 % Puffer A (20 mM Imidazol); WF = Waschfraktion mit 30 % Puffer B (250 mM Imidazol).

Die beobachtete Verfärbung der Proteinlösung nach der Isolation könnte entweder durch Proteinverunreinigungen oder durch mögliche Wechselwirkungen mit niedermolekularen Verbindungen im Wirtsorganismus (*E. coli*) erklärt werden. Jedoch wurden, wie im oberen Beispiel für die DIR-Lösung (Abb. 30 C), ebenfalls in SDS-PAGE von *OsJAC1*-Lösungen (Abb. 30 B), keine zusätzlichen Proteinbanden identifiziert, trotz Verfärbung der Proteinlösung. Bei der schwachen zusätzlichen Bande von 20 kDa in der *OsJAC1*-Probe von Abbildung 29 B könnte es sich um ein JRL-Domänenprotein handeln.

Um die Absorptionswellenlänge der Proteinverfärbung zu untersuchen, wurde ein vollständiger Wellenlängen-Scan (UV-VIS) durchgeführt (s. Abb. 31).

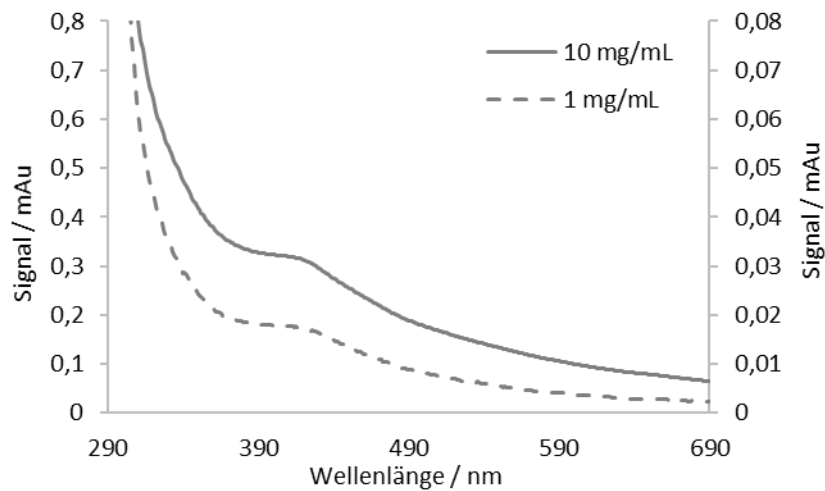


Abbildung 31: Wellenlängen-Scan (UV-VIS) einer gelblich verfärbten DIR-Proteinlösung mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen (10 und 1 mg·mL⁻¹).

Für den UV-VIS Scan wurden zwei verschiedene Verdünnungen verwendet (10 und 1 mg·mL⁻¹). Bei einer Wellenlänge von etwa 420 – 440 nm ist ein Maximum mit einer breiten Schulter zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass die Farbe nicht auf die RAYLEIGH-Streuung zurückzuführen ist, sondern eine noch unbekannte Komponente (Produkt aus einem Komplex oder einer Substanz) das Licht in diesem Bereich absorbiert.

Identifizierung der Proteinverunreinigung in *OsJAC1*-Proben

Nach der heterologen Expression und Isolation von *OsJAC1* konnten in einigen Fällen schwach ausgeprägte zusätzliche Banden in SDS-PAGE Gelen beobachtet werden. Um die Verunreinigungen zu identifizieren, wurde eine höhere Proteinmenge auf die Gele aufgetragen (29 µg statt 2,9 µg), entsprechende Banden ausgeschnitten (s. Abb. 32) und anschließend mittels MALDI-ToF identifiziert (s. Tabelle 13).

Tabelle 13: Identifizierte Proteinverunreinigungen aus *OsJAC1*-Proben mittels MALDI-ToF-Analysen.

Bande	Protein	MW [kDa] ¹	MW [kDa] ²	e-Wert
1	Chaperon Hsp70	69,0	70	0.00031
2	Glutamin-Fructose-6-Phosphat-Transaminase	67,1	80	8.4e-8
3	Alkyl-Hydroperoxid-Reductase – AhpF	57,7	150	3.1e-6
4	UDP-L-Ara4N Formyltransferase	74,3	> 150	8.4e-9

¹Theoretische Molekularmasse; ² Geschätzt über SDS-PAGE

Es konnten vier unterschiedliche Proteine identifiziert werden. Proteinverunreinigungen mit Chaperonen kommen oft vor und können über einen weiteren Waschschrift entfernt werden.^[229, 230] Bei den drei weiteren identifizierten Proteinen müsste noch gezeigt werden, ob es sich bei ihnen um unspezifische Verunreinigungen handelt oder sie durch eine spezifische Protein-Protein-Interaktion mit *OsJAC1* aus *E. coli* co-eluiert werden.

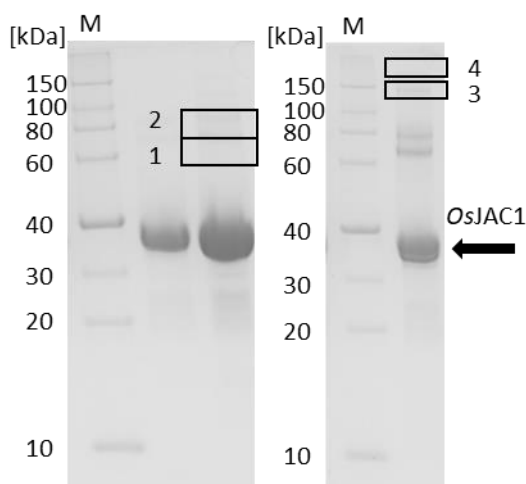


Abbildung 32: Coomassiegefärbte SDS-PAGE (12 %) nach Isolierung von *OsJAC1*. Schwarz eingerahmte Banden wurden ausgeschnitten und anschließend mittels MALDI-ToF analysiert. Es wurde eine höhere Proteinmenge (29 µg statt 2,9 µg) jeweils aufgetragen, um die schwachen Banden (1 – 4) deutlicher zu erkennen. M = Marker.

Zusammenfassung der optimierten Expressionsbedingungen

Durch die optimierte Kaltexpression konnte eine robuste und reproduzierbare heterologe Produktion des MCJs OsJAC1 und seiner beiden individuellen Domänenproteine in *E. coli* etabliert werden. Tabelle 14 fasst die wesentlichen Kenndaten der Expressionsbedingungen und die Ergebnisse nach der Proteinisolation zusammen.

Tabelle 14: Überblick über die Expressionsbedingungen und Ergebnisse der Isolierung durch immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) von OsJAC1 und seinen künstlich getrennten Domänen (DIR und JRL).

	OsJAC1	DIR-RH	JRL
Sequenzbereich	1 – 329 ¹	5 – 162 ¹	163 – 329 ¹
Plasmid	pCold IV	pET15b	pET15b
Wirtssystem	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)
Expressionsbedingung	15 °C für 3,5 d	15 °C für 3,5 d	15 °C für 3,5 d
MW [kDa]	35,6	19,3	18,4
Reinheit ² [%]	>95	>95	>95
Ausbeute [mg mL ⁻¹]	10,7	11,6	13,1
V _{Proteinlösung} [mL]	3,5	3,5	3,5
Pellet Größe [g]	7,0	5,4	6,4
Verfärbung	Gelb	Gelb	Farblos
Kulturgröße [mL]	500	500	500

¹Zählung ohne Tag und bezogen auf OsJAC1-Sequenz

²Geschätzt über die Banden in der SDS-PAGE

Die His₆-markierten Proteine wurden nach dem Zellaufschluss mittels IMAC isoliert. Die Reinheit des rekombinanten OsJAC1 und der beiden Domänenproteine nach der IMAC-Isolierung war höher als 95 % (Schätzung anhand der entsprechenden SDS-PAGE-Gele, s. Abb. 32).

B.3.2.2 Größenausschlusschromatographie von OsJAC1 und seinen zwei Domänen

Nach der IMAC-Proteinisolation wurden alle drei Proteine durch eine Größenausschlusschromatographie (englisch: *size-exclusion-chromatography*: SEC) jeweils getrennt. Anhand des Elutionsprofils wurde untersucht, ob ein weiterer Reinigungsschritt benötigt wird. Abbildung 33 zeigt die entsprechenden SDS-Gele der Expression und Isolation (IMAC und SEC) von OsJAC1 und seine beiden individuellen Domänenproteine. Abbildung 34 zeigt das Elutionsprofil der SEC-Analyse, die Kalibrierkurve mit Kennwerten ist in Abbildung 35 aufgezeigt.

Ergebnisse und Diskussion

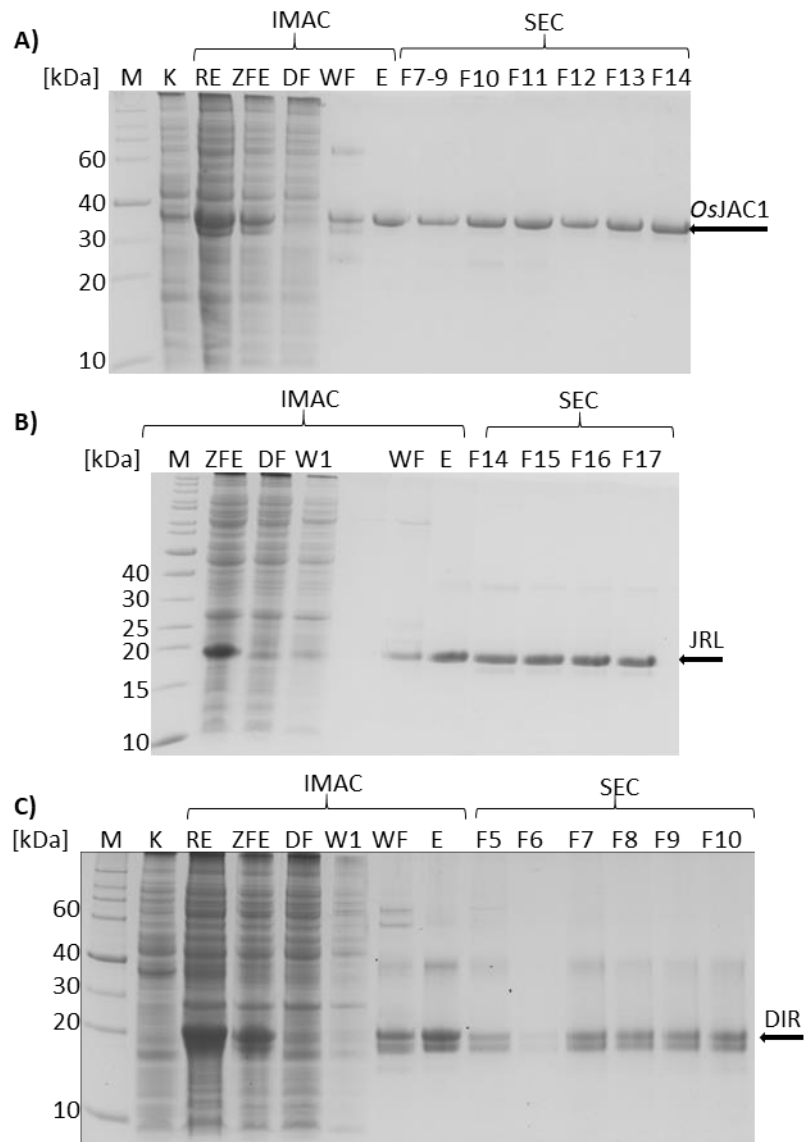


Abbildung 33: Coomassiegefärbte SDS-PAGE (12 %) der heterologen Produktion und Isolierung von **A)** OsJAC1, **B)** der JRL-Domäne und **C)** der DIR-Domäne. M = Marker; K = Kontrolle; RE = Rohextrakt; ZFE = zellfreier Extrakt; DF = Durchfluss; W1 = Waschfraktion mit 100 % Puffer A (20 mM Imidazol); WF = Waschfraktion mit 30 % Puffer B (250 mM Imidazol); E = Elution mit 100 % Puffer B (250 mM Imidazol); F# = SEC-Fraktion.

Biochemische Charakterisierung des Reisproteins OsJAC1

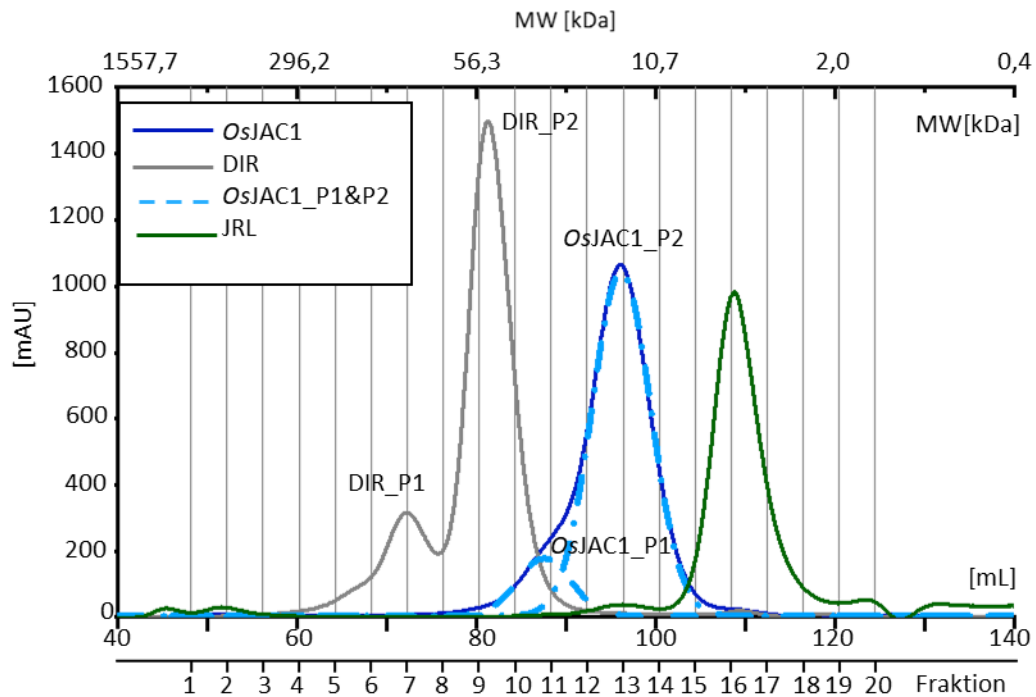


Abbildung 34: SEC-Chromatogramm von OsJAC1 (Blau), JRL-Domäne (Grün) und DIR-Domäne (Grau). SEC-Puffer: 50 mM KPi-Puffer, pH 7,4 und 300 mM NaCl. P1 und P2 sind die unterschiedlichen Signale der entsprechenden Proteine.

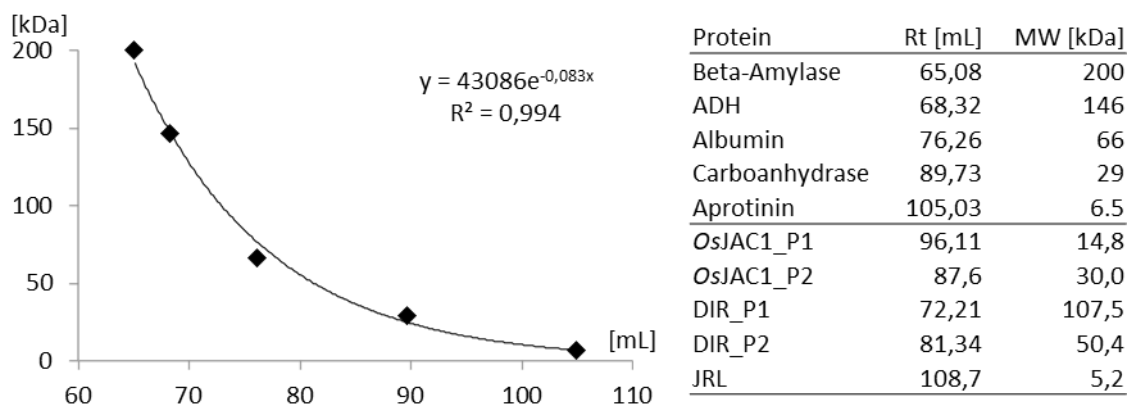


Abbildung 35: Links zu sehen ist die Kalibrierkurve für die Größenausschlusschromatographie; die rechte Tabelle listet die Kalibrierparameter auf mit den verwendeten Proteinen, den beobachteten Retentionszeiten und den putativen abgeleiteten Molekularmassen der OsJAC1-Proteine (Volllängenproteine und Domänenproteine).

Im Elutionsprofil von OsJAC1 (blaue Kurve, Abb. 34) ist eine leichte vorausgehende Schulter zu erkennen. Eine Peak-Dekonvolutionsanalyse mit *OriginPro 2019* hebt ein mögliches zweites Signal hervor, das von dem Hauptsignal überdeckt wird. Die berechnete Masse des sekundären Peaks (OsJAC1_P2) entspricht 30 kDa, was dem doppelten Molekulargewicht des Hauptpeaks (OsJAC1_P1) entspricht. Es ist jedoch wichtig zu beachten, dass beide berechneten Molekulargewichte unter der theoretischen Masse von 35,5 kDa liegen. Diese Diskrepanz könnte durch eine ungewöhnliche Elution aufgrund einer nicht globulären Form von OsJAC1 oder durch eine Wechselwirkung des Proteins mit der

Säulenmatrix erklärt werden, was ebenfalls zu einer verzögerten Elution führen würde. Es konnte kein wesentlicher Unterschied zwischen den untersuchten Fraktionen mittels SDS-PAGE festgestellt werden. Die Proteinisolation mittels IMAC erbrachte somit bereits eine hohe Reinheit, wobei die weitere Proteinisolation mittels SEC keine signifikante Verbesserung erbrachte.

Ähnliche Ergebnisse wurden für die Proteine der DIR- und JRL-Domäne erzielt. Die Doppelbanden bei 20 kDa der DIR-Fraktionen werden, wie bereits zuvor (S. 70) erläutert, aufgrund der SDS-PAGE-Probenvorbereitung verursacht.

Das SEC-Chromatogramm der DIR-Domäne zeigte zwei unterschiedliche Signale, jedoch konnte durch die SDS-PAGE festgestellt werden, dass alle Fraktionen eine identische Zusammensetzung aufweisen (s. Abb. 33 C). Die identische Zusammensetzung der Fraktionen deuten auf zwei Oligomere-Spezies hin. Die berechneten Massen der beiden Signale betragen 50 bzw. 107 kDa, was etwa dem Doppelten bzw. Vierfachen der theoretischen Masse von 20,9 kDa entspricht. Diese berechneten Massen könnten somit auf eine homodimere und tetramere Quartärstruktur hinweisen.

Die JRL-Domäne wies ein monodisperses Signal mit einer berechneten Masse von 5,2 kDa auf, was etwa 3,5-mal niedriger als die theoretische Masse von 18,4 kDa ist. Eventuell hat die JRL-Domäne den größten Einfluss auf das Elutionsverhalten des Volllängenproteins *OsJAC1*. Aufgrund der niedrigen putativen abgeleiteten Massen mittels der SEC-Analyse für *OsJAC1* und der JRL-Domäne, kann keine Aussage über die Oligomerisierung der beiden Proteine getroffen werden.

Zusätzlich wurde eine mögliche Wechselwirkung zwischen den beiden individuellen Domänen untersucht, indem eine stöchiometrische Mischung der Domänen (DIR und JRL) mittels SEC analysiert wurde (s. Abb. 36). Anschließend wurden die Fraktionen mittels SDS-PAGE untersucht (s. Abb. 37).

Biochemische Charakterisierung des Reisproteins OsJAC1

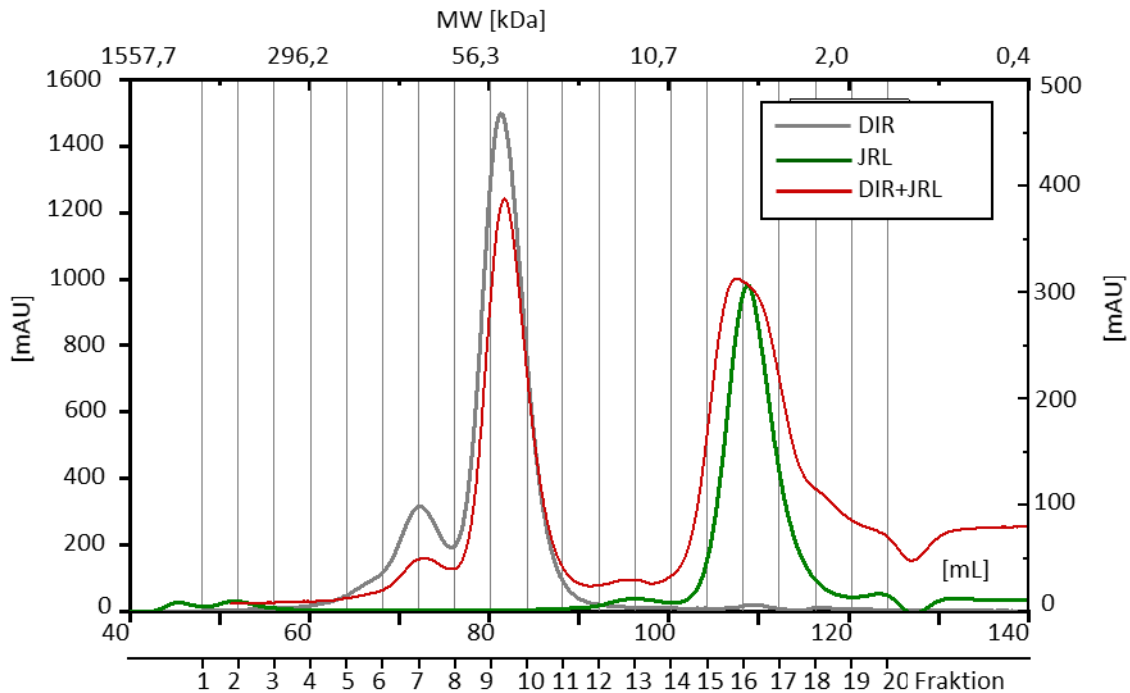


Abbildung 36: SEC-Chromatogramm der JRL-Domäne (Grün), DIR-Domäne (Grau) und eine stöchiometrische Mischung der beiden Domänen (Rot). SEC-Puffer: 50 mM KPi-Puffer, pH 7,4 und 300 mM NaCl.

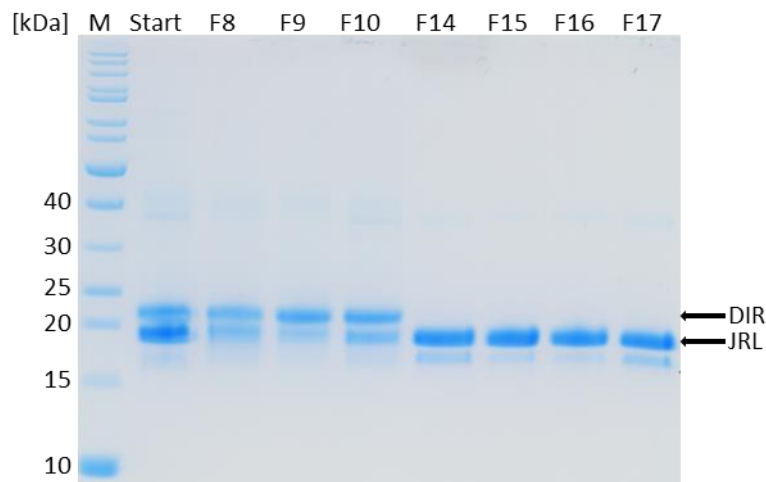


Abbildung 37: Coomassiegefärbte SDS-PAGE (12 %) der Fraktionen aus der SEC-Untersuchung von einer äquimolaren Mischung der beiden Domänen (DIR und JRL). M = Marker; Start = DIR- und JRL-Mischung von der Initiierung; F# = SEC-Fraktion.

Im Fall einer Interaktion zwischen den beiden individuellen Domänenproteinen wäre ein SEC-Signal zu erwarten. Dies war jedoch nicht zu beobachten, es wurden vergleichbare Retentionszeiten in der äquimolaren Mischung der beiden Domänen ermittelt zu den einzelnen Messungen. Demzufolge kam es zu einer Aufspaltung der beiden Domänen. Es waren lediglich in den Fraktionen F8 bis F10 drei Banden mit unterschiedlichen Intensitäten zu sehen (s. Abb. 37), welche der JRL-Domäne in geringen Mengen im DIR-Signal entsprechen.

Auffallend ist der breitere Signalverlauf der JRL-Domäne in der Domänenmischung, was eventuell durch Wechselwirkungen mit der DIR-Domäne verursacht wurde. Jedoch scheint der Einfluss der Wechselwirkung zwischen der JRL-Domäne und dem Säulenmaterial größer als zwischen den einzelnen Domänen zu sein.

Das Säulenmaterial besteht aus einer Dextran-Matrix (Glukose-Polysaccharid), die kovalent an eine vernetzte Agarose gebunden ist. In der Interaktionsanalyse mit unterschiedlichen Sacchariden (B.3.4.1, S. 113) wird gezeigt, dass die JRL-Domäne spezifische Glukose-Disaccharide erkennen kann, was zu einer Interaktion mit der Säulenmatrix und einer anschließenden Erhöhung der Retentionszeit führen kann.

B.3.3 Biochemische und strukturelle Charakterisierung

B.3.3.1 Schmelzpunktbestimmung als Maß der Proteinstabilität

Um Informationen über die Qualität und Stabilität der rekombinant produzierten Proteine zu erhalten, wurden Schmelzkurven mittels Fluoreszenzmessungen in Abhängigkeit zur Thermostabilität [Engl. *differential scanning fluorimetry* (DSF)] aufgenommen. Das Verfahren (Engl. *thermal shift assay*) basiert auf der Messung des intrinsischen Fluoreszenzsignals der Proteine bei 350/330 nm.^[231, 232] Die Aminosäure Tryptophan ist in erster Linie für das Fluoreszenzsignal in diesem Wellenlängenbereich verantwortlich, wobei die Signalintensität empfindlich gegen die Umgebung des Tryptophans ist. Eine Rotverschiebung des Emissionsmaximums zeigt den Übergang in eine Umgebung mit einem höheren polaren Anteil.^[233] Entsprechend werden in diesem Verfahren die Emissionsmaxima ($\lambda_{\text{max,em}}$) von gefalteten Proteinen bei einer Wellenlänge von 330 nm gemessen, während ungefaltete Zustände bei 350 nm beobachtet werden können.^[232] Das Verhältnis der Signale bei diesen beiden Wellenlängen wird gegen die Temperatur aufgetragen, um den Schmelzpunkt (T_M) eines Proteins zu bestimmen.^[232]

Einfluss der Pufferzusammensetzung auf die Proteinstabilität

Zunächst wurden unterschiedliche Pufferbedingungen wie der pH-Wert (Abb. 38) und die Additivkonzentrationen von Natriumchlorid (Tabelle 15) getestet, um ideale Lagerungsbedingungen für die Proteine zu testen.

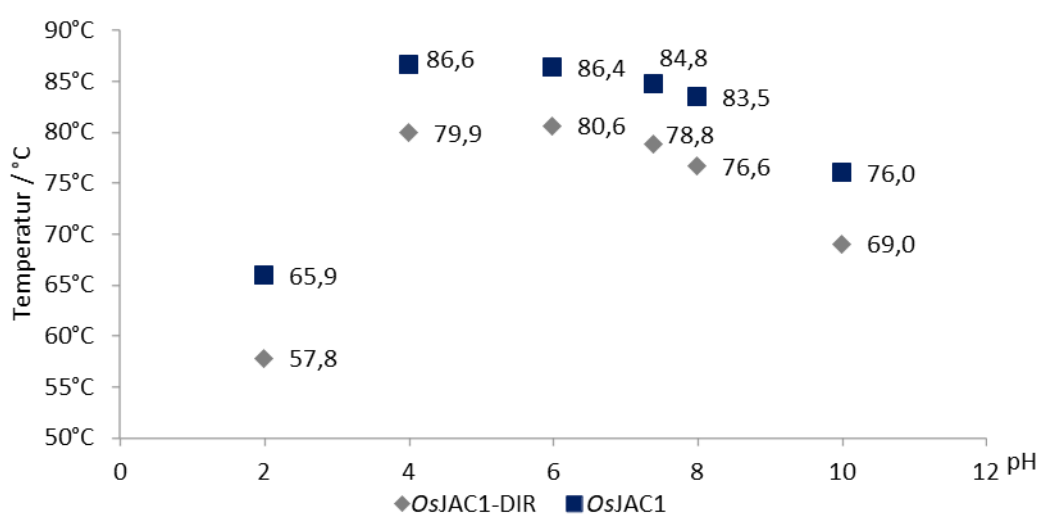


Abbildung 38: Schmelzpunkte von OsJAC1 und seiner DIR-Domäne (OsJAC1-DIR) in Abhängigkeit des pH-Werts.

Tabelle 15: Schmelzpunkte von *OsJAC1* in Abhängigkeit der Salzkonzentration (NaCl) im Puffer (50 mM KPi, pH 7,4).

Puffer	50 mM KPi, pH 7,4	+ 50 mM NaCl	+ 250 mM NaCl	+ 500 mM NaCl
T_M [°C]	84,8	84,9	85,5	87,4

Es wurde unter den getesteten Bedingungen jeweils ein Schmelzpunkt für das Volllängenprotein ermittelt. Allgemein waren die ermittelten Schmelzpunkte unter der anfänglichen Pufferbedingung (50 mM KPi, pH 7,4) für das Volllängenprotein *OsJAC1* (T_M = 84,8 °C) und der DIR-Domäne (T_M = 78,8 °C) bereits sehr hoch. Beide Proteine weisen eine höhere Stabilität im sauren als im basischen Bereich auf. Die Zugabe von Natriumchlorid als Additiv erhöhte den Schmelzpunkt bzw. die Stabilität von *OsJAC1* lediglich bei einer hohen Salzkonzentration von 500 mM um ca. 2 K. Aufgrund des hohen ermittelten Schmelzpunkts für *OsJAC1* und der DIR-Domäne unter den anfänglichen Pufferbedingungen (50 mM KPi, pH 7,4) und der guten Lagerung bei 4 °C wurde auf das Screening von weiteren Pufferbedingungen verzichtet.

Die Schmelzkurven von *OsJAC1* und seinen isolierten Domänen (individuell und gemischt) unter reduzierenden als auch oxidierenden Bedingungen sind in Abbildung 39 zu sehen sowie eine Zusammenfassung der Ergebnisse in Tabelle 16.

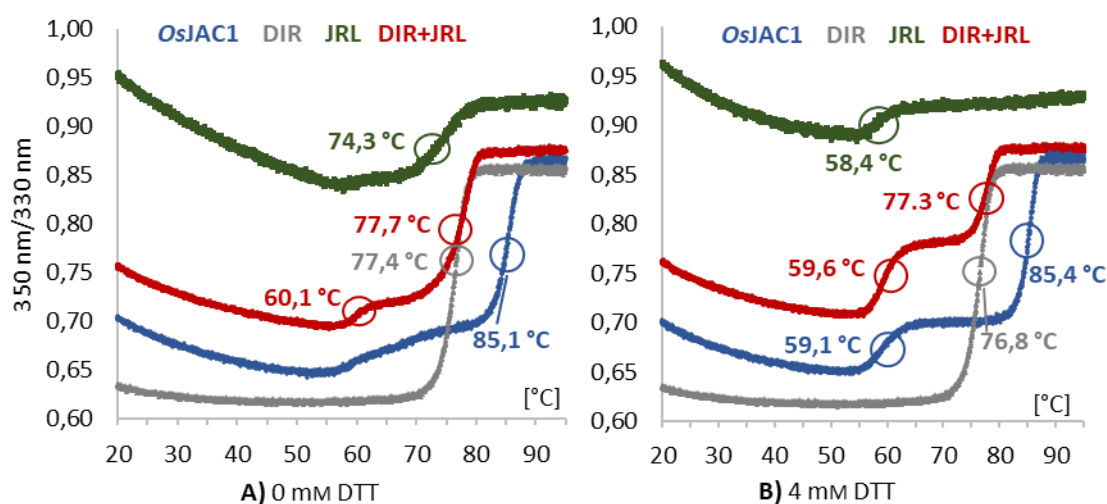


Abbildung 39: Schmelzkurven von *OsJAC1* (blau), der beiden individuellen Domänen JRL und DIR (grün und grau) und einer äquimolaren Mischung der beiden Domänen (rot) in **A)** 50 mM KPi-Puffer (pH 7,4) und in **B)** 50 mM KPi-Puffer (pH 7,4) und 4 mM DTT. Die Wendepunkte der Übergänge sind eingekreist und die jeweiligen Schmelztemperaturen (T_M) angegeben.

Tabelle 16: Ergebnisse der Schmelzpunktbestimmung mittels DSF für OsJAC1 und den einzelnen Domänen (getrennt und in einer äquimolaren Mischung JRL + DIR).

DTT [mM]	Proteine	Ausgangs-verhältnis ^a	Δ -Verhältnis ^b	T _{M1} [°C]	T _{M2} [°C]
0	JRL	0,95	-0,03	n.b.	74,3 ± 0,04
0	DIR	0,63	0,23	n.v.	77,4 ± 0,01
0	OsJAC1	0,70	0,17	n.b.	85,1 ± 0,03
0	JRL + DIR	0,76	0,12	60,1 ± 0,02	77,7 ± 0,02
4	JRL	0,96	-0,03	58,4 ± 0,13	n.b.
4	DIR	0,56	0,28	n.v.	76,8 ± 0,03
4	OsJAC1	0,70	0,16	59,1 ± 0,01	85,4 ± 0,01
4	JRL + DIR	0,77	0,12	59,6 ± 0,51	77,3 ± 0,05

^a I(350 nm)/I(330 nm); ^b [I(350 nm, 95 °C)/I(330 nm, 95 °C)] - [I(350 nm, 20 °C)/I(330 nm, 20 °C)]; n.b. nicht bestimmbar; n.v. nicht vorhanden

Die unterschiedlichen Schmelzkurven der untersuchten Proteine sind in Abbildung 39 aufgeführt. Die DIR-Domäne (grau) zeigte insgesamt das niedrigste Ausgangsverhältnis der gemessenen Intensitäten [I(350 nm)/I(330 nm)] sowie das höchste Δ -Verhältnis. Das Δ -Verhältnis beschreibt die Differenz der Intensitätsverhältnisse zwischen Anfang und Ende der Schmelzkurve {Formel: [I(350 nm, 95 °C)/I(330 nm, 95 °C)] - [I(350 nm, 20 °C)/I(330 nm, 20 °C)]}. Außerdem konnte kein signifikanter Effekt der Redoxbedingungen des Mediums für die DIR-Domäne festgestellt werden, da lediglich eine leichte Abnahme des Schmelzpunkts unter reduzierenden Bedingungen zu beobachten war (0,6 K).

Die Schmelzkurve der individuellen JRL-Domäne (grüne Kurve) wies ein sehr hohes Ausgangsverhältnis im Vergleich zu den anderen Kurven auf. Mit zunehmender Temperatur nahm der Wert stetig ab, bis es zu einer deutlichen thermischen Entfaltung kam. Im Vergleich zu der Saccharid-Bindestelle des JRL-Homologs *Banlec* aus der Bananenfrucht (*Musa acuminata*),^[204] enthält die JRL-Domäne von OsJAC1 ein Tryptophan in Position W196 an der putativen Bindestelle (B.3.4.4, S. 126). Die aromatische Seitengruppe des Tryptophans befindet sich an der Oberfläche des Proteins. Dies könnte das hohe anfängliche Fluoreszenzintensitätsverhältnis der JRL-Domäne erklären.

Der Übergang bei ca. 59 °C in den Schmelzkurven wurde in allen Proben beobachtet, die die JRL-Domäne enthielten (JRL individuell, OsJAC1, JRL+DIR). Besonders auffällig ist der Schmelztemperaturunterschied von 16 K im Vergleich von reduzierenden und oxidierenden Bedingungen für die JRL-Domäne. Als Begründung für den Stabilitätsgewinn wurde die Bildung einer Disulfidbrückenbindung in Betracht gezogen. Allerdings weist die JRL-Domäne lediglich ein Cystein (Cys161) auf, somit kann es sich bei dieser Disulfidbindung ausschließlich um eine intermolekulare Bindung innerhalb von Homodimeren handeln. Das Vorhandensein einer

Disulfidbrückenbindung wurde zusätzlich durch die Strukturbestimmung der JRL-Domäne nachgewiesen (Abb. 50, S. 100).

Im Falle des Volllängenproteins *OsJAC1* kann ebenfalls davon ausgegangen werden, dass die JRL-Domäne eine intermolekulare Disulfidbindung aufweist. In Abwesenheit der Disulfidbindung ist der erste Wendepunkt (bei T_{M1}) deutlich zu sehen (s. Abb. 39 B, blaue Kurve), was möglicherweise auf eine Denaturierung der JRL-Domäne oder einer Untereinheit hindeutet. Dieser Übergang ist unter nicht reduzierenden Bedingungen kaum sichtbar und der größte Teil der Verschiebung des Signalverhältnisses tritt bei T_{M2} auf (blaue Kurve in Abb. 39 A). Da *OsJAC1* unter physiologischer Bedingung in einer reduzierenden Umgebung (Zytosol) vorkommt, kann davon ausgegangen werden, dass beide Übergangspunkte das natürliche thermische Entfaltungsprofil des Proteins widerspiegeln.

Versuche *in planta* zeigten, dass die künstlich getrennten *OsJAC1*-Domänen miteinander interagieren.^[192] Basierend auf dieser Erkenntnis wurde eine stöchiometrische (1:2) Mischung der einzelnen Domänen getestet. Sowohl unter nicht reduzierenden als auch unter reduzierenden Bedingungen stimmten die beobachteten Schmelztemperaturen weitgehend mit den Einzeldomänen überein, wobei T_{M2} in *OsJAC1* um ca. 8 K nach oben verschoben ist (Tabelle 16). Da dieser Übergang von der DIR-Domäne dominiert zu sein scheint, könnte diese Beobachtung darauf hinweisen, dass die kovalente Verknüpfung der beiden Module eine besonders stabilisierende Wirkung auf die DIR-Domäne hat. Jedoch ist nicht zweifelsfrei auszuschließen, dass der Unterschied in T_{M2} zwischen der individuellen DIR-Domäne und der DIR-Domäne im Volllängenprotein auf eine Punktmutation in dem individuell produzierten DIR-Domänenprotein zurückzuführen ist.

Hypothese: Entfaltet sich die JRL-Domäne vollständig bei T_{M1} ?

Unter reduzierten Bedingungen wurden für das Volllängenprotein *OsJAC1* zwei Schmelzpunkte beobachtet (siehe Abb. 39). Jedoch stellte sich die Frage, ob der erste Wendepunkt der Schmelzkurve (T_{M1}) bei etwa 59 °C ausschließlich auf die JRL-Domäne zurückzuführen ist oder auf eine Denaturierung einer Untereinheit der JRL-Domäne. Hierfür wurden die Schmelzkurven und Proteinkonzentrationen aller drei Proteine (*OsJAC1*, JRL- und DIR-Domäne) unter reduzierenden (10 mM DTT) und nicht reduzierenden Bedingungen (0 mM DTT) vor und nach dem Erhitzen bei 60 °C für 10 Minuten verglichen. Tabelle 17 listet die Proteinkonzentration aller drei Proteine auf. Die Schmelzkurve von *OsJAC1* vor und nach der Hitzebehandlung wird in Abbildung 40 gezeigt.

Tabelle 17: Proteinkonzentration von *OsJAC1* und den individuellen Domänen (JRL und DIR) vor (HB_0) und nach (HB_1) der Hitzebehandlung bei 60 °C für 10 min. Die Konzentrationen wurden nach der Zentrifugation der Proteinlösung bestimmt.

DTT [mM]	Proteine	Konzentration- T_0 [mg·mL ⁻¹]	Konzentration- T_1 [mg·mL ⁻¹]	Veränderung der Proteinlösung ¹
0	JRL	1,50	1,47	-
10	JRL	1,39	0,33	starke Trübung
0	<i>OsJAC1</i>	11,84	12,26	-
10	<i>OsJAC1</i>	10,10	3,25	Trübung
0	DIR	7,95	8,10	-
10	DIR	6,90	7,40	-

¹Nach der Hitzebehandlung und visueller Beurteilung.

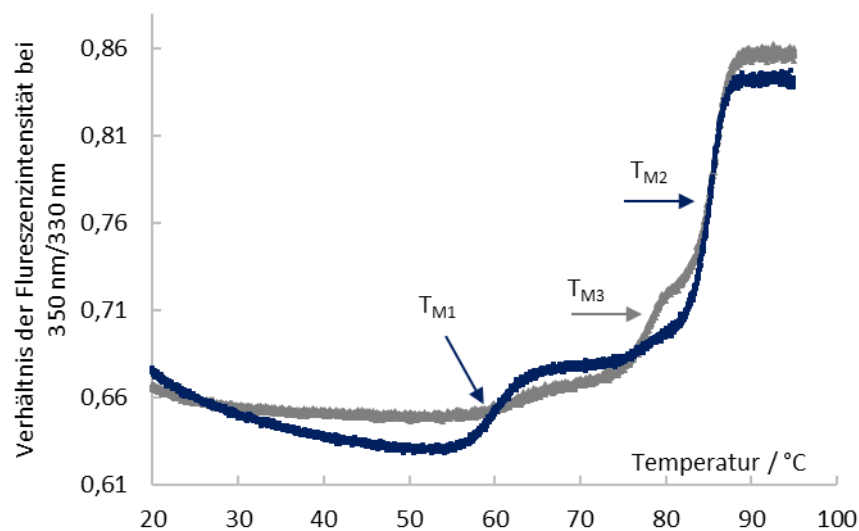


Abbildung 40: Schmelzkurve von *OsJAC1* unter reduzierender Bedingung (10 mM DTT) vor (blaue Kurve) und nach (graue Kurve) der Hitzebehandlung bei 60 °C für 10 min. Die entsprechenden Schmelzpunkte (T_{M1-3}) wurden mit einem Pfeil markiert.

Nach der Hitzebehandlung unter nicht reduzierenden Bedingungen (0 mM DTT) konnte keine Abnahme der Proteinkonzentration für alle getesteten Proteinlösungen festgestellt

werden (s. Tabelle 17). Jedoch unter reduzierenden Bedingungen (10 mM DTT) wurde eine hohe Abnahme für *OsJAC1* und der JRL-Domäne beobachtet. Im Fall der JRL-Domäne konnte keine Schmelzkurve nach der Hitzebehandlung mit 10 mM DTT ermittelt werden, was für eine vollständige Denaturierung unter diesen Bedingungen spricht. Das Volllängenprotein *OsJAC1* wies lediglich 30 % der Anfangskonzentration nach der ersten Hitzebehandlung (HB_1) unter reduzierenden Bedingungen auf. Die dazugehörige Schmelzkurve (s. Abb. 40, grau) wies keinen Wendepunkt mehr bei 59 °C ($T_{M1,JRL}$), sondern einen zuvor nicht beobachteten Wendepunkt bei etwa 79 °C (T_{M3}) auf. Interaktionstests mit putativen Liganden zeigten einen Verlust des stabilisierenden Effekts auf die JRL-Domäne, für die DIR-Domäne war der stabilisierende Effekt für beide Schmelzpunkte (79 °C und 85 °C) zu beobachten (s. Abb. 86, S. 192). Diese Ergebnisse bestätigen, dass die JRL-Domäne unter reduzierenden Bedingungen im Volllängenprotein bei HB_1 vollständig denaturiert ist. Eventuell nimmt eine strukturelle Untereinheit der DIR-Domäne im Volllängenprotein durch die kovalente Bindung zur JRL-Domäne eine neue Konformation ein, was wiederum zu der Schmelzpunkterhöhung um 8 K im Vergleich zum individuellen DIR-Domänenprotein führt.

B.3.3.2 Pinoresinol Assay

Klassische Dirigent-Proteine sind beteiligt an der Synthese von Lignan und sind in der Lage, eine enantioselektive radikalische Kopplung von phenolischen Verbindungen (Coniferylalkohol (**5**) s. S. 18) durchzuführen.^[70] Um zu testen, ob *OsJAC1* bzw. seine DIR-Domäne eine vergleichbare Aktivität aufweist, wurde das Volllängenprotein auf eine mögliche enantio-selektive Kopplung von Coniferylalkohol (**5**) zu Pinoresinol (**1a/b**) getestet (s. Abb. 41).

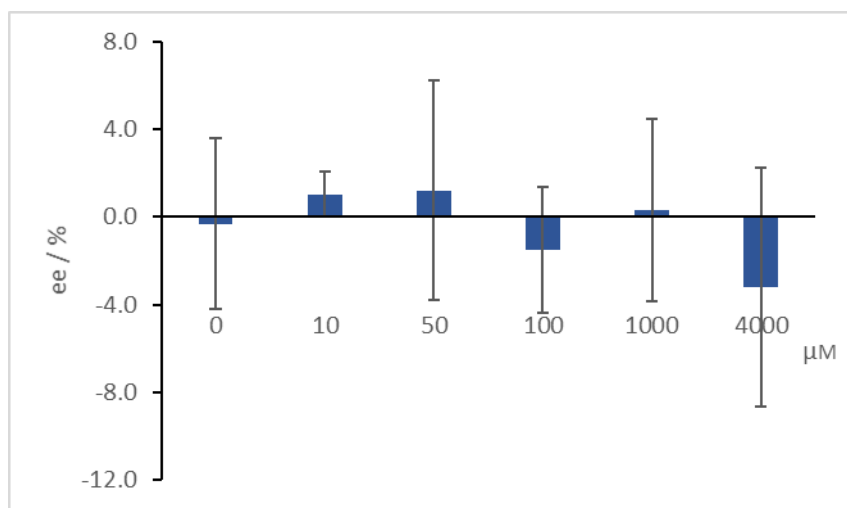


Abbildung 41: Enantiomerenüberschuss von (+/-)-Pinoresinol (ee in %) in Abhängigkeit von der *OsJAC1*-Konzentration (μM).

Wie in Abbildung 41 zu sehen ist, konnte keine Enantioselektivität für die Kopplungsreaktion von Coniferylalkohol mit *OsJAC1* beobachtet werden. Dies deckt sich mit der Beobachtung für das Homolog *TaJA1*, wo ebenfalls keine gerichtete Kopplung für ein Enantiomer des Pinoresinols ermittelt wurde.^[47]

Im Abschnitt B.3.4.5 (S. 131) wird die Binderegion der DIR-Domäne von *OsJAC1* und der von klassischen bekannten DIR-Proteinen verglichen und auf die Unterschiede näher eingegangen.

B.3.3.3 Erstes Modell für das Volllängenprotein OsJAC1

In diesem Abschnitt werden die bisherigen Erkenntnisse zusammengefasst und ein erstes Modell für das Volllängenprotein erstellt (Abb. 42).

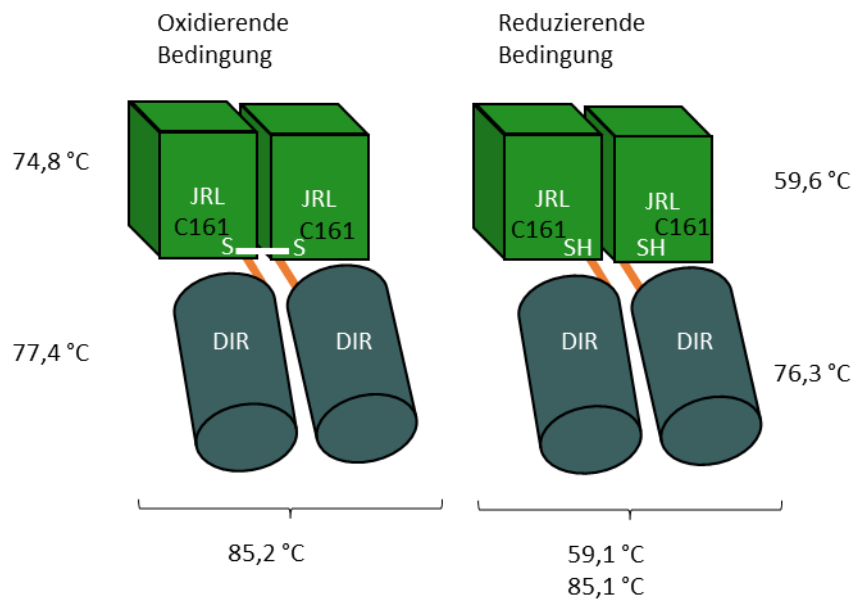


Abbildung 42: Modell für OsJAC1 als Dimer. Die JRL-Domäne hat ein Cystein (Cys161) und kann unter oxidierenden Bedingungen eine intermolekulare Disulfidbindung bilden. Die angegebenen Temperaturen sind Schmelzpunkte für die jeweiligen Domänen und das Volllängenprotein unter den gegebenen Bedingungen (oxidierend oder reduzierend).

Der Schmelzpunkt der DIR-Domäne war unempfindlich gegenüber den Redoxbedingungen des Mediums, lediglich eine leichte Abnahme wurde unter reduzierenden Bedingungen beobachtet (Abb. 42). Es gibt somit keine Hinweise darauf, dass die DIR-Domäne in der Lage ist, Disulfidbindungen zu bilden. Das JRL-Domänenprotein wies unter reduzierenden Bedingungen einen niedrigeren Schmelzpunkt als unter oxidierenden Bedingungen auf, was auf eine mögliche Rückbildung einer intermolekularen Disulfidbindung innerhalb eines JRL-Homodimers zurückzuführen sein könnte. Das entsprechende Cystein (Cys161) befindet sich dabei am N-terminalen Ende der JRL-Domäne (Abb. 50, S. 100). Da OsJAC1 jedoch biologisch in einer reduzierenden Umgebung vorkommt, dem Zytosol, kann davon ausgegangen werden, dass die Bildung von Disulfidbindungen nicht begünstigt wird.^[234]

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass ausschließlich die DIR-Domäne eine Stabilisierung (um bis zu 8 K) im Volllängenprotein im Vergleich zum getrennten Einzeldomänenprotein erfährt (Abb. 39, S. 81). Dies deutet auf eine mögliche Interaktion mit einer strukturell relevanten Untereinheit hin, obwohl der größte Teil der JRL-Domäne bereits entfaltet ist (Abb. 40, S. 84).

B.3.3.4 Strukturbestimmung

Fern-UV-Zirkulardichroismus-Spektroskopie zur Bestimmung des Sekundärstrukturgehalts

Um einen ersten Eindruck über die Sekundärstrukturelemente von *OsJAC1* bzw. seinen beiden Domänen (DIR und JRL) zu erhalten, wurden diese mittels Zirkulardichroismus- (CD) Spektroskopie unter reduzierenden Bedingungen (4 mM DTT) untersucht. Abbildung 43 A zeigt die geglätteten CD-Spektren der drei Proteine (Volllängenprotein, DIR- und JRL-Domäne) sowie die abgeleiteten Sekundärstrukturzusammensetzungen (%).

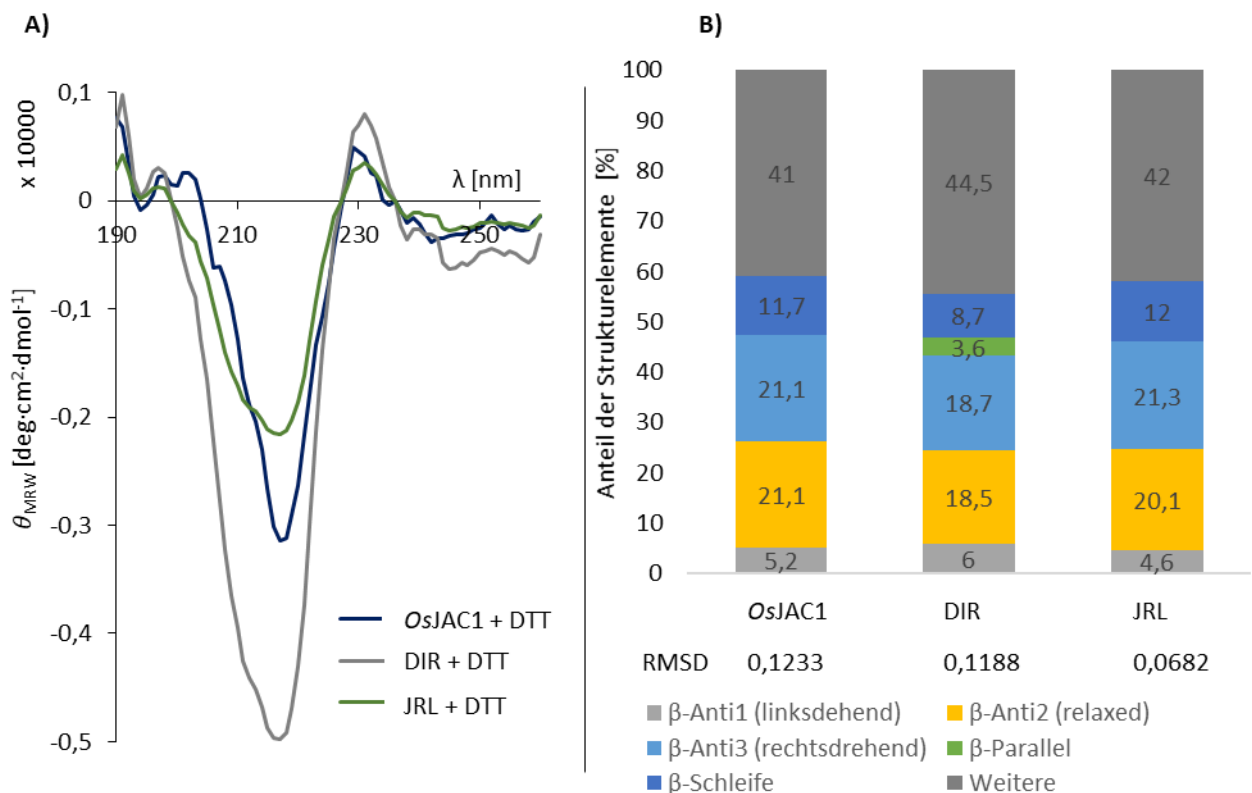


Abbildung 43: **A)** Geglättete CD-Spektren durch den *Savitzky-Golay*-Algorithmus^[235] des Volllängenproteins *OsJAC1* und der Einzeldomänenproteine JRL und DIR unter reduzierenden Bedingungen (10 mM KPi-Puffer, 4 mM DTT, pH 7,4). **B)** Jeweilige geschätzte Sekundärstrukturgehalte (%), ermittelt mit BeStSel.^[236]

Für die Auswertung der Sekundärstruktur wurde die webbasierte Anwendung *BeStSel* verwendet.^[236] Allgemein sind die Ähnlichkeiten in der Sekundärstruktur zwischen den beiden Einzeldomänenproteinen und dem Volllängenprotein sehr hoch. Die vorherrschenden Strukturelemente sind antiparallele β -Faltblätter, wie in Abbildung 43 B zu sehen ist. Zusätzlich konnten parallele β -Faltblattanteile für das DIR-Domänenprotein als weiteres Strukturelement ermittelt werden. Jedoch ist der Anteil sehr gering und wurde nicht im Volllängenprotein *OsJAC1* nachgewiesen. Eine Konformationsänderung aufgrund der Interaktion zwischen den beiden Domänen im Volllängenprotein *OsJAC1* lässt sich anhand dieser

Daten nicht feststellen. Tabelle 18 zeigt einen Vergleich der CD-abgeleiteten Sekundärstrukturschätzungen für die beiden *OsJAC1*-Domänen mit der Zusammensetzung ausgewählter Homologe, für die dreidimensionale Strukturinformationen verfügbar sind.

Tabelle 18: Vergleich der Sekundärstrukturzusammensetzung, die durch CD-Spektroskopie für die *OsJAC1*-Domänen (JRL und DIR) und durch Röntgenkristallographie für bestimmte Homologe bestimmt wurden [Jacaline aus *Morus indica* (gJRL) und aus *Musa acuminata* (mJRL); Dirigent-Proteine aus *Glycyrrhiza echinata* (GePTS1) und aus *Arabidopsis thaliana* (AtDIR6)].

Protein	α -Helix [%]	β -Faltblatt [%]	β -Schleife [%]	Weitere [%]	Literatur / PDB Eintrag
<i>OsJAC1</i> -JRL	0	46	12	42	-
gJRL	2	34	23	39	[237]
mJRL	0	73 ¹	-	27	4PIF ^[238]
<i>OsJAC1</i> -DIR	1	47	9	44	-
GePTS1	4	56 ¹	-	40	6OOC ^[22]
AtDIR6	0	56 ¹	-	44	5LAL ^[41]

¹Angabe in der entsprechenden PDB-Datei

Die DIR-Domäne von *OsJAC1* weist eine Sekundärstrukturzusammensetzung auf, die ihren Homologen sehr ähnlich ist, während die Zusammensetzung der verschiedenen JRL-Homologe vielfältiger erscheint. Nichtsdestotrotz weisen beide *OsJAC1*-Domänen Strukturelemente mit einem hohen β -Faltblattanteil auf und es kann davon ausgegangen werden, dass sie strukturelle Ähnlichkeiten im Vergleich zu ihren Homologen aufweisen.

Röntgenkristallographie – Proteinstrukturbestimmung

Es wurden vielfältige Bemühungen unternommen, um das Volllängenprotein *OsJAC1* zu kristallisieren. Jedoch ergab das Screening von über 2000 verschiedenen Bedingungen keine Treffer. Aus diesem Grund wurde eine weitere Strategie verfolgt. Die zwei Einzeldomänen wurden getrennt voneinander für das Kristallisationsscreening verwendet. Die hier in dieser Arbeit beschriebene JRL-Domäne von *OsJAC1* wurde bereits in einer vorangegangenen Zusammenarbeit von *Alexander V. Fejzagic* und *Prof. Dr. Oliver H. Weiergräber* kristallisiert.^[219] Die Kristallisationsansätze, Röntgenstrukturanalyse und Erstellung des Modells der DIR-Domäne von *OsJAC1* wurden im Rahmen dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit *Prof. Dr. Oliver H. Weiergräber* durchgeführt. Die in diesem Abschnitt beschriebenen kristallographischen Ergebnissen resultieren aus dieser Kooperation. Die Beschreibung, Interpretation der JRL- und DIR-Struktur und alle in dieser Arbeit erwähnten *in silico* Verfahren, in denen die beiden Strukturen verwendet wurden, stellen hierbei die Eigenleistung dar.

Die Kristallbildung der DIR-Domäne konnte nur unter reduzierenden Bedingungen (1 mM DTT) beobachtet werden, die erhaltenen Treffer waren jedoch hauptsächlich nadelförmig und

für eine Röntgenstrukturanalyse nicht geeignet. Eventuell beeinträchtigte der His₆-Tag die Kristallisation. Durch einen Thrombinverdau konnte der His₆-Tag entfernt werden (s. Abb. 44).

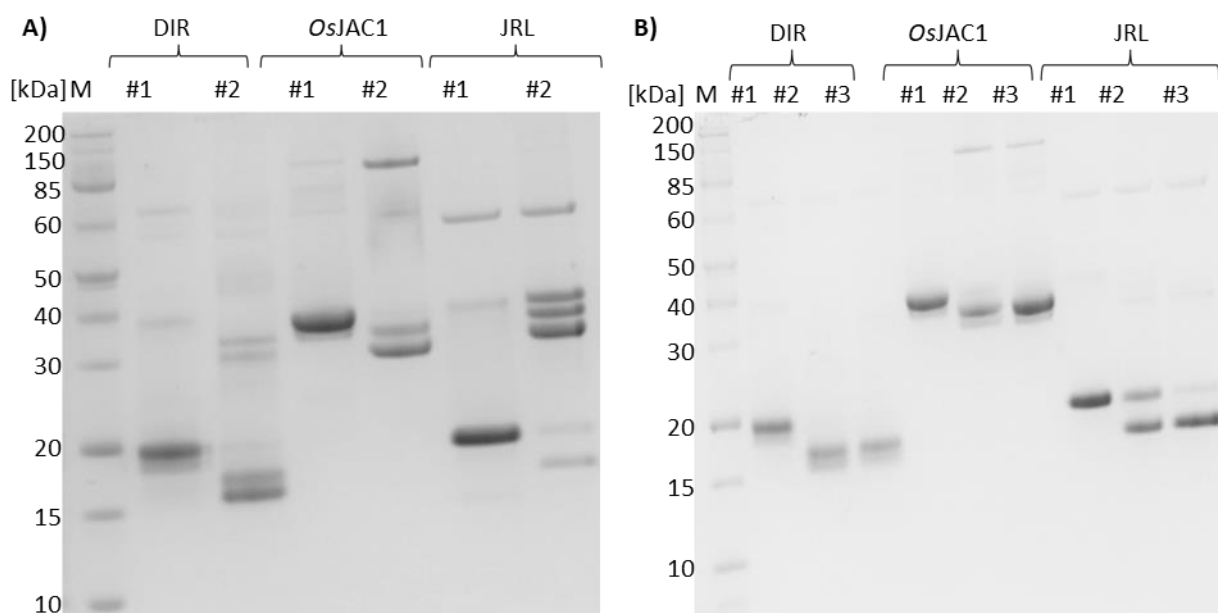


Abbildung 44: Coomassiegefärbte SDS-PAGE (12 %) des Thrombinverdaus der His₆-Tags von OsJAC1 und seinen zwei Einzeldomänenproteinen (DIR und JRL). **A)** Reduzierende Wirkung des SDS-Probenpuffers war nicht mehr gewährleistet und es konnten unterschiedliche Oligomierzustände beobachtet werden. **B)** Nach Zugabe von 4 mM DTT in allen Proben, konnte die Oligomerisierung unterbunden werden. M: Marker, #1: Proteinlösung vor Thrombinverdau, #2: Proteinlösung nach 24 h Thrombinverdau und #3: Proteinlösung nach 48 h Thrombinverdau.

Neben dem individuellen DIR-Domänenprotein wurde ebenfalls der His₆-Tag mit Hilfe eines Thrombinverdaus für das Volllängenprotein und des JRL-Domänenproteins durchgeführt (C.3.3.7, S. 170). Nach 24 h wurde der Verdau durch eine SDS-PAGE überprüft (s. Abb. 44 A). Für alle drei getesteten Proteine konnte eine Reduktion des Molekulargewichtes um etwa 2 kDa, was etwa dem His₆-Tag entspricht, beobachtet werden. Jedoch entstanden unterschiedliche weitere Banden im Vergleich zu der Proteinlösung vor dem Thrombinverdau (#1 in Abb. 44 A). Die zusätzlichen Banden wurden auf unterschiedliche Oligomierzustände zurückgeführt, die durch die Probenvorbereitung für die SDS-PAGE nicht aufgelöst wurden. Nach weiteren 24 h (insgesamt 48 h) wurde eine weitere Probe genommen und in alle SDS-Proben frisches DTT hinzugegeben (s. Abb. 44 B). Für das DIR-Domänenprotein war die Entfernung des Tags bereits nach 24 h erfolgreich und durch die Zugabe von DTT konnten alle zuvor beobachteten Banden der Oligomierzustände (bei etwa 30 und 60 kDa) entfernt werden. Für das Volllängenprotein konnte ebenfalls eine erfolgreiche Entfernung des Tags nach 24 h beobachtet werden. Dies war jedoch nicht der Fall für das JRL-Domänenprotein, bei dem nach 48 h weiterhin eine Bande für unverdautes Protein zu sehen war. Da für alle drei Proteine der Tag sich am N-Terminus befand und im Volllängenprotein (OsJAC1) die DIR-Domäne den Tag

enthält, kann davon ausgegangen werden, dass der Tag an der DIR-Domäne leichter zugänglich ist als für das JRL-Domänenprotein. Diese Beobachtung deckt sich mit dem Strep-Tag® Isolationsversuch, in dem eine niedrigere Isolationseffizienz für das JRL-Domänenprotein zu beobachten war (S. 60). Eine weitere Erkenntnis aus diesem Versuch ist, dass die Bildung von Oligomeren für das JRL-Domänenprotein nach dem Entfernen des Tags verbessert wurde. Insbesondere, wenn die reduzierende Wirkung des SDS-Puffers nicht mehr gewährleistet war, war die Bande für das JRL-Dimer stark ausgeprägt (s. Abb. 44 A; JRL #2). Bei der Bande in der Höhe von 60 kDa, die in allen JRL-Proben zu sehen war, handelt es sich um Verunreinigungen des Proteins Cpn60, ein Chaperonin aus *E. coli* Arctic Express(DE3). Diese Verunreinigung ist nicht ungewöhnlich nach der Proteinisolation aus *E. coli* Arctic Express.^[103]

Nach dem Entfernen des His₆-Tags wurden neue Kristallisationsansätze für das DIR-Domänenprotein angefertigt und es konnten zwei Kristallformen durch unterschiedliche Kristallisationsbedingungen (C.3.6.2, S. 177) für die Röntgenstrukturanalyse gewonnen werden. Zusätzlich zur Apoproteinstruktur der DIR-Domäne konnte eine DIR-Struktur im Komplex mit Galactobiose als Ligand nach einem *soaking*-Experiment erzeugt werden (C.3.6.2, S. 177). Die röntgenkristallographischen Daten, die in dieser Arbeit behandelt werden, sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Biochemische Charakterisierung des Reisproteins OsJAC1

Tabelle 19: Kristallographische Kenngrößen der beiden erfassten OsJAC1-DIR Domänenstrukturen und die DIR-Domäne im Komplex mit Galactobiose.

Interne Bezeichnung	DIR46	DIR48	DIR-lig
PDB-Eintrag	7R5Z	7YWE	7YWF
Beamline	ID30A-3 (ESRF)	ID30A-3 (ESRF)	ID23-1 (ESRF)
Detektor	EIGER 4M	EIGER 4M	EIGER2 16M
Wellenlänge [Å]	0,968	0,968	0,775
Raumgruppe	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	H 3 (R3:H)	H 3 (R3:H)
Einheit Zelle			
a, b, c [Å]	49,0/87,4/93,7	158,9/158,9/47,9	158,1/158,1/48,7
α, β, γ [°]	90/90/90	90/90/120	90/90/120
Auflösung [Å] (<i>high resolution bin</i>)	43,68 – 1,75 (1,80 – 1,75)	45,87 – 2,15 (2,21 – 2,15)	45,90 – 2,60 (2,67 – 2,60)
Anzahl Reflektionen	41.085	24.425	13.939
Multiplizität	13,7 (13,2)	4,2 (4,4)	5,7 (5,8)
Vollständigkeit [%]	99,4 (97,6)	99,7 (99,9)	99,9 (100,0)
I/σI	10,11 (0,69)	7,83 (0,68)	6,02 (0,51)
CC _{1/2}	99,8 (34,6)	99,8 (35,3)	99,5 (38,1)
R _{means} [%]	13,9 (439,7)	12,4 (276,8)	20,4 (325,6)
Verfeinerungsstatistik			
Anzahl Reflektionen	41050	24347	13912
R _{work} [%]	19,10	21,78	24,24
R _{free} [%]	22,90	25,44	27,77
RMSD-Bindungen [Å]	0,006	0,002	0,002
RMSD Winkel [°]	0,863	0,460	0,567
 [Å ²] (Anzahl Atome)			
Protein	55,4 (3352)	80,3 (3204)	111,4 (3109)
Wasser	49,6 (120)	68,7 (26)	97,1 (5)
Sonstige	47,2 (6)	96,4 (28)	118,5 (90)
Ramachandran Plot			
Bevorzugt [%]	96,27	96,24	95,07
Erlaubt [%]	3,03	3,05	4,23
Ausreißer [%]	0,70	0,70	0,70

Proteinstruktur der OsJAC1-DIR Domäne

Die Kristallstruktur von OsJAC1-DIR wurde mit einer Auflösung von 1,75 beziehungsweise 2,15 Å bestimmt. Als Suchmodell wurde PsPTS1 (PDB Eintrag: 6OOD)^[22] verwendet. Dies entsprach der Struktur aus der *Protein Data Bank* (PDB) mit der höchsten Sequenzidentität (26,3 %). Die beiden erhaltenen Struktur-Modelle gehören zur Raumgruppe $P 2_1 2_1 2_1$ und $R 3:H$ und sind gekennzeichnet durch *Rwork* und *Rfree* mit 19 % und 22 % bzw. 23 % und 25 % (s. Tabelle 19 für zusätzliche Statistiken zur Modellverfeinerung). In allen zwei Modellen für die DIR-Domäne von OsJAC1 (DIR46 und DIR48) sind drei unabhängige Monomere in der asymmetrischen Einheit des Kristalls abgebildet (siehe Abb. 45). Die drei unterschiedlich langen Ketten bilden jeweils eine nichtkristallographische Symmetrie entweder gegen den Uhrzeigersinn (s. Abb. 45 A) oder im Uhrzeigersinn (s. Abb. 45 B). Bedingt durch unterschiedliche Umgebungen in den Kristallen kann in beiden erstellten DIR-Modellen der N-Terminus von Kette B deutlicher weiterverfolgt werden als in den anderen Ketten, wodurch das β -Faltblatt des Nachbarmonomers erweitert wird. Die Trimer-Anordnung in beiden Modellen ist bisher der einzige bekannte Oligomierzustand für DIR- und DIR-ähnliche Proteine nach der Kristallisation.^[22, 41, 44]

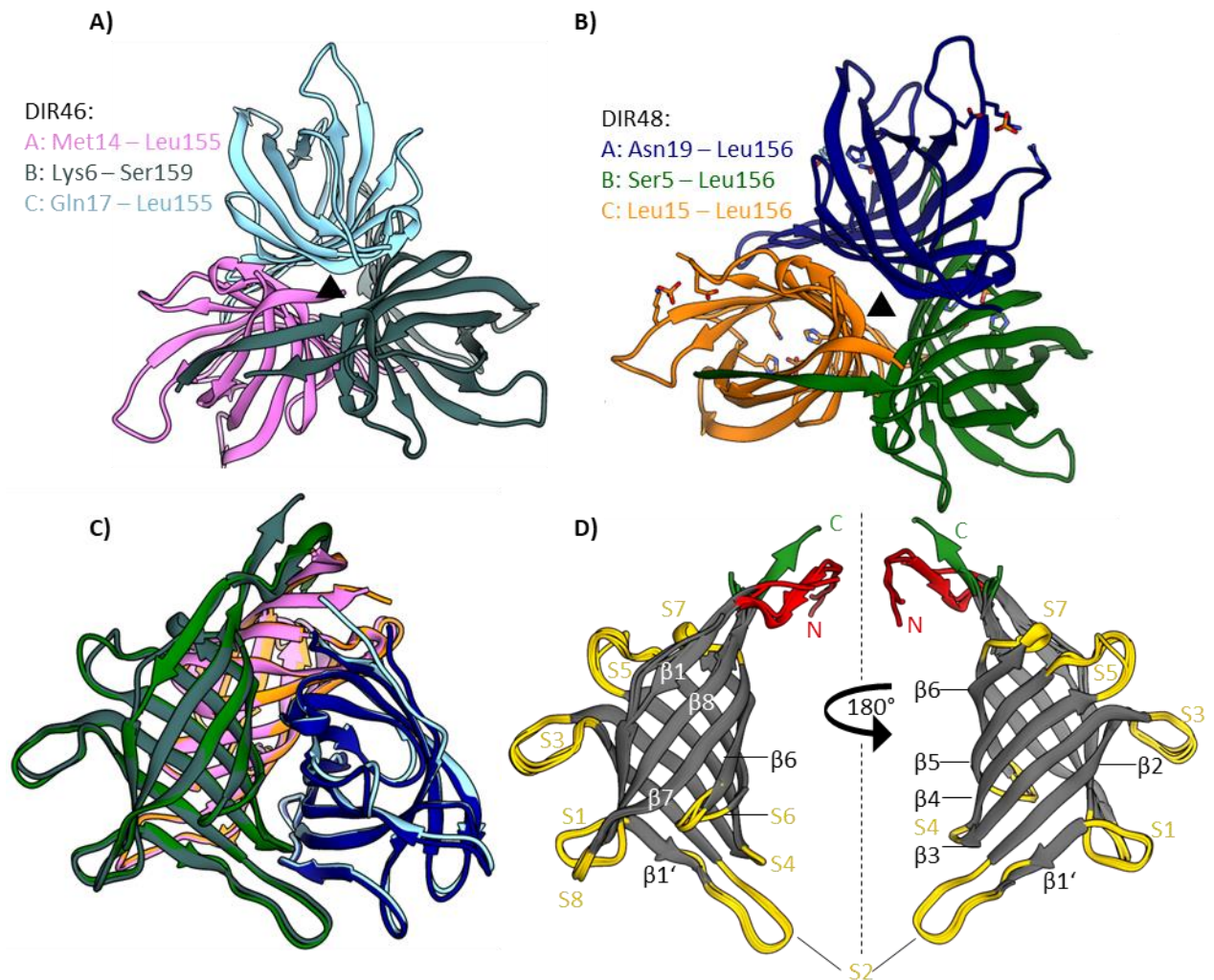


Abbildung 45: **A)** Modell DIR46 (PDB: 7R5Z) der Raumgruppe $P2_12_12_1$ und **B)** das Modell DIR48 (PDB: 7YWE) mit der Raumgruppe $R3:H$. OsJAC1-DIR-Domänenstruktur-Modell als Trimer in der asymmetrischen Einheit (C_3 -Achse wurde mit einem schwarzen Dreieck markiert). Die Ketten und ihre Längen sind farblich hervorgehoben. **C)** Strukturelles Alignment der beiden DIR-Modelle (DIR46 und DIR48) als Trimer. Beide Modelle weisen die gleiche Orientierung auf und alle drei Monomere eines Modells sind ineinander um eine zentrale Achse verdreht. **D)** Strukturelles Alignment aller Monomere aus DIR46 und DIR48. Darstellung der achtsträngigen β -barrel-Faltung, die aus zwei gewundenen antiparallelen β -Faltblättern besteht. Die senkrecht gestrichelte Linie stellt die C_2 -Achse für die beiden Seitenansichten dar. Schleifen (S1 – 8) sind gelb hervorgehoben und β -Stränge ($\beta 1$ – 8) sind grau schattiert. Der N-terminale Bereich ist rot hervorgehoben und der C-terminale Bereich ist grün eingefärbt.

Verursacht durch die Kristallisationsbedingung konnten unterschiedliche co-kristallisierte Additive in den beiden DIR-Modellen beobachtet werden. In DIR46 befindet sich ein Calciumion zwischen den drei Monomeren in der Nähe des N- bzw. C-terminalen Bereichs. Chloridionen befinden sich in diesem Modell an der Oberfläche entgegengesetzt zu den Termini, am anderen Ende der β -barrel-Faltung. In DIR48 ist Phosphat in unterschiedlichen Positionen der Peripherie des Trimers zu sehen und in einer Position von Kette A wurde 2-Methyl-2,4-pentandiol (MPD) komplexiert. Die Trimer-Anordnung in beiden DIR-Modellen weisen die gleiche Orientierung auf, wie zu sehen ist nach einem strukturellen Alignment

(Abb. 45 C). Die einzelnen Monomere sind dabei ineinander um eine zentrale Achse verdreht und decken eine Oberfläche von 900 Å² ab.

Ein weiteres strukturelles Alignment aller Monomere aus DIR46 und DIR48 verdeutlicht den achtsträngigen β -barrel-Aufbau, der aus zwei gewundenen antiparallelen β -Faltblättern besteht (s. Abb. 45 D). Die erste Seite wird aus den Strängen β 1, β 6, β 7 und β 8 gebildet und die zweite Seite aus den Strängen β 1', β 2, β 3, β 4, β 5 und β 6 (in Teilen). Das Alignment aller DIR-Monomere hat eine mittlere quadratische Abweichung [engl. *root mean square deviation* (RMSD)] zwischen den C α -Atomen von 0,423 – 1,138 Å. Wie in Abbildung 45 D zu sehen ist, ergibt sich die größte Abweichung durch den N- und C-terminalen Bereich (rot und grün eingefärbt). Hier zeigt sich, dass insbesondere der N-terminale Bereich dynamisch ist und dies Auswirkung auf die Faltung des β 1-Strangs hat, wodurch verschiedene Anordnungen in diesem Bereich zu sehen sind. Alle anderen β -Stränge weisen eine hohe strukturelle Übereinstimmung auf. Hingegen zeigen die Schleifen (gelb hervorgehoben in Abb. 45 D) des DIR-Strukturmodells eine höhere strukturelle Varianz auf. Auffällig ist dabei, dass die längste Schleife (S2 mit 12 Resten) weniger strukturelle Unterschiede zwischen den DIR-Monomeren aufweist als kürzere Schleifen wie S3 (8 Reste), S5 (8 Reste) und S6 (4 Reste). Dies sind ebenfalls die Schleifen, die keine Interaktion zwischen den DIR-Monomeren im Trimer eingehen und von dem asymmetrischen Zentrum weggewandt sind. Die Wechselwirkung im Trimer wird durch die beiden Abbildungen 46 (Monomer A und B) und 47 (Monomer A und C) schematisch dargestellt, welche durch DIMPLOT^[239] erstellt wurden und anschließend graphisch mittels PowerPoint® nachgestellt wurden.

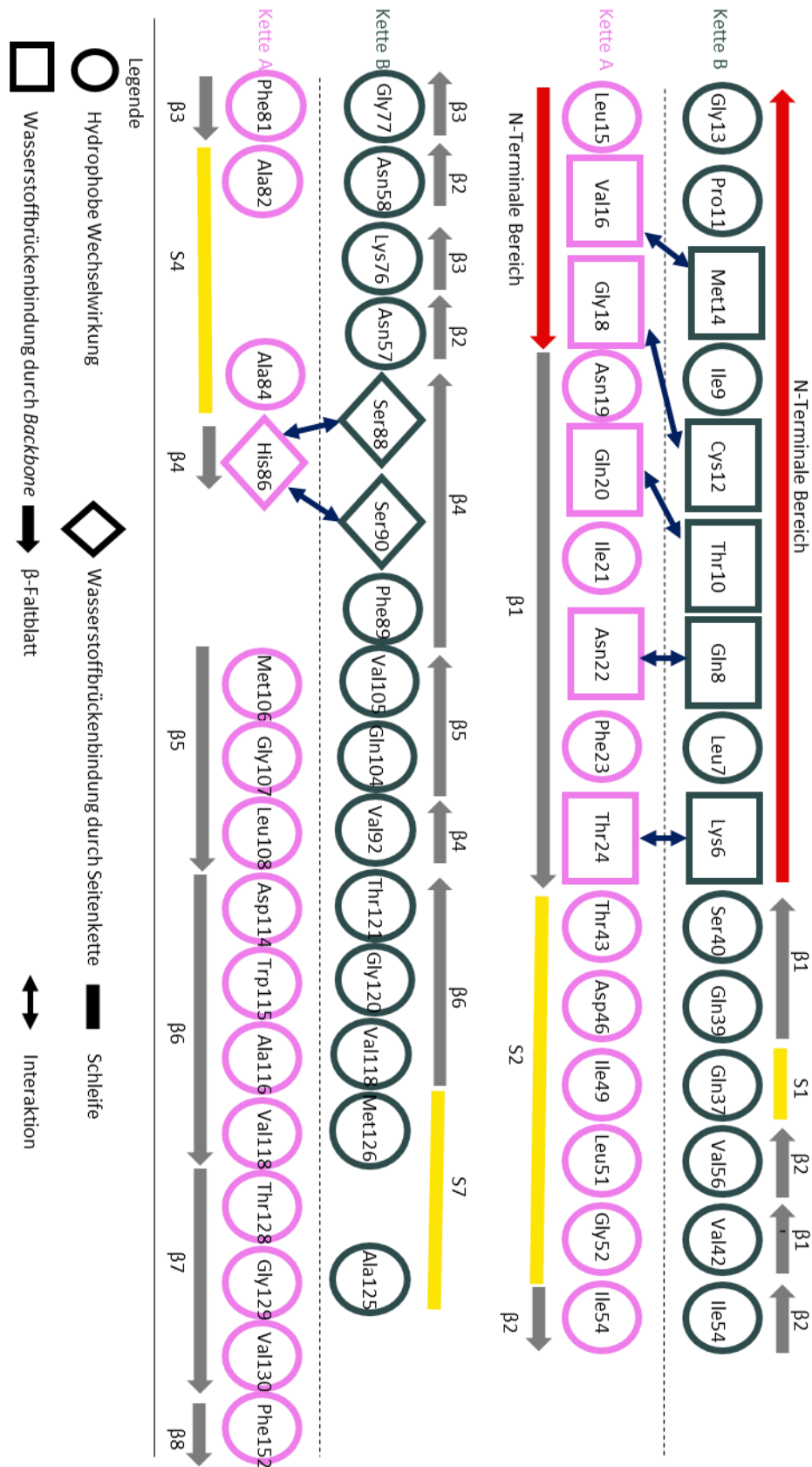


Abbildung 46: DIMPLLOT:^[239] Wechselwirkung der Reste an der Grenzfläche zwischen Kette A und B des DIR46-Strukturmodells. Die horizontale gestrichelte Linie stellt die Grenzfläche zwischen den beiden Ketten dar. Reste geordnet nach der Sequenz von Kette A.

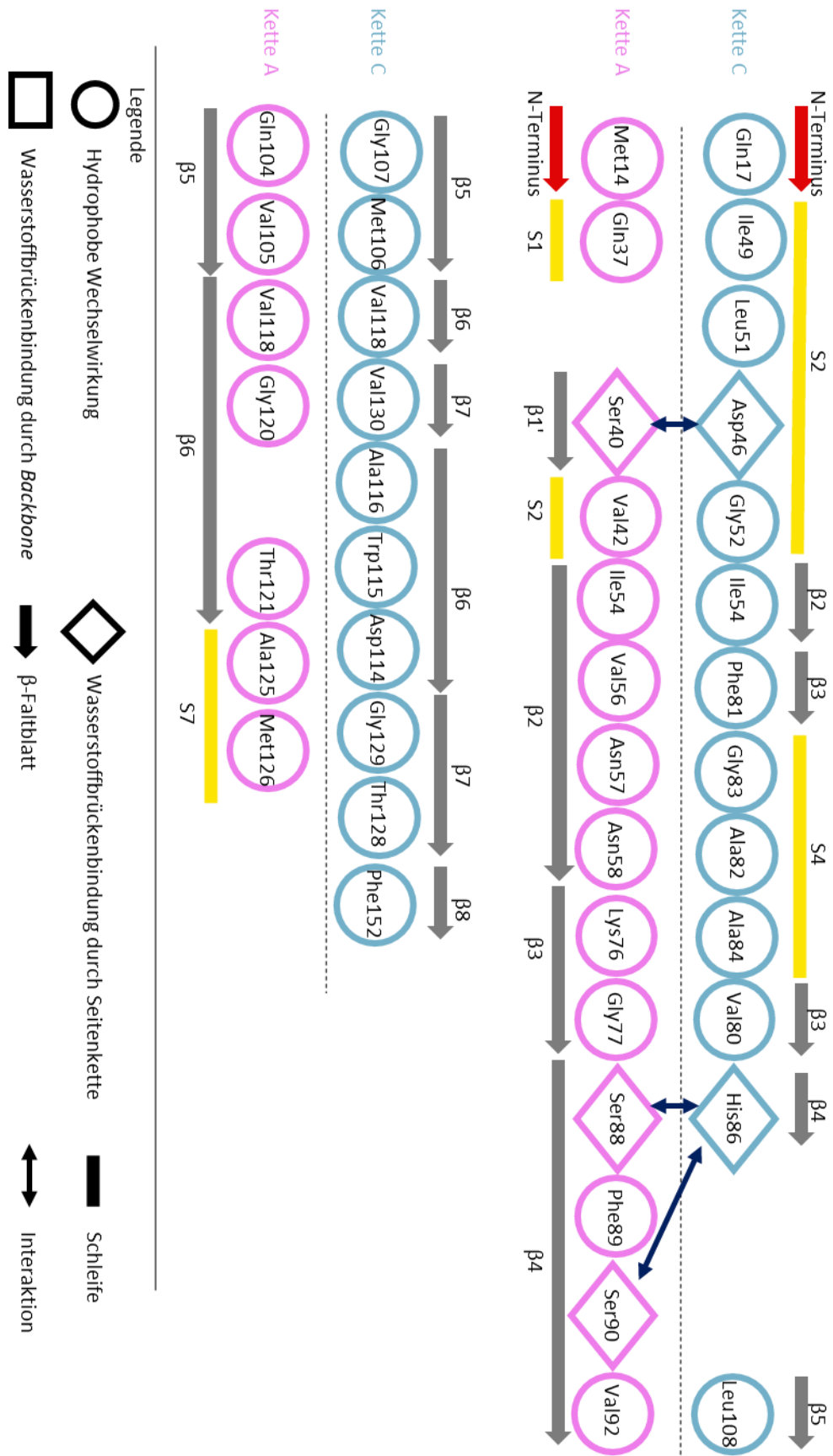


Abbildung 47: DIMPLLOT:^[239] Wechselwirkung der Reste an der Grenzfläche zwischen Kette A und B des DIR46-Strukturmodells. Die horizontale gestrichelte Linie stellt die Grenzfläche zwischen den beiden Ketten dar. Reste geordnet nach der Sequenz von Kette A.

In beiden erhaltenen DIR-Modellen kann der N-Terminus von Kette B deutlicher weiterverfolgt werden als in den anderen Ketten. Diese Erweiterung ist nicht in der Faltung des β -barrels involviert. Der N-terminale Bereich von Kette B wechselwirkt hauptsächlich über Wasserstoffbrückenbindungen mit dem N-terminalen Bereich und dem β 1-Strang des Nachbarmoleküls (Monomer-A in DIR46 und Monomer-C in DIR48). Jedoch findet diese Interaktion nur mit dem *Backbone* der Peptidkette statt und ist somit unabhängig von der Sequenz in diesem Bereich. Die restlichen Interaktionen entlang der Grenzfläche sind hauptsächlich von hydrophoben Wechselwirkungen geprägt, wodurch sich zwischen den drei DIR-Monomeren ein hydrophober Kern ausbildet. Hierbei sind insbesondere die Reste aus den Strängen β 2, β 3, β 4, β 5 und β 6 und den Schleifen S2, S4 und S7 in der Interaktion zwischen den Monomeren beteiligt. Dementsprechend findet die Interaktion hauptsächlich auf einer Seite des antiparallelen β -barrels statt (s. Abb. 48 A). Abgesehen von dem N-terminalen Interaktionsbereich der Kette B waren sich die Interaktionen zwischen den insgesamt sechs Grenzflächen (jeweils zwei Monomere in beiden Struktur-Modellen) sehr ähnlich. So wurde in den meisten Fällen eine Wasserstoffbrückenbindung der Seitenketten Ser40 mit Asp46 und His86 mit Ser88 und Ser90 beobachtet. Im letzten Fall bildet sich eine Art Reißverschluss, durch den sich die Reste ineinander verhaken (s. Abb. 48 B).

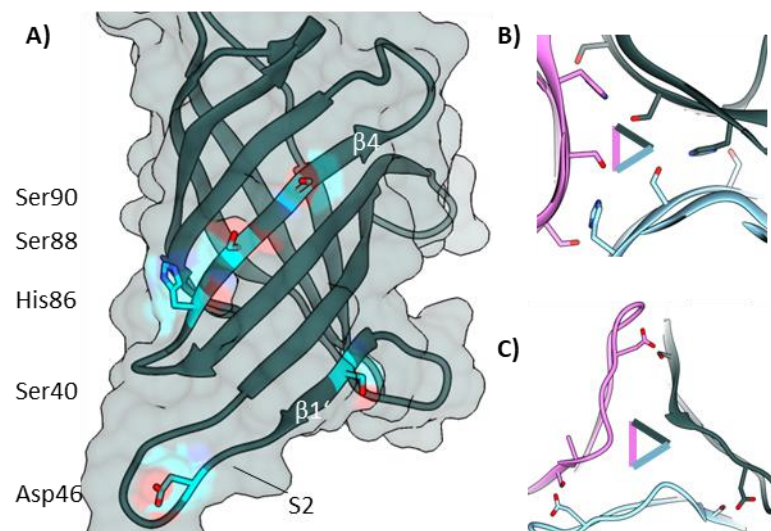


Abbildung 48: **A)** Struktur des OsJAC1-DIR-Domänenproteins mit transparenter Oberfläche. Die beteiligten Reste der Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Monomeren in dem kristallographischen Trimer sind farblich hervorgehoben (blaue Reste). **B)** Ausschnitt der Interaktion von His86 mit Ser88 und Ser90 zwischen den drei DIR-Monomeren. **C)** Ausschnitt der Interaktion von Ser40 mit Asp46 zwischen den drei DIR-Monomeren.

Die an der Wasserstoffbrückenbindung beteiligten polaren Reste sind entlang zweier diagonalen Ebenen in der DIR-Domäne zueinander versetzt (s. Abb. 48 A). Die Reste His86, Ser88 und Ser90 auf dem β -4-Strang bilden eine diagonale Ebene und Ser40 mit Asp46 eine weitere Ebene. Durch das ineinander Verdrehen der Monomeren im Trimer (s. Abb. 45 S. 94)

um eine zentrale Achse können die zwei diagonalen Ebenen eines Monomers jeweils mit zwei Nachbarmonomeren interagieren und bilden somit eine dreieckige Fläche aus (s. Abb. 48 B und C). Diese Anordnung und die Interaktion zwischen den Monomeren erklärt die niedrige strukturelle Varianz der Schleife S2, da sie dadurch stabilisiert wird und damit ihre lange offene Konformation ermöglicht wird.

Vergleich von Strukturmodellen zwischen *OsJAC1-DIR* und Homologen

Das strukturelle Alignment der *OsJAC1-DIR*-Domäne mit Homologen wie *AtDIR6* (s. Abb. 49 A) und *PsPTS1* (s. Abb. 49 B) hatte einen RMSD von 0,981 Å für die β -barrel-Struktur und zeigte höhere RMSDs von 4,7 bzw. 3,2 Å (unter Berücksichtigung aller C α -Atome).

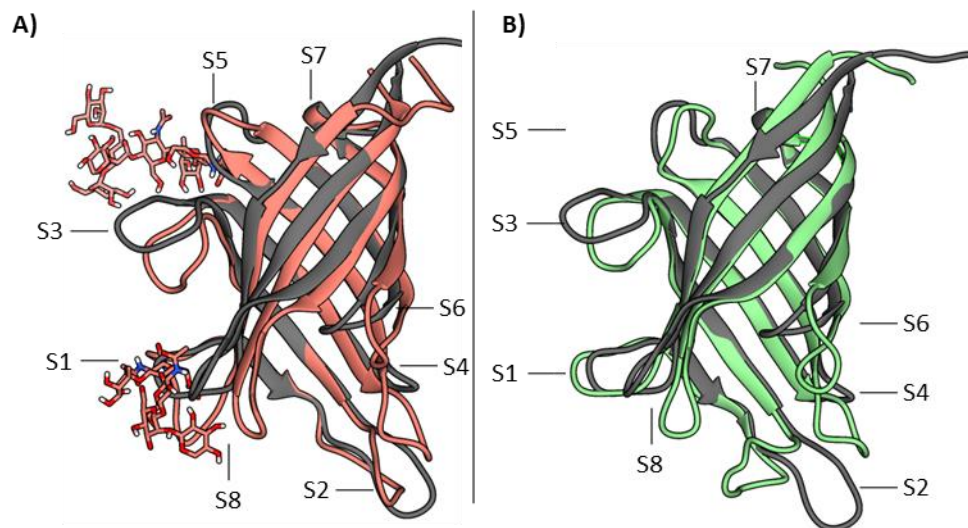


Abbildung 49: Alignment von *OsJAC1-DIR*-Domäne (grau hervorgehoben; Kette A von DIR46) mit **A)** *AtDIR6* (rot hervorgehoben; PDB Eintrag: 5LAL) mit Glykosylierung an zwei Positionen (Asn59 und Asn123).^[41] **B)** *PsPTS1* (grün hervorgehoben; PDB Eintrag: 5OOD).^[22] Schleifen der *OsJAC1-DIR*-Domäne (S1 – S8) wurden gekennzeichnet.

Grundsätzlich zeigt das Struktur-Alignment eine hohe Übereinstimmung in der β -barrel-Faltung und verdeutlicht die hohe strukturelle Konservierung dieser Proteinfamilie (Pfam Eintrag: PF03018).^[16, 240] Die erhöhte Abweichung nach Berücksichtigung aller Atome ist auf die Schleifenstruktur in den Proteinen zurückzuführen. Insbesondere die Schleifen an der putativen Bindestelle (S2, S4, S6 und S8) unterscheiden sich in ihrer Länge und ihren Konformationen. Eventuell sind die Schleifen für die Modellierung der Funktionalität des Proteins verantwortlich. In Abschnitt B.3.4.5 (S. 131) wird detaillierter auf den putativen Bindebereich der *OsJAC1-DIR*-Domäne eingegangen.

Proteinstruktur der OsJAC1-JRL-Domäne

Die Kristallisation der JRL-Domäne wurde bereits in einer vorherigen Kooperation mit Prof. Dr. Oliver Weiergräber durchgeführt,^[219] allerdings erfolgt die Beschreibung und Interpretation der Struktur im Rahmen dieser Arbeit. Beide erhaltene kristallographischen Modelle der JRL-Domäne (Interne Bezeichnung: JRL8 und JRL11) kristallisierten als Dimer pro asymmetrische Einheit (s. Abb. 50 A). Die OsJAC1-JRL-Domäne hat eine β -Prisma-I-Faltung, die aus drei viersträngigen antiparallelen β -Faltblättern besteht. Zwei dieser Blätter sind kanonische griechische Schlüsselmotive. Im dritten Fall bildet sich ein pseudogriechisches Schlüsselmotiv aus, welches durch N- und C-terminale Segmente des Proteins geformt wird, um das äußere bzw. innere Paar von Strängen zu bilden (s. Abb. 50 B).

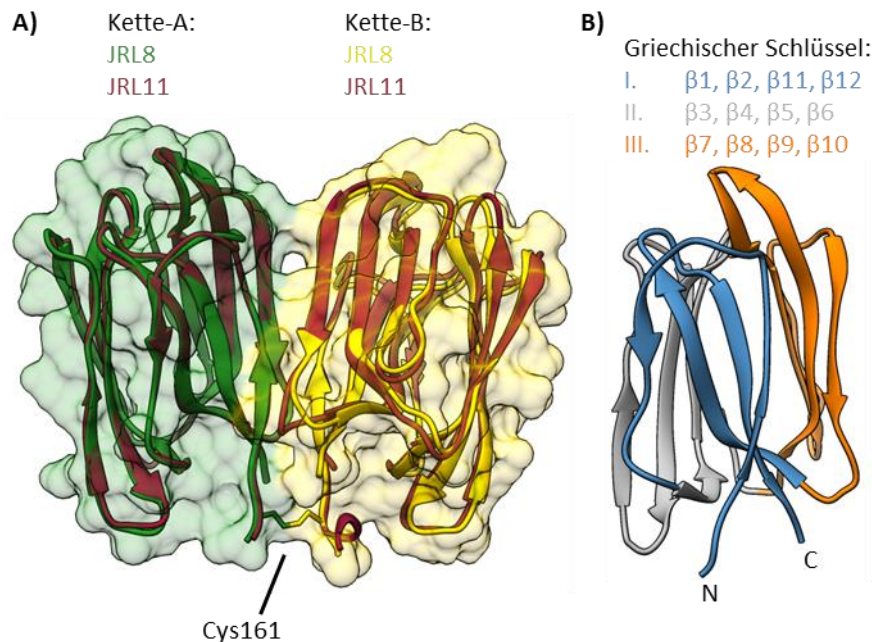


Abbildung 50: Struktur des OsJAC1-JRL-Domänenproteins. **A)** JRL8 (PDB: 7YWG) und JRL11 (PDB: 7YWW) interne Bezeichnung der JRL-Struktur-Modelle) als Dimer in der asymmetrischen Einheit mit den jeweiligen Ketten farblich hervorgehoben. In beiden Struktur-Modellen hat das Homodimer eine Disulfidbindung zwischen den Monomeren an Cys161. **B)** Tertiärstruktur eines JRL-Monomers. Die drei viersträngigen antiparallelen β -Faltblätter und ihre Schleifen wurden farblich hervorgehoben. Bei den griechischen Schlüsselmotiven II & III handelt es sich um echte und bei I um ein pseudogriechisches Schlüsselmotiv. Der N-Terminus (mit N gekennzeichnet) befindet sich bei Gln160 und die JRL-Sequenz endet bei Pro305 (C-Terminus; mit C gekennzeichnet).

Die beiden Ketten des Dimers von OsJAC1-JRL sind über eine symmetrische Disulfidbindung verbunden, die durch einen Cystein-Rest nahe dem N-Terminus (Cys161) gebildet wird. Bisher wurde nur für das JRL-Homolog in der Perlmuschel (*Ptereria penguin*) von einer solchen Disulfidbindung (Cys161-Cys161) zwischen den Untereinheiten berichtet, aber in diesem Fall wurde die Bildung durch Cysteine an den C-Termini vermittelt.^[241] Abbildung 51 zeigt die Wechselwirkung der Reste an der Grenzfläche im JRL8-Modell.

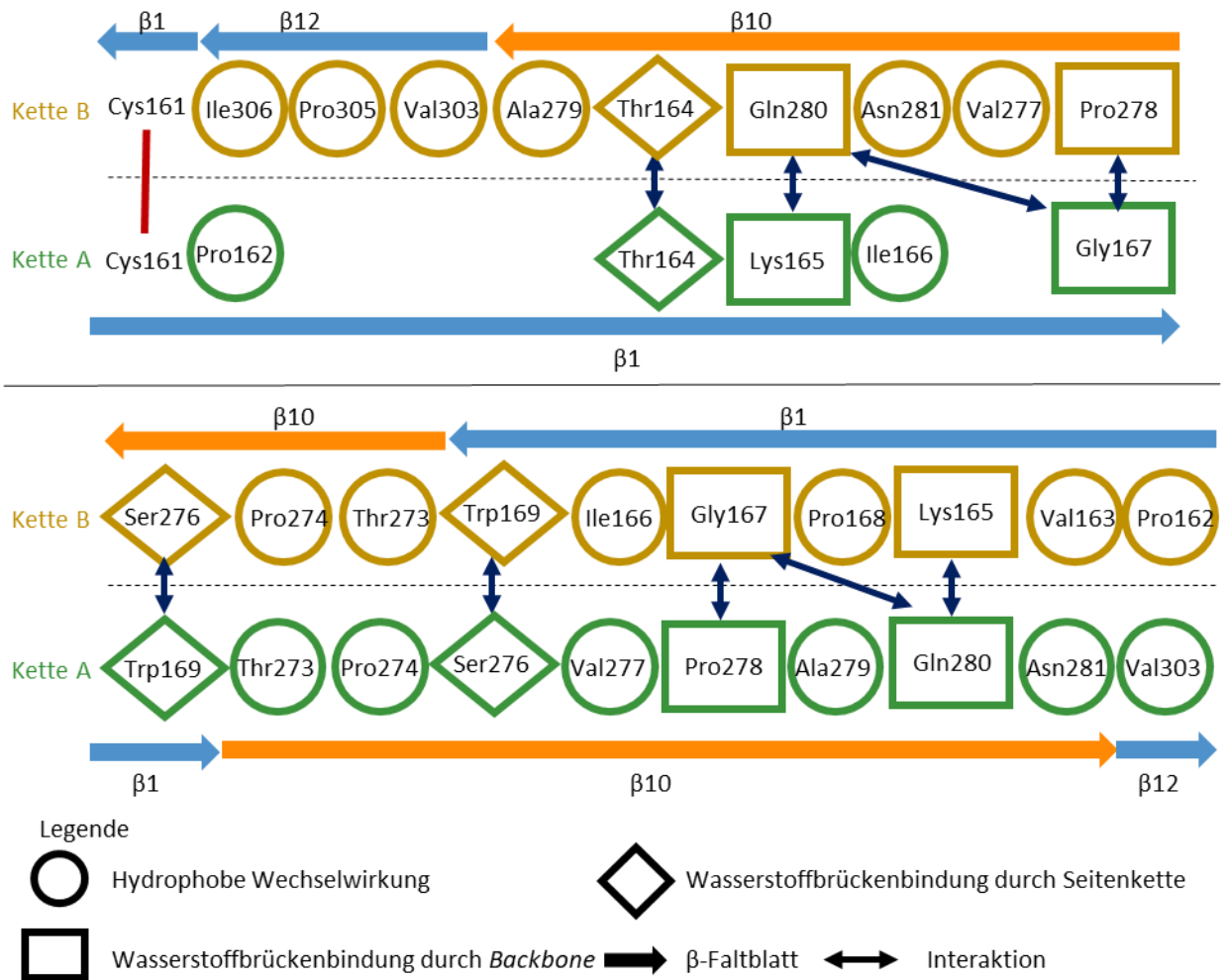


Abbildung 51: DIMPLOT:^[239] Wechselwirkung der Reste an der Grenzfläche zwischen Kette A und B des JRL8-Strukturmodells. Die horizontale gestrichelte Linie stellt die Grenzfläche zwischen den beiden Ketten dar. Reste sind geordnet nach der Sequenz von Kette A. Die Disulfidbrückenbindung zwischen den zwei Monomeren ist mit einem roten Balken dargestellt in Position Cys161.

Auf der Interaktionsgrenzfläche zwischen den beiden JRL-Monomeren sind sowohl hydrophobe als auch polare Wechselwirkungen beteiligt. Damit wird eine Fläche von $800 \text{ \AA}^2$ auf beiden Seiten abgedeckt. Aufgrund der Disulfidbrückenbindung zwischen den beiden Monomeren wird eine asymmetrische (*tail-to-tail*) Dimer Konfiguration gebildet, ähnlich wie für *Banlec* und *AcmJRL*.^[202, 204] Die Asymmetrie zwischen den beiden JRL-Monomeren wird sehr gut in der Interaktionsgrenzfläche verdeutlicht (s. Abb. 51). Für die Interaktion sind hauptsächlich die Reste in den beiden Strängen $\beta 1$ und $\beta 10$ beteiligt, die ab Pro274 antiparallel zueinander verlaufen. Insgesamt deutet die enge Interaktion zwischen den Untereinheiten auf eine physiologisch relevante Funktion hin. Folglich ist es unwahrscheinlich, dass es sich bei der Disulfidbindung um ein Artefakt in der Kristallisation handelt, da diese ebenfalls in beiden Kristallformen (PDB: 7YWG und 7YWW) konsistent beobachtet wurde (s. Abb. 50). Ebenfalls

durch unterschiedliche mJRLs aus einkeimblättrigen Pflanzen (Monokotyledone) gebildet wie z.Bsp. SalT aus *O. sativa* und das zweite Cluster aus Eudikotyledone mJRLs wie Heltuba (aus *Helianthus tuberosus*). Ein weiterer Ast innerhalb des Pflanzenreichs wird durch JRLs aus der Familie der *Moraceae* gebildet, die sowohl gJRL (Jacalin) als auch mJRL (Frutapin) aufweisen. Darüber hinaus wurden JRL-Mitglieder außerhalb des Pflanzenreichs identifiziert, die eine Sequenzähnlichkeit zwischen 16 % (*Mevo lectin*) und 22,6 % (*Griffithsin*) zu OsJAC1-JRL aufwiesen. Dies verdeutlicht die weite Verbreitung von JRLs in verschiedenen taxonomischen Gruppen. Die *Malay Banlec*-Mutante mit einer Punktmutation (His84Thr; s. Abb. 52) weist einen höheren Verwandtschaftsgrad zu OsJAC1-JRL auf als ihr Wildtyp. Die Autoren konnten zeigen, dass durch die Mutation die Mitogenität von *Banlec* reduziert werden konnte, jedoch die antivirale Aktivität beibehalten werden konnte.^[243]

Tabelle 20 vergleicht OsJAC1-JRL Homologe mit dem höchsten Verwandtschaftsgrad hinsichtlich ihrer strukturellen Abweichung (RMSD), Sequenzähnlichkeit (bezogen auf die OsJAC1-JRL-Domäne) und ihrer Zucker-Spezifität.

Tabelle 20: Vergleich der strukturellen Abweichung (RMSD in Å), Sequenzähnlichkeit und Zucker-Spezifität von OsJAC1-JRL Homologe.

Protein (PDB-Eintrag)	RMSD [Å]	Sequenzähnlichkeit [%]	Zucker-Spezifität
<i>SalT</i> (5GVY)	0,865 – 1,306	41,7	Poly-Mannose ^[215]
<i>AcmJRL</i> (6FLW)	0,752 – 1,129	42,4	Mannopentaose ^[202]
<i>Banlec</i> (4PIF)	0,873 – 2,268	38,2	Laminaribiose ^[204]
<i>PPL</i> (4MQ0)	1,024 – 4,302	35,7	Mannose ^[209]
<i>Heltuba</i> (1C3K)	0,893 – 2,798	36,7	Mannotriose ^[210]
<i>Calsepa</i> (5XFI)	1,012 – 4,941	36,9	Komplexe Glucane ^[215]
<i>MornigaM</i> (1XXQ)	0,773 – 2,611	40,5	Mannose ^[214]
<i>Ipomoelin</i> (3R50)	0,768 – 6,792	50,8	Mannose ^[213]

Wie aus der oberen Tabelle zu entnehmen ist, ist die Struktur der JRL-Domäne von OsJAC1 hoch konserviert in unterschiedlichen Pflanzenarten. Die höchste strukturelle Übereinstimmung hat die OsJAC1-JRL-Domäne mit *AcmJRL* (JRL aus Ananas), die vergleichbar zu der Abweichung zwischen den zwei OsJAC1-JRL-Strukturmodellen (JRL8 und JRL11; RMSD der Ca-Atome von 0,585 – 1,02 Å) ist. Die höchste Sequenzähnlichkeit von 50,8 % hat *Ipomoelin* (JRL aus der Süßkartoffel; *Ipomoea batatas*), jedoch weist es eine hohe strukturelle Abweichung auf, wenn alle Ca-Atome einbezogen werden (RMSD von 6,792 Å). Diese Abweichung ist auf

zwei zusätzliche kurze β -Stränge am N-Terminus von *Ipomoelin* zurückzuführen.^[213] Alle OsJAC1-JRL Homologen aus Tabelle 20 sind in der Lage, mindestens Mannose zu binden und sie weisen eine höhere Bindediversität auf für komplexe Polysaccharide, bestehend aus Mannose oder Glukose. Eine weitere Unterscheidung ist die Anzahl der Bindestellen eines JRL-Proteins. Bisher wurden nur für mJRLs aus einkeimblättrigen Pflanzen zwei Bindestellen nachgewiesen (*Banlec* und *AcmJRL*)^[202, 204] mit Ausnahme von SalT, welches eine Bindestelle für Kohlenstoffhydrate enthält.^[215] Somit kommen nur in einkeimblättrigen Pflanzen mJRLs mit sowohl einer oder zwei Bindestellen vor. Die Positionen der Bindestellen werden in Abbildung 53 dargestellt.

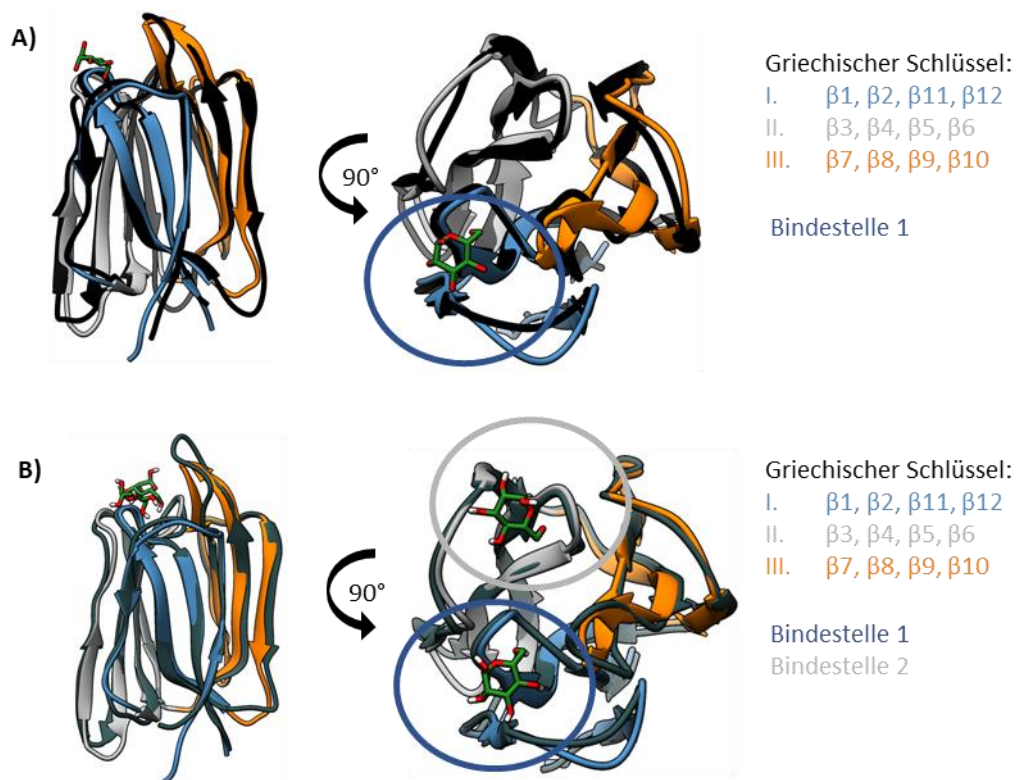


Abbildung 53: Strukturelles Alignment der OsJAC1-JRL-Domäne (griechische Schlüsselmotive wurden farblich hervorgehoben) mit **A)** SalT (PDB Eintrag: 5GVY) und **B)** AcmJRL (PDB Eintrag: 6FLY)^[202]. Beide Homologe lagen im Komplex mit Mannose (grün hervorgehoben) vor und die entsprechenden Bindestellen wurden eingekreist.

Die β -Stränge der beiden Homologen innerhalb der griechischen Schlüsselmotive weisen jeweils eine hohe strukturelle Übereinstimmung mit der OsJAC1-JRL-Domäne auf. Die höchsten Abweichungen sind jeweils in den Schleifen auf der Prismagrundfläche nahe des N- und C-Terminus und an dem putativen Bindebereich (s. eingekreiste Bereiche in Abb. 53) zu erkennen. Die Bindestellen befinden sich jeweils auf der Grundfläche eines griechischen Schlüsselmotivs (I und II) und werden jeweils von zwei Schleifen gebildet. Innerhalb der putativen Bindestellen weist die OsJAC1-JRL-Domäne die höchste strukturelle

Übereinstimmung mit *AcmJRL* auf und könnte somit ein Indiz sein, dass die *OsJAC1-JRL*-Domäne ebenfalls zwei Bindestellen enthält (Näheres in Abschnitt B.3.4.4, s. S. 126).

B.3.3.5 Untersuchung der Oligomerisierung von *OsJAC1*

Bestimmung der apparenten Molekularmasse mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS)

Es wurden dynamische Lichtstreuungsmessungen (DLS) durchgeführt, um den Einfluss verschiedener Pufferbedingungen auf das Größenverteilungsprofil des Volllängenproteins *OsJAC1* zu bestimmen (s. Tabelle 21).

Tabelle 21: Dispersität und apparente Molekularmasse (MW) von *OsJAC1* in Abhängigkeit von verschiedenen Pufferadditiven, bestimmt durch DLS. Die berechneten Molekulargewichte der niedrigsten und höchsten vorkommenden Spezies sind aufgeführt und die entsprechenden Diagramme finden sich im Anhang (S. 188). Alle getesteten Bedingungen wurden mit 15 mM TRIS-HCl-Puffer durchgeführt.

Puffer	Min. MW [kDa]	Max. MW [MDa]	Anzahl Spezies	Oligomer ¹
15 mM TRIS-HCl pH 7,4	308	26,95	2	Nonamer
+ 150 mM CaCl ₂	268,8	3317	n.b.	Octamer
+ 50 mM Laktose	187,4		1	Pentamer
+ 150 mM MgSO ₄	183,7		1	Pentamer
+ 4 mM DTT	137,5		1	Tetramer
+ 50 mM CaCl ₂ + 50 mM Mannose	122		1	Trimer

n.b. nicht bestimmbar

¹Bezogen auf min. MW und eine theoretische MW für *OsJAC1* von 35,5 kDa

Die DLS-Ergebnisse deuten auf unterschiedliche Größenverteilungen und somit auf unterschiedliche Oligomerzustände von *OsJAC1* in Abhängigkeit von den Pufferbedingungen hin. Eine niedrige Pufferkonzentration ohne Zusatzstoffe (15 mM TRIS-Puffer) führte zu zwei unterschiedlichen Partikelpopulationen. Die beiden Arten unterscheiden sich in ihrem scheinbaren hydrodynamischen Radius um eine Größenordnung (kDa – MDa). Die großen Partikeln im MDa-Bereich deuten auf eine Aggregation des Proteins hin. Durch das Testen von denaturierenden Bedingungen (CaCl₂) konnte die Aggregation weiter verstärkt werden, dies beinhaltete außerdem eine breitere Größendispersität. Umgekehrt führte die Zugabe von DTT (reduzierende Bedingungen), Laktose, Mannose oder einem nicht chaotropen Salz wie MgSO₄ zu einer Monodispersität und einer geringeren Molekularmasse. Laktose und Mannose wurden als putative Liganden verwendet, die durch Interaktionsanalysen ermittelt wurden (s. Abschnitt B.3.4.1, S. 113).

Alle ermittelten Molekulargewichte sind jedoch mindestens dreimal so hoch wie die theoretische Masse von 35,5 kDa. Der Oligomierzustand war dabei besonders abhängig von den Additiven der Pufferlösung. Auffällig ist zum Beispiel eine Halbierung des ermittelten Molekulargewichts von oxidierenden Bedingungen (15 mM TRIS-HCl-Puffer) zu reduzierenden Bedingungen (Zugabe von 4 mM DTT). Dies spricht dafür, dass die zuvor ermittelte Bildung der Disulfidbrückenbindung zwischen zwei JRL-Domänen einen Einfluss auf den Oligomierzustand des Proteins hat. Bei den zwei getesteten putativen Liganden (Laktose und Mannose) hatte Mannose den größten Einfluss auf den Oligomierzustand des Volllängenproteins. Ein eventueller Zusammenhang zwischen der Bindung des Liganden und möglichen Konformationsänderungen wird in Abschnitt B.4.3 (s. S. 143) näher diskutiert.

Protein-Protein Docking der Einzeldomänen von *OsJAC1*

Um einschätzen zu können, ob die beiden Domänen von *OsJAC1* miteinander interagieren, wurden *in silico* Analysen durchgeführt. Sie wurden mit dem webbasierten Docking-Programm HADDOCK^[244] auf mögliche Interaktionen untersucht. Vor dem Docking wurden zunächst mögliche Interaktionspositionen für jede Domäne mit dem Webtool CPORT^[245] vorhergesagt. CPORT kombiniert sechs Webserver für die Interaktionsvorhersage.^[245] Unter den vorhergesagten Positionen für die JRL-Domäne sind die Aminosäuren der β 1- und β 10-Stränge mitaufgeführt. Diese beiden Stränge sind jedoch die primäre Interaktionsphase zwischen den beiden JRL-Monomeren, die durch die intermolekulare Disulfidbindung verbunden sind (s. Abb. 50 auf S. 100). Auf die Ausbildung der Disulfidbrückenbindung wurde in Abschnitt B.3.3.1 (S. 80) ausführlich eingegangen und es kann somit gefolgert werden, dass die Verknüpfung der Cystein-Reste (Cys161-Cys161) für die physiologische Funktion von Bedeutung ist. Daher wurden die entsprechenden antiparallelen β -Faltblätter der JRL-Domäne nicht im Docking mit der DIR-Domäne einbezogen. Alle anderen vorhergesagten aktiven Reste sind in Tabelle 48 aufgeführt (S. 193). Abbildung 54 zeigt das Docking-Modell für das Volllängenprotein, welche mit Kette A der entsprechenden *OsJAC1*-Domäne durchgeführt wurde.

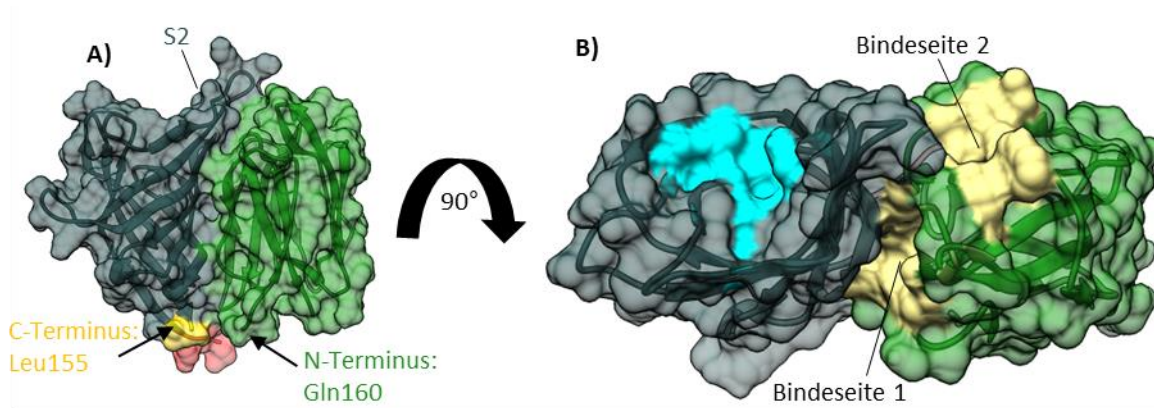


Abbildung 54: Interaktionsanalyse der JRL- und DIR-Domänen von OsJAC1 durch Protein-Protein-Docking mittels HADDOCK^[244]. Docking wurde mit Kette A der jeweiligen Domänen durchgeführt. **A)** Docking-Modell des Vollständigproteins in transparenter Oberflächenansicht (JRL- in grün und DIR-Domäne in grau). Die Region des N- und C-Terminus wurde jeweils rot und gelb hervorgehoben. Zwischen der DIR-Domäne (C-Terminus bei Leu155) und der JRL-Domäne (N-Terminus bei Gln160) fehlt ein Linker von vier Aminosäuren. **B)** Um 90° gedrehte Ansicht; Schleife S2 der DIR-Domäne befindet sich in der Nähe der Bindestelle I und II der JRL-Domäne. Die putative Bindestelle der DIR-Domäne wurde blau hervorgehoben und die beiden putativen Bindestellen der JRL-Domäne (Bindestelle I und II) sind gelb hervorgehoben.

Das Docking-Ergebnis der beiden OsJAC1-Domänen war maßgeblich von der Auswahl der für das Docking einbezogene Reste abhängig. Aus diesem Grund wurden unterschiedliche Aspekte berücksichtigt, wie die Länge des Linkers (Leu155 – Gln160), sowie die Interaktionsfläche des DIR-Homo-Trimers und des JRL-Homo-Dimers (Abb. 46, S. 96 und Abb. 51, S. 101), um das wahrscheinlichste Modell für das Vollständigprotein zu bestimmen. Es ist anzumerken, dass die N- und C-terminale Region der DIR-Monomere in den kristallographischen Modellen (DIR46 und DIR48) unterschiedliche Längen und Orientierungen aufwiesen, was wahrscheinlich auf die unterschiedliche Umgebung im Kristall zurückzuführen ist. Ein strukturelles Alignment aller sechs DIR-Monomere mit dem Docking-Modell des Vollständigproteins verdeutlicht den Unterschied in der terminalen Region der DIR-Domäne (s. Abb. 55).



Abbildung 55: *OsJAC1*-Docking-Modell mit DIR- (grau) und JRL-Domäne (grün). Die N- und C-terminalen Bereiche der DIR-Monomere sind rot bzw. gelb hervorgehoben. Ein Alignment aller DIR-Monomere der kristallographischen Modelle (DIR46 und Dir48) zeigt die unterschiedlichen Grade der aufgelösten Längen und Orientierungen der terminalen Regionen der DIR-Domäne.

Wie in der oberen Abbildung 55 zu sehen ist, liegen die N- und C-terminalen Regionen der DIR-Domäne nahe beieinander. Eventuell sind die beiden terminalen Segmente für die Bildung und Stabilisierung der Region des Linkers zwischen den beiden Domänen im Volllängenprotein verantwortlich. Hierfür spricht, dass die DIR-Domäne einen um 8 K erhöhten Schmelzpunkt im Volllängenprotein im Vergleich zum einzelnen Domänenprotein aufwies (s. Abschnitt B.3.3.1 auf S. 80). Kette B der zwei erhaltenen kristallographischen DIR-Modelle (DIR46 und DIR48) zeigten jeweils die längste aufgelöste Kettenlänge. Jedoch könnte die Orientierung des N-terminalen Bereichs (rot hervorgehoben in Abb. 55) das Protein-Docking mit der JRL-Domäne negativ beeinflussen. Deswegen wurde die kürzere Kette A (DIR46) für das Protein-Docking gewählt, um einen Einfluss durch die kristallographische Umgebung des N-terminalen Bereichs in der individuellen DIR-Domäne zu vermeiden.

Das in der Abbildung 54 dargestellte HADDOCK-Modell des Volllängenproteins zeigt eine Konformation, bei der die beiden putativen Bindeseiten der jeweiligen Domänen (gelb für JRL und blau für DIR) in die gleiche Richtung zeigen und beide sich auf der gegenüberliegenden Seite ihrer jeweiligen Termini befinden. Im Falle eines Pathogenangriffs wären die Bindeseiten der beiden *OsJAC1*-Domänen entsprechend auf dasselbe Ziel gerichtet. Unter der Annahme, dass die JRL-Domäne für die Pathogenerkennung und die DIR-Domäne für die Abwehrreaktion verantwortlich ist, deutet dieses Docking-Modell daraufhin, dass beide Funktionen in unmittelbarer Nähe stattfinden.

***In silico* Modelle von möglichen Oligomierzuständen**

Weitere *in silico* Analysen erfolgten, um potenzielle Quartärstrukturen von OsJAC1 zu untersuchen. Abbildung 56 zeigt das zweite Protein-Protein-Docking mittels HADDOCK des erhaltenen Volllängenprotein-Modells.

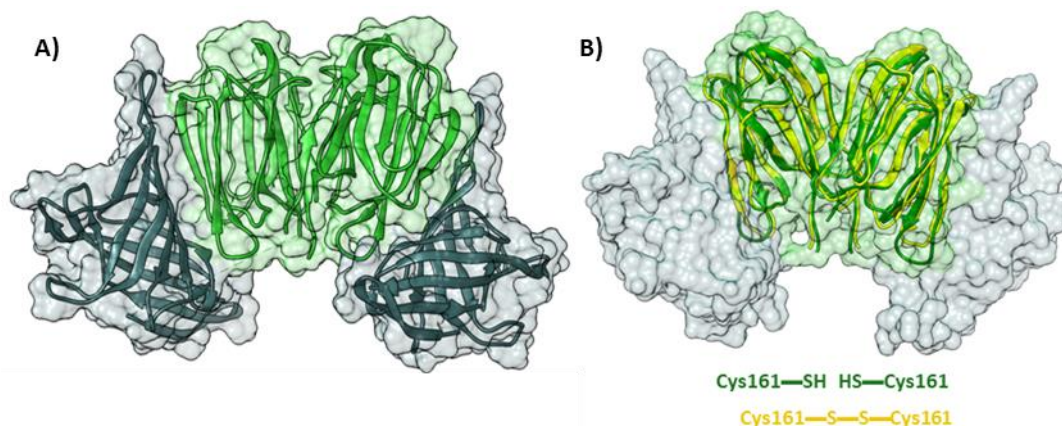


Abbildung 56: *In silico* Untersuchung von möglichen Quartärstrukturen von OsJAC1 durch Protein-Protein-Docking mittels HADDOCK^[244]. Dimer des Volllängenprotein-Modells in transparenter Oberflächenansicht mit DIR (grau) und JRL (grün) eingefärbt. **A)** Aktive Reste für die putative Interaktion wurden entsprechend der Schnittstelle des JRL-Homo-Dimers (PDB: 7YWG) ausgewählt. Die Hauptinteraktion findet zwischen den beiden JRL-Monomeren statt. **B)** Alignment der Dimere zwischen dem OsJAC1-Modell (JRL in grün und graue DIR-Oberfläche) mit Cys161-Resten und dem aus der Kristallographie der JRL-Domäne (gelb) erhaltenen Homo-Dimer mit intermolekularer Disulfidbindung an Cys161-Cys161 (RMSD von 0,56 Å).

Die zwei individuellen Domänen von OsJAC1 wiesen unterschiedliche Oligomierzustände in der kristallographischen asymmetrischen Einheit auf (s. Abschnitt B.3.3.4 auf S. 89). Durch die hohe Interaktion in den jeweiligen Anordnungen kann davon ausgegangen werden, dass sowohl das JRL-Dimer als auch der DIR-Trimer stabil in Lösung ist. Die jeweiligen Interaktionsschnittstellen wurden für das *in silico* Docking-Modell berücksichtigt, um potenzielle Oligomierzustände des Volllängenproteins zu erhalten. Alle Docking Ergebnisse sind in Tabelle 49 (S. 193) aufgeführt. Zunächst wurde eine mögliche Dimerisierung des Volllängenproteins hinsichtlich der JRL-Schnittstelle untersucht (s. Abb. 56). Ein strukturelles Alignment des OsJAC1-JRL-Homo-Dimers aus der Kristallographie (PDB: 7YWG) und des HADDOCK-Dimers hatte eine RMSD von 0,56 Å (Abb. 56 B). Dies verdeutlicht, dass die zuvor gewählten Docking-Parameter für die Erstellung des Volllängen-Modells (Abb. 54) geeignet waren und entsprechend die DIR-Domäne nicht mit der Interaktion zwischen den beiden JRL-Monomeren interferiert.

Neben der JRL-Schnittstelle könnten die Interaktionsschnittstellen zwischen den DIR-Domänen eine weitere mögliche Konformation des Volllängenproteins darstellen. Die individuelle DIR-Domäne zeigte ein Trimer in der kristallographischen asymmetrischen Einheit

(s. Abb. 45, S. 94) mit vielen hydrophoben Kontakten, die durch das Trimer verdeckt werden. Abbildung 57 zeigt eine mögliche Anordnung des Volllängenproteins *OsJAC1*, welches die hydrophoben Kontakte der DIR-Domäne im Zentrum des Komplexes ermöglicht.

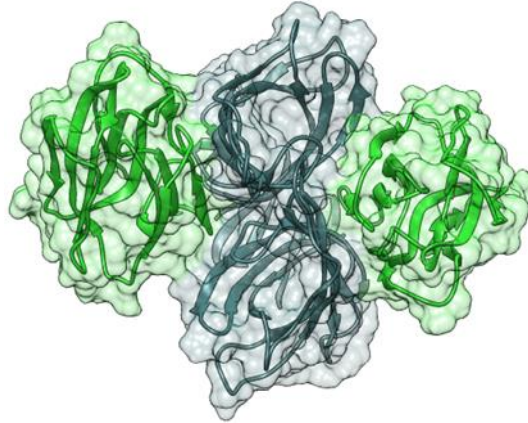


Abbildung 57: *In silico* Untersuchung von möglichen Quartärstrukturen von *OsJAC1* durch Protein-Protein-Docking mittels HADDOCK^[244]. Dimer des Volllängenprotein-Modells in transparenter Oberflächenansicht mit DIR (grau) und JRL (grün) eingefärbt. Aktive Reste wurden entsprechend der Schnittstelle des DIR-Homo-Trimers (PDB: 7R5Z) ausgewählt. Die Interaktion findet zwischen zwei DIR-Domänen, die von JRL-Domänen flankiert werden, statt.

Basierend auf den beiden beschriebenen Oligomer-Modellen könnte ein höherer Oligomerzustand möglich sein (s. Abb. 58).

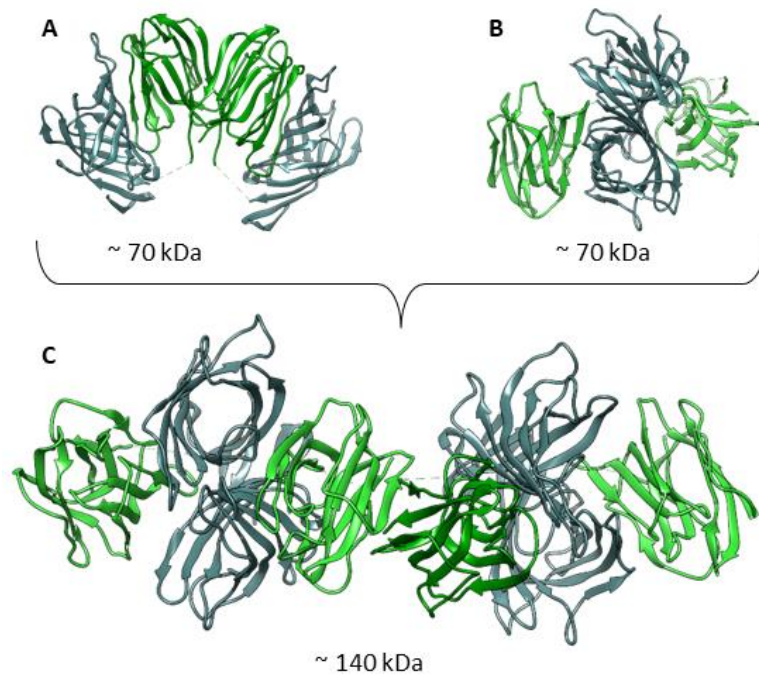


Abbildung 58: Mögliche Bildung eines *OsJAC1*-Tetramers mit einer MW von ~140 kDa unter reduzierenden Bedingungen. **A)** Zwei *OsJAC1*-Dimer-Modelle mit einer Interaktionsfläche zwischen den JRL-Domänen und den DIR-Domänen. **B)** Kombination der beiden Dimer-Modelle, die zu einem Tetramer mit einem MW von ~140 kDa führen könnten.

Die Kombination beider Dimer-Modelle von *OsJAC1* resultiert in einem Tetramer mit einer Molekularmasse von ~140 kDa (Abb. 58). Dies würde mit dem zuvor durch DLS ermittelten Ergebnis unter reduzierenden Bedingungen übereinstimmen (s. Tabelle 21, S. 106). Weitere Selbstassoziationen mit höheren Oligomierzustände könnten möglich sein und wurden ebenfalls in den DLS-Messungen beobachtet (bis zu Nonamer; Tabelle 21).

B.3.4 Interaktionsanalyse

B.3.4.1 Protein-Liganden-Interaktionsbestimmung mittels DSF

Allgemein erhöhen die Wechselwirkungen mit Bindungspartnern, wie z.B. niedermolekularen Liganden, die Stabilität eines Proteins.^[246] Dieser Zusammenhang wurde genutzt, um die JRL-Domäne des chimären Lektins OsJAC1 mittels *differential scanning fluorimetry* auf potenzielle Zuckerinteraktionspartner zu untersuchen; ein Anstieg des Schmelzpunkts wurde als Hinweis auf eine Ligandenbindung verwendet. Wie im Abschnitt B.3.3.1 (S. 80) bereits gezeigt, weist die Schmelzkurve von OsJAC1 zwei Wendepunkte und somit zwei Schmelzpunkte unter reduzierenden Bedingungen auf. Der erste Wendepunkt (T_{M1}) wurde der JRL-Domäne zugeordnet und dementsprechend wurden Schmelzpunkterhöhungen von T_{M1} auf eine Interaktion mit dem Liganden bezogen. Hierbei ist zu erwähnen, dass T_{M1} für OsJAC1 zwischen 59 °C und 61 °C für einzelne Isolierungschargen variierte, während die Erhöhung des Schmelzpunkts (ΔT_{M1}) durch die Zugabe von Zuckern gleichblieb. Die beobachtete Differenz des ersten Wendepunkts wurde daher auf minimale Änderungen der Pufferzusammensetzung zwischen den Chargen zurückgeführt. Die Bewertung der Liganden-Interaktion basierte ausschließlich auf ΔT_{M1} ($T_{M1, \text{Zucker}} - T_{M1, \text{Kontrolle}}$) anstatt von T_{M1} .

Abbildung 59 zeigt die ermittelten Verschiebungen der Wendepunkte (induziert durch verschiedene ausgewählte Mono- und Disaccharide) für das Volllängenprotein OsJAC1, die individuelle JRL-Domäne in einer äquimolaren Mischung mit der DIR-Domäne unter reduzierenden Bedingungen (4 mM DTT) und die individuelle JRL-Domäne unter oxidierenden Bedingungen (0 mM DTT). Weitere getestete Saccharide sind in Tabelle 46 und 47 aufgelistet (s. Abschnitt D.2.2 auf S. 191). Der Wendepunkt der individuellen JRL-Domäne war allgemein unter reduzierenden Bedingungen nicht nachweisbar und daher nicht für das Screening möglicher Zuckerinteraktionspartner geeignet. Dies lässt sich auf die exponierten Tryptophan-Reste (Trp169 und Trp196) zurückführen, die zu erhöhten Ausgangswerten in der DSF-Messung führten. Durch die Verwendung eines Gemischs aus den individuellen Domänenproteinen (DIR und JRL) wurde jedoch die Nachweisbarkeit des JRL-Wendepunkts verbessert und somit besser für das Screening geeignet.

Biochemische Charakterisierung des Reisproteins OsJAC1

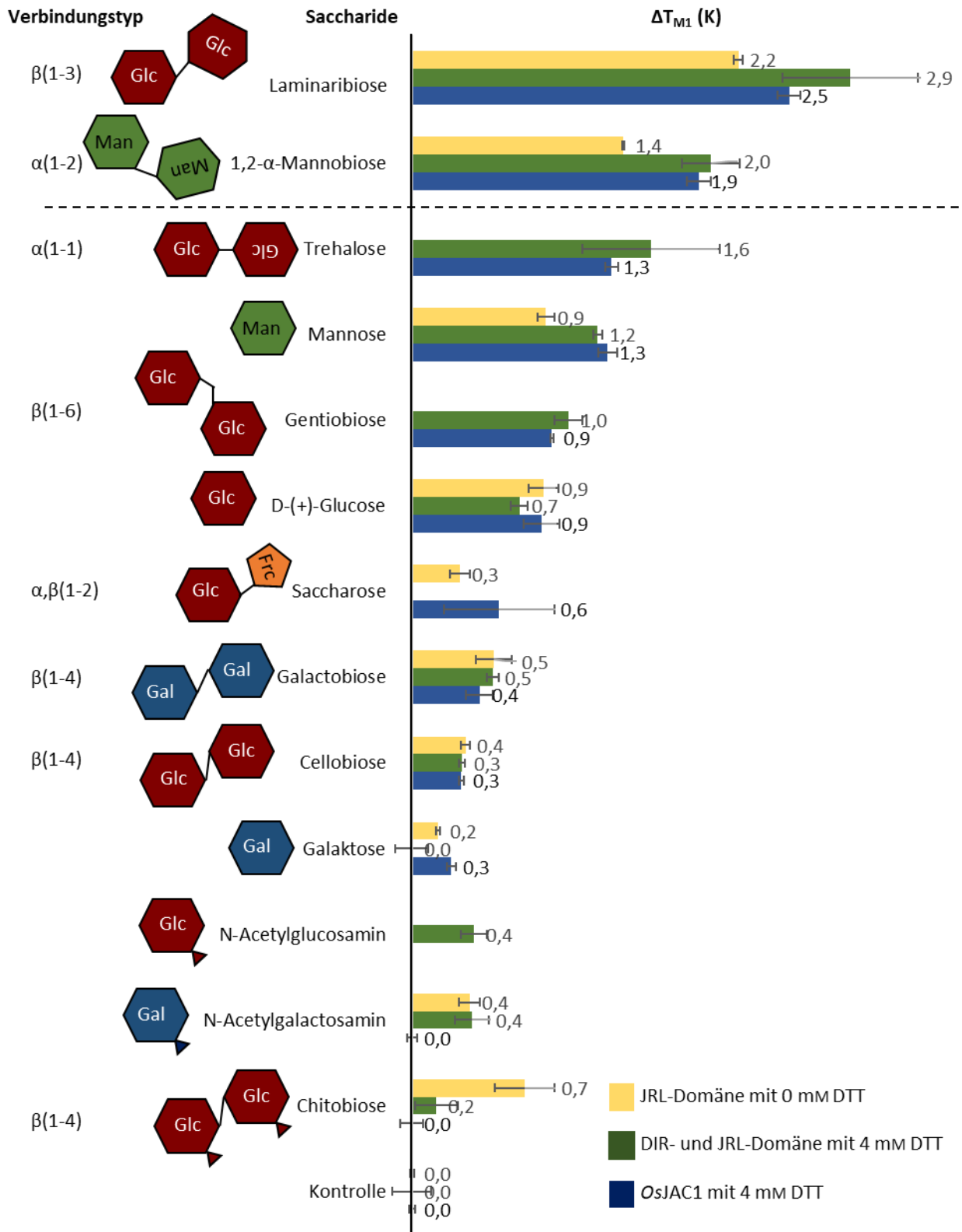


Abbildung 59: Ermittelte ΔT_{M1} von OsJAC1 (blau), der JRL-Domäne in einer 1:1-Mischung mit der DIR-Domäne (grün) unter reduzierenden Bedingungen (4 mM DTT) und der individuellen JRL-Domäne unter oxidierenden Bedingungen (0 mM DTT) nach Zugabe von unterschiedlichen Sacchariden (50 mM). Die Clusteranalyse erfolgte durch *K-Means* (*OriginPro 2019*). Die beiden Cluster werden in der Abbildung mit einer gestrichelten Linie voneinander getrennt.

Zunächst wurden unterschiedliche Monosaccharide mit dem Fokus auf Mannose getestet, da *Jiang et al.* bereits über die spezifische Bindung von Mannose durch die JRL-Domäne berichtete.^[194] Eine leichte Erhöhung von T_{M1} um 1 K wurde in Gegenwart von Mannose und Glukose sowohl für OsJAC1 als auch für die individuelle JRL-Domäne beobachtet. Mannose und Glukose haben ein ähnliches Interaktionsprofil, bei dem Lektine die äquatoriale Position der 4-Hydroxylgruppe erkennen, im Gegensatz zur axialen 4-Hydroxylgruppe in Galaktose.^[218]

In einem zweiten Screening wurden verschiedene Disaccharide getestet, wie *N,N'*-Di-acetylchitobiose (Chitobiose; Bestandteil der Pilzzellwand)^[247] oder glukosehaltige Saccharide (z.B. Cellobiose oder Laminaribiose). Diese Zucker können unter anderem Bestandteil des Pilzerregers sein, der die pflanzliche Zellwand mit Hilfe von Appressorien eindringt, oder Pflanzenbestandteile, die durch den Eindringvorgang zugänglich gemacht werden. Die Disaccharide 1,2- α -Mannobiose und insbesondere Laminaribiose waren in der Lage, T_{M1} um 2 – 3 K im Vergleich zur Kontrolle zu erhöhen. Die Ergebnisse zeigten ebenfalls, dass die JRL-Domäne in der Lage ist, zwischen verschiedenen Glykosyl-Disacchariden zu unterscheiden, wobei die β 1,3-verknüpfte Laminaribiose den größten Effekt zeigte. Eine Clusteranalyse mittels *K-Means* Algorithmus (*OriginPro* 2019) bekräftigt diese Beobachtung. Die beiden Disaccharide mit dem höchsten Schmelzpunktanstieg bilden gemeinsam einen Cluster und unterscheiden sich signifikant von den anderen getesteten Sacchariden (s. auch weitere Resultate aus Tabelle 46 und 47 in Abschnitt D.2.1 auf S. 191).

Grundsätzlich konnte es keine (für Monosaccharide) bzw. eine niedrigere (für Disaccharide) stabilisierende Wirkung durch die Ligandeninteraktion unter oxidierenden als unter reduzierenden Bedingungen festgestellt werden (Vergleich gelber und grüner Balken in Abb. 59). Jedoch konnte eine hohe Übereinstimmung der ermittelten Schmelzpunktunterschiede (ΔT_{M1}) zwischen der JRL-Domäne im Volllängenprotein (blauer Balken in Abb. 59) und der individuellen JRL-Domäne unter reduzierenden Bedingungen (4 mM DTT) beobachtet werden. Diese Beobachtung bekräftigt, dass der erste Wendepunkt der Schmelzkurve von OsJAC1 (s. Abb. 39, S. 81) mit der JRL-Domäne zusammenhängt. Zusätzlich zeigt dies, dass die DIR-Domäne keinen Einfluss auf die Bindefähigkeit der JRL-Domäne im Volllängenprotein ausübt. Im Gegensatz dazu kann T_{M1} von OsJAC1 unter nicht reduzierenden Bedingungen nicht direkt verglichen werden, da der charakteristische Übergang an T_{M1} des Volllängenproteins unter diesen Bedingungen kaum nachweisbar ist.

Lundstrøm et al. (2021) haben mit einem Modell vorausgesagt, dass die OsJAC1-JRL-Domäne spezifisch komplexe Polysaccharide mit einem hohen Mannoseanteil bindet. Zweitens sagt ihr Modell sowohl eine Bindung zu komplexen Glukosestrukturen als auch zu Strukturen mit Sialinsäure (*N*-Acetylneuraminsäure) voraus.^[248] Ihre Ergebnisse decken sich sehr gut mit den in dieser Arbeit durchgeführten Interaktionsstudien für Mannose- und Glukoseverbindungen. Interaktionsstudien mit Sialinsäure wurden ebenfalls durchgeführt und es konnte eine Erhöhung des Schmelzpunkts um 1 K ermittelt werden. Jedoch wurde dies auch für die DIR-Domäne beobachtet (s. Tabelle 47 auf S. 192). Da der pH-Wert von 7,4 unter den gewählten Bedingungen (50 mM Sialinsäure in 50 mM KPi-Puffer) nicht mehr gewährleistet war, der pH-Wert sich vielmehr im sauren Bereich befand, wurde der Schmelzpunktanstieg auf den pH-Wert zurückgeführt.

Die DIR-Domäne weist ebenfalls spezifische Interaktionen mit Sacchariden auf

Neben dem von Liganden bedingten Effekt auf T_{M1} wurde ebenfalls ein Anstieg des zweiten Schmelzpunktes ($T_{M2} = 85\text{ °C}$) von *OsJAC1* bei Zugabe von galaktosehaltigen Zuckern beobachtet (s. Abb. 61). *OsJAC1*- T_{M2} wurde ausschließlich auf die DIR-Domäne zurückgeführt (s. Abschnitt B.3.3.1 auf S. 80). Der zuckerbedingte Stabilitätsanstieg der DIR-Domänen war unerwartet. Um zu testen, ob die Erhöhung des Schmelzpunkts auf eine unspezifische Interaktion der galaktosehaltigen Zuckervarianten zurückzuführen ist, wurden Lysozym und Serumalbumin als Negativkontrollen verwendet (s. Abb. 60).

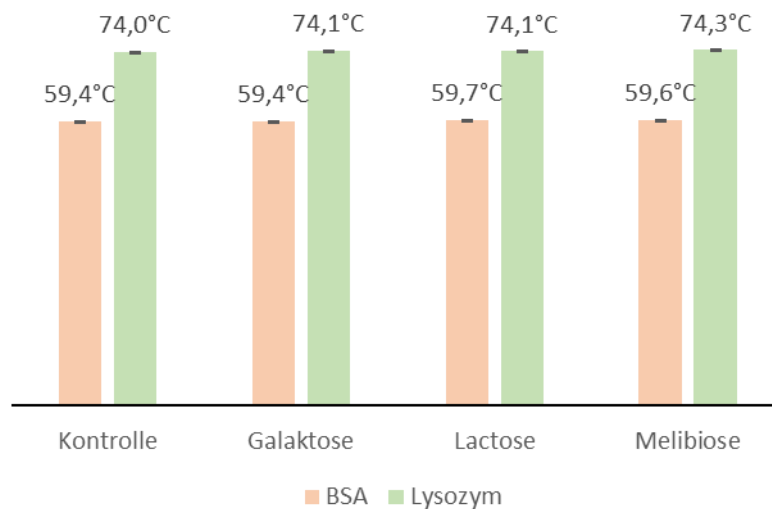


Abbildung 60: Negativkontrolle der Saccharid-Interaktionsstudie. Schmelzpunkt T_M von BSA (Serumalbumin) und Lysozym im Verhältnis zu verschiedenen Sacchariden (50 mM).

Die getesteten Zuckerverbindungen (z.B. Galaktose und Laktose) wirkten sich positiv auf T_{M2} der individuellen DIR-Domäne und des *OsJAC1*-Proteins aus (s. Abb. 61), zeigten jedoch keine Wirkung auf die Kontrollen (s. Abb. 60). Es ist zu erwähnen, dass die im Kontrollversuch getesteten Zuckervarianten ebenfalls keinen Einfluss auf den Schmelzpunkt der JRL-Domäne von *OsJAC1* hatten und es sich somit um eine spezifische Interaktion der DIR-Domäne mit diesen Sacchariden handelt.

Abbildung 61 zeigt die ermittelten Verschiebungen des Wendepunkts T_{M2} (induziert durch verschieden ausgewählte Mono- und Disaccharide) für das Volllängenprotein *OsJAC1* und die individuelle DIR-Domäne unter reduzierenden (4 mM DTT) und oxidierenden Bedingungen (0 mM DTT). Weitere getestete Saccharide für die DIR-Domäne sind ebenfalls in Tabelle 46 und 47 aufgelistet (s. Abschnitt D.2.2 auf S. 191).

Biochemische Charakterisierung des Reisproteins OsJAC1

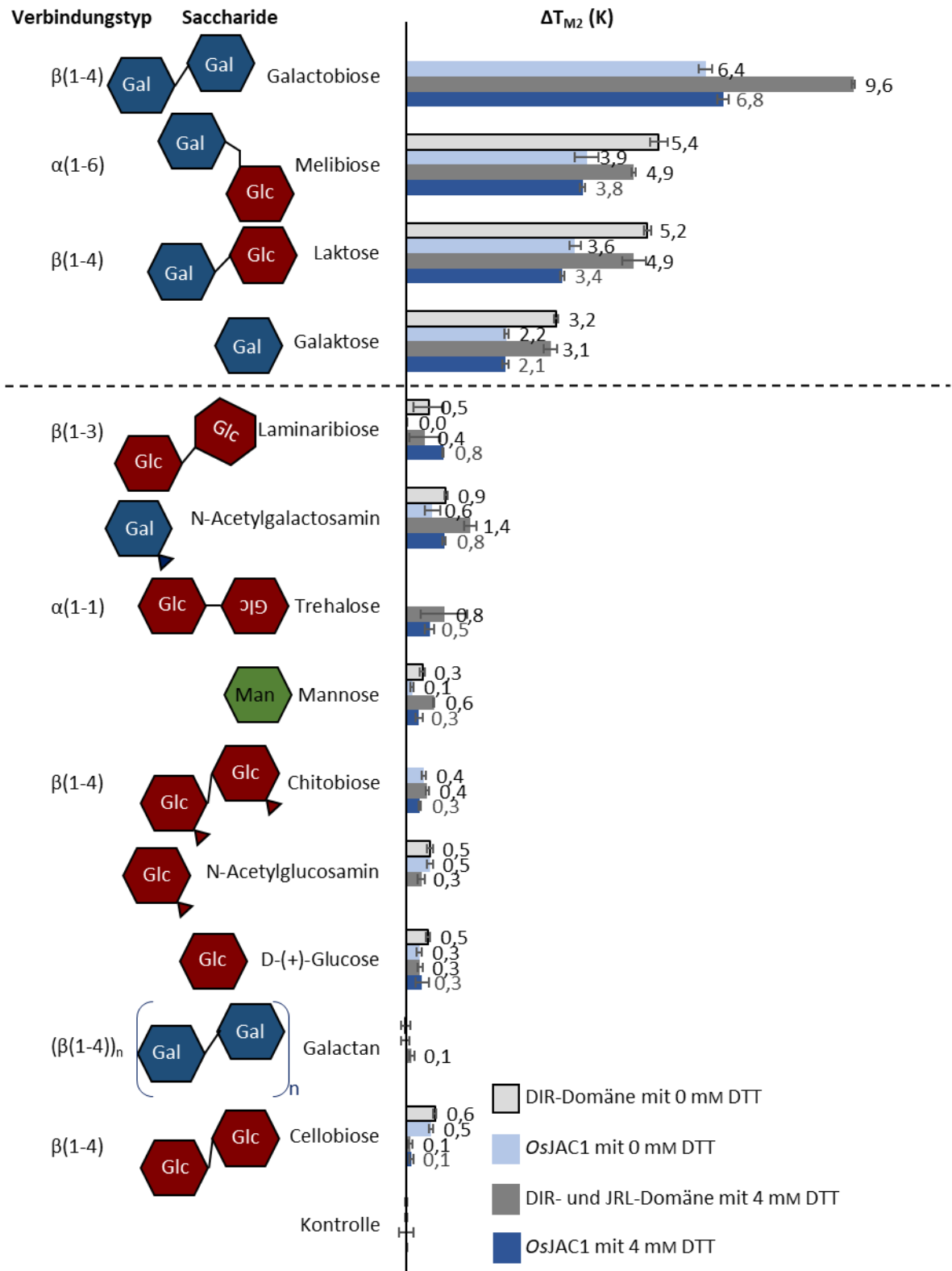


Abbildung 61: Ermittelte ΔT_{M2} für OsJAC1, das isolierte DIR-Domänenprotein und DIR/JRL (1:1)-Proteinmischung nach Zugabe von verschiedenen Sacchariden (50 mM) unter reduzierenden (4 mM DTT) und oxidierenden (0 mM DTT) Bedingungen. Die Clusteranalyse erfolgte durch *K-Means* (*OriginPro* 2019). Die beiden Cluster werden in der Abbildung mit einer gestrichelten Linie voneinander getrennt.

Die in Abbildung 61 gezeigten Daten legen nahe, dass die durch Saccharid induzierte Verschiebung von T_{M2} ausschließlich auf die DIR-Domäne zurückzuführen ist. Es wurde für beide *OsJAC1*-Domänen keine Überschneidung in ihrer Interaktionsaktivität beobachtet und entsprechend interagierten beide Domänen spezifisch auf unterschiedliche Saccharide. Zusätzlich konnte kein Unterschied der Bindefähigkeit im Zusammenhang mit den Redoxbedingungen des Puffers für die DIR-Domäne (individuell und im Volllängenprotein) festgestellt werden.

Von den unterschiedlich getesteten Monosacchariden zeigte Galaktose den stärksten Anstieg in T_{M2} von bis zu 2 K für *OsJAC1* und 3 K für die DIR-Domäne. Dagegen zeigte *N*-Acetylgalactosamin einen geringeren Anstieg von T_{M2} als Galaktose. Diese geringere Reaktion auf den Liganden spricht für eine mögliche sterische Hinderung der Interaktion durch die Acetylgruppe im *N*-Acetylgalactosamin. Einen weiteren Anstieg von 3 bis 6 K für *OsJAC1* und für die DIR-Domäne von 5 bis 10 K konnte mittels galaktosehaltigen Disacchariden (Laktose, Melibiose und Galactobiose) erreicht werden. Jedoch hatte das lineare Polysaccharid β -1,4-Galactan keinen Einfluss auf die Stabilität der DIR-Domäne gehabt. Dies spricht dafür, dass die DIR-Domäne das nicht reduzierende Ende von Galaktose-Zuckern wie in Galactobiose, Laktose und Melibiose erkennt und spezifisch bindet. Im Fall von Galactan ist durch den hohen Polymerisierungsgrad des Zuckers der Kontakt zu den nicht reduzierenden Enden eventuell nicht gewährleistet. Eine Clusteranalyse mit dem *K-Means* Algorithmus aller Daten für die DIR-Domäne konnte somit zwischen Sacchariden, die Galaktose enthalten und solchen, die sie nicht enthalten, unterscheiden, wie in Abbildung 61 dargestellt.

B.3.4.2 Nah Zirkular-Dichroismus (CD) Spektroskopie

Mittels DSF wurde die spezifische Saccharid-Interaktion der beiden OsJAC1-Domänen ermittelt. Um diese Beobachtung weiter zu untersuchen, wurde Nah-UV-CD-Spektroskopie eingesetzt. Mithilfe dieser Methode können insbesondere Wechselwirkungen mit aromatischen Resten (Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin) untersucht werden.^[249] Hierfür wurden die Bindungspartner mit den auffälligsten Effekten in den vorherigen DSF-Experimenten, wie Galactobiose für die DIR-Domäne und Laminaribiose für die JRL-Domäne, eingesetzt und untersucht (s. Abb. 62).

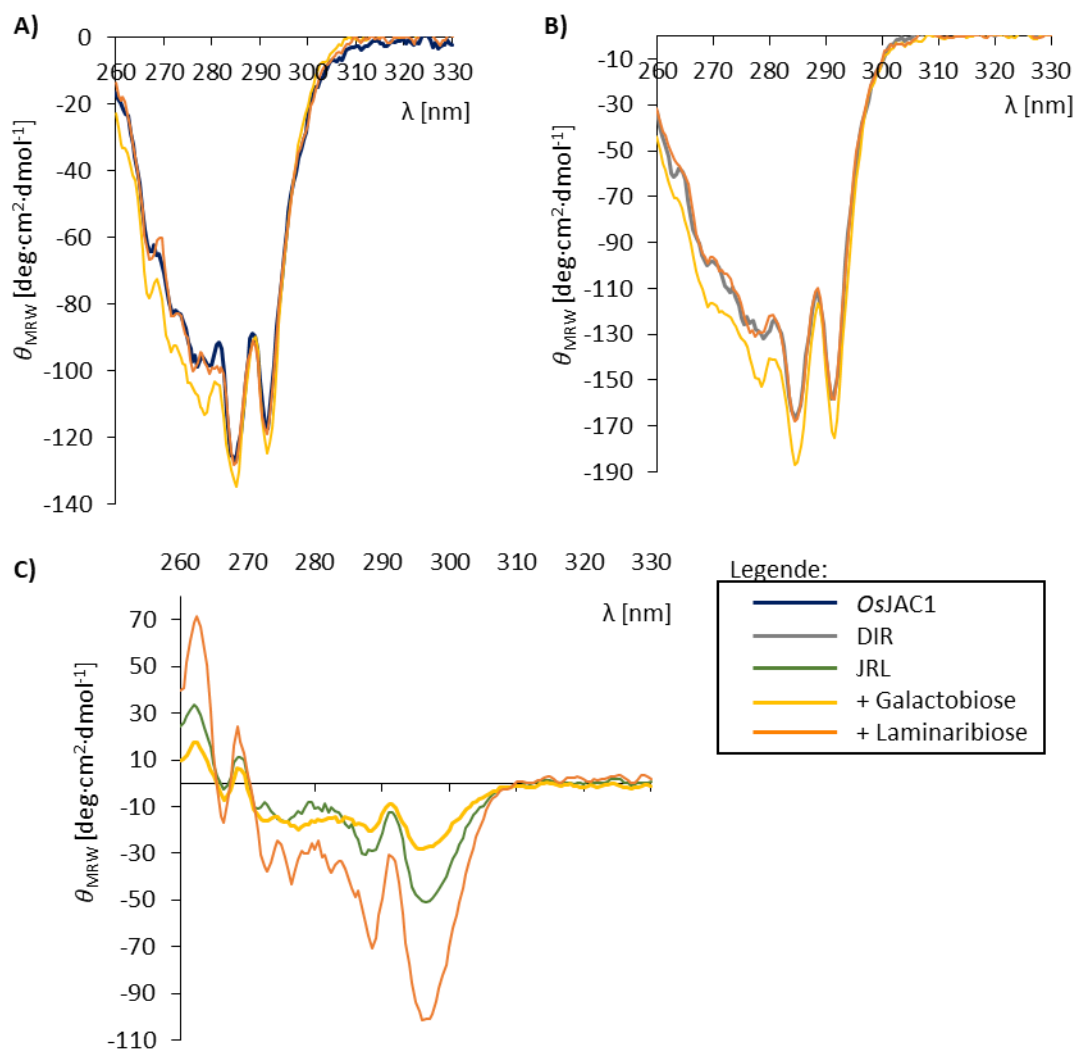


Abbildung 62: Geglättete Nah-UV-CD-Spektren durch den Savitzky-Golay-Algorithmus^[235] von A) OsJAC1, B) der DIR- und C) JRL-Domänenprotein in Anwesenheit von 1 mM Galactobiose (gelb) oder Laminaribiose (orange). 50 mM KPi Puffer, pH 7,4.

Die Verläufe der Spektren der drei untersuchten Proteine weisen ein ähnliches Profil auf. Es sind zwei deutliche Minima zwischen 285 und 295 nm im Absorptionsbereich von Tryptophan zu erkennen sowie ein weniger ausgeprägtes Minimum bei etwa 280 nm (Tyrosin)

und ein Signalanstieg bei etwa 260 nm (Phenylalanin). Jedoch ist letzteres im Fall der individuellen JRL-Domäne deutlich ausgeprägter mit einem erkennbaren Maximum in diesem Bereich. Die Zugabe der entsprechenden Liganden führte zu einer deutlichen Verschiebung der CD-Spektren für beide *OsJAC1*-Domänen. Eine Verschiebung durch Laminaribiose war für das Volllängenprotein nicht nachweisbar, führte jedoch im Falle der individuellen JRL-Domäne zu einer deutlichen Verschiebung. Somit zeigen zwei voneinander unabhängige Methoden (Nah-UV-CD und DSF), dass beide Domänen von *OsJAC1* unterschiedliche spezifische Saccharid-Bindestellen mit Affinitäten zu Galaktose- bzw. Glukose-/Mannose-Einheiten aufweisen.

B.3.4.3 Hämagglutinations-Assay

Multivalente Lektine sind in der Lage, Erythrozyten zu agglutinieren, indem sie spezifische Kohlenhydratmuster auf der Zelloberfläche erkennen und in der Suspension ein Netzwerk bilden. Durch serielle Verdünnung des zu untersuchenden Lektins in einer 96-Well-Mikrotiterplatte und Zugabe einer konstanten Menge an Erythrozyten kann die Aktivität des Lektins halbquantitativ bestimmt werden.^[250]

Tabelle 22 fasst die Ergebnisse des Hämagglutinations-Tests von *OsJAC1* und den beiden Domänen mit Kaninchenerythrozyten zusammen. Abbildung 63 zeigt eine untersuchte Platte. Ein Replikat dieses Versuchs ist im Anhang enthalten (s. Abb. 87 auf S. 195).

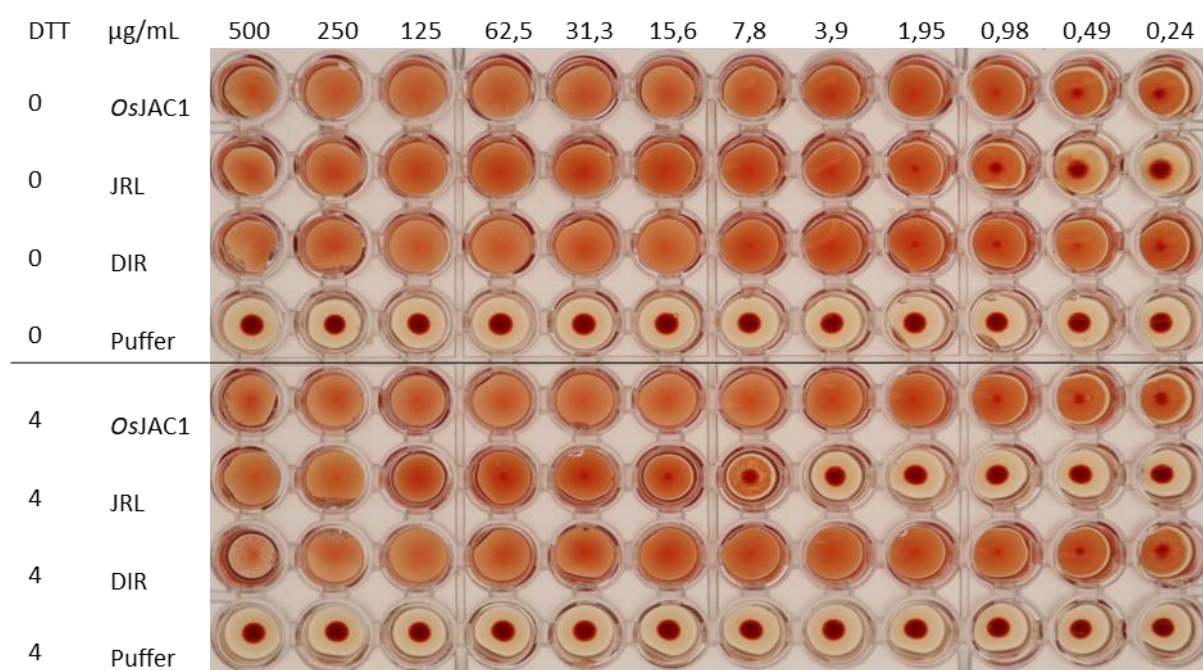


Abbildung 63: Hämagglutinations-Test von Kaninchen-Erythrozyten mit *OsJAC1* und seinen Domänen (JRL und DIR) unter oxidierenden (0 mM DTT) oder reduzierenden (4 mM DTT) Testbedingungen. Die Proteine wurden seriell von 500 auf 0,24 µg/mL verdünnt. In den Well-Vertiefungen mit einem roten Punkt (Zellpellet) wurde keine Hämagglutination beobachtet, dementsprechend wurde in den Vertiefungen mit einer roten, trüben Suspension Hämagglutination beobachtet. Bei den Negativkontrollen handelte es sich um die spezifischen Pufferbedingungen ohne jegliches Protein. Als Positivkontrolle wurde die *OsJAC1*-JRL-Domäne verwendet, von der bereits gezeigt wurde, dass sie Kaninchenerythrozyten agglutiniert.^[194]

Das Volllängenprotein *OsJAC1* und das DIR-Domänenprotein zeigten eine ähnliche und hohe Reaktion auf die getesteten Kaninchen-Erythrozyten. Die niedrigste Proteinkonzentration für die Hämagglutination lag bei ca. 0,98 µg·mL⁻¹, wobei kein Unterschied unter oxidativen und reduzierenden Redoxbedingungen für diese beiden Proteine im Assay zu beobachtet war. Das individuelle JRL-Domänenprotein von *OsJAC1* zeigte eine geringere Reaktion auf Kaninchen-Erythrozyten unter oxidierenden Bedingungen mit Proteinkonzentra-

tionen zwischen 1,95 – 3,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, was der zuvor publizierten Konzentration (1,95 $\mu\text{g}/\text{mL}$) entspricht.^[194] Die Hämagglutinationsaktivität nahm jedoch unter reduzierenden Testbedingungen (4 mM DTT) um das bis zu 8-fache ab.

Tabelle 22: Überblick über die Hämagglutinations-Hemm-Tests von Kaninchen-Erythrozyten mit *OsJAC1* und seinen Domänen. Die aufgeführten Proteinkonzentrationen sind die niedrigsten Konzentrationen, bei denen Hämagglutination unter oxidierenden (0 mM DTT) oder reduzierenden (4 mM DTT) Testbedingungen zu beobachten war.

DTT [mM]	Protein	$[\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}]$
4	<i>OsJAC1</i>	0,98
4	DIR	0,98
4	JRL	15,6 – 7,8
0	<i>OsJAC1</i>	0,98
0	DIR	0,98
0	JRL	1,95 – 3,9

Inhibition der Hämagglutination durch die Interaktion mit spezifischen Sacchariden

Die Interaktion von Lektine mit den Kohlenhydratmustern auf der Zelloberfläche von Erythrozyten kann durch die Zugabe von spezifischen Sacchariden inhibiert werden. Mit dieser Methode können halbquantitative Ergebnisse für die Zuckerbindung und Spezifität eines Lektins erhalten werden. Da bereits ausführliche Zucker-Interaktionsstudien (s. Abschnitt B.3.4.1 auf S. 113) durchgeführt wurden, war Ziel dieses Versuchs, das Volllängenprotein und die zwei Domänenproteine (DIR und JRL) auf ihr Lektinverhalten hinsichtlich der Hämagglutinations-Inhibition zu testen (s. Abb. 64).

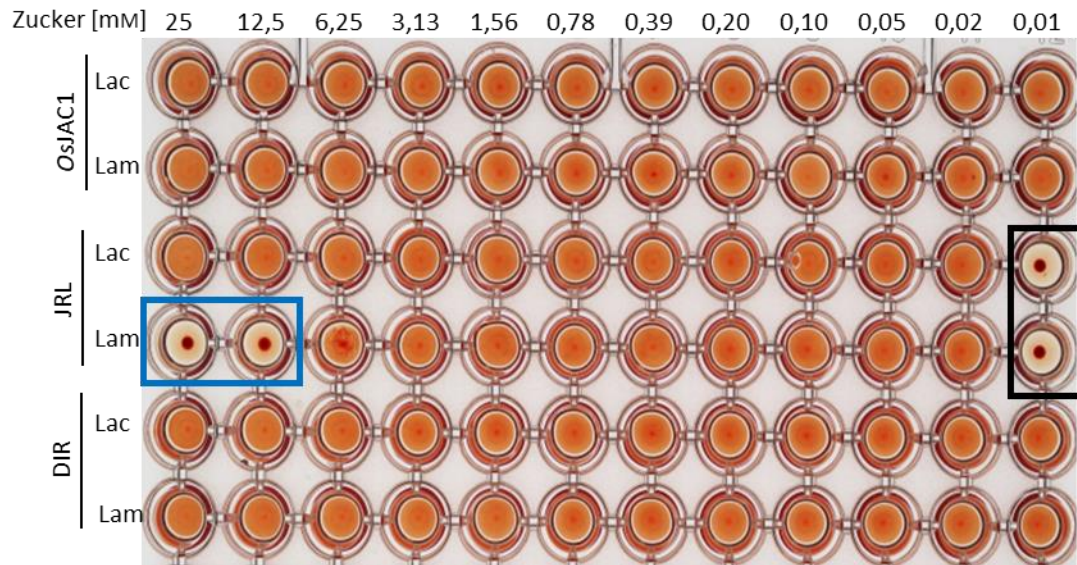


Abbildung 64: Inhibition der Hämagglutination von Kaninchen-Erythrozyten mit OsJAC1 und seinen Domänen (JRL und DIR) durch Zugabe von Disacchariden (Laktose und Laminaribiose). Die Zuckerlösung wurde seriell von 25 auf 0,01 mg/mL verdünnt und die Proteinkonzentration war in allen Wells konstant. In den Well-Vertiefungen mit einem roten Punkt (Zellpellet) wurde keine Hämagglutination beobachtet (positive Inhibition; blau umrandet), dagegen wurde in den Vertiefungen mit einer roten, trüben Suspension Hämagglutination beobachtet (keine Inhibition). Bei den Negativkontrollen handelte es sich um die Pufferbedingungen ohne jegliches Protein (schwarz umrandet).

Lactose bzw. Laminaribiose war nicht in der Lage, die Hämagglutinationsaktivität von OsJAC1 oder der DIR-Domäne zu inhibieren. Dies war im Fall der Laminaribiose und der DIR-Domäne zu erwarten, da in den vorherigen Interaktionsstudien keine Wechselwirkung festgestellt werden konnte. Jedoch wäre eine Inhibition durch Laktose eher zu erwarten gewesen. Dies spricht zunächst nicht für ein typisches Lektinverhalten der DIR-Domäne. Eventuell sind neben der Zuckerbindestelle der DIR-Domäne weitere strukturelle Einheiten mit der Hämagglutination involviert. Jedoch könnte auch die Zuckerkonzentration für die Inhibition nicht ausreichend gewesen sein und eine höhere Konzentration sollte getestet werden. Im Gegensatz dazu wurde eine Inhibition der Hämagglutinationsaktivität der JRL-Domäne mit Laminaribiose (12,5 mM) beobachtet (s. Abb. 64; blauer Rahmen). Unterstützt wird dies durch die zuvor publizierte Konzentration für die Inhibition mit Mannose von 66,7 mM.^[194] Damit gibt es erste Indizien, dass die JRL-Domäne sich wie ein klassisches Lektin verhält und die DIR-Domäne eventuell nicht, allerdings muss der Assay noch reproduziert werden und weitere Parameter wie eine höherer Zuckerkonzentration getestet werden, um die Beobachtungen zu bekräftigen.

Abbildung 65 veranschaulicht schematisch die erhaltenen Erkenntnisse für die JRL-Domäne in dieser Versuchsreihe, so zum einen die niedrigere Hämagglutinationsaktivität unter reduzierenden Bedingungen (s. Abb. 65 A) als unter oxidierenden Bedingungen (s.

Abb. 65 B) sowie zweitens die Inhibition der Hämagglutination durch Laminaribiose (s. Abb. 65 C). Unter reduzierenden Bedingungen liegt keine Disulfidbrückenbindung zwischen den Homo-JRL-Monomeren vor und entsprechend könnte das JRL-Domänenprotein als Monomer oder transient Dimer ein unorganisiertes Interaktionsnetzwerk mit den Erythrozyten bilden. Hingegen unter oxidierenden Bedingungen bilden zwei JRL-Monomere eine intermolekulare Disulfidbindung an Cys161-Cys161, was zu einer erhöhten Aktivität führt. Dies ist eventuell auf die bessere Interaktion eines größeren Proteinkomplexes (Dimer statt Monomer) und vorteilhaften Abstand zwischen Lektin und Erythrozyten zurückzuführen. Laminaribiose kann die Hämagglutination der JRL-Domäne inhibieren, indem es an den Bindestellen der JRL-Domäne bindet und damit die Interaktion mit den Kohlenhydratstrukturen auf den Erythrozyten verhindert.

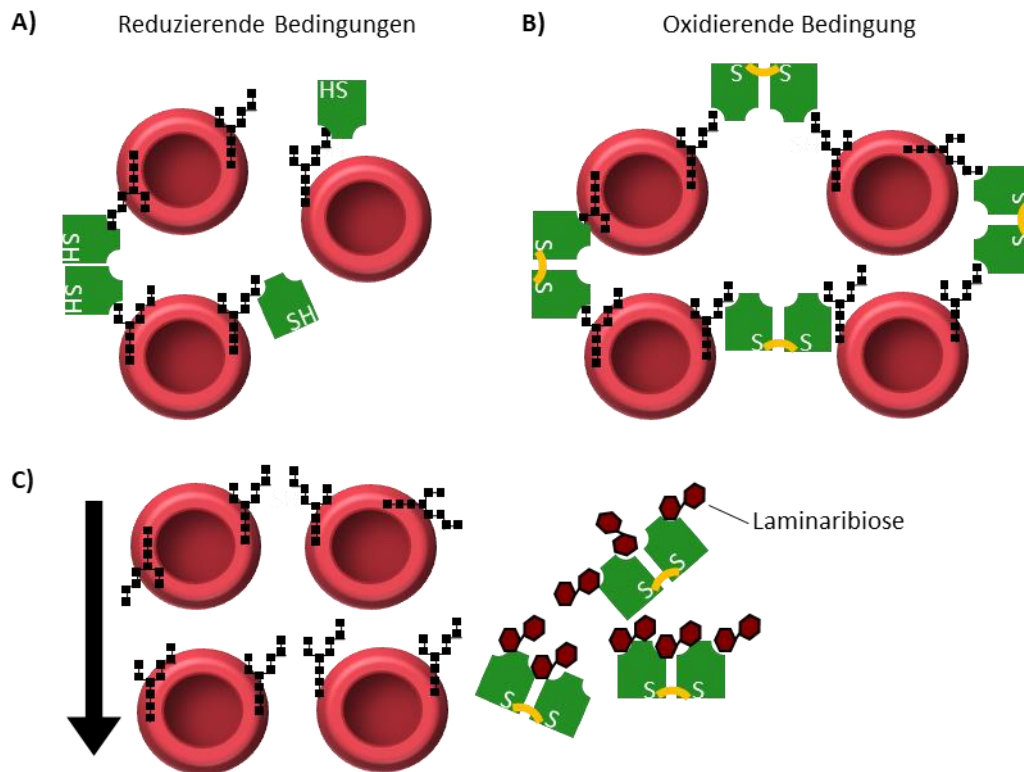


Abbildung 65: Schematische Darstellung der Hämagglutination von Erythrozyten durch die OsJAC1-JRL-Domäne [grüne Blöcke mit dem jeweiligen Cysteine-Rest (SH) und Cystin (S-S)]. JRL wechselwirkt mit Kohlenhydraten (schwarze Blöcke) auf der Oberfläche von Erythrozyten. **A)** Unter reduzierenden Bedingungen könnte die JRL-Domäne als Monomer oder transient Dimer ein unorganisiertes Interaktionsnetzwerk mit den Erythrozyten bilden. **B)** Unter oxidierenden Bedingungen bilden zwei JRL-Monomere eine intermolekulare Disulfidbindung an Cys161-Cys161, was zu einem organisierten Interaktionsnetzwerk mit erhöhter Aktivität führt. **C)** Inhibition der Hämagglutination durch Laminaribiose. Durch die Bindung von Laminaribiose an die JRL-Domäne, wird eine Interaktion des Proteins mit den Kohlenhydratstrukturen der Erythrozyten verhindert. Die Erythrozyten sedimentieren anschließend.

B.3.4.4 Docking von Laminaribiose an der OsJAC1-JRL

Klassische JRLs werden nach ihrer Bindeselektivität unterteilt. Ihre Selektivität zu Mannose (mJRL) oder Galaktose (gJRL)^[157] und deren allgemeine Bindemotive sind gut beschrieben (s. Abschnitt B.1.1.2 auf S. 55).^[143] Die JRL-Domäne von OsJAC1 ist selektiv für Mannose.^[194] Mittels DSF wurde eine höhere Schmelzpunkterhöhung gegenüber den Disacchariden Laminaribiose und 2 α -Mannobiose im Vergleich zu den entsprechenden Monosacchariden festgestellt. Um die Bindestelle der JRL-Domäne zu untersuchen, wurden Docking-Experimente mit Laminaribiose durchgeführt. Die dazugehörigen Docking-Parameter sind im experimentellen Teil beschrieben (S. 178). In Abschnitt B.3.3.4 (S. 93) wurde bereits beschrieben, dass OsJAC1-JRL eventuell zwei Bindestellen haben könnte. Dadurch wurden ebenfalls die Positionen der putativen Bindestellen näher eingegrenzt. An den identifizierten putativen Bindestellen der JRL-Domäne sind zwei kleine, voneinander getrennte Kohlenhydrat-Bindetaschen zu erkennen (s. Abb. 66 A). Solche Bindetaschen in Lektinen stellen die erste Bindeebene dar, in der Monosaccharide spezifisch interagieren können.^[166] Diese beiden Kohlenhydratbindestellen und die damit verbundenen Wechselwirkungen sind den in *Banlec* und *AcmJRL* beschriebenen Kohlenhydratbindestellen recht ähnlich.^[202, 204] Abbildung 66 zeigt ausgewählte Docking-Ergebnisse mit Laminaribiose an beiden putativen Bindestellen und die möglichen beteiligten Wechselwirkungen.

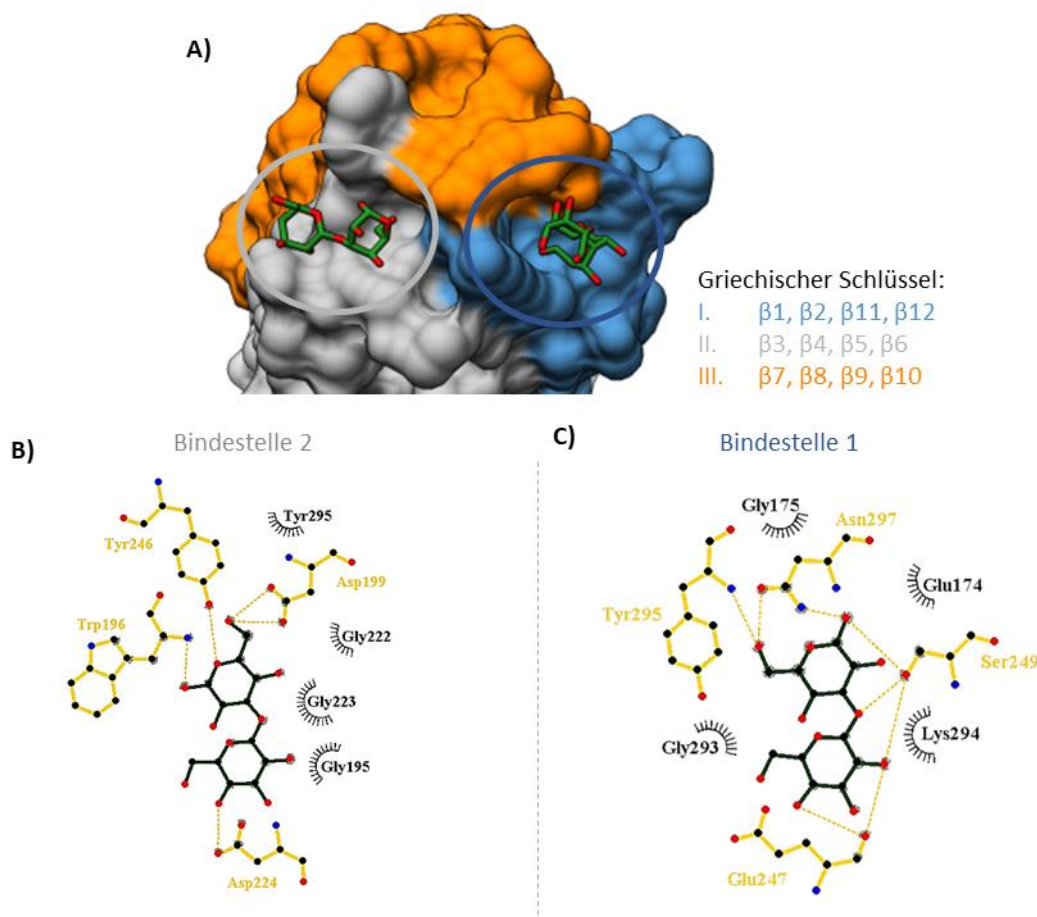


Abbildung 66: Docking von Laminaribiose (grüne Stäbchen) an die JRL-Domäne von *OsJAC1* (griechische Schlüsselmotive wurden farblich hervorgehoben). **A)** Oberflächenansicht von *OsJAC1*-JRL mit den beiden potenziellen Bindestellen 1 und 2 (blau und grau eingekreist). **B)** und **C)** Liganden-Interaktionsschema mittels LigPlotPlus^[239] der beteiligten Reste an Bindestelle 1 und 2. Elektrostatische Wechselwirkungen sind mit grünen gestrichelten Linien markiert und hydrophobe Wechselwirkungen in Halbkreisen dargestellt. Die Reste wurden entsprechend ihrer Position analog zum griechischen Schlüsselmotiv eingefärbt.

Nach *Meagher et al.* (2005) bestehen die beiden Kohlenhydratbindestellen von *Banlec* (Bindestelle 1 und 2) jeweils aus einer Gly-Gly-Schleife und einer Gly-X₃-Asp-Motivschleife.^[204] Das Docking von Laminaribiose an der Bindestelle 2 der *OsJAC1*-JRL-Domäne veranschaulicht die Interaktion mit den beiden Schleifen (Gly222-Gly223; Gly135-Asp199), zusätzlich könnten Asp224 und Tyr246 zum Liganden hin koordinieren und ihn weiter stabilisieren (s. Abb. 66 B). Dagegen weisen die beiden Schleifen an der putativen Bindestelle 1 der *OsJAC1*-JRL-Domäne einen modifizierten Aufbau auf. Anstelle eines Asparaginsäure-Rests enthält die eine Schleife an der Bindestelle 1 ein Gly-X₃-Asn-Muster (293-297). Dies ermöglicht jedoch weiterhin ein ähnliches Interaktionsmuster in dieser Schleifenregion wie in der Bindestelle 2. An der zweiten Schleife von Bindestelle 1 ist jedoch ein Glycin des Gly-Motivs durch eine Glutaminsäure (Glu174) ersetzt, wodurch das Liganden-Interaktionsmuster und die Orientierung des Liganden im Vergleich zu Position 2 verändert wird. Dadurch stellt sich die Frage, ob

die putative Bindestelle 1 der JRL-Domäne von *OsJAC1* in der Lage ist, Zucker zu binden, weswegen im nächsten Schritt ein Vergleich der Bindebereiche von unterschiedlichen JRL-Homologen erfolgt.

Vergleich der Bindemotive mit anderen JRL-Proteinen und -Domänen

Durch die Erkenntnisse aus dem Liganden-Docking ist es möglich, die Bindestellen unterschiedlicher JRL in MCJs und klassische mJRL miteinander zu vergleichen. Abbildung 67 zeigt ein entsprechendes Sequenz-Alignment der JRL-Domäne mit verschiedenen MCJ- und mJRL-Proteinen. Die Balken entsprechen den Schleifen und die Pfeile den β -Strängen ($\beta 1 - \beta 12$) der *OsJAC1*-JRL-Domäne, die jeweils farblich hervorgehoben wurden nach dem Farbmuster wie zuvor in Abbildung 50 B (S. 100). Es ist zu beachten, dass die automatische Zuordnung von $\beta 9$ in *OsJAC1*-JRL nicht vollständig ist, obwohl die Winkel ϕ und ψ im Ramachandran-Bereich der β -Stränge liegen. Die beschriebenen Reste von Bindestelle 1 und 2 für die *OsJAC1*-JRL-Domäne sind schwarz und rot umrandet (s. Abb. 67).

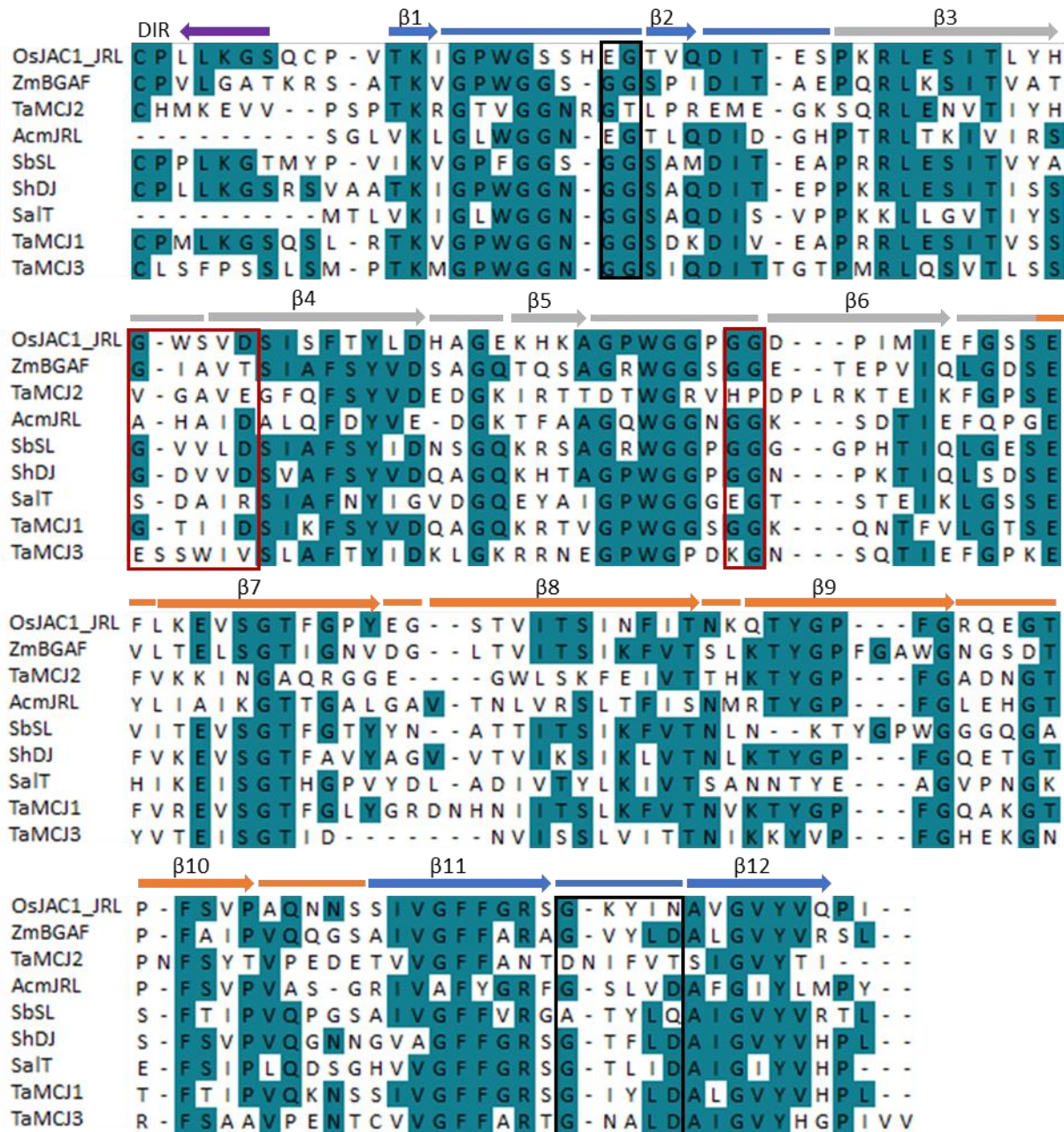


Abbildung 67: Sequenz-Alignment mittels CLUSTAL^[251] der OsJAC1-JRL-Domäne mit verschiedenen MCJ- und mJRL-Proteinsequenzen. Balken entsprechen den Schleifen und Pfeile den β-Strängen (β1 – β12) der OsJAC1-JRL-Domäne. Schwarz umrahmte Reste entsprechen der Bindestelle 1 und rot umrahmte Reste entsprechen der Bindestelle 2 der OsJAC1-JRL-Domäne. Konservierte Bereiche (>50 %) sind blau eingefärbt.

Allgemein fällt der hohe Grad an konservierten Regionen zwischen den verglichenen JRLs auf, insbesondere im griechischen Schlüsselmotiv 1 (blaue Balken und Pfeile). In dieser Region befindet sich der putative Bindebereich 1 (schwarz umrandete Sequenzen in Abb. 67), der die höchste Übereinstimmung im Bindemuster nach *Banlec* aufweist (S. 59). *AcmJRL* enthält, wie die *OsJAC1-JRL*-Domäne, an der ersten Bindestelle eine Glutaminsäure in der Gly-Gly-Schleife (schwarz umrandet in der Nähe zum β2-Stang). Da für *AcmJRL* bereits gezeigt wurde, dass es zwei Bindestellen enthält, kann aufgrund der Ähnlichkeit zu der *OsJAC1-JRL*-Domäne und

aufgrund der Docking-Ergebnisse (Abb. 66) davon ausgegangen werden, dass die *OsJAC1*-JRL-Domäne ebenfalls zwei Bindestellen besitzt.^[202] *TaMCJ1* und *ShDJ* zeigen ein vergleichbares Bindemuster und könnten dementsprechend zwei Bindestellen enthalten. *TaMCJ3* und *SalT* könnten eine Bindestelle in Position 2 haben, was für *SalT* bereits nachgewiesen wurde.^[215] Die beiden MCJ *ZmBGAF* und *SbSL* weisen jeweils ein klares Bindemuster entweder in Bindebereich 1 oder 2 auf und an den entsprechenden anderen Stellen einen modifizierten Aufbau. Dadurch kann ihre Bindestellenanzahl durch den Sequenzvergleich nicht eindeutig bestimmt werden. *TaMCJ2* weist nicht das oben beschriebene Bindemotiv von *Banlec* auf und könnte zu einer anderen Untergruppe von JRL-Proteinen gehören.

B.3.4.5 Co-Kristallisation von Galactobiose und der DIR-Domäne

Charakterisierte DIR-Proteine sind bei der Umsetzung von phenolischen Verbindungen wie Lignanen, Flavonoiden oder terpenoiden Phenolen involviert.^[15, 54, 55] Die Funktion von DIR-Domänen in MCJs ist allerdings bisher nicht bekannt. Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Interaktionsstudien, konnte eine spezifische Wechselwirkung der DIR-Domäne mit Galactobiose nachgewiesen werden. Zusätzlich ist es gelungen, Galactobiose gemeinsam mit der OsJAC1-DIR-Domäne in einem Komplex zu kristallisieren (s. Abb. 68).

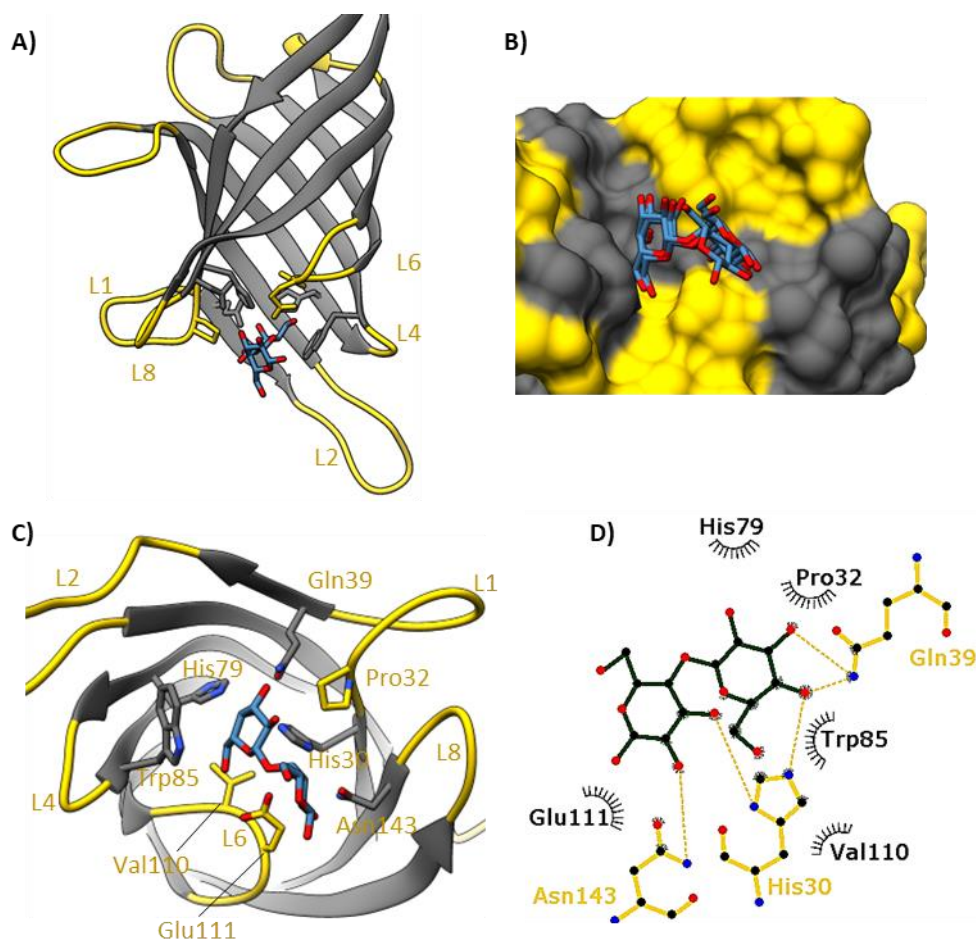


Abbildung 68: Bindestelle von Galactobiose (blaue Stäbchen) an der DIR-Domäne von OsJAC1 (grau und gelb eingefärbt). **A)** Galactobiose ist von den Schleifen L1, L2, L4, L6 und L8 (alle gelb gefärbt) umgeben. **B)** Oberflächenansicht der Bindestelle mit Blick auf die Bindetasche und Alignment der Liganden (Galactobiose) der drei DIR-Monomere. **C)** Blick auf die Bindetasche mit allen beteiligten Resten in der Interaktion mit Galactobiose hervorgehoben. **D)** Schema der Ligand-Protein-Interaktion (LigPlot⁺)^[239] der beteiligten Reste, die über elektrostatische (gelb) oder hydrophobe (schwarz) Interaktionen mit Galactobiose (grüne Stäbchen) wechselwirken.

Die DIR-Domäne von OsJAC1 bindet Galactobiose ($\beta 1 - 4$) an der gegenüberliegenden Seite ihres N- und C-Terminus, wo sie eine gut zugängliche Bindetasche mit einer Fläche von $442 \text{ \AA}^2$ bildet, die von den verschiedenen langen Schleifen L1, L2, L4, L6 und L8 flankiert werden (s. Abb. 68 A). Zwischen den antiparallelen β -Strängen $\beta 3 - 4$ und $\beta 7 - 8$ der Bindestelle wird

eine Vertiefung ausgebildet. In diese Vertiefung passt die nicht reduzierende Einheit der Galactobiose präzise hinein, was für alle drei DIR-Monomere in diesem Modell zu beobachten war. Das reduzierende Ende des Zuckers weist dahingegen eine höhere strukturelle Varianz auf (s. Abb. 68 B). Galactobiose interagiert dabei sowohl mit Resten der Schleifen als auch mit den β -Strängen (s. Abb. 68 C) durch elektrostatische (His30, Gln39 und Asn143) und hydrophobe Wechselwirkungen (Pro32, His79, Trp85, Val110 und Glu111; s. Abb. 68 C). Es wurde durch die Liganden-Bindung keine wesentliche Konformationsänderung des Proteins beobachtet. Die Konformationen der *OsJAC1*-DIR-Schleifen in der Binderegion führen somit zu einem weit geöffneten Bindebereich, während für strukturbekannte Homologe in diesem Bereich entweder zwei voneinander getrennte Hohlräume (*AtDIR6*) oder ein tiefes putatives aktives Zentrum (*PsPTS1*) gebildet wird.^[22, 41]

Kann die Zuckerbindung in weiteren DIR-Proteinen/Domänen vorhergesagt werden?

Abbildung 69 zeigt ein Sequenz-Alignment der DIR-Domäne mit verschiedenen bekannten MCJ- und DIR-Proteinen. Die gelben Balken entsprechen den Schleifen und die grauen Pfeile den β -Strängen der *OsJAC1*-DIR-Domäne.

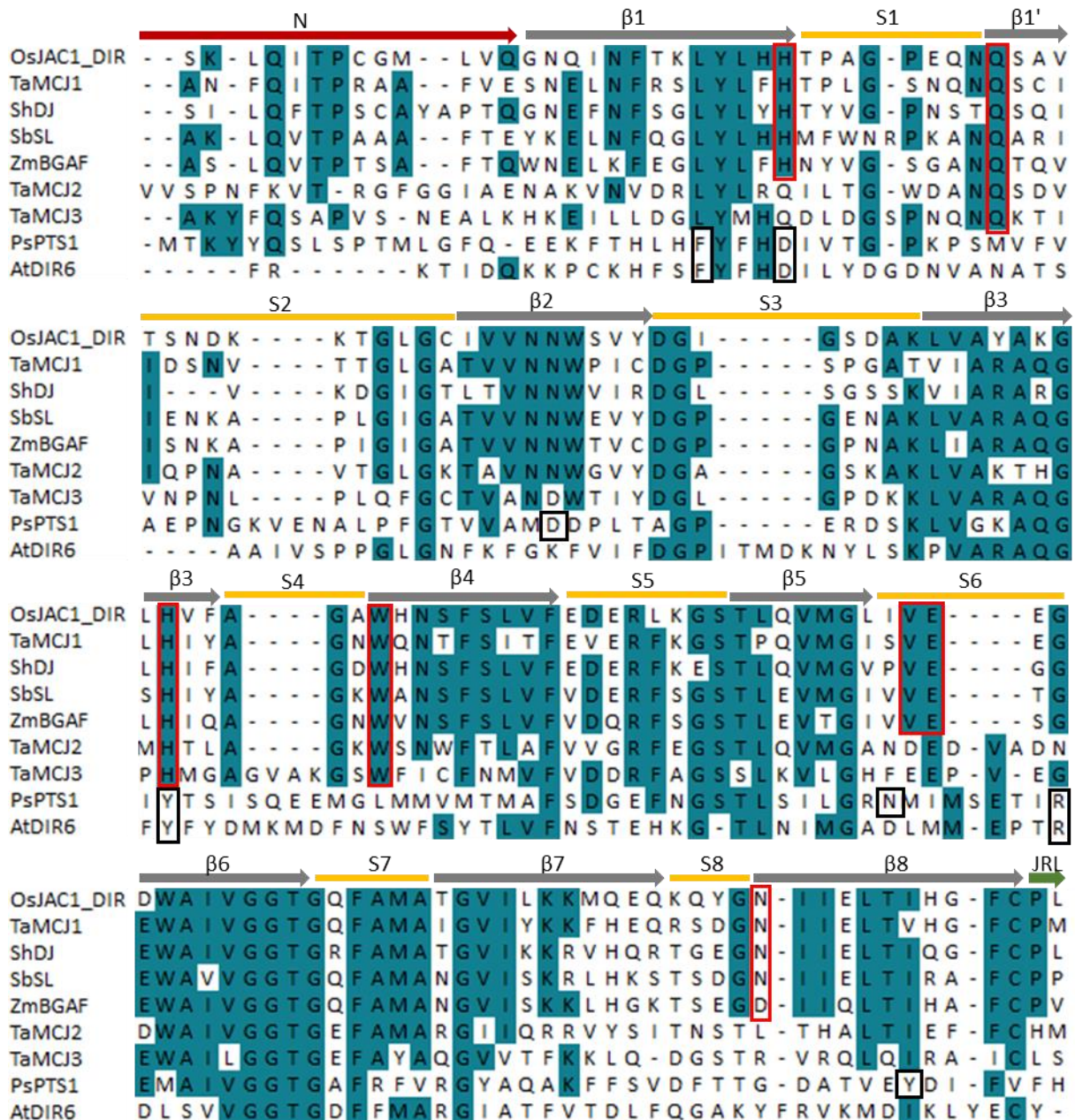


Abbildung 69: Sequenz-Alignment mittels CLUSTAL^[251] der *OsJAC1*-DIR-Domäne mit verschiedenen MCJ- und DIR-Proteinsequenzen. Gelbe Balken entsprechen den Schleifen, graue Pfeile den β -Strängen und rot eingerahmte Reste dem Kohlenhydrat-Binde-Motiv der *OsJAC1*-DIR-Domäne. Die schwarz umrahmten Reste entsprechen dem putativen aktiven Zentrum in *PsPTS1*.^[22] Konservierte Regionen (> 50%) sind blau eingefärbt. Der N-terminale Bereich (N) der *OsJAC1*-DIR-Domäne mit einem roten Pfeil markiert und der Übergang in die JRL-Domäne mit einem grünen Pfeil.

Der Vergleich der zwei Bindemotive zwischen *PsPTS1*^[22] und der DIR-Domäne von *OsJAC1* ergab zwei unterschiedliche Bindemuster (rot und schwarz eingerahmte Reste in Abb. 69). Hierbei weisen *TaMCJ1*, *ShDJ*, *SbSL* und *ZmBGAF* exakt das gleiche Bindemuster auf wie

OsJAC1-DIR bzw. lediglich eine Variation im Fall von *ZmBGAF* (siehe β 8-Strang in Abb. 69). Weitere BLAST-Suchen mit verschiedenen Algorithmen (blastp, PSI und DELTA)^[242, 252] zeigten, dass das Kohlenhydrat-Bindemotiv der DIR-Domäne hauptsächlich in MCJ vorkommt und in dieser Familie hoch konserviert ist. Die Sequenzidentität deutet darauf hin, dass die DIR-Domänen von MCJs eine acht- β -*barrel*-Architektur mit einer langen N-terminalen Sequenz aufweisen, analog zum OsJAC1-DIR-Domänen-Modell. *TaMCJ2* und *TaMCJ3* weisen ein leicht unterschiedliches Sequenzmuster im Binde-Bereich der OsJAC1-DIR-Domäne auf, was auf eine andere Funktion hindeuten könnte.

B.3.4.6 Pull-down-Assay als Nachweis für Protein-Protein-Interaktionen (PPI)

Pathogene Bakterien und Pilze produzieren Virulenzfaktoren, die dem Erreger helfen, in einer Umwelt nische zu überleben, die Kolonisierung und Invasion von Wirtsgewebe zu fördern oder das Immunsystem des Wirtsorganismus zu modulieren.^[253] Virulenzfaktoren sind Toxine oder Effektorproteine, die durch verschiedene Sekretionsmechanismen des Pathogens transportiert werden können.^[254, 255] Nach der Sekretion können diese Proteine auf der pathogenen Zelloberfläche zusammengefügt, in den extrazellulären Raum freigesetzt oder direkt in eine Wirtszelle sezerniert werden.^[254, 255] In den Wirtszellen angekommen, zielen die Effektoren häufig auf Schlüsselproteine ab, um die zelluläre Maschinerie des Wirts zu kapern und Signalkaskaden umzugestalten.^[253-255] Da OsJAC1 in der Lage ist, gezielt die Pathogenangriffsstelle an der Pflanzenzelle zu erkennen und dort zu akkumulieren,^[192] wurden Untersuchungen unternommen um mögliche Proteininteraktionspartner zu identifizieren. Die Bestimmung von Proteininteraktionspartnern ist ein wesentlicher Schritt zum Verständnis von Proteinfunktionen und zur Identifizierung relevanter biologischer Stoffwechselwege. Es gibt viele Methoden zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen (PPI). Der *Pull-down-Assay* ist eine *In-vitro*-Technik zum Nachweis physikalischer Wechselwirkungen zwischen zwei oder mehr Proteinen. Bei dieser Methode wird in der Regel eine Affinitätsisolation mit verschiedenen Wasch- und Elutionsschritten durchgeführt (s. Schema in Abb. 70).

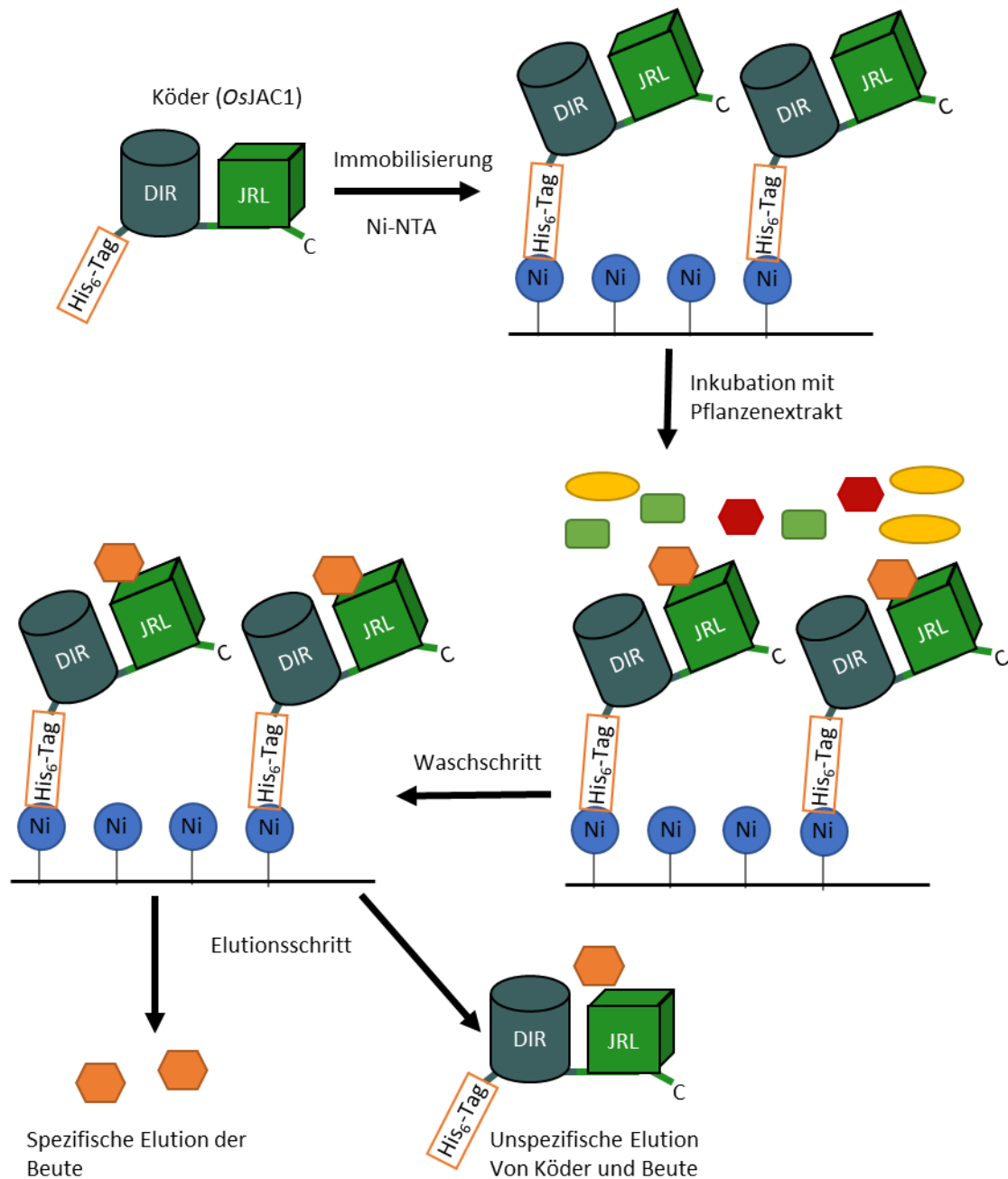


Abbildung 70: Schematische Darstellung des Pull-down-Assays mit *OsJAC1* als Köder und putative Interaktionspartner (Beuteproteine) im Pflanzenextrakt.

Beim *Pull-down*-Ansatz wurde heterolog produziertes und isoliertes *OsJAC1* als Köder verwendet, um interagierende Proteine aus Pflanzenextraktproben zu binden. Die Methode besteht darin, zunächst das Volllängenprotein *OsJAC1* (Köderprotein), welches ein His₆-Tag enthält, auf der Ni-NTA-Säule zu immobilisieren, wodurch ein Affinitätsträger entsteht, der andere Proteine (Beute) aus den untersuchten Pflanzenextrakten, die mit dem Köder wechselwirken, abfängt und bindet. Nachdem die Beuteproteine mit dem immobilisierten Köderprotein inkubiert wurden, werden die interagierenden Komplexe mit einem Elutionspuffer

eluiert (s. Abschnitt C.3.5.4, S. 173). Hierbei kann entweder eine spezifische Elution des Beuteproteins oder eine unspezifische Elution (Köder- und Beuteprotein zusammen) erfolgen. Nach dem *Pull-Down*-Experiment wurden die Proteinfractionen durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend durch Gelfärbung sichtbar gemacht (s. Abb. 71). Das verwendete Pflanzenmaterial für die *Pull-Down*-Experimente wurde von unserem Kooperationspartnern Prof. U. Schaffrath und C. Kirsch (RWTH Aachen) zur Verfügung gestellt.

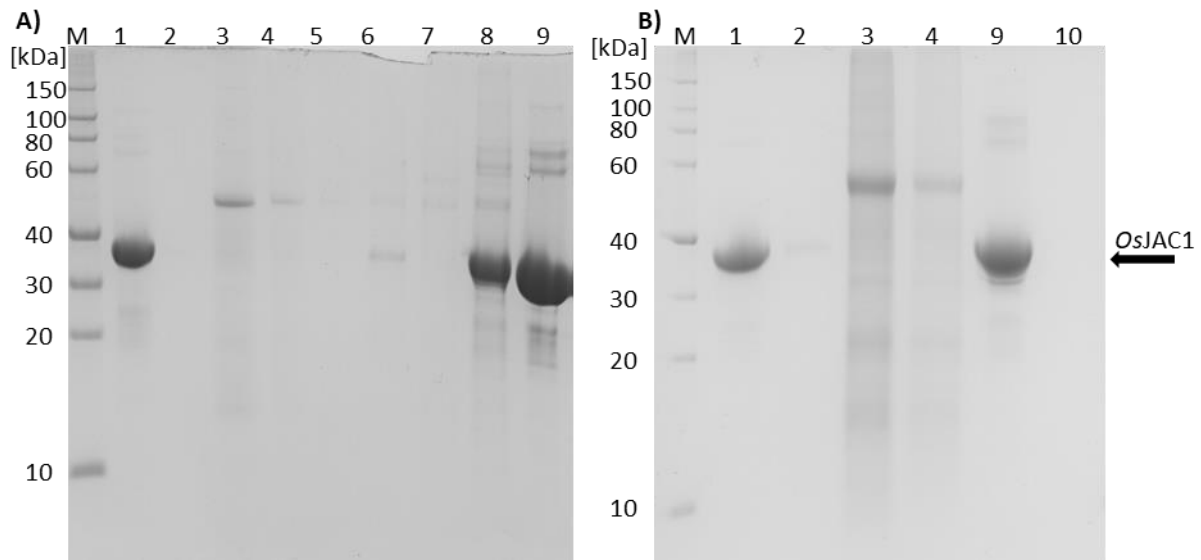


Abbildung 71: Coomassiegefärbte SDS-PAGE (12 %) von *Pull-down*-Experimenten mit **A)** Gerste (*H. vulgare*) und **B)** Gerste infiziert mit dem Mehltäupilz (*B. graminis* f. sp. *Hordei*). Die Abkürzungen in der Abbildung stehen für: M = Marker; 1 = *OsJAC1*-Proteinlösung vor der Immobilisierung; 2 = Durchfluss nach der Immobilisierung; 3 = Pflanzenextrakt; 4 und 5 = Waschfraktion mit 100 % Puffer A (20 mM Imidazol); 6 = Waschfraktion mit 100 % Puffer G (250 mM Galaktose); 7 = Waschfraktion mit 100 % Puffer A (20 mM Imidazol); 8 = Waschfraktion mit 30 % Puffer B (250 mM Imidazol); 9 = Elution mit 100 % Puffer B (250 mM Imidazol); 10 = Kontrolle nach Inkubation des Pflanzenextrakts mit unbehandelten Ni-NTA-Säule.

Es wurden *Pull-down*-Experimente durchgeführt mit Pflanzenextrakt aus Gerste (*Hordeum vulgare*), welches nicht infiziert wurde (Abb. 71 A) und Gerste, welches mit dem Mehltäupilz [*Blumeria graminis* f. sp. *Hordei* (*Bgh*)] infiziert wurde (s. Abb. 71 B). Um schwach aufgelöste Proteinbanden besser zu erkennen, wurde die aufgetragene Proteinmenge (insgesamt 29 µg statt 2,9 µg) im Vergleich zu anderen Gelen erhöht.

Die Immobilisierung des Volllängenproteins *OsJAC1* war jeweils erfolgreich, da in den Durchflussfraktionen kein bzw. kaum Protein zu sehen war (s. Spur 2 in Abb. 71 A und B). Im ersten *Pull-down*-Assay wurde die Möglichkeit untersucht, Galaktose als Eluent zu verwenden für eine spezifische Verdrängung von putativen Interaktionspartnern (s. Spur 6 in Abb. 71 A). Jedoch wurde die schwach ausgeprägte Bande auf Höhe von *OsJAC1* in Spur 6 mittels MALDI-ToF-Messungen als das Volllängenprotein *OsJAC1* identifiziert. Allgemein konnte keine spezifische Proteinbande in den Elutionsfraktionen der *Pull-down*-Experimente ermittelt

werden (s. Spur 9 in Abb. 71 A und B). Einzelne Banden waren schwach aufgelöst und eine anschließende MALDI-ToF-Messung von ausgeschnittenen Banden nicht aussagekräftig. Aus diesem Grund wurde ein neuer Messansatz für die Identifizierung von möglichen Proteininteraktionspartnern gewählt. Hierbei wurden Aliquotes aus untersuchten Fraktionen verwendet, die beinhalteten Proteine wurden verdaut und anschließend mit dem nanoLC-Triple-TOF-System analysiert. Die Tabelle 23 zeigt eine Übersicht der Proben, die mit dieser Methode gemessen wurden.

Tabelle 23: Übersicht der untersuchten Proben mittels nanoLC-Triple-TOF-Systems.

Proben-ID	Beschreibung der Fraktionen	Organismus
sID0343	Vollständige Elution mit 100 % Puffer B	<i>E. coli</i> BL21 (DE3), <i>H. vulgare</i> , <i>B. graminis</i>
sID0344	Kontrolle ohne immobilisiertes <i>OsJAC1</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3), <i>H. vulgare</i> , <i>B. graminis</i>
sID0375	<i>OsJAC1</i> vor der Immobilisierung	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)
sID0376	Vollständige Elution mit 100 % Puffer B	<i>E. coli</i> BL21 (DE3), <i>H. vulgare</i>
sID0377	Elution mit Puffer L (250 mM Laktose)	<i>E. coli</i> BL21 (DE3), <i>H. vulgare</i>
sID0378	Kontrolle ohne immobilisiertes <i>OsJAC1</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3), <i>H. vulgare</i>

Als Kontrollversuch wurde eine unbehandelte Ni-NTA-Säule (ohne *OsJAC1*) verwendet. Hierfür wurde die gleiche Inkubationszeit des Pflanzenextrakts und die gleichen Wasch- und Elutionsschritte genutzt. Damit sollten unspezifische Proteinbindungen an dem Säulenmaterial ermittelt werden und dadurch als putative Interaktionspartner von *OsJAC1* ausgeschlossen werden. Da das Volllängenprotein *OsJAC1* heterolog in *E. coli* BL21(DE3) produziert wurde, können Proteinverunreinigungen, wie bereits in Abschnitt B.3.2.1 (S. 73) erläutert wurde, ebenfalls auftreten. Für die Bewertung der Treffer wurde der durch die Auswertesoftware (*ProteinPilot*TM) erstellte Bewertungsparameter für die Proteinkonfidenz (*Unused ProtScore*) gewählt und die Treffer entsprechend geordnet. Tabelle 24 listet ausgewählte Treffer aus *E. coli* auf, die sowohl vor der Immobilisierung (sID0375) als auch nach der Elution mit *OsJAC1* (sID0343 und sID0376) identifiziert wurden.

Tabelle 24: Mögliche Proteinverunreinigungen aus *E. coli*, die sowohl vor der Immobilisierung (sID0375) und nach der Elution mit *OsJAC1* (sID0343 und sID0376) identifiziert wurden.

Protein	% Abdeckung (95)	Peptide (95 %)	MW [kDa]
DEAD-box RNA Helikase	54,7	32	70,5
UDP-L-Ara4N Formyltransferase	52,1	68	74,3
DNA Gyrase Untereinheit B	29,6	18	90,0
Blaulich-kontrollierter Regulator YcgE	32,5	18	45,3
DnaK Chaperon	41,2	17	41,0

Eine der identifizierten Proteinverunreinigungen aus *E. coli* (UDP-L-Ara4N Formyltransferase) wurde ebenfalls zuvor durch MALDI-ToF-Analysen von ausgeschnittenen SDS-PAGE Banden ermittelt (s. Tabelle 13, S. 73). Ob es sich bei den aufgelisteten Treffern um unspezifische Verunreinigungen handelte oder eventuell um mögliche Interaktionspartner von OsJAC1 mit Proteinen aus *E. coli*, müssen weitere Experimente zeigen. Im Folgenden erfolgt eine Auflistung (s. Tabelle 25 und 26) von potenziellen Interaktionspartnern aus Gerste, die in zwei *Pull-down*-Experimenten (sID0343 und sID0376) ermittelt wurden und von putativen Interaktionspartnern aus dem Mehлтаupilz (sID0343).

Tabelle 25: Putative OsJAC1-Interaktionspartner aus Gerste, die in zwei *Pull-down*-Experimenten (sID0343 und sID0376) ermittelt wurden.

Protein	% Abdeckung (95)	Peptide (95 %)	MW [kDa]
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	28,7	10	43,7
Phosphoglyceratkinase	8,1	3	40,2
Carboanhydrase-II	14	3	25,4

Tabelle 26: Putative OsJAC1-Interaktionspartner des Mehлтаupilzes (sID0343).

Protein	% Abdeckung (95)	Peptide (95 %)	MW [kDa]
Catalase / Cat1	18,4	10	79,0
3-Phytase B	15,1	6	64,5
Putative Enolase	17,4	5	47,2
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	18,1	4	36,5
Putative Ser/Thr Protein-Phosphatase	8,9	4	68,3
Putatives Effektorprotein (BLGH_03612-mRNA-1)	25,2	3	14,0

Es wurden wenige potenzielle Interaktionspartner aus Gerste identifiziert, die in beiden *Pull-down*-Experimenten vorzufinden waren (sID0343 und sID0376). Durch die Kontrollen konnten viele unspezifische Treffer aussortiert werden. Jedoch werden weitere *Pull-down*-Assays und Kontrollen benötigt, um die Ergebnisse zu reproduzieren bzw. weiter einzugrenzen. Das Gleiche gilt für die Treffer aus dem Mehлтаupilz, um die ersten gefundenen putativen Interaktionspartner zu verifizieren. So wäre beispielsweise das putative Effektorprotein (Uniprot-Accession: BLGH_03612-mRNA-1) aus Tabelle 26 ein interessanter Interaktionspartner für OsJAC1. Dieses putative Effektorprotein gehört zur Familie der Cerato-Platanin-Proteine, die als Pilztoxin die Zellnekrose auslösen.^[256] Weitere putative Interaktionskandidaten und ihre Funktionen werden im Ausblick (B.4.3, S. 143) beschrieben.

B.4 Ausblick

Das modular aufgebaute *OsJAC1* ist in der Lage, eine Breitbandresistenz gegen verschiedene bakterielle und pilzliche Pflanzenpathogene zu vermitteln.^[192] Neben weiteren Reaktionen auf biotische und abiotische Stressfaktoren (s. Abschnitt B.1.1.2, S. 52) war bisher lediglich bekannt, dass die JRL-Domäne des Volllängenproteins spezifisch Mannose bindet.^[194] Jedoch fehlte nach wie vor ein grundlegendes mechanistisches Verständnis des Volllängenproteins und die Funktionen der einzelnen Domänen. In der vorliegenden Arbeit wurde das Volllängenprotein *OsJAC1* und dessen beide Einzeldomänenproteine (DIR und JRL) systematisch hinsichtlich ihrer biochemischen und strukturellen Eigenschaften erforscht. Dies konnte erreicht werden durch die Etablierung eines robusten Arbeitsablaufs vom Gen zum Protein mit einer Kombination aus hoher Reinheit und Ausbeute (s. Tabelle 14, S. 74). Im Folgenden werden die erworbenen Erkenntnisse der beiden Domänen zusammengefasst, ihr Beitrag zum Volllängenprotein diskutiert und skizziert, welche weiteren Maßnahmen getroffen werden können.

B.4.1 Die DIR-Domäne von *OsJAC1*

Klassische DIR-Proteine sind beteiligt an der enantioselektiven Radikalreaktion in der Lignansynthese.^[70] Als Teil eines Multidomänen-Proteins können Domänen jedoch modifizierte oder neue Funktionen aufweisen.^{[257](Quellen inkl.)} So wurde z.B. berichtet, dass *TaJA1* aus Weizen nicht zu einer Erhöhung des Lignangehalts führt,^[47] was vergleichbar mit der Beobachtung in Abschnitt B.3.3.2 (S. 85) für *OsJAC1* ist. Durch die Interaktionsstudie mittels DSF (s. Abschnitt B.3.4.1, S. 113) konnte gezeigt werden, dass die DIR-Domäne von *OsJAC1* eine breite Interaktionsfähigkeit mit verschiedenen galaktosehaltigen Disacchariden aufweist. Diese Fähigkeit der DIR-Domäne von *OsJAC1*, unterschiedliche Zuckergruppen spezifisch zu binden, könnte ein Indiz sein für eine noch unbekannte physiologische Funktion in der Pflanzenzelle. Daher muss die Rolle der DIR-Domäne in MCJ möglicherweise neu überdacht werden. Durch Proteinkristallisation des *OsJAC1*-DIR-Domänenproteins in Komplex mit Galactobiose konnten die Binderegion und die beteiligten Reste in der Interaktion ermittelt werden (s. Abschnitt B.3.4.5, S. 131). Diese Erkenntnisse können nun genutzt werden, um gezielt die Reste in der Binderegion zu mutieren und dadurch die Bindefähigkeit zu galaktosehaltigen Zuckern zu unterbinden. Nachdem die fehlende Interaktion mit Galaktose mittels der etablierten DSF-Methode nachgewiesen wurde, können diese Varianten in transgenen Pflanzen getestet werden. Dadurch kann ermittelt werden, ob die Galaktose-Binderegion

einen Einfluss auf die Breitbandresistenz vermittelnde Eigenschaft von *OsJAC1* hat. Für die Erstellung der nicht bindenden Galaktose *OsJAC1*-Variante könnten zwei Mutationsstrategien in Frage kommen. Zum einem könnten die Reste, die eine polare Interaktion mit dem nicht reduzierenden Ende der Galactobiose eingehen, durch unpolare Reste ersetzt werden (His30, Gln39 und His79; orange hervorgehoben in Abb. 72). Der Tryptophan-Rest an Position 85 ist integraler Bestandteil in der unpolaren Interaktion mit dem Zucker, könnte jedoch ebenfalls wichtig für die strukturelle Integrität des Proteins sein, weswegen eine Mutation an dieser Stelle zunächst nicht zu empfehlen ist. Eine weitere Möglichkeit könnte sein, die blau hervorgehobenen Reste (s. Abb. 72) mit größeren Aminosäuren auszutauschen, um die Binderegion sterisch einzugrenzen und dadurch die Zuckerinteraktion zu unterbinden.

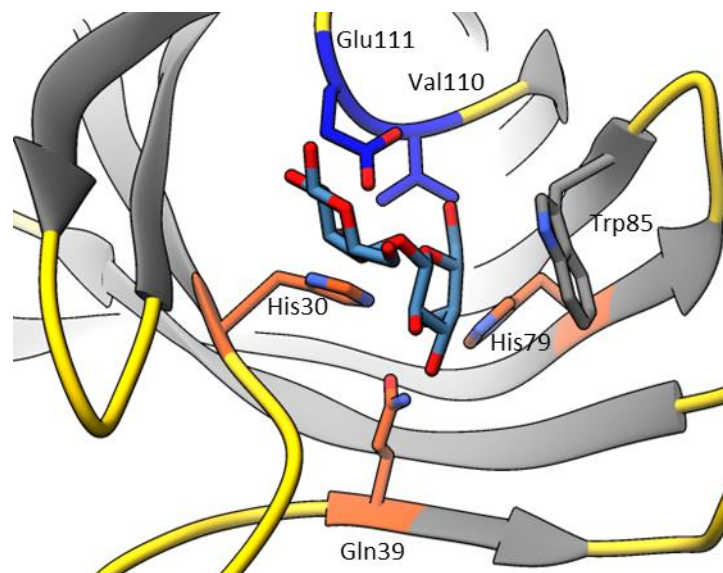


Abbildung 72: Bindestelle von Galactobiose (blaue Stäbchen) an der DIR-Domäne von *OsJAC1*. Die β -Stränge sind grau und die Schleifen gelb eingefärbt. Beteiligte Reste an der Interaktion mit Galactobiose sind hervorgehoben und die farbliche Unterscheidung repräsentiert die verschiedenen Mutationsstrategien.

Es konnte nicht vollständig ermittelt werden, ob es sich bei der Verfärbung der Proteinlösung (s. S. 70) um eine Proteinverunreinigung oder niedermolekulare Verbindungen handelte. Es wurde erste Versuche unternommen die Verfärbung mit Essigsäureethylester nach Proteindenaturierung (mittels Hitze und 1 % Trifluoressigsäure) zu extrahieren. Jedoch konnte die Verfärbung nicht im Extrakt beobachtet werden. Weitere Extraktionsexperimente mit anderen Lösungsmitteln könnten getestet und die Extrakte anschließend massenspektrometrisch untersucht werden, um mögliche niedermolekulare Verbindungen nachzuweisen.

B.4.2 Die JRL-Domäne von *OsJAC1*

Obwohl klassische JRLs in Galaktose- und Mannose-spezifisch bindende Lektine unterteilt sind,^[143, 157] wurde die Vielfalt der Bindemuster von MCJ immer auf die JRL-Domäne zurückgeführt (s. Abschnitt B.1.1.2, S. 55). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass für *OsJAC1* die DIR-Domäne für die Interaktion mit Galaktose und die JRL-Domäne für die Interaktion mit Mannose und Glucose verantwortlich ist (s. Abschnitt B.3.4.1, S. 113). Sequenzvergleiche zeigten, dass die Bindemotive der beiden Domänen ebenfalls in MCJ-Homologen vorkommen (s. Abb. 67, S. 129 und Abb. 69, S. 133). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass nur mJRL aus einkeimblättrigen Pflanzen sowohl ein als auch zwei Bindebereiche aufweisen (s. Abb. 52, S. 102 und Abb. 53, S. 104). Docking-Versuche mit Laminaribiose deuten für die JRL-Domäne von *OsJAC1* auf das Vorhandensein von zwei Binderegionen hin (s. Abschnitt B.3.4.4, S. 126). Dies muss zusätzlich durch *in vitro* Experimente nachgewiesen werden. Zum einen könnten analog zu der DIR-Domäne, Co-Kristallisationsexperimente mit einem geeigneten Liganden wie Mannose oder Laminaribiose durchgeführt werden. Hierfür wurden bereits erste Ansätze mit Laminaribiose durchgeführt, jedoch wurden bisher keine Kristalle generiert. Eine weitere Möglichkeit wäre, die Bindebereiche getrennt voneinander zu mutieren. *Weidenbach et al.* (2016) führten bereits gezielte Mutagenesen von Aminosäuren an der putativen ersten Bindeseite durch (s. Abb. 73 A, Reste lila hervorgehoben).^[192] Durch diese Mutationen konnte gezeigt werden, dass die Häufigkeit drastisch reduziert wurde, mit der das markierte Protein an der Infektionsseite des Pathogens gefunden wurde.^[192] Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass die kohlenhydratbindende Funktion des Lektins für die Lokalisierung an der Infektionsstelle wichtig ist.^[192] Der gleiche Ansatz könnte für die putative zweite Bindeseite der JRL-Domäne durchgeführt werden. Zunächst müsste sichergestellt werden, dass die Mutationen an beiden Positionen in der Lage sind, die Zuckerbindung vollständig zu unterbinden. Hierfür könnten die Glycin-Reste (175, 222, und 223) durch Alanin-Reste ersetzt werden und die beiden Reste (Asp199 und Asn297), die wichtig für die Positionierung und polaren Interaktionen mit dem Zucker sind, mit unpolaren Aminosäuren ersetzt werden (entsprechende Aminosäuren wurden farblich in Abb. 73 hervorgehoben). Nachdem eine nicht bindende JRL-Variante hergestellt wurde, können die einzelnen Binderegionen mutiert werden und folgende Fragestellungen untersucht werden: (I) Unterscheiden sich die Bindeaffinität und -spezifität der beiden Bindeseiten, (II) lässt sich ein

Einfluss auf die Hämagglutinationsaktivität beschreiben und (III) wie ist der Einfluss der putativen zweiten Bindeseite auf die Pathogenerkennung in transgenen Pflanzen?

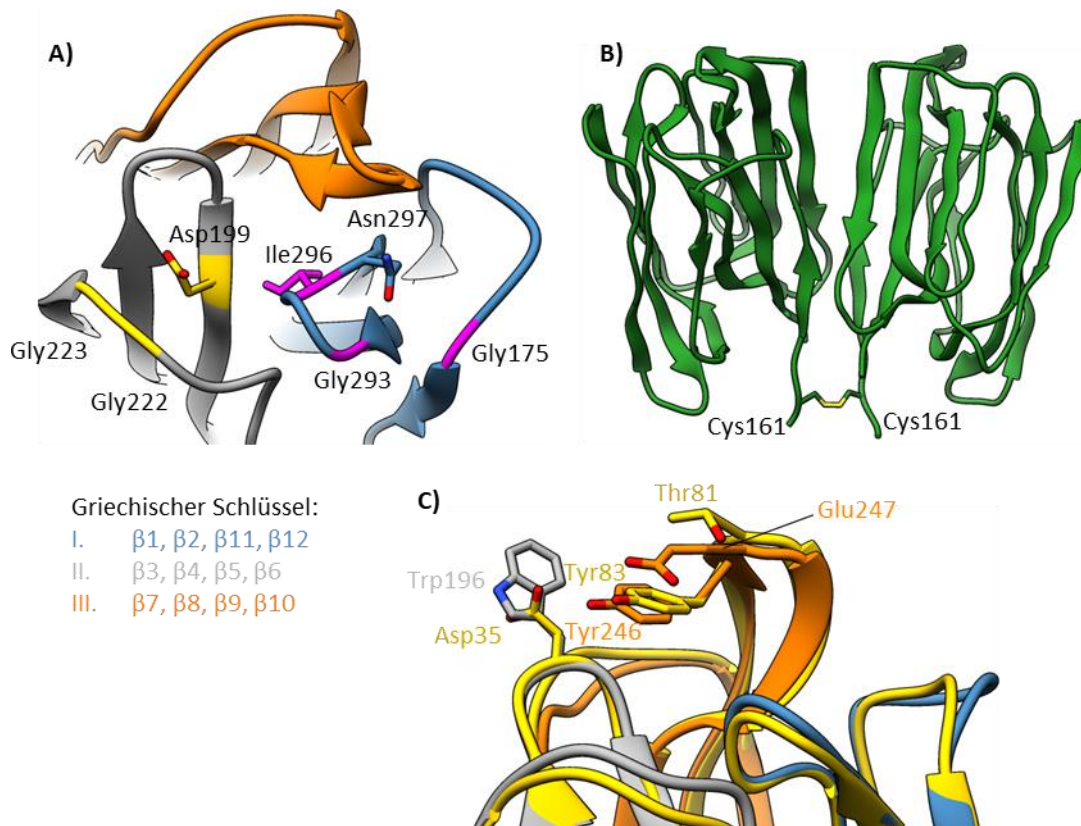


Abbildung 73: **A)** Farblich hervorgehobene und gekennzeichnete Reste für eine Mutation an den beiden putativen Bindestellen der JRL-Domäne von OsJAC1. **B)** Struktur des OsJAC1-JRL Domänenproteins als Dimer in der asymmetrischen Einheit (grün). Das Homodimer weist eine Disulfidbindung zwischen den Monomeren an Cys161 auf und könnte für eine Punktmutation genutzt werden. **C)** Struktur-Alignment der JRL-Domäne von OsJAC1 mit *Malay BanLec* Variante (PDB-Eintrag: 7KMV).

Es konnte gezeigt werden, dass die JRL-Domäne von OsJAC1 in der Lage ist, eine Disulfidbrückenbindung zwischen zwei Homo-Monomeren einzugehen (s. Abb. 73 B). Um zu ermitteln, ob die Disulfidbrückenbindung eine relevante physiologische Funktion hat, könnte eine Punktmutation in Cys161, sowohl im Volllängenprotein als auch in der Einzeldomänenprotein, eingebracht werden. Anschließend könnten die Varianten genutzt werden, um den Einfluss auf die Oligomerisierung (mittels DLS), der Hämagglutination und in der Pathogenabwehr in transgenen Pflanzen getestet werden.

Covés-Datson *et al.* zeigten, dass die mitogene und antivirale Wirkung von mJRLs (*Banlec* und einem Homolog) durch eine Punktmutation an Position 84 (His84Thr), innerhalb des dritten griechischen Schlüsselmotivs, getrennt werden können und nur die antivirale Aktivität erhalten bleibt.^[243] Ein strukturelles Alignment der OsJAC1-JRL-Domäne mit *Malay BanLec* Variante (PDB Eintrag: 7KMV) zeigt, dass die JRL-Domäne einen ähnlichen Aufbau in dieser

Region aufweist (s. Abb. 73 C). Antivirale Assays könnten durchgeführt werden, um die potenzielle antivirale Wirkung der OsJAC1-JRL-Domäne zu ermitteln. Eine weitere interessante Position, die eventuell zu dem erweiterten Bindebereich der OsJAC1-JRL-Domäne gehört, ist Trp196 (s. Abb. 73 C). Eine Punktmutation an dieser Stelle könnte eventuell einen Einfluss auf die Bindung von komplexen Zuckermotiven haben.

B.4.3 Das Volllängenprotein OsJAC1

Die lösliche Produktion des Volllängenproteins und der beiden Einzeldomänenproteine wurde hauptsächlich unter kalten Expressionsbedingungen erreicht. Während der Inkubation bei niedrigen Temperaturen wurde die Expressionsrate reduziert, was für die korrekte Faltung der Proteine von Vorteil zu sein scheint. Jedoch konnte ein reduzierendes Zellwachstum bzw. eine geringere Ausbeute der Zellmasse nach der Überexpression von OsJAC1 im Vergleich zu den Einzeldomänenproteinen festgestellt werden bei gleichen Expressionsbedingungen. Einen Einfluss auf das *E. coli* Zellwachstum durch die Überexpression von OsJAC1 wurde bereits nachgewiesen^[192] und kann zusätzlich auf die beiden Einzeldomänenproteine in systematischen Untersuchungen erweitert werden. Da es Indizien gibt, dass OsJAC1 in Pflanzen an der Genregulierung beteiligt ist,^[191, 193] könnte das Volllängenprotein eventuell in *E. coli* einen negativen Einfluss auf die Genregulierung haben und somit auf das Zellwachstum. Dadurch könnten die Ergebnisse aus den *Pull-down-Assays* (s. Tabelle 24, S. 137) neu bewertet werden. Bei den identifizierten Proteinen aus *E. coli* könnte es sich um putative Interaktionspartner handeln und nicht um Proteinverunreinigungen. Interessante Treffer wären dabei die DEAD-box RNA Helikase, welche ein wichtiger Bestandteil im RNA-Stoffwechsel ist,^[258] und die DNA Gyrase, welche in der lokalen Entwindung von DNA-Strängen beteiligt ist.^[259] Letztere ist auch ein Target für antimikrobielle Wirkstoffe.^[260]

Studien zu einem OsJAC1-Homolog aus Weizen (*TaVER2*) zeigten, dass das Protein eine Protein-Protein-Interaktion mit einem RNA-bindenden Protein im Nukleus eingeht^[190] und bekräftigt zunächst die Hypothese, dass OsJAC1 eventuell mit der DEAD-box RNA Helikase aus *E. coli* interagieren kann. Damit *TaVER2* in den Nukleus transportiert werden kann, muss es phosphoryliert werden.^[189] Als Position für die Phosphorylierung und entsprechend wichtig für die Aktivität wurde Ser33 identifiziert.^[189] Damit befindet sich die putative Phosphorylierungsseite an der DIR-Domäne und ein Sequenzvergleich mit OsJAC1 würde diese Position an der Schleife S1 in der Nähe zur Binderegion lokalisieren (s. Abb. 86, S. 194). Es ist jedoch zu erwähnen, dass OsJAC1 kein Serin in dieser Position aufweist und die Binderegionen sowohl

für die JRL- wie auch die DIR-Domäne zwischen den zwei Proteinen sich sehr unterscheiden. Jedoch werden durch das Analyseprogramm NetPhos – 3.1^[261] unterschiedliche Phosphorylierungsseiten für OsJAC1 vorhergesagt. Somit müsste noch gezeigt werden, ob OsJAC1 ähnlich zu TaVER2 durch eine Phosphorylierung in den Zellkern gelangt und dadurch seine Aktivität moduliert wird. Zunächst müsste die Zellkernlokalisierung in Abhängigkeit zu bestimmten Stressfaktoren für OsJAC1 nachgewiesen werden. Hierfür könnte die Vorgehensweise von Weidenbach *et al.* (2016) angewendet werden, wonach ein Fusionsprotein von OsJAC1 mit einem YFP (engl. *yellow fluorescent protein*) für die Lokalisierung nach einem Pathogenangriff genutzt wurde.^[192] Anschließend könnten abiotische Stressreaktionen getestet werden wie die Gammabestrahlung nach Jung *et al.* (2019)^[193] oder weitere abiotische Stressreaktion wie Bodentrockenheit oder Salzstress. Nachdem OsJAC1 im Zellkern nachgewiesen wurde, müsste im nächsten Schritt eine mögliche Phosphorylierung des Proteins geprüft werden. Für die spezifische Isolation von OsJAC1 aus Pflanzenextrakten kann auf die bereits etablierte Methode von unseren Kooperationspartnern aus der RWTH Aachen (*Prof. U. Schaffrath*) zurückgegriffen werden. Hierbei werden magnetische *beads* verwendet, die mit einem Antikörper beschichtet sind, welcher spezifisch für ein Protein-Tag (bspw. YFP) ist. Nach der Isolation können die Fraktionen analog zu den *Pull-down-Assays* analysiert werden.

Ein weiterer interessanter putativer Interaktionspartner aus *E. coli* könnte die UDP-L-Ara4N Formyltransferase sein, die sowohl durch Analysen aus einer Gel-Bande (s. Abschnitt B.3.2.1 S. 73) als auch über die Analysen der *Pull-down-Assays* (s. Tabelle 24, S. 137) identifiziert wurde. In *E. coli* ist das Enzym zuständig für die Synthese eines Glycolipids, dass in der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien zu finden ist.^[262] In Pflanzen sind solche Glykosyltransferasen beteiligt in der Glykosylierung von Flavonoiden und Galaktose ist eines der Zucker, die dadurch verbunden werden können.^[263] Interessanterweise interagiert TaVer2 mit Glykosyltransferasen *in planta* und bildet dabei ein Multiproteinkomplex.^[264] Dies verdeutlicht die Vielfältigkeit von MCJ in ihrer Protein-Protein-Interaktivität. Weitere Proteomanalysen und *Pull-down-Assays* sind notwendig, um die Treffer zu bestätigen und eine spezifische Interaktion mit OsJAC1 nachzuweisen.

Hinsichtlich der putativen Interaktionspartner aus *E. coli* könnten Fraktionen nach der Proteinisolation der Einzeldomänenproteine sowie geeignete Kontrollen auf ihr Verunreinigungsprofil analysiert werden. Dadurch könnte eventuell bestimmt werden, ob eine

bestimmte Domäne für die Proteininteraktion in *E. coli* zuständig ist. Als Kontrolle könnte das Verunreinigungsprofil von anderen isolierten Proteinen analysiert werden und mit dem von *OsJAC1* verglichen werden. Da *OsJAC1* nach der Isolation bereits unterschiedliche Proteinverunreinigungen aus *E. coli* aufweist, wird ein zusätzlicher Waschschriff oder eine anschließende Isolation mit der SEC benötigt, um den Einfluss dieser Verunreinigungen auf das *Pull-down-Assay* mit Pflanzenextrakten zu minimieren. Als Waschschriff könnte das Protokoll von *Belval et al.* (2015) genutzt werden, wonach durch die Verwendung von Harnstoff in einer subdenaturierenden Konzentration die Verunreinigungen von Chaperonen entfernt werden konnten.^[103]

Bisherige *Pull-down-Assays* wurden ausschließlich mit dem Volllängenprotein durchgeführt und neben der Wiederholung dieser Experimente, werden weitere mit den Einzel-domänenproteinen benötigt. Folgende Maßnahmen könnten zusätzlich getroffen werden, um die *Pull-down-Assays* zu optimieren:

1. Vermeidung von falsch-positiv Ergebnissen durch die Interaktion mit Nucleinsäure (bspw. Zelluläre RNA), könnte durch die Zugabe von Nuclease erreicht werden.^[265]
2. Verwendung von Lactose und/oder Mannose im Eluentenpuffer für die spezifische Elution. Da nach einer unspezifischen Elution mit Imidazol sowohl das immobilisierte Protein (Köder) als auch die Beuteproteine eluiert werden, müssen aufgrund der hohen Konzentration des Köderproteins die Fraktionen stark verdünnt werden. Durch eine spezifische Elution des Beuteproteins könnte gleichzeitig die Nachweisbarkeit der putativen Interaktionspartner erhöht werden.
3. Bei der Beurteilung von putativen Interaktionspartnern aus Gerste wurden in Tabelle 25 (S. 138) Treffer aufgelistet, die sowohl aus Gerste und infizierter Gerste mit dem Mehltäupilz vorkamen. Jedoch könnte eine Proteininteraktion erst durch den Pathogenangriff induziert werden, was in der Beurteilung von möglichen Interaktionspartnern aus der Gerste berücksichtigt werden muss.

Bestätigte Treffer müssen anschließend durch weitere unabhängige Versuche reproduziert werden. Die Treffer aus *E. coli* könnten überexprimiert, isoliert und anschließend mittels SEC, DSL oder einem *Gel-shift-Assay* (analog zu BGAF)^[195] getrennt und zusammen mit *OsJAC1* analysiert werden. Im Fall der SEC-Analyse müsste eine andere Säule verwendet werden, da die JRL-Domäne von *OsJAC1* mit der Säulenmatrix interagiert und dadurch die Ergebnisse

negativ beeinflussen könnte. Durch DSL-Messungen könnten unterschiedliche Pufferbedingungen, niedermolekulare Inhibitoren und Proteinkonzentrationen getestet werden, um die Protein-Protein-Wechselwirkung zu charakterisieren.^[266] Grundsätzlich könnten diese Methoden ebenfalls für die Treffer aus der Gerste und dem Mehltaupilz angewendet werden. Jedoch müsste zunächst eine heterologe Expression in *E. coli* jeweils etabliert werden. Dies ist zeitintensiv und im Fall, dass die Proteine posttranslational modifiziert werden, kann dies durch die heterologe Expression in *E. coli* nicht erfolgen. Alternativ könnten Interaktionsanalysen in den Zellen und somit in der natürlichen Umgebung der Proteine durchgeführt werden. Hierfür gibt es unterschiedliche Ansätze, die nach dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers (FRET),^[267] des Biolumineszenz-Resonanzenergietransfers (BRET),^[268] oder nach dem Protein-Fragment-Komplementierungs-Assays (engl. *Protein-fragment complementation assay*; PCA) beruhen. In PCAs wird ein Reportergen in zwei komplementäre Fragmente gespaltet und die beiden Fragmente mit den zwei putativen Interaktionspartnern fusioniert.^[269] Wenn die beiden Proteine interagieren, werden die komplementären Fragmente zusammengebracht und bilden das Reporterprotein, das anschließend mit einem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden kann.^[270] Als komplementäre Fragmente können fluoreszierenden Proteine (engl. *Bimolecular fluorescence complementation*; BiFC) oder Enzyme wie die Luciferase verwendet werden.^[271, 272] Durch die Verwendung von unterschiedlichen fluoreszierenden Proteinen als Reporter in BiFC-Assays können mehrere Proteininteraktionen in derselben Zelle gleichzeitig visualisiert werden.^[273] Da OsJAC1 potentiell in der Lage ist mit unterschiedlichen Proteinen zu interagieren, wäre dies ein vielversprechender Ansatz.

Die DIR-Domäne von OsJAC1 konnte ausschließlich unter reduzierenden Bedingungen kristallisiert werden. Die Domäne enthält drei Cystein-Reste (Cys12, Cys53 und Cys153). Dabei befindet sich Cys12 im dynamischen N-terminalen Bereich und konnte lediglich in Kette B der beiden Strukturmodelle (DIR46 und DIR48) beobachtet werden. Aufgrund der intrinsischen Flexibilität in diesem Bereich, könnte eventuell eine Disulfidbrücke zwischen zwei Monomeren gebildet werden, die einer geordneten Kristallisation entgegenwirkt. Durch das Entfernen des N-terminalen Bereichs (einschließlich Gln17) könnte eine verbesserte Interaktion zwischen den DIR-Ketten während der Kristallisation erzeugt werden und die beobachtete Fehlordnung in diesem Bereich vermieden werden (s. Abb. 45 D, S. 94). Ebenfalls könnte diese Strategie (das Entfernen des N-terminalen Bereichs) für das Volllängenprotein angewendet werden (s.

Abb. 74). Durch zusätzliche Schmelzpunktbestimmung der beiden Varianten könnte ermittelt werden, ob der N-terminale Bereich einen stabilisierenden Einfluss hat und somit eine strukturelle Funktion im Volllängenprotein erfüllt.

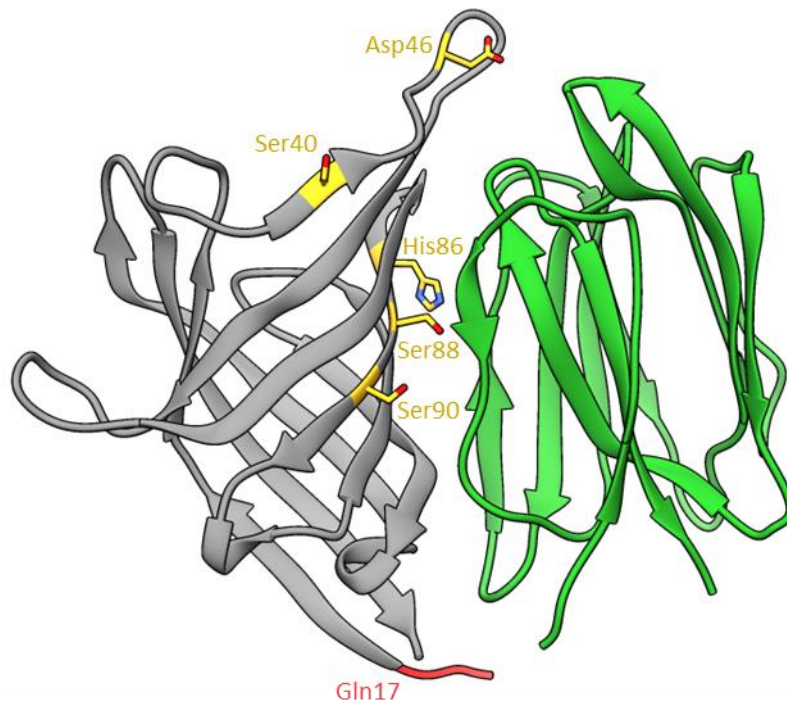


Abbildung 74: Docking-Modell des Volllängenproteins (DIR- in grau und JRL- Domäne in grün). Die Region des N-Terminus wurde rot hervorgehoben. Gelb hervorgehobene Reste könnten genutzt werden für gezielte Mutagenese, um die Interaktion zwischen den beiden Domänen zu untersuchen.

Es wurde versucht, potenzielle Interaktionspositionen zwischen den zwei Domänen mittels Wasserstoff-Deuterium-Austausch Experimenten (HDX-MS) zu untersuchen. Die Domänen und das Volllängenprotein OsJAC1 konnten jedoch nicht durch Pepsin verdaut werden und waren daher für diesen Ansatz nicht geeignet. Alternativ könnte die Interaktion im Volllängenprotein zwischen den beiden Domänen durch gezielte Mutagenese von Aminosäuren an der putativen Interaktionsseite durchgeführt werden. In Abbildung 74 sind mögliche Positionen hervorgehoben (gelbe Reste), die für die polare Wechselwirkung im Homo-Trimer des DIR-Domänenproteins verantwortlich waren und eventuell mit der JRL-Domäne im Volllängenprotein interagieren oder in der Oligomerisierung beteiligt sind. Die erzeugten Varianten können anschließend charakterisiert werden durch Schmelzpunktbestimmungen und DSL-Messungen (Bestimmung der apparenten Molekularmasse). In dieser Arbeit konnte durch DSL-Messungen gezeigt werden, dass Mannose den größten Einfluss auf den Oligomerzustand des Volllängenproteins hatte (s. Tabelle 21, S. 106). Eine Möglichkeit ist, dass die Zuckerbindung an der JRL-Domäne zu einer Konformationsänderung führt und dadurch der Oligomerzustand beeinflusst wird. Das *in silico* Modell für OsJAC1 (s. Abb. 54,

S. 108) positioniert die Bindeseiten der JRL-Domäne in der Nähe der S2-Schleife der DIR-Domäne. Eventuell wird eine Konformationsänderung an der langen S2-Schleife durch die Zuckerbindung an der JRL-Domäne hervorgerufen. Um dies nachzuweisen, müssen weitere DSL-Messungen durchgeführt werden. Hierfür müssten systematische Untersuchungen mit den Einzeldomänenproteinen, den Bindestellenvarianten [Einzeldomänenproteine (s. Abb. 72 und 73) und das Volllängenprotein] mit zusätzlichen Kontrollen (nicht interagierende Zucker) getestet werden.

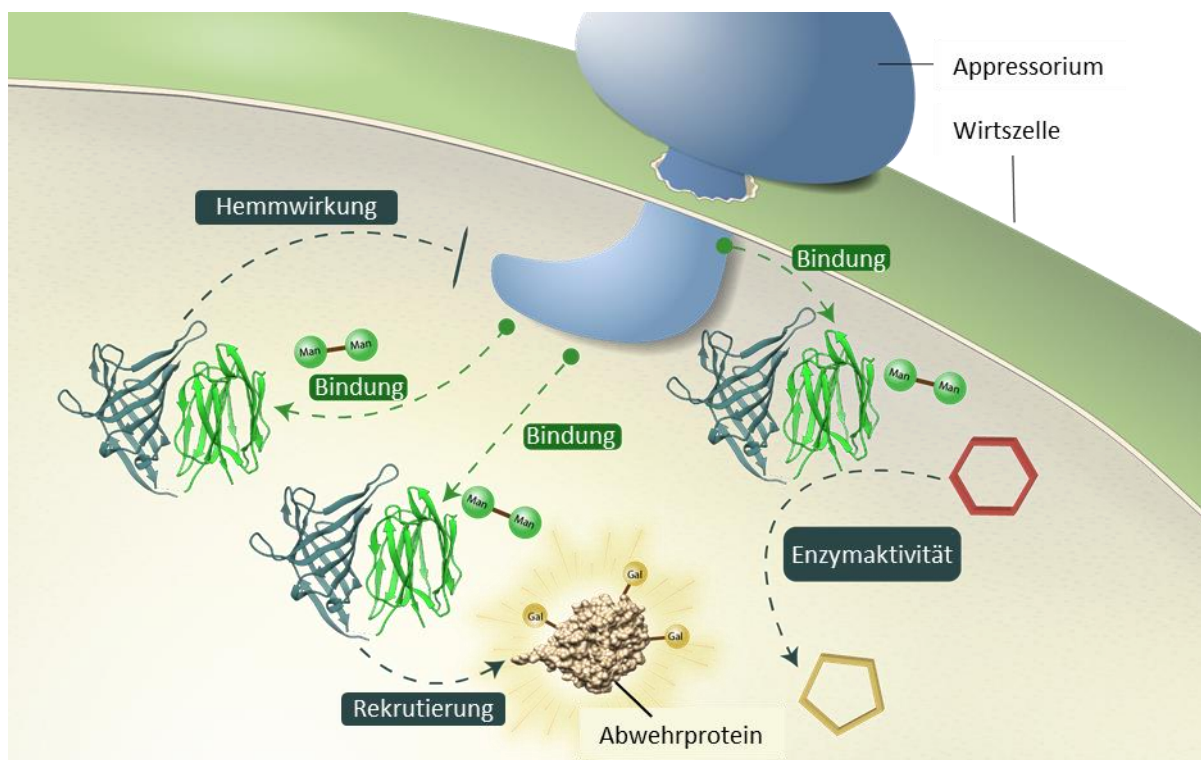


Abbildung 75: Mögliche Beiträge der OsJAC1-DIR-Domäne zur Pathogenabwehr am Ort der Pilzinfektion. Die OsJAC1-JRL-Domäne (grün hervorgehoben) erkennt Mannose-Glykokonjugate, die mit der Membran oder Proteinen von Pflanzen oder Pilzen verbunden sind. Zu den möglichen Pathogenabwehrmechanismen der OsJAC1-DIR-Domäne (grau hervorgehoben) gehören eine hemmende Wirkung, die Rekrutierung anderer abwehrbezogener Proteine und die Aktivität als Hilfsenzym. Die Abbildung wurde von Dr. Irene Küberl erstellt.

Zusammenfassend sind folgende Beiträge der OsJAC1-DIR-Domäne zur Pathogenabwehr am Ort der Pilzinfektion denkbar (s. Abb. 75): Die DIR-Domäne könnte gemeinsam mit der JRL-Domäne eine hemmende Wirkung haben, in dem das Volllängenprotein an bestimmte Strukturen des Pathogens bindet und ihre Aktivität unterbindet. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die DIR-Domäne in der Rekrutierung von Abwehrproteinen beteiligt ist. Jedoch kann es nicht ausgeschlossen werden, dass Galaktose ein Surrogat für eine andere physiologische Verbindung ist und die DIR-Domäne eine Aktivität als Hilfsenzym aufweist. Die Erkenntnisse aus dieser Arbeit dienen als Grundlage für weiterführenden Studien zur Aufklärung der relevanten Funktion der Pathogenresistenz von OsJAC1 und anderen Vertretern seiner Familie.

C. Experimentalteil

Im folgenden Abschnitt werden die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente ausführlich erläutert. Hierfür werden zunächst allgemein verwendete Gebrauchsmittel aufgelistet und anschließend die Durchführung der Experimente dargestellt.

C.1 Allgemeines

C.1.1 Geräte

Tabelle 27: Übersicht der verwendeten Geräte.

Gerät	Beschreibung	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese	300 V Netzgerät	VWR International GmbH, Darmstadt
	Agarose Gelkammern	peqLab Biotechnology, Erlangen
Autoklave	Laboklav ECO	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloß
Fotoapparat	Canon EOS 1000D, SLR-Digitalkamera mit EF-S 60 mm f/2.8 USM Makro Objektiv	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
Geldokumentationssystem	INTAS Gel iX Imager	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Magnetrührer mit Heizplatte	Heidolph MR 3001 K	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Milli-Q[®] millipore und millipak Express 40 0,22 µm Filter	Milli-Q [®] -Wasser	Merck KGaA, Darmstadt
PCR-Thermocycler	VWR Doppio	VWR International GmbH, Darmstadt
Peristaltische Pumpe	Peristaltische Pumpe, P-1	Pharmacia Fine Chemicals (ehemals), Pharmacia & Upjohn, Uppsala, Schweden
pH-Elektrode	pH Elektrode IJ44C	NORDANTEC GmbH, Bremerhaven
pH-Meter	Mikroprozessor-pH-Meter 764	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin
Photometer	NanoDrop 2000c	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Ma, USA
Pipetten	Eppendorf Research [®] (0,1–2,5 µL / 1–10 µL / 10–100 µL / 100–1000 µL)	Eppendorf AG, Hamburg
	Gilson Pipetman, 0,5-5 mL	Gilson, Middleton, WI, USA

Gerät	Beschreibung	Hersteller
Protein-Chromatographiesystem	ÄKTA™ Purifer Äktaprime plus	GE Healthcare, München Cytiva, Marlborough, MA, USA
Reagenzglasschüttler	<i>Reax top</i>	<i>Heidolph Instruments</i> GmbH & Co. KG, Schwabach
Schüttler und Inkubator	<i>BioCote Stuart rotator</i> <i>SB2</i>	<i>BioCote Ltd</i> , Wolverhampton, UK
	<i>Eppendorf Thermomixer</i> <i>compact</i> <i>New Brunswick™</i> <i>Innova® 42</i>	<i>Eppendorf AG</i> , Hamburg
SDS-PAGE	<i>Mini-Protean® Tetra</i> <i>System</i> <i>XCell SureLock™ Mini-</i> <i>Cell Electrophoresis</i> <i>System</i>	<i>Bio-Rad Laboratories</i> GmbH, München <i>Invitrogen GmbH</i> , Darmstadt
Vakuum Drehschiebepumpe	<i>Vacuubrand RZ 6</i>	<i>Vacuubrand GmbH & Co.</i> KG, Wertheim
Waagen	<i>Sartorius (MC1,</i> <i>LA1200S und 2004MP)</i>	<i>Sartorius AG</i> , Göttingen
Zellaufschluss	<i>Sonoplus HD2070</i> , verschiedene Horngößen (1,5-50 mL)	<i>Bandelin electronic GmbH</i> & Co. KG, Berlin
Zentrifugen	<i>Eppendorf Centrifuge</i> <i>5424R</i> mit Festwinkelrotor (Reaktionsgefäße 1,5 und 2 mL) <i>Eppendorf Centrifuge</i> <i>5810R</i> mit Festwinkelrotor (Reaktionsgefäße 15 und 50 mL) <i>Eppendorf Concentrator</i> <i>5301</i> <i>Sorvall RC6+</i> mit Festwinkelrotor (<i>Sorvall</i> <i>F10S-4x1000</i> und <i>Sorvall</i> <i>F9S</i>)	<i>Eppendorf AG</i> , Hamburg <i>Thermo Fischer Scientific</i> , Waltham, Ma, USA

Für das Arbeiten unter sterilen Bedingungen wurden Verbrauchsmaterialien aus Plastik autoklaviert (20 min bei 121 °C) und Glasgeräte (Kolben etc.) wurden im Heißluftschrank bei 200 °C über Nacht sterilisiert. Bis zu ihrer Verwendung wurden sie verschlossen aufbewahrt.

C.1.2 Software

Tabelle 28: Übersicht der verwendeten Software.

Software	Beschreibung	Hersteller
ChemBioDraw Ultra 16.0	Zeichnung von Strukturformeln	<i>PerkinElmer Informatics</i>
Clone Manager 9.4 Professional	Planung von Klonierungsstrategien und Bewertung von Sequenzierungen	<i>Scientific & Educational Software</i>
Discovery Studio 2021 Client	Darstellung von Sequenz-Alignment und Proteinstrukturen	<i>Dassault Systèmes</i>
Microsoft Office 365 (Word, Excel, PowerPoint)	Erstellung von Textdokumenten, Präsentationen und Abbildungen.	<i>Microsoft Corp.</i>
OriginPro 9.0G	Auswertung von Datensätze.	<i>OriginLab Corp.</i>
<i>SnapGene Viewer</i> (free version)	Statistische Auswertung	<i>UCSF Resource for Biocomputing, Visualization and Informatics</i>
UCSF Chimera 1.14	Darstellung der Vektorkarten	
	Darstellung von Proteinstrukturen	

C.2 Materialien

C.2.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 29: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterialien	Beschreibung	Hersteller
96-Well Assay-Mikrotiterplatten	Greiner Bio One®, Polystyrol/Polypropylen mit V-förmigen Boden	<i>Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen</i>
Petrischalen	92 x 16 mm	<i>neoLab Migge GmbH, Heidelberg</i>
Pipettenspitzen	Luftpolsterpipetten (0,1-1000 µL)	<i>neoLab Migge GmbH, Heidelberg</i>
Reaktionsgefäße	1,5 mL, 2 mL, 15 mL und 50 mL	<i>neoLab Migge GmbH, Heidelberg</i>
Semi-Mikro-Küvetten	Polystyrol	<i>neoLab Migge GmbH, Heidelberg</i>
Sterile Einwegspritzen	<i>Injekt®</i> Serie (Polypropylen/Polyethylen)	<i>B. Braun Melsungen AG, Melsungen</i>
Sterile Flaschenaufsatzfilter	Polyethersulfon (0,2 µm)	<i>SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht</i>
Sterile Spritzenfilter	Celluloseacetatmembran (0,2 µm), Regenerierter Cellulose (<i>Sartorius Minisart RC4</i> , 0,45 µm)	<i>VWR International GmbH, Darmstadt</i>
Zentrifugalkonzentratoren	<i>Vivaspin® 20</i> (MWCO 10 kDa)	<i>Sartorius AG, Göttingen</i>

C.2.2 Nährmedien und Puffer

Pufferlösungen wurden vorbereitet oder verdünnt mit Milli-Q® Reinstwasser, sofern nicht anders angegeben und steril filtriert vor der Verwendung. Die Nährmedien wurden mit destilliertem Wasser (dH_2O) angesetzt und anschließend autoklaviert.

Tabelle 30: Übersicht der verwendeten Nährmedien- und Pufferzusammensetzung.

Medium / Puffer	Zusammensetzung
<u>Nährmedien</u>	
LB-Agar	15 g Agar / 1L LB-Medium, pH = 7,0
LB-Medium	5 g·L ⁻¹ NaCl, 10 g·L ⁻¹ Trypton, 5 g·L ⁻¹ Hefeextrakt
TB-Medium	Vorgemischtes Medium 50 g·L ⁻¹ (<i>Carl Roth</i>), Glycerin (> 99,5 %) 4 mL·L ⁻¹
<u>Assay-Puffer</u>	
KPi-Puffer	50 mM KPi, pH 7,4
Pinoresinol Assay	50 mM KPi, pH 5,0
<u>Protein-Chromatographie</u>	
Puffer A	50 mM TRIS-HCl (pH 7,4), 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol
Puffer A2	50 mM TRIS-HCl (pH 7,4), 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 2 M Harnstoff
Puffer B	50 mM TRIS-HCl (pH 7,4), 500 mM NaCl, 250 mM Imidazol
Puffer E	100 mM TRIS-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2,5 mM Desthiobiotin
Puffer R	100 mM TRIS-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM HABA
Puffer W	100 mM TRIS-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA
SEC-Puffer	50 mM KPi (pH 7,4), 300 mM NaCl
<u>Proteinextraktion aus inclusion-bodies</u>	
Puffer W2	100 mM TRIS-HCl (pH 7,0), 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 2 M Harnstoff, 2 % (w/v) Triton X-100
Puffer W3	100 mM TRIS-HCl (pH 7,0), 5 mM EDTA, 5 mM DTT
Puffer E2	50 mM TRIS-HCl (pH 8,0), 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 1 M L-Arginin
<u>Agarose-Gelelektrophorese</u>	
50x TEA	2 M TRIS, 50 mM EDTA (Stammlösung: 0,5 M, pH 8,0), 0,9 M Essigsäure
Agarose-Gel- Lösung	1x TEA, 0,8 % (w/v) Agarose, 0.1 % Gel Red™ (<i>Bioticum Inc.</i> , Hayward, CA, USA)
5x DNA- Ladepuffer	100 mM EDTA, 43 % (v/v) Glycerol, 0,05 % (w/v) Bromphenol Blau

Die oben aufgelisteten Komponenten wurden von *Carl Roth GmbH & Co. KG* (Karlsruhe), *IBA Lifesciences* (Göttingen), *Sigma-Aldrich/Merck KGaA* (Darmstadt), *Alfa Aesar/Thermo Fisher Scientific* (Kandel) und *VWR International GmbH* (Darmstadt) erworben und den Herstellerangaben entsprechend gelagert.

C.2.3 Stammlösungen und Standards.

Tabelle 31: Übersicht aller verwendeten Stammlösungen und Standards. Antibiotika und IPTG wurden vor Gebrauch sterilfiltriert.

Substanz	Stammlösung	Finale Konzentration	Hersteller
<u>Antibiotika</u>	mg·mL ⁻¹	µg·mL ⁻¹	
Ampicillin	100	100	Carl Roth GmbH & Co. KG
Gentamicin	20	20	
Chloramphenicol	20	20	
IPTG	0,1 M	0,1 mM	
<u>Standard</u>			
Roti®Mark 10-150	-	-	Carl Roth GmbH & Co. KG
Gel Filtration Markers Kit for Protein Molecular Weights 12-200 kDa	10	-	Sigma-Aldrich/Merck KGaA
Fermentas GeneRuler DNA Ladder Mix	-	-	Thermo Fisher Scientific

C.2.4 Zuckerverbindungen

Tabelle 32: Übersicht aller verwendeten Zuckerverbindungen und sonstigen benötigte Reagenzien für Assays.

Reagenzien	Hersteller
1,4-β-D-Galactobiose, Galactan, Laminaribiose	Megazyme, Bray, Irland
2α-Mannobiose	Dextra Laboratories Ltd, Reading, UK
D(+)-Galactose	AppliChem GmbH, Darmstadt
D-(+)-Maltose Monohydrat	TCI Deutschland GmbH, Eschborn
D-(+)-Mannose	Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, Ma, USA
D-Sorbit, D-(+)-Xylose, L-Rhamnose Monohydrat, N-Acetyl-D-Galactosamine	Merck KGaA, Darmstadt
L-(+)-Arabinose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
N,N'-Diacetylchitobiose	Carbosynth Limited, Berkshire, UK
N-Acetyl-β-D-Glucosamin	GLYCON Biochemicals GmbH, Luckenwalde
Saccharose, Dithiothreitol (DTT)	Fisher Chemical, Schwerte
α-D(+)-Glucose, D(+)-Melibiose-Monohydrat, N-Acetylneuraminsäure, β-D-Gentiobiose, Lactose, D-(+)-Trehalose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

C.2.5 Plasmide und Mikroorganismen

Tabelle 33: Verwendete Vektoren und Bakterienstämme.

Stamm / Plasmid	Genotyp	Herkunft/Referenz
<i>E. coli</i> ArcticExpress (DE3)	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r gal λ(DE3) <i>endA</i> Hte [cpn10 cpn60 Gent ^r]	Agilent Technologies ^[274]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ</i> <i>DE3 = λ sBamHI ΔEcoRI-B</i> <i>int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5</i>	New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, USA ^[275]
<i>E. coli</i> DH5α	<i>fhuA2::IS2 Δ(mmuP-mhpD)169 ΔphoA8</i> <i>glnX44 φ80d[ΔlacZ58(M15)] rfbD1 gyrA96</i> <i>luxS11 recA1 endA1 rph^{WT} thiE1 hsdR17</i>	New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, USA ^[276]
Plasmid		
pET51b(+)	<i>lacI</i> , T7(<i>lacUV5::</i>), f1 Ori, Amp ^R , N-terminal 6xHis*Tag, pBR322 Ori	Novagen/Merck KGaA, Darmstadt Takara Bio Inc., Kusatsu City, Japan ^[277]
pKJE7	<i>araB(dnaK, dnaJ, grpE)</i> , <i>araC</i> , Cm ^R , pACYC ori	J. Rosengarten
pET51b(+)::his- tag_fidir1	pET51b(+)-Vektor mit <i>FiDIR1</i> -Gen encodiert <i>FiDIR1</i> mit einem N-terminalen His ₆ -Tag	J. Rosengarten
pET51b(+)::his- tag_atdir6	pET51b(+)-Vektor mit <i>AtDIR6</i> -Gen encodiert <i>AtDIR6</i> mit einem N-terminalen His ₆ -Tag	J. Rosengarten
pET51b(+)::strep_ fidir1	pET51b(+)-Vektor mit <i>FiDIR1</i> -Gen encodiert <i>FiDIR1</i> mit einem N-terminalen Strep [®] -Tag	J. Rosengarten
pET51b(+)::strep_ atdir6	pET51b(+)-Vektor mit <i>AtDIR6</i> -Gen encodiert <i>AtDIR6</i> mit einem N-terminalen Strep [®] -Tag	J. Rosengarten
pET51b(+)::strep_ male_fidir1	pET51b(+)-Vektor mit <i>male_FiDIR1</i> -Gen encodiert FP aus MBP (N-terminalen Strep [®] - Tag) und <i>FiDIR1</i>	J. Rosengarten
pET51b(+)::strep_ male_atdir6	pET51b(+)-Vektor mit <i>male_AtDIR6</i> -Gen encodiert FP aus MBP (N-terminalen Strep [®] - Tag) und <i>AtDIR6</i>	J. Rosengarten
pET15b	Amp ^R , <i>lacI</i> , T7(<i>lacUV5::</i>)	Novagen/Merck KGaA, Darmstadt
pET15b::osjac1	pET15b-Vektor mit <i>OsJAC1</i> -Gen encodiert Volllängenprotein (<i>OsJAC1</i>) mit einem N- terminalen His ₆ -Tag	Prof. U. Schaffrath, RWTH Aachen
pET15b::strep_osj ac1_dir	pET15b-Vektor mit <i>strep_OsJAC1_dir</i> -Gen encodiert Domänen-Protein (<i>OsJAC1</i> -DIR) mit einem N-terminalen Strep [®] -Tag	M. Nöth ^[220]
pET15b::his- tag_osjac1_dir	pET15b-Vektor mit <i>his-tag_OsJAC1_DIR</i> -Gen encodiert Domänen-Protein (<i>OsJAC1</i> -DIR) mit einem N-terminalen His ₆ -Tag	Prof. U. Schaffrath, RWTH Aachen
pET15b::his- tag_osjac1_dir- RH	pET15b-Vektor mit <i>his-tag_OsJAC1_DIR_RH</i> - Gen encodiert Domänen-Protein (<i>OsJAC1</i> - DIR-RH) mit einem N-terminalen His ₆ -Tag	Diese Arbeit

pET15b::strep_osj ac1_jrl	pET15b-Vektor mit <i>strep_OsJAC1_JRL</i> -Gen enkodiert Domänen-Protein (OsJAC1-DIR) mit einem N-terminalen Strep®-Tag	M. Nöth ^[220]
pET15b::his- tag_osjac1_jrl	pET15b-Vektor mit <i>his-tag_OsJAC1_JRL</i> -Gen enkodiert Domänen-Protein (OsJAC1-JRL) mit einem N-terminalen His ₆ -Tag	Prof. U. Schaffrath, RWTH Aachen
pColdIV	<i>cspA</i> Promoter, <i>lacI</i> , ColE1 Ori, Amp ^R , M13 IG	Takara Bio Inc., Kusatsu City, Japan
pCold IV::his- tag_osjac1	pColdIV-Vektor mit <i>OsJAC1</i> -Gen enkodiert Volllängenprotein (OsJAC1) mit einem N- terminalen His ₆ -Tag	Diese Arbeit

C.2.6 Oligonukleotide

Tabelle 34 listet die in dieser Arbeit erstellten und eingesetzten Oligonukleotide auf. Für die *round-the-horn-PCR* Methode (B.3.1, S. 64) wurden die ersten beiden Primer aus Tabelle 34 verwendet. Die Primer (pColdIV_fw/rev_NHU) wurden für das *Gibson-Assembly* (B.3.1, S. 64) verwendet. Die letzten beiden Primer aus Tabelle 34 wurden verwendet, um die Klonierung in einen pCold-Vektor mittels Sequenzierung zu überprüfen.

Tabelle 34: Übersicht der verwendeten Primer in dieser Arbeit. Die angegebenen Schmelzpunkte (T_M) sind die Angaben des Herstellers.

Name	Sequenz 5'-3'	T_M [°C]
DIR-RH-fw	TAACAAAGCCCCGAAAGG	58,8
DIR-RH-rv	TGACCCTTTTAAGAGAGGAC	57,4
pColdIV_fw_NHU	GCACACTTAATTATTAAGAGGTAATACCAATGGGCAGCAGCCATC	78,9
pColdIV_rev_NHU	GCAGGTCGACAAGCTTGTTAGATCGGCTGCACGTA	82,0
pCold-fw	ACGCCATATCGCCGAAAGG	69,1
pCold-rv	GGCAGGGATCTTAGATTCTG	60,2

C.3 Methoden

C.3.1 Molekularbiologische Methoden

C.3.1.1 Konstrukte und Klonierung

Wie in Tabelle 33 (S. 156) zu sehen ist, standen alle benötigten DNA-Konstrukte für diese Arbeit bereits zur Verfügung. Für die heterologe Überexpression wurden hauptsächlich die Gene in dem pET-15b-Vektor verwendet. Die resultierenden Proteine enthielten einen N-terminalen His₆-Tag. Für diese Arbeit wurden zwei Anpassungen in der Konstruktion der Vektoren vorgenommen. Zu einem wurde durch eine *round-the-horn* PCR^[278] das C-terminale Ende des OsJAC1-DIR-Domänenproteins verkürzt und zum anderem wurde das *osjac1*-Gen durch *Gibson-Assembly* in das pColdIV-Vektorsystem kloniert. Die Durchführung dieser beiden Methoden wird im Folgenden detailliert erläutert.

Round-the-horn PCR

Durch die *round-the-horn* PCR^[278] wurde der ursprüngliche Vektor für das OsJAC1-DIR-Domänenprotein verkürzt (s. S. 65). Hierfür wurden die Primer so erstellt, dass die zu entfernenden Stellen im Vektor nicht abgedeckt und entsprechend durch die PCR nicht amplifiziert wurden. Da die Primer nicht komplementär zueinander sind, erfolgte die Amplifikation exponentiell. Es wurden drei unterschiedliche Temperaturen für die Anlagerung der Primer in der PCR verwendet (s. Tabelle 35).

Tabelle 35: *Round-the-horn* PCR-Zusammensetzung und Reaktionsbedingung.

<u>Zusammensetzung</u>		<u>Bedingungen</u>		
Komponente	Volumen [μL]	Prozess	Temp. [°C]	Dauer [min]
Phusion Puffer 5x	5	Initiale Denaturierung	95	6
10 mM dNTPs	0,5	Denaturierung ¹	95	0,5
10 μM Primer fw	1,25	Anlagerung ¹	58/63/68	0,5
10 μM Primer rv	1,25	Elongation ¹	72	1,5
Template DNA	0,5 (10 ng)	Elongation zum Schluss	72	10
DMSO	0,6	Lagerung	10	∞
dd H ₂ O	15,2			
Phusion Polymerase	0,5			

¹Reaktionsschritt wurde 35-mal im Zyklus wiederholt.

Lediglich die PCR mit der höchsten verwendeten Temperatur für die Primer-Anlagerung von 68 °C führte zu einer Amplifikation der Ziel-DNA. Nach der PCR enthielt die Reaktionsmischung die Ziel-DNA und das DNA-Template. Zur Entfernung des DNA-Templates wurde ein gezielter Verdau mit dem Restriktionsenzym *DpnI* (*FastDigest System*, Thermo

Fischer Scientific, Waltham, Ma, USA) angewendet. Das Enzym erkennt und hydrolysiert methylierte DNA. Da das PCR-Produkt (Ziel-DNA) nicht methyliert ist, wird es entsprechend nicht von *DpnI* abgebaut. Für den Verdau wurden 0,5 µL der *DpnI*-Lösung zur PCR-Mischung hinzugegeben und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die PCR-Mischung über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Ziel-DNA aus dem Gel extrahiert (C.3.1.3). Die resultierende DNA wies *blunt ends* auf, wodurch die DNA- Zirkularisierung durch Überlappungen der DNA-Enden verhindert wurde. Jedoch waren die verwendeten Primer am 5'-Ende phosphoryliert und konnten durch eine Ligase zirkularisiert werden. Die Ligation konnte ebenfalls im Wirtsorganismus erfolgen, weswegen der entsprechende *E. coli*-Stamm transformiert wurde mit dem PCR-Produkt (C.3.2.3). Um die erfolgreiche Entfernung der Sequenz nachzuweisen, wurden Vorkulturen und Plasmid-Isolationen von sechs Kolonien durchgeführt. Anschließend erfolgte ein Testverdau der erhaltenen Plasmid-DNA mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *XbaI*. Der zu entfernende Sequenzbereich des DNA-Templates weist eine Restriktionsstelle für *BamHI* auf. Wird die gewünschte Sequenz nun entfernt, kann das Plasmid an dieser Position nicht geschnitten werden. Die Kombination mit *XbaI* ergibt zwei Fragmente für das ursprüngliche Konstrukt des DNA-Templates. Die resultierenden Fragmente hatten eine Größe von 611 bp und 5599 bp. Dies wurde als Negativkontrollen verwendet. Im Fall, dass die Sequenz richtig entfernt wurde, ist lediglich *XbaI* in der Lage das Plasmid zu schneiden. Dadurch entstand ein Fragment über 6 kbp. Für den Restriktionsverdau wurde das *FastDigest System (Thermo Fischer Scientific)* verwendet und 100 ng DNA wurde für 15 min bei 37 °C inkubiert. Durch eine anschließende Agarose-Gelelektrophorese wurde für zwei Kolonien das richtige Fragmentationsprofil (eine Bande bei 6 kbp) beobachtet. Es folgte eine Sequenzierung (C.3.1.2) zur weiteren Verifikation und zwei Glycerinkulturen wurden erstellt zur Lagerung bei -80 °C (C.3.2.1).

Gibson-Assembly

Für die gezielte Insertion des *OsJAC1*-Gens in das pColdIV-Expressionsvektor wurde die *Gibson-Assembly*-Klonierungsmethode angewendet. Das Ziel-Insertionsgen wurde zunächst mit geeignetem Primer (s. Tabelle 34, S. 157) mittels einer PCR amplifiziert und verlängert (s. Tabelle 36). Die Sequenzverlängerung ist dabei komplementär zu der gewünschten Insertionsposition des Vektors.

Tabelle 36: Zusammensetzung der PCR für die anschließende *Gibson-Assembly*-Methode und die PCR-Reaktionsbedingung.

<u>Zusammensetzung</u>		<u>Bedingungen</u>		
Komponente	Volumen [μ L]	Prozess	Temp. [°C]	Dauer [min]
Phusion Puffer 5x	5	Initiale Denaturierung	95	5
10 mM dNTPs	0,5	Denaturierung ¹	95	10 s
10 μ M Primer fw	1,25	Anlagerung ¹	64	0,5
10 μ M Primer rv	1,25	Elongation ¹	72	1
Template DNA	1,1 (10 ng)	Elongation zum Schluss	72	5
dd H ₂ O	15,2	Lagerung	10	∞
Phusion Polymerase	0,25			

¹Reaktionsschritt wurde 35-mal im Zyklus wiederholt.

Das PCR-Produkt wurde zunächst nach den Angaben des Kit-Herstellers (*innuPREP DoubleEpure Kit*, AnalytikJena AG, Jena) gereinigt (Elution erfolgte mit dH₂O). Um das Ziel-Gen in den Vektor einzubringen, muss die Vektor-DNA linearisiert vorliegen. Hierfür wurden zwei geeignete Schnittstellen im Plasmid gewählt (*NdeI* und *EcoRI*), die eine wiederholte Zyklisierung verhindern und die entsprechenden komplementären Sequenzen zu dem Ziel-Gen enthalten. Die Plasmid-DNA wurde nach den Arbeitsschritten für die Transformation von *E. coli* DH5 α (C.3.2.3), Erstellung der Vorkulturen (C.3.2.1) und Plasmid-Isolation (C.3.1.2) erhalten. Der Restriktionsverdau erfolgte durch das *FastDigest System* (15 min bei 37 °C) und die Zusammensetzung des Verdau ist in Tabelle 37 aufgelistet.

Tabelle 37: Zusammensetzung des Restriktionsverdau für die Linearisierung des pColdIV-Vektors.

Komponente	Volumen [μ L]
<i>NdeI</i> / <i>EcoRI</i>	Jeweils 0,5
10x Puffer	2
DNA 500 ng	4
dd H ₂ O	13

Nach dem Verdau erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme für 20 min bei 80 °C und ein anschließender Waschschrift (analog zur PCR durch *innuPREP DoubleEpure Kit*). Die linearisierte Vektor-DNA wurde im nächsten Schritt mit der Ziel-DNA und dem *Gibson-*

Assembly-Mastermix kombiniert. Die enthaltenen Komponenten im Mastermix (s. Tabelle 38 für die Zusammensetzung) katalysierten die Insertion des Ziel-Gens in den Vektor. Hierfür erzeugt die T5-Exonuklease *sticky-ends*, die das Annealing von komplementären DNA-Sequenzen des Vektors und des Ziel-Gens ermöglicht. Die Lücken werden von der vorhandenen Polymerase (*Phusion Hot Start II*) aufgefüllt und anschließend von der Taq-DNA-Ligase ligiert, wodurch das gewünschte Konstrukt entsteht. Das Reaktionsgemisch bestand aus 2,0 μL ($27,1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) linearisierte Vektor-DNA, 1,5 μL ($340 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) Ziel-DNA, 10 μL *Gibson-Assembly*-Mastermix und mit dH_2O wurde es auf ein Endvolumen von 20 μL aufgefüllt. Die Reaktion wurde 1 h lang bei 50 °C inkubiert.

Tabelle 38: Zusammensetzung des Mastermixes und des ISO-Puffers für die *Gibson-Assembly*-Klonierungsmethode.

<u><i>Gibson-Assembly</i>-Mastermix</u>		<u>5x ISO-Puffer</u>	
Komponente	Volumen [μL]	Komponente	Volumen [μL]
ISO-Puffer (5x)	60	TRIS-HCl (1 M, pH 7,5)	500
T5-Exonuclease ($100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	24	MgCl_2 (2 M)	25
<i>Phusion Hot Start II</i> DNA-Polymerase ($0,4 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	18	dNTPs (jeweils 100 mM)	4 x 10 μL
Taq DNA-Ligase ($8000 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	0,25	DTT (1 M)	50
dd H_2O	450	PEG-8000	250 mg
		NAD^+ (100 mM)	50

Nach dem *Gibson-Assembly* wurde die Reaktionslösung verwendet für die Transformation von *E. coli* DH5 α . Das Vorhandensein des Ziel-Gens im pColdIV-Plasmid wurde mittels Kolonie-PCR getestet. Hierfür wurden insgesamt neun Kolonien aus der Agar-Platte mit einer Pipettenspitze entnommen und direkt in die Kolonie-PCR-Mischung (s. Tabelle 39) pipettiert. Für die PCR wurden die erstellten Primer für das *Gibson-Assembly* verwendet. Die Reaktionsbedingung für die Kolonie-PCR ist in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 39: Zusammensetzung der Kolonie-PCR und die Reaktionsbedingung.

<u>Zusammensetzung</u>		<u>Bedingungen</u>		
Komponente	Volumen [μ L]	Prozess	Temp. [°C]	Dauer [min]
<i>RedTaq® ready mix™</i>	7	Initiale Denaturierung	95	5
10 μ M Primer fw	1,5	Denaturierung ¹	95	10 s
10 μ M Primer rv	1,5	Anlagerung ¹	64	0,5
		Elongation ¹	72	1
		Elongation zum Schluss	72	5
		Lagerung	10	∞

¹Reaktionsschritt wurde 25-mal im Zyklus wiederholt.

Für die Negativkontrolle wurde Wasser verwendet und für die Positivkontrolle das PCR-Produkt des Ziel-Gens. Von den neun ausgewählten Kolonien konnte für eine Kolonie das gewünschte Insert-Gen nachgewiesen werden. Es folgte eine Sequenzierung (C.3.1.2) zur weiteren Verifikation und die Erstellung einer Glycerinkultur zur Lagerung bei -80 °C (C.3.2.1).

C.3.1.2 Plasmid-Isolation und Sequenzierung

Isolierte Plasmide wurden zur Transformation von entsprechenden Wirtsorganismen verwendet. Für die Herstellung wurden 2 mL Vorkultur verwendet. Die Präparation erfolgte mit dem *innuPREP* DNA Mini Kit (*AnalytikJena AG*, Jena). Das entsprechende Protokoll des Herstellers mit den folgenden Schritten wurde befolgt: Alkalische Lyse, Neutralisation, Bindung der DNA an das Säulenmaterial, Waschen und Elution der DNA. Die Elution wurde allerdings mit 35 μ L H₂O anstatt des mitgelieferten Elutionspuffers durchgeführt. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch (Absorption bei λ = 260 nm) mit dem *NanoDrop 2000c* bestimmt. Hierfür wurde 2 μ L der DNA-Probenlösung verwendet und H₂O als Referenzprobe.

Zur Sequenzidentifikation wurden zwischen 350 und 500 ng Plasmid-DNA mit der entsprechenden Menge H₂O gemischt, um ein Gesamtvolumen von 20 μ L zu erreichen. Alle Proben wurden durch *GATC Biotech AG* (Konstanz) sequenziert.

C.3.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde in Kombination mit unterschiedlichen molekularbiologischen Methoden verwendet, um die Größe zu bestimmen und/oder Plasmide oder Gene zu isolieren. Die Agarose-Gel-Lösung wurde durch Aufkochen von 0,8 % (w/v) Agarose in TEA-Puffer bis zur vollständigen Auflösung der Agarose hergestellt. Nach Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffs *Gel Red™* (*Bioticum Inc.*, Hayward, CA, USA) wurde die Lösung bei 60 °C gelagert, um eine Erstarrung der Agarose während der Lagerung zu vermeiden. Der Farbstoff *Gel Red™* ermöglicht den selektiven Nachweis von DNA-Strängen

durch Fluoreszenz, indem es in die DNA interkaliert. Das Abkühlen des Gels nach dem Gießen erfolgte bei Raumtemperatur ($\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) für etwa 30 min. Die Proben wurden mit (5x) DNA-Ladepuffer gemischt, bevor sie in die Agarosegel-Probenkammern geladen wurden. Zur Größenbestimmung wurden 1-1,5 μL des DNA-Größenstandards *GeneRuler 1 kb DNA-Leiter* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) als Größenvergleich verwendet. Die Elektrophorese wurde für 26 min bei 180 V in (1x) TEA-Puffer durchgeführt. Die Dokumentation des Agarose-Gels erfolgte mit dem Gel-Dokumentationssystem *INTAS Gel iX Imager*.

Im Fall, dass ein reines DNA-Produkt benötigt wurde, erfolgte nach der Agarose-Gelelektrophorese die Isolierung der Ziel-DNA durch Gelextraktion mit dem *innuPREP DOUBLEpure Kit* (AnalytikJena AG, Jena). Das gewünschte Fragment wurde mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten und in ein 2,0 mL Reaktionsgefäß gegeben. Die DNA-Extraktion wurde nach dem Protokoll des Kit-Herstellers durchgeführt. Abweichend vom Protokoll erfolgte die Elution der DNA mit H_2O (30 μL) anstatt mit dem mitgelieferten Elutionspuffer.

C.3.2 Mikrobiologische Methoden

C.3.2.1 Kultivierung von Vorkulturen und Anfertigung der Glycerinkulturen

Vorkulturen wurden zur Plasmid-Präparation und zur Inokulation von heterologen Expressionen verwendet. Die Proliferation für die Plasmid-Präparation erfolgte in einem Reaktionsgefäß (10 mL) mit 5 mL LB^{amp} Medium. Die jeweiligen Zellen wurden aus einer Glycerinkultur gewonnen und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 200 rpm gezüchtet. Zur Herstellung der Glycerinkulturen wurde eine Mischung aus 700 mL Zellsuspension und 300 μL 80 % Glycerin in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

C.3.2.2 Herstellung chemischer kompetenter *E. coli*-Stämme

Damit die eingesetzten *E. coli*-Stämme (s. Tabelle 33, S. 156) in der Lage sind, Plasmid-DNA aufzunehmen, wurden vorher entsprechende chemisch kompetente Zellen hergestellt. Alle verwendeten Salzlösungen, Nährmedien, Kolben und Becher lagen steril vor. Zunächst wurde eine 5 mL-Vorkultur (LB-Medium) mit dem gewünschten Stamm angesetzt und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Im Fall von *E. coli* ArcticExpress (DE3) wurde 20 μM Gentamicin ins Medium gegeben, da der Stamm bereits die entsprechende Resistenz aufwies. Anschließend wurde 400 mL LB-Medium in einem 5 L Fernbachkolben (mit Schikanen) mit 2 mL der Vorkultur inokuliert und bis zu einer OD_{600} von 0,4-0,6 bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 120 rpm inkubiert. Danach wurde die Kultur zentrifugiert (10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $1230 \times g$) und das resultierende Zell-Pellet

in 10 mL 100 mM MgCl_2 (auf Eis vorgekühlt) suspendiert. Nach etwa 20 min Inkubation der Zellsuspension (auf Eis), wurde die Kultur erneut zentrifugiert (10 min, 4 °C, $1230 \times g$) und anschließend in 2 mL einer 100 mM CaCl_2 -Lösung mit 15 % (w/v) Glycerin suspendiert. Die Zellsuspension wurde in sterile Reaktionsgefäße (1,5mL) in 50 μL aliquotiert und sofort mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

C.3.2.3 Transformation von kompetenten *E. coli*-Stämmen

Für die heterologe Genexpression oder um Plasmid-DNA zu replizieren, erfolgte eine Transformation der geeigneten Wirtsorganismen mit der gewünschten Plasmid-DNA. Die Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen wurde mittels der Hitzeschockmethode durchgeführt. Hierfür wurde $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ der Plasmid-Lösung zu 50 μL chemisch kompetenter Zellen (s. oben) hinzugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in einem Wärmeblock für 90 Sekunden auf 42 °C erhitzt. Eine kürzere Inkubationszeit von 30 s führte im Fall von *E. coli* ArcticExpress (DE3) zu einer höheren Transformationseffizienz. Nach dem Hitzeschock wurde der Zellsuspension 1 mL LB-Medium zugesetzt und anschließend für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen für 1 min bei $10.000 \times g$ pelletiert und etwa 900 μL Überstand entfernt. Die Zellen wurden im restlichen LB-Medium wieder suspendiert (etwa 100 μL) und auf eine Agarplatte mit dem geeigneten Selektionsantibiotikum übertragen. Kolonien des transformierten Stammes wurden nach 18 h Inkubation bei 37 °C beobachtet. Angeimpfte Agarplatten wurden bis zu zwei Wochen bei 4 °C gelagert. Einzelne Kolonien wurden für die Anfertigung von Vorkulturen und Glycerinkulturen verwendet.

C.3.2.4 Heterologe Expression

Allgemeine Expressionsbedingung

Für die bakterielle Kultivierung oder heterologe Überexpression wurden alle verwendeten Nährmedien vorher autoklaviert und bei RT gelagert. Die entsprechenden Antibiotika wurden den Nährmedien vor der Verwendung steril zugesetzt. Folgende Arbeitsschritte wurden allgemein für jede Kultivierung im Kolben (50 mL – 5 L) befolgt:

Die Hauptkultur wurde mit einer Vorkultur (C.3.2.1) 1:100 (v/v) inokuliert. Für die Produktion von größeren Proteinmengen wurden 1 L TB-Medium in 5 L Fernbachkolben (mit Schikanen) verwendet. Für *E. coli* Stämme mit einem pET15b-Vektor wurde Ampicillin hinzugegeben und zusätzlich für die Co-Expression von Chaperonen durch den pKJE7-Vektor

wurde Chloramphenicol und für *E. coli* ArcticExpress (DE3) Gentamicin hinzugefügt. Die Expressionskultur wurde bei 37 °C und 120 rpm bis zum Erreichen eines OD₆₀₀-Werts zwischen 0,4–0,6 inkubiert. Die Induktion der heterologen Überexpression erfolgte durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,1 mM) und zusätzlich für die Induktion der Chaperonen aus dem pKJE7-Vektor wurde L-Arabinose (Endkonzentration 1 mg·mL⁻¹) hinzugegeben. Nach der Induktion wurden die Kulturen für 24 h bei 25 °C und 120 rpm konstant inkubiert. Die anschließende Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (15 min, 3000 × g, 4 °C). Zum Schluss wurden die Zellpellets bis zur ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert.

Optimierte Expressionsbedingungen

Im Folgenden werden die abweichenden bzw. optimierten Expressionsbedingungen erläutert: Die rekombinanten pflanzlichen DIR-Proteine (*AtDIR6* und *FiDIR1*) wurden bei 15 °C für 24 h in den entsprechenden *E. coli* Kulturen produziert (nach der Induktion). Zuvor wurde 2 % Ethanol (v/v) dem Nährmedium zugegeben. Die Zugabe von Ethanol hat sich als besonders effektive Maßnahme erwiesen, um die Löslichkeit und die Überexpression zu steigern. Analog zu den beiden DIR-Proteinen wurde für die heterologe Produktion der *OsJAC1*-Proteine (Volllängenprotein, DIR- und JRL-Domäne) ebenfalls 2 % Ethanol (v/v) zu Beginn hinzugegeben. Jedoch wurde abweichend nach dem Erreichen des OD₆₀₀-Werts (0,4–0,6) ein Kälteschock durchgeführt, bei dem die Kolben für 0,5 h auf Eis inkubiert wurden. Vor der Induktion mit 100 µM IPTG wurden die Zellen zusätzlich für 0,5 h bei 10 °C und 120 rpm inkubiert. Nach der Induktion wurden die Zellen für 3,5 d bei 10 °C konstant inkubiert.

C.3.3 Proteinbiochemische Methoden

Tabelle 40 zeigt relevante Parameter für die unterschiedlichen verwendeten rekombinanten Proteine an, die in proteinbioschemische und strukturelle Messungen und Berechnungen eingesetzt wurden. Die Werte wurden durch den Online-Tool *ProtParam* des *ExPASy*-Servers bestimmt.^[105] Als Affinitäts-Tag wurde in den meisten Fällen der His₆-Tag (His) verwendet. Zur Vollständigkeit werden in Tabelle 40 ebenfalls die Parameter für die Proteine mit einem Strep-Tag® (Strep) aufgelistet.

Tabelle 40: Übersicht von verwendeten biochemischen Parameter der rekombinanten Proteine, berechnet durch den Online-Tool *ProtParam* des *ExPASy*-Servers.^[105] Die Abkürzung in der Tabelle steht für folgende Parameter: ϵ = Extinktionskoeffizient (unter der Annahme, dass alle Cys-Reste reduziert sind), MW = Molekulargewicht, pI = Theoretischer isoelektrischer Punkt.

Protein	ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	MW [kDa]	pI	Anzahl Reste
<i>AtDIR6</i> -His	20400	22,41	6,74	197
<i>FiDIR1</i> -His	32890	23,14	6,48	205
<i>AtDIR6</i> -Strep	25900	22,59	6,41	199
<i>FiDIR1</i> -Strep	38390	23,36	6,06	207
MBP- <i>AtDIR6</i> -Strep	92250	63,33	5,37	570
MBP- <i>FiDIR1</i> -Strep	104740	64,07	5,30	578
<i>OsJAC1</i> -His	47900	35,57	6,49	329
<i>OsJAC1</i> -JRL-His	25440	18,39	6,39	170
<i>OsJAC1</i> -DIR-His	27960	20,90	8,14	194
<i>OsJAC1</i> -JRL-Strep	30940	18,60	6,05	172
<i>OsJAC1</i> -DIR-Strep	33460	21,18	8,27	196
<i>OsJAC1</i> -DIR-His-RH	22460	19,32	7,21	178

C.3.3.1 Zellaufschluss

Um die heterolog produzierten Proteine aus den *E. coli* Zellen zu isolieren, wurde zunächst ein Ultraschall Zellaufschluss durchgeführt. Hierfür wurden die bei -20 °C gelagerten Zellpellets (C.3.2.4) im ersten Schritt aufgetaut. 1 g Zellpellet wurde mit 2 mL eines für die Proteinaffinitätschromatographie genutzten Waschpuffers verdünnt. Die Zell-Lyse wurde mit 5x10 Zyklen, einer Intensität von 37 %, mit 30 s Pulsen und 30 s Ruhepausen für eine Gesamtzeit von 10 min (*BANDELIN Sonoplus HD220* und mit einer geeigneten Sonotrode, abhängig vom Volumen der Probe) durchgeführt. Durch die Wärmeerzeugung während der Zell-Lyse muss die Probe durchgehend gekühlt werden, um eine Denaturierung des Proteins zu verhindern. Anschließend wurden die lysierten Zellen bei 16.000 rpm und 4 °C für 45 min zentrifugiert (*SORVALL RC6 Plus*), um die Proteinlösung von den Zelltrümmern zu trennen. Abschließend wurde das Lysat durch einen Spritzenfilter filtriert (0,45 µm Poren, *VWR*) und konnte nun für die Proteinaffinitätschromatographie genutzt werden.

C.3.3.2 Affinitätschromatographie für die Proteinisolation

Für die Proteinisolation wurden alle verwendeten Puffer (s. Tabelle 30, S. 154) vorher mit einem Flaschenaufsatzfilter (0,2 µm Poren) filtriert, anschließend für 0,5 h im Ultraschallbad entgast und bis zur ihrer Verwendung bei RT gelagert. Für die Isolation standen zwei unterschiedliche Affinitäts-Tags zur Verfügung, diese befanden sich jeweils in allen rekombinanten Proteinen am N-terminalen Ende. Die Proteinisolation erfolgte mit der *Äktaprime plus* (*Cytiva*) unter RT. In allen Isolationsverfahren wurde das Lysat kontinuierlich im Zyklus mit einer peristaltischen Pumpe für 0,5 h auf die entsprechende Säule geladen. Im Anschluss zu der Proteinisolation erfolgte ein Pufferwechsel (C.3.3.4) und die Reinheit der erhaltenen Proteinlösung wurde durch SDS-PAGE (C.3.3.5) geprüft.

Isolation mittels StrepTactin®-Affinitätschromatographie

Der Strep-tag® ist ein kurzes Peptid, bestehend aus acht Resten (WSHPQFEK), das mit hoher Selektivität an Strep-Tactin® bindet.^[279] Aufgrund der hohen Affinität kann die Isolation der rekombinanten Proteine in einem Schritt erfolgen.^[102] Hierfür wurde zunächst die kommerziell erhältliche Strep-Tactin®-Säule (5 mL *Strep-Tactin® Superflow Kartusche*, *IBA GmbH*, Göttingen) mit Puffer W für 5 CVs (Säulenvolumen; 1 CV = 5 mL) und bei einer Flussrate von 1 mL·min⁻¹ äquilibriert. Nachdem die Säule mit dem Lysat beladen wurde (s. oben) folgte der Waschschrift für 10 CV mit Puffer W. In einigen Experimenten wurden die ersten vier Fraktionen (jeweils 2 mL) gesammelt und untersucht. Danach folgte die Elution der

rekombinanten Proteine mit Puffer E für 8 CV in jeweils 0,5 mL Fraktionen. Um die Säule für weitere Isolationen zu nutzen, wurde sie mit Puffer R (5 CV) regeneriert. Ein Farbwechsel der Säule von gelb nach rot zeigte den Regenerationsprozess an und die Intensität der roten Farbe war ein Maß für die Aktivität des Strep-Tactins® auf der Säule. Die Säule wurde in Puffer W bei 4 °C gelagert.

Isolationsbedingung mittels IMAC

Die IMAC beruht auf der Wechselwirkung zweiwertiger Ni-Ionen, die an der Säule durch Nitrilotriessigsäure (NTA) komplexiert sind mit dem His₆-Tag (bestehend aus sechs Histidin-Resten). Die rekombinanten Proteine wurden unter Verwendung einer Ni-NTA-Säule (CV = 5 mL) von IBA GmbH isoliert. Zuerst wurde die Säule mit 3 CV-Wasser gespült und dann mit 5 CV Puffer A bei einer Fließgeschwindigkeit von 2,5 mL·min⁻¹ äquilibriert. Der Waschschrift umfasste 12 CV Puffer A (oder A2) und eine einstufige Erhöhung von Puffer B, um unselektiv gebundene Verunreinigungen zu entfernen (30 % Puffer B für 8–12 CV). Das Protein wurde mit 10 CV Puffer B (100 %) eluiert in jeweils 2,5 mL Fraktionen. Die Säule wurde in 20 % Ethanol (v/v) bei 4 °C gelagert. Puffer A2 wurde verwendet, um die Verunreinigung mit Chaperonen zu reduzieren (A.3.1.5, S. 30).

C.3.3.3 Größenausschlusschromatographie

Analog zu der Proteinaffinitätschromatographie wurde der verwendete SEC-Puffer (s. Tabelle 30, S. 154) mit einem Flaschenaufsatzfilter (0,2 µm Poren) filtriert, für 0,5 h im Ultraschallbad entgast und bis zur Verwendung bei RT gelagert. Die Größenausschlusschromatographie wurde mit der *Cytiva* (ehemals *GE Healthcare Life Sciences*) *HiLoad™ 16/600 Superdex™ 200 pg* (120 cm x Ø 1,6 cm) Säule durchgeführt (Lagerung in 20 % Ethanol bei RT). Als Proteinpuffer wurde der SEC-Puffer verwendet. Alle Proteinlösungen wurden vor der Messung durch einen Spritzenfilter filtriert (0,45 µm; VWR). Die Messung wurde mit einer Flussrate von 1 mL·min⁻¹ und einer Injektion von 1 mL Proteinprobe (10 mg·mL⁻¹) durchgeführt. Probenfraktionen von 4 mL wurden gesammelt.

C.3.3.4 Konzentrierung von Proteinfractionen und Pufferaustausch

Nach der Proteinisolation wurden in den meisten Fällen die Elutionsfraktionen vereinigt. Um das Volumen zu reduzieren und gleichzeitig die Proteinkonzentration zu erhöhen, wurden Zentrifugalkonzentratoren (*Vivaspin® 20*) mit einem MWCO (*engl. molecular weightcut-off*) von 10 kDa für alle rekombinanten Proteine verwendet. Die Proben wurden zentrifugiert (4 °C und 5000 rpm) bis zum Erreichen eines Volumens von etwa 2,5 mL.

Im Anschluss erfolgte der Pufferaustausch mittels PD-10 Entsalzungssäulen (*Cytiva*) mit Sephadex® G-25 als Säulenmaterial. Die Säulen wurden zunächst mit Wasser (3× 3,5 mL) und dann mit dem gewünschten Puffer (3× 3,5 mL) äquilibriert, danach wurde 2,5 mL der Proteinprobe auf die Säule gegeben. Nachdem die Probe vollständig durch die Säule geflossen war, wurde das Protein mit 3,5 mL Puffer von der Säule eluiert. Die gesammelte Probe wurde entweder direkt in weiteren Experimenten eingesetzt oder bei 4 °C gelagert. Nach dem Entsalzen der Probe wurden die Säulen durch dreimalige Zugabe von Wasser (3,5 mL) vom Puffer befreit. Anschließend wurden die Säulen bei 4 °C in 20 % (v/v) Ethanol gelagert.

C.3.3.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Dieses Verfahren ermöglicht eine Trennung von Proteinen entlang eines elektrischen Feldes nach ihrem Molekulargewicht. Dieses Prinzip erfordert, dass die Proteine keine Ladungs- oder Formunterschiede aufweisen. Daher wird der Proteinprobe eine Mischung aus DTT und Natriumdodecylsulfat (SDS) zugesetzt und sie dann erhitzt. Das DTT wird zur Spaltung von Disulfidbindungen hinzugegeben und das SDS dient als Denaturierungsmittel und vermittelt die einheitliche Ladung der Proteine. Zwei unterschiedliche Arten der SDS-PAGE-Gel und Puffer Zusammensetzung (Glycin und Tricin) wurden verwendet. Die Glycin-Gele wurden mit dem *BioRad Mini Protean Tetra System* gegossen. Hierfür wurde das höher konzentrierte Trenngel (10-12 %) zuerst polymerisiert und mit Isopropanol überdeckt. Dadurch sollte ein gerader Übergang des Gels gewährleistet werden. Nach der Polymerisation wurde das niedriger konzentrierte Stapelgel (4 %) über das Trenngel gegossen und ein Probenkamm eingesetzt. Die Tricin-Gele wurden kommerziell und vorgefertigt erworben (*Invitrogen Novex Tricine Gel, Thermo Fisher Scientific*).

Alle Proben wurden mit einem Gesamtvolumen von 100 µL angesetzt und ihnen mit 25 µL von 5x SDS-PAGE-Pufferlösung zugegeben. Die SDS-PAGE-Proben wurden im nächsten Schritt für 10 min bei 95 °C erhitzt. Da die hohe Temperatur während der Hitzedenaturierung eventuell zu Doppelbanden im SDS-PAGE führen kann (B.3.2.1, S. 70), wurden die Proben stattdessen bei 70 °C für 10 min erhitzt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (13000 rpm, 5 min). Zur Zuordnung der Proteinmasse wurde der Proteinmarker *Pageruler prestained ladder* (Thermo Scientific) verwendet. Es wurde etwa 2,9 µg (in 10 µL) Proteinprobe jeweils auf das SDS-PAGE Gel aufgetragen, wenn nicht anders angegeben. Die SDS-PAGE-Trennung wurde für 1 h bei 120 Volt durchgeführt. Die Proteine im Gel wurden mit Coomassielösung gefärbt, übermäßige Verfärbungen wurden mit einer Entfärbelösung (5 %

Essigsäure, 48 % EtOH) und Wasser entfernt. Die resultierenden Gele wurden fotografisch dokumentiert.

C.3.3.6 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration von isolierten Proteinen wurde mittels Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 280 nm (*NanoDrop 2000c*) bestimmt. Die Extinktionskoeffizienten und die molekularen Massen aus Tabelle 40 (S. 166) wurden verwendet. Für die Messung wurde 2 µL Proteinlösung (in Triplikat) verwendet und das entsprechende Proteinpuffer als Referenzprobe.

C.3.3.7 Proteolytischer Verdau

Spaltung des Fusionsproteins

Die Fusionsproteine aus MBP und den zwei rekombinanten DIR-Proteinen (*AtDIR6* und *FiDIR1*) enthielten eine Spaltsequenz, die hochspezifisch von der TEV-Protease (*ProTEV Plus*, *Promega Corporation*, Madison, WI, USA) erkannt und gespalten werden kann. Der Verdau von zwei unterschiedlichen Mengen Fusionsprotein (s. Tabelle 41) wurde über Nacht (18 h) bei 4 °C durchgeführt.

Tabelle 41: Zusammensetzung des proteolytischen Verdaus mit *ProTEV Plus* (*Promega Corporation*).

Komponente	Volumen 1 [µL]	Volumen 2 [µL]
<i>ProTEV</i> Puffer 20x	5	5
100 mM DTT	1	1
Fusionsprotein ¹	10	50
<i>ProTEV Plus</i> (10 U)	2	2
dH ₂ O	82	42

¹Proteinkonzentration: MBP-*AtDIR6* = 969 µg·mL⁻¹, MBP-*FiDIR1* = 856 µg·mL⁻¹

Spaltung des Affinitäts-Tags (His₆)

Die Spaltung des His₆-Tags erfolgte für die *OsJAC1*-Proteine (Volllängen, DIR- und JRL-Domäne) über eine Proteolyse mit Thrombin (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Oliver H. Weiergräber). 10 µL der Thrombinlösung (50 U) wurde in den folgenden Proteinlösungen hinzugegeben.

Tabelle 42: Eingesetzte Volumen und Proteinkonzentration für die Proteolyse mit Thrombin.

Protein	<i>OsJAC1</i>	<i>OsJAC1</i> -DIR-RH	<i>OsJAC1</i> -JRL
Volumen [mL]	1	3	2
Konzentration [mg·mL ⁻¹]	12,15	3,61	5,15

SDS-PAGE Proben wurden nach 24 h und 48 h Inkubation bei RT genommen, um die Proteolyse zu verfolgen.

Proteom-Verdau

Um das vollständige Proteom nach den *Pull-down-Assays* (0) mittels LC-MS zu analysieren, wurden die erhaltenen Proteinlösungen mit Trypsin (*Pierce® Trypsin Protease, MS-Gütegrad, Thermo Scientific*) proteolytisch verdaut. Hierfür wurde eine Proteinmenge von bis zu 100 µg (15 mM TRIS-HCl Puffer, pH 7,4) zunächst mit einer 6 µl Trypsin-Lösung (10 ng·µL⁻¹ in 3 mM TRIS-HCl, pH 8,8) versetzt. Es folgte eine Inkubation für 0,5 h bei RT. Weitere 6 µl TRIS/Trypsin-Puffer wurden zugegeben und über Nacht (18 h) bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden 10 µL ddH₂O hinzugegeben und weitere 15 min inkubiert. Schließlich wurden 10 µl 30 % (v/v) Acetonitril mit 0,2 % (v/v) Trifluoressigsäure addiert und für 10 min inkubiert. Die Proben wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert.

C.3.3.8 Proteinextraktion aus *inclusion bodies*

Für die Proteinextraktion wurde das Protokoll von *Palmer et al.* (2012) modifiziert angewendet.^[96] Die Waschschrte erfolgten nach der Vorgehensweise von *Palmer et al.* (2012) und für die anschließende Extraktion wurde ein mildes Proteinextraktionsverfahren mit 1 M L-Arginin getestet.^[97] Nach dem Zellaufschluss mit Puffer W und anschließender Zentrifugation (C.3.3.1) wurde der Überstand verworfen. Die resultierende Zellmasse wurde mit 4 mL Waschpuffer (W2) pro Gramm Nassgewicht der Zellen suspendiert (w/v). Danach wurde die Suspension für 30 min bei 12.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und der Waschschrte wurde zwei weitere Male wiederholt. Es folgte ein weiterer Waschschrte mit Puffer W3 (gleiches w/v Verhältnis wie für W2). Die Proteinextraktion erfolgte nach der Suspension der Zellmasse mit 2 mL (w/v) Puffer E2 für 18 h bei 4 °C. Abschließend wurde die Suspension wieder zentrifugiert und der Überstand für die Proteinaffinitätschromatographie (C.3.3.2) verwendet.

C.3.4 Pinoresinol Assay

Aus vorausgegangenen Arbeiten von *J. Rosengarten* in der Arbeitsgruppe von *Dr. T. Classen* wurde ein erstes Protokoll für die Durchführung der Dimerisierung von Coniferylalkohol (5) über eine Laccasereaktion erarbeitet. Auf Grundlage dieser Arbeit wurden die Pufferzusammensetzung (50 mM KPi, pH 5,0) und die Verwendung der Laccase aus *Agaricus bisporus* übernommen. Alle anderen Reaktionsbedingungen wurden im Rahmen dieser Arbeit mittels der statistischen Versuchsplanungssoftware *Design-Expert®* (*Stat-Ease*) erarbeitet. Als Variable für die Ermittlung der optimierten Reaktionsbedingungen wurde die

Reaktionszeit (t in h), die Eduktkonzentration (**5** in mM) und die Aktivität der Laccase (U) gewählt. Die optimierten Reaktionsbedingungen wurden wie folgt angewendet:

Zunächst wurde der Reaktionspuffer (50 mM KPi, pH 5,0) in 1,5 mL Reaktionsgefäße vorgelegt (Reaktionsvolumen von 0,25 mL). Das Substrat (Coniferylalkohol (**5**)) wurde von *Dr. P. O. Sanwald* zur Verfügung gestellt.^[280] Eine Stammlösung von **5** (0,3 M) wurde mit Ethanol als Lösungsmittel angesetzt und 3,87 mM (finale Konzentration) zu dem Reaktionspuffer hinzugegeben. Laccase aus *A. bisporus* ($6,2 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, *Sigma-Aldrich*) wurde eingewogen, gelöst (50 mM KPi, pH 5,0) und eine finale Aktivität von 8,75 U zu der Reaktionsmischung hinzugegeben. Die Reaktion erfolgte 3,87 h bei konstanten 30 °C und 300 rpm. Die Reaktion wurde gestoppt durch die Extraktion der Reaktionskomponenten mit Ethylacetat (3x 100 µL). Die Extrakte wurden in HPLC-Vials mit einem Mikroinsert überführt und für 18 h bei RT verdampft. Anschließend erfolgte die HPLC-Messung (0).

C.3.5 Interaktionsanalysen

C.3.5.1 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Dynamische Lichtstreuungsexperimente (englisch: *Dynamic light scattering*) wurden mit dem *SpectroSize 300*-Instrument (*Xtal Concepts GmbH*, Hamburg) durchgeführt. Alle OsJAC1-Proben (Proteinkonzentration $1,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) wurden vor den Messungen 30 min bei $20.000 \times g$ und 4 °C zentrifugiert. Die Daten wurden in 25 aufeinanderfolgenden Akquisitionen aufgezeichnet, die jeweils ein Intervall von 10 s abdeckten bei einer konstanten Temperatur von 20 °C.

C.3.5.2 Differential Scanning Fluorimetrie (DSF)

Die Schmelzkurven der Proteine wurden mittels *Prometheus NT.Plex nano DSF* (*NanoTemper*, München) bestimmt. Für alle untersuchten Zucker wurden zunächst 100 mM Stammlösungen hergestellt, welche dann mit Proteinlösung (1:1) verdünnt wurden (finale Zuckerendkonzentration 50 mM). 50 mM KPi mit einem pH-Wert von 7,4 wurde als Puffer verwendet. Die Galactanlösung wurde gemäß Anleitung des Herstellers vorbereitet; 100 mg wurden in 10 mL Wasser verdünnt und für 20 min auf 60 °C erhitzt, bis sich eine klare Lösung bildete. Die endgültige Proteinkonzentration für das Assay lag zwischen $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ und $1,87 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Die Proben wurden für 0,5 h vor der Messung inkubiert. Alle Messungen wurden dreifach durchgeführt. Die Fluoreszenz wurde mit einer Anregungsleistung von 7 % aufgezeichnet, wobei ein Temperaturbereich von 20 bis 95 °C mit einer Geschwindigkeit von $0,5 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ verwendet wurde.

C.3.5.3 Hämagglutinations-Assay

Das Hämagglutinations-Assay wurde nach dem Protokoll von *Sano und Ogawa (2014)* mit leichten Modifikationen durchgeführt.^[250] Im ersten Schritt wurden die Erythrozyten bei 4 °C mit gekühltem PBS-Puffer (phosphatgepufferte Salzlösung; 150 mM NaCl, 20 mM Na-Phosphat, pH 7,2) gewaschen. Die Suspension wurde bei 500 × g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert, gefolgt von der Entfernung des Überstandes. Der Waschschrift wurde dreimal wiederholt, bis der Überstand klar war. Zur Bestimmung der Hämagglutinationsaktivität wurden die Proteine (*OsJAC1* und die Einzel-Domänenproteine) in einer 96-Well Mikrotiterplatte (*Greiner Bio One*®) seriell verdünnt. Die endgültige Proteinkonzentration der ersten Reihe für jedes Protein betrug 0,5 mg·mL⁻¹. Das Assay wurde mit konstant 1 % (v/v) Kaninchenerythrozytensuspension durchgeführt. Die Platte wurde durch vorsichtiges Schwenken auf der Tischplatte in einer kreisförmigen Bewegung gemischt. Die Ergebnisse des Assays wurden nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur durch visuelle Bestimmung der Hämagglutination dokumentiert und die Platten fotografiert. Dabei wurde die niedrigste Proteinkonzentration, die in der Lage ist, eine Hämagglutination zu verursachen, ermittelt. Die folgenden Kontrollen wurden verwendet: spezifische Pufferbedingungen ohne jegliches Protein als Negativkontrolle und das *OsJAC1*-JRL-Domänenprotein als Positivkontrolle.

Messung der Hämagglutinationshemmung durch Kohlenhydrate

Zur Bestimmung der Zucker-Inhibition der Hämagglutination wurde die Erythrozytensuspension wie oben beschrieben, vorbereitet und verwendet. Zunächst wurden die Zuckerlösungen in einer 96-Well Mikrotiterplatte seriell mit dem gekühltem PBS-Puffer verdünnt. Die finale Zuckerkonzentration der ersten Reihe betrug 25 mM. Als Negativkontrolle wurde PBS-Puffer verwendet. Im nächsten Schritt wurde ein festgelegter Titer der Proteinlösung hinzugegeben und für 0,5 h inkubiert. Als Titer wurde die vierfache Konzentration der zuvor ermittelten minimalen Hämagglutinationskonzentration verwendet. Die Hämagglutination erfolgte mit 1 % (v/v) Kaninchenerythrozytensuspension und für 1 h. Anschließend wurde der MIC-Wert (engl. *minimum inhibitory concentration*) bestimmt, der als niedrigste Zuckerkonzentration definiert ist, die die Hämagglutination vollständig inhibiert.

C.3.5.4 Pull-down-Assay

Pull-down ist eine *in vitro*-Methode, die häufig zum Nachweis oder zur Bestätigung von Wechselwirkungen zwischen mehreren Proteinen verwendet wird. Dieser Test ähnelt in seiner Methodik den Co-Immunpräzipitationsexperimenten, da ebenfalls Affinitätsliganden

verwendet werden, um interagierende Proteine einzufangen. Der Unterschied zwischen diesen beiden Methoden besteht darin, dass bei der Co-Immunpräzipitation immobilisierte Antikörper verwendet werden, um Proteinkomplexe einzufangen, während beim *Pull-down*-Ansatz ein isoliertes und markiertes Protein als "Köder" verwendet wird, um interagierende Proteine zu binden. Die Methode besteht darin, zunächst das markierte Protein (Köder) auf einem für den Köder spezifischen Affinitätsliganden zu immobilisieren, wodurch ein Affinitätsträger entsteht, der andere Proteine (Beute), die mit dem Köder wechselwirken, abfängt und bindet. Die Köder- und Beuteproteine können aus verschiedenen Quellen gewonnen werden, z.B. aus Zelllysaten, isolierten Proteinen und Expressionssystemen. Nachdem die Beuteproteine mit einem immobilisierten Köderprotein inkubiert wurden, werden die interagierenden Komplexe mit einem Elutionspuffer eluiert, der vom Affinitätsliganden abhängt.

Das verwendete Pflanzenmaterial für die *Pull-down*-Assays mit dem OsJAC1-Volllängenprotein wurde von unserem Kooperationspartnern Prof. U. Schaffrath und C. Kirsch (RWTH Aachen) zur Verfügung gestellt. Für die Untersuchung von putativen Interaktionspartnern wurden 5 bis 7 Tage alte Gerstenblätter der Sorte *Ingrid MLO* verwendet und Gerstenblätter, die zuvor auf der lebendigen Gerstenpflanze mit echten Gerstenmehltau (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) inokuliert wurden. Das entsprechende Pflanzenmaterial wurde mittels flüssigen Stickstoffs schockgefroren und bis zur Verwendung in -80 °C gelagert. Zur Extraktion der Proteine wurde 2 g Pflanzenmaterial unter flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver vermahlen. Pro g Pflanzenmaterial wurde anschließend vorgekühlte 2 mL (w/v) *CellLytic™ P Cell Lysis Reagent* (Sigma-Aldrich) mit einem Proteasehemmer-Cocktail (Verdünnung 1:100; *P9599*, Sigma-Aldrich) zugegeben und für 0,5 h bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Suspension für 20 Minuten bei hoher Geschwindigkeit (15.000 rpm) und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abschließend filtriert (0,45 µm, VWR) und für den *Pull-down*-Assay weiterverwendet.

Währenddessen wurde eine OsJAC1-Lösung (nicht älter als einen Tag und bei 4 °C gelagert) erneut auf der *Ni-NTA*-Säule (IBA) immobilisiert. Dazu wurde die Proteinlösung kontinuierlich im Zyklus mit einer peristaltischen Pumpe für 15 min geladen. Dieser Schritt wurde anschließend mit der Extraktionslösung wiederholt. Die weiteren Arbeitsschritte des *Pull-Down*-Assays sind analog zu der Proteinisolation mittels IMAC (C.3.3.2) und wurden ebenfalls mittels des Chromatographiesystems *Äktaprime plus* (Cytiva) durchgeführt. Im

Allgemeinen wurde mit ca. 100 mL Puffer A die Säule gespült und anschließend erfolgte die Elution. Hierfür wurden in den unterschiedlichen *Pull-down*-Ansätzen verschiedene Elutionspuffer getestet. Für eine spezifische Elution wurde dem Puffer A entweder 250 mM Galaktose oder 250 mM Laktose hinzugegeben. Da keine Signalveränderung im Chromatogramm beobachtet wurde, wurde im Anschluss mit Puffer B (100 %) die Proteine unspezifisch eluiert. Die jeweiligen Elutionsfraktionen wurden gesammelt und es folgte ein Pufferwechsel und eine Reduzierung des Volumens (C.3.3.4). Für jeden Schritt wurden SDS-Proben entnommen und über die SDS-PAGE dokumentiert. Um nachzuweisen, dass die charakterisierten Wechselwirkungen keine Artefakte sind, wurden folgende Kontrollen verwendet: Um falsch positive Ergebnisse, die durch unspezifische Bindung von Beuteproteinen an das Säulenmaterial (Ni-NTA) verursacht werden, zu erkennen und auszuschließen, wurde das Proteinextrakt auf eine unbehandelte Ni-NTA-Säule (enthält kein immobilisiertes OsJAC1) aufgebracht. Alle weiteren Schritte erfolgten analog zu dem *Pull-down*-Assay mit immobilisiertem OsJAC1. Da keine eindeutigen Banden für putative Interaktionspartner in den SDS-PAGE-Gelen beobachtet werden konnten, wurden Proteom-Analysen mittels LC-MS (*nanoLC-TripleTOF® 6600*) von unterschiedlichen erhaltenen Fraktionen (s. Tabelle 23, S. 137) durchgeführt. Hierfür wurden Protein-Aliquotes zunächst verdaut (0). Die anschließenden Messungen und eventuell zusätzliche Entsalzungsschritte erfolgten am Institut für Bio- und Geowissenschaften (*IBG-1: Biotechnologie, Forschungszentrum Jülich*) durch A. Wirtz. Die Zuordnung der MS-Ergebnisse erfolgte durch die Auswertesoftware *ProteinPilot™* (SCIEX) und folgende Protein-Datenbanken wurden verwendet: Echter Mehltau (*Blumeria_graminis.EF2.pep.all.fasta*, *EnsemblFungi*),^[281] Gerste (*160517_Hv_IBSC_PGSA_r1_proteins_HighConf_REPR_annotation.fasta*; IPK Gatersleben) und *E. coli* BL21 (DE3). Alle Proben wurden durch *ProteinPilot™* individuell durchsucht. Daran anschließend wurde eine Liste von identifizierten Proteinen erstellt.

C.3.6 Strukturbiologische Methoden

C.3.6.1 Zirkulardichroismus- (CD) Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie wurde für die Charakterisierung der OsJAC1-Proteine (Volllängen- und Domänenproteine) eingesetzt, um den Gehalt an Sekundärstrukturelementen zu analysieren (Fern-UV-Bereich) und um Konformationsänderungen bei der Bindung eines Liganden zu beobachten (Nah-UV-Bereich). Die CD-Spektren wurden auf einem J-1100 CD-Spektrometer (*JASCO Deutschland GmbH, Pfungstadt*) bei 20 °C aufgenommen. Die

Auswertung erfolgte nach der Subtraktion der Pufferspektren. Alle Proben wurden vor der Messung 30 min bei $20.000 \times g$ und 4°C zentrifugiert.

Scans im Fern-UV-Bereich (260 – 190 nm, fünf Akquisitionen pro Probe) wurden mit einer Scanrate von $50 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$ mit einem Datenabstand von 1 nm durchgeführt. Die Proben (OsJAC1: $1,52 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; DIR-Domäne: $1,04 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; JRL-Domäne: $2,39 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) wurden in 10 mM KPi und 1 mM DTT bei einem pH von 7,4 in demontierbaren 0,2-mm-Küvetten (106-QS, Hellma GmbH & Co. KG, Mühlheim) gemessen. Die Ableitung der Sekundärstrukturzusammensetzung erfolgte mittels der webbasierten Anwendung *BeStSel*.^[236] Als Eingabeformat wurde die gemessene Elliptizität (θ in m°) in Abhängigkeit zur Wellenlänge (λ in nm), die Proteinkonzentration (in μM), die Anzahl der Reste und die Pfadlänge (Schichtdicke der Küvette in cm) verwendet. Für die Darstellung wurden die CD-Spektren durch den *Savitzky-Golay*-Algorithmus geglättet.^[235]

Scans im Nah-UV-Bereich (330 – 260 nm, fünf Akquisitionen pro Probe) wurden mit einer Scanrate von $20 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$ mit einem Datenabstand von 0,5 nm durchgeführt. Proben (OsJAC1: $7,67 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; DIR-Domäne: $7,93 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; JRL-Domäne: $15,58 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) wurden in 50 mM KPi mit 1 mM Laminaribiose oder Galactobiose bei einem pH-Wert von 7,4 in einer 1-mm-Küvette (Hellma GmbH & Co. KG, Mühlheim) gemessen.

Da die Elliptizität θ abhängig von der verwendeten Proteinkonzentration und dem mittleren molaren Restgewicht (*engl. mean residue weight, MRW*) ist, erfolgte eine Umrechnung auf eine einheitliche Größe (θ_{MRW} , s. Gleichung 1). Dadurch konnten unterschiedliche Proteinspektren miteinander verglichen werden.

$$\theta_{MRW} = \frac{\theta \cdot M}{10d^{-1} \cdot c \cdot d \cdot (n - 1)}$$

Gleichung 1: Gleichung zur Berechnung der *mean residue weight (MRW)* Elliptizität θ_{MRW} in $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$. Eingesetzt wurde die gemessene θ in mdeg, das Molekulargewicht M in $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, die Massenproteinkonzentration in $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, die Pfadlänge in cm und die Anzahl der Reste n . Der Faktor 10 wurde genutzt für die Umrechnung von mol in dmol.

C.3.6.2 Kristallisation, *Soaking*-Experimente und Datensammlung

In dieser Arbeit wurde erfolgreich das DIR-Domänenprotein von *OsJAC1* kristallisiert. Hierfür wurde nach der Proteinisolation mittels IMAC (C.3.3.2) der His₆-Tag des DIR-Domänenproteins proteolytisch gespalten (0). Nach einem Pufferwechsel (C.3.3.4) folgte kein weiterer Isolationsschritt. Das Kristallisationsscreening, die Erfassung der Röntgenbeugungsdaten und die anschließende Erstellung der dreidimensionalen Strukturmodelle erfolgte in Zusammenarbeit mit *Prof. Dr. Oliver H. Weiergräber (Institut für Biologische Informationsprozesse, IBI-7: Strukturbiochemie, Forschungszentrum Jülich)*.

Das Kristallisationsscreening wurde bei 20 °C auf einem *FreedomEvo-Robotersystem* von *Tecan* (Männedorf, Schweiz) in einem sitzenden Tropfenaufbau mit einem 1:2-Verdünnungsverhältnis zwischen der anfänglichen Proteinlösung und des Reservoirpuffers durchgeführt. Zwei Kristallisationsbedingungen (s. Tabelle 43) führten zur Bildung von zwei unterschiedlichen Kristallformen für die DIR-Domäne (DIR46 und 48). Diese DIR-Domänen-Kristallisationsbedingungen ergaben mehrere nutzbare Kristalle. Es wurden zunächst unterschiedliche Kristalle entnommen und für die Beugungsmessung präpariert. Im weiteren Verlauf wurde zu den noch vorhandenen Proteinkristallen 1 mM Galactobiose (verdünnt mit dem jeweiligen Reservoirpuffer) hinzugegeben. Die Kristalle wurden nach 1 h Inkubation gesammelt.

Alle Röntgenbeugungsmessungen für die *OsJAC1*-DIR-Domäne erfolgten an der *European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, Frankreich)*. Die Datensätze wurden bei 100 K an der Beamline ID30A-3 (DIR46 und 48) und an der Beamline ID23-1 (DIR48 gebunden mit Galactobiose) aufgenommen. Alle zugehörigen kristallographischen Statistiken und Daten des *OsJAC1*-DIR-Domänenproteins sind in Tabelle 19 (S. 92) aufgeführt. Die aufgenommenen Datensätze wurden mit XDS und XSCALE verarbeitet.^[282]

Tabelle 43: Experimentelle Bedingungen der erfolgreichen Kristallisationen des *OsJAC1*-DIR-Domänenproteins.

Proben-ID	Pufferbedingungen Start	Start Konzentration [mg·mL ⁻¹]	Bedingungen Pufferreservoir
DIR46	15 mM TRIS-HCl, pH 7,4, 1 mM DTT	6,25	0,2 M CaCl ₂ , 20 % (w/v) PEG 3000 (<i>JCSG Core III, Qiagen</i>)
DIR48	15 mM TRIS-HCl, pH 7,4, 1 mM DTT	6,25	0,2 M Ammoniumdihydrogenphosphat, 0,1 M TRIS, pH 8,5, 50 % (v/v) MPD (<i>JCSG Core I, Qiagen</i>)

C.3.6.3 Strukturbestimmung und -verfeinerung

Alle in dieser Arbeit vorgestellten Strukturen wurden durch *molecular replacement* erhalten. Für die beiden Kristallformen von OsJAC1-DIR (ohne Liganden) wurde mit Hilfe von MoRDa^[283] auf der Grundlage der Struktur von PsPTS1 (PDB-Eintrag 6OOD) ein erstes Modell erstellt. Das ursprüngliche Modell wurde iterativ verbessert, indem abwechselnd eine reziproke Raumverfeinerung mit *phenix.refine*^[284] und ein manueller Umbau mit *Coot*^[285] durchgeführt wurde.

C.3.6.4 Liganden-Protein und Protein-Protein-Docking

Das Docking zwischen Liganden und der JRL-Domäne wurde mit *AutoDock Vina* durchgeführt.^[286] Vor dem Docking wurden den jeweiligen 3D-Domänenstrukturen Gasteiger- und Wasserstoffladungen hinzugefügt. *Chem3D*[®] wurde für den Aufbau von Ligandenstrukturen und zur Energieminimierung verwendet, sowie für die Erzeugung des .mol2-Formats der Liganden. *Open Babel* 2.3.1^[287] diente der Umformatierung der Ligandendatei in das .pdbqt-Format. Die beiden Bindestellen der JRL-Domäne (PDB-Eintrag: 7YWG) mit der Position 13,7 x 46,4 x 24,0 für Bindestelle 1 und der Position 38,5 x 46,4 x 24,0 für Bindestelle 2 wurden separat für das Docking implementiert. Als Boxgrößen wurden jeweils die Dimensionen von 24,8 x 28,1 x 21,98 = 15.310 Å³ verwendet.

Die Domäneninteraktion in OsJAC1 wurde *in silico* analysiert, indem beide Domänen über das webbasierte Docking-Programm HADDOCK V2.4 analysiert wurden.^[244] Vor dem Domain-Docking wurden mögliche Interaktionsreste für jede Domain mit dem Webtool CPORT^[245] vorhergesagt, diese sind in Tabelle 46 (S. 193) aufgelistet. Alle Standard-Dockingparameter aus HADDOCK V2.4 wurden ohne Abweichungen übernommen. Die Darstellung der Ligand-Protein- oder Protein-Protein-Interaktion erfolgte mit LigPlot⁺.^[239]

C.3.7 Analytische Methoden

C.3.7.1 Photometer

Die Absorption wurde mit einem Vollwellenlängenscan (UV-VIS) an einem Spektrophotometer (*UV-1800, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg*) durchgeführt. Für den Scan wurden zwei unterschiedliche Verdünnungen verwendet (10 und 1 mg·mL⁻¹).

C.3.7.2 Chirale-LC

Alle verwendeten Lösungsmittel waren von analytischem Gütegrad (> 99,5 %) und wurden vor ihrer Nutzung für 3 h im Ultraschallbad entgast. Die getrockneten Rückstände der Proben (0) wurden mit 250 µL Isopropanol/*n*-Hexan (1:2) gelöst. Als interner Standard wurde 0,3 mM Acetophenon (*Carl Roth*) verwendet. Die Messung erfolgte mittels des *Dionex UltiMate™ 3000* HPLC-Systems (*Thermo Fisher Scientific*) und einer *Chiralpeak® IA* (*Daicel*) Säule (250 mm x 4,6 mm, 5 µm). Als Eluent wurde eine Mischung aus 60 % 2-Propanol:*n*-Hexan (1:2) und 40 % *n*-Hexan verwendet. Es wurden 5 µL der Probe injiziert. Die Auftrennung erfolgte bei einer Flussrate von 0,5 mL·min⁻¹ und die Komponenten wurden bei einer Wellenlänge von 225 nm detektiert. Die Zuordnung der Signale erfolgte bereits durch *Dr. P. O. Sanwald*.^[280] Folgende Retentionszeiten wurden den Reaktionskomponenten zugeordnet: Acetophenon: 8,5-8,7 min; Coniferylalkohol (**3**): 12,8-13,1 min; Dehydrodiconiferylalkohol: 22,6 min; (–)-Pinoresinol (**4b**): 46,5-47,0 min; (+)-Pinoresinol (**4a**): 69,0-71,0 min. Die Berechnung des Enantiomerenüberschusses (*ee*) in % erfolgte über die Integrierten Flächen (*A*²) im Chromatogramm der zwei Enantiomere von Pinoresinol nach der folgenden Formel:

$$ee = \frac{e_1 - e_2}{e_1 + e_2} \cdot 100\%$$

Gleichung 2: Gleichung zur Berechnung des Enantiomerenüberschusses (*ee*) in % mit *e*₁ die Fläche von (–)-Pinoresinol (2b) und *e*₁ die Fläche von (+)-Pinoresinol (2a). Ein negativer *ee*-Wert entspricht einem Überschuss für (–)-Pinoresinol (2b).

C.3.7.3 MALDI-ToF-MS Analyse

Für die Proteinidentifikation von Banden aus SDS-PAGE-Gelen wurden MALDI-ToF-MS Messungen durchgeführt. Hierfür wurden die gewünschten SDS-PAGE-Bande mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. 750 µL einer 30 % (v/v) Acetonitril in 100 mM NH_4HCO_3 -Lösung wurden daraufhin zugegeben und für 10 min bei Raumtemperatur sehr vorsichtig geschüttelt (200 rpm). Der Überstand wurde sorgfältig verworfen. Diese Schritte wurden zweimal wiederholt. Das restliche Lösungsmittel wurde unter Verwendung einer Vakuumzentrifuge für 20 min bei 37 °C verdampft. Zur Rehydratation des Gelstücks wurden 6 µL eines TRIS-HCl-Puffers (3 mM, pH 8,8) mit Trypsin ($10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) hinzugegeben. Die Probe wurde daraufhin zentrifugiert und anschließend für 0,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Weitere 6 µL TRIS/Trypsin-Puffer wurden zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden 10 µL ddH₂O hinzugegeben und weitere 15 min inkubiert. Schließlich wurden 10 µL 30 % (v/v) Acetonitril mit 0,2 % (v/v) Trifluoressigsäure addiert und für 10 min inkubiert. Die Proben wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Messungen wurden am Institut für Bio- und Geowissenschaften IBG-1: Biotechnologie (Forschungszentrum Jülich) an einem *Daltonics Ultraflex III* TOF/TOF-Massenspektrometer (*Bruker*, Bremen) von C. Mack durchgeführt

D. Anhang

D.1 Studien zur heterologen Produktion der Dirigent-Proteine AtDIR6 aus *A. thaliana* und FiDIR1 aus *F. intermedia*

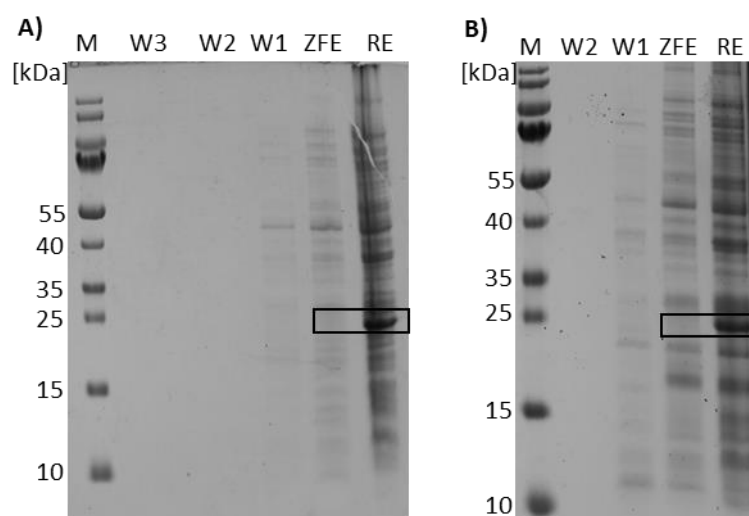


Abbildung 76: Coomassiegefärbte SDS-PAGE (10 %) der Löslichkeits-Assays für heterolog produzierte DIR-Proteine **A)** Überexpression von AtDIR6. **B)** Überexpression von AtDIR6. M = Marker; RE = Rohextrakt; ZFE = zellfreier Extrakt; W# = Waschfraktion.

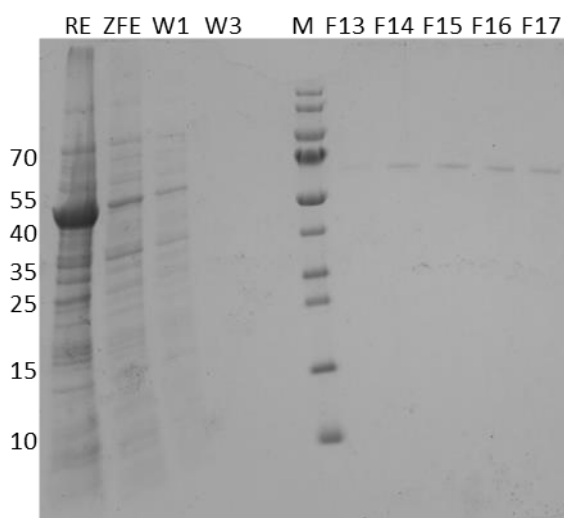


Abbildung 77: Coomassiegefärbte SDS-PAGE (10 %). Überexpression und Proteinisolation von AtDIR6-MBP-Fusionsprotein (60 kDa) mittels StrepTactin®-Affinitätschromatographie. M = Marker; RE = Rohextrakt; ZFE = zellfreier Extrakt; W# = Waschfraktion; F# = Elutionsfraktion.

<i>AtDIR6</i>	1	MAFLVEKQLFKALFSFFLLVLLFSDTV-LSFR--KTIDQ---KKPC	40
<i>A0A3B6C1Z4.1</i>	1	MQGLAAASRVVVLATFFLIGFG--VAAADGRRRLVSGSP---DEPC	41
<i>CSYAT2.1</i>	1	---MATSSPMFS--LFFLLLIIL-AASSSSTTTVLASSGGEDDGGV	40
<i>A0A3B6IU07.1</i>	1	---MAANTRSASLLRLTMLFSLAAAA--PPRSNETRDG--GGGKT	39
<i>A0A3B6AQK4.1</i>	1	MQGLTASSKLSLAVVFAVFLLG-SAGAAHGLTRVVSSSS--DEPC	42
<i>A0A3L6PWV2.1</i>	88	-----MDGPSRRKRNRGL	100
<i>K3ZZU3.1</i>	43	MQGLMPTCKLITVIPAILLLLGLMTGVAHGRRRLVSSH---GEP	85
<i>AtDIR6</i>	41	KHFSFYFHD--ILYDGDN-VANATSAAIVSPPGLG-----N	73
<i>A0A3B6C1Z4.1</i>	42	RQMTLFYHD--ILHDGANNTANATSAAATSPPALS-----ND	76
<i>CSYAT2.1</i>	41	THIHLYLHE--T-----FKGANATAI-----TAVASPRGSN	69
<i>A0A3B6IU07.1</i>	40	LSFTLYQQE--TINKTAYMVVDG-----VAGAGVSQTT	70
<i>A0A3B6AQK4.1</i>	43	NKMTLYYHD--ILYNGVNNTRNATSAAATKPTALSTTHW---KNG	82
<i>A0A3L6PWV2.1</i>	101	EAQHRLLTVPKPIVPKQGRSGPWSPTFNWPTRRSGPWCSTTSC	146
<i>K3ZZU3.1</i>	86	LNMTVYYHD--ILYDGTN-TANATAAAATQPTLLSRVS---IND	124
<i>AtDIR6</i>	74	FKFGKFFVIFDGPITMDKNYL---SKPVARAQGFYFY-DMKMDFNS	114
<i>A0A3B6C1Z4.1</i>	77	TYFGMLVVFD DDPVTEGQALPVGAEEEPAAARAGGFYFY-DGKGFFNA	121
<i>CSYAT2.1</i>	70	SSFGSVGVLDDEL RVGRDRS---SELVGRYQGIVMGTDVDGSADY	111
<i>A0A3B6IU07.1</i>	71	TPFGTVYVFRDNLTVHADGA---SPVVGVAEGTSIT---SLDG	108
<i>A0A3B6AQK4.1</i>	83	TYFGTLVVFN DPMTVGKALPVAG-EEPAARAGGFYFY-DKQESYTS	126
<i>A0A3L6PWV2.1</i>	147	ASAGTAGVRA-----RRAVPGPHHRHRPRR	171
<i>K3ZZU3.1</i>	125	TYFGEIVVFNDVVTAAPALA---SAPVARAEGFYFY-DRKEALSA	165
<i>AtDIR6</i>	115	WFSYTLV---FNSTEHK-GTLNIMGADLMMEPTRDLSVVGGTGDF	156
<i>A0A3B6C1Z4.1</i>	122	WFAFSLV---FNSTAHR-GTLNLMGADLMGEETRDLSVVGGTGDF	163
<i>CSYAT2.1</i>	112	LTCITYV---FTAGEYEGSTLSMQGPVLGFNGTIERPLVGGTGKFR	154
<i>A0A3B6IU07.1</i>	109	LLSLSLAKITIHHRGHR-GSVSVLGGTH-NTRQSDYPPVVGGTGDF	152
<i>A0A3B6AQK4.1</i>	127	WFGFSIV---FNSTAHK-GTMNLVGADLMDDKTRDLSVVGGTGDF	168
<i>A0A3L6PWV2.1</i>	172	RREL PDV---FTAGEYQGSTVSVLGPVLGFKGAI EHPVVGGTGKFR	214
<i>K3ZZU3.1</i>	166	WFAFSLV---FNSTAHR-GTLNLMGADLMAEKT RDLSVVGGTGDF	207
<i>AtDIR6</i>	157	MARGIATFVT-DL--FQGAKYFRVKMDIKLYECY-----	187
<i>A0A3B6C1Z4.1</i>	164	MARGVATIRT-DA--IEGLYYFRLQMDIKLYECYV-----	195
<i>CSYAT2.1</i>	155	MARGYSLFKL-LGNPTPATVLFEIDLFLVMYRGK-----	187
<i>A0A3B6IU07.1</i>	153	YALGYVRSSPVDLRGSTVTYKME LR LWPPYAPYAPT PQ---	191
<i>A0A3B6AQK4.1</i>	169	MARGIATLRL-DA--SEGTVYFRLQMDIKLYECYV-----	200
<i>A0A3L6PWV2.1</i>	215	MARGYSL LKV-----FEVDLFVLNCS CIAPSTSWLA	245
<i>K3ZZU3.1</i>	208	MARGVATLRT-DT--FQGLYYFRLQMDIKLYECYV-----	239

Abbildung 78: Sequenz-Alignment von *AtDIR6* und putativen pinoresinolbildende DIR-Homologe aus Süßgräsern. Schwarz eingerahmte Reste repräsentieren die putativen Reste in den Bindetaschen von *AtDIR6*, rote die Position der Glykosylierung und die Cystein-Reste in *AtDIR6* (gelb eingerahmt) bilden die intramolekulare Disulfidbrückenbindung aus.^[41] Konservierte Regionen (>50 % Identität) sind blau schattiert. Die Annotation der Homologe sind die jeweiligen UniProt-Einträge.^[111]

D.1.1 Pinoresinol Assay

Assay-Optimierung mittels Design of Experiment (DoE)

Tabelle 44: Übersicht der Ausgangsbedingungen und Ergebnisse für das erste Screening der dreidimensionalen Parameteroptimierung des Pinoresinol Assays durch DoE. Acetophenon wurde als interne Standard verwendet und diente zur Normierung der Ergebnisse (Summe von 4a und 4b).

#	Startbedingungen			Ergebnisse (Fläche)				Normiert
	Laccase [U]	3 [mM]	t [h]	Acetophenon	3	4b	4a	
5	8,75	1,625	1,875	126,319	205,804	3,826	2,8	0,05
4	8,75	1,625	1,875	152,628	96,475	6,015	7,042	0,09
15	16,25	1,625	1,875	143,257	0	14,095	12,655	0,19
14	16,25	1,625	1,875	141,371	57,413	10,135	10,556	0,15
21	8,75	3,875	1,875	137,692	292,645	4,67	4,295	0,07
18	8,75	3,875	1,875	144,883	432,011	5,361	4,685	0,07
2	16,25	3,875	1,875	932,55	111,396	3,891	4,565	0,01
10	16,25	3,875	1,875	136,885	212,923	6,595	5,316	0,09
19	8,75	1,625	4,625	140,327	16,952	4,074	3,811	0,06
9	8,75	1,625	4,625	132,803	12,925	7,894	6,11	0,11
26	16,25	1,625	4,625	140,872	0	15,796	13,467	0,21
28	16,25	1,625	4,625	134,898	1,472	14,336	13,24	0,20
1	8,75	3,875	4,625	927,776	204,472	22,804	22,346	0,05
27	8,75	3,875	4,625	142,743	99,625	11,942	10,493	0,16
13	16,25	3,875	4,625	145,224	4,259	41,994	44,084	0,59
11	16,25	3,875	4,625	132,233	13,515	27,826	28,168	0,42
6	5	2,75	3,25	122,151	229,707	8,762	9,145	0,15
16	20	2,75	3,25	139,489	6,261	11,444	11,478	0,16
17	12,5	0,5	3,25	142,769	8,385	0	0	0,00
20	12,5	5	3,25	148,019	83,602	12,387	12,265	0,17
8	12,5	2,75	0,5	131,474	141,503	2,583	3,11	0,04
3	12,5	2,75	6	802,386	0	8,152	8,258	0,02
12	12,5	2,75	3,25	144,12	45,977	12,061	11,413	0,16
23	12,5	2,75	3,25	143,583	29,183	15,877	17,746	0,23
25	12,5	2,75	3,25	139,581	12,764	14,338	17,584	0,23
24	12,5	2,75	3,25	141,855	65,56	14,682	15,332	0,21
7	12,5	2,75	3,25	135,527	82,485	9,321	9,184	0,14
22	12,5	2,75	3,25	141,263	107,153	13,415	12,028	0,18

Tabelle 45: Übersicht der Ausgangsbedingungen und Ergebnisse für die Validierung der dreidimensionalen Parameteroptimierung des Pinoresinol Assays durch DoE. Acetophenon wurde als interne Standard verwendet und diente zur Normierung der Ergebnisse (Summe von 4a und 4b).

#	Startbedingungen			Ergebnisse (Fläche)				Normiert 4a/4b
	Laccase [U]	CA (3) [mM]	t [h]	Acetophenon	CA (3)	4b	4a	
1_1	10,81	3,87	4,62	141,292	13,504	43,119	45,467	0,627
1_2	10,81	3,87	4,62	148,557	27,036	57,885	59,255	0,789
1_3	10,81	3,87	4,62	150,47	4,856	26,028	26,979	0,352
1_4	10,81	3,87	4,62	137,965	6,884	19,388	19,876	0,285
1_5	10,81	3,87	4,62	141,78	8,375	56,362	54,781	0,784
				Mittelwert				0,567
				Abweichung				0,212
3_1_1	8,75	3,3	3,9	137,93	7,495	47,303	49,268	0,700
3_1_2	8,75	3,3	3,9	133,629	11,513	39,04	38,322	0,579
3_2_1	8,75	3,3	2,5	137,117	18,345	13,505	15,41	0,211
3_2_2	8,75	3,3	2,5	135,972	118,858	4,04	4,18	0,060
3_3_1	8,75	2,2	3,9	128,383	13,858	12,205	12,091	0,189
3_3_2	8,75	2,2	3,9	135,34	3,522	19,778	19,718	0,292
3_4_1	8,75	2,2	2,5	134,128	36,605	7,758	8,058	0,118
3_4_2	8,75	2,2	2,5	134,577	15,688	15,383	16,23	0,235
1_1	10,81	3,87	1	164,185	325,318	18,892	21,017	0,243
1_2	10,81	3,87	1	162,156	356,426	19,657	21,223	0,252
2_1	10,81	3,87	2	159,16	160,825	23,336	25,063	0,304
2_2	10,81	3,87	2	160,111	100,561	23,559	23,577	0,294
3_1	10,81	3,87	3	160,59	50,45	53,755	53,932	0,671
3_2	10,81	3,87	3	158,095	48,532	28,451	29,757	0,368
4_1	10,81	3,87	4	157,798	14,838	29,794	28,927	0,372
4_2	10,81	3,87	4	159,131	52,932	59,164	57,407	0,733
5_1	10,81	3,87	5	158,049	38,031	23,392	24,413	0,302
5_2	10,81	3,87	5	158,74	32,482	28,603	29,392	0,365
6_1	10,81	3,87	6	154,436	0	45,062	45,664	0,587
6_2	10,81	3,87	6	158,449	0	32,734	31,118	0,403
7_1	10,81	3,87	7	155,978	0	60,177	59,132	0,765
7_2	10,81	3,87	7	155,765	28,295	22,045	21,135	0,277
8_1	10,81	3,87	8	155,795	69,71	43,574	42,83	0,555
8_2	10,81	3,87	8	153,5	56,415	58,246	58,609	0,761
9_1	10,81	3,87	9	155,848	45,189	39,921	38,393	0,503
9_2	10,81	3,87	9	154,741	46,312	27,368	27,824	0,357
10_1	10,81	3,87	10	153,311	50,863	25,49	24,804	0,328
10_2	10,81	3,87	10	150,865	29,212	39,366	37,473	0,509
24_1	10,81	3,87	24	152,015	0	0,908	8,982	0,065
24_2	10,81	3,87	24	148,779	0	7,341	6,098	0,090
blank_1	0	3,87	24	149,016	326,954	0	0	0,000
blank_2	0	3,87	24	149,74	346,06	0	0	0,000

D.1.2 MALDI-ToF-MS Analyse

Match to: **gi|430|ref|YP_XXXXXX.X|NHU050_1_3_FiDIR1** Score: **102** Expect: **2.7e-008**

Nominal mass (M_r): **23238**; Calculated pI value: **6.48**

NCBI BLAST search of [gi|430|ref|YP_XXXXXX.X|NHU050_1_3_FiDIR1](#) against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Number of mass values searched: **75**

Number of mass values matched: **13**

Sequence Coverage: **74%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MASHHHHHHG ADDDDKVPDP TSGENLYFQS RIQATYGRKP RPRRPCKELV
51 FYFHDVLFKG NNYHNATSAI VGSPQWGNKT AMAVPFNYGD LVVFDPPITL
101 DNNLHSPVVG RAQGMFYDQ KNTYNWLGF SFLFNSTKYV GTLNFAQADP
151 LLNKTRDISV IGGTGDFDMA RGVATLMTDA FEGDVYFRLR VDINLYECWR
201 IQGAG

Abbildung 79: Ergebnis der MALDI Analyse von *FiDIR1*. Die *FiDIR1*-Sequenzabschnitte, die identifiziert werden konnten, sind rot markiert. Es wurde eine Sequenzabdeckung von 74 % erreicht.

D.2 Biochemische Charakterisierung des Reisproteins OsJAC1

D.2.1 DLS-Daten

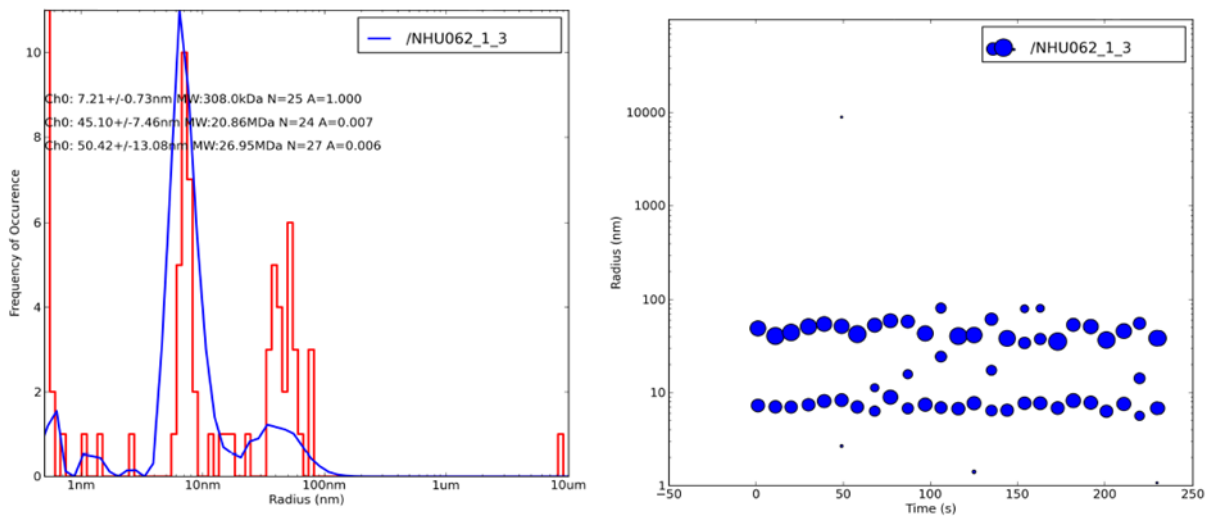


Abbildung 80: Dispersität und apparente Molekularmasse (MW) von *OsJAC1* in 15 mM TRIS-HCl (pH 7,4) bestimmt durch DLS. Histogramm (links) und Radien-Plot (rechts).

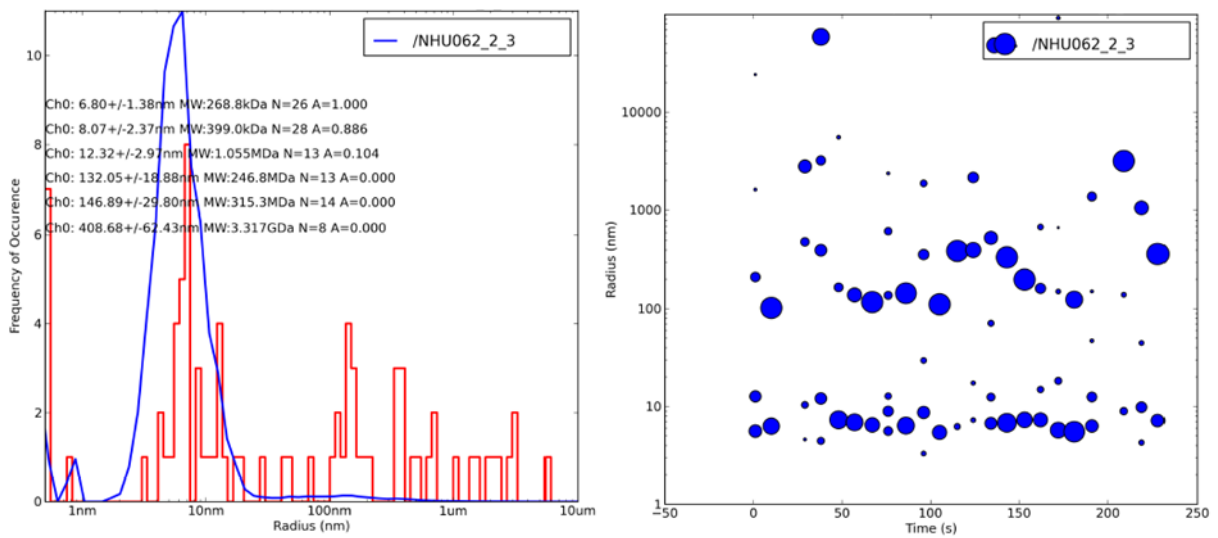


Abbildung 81: Dispersität und apparente Molekularmasse (MW) von *OsJAC1* in 15 mM TRIS-HCl (pH 7,4) und 150 mM CaCl₂ bestimmt durch DLS. Histogramm (links) und Radien-Plot (rechts).

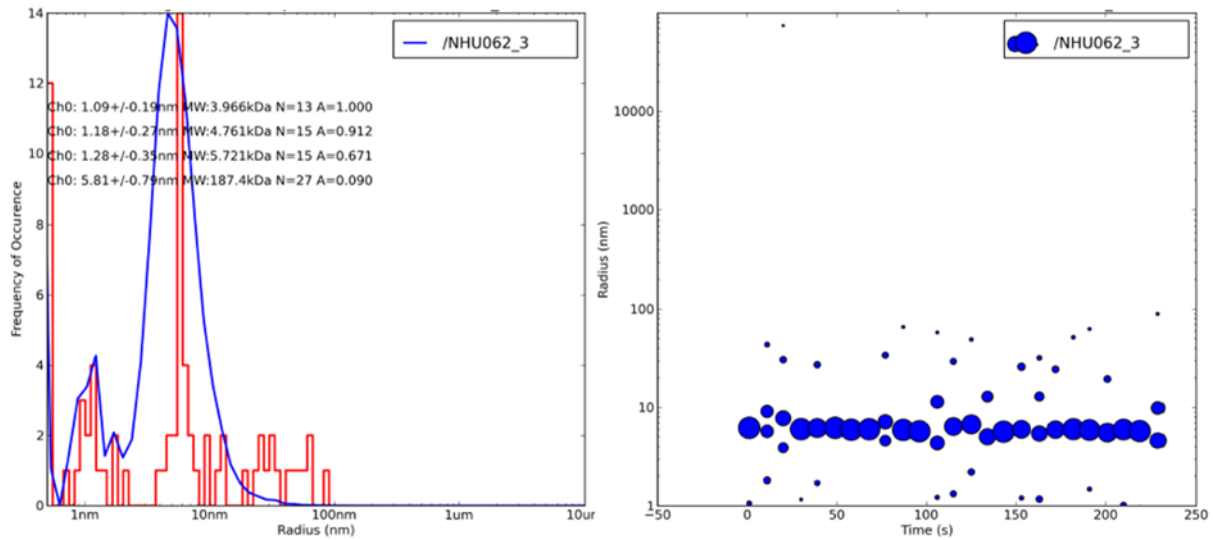


Abbildung 82: Dispersität und apparente Molekularmasse (MW) von OsJAC1 in 15 mM TRIS-HCl (pH 7,4) und 50 mM Laktose bestimmt durch DLS. Histogramm (links) und Radien-Plot (rechts).

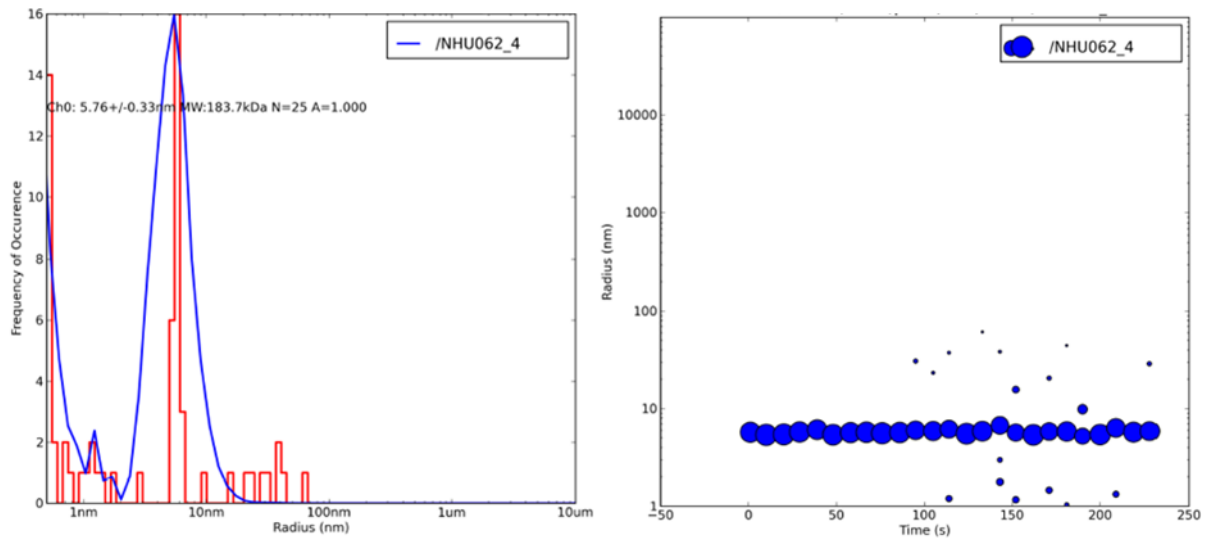


Abbildung 83: Dispersität und apparente Molekularmasse (MW) von OsJAC1 in 15 mM TRIS-HCl (pH 7,4) und 150 mM MgSO₄ bestimmt durch DLS. Histogramm (links) und Radien-Plot (rechts).

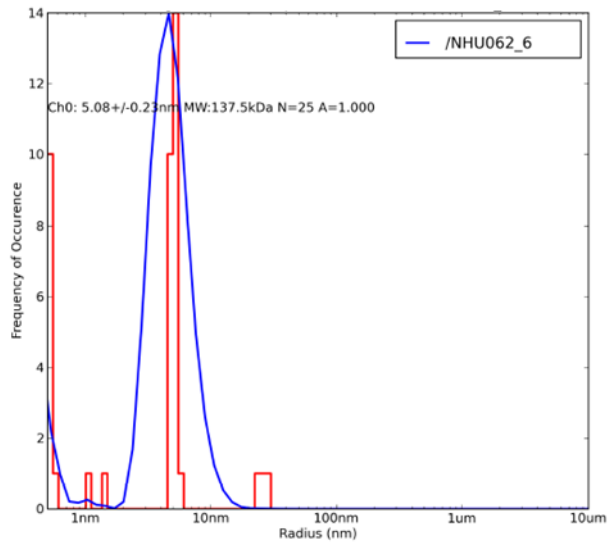


Abbildung 84: Dispersität und apparente Molekularmasse (MW) von *OsJAC1* in 15 mM TRIS-HCl (pH 7,4) und 4 mM DTT bestimmt durch DLS und dargestellt als Histogramm.

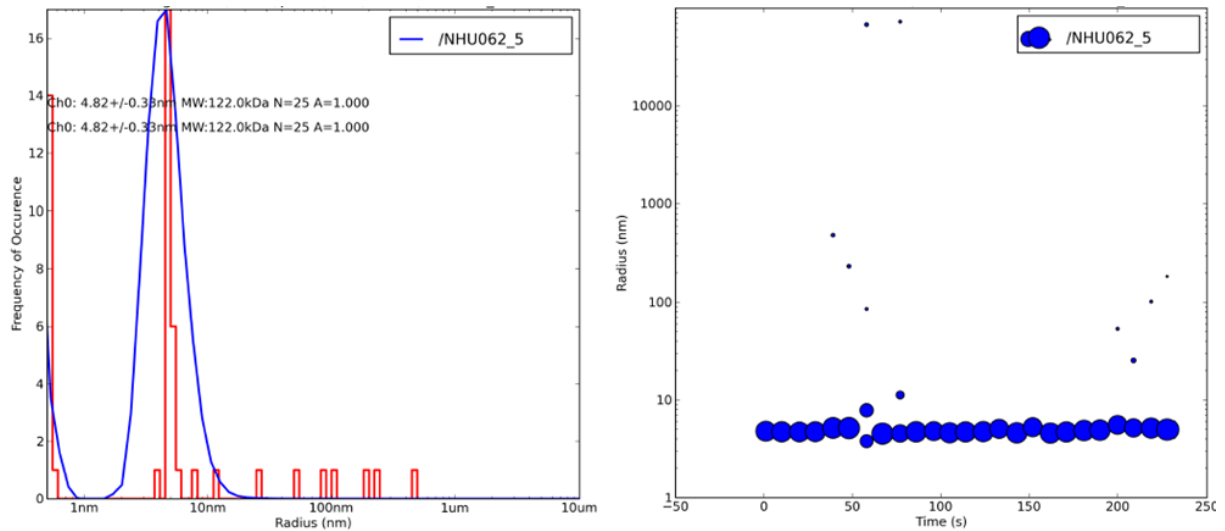


Abbildung 85: Dispersität und apparente Molekularmasse (MW) von *OsJAC1* in 15 mM TRIS-HCl (pH 7,4) mit 50 mM CaCl_2 und 50 mM Mannose bestimmt durch DLS. Histogramm (links) und Radien-Plot (rechts).

D.2.2 DSF-Daten**Tabelle 46:** Schmelzpunkt (T_M) des Übergangs über 70 °C für OsJAC1 und seine beiden Domänenproteine JRL und DIR in Abhängigkeit von verschiedenen Sacchariden (50 mM) ohne DTT (0 mM).

	OsJAC1		JRL		DIR	
0 mM DTT	T_{M2} (°C)	±	T_M (°C)	±	T_M (°C)	±
Kontrolle	85,1	0,05	73,7 °C - 74,2 °C	0,05	77,4 °C	0,02
Zucker						
1,2- α -Mannobiose	86,3	0,16				
1,4- β -D-Galactobiose	91,1	0,12	74,3	0,12	80,0	0,16
D-(+)-Cellobiose	85,6	0,04	74,1	0,03	78,0	0,03
D-(+)-Galaktose	87,1	0,25	74,5	0,09	80,6	0,04
D-(+)-Glucose	85,4	0,05	74,9	0,05	77,8	0,05
D-(+)-Mannose	85,3	0,04	75,2	0,04	77,7	0,05
D-(+)-Melibiose	88,5	0,18	74,3	0,06	82,8	0,19
D-(+)-xylose	85,1	0,04	74,6	0,04		
D-Mannitol	85,7	0,15				
D-Sorbitol	85,4	0,04	74,4	0,06		
Galactan	84,7	0,05	74,3	0,12	77,4	0,10
L-(+)-Rhamnose	85,0	0,15	74,4	0,03		
Lactose	88,9	0,13	74,6	0,05	82,5	0,07
Laminaribiose	84,7	0,01	75,9	0,03	77,8	0,33
Maltose	85,6	0,04	74,7	0,06		
N,N'-Diacetylchitobiose	85,8	0,18	74,5	0,20	77,9	0,11
N-Acetyl-D-Galaktosamin	85,6	0,17	74,3	0,06	78,7	0,17
N-Acetyl- β -D-Glucosamin	85,6	0,06	74,9	0,07		
Sucrose	85,7	0,12	74,6	0,06		

Tabelle 47: Schmelzpunkte (T_M) von *OsJAC1*- und DIR/JRL-Proteinmischung (2:1) in Abhängigkeit von verschiedenen Sacchariden (50 mM) mit 4 mM DTT.

Mit 4 mM DTT	<i>OsJAC1</i>				JRL/DIR			
	T_{M1} (°C)	±	T_{M2} (°C)	±	T_{M1} (°C)	±	T_{M2} (°C)	±
Kontrolle	60,7	0,08	85,7	0,11	59,4	0,14	77,7	0,03
Zucker								
1,2- α -Mannobiose	62,6	0,08	85,8	0,09	61,2	0,19	78,2	0,20
1,4- β -D-Galactobiose	61,1	0,06	91,9	0,12	59,7	0,07	85,8	0,06
D-(+)-Cellobiose	60,9	0,00	85,2	0,13	59,9	0,19	77,9	0,09
D-(+)-Galaktose	61,2	0,08	87,6	0,08	59,7	0,05	80,6	0,07
D-(+)-Glucose	61,8	0,19	85,8	0,24	60,4	0,02	77,9	0,02
D-(+)-Mannose	61,8	0,14	85,6	0,09	60,8	0,10	78,0	0,04
D-(+)-Melibiose	61,1	0,00	88,8	0,07	59,8	0,17	82,4	0,13
D-(+)-Trehalose	62,3	0,04	85,6	0,10	61,4	0,46	78,1	0,50
Galactan					59,2	0,03	78,0	0,01
Lactose	61,0	0,02	88,7	0,02	59,7	0,01	81,9	0,02
Laminaribiose	63,3	0,08	86,3	0,02	61,6	0,06	78,5	0,01
<i>N,N'</i> -Diacetylchitobiose					59,6	0,08	78,0	0,01
<i>N</i> -Acetyl-D-Galactosamin					59,6	0,03	78,5	0,03
<i>N</i> -Acetylneuraminsäure	60,6	0,19	87,1	0,09	61,0	0,03	79,2	0,02
<i>N</i> -Acetyl- β -D-Glucosamin					60,0	0,09	78,0	0,07

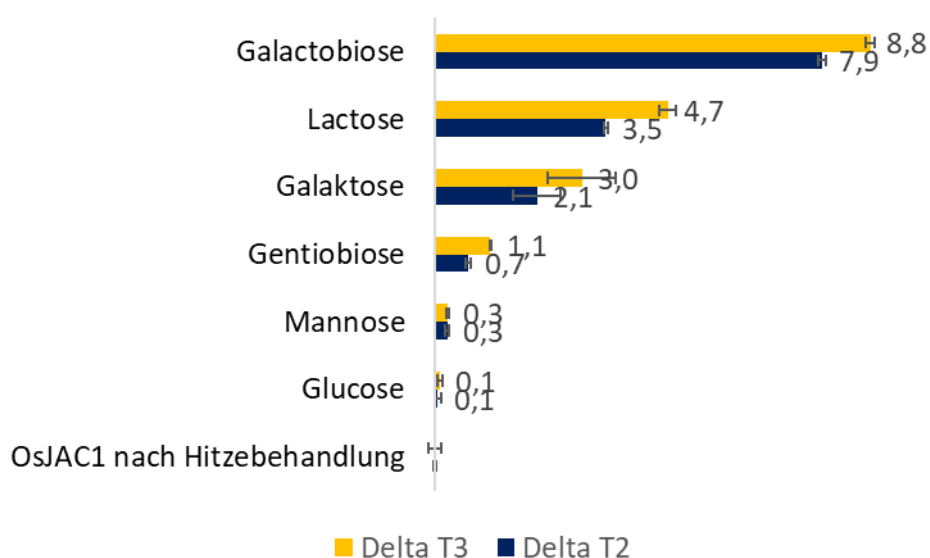


Abbildung 86: Ermittelte ΔT_{M2} und ΔT_{M3} von *OsJAC1* nach der Hitzebehandlung (10 min bei 60 °C) unter reduzierenden Bedingungen (4 mM DTT) nach Zugabe von unterschiedlichen Sacchariden (50 mM).

D.2.3 *In silico* Daten

Tabelle 48: Die folgenden Reste wurden für das HADDOCK-Protein-Protein-Docking^[244] der beiden OsJAC1-Domänenproteine (DIR und JRL) und für die Untersuchung der Oligomerezustände ausgewählt.

OsJAC1-Domäne	Ausgewählte Reste für das Protein-Protein Docking
DIR (Docking-Modell des Volllängenproteins)	42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 60, 78, 79, 80, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 90, 92, 94, 98, 101, 102, 106, 108, 109, 110, 111, 115, 116, 118, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 127, 128, 130, 131, 132, 134, 152, 153, 156
JRL (Docking-Modell des Volllängenproteins)	160, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 206, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 216, 217, 219
JRL-Interaktion (Dimer des Volllängenprotein-Modells)	160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 273, 274, 276, 277, 278, 280
DIR-Interaktion (Dimer des Volllängenprotein-Modells)	42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 60, 78, 79, 80, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 90, 92, 94, 98, 101, 102, 106, 108, 109, 110, 111, 115, 116, 118, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 127, 128, 130, 131, 132, 134, 152, 153, 156

Tabelle 49: HADDOCK-Protein-Protein-Docking^[244] Ergebnisse für das Volllängenmodell und die beiden putativen Oligomerezustände.

Docking Ergebnisse	Volllängenmodell Abbildung 54	Dimer-Dimer Abbildung 56	Dimer-Dimer Abbildung 57
HADDOCK Ergebnis	-48,2 ± 7,5	-102,8 ± 1,3	-36,3 ± 12,0
Cluster Größe	22	200	13
RMSD	14,9 ± 0,2	1,1 ± 0,7	0,9 ± 0,6
Van der Waals Energie	-63,0 ± 5,5	-72,8 ± 1,4	-75,2 ± 10,2
Elektrostatische Energie	-92,8 ± 6,2	-69,4 ± 14,3	-326,0 ± 31,9
Desolvierungsenergie	-3,7 ± 2,5	-18,1 ± 2,1	-9,4 ± 1,6
<i>Restraints violation</i> Energie	370,9 ± 15,9	20,2 ± 6,6	1134,5 ± 44,9
Interaktionsoberfläche	2128,0 ± 57,3	1777,5 ± 42,0	3105,8 ± 216,5
Z-Score	-0,6	0,0	-1,9

		10		20		30		40	
OsJAC1	M A D P S	K L Q I T P C G M	L V Q G N Q I N F T K	L Y L H H T P A G P E Q N Q S					
TaVER2	- - - M A K	F Q I T P F P G L V E N T E F N F G S L Y L Y N I S N P P S Y - - A							
		50		60		70		80	
OsJAC1	A V T S	N D K K I G L G C I V V N N W S V Y D G I G S D A K L V A Y A K G L H V							
TaVER2	S I K E N N A T T	G W G G A S L V N W Q I Y D G D G S G A N L V G H A Q G M Q I							
		90		100		110		120	
OsJAC1	F A G A W H N S F S	L V F E D E R L K G S T L Q V M G L I V - - - E E G D W A I							
TaVER2	H A G A S H Q S F T	L V F E N G R F K G S T L Y V V G Q T V R V E Q A G E W S I							
		130		140		150		160	
OsJAC1	V G G T G Q F A M A T G V I L K K M Q E Q K Q Y G N I I E L T I H G F C P L L K								
TaVER2	V G G T G D L A M A R G V V K V K F H E K V K D G N T W E L R F H G F C S M Q S								
		170		180		190		200	
OsJAC1	G S Q C P V T K I G P W G S S H E G T V Q D I T E S P K R L E S I T L Y H G W S								
TaVER2	- - L P T L T K T G P W G G H G G S - - V T E S E Q P W R I E S M T I V H E G I								
		210		220		230		240	
OsJAC1	V D S I S F T Y L D H A G E K H K A G P W G G P G G D P I M I E F G S S E F L K								
TaVER2	I A M F S C S Y V D L S G K R R T T G S W G G G N G I R T K V E L G P R E I L K								
		250		260		270		280	
OsJAC1	E V S G T F G - P Y E G S T V I T S I N F I T N K Q T Y G P F G R Q E G T P F S								
TaVER2	A V S G T Y V S L Y N G Q T V I E S L K F V T N E G T Y G P Y G R T T G T P F N								
		290		300		310		320	
OsJAC1	V P A Q N N S S I V G F F G R S G K Y - I N A V G V Y V Q P I								
TaVER2	A D V P K D Q S I V G F F G R A D D T Q L I A F G V Y T V - -								

Abbildung 87: Sequenz-Alignment von *OsJAC1* und *TaVER2*. Eingerahmte Reste repräsentieren: Putative Bindestelle der DIR-Domäne von *OsJAC1* (schwarz), putative Bindestelle 1 (rot) und 2 (grün) der JRL-Domäne von *OsJAC1* und die Phosphorylierungsstelle von *TaVER2* (gelb).

Tabelle 50: Ergebnisse bzw. verwendete Messgrößen von RaptorX,^[224] um die Qualität des dreidimensionalen Strukturmodells für das Volllängenprotein (*OsJAC1*) zu bewerten.

Ergebnisse / Messgröße	DIR-Domäne	JRL-Domäne
<i>P</i> -Wert	4,13e ⁻⁸	1,28e ⁻⁸
<i>Score</i>	128	150
<i>SeqID</i> [%]	28	41
<i>uGDT</i> (<i>GDT</i>)	111 (70)	129 (88)
Template (PDB-Eintrag)	6OOD, 6OOC, 5LAL	6FLZ, 5GVY, 7KMV

D.2.4 Hämagglutinations-Assay

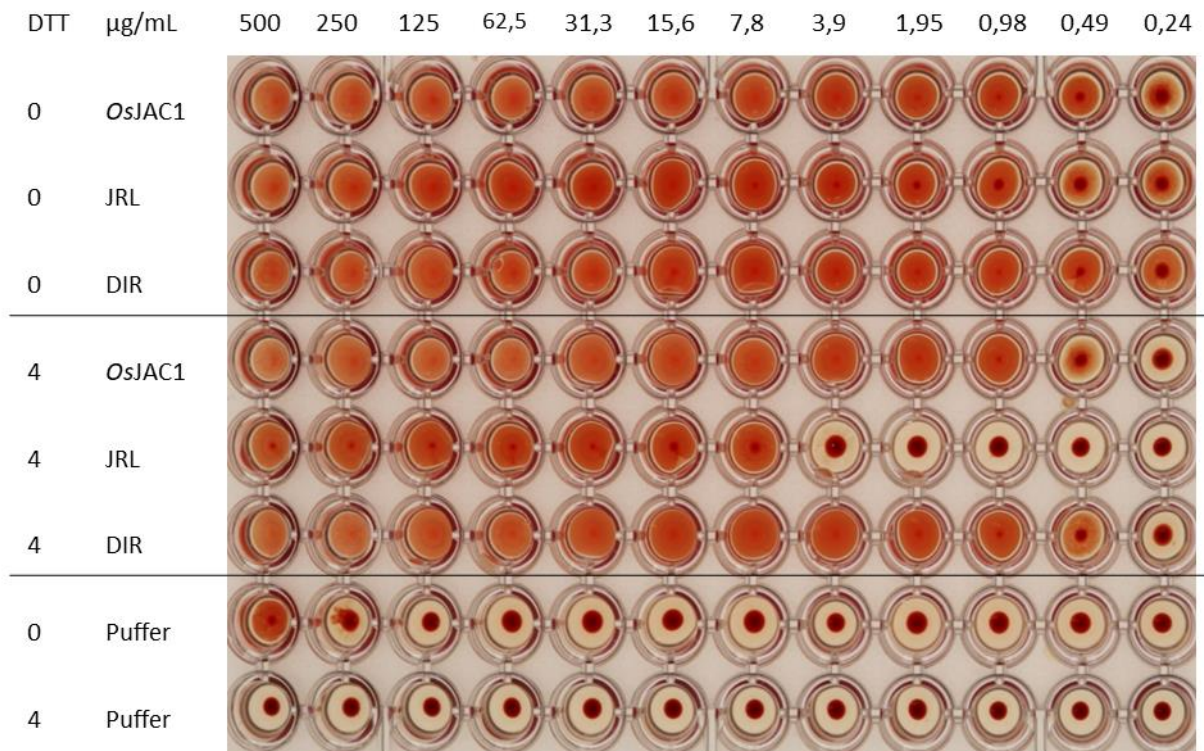


Abbildung 88: Replikat des Hämagglutinations-Tests von Kaninchen-Erythrozyten mit *OsJAC1* und seinen Domänen (JRL und DIR) unter oxidierenden (0 mM DTT) oder reduzierenden (4 mM DTT) Testbedingungen.

D.3 Vektorkarten, Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

D.3.1 Expressionsvektoren

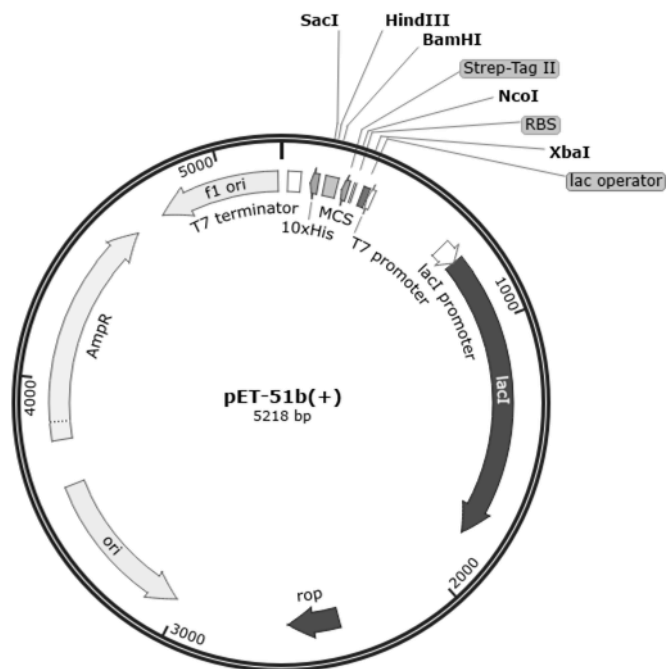


Abbildung 89: Vektorkarte von pET-51b(+).

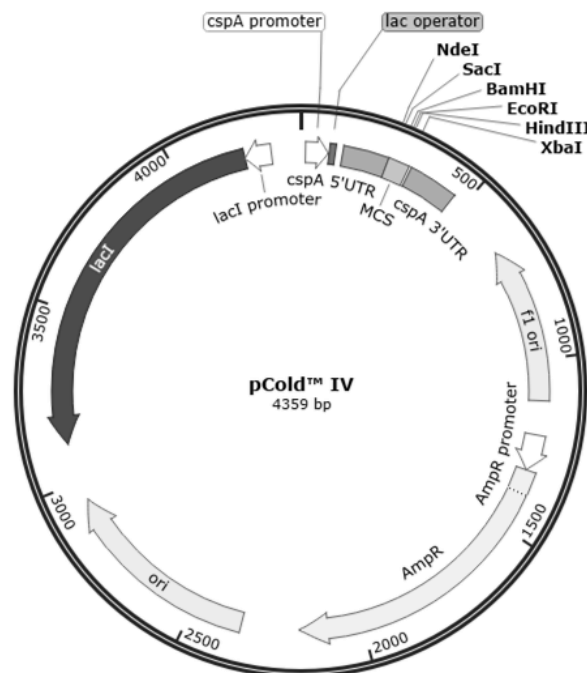


Abbildung 90: Vektorkarte des Expressionssystems pCold™ IV mit ausgewählten Positionen der Restriktionsschnittstellen.

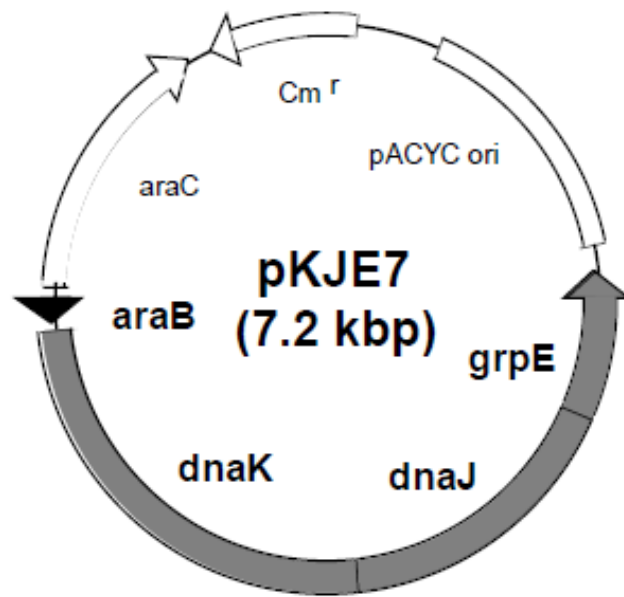


Abbildung 91: Vektorkarte pKJE7 laut Herstellerangabe (*Takara Bio Inc.*, Kusatsu City, Japan).

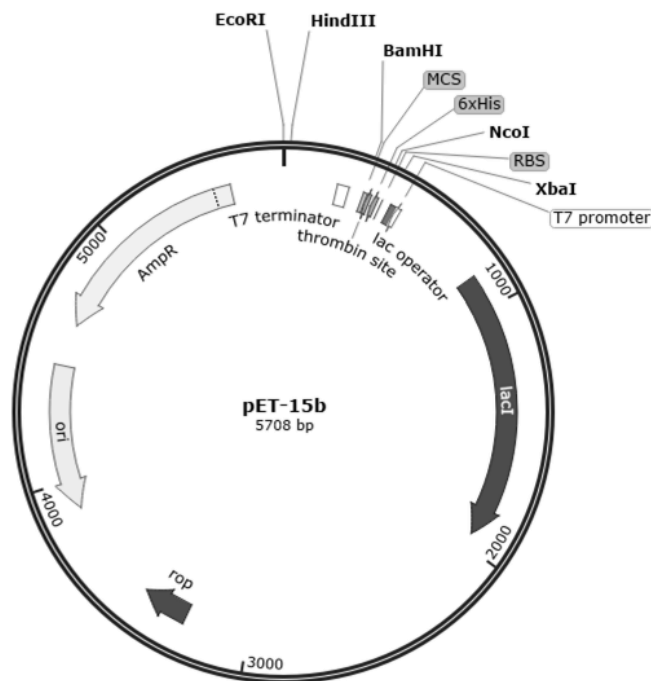


Abbildung 92: Vektorkarte für pET-15b.

D.3.1.1 Vektorkarten – Pflanzliche DIR-Proteine im pET51b(+) Vektor

Die folgenden Vektoren wurden von *J. Rosengarten* während ihrer Tätigkeit in der Arbeitsgruppe von *Dr. T. Classen* erstellt und im Rahmen dieser Arbeit übernommen.

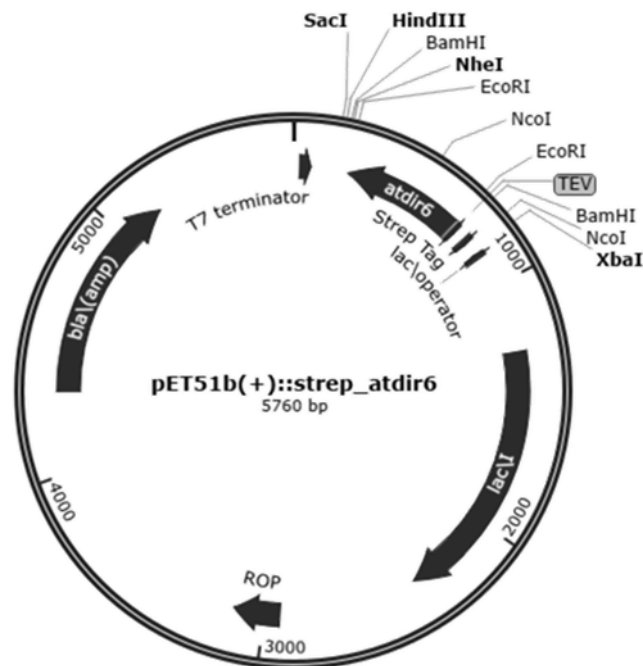


Abbildung 93: Vektorkarte von pET51b(+)::strep_atdir6.

Nukleotidsequenz (5'→3') von atdir6 mit einem Strep®-Tag

```
CTAGCCGGCGCCCTGAATTCTGTAGCATTCTGACAGTTTGATATCCATTTTAACACGGAAGTATTTTCG
CGCCCTGGAACAGGTCGGTAACGAAGGTCGCAATACCACGCGCCATAAAGAAGTCACCGGTGCCAC
CAACCACGCTCAGATCACGGGTCGGTTCATCATCAGATCCGCACCCATGATGTTTCAGGGTACCTTTG
TGCTCGGTGCTGTTGAACACCAGGGTATAGCTGAACCAGCTGTTGAAGTCCATCTTCATGTCATAGA
AGTAAAAACCTGCGCACGCGCAACCGGTTTGCTCAGGTAGTTCTTGTCCATGGTGATCGGACCGTC
AAAGATCACGAATTTGCCAACTTGAAGTTACCCAGACCCGGCGGGCTAACAATCGCCGCGCTGGTC
GCGTTCGCCACATTGTCGCCGTCATACAGGATATCATGGAAGTAAAAGCTAAAGTGTTTGCACGGTT
TCTTCTGATCGATGGTCTTGCAGGAATTGAATTCTACTCTGAAAATACAGATTTTCCCACTAGTTGGAT
CCGGTACCTTGTCGTCGTCATCTGCACCCTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAGCTTGCCAT
```

Aminosäuresequenz von AtDIR6 mit einem Strep®-Tag

```
MASWSHPQFEKGADDDDKVPDPTSGENLYFQSRIQFRKTIDQKKPCKHFSFYFHDILYDGDNVANATSA
AIVSPPGLGNFKFGKFVIFDGPITMDKNYLSKPVARAQGFYFYDMKMDFNSWFSYTLVFNSTEHKGTLLI
MGADLMMEPTRDLSVVGTTGDFFMARGIATFVTDLFQGAQYFRVKMDIKLYECYRIQGAG
```

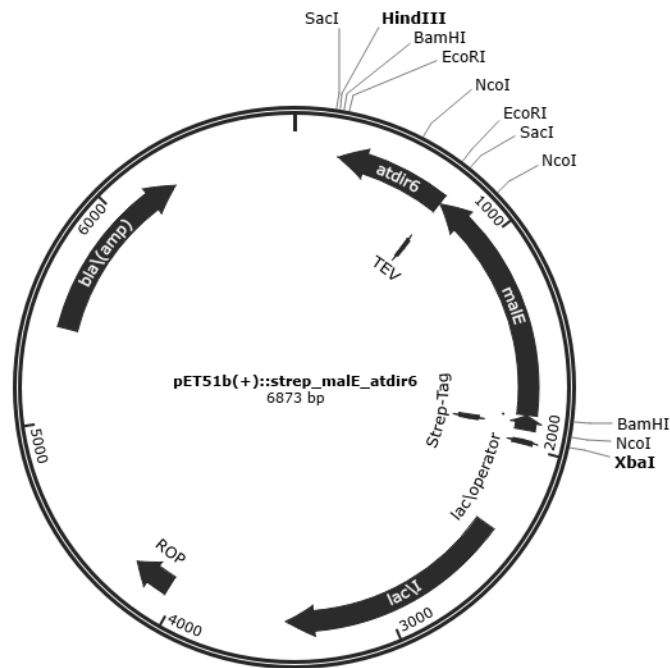


Abbildung 94: Vektorkarte von pET51b(+):strep_malE_atdir6. Gen *malE* kodiert für das Protein MBP.

Nukleotidsequenz (5'→3') von *strep_malE_atdir6*

CTAGCCGGCGCCCTGAATTCTGTAGCATTCGTACAGTTTGATATCCATTTTAACACGGAAGTATTTTCG
CGCCCTGGAACAGGTCGGTAACGAAGGTCGCAATACCACGCGCCATAAAGAAGTCACCGGTGCCAC
CAACCACGCTCAGATCACGGGTCGGTTCATCATCAGATCCGCACCCATGATGTTTCAGGGTACCTTTG
TGCTCGGTGCTGTTGAACACCAGGGTATAGCTGAACCAGCTGTTGAAGTCCATCTTCATGTCATAGA
AGTAAAAACCTGCGCAGCGCAACCGGTTTGCTCAGGTAGTTCTTGTCATGGTGATCGGACCGTC
AAAGATCACGAATTTGCCAACTTGAAGTTACCCAGACCCGGCGGGCTAACAATCGCCGCGCTGGTC
GCGTTCGCCACATTGTCGCCGTCATACAGGATATCATGGAAGTAAAAGCTAAAGTGTTTGCACGGTT
TCTTCTGATCGATGGTCTTGCGGAATTGAATTCTACTCTGAAAATACAGATTTTCCCAATCGAGCTCG
AATTAGTCTGCGCGTCTTTCAGGGCTTCATCGACAGTCTGACGACCGCTGGCGGCGTTGATCACCGC
AGTACGCACGGCATAACCAGAAAGCGGACATCTGCGGGATGTTGCGCATGATTTACCTTTCTGGGCG
TTTTCCATGGTGGCGGCAATACGTGGATCTTTCGCCAACTCTTCCTCGTAAGACTTCAGCGCTACGGC
ACCCAGCGGTTTGTCTTTATTAACCGCTTCAGACCTTCATCAGTCAGCAGATAGTTTTCGAGGAACT
CTTTCGCCAGCTCTTTGTTTCGGACTGGCGGCGTTAATACCTGCGCTCAGCACGCCAACGAACGGTTTG
GATGGTTGACCCTGAAGGTCGGCAGTACCGTTACACCATAATCACTTTGCTGGTGTGATGTTGGA
CCATGCCACGGGCGGTTGATGGTCATCGCTGTTTCGCCTTTATTAAAGGCAGCTTCTGCGATGGAGT
AATCGGTGTCTGCATTCATGTGTTTGTGTTTAAATCAGGTCAACCAGGAAGGTCAGACCCGCTTTCGCG
CCAGCGTTATCCACGCCCACGTCTTTAATGTCGTAAGTGGCGTTTTTCATACTTGAACGCATAACCCCCG
TCAGCAGCAATCAGCGGCCAGGTGAAGTACGGTTCTTGACAGGTTGAACATCAGCGCGCTCTTACCTT

TCGCTTTCAGTTCTTTATCCAGCGCCGGGATCTCTTCCCAGGTTTTTGGCGGGTTCGGCAGCAGATCT
 TTGTTATAAATCAGCGATAACGCTTCAACAGCGATCGGGTAAGCAATCAGCTTGCCGTTGTAACGTA
 CGGCATCCCAGGTAAACGGATACAGCTTGTCTGGAACGCTTTGTCCGGGGTGATTTACGCCAACAG
 GCCAGATTGAGCGTAGCCACCAAAGCGGTCGTGTGCCAGAAGATAATGTCAGGGCCATCGCCAGT
 TGCCGCAACCTGTGGGAATTTCTCTCCAGTTTATCCGGATGCTCAACGGTGACTTTAATTCCGGTATC
 TTTCTCGAATTTCTTACCGACTTCAGCGAGACCGTTATAGCCTTTATCGCCGTTAATCCAGATTACCAG
 TTTACCTTCTTCAGTTTTTCATGGTTGGATCCGGTACCTTGTCTGTCGTCATCTGCACCCTTTTCGAACTGC
 GGGTGGCTCCAGCTTGCCAT

Aminosäuresequenz von MBP-AtDIR6 mit einem Strep®-Tag

MASWSHPQFEKGADDDDKVPDPTMKTEEGKLVIWINGDKGYNGLAEVGKKFEKDTGIKVTVEHPDKLE
 EKFPQVAATGDGPDIIFWAHDRFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALSL
 IYNKDLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGKYDIKDVGVND
 AGAKAGLTFLVDLIKNKHMNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLPTFKGQ
 PSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPLGAVALKSYYEELAKDPRIAATMENA
 QKGEIMPNIQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKDAQTNSSSIGENLYFQSRIQFRKTIDQKKPCK
 HFSFYFHDILYDGDNVANATSAAIVSPPGLGNFKFGKFVIFDGPITMDKNYLSKPVARAQGFYFYDMKMD
 FNSWFSYTLVFNSTEHKGTNLNIMGADLMMEPTRDLSVVGGTGDDFMARGIATFVTDLFQGAKYFRVKM
 DIKLYECYRIQGAG

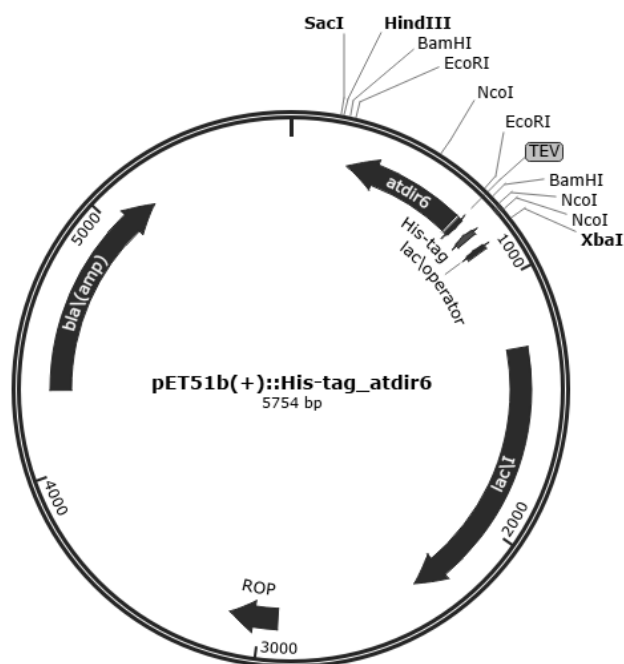


Abbildung 95: Vektorkarte von pET51b(+):his-tag_atdir6.

Nukleotidsequenz (5'→3') von *atdir6* mit einem His₆-Tag

CTAGCCGGCGCCCTGAATTCTGTAGCATTCGTACAGTTTGATATCCATTTTAACACGGAAGTATTTTCG
CGCCCTGGAACAGGTCGGTAACGAAGGTCGCAATACCACGCGCCATAAAGAAGTCACCGGTGCCAC
CAACCACGCTCAGATCACGGGTCGGTTCATCATCAGATCCGCACCCATGATGTTTCAGGGTACCTTTG
TGCTCGGTGCTGTTGAACACCAGGGTATAGCTGAACCAGCTGTTGAAGTCCATCTTCATGTCATAGA
AGTAAAAACCTGCGCACGCGCAACCGGTTTGCTCAGGTAGTTCTTGTCCATGGTGATCGGACCGTC
AAAGATCACGAATTTGCCAACTTGAAGTTACCCAGACCCGGCGGGCTAACAATCGCCGCGCTGGTC
GCGTTCGCCACATTGTCGCCGTCATACAGGATATCATGGAAGTAAAAGCTAAAGTGTTCACGGTT
TCTTCTGATCGATGGTCTTGCAGGAATTGAATTCTACTCTGAAAATACAGATTTTCCCACTAGTTGGAT
CCGGTACCTTGTCGTCGTCATCTGCACCATGGTGGTGATGATGGTGGCTTGCCAT

Aminosäuresequenz von *AtDIR6* mit einem His₆-Tag

MASHHHHHHGADDDDKVPDPTSGENLYFQSRIQFRKTIDQKPKCHKFSFYFHDILYDGDNVANATSAAI
VSPPLGLGNFKFGKFVIFDGPITMDKNYLSKPVARAQGFYFYDMKMDFNSWFSYTLVFNSTEHKGTLMIM
GADLMMEPTRDLSSVGGTGDFFMARGIATFVTDLFQGAQYFRVKMDIKLYECYRIQGAG

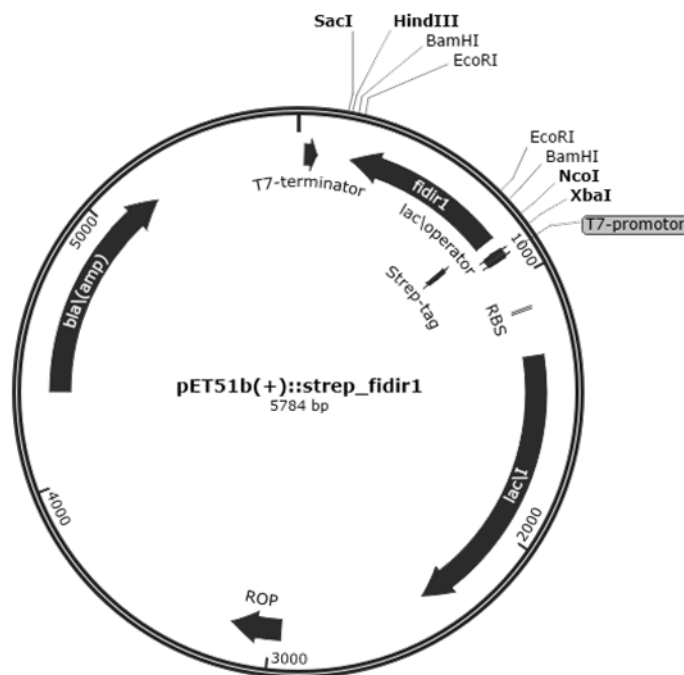


Abbildung 96: Vektorkarte von pET51b(+):strep_fidir1.

Nukleotidsequenz (5'→3') von *fidir1* mit einem Strep[®]-Tag

CTAGCCGGCGCCCTGAATTCTCCAGCACTCGTACAGATTGATGTCAACACGCAGACGGAAGTAAACG
TCGCCCTCGAACGCGTCGGTCATCAGGGTCGCAACACCACGCGCCATGAAAAAGTCACCGGTGCCAC
CAATCACGCTGATATCACGGTCTTGTTTCAGCAGCGGGTCCGCACCCGCGAAGTTCAGGGTACCCAC
GTACTTGGTGCTGTTGAACAGAAAGCTGAAACCCAGCCACGCGTTGTAGGTGTTCTTCTGGTCGTAG

AAATACATGCCCTGCGCACGACCAACCGGCGGGCTGTGCAGGTTGTTATCCAGGGTGATCGGATCGT
 CGAACACAACCAGATCACCGTAGTTGAACGGAACCGCCATCGCGGTCTTGTTACCCCATTGCGGGCT
 ACCAACGATCGCGCTGGTCGCGTTGTGGTAGTTATTGCCTTTGAACAGCACATCGTGGAAGTAAAC
 ACCAGCTCCTTGACGGGCGGCGGGCGCGGCTTGCGGCCATAGGTCGCTTGAATTCTACTCTGAA
 AATACAGATTTTCCCCACTAGTTGGATCCGGTACCTTGTCGTCGTCATCTGCACCCTTTTCGAACTGCG
 GGTGGCTCCAGCTTGCCAT

Aminosäuresequenz von *FiDIR1* mit einem Strep®-Tag

MASWSHPQFEKGADDDDKVPDPTSGENLYFQSRIQATYGRKPRPRRPCKELVFYFHDVLFKGNNYHNA
 TSAIVGSPQWGNKTAMAVPFNYGDLVVFDDPITLDNNLHSPVGRAQGMFYDQKNTYNWLGFSL
 FNSTKYVGTLNFAGADPLLNKTRDISVIGGTGDDFMARGVATLMTDAFEGDVYFRLRVDINLYECWRIQG
 AG

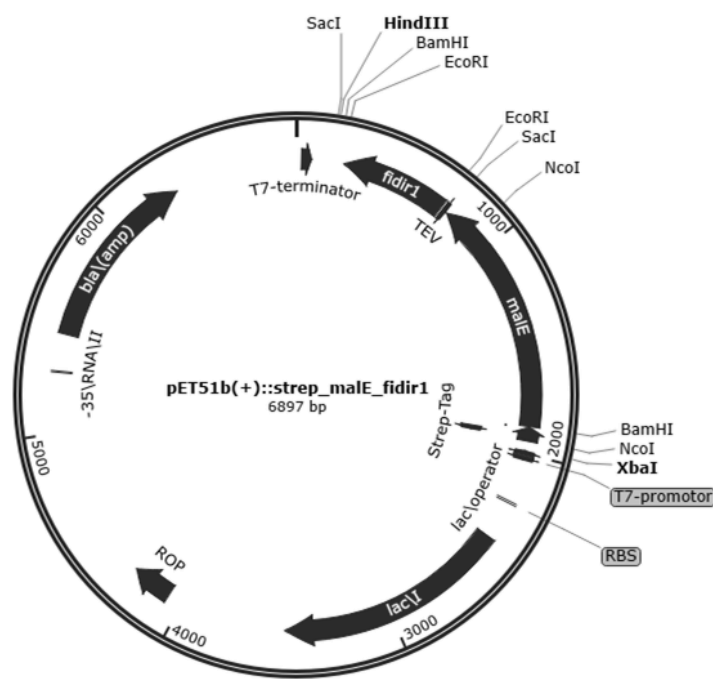


Abbildung 97: Vektorkarte von pET51b(+):strep_male_fidir1. Gen *male* kodiert für das Protein MBP.

Nukleotidsequenz (5'→3') von *strep_male_fidir1*

CTAGCCGGCGCCCTGAATTCTCCAGCACTCGTACAGATTGATGTCAACACGCAGACGGAAGTAAACG
 TCGCCCTCGAACGCGTCGGTCATCAGGGTCGCAACACCACGCGCCATGAAAAAGTCACCGGTGCCAC
 CAATCACGCTGATATCACGGGTCTTGTTTCAGCAGCGGGTCCGCACCCGCGAAGTTCAGGGTACCCAC
 GTACTTGGTGCTGTTGAACAGAAAGCTGAAACCCAGCCACGCGTTGTAGGTGTTCTTCTGGTCGTAG
 AAATACATGCCCTGCGCACGACCAACCGGCGGGCTGTGCAGGTTGTTATCCAGGGTGATCGGATCGT
 CGAACACAACCAGATCACCGTAGTTGAACGGAACCGCCATCGCGGTCTTGTTACCCCATTGCGGGCT
 ACCAACGATCGCGCTGGTCGCGTTGTGGTAGTTATTGCCTTTGAACAGCACATCGTGGAAGTAAAC

ACCAGCTCCTTGACGGGCGGCGGGCGCGGCTTGCGGCCATAGGTCGCTTGAATTCTACTCTGAA
AATACAGATTTTCCCAATCGAGCTCGAATTAGTCTGCGCGTCTTTCAGGGCTTCATCGACAGTCTGA
CGACCGCTGGCGGCGTTGATCACCGCAGTACGCACGGCATAACCAGAAAGCGGACATCTGCGGGATG
TTCGGCATGATTTACCTTTCTGGGCGTTTTCCATGGTGGCGGCAATACGTGGATCTTTCGCCAACTC
TTCCTCGTAAGACTTCAGCGCTACGGCACCCAGCGGTTTGTCTTTATTAACCGCTTCCAGACCTTCATC
AGTCAGCAGATAGTTTTCGAGGAACTCTTTCGCCAGCTCTTTGTTTCGGACTGGCGGCGTTAATACCTG
CGCTCAGCACGCCAACGAACGGTTTGGATGGTTGACCCTTGAAGGTCGGCAGTACCGTTACACCATA
ATTCACTTTGCTGGTGTGATGTTGGACCATGCCCACGGGCGGTTGATGGTCATCGCTGTTTCGCCTT
TATTAAAGGCAGCTTCTGCGATGGAGTAATCGGTGTCTGCATTCATGTGTTTGTITTTAATCAGGTCA
ACCAGGAAGGTCAGACCCGCTTTCGCGCCAGCGTTATCCACGCCACGTCTTTAATGTCGTACTTGCC
GTTTTCATACTTGAACGCATAACCCCGTCAGCAGCAATCAGCGGCCAGGTGAAGTACGGTTCTTGC
AGGTTGAACATCAGCGCGCTCTTACCTTTCGCTTTCAGTTCTTTATCCAGCGCCGGGATCTCTTCCAG
GTTTTTGGCGGGTTCGGCAGCAGATCTTTGTTATAAATCAGCGATAACGCTTCAACAGCGATCGGGT
AAGCAATCAGCTTGCCGTTGTAACGTACGGCATCCCAGGTAAACGGATACAGCTTGTCTTGGAACGC
TTTGTCCGGGGTGATTTAGCCAACAGGCCAGATTGAGCGTAGCCACCAAAGCGGTCGTGTGCCAG
AAGATAATGTCAGGGCCATCGCCAGTTGCCGCAACCTGTGGGAATTTCTCTTCCAGTTTATCCGGATG
CTCAACGGTGACTTTAATTCCGGTATCTTCTCGAATTTCTTACCGACTTCAGCGAGACCGTTATAGCC
TTTATCGCCGTTAATCCAGATTACCAGTTTACCTTCTTCAAGTTTTCATGGTTGGATCCGGTACCTTGTC
GTCGTCATCTGCACCCTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAGCTTGCCAT

Aminosäuresequenz von MBP-*Fi*DIR1 mit einem Strep®-Tag

MASWSHPQFEKGADDDDKVPDPTMKTEEGKLVIWINGDKGYNGLAIEVGKKFEKDTGIKVTVEHPDKLE
EKFPQVAATGDGPDIIFWAHDRFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALSL
IYNKDLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIADGGYAFKYENGKYDIKDVGVND
AGAKAGLTLVDLIKNKHMNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGPWAWSNIDTSKVNIGVTVLPTFKGQ
PSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPLGAVALKSYYEELAKDPRIAATMENA
QKGEIMPNIQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKDAQTNSSSIGENLYFQSRIQATYGRKPRPRR
PCKELVFYFHDVLFKGNYYHNATSAIVGSPQWGNKTAMAVPFNYGDLVVFDDPITLDNNLHSPVVGRA
QGMFYFDQKNTYNWLGFSLFNSTKYVGTLNFAGADPLLKTRDISVIGGTGDDFMARGVATLMTDA
FEGDVYFRLRVDINLYECWRIQGAG

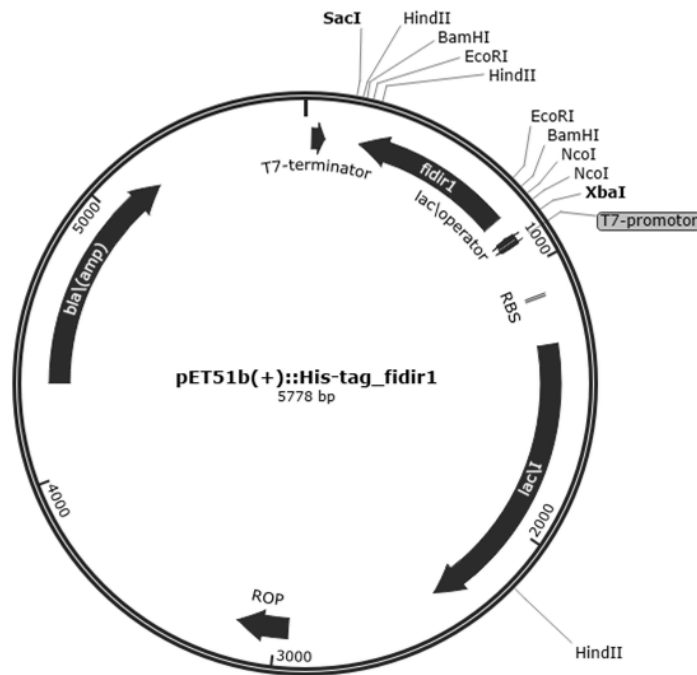


Abbildung 98: Vektorkarte von pET51b(+):his-tag_fidir1.

Nukleotidsequenz (5'→3') von his-tag_fidir1

CTAGCCGGCGCCCTGAATTCTCCAGCACTCGTACAGATTGATGTCAACACGCAGACGGAAGTAAACG
TCGCCCTCGAACGCGTCGGTCATCAGGGTCGCAACACCACGCGCCATGAAAAAGTCACCGGTGCCAC
CAATCACGCTGATATCACGGGTCTTGTTTCAGCAGCGGGTCCGCACCCGCGAAGTTCAGGGTACCCAC
GTACTTGGTGCTGTTGAACAGAAAGCTGAAACCCAGCCACGCGTTGTAGGTGTTCTTCTGGTCGTAG
AAATACATGCCCTGCGCACGACCAACCGGCGGGCTGTGCAGGTTGTTATCCAGGGTGATCGGATCGT
CGAACACAACCAGATCACCGTAGTTGAACGGAACCGCCATCGCGGTCTTGTTACCCATTGCGGGCT
ACCAACGATCGCGCTGGTCGCGTTGTGGTAGTTATTGCCTTTGAACAGCACATCGTGGAAGTAAAC
ACCAGCTCCTTGACGGGCGGCGGGCGCGGCTTGCGGCCATAGGTCGCTTGAATTCTACTCTGAA
AATACAGATTTTCCCCACTAGTTGGATCCGGTACCTTGTCGTCGTCATCTGCACCATGGTGGTGATGA
TGGTGGCTTGCCAT

Aminosäuresequenz von FiDIR1 mit einem His₆-Tag

MASHHHHHHGADDDDKVPDPTSGENLYFQSRIQATYGRKPRPRRPCKELVFYFHDVLFKGN NYHNATS
AIVGSPQWGNKTAMAVPFNYGDLVVFDDPITLDNNLHSPVGRAQGMFYDQKNTYN AWLGF SFLFN
STKYVGTLNFAGADPLLNKTRDISVIGGTGDDFMARGVATLMTDAFEGDVYFRLRVDINLYECWRIQGAG

D.3.1.2 Vektorkarten – *OsJAC1* und die Einzeldomänen (DIR und JRL)

Sequenzen für *OsJAC1*

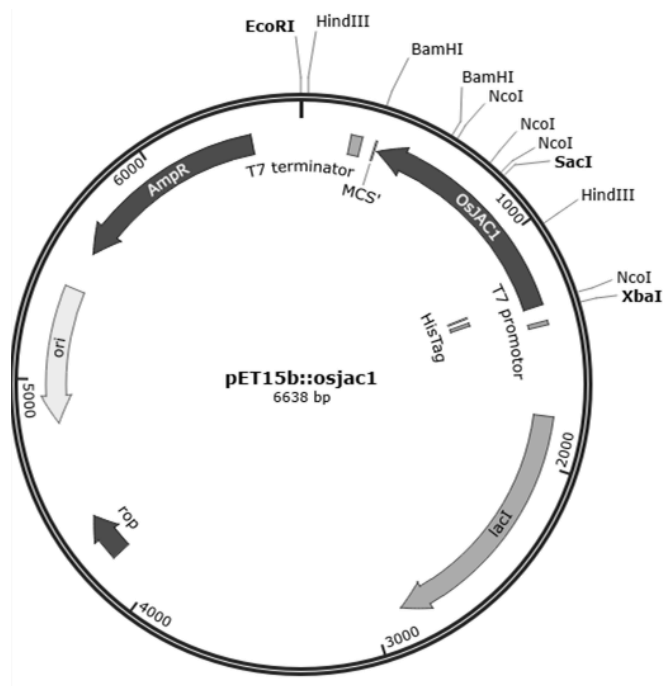


Abbildung 99: Vektorkarte von pET15b::osjac1.

Nukleotidsequenz (5'→3') von *OsJAC1* mit einem His₆-Tag

TTAGATCGGCTGCACGTAGACACCAACTGCATTTATGTATTTCCCACTGCGCCCAAAGAAACCCACTA
TACTGGAGTTATTCTGCGCTGGGACACTGAAAGGGGTTCCCTCCTGTCGTCCAAATGGGCCATATGTT
TGCTTATTGGTGATAAAATTAATAGATGTTATAACGGTGCTGCCCTCATATGGGCCAAACGTTCCAGA
AACTTCCTTGAGAACTCTGAACTGCCAAATTCAATCATTATGGGATCCCCGCCAGGACCACCCCATG
GACCTGCCTTGTGCTTCTCTCCGGCATGGTCAAGGTAAGTAAACGAGATTGAGTCAACAGACCAGCC
GTGGTATAATGTGATGCTTTGAGACGCTTGGAGACTCAGTGATGTCTTGAAGTGTCCCTTCATGAG
ATGAACCCCATGGCCCAATCTTGGTGACAGGGCACTGTGACCCTTTTAAGAGAGGACAAAACCCATG
GATAGTGAGCTCTATTATGTTTCCGTATTGTTTTGTTCTTGCAATTTCTTCAAGATAACACCAGTTGCC
ATAGCAAAGTGCCTGTGCCCCCAACAATAGCCCAATCACCTTCTCGACAATTAGCCCCATCACCTGA
AGCGTGGACCCCTTAAGCCTTTCATCCTCGAACACTAGGCTGAAGGAGTTGTGCCAGGCACCCGCAA
AAACGTGGAGGCCTTTTGCATAGGCAACAAGCTTGGCGTCGCTGCCGATTCCGTCATATACTGACCA
GTTGTTAACGACAATGCAACCCAACCCGGTTTTTTTGTCAATTGCTTGTGACCGCCGACTGGTTTTGTTC
TGGACCAGCCGGCGTGTGGTGCAGGTAGAGTTTGGTGAAGTTGATCTGGTTGCCCTGAACAAGCAT
GCCACAGGGTGTGATTTGCAGCTTGCTGGGATCAGCCATCTCGAGCATATGGCTGCCGCGCGGCACC
AGGCCGCTGCTGTGATGATGATGATGATGGCTGCTGCCCAT

Aminosäuresequenz von *OsJAC1* mit einem His₆-Tag

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMLEMADPSKLQITPCGMLVQGNQINFTKLYLHHTPAGPEQNNQSAVTS
 NDKKTGLGCIVVNNWSVYDGIGSDAKLVAYAKGLHVFAGAWHNSFSLVFEDERLKGSTLQVMGLIVEEG
 DWAIVGGTGQFAMATGVILKKMQEQKQYGNIIELTIHGFCPLLKGSQCPVTKIGPWGSSHEGTVQDITES
 PKRLESITLYHGWSVDSISFTYLDHAGEKHKAGPWGGPGDPIMIEFGSSEFLKEVSGTFGPYEGSTVITSI
 NFITNKQTYGPFGRQEGTPFSVPAQNNSSIVGFFGRSGKYINAVGVYVQPI

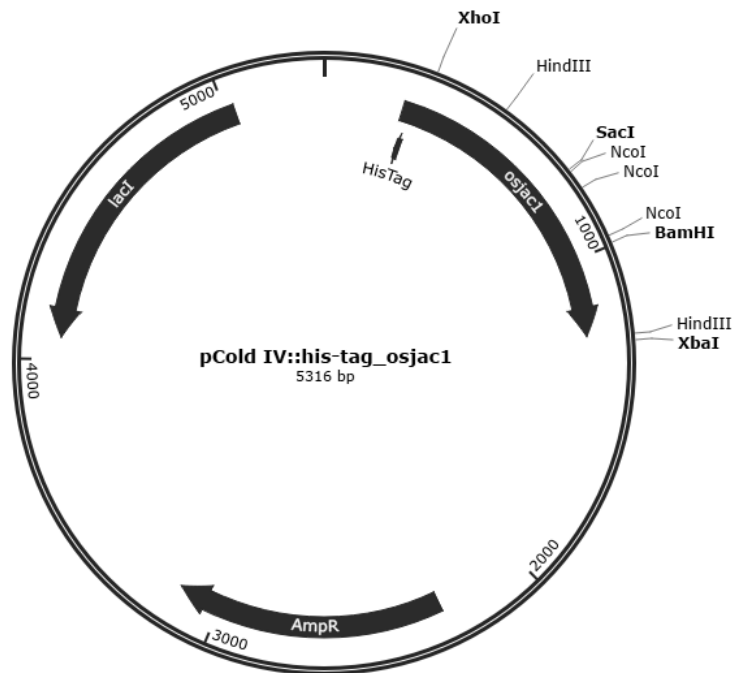


Abbildung 100: Vektorkarte von pCold IV::his-tag_osjac1.

Nukleotidsequenz (5'→3') von *OsJAC1* mit einem His₆-Tag

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGCTCG
 AGATGGCTGATCCCAGCAAGCTGCAAATCACACCCTGTGGCATGCTTGTTTCAGGGCAACCAGATCAA
 CTTACCAAACCTCTACCTGCACCACACGCCGGCTGGTCCAGAACAAAACAGTCGGCGGGTCACAAGC
 AATGACAAAAAACCAGGGTTGGGTTGCATTGTCGTTAACAACTGGTCAGTATATGACGGAATCGGCA
 GCGACGCCAAGCTTGTTGCCTATGCAAAAGGCCTCCACGTTTTTTCGGGTGCCTGGCACAACCTCTTC
 AGCCTAGTGTTTCGAGGATGAAAGGCTTAAGGGGTCCACGCTTCAGGTGATGGGGCTAATTGTCGAA
 GAAGGTGATTGGGCTATTGTTGGGGGCACAGGACAGTTTGCTATGGCAACTGGTGTTATCTTGAAG
 AAAATGCAAGAACAAAAACAATACGGAAACATAATAGAGCTCACTATCCATGGGTTTTGTCCTCTCTT
 AAAAGGGTCACAGTGCCCTGTCACCAAGATTGGGCCATGGGGTTCATCTCATGAAGGGACAGTTCA
 AGACATCACTGAGTCTCAAAGCGTCTCGAAAGCATCACATTATACCACGGCTGGTCTGTTGACTCAA
 TCTCGTTTACTTACCTTGACCATGCCGGAGAGAAGCACAAGGCAGGTCCATGGGGTGGTCCTGGCGG
 GGATCCCATAATGATTGAATTTGGCAGTTCAGAGTTTCTCAAGGAAGTTTCTGGAACGTTTGGCCCAT

ATGAGGGCAGCACCGTTATAACATCTATTAATTTTATCACCAATAAGCAAACATATGGCCCATTTGGA
CGACAGGAGGGAACCCCTTTCAGTGTCCCAGCGCAGAATAACTCCAGTATAGTGGGTTTCTTTGGGC
GCAGTGGGAAATACATAAATGCAGTTGGTGTCTACGTGCAGCCGATCTAA

Aminosäuresequenz von *OsJAC1* mit einem His₆-Tag

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMLEMADPSKLQITPCGMLVQGNQINFTKLYLHHTPAGPEQNQSAVTS
NDKKTGLGCIVVNNWSVYDYGIGSDAKLVAYAKGLHVFAGAWHNSFSLVFEDERLKGSTLQVMGLIVEEG
DWAIVGGTGQFAMATGVILKKMQEQKQYGNIIELTIHGFCPLLKGSQCPVTKIGPWGSSHEGTVQDITES
PKRLESITLYHGWSVDSISFTYLDHAGEKHKAGPWGGPGDPIMIEFGSSEFLKEVSGTFGPYEGSTVITSI
NFITNKQTYGPFGRQEGTPFSVPAQNNSSIVGFFGRSGKYINAVGVYVQPI

Sequenzen für *OsJAC1*-DIR

Alle Konstrukte der DIR-Einzeldomäne von *OsJAC1* enthielten eine Punktmutation von Threonin zu Isoleucin. Die Position in den entsprechenden Sequenzen ist jeweils markiert (hervorgehoben und unterstrichen).

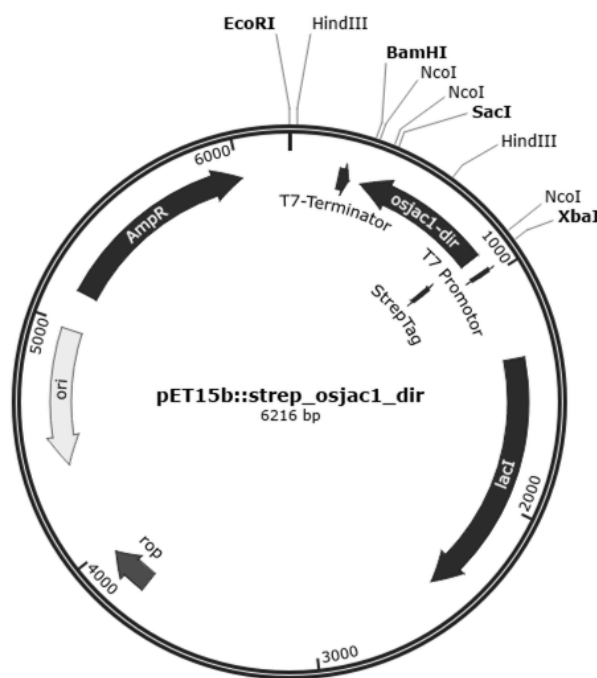


Abbildung 101: Vektorkarte pET15b::strep_osjac1_dir.

Nukleotidsequenz (5'→3') von *OsJAC1*-DIR mit einem Strep[®]-Tag und Punktmutation

TTAGCAGCCGGATCCTCGAGCCCATGGCCCAATCTTGGTGACAGGGCACTGTGACCCTTTTAAGAGA
GGACAAAACCCATGGATAGTGAGCTCTATTATGTTTCCGTATTGTTTTTGTTCCTTGCAATTTCTTCAAG
ATAACACCAGTTGCCATAGCAAACGTCTGTGCCCAACAATAGCCCAATCACCTTCTTCGACAATT
AGCCCCATCACCTGAAGCGTGGACCCCTTAAGCCTTTCATCCTCGAACACTAGGCTGAAGGAGTTGT

GCCAGGCACCCGCAAAAACGTGGAGGCCTTTTGCATAGGCAACAAGCTTGGCGTCGCTGCCGATTCC
 GTCATATACTGACCAGTTGTTAACGACAATGCAACCCAACCCGATTTTTTTTGTCATTGCTTGTGACCGC
 CGACTGGTTTTGTTCTGGACCAGCCGGCGTGTGGTGCAGGTAGAGTTTGGTGAAGTTGATCTGGTTG
 CCCTGAACAAGCATGCCACAGGGTGTGATTTGCAGCTTGCTCTCGAGCATATGGCTGCCGCGCGGCA
 CCAGGCCGCTGCTCTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAGCTGCTGCCCAT

Aminosäuresequenz von *OsJAC1-DIR* mit einem Strep®-Tag und Punktmutation (I)

MGSSWSHPQFEKSSGLVPRGSHMLESKLQITPCGMLVQGNQINFTKLYLHHTPAGPEQNNQSAVTSNDK
 KIGLGCIVVNNWSVYDGIGSDAKLVAYAKGLHVFAGAWHNSFSLVFEDERLKGSTLQVMGLIVEEGDWA
 IVGGTGQFAMATGVILKKMQEQKQYGNIELTIHGFCPLLKGSQCPVTKIGPWARGSGC

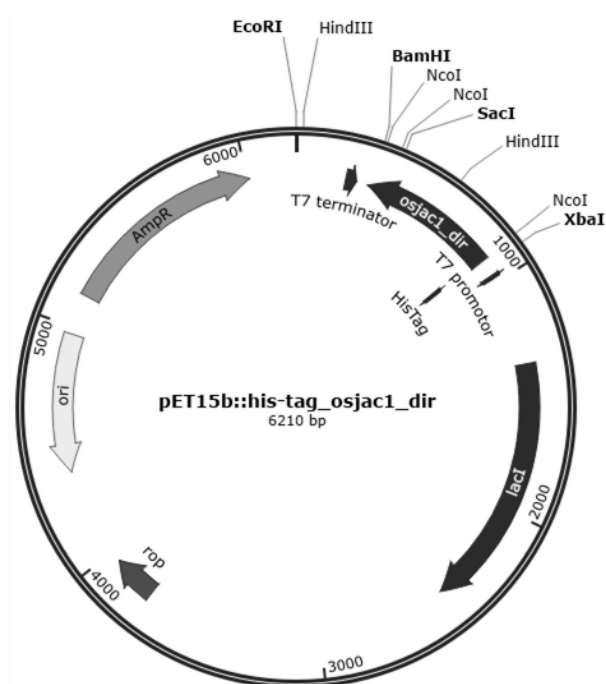


Abbildung 102: Vektorkarte pET15b::his-tag_osjac1_dir.

Nukleotidsequenz (5'→3') von *OsJAC1-DIR* mit einem His₆-Tag und Punktmutation

TTAGCAGCCGGATCCTCGAGCCCATGGCCCAATCTTGGTGACAGGGCACTGTGACCCTTTAAAGAGA
 GGACAAAACCCATGGATAGTGAGCTCTATTATGTTTCCGTATTGTTTTTGTCTTGCATTTTCTTCAAG
 ATAACACCAGTTGCCATAGCAAACGTCTGTGCCCCCAACAATAGCCCAATCACCTTCTTCGACAATT
 AGCCCCATCACCTGAAGCGTGGACCCCTTAAGCCTTTCATCCTCGAACACTAGGCTGAAGGAGTTGT
 GCCAGGCACCCGCAAAAACGTGGAGGCCTTTTGCATAGGCAACAAGCTTGGCGTCGCTGCCGATTCC
 GTCATATACTGACCAGTTGTTAACGACAATGCAACCCAACCCGATTTTTTTTGTCATTGCTTGTGACCGC
 CGACTGGTTTTGTTCTGGACCAGCCGGCGTGTGGTGCAGGTAGAGTTTGGTGAAGTTGATCTGGTTG
 CCCTGAACAAGCATGCCACAGGGTGTGATTTGCAGCTTGCTCTCGAGCATATGGCTGCCGCGCGGCA
 CCAGGCCGCTGCTGTGATGATGATGATGATGGCTGCTGCCCAT

Aminosäuresequenz von *OsJAC1-DIR* mit einem His₆-Tag und Punktmutation (T)

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMLESKLQITPCGMLVQGNQINFTKLYLHHTPAGPEQNQSAVTSNDKK**T**
 GLGCIVNNWSVYDGIGSDAKLVAYAKGLHVFAGAWHNSFSLVFEDERLKGSTLQVMGLIVEEGDWAIV
 GGTGQFAMATGVILKKMQEQKQYGNIIELTIHGFCPLLKGSQCPVTKIGPWARGSGC

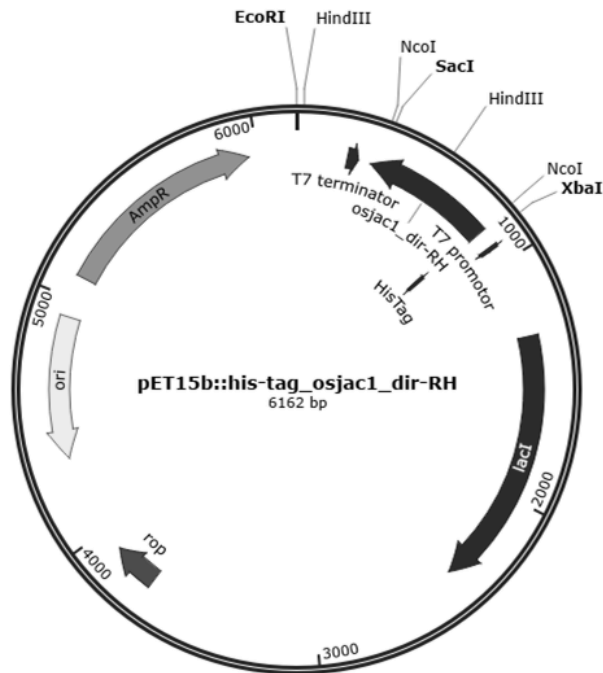


Abbildung 103: Vektorkarte von pET15b::his-tag_osjac1_dir-RH.

Nukleotidsequenz (5'→3') von *OsJAC1-DIR-RH* mit einem His₆-Tag und Punktmutation

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGCTCG
 AGAGCAAGCTGCAAATCACACCCTGTGGCATGCTTGTTTCAGGGCAACCAGATCAACTTCACCAA
 CTACCTGCACCACACGCCGGCTGGTCCAGAACAAAACAGTCGGCGGTCACAAGCAATGACAAAAA
 AA**T**CGGGTTGGGTTGCATTGTCGTTAACTGGTCAGTATATGACGGAATCGGCAGCGACGCCAA
 GCTTGTTGCCTATGCAAAAGGCCTCCACGTTTTTGCGGGTGCCTGGCACAACCTTCAGCCTAGTGT
 TCGAGGATGAAAGGCTTAAGGGGTCCACGCTTCAGGTGATGGGGCTAATTGTCGAAGAAGGTGATT
 GGGCTATTGTTGGGGGCACAGGACAGTTTGCTATGGCAACTGGTGTTATCTTGAAGAAAATGCAAG
 AACAAAAACAATACGGAAACATAATAGAGCTCACTATCCATGGGTTTTGTCCTCTCTTAAAGGGTCA
 TAA

Aminosäuresequenz von *OsJAC1-DIR-RH* mit einem His₆-Tag und Punktmutation (T)

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMLESKLQITPCGMLVQGNQINFTKLYLHHTPAGPEQNQSAVTSNDKK**T**
 GLGCIVNNWSVYDGIGSDAKLVAYAKGLHVFAGAWHNSFSLVFEDERLKGSTLQVMGLIVEEGDWAIV
 GGTGQFAMATGVILKKMQEQKQYGNIIELTIHGFCPLLKGS

Sequenzen für *OsJAC1-JRL*

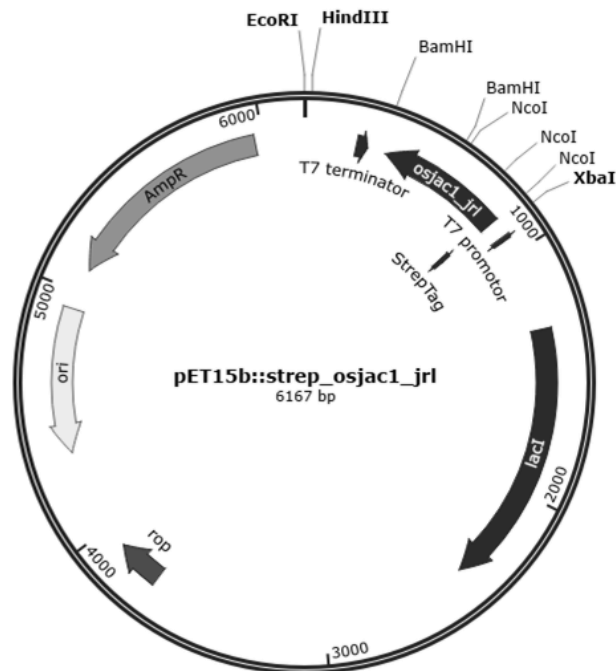


Abbildung 104: Vektorkarte pET15b::strep_osjac1_jrl.

Nukleotidsequenz (5'→3') von *OsJAC1-JRL* mit einem Strep®-Tag

TTAGATCGGCTGCACGTAGACACCAACTGCATTTATGTATTTCCCACTGCGCCAAAGAAACCCACTA
TACTGGAGTTATTCTGCGCTGGGACACTGAAAGGGGTTCCCTCCTGTCGTCAAATGGGCCATATGTT
TGCTTATTGGTGATAAAATTAATAGATGTTATAACGGTGCTGCCCTCATATGGGCCAAACGTTCCAGA
AACTTCCTTGAGAACTCTGAACTGCCAAATTCAATCATTATGGGATCCCCGCCAGGACCACCCCATG
GACCTGCCTTGTGCTTCTCTCCGGCATGGTCAAGGTAAGTAAACGAGATTGAGTCAACAGACCAGCC
GTGGTATAATGTGATGCTTTGAGACGCTTTGGAGACTCAGTGATGTCTTGAAGTGTCCCTTCATGAG
ATGAACCCCATGGCCCAATCTTGGTGACAGGGCACTGCTCGAGCATATGGCTGCCGCGCGGCACCA
GGCCGCTGCTCTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAGCTGCTGCCCAT

Aminosäuresequenz von *OsJAC1-JRL* mit einem Strep®-Tag

MGSSWSHPQFEKSSGLVPRGSHMLEQCPVTKIGPWGSSHEGTVQDITESPKRLESITLYHGWSVDSISFT
YLDHAGEKHKAGPWGGPGGDPIMIEFGSSEFLKEVSGTFGPYEGSTVITSINFITNKQTYGPFGRQEGTPF
SVPAQNNSSIVGFFGRSGKYINAVGVYVQPI

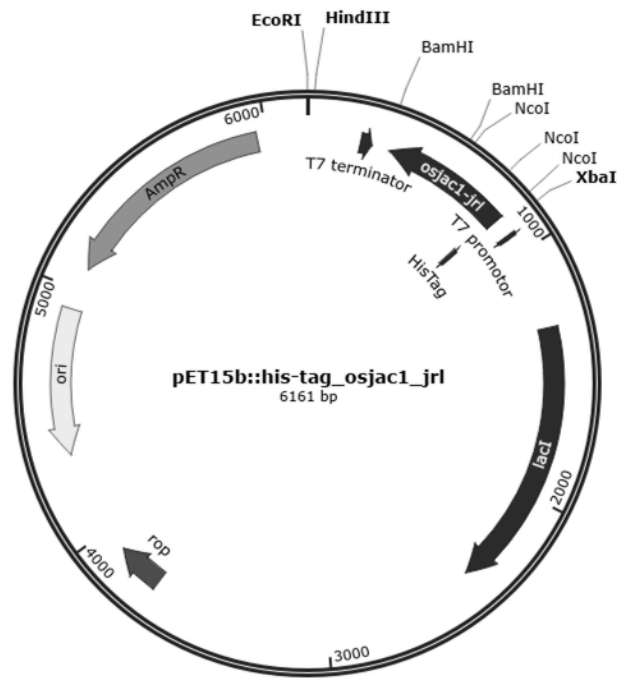


Abbildung 105: Vektorkarte pET15b::his-tag_osjac1_jrl.

Nukleotidsequenz (5'→3') von *OsJAC1-JRL* mit einem His₆-Tag

TTAGATCGGCTGCACGTAGACACCAACTGCATTTATGTATTTCCCACTGCGCCCAAAGAAACCCACTA
 TACTGGAGTTATTCTGCGCTGGGACACTGAAAGGGGTTCCCTCCTGTCGTCAAATGGGCCATATGTT
 TGCTTATTGGTGATAAAATTAATAGATGTTATAACGGTGCTGCCCTCATATGGGCCAAACGTTCCAGA
 AACTTCCTTGAGAACTCTGAACTGCCAAATTCAATCATTATGGGATCCCCGCCAGGACCACCCCATG
 GACCTGCCTTGTGCTTCTCTCCGGCATGGTCAAGGTAAGTAAACGAGATTGAGTCAACAGACCAGCC
 GTGGTATAATGTGATGCTTTTCGAGACGCTTTGGAGACTCAGTGATGTCTTGAACGTCCCTTCATGAG
 ATGAACCCCATGGCCCAATCTTGGTGACAGGGCACTGCTCGAGCATATGGCTGCCGCGCGGCACCA
 GGCCGCTGCTGTGATGATGATGATGATGGCTGCTGCCCAT

Aminosäuresequenz von *OsJAC1-JRL* mit einem His₆-Tag

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMLEQCPVTKIGPWGSSHEGTVQDITESPKRLESITLYHGWSVDSISFTYL
 DHAGEKHKAGPWGGPGDPIMIEFGSSEFLKEVSGTFGPYEGSTVITSINFITNKQTYGPFGRQEGTPFSV
 PAQNNSSIVGFFGRSGKYINAVGVYVQPI

Eigenanteile an den veröffentlichten Publikationen

Huwa, N., Weiergräber, O. H., Fejzagić, A.V., Kirsch, C., Schaffrath, U., & Classen, T. (2022). The Crystal Structure of the Defense Conferring Rice Protein OsJAC1 Reveals a Carbohydrate Binding Site on the Dirigent-like Domain. *Biomolecules*, 12(8), 1126.

Die oben genannte Publikation enthält den folgenden Eigenbeitrag:

Die Strukturauflösung der dirigierenden Domäne von OsJAC1 wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. O. H. Weiergräber (Institut für Biologische Informationsprozesse, IBI-7: Strukturbiochemie, Forschungszentrum Jülich) durchgeführt. Docking des Liganden an die OsJAC1-JRL Domäne erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. T. Classen. Durchführung der Domänen-Domänen-Interaktionsanalyse mittels Protein-Protein-Docking. Durchführung des Hämagglutinations- und Wachstumshemmungs-Assays. Die Ergebnisse wurden in der Publikation zusammengefasst und ausgewertet. Verfassen des ersten Entwurfs des gesamten Manuskripts.

Huwa, N., Weiergräber, O. H., Kirsch, C., Schaffrath, U., & Classen, T. Biochemical and Initial Structural Characterization of the Monocot Chimeric Jacalin OsJAC1. *International journal of molecular sciences* **2021**, 22(11), 5639.

Die oben genannte Publikation enthält den folgenden Eigenbeitrag:

Klonierung des OsJAC1-Gens in das pColdIV-Vektorsystem. Heterologe Expression und Isolation (IMAC und SEC) des Volllängenproteins (OsJAC1) und der beiden Einzeldomänenproteine (JRL und DIR). MALDI-ToF-MS Messung erfolgte durch C. Mack (Institut für Bio- und Geowissenschaften IBG-1: Biotechnologie). DLS und CD-Messung erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. O. H. Weiergräber (Institut für Biologische Informationsprozesse, IBI-7: Strukturbiochemie, Forschungszentrum Jülich). Schmelzpunktbestimmung und Screening von Interaktionspartner der drei untersuchten Proteine mittels DSF. Die Ergebnisse wurden in der Publikation zusammengefasst und ausgewertet. Verfassen des ersten Entwurfs des Manuskripts. Beitrag von C. Kirsch Abschnitt: „Western Blot Using Transgenic Plants Tissue“.

Übersichtsartikel

Huwa, N., Feizagić, A. V., Gebauer, J., & Classen, T. (2019). Halogenating enzymes for active agent synthesis: first steps are done and many have to follow. *Molecules*, 24(21), 4008.

Die oben genannte Publikation enthält den folgenden Eigenbeitrag:

Literaturrecherche und Verfassen des ersten Entwurfs der Abschnitte: „*Fluorinase*“, „*Fe(II)/ α -Ketoglutarate-Dependent Halogenases*“ und „*Halogen Chemistry is Energy-Demanding*“.

Literaturverzeichnis

- [1] D. Simpson, S. Amos, in *Pharmacognosy*, Elsevier, **2017**, pp. 267-280.
- [2] J. Ralph, C. Lapierre, W. Boerjan, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2019**, *56*, 240-249; 'Lignin structure and its engineering'.
- [3] J. K. Weng, C. Chapple, *New Phytol.* **2010**, *187*, 273-285; 'The origin and evolution of lignin biosynthesis'.
- [4] N. H. Bhuiyan, G. Selvaraj, Y. Wei, J. King, *J. Exp. Bot.* **2008**, *60*, 509-521; 'Gene expression profiling and silencing reveal that monolignol biosynthesis plays a critical role in penetration defence in wheat against powdery mildew invasion'.
- [5] T. Vogt, *Mol. Plant* **2010**, *3*, 2-20; 'Phenylpropanoid biosynthesis'.
- [6] I. Spiridon, *Environ. Chem. Lett.* **2020**, *18*, 771-785; 'Extraction of lignin and therapeutic applications of lignin-derived compounds. A review'.
- [7] A. Ullah, S. Munir, S. L. Badshah, N. Khan, L. Ghani, B. G. Poulson, A.-H. Emwas, M. Jaremko, *Molecules* **2020**, *25*, 5243; 'Important flavonoids and their role as a therapeutic agent'.
- [8] M. Saleem, H. J. Kim, M. S. Ali, Y. S. Lee, *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22*, 696-716; 'An update on bioactive plant lignans'.
- [9] C. Canel, R. M. Moraes, F. E. Dayan, D. Ferreira, *Phytochemistry* **2000**, *54*, 115-120; 'Podophyllotoxin'.
- [10] C.-C. Wu, T.-K. Li, L. Farh, L.-Y. Lin, T.-S. Lin, Y.-J. Yu, T.-J. Yen, C.-W. Chiang, N.-L. Chan, *Science* **2011**, *333*, 459-462; 'Structural basis of type II topoisomerase inhibition by the anticancer drug etoposide'.
- [11] S. Apers, A. Vlietinck, L. Pieters, *Phytochem. Rev.* **2003**, *2*, 201-217; 'Lignans and neolignans as lead compounds'.
- [12] S. S. Kim, E. S. Sattely, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 5011-5021; 'Dirigent Proteins Guide Asymmetric Heterocoupling for the Synthesis of Complex Natural Product Analogues'.
- [13] C. Kazenwadel, J. Klebensberger, S. Richter, J. Pfannstiel, U. Gerken, B. Pickel, A. Schaller, B. Hauer, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 7215-7227; 'Optimized expression of the dirigent protein AtDIR6 in *Pichia pastoris* and impact of glycosylation on protein structure and function'.
- [14] K.-W. Kim, S. G. Moinuddin, K. M. Atwell, M. A. Costa, L. B. Davin, N. G. Lewis, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 33957-33972; 'Opposite stereoselectivities of dirigent proteins in *Arabidopsis* and *Schizandra* species'.
- [15] L. B. Davin, H.-B. Wang, A. L. Crowell, D. L. Bedgar, D. M. Martin, S. Sarkanen, N. G. Lewis, *Science* **1997**, *275*, 362-367; 'Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an active center'.
- [16] C. Corbin, S. Drouet, L. Markulin, D. Auguin, É. Lainé, L. B. Davin, J. R. Cort, N. G. Lewis, C. Hano, *Plant Mol. Biol.* **2018**, *97*, 73-101; 'A genome-wide analysis of the flax (*Linum usitatissimum* L.) dirigent protein family: From gene identification and evolution to differential regulation'.
- [17] A. Khan, R.-J. Li, J.-T. Sun, F. Ma, H.-X. Zhang, J.-H. Jin, M. Ali, S. ul Haq, J.-E. Wang, Z.-H. Gong, *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1-21; 'Genome-wide analysis of dirigent gene family in pepper (*Capsicum annuum* L.) and characterization of *CaDIR7* in biotic and abiotic stresses'.
- [18] S. A. Dabravolski, *Curr. Microbiol.* **2020**, *77*, 517-521; 'The resurgence of dirigent story: time for a bacterial chapter'.

- [19] S. G. Ralph, S. Jancsik, J. Bohlmann, *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1975-1991; 'Dirigent proteins in conifer defense II: Extended gene discovery, phylogeny, and constitutive and stress-induced gene expression in spruce (*Picea* spp.)'.
- [20] S. Ralph, J.-Y. Park, J. Bohlmann, S. D. Mansfield, *Plant Mol. Biol.* **2006**, *60*, 21; 'Dirigent proteins in conifer defense: gene discovery, phylogeny, and differential wound-and insect-induced expression of a family of DIR and DIR-like genes in spruce (*Picea* spp.)'.
- [21] P. M. Nobile, A. Bottcher, J. L. Mayer, M. S. Brito, I. A. dos Anjos, M. G. de Andrade Landell, R. Vicentini, S. Creste, D. M. Riaño-Pachón, P. Mazzafera, *Mol. Genet. Genomics* **2017**, *292*, 1323-1340; 'Identification, classification and transcriptional profiles of dirigent domain-containing proteins in sugarcane'.
- [22] Q. Meng, S. G. Moinuddin, S.-J. Kim, D. L. Bedgar, M. A. Costa, D. G. Thomas, R. P. Young, C. A. Smith, J. R. Cort, L. B. Davin, *J. Biol. Chem.* **2020**, *295*, 11584-11601; 'Pterocarpan synthase (PTS) structures suggest a common quinone methide-stabilizing function in dirigent proteins and proteins with dirigent-like domains'.
- [23] V. Yadav, Z. Wang, X. Yang, C. Wei, X. Changqing, X. Zhang, *Genes* **2021**, *12*, 326; 'Comparative Analysis, Characterization and Evolutionary Study of Dirigent Gene Family in *Cucurbitaceae* and Expression of Novel Dirigent Peptide against Powdery Mildew Stress'.
- [24] Y. Liao, S. Liu, Y. Jiang, C. Hu, X. Zhang, X. Cao, Z. Xu, X. Gao, L. Li, J. Zhu, *Genes & Genomics* **2017**, *39*, 47-62; 'Genome-wide analysis and environmental response profiling of dirigent family genes in rice (*Oryza sativa*)'.
- [25] X. Ma, W. Xu, T. Liu, R. Chen, H. Zhu, H. Zhang, C. Cai, S. Li, *Genomics* **2021**, *113*, 979-990; 'Functional characterization of soybean (*Glycine max*) DIRIGENT genes reveals an important role of *GmDIR27* in the regulation of pod dehiscence'.
- [26] Z. Liu, X. Wang, Z. Sun, Y. Zhang, C. Meng, B. Chen, G. Wang, H. Ke, J. Wu, Y. Yan, *BMC Plant Biol.* **2021**, *21*, 1-16; 'Evolution, expression and functional analysis of cultivated allotetraploid cotton *DIR* genes'.
- [27] Q. Li, J. Chen, Y. Xiao, P. Di, L. Zhang, W. Chen, *BMC genomics* **2014**, *15*, 1-13; 'The dirigent multigene family in *Isatis indigotica*: gene discovery and differential transcript abundance'.
- [28] M. Song, X. Peng, *Biochem. Genet.* **2019**, *57*, 487-506; 'Genome-wide identification and characterization of DIR genes in *Medicago truncatula*'.
- [29] L. Li, W. Sun, P. Zhou, H. Wei, P. Wang, H. Li, S. Rehman, D. Li, Q. Zhuge, *Forests* **2021**, *12*, 507; 'Genome-Wide Characterization of Dirigent Proteins in *Populus*: Gene Expression Variation and Expression Pattern in Response to *Marssonina brunnea* and Phytohormones'.
- [30] X. Cheng, X. Su, A. Muhammad, M. Li, J. Zhang, Y. Sun, G. Li, Q. Jin, Y. Cai, Y. Lin, *Front. Genet.* **2018**, *9*; 'Molecular Characterization, Evolution, and Expression Profiling of the Dirigent (DIR) Family Genes in Chinese White Pear (*Pyrus bretschneideri*)'.
- [31] W. Xu, T. Liu, H. Zhang, H. Zhu, *Front. Genet.* **2021**, *12*; 'Mungbean *DIRIGENT* gene subfamilies and their expression profiles under salt and drought stresses'.
- [32] T. Nakatsubo, M. Mizutani, S. Suzuki, T. Hattori, T. Umezawa, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 15550-15557; 'Characterization of *Arabidopsis thaliana* pinorensinol reductase, a new type of enzyme involved in lignan biosynthesis'.
- [33] C. Bottcher, E. von Roepenack-Lahaye, J. Schmidt, C. Schmotz, S. Neumann, D. Scheel, S. Clemens, *Plant Physiol.* **2008**, *147*, 2107-2120; 'Metabolome analysis of biosynthetic mutants reveals a diversity of metabolic changes and allows identification of a large number of new compounds in *Arabidopsis*'.

- [34] A. Okazawa, K. Hori, R. Okumura, Y. Izumi, N. Hata, T. Bamba, E. Fukusaki, E. Ono, H. Satake, A. Kobayashi, *Plant Biotechnol.* **2011**, *28*, 287-293; 'Simultaneous quantification of lignans in *Arabidopsis thaliana* by highly sensitive capillary liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap mass spectrometry'.
- [35] V. Burlat, M. Kwon, L. B. Davin, N. G. Lewis, *Phytochemistry* **2001**, *57*, 883-897; 'Dirigent proteins and dirigent sites in lignifying tissues'.
- [36] K. Yonekura-Sakakibara, M. Yamamura, F. Matsuda, E. Ono, R. Nakabayashi, S. Sugawara, T. Mori, Y. Tobimatsu, T. Umezawa, K. Saito, *The Plant Cell* **2021**, *33*, 129-152; 'Seed-coat protective neolignans are produced by the dirigent protein AtDP1 and the laccase AtLAC5 in *Arabidopsis*'.
- [37] D. S. Dalisay, K. W. Kim, C. Lee, H. Yang, O. Rübel, B. P. Bowen, L. B. Davin, N. G. Lewis, *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 1231-1242; 'Dirigent protein-mediated lignan and cyanogenic glucoside formation in flax seed: integrated omics and MALDI mass spectrometry imaging'.
- [38] M. K. Kim, J.-H. Jeon, M. Fujita, L. B. Davin, N. G. Lewis, *Plant Mol. Biol.* **2002**, *49*, 199-214; 'The western red cedar (*Thuja plicata*) 8-8' *DIRIGENT* family displays diverse expression patterns and conserved monolignol coupling specificity'.
- [39] B. Pickel, M. A. Constantin, J. Pfannstiel, J. Conrad, U. Beifuss, A. Schaller, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 202-204; 'An enantiocomplementary dirigent protein for the enantioselective laccase-catalyzed oxidative coupling of phenols'.
- [40] B. Pickel, J. Pfannstiel, A. Steudle, A. Lehmann, U. Gerken, J. Pleiss, A. Schaller, *FEBS J.* **2012**, *279*, 1980-1993; 'A model of dirigent proteins derived from structural and functional similarities with allene oxide cyclase and lipocalins'.
- [41] R. Gasper, I. Effenberger, P. Kolesinski, B. Terlecka, E. Hofmann, A. Schaller, *Plant Physiol.* **2016**, *172*, 2165-2175; 'Dirigent protein mode of action revealed by the crystal structure of AtDIR6'.
- [42] S. C. Halls, L. B. Davin, D. M. Kramer, N. G. Lewis, *Biochemistry* **2004**, *43*, 2587-2595; 'Kinetic study of coniferyl alcohol radical binding to the (+)-pinoresinol forming dirigent protein'.
- [43] H. Funatsuki, M. Suzuki, A. Hirose, H. Inaba, T. Yamada, M. Hajika, K. Komatsu, T. Katayama, T. Sayama, M. Ishimoto, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111*, 17797-17802; 'Molecular basis of a shattering resistance boosting global dissemination of soybean'.
- [44] K.-W. Kim, C. A. Smith, M. D. Daily, J. R. Cort, L. B. Davin, N. G. Lewis, *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 1308-1318; 'Trimeric structure of (+)-pinoresinol-forming dirigent protein at 1.95 Å resolution with three isolated active sites'.
- [45] H. K. Seneviratne, D. S. Dalisay, K.-W. Kim, S. G. Moinuddin, H. Yang, C. M. Hartshorn, L. B. Davin, N. G. Lewis, *Phytochemistry* **2015**, *113*, 140-148; 'Non-host disease resistance response in pea (*Pisum sativum*) pods: biochemical function of DRR206 and phytoalexin pathway localization'.
- [46] Y. Wang, B. Fristensky, *Mol. Breed.* **2001**, *8*, 263-271; 'Transgenic canola lines expressing pea defense gene DRR206 have resistance to aggressive blackleg isolates and to *Rhizoctonia solani*'.
- [47] Q.-H. Ma, Y.-C. Liu, *Plant Mol. Biol. Rep.* **2015**, *33*, 143-152; 'TaDIR13, a dirigent protein from wheat, promotes lignan biosynthesis and enhances pathogen resistance'.
- [48] G. Wallace, S. C. Fry, *Phytochemistry* **1999**, *52*, 769-773; 'Action of diverse peroxidases and laccases on six cell wall-related phenolic compounds'.
- [49] D. R. Gang, M. A. Costa, M. Fujita, A. T. Dinkova-Kostova, H.-B. Wang, V. Burlat, W. Martin, S. Sarkanen, L. B. Davin, N. G. Lewis, *Chemistry & biology* **1999**, *6*, 143-151;

- 'Regiochemical control of monolignol radical coupling: a new paradigm for lignin and lignan biosynthesis'.
- [50] H. Shi, Z. Liu, L. Zhu, C. Zhang, Y. Chen, Y. Zhou, F. Li, X. Li, *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2012**, *44*, 555-564; 'Overexpression of cotton (*Gossypium hirsutum*) *dirigent1* gene enhances lignification that blocks the spread of *Verticillium dahliae*'.
- [51] R. Wu, L. Wang, Z. Wang, H. Shang, X. Liu, Y. Zhu, D. Qi, X. Deng, *Prog. Nat. Sci.* **2009**, *19*, 347-352; 'Cloning and expression analysis of a dirigent protein gene from the resurrection plant *Boea hygrometrica*'.
- [52] C. Liu, Z. Qin, X. Zhou, M. Xin, C. Wang, D. Liu, S. Li, *BMC Plant Biol.* **2018**, *18*, 1-12; 'Expression and functional analysis of the Propamocarb-related gene *CsDIR16* in cucumbers'.
- [53] N. Li, M. Zhao, T. Liu, L. Dong, Q. Cheng, J. Wu, L. Wang, X. Chen, C. Zhang, W. Lu, *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1185; 'A novel soybean dirigent gene *GmDIR22* contributes to promotion of lignan biosynthesis and enhances resistance to *Phytophthora sojae*'.
- [54] K. Uchida, T. Akashi, T. Aoki, *Plant Cell Physiol.* **2017**, *58*, 398-408; 'The missing link in leguminous pterocarpan biosynthesis is a dirigent domain-containing protein with isoflavanol dehydratase activity'.
- [55] I. Effenberger, B. Zhang, L. Li, Q. Wang, Y. Liu, I. Klaiber, J. Pfannstiel, Q. Wang, A. Schaller, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54*, 14660-14663; 'Dirigent proteins from cotton (*Gossypium* sp.) for the atropselective synthesis of gossypol'.
- [56] L. Zhu, X. Zhang, L. Tu, F. Zeng, Y. Nie, X. Guo, *J. Plant Pathol.* **2007**, 41-45; 'Isolation and characterization of two novel dirigent-like genes highly induced in cotton (*Gossypium barbadense* and *G. hirsutum*) after infection by *Verticillium dahliae*'.
- [57] I. Effenberger, M. Harport, J. Pfannstiel, I. Klaiber, A. Schaller, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101*, 2021-2032; 'Expression in *Pichia pastoris* and characterization of two novel dirigent proteins for atropselective formation of gossypol'.
- [58] G. Jin-Long, X. Li-Ping, F. Jing-Ping, S. Ya-Chun, F. Hua-Ying, Q. You-Xiong, X. Jing-Sheng, *Plant Cell Rep.* **2012**, *31*, 1801-1812; 'A novel dirigent protein gene with highly stem-specific expression from sugarcane, response to drought, salt and oxidative stresses'.
- [59] J. Liu, R. D. Stipanovic, A. A. Bell, L. S. Puckhaber, C. W. Magill, *Phytochemistry* **2008**, *69*, 3038-3042; 'Stereoselective coupling of hemigossypol to form (+)-gossypol in moco cotton is mediated by a dirigent protein'.
- [60] R. D. Stipanovic, J. D. Lopez, M. K. Dowd, L. S. Puckhaber, S. E. Duke, *J. Chem. Ecol.* **2006**, *32*, 959-968; 'Effect of racemic and (+)-and (–)-gossypol on the survival and development of *Helicoverpa zea* larvae'.
- [61] M. Eisenring, M. Meissle, S. Hagenbucher, S. E. Naranjo, F. Wettstein, J. Romeis, *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*; 'Cotton Defense Induction Patterns Under Spatially, Temporally and Quantitatively Varying Herbivory Levels'.
- [62] Q.-H. Ma, *Crit. Rev. Biotechnol.* **2014**, *34*, 300-306; 'Monocot chimeric jacalins: a novel subfamily of plant lectins'.
- [63] P. S. Hosmani, T. Kamiya, J. Danku, S. Naseer, N. Geldner, M. L. Guerinot, D. E. Salt, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110*, 14498-14503; 'Dirigent domain-containing protein is part of the machinery required for formation of the lignin-based Casparian strip in the root'.
- [64] I. C. R. Barbosa, N. Rojas-Murcia, N. Geldner, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2019**, *56*, 121-129; 'The Casparian strip—one ring to bring cell biology to lignification?'.

- [65] M. Petersen, J. Hans, U. Matern, *Annual Plant Reviews Volume 40: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism* **2010**, 182-257; 'Biosynthesis of phenylpropanoids and related compounds'.
- [66] J.-Y. Pan, S.-L. Chen, M.-H. Yang, J. Wu, J. Sinkkonen, K. Zou, *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 1251-1292; 'An update on lignans: natural products and synthesis'.
- [67] D. Schomburg, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2339-2351; 'Nomenklatur der Lignane und Neolignane'.
- [68] C. L. Céspedes, J. G. Avila, A. M. Garcia, J. Becerra, C. Flores, P. Aqueveque, M. Bittner, M. Hoeneisen, M. Martinez, M. Silva, *Zeitschrift für Naturforschung C* **2006**, *61*, 35-43; 'Antifungal and antibacterial activities of *Araucaria araucana* (Mol.) K. Koch heartwood lignans'.
- [69] A.-K. Borg-Karlson, G. Nordlander, A. Mudalige, H. Nordenhem, C. R. Unelius, *J. Chem. Ecol.* **2006**, *32*, 943-957; 'Antifeedants in the feces of the pine weevil *Hylobius abietis*: identification and biological activity'.
- [70] C. Paniagua, A. Bilkova, P. Jackson, S. Dabravolski, W. Riber, V. Didi, J. Houser, N. Gigli-Bisceglia, M. Wimmerova, E. Budínská, *J. Exp. Bot.* **2017**, *68*, 3287-3301; 'Dirigent proteins in plants: modulating cell wall metabolism during abiotic and biotic stress exposure'.
- [71] C. Modolo, L. Ren, E. Besson, V. Robert, S. Gastaldi, P. Rousselot-Pailley, T. Tron, *ChemBioChem* **2021**, *22*, 992-995; 'Coniferyl Alcohol Radical Detection by the Dirigent Protein At DIR6 Monitored by EPR'.
- [72] A. X. Cheng, Y. G. Lou, Y. B. Mao, S. Lu, L. J. Wang, X. Y. Chen, *J. Integr. Plant Biol.* **2007**, *49*, 179-186; 'Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions'.
- [73] T. A. Wagner, J. Liu, R. D. Stipanovic, L. S. Puckhaber, A. A. Bell, *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 2594-2598; 'Hemigossypol, a constituent in developing glanded cottonseed (*Gossypium hirsutum*)'.
- [74] R. D. Stipanovic, L. S. Puckhaber, J. Liu, A. A. Bell, *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 566-571; 'Total and percent atropisomers of Gossypol and Gossypol-6-methyl ether in seeds from Pima cottons and accessions of *Gossypium barbadense* L'.
- [75] S. Hagenbucher, D. M. Olson, J. R. Ruberson, F. L. Wäckers, J. Romeis, *Crit. Rev. Plant Sci.* **2013**, *32*, 458-482; 'Resistance mechanisms against arthropod herbivores in cotton and their interactions with natural enemies'.
- [76] H. Keshmiri-Neghab, B. Goliaei, *Pharm. Biol.* **2014**, *52*, 124-128; 'Therapeutic potential of gossypol: an overview'.
- [77] L. Lan, C. Appelman, A. R. Smith, J. Yu, S. Larsen, R. T. Marquez, H. Liu, X. Wu, P. Gao, A. Roy, *Mol. Oncol.* **2015**, *9*, 1406-1420; 'Natural product (-)-gossypol inhibits colon cancer cell growth by targeting RNA-binding protein Musashi-1'.
- [78] M. Zhou, C. Zhang, Y. Wu, Y. Tang, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 6159-6165; 'Metabolic engineering of gossypol in cotton'.
- [79] J. Buckingham, V. R. N. Munasinghe, *Dictionary of Flavonoids with CD-ROM*, CRC Press, **2019**.
- [80] L. Fini, E. Hotchkiss, V. Fogliano, G. Graziani, M. Romano, E. B. De Vol, H. Qin, M. Selgrad, C. R. Boland, L. Ricciardiello, *Carcinogenesis* **2008**, *29*, 139-146; 'Chemopreventive properties of pinoresinol-rich olive oil involve a selective activation of the ATM-p53 cascade in colon cancer cell lines'.
- [81] A. López-Biedma, C. Sánchez-Quesada, G. Beltrán, M. Delgado-Rodríguez, J. J. Gaforio, *BMC Complementary Altern. Med.* **2016**, *16*, 1-14; 'Phytoestrogen (+)-pinoresinol

- exerts antitumor activity in breast cancer cells with different oestrogen receptor statuses'.
- [82] Y. Ning, Y. L. Fu, Q. H. Zhang, C. Zhang, Y. Chen, *J. BUON* **2019**, *24*, 709-714; 'Inhibition of in vitro and in vivo ovarian cancer cell growth by pinoresinol occurs by way of inducing autophagy, inhibition of cell invasion, loss of mitochondrial membrane potential and inhibition Ras/MEK/ERK signalling pathway'.
 - [83] M. Martínez-Alonso, N. González-Montalbán, E. García-Fruitós, A. Villaverde, *Microb. Cell Fact.* **2009**, *8*, 1-5; 'Learning about protein solubility from bacterial inclusion bodies'.
 - [84] M. M. Carrió, A. Villaverde, *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 3599-3601; 'Localization of chaperones DnaK and GroEL in bacterial inclusion bodies'.
 - [85] A. Mitraki, J. King, *Bio/technology* **1989**, *7*, 690-697; 'Protein folding intermediates and inclusion body formation'.
 - [86] B. Fischer, I. Sumner, P. Goodenough, *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, *41*, 3-13; 'Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies'.
 - [87] D. M. Francis, R. Page, *Curr. Protoc. Protein Sci.* **2010**, *61*, 5.24. 21-25.24. 29; 'Strategies to optimize protein expression in *E. coli*'.
 - [88] S. M. Singh, A. K. Panda, *J. Biosci. Bioeng.* **2005**, *99*, 303-310; 'Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins'.
 - [89] A. Singh, V. Upadhyay, A. K. Upadhyay, S. M. Singh, A. K. Panda, *Microb. Cell Fact.* **2015**, *14*, 1-10; 'Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process'.
 - [90] M.-R. Ki, S. P. Pack, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104*, 2411-2425; 'Fusion tags to enhance heterologous protein expression'.
 - [91] S. Raran-Kurussi, D. S. Waugh, *PloS one* **2012**, *7*, e49589; 'The ability to enhance the solubility of its fusion partners is an intrinsic property of maltose-binding protein but their folding is either spontaneous or chaperone-mediated'.
 - [92] A. Malhotra, *Methods Enzymol.* **2009**, *463*, 239-258; 'Tagging for protein expression'.
 - [93] O. Kolaj, S. Spada, S. Robin, J. G. Wall, *Microb. Cell Fact.* **2009**, *8*, 1-17; 'Use of folding modulators to improve heterologous protein production in *Escherichia coli*'.
 - [94] M. Ferrer, T. N. Chernikova, M. M. Yakimov, P. N. Golyshin, K. N. Timmis, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1266-1267; 'Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperatures'.
 - [95] E. García-Fruitós, *Microb. Cell Fact.* **2010**, *9*, 1-3; 'Inclusion bodies: a new concept'.
 - [96] I. Palmer, P. T. Wingfield, *Curr. Protoc. Protein Sci.* **2012**, *70*, 6.3. 1-6.3. 20; 'Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from *Escherichia coli*'.
 - [97] J. Arakawa, M. Uegaki, T. Ishimizu, *Protein Expression Purif.* **2011**, *80*, 91-96; 'Effects of l-arginine on solubilization and purification of plant membrane proteins'.
 - [98] J. Kaur, A. Kumar, J. Kaur, *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *106*, 803-822; 'Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements'.
 - [99] G. Chhetri, P. Kalita, T. Tripathi, *MethodsX* **2015**, *2*, 385-391; 'An efficient protocol to enhance recombinant protein expression using ethanol in *Escherichia coli*'.
 - [100] S. Chaudhuri, B. Jana, T. Basu, *Cell Biol. Toxicol.* **2006**, *22*, 29-37; 'Why does ethanol induce cellular heat-shock response?'.

- [101] J. J. Almagro Armenteros, C. K. Sønderby, S. K. Sønderby, H. Nielsen, O. Winther, *Bioinformatics* **2017**, 33, 3387-3395; 'DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning'.
- [102] T. G. Schmidt, A. Skerra, *Nat. Protoc.* **2007**, 2, 1528-1535; 'The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins'.
- [103] L. Belval, A. Marquette, P. Mestre, M.-C. Piron, G. Demangeat, D. Merdinoglu, J.-F. Chich, *Protein Expression Purif.* **2015**, 109, 29-34; 'A fast and simple method to eliminate Cpn60 from functional recombinant proteins produced by *E. coli* Arctic Express'.
- [104] J. M. Song, Y. J. An, M. H. Kang, Y.-H. Lee, S.-S. Cha, *Protein Expression Purif.* **2012**, 82, 297-301; 'Cultivation at 6–10 C is an effective strategy to overcome the insolubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*'.
- [105] E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, M. R. Wilkins, R. D. Appel, A. Bairoch, *The proteomics protocols handbook* **2005**, 571-607; 'Protein identification and analysis tools on the ExPASy server'.
- [106] M. Lebendiker, T. Danieli, *FEBS Lett.* **2014**, 588, 236-246; 'Production of prone-to-aggregate proteins'.
- [107] M. Zhou, J. A. Laureanti, C. J. Bell, M. Kwon, Q. Meng, I. V. Novikova, D. G. Thomas, C. D. Nicora, R. L. Sontag, D. L. Bedgar, *Analyst* **2021**, 146, 7670-7681; 'De novo sequencing and native mass spectrometry revealed hetero-association of dirigent protein homologs and potential interacting proteins in *Forsythia× intermedia*'.
- [108] J. Mistry, S. Chuguransky, L. Williams, M. Qureshi, G. A. Salazar, E. L. Sonnhammer, S. C. Tosatto, L. Paladin, S. Raj, L. J. Richardson, *Nucleic Acids Res.* **2021**, 49, D412-D419; 'Pfam: The protein families database in 2021'.
- [109] F. Sievers, A. Wilm, D. Dineen, T. J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Söding, *Mol. Syst. Biol.* **2011**, 7, 539; 'Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega'.
- [110] I. Letunic, P. Bork, *Nucleic Acids Res.* **2021**, 49, W293-W296; 'Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation'.
- [111] U. Consortium, *Nucleic Acids Res.* **2019**, 47, D506-D515; 'UniProt: a worldwide hub of protein knowledge'.
- [112] F. Liu, W. Xu, Q. Wei, Z. Zhang, Z. Xing, L. Tan, C. Di, D. Yao, C. Wang, Y. Tan, *PLoS One* **2010**, 5, e8632; 'Gene expression profiles deciphering rice phenotypic variation between Nipponbare (Japonica) and 93-11 (Indica) during oxidative stress'.
- [113] T. Sasaki, B. Burr, *Curr. Opin. Plant Biol.* **2000**, 3, 138-142; 'International Rice Genome Sequencing Project: the effort to completely sequence the rice genome'.
- [114] N. Alexandratos, J. Bruinsma, **2012**; 'World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision'.
- [115] E.-C. Oerke, *J. Agric. Sci.* **2006**, 144, 31-43; 'Crop losses to pests'.
- [116] R. Mendelsohn, *J. Natural Resources Policy Research* **2009**, 1, 5-19; 'The impact of climate change on agriculture in developing countries'.
- [117] N. K. Arora, *Vol. 2*, Springer, **2019**, pp. 95-96.
- [118] S. Shrestha, *Acta Sci. Agric* **2019**, 3, 74-80; 'Effects of climate change in agricultural insect pest'.
- [119] G. S. Malhi, M. Kaur, P. Kaushik, *Sustainability* **2021**, 13, 1318; 'Impact of climate change on agriculture and its mitigation strategies: A review'.
- [120] I. Secretariat, M. Gullino, R. Albajes, I. Al-Jboory, F. Angelotti, S. Chakraborty, K. Garrett, B. Hurley, P. Juroszek, K. Makkouk, *Scientific review of the impact of climate*

- change on plant pests-A global challenge to prevent and mitigate plant pest risks in agriculture, forestry and ecosystems* **2021**; 'Scientific review of the impact of climate change on plant pests'.
- [121] S. Bregaglio, M. Donatelli, R. Confalonieri, *Agron. Sustainable Dev.* **2013**, *33*, 767-776; 'Fungal infections of rice, wheat, and grape in Europe in 2030–2050'.
- [122] D. J. Bowles, *Annu. Rev. Biochem.* **1990**, *59*, 873-907; 'Defense-related proteins in higher plants'.
- [123] R. N. Bennett, R. M. Wallsgrove, *New Phytol.* **1994**, *127*, 617-633; 'Secondary metabolites in plant defence mechanisms'.
- [124] H. Stillmark, MD Thesis thesis, University of Dorpat **1888**.
- [125] E. J. Van Damme, W. J. Peumans, A. Pusztai, S. Bardocz, *Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications*, John Wiley & Sons, **1998**.
- [126] K. Landsteiner, H. Raubitschek, *Zbl Bakt I Abt Orig* **1907**, *45*, 600-607; 'Beobachtungen über hämolyse und hämagglutination'.
- [127] M. Elfstrand, *Görberdorfer Veröffentlichungen a. Band I* **1898**, 1-159; 'Über blutkörperchenagglutinierende Eiweisse'.
- [128] W. C. Boyd, E. Shapleigh, *Science* **1954**, *119*, 419; 'Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins)'.
- [129] W. M. Watkins, W. Morgan, *Nature* **1952**, *169*, 825-826; 'Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by simple sugars'.
- [130] E. J. Van Damme, *Lectins* **2014**, 3-13; 'History of plant lectin research'.
- [131] M. Tsaneva, E. J. Van Damme, *Glycoconjugate J.* **2020**, 1-19; '130 years of plant lectin research'.
- [132] I. J. Goldstein, *Nature* **1980**, *285*, 66; 'What should be called a lectin?'.
- [133] S. H. Barondes, *Trends Biochem. Sci.* **1988**, *13*, 480-482; 'Bifunctional properties of lectins: lectins redefined'.
- [134] W. J. Peumans, E. Van Damme, *Plant Physiol.* **1995**, *109*, 347; 'Lectins as plant defense proteins'.
- [135] R. Warkentin, D. H. Kwan, *Molecules* **2021**, *26*, 380; 'Resources and Methods for Engineering “Designer” Glycan-Binding Proteins'.
- [136] N. Lannoo, E. J. Van Damme, *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*, 397; 'Lectin domains at the frontiers of plant defense'.
- [137] A. Barre, Y. Bourne, E. J. Van Damme, P. Rougé, *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 254; 'Overview of the structure–function relationships of mannose-specific lectins from plants, algae and fungi'.
- [138] E. J. Van Damme, W. J. Peumans, A. Barre, P. Rougé, *Crit. Rev. Plant Sci.* **1998**, *17*, 575-692; 'Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles'.
- [139] E. J. Van Damme, D. F. Smith, R. Cummings, W. J. Peumans, in *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates-3*, Springer, **2011**, pp. 757-767.
- [140] N. Sharon, **2008**; 'Lectins: past, present and future'.
- [141] T. De Coninck, K. Gistelincx, H. C. Janse van Rensburg, W. Van den Ende, E. J. Van Damme, *Biomolecules* **2021**, *11*, 756; 'Sweet Modifications Modulate Plant Development'.
- [142] H. Kaku, I. J. Goldstein, E. J. Van Damme, W. J. Peumans, *Carbohydr. Res.* **1992**, *229*, 347-353; 'New mannose-specific lectins from garlic (*Allium sativum*) and ramsons (*Allium ursinum*) bulbs'.

- [143] P. Rougé, W. J. Peumans, A. Barre, E. J. Van Damme, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *304*, 91-97; 'A structural basis for the difference in specificity between the two jacalin-related lectins from mulberry (*Morus nigra*) bark'.
- [144] N. Varejão, M. da Silva Almeida, N. N. De Cicco, G. C. Atella, L. C. Coelho, M. T. S. Correia, D. Foguel, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* **2010**, *1804*, 1917-1924; 'Heterologous expression and purification of a biologically active legume lectin from *Cratylia mollis* seeds (CRAMOLL 1)'.
- [145] E. Van Damme, W. Peumans, *Planta* **1990**, *182*, 605-609; 'Developmental changes and tissue distribution of lectin in *Galanthus nivalis* L. and *Narcissus* cv. Carlton'.
- [146] E. Van Damme, W. J. Peumans, *Planta* **1989**, 10-18; 'Developmental changes and tissue distribution of lectin in Tulipa'.
- [147] D. G. Robinson, P. Oliviusson, G. Hinz, *Traffic* **2005**, *6*, 615-625; 'Protein sorting to the storage vacuoles of plants: a critical appraisal'.
- [148] J. Greenwood, H. Stinissen, W. Peumans, M. Chrispeels, *Planta* **1986**, *167*, 275-278; '*Sambucus nigra* agglutinin is located in protein bodies in the phloem parenchyma of the bark'.
- [149] W. Zhang, W. J. Peumans, A. Barre, C. H. Astoul, P. Rovira, P. Rougé, P. Proost, P. Truffa-Bachi, A. A. Jalali, E. J. Van Damme, *Planta* **2000**, *210*, 970-978; 'Isolation and characterization of a jacalin-related mannose-binding lectin from salt-stressed rice (*Oryza sativa*) plants'.
- [150] Y. Chen, W. J. Peumans, B. Hause, J. Bras, M. Kumar, P. Proost, A. Barre, P. Rougé, E. J. Van Damme, *The FASEB J.* **2002**, *16*, 905-907; 'Jasmonate methyl ester induces the synthesis of a cytoplasmic/nuclear chitooligosaccharide-binding lectin in tobacco leaves'.
- [151] T. De Coninck, E. J. Van Damme, *Plant Sci.* **2021**, 111096; 'The multiple roles of plant lectins'.
- [152] N. Lannoo, E. J. Van Damme, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **2010**, *1800*, 190-201; 'Nucleocytoplasmic plant lectins'.
- [153] E. J. Van Damme, N. Lannoo, W. J. Peumans, *Adv. Bot. Res.* **2008**, *48*, 107-209; 'Plant lectins'.
- [154] W. J. Peumans, J. Van Damme, A. Barre, P. Rougé, *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates—2* **2001**, 27-54; 'Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins'.
- [155] Y.-j. Han, Z.-h. Zhong, L.-l. Song, O. Stefan, Z.-h. Wang, G.-d. Lu, *J. Integr. Agric.* **2018**, *17*, 1252-1266; 'Evolutionary analysis of plant jacalin-related lectins (JRLs) family and expression of rice JRLs in response to *Magnaporthe oryzae*'.
- [156] R. de Azevedo Moreira, I. L. Ainouz, *Biol. Plant.* **1981**, *23*, 186; 'Lectins from seeds of jack fruit (*Artocarpus integrifolia* L.): isolation and purification of two isolectins from the albumin fraction'.
- [157] W. J. Peumans, B. Hause, E. J. Van Damme, *FEBS Lett.* **2000**, *477*, 186-192; 'The galactose-binding and mannose-binding jacalin-related lectins are located in different sub-cellular compartments'.
- [158] R. Sankaranarayanan, K. Sekar, R. Banerjee, V. Sharma, A. Surolia, M. Vijayan, *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 596-603; 'A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a *Moraceae* plant lectin with a β -prism fold'.
- [159] Y. Li, J. Zhang, F. Hu, A. Adolf, M. Ackah, A. A. Justice, Q. Lin, L. Li, W.-G. Zhao, *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **2021**, *96*, 24-33; 'Cloning and abiotic stress expression analysis of

- galactose-binding lectin (GBL) gene from mulberry and its prokaryotic expression in *E. coli*'.
- [160] X.-Y. Liu, H. Li, W. Zhang, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2014**, *28*, 408-416; 'The lectin from *Musa paradisiaca* binds with the capsid protein of tobacco mosaic virus and prevents viral infection'.
 - [161] J. Xiao, C. Li, S. Xu, L. Xing, Y. Xu, K. Chong, *Plant Physiol.* **2015**, *169*, 2102-2117; 'JACALIN-LECTIN LIKE1 regulates the nuclear accumulation of GLYCINE-RICH RNA-BINDING PROTEIN7, influencing the RNA processing of FLOWERING LOCUS C antisense transcripts and flowering time in *Arabidopsis*'.
 - [162] M. Kanagawa, Y. Liu, S. Hanashima, A. Ikeda, W. Chai, Y. Nakano, K. Kojima-Aikawa, T. Feizi, Y. Yamaguchi, *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 16954-16965; 'Structural basis for multiple sugar recognition of Jacalin-related human ZG16p lectin'.
 - [163] M. Gabrielsen, P. S. Abdul-Rahman, S. Othman, O. H. Hashim, R. J. Cogdell, *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Commun.* **2014**, *70*, 709-716; 'Structures and binding specificity of galactose-and mannose-binding lectins from champedak: differences from jackfruit lectins'.
 - [164] H. Yang, T. H. Czapla, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 5905-5910; 'Isolation and characterization of cDNA clones encoding jacalin isolectins'.
 - [165] X. Lee, A. Thompson, Z. Zhang, H. Ton-that, J. Biesterfeldt, C. Ogata, L. Xu, R. A. Johnston, N. M. Young, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 6312-6318; 'Structure of the Complex of *Maclura pomifera* Agglutinin and the T-antigen Disaccharide, Gal β 1, 3GalNAc'.
 - [166] E. J. Van Damme, *Glycoconjugate J.* **2021**, 1-15; '35 years in plant lectin research: a journey from basic science to applications in agriculture and medicine'.
 - [167] G. Poiroux, A. Barre, M. Simplicien, S. Pelofy, B. Ségui, E. J. Van Damme, P. Rougé, H. Benoist, *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 230; 'Morniga-G, a T/Tn-specific lectin, induces leukemic cell death via caspase and DR5 receptor-dependent pathways'.
 - [168] B. Claes, R. Dekeyser, R. Villarroel, M. Van den Bulcke, G. Bauw, M. Van Montagu, A. Caplan, *The Plant Cell* **1990**, *2*, 19-27; 'Characterization of a rice gene showing organ-specific expression in response to salt stress and drought'.
 - [169] X. He, L. Li, H. Xu, J. Xi, X. Cao, H. Xu, S. Rong, Y. Dong, C. Wang, R. Chen, *Plant Biol.* **2017**, *19*, 257-267; 'A rice jacalin-related mannose-binding lectin gene, *OsJRL*, enhances *Escherichia coli* viability under high salinity stress and improves salinity tolerance of rice'.
 - [170] M. Regente, G. B. Taveira, M. Pinedo, M. M. Elizalde, A. J. Ticchi, M. S. Diz, A. O. Carvalho, L. de la Canal, V. M. Gomes, *Curr. Microbiol.* **2014**, *69*, 88-95; 'A sunflower lectin with antifungal properties and putative medical mycology applications'.
 - [171] M. Song, W. Xu, Y. Xiang, H. Jia, L. Zhang, Z. Ma, *Plant Mol. Biol.* **2014**, *84*, 95-110; 'Association of jacalin-related lectins with wheat responses to stresses revealed by transcriptional profiling'.
 - [172] S. Van Holle, E. J. Van Damme, *Molecules* **2015**, *20*, 2868-2891; 'Distribution and evolution of the lectin family in soybean (*Glycine max*)'.
 - [173] L. Eggermont, B. Verstraeten, E. Van Damme, *Plant Genome* **2017**, *10*; 'Genome-wide screening for lectin motifs in *Arabidopsis thaliana*'.
 - [174] S. Van Holle, K. De Schutter, L. Eggermont, M. Tsaneva, L. Dang, E. J. Van Damme, *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1136; 'Comparative study of lectin domains in model species: new insights into evolutionary dynamics'.
 - [175] L. Esch, U. Schaffrath, *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1592; 'An update on jacalin-like lectins and their role in plant defense'.

- [176] Q.-H. Ma, J.-Q. Han, *Planta* **2021**, 253, 1-10; 'Identification of monocot chimeric jacalin family reveals functional diversity in wheat'.
- [177] R. Ma, B. Huang, J. Chen, Z. Huang, P. Yu, S. Ruan, Z. Zhang, *PLOS ONE* **2021**, 16, e0248318; 'Genome-wide identification and expression analysis of dirigent-jacalin genes from plant chimeric lectins in Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*)'.
- [178] M. Tsaneva, K. De Schutter, B. Verstraeten, E. J. Van Damme, *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20, 437; 'Lectin sequence distribution in QTLs from rice (*Oryza sativa*) suggest a role in morphological traits and stress responses'.
- [179] H. M. Li, D. Rotter, S. A. Bonos, W. A. Meyer, F. C. Belanger, *Plant Physiol.* **2005**, 138, 2386-2395; 'Identification of a gene in the process of being lost from the genus *Agrostis*'.
- [180] F. S. Kittur, H. Y. Yu, D. R. Bevan, A. Esen, *Glycobiology* **2009**, 19, 277-287; 'Homolog of the maize β -glucosidase aggregating factor from sorghum is a jacalin-related GalNAc-specific lectin but lacks protein aggregating activity'.
- [181] F. S. Kittur, H. Y. Yu, D. R. Bevan, A. Esen, *Plant Physiol. Biochem.* **2010**, 48, 731-734; 'Deletion of the N-terminal dirigent domain in maize β -glucosidase aggregating factor and its homolog sorghum lectin dramatically alters the sugar-specificities of their lectin domains'.
- [182] L. M. Andrade, R. F. Peixoto-Junior, R. V. Ribeiro, P. M. Nóbile, M. S. Brito, P. E. R. Marchiori, S. D. Carlin, A. P. B. Martins, M. H. S. Goldman, J. P. P. Llerena, *Front. Plant Sci.* **2019**, 10, 65; 'Biomass accumulation and cell wall structure of rice plants overexpressing a dirigent-jacalin of sugarcane (*ShDJ*) under varying conditions of water availability'.
- [183] S. Subramanyam, D. F. Smith, J. C. Clemens, M. A. Webb, N. Sardesai, C. E. Williams, *Plant Physiol.* **2008**, 147, 1412-1426; 'Functional characterization of HFR1, a high-mannose N-glycan-specific wheat lectin induced by Hessian fly larvae'.
- [184] C. E. Williams, C. C. Collier, J. A. Nemacheck, C. Liang, S. E. Cambron, *J. Chem. Ecol.* **2002**, 28, 1411-1428; 'A lectin-like wheat gene responds systemically to attempted feeding by avirulent first-instar Hessian fly larvae'.
- [185] X.-M. Wang, Q.-H. Ma, *Plant Physiol. Biochem.* **2005**, 43, 185-192; 'Characterization of a jasmonate-regulated wheat protein related to a beta-glucosidase-aggregating factor'.
- [186] Q.-H. Ma, B. Tian, Y.-L. Li, *Biochimie* **2010**, 92, 187-193; 'Overexpression of a wheat jasmonate-regulated lectin increases pathogen resistance'.
- [187] Q.-H. Ma, W.-B. Zhen, Y.-C. Liu, *Biochimie* **2013**, 95, 359-365; 'Jacalin domain in wheat jasmonate-regulated protein Ta-JA1 confers agglutinating activity and pathogen resistance'.
- [188] W.-d. Yong, Y.-y. Xu, W.-z. Xu, X. Wang, N. Li, J.-s. Wu, T.-b. Liang, K. Chong, Z.-h. Xu, K.-h. Tan, *Planta* **2003**, 217, 261-270; 'Vernalization-induced flowering in wheat is mediated by a lectin-like gene VER2'.
- [189] L. Xing, J. Li, Y. Xu, Z. Xu, K. Chong, *PLoS one* **2009**, 4, e4854; 'Phosphorylation modification of wheat lectin VER2 is associated with vernalization-induced O-GlcNAc signaling and intracellular motility'.
- [190] J. Xiao, S. Xu, C. Li, Y. Xu, L. Xing, Y. Niu, Q. Huan, Y. Tang, C. Zhao, D. Wagner, *Nat. Commun.* **2014**, 5, 1-13; 'O-GlcNAc-mediated interaction between VER2 and TaGRP2 elicits TaVRN1 mRNA accumulation during vernalization in winter wheat'.
- [191] J. F. Jiang, Y. Y. Xu, K. Chong, *J. Integr. Plant Biol.* **2007**, 49, 230-237; 'Overexpression of *OsJAC1*, a lectin gene, suppresses the coleoptile and stem elongation in rice'.

- [192] D. Weidenbach, L. Esch, C. Möller, G. Hensel, J. Kumlehn, C. Höfle, R. Hüchelhoven, U. Schaffrath, *Mol. Plant* **2016**, *9*, 514-527; 'Polarized defense against fungal pathogens is mediated by the Jacalin-related lectin domain of modular *Poaceae*-specific proteins'.
- [193] I. J. Jung, J.-W. Ahn, S. Jung, J. E. Hwang, M. J. Hong, H.-I. Choi, J.-B. Kim, *BMC Plant Biol.* **2019**, *19*, 561; 'Overexpression of rice jacalin-related mannose-binding lectin (OsJAC1) enhances resistance to ionizing radiation in *Arabidopsis*'.
- [194] J.-F. Jiang, Y. Han, L.-J. Xing, Y.-Y. Xu, Z.-H. Xu, K. Chong, *Toxicon* **2006**, *47*, 133-139; 'Cloning and expression of a novel cDNA encoding a mannose-specific jacalin-related lectin from *Oryza sativa*'.
- [195] F. S. Kittur, M. Lalgondar, H. Y. Yu, D. R. Bevan, A. Esen, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 7299-7311; 'Maize β -glucosidase-aggregating factor is a polyspecific jacalin-related chimeric lectin, and its lectin domain is responsible for β -glucosidase aggregation'.
- [196] A. Esen, D. J. Blanchard, *Plant Physiol.* **2000**, *122*, 563-572; 'A specific β -glucosidase-aggregating factor is responsible for the β -glucosidase null phenotype in maize'.
- [197] D. J. Blanchard, M. Cicek, J. Chen, A. Esen, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 11895-11901; 'Identification of β -glucosidase aggregating factor (BGAF) and mapping of BGAF binding regions on maize β -glucosidase'.
- [198] H. Y. Yu, F. S. Kittur, D. R. Bevan, A. Esen, *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1355-1365; 'Determination of β -glucosidase aggregating factor (BGAF) binding and polymerization regions on the maize β -glucosidase isozyme Glu1'.
- [199] R. D. Finn, J. Mistry, B. Schuster-Böckler, S. Griffiths-Jones, V. Hollich, T. Lassmann, S. Moxon, M. Marshall, A. Khanna, R. Durbin, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, D247-D251; 'Pfam: clans, web tools and services'.
- [200] A. E. Vieira Neto, F. D. de Sousa, H. D. M. Pereira, F. B. M. B. Moreno, M. R. Lourenzoni, T. B. Grangeiro, A. C. d. O. Monteiro Moreira, R. d. A. Moreira, *Biochem. J.* **2019**, *476*, 101-113; 'New structural insights into anomeric carbohydrate recognition by frutalin: an α -d-galactose-binding lectin from breadfruit seeds'.
- [201] A. A. Jeyaprakash, P. G. Rani, G. B. Reddy, S. Banumathi, C. Betzel, K. Sekar, A. Surolia, M. Vijayan, *J. Mol. Biol.* **2002**, *321*, 637-645; 'Crystal structure of the jacalin–T-antigen complex and a comparative study of lectin–T-antigen complexes'.
- [202] M. Azarkan, G. Feller, J. Vandenameele, R. Herman, R. El Mahyaoui, E. Sauvage, A. V. Broeck, A. Matagne, P. Charlier, F. Kerff, *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1-14; 'Biochemical and structural characterization of a mannose binding jacalin-related lectin with two-sugar binding sites from pineapple (*Ananas comosus*) stem'.
- [203] F. D. de Sousa, B. B. da Silva, G. P. Furtado, I. d. S. Carneiro, M. D. P. Lobo, Y. Guan, J. Guo, A. R. Coker, M. R. Lourenzoni, M. I. F. Guedes, *Biosci. Rep.* **2017**, *37*, BSR20170969; 'Frutapin, a lectin from *Artocarpus incisa* (breadfruit): cloning, expression and molecular insights'.
- [204] J. L. Meagher, H. C. Winter, P. Ezell, I. J. Goldstein, J. A. Stuckey, *Glycobiology* **2005**, *15*, 1033-1042; 'Crystal structure of banana lectin reveals a novel second sugar binding site'.
- [205] E. Garénaux, M. Kanagawa, T. Tsuchiyama, K. Hori, T. Kanazawa, A. Goshima, M. Chiba, H. Yasue, A. Ikeda, Y. Yamaguchi, *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 5484-5501; 'Discovery, primary, and crystal structures and capacitation-related properties of a prostate-derived heparin-binding protein WGA16 from boar sperm'.
- [206] A. Sharma, M. Vijayan, *Glycobiology* **2011**, *21*, 23-33; 'Influence of glycosidic linkage on the nature of carbohydrate binding in β -prism I fold lectins: An X-ray and molecular dynamics investigation on banana lectin–carbohydrate complexes'.

- [207] Y. Bourne, V. Roig-Zamboni, A. Barre, W. J. Peumans, C. H. Astoul, E. J. Van Damme, P. Rougé, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 527-533; 'The crystal structure of the *Calystegia sepium* agglutinin reveals a novel quaternary arrangement of lectin subunits with a β -prism fold'.
- [208] A. A. Jeyaprakash, S. Katiyar, C. Swaminathan, K. Sekar, A. Surolia, M. Vijayan, *J. Mol. Biol.* **2003**, 332, 217-228; 'Structural basis of the carbohydrate specificities of jacalin: an X-ray and modeling study'.
- [209] F. G. del Sol, C. Nagano, B. S. Cavada, J. J. Calvete, *J. Mol. Biol.* **2005**, 353, 574-583; 'The first crystal structure of a *Mimosa* lectin reveals a novel quaternary arrangement of a widespread domain'.
- [210] Y. Bourne, V. Zamboni, A. Barre, W. J. Peumans, E. J. Van Damme, P. Rougé, *Structure* **1999**, 7, 1473-1482; '*Helianthus tuberosus* lectin reveals a widespread scaffold for mannose-binding lectins'.
- [211] J. Huang, Z. Xu, D. Wang, C. M. Ogata, K. Palczewski, X. Lee, N. M. Young, *Glycobiology* **2010**, 20, 1643-1653; 'Characterization of the secondary binding sites of *Maclura pomifera* agglutinin by glycan array and crystallographic analyses'.
- [212] J. Pratap, A. A. Jeyaprakash, P. G. Rani, K. Sekar, A. Surolia, M. Vijayan, *J. Mol. Biol.* **2002**, 317, 237-247; 'Crystal structures of artocarpin, a *Moraceae* lectin with mannose specificity, and its complex with methyl- α -D-mannose: implications to the generation of carbohydrate specificity'.
- [213] W.-C. Chang, K.-L. Liu, F.-C. Hsu, S.-T. Jeng, Y.-S. Cheng, *PLoS One* **2012**, 7, e40618; 'Ipomoelin, a jacalin-related lectin with a compact tetrameric association and versatile carbohydrate binding properties regulated by its N terminus'.
- [214] A. Rabijns, A. Barre, E. J. Van Damme, W. J. Peumans, C. J. De Ranter, P. Rougé, *FEBS J.* **2005**, 272, 3725-3732; 'Structural analysis of the jacalin-related lectin MornigaM from the black mulberry (*Morus nigra*) in complex with mannose'.
- [215] M. Nagae, S. K. Mishra, S. Hanashima, H. Tateno, Y. Yamaguchi, *Glycobiology* **2017**, 27, 1120-1133; 'Distinct roles for each N-glycan branch interacting with mannose-binding type Jacalin-related lectins *Oryza* and *Calsepa*'.
- [216] M. Nagae, M. Kanagawa, K. Morita-Matsumoto, S. Hanashima, Y. Kizuka, N. Taniguchi, Y. Yamaguchi, *Sci. Rep.* **2016**, 6, 1-11; 'Atomic visualization of a flipped-back conformation of bisected glycans bound to specific lectins'.
- [217] S. Nakamura-Tsuruta, N. Uchiyama, W. J. Peumans, E. J. Van Damme, K. Totani, Y. Ito, J. Hirabayashi, *FEBS J.* **2008**, 275, 1227-1239; 'Analysis of the sugar-binding specificity of mannose-binding-type Jacalin-related lectins by frontal affinity chromatography—an approach to functional classification'.
- [218] H.-J. Gabius, S. André, J. Jiménez-Barbero, A. Romero, D. Solís, *Trends Biochem. Sci.* **2011**, 36, 298-313; 'From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code'.
- [219] A. V. Fejzagic, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **2016**.
- [220] M. Nöth, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **2017**.
- [221] T. El Harrar, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **2018**.
- [222] G. Qing, L.-C. Ma, A. Khorchid, G. Swapna, T. K. Mal, M. M. Takayama, B. Xia, S. Phadtare, H. Ke, T. Acton, *Nat. Biotechnol.* **2004**, 22, 877-882; 'Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*'.
- [223] L. Kong, S. Ranganathan, *Briefings Bioinf.* **2004**, 5, 179-192; 'Delineation of modular proteins: domain boundary prediction from sequence information'.

- [224] M. Källberg, H. Wang, S. Wang, J. Peng, Z. Wang, H. Lu, J. Xu, *Nat. Protoc.* **2012**, 7, 1511-1522; 'Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server'.
- [225] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, 235-242; 'The protein data bank'.
- [226] J. J. A. Armenteros, K. D. Tsirigos, C. K. Sønderby, T. N. Petersen, O. Winther, S. Brunak, G. von Heijne, H. Nielsen, *Nat. Biotechnol.* **2019**, 37, 420-423; 'SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks'.
- [227] F. W. Studier, *J. Mol. Biol.* **1991**, 219, 37-44; 'Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system'.
- [228] T. S. Kumar, K. Gopalakrishna, V. Prasad, M. Pandit, *Anal. Biochem.* **1993**, 213, 226-228; 'Multiple bands on the sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gels of proteins due to intermolecular disulfide cross-linking'.
- [229] D. V. Rial, E. A. Ceccarelli, *Protein Expression Purif.* **2002**, 25, 503-507; 'Removal of DnaK contamination during fusion protein purifications'.
- [230] E. S. Morales, I. L. Parcerisa, E. A. Ceccarelli, *Protein Sci.* **2019**, 28, 800-807; 'A novel method for removing contaminant Hsp70 molecular chaperones from recombinant proteins'.
- [231] S. A. Seidel, C. J. Wienken, S. Geissler, M. Jerabek-Willemsen, S. Duhr, A. Reiter, D. Trauner, D. Braun, P. Baaske, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, 51, 10656-10659; 'Label-free microscale thermophoresis discriminates sites and affinity of protein–ligand binding'.
- [232] M. Maschberger, H. M. Resch, S. Duhr, D. Breitsprecher, *Germany: NanoTemper Technologies GmbH. Available from: www.nanotemper-technologies.com* **2015**; 'Exploring protein stability by nanoDSF'.
- [233] C. A. Royer, C. J. Mann, C. R. Matthews, *Protein Sci.* **1993**, 2, 1844-1852; 'Resolution of the fluorescence equilibrium unfolding profile of trp aporepressor using single tryptophan mutants'.
- [234] A. J. Meyer, T. Brach, L. Marty, S. Kreye, N. Rouhier, J. P. Jacquot, R. Hell, *Plant J.* **2007**, 52, 973-986; 'Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer'.
- [235] A. Savitzky, M. J. Golay, *Anal. Chem.* **1964**, 36, 1627-1639; 'Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures'.
- [236] A. Micsonai, F. Wien, É. Bulyáki, J. Kun, É. Moussong, Y.-H. Lee, Y. Goto, M. Réfrégiers, J. Kardos, *Nucleic Acids Res.* **2018**, 46, W315-W322; 'BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra'.
- [237] D. Datta, G. Pohlentz, M. Schulte, M. Kaiser, F. M. Goycoolea, J. Müthing, M. Mormann, M. J. Swamy, *Arch. Biochem. Biophys.* **2016**, 609, 59-68; 'Physico-chemical characteristics and primary structure of an affinity-purified α -D-galactose-specific, jacalin-related lectin from the latex of mulberry (*Morus indica*)'.
- [238] M. D. Swanson, D. M. Boudreaux, L. Salmon, J. Chugh, H. C. Winter, J. L. Meagher, S. André, P. V. Murphy, S. Oscarson, R. Roy, *Cell* **2015**, 163, 746-758; 'Engineering a therapeutic lectin by uncoupling mitogenicity from antiviral activity'.
- [239] R. A. Laskowski, M. B. Swindells, ACS Publications, **2011**.
- [240] S. El-Gebali, J. Mistry, A. Bateman, S. R. Eddy, A. Luciani, S. C. Potter, M. Qureshi, L. J. Richardson, G. A. Salazar, A. Smart, *Nucleic Acids Res.* **2019**, 47, D427-D432; 'The Pfam protein families database in 2019'.

- [241] S. Nakae, M. Shionyu, T. Ogawa, T. Shirai, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2018**, *86*, 644-653; 'Structures of jacalin-related lectin PPL3 regulating pearl shell biomineralization'.
- [242] G. M. Boratyn, A. A. Schäffer, R. Agarwala, S. F. Altschul, D. J. Lipman, T. L. Madden, *Biol. Direct* **2012**, *7*, 1-14; 'Domain enhanced lookup time accelerated BLAST'.
- [243] E. M. Covés-Datson, S. R. King, M. Legendre, M. D. Swanson, A. Gupta, S. Claes, J. L. Meagher, A. Boonen, L. Zhang, B. Kalveram, *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 1-15; 'Targeted disruption of pi–pi stacking in Malaysian banana lectin reduces mitogenicity while preserving antiviral activity'.
- [244] G. Van Zundert, J. Rodrigues, M. Trellet, C. Schmitz, P. Kastitis, E. Karaca, A. Melquiond, M. van Dijk, S. De Vries, A. Bonvin, *J. Mol. Biol.* **2016**, *428*, 720-725; 'The HADDOCK2. 2 web server: user-friendly integrative modeling of biomolecular complexes'.
- [245] S. J. de Vries, A. M. Bonvin, *PloS one* **2011**, *6*, e17695; 'CPORT: a consensus interface predictor and its performance in prediction-driven docking with HADDOCK'.
- [246] D. Solís, M. J. Maté, M. Lohr, J. P. Ribeiro, L. López-Merino, S. André, E. Buzamet, F. J. Cañada, H. Kaltner, M. Lensch, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2010**, *42*, 1019-1029; 'N-domain of human adhesion/growth-regulatory galectin-9: preference for distinct conformers and non-sialylated N-glycans and detection of ligand-induced structural changes in crystal and solution'.
- [247] R. Chang, A. R. Yeager, N. S. Finney, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 39-41; 'Probing the mechanism of a fungal glycosyltransferase essential for cell wall biosynthesis. UDP-chitobiose is not a substrate for chitin synthase'.
- [248] J. Lundstrøm, E. Korhonen, F. Lisacek, D. Bojar, *Adv. Sci.* **2021**, 2103807; 'LectinOracle: A Generalizable Deep Learning Model for Lectin–Glycan Binding Prediction'.
- [249] E. H. Strickland, S. Beychok, *Crit. Rev. Biochem.* **1974**, *2*, 113-175; 'Aromatic contributions to circular dichroism spectra of protein'.
- [250] K. Sano, H. Ogawa, in *Lectins*, Springer, **2014**, pp. 47-52.
- [251] L. Zimmermann, A. Stephens, S.-Z. Nam, D. Rau, J. Kübler, M. Lozajic, F. Gabler, J. Söding, A. N. Lupas, V. Alva, *J. Mol. Biol.* **2018**, *430*, 2237-2243; 'A completely reimplemented MPI bioinformatics toolkit with a new HHpred server at its core'.
- [252] S. F. Altschul, T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D. J. Lipman, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3389-3402; 'Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs'.
- [253] M. Koeck, A. R. Hardham, P. N. Dodds, *Cell. Microbiol.* **2011**, *13*, 1849-1857; 'The role of effectors of biotrophic and hemibiotrophic fungi in infection'.
- [254] T. R. Costa, C. Felisberto-Rodrigues, A. Meir, M. S. Prevost, A. Redzej, M. Trokter, G. Waksman, *Nat. Rev. Microbiol.* **2015**, *13*, 343-359; 'Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights'.
- [255] J. F. Peberdy, *Trends Biotechnol.* **1994**, *12*, 50-57; 'Protein secretion in filamentous fungi—trying to understand a highly productive black box'.
- [256] L. Pazzagli, G. Cappugi, G. Manao, G. Camici, A. Santini, A. Scala, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 24959-24964; 'Purification, characterization, and amino acid sequence of ceratoplatenin, a new phytotoxic protein from *Ceratocystis fimbriata* f. sp. platani'.
- [257] A. D. Moore, Å. K. Björklund, D. Ekman, E. Bornberg-Bauer, A. Elofsson, *Trends Biochem.* **2008**, *33*, 444-451; 'Arrangements in the modular evolution of proteins'.
- [258] P. Linder, E. Jankowsky, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, *12*, 505-516; 'From unwinding to clamping—the DEAD box RNA helicase family'.
- [259] N. R. Cozzarelli, *Science* **1980**, *207*, 953-960; 'DNA gyrase and the supercoiling of DNA'.

- [260] A. Tanitame, Y. Oyamada, K. Ofuji, M. Fujimoto, N. Iwai, Y. Hiyama, K. Suzuki, H. Ito, H. Terauchi, M. Kawasaki, *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 3693-3696; 'Synthesis and antibacterial activity of a novel series of potent DNA gyrase inhibitors. Pyrazole derivatives'.
- [261] N. Blom, S. Gammeltoft, S. Brunak, *J. Mol. Biol.* **1999**, 294, 1351-1362; 'Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites'.
- [262] S. D. Breazeale, A. A. Ribeiro, A. L. McClerren, C. R. Raetz, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 14154-14167; 'A formyltransferase required for polymyxin resistance in *Escherichia coli* and the modification of lipid A with 4-amino-4-deoxy-l-arabinose: identification and function of UDP-4-deoxy-4-formamido-l-arabinose'.
- [263] D. Bowles, E.-K. Lim, B. Poppenberger, F. E. Vaistij, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2006**, 57, 567-597; 'Glycosyltransferases of lipophilic small molecules'.
- [264] N. Jiang, R. E. Wiemels, A. Soya, R. Whitley, M. Held, A. Faik, *Plant Physiol.* **2016**, 170, 1999-2023; 'Composition, assembly, and trafficking of a wheat xylan synthase complex'.
- [265] T. N. Nguyen, J. A. Goodrich, *Nat. Methods* **2006**, 3, 135-139; 'Protein-protein interaction assays: eliminating false positive interactions'.
- [266] A. D. Hanlon, M. I. Larkin, R. M. Reddick, *Biophys. J.* **2010**, 98, 297-304; 'Free-solution, label-free protein-protein interactions characterized by dynamic light scattering'.
- [267] A. K. Kenworthy, *Methods* **2001**, 24, 289-296; 'Imaging protein-protein interactions using fluorescence resonance energy transfer microscopy'.
- [268] K. D. Pfleger, K. A. Eidne, *Nat. Methods* **2006**, 3, 165-174; 'Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)'.
- [269] I. Remy, S. W. Michnick, *Biotechniques* **2007**, 42, 137-145; 'Application of protein-fragment complementation assays in cell biology'.
- [270] Y. Fujikawa, N. Kato, *The Plant J.* **2007**, 52, 185-195; 'TECHNICAL ADVANCE: Split luciferase complementation assay to study protein-protein interactions in Arabidopsis protoplasts'.
- [271] C.-D. Hu, T. K. Kerppola, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 539-545; 'Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis'.
- [272] I. Remy, S. W. Michnick, *Nat. Methods* **2006**, 3, 977-979; 'A highly sensitive protein-protein interaction assay based on Gaussia luciferase'.
- [273] R. Waadt, L. K. Schmidt, M. Lohse, K. Hashimoto, R. Bock, J. Kudla, *The Plant J.* **2008**, 56, 505-516; 'Multicolor bimolecular fluorescence complementation reveals simultaneous formation of alternative CBL/CIPK complexes in planta'.
- [274] I. Manual; 'ArcticExpress Competent Cells and ArcticExpress (DE3) Competent Cells'.
- [275] F. W. Studier, B. A. Moffatt, *J. Mol. Biol.* **1986**, 189, 113-130; 'Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes'.
- [276] B. P. Anton, E. A. Raleigh, *Genome Announcements* **2016**, 4, e01245-01216; 'Complete genome sequence of NEB 5-alpha, a derivative of *Escherichia coli* K-12 DH5α'.
- [277] K. Nishihara, M. Kanemori, M. Kitagawa, H. Yanagi, T. Yura, *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, 64, 1694-1699; 'Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*'.
- [278] S. D. Moore, P. E. Prevelige Jr, *J. Virol.* **2002**, 76, 10245-10255; 'A P22 scaffold protein mutation increases the robustness of head assembly in the presence of excess portal protein'.

- [279] A. Skerra, T. G. Schmidt, *Methods Enzymol.* **2000**, 326, 271-304; '[18] Use of the Strep-tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins'.
- [280] P. O. Sanwald, Dissertation thesis, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **2020**.
- [281] K. L. Howe, B. Contreras-Moreira, N. De Silva, G. Maslen, W. Akanni, J. Allen, J. Alvarez-Jarreta, M. Barba, D. M. Bolser, L. Cambell, *Nucleic Acids Res.* **2020**, 48, D689-D695; 'Ensembl Genomes 2020—enabling non-vertebrate genomic research'.
- [282] W. Kabsch, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2010**, 66, 125-132; 'Xds'.
- [283] A. Vagin, A. Lebedev, in *Acta Crystallographica a-Foundation and Advances*, Vol. 71, IUCr, 2 Abbey SQ, Chester, CH1 2HU, England, **2015**, p. S19.
- [284] P. D. Adams, P. V. Afonine, G. Bunkóczi, V. B. Chen, I. W. Davis, N. Echols, J. J. Headd, L.-W. Hung, G. J. Kapral, R. W. Grosse-Kunstleve, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **2010**, 66, 213-221; 'PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution'.
- [285] P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, K. Cowtan, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **2010**, 66, 486-501; 'Features and development of Coot'.
- [286] O. Trott, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **2010**, 31, 455-461; 'AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading'.
- [287] N. M. O'Boyle, M. Banck, C. A. James, C. Morley, T. Vandermeersch, G. R. Hutchison, *J. Cheminf.* **2011**, 3, 1-14; 'Open Babel: An open chemical toolbox'.

Danksagung

Am Ende meiner Dissertation möchte ich mich bei all den wunderbaren Menschen bedanken, die mich auf meinem langen Weg begleitet, mir geholfen und mich während meiner Promotion unterstützt haben.

Zuallererst gilt mein herzlicher Dank Dr. Thomas Classen. Ich erkannte bereits bei meinem Bewerbungsgespräch, dass ich im IBOC und speziell in der Arbeitsgruppe SecMetEnz in guten Händen bin und dass ich viel lernen kann. Durch das entgegengebrachte Vertrauen in mir, konnte ich mich während meiner Zeit frei entfalten und das Projekt nach meinen Vorstellungen und Interessen gestalten.

Mein weiterer Dank gilt Prof. Jörg Pietruszka für Deine Beurteilung und fachliche Unterstützung bei meiner Arbeit als Erstgutachter sowie in den zahlreichen Gesprächen während meiner Zeit am IBOC.

Ohne das Engagement und die Hilfe meiner KooperationspartnerInnen wäre diese Arbeit in ihrer Vielfalt nicht möglich gewesen.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Schaffrath sowohl für die erfolgreiche Zusammenarbeit als auch für die Übernahme der Bewertung der vorliegenden Arbeit als Zweitgutachter bedanken. Die Zusammenarbeit im OsJAC1-Projekt war mir eine sehr große Freude. Ich möchte mich auch ausdrücklich bei Christian Kirsch für die Bereitstellung des Pflanzenmaterials und für seine hohe Hilfsbereitschaft und Motivation bedanken. Eure Zuverlässigkeit und Eure fachliche Expertise haben es uns ermöglicht, die pflanzenbiologischen Aspekte dieses Projekts näher zu beleuchten.

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Dr. Oliver Weiergräber bedanken, der mich bei meinen kristallographischen Experimenten unterstützt hat. Deine Motivation und Dein Interesse an meinem Projekt haben mich trotz der anfänglichen Rückschläge bei der Kristallisation stets ermutigt. Unsere Gespräche waren äußerst hilfreich und so konnten wir Schritt für Schritt einen Weg finden, die DIR-Domäne erfolgreich zu kristallisieren. Besonders möchte ich mich für Deine kritische und fachliche Auseinandersetzung mit meinen Manuskripten bedanken, die den Publikationen ein hohes Maß an Qualität verliehen haben.

Eines meiner Interessen war es, das Projekt mit massenspektrometrischen Methoden zu untersuchen. Hierfür konnte ich auf die Expertise unseres Nachbarinstituts IBG-1 zurückgreifen. Ich möchte mich bei Christina Mack für die Messung meiner MALDI-ToF-Proben

bedanken. Bei Astrid Wirtz möchte ich mich für die Durchführung und das Engagement bei den LC-MS/MS-Messungen bedanken. Die Zusammenarbeit mit Euch hat mir viel Freude bereitet und mich in meiner Entscheidung bestärkt, auch nach meiner Promotion mit massenspektrometrischen Messmethoden weiterzuarbeiten.

Mein weiterer Dank gilt dem gesamten IBOC, das sich durch den engen fachlichen Austausch zwischen den Chemikern und den Biochemikern auszeichnet. Darüber hinaus haben meine KollegInnen im IBOC mich auch in schwierigen Zeiten während des Projektes und der Corona-Pandemie unterstützt und mich angetrieben. Ich möchte mich bei Moni, Rainer, Vera, Sonja, Erik, Irene, Bea und Birgitt für die zahlreiche administrative und technische Unterstützung bedanken.

Besonders in Erinnerung bleiben wird mir die Zeit im Labor 212 mit Herrn Weber (Moritz), Bea, Krisztian und Martin. Eure ständige Hilfsbereitschaft im Labor, Euer Humor sowie der fachliche und soziale Austausch hat meine Zeit im IBOC sehr bereichert.

Ich bin auch sehr dankbar für die Zeit, die ich mit meinen beiden SecMetEnz-Kollegen Jan Gebauer und Alex Fejzagić verbracht habe. Ich konnte mich immer auf Euch verlassen. In diesem Zusammenhang möchte ich mich bei dem besten Laborleiter (a.D.) Alex F. entschuldigen, da ich mich höchstwahrscheinlich nicht in all Deine Listen eingetragen habe.

Ich möchte mich auch bei allen Studierenden und PraktikantInnen, die ich während meiner Zeit am IBOC betreuen durfte, für ihre hohe Motivation und ihr Interesse bedanken. Mein besonderer Dank gilt meiner RISE-Austauschstudentin Shailey Shah, die mit ihrer fröhlichen Art und ihren vielen Fragen die Zusammenarbeit bereichert hat.

Ich möchte mich bei meinen Freunden den Einhörnern Dr. Dominik Karrer, Thomas Klaus und Kai Krämer für Eure Anregungen und die vielen Diskussionen zu wissenschaftlichen, politischen und allen anderen Themen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Bruno Breuninger, Dr. Dominik Karrer und Esther Breuninger, die sich die Mühe gemacht haben, meine Dissertation zu lesen und mir wertvolle Korrekturvorschläge gemacht haben. Ich schätze Euren Beitrag sehr.

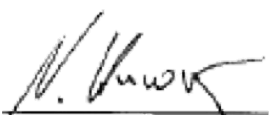
Ich möchte mich bei meiner Familie und insbesondere bei meinen Eltern für ihre Unterstützung bedanken. Ohne Euch wäre ich nicht in der Lage gewesen, meinen bisherigen Lebensweg in dieser Vielfalt zu gehen.

Abschließend möchte ich mich insbesondere bei Esther Bedanken dafür, dass Du mich motivierst, unterstützt, antreibst und einfach immer für mich da bist.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Nikolai Huwa, versichere an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unzulässige Hilfe unter Beachtung der Grundsätze zur Sicherung der guten wissenschaftlichen Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf verfasst habe. Gedanken, die direkt oder indirekt aus fremden Quellen übernommen wurden, sind als solche gekennzeichnet. Bei Ergebnissen, die in Zusammenarbeit mit anderen entstanden sind, habe ich meinen Beitrag angegeben.

Ferner erkläre ich, dass ich in keinem anderen Dissertationsverfahren mit oder ohne Erfolg versucht habe, diese Dissertation einzureichen.



(Nikolai Huwa)