

Die Cysteinpeptidase HvPAP14 der Gerste und ihre Rolle beim Abbau plastidärer Proteine

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Susann Frank

Die Cysteinpeptidase HvPAP14 der Gerste und ihre Rolle beim Abbau plastidärer Proteine

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Susann Frank

Erste Gutachterin: Prof. Dr. Karin Krupinska

Zweiter Gutachter: PD Dr. Christoph Plieth

Tag der mündlichen Prüfung: 22.02.2017

Zum Druck genehmigt: 28.02.2017

gez. Prof. Dr. Natascha Oppelt, Dekanin

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung	10
1.1 Biologische Bedeutung der Proteolyse	10
1.2 Abbau von Chloroplastenproteinen	11
1.2.1 Abbau von Fotosyntheseproteinen	11
1.2.2 Abbau plastidärer Proteine während der Seneszenz	13
1.2.3 Plastidäre Proteasen	14
1.3 HvPAP14 - eine Papain-ähnliche Cysteinpeptidase des KDEL-Typs	16
1.3.1 Cysteinpeptidasen der C1A-Familie	16
1.3.2 KDEL-Cysteinpeptidasen	18
1.3.3 HvPAP14	20
1.4 Zielsetzung der Arbeit	22
2 Material und Methoden	24
2.1 Pflanzenmaterial	24
2.2 Bakterienkulturen und Vektoren	24
2.2.1 <i>Escherichia coli</i> -Stämme und ihre Kultivierung	24
2.2.2 Vektoren	25
2.3 Mikrobiologische Arbeiten	25
2.3.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	25
2.3.2 Transformation von Bakterienzellen mittels Hitzeschock	26
2.3.3 Heterologe Expression in <i>E. coli</i> -Zellen	26
2.4 Proteinbiochemische Methoden	26
2.4.1 Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie	26
2.4.2 Proteinanalyse der pH-abhängigen Aktivierung von HvPAP14	28
2.4.3 Aktivierungs- und Aktivitätsanalyse von HvPAP14 mithilfe von Z-FR-AMC	28
2.4.4 Messung der Enzymkinetik von HvPAP14	29
2.4.5 Proteinisolierung aus Gerstenblättern	31
2.4.6 Plastidenisolierung	31
2.4.7 Isolierung stromaler Proteine	33

2.4.8	Isolierung und Fraktionierung von Thylakoidmembranproteinen.....	33
2.4.9	Bestimmung der Proteinkonzentration	33
2.4.10	SDS-PAGE.....	34
2.4.11	Coomassie-Färbung von SDS-Acrylamidgelen.....	34
2.4.12	Western Blot.....	34
2.4.13	Immundetektion.....	35
2.5	Nukleinsäure-Analytik	36
2.5.1	RNA-Isolierung	36
2.5.2	cDNA-Synthese.....	36
2.5.3	Isolierung von Nukleinsäuren aus <i>E. coli</i>	37
2.5.4	DNA-Isolierung aus Agarose-Gel	37
2.5.5	DNA-Fällung.....	37
2.5.6	Nukleinsäure-Agarosegelelektrophorese.....	37
2.5.7	Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	38
2.5.8	Restriktion	38
2.5.9	Ligation	38
2.5.10	Sequenzierung	38
2.5.11	Polymerasekettenreaktion (PCR)	39
2.5.11.1	Standard-PCR.....	40
2.5.11.2	Pfu-PCR.....	40
2.5.11.3	Kolonie-PCR	41
2.5.11.4	Expressionsanalyse mittels RT-PCR.....	42
2.6	Biolistische Transformation von Zwiebelepidermiszellen	43
2.7	Transiente Transformation von Protoplasten aus Gerstenblättern mittels PEG	43
2.8	Fluoreszenzmikroskopie.....	45
2.9	Bestimmung des Chlorophyllgehalts von Thylakoidsuspensionen.....	45
2.10	<i>In silico</i> -Bestimmung der subzellulären Lokalisation von Proteinen.....	46
3	Ergebnisse	47
3.1	Die subzelluläre Lokalisation von HvPAP14.....	47
3.1.1	<i>In silico</i> -Analyse der subzellulären Lokalisation von HvPAP14	47
3.1.2	Analyse der subzellulären Lokalisation von HvPAP14 mittels <i>Life-Cell-Imaging</i>	48
3.1.2.1	Biolistisch transformierte Zwiebelepidermiszellen.....	48
3.1.2.2	Transiente Transformation von Gerstenprotoplasten	49
3.2	Rekombinante HvPAP14.....	51
3.2.1	Proteinsynthese und -isolierung von HvPAP14	51

3.2.2	Biochemische Charakterisierung von HvPAP14.....	52
3.2.2.1	pH-Abhängigkeit der aktivierenden Prozessierung und der Aktivität von HvPAP14.....	52
3.2.2.2	Redoxabhängigkeit der aktivierenden Prozessierung und der Aktivität von HvPAP14.....	56
3.2.2.3	Einfluss von Ionen auf die aktivierende Prozessierung und die Aktivität von HvPAP14.....	57
3.2.2.4	Einfluss von Natriumdodecylsulfat auf die Aktivierung und die Aktivität von HvPAP14.....	59
3.2.2.5	Enzymkinetik von HvPAP14.....	59
3.3	Analyse potentieller plastidärer Substrate von HvPAP14.....	61
3.3.1	Stromale Proteine als HvPAP14-Substrate.....	61
3.3.2	Thylakoidmembranproteine als HvPAP14-Substrate.....	63
3.4	Überexpression von HvPAP14 in Gerstenprotoplasten.....	66
3.5	HvPAP14 in Gerstenpflanzen.....	69
3.5.1	HvPAP14 in Chlorina-Mutanten.....	69
3.5.2	Einfluss von Licht auf die HvPAP14-Menge in Gerstenblättern.....	71
4	Diskussion.....	73
4.1	Subzelluläre Lokalisationen und biochemische Eigenschaften von HvPAP14.....	73
4.1.1	Lokalisation von HvPAP14 in der Pflanzenzelle.....	73
4.1.2	Einfluss der Ionenbedingungen auf HvPAP14.....	76
4.2	Abbau plastidärer Proteine durch HvPAP14.....	80
4.2.1	RbcL als Substrat von HvPAP14.....	81
4.2.2	PSII- und LHC-Proteine als Substrate von HvPAP14.....	85
4.3	Funktionen von HvPAP14.....	91
4.4	Ausblick.....	92
5	Zusammenfassung / Abstract.....	94
6	Literaturverzeichnis.....	96
Anhang.....		108
Erklärung.....		113
Danksagung.....		114

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schematischer Aufbau des Fotosyntheseapparats höherer Pflanzen.....	12
Abb. 1.2: Schematische Darstellung plastidärer Peptidasen.....	14
Abb. 1.3: Reaktionsmechanismus im aktiven Zentrum von Papain.....	17
Abb. 1.4: Schematischer Aufbau und Sequenzvergleich der KDEL-CysEP Ricinus-CysEP (AAC62396.1) aus <i>R. communis</i> , CEP1 (NP_568722.1) aus <i>A. thaliana</i> und HvPAP14 (CAQ00109.1) aus <i>H. vulgare</i>	19
Abb. 1.5: Proteinformen der Cysteinpeptidase HvPAP14 und ihre Lokalisation.....	21
Abb. 3.1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der HvPAP14:RFP-Fusionsproteine in transient transformierten Zwiebelepidermiszellen.....	48
Abb. 3.2: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der HvPAP14:RFP-Fusionsproteine in transformierten Gerstenprotoplasten.....	50
Abb. 3.3: Isolierung von rekombinanter HvPAP14 aus <i>E. coli</i> -Zellen.....	51
Abb. 3.4: Proteinanalyse zur pH-Abhängigkeit der Aktivierung von HvPAP14.....	53
Abb. 3.5: pH-Abhängigkeit der aktivierenden Prozessierung von HvPAP14.....	54
Abb. 3.6: pH-Abhängigkeit der Aktivität von HvPAP14.....	55
Abb. 3.7: Abhängigkeit der Aktivierung und der Aktivität von HvPAP14 vom Redoxstatus.....	56
Abb. 3.8: Einfluss von Ionen auf die aktivierende Prozessierung von HvPAP14.....	58
Abb. 3.9: Einfluss von Ionen auf die Aktivität von HvPAP14.....	58
Abb. 3.10: Aktivierung und Aktivität von HvPAP14 unter dem Einfluss von SDS.....	59
Abb. 3.11: Umsatz von Z-FR-AMC durch HvPAP14 und Auftragungen zur Ermittlung der Reaktionskonstanten.....	60
Abb. 3.12: Behandlung von stromalen Proteinen mit HvPAP14 und der Abbau von RbcL durch HvPAP14.....	62
Abb. 3.13: Thylakoidmembranproteine in Fraktionen eines Saccharosedichtegradienten nach Jensen <i>et al.</i> (2000).....	63
Abb. 3.14: Behandlung von Thylakoidmembranproteinen mit HvPAP14.....	64
Abb. 3.15: Analyse der durch HvPAP14 abbaubaren Thylakoidmembranproteine durch Immundetektion mit spezifischen Antikörpern.....	65
Abb. 3.16: Proteinanalyse der <i>HvPAP14</i> -überexprimierenden Protoplasten.....	66
Abb. 3.17: <i>HvPAP14</i> -überexprimierende Protoplasten 20 h nach der Transformation.....	67

Abb. 3.18: Analyse der HvPAP14 und ihrer potentiellen plastidären Substrate in <i>HvPAP14</i> - überexprimierenden Protoplasten.....	68
Abb. 3.19: Analyse der HvPAP14 in LHC-defizienten Gerstenblättern.....	70
Abb. 3.20: Analyse der HvPAP14 in Gerstenblättern bei unterschiedlicher Lichtintensität.....	71

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Zusammensetzung der pH-Puffer.....	28
Tab. 2.2: Zusammensetzung der Kontrolllösungen für die Aktivierungs- und Aktivitätsanalyse.....	29
Tab. 2.3: Zusammensetzung des GM-Puffers.	32
Tab. 2.4: Zusammensetzung der Lösungen für den Percoll-Gradienten.	32
Tab. 2.5: Verwendete Antikörper.	35
Tab. 2.6: Primer für die Sequenzierung.....	39
Tab. 2.7: Verwendete Primer zur Amplifizierung von DNA mittels PCR.	39
Tab. 2.8: Pipettierschema für die Standard-PCR.....	40
Tab. 2.9: Temperaturprofil für die durchgeführten PCR.	40
Tab. 2.10: Pipettierschema für die Pfu-PCR.....	41
Tab. 2.11: Temperaturprofil für die Pfu-PCR.....	41
Tab. 2.12: Pipettierschema für die Kolonie-PCR.	41
Tab. 2.13: Verwendete Primer zur Amplifizierung von cDNA mittels RT-PCR.....	42
Tab. 2.14: Pipettierschema für die RT-PCR.....	42
Tab. 2.15: Temperaturprofil für die RT-PCR.....	42
Tab. 2.16: Zusammensetzung der Enzymlösung zum Zellwandabbau.....	44
Tab. 2.17: Zusammensetzung des Saccharosepuffers.	44
Tab. 2.18: Zusammensetzung des W5-Puffers.	45
Tab. 2.19: Zusammensetzung der MaMg-Lösung.....	45
Tab. 2.20: Für die verwendeten Fluorophore spezifischen Einstellungen des CLSM.....	45
Tab. 2.21: Verwendete Programme für die <i>in silico</i> -Vorhersage der subzellulären Lokalisation.	46
Tab. 3.1: <i>In silico</i> -Vorhersage der subzellulären Lokalisation von HvPAP14.....	47
Tab. 3.2: Ermittelte Konstanten der Reaktion von HvPAP14 mit Z-FR-AMC.....	61
Tab. 4.1: Zusammenfassung der Ergebnisse der HvPAP14-Substratanalyse.....	80

Abkürzungsverzeichnis

AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
β -DM	Dodecyl- β -D-maltosid
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	bovines Serumalbumin
CCV	<i>chloroplast vesiculation protein-containing vesicles</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>copy DNA</i>)
CysEP	Cysteinendopeptidasen
Cyt b ₆ f	Cytochrom b ₆ f-Komplex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI-LC/MS	<i>electrospray ionization - liquid chromatography / mass spectrometry</i>
Fd	Ferredoxin
FNR	Ferredoxin-NADP-Reduktase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KL(o/r)	Kontrollösung (oxidierend/reduzierend)
K _m	Michaelis-Konstante
KV	KDEL-Protease-akkumulierende Vesikel
LB	<i>lysogeny broth</i>
LHC	Lichtsammelkomplex (<i>light harvesting complex</i>)
MBP	Maltose-bindendes Protein
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MS	Murashige und Skoog
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
NTA	Nitrilotriessigsäure (<i>nitrilotriacetic acid</i>)
OEC	<i>oxygen evolving complex</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PC	Plastocyanin
PCD	programmierter Zelltod (<i>programmed cell death</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
PQ	Plastochinon (<i>plastoquinone</i>)
PS	Fotosystem (<i>photosystem</i>)
PTM	posttranslationale Modifikation
RCB	<i>Rubisco-containing bodies</i>

Abkürzungsverzeichnis

RFP	rot fluoreszierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
RT	reverse Transkription
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
SAG	seneszenzassoziiertes Gen
SAV	seneszenzassoziierte Vakuole
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SP	Signalpeptid
SPP	<i>stromal processing peptidase</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBS-T	TRIS-gepufferte Salzlösung (<i>TRIS-buffered saline</i>) mit Tween-20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TIC	<i>translocon on the inner chloroplast membrane</i>
T _m	Schmelztemperatur (<i>melting temperature</i>)
TOC	<i>translocon on the outer chloroplast membrane</i>
TPP	<i>thylakoidal processing peptidase</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV/VIS	ultraviolette/sichtbares (<i>visible</i>) Licht
v ₀	Anfangsgeschwindigkeit
v _{max}	maximale Anfangsgeschwindigkeit
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
w/v	Masse pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
Z-FR-AMC	Benzyloxycarbonyl-phenylalanylarginin-4-methylcoumaryl-7-amid

1 Einleitung

1.1 Biologische Bedeutung der Proteolyse

Pflanzen durchlaufen in ihrer Entwicklung nicht nur Prozesse, die mit dem Aufbau von Stoffen, Zellenstrukturen, Geweben und Organen verbunden sind. Vielmehr sind diese Syntheseprozesse meist auch eng mit Abbauprozessen verbunden. So beginnt die Entwicklung eines pflanzlichen Embryos mithilfe von Nährstoffen, die durch den Abbau von Kohlenhydraten, Lipiden und Speicherproteinen bereitgestellt werden. An diesen Abbauprozessen sind Enzyme wie Glycosidasen, Lipasen und Proteasen beteiligt. Proteasen katalysieren die Hydrolyse von Peptidbindungen, was bedeutet, dass sie Peptide und Proteine irreversibel spalten können. Diese Proteolysen sind während des gesamten Lebenszyklus von entscheidender Bedeutung. Sie spielen bei der Biogenese und der Erhaltung von Zellkompartimenten und deren Metabolismen eine große Rolle, in dem sie u.a. für die Erhaltung der Qualität des jeweiligen Proteoms sorgen, die essentiell für die Lebenserhaltung ist.

Auf molekularer Ebene kann die Lokalisation von Proteinen, die Aktivierung zahlreicher Enzyme und die Funktion strukturgebender Eiweiße häufig erst durch die Modifizierung mithilfe von Proteasen stattfinden. Die Proteasen werden beispielsweise benötigt, um Signalsequenzen, die der richtigen Lokalisierung der Proteine dienen, nach deren Transport in das Zielkompartiment abzuspalten. So wird das Signalpeptid von Proteinen, die am rauen Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert werden, abgespalten, wenn diese ins ER-Lumen entlassen werden. Einige Enzyme werden durch die Proteasen aus ihrer Vorform, dem Zymogen, durch Abspalten von Peptiden in ihre aktive Form umgewandelt. So können sie an dem Ort der Aktivität bereits vorher in ihrer inaktiven Form bereitgestellt und bei Bedarf aktiviert werden. Proteasen können zudem Protein-Protein-Interaktionen regulieren, indem sie die betroffenen Proteine modifizieren. Durch die Prozessierung und die damit verbundene Reifung oder Freisetzung von Transkriptionsfaktoren können sie außerdem Einfluss auf die Genexpression nehmen. Auch bioaktive Moleküle, die als intrazelluläre Signale wirken, können durch Proteolyse generiert werden.

Eine der wichtigsten Funktionen von Proteasen ist der Abbau fehlgefalteter, beschädigter oder aggregierter Proteine. Der Proteinabbau kann begünstigt werden durch posttranslationale Modifikationen wie beispielsweise Phosphorylierungen, durch eine unausgeglichene Stöchiometrie von Proteinen eines Komplexes, durch die limitierte Verfügbarkeit von Kofaktoren und speziell bei Pflanzen auch durch die Änderungen der Lichtbedingungen. Am Ende der Entwicklung von pflanzlichen Zellen und Organen werden im Seneszenzprozess gezielt Proteine abgebaut, um vor allem Stickstoff in Form von Aminosäuren zu remobilisieren. Dieser Stickstoff kann beispielsweise bei der Entwicklung von neuen Blättern oder Samen genutzt werden. Aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen unterliegen die Proteasen einer starken Regulation. Meist liegen sie nur in einer geringen Grundmenge vor und müssen

selbst erst aktiviert werden. Außerdem muss sichergestellt sein, dass sie nur die Proteine schneiden, die für einen Abbau oder eine Prozessierung vorgesehen sind.

1.2 Abbau von Chloroplastenproteinen

1.2.1 Abbau von Fotosyntheseproteinen

Von besonderem Interesse ist der Abbau plastidärer Proteine, der sowohl bei der Anpassung an Umweltbedingungen als auch bei der Remobilisierung wichtiger Nährstoffe während der Seneszenz eine wichtige Rolle spielt. In den Chloroplasten findet die Fotosynthese statt, bei der Lichtenergie genutzt wird, um Zucker und Sauerstoff zu erzeugen. An diesem Prozess sind zahlreiche Proteine und Proteinkomplexe beteiligt (Abb. 1.1). Durch die Lichtenergie wird Chlorophyll, das gebunden an Lichtsammelkomplexe (LHC) und Fotosysteme (PS) in der Thylakoidmembran vorliegt, in einen angeregten Zustand versetzt. Diese Anregungsenergie wird an die zentralen Chlorophyll a-Moleküle des PSII weitergeleitet, die dadurch Elektronen abgeben können. Diese Elektronen werden über das Redoxsystem der Elektronentransportkette vom Fotosystem II (PSII) über Plastochinon (PQ), den Cytochrom $b_6 f$ -Komplex (Cyt $b_6 f$) und Plastocyanin (PC) auf das Fotosystem I (PSI) übertragen. Von dort aus gelangen die Elektronen über Ferredoxin (Fd) zur Ferredoxin-NADP-Reduktase (FNR), die NADP^+ zu NADPH reduziert. Die aus dem Chlorophyll frei gewordenen Elektronen werden am PSII durch die Spaltung von Wasser zu Sauerstoff und Protonen ($2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4 \text{H}^+ + 4 \text{e}^-$) zurückgewonnen.

Durch die Fotosyntheseprozesse sinkt der pH-Wert des Thylakoidlumens von etwa 7,8 auf bis zu 5,7, während der pH-Wert im Stroma etwa konstant bei 7,8 bis 8,0 bleibt (Höhner *et al.*, 2016). Mithilfe der ATP-Synthase kann durch den so entstandenen Protonengradient ADP zu ATP phosphoryliert werden. NADPH und ATP können anschließend für die Kohlenstofffixierung im sogenannten Calvin-Zyklus genutzt werden. Das Schlüsselenzym des Calvin-Zyklus ist die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco), die CO_2 auf Ribulose-1,5-bisphosphat übertragen kann. Dies führt nach weiteren Schritten schließlich zur Bildung von Glucose.

Durch die während der Fotosynthese auftretende Anregungsenergie oder übertragenen Elektronen können reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen, die in der Lage sind Makromoleküle wie Proteine und Lipide zu schädigen (Apel und Hirt, 2004). Die ROS werden vermehrt unter bestimmten Stresssituationen gebildet, bei denen ein Überangebot an Licht bzw. ein Mangel an Elektronenakzeptoren vorherrscht. Die Energie bzw. die Elektronen werden dann gehäuft an Sauerstoff und dessen Derivate übertragen, wobei hochreaktive Moleküle entstehen. Diese können u.a. mit Proteinen reagieren, die anschließend ihre Funktionsfähigkeit verlieren.

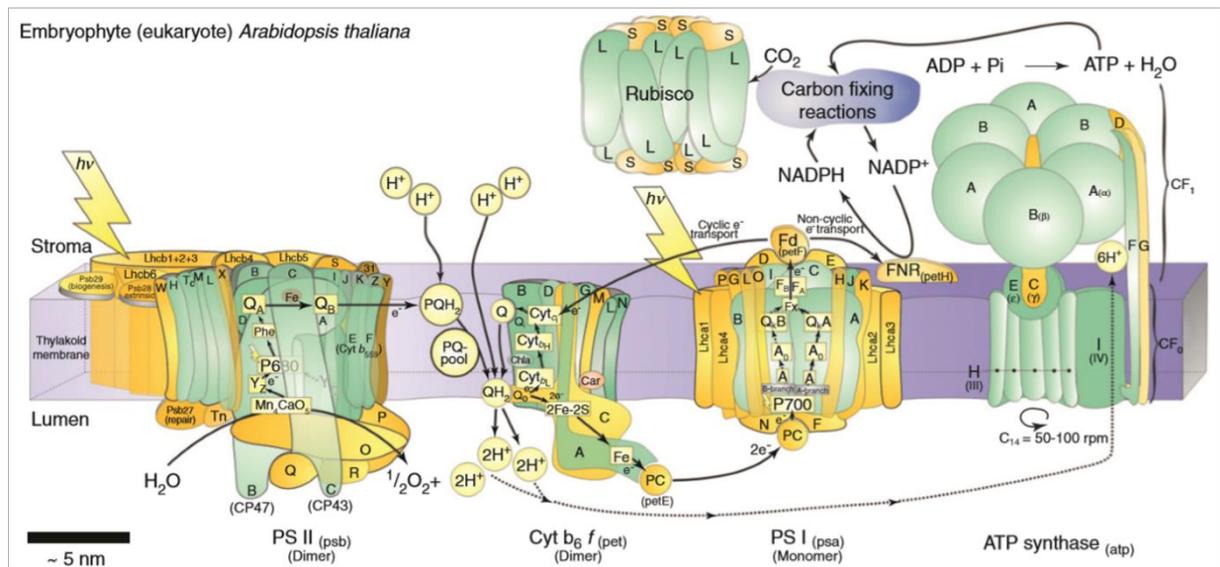


Abb. 1.1: Schematischer Aufbau des Fotosyntheseapparats höherer Pflanzen (exemplarisch von *Arabidopsis thaliana*). Gezeigt sind die Reaktionen an und zwischen den großen Fotosynthesekomplexen Fotosystem II (PSII), Cytochrom $b_6 f$ (Cyt $b_6 f$), Fotosystem I (PSI), ATP-Synthase und Rubisco. (Abb. aus Allen *et al.*, 2011)

Werden einzelne Proteine bzw. Untereinheiten eines großen Proteinkomplexes geschädigt, ist ein Abbau dieser Untereinheit durch Proteasen notwendig. So können diese schnellstmöglich durch intakte Proteine ersetzt und damit die Funktion des gesamten Komplexes wiederhergestellt werden. Ein Beispiel hierfür ist der Reparaturzyklus von fotoinhibiertem D1-Protein (PsbA), das als Kernprotein des PSII besonders oft von Schädigungen durch ROS betroffen ist (Andersson und Aro, 2001). Außer bei diesen Reparaturmechanismen spielen Proteasen auch beim Abbau bestimmter Proteine zur Anpassung an bestimmte Umweltbedingungen eine große Rolle. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Proteine des LHCII bei der Adaptation an Starklicht vermehrt abgebaut werden, um u.a. Schäden durch ROS zu vermeiden (Lindahl *et al.*, 1995; Ballottari *et al.*, 2007).

Neben plastidären Proteasen spielen auch posttranslationale Modifikationen der abzubauenen Proteine eine Rolle. Die Proteine können z.B. durch die Reaktion mit ROS in ihrer Löslichkeit verändert werden, wodurch eine Assoziation an die Membranen erfolgen kann, was wiederum einen Abbau durch membranständige Peptidasen erleichtert. Dies wurde u.a. für Rubisco beschrieben (Desimone *et al.*, 1996). Durch (De-)Phosphorylierungen können Proteine in eine andere Konformation gebracht werden, die einen Abbau durch plastidäre Proteasen begünstigt. Beispielsweise stabilisieren die Phosphorylierungen des D1-Proteins den PSII-Komplex. Erst die Dephosphorylierung von D1 führt zum vermehrten Abbau des Proteins und des Komplexes (Kato und Sakamoto, 2014).

1.2.2 Abbau plastidärer Proteine während der Seneszenz

Ein massiver Abbau von Chloroplastenproteinen findet zum Ende der Entwicklung von Pflanzenzellen statt. Während der Seneszenz werden Nährstoffe remobilisiert, um an anderer Stelle, wie in den sich entwickelnden Blättern und reifenden Samen, wieder genutzt werden zu können (Krupinska, 2007). Es wird vor allem Stickstoff in Form von Aminosäuren durch den Abbau von plastidären Proteinen zurückgewonnen. Als größte Stickstoffquelle gilt das stromale Enzym Rubisco, das rund 70% des Stickstoffs aus Chloroplasten enthält (Hörtensteiner und Feller, 2002; Krupinska, 2007). Der restliche Stickstoff stammt hauptsächlich aus den Proteinkomplexen des Fotosyntheseapparates der Thylakoidmembran, vor allem aus den LHCII-Proteinen (Matile, 1992; Hörtensteiner und Feller, 2002).

Für den Abbau der Chloroplastenproteine sind unterschiedliche Mechanismen bekannt. Die meisten Proteasen und insbesondere die, die während der Seneszenz verstärkt auftreten, sind nicht in den Chloroplasten sondern in Vakuolen lokalisiert (Guamét *et al.*, 1999). Mittels Phagozytose können ganze Plastiden in die zentrale Vakuole aufgenommen und dort abgebaut werden (Minamikawa *et al.*, 2001). Ebenfalls können plastidäre Proteine über Vesikel zum Abbau in die Vakuole transportiert werden. Ein Beispiel hierfür sind die RCB (*Rubisco-containing bodies*), die von den Chloroplasten bzw. von deren Ausläufern, den Stromuli, abgeschnürt werden. Sie besitzen eine Doppelmembran und enthalten stromale Proteine, jedoch keine Thylakoide (Chiba *et al.*, 2003). Des Weiteren konnten in *Arabidopsis thaliana* während der Seneszenz und unter abiotischen Stressbedingungen sogenannte CCV (*chloroplast vesiculation protein-containing vesicles*) beobachtet werden. Diese von den Chloroplasten stammenden, vesikulären Strukturen enthalten Stroma-, Hüllmembran- und Thylakoidproteine (Wang und Blumwald, 2014). Außerdem dienen während der Seneszenz kleine, saure Vakuolen, die SAV (seneszenz-assoziierte Vakuolen), dem Abbau von Chloroplastenproteinen. In ihnen konnten stromale Proteine wie Rubisco und auch Thylakoidmembranproteine des PSI nachgewiesen werden. Sie enthalten zudem u.a. die seneszenzinduzierte Cysteinpeptidase SAG12 (Otegui *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2013).

Die ersten Schritte des Abbaus von plastidären Proteinen finden oft innerhalb der Chloroplasten statt. Die Proteasen, die für den Proteinabbau innerhalb der Plastiden während der Seneszenz verantwortlich sind, sind jedoch noch größtenteils unbekannt. Bei der Untersuchung der seneszenzabhängigen Genexpression in Fahnenblättern von Gerste (*Hordeum vulgare*) stachen besonders Gene für Cysteinpeptidasen hervor, da ihre Expression in der späten Entwicklungsphase stark hochreguliert war (Hollmann *et al.*, 2014). Zudem lieferten auch Inhibitorexperimente deutliche Hinweise auf Cysteinpeptidase-Aktivitäten in Chloroplasten während der Seneszenz (Navarre und Wolpert, 1999).

1.2.3 Plastidäre Proteasen

Zu den bekanntesten plastidären Proteasen zählen DEG-, CLP- und FTSH-Proteasen sowie die prozessierenden Proteasen wie SPP (*stromal processing peptidase*) oder TPP (*thylakoidal processing peptidase*). SPP und TPP dienen der Abspaltung der Transitpeptide von Vorstufenproteinen nach deren Import in das Stroma bzw. in das Thylakoidlumen der Chloroplasten (Teixeira und Glaser, 2013). Die DEG-, CLP- und FTSH-Proteasen haben eine große Ähnlichkeit zu bakteriellen Proteasen, die bereits umfassend in *Escherichia coli* charakterisiert wurden. Da Plastiden nach der Endosymbiontentheorie aus photosynthetischen Bakterien hervorgegangen sind, kann diese Ähnlichkeit durch den bakteriellen Ursprung der Proteasen begründet sein. Die plastidären Homologe der DEG-, CLP- und FTSH-Proteasen weisen jedoch eine deutlich größere Anzahl an Isomeren auf (Sakamoto, 2006).

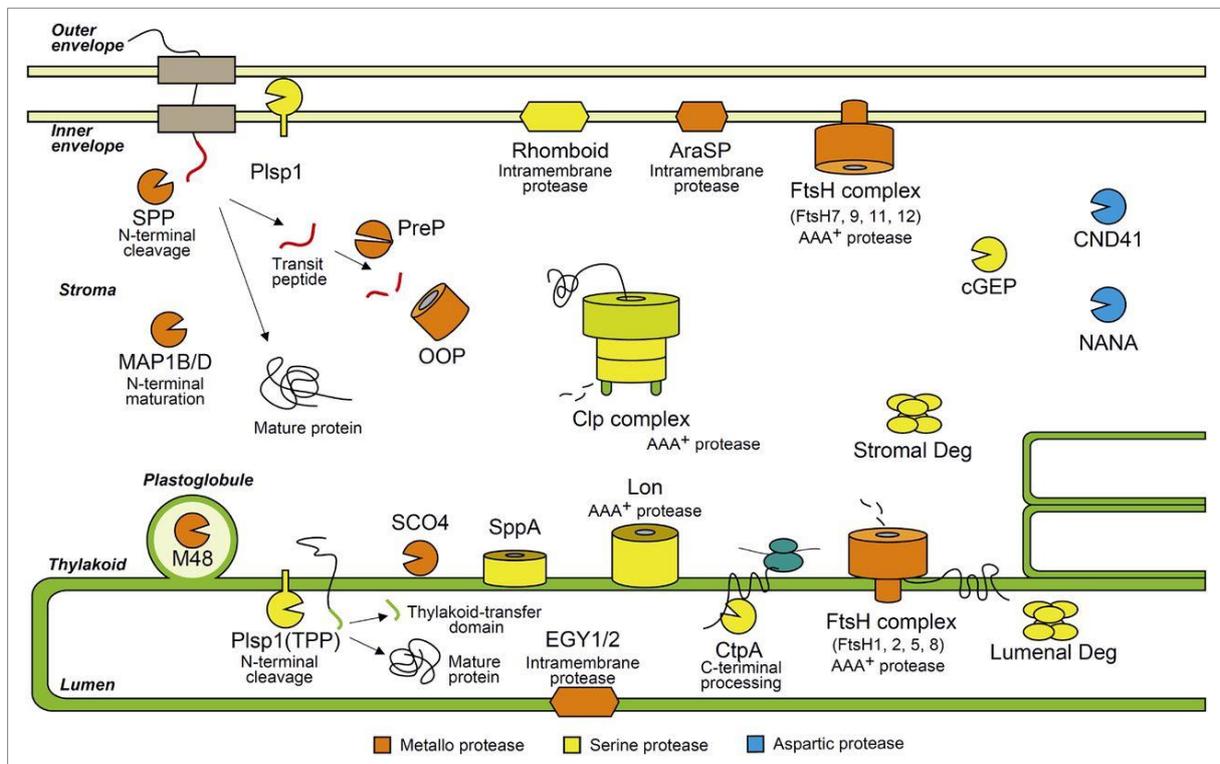


Abb. 1.2: Schematische Darstellung plastidärer Peptidasen. (Abb. aus Nishimura *et al.*, 2016)

Proteasen können anhand der Aminosäuren in ihren katalytischen Zentren in verschiedene Hauptklassen eingeteilt werden. Zu diesen Klassen zählen u.a. die Serin-, die Threonin-, die Cystein-, die Aspartat-, die Glutamat- und die Metalloproteasen. Zu den bekannten plastidären Proteasen zählen vor allem zahlreiche Serin- und Metalloproteasen sowie einige Aspartatproteasen (Abb.1.2; Nishimura *et al.*, 2016).

Die Serinpeptidasen der DEG-Familie gehören zu den Haushaltsproteinen der Plastiden. Sie sind auch als HtrA-Proteasen bekannt und dienen der generellen Kontrolle und Modellierung des Proteoms (Hansen und Hilgenfeld, 2013). Sie schützen durch den Abbau fehlerhaft gefalteter Proteine vor Stress.

Die DEG-Proteasen werden aktiv als Hexamer, das sich in Abhängigkeit vom pH-Wert bildet. Das Hexamer besteht aus zwei trimeren Ringen, in deren Inneren sich das aktive proteolytische Zentrum befindet (Krojer *et al.*, 2002). Neben der Protease-Aktivität besitzen die DEG-Proteasen auch eine Aktivität als Chaperon. DEG1, DEG5 und DEG8 sind auf der luminalen Seite der Thylakoidmembran lokalisiert, wohingegen DEG2, DEG7 und DEG11 im Stroma bzw. auf der stromalen Seite peripher an die Thylakoidmembran assoziiert vorliegen (van Wijk, 2015). Die luminalen DEG-Proteasen sind beteiligt an dem Reparaturzyklus des D1-Proteins des PSII-Komplexes, in dem sie lumenständige Schleifen des D1-Proteins an spezifischen Stellen schneiden (Kapri-Pardes *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2007). *In vitro* konnte außerdem ein Abbau von PSBO und von Plastocyanin durch DEG1 gezeigt werden (Chassin *et al.*, 2002).

Die CLP-Proteasen gehören ebenfalls zu den Serinpeptidasen. Sie zählen zu den häufigsten und komplexesten stromalen Proteasen und gelten wie die DEG-Proteasen als Haushaltsproteine (van Wijk, 2015). Der Kern der CLP-Protease-Komplexe besteht aus zwei heptameren Ringen, die eine Fassstruktur bilden, wobei sich das proteolytische Zentrum wiederum innen befindet. Diese Ringe werden aus CLPP- und CLPR-Proteinen gebildet (van Wijk, 2015). Die CLPP-Proteine (CLPP1, -3, -4, -5, -6) besitzen die eigentliche Serinpeptidasefunktion, während die nicht-katalytischen CLPR-Proteine (CLPR1, -2, -3, -4) wahrscheinlich der Strukturbildung dienen. Weitere CLP-Proteine sind CLPC1, CLPC2 und CLPD. Diese sind Chaperone und so in der Lage in Abhängigkeit von ATP Substratproteine zu entfalten (Adam und Clarke, 2002). Die Substrate können so in die Fassstruktur hineingebracht und dort geschnitten werden. Trotz ihrer Häufigkeit sind die spezifischen Substrate der stromalen CLP-Proteasen weitestgehend unbekannt.

Die Proteasen der FTSH-Familie gehören zu den Zink-Metalloproteasen und sind am Abbau verschiedener kurzlebiger Proteine beteiligt. Die FTSH-Proteine besitzen N-terminal ein bis zwei hydrophobe Domänen, was sie zu integralen Membranproteinen macht. Ihre Aktivität ist ATP-abhängig (Ito und Akiyama, 2005). FTSH7, FTSH9, FTSH11 und FTSH12 sind in der inneren Hüllmembran der Chloroplasten zu finden. Die Proteine FTSH1, FTSH2, FTSH5 und FTSH8 sind in der Thylakoidmembran lokalisiert und bilden dort ein Heterohexamer, bei dem das aktive Zentrum in Richtung Stroma zeigt (van Wijk, 2015). Ihre Funktion ist der generelle Abbau von Thylakoidproteinen. So sind sie beispielsweise zusammen mit den DEG-Proteasen an dem Abbau des D1-Proteins des PSII beteiligt (Chi *et al.*, 2012). FTSH6 befindet sich ebenfalls in den Chloroplasten. Eine genauere Lokalisation ist jedoch nicht bekannt und auch die genaue Funktion ist unklar (van Wijk, 2015).

Neben diesen und weiteren Serin- und Metalloproteasen sowie einigen Aspartatproteasen (Abb. 1.2) gibt es auch deutliche Hinweise auf die Aktivität von Cysteinpeptidasen innerhalb der Chloroplasten. Meist sind Cysteinpeptidasen in lytischen Vakuolen lokalisiert, wo sie aufgrund des niedrigen pH-Wertes reifen und katalytisch aktiv sein können (Wiederanders, 2003; Grudkowska und Zagdanska,

2004). Sie konnten aber bereits durch verschiedene Untersuchungen auch in Plastiden nachgewiesen werden. In einer Chloroplastenfraktion aus *A. thaliana* wurde durch eine Proteomanalyse die Cysteinpeptidase OTL gefunden (Bayer *et al.*, 2011). Zudem konnten Cysteinpeptidasen in den Plastiden von Spinat nachgewiesen werden, die beständig gegenüber Natriumdodecylsulfat (SDS) sind (Sokolenko *et al.*, 1997). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass in isolierten, intakten Chloroplasten sowie in einer isolierten Thylakoidmembranfraktion der Abbau des LHCII-Komplexes durch den Cysteinpeptidase-inhibitor E-64 stark gehemmt wird (Lindahl *et al.*, 1995). Durch weitere Inhibitorexperimente konnte zudem eine Beteiligung von Cysteinpeptidasen beim Abbau von RbcL, der großen Untereinheit von Rubisco, gezeigt werden (Mae *et al.*, 1989; Navarre und Wolpert, 1999; Thoenen *et al.*, 2007).

1.3 HvPAP14 - eine Papain-ähnliche Cysteinpeptidase des KDEL-Typs

1.3.1 Cysteinpeptidasen der C1A-Familie

Die Enzymklassen werden meist aufgrund struktureller Gemeinsamkeiten in Clans unterteilt und diese wiederum in Familien (Rawlings und Barrett, 1993). Unter den Cysteinpeptidasen ist eine der größten Familien die Papain-Superfamilie C1 des CA-Clans. Die Peptidasen dieser C1A-Familie werden - nach dem bekanntesten Vertreter der Familie - auch Papain-ähnliche Peptidasen genannt. Sie zählen zu den Endopeptidasen und sind in den Eukaryoten, Prokaryoten und sogar in einigen Viren vertreten (Wiederanders, 2003).

Die Cysteinpeptidasen der C1A-Familie haben einen gemeinsamen Grundaufbau. Sie bestehen aus einem N-terminalen Signalpeptid, einem inhibitorischen Propeptid und der eigentlichen Peptidase mit dem aktiven Zentrum (Wiederanders, 2003). Das Signalpeptid, das etwa 10-20 Aminosäuren umfasst, dient dem kotranslationalen Transport des Proteins in das Lumen des ER, wo es vom restlichen Protein abgespalten wird. Für viele dieser Proteasen ist bekannt, dass sie über den sekretorischen Weg u.a. in die Vakuole oder den Apoplasten transportiert werden (Grudkowska und Zagdanska, 2004). Der Proteinabschnitt, der später dem reifen Enzym entspricht, besteht aus etwa 220-260 Aminosäuren. Die tertiäre Struktur des Enzyms besteht aus zwei Domänen, die eine Furche bilden. In dieser ist das aktive Zentrum lokalisiert, das durch die katalytische Triade aus einem Cystein-, einem Histidin- und einem Asparagin-Rest gebildet wird. Dieses katalytische Zentrum wird zunächst von dem inhibitorischen Propeptid bedeckt, das so die Bindung von Substraten sterisch verhindert (Coulombe *et al.*, 1996). Es dient somit als regulatorisches Element der Cysteinpeptidase-Aktivität (Maubach *et al.*, 1997). Das inhibitorische Propeptid ist bis zu 250 Aminosäuren lang und meist hydrophob (Wiederanders, 2003).

Die Papain-ähnlichen Cysteinpeptidasen werden als inaktive Vorstufenproteine synthetisiert, wobei das inhibitorische Propeptid die korrekte Faltung unterstützt (Tao *et al.*, 1994; Wiederanders, 2003). Erst

später werden diese Cysteineptidasen unter bestimmten Einflüssen aktiviert. Dadurch kann sichergestellt werden, dass die Peptidase erst unter bestimmten Umständen bzw. in bestimmten Kompartimenten in der Lage ist, andere Proteine zu prozessieren oder abzubauen. Die Aktivierung erfolgt durch die Abspaltung des inhibitorischen Propeptids durch eine intra- oder intermolekulare Proteolyse. Vermutlich läuft die Aktivierung in zwei Schritten ab. Erst werden potentielle Schnittstellen im Bereich zwischen dem Inhibitor und der später reifen Protease durch Konformationsänderungen zugänglich gemacht. Im zweiten Schritt erfolgt die eigentliche proteolytische Spaltung (Menard *et al.*, 1998). Die Aktivierung wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Der wichtigste Faktor ist die Änderung des pH-Werts, denn besonders bei saurem pH können diverse Peptidasen der C1A-Familie aktiviert werden (Maubach *et al.*, 1997). Weitere wichtige Faktoren sind andere Peptidasen, die die C1A-Peptidasen prozessieren können, sowie endogene Inhibitoren. Zu diesen zählen beispielsweise Cystatine und Serpine (Martinez *et al.*, 2009; Fluhr *et al.*, 2012). Außerdem kann die Aktivierung dem Einfluss von anderen Makromolekülen wie beispielsweise Glycosaminoglycanen unterliegen (Ishidoh und Kominami, 1995; Kihara *et al.*, 2002).

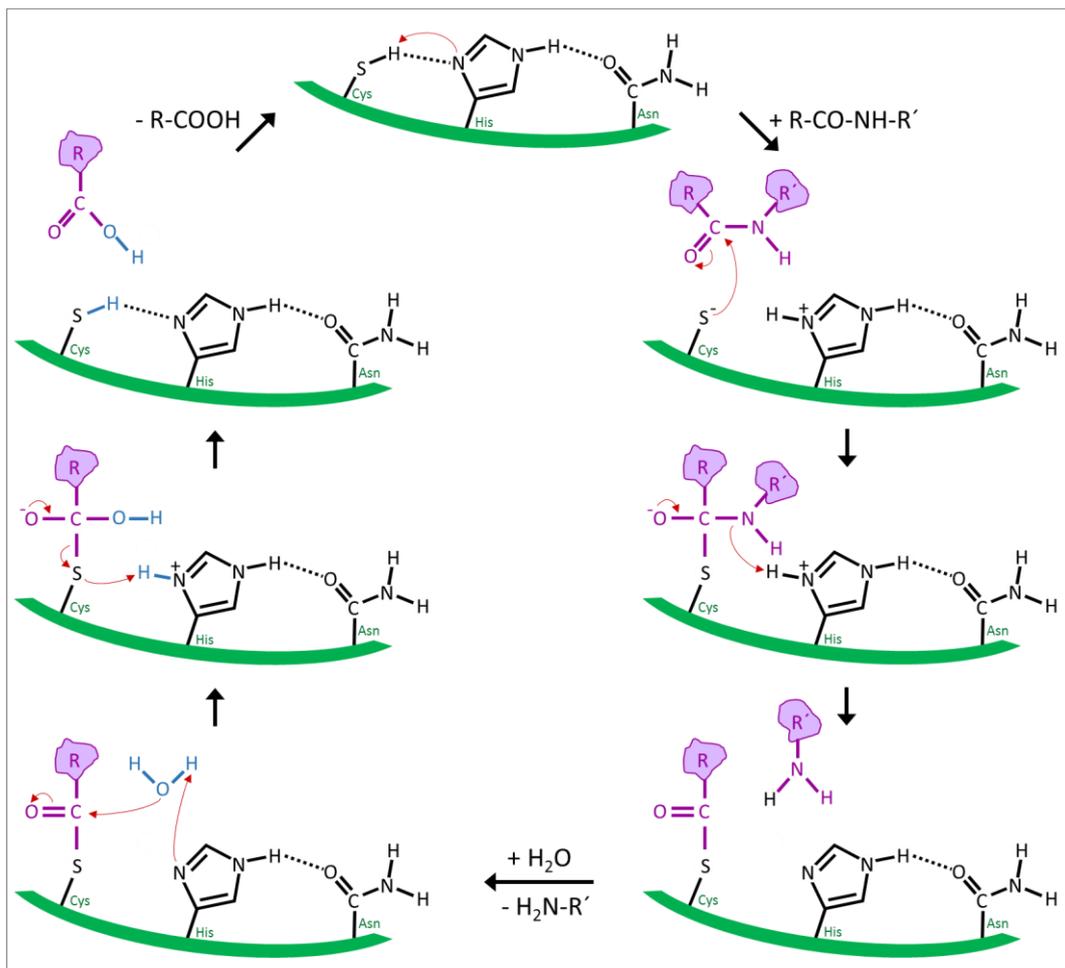


Abb. 1.3: Reaktionsmechanismus im aktiven Zentrum von Papain. Gezeigt ist der Reaktionsmechanismus zur Hydrolyse einer Peptidbindung durch die katalytische Triade des aktiven Zentrums von Papain. (Abb. modifiziert nach Lowe, 1976 und van Duijnen *et al.*, 1978)

Die aktive Cysteinpeptidase katalysiert die hydrolytische Spaltung der Peptidbindung ihrer Substratproteine. Diese läuft nach einem komplexen Reaktionsmechanismus ab (Abb. 1.3): Im katalytischen Zentrum ist die Thiolgruppe des Cysteins mit dem Imidazolring des Histidins über eine Wasserstoffbrückenbindung verbunden. Das nukleophile Thiolat kann mit dem Substrat reagieren, sodass der Schwefel des Cysteins mit dem Carbonylkohlenstoff des Peptids eine Bindung eingeht. Die negative Ladung des Intermediats wird durch die Wechselwirkungen mit den Nachbargruppen stabilisiert. Ein Proton des protonierten Imidazols des Histidins wird anschließend auf den Stickstoff der Peptidbindung übertragen, was die Spaltung dieser Bindung ermöglicht. Dadurch entsteht eine Thioesterbindung zwischen dem Cystein und der restlichen Peptidkette, die wiederum durch einen nukleophilen Angriff auf den Kohlenstoff durch ein Wassermolekül gespalten werden kann. Somit entstehen aus dem Substrat zwei Peptide mit jeweils neuem Aminoterminus (N-Terminus) bzw. Carboxylterminus (C-Terminus). Im aktiven Zentrum der Cysteinpeptidase bilden die Thiolgruppe des Cysteins und der Imidazolring des Histidins anschließend wieder eine Wasserstoffbrücke aus (Lowe, 1976). Der Asparagin-Rest der katalytischen Triade dient der Stabilisierung des Thiolat-Imidazolium-Ionenpaars, indem sein Sauerstoff ebenfalls mit dem Imidazolring eine Wasserstoffbrückenbindung ausbildet und diesen dadurch günstiger ausrichtet (van Duijnen *et al.*, 1978).

1.3.2 KDEL-Cysteinpeptidasen

Die Proteasen der C1A-Familie können beispielsweise anhand ihrer strukturellen Besonderheiten oder funktionellen Motive in zahlreiche Unterfamilien eingeteilt werden. Bei pflanzlichen C1A-Proteasen sind es bisher neun Unterfamilien (Beers *et al.*, 2004; Richau *et al.*, 2012). Eine dieser Unterfamilien bilden die CEP1-ähnlichen Proteasen bzw. die K/HDEL-Cysteinendopeptidasen (KDEL-CysEP). Wie der Name bereits verrät, ist eine C-terminale KDEL- bzw. HDEL-Sequenz charakteristisch für diese Peptidasen. Bei dieser handelt es sich um ein ER-Retentionssignal (Munro und Pelham, 1987; Pelham *et al.*, 1988), das bei den reifen Peptidasen wie das Propeptid abgespalten sein kann (Okamoto *et al.*, 1994).

Die KDEL-CysEP sind in mono- und dikotylen Angiospermen sowie in Gymnospermen vertreten, jedoch nicht in Tieren oder Pilzen (Hierl *et al.*, 2012). Sie wurden zuerst in *Ricinus communis* entdeckt (Schmid *et al.*, 1998) und weisen zwischen den Spezies große Bereiche hoch konservierter Aminosäuresequenzen auf (Abb. 1.4). Hierzu zählt beispielsweise das ERFNIN-Motiv in dem inhibitorischen Propeptid, ein α -Helix-Motiv, das die autoinhibitorische Funktion ermöglicht (Kreusch *et al.*, 2000). In der Sequenz der reifen Peptidasen sind u.a. natürlich die Aminosäuren der katalytischen Triade hoch konserviert sowie sechs weitere Cysteine, die die Ausbildung von Disulfidbrücken ermöglichen (Richau *et al.*, 2012).

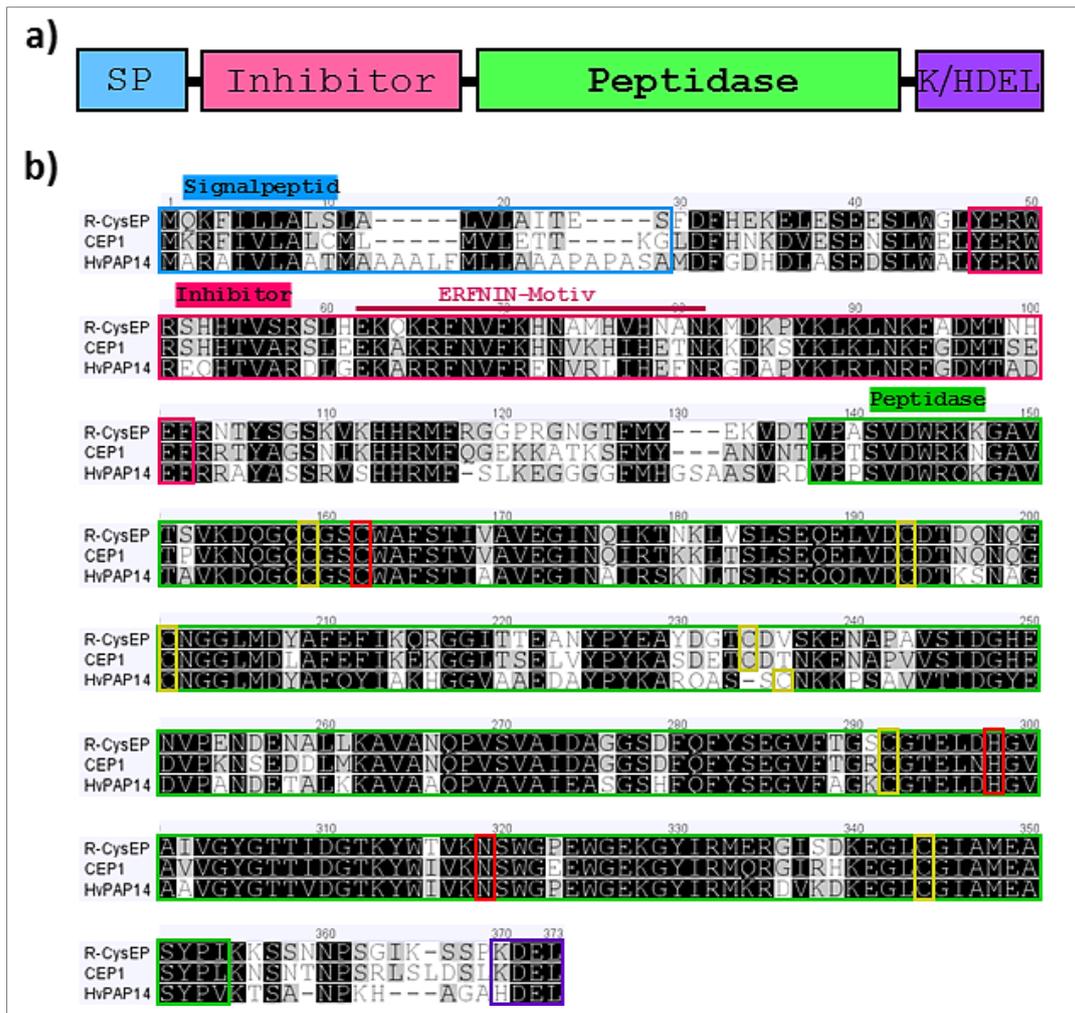


Abb. 1.4: Schematischer Aufbau (a) und Sequenzvergleich (b) der KDEL-CysEP Ricinus-CysEP (AAC62396.1) aus *R. communis*, CEP1 (NP_568722.1) aus *A. thaliana* und HvPAP14 (CAQ00109.1) aus *H. vulgare*. Die KDEL-CysEP besitzen ein Signalpeptid (SP, blau) zum kotranslationalen Transport in das ER, ein inhibitorisches Propeptid (pink) zur sterischen Abschirmung des aktiven Zentrums der Peptidase (grün) und eine C-terminale HDEL- bzw. KDEL-Sequenz (violett) als ER-Retentionssignal. Konservierte Aminosäuren sind in (b) in schwarz markiert, die Aminosäuren der katalytischen Triade sind rot und Cysteinreste, die potentiell Disulfidbrücken ausbilden können, gelb umrandet.

In *R. communis* wurde das Vorstufenprotein einer KDEL-CysEP in speziellen Vesikeln entdeckt, den Ricinosomen. Diese entstehen durch Abschnürung aus dem ER, sind von einer Membran umgeben und haben einen Durchmesser von etwa 1 µm (Mollenhauer und Totten, 1970; Vigil, 1970; Schmid *et al.*, 1998). Sie entstehen vor allem im Zusammenhang mit Remobilisierungs- und Zelltodprozessen. So können während des Prozesses des programmierten Zelltods (PCD) die Membranen der Ricinosomen aufgelöst werden, wodurch die enthaltenen Proteasen in das Cytoplasma freigesetzt werden und dort zum Abbau zahlreicher Proteine führen (Schmid *et al.*, 1999; Schmid *et al.*, 2001). Außer in *R. communis* wurden derartige Ricinosomen u.a. auch in den Antheren und Samen von Tomaten (*Solanum lycopersicum*) (Trobacher *et al.*, 2013), in seneszierenden Blütenblättern von *Hemerocallis* (Schmid *et al.*, 1999) und in *A. thaliana* (Hierl *et al.*, 2014) gefunden. In *A. thaliana* gibt es drei Vertreter

der KDEL-CysEP: CEP1, CEP2 und CEP3. Das CEP1-kodierende Gen wird beispielsweise bei der Lateralwurzelentwicklung exprimiert und das CEP2-kodierende Gen verstärkt in der Wurzelhaube (Helm *et al.*, 2008). In *Vigna mungo* wurde die KDEL-CysEP SH-EP in KDEL-Protease-akkumulierenden Vesikeln (KV) gefunden, die im Gegensatz zu Ricinosomen große Mengen an SH-EP in Proteinspeichervakuolen transportieren (Toyooka *et al.*, 2000).

Die KDEL-CysEP haben in der Regel ein breites Substratspektrum. Sie bevorzugen in den zweiten Positionen neben der Spaltstelle neutrale Aminosäuren mit langen aliphatischen und unpolaren (Leu, Val, Met) oder aromatischen (Phe, Tyr, Trp) Seitenketten. Direkt neben der Spaltstelle ist keine eindeutige Präferenz bekannt (Than *et al.*, 2004; Hierl *et al.*, 2014). Eine Besonderheit und eher ungewöhnlich für Endopeptidasen ist, dass auch Prolin nahe der Schnittstelle akzeptiert wird. Das ermöglicht die Spaltung von Extensinen, was bereits für die KDEL-CysEP aus *R. communis* gezeigt wurde (Helm *et al.*, 2008). Die Extensine bilden das Grundgerüst pflanzlicher Zellwände. Ihr Abbau kann somit die Zellwände auflockern und eine Gewebeumstrukturierung wie beispielsweise ein Durchbrechen von sich neu entwickelnden Wurzeln durch das schon vorhandene Gewebe ermöglichen.

Somit spielen die KDEL-CysEP eine wichtige Rolle bei der Mobilisierung von Speicherproteinen, u.a. in Samen, sowie bei der Gewebeumstrukturierung durch den Abbau von Zellen und Zellwandbestandteilen. Außerdem können KDEL-CysEP an der Remobilisierung von Nährstoffen aus seneszierenden Zellen beteiligt sein. Es gibt deutliche Hinweise auf eine Beteiligung der Cysteinpeptidase HvPAP14 aus Gerste an diesen seneszenzbedingten Remobilisierungsprozessen (Hollmann *et al.*, 2014; Hollmann, 2016).

1.3.3 HvPAP14

HvPAP14 ist eine Papain-ähnliche Cysteinpeptidase des KDEL-Typs aus Gerste (*H. vulgare*). Eine Analyse der entwicklungsabhängigen Genexpression in Fahnenblättern von Gerste zeigte, dass besonders das *HvPAP14*-Gen während der Seneszenz stark exprimiert wird (Hollmann *et al.*, 2014). Unter den untersuchten Cysteinpeptidasen wies es die größte seneszenzabhängige Zunahme der Transkriptmenge auf. Das zeitliche Expressionsmuster ähnelte dabei dem des Seneszenz-Markergens *SAG12* (Lohmann *et al.*, 1994). Enzyme, deren Gene während der Seneszenz aufreguliert sind, könnten an den Remobilisierungsprozessen beteiligt sein. Obwohl die meisten Proteine während der Seneszenz in den Chloroplasten abgebaut werden, waren aber keine Gene aufreguliert, die für Proteasen kodieren, die ein Transitpeptid für den plastidären Import über das TOC/TIC-System besitzen. Stattdessen werden Gene von Cysteinpeptidasen, die über den sekretorischen Weg transportiert werden, seneszenzabhängig exprimiert (Beers *et al.*, 2004; Jukanti *et al.*, 2008; Richau *et al.*, 2012; Hollmann *et al.*, 2014).

Mithilfe der Markierung aktiver Cysteinpeptidasen durch DCG-04 konnte gezeigt werden, dass die aktive Form von HvPAP14 während der Seneszenz in einer deutlich erhöhten Menge vorliegt (Hollmann, 2016). DCG-04 ist ein biotinyliertes Derivat des Cysteinpeptidaseinhibitors E-64 und bindet irreversibel an die aktiven Zentren der Cysteinpeptidasen (van der Hoorn *et al.*, 2004). Über Streptavidin konnten die Cysteinpeptidasen aus den Extrakten von seneszenten (70% Chlorophyll) und nicht-seneszenten Gerstenblättern affinitätschromatographisch aufgereinigt und nach einem Trypsinverdau mittels Massenspektrometrie (ESI-LC/MS) identifiziert werden. Neben HvPAP14 war der Seneszenzmarker HvSAG12 als einzige weitere Cysteinpeptidase in den seneszenten Proben angereichert (Hollmann, 2016).

In seneszenten Fahnenblättern von Gerste, die unter Freilandbedingungen angezogen wurde, konnte zudem ein Anstieg in der Menge der unprozessierten, inaktiven Vorstufe von HvPAP14 festgestellt werden, der bei stärkerer Stickstoffdüngung vermindert war bzw. verzögert auftrat. Die Zunahme an HvPAP14 korrelierte mit der Abnahme der Chlorophyllmenge, was auf einen möglichen Abbau Chlorophyll-bindender Proteine durch die Cysteinpeptidase hindeutet (Hollmann, 2016).

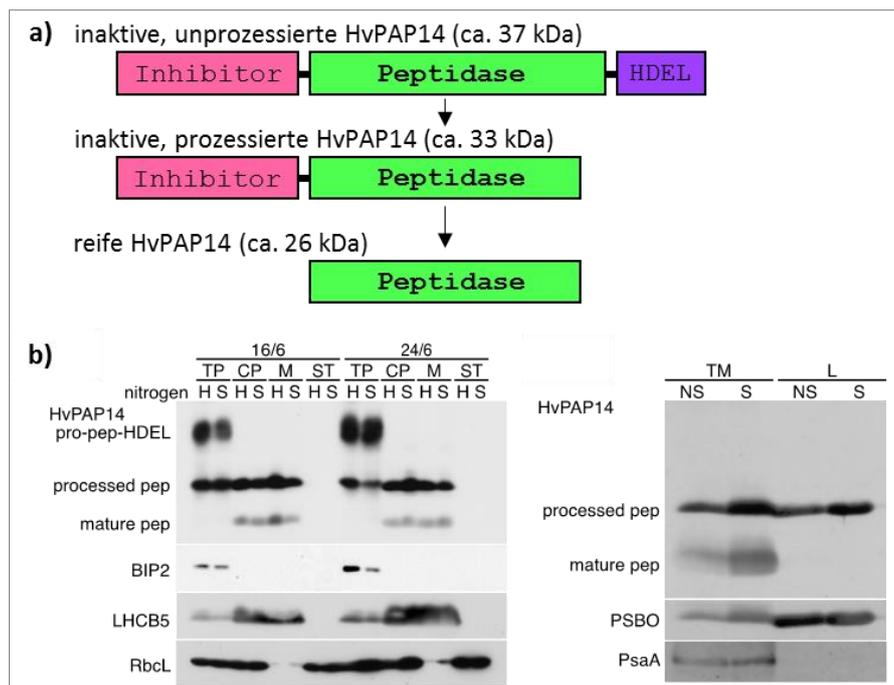


Abb. 1.5: Proteinformen der Cysteinpeptidase HvPAP14 und ihre Lokalisation. (a) Die schematische Darstellung der schrittweisen Prozessierung von HvPAP14 zeigt die erwarteten Proteinformen und die berechneten Molekulargewichte. (b) Durch die immunologische Analyse der HvPAP14 in Zell- und Plastidenfraktionen ist das Auftreten der verschiedenen Proteinformen in Abhängigkeit von der subzellulären Lokalisation ersichtlich. Links: Der Proteingesamtextrakt (TP), die Chloroplasten (CP), die Plastidenmembranen (M) und die Stromafraktion (S) wurden aus Fahnenblättern von Gerste isoliert, die bei Standard- (S) oder erhöhter (H) Stickstoffdüngung im Feld angezogen und am 16. bzw. 24. Juni 2010 geerntet wurden. Als Kontrollen für Reinheit der Fraktionen dienten: BIP2 (ER-Protein), LHCB5 (Thylakoidmembranprotein) und RbcL (Stroma-Protein). Rechts: Die Thylakoidmembranfraktion (TM) und das Thylakoidlumen (L) wurden aus nicht-seneszenten (NS) und seneszenten (S) Gerstenprimärblättern isoliert. Als Kontrollen dienten hier PSBO (Lumenprotein) und PsaA (Thylakoidmembranprotein). (Abb. (b) aus Hollmann, 2016).

Für die Analyse der subzellulären Lokalisation von HvPAP14 wurden Zell- und Plastidenfraktionen genutzt. Dabei konnten drei Formen von HvPAP14 immunologisch mithilfe eines Antikörpers gegen ein Peptid der reifen Peptidase nachgewiesen werden (Abb. 1.5): die unprozessierte, inaktive Form mit HDEL-Sequenz (berechnet ca. 37 kDa), die C-terminal prozessierte, inaktive Form ohne HDEL-Sequenz (berechnet ca. 33 kDa) und die potentiell aktive Peptidaseform ohne inhibitorisches Propeptid und ohne HDEL-Sequenz (berechnet ca. 26 kDa). Im Proteingestamtextrakt konnten die beiden inaktiven Formen nachgewiesen werden. In den Chloroplasten war die unprozessierte, inaktive Form nicht detektierbar, jedoch die prozessierte Form ohne HDEL-Sequenz sowie die potentiell aktive Form. Innerhalb der Chloroplasten lagen diese beiden Formen gebunden an die Thylakoidmembran vor. Zudem war die prozessierte inaktive HvPAP14-Form im Thylakoidlumen lokalisiert. Im Stroma der Chloroplasten war HvPAP14 nicht nachweisbar (Hollmann, 2016).

Mithilfe einer immunologischen Goldmarkierung konnte durch die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen von Gerstenblättern die Lokalisation von HvPAP14 in den Chloroplasten bestätigt werden. Dazu wurden Antikörper, die gegen das inhibitorische Propeptid bzw. gegen die reife Peptidase gerichtet sind, eingesetzt. Mit beiden dieser Antikörper wurde ein Signal in den Chloroplasten erhalten. An freien Thylakoiden konnte jedoch nur der Antikörper, der gegen die reife Peptidase gerichtet ist, binden. Dies deutet auf eine Membranbindung von HvPAP14 hin, die erst nach der Aktivierung (Abspaltung des inhibitorischen Propeptids) stattfindet. Das Substrat der aktiven Peptidase könnte somit auch membranständig sein. Neben der Lokalisation in Chloroplasten konnte eine Akkumulation der Proform von HvPAP14 in sogenannten Microbodies (Durchmesser: 500 nm) nachgewiesen werden, die Ähnlichkeiten zu Ricinosomen (Schmid *et al.*, 1998) aufweisen (Hollmann, 2016).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Rolle der Cysteinpeptidase HvPAP14 der Gerste beim Abbau von Chloroplastenproteinen näher untersucht werden. Da die Lokalisation der HvPAP14 in den Chloroplasten unerwartet ist und bisher für keine andere KDEL-CysEP gezeigt wurde, soll zunächst die subzelluläre Lokalisation von HvPAP14 mit weiteren unabhängigen Methoden überprüft werden, die nicht auf immunologischen Verfahren basieren. Neben der plastidären Lokalisation soll dabei das Auftreten von HvPAP14 außerhalb der Plastiden untersucht werden, denn die inaktive, unprozessierte HvPAP14-Form konnte zuvor im Proteingestamtextrakt von Gerstenblättern, jedoch nicht in isolierten Plastiden nachgewiesen werden (Hollmann, 2016). Eine *in silico*-Vorhersage mithilfe diverser Lokalisationsprogramme kann dazu erste Hinweise liefern, die durch fluoreszenzmikroskopische Analysen in lebenden Zellen überprüft werden sollen. Dazu sollen Zwiebelepidermiszellen und

Protoplasten aus Gerstenblättern transient mit einem Konstrukt für ein HvPAP14:RFP-Fusionsprotein transformiert werden.

Um mehr über die Eigenschaften und Funktionen von HvPAP14 zu erfahren, soll für *in vitro*-Untersuchungen HvPAP14 in *E. coli* synthetisiert und affinitätschromatographisch isoliert werden. Da für einige Papain-ähnliche Proteasen die Aktivierung durch eine Veränderung des pH-Wertes bekannt ist, wie beispielsweise für die KDEL-CysEP CEP2 aus *A. thaliana* (Hierl *et al.*, 2014), soll auch für HvPAP14 diese Möglichkeit der Aktivierung überprüft werden. Zudem soll die Aktivität von HvPAP14 in Abhängigkeit vom pH-Wert untersucht werden. Dies lässt ggf. einen Rückschluss auf mögliche Einsatzorte innerhalb der Zelle bzw. der Plastiden zu. Daneben soll ebenfalls mithilfe der isolierten, rekombinanten HvPAP14 der Einfluss des Redoxstatus sowie verschiedener Ionen auf die aktivierende Prozessierung und Aktivität von HvPAP14 untersucht werden. Unter standardisierten Bedingungen kann anschließend die Enzymkinetik von HvPAP14 beim Umsatz des fluoreszierenden Substrats Z-FR-AMC gemessen und die dazugehörigen Reaktionskonstanten ermittelt werden.

Für die Suche nach potentiellen, plastidären Substraten sollen isolierte Plastidenfraktionen, also Stroma- und Thylakoidmembranfraktionen, mit der aktivierten, rekombinanten HvPAP14 behandelt werden. Die in den Fraktionen enthaltenen Proteine können dann proteinbiochemisch auf eine mögliche Reduktion der Proteinmenge und auf Abbauprodukte analysiert werden. Um die Ergebnisse der *in vitro*-Analysen auch *in vivo* zu überprüfen, soll das *HvPAP14*-Gen in Protoplasten aus Gerstenblättern überexprimiert werden. Diese Protoplasten sollen dann mithilfe von immunologischen Analysen auf die Proteinmenge der vorher eingegrenzten, potentiellen Substrate und auf eventuell auftretende Abbauprodukte dieser Proteine hin untersucht werden. Anschließend sollen die Mengen und Formen von HvPAP14 in Abhängigkeit vom Vorkommen von identifizierten Substraten sowie von verschiedenen Lichtbedingungen immunologisch untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

Mit Ausnahme von Mutanten wurden für die Untersuchungen Gerste (*Hordeum vulgare* L.) der Sorte Golden Promise benutzt. Die Anzucht der zur Protoplastierung sowie zur Zellfraktionierung verwendeten Gerstenpflanzen erfolgte für 7-12 Tage auf Einheitserde in einer Klimakammer in einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 16 h Licht und 8 h Dunkelheit. Die Lichtintensität betrug $150 \mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{m}^{-2}$, die Temperatur $19\text{-}21^\circ\text{C}$ und die relative Luftfeuchte 65%.

Für die Analyse des Einflusses von Licht auf die HvPAP14-Menge in Gerstenblättern wurden die Pflanzen auf Vermiculit nach dem Vorquellen (3 Tage im Dunkeln bei 6°C) in einer Klimakammer in einem Rhythmus von 16 h Licht und 8 h Dunkelheit bzw. bei kompletter Dunkelheit, bei 21°C und 65% relative Luftfeuchte 7 Tage lang angezogen. Die Lichtintensitäten betragen ca. $15 \mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{m}^{-2}$, $140 \mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{m}^{-2}$ bzw. $270 \mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{m}^{-2}$. Für die Analyse der Proteine wurden je 10 Primärblätter pro Lichtbedingung in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Für die Untersuchung der Chlorophyll-defizienten Gerstenmutanten Chlorina-a¹¹⁷, Chlorina-a¹²⁶ und Chlorina-a¹³⁴ aus der Sammlung des Carlsberg Laboratory (Kopenhagen, Dänemark) wurden diese mit Gerste der Sorte Golden Promise verglichen. Die Samen wurden auf Vermiculit ausgesät. Nach dem Vorkeimen wurden die Pflanzen 7 Tage bei ca. $70 \mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{m}^{-2}$ im Dauerlicht, bei 21°C und 65% relative Luftfeuchtigkeit angezogen. Anschließend wurden je 10 Primärblätter geerntet und in flüssigem Stickstoff für die weiteren Analysen eingefroren.

2.2 Bakterienkulturen und Vektoren

2.2.1 *Escherichia coli*-Stämme und ihre Kultivierung

Zur Amplifizierung von eingebrachten Plasmiden wurden Bakterien des *E. coli*-Stammes *DH5 α* verwendet. Für die heterologe Expression zur Synthese von Proteinen diente der *E. coli*-Stamm *ER2523* (*NEB Express*) (New England Biolabs, Frankfurt). Von beiden Stämmen standen chemisch kompetente Zellen zur Verfügung (Kap. 2.3.1).

Kultiviert wurden die *DH5 α* -Zellen in flüssigem LB-Medium (1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt) und die *NEB Express*-Zellen in flüssigem NEB-LB-Medium (1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,2% (w/v) Glucose) bis zu 18 h unter Schütteln bei 180 rpm bei 37°C . Zudem wurden beide Stämme auf festem LB-Agar (1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) Agar) angezogen.

Die kurzzeitige Lagerung fand bei 4°C statt. Für eine längere Lagerung bei -80°C wurden Glycerinkulturen hergestellt, indem zu 500 µl Zellsuspension 250 µl Glycerin (80% (v/v)) hinzugegeben und in flüssigem Stickstoff gefroren wurden.

2.2.2 Vektoren

Für die Erstellung von Konstrukten für die Transformation von *E. coli*- und Pflanzenzellen wurden verschiedene Vektoren verwendet. Der Vektor pART7 (Gleave, 1992) diente ausschließlich als Werkzeug der Klonierung und besitzt neben einer multiplen Klonierungsstelle eine Ampicillin-Resistenz-Kassette. Zur transienten Transformation von Pflanzenzellen wurden Konstrukte verwendet, denen der Vektor pUbi-ABM (DNA Cloning Service, Hamburg) zu Grunde lag. Dieser besitzt einen Ubiquitin-Promotor und ebenfalls ein Ampicillin-Resistenzgen, das der Selektion dient.

Die heterologe Expression von *HvPAP14* erfolgte mithilfe des pMAL-c5X-Vektors (New England Biolabs, Frankfurt). Dieser kodiert bereits für das Maltose-bindende Protein, das aufgrund der günstigen Lage der multiplen Klonierungsstelle einfach mit dem Zielprotein fusioniert werden kann. Auch hier kann durch das im Vektor enthaltene Resistenzgen mit Ampicillin selektiert werden.

Als Grundlage für die Klonierung von Konstrukten dienten zudem folgende Plasmide: das Plasmid des Klons NIASHv2079N05 (Matsumoto *et al.*, 2011) mit *HvPAP14*-Sequenz, das Plasmid pB7RWG2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) mit *rfp*-Sequenz und das Plasmid pART7-TS(RBCS)-PtGFP mit *gfp*-Sequenz (C. Plieth, CAU, Kiel).

2.3 Mikrobiologische Arbeiten

2.3.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach der Methode von Cohen *et al.* (1972) hergestellt. Dazu wurden 500 ml LB-Medium mit 5 ml einer *E. coli*-Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,6 angezogen. Anschließend wurde die Kultur 45 min lang unter Schwenken auf Eis abgekühlt und dann für 10 min bei 3000 × g und 4°C zentrifugiert. Die sedimentierten Bakterien wurden in 100 ml kalter MgCl₂-Lösung (0,1 M) resuspendiert und anschließend erneut wie zuvor zentrifugiert. Nachdem die Zellen in 100 ml kalter CaCl₂-Lösung (0,1 M) resuspendiert wurden, folgte eine 30-minütige Inkubation unter Schütteln auf Eis. Die Bakterienzellen wurden durch Zentrifugation sedimentiert und nach dem Entfernen des Überstandes in 12,5 ml kalter CaCl₂-Glycerin-Lösung (0,09 M CaCl₂, 14% (v/v) Glycerin) resuspendiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension aliquotiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.2 Transformation von Bakterienzellen mittels Hitzeschock

Um die jeweiligen Plasmide in die chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen zu transformieren, wurden 100 µl einer Zellsuspension mit Glycerin (14% (v/v)) vorsichtig auf Eis aufgetaut. Nach der Zugabe der jeweiligen Plasmid-Lösung wurden die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte durch eine Inkubation der Bakterien für 45 s bei 42°C. Anschließend wurden die Zellen für 2 min auf Eis inkubiert. Die Bakterienzellen wurden mit 450 µl LB-Medium (37°C) versetzt und nach einer Inkubation für 45 min bei 37°C (unter Schütteln) auf festem LB-Medium, das der jeweiligen Resistenz entsprechend bestimmte Antibiotika enthielt, ausplattiert. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C über Nacht.

2.3.3 Heterologe Expression in *E. coli*-Zellen

Für die Synthese der MBP:HvPAP14-Fusionsproteine in *E. coli*-Zellen wurden zunächst 250 ml flüssiges NEB-LB-Medium, das 0,1 ng/ml Ampicillin enthielt, mit 2,5 ml *E. coli* NEB Express-Kultur angeimpft. Die Zellen waren hierzu zuvor mit den Plasmiden pMAL-c5X-HvPAP14, pMAL-c5X-HvPAP14(Δ HDEL), pMAL-c5X-His-HvPAP14 bzw. pMAL-c5X-His-HvPAP14(Δ HDEL) transformiert worden. Der Ansatz wurde etwa 2 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Bei Erreichen einer optischen Dichte bei 600 nm von etwa 0,55 wurden die Zellen mit IPTG (Endkonzentration: 0,3 mM) induziert und für weitere 2 h bei 37°C schüttelnd inkubiert.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie

Zur Reinigung der rekombinanten Proteine wurden die mit IPTG induzierten *E. coli* NEB Express-Zellen (Kap. 2.3.3) aus 250 ml Zellkultur 15 min bei $6000 \times g$ und 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 6,25 ml Säulenpuffer (200 mM NaCl, 20 mM TRIS/HCl pH 8) resuspendiert, bei -20°C eingefroren, wieder aufgetaut und sechsmal je 1 min (50% Cycle, 30% Power) auf Eis mit dem Ultraschall-Homogenisator Sonopuls HD 2070 (Bandelin, Berlin) aufgeschlossen. Zum Abtrennen von unaufgeschlossenen Zellen und Zellresten wurde die Probe 20 min bei $6000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Für eine größere Ausbeute wurde der Aufschluss mit dem in 6,25 ml Säulenpuffer resuspendierten Pellet wiederholt. 12,5 ml des nach der Zentrifugation erhaltenen Überstands (Rohextrakt), der gelöstes MBP:HvPAP14-Fusionsprotein enthielt, wurden mit 20 ml Säulenpuffer verdünnt. Der verdünnte Proteinrohextrakt wurde in einer Säule mit 3 ml Amylose (Qiagen, Hilden) gemischt, die zuvor dreimal mit je 14 ml Säulenpuffer gewaschen worden war. Das Gemisch wurde 15 min auf Eis geschwenkt. Nachdem sich die Amylose in der Säule gesetzt hatte, wurde der Durchlauf zur Analyse mittels SDS-

PAGE aufgefangen. Anschließend wurde die Säule zweimal mit je 14 ml Säulenpuffer gewaschen, um ungebundene und unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Der Durchlauf wurde hierbei verworfen. Eluiert wurden die Proteine mit 12 ml Säulenpuffer, der zusätzlich Maltose (10 mM) enthielt. Das Eluat wurde in 1 ml-Fractionen gesammelt. Proteinhaltige Fractionen wurden anhand der Absorption bei 280 nm mithilfe des NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) ermittelt und anschließend vereinigt.

Für den Verdau mit Faktor Xa zur Abspaltung des MBP wurde die Proteinlösung auf ca. 1 µg/µl aufkonzentriert in der VIVASPIN 6 (Membran: 3000 Da MWCO PES, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen), worin sie insgesamt für 1 h bei $9000 \times g$ und 4°C zentrifugiert wurde. Zu der konzentrierten Proteinlösung wurde 1 µg Faktor Xa pro 100 µg Fusionsprotein hinzugesetzt. Der Ansatz wurde für ca. 15 h bei 5°C inkubiert.

Zur anschließenden Entfernung des MBP aus der Proteinlösung wurde dessen His-Tag genutzt. Dazu wurden 500 µl Ni-NTA(Nitrilotriessigsäure)-Agarose (Qiagen, Hilden), die zuvor je dreimal mit 1,5 ml Säulenpuffer gewaschen wurden, in der Proteinlösung resuspendiert und 5 min auf Eis geschwenkt. Nach einer dreiminütigen Zentrifugation bei $4000 \times g$ und 4°C konnte die HvPAP14-Lösung als Überstand abgenommen werden, wobei das MBP an der Ni-NTA-Agarose gebunden zurückbleibt. Um eine bessere Aufreinigung zu erzielen, wurden diese Schritte insgesamt dreimal wiederholt. Anschließend wurde die erhaltene HvPAP14-Lösung ggf. nochmals aufkonzentriert und konnte u.a. für die Analyse mittels SDS-PAGE oder für Enzymkinetikkmessungen eingesetzt werden.

Für die Aufreinigung kleiner Proteinmengen wurden pro Ansatz 3,3 µl einer Amylose-Granulat-Suspension verwendet. Dieses Granulat wurde dreimal mit je 30 µl Säulenpuffer (pH 8) gewaschen und jeweils bei $4000 \times g$ für 2 min abzentrifugiert. Dazu wurden 78 µl Säulenpuffer (pH 8) und 2,5 µl Proteinrohextrakt gegeben, das MBP:HvPAP14-Fusionsprotein enthielt und wie zuvor beschrieben gewonnen wurde. Das Amylose-Granulat wurde in der Proteinlösung resuspendiert und zur Bindung des Proteins an die Amylose für 15 min auf Eis geschwenkt. Nach einer Zentrifugation für 2 min bei $4000 \times g$ und 4°C wurde der Überstand abgenommen und die Kügelchen wurden erneut dreimal mit Säulenpuffer (pH 8) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand möglichst komplett abgenommen, sodass die Amylose-Matrix nun möglichst nur noch reines MBP:HvPAP14-Fusionsprotein gebunden hat. Dies konnte nun mit Lösungen zur Untersuchung der Abhängigkeit von pH-, Redox- und Ionenbedingungen inkubiert und anschließend mittels SDS-PAGE analysiert oder für Enzymaktivitätstests eingesetzt werden.

2.4.2 Proteinanalyse der pH-abhängigen Aktivierung von HvPAP14

Um zu sehen, ob der pH-Wert einen Einfluss auf die Aktivierung von HvPAP14 hat, wurde es in Fusion mit dem Maltose-bindenden Protein wie zuvor beschrieben im kleinen Maßstab aufgereinigt (Kap. 2.4.1). Das am Granulat gebundene Fusionsprotein wurde mit je 15 µl Puffer aus einer pH-Reihe (Tab. 2.1) versetzt und darin resuspendiert. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur für 45 min, wurden die Kügelchen abzentrifugiert und der Überstand mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Tab. 2.1: Zusammensetzung der pH-Puffer. Die unterschiedlichen pH-Werte wurde mithilfe von HCl und NaOH eingestellt.

	Konzentration
NaCl	200 mM
EDTA	1 mM
HEPES	20 mM
MES	20 mM
TRIS	20 mM
NaAcetat	20 mM

pH 3,5-9 (in 0,5-Schritten)

2.4.3 Aktivierungs- und Aktivitätsanalyse von HvPAP14 mithilfe von Z-FR-AMC

Zur Untersuchung der Aktivierung und Aktivität von HvPAP14 wurde das fluoreszierende Substrat Z-FR-AMC (Benzyloxycarbonyl-phenylalanylarginin-4-methylcoumaryl-7-amid) (Bachem, Bubendorf, Schweiz) eingesetzt. Das Substrat fluoresziert schwach mit einem Maximum bei einer Wellenlänge von 393 nm (Abb. 3.11a). Werden von diesem Substrat die Aminosäuren (FR) durch eine Cysteinpeptidase abgespalten, wird Coumarin (AMC), das eine starke Fluoreszenz mit einem Maximum bei 440 nm besitzt (Abb. 3.11a), freigesetzt. So ist es möglich den Substratumsatz ratiometrisch aus den Fluoreszenzintensitäten bei 440 nm und 393 nm zu ermitteln.

Z-FR-AMC wurde in einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst und anschließend im jeweiligen Puffer verdünnt, sodass es in einer Endkonzentration von 20 µM eingesetzt wurde. Die Fluoreszenz wurde mithilfe des Spektralfotometers Tecan Infinite M200 Pro (Tecan, Männedorf, Schweiz) zusammen mit dem Programm i-control1.10 (Tecan, Männedorf, Schweiz) gemessen. Als Anregungswellenlänge wurde 345 nm gewählt und die Emission wurde bei 393 nm und 440 nm gemessen, wobei jeder Messwert aus 10 Einzelmessungen ermittelt wurde. Die Fluoreszenzmessungen erfolgten in schwarzen 96-Well-Platten mit flachen Böden (Greiner Bio-One, Frickenhausen) bei 28°C, wobei das Probenvolumen jeweils 100 µl betrug.

Für die Analyse der Aktivierung von HvPAP14 wurde das gereinigte, an Amylose-Kügelchen gebundene MBP:HvPAP14-Fusionsprotein in 117,6 µl Puffer mit 2,4 µl Z-FR-AMC-Lösung (1 mM) für etwa 30 min bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Mischen inkubiert. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei $4000 \times g$ wurden 100 µl des Überstandes für eine Fluoreszenzmessung eingesetzt. Als Puffer dienten die Lösungen der pH-Reihe (Kap. 2.4.2) oder Ionenlösungen. Diese Ionenlösungen bestanden zum einen aus einer reduzierenden Kontrolllösung (KLr, Tab. 2.2), der 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂, 4 mM EDTA oder 1% (w/v) SDS zugesetzt wurden. Zum anderen wurde einer Kontrolllösung ohne Zusatz von Reduktionsmitteln (Klo, Tab. 2.2) 1 mM CuCl₂ oder 1 mM FeCl₂ hinzugesetzt.

Tab. 2.2: Zusammensetzung der Kontrolllösungen für die Aktivierungs- und Aktivitätsanalyse.

	reduzierende Kontrolllösung (KLr)	nicht-reduzierende Kontrolllösung (Klo)
NaCl	200 mM	200 mM
NaAcetat	20 mM	20 mM
DTT	1 mM	

pH 4,5 (eingestellt mit NaOH)

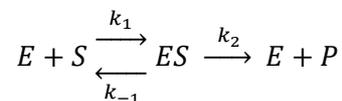
Um die Aktivität von HvPAP14 unter Einfluss bestimmter Bedingungen und in Anwesenheit bestimmter Substanzen untersuchen zu können, wurde das Enzym zunächst aktiviert. Dazu wurde das an Amylose-Granulat gebundene MBP:HvPAP14-Fusionsprotein in 11 µl pH-Puffer (pH 4,5) für die pH-Tests bzw. in KL-Lösungen für die restlichen Analysen für 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem das Granulat bei $4000 \times g$ für 2 min abzentrifugiert wurde, konnten 10 µl des Überstandes mit der aktiven Peptidase mit 88 µl der Ionen-Lösungen bzw. Puffer der pH-Reihe und 2 µl Z-FR-AMC-Lösung (1 mM) versetzt werden. Diese Ansätze wurden für ca. 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend fluoreszenzspektroskopisch analysiert.

2.4.4 Messung der Enzymkinetik von HvPAP14

Zur Bestimmung der Michaelis-Konstante K_m von HvPAP14 für den Umsatz des fluoreszierendes Substrates Z-FR-AMC wurde das Enzym wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben, gereinigt. Es wurde die Proteinform ohne C-terminale HDEL-Sequenz eingesetzt, da diese dem erwarteten natürlichen aktiven Enzym am ehesten entspricht. Das rekombinante Enzym wurde zunächst für 5 min bei Raumtemperatur durch die Zugabe von 8-fachem Volumen KLr-Puffer (Kap. 2.4.3) aktiviert.

Zunächst wurden die Z-FR-AMC-Lösungen (10 mM in DMSO) mit KLr-Puffer verdünnt, sodass das Substrat nach der Zugabe der Proteinlösung in Endkonzentrationen von 0,5 µM, 0,75 µM, 1 µM, 2 µM,

4 μM , 8 μM und 16 μM vorliegt. Die Fluoreszenz dieser Lösungen bei 370-470 nm bei einer Anregungswellenlänge von 345 nm wurde für je etwa 4 min gemessen bis sie stabil war, bevor die Enzymlösung mit aktiver HvPAP14 (1 μg bzw. 3,5 μg Protein) hinzugesetzt wurde. Die Messungen der Spektren erfolgten in einem Gesamtvolumen von 1 ml im Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Varian, Palo Alto, USA) unter ständigem Rühren in einem Abstand von 15 s für insgesamt 10 min. Zur Auswertung wurden die Fluoreszenzintensitäten bei der Wellenlänge 440 nm verwendet, die der Emission des verdauten Substrats (/des Produktes (P)) entspricht. Die Fluoreszenzintensitäten bei 440 nm wurden über die Zeit aufgetragen. Die Steigung der Regressionsgeraden in den ersten 2,5 min ergab die Anfangsgeschwindigkeit dieser enzymatischen Reaktion. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist abhängig von der Affinität zwischen dem Enzym (E) und des Substrats (S) bei der Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes (ES), was den Umsatz des Substrates erst ermöglicht. Als vereinfachte Reaktionsgleichung (mit den jeweiligen Geschwindigkeits-konstanten (k)) ergibt sich:



Mithilfe der Anfangsgeschwindigkeiten v_0 der Reaktion bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen lassen sich die jeweilige maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} und die Michaelis-Konstante K_m des untersuchten Enzyms HvPAP14 bestimmen, da gilt:

$$v_0 = \frac{v_{\text{max}} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Zur Ermittlung der Größen dienten unterschiedliche Auftragungen: das Michaelis-Menten-Diagramm, das Lineweaver-Burk-Diagramm, das Hanes-Woolf-Diagramm und das Eadie-Hofstee-Diagramm (Michaelis und Menten, 1913; Hanes, 1932; Lineweaver und Burk, 1934; Hofstee, 1952). Der Vergleich der erhaltenen Werte sollte die jeweiligen Stärken und Schwächen der verschiedenen Varianten ausgleichen.

Aus der direkt-linearen Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration nach Michaelis und Menten ergibt sich als Annäherung eine Hyperbel, die sich bei (unendlich) hohen Substratkonzentrationen der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} annähert. K_m entspricht der Substratkonzentration bei der halbmaximalen Umsatzgeschwindigkeit. Da v_{max} dabei jedoch nur schwer abzuschätzen ist und nicht genau ermittelt werden kann, wurden die folgenden Linearisierungsverfahren verwendet.

Das Lineweaver-Burk-Diagramm ist die doppelt-reziproke Auftragung von der Anfangsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration und ergibt sich aus folgender Umformung:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{v_{\text{max}}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\text{max}}}$$

Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Ordinate entspricht $1/v_{\max}$ und der Schnittpunkt mit der Abszisse $-1/K_m$.

Bei dem Hanes-Woolf- bzw. Hanes-Wilkinson-Diagramm wird $[S]/v_0$ gegen $[S]$ aufgetragen, wobei nur eine geringe Fehlerverzerrung stattfindet. Dabei beträgt der Anstieg der Regressionsgeraden $1/v_{\max}$, der Schnittpunkt mit der Abszisse $-K_m$ und der Schnittpunkt mit der Ordinate K_m/v_{\max} . Grundlage hierfür ist die Gleichung:

$$\frac{[S]}{v_0} = \frac{1}{v_{\max}} \cdot [S] + \frac{K_m}{v_{\max}}$$

Beim Linearisierungsverfahren nach Eadie und Hofstee wird v_0 gegen $v_0/[S]$ aufgetragen, wobei der Schnittpunkt mit der Ordinate v_{\max} entspricht und die Steigung der Regressionsgeraden $-K_m$.

$$v_0 = -K_m \cdot \frac{v_0}{[S]} + v_{\max}$$

Durch die Linearisierungsverfahren kann es teilweise zu einer erheblichen Verfälschung der ermittelten Größen durch Messfehler kommen, jedoch sind v_{\max} und K_m erheblich leichter ermittelbar. Für einen besseren Überblick wurden daher die Ergebnisse dieser verschiedenen Auftragungen bestimmt.

2.4.5 Proteinisolierung aus Gerstenblättern

Um einen Gesamtproteinextrakt aus Gerstenblättern zu erhalten, wurden diese in flüssigem Stickstoff gefroren und zu feinem Pulver zermahlen. Von diesem Blattpulver wurden 0,5 ml mit 0,75 ml Extraktionspuffer (62,5 mM TRIS (pH 6,8), 10% (v/v) Glycerin, 1% (w/v) SDS, 5% (v/v) β -Mercaptoethanol) versetzt und gründlich gemischt. Das Gemisch wurde für 5 min bei 95°C schüttelnd inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Durch eine 15-minütige Zentrifugation bei $16100 \times g$ wurde die Proteinlösung von unlöslichen Zellbestandteilen abgetrennt und danach in ein neues Gefäß gegeben. Sie konnte dann beispielsweise für eine Proteinkonzentrationsbestimmung (Kap. 2.4.9) eingesetzt und bei -80°C gelagert werden.

2.4.6 Plastidenisolierung

Die Isolierung von Plastiden erfolgte nach Gruissem *et al.* (1986). Dazu wurden in einem Kühlraum bei 6°C ca. 80 g Gerstenblätter geerntet und klein geschnitten. Nach der Zugabe von 360 ml GM-Puffer (Tab. 2.3) wurden die Blätter mit einem Mixer zweimal kurz und einmal für 4 s weiter zerkleinert. Das Homogenat wurde anschließend durch 4 Lagen Miracloth (Merck, Darmstadt) gefiltert und für 2 min bei $3500 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Der Überstand wurde abdekantiert und das Pellet in dem verbliebenen Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde mit GM-

Puffer auf 24 ml aufgefüllt und je 6 ml davon wurden auf einen Percoll-Gradienten gegeben. Diese Gradienten bestehen jeweils aus 12 ml einer 80%iger (v/v) Percoll-Lösung, über die eine 40%ige (v/v) geschichtet wurde (Tab. 2.4). Zusammen mit der Gerstensuspension wurden diese Gradienten für 45 min bei 4°C und $4500 \times g$ mit sehr niedriger Beschleunigung und ohne Bremse zentrifugiert. Intakte Plastiden befanden sich dann im Grenzbereich zwischen den beiden Percoll-Lösungen. Um Verunreinigungen zu vermindern wurde zunächst der obere Teil des Gradienten abgenommen, der unerwünschte Zellbestandteile und bereits beschädigte Plastiden enthielt. Die intakten Plastiden konnten nun vorsichtig entnommen und in ein neues, vorgekühltes Gefäß überführt werden. Die Plastiden wurden anschließend mit dem doppelten Volumen an GM-Puffer gewaschen. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 4°C und $3500 \times g$, wurde der Überstand verworfen. Die Plastiden wurden dann in 10 ml GM-Puffer resuspendiert und erneut bei 4°C und $3500 \times g$ für 1 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand entfernt war, konnten die Plastiden im restlichen Puffer resuspendiert und so für weitere Untersuchungen verwendet werden. Zur Lagerung wurden sie in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Tab. 2.3: Zusammensetzung des GM-Puffers.

	Konzentration
Sorbitol	330,00 mM
HEPES	50,00 mM
EDTA	2,50 mM
MgCl ₂	2,13 mM
MnCl ₂	1,57 mM
(tetra)-Natriumpyrophosphat	1,67 mM
DTT	2,00 mM

pH 6,8 (eingestellt mit NaOH bzw. HCl)

Tab. 2.4: Zusammensetzung der Lösungen für den Percoll-Gradienten.

	80%ige Gradientenlösung	40%ige Gradientenlösung
HEPES/KOH (pH 8,0)	50 mM	50 mM
Sorbitol	6 % (w/v)	6 % (w/v)
EDTA	2 mM	2 mM
MgCl ₂	1 mM	1 mM
DTT	2 mM	2 mM
Gluthation (reduziert)	0,5 mM	0,5 mM
Percoll mit 3% (w/v) PEG (MW 6000) 1% (w/v) BSA 1% (w/v) Ficoll	80 % (v/v)	40 % (v/v)

2.4.7 Isolierung stromaler Proteine

Für die Isolierung der stromalen Proteine wurden zunächst intakte Plastiden aus Gerstenblättern isoliert (Kap. 2.4.6) und eingefroren, wodurch sie teilweise aufgebrochen wurden. Nachdem die Plastiden wieder aufgetaut waren, wurden sie für 5 min bei $10000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde als Stromafraktion abgenommen.

2.4.8 Isolierung und Fraktionierung von Thylakoidmembranproteinen

Um Thylakoide aus den Chloroplasten zu gewinnen, wurden zunächst Plastiden aus Gerstenblättern isoliert (Kap. 2.4.6) und ihre Chlorophyllmenge bestimmt (Kap. 2.9). Die Plastiden wurden in 50 ml hypotonischem Puffer (5 mM EDTA, 10 mM HEPES/KOH (pH 7,8)) resuspendiert und gut gemischt. Die so aufgebrochenen Plastiden wurden für 10 min bei $10000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Die sedimentierten Thylakoide wurden in je 1 ml hypotonischen Puffer pro 1 mg Chlorophyll resuspendiert, gewaschen und wiederum für 10 min bei $10000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Die Fraktionierung der Thylakoidmembranproteine erfolgte nach Jensen (Jensen *et al.*, 2000). Dazu wurden eine 1 mg Chlorophyll entsprechende Menge an Thylakoide in 1 ml β -DM-Lösung (1% (v/v) Dodecyl- β -D-maltosid, 10 mM HEPES/KOH pH 7,8) aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei $20000 \times g$ wurde je 1 ml des erhaltenen Überstands auf ein 11,5 ml-Saccharosedichtegradienten gegeben. Dieser wurde erzeugt, indem die Saccharose-Lösung (0,4 M Saccharose, 0,06% (v/v) β -DM, 20 mM Tricine/NaOH pH 7,5) bei -20°C eingefroren und langsam bei 4°C aufgetaut wurde. Die Gradienten samt Thylakoidproben wurden im Ausschwingrotor für 24 h bei $200000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden 21 Fraktionen zu je 595 μl von oben vom Gradienten abgenommen. Gelagert wurden diese Fraktionen bei -20°C .

2.4.9 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Konzentrationen von Proteinlösungen wurde nach der Methode von Bradford (1976) verfahren. Hierzu wurden je 1 μl der Proteinlösung mit 799 μl Wasser und 200 μl Bradford-Reagenz (Bio-Rad Protein-Assay, Bio-Rad, München) versetzt. Für den Leerwert wurden anstatt einer Proteinlösung 1 μl Wasser eingesetzt. Zur Erstellung einer Standardreihe wurden 1-7 μl BSA-Lösung (1,42 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) mit Wasser auf 800 μl verdünnt und ebenfalls mit 200 μl Bradford-Reagenz versetzt. Nach gründlichem Mischen und einer zehnminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde mithilfe des UV/VIS-Spektralfotometers UV-2501 PC (Shimadzu, Kyoto, Japan) die Absorption bei der Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Der Proteingehalt konnte anschließend mithilfe der Absorption der BSA-Standardreihe berechnet werden.

2.4.10 SDS-PAGE

Zur Auftrennung von Proteinen wurde eine diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurden die Proteinlösungen jeweils mit fünffach konzentriertem Probenpuffer (314 mM TRIS/HCl (pH 6,8), 10 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) Glycerin, 0,5 % (w/v) BPB, 250 mM DTT) versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Als Proteinmarker dienten P7702S (New England Biolabs, Frankfurt), P7703S (New England Biolabs, Frankfurt) und P7704S (New England Biolabs, Frankfurt), wovon jeweils 7-8 µl aufgetragen wurden. Die Gele bestanden jeweils aus einem Sammelgel (4,2% (w/v) Bis-/Acrylamid, 256 mM TRIS/HCl (pH 6,8), 0,1% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) APS, 0,15% (v/v) TEMED), das über ein Trenngel (10-16% (w/v) Bis-/Acrylamid, 379 mM TRIS/HCl (pH 8,8), 0,1% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) APS, 0,05% (v/v) TEMED) geschichtet wurde. Die Auftrennung fand für 1-3 h bei einer Stromstärke von 20 mA pro Gel in dem Laufpuffer nach Laemmli (25 mM TRIS, 190 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS) statt (Laemmli, 1970).

2.4.11 Coomassie-Färbung von SDS-Acrylamidgelen

Nach der Elektrophorese konnten die in den SDS-Acrylamidgelen enthaltenen Proteine angefärbt werden. Dazu wurden die Gele über Nacht in Färbelösung (25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0,6 g/l Coomassie-Brilliant-Blau R-250) inkubiert und nach kurzem Waschen mit Wasser in Entfärbelösung (25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure) entfärbt. Um die Hintergrundfärbung noch zu verringern, wurde das Gel anschließend über Nacht in Wasser inkubiert.

2.4.12 Western Blot

Um die Proteine, die mithilfe einer SDS-PAGE (Kap. 2.4.10) aufgetrennt wurden, auf eine Nitrocellulosemembran (Roti-NC, 0,2 µm Porengröße, Roth, Karlsruhe) zu transferieren, wurde ein Western Blot nach der Semi-Dry-Methode durchgeführt. Dazu wurden die Membran und das SDS-Acrylamidgel für 10 min in Transferpuffer (50 mM TRIS, 40 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, 0,0375% (w/v) SDS) äquilibriert. Auch Whatman-Papiere, die der Größe der Membran entsprachen, wurden mit Transferpuffer getränkt. Der Aufbau des Blots in der Elektrophoresekammer erfolgte luftblasenfrei in folgender Reihenfolge: Anode (Pluspol), drei Schichten Whatman-Papier, Nitrocellulose-Membran, SDS-Acrylamidgel, drei Schichten Whatman-Papier, Kathode (Minuspol). Durch das Anlegen eines Stroms mit einer Stromstärke von 2 mA pro cm² Fläche der Membran für 37 min wurden die durch die Anlagerung des SDS negativ geladenen Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulose-Membran übertragen.

2.4.13 Immundetektion

Bei der Immundetektion wurden zunächst die Nitrocellulose-Membranen der Western Blots (Kap. 2.4.12) für 1 h bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 6°C in einer Blockierungslösung (4% (w/v) Milchpulver in TBS-T (10 mM TRIS, 150 mM NaCl, 0,5 % (w/v) Tween 20, pH 8)) schüttelnd inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend erfolgte unter Schütteln eine einstündige Inkubation in einer TBS-T-Lösung mit dem primären Antikörper (Tab. 2.5) bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 6°C. Die Membranen wurden dann zweimal kurz und viermal für 5 min mit TBS-T gewaschen, bevor sie für 1-2 h bei Raumtemperatur in einer TBS-T-Lösung mit 2% (w/v) Milchpulver und dem sekundären Antikörper mit konjugierter Meerrettich-Peroxidase geschwenkt wurden. Danach wurden die Membranen wieder zweimal kurz und viermal für 5 min mit TBS-T gewaschen.

Tab. 2.5: Verwendete Antikörper. Die Antikörper wurden von folgenden Firmen bzw. Institutionen bezogen: BG - BioGenes (Berlin), Ag - Agrisera (Vännäs, Schweden), NEB - New England Biolabs (Frankfurt), UC - University of California (Berkeley, CA, USA), CL - Carlsberg Research Laboratory (Kopenhagen, Dänemark), ao - antibodies-online (Aachen).

primärer Antikörper			sekundärer Antikörper		
Antigen	Verdünnung	Herkunft	Bezeichnung	Verdünnung	Herkunft
HvPAP14 (reife Peptidase)	1:1000	i.A.: BG	Goat anti-rabbit IgG (H&L) HRP conjugated	1:50000	Ag: AS09 602
MBP	1:10000	NEB: E8032S	Goat anti-rabbit IgG (H&L) HRP conjugated	1:50000	Ag: AS09 602
RbcL	1:50000	Ag: AS03 037	Goat anti-rabbit IgG (H&L) HRP conjugated	1:50000	Ag: AS09 602
PSBO	1:3000	Ag: AS06 142- 33	Goat anti-rabbit IgG (H&L) HRP conjugated	1:50000	Ag: AS09 602
LHCB1	1:5000	Ag: AS01 004	Goat anti-rabbit IgG (H&L) HRP conjugated	1:50000	Ag: AS09 602
LHCB1/2/3	1:1500	UC (A. Melis)	Goat anti-rabbit IgG (H&L) HRP conjugated	1:50000	Ag: AS09 602
LHCB4	1:2000	CL	Rabbit anti-mouse IgG (H&L) HRP conjugated	1:10000	Ag: AS09 627
LHCB5	1:1000	Ag: AS01009	Goat anti-rabbit IgG (H&L) HRP conjugated	1:50000	Ag: AS09 602
LHCA3	1:3000	ao: ABIN93513	Goat anti-rabbit IgG (H&L) HRP conjugated	1:50000	Ag: AS09 602

Die Proteine wurden mithilfe des Luminols des Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), des Amersham ECL Select Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Freiburg) oder des Lumigen ECL TMA-6 (Lumigen, Southfield, MI, USA) detektiert, das von der Peroxidase umgesetzt wird und wobei Chemilumineszenz entsteht. Hierzu wurden die Membranen mit dem Gemisch der Substratlösungen des jeweiligen Kits benetzt. Nach kurzer Inkubation wurde die überständige Lösung entfernt und die Membranen zwischen Plastikfolie gelegt. Das

entstandene Licht wurde mittels eines Films (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare, Freiburg) detektiert, wobei die Belichtungszeit 15 s bis 15 min betrug. Entwickelt wurden die Filme in Roentoroll HC (Tetenal, Norderstedt) und fixiert in Superfix MRP (Tetenal, Norderstedt).

2.5 Nukleinsäure-Analytik

2.5.1 RNA-Isolierung

Für die Analyse der Genexpression mittels RT-PCR wurde die RNA aus Pflanzenmaterial extrahiert. Dazu wurde das Material in flüssigem Stickstoff eingefroren und zu feinem Pulver gemörsert. 0,5 ml dieses Pulvers wurden mit 1 ml pegGOLD TriFast (PEQLAB, Erlangen) versetzt, gut gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Mischen wurde für 5 min bei 4°C und $16000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 200 µl Chloroform ausgeschüttelt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur, wobei die Probe hin und wieder gemischt wurde, folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 4°C und $16000 \times g$. Die obere, wässrige Phase wurde wiederum in ein neues Gefäß überführt und die darin enthaltene RNA mit 500 µl Isopropanol innerhalb von 10 min bei Raumtemperatur gefällt. Das durch eine Zentrifugation (für 10 min bei 4°C und $16000 \times g$) erhaltene Pellet wurde dann mit 1 ml EtOH (70% (v/v)) gewaschen. Nach fünfminütigem Zentrifugieren bei 4°C und $16000 \times g$ wurde der Überstand komplett abgenommen und das Pellet getrocknet. Die RNA wurde in 30-50 µl RNase-freiem Wasser gelöst und dann für 10 min bei 65°C inkubiert, bevor sie mithilfe einer Agarosegelelektrophorese (Kap. 2.5.6) überprüft, für die Reverse Transkription eingesetzt bzw. bei -80°C gelagert wurde.

2.5.2 cDNA-Synthese

Die Synthese der cDNA wurde mithilfe des QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden) synthetisiert. Dafür wurden 500 ng RNA eingesetzt, die mit 1 µl gDNA Wipeout Buffer (7x) versetzt, mit H₂O auf 7 µl aufgefüllt und gemischt wurden. Nach einer Inkubation bei 42°C für 10 min, wurden auf Eis 2 µl Quantiscript RT Buffer (5x), 0,5 µl RT Primer Mix und 0,5 µl Reverse Transkriptase (Quantiscript RT) hinzugeben. Der Ansatz wurde für 15 min bei 42°C inkubiert und die Reverse Transkriptase für 3 min bei 95°C inaktiviert. Die synthetisierte cDNA wurde anschließend mit 20 µl H₂O versetzt und u.a. für RT-PCR (Kap. 2.5.11.4) eingesetzt bzw. bei -20°C gelagert.

2.5.3 Isolierung von Nukleinsäuren aus *E. coli*

Für die Klonierung und Sequenzierung der Plasmide wurden diese mithilfe des Roti-Prep Plasmid MINI Kit (Roth, Karlsruhe) aus *E. coli*-Zellen isoliert. Dazu wurden 5 ml Flüssigkultur eingesetzt. Die DNA wurde mit 40 µl Wasser eluiert. Ansonsten wurde nach Herstellerangaben verfahren.

Die Isolierung von Plasmiden zur transienten Transformation von Zwiebelzellen und Protoplasten wurde mit dem Plasmid DNA Purification NucleoBond PC 100-Kit (MACHEREY-NAGEL, Düren) durchgeführt, wobei 40-50 ml Flüssigkultur aufgearbeitet wurden. Zur Elution der DNA wurden 200 µl eines auf 60°C erwärmten Wassers eingesetzt.

Die isolierten Plasmide wurden bei -20°C gelagert.

2.5.4 DNA-Isolierung aus Agarose-Gel

Um DNA aus Agarose-Gelstückchen zu isolieren, wurde das NucleoSpin Gel and PCR Clean-up-Kit (MACHEREY-NAGEL, Düren) verwendet. Die DNA wurde mit je 20 µl H₂O eluiert.

2.5.5 DNA-Fällung

Um nach PCR oder Restriktionsreaktionen die DNA von den anderen Reagenzien abzutrennen, wurde eine Ethanol-Fällung durchgeführt. Die DNA-Lösung wurde dazu mit dem 0,1-fachen Volumen Natriumacetat (3 M, pH 5,6) und dem 2,5-fachen Volumen Ethanol (100%) versetzt. Nachdem der Ansatz bei -20°C für mindestens 30 min inkubiert bzw. in flüssigem Stickstoff eingefroren wurde, konnte die ausgefallene DNA durch zehnmütiges Zentrifugieren bei 16000 × g pelletiert werden. Der Überstand wurde abdekantiert und das entstandene Pellet mit 0,5-1 ml eiskaltem Ethanol (80% (v/v)) gewaschen. Anschließend wurde erneut für 3 min bei 16000 × g zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Ethanols und dem Trocknen des Pellets wurde die DNA in Wasser (60°C) gelöst.

2.5.6 Nukleinsäure-Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA- und RNA-Moleküle erfolgte durch eine Agarosegelelektrophorese. Die verwendeten Agarosegele bestanden aus TAE-Puffer (40 mM TRIS, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8) mit 0,75-2% (w/v) Agarose und enthielten 0,006% (v/v) Ethidiumbromid. Die DNA-Lösungen wurden mit zehnfachem DNA-Ladepuffer (50% (v/v) Glycerin, 0,1% (w/v) BPB) versetzt, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Als DNA-Größenmarker diente die GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo

Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bzw. GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Zur Analyse der RNA-Proben wurden 0,5-2 µl RNA-Lösung mit 9 µl RNA-Ladepuffer (40% (v/v) Formamid (deionisiert), 20% (v/v) 10x BPB, in 1x MOPS-Puffer (400 mM MOPS, 100 mM NaAcetat, 10 mM EDTA)) versetzt. Die Auftrennung erfolgte innerhalb von 30-60 min bei einer Spannung von 80 V unter Verwendung von TAE-Puffer.

2.5.7 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäurekonzentrationen wurden fotometrisch über die Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm mithilfe des UV/VIS-Spektralfotometers NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bestimmt.

2.5.8 Restriktion

Zur Vorbereitung der Ligation (Kap. 2.5.9) wurden die Vektoren sowie die aus der PCR (Kap. 2.5.11) hervorgehenden Produkte als einzuführende Genabschnitte (Inserts) mithilfe von Endonukleasen verdaut. Dazu wurde die DNA nach der PCR mithilfe einer Ethanol-fällung (Kap. 2.5.5) aufgereinigt. Die erstellten Konstrukte wurden zudem mithilfe von Restriktionen überprüft. Die verwendeten Restriktionsenzyme *AvaI*, *BamHI*, *EcoRI*, *HindIII*, *SalI*, *XbaI*, *XhoI*, *XmaI*, *XmnI* wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) bezogen. Die Reaktionsansätze zur Hydrolyse der DNA wurden nach Herstellerangaben zusammengesetzt. Die Restriktionen fanden jeweils für 0,5-2 h bei 37°C statt.

2.5.9 Ligation

Zur Erstellung der jeweiligen Konstrukte wurde für die Ligationen das Rapid DNA Ligation Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) eingesetzt. Der jeweiligen restriktionsverdauten Vektoren und Inserts lagen in einem Mengenverhältnis von etwa 1:3 vor. Der Ligationsansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 µl wurde für 1,5 h bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei etwa 6°C inkubiert. 12,5 µl eines Ansatzes wurden anschließend für je eine Transformation von *E. coli DH5α*-Zellen (Kap. 2.3.2) eingesetzt.

2.5.10 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmide wurde durch das Institut für Klinische Molekularbiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel nach der Methode von Sanger *et al.* (1977) durchgeführt. Es

wurden jeweils 200-300 ng Plasmid und 5 pmol Sequenzierprimer pro Reaktion verwendet. Als Sequenzierprimer dienen die in Tabelle 2.6 aufgeführten Oligonukleotide bzw. die für die PCR zur Klonierung verwendeten Primer (Tab. 2.7).

Tab. 2.6: Primer für die Sequenzierung.

Primer	Sequenz
pART7_for	TATCCTTCGCAAGACCCTTC
pUbi_for	TAGCCCTGCCTTCATACGCT
pUbi_rev	CCGGCAACAGGATTCAATCT
pMAL_for	TCAGACTGTCGATGAAGC
pMAL_rev	TGTCCTACTCAGGAGAGCGTTCAC

2.5.11 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung der DNA wurden alle PCR mit dem Thermocycler Primus 96 plus (MWG-BIOTECH, Ebersberg) durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma Sigma-Aldrich (München) synthetisiert und sind in der Tabelle 2.7 aufgelistet. Für die Klonierungen von Konstrukten für die Transformation von *E. coli*- bzw. Pflanzenzellen dienen folgende Plasmide bzw. cDNA als Template-DNA: Das Plasmid des Klons NIASHv2079N05 (Matsumoto *et al.*, 2011) für die *HvPAP14*-Sequenz, das Plasmid pB7RWG2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) für die *rfp*-Sequenz und cDNA aus Gerste der Sorte Golden Promise für die *RBCS*-Sequenz. Die erhaltenen Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

Tab. 2.7: Verwendete Primer zur Amplifizierung von DNA mittels PCR.

Primer	Sequenz	T _m (°C)
PAP14N_for	GAACTCTCGAGAAGCTTATGGCGAGAGCGATC	71
PAP14N_rev	TCATTGGATCCGAATTCCACATCGCGCTTCAT	68
RFP_for	ATATTGAATTTCGGCGGTATGGCCTCCTCCGAG	71
RFP_rev	TAATTGGATCCACCGGCGCCGGTGGAGTG	72
PAP14C_for	AGAATGGATCCAAGGACAAGGAAGGGCTCT	68
PAP14C_rev	TCATTTCTAGAGTCGACTCAGGCATGCTTCGGGT	71
PAP14C-HDEL_rev	TCATTTCTAGAGTCGACTCAGAGCTCGTCATGG	69
RFPpU_rev	TCATAGTCGACTTAGGCGCCGGTGGAGTG	71
BamHI_RbcS_for	CTCGAGGATCCATGGCCCCACCGTGATG	74
RbcS_XmaI_rev	GTCGACCCGGGTGCCTTGCCCGACTCCTG	76
PAP14UE_for	ATGGACTTCGGCGACCACGACCTG	68
PAP14UEC_rev	TCAGAGTCGACTCAGGTCTTGACTGGGTA	68

2.5.11.1 Standard-PCR

Eine Standard-PCR wurde beispielsweise zur Überprüfung der Sequenzen bereits vorhandener Plasmide, vor allem aber zur Ermittlung geeigneter Bedingungen für die Reaktion verwendet. Als Polymerase diente dabei die thermostabile Taq-Polymerase. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze ist Tabelle 2.8 und die verwendeten Temperaturbedingungen in Tabelle 2.9 zusammengefasst. Als Negativkontrolle wurde die Template-DNA jeweils durch Wasser ersetzt.

Tab. 2.8: Pipettierschema für die Standard-PCR.

	eingesetzte Volumina
Template-DNA	0,5 µl
Forward-Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
Reverse-Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
dNTP (je 0,5 mM)	2,0 µl
10x DreamTaq Green Buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)	2,0 µl
DreamTaq DNA Polymerase (5 U/µl, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)	0,1 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Tab. 2.9: Temperaturprofil für die durchgeführten PCR.

Zeit	Temperatur
4 min	95°C
0,5 min	95°C
0,5 min	x°C*
y min**	72°C
4 min	72°C

} 33-38x

* Durchschnittswert der T_m der beiden verwendeten Primer abzüglich (3-)5°C

** 1 min pro 1000 bp des gewünschten Amplifikates + 20 s

2.5.11.2 Pfu-PCR

Für die Klonierungen wurde eine möglichst fehlerfreie Amplifizierung der gewünschten DNA-Sequenzen benötigt. Daher wurde hierfür die Pfu-Polymerase eingesetzt, die noch eine zusätzliche Funktion als Exonuklease und somit eine „Korrekturlesefunktion“ besitzt. Die PCR-Produkte besitzen zudem keine Nukleotid-Überhänge. Das Pipettierschema und das PCR-Programm für die Herstellung der einzuführenden Genabschnitte (Inserts) für die Ligationen sind in der Tabelle 2.10 und 2.11 zusammengefasst.

Tab. 2.10: Pipettierschema für die Pfu-PCR.

	eingesetzte Volumina
Template-DNA	1 µl
Forward-Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Reverse-Primer (10 pmol/µl)	1 µl
dNTP (je 0,5 mM)	20 µl
10x Pfu Buffer mit MgSO ₄ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)	5 µl
Pfu DNA Polymerase (2,5 U/µl, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)	1 µl
H ₂ O	ad 50 µl

Tab. 2.11: Temperaturprofil für die Pfu-PCR.

Zeit	Temperatur	
3 min	95°C	} 35x
0,5 min	95°C	
0,5 min	x°C*	
y min**	72°C	
6 min	72°C	

* Durchschnittswert der T_m der beiden verwendeten Primer abzüglich (3-)5°C

** 2 min pro 1000 bp des gewünschten Amplifikates + 20 s

2.5.11.3 Kolonie-PCR

Zur Identifikation von Klonen, die ein gewünschtes Plasmid enthalten, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Die Template-DNA wurde hierbei von im Reaktionsgefäß abgestrichenen *E. coli*-Kolonien geliefert. Das Pipettierschema hierfür ist in der Tabelle 2.12 aufgeführt. Das Temperaturprofil für die PCR entspricht jeweils dem der entsprechenden Standard-PCR, wobei eine 38- bis 40-fache Wiederholung des Amplifikationszykluses gewählt wurde. Bei der Negativ-Kontrolle wurde auf die *E. coli*-Kolonie verzichtet.

Tab. 2.12: Pipettierschema für die Kolonie-PCR.

	eingesetzte Volumina
Template-DNA in <i>E. coli</i>	.
Forward-Primer (10 pmol/µl)	0,3 µl
Reverse-Primer (10 pmol/µl)	0,3 µl
dNTP (je 0,5 mM)	2,0 µl
10x DreamTaq Green Buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)	2,0 µl
DreamTaq DNA Polymerase (5 U/µl, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)	0,1 µl
H ₂ O	15,3 µl

2.5.11.4 Expressionsanalyse mittels RT-PCR

Zur Ermittlung der Änderungen von Transkriptmengen wurde zunächst die mRNA aus den jeweiligen Gerstenblättern isoliert und anschließend mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben (Kap. 2.5.1 und 2.5.2). Die Mengenunterschiede der Transkripte wurden ermittelt indem die Sequenzen mit spezifischen Primern amplifiziert und über Agarosegelelektrophorese analysiert wurden. Als Kontrollgen diente *18S* (AH001585.2), das konstitutiv exprimiert wird. Die verwendeten Oligonukleotide, die Zusammensetzung der Reaktionsansätze und die Reaktionsbedingungen sind in folgenden Tabellen zu finden:

Tab. 2.13: Verwendete Primer zur Amplifizierung von cDNA mittels RT-PCR.

Primer	Sequenz
Hv18SqRTfor	CAGGTCCAGACATAGCAAGGATTGACAG
Hv18SqRTrev	TAAGAAGCTAGCTGCGGAGGGATGG
RTHvPAP14_for	AGTTCAACCGCGGTGACGCC
RTHvPAP14_rev	TGCCGTGCATGAAACCGCCA

Tab. 2.14: Pipettierschema für die RT-PCR.

	eingesetzte Volumina
Template-DNA	1,5 µl (0,9-5 µl)
Forward-Primer (10 pmol/µl)	0,4 µl
Reverse-Primer (10 pmol/µl)	0,4 µl
dNTP (je 0,5 mM)	1,5 µl
10x DreamTaq Green Buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)	1,5 µl
DreamTaq DNA Polymerase (5 U/µl, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)	0,1 µl
H ₂ O	ad 15,0 µl

Tab. 2.15: Temperaturprofil für die RT-PCR.

Zeit	Temperatur
4 min	95°C
0,5 min	95°C
0,5 min	58°C
0,5 min	72°C
4 min	72°C

} 16-30x

2.6 Biolistische Transformation von Zwiebelepidermiszellen

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Proteinen wurden diese in Fusion mit fluoreszierenden Proteinen in Pflanzenzellen synthetisiert. Dafür wurden Zwiebelepidermiszellen mithilfe der Genkanone PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System (Bio-Rad, München) transient transformiert.

Zunächst wurden Zwiebelepidermen von Lauchzwiebeln präpariert und mit der offenen Seite luftblasenfrei auf MS-Platten (0,5x MS-Salze, 0,5% (w/v) Saccharose, 1,5% (w/v) Agar) gelegt. 5 µg Plasmid-DNA wurde zu einer Goldsuspension gegeben. Diese enthielt 2 mg Gold mit einer Partikelgröße von 1,3-3 µm, das mit Ethanol (100%) gewaschen und schließlich in 50 µl Wasser aufgenommen wurde. Zur Bindung der Plasmid-DNA an die Goldpartikel wurden unter ständigem Mischen 50 µl CaCl₂-Lösung (2,5 M) und 20 µl Spermidin (0,1 M) hinzugefügt und sofort für etwa 2 min gemischt. Die Goldpartikel wurden durch eine einminütige Zentrifugation bei 2300 × g pelletiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurden die Partikel in 250 µl Ethanol (100%) gewaschen und schließlich in 50 µl Ethanol (100%) resuspendiert. Jeweils 10 µl dieser Suspension wurden auf einen sterilen Makroträger in einem Makroträgerhalter pipettiert und dort trocknen gelassen. Zusammen mit einem sterilen Stoppnetz und einer sterilen Reißscheibe (1100 psi bzw. 900 psi) wurde der Makroträger in die Genkanone eingesetzt. Zuletzt wurde die Zwiebelepidermis auf MS-Agar in dem Gerät platziert. In der Kammer der Genkanone wurde ein Unterdruck von etwa 25 inHg erzeugt und dann mithilfe von Helium oberhalb der Reißscheibe Druck aufgebaut, bis diese zerriss. Durch den Druckausgleich wurden die Goldpartikel samt Plasmid-DNA beschleunigt und auf die Zwiebelepidermiszellen geschossen. Die Zwiebelepidermen wurden für 24 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert bis sie mikroskopisch untersucht werden konnten.

2.7 Transiente Transformation von Protoplasten aus Gerstenblättern mittels PEG

Zur Isolierung von Protoplasten aus Gerstenblättern wurde die untere Epidermis von Primärblättern entfernt. Um die Zellwände abzubauen, wurden die Blätter mit der offenen Seite auf eine Enzymlösung (Tab. 2.16) gelegt und bei Raumtemperatur, Schwachlicht und unter leichtem Schwenken für 1 h inkubiert. Die Ablösung der Protoplasten vom restlichen Gewebe wurde durch leichtes Quetschen noch begünstigt. Die Protoplastensuspension wurde durch Nylongaze (90 µm Maschenweite) filtriert und für 5 min bei 63 × g im Ausschwingrotor mit niedriger Beschleunigung und Bremse zentrifugiert. Nachdem der Überstand fast vollständig entfernt wurde, wurde das Pellet in dem restlichen Überstand vorsichtig resuspendiert. Diese Suspension wurde mit 10 ml Saccharosepuffer (Tab. 2.17) unterschichtet und mit 2 ml W5-Lösung (Tab. 2.18) überschichtet. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 80 × g für 10 min,

konnten intakte Protoplasten aus der Zwischenphase entnommen werden. Die Protoplastensuspension wurde ggf. mit W5-Lösung verdünnt. Zur Bestimmung der Zelldichte wurde eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer benutzt.

Tab. 2.16: Zusammensetzung der Enzymlösung zum Zellwandabbau.

	Konzentration / Anteil
Cellulase R-10 (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande)	1 % (w/v)
Mazerozym R-10 (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande)	0,3 % (w/v)
Succinat	20 mM
Sorbitol	0,5 M
KH ₂ PO ₄	0,5 mM
KNO ₃	1 mM
MgSO ₄	1 mM
EDTA	1 mM
BSA	0,025% (w/v)

pH 5,7 (eingestellt mit KOH bzw. H NO₃)

Tab. 2.17: Zusammensetzung des Saccharosepuffers.

	Konzentration
CaCl ₂	1 mM
Saccharose	1 mM
Sorbit	100 mM
MES	25 mM

pH 5,8 (eingestellt mit HCl)

Für die transiente Transformation der Gerstenzellen wurden zunächst 2 Millionen Protoplasten durch eine Zentrifugation bei $70 \times g$ für 10 min im Ausschwingrotor mit niedriger Beschleunigung und Bremse sedimentiert. Die Zellen wurden in 250 μ l MaMg-Lösung (Tab. 2.19) resuspendiert. Nachdem etwa 20 μ g Plasmid-DNA und 250 μ l PEG-Lösung (40% (w/v) PEG 1500 in MaMg-Lösung) hinzugegeben wurden, folgte eine Inkubation für 35 min bei RT, wobei die Suspension im Abstand von 5-10 min jeweils vorsichtig, aber gründlich gemischt wurde. In drei Schritten wurde die Protoplastensuspension mit 0,5 ml, 1 ml und nochmals 1 ml W5-Lösung verdünnt. Nach der Zentrifugation bei $80 \times g$ für 10 min wurden die pelletierten Protoplasten in 0,5 ml W5-Lösung aufgenommen und über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert bis sie u. a. mikroskopisch analysiert werden konnten.

Tab. 2.18: Zusammensetzung des W5-Puffers.

	Konzentration
NaCl	154 mM
CaCl ₂	125 mM
KCl	5 mM
Glukose	5 mM

pH 5,8 (eingestellt mit HCl)

Tab. 2.19: Zusammensetzung der MaMg-Lösung.

	Konzentration / Anteil
Mannitol	0,4 M
MgCl ₂	15 mM
MES	0,1% (w/v)

pH 6,5 (eingestellt mit HCl)

2.8 Fluoreszenzmikroskopie

Zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Pflanzenzellen und -gewebe wurde das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) TCS SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar) benutzt. Dazu wurden die in der Tabelle 2.20 zusammengefassten Anregungs- und Emissionswellenlängen verwendet. Für die Färbung des ER wurden Protoplasten in W5-Lösung (Tab. 2.18) mit 2 µM ER-Tracker Red (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) für etwa 40 min inkubiert. Das Pflanzenmaterial wurde unmittelbar vor den fluoreszenzmikroskopischen Analysen möglichst dunkel gehalten um empfindliche Fluophore vor dem Ausbleichen zu schützen.

Tab. 2.20: Für die verwendeten Fluorophore spezifischen Einstellungen des CLSM.

Fluorophor	Anregungswellenlänge	Emissionswellenlänge
RFP	543 nm	590-615 nm
GFP	488 nm	505-530 nm
Chlorophyll	633 nm	660-700 nm
ER-Tracker Red	543 nm	590-615 nm

2.9 Bestimmung des Chlorophyllgehalts von Thylakoidsuspensionen

Zur Bestimmung des Chlorophyllgehalts von Thylakoidmembransuspensionen wurde 1 µl davon in 999 µl Aceton (80% (v/v)) gegeben. Mithilfe des UV/VIS-Spektrofotometers UV-2501 PC (Shimadzu, Kyoto, Japan) wurde die optische Dichte bei den Wellenlängen 646,6 nm, 663,6 nm und 750 nm gegen

Aceton (80% (v/v)) gemessen. Die Berechnung der Chlorophyllkonzentration erfolgte nach Porra *et al.* (1989):

$$\text{Chlorophyll a + b: } \beta_{Chl\ a+b} = 7,34 \frac{\mu g}{\mu l} \cdot (A_{663,6\ nm} - A_{750\ nm}) + 17,76 \frac{\mu g}{\mu l} \cdot (A_{646,6\ nm} - A_{750\ nm})$$

$$\text{Chlorophyll a: } \beta_{Chl\ a} = 12,25 \frac{\mu g}{\mu l} \cdot (A_{663,6\ nm} - A_{750\ nm}) - 2,55 \frac{\mu g}{\mu l} \cdot (A_{646,6\ nm} - A_{750\ nm})$$

$$\text{Chlorophyll b: } \beta_{Chl\ b} = -4,91 \frac{\mu g}{\mu l} \cdot (A_{663,6\ nm} - A_{750\ nm}) + 20,31 \frac{\mu g}{\mu l} \cdot (A_{646,6\ nm} - A_{750\ nm})$$

2.10 *In silico*-Bestimmung der subzellulären Lokalisation von Proteinen

Zur Vorhersage der subzellulären Lokalisation von Proteinen wurden verschiedene Computerprogramme verwendet, die frei im Internet verfügbar sind. Sie sind in der Tabelle 2.21 zusammengefasst. Die Berechnungsgrundlagen dieser Programme sind sehr unterschiedlich. Beispielsweise werden Signalsequenzen wie plastidäre oder mitochondriale Importsequenzen, die Kernlokalisationssequenz NLS oder ER-Retentionssignale erkannt. Andere Vorhersagen basieren auf dem Vergleich der Proteinsequenz mit Sequenzen von Proteinen, deren Lokalisation bereits bekannt ist. Oft sind es komplexe Berechnungen, die verschiedenen Vorgehensweisen kombinieren um ein möglichst wahrscheinliches Ergebnis zu erzielen. Wenn möglich wurden die Einstellungen so gewählt, dass die Suche sich auf eukaryotische bzw. pflanzliche Proteine und Lokalisationen eingrenzte. So wurden pflanzenspezifische Kompartimente wie Chloroplasten in die Analyse miteinbezogen.

Tab. 2.21: Verwendete Programme für die *in silico*-Vorhersage der subzellulären Lokalisation. Der letzte Aufruf erfolgte am 21.11.2016.

	Internetadresse	Referenz
CELLO	http://cello.life.nctu.edu.tw/	Yu <i>et al.</i> , 2006
LocTree3	https://roslab.org/services/loctree3/	Goldberg <i>et al.</i> , 2014
MultiLoc	http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/MultiLoc	Hoeglund <i>et al.</i> , 2006
MultiLoc2	http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/MultiLoc2	Blum <i>et al.</i> , 2009
PSORT	http://psort.hgc.jp/form.html	Nakai und Horton, 1999
PredSL	http://aias.biol.uoa.gr/PredSL/	Petsalaki <i>et al.</i> , 2006
TargetP	http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/	Emanuelsson <i>et al.</i> , 2000
YLoc	http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/YLoc/webloc.cgi	Briesemeister <i>et al.</i> , 2010

3 Ergebnisse

HvPAP14 wurde als seneszenzassoziierte Cysteinpeptidase der Gerste identifiziert, die an der Thylakoidmembran der Chloroplasten lokalisiert ist (Kap. 1.3.3). Eine erweiterte Untersuchung der subzellulären Lokalisation von HvPAP14 kann Hinweise auf die Eigenschaften und Funktion der Cysteinpeptidase liefern (Kap. 3.1). An isolierter HvPAP14 können Eigenschaften wie die Aktivierung, die Aktivität, und die Enzymkinetik näher untersucht werden (Kap. 3.2). Die dabei gewonnenen Erkenntnisse über das Enzym können genutzt werden, um isolierte HvPAP14 unter optimalen Bedingungen für eine Analyse möglicher Substrate einzusetzen (Kap. 3.3). Die Prozessierung bzw. der Abbau dieser potentiellen Substrate der HvPAP14 können anschließend *in vivo* in *HvPAP14*-überexprimierenden Gerstenzellen überprüft und charakterisiert werden (Kap. 3.4).

3.1 Die subzelluläre Lokalisation von HvPAP14

3.1.1 *In silico*-Analyse der subzellulären Lokalisation von HvPAP14

Die *in silico*-Analyse der subzellulären Lokalisation von HvPAP14 basiert auf der Vorhersage durch Computerprogramme, deren Berechnungsgrundlagen unterschiedlich sind. Daher wurden die Ergebnisse mehrerer Programme ausgewertet und verglichen (Tab. 3.1). Vier der acht verwendeten Programme sagten vorher, dass HvPAP14 im Endoplasmatischen Retikulum bzw. im sekretorischen Weg lokalisiert ist. Dies ist u.a. auf das in der Sequenz enthaltene Signalpeptid sowie das C-terminale ER-Retentionssignal HDEL zurückzuführen. Laut dem Programm PSORT ist HvPAP14 im Extrazellulärraum zu erwarten, wohin die Peptidase erst nach Passieren des sekretorischen Wegs gelangen kann. Das Programm CELLO sagt dagegen die Chloroplasten als wahrscheinlichste Lokalisation vorher, LocTree3 das Cytoplasma, MultiLoc (MultiLoc) die Peroxisomen und PredSL die Mitochondrien.

Tab. 3.1: *In silico*-Vorhersage der subzellulären Lokalisation von HvPAP14. Für die Vorhersage wurde die Aminosäuresequenz von HvPAP14 (CAQ00109.1) eingesetzt. Aufgeführt sind die Ergebnisse mit der höchsten Wahrscheinlichkeit und ggf. weitere Lokalisationen mit ähnlich hohen Wahrscheinlichkeiten in Klammern.

Programm	Vorhergesagte Lokalisation
CELLO	Chloroplast (Mitochondrium, ER)
LocTree3	Cytoplasma
MultiLoc - MultiLoc	Peroxisom (Vakuole, ER)
MultiLoc - TargetLoc	sekretorischer Weg
MultLoc2	ER
PSORT	extrazellulär
PredSL	Mitochondrium
TargetP	sekretorischer Weg
YLoc	ER

3.1.2 Analyse der subzellulären Lokalisation von HvPAP14 mittels *Life-Cell-Imaging*

3.1.2.1 Biolistisch transformierte Zwiebelepidermiszellen

Um die subzelluläre Lokalisation von HvPAP14 in lebenden Zellen zu untersuchen, wurden zunächst Zwiebelepidermiszellen biolistisch transformiert. Dazu wurden Konstrukte verwendet, die für HvPAP14:RFP-Fusionsproteine mit (pUbi-HvPAP14N-RFP-HvPAP14) oder ohne das ER-Retentions-signal HDEL (pUbi-HvPAP14N-RFP-HvPAP14(Δ HDEL)) kodieren und unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors aus Mais stehen. Analysiert wurden die Zellen mithilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskops.

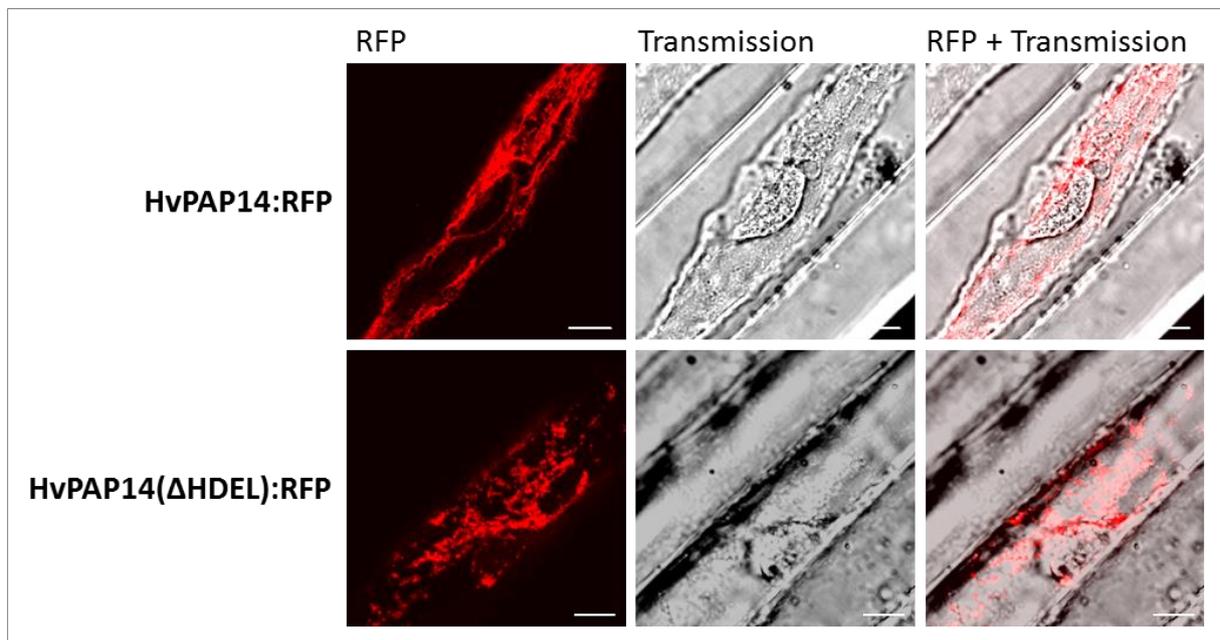


Abb. 3.1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der HvPAP14:RFP-Fusionsproteine in transient transformierten Zwiebelepidermiszellen. Gezeigt sind Zellen, in die das Konstrukt für HvPAP14:RFP (pUbi-HvPAP14N-RFP-HvPAP14C) bzw. für HvPAP14(Δ HDEL):RFP (pUbi-HvPAP14N-RFP-HvPAP14C(Δ HDEL)) biolistisch eingebracht wurde. Nach einer Inkubationszeit von ca. 20 h erfolgten die Aufnahmen mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) bei $\lambda_{\text{Ex}}=543$ nm und $\lambda_{\text{Em}}= 590-615$ nm für RFP. Messbalken: 10 μm .

Das RFP-Signal der Fusionsproteine war über die ganze Zelle verteilt in einer netzartigen und z.T. vesikulären Struktur zu finden (Abb. 3.1). Diese umgab eng den Zellkern, der in den Transmissionsschichtaufnahmen zu erkennen ist. Dies spricht für eine Lokalisation der Fusionsproteine im Endoplasmatischen Retikulum, das mit der Kernhülle verbunden ist. Zwischen den Fusionsproteinen mit oder ohne ER-Retentionssignal gab es keine erkennbaren Unterschiede im Hinblick auf die Lokalisation der Fluoreszenzsignale.

3.1.2.2 Transiente Transformation von Gerstenprotoplasten

Um die subzelluläre Lokalisation der Cysteinpeptidase auch im homologen System zu analysieren, wurden Protoplasten aus Gerstenblättern verwendet. Die Gerstenprotoplasten enthalten im Unterschied zu den Zwiebelepidermiszellen Chloroplasten. Das bietet den Vorteil, dass die Autofluoreszenz des Chlorophylls in der Thylakoidmembran der Chloroplasten als Kontrolle bei der Analyse der subzellulären Lokalisation von HvPAP14 genutzt werden kann. Die Gerstenzellen wurden mit folgenden Konstrukten transformiert: Ein Konstrukt, das für ein HvPAP14:RFP-Fusionsprotein mit bzw. ohne HDEL-Sequenz kodiert (pUbi-HvPAP14N-RFP-HvPAP14C, pUbi-HvPAP14N-RFP-HvPAP14C(Δ HDEL)) und als weitere Lokalisationskontrollen jeweils ein Konstrukt, das für GFP, RFP bzw. RBSC:GFP kodiert. Das GFP und RFP markiert das Cytosol sowie den Zellkern. Das RBSC:GFP akkumuliert im Stroma der Chloroplasten. Die Expression der Konstrukte stand unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors aus Mais. Außerdem wurde das ER der Protoplasten mit dem ER-Tracker Red angefärbt. Die Zellen wurden anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Wie bereits in den Zwiebelzellen waren auch hier die Fluoreszenzsignale der HvPAP14:RFP-Fusionsproteine in einer netzartigen Struktur in der ganzen Zelle verteilt zu sehen (Abb. 3.2). Zudem war die RFP-Fluoreszenz teilweise in vesikulären Strukturen zu finden. Diese Strukturen ähnelten den Fluoreszenzsignalen in Protoplasten, die mit ER-Tracker angefärbt wurden.

Die Fluoreszenzsignale des GFP, die wie die Signale des freien RFP im Cytosol und im Zellkern zu erkennen war (Abb. 3.2), zeigten eine sehr ähnliche Verteilung wie die netzartigen Strukturen, in denen die Fluoreszenz der HvPAP14:RFP-Fusionsproteine zu sehen waren. Sie kolokalisierten jedoch nicht, wodurch die Lokalisation der HvPAP14:RFP-Proteine im Cytosol auszuschließen ist. Durch die Kotransformation wurde jedoch deutlich, dass die Signale der HvPAP14:RFP-Fusionsproteine eng um den Zellkern herum lagen. Da das ER mit der Kernhülle verbunden ist, spricht dies wiederum für eine Lokalisation des Fusionsproteins im ER

Schwache Fluoreszenzsignale der HvPAP14:RFP-Fusionsproteine waren zusätzlich in den Chloroplasten zu erkennen. Diese Signale kolokalisierten mit der Autofluoreszenz des Chlorophylls, unterschieden sich jedoch von den Signalen, die vom stromalen RBSC:GFP stammten. Diese GFP-Signale befanden sich in direkter Nähe der Chlorophyll-Signale und lagen eng um diese herum, kolokalisierten jedoch nicht mit ihnen. Dies deutet auf eine Lokalisation der HvPAP14:RFP-Fusionsproteine an bzw. in den Thylakoiden hin. Kein Unterschied war zwischen den Protoplasten, die mit Konstrukten für das HvPAP14:RFP-Fusionsprotein mit oder ohne HDEL-Sequenz transformiert wurden, zu erkennen.

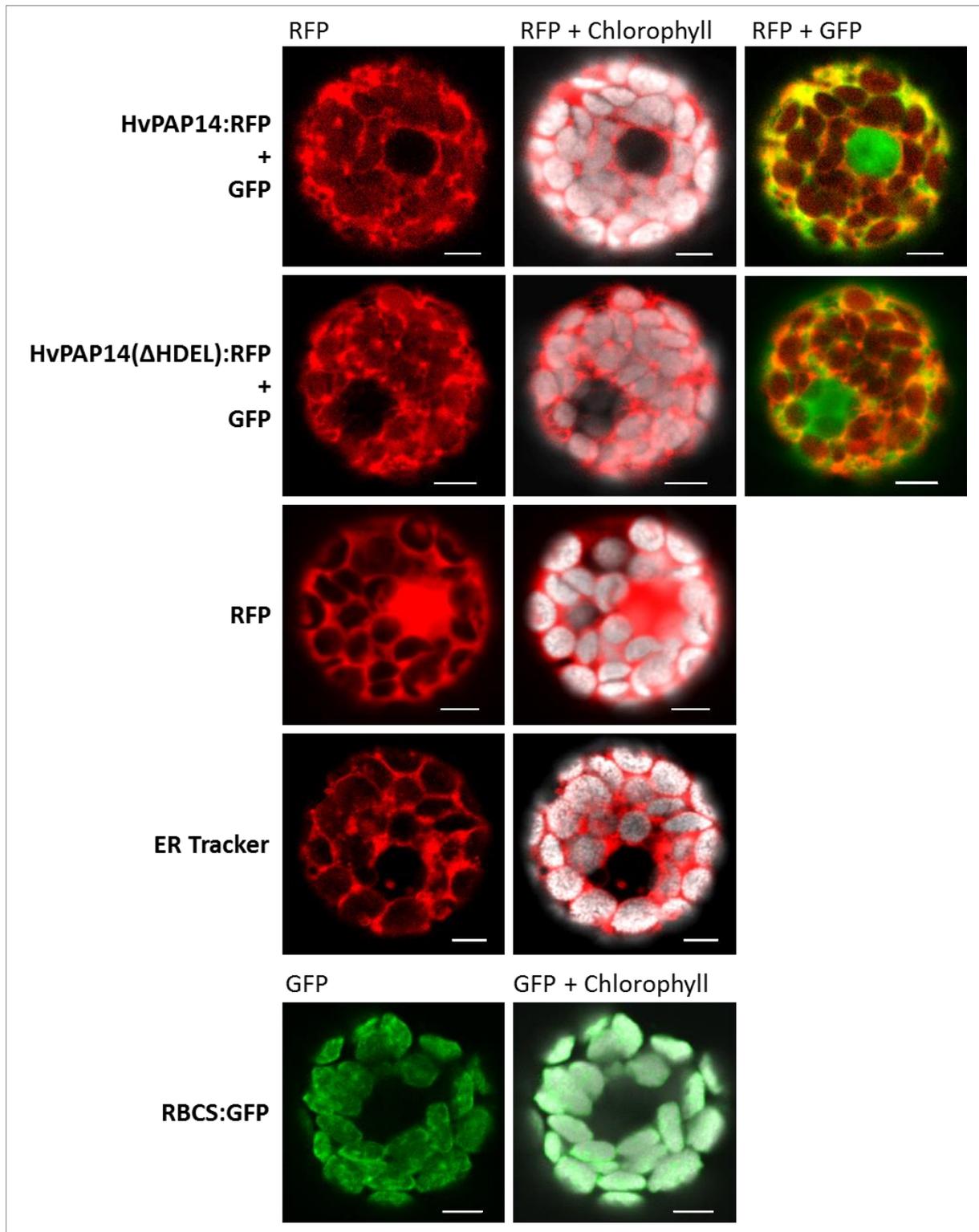


Abb. 3.2: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der HvPAP14:RFP-Fusionsproteine in transformierten Gerstenprotoplasten. In die Protoplasten wurden mithilfe von PEG die Konstrukte für HvPAP14:RFP (pUbi-HvPAP14N-RFP-HvPAP14C), HvPAP14(ΔHDEL):RFP (pUbi-HvPAP14N-RFP-HvPAP14C(ΔHDEL)), GFP (pUbi-GFP), RFP (pUbi-RFP) oder RBCS:GFP (pUbi-RBCS-GFP) eingebracht bzw. wurden sie mit ER-Tracker Red (2 μM) gefärbt. Die Aufnahmen erfolgten mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) bei folgenden Wellenlängen: $\lambda_{\text{Ex}}=543$ nm und $\lambda_{\text{Em}}=590-615$ nm für RFP und ER-Tracker Red (rot), $\lambda_{\text{Ex}}=488$ nm und $\lambda_{\text{Em}}=505-530$ nm für GFP (grün) und $\lambda_{\text{Ex}}=633$ nm und $\lambda_{\text{Em}}=660-700$ nm für Chlorophyll (grau). Messbalken: 5 μm.

3.2 Rekombinante HvPAP14

3.2.1 Proteinsynthese und -isolierung von HvPAP14

Um die Eigenschaften der rekombinanten HvPAP14 (mit und ohne HDEL-Sequenz) im Hinblick auf die Aktivierung durch Prozessierung und Enzymaktivität untersuchen zu können, wurde die Cysteinpeptidase zunächst als Fusionsprotein mit dem Maltose-bindenden Protein (MBP) mithilfe von *Escherichia coli* NEB Express-Zellen synthetisiert, die das entsprechende Plasmid pMAL-c5X-His-HvPAP14 bzw. pMAL-c5X-His-HvPAP14(Δ HDEL) besitzen. Dies geschah nach Induktion der Expression mit IPTG. Um die Proteine anschließend aus den *E. coli*-Zellen zu isolieren, wurden diese durch Ultraschall aufgeschlossen. Durch eine Zentrifugation konnten unlösliche Zellreste und unaufgeschlossene Zellen abgetrennt werden.

Die Fusionsproteine konnten anschließend aus dem erhaltenen Proteinrohextrakt mittels Affinitätschromatographie über eine Amylose-Säule gereinigt werden, wobei das MBP an die Amylose-Matrix band (Riggs, 2001). Andere im Überstand enthaltenen Proteine konnten durch mehrere Waschschrte entfernt werden. Eluiert wurden die MBP:HvPAP14-Fusionsproteine mithilfe von Maltose, das die Amylose der Matrix als Bindungspartner ersetzte. Um das MBP zu entfernen, wurden die Fusionsproteine mit Faktor Xa verdaut, wodurch HvPAP14 ohne zusätzliche Aminosäuren freigesetzt wurde. Da das MBP einen His-Tag besitzt, konnte es mithilfe einer Ni-NTA-Agarose entfernt werden. Dabei bindet der His-Tag des Proteins an die Ni²⁺-Ionen der Agarose.

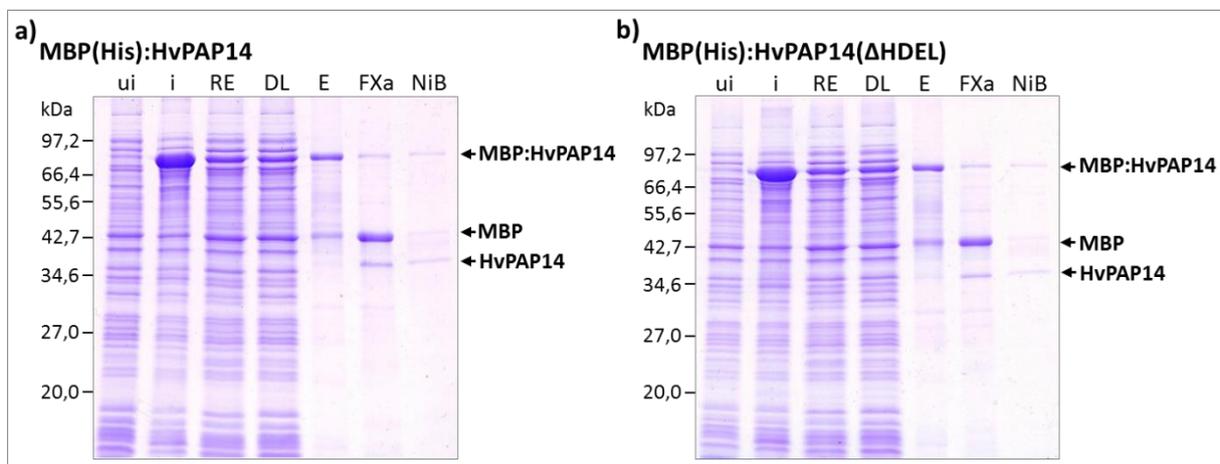


Abb. 3.3: Isolierung von rekombinanter HvPAP14 aus *E. coli*-Zellen. Die Aufreinigung der Fusionsproteine MBP(His):HvPAP14 (a) bzw. MBP(His):HvPAP14(Δ HDEL) (b) aus *E. coli*-Lysat erfolgte mithilfe einer Amylosesäule. Nach der Spaltung des Fusionsproteins mit Faktor Xa wurde das MBP(His) mithilfe von Ni-NTA-Agarose von HvPAP14 abgetrennt. Die Proteine konnten nach einer Auftrennung mittels SDS-PAGE und einer Färbung mit Coomassie analysiert werden. ui - uninduzierte *E. coli*-Zellen, i - mit IPTG induzierte *E. coli*-Zellen, RE - Proteinrohextrakt, DL - Durchlauf der Amylosesäule, E - Eluat der Amylosesäule, FXa - Proteine nach Verdau mit Faktor Xa, NiB - Proteine nach Reinigung mit Ni-NTA-Agarose.

Nach verschiedenen Schritten der Aufreinigung wurden die Fraktionen mithilfe von SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen analysiert (Abb. 3.3). Bereits nach der Induktion der Expression in den *E. coli*-Zellen war eine deutliche Anreicherung von Proteinen mit einer Molekülmasse von etwa 80 kDa zu erkennen. Dies entspricht etwa der errechneten Größe der Fusionsproteine: MBP(His):HvPAP14 mit 81,7 kDa und MBP(His):HvPAP14(Δ HDEL) mit 80,4 kDa.

In den Proteinrohextrakten waren anteilig jedoch deutlich weniger Fusionsproteine enthalten, was dafür spricht, dass ein großer Anteil dieses Proteins trotz Ultraschallbehandlung unlöslich ist bzw. an die abzentrifugierten Zellmembranen gebunden war. Nach der Inkubation der Rohextrakte mit der Amylosematrix war in den Durchläufen kaum eine Verringerung der Fusionsproteine festzustellen, dennoch bestanden die Eluate zum größten Anteil aus diesen. Des Weiteren trat zusätzlich eine Proteinbande mit 42 kDa nahe der erwarteten Größe des MBP (44,7 kDa) auf. Zudem waren andere unerwünschte Hintergrundbanden detektierbar, bei denen es sich ggf. um Abbauprodukte der MBP:HvPAP14-Fusionsproteine gehandelt haben könnte. Nach dem Verdau mit dem Faktor Xa trat besonders die MBP-Bande hervor. Außerdem waren schwächere Banden erkennbar, die der Molekülmasse der freien HvPAP14-Varianten entsprechen: HvPAP14 mit 37,1 kDa (Abb. 3.3a) und HvPAP14(Δ HDEL) mit 35,7 kDa (Abb. 3.3b). Die geringere Menge der HvPAP14 im Verhältnis zum MBP könnte darauf hindeuten, dass die Protease in der Lage ist, sich selbst abzubauen. Durch die weitere Aufreinigung mithilfe der Ni-NTA-Agarose stieg der Anteil an freier HvPAP14 deutlich, wohingegen die Menge an MBP stark reduziert wurde. Unverdautes Fusionsprotein war in der Probe nur noch in Spuren enthalten. Die Fraktion mit der so gereinigten HvPAP14 konnte anschließend für weitere Analysen wie beispielsweise Messungen der Enzymkinetik eingesetzt werden. Für Aktivierungs- und Aktivitätstests wurden zunächst die isolierten MBP:HvPAP14-Fusionsproteine verwendet.

3.2.2 Biochemische Charakterisierung von HvPAP14

3.2.2.1 pH-Abhängigkeit der aktivierenden Prozessierung und der Aktivität von HvPAP14

Da HvPAP14 wie andere Cysteinpeptidasen des Papain-Typs ein intramolekulares inhibitorisches Propeptid besitzt, das das aktive Zentrum sterisch abschirmen kann, ist die Abspaltung dieses Peptids für die Aktivierung der Peptidase nötig. Für die KDEL-Cysteinpeptidase CEP2 aus *Arabidopsis thaliana* ist bekannt, dass die Prozessierung zur Aktivierung bei niedrigem pH-Wert erfolgt (Hierl *et al.*, 2014). Ob dies ebenfalls auf HvPAP14 (mit oder ohne der C-terminalen HDEL-Sequenz) zutrifft, wurde mithilfe der Fusionsproteine mit dem Maltose-bindenden Protein untersucht. Diese Fusionsproteine wurden dazu an Amylose-Kügelchen gebunden, was die Stabilität der Cysteinpeptidase im Vergleich zur freien Form erhöht. Bereits für Papain konnte gezeigt werden, dass die immobilisierte Form deutlich

stabiler ist (Homaei, 2015). Da zu erwarten ist, dass die Peptidasen auch bei ungünstigen Bedingungen und mit vorhandenem inhibitorischen Propeptid eine gewisse Grundaktivität aufweisen, wird die freie Bewegung der Proteine durch die Bindung an eine Matrix eingeschränkt und der gegenseitige Abbau verringert. Erst unter Bedingungen, die eine Abspaltung des inhibitorischen Propeptids ermöglichen, liegen die aktiven Peptidasen frei vor. Um diese Bedingungen zu ermitteln, wurden die an den Amylose-Kügelchen gebundenen MBP:HvPAP14-Fusionsproteine in Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten im Bereich von 3,5 bis 8,5 inkubiert. Die Proteine im Überstand wurden mithilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot mit Antikörpern gegen HvPAP14 bzw. das MBP analysiert.

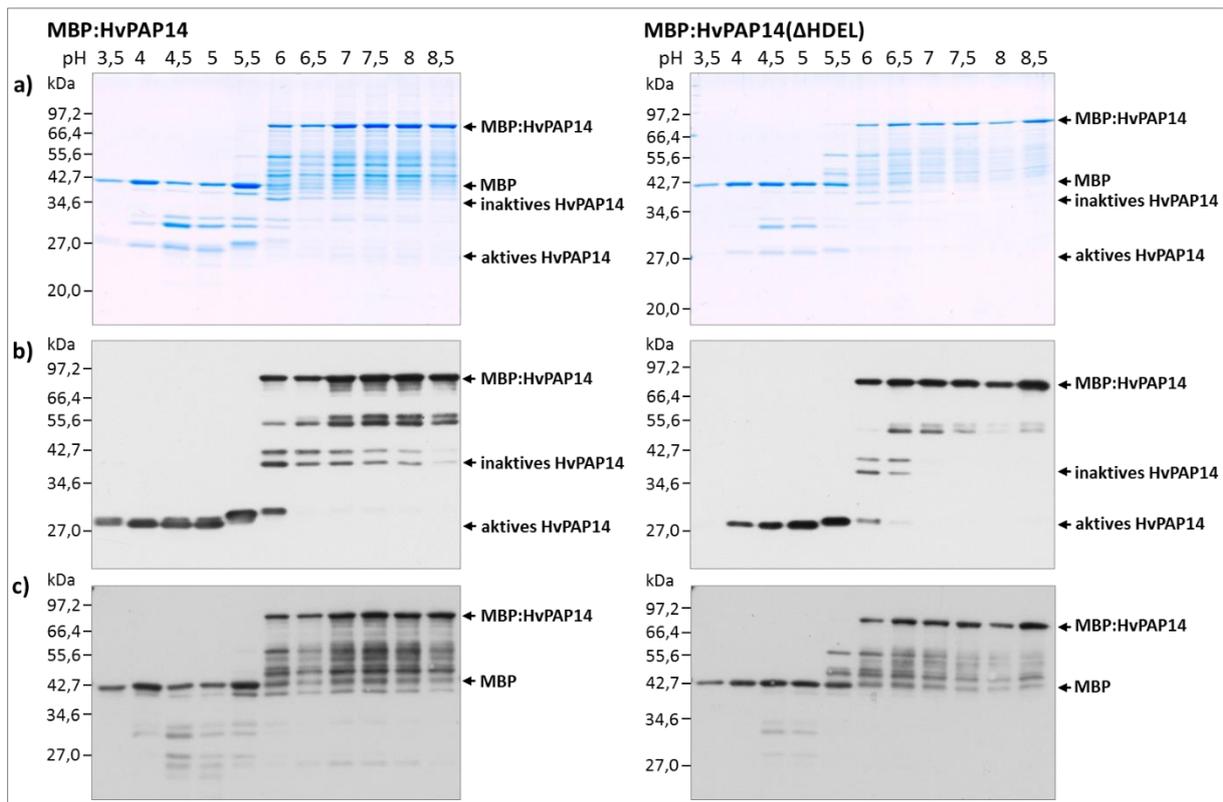


Abb. 3.4: Proteinanalyse zur pH-Abhängigkeit der Aktivierung von HvPAP14. Die MBP:HvPAP14-Fusionsproteine (mit oder ohne HDEL-Sequenz) wurden isoliert und an eine Amylosematrix in Puffern mit verschiedenen pH-Werten (3,5-8,5) gebunden. Der Überstand wurde mithilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine mit Coomassie angefärbt (a) bzw. für Westen Blots genutzt. Die Immundetektion erfolgte mit einem Antikörper gegen HvPAP14 (b) und mit einem Antikörper gegen MBP (c).

Das Coomassie gefärbte SDS-Acrylamidgel zeigte, dass die MBP:HvPAP14-Fusionsproteine bei einem pH-Wert unterhalb von 6 komplett gespalten wurden (Abb. 3.4a). Bei höheren pH-Werten waren eine dominante Bande der Größe der Fusionsproteine (81,7 kDa bzw. 80,4 kDa) und zusätzliche Banden von einigen unbestimmten Proteinfragmenten sichtbar, die bei niedrigen pH-Werten nicht zu finden waren. Durch die Immundetektion mit Antikörpern gegen HvPAP14 wurde deutlich, dass die aktive Peptidase-Form mit einem Molekulargewicht von ca. 28 kDa bei einem pH-Wert unter 6 auftrat (Abb. 3.4b). Da

im Vergleich zu den Proben, die bei pH 5 und niedriger inkubiert wurden, bei einem pH-Wert von 5,5 eine etwas höhere Proteinbande zu verzeichnen war, scheint die Spaltung stufenweise abzulaufen. Auffällig war, dass bei einem pH-Wert zwischen 4 und 5 bei dem Fusionsprotein, das noch in Besitz des C-Terminus mit der HDEL-Sequenz ist, eine Doppelbande im Bereich der aktiven Proteinform auftrat, die bei dem Protein ohne ER-Retentionssignal nicht zu sehen war. Dies deutet darauf hin, dass eine Abspaltung des C-Terminus mit der HDEL-Sequenz durch die aktive HvPAP14 selbst katalysiert wird.

Banden mit der Größe des freien MBP (ca. 42 kDa) traten besonders bei saurem pH auf (Abb. 3.4c). Im pH-Bereich um 4,5 waren außerdem diverse Proteinbanden mit einer Molekulargröße zwischen 21 kDa und 32 kDa zu erkennen, wobei die Bande des freien MBP abnahm. Diese Proteine konnten mittels Immundetektion als MBP-Fragmente identifiziert werden, was für eine Aktivität des HvPAP14 in diesem pH-Bereich spricht.

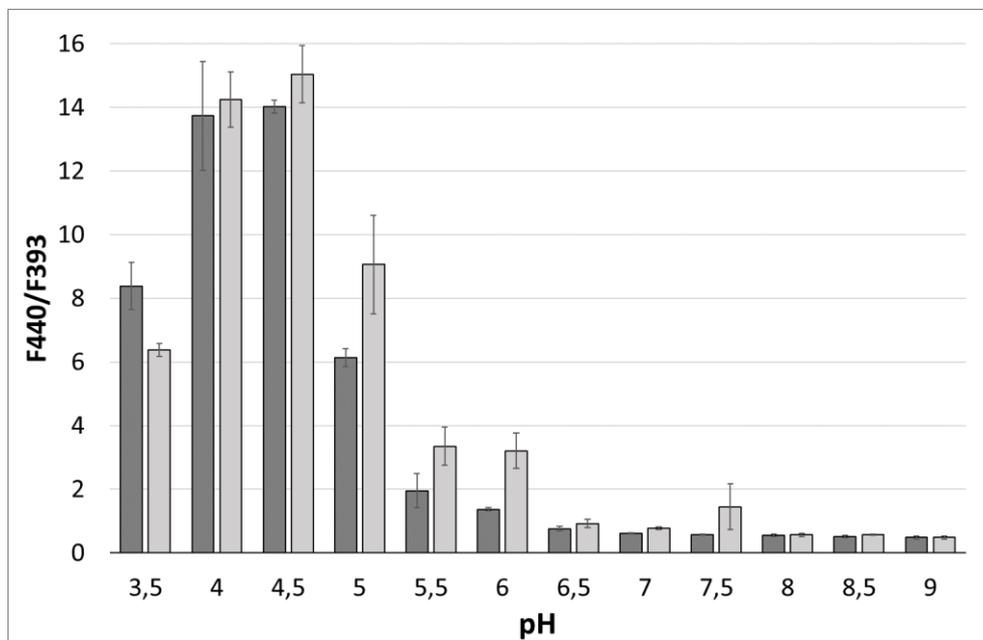


Abb. 3.5: pH-Abhängigkeit der aktivierenden Prozessierung von HvPAP14. Isolierte MBP:HvPAP14-Fusionsproteine wurde in Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten zusammen mit dem fluoreszierenden Substrat Z-FR-AMC inkubiert, dessen Umsatz ratiometrisch aus den Emissionen bei 440 nm (für AMC) und 393 nm (für Z-FR-AMC) bei einer Anregungswellenlänge von 345 nm bestimmt wurde. In dunkelgrau sind die Ergebnisse für HvPAP14 mit HDEL-Sequenz und in hellgrau die für HvPAP14 ohne HDEL-Sequenz dargestellt. Die gezeigten Standardabweichungen resultieren aus jeweils drei technischen Replikaten.

Um die Aktivierung der HvPAP14 bei niedrigem pH mit einer weiteren unabhängigen Methode zu überprüfen, wurde das fluoreszierende Substrat Z-FR-AMC eingesetzt, das von Papain-ähnlichen Cysteineptidasen umgesetzt werden kann und bereits häufig für Untersuchungen zu den Eigenschaften dieser Peptidasen verwendet wurde (Wiederanders, 2003). Z-FR-AMC besitzt eine schwache Fluoreszenz mit einem Maximum bei einer Wellenlänge von 393 nm. Werden die Aminosäuren (FR)

von dem Coumarin (AMC) abgespalten, fluoresziert letzteres deutlich stärker mit einem Fluoreszenzmaximum bei 440 nm (Abb. 3.11a). So ist eine ratiometrische Bestimmung des Substratumsatzes möglich. Für die Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Aktivierung von HvPAP14 wurden wiederum die MBP:HvPAP14-Fusionsproteine an Amylose-Kügelchen gebunden und in Puffern mit pH-Werten im Bereich von 3,5 bis 9 inkubiert, die nun zusätzlich Z-FR-AMC enthielten.

Die fotometrischen Messungen ergaben, dass ein Substratumsatz und somit die aktivierende Prozessierung von HvPAP14 bei niedrigem pH auftritt. Ein geringer Umsatz von Z-FR-AMC war bereits bei pH 6 zu verzeichnen, wobei deutliche Reaktionen im Bereich von pH 3,5 bis 5 mit einem maximalen Substratumsatz bei pH 4,5 stattfanden (Abb. 3.5). Dies bestätigt die Ergebnisse, die zuvor mithilfe der SDS-Acrylamidgele und Western Blot-Analysen erhalten wurden. Zwischen HvPAP14 mit bzw. ohne HDEL-Sequenz waren wieder keine großen Unterschiede zu erkennen.

Um zu testen, ob neben der Aktivierung von HvPAP14 auch die Aktivität der reifen Protease pH-abhängig ist, wurde die Spaltung des fluoreszierenden Substrats Z-FR-AMC erst nach vorheriger Aktivierung der Cysteinpeptidase gemessen. Für die aktivierende Prozessierung wurden die MBP:HvPAP14-Fusionsproteine in einem Puffer mit dem pH-Wert von 4,5 inkubiert. Anschließend wurde die aktive HvPAP14 in Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten im Bereich von 3,5 bis 9 gegeben und dann wurde jeweils das Substrat Z-FR-AMC zugesetzt.

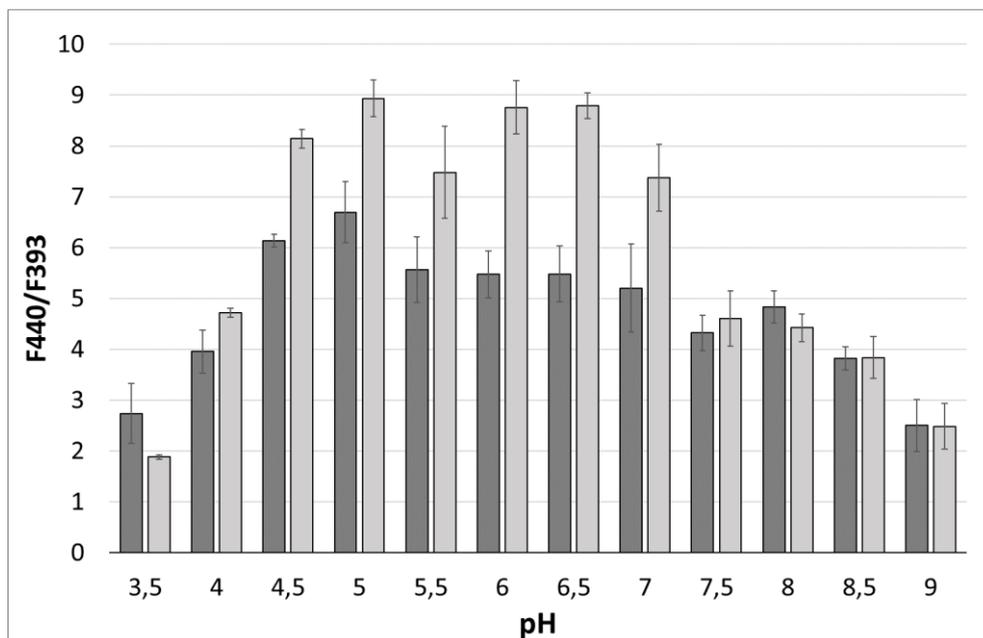


Abb. 3.6: pH-Abhängigkeit der Aktivität von HvPAP14. HvPAP14 mit HDEL-Sequenz (dunkelgrau) oder ohne HDEL-Sequenz (hellgrau) wurde bei pH 4,5 aktiviert und anschließend in Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten zusammen mit dem fluoreszierenden Substrat Z-FR-AMC inkubiert. Der Umsatz von Z-FR-AMC wurde ratiometrisch aus den Emissionen bei 440 nm (für AMC) und 393 nm (für Z-FR-AMC) bei einer Anregungswellenlänge von 345 nm bestimmt. Die gezeigten Standardabweichungen resultieren aus jeweils drei technischen Replikaten.

Die Fluoreszenzmessungen zeigten, dass HvPAP14 bei jedem pH im Bereich von 3,5 bis 9 in der Lage war, das Substrat umzusetzen (Abb. 3.6). Am größten war die Aktivität im Bereich von pH 4,5 bis 7. Dies traf für sowohl für HvPAP14 mit als auch ohne die C-terminale HDEL-Sequenz zu, wobei die Aktivität von HvPAP14 ohne ER-Retentionssignal im Vergleich zu der Peptidase mit diesem Signal im Bereich von pH 4,5 bis 7 noch höher war.

Aufgrund der sehr geringen Unterschiede im Verhalten der Proteine mit oder ohne C-terminale HDEL-Sequenz, wurde in den folgenden Versuchen HvPAP14 ohne HDEL-Sequenz untersucht.

3.2.2.2 Redoxabhängigkeit der aktivierenden Prozessierung und der Aktivität von HvPAP14

Da HvPAP14 zahlreiche Cysteinreste enthält, die potentiell Disulfidbrücken ausbilden können (Abb. 1.4; Richau *et al.*, 2012), kann es von enormer Bedeutung für die Enzymeigenschaften und -funktionen sein, ob die Peptidase in der reduzierten oder oxidierten Form vorliegt. Um zu untersuchen, ob der Redoxstatus des Proteins eine Rolle bei der Aktivierung spielt, wurde wie bei den Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit von HvPAP14 isoliertes MBP:HvPAP14-Fusionsprotein eingesetzt. Dies wurde in einem Puffer mit pH 4,5 inkubiert, der entweder 1 mM DTT oder kein Reduktionsmittel enthielt (Tab. 2.2). Mithilfe von Z-FR-AMC konnte der Substratumsatz als Maß der Enzymaktivität fluoreszenzspektrometrisch bestimmt werden. Als Kontrolle diente Z-FR-AMC, das in den gleichen Puffern ohne Zusatz der Peptidase inkubiert wurde.

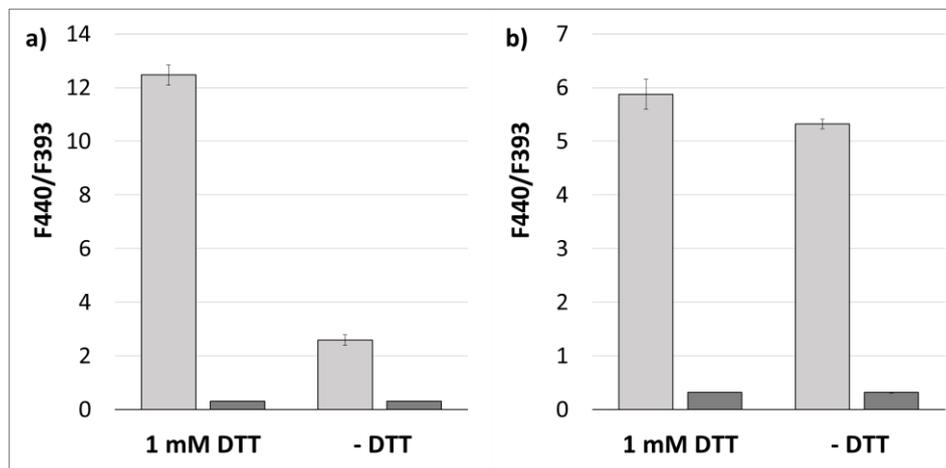


Abb. 3.7: Abhängigkeit der Aktivierung (a) und der Aktivität (b) von HvPAP14 vom Redoxstatus. In Puffern mit 1 mM bzw. ohne DTT wurde (a) isoliertes MBP:HvPAP14-Fusionsprotein oder (b) bereits aktivierte HvPAP14 zusammen mit dem fluoreszierenden Substrat Z-FR-AMC inkubiert (hellgrau). Als Kontrolle diente Z-FR-AMC in den jeweiligen Puffern, jedoch ohne Peptidase (dunkelgrau). Der Umsatz des Z-FR-AMC wurde ratiometrisch aus den Emissionen bei 440 nm (für AMC) und 393 nm (für Z-FR-AMC) bei einer Anregungswellenlänge von 345 nm bestimmt. Die gezeigten Standardabweichungen resultieren aus jeweils drei technischen Replikaten.

Mit dem Reduktionsmittel DTT war eine sehr viel stärkere Aktivierung der HvPAP14 zu verzeichnen als ohne (Abb. 3.7a), wobei bei beiden Ansätzen ein deutlicher Substratumsatz erkennbar war. Auf die Fluoreszenzverhältnisse des Substrates allein (ohne Peptidase) hatten die Redoxbedingungen keinen Einfluss.

Wurde nun die HvPAP14 zuerst aktiviert, indem sie in Puffer mit pH 4,5 und DTT (1 mM) inkubiert wurde, und anschließend zusammen mit dem fluoreszierenden Substrat in ein deutlich größeres Volumen Puffer mit 1 mM DTT bzw. ohne DTT gegeben, zeigte sich kaum ein Unterschied in der Aktivität der Peptidase (Abb. 3.7b). Somit ist die aktivierende Prozessierung von HvPAP14, nicht jedoch die Aktivität der reifen Protease redoxabhängig.

3.2.2.3 Einfluss von Ionen auf die aktivierende Prozessierung und die Aktivität von HvPAP14

Die Aktivierung und Aktivität eines Enzyms hängen meist auch stark von der Zusammensetzung seiner Umgebung ab. So kann beispielsweise Papain durch zweiwertige Metallionen gehemmt werden (Homaei, 2015). Daher wurde der jeweilige Einfluss von Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , EDTA (welches zweiwertige Ionen abfangen kann), NO_3^- , SO_4^{2-} und PO_4^{3-} auf HvPAP14 untersucht. So werden eventuell Rückschlüsse auf die natürlichen Bedingungen möglich, die die Aktivierung regulieren könnten und für eine optimale Enzymaktivität erforderlich sind.

Die aktivierende Prozessierung wurde wiederum mithilfe des gereinigten, an Amylose-Kügelchen gebundenen MBP:HvPAP14-Fusionsproteins untersucht. Dies wurde in Puffern mit einem pH von 4,5 sowie DTT (1 mM) und dem fluoreszierenden Substrat Z-FR-AMC inkubiert, die jeweils die bestimmten Ionen in einer Konzentration von 1 mM oder 4 mM EDTA enthielten. Bei den Fe^{2+} - oder Cu^{2+} -Ionen enthaltenden Puffern wurde kein DTT zugegeben, um eine Reduktion der Ionen zu vermeiden. Die Aktivierung wurde durch den Umsatz von Z-FR-AMC zu AMC ratiometrisch bestimmt (Abb. 3.8). Mg^{2+} und EDTA hatten scheinbar keinen Effekt auf die Aktivierung von HvPAP14. Auch der Einfluss durch Ca^{2+} war nur sehr gering und daher zu vernachlässigen. Eine erhöhte Aktivierung war nach dem Zusatz von NO_3^- , SO_4^{2-} und PO_4^{3-} zu verzeichnen. Die Aktivierung wurde durch Fe^{2+} -Ionen leicht gehemmt. Nach dem Zusatz von Zn^{2+} - und Cu^{2+} -Ionen fand nahezu keine Aktivierung von HvPAP14 statt.

Zur Untersuchung der Aktivität von HvPAP14 in Abhängigkeit von den umgebenden Ionen wurde zuvor aktivierte HvPAP14 zu den oben genannten Ionen-Puffern gegeben. Der Abbau des anschließend zugesetzten Z-FR-AMC konnte wie zuvor ratiometrisch ermittelt werden (Abb. 3.9). Die Ionen Ca^{2+} , Mg^{2+} , EDTA, NO_3^- , SO_4^{2-} und PO_4^{3-} besaßen scheinbar keinen oder einen nur sehr geringen Einfluss auf die Aktivität von HvPAP14. Gehemmt wurde die Enzymaktivität durch Zn^{2+} -, Fe^{2+} - und Cu^{2+} -Ionen. Nach dem Zusatz von Fe^{2+} sank die Aktivität von HvPAP14 auf etwa ein Drittel der Aktivität des

Kontrollansatzes. Durch Zn^{2+} wurde die Peptidase deutlich stärker gehemmt als durch die Fe^{2+} , jedoch war noch eine niedrige Aktivität vorhanden. Bei Anwesenheit von Cu^{2+} war keine Aktivität der Peptidase detektierbar.

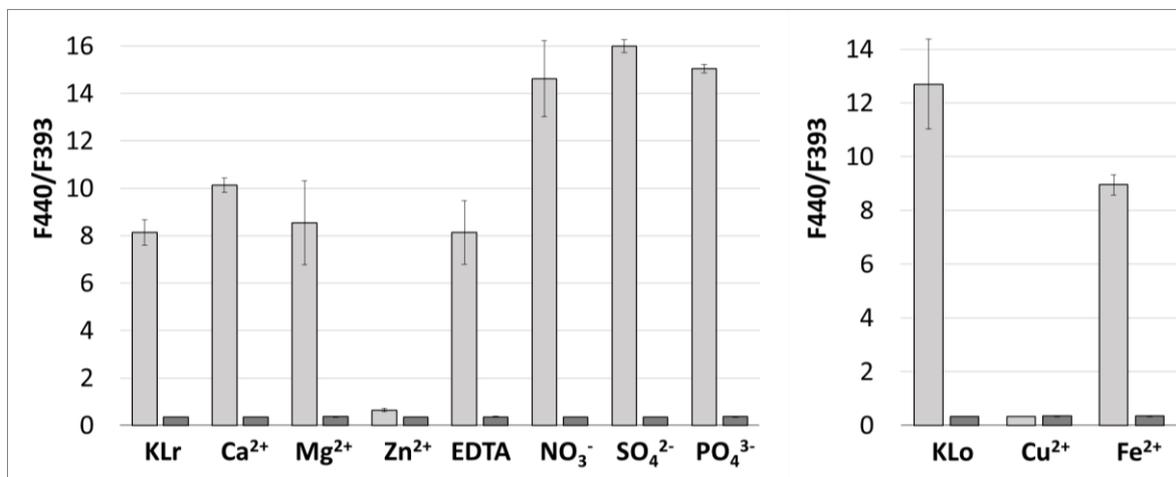


Abb. 3.8: Einfluss von Ionen auf die aktivierende Prozessierung von HvPAP14. Isoliertes MBP:HvPAP14-Fusionsprotein wurde in verschiedenen Ionenlösungen zusammen mit dem fluoreszierenden Substrat Z-FR-AMC inkubiert (hellgrau). Als Kontrolle diente Z-FR-AMC in den jeweiligen Lösungen, jedoch ohne Peptidase (dunkelgrau). Die Ionenlösungen basierten auf einer Kontrolllösung (0,2 M NaCl, 20 mM NaAcetat, pH 4,5) mit 1 mM DTT (KLr) bzw. ohne Reduktionsmittel (KLo, für Cu^{2+} - und Fe^{2+} -Ionen) und enthielten zudem 1 mM der angegebenen Ionen oder 4 mM EDTA. Der Umsatz von Z-FR-AMC wurde ratiometrisch aus den Emissionen bei 440 nm (für AMC) und 393 nm (für Z-FR-AMC) bei einer Anregungswellenlänge von 345 nm bestimmt. Die gezeigten Standardabweichungen resultieren aus jeweils drei technischen Replikaten.

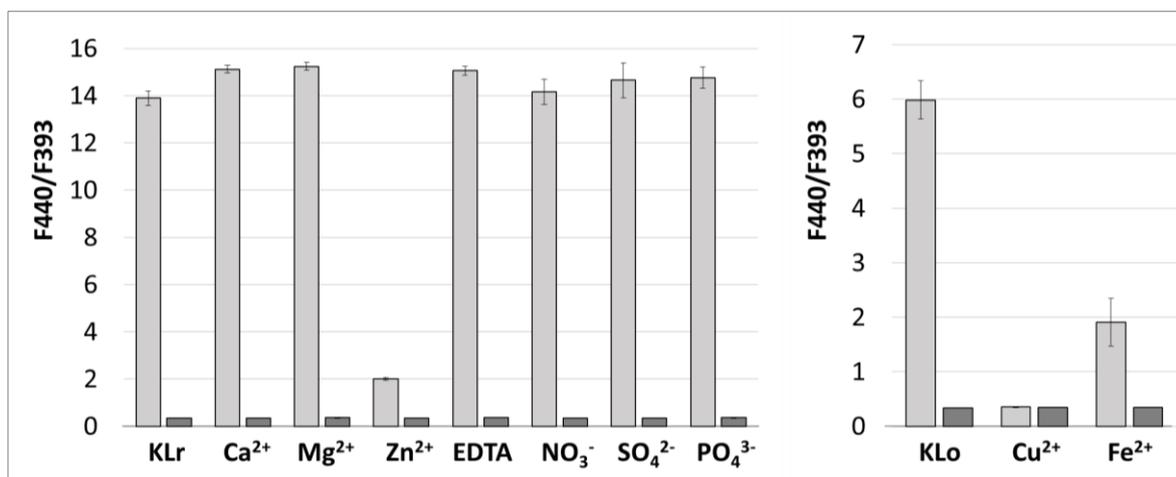


Abb. 3.9: Einfluss von Ionen auf die Aktivität von HvPAP14. In verschiedenen Ionenlösungen wurde bereits aktivierte HvPAP14 zusammen mit dem fluoreszierenden Substrat Z-FR-AMC inkubiert (hellgrau). Als Kontrolle diente Z-FR-AMC in den jeweiligen Lösungen, jedoch ohne Peptidase (dunkelgrau). Die Ionenlösungen bestanden aus einer Kontrolllösung (0,2 M NaCl, 20 mM NaAcetat, pH 4,5) mit 1 mM DTT (KLr) bzw. ohne Reduktionsmittel (KLo, für Cu^{2+} - und Fe^{2+} -Ionen), der 1 mM der angegebenen Ionen oder 4 mM EDTA zugesetzt wurden. Aus den Emissionen bei 440 nm (für AMC) und 393 nm (für Z-FR-AMC) bei einer Anregungswellenlänge von 345 nm wurde der Umsatz von Z-FR-AMC ratiometrisch bestimmt. Die gezeigten Standardabweichungen resultieren aus jeweils drei technischen Replikaten.

3.2.2.4 Einfluss von Natriumdodecylsulfat auf die Aktivierung und die Aktivität von HvPAP14

In Spinat konnten mehrere plastidäre Cysteinproteasen beschrieben werden, die eine Beständigkeit gegenüber Natriumdodecylsulfat (SDS) aufweisen (Sokolenko *et al.*, 1997). Um zu überprüfen, ob HvPAP14 ebenfalls beständig gegenüber SDS ist, wurden die aktivierende Prozessierung und die Aktivität des Enzyms wie in den vorher beschriebenen Versuchen mit Ionen untersucht. Dabei wurde 0,1% (w/v) SDS eingesetzt. Die ratiometrische Bestimmung des Z-FR-AMC-Umsatzes ergab, dass weder eine Aktivierung noch eine Aktivität gemessen werden konnte und die Fluoreszenzen denen der Kontrolle ohne HvPAP14 entsprachen (Abb. 3.10).

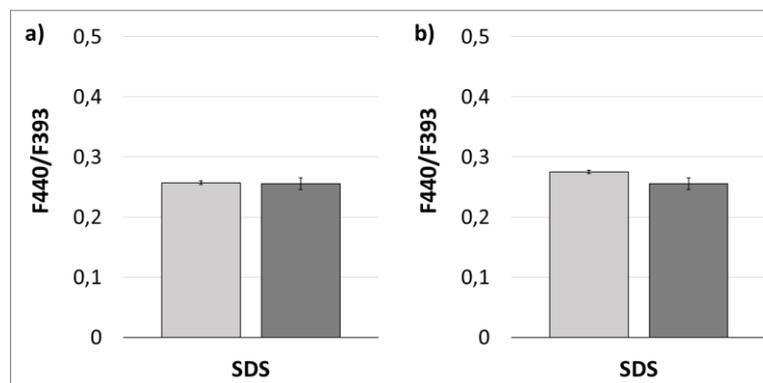


Abb. 3.10: Aktivierung (a) und Aktivität (b) von HvPAP14 unter dem Einfluss von SDS. In Puffern mit 0,1% (w/v) SDS wurde (a) isoliertes MBP:HvPAP14-Fusionsprotein oder (b) bereits aktivierte HvPAP14 zusammen mit dem fluoreszierenden Substrat Z-FR-AMC inkubiert (hellgrau). Als Kontrolle diente Z-FR-AMC in den jeweiligen Puffern, jedoch ohne Peptidase (dunkelgrau). Der Umsatz des Z-FR-AMC wurde ratiometrisch aus den Emissionen bei 440 nm (für AMC) und 393 nm (für Z-FR-AMC) bei einer Anregungswellenlänge von 345 nm bestimmt. Die gezeigten Standardabweichungen resultieren aus jeweils drei technischen Replikaten.

3.2.2.5 Enzymkinetik von HvPAP14

Zur Ermittlung der Michaelis-Konstante K_m von HvPAP14 für den Umsatz von Z-FR-AMC wurden Reaktionskinetiken ausgehend von verschiedenen Substratkonzentrationen betrachtet. So konnten die jeweiligen Anfangsgeschwindigkeiten v_0 der Reaktionen bestimmt werden, die mit zunehmender Substratkonzentration ansteigen (Abb. 3.11a, b). Dieser Anstieg führt bis zur maximalen Geschwindigkeit v_{max} , die theoretisch bei unendlich großer Substratkonzentration erreicht wird. Der K_m -Wert entspricht der Substratkonzentration bei der halbmaximalen Geschwindigkeit. Da durch eine direkt-lineare Auftragung nach Michaelis und Menten (Abb. 3.13c) nur eine Annäherung möglich ist und die Enzymkonstante daraus nur recht ungenau bestimmt werden kann, wurden unterschiedliche Linearisierungsverfahren verwendet. Aus diesen Auftragsvarianten, im Speziellen das Lineweaver-Burk-, Hanes-Woolf- oder Eadie-Hofstee-Diagramm (Abb. 3.13d-f), konnten v_{max} und K_m für diese Reaktion einfach ermittelt werden (Tab. 3.2) (Michaelis und Menten, 1913; Hanes, 1932; Lineweaver und Burk, 1934; Hofstee, 1952).

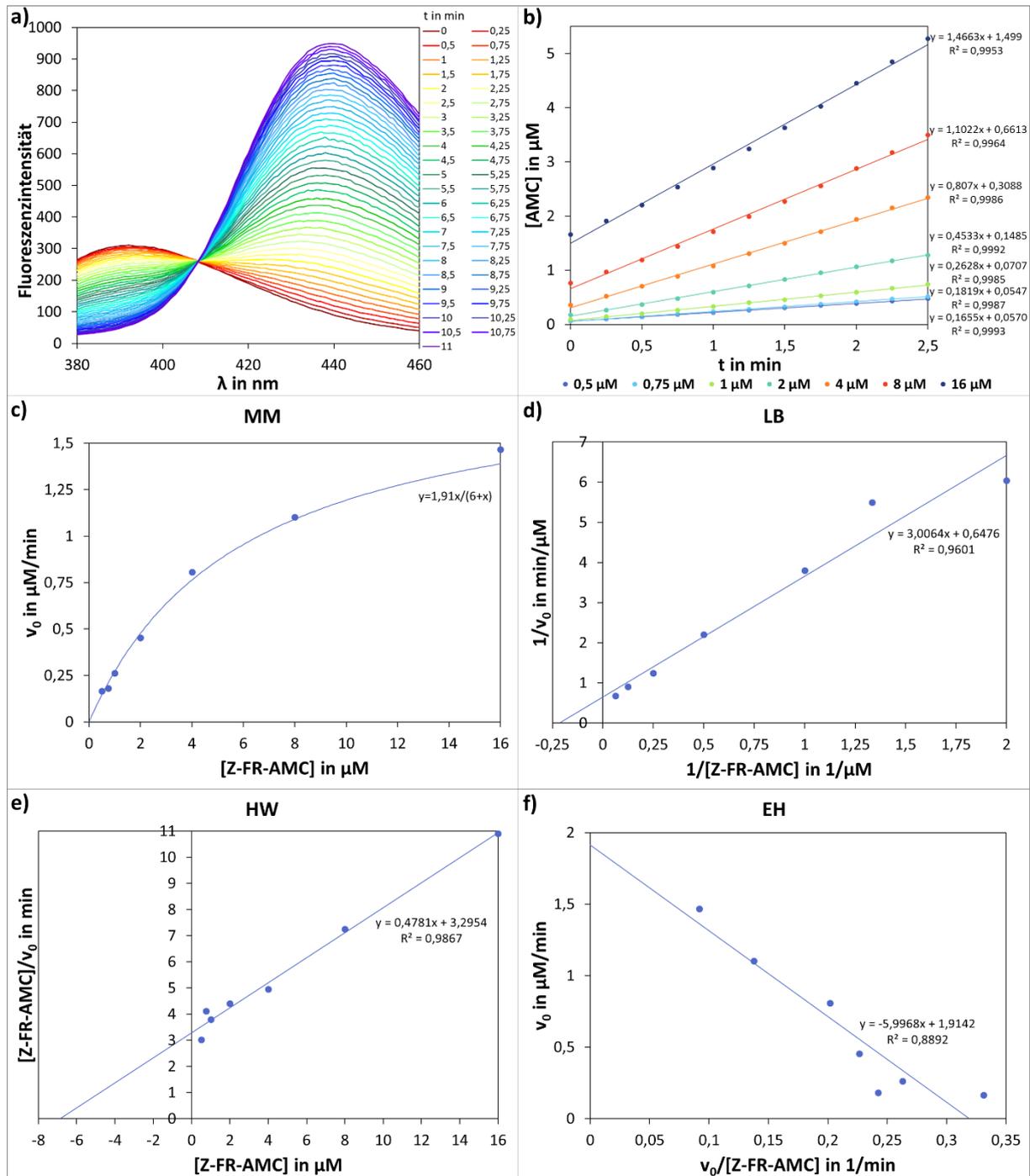


Abb. 3.11: Umsatz von Z-FR-AMC durch HvPAP14 und Auftragungen zur Ermittlung der Reaktionskonstanten. (a) Die Emissionsspektren zum zeitlichen Verlauf des Umsatzes von Z-FR-AMC durch HvPAP14 (exemplarisch) wurden in KLR-Lösung (0,2 M NaCl, 20 mM NaAcetat, 1 mM DTT, pH 4,5) bei einer Anregungswellenlänge von 345 nm gemessen. (b) Zur Ermittlung der Anfangsgeschwindigkeiten v_0 der Reaktionen wurden die Konzentrationen des Reaktionsproduktes (AMC), die zuvor mithilfe der Emission bei 440 nm bestimmt wurden, gegen die Reaktionsdauer (t) aufgetragen. Exemplarisch sind die Werte für die Reaktion von 3,5 μg HvPAP14/ml mit dem Substrat Z-FR-AMC, das in Anfangskonzentrationen von 0,5-16 μM vorlag, gezeigt. Der Anstieg der Regressionsgeraden entspricht v_0 . (c-d) Die Auftragungen zur Ermittlung der Michaelis-Konstanten K_m und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} erfolgten mithilfe der v_0 nach Michaelis-Menten (c), Lineweaver-Burk (d), Hanes-Woolf (e) und Eadie-Hofstee (f) (exemplarisch für 3,5 μg HvPAP14/ml).

Tab. 3.2: Ermittelte Konstanten der Reaktion von HvPAP14 mit Z-FR-AMC. Die Michaelis-Konstanten K_m und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} wurde aus den Auftragungen nach Lineweaver-Burk (LB), Hanes-Woolf (HW) und Eadie-Hofstee (EH) ermittelt.

	v_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}$)			K_m (μM)		
	LB	HW	EH	LB	HW	EH
Enzymmenge 1 3,5 μg Protein/ml	1,54	2,09	1,91	4,64	6,89	6,00
Enzymmenge 2 1 μg Protein/ml	0,79	0,57	0,58	7,85	4,97	5,06

Die maximale Anfangsgeschwindigkeit ist abhängig von der Enzymmenge und ist umso größer je mehr Enzym eingesetzt wird. Sie lag bei einer Enzymkonzentration von 3,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bei 1,5-2,1 $\mu\text{M}/\text{min}$ und bei einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bei 0,6-0,8 $\mu\text{M}/\text{min}$ (Tab. 3.2). Der K_m -Wert ist als Konstante unabhängig von der Enzymmenge und betrug trotz möglicher Abweichungen durch die jeweils unterschiedlichen Fehlerfortpflanzungen im Durchschnitt bei allen drei Linearisierungsverfahren ca. 6 μM . Das bedeutet, dass bei einer Substratkonzentration von 6 μM jeweils die Hälfte der HvPAP14 in einem Enzym-Substrat-Komplex gebunden war.

3.3 Analyse potentieller plastidärer Substrate von HvPAP14

Die subzelluläre Lokalisation von HvPAP14 an der Thylakoidmembran der Chloroplasten konnte sowohl durch immunologische Untersuchungen von Zell- und Plastidenfraktionen sowie durch Immungoldmarkierung mithilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (Hollmann, 2016) als auch durch HvPAP14:RFP-Fusionsproteine fluoreszenzmikroskopisch (3.1.2.2) nachgewiesen werden. Diese Lokalisation weist darauf hin, dass auch die Substrate der Cysteinpeptidase in den Plastiden zu finden sind. Daher wurden Stroma- und Thylakoidfraktionen aus intakten Gerstenchloroplasten isoliert und mit der rekombinanten HvPAP14 versetzt. Diese wurde zuvor bei einem pH-Wert von 4,5 unter reduzierenden Bedingungen aktiviert. Die durch HvPAP14 verdauten Proteine der Chloroplasten-subfraktionen wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Als Kontrollen dienten dabei zum einen eine Probe der jeweiligen Fraktion nach einer Kontrollbehandlung mit den gleichen Puffern ohne Zusatz von HvPAP14 und zum anderen die aktivierte HvPAP14 allein.

3.3.1 Stromale Proteine als HvPAP14-Substrate

Stromale Proteine, besonders Rubisco, gelten als wichtigste Stickstoffquelle bei der Nährstoffremobilisierung während der Seneszenz. Auch unter Stressbedingungen konnte ein Abbau der großen Untereinheit von Rubisco (RbcL) beobachtet werden. Zu diesen Bedingungen zählen Hypoxie

(Hildbrand *et al.*, 1994) oder Stress durch reaktive Sauerstoffspezies (Desimone *et al.*, 1996), wobei jeweils distinkte Abbauprodukte von RbcL auftraten. Die dafür verantwortlichen Peptidasen sind jedoch unbekannt. Daher wurde nun geprüft, ob Rubisco und andere stromale Proteine durch HvPAP14 verdaut werden können.

Der Zusatz des rekombinanten Enzyms zur Stromafraktion führte zum Auftreten einer neuen Proteinbande mit einer Größe von 50 kDa, die direkt unterhalb der markanten RbcL-Bande bei 53 kDa nachweisbar war (Abb. 3.12a). Diese Bande war mithilfe eines Western Blots immunologisch mit einem Antikörper gegen RbcL nachweisbar (Abb. 3.12b), was somit dieses Protein als Abbauprodukte von Rubisco identifizierte.

Nach dem Verdau der stromalen Proteine mit HvPAP14 traten außerdem neue schwache Banden bei etwa 185 kDa und bei etwa 30 kDa auf, wobei es sich ebenfalls Abbauprodukte stromaler Proteine handeln könnte. Diese Proteine konnten bisher nicht identifiziert werden. Die Kontrolle, die die aktive HvPAP14 mit einer Größe von 28 kDa enthielt (P), beinhaltete zudem das MBP mit etwa 42 kDa. Diese Banden fanden sich ebenfalls in dem Verdauansatz wieder.

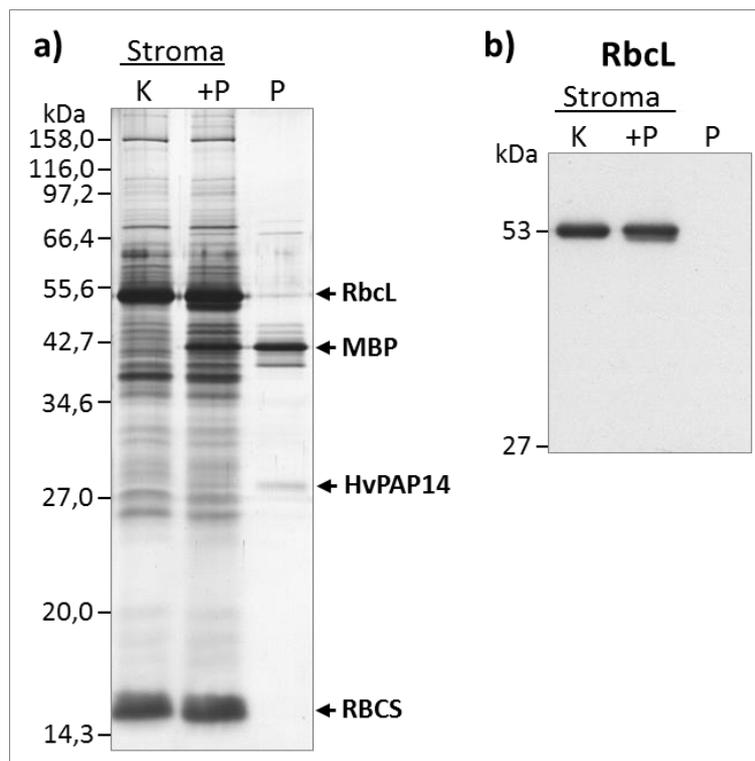


Abb. 3.12: Behandlung von stromalen Proteinen mit HvPAP14 (a) und der Abbau von RbcL durch HvPAP14 (b). Die stromalen Proteine (1,7 µg) wurden aus Chloroplasten von Gerstenprimärblättern isoliert und 30 min mit aktiver rekombinanter HvPAP14 inkubiert (+P). Als Kontrolle erfolgte die gleiche Behandlung, jedoch ohne Zugabe von HvPAP14 (K). Neben den behandelten Proben wurde auch die isolierte HvPAP14 (P) (mit MBP) durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. (a) Die Proteine wurden mithilfe einer Silberfärbung sichtbar gemacht. (b) Nach einem Western Blot wurde RbcL immunologisch nachgewiesen.

3.3.2 Thylakoidmembranproteine als HvPAP14-Substrate

Immunologische Analysen zeigten, dass HvPAP14 an der Thylakoidmembran lokalisiert ist (Hollmann, 2016). Daher kommen auch Thylakoidmembranproteine als Zielsubstrate für HvPAP14 in Frage. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden Thylakoide aus intakten aus Gerstenprimärblättern isoliert. Nachdem die Thylakoidmembranproteine mithilfe des Detergenz Dodecyl- β -D-maltosid solubilisiert wurden, konnten sie durch einen Saccharosedichtegradienten nach Jensen weiter aufgetrennt werden (Jensen *et al.*, 2000; Khrouchtchova *et al.*, 2005). Es erfolgte eine Auftrennung entsprechend der Proteinkomplexe LHCII bei niedriger Dichte, PSII bei mittlerer Dichte und PSI bei hoher Dichte. Diese Auftrennung konnte nach einer Analyse der aus dem Gradienten erhaltenen Fraktionen mittels SDS-PAGE beobachtet werden (Abb. 3.13).

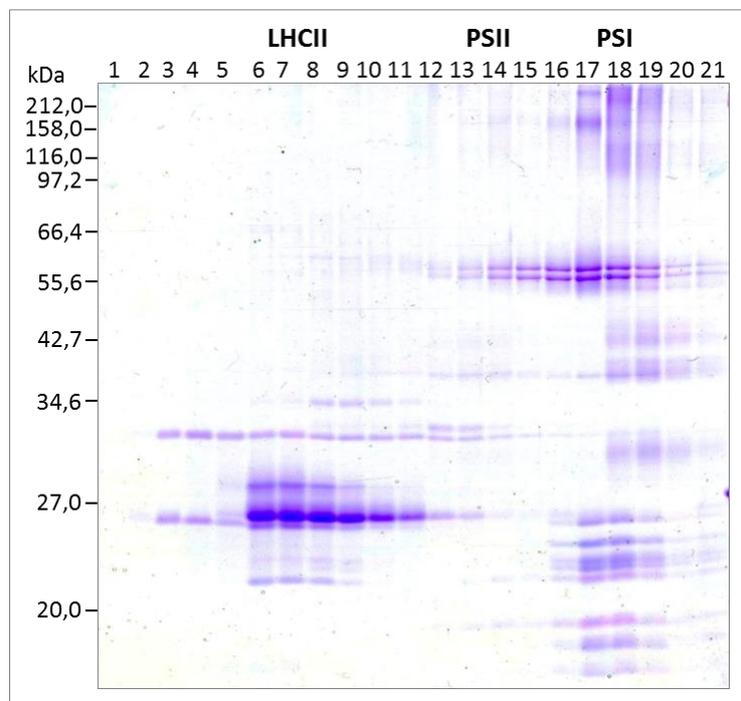


Abb. 3.13: Thylakoidmembranproteine in Fraktionen eines Saccharosedichtegradienten nach Jensen *et al.* (2000). Thylakoidmembranen wurden aus Gerstenchloroplasten isoliert. Die Membranproteine wurden mithilfe von Dodecyl- β -D-maltosid solubilisiert und über einen Saccharosegradienten aufgetrennt, wobei die Komplexe des LHCII, PSII und PSI in bestimmten Fraktionen angereichert waren. Die Gradientenfraktionen (1-21) wurden mithilfe einer SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert.

Zur Substratanalyse wurden jeweils drei aufeinanderfolgende Fraktionen vereinigt und mit der rekombinanten aktivierten HvPAP14 behandelt. Im Vergleich zur Kontrollbehandlung konnte nach der Zugabe von HvPAP14 das Verschwinden von Proteinbanden im Coomassie-gefärbten SDS-Acrylamidgel (Abb. 3.14, rote Pfeile) sowie das Erscheinen neuer zusätzlicher Proteinbanden (Abb. 3.14, grüne Pfeile) festgestellt werden. Auffällig war hierbei, dass besonders Proteine im Bereich des LHCII-Komplexes abgebaut werden konnten. Diese besaßen Molekulargewichte im Bereich von etwa 25 kDa bis 30 kDa.

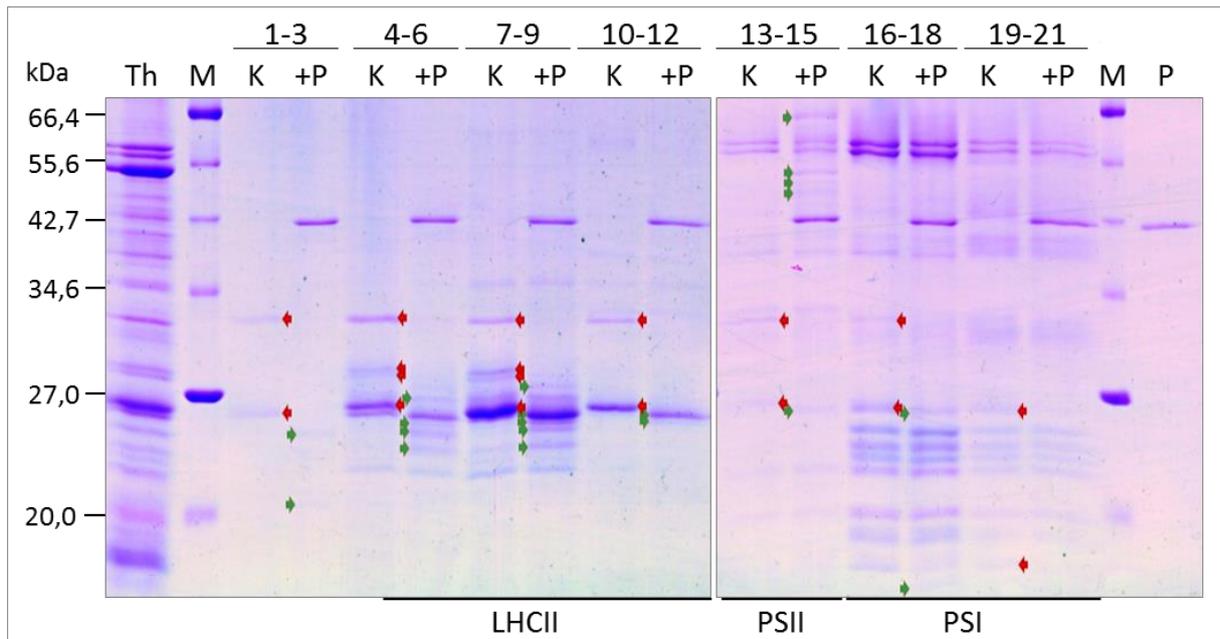


Abb. 3.14: Behandlung von Thylakoidmembranproteinen mit HvPAP14. Je drei der Saccharosegradientfraktionen (1-21) aus Abbildung 3.13 wurden vereinigt und 30 min mit aktiver rekombinanter HvPAP14 behandelt (+P) bzw. erhielten eine Kontrollbehandlung (K) ohne HvPAP14-Zugabe. Als weitere Kontrollen dienten ein Thylakoidmembranproteingestamtextrakt (Th) und isolierte HvPAP14 (P). Die Proteine wurden mithilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Nach der Behandlung mit HvPAP14 verschwindende Banden sind mit roten Pfeilen und neue Banden sind mit grünen Pfeilen gekennzeichnet. M - Proteinmarker.

Die Größe der Proteine, ihre Häufigkeit im Verhältnis zu den restlichen Thylakoidproteinen und das Vorkommen in Fraktionen, die bestimmten Komplexen zuzuordnen sind, lieferten erste Hinweise auf die Identität der betroffenen Proteine. Die Identität der potentiellen Kandidaten wurde mithilfe von Immundetektionen mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern verifiziert. Bei dem Abbau der Proteine konnten neben der Verringerung der jeweiligen Hauptbande in einigen Fällen auch Abbauprodukte mit definierten Größen detektiert werden.

Eine durch HvPAP14-abbaubare Proteinbande mit einem molekularen Gewicht von etwa 30 kDa trat in Fraktionen mit dem LHCII und dem PSII auf. Diese konnte dem luminalen Protein PSBO (auch OEC33), einer Untereinheit des Wasserspaltenden Apparates, zugeordnet werden. Nach dem Verdau war die 30 kDa-Bande deutlich schwächer und eine zusätzliche Bande war bei etwa 22 kDa sichtbar (Abb. 3.15, PSBO).

In den LHCII-Fraktionen waren im Molekulargewichtsbereich von 25-26 kDa besonders starke Proteinbanden erkennbar. Sie waren den Apoproteinen des LHCII-Trimers zuzuordnen, einem Komplex aus LHCBI, -2 und -3. Die stärkste Bande bei 26 kDa war nach der Behandlung mit HvPAP14 nicht mehr detektierbar, wohingegen mehrere Proteinfragmente mit einer Größe von 23-25 kDa auftraten (Abb. 3.15, LHCII-Trimer). Diese waren nicht nur nach der Immundetektion mit einem Antikörper gegen die Proteine des LHCII-Trimers erkennbar, sondern bereits in dem Coomassie-gefärbten SDS-

Acrylamidgel. Die Analyse mittels eines LHCB1-spezifischen Antikörpers zeigte eine Doppelbande bei ca. 26 kDa in der Proteinfraction ohne HvPAP14. Nach dem Verdau mit HvPAP14 war hingegen eine Doppelbande bei ca. 25 kDa detektierbar (Abb. 3.15, LHCB1). Da sich diese Fragmente jedoch nur mit einem Teil der Abbauprodukte deckten, die mithilfe des Antikörpers gegen die Proteine des LHCII-Trimers nachgewiesen wurden, konnten offenbar ebenfalls LHCB2 bzw. LHCB3 durch HvPAP14 geschnitten werden.

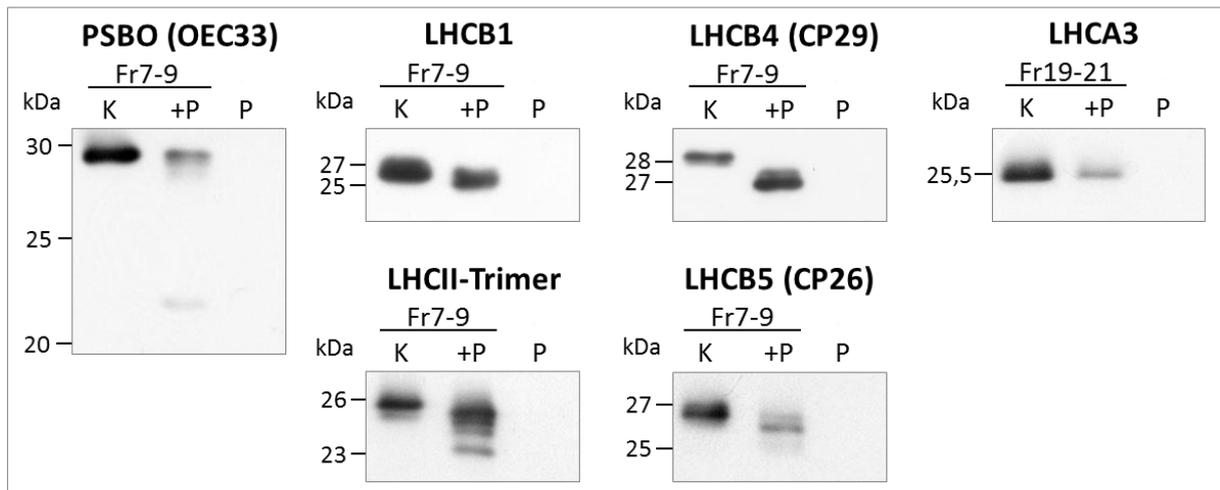


Abb. 3.15: Analyse der durch HvPAP14 abbaubaren Thylakoidmembranproteine durch Immundetektion mit spezifischen Antikörpern. Zur Identifizierung der HvPAP14-Substrate wurde der nach der Coomassie-Färbung sichtbare Proteinabbau aus Abbildung 3.14 analysiert. Dazu wurden die mit HvPAP14 behandelten (+P) bzw. als Kontrolle ohne Peptidase behandelten (K) betroffenen Fraktionen (Fr) sowie die isolierte HvPAP14 (P) über eine SDS-PAGE aufgetrennt und nach einem Western Blot immunologisch mithilfe von Antikörpern gegen PSBO, LHCB1, LHCII-Trimer (LHCB1/2/3), LHCB4, LHCB5 bzw. LHCA3 untersucht. Die Kontrolle der Beladung ist in Abb. 3.14 zu sehen.

Zwei weitere Banden, die im Bereich der LHCII-Fractionen zu finden waren und nach der Zugabe von rekombinanter HvPAP14 nicht mehr nachweisbar waren, besaßen eine Größe von 27 kDa und 28 kDa. Das Protein der 28 kDa-Bande konnte immunologisch als LHCB4 (CP29) identifiziert werden. Nach dem Verdau waren LHCB4-Abbauprodukte als eine Doppelbande bei etwa 27 kDa erkennbar (Abb. 3.15, LHCB4). Das zweite Protein mit einer Größe von etwa 27 kDa wurde mithilfe eines spezifischen Antikörpers als LHCB5 (CP26) identifiziert. Die Behandlung mit HvPAP14 führte zum Abbau des LHCB5, wobei Fragmente entstanden, die sich als zwei deutlich schwächere Doppelbanden bei etwa 26 kDa und 25 kDa zeigten (Abb. 3.15, LHCB5).

Im Bereich der PSI-Fractionen war besonders die Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 25,5 kDa auffällig, die durch HvPAP14 abgebaut werden konnte. Das Protein wurde als LHCA3, eine Untereinheit des LHCI, identifiziert. Die Analyse mithilfe eines spezifischen Antikörpers gegen LHCA3 zeigte keine neu auftretenden Proteinfractionen, jedoch eine deutliche Abnahme der Proteinmenge (Abb. 3.15, LHCA3).

3.4 Überexpression von *HvPAP14* in Gerstenprotoplasten

Die *in vitro*-Analyse mit rekombinanter *HvPAP14* lieferte Hinweise auf potentielle Substrate von *HvPAP14*. Um zu überprüfen, ob der Abbau dieser Substrate auch *in vivo* stattfinden kann, wurden Gerstenprotoplasten aus Primärblättern isoliert und mit dem Plasmid pUbi-*HvPAP14* transient transformiert. So konnte eine Überexpression von *HvPAP14* unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors erfolgen. Die Anreicherung des *HvPAP14*-Proteins wurde zunächst in Abhängigkeit von der Inkubationszeit analysiert. Dazu wurden die Protoplasten zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und ihre Proteine isoliert. Diese wurden anschließend durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und durch eine Western Blot-Analyse mithilfe eines Antikörpers gegen *HvPAP14* untersucht.

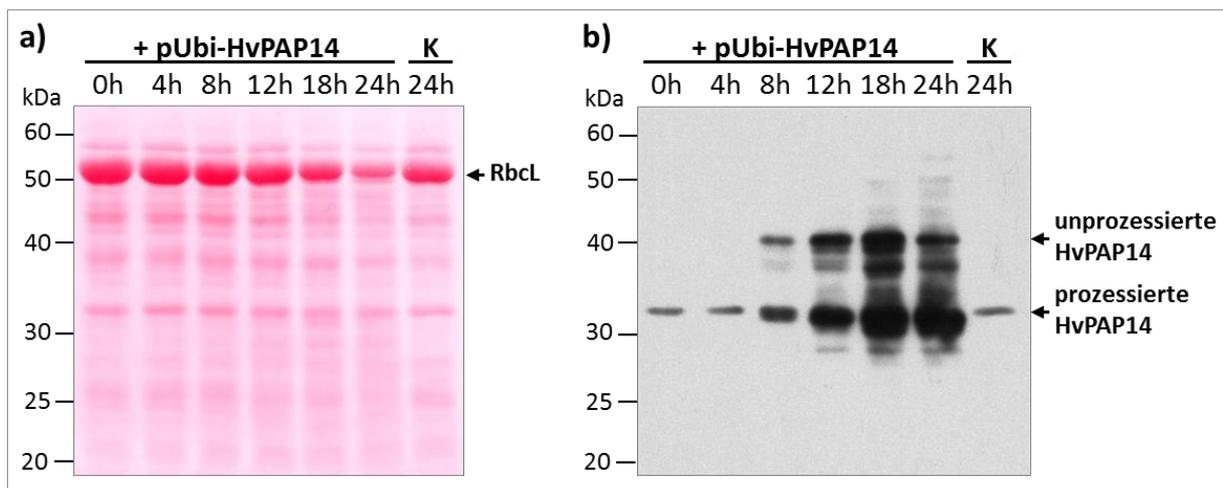


Abb. 3.16: Proteinanalyse der *HvPAP14*-überexprimierenden Protoplasten. Protoplasten aus Gerstenprimärblättern wurden mit pUbi-*HvPAP14* PEG-vermittelt transient transformiert und nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (0-24 h) beprobt. Als Kontrolle (K) dienen Protoplasten nach gleicher Behandlung, jedoch ohne Zugabe des pUbi-*HvPAP14*-Plamids. Die Proteine der Protoplasten wurden isoliert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach einem Western Blot wurden die Proteine mit Ponceau angefärbt (a) und es folgte eine Immundetektion mit einem Antikörper gegen *HvPAP14* (b).

Die Ponceau-Färbung der Proteine auf der Western Blot-Membran zeigte mit ansteigender Inkubationszeit eine Veränderung der Proteinbanden in den Protoplastenextrakten (Abb. 3.16a). Besonders fiel auf, dass nach 18 h und stärker noch nach 24 h Inkubation die markante Bande der großen Untereinheit von Rubisco (RbcL, 53 kDa) abnahm. Die Immundetektion von *HvPAP14* zeigte einen ersten Anstieg der *HvPAP14*-Menge bereits 8 h nach der Transformation (Abb. 3.16b). Sie stieg weiter bis 18 h nach der Transformation stark an und wurde nach weiteren 6 h Inkubation gehalten. Durch die starke Anreicherung waren die zahlreichen Proteinformen der *HvPAP14* erkennbar, deren Molekulargewichte zwischen 55 kDa und 26 kDa lagen. In den größten Mengen lagen die 32 kDa- und 40 kDa-Form vor. Die *HvPAP14*-Form mit 32 kDa entspricht wahrscheinlich der C-terminal prozessierten inaktiven *HvPAP14* (berechnet 33 kDa). Sie war sowohl bereits direkt nach der Transformation als auch in den

Protoplasten nach der Kontrollbehandlung in geringerer Menge detektierbar. Die 40 kDa-Form entspricht höchst wahrscheinlich der inaktiven HvPAP14-Form samt inhibitorischem Propeptid und C-Terminus (berechnet: 37 kDa).

Aufgrund der beobachteten Akkumulation der HvPAP14 in den transient transformierten Gerstenzellen, wurde für die weiteren Untersuchungen eine Inkubationszeit von 20 h ausgewählt. Die Protoplasten wurden nach diesen 20 h zunächst mikroskopisch analysiert (Abb. 3.17a). Dies zeigte, dass die Gerstenzellen nach der Behandlung noch größtenteils intakt waren und somit tatsächlich eine *in vivo*-Situation vorlag. Anschließend wurde die Proteinmenge von HvPAP14 und von den potentiellen HvPAP14-Substraten bzw. von deren Abbauprodukten analysiert.

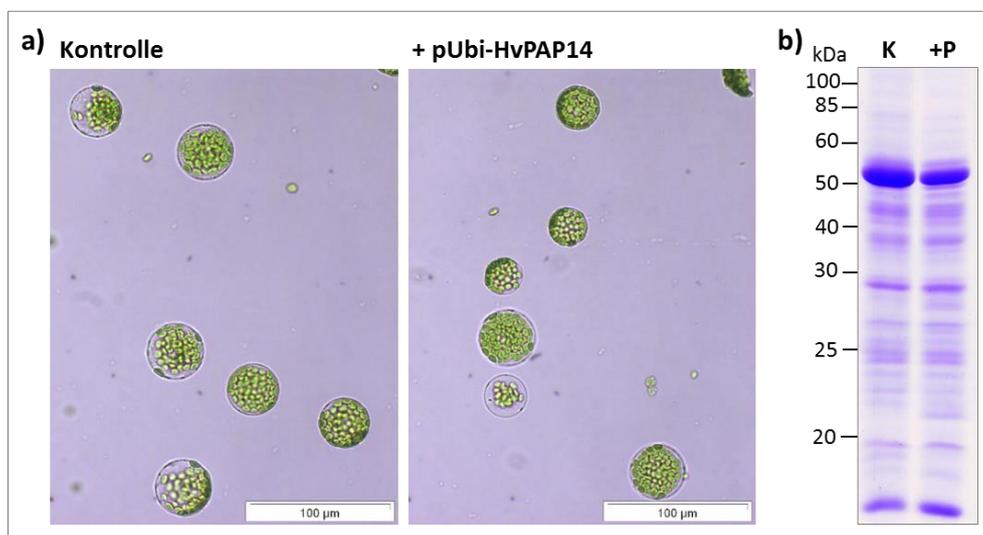


Abb. 3.17: *HvPAP14*-überexprimierende Protoplasten 20 h nach der Transformation. Protoplasten aus Gerstenprimärblättern wurden mit pUbi-HvPAP14 transient transformiert (+P) bzw. zur Kontrolle (K) ohne Plasmid der gleichen Behandlung unterzogen. Nach einer Inkubation von 20 h wurden die Protoplasten mikroskopiert (a) und für eine Proteinanalyse (b) beprobt. Dazu wurden die Proteine der Protoplasten isoliert, über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt.

Die immunologische Analyse der HvPAP14 zeigte auch nach 20 h Inkubation der Protoplasten, wie zuvor nach 18 h bzw. 24 h (Abb. 3.16b), eine starke Anreicherung des Proteins in den *HvPAP14*-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 3.18, HvPAP14). Besonders hervor traten hier erneut die Banden bei etwa 32 kDa und 40 kDa. Somit kann von einem Effekt auf die Proteinzusammensetzung ausgegangen werden, der direkt oder indirekt mit der Menge der HvPAP14 zusammenhängt.

Bereits nach der Auftrennung der Protoplastenproteine in einem SDS-Acrylamidgel und anschließender Coomassie-Färbung war in den mit pUbi-HvPAP14 transformierten Zellen im Vergleich zu den Zellen der Kontrollbehandlung eine Verringerung der RbcL-Menge sowie das Auftreten einer neuen Bande

direkt unterhalb von RbcL (Abb. 3.17b) zu erkennen. Die Immundetektion mit einem Antikörper gegen RbcL zeigte ebenfalls, dass die große Untereinheit von Rubisco in geringerer Menge in den Zellen mit erhöhter HvPAP14-Menge vorliegt (Abb. 3.18, RbcL). Zudem sind deutlich mehr Abbauprodukte vorhanden, die in den Kontrollzellen nur schwach oder gar nicht detektierbar sind. Dies betrifft besonders die Bande direkt unterhalb der RbcL-Hauptbande (bei 53 kDa) mit etwa 50 kDa, aber auch Proteinfragmente mit einer Größe von etwa 47 kDa, 44 kDa, 41 kDa, 29 kDa und 28 kDa.

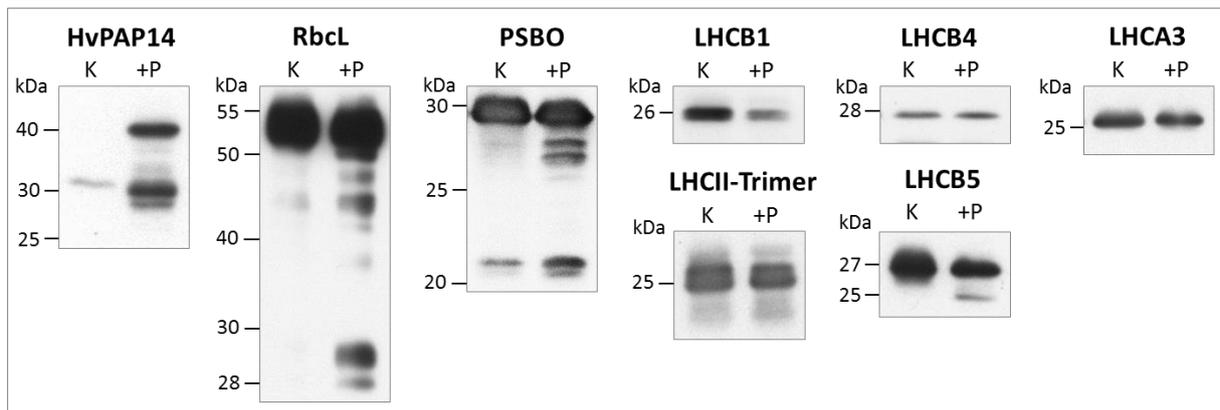


Abb. 3.18: Analyse der HvPAP14 und ihrer potentiellen plastidären Substrate in *HvPAP14*-überexprimierenden Protoplasten. Gerstenprotoplasten aus Primärblättern wurden transient mit pUbi-HvPAP14 transformiert (+P) bzw. zur Kontrolle (K) ohne Plasmid der gleichen Behandlung unterzogen. Nach einer Inkubation von 20 h wurden die Proteine der Protoplasten isoliert und über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Nach einem Western Blot erfolgte die Immundetektion von HvPAP14 und potentieller HvPAP14-Substrate mit spezifischen Antikörpern gegen HvPAP14, RbcL, PSBO, LHCB1, LHCBII-Trimer (LHCB1/2/3), LHCB4, LHCB5 bzw. LHCA3. Die Kontrolle der Beladung ist in Abb. 3.17b zu sehen.

Im Fall von PSBO konnte in den *HvPAP14*-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen kein signifikanter Unterschied in der Stärke der Hauptbande bei 30 kDa festgestellt werden, jedoch traten verstärkt Abbauprodukte von PSBO auf (Abb. 3.18, PSBO). Neben Fragmenten bei etwa 27 kDa und 26 kDa war auch eine Doppelbande bei etwa 21 kDa sichtbar.

Mit einem Antikörper gegen die Apoproteine des LHCBII-Trimers (LHCB1, LHCB2 und LHCB3) war kein signifikanter Unterschied in den Signalen zwischen der Kontrolle und den mit pUbi-HvPAP14 transformierten Zellen erkennbar (Abb. 3.18, LHCBII-Trimer). Die Analyse mithilfe des spezifischen Antikörpers gegen das 26 kDa große LHCB1 zeigte jedoch eine deutliche Abnahme des Proteins in den Zellen mit erhöhter HvPAP14-Menge (Abb. 3.18, LHCB1).

Die *HvPAP14*-überexprimierenden Protoplasten wiesen außerdem eine deutlich geringere Menge des Proteins LHCB5 (CP26, ca. 27 kDa) auf. Zusätzlich waren Abbauprodukte mit einer Größe von etwa 25 kDa detektierbar (Abb. 3.18, LHCB5). Die *in vitro*-Analysen zeigten, dass auch LHCB4 (CP29) als potentielles Substrat von HvPAP14 in Frage kam, da es durch hinzugegebene, aktivierte HvPAP14

verdaubar war (Abb. 3.15). In der *in vivo*-Situation zeigte sich dieser Abbau jedoch nicht, da kein Unterschied zwischen den LHCB4-Mengen der Kontrollzellen und denen der Protoplasten, in denen HvPAP14 akkumulierte, erkennbar war (Abb. 3.18, LHCB4).

Neben den LHC-Proteinen des PSII kam auch mindestens ein Protein des LHCI als potentielles Substrat von HvPAP14 in Frage: das LHCA3. Nach der Immundetektion von LHCA3 zeigte sich in den *HvPAP14*-überexprimierenden Protoplasten im Unterschied zu den Kontrollzellen eine geringe Abnahme der Hauptbande bei 25,5 kDa. Zudem trat in den Zellen mit erhöhter HvPAP14-Menge direkt unterhalb dieser Hauptbande eine zusätzliche Bande bei etwa 25 kDa auf (Abb. 3.18, LHCA3).

3.5 HvPAP14 in Gerstenpflanzen

Bei der Analyse der Substrate von HvPAP14 stellte sich heraus, dass die Cysteinpeptidase neben RbcL vor allem auch Proteine der LHC und des PSII abbauen kann. Um weitere Hinweise auf die Funktion und Regulation von HvPAP14 zu erhalten, wurden die HvPAP14-Mengen von Primärblättern von Gerstenpflanzen untersucht, die eine LHC-Defizienz besitzen bzw. verschiedenen Lichtbedingungen ausgesetzt waren.

3.5.1 HvPAP14 in Chlorina-Mutanten

Es gibt Gerstenmutanten mit verringerten Mengen bestimmter LHC-Proteine, die sogenannten Chlorina-Mutanten. Drei dieser Mutanten sollten näher auf die Mengen der HvPAP14-Formen hin untersucht werden: *clo-a*¹¹⁷, *clo-a*¹²⁶ und *clo-a*¹³⁴. Diese Mutanten zeichnen sich durch einen stark verringerten bis hin zu nicht mehr detektierbaren Gehalt an LHCA1, LHCA4, LHCB1 und LHCB3 aus (Bossmann *et al.*, 1997). Da besonders LHCB1 als Substrat für HvPAP14 in Frage kommt, wäre ein möglicher Einfluss auf HvPAP14 durch das Fehlen dieses Substrates interessant. Analysiert wurden dazu Primärblätter 10 Tage alter Pflanzen, die unter Dauerlicht angezogen wurden.

Nach der Auftrennung des Proteingestamtexttrakts mittels SDS-PAGE und folgendem Western Blot zeigte die Immundetektion mit Antikörpern gegen HvPAP14 deutliche Unterschiede in Bezug auf die Proteinformen zwischen den Chlorina-Mutanten und Kontrollpflanzen der Gerstensorte Golden Promise (Abb. 3.19a). Im Vergleich zu den Golden Promise-Pflanzen war in den Chlorina-Mutanten eine 61 kDa große Form von HvPAP14 detektierbar. Die Golden Promise-Pflanzen enthielt hingegen eine etwas größere Menge der unprozessierten inaktiven 40 kDa-Form und der prozessierten inaktiven 32 kDa-Form des HvPAP14. Das 40 kDa-Protein war bei der *clo-a*¹²⁶-Mutante etwas stärker vertreten als bei den *clo-a*¹¹⁷- und *clo-a*¹³⁴-Mutanten. Zudem war die potentiell aktive HvPAP14-Form bei etwa 26 kDa nur bei den Golden Promise-Pflanzen nachweisbar.

Eine Analyse der *HvPAP14*-Expression zeigte, dass das *HvPAP14*-Transkript in allen Proben in sehr geringen Mengen vorlag und nur wenig in der Menge variierte (Abb. 3.19b). Bei den Golden Promise-Pflanzen war die *HvPAP14*-Transkriptmenge schwach und bei der *clo-a*¹²⁶-Mutante etwas stärker erhöht im Vergleich zu den *clo-a*¹¹⁷- und *clo-a*¹³⁴-Mutanten. Durch die geringen Transkriptmengen schien kein erhöhter Bedarf an *HvPAP14* in den Chlorina-Mutanten vorzuliegen, wie es beispielsweise während der Seneszenz der Fall wäre (Hollmann *et al.*, 2014).

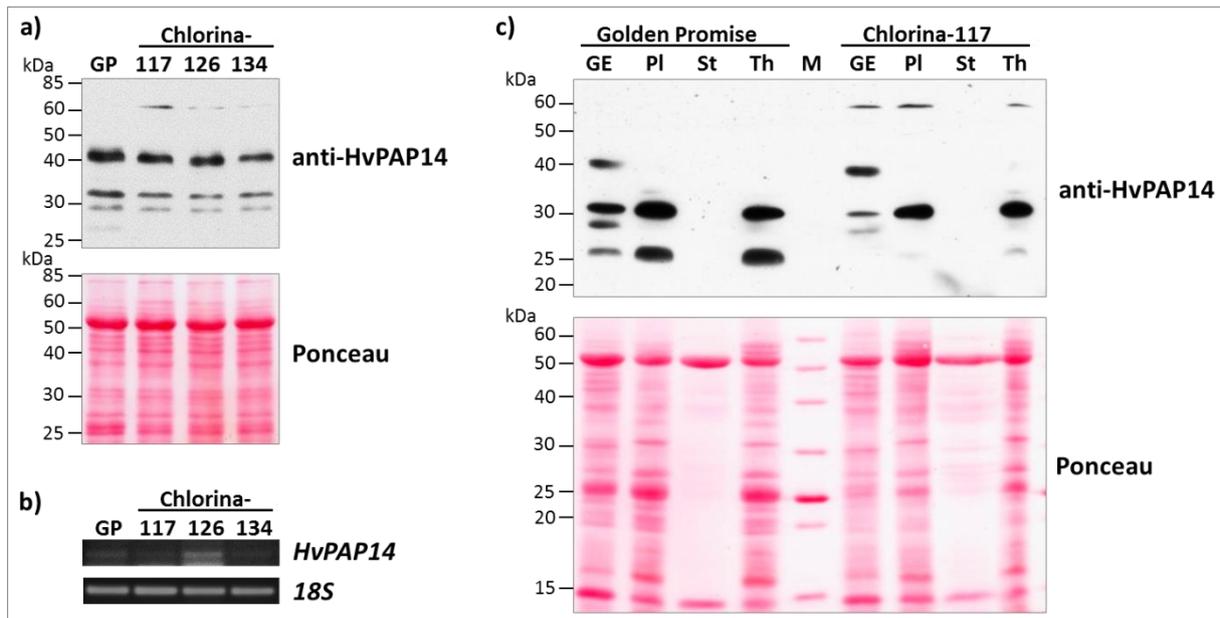


Abb. 3.19: Analyse der *HvPAP14* in LHC-defizienten Gerstenblättern. Die Primärblätter von Gerste der Sorte Golden Promise (GP) bzw. von LHC-defizienten Chlorina-Mutanten *clo-a*¹¹⁷, *clo-a*¹²⁶ und *clo-a*¹³⁴ wurden für eine Protein- und Expressionsanalyse verwendet. (a) Zur Proteinanalyse wurden die Gesamtproteinextrakte mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach einem Western Blot mit Ponceau gefärbt. Die *HvPAP14*-Formen wurden mittels Immundetektion mit einem Antikörper gegen *HvPAP14* nachgewiesen. (b) Die relativen Mengen der *HvPAP14*-Transkripte wurden mittels RT-PCR ermittelt. Als Kontrolle wurden dabei die *18S*-Transkripte verwendet. (c) Für die Analyse der subzellulären Lokalisation der verschiedenen *HvPAP14*-Formen in den Golden Promise-Pflanzen und der Chlorina-Mutanten *clo-a*¹¹⁷ wurde aus den Primärblättern der Gesamtproteinextrakt (GE), die Plastiden (PI), die Stromafraktion (St) und die Membranfraktion (Th) isoliert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach einem Western Blot mit Ponceau gefärbt. Anschließend erfolgte die Immundetektion der *HvPAP14*-Formen mithilfe des *HvPAP14*-Antikörpers. M-Marker.

Um die neu aufgetretene 61 kDa große *HvPAP14*-Form genauer zu untersuchen, wurde deren subzelluläre Lokalisation mithilfe von Zell- und Plastidenfraktionierung immunologisch bestimmt (Abb. 3.19c). Die Fraktionen wurden dazu aus Primärblättern der Golden Promise-Pflanzen und der *clo-a*¹¹⁷-Mutante isoliert. Die Immundetektion mit Antikörpern gegen *HvPAP14* zeigte, dass die 61 kDa-Form in der *clo-a*¹¹⁷-Mutante im Gesamtproteinextrakt, den isolierten Plastiden und in der Membranfraktion der Plastiden auftrat, jedoch nicht in der Stromafraktion und auch nicht in den Fraktionen der Golden Promise-Pflanzen. Dahingegen war kaum *HvPAP14* in der potentiell aktiven Form mit 26 kDa, die bei den Golden Promise-Pflanzen stark in der Plastiden- bzw.

Plastidenmembranfraktion angereicht war, in den Plastiden und in den Thylakoiden der *clo-a¹¹⁷*-Mutante nachweisbar.

Somit variierten die Mengen der bestimmten HvPAP14-Formen stark zwischen den Golden Promise-Pflanzen und den Chlorina-Mutanten. Dies legt nahe, dass die HvPAP14-Prozessierung bis hin zur Aktivierung bzw. bestimmte Modifizierungen der HvPAP14 abhängig vom LHC-Gehalt sind.

3.5.2 Einfluss von Licht auf die HvPAP14-Menge in Gerstenblättern

Die Substratanalyse zeigte, dass HvPAP14 u.a. Proteine der LHC und des PSII abbauen kann. Diese befinden sich in enger Verbindung mit fotosensitiven Molekülen wie Chlorophyll a und b, wodurch sie vermehrt der Fotoinaktivierung unterliegen (Nixon *et al.*, 2005; Ballottari *et al.*, 2007). Um ihre Funktion zu erhalten, müssen beschädigte Proteine abgebaut und durch intakte ersetzt werden. Aus diesem Grund sollte das Auftreten der HvPAP14-Formen sowie die *HvPAP14*-Expression in Abhängigkeit von Licht untersucht werden. Dazu wurden Gerstenpflanzen unter vier verschiedenen Lichtbedingungen angezogen: 0 $\mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{m}^{-2}$, 15 $\mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{m}^{-2}$, 140 $\mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{m}^{-2}$ und 270 $\mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{m}^{-2}$. Die Primärblätter wurden nach 10 Tagen geerntet und für Protein- und Expressionsanalysen eingesetzt.

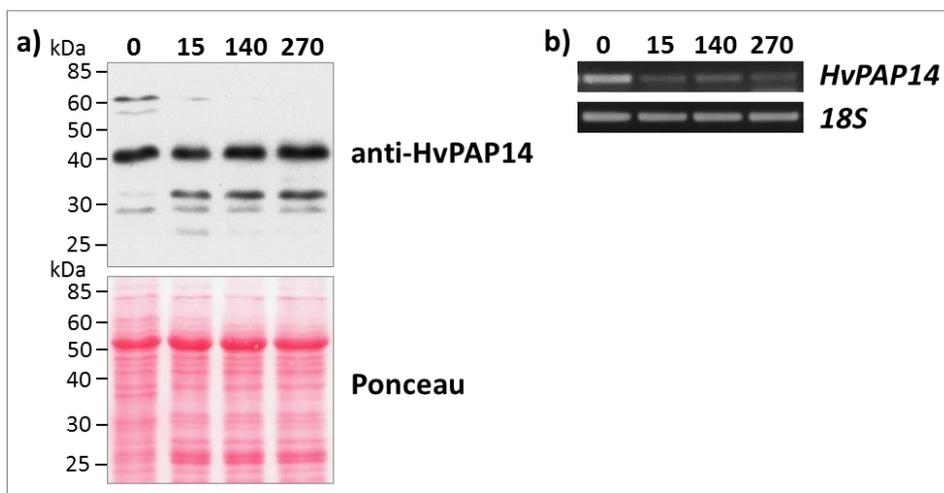


Abb. 3.20: Analyse der HvPAP14 in Gerstenblättern bei unterschiedlicher Lichtintensität. Die Primärblätter von Gerste der Sorte Golden Promise wurden bei Lichtintensitäten von 0-270 $\mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{m}^{-2}$ (0-270) angezogen. (a) Die Gesamtproteinextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach einem Western Blot mit Ponceau gefärbt. Die HvPAP14-Formen wurden immunologisch mit einem Antikörper gegen HvPAP14 nachgewiesen. (b) Die relativen Mengen der *HvPAP14*-Transkripte wurden mittels RT-PCR ermittelt, wobei die *18S*-Transkripte als Kontrolle verwendet wurden.

Die Proteinanalyse zeigte, dass wie in den vorherigen Untersuchungen die beiden HvPAP14-Formen mit einer Größe von 40 kDa und 32 kDa dominant waren (Abb. 3.20a). Die 40 kDa-Form war in allen Proben vorhanden und nahm mit ansteigender Lichtintensität leicht zu. Die HvPAP14-Form mit 32 kDa trat stark in den ergrüntem Blättern auf, jedoch kaum in etiolierten. Die potentiell aktive Protein-Form mit etwa 26 kDa trat nach der Anzucht bei $15 \mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{m}^{-2}$ und etwas schwächer bei $140 \mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{m}^{-2}$ auf. Bei Pflanzen, die bei $0 \mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{m}^{-2}$ bzw. bei $270 \mu\text{mol Photonen s}^{-1} \text{m}^{-2}$ angezogen wurden, war die aktive Form nicht detektierbar, was entweder für einen geringen Bedarf oder einen hohen Umsatz spricht. Alle Proben enthielten eine 31 kDa große Form in gleicher Menge. Außerdem zeigte sich besonders in den etiolierten Pflanzen die HvPAP14-Form mit einer Größe von 61 kDa, die in den im Licht angezogenen Pflanzen kaum detektierbar war.

Die Analyse der *HvPAP14*-Expression zeigte eine erhöhte *HvPAP14*-Transkriptmenge bei den etiolierten Pflanzen im Vergleich zu den ergrüntem (Abb. 3.20b). Dies deutet auf einen erhöhten Bedarf bzw. Umsatz der Cysteinpeptidase in etiolierten Pflanzen hin. Zwischen den bei unterschiedlichen Lichtintensitäten ergrüntem Pflanzen war kein großer Unterschied in der *HvPAP14*-Transkriptmenge auszumachen.

Alles in allem sprechen diese Ergebnisse für eine lichtabhängige Regulation der HvPAP14 sowohl auf der mRNA- als auch auf der Proteinebene, bei der Prozessierungen und ggf. auch posttranslationale Modifikationen eine entscheidende Rolle spielen.

4 Diskussion

4.1 Subzelluläre Lokalisationen und biochemische Eigenschaften von HvPAP14

4.1.1 Lokalisation von HvPAP14 in der Pflanzenzelle

Die Cysteinpeptidase HvPAP14 aus Gerste (*Hordeum vulgare*) zählt zu den Papain-ähnlichen Proteasen des KDEL-Typs und besitzt neben einem inhibitorischen Propeptid eine C-terminale HDEL-Sequenz, die als ER-Retentionssignal dient. Durch immunologische Nachweisverfahren sind verschiedene Proteinformen detektierbar, die unterschiedlichen Prozessierungsstufen zugeordnet werden können (Abb. 1.5, 3.16, 3.19 und 3.20; Hollmann, 2016). Die inaktive Proform der Protease zeigt eine Größe von 41 kDa (berechnet 37 kDa), eine höchst wahrscheinlich am C-Terminus prozessierte Form besitzt eine Größe von 32 kDa (berechnet 33 kDa) und die aktive Form ohne das inhibitorische Propeptid ist etwa 26 kDa (berechnet 26 kDa) groß. Zudem traten weitere Formen wie beispielsweise die 61 kDa große Proteinform auf, die keine der zu erwartenden Prozessierungsstufen zuzuordnen ist. Auch bei anderen KDEL-CysEP waren unterschiedliche Proteinformen nachweisbar, wie beispielsweise bei der CysEP der Tomate (*Solanum lycopersicum*) oder von *Ricinus communis* und dem CEP2 aus *Arabidopsis thaliana* (Schmid *et al.*, 1998; Trobacher *et al.*, 2013; Hierl *et al.*, 2014). So ist von einer stufenweisen Prozessierung auszugehen, die durchaus mit einer Änderung der Lokalisation einhergehen kann, da dabei eine Abspaltung des Lokalisationssignals für das Endoplasmatische Retikulum (ER), die HDEL-Sequenz, erfolgen kann.

Zuvor konnte durch immunologische Untersuchungen mithilfe von Zell- und Plastidenfraktionierungen sowie transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen gezeigt werden, dass die potentiell aktive Form der HvPAP14 an der Thylakoidmembran der Chloroplasten gebunden vorliegt. Zudem konnte die potentiell prozessierte inaktive HvPAP14-Form mit 32 kDa im Lumen der Thylakoide sowie ebenfalls an der Thylakoidmembran lokalisiert werden, wo auch die unerwartete 61 kDa große Proteinform zu finden ist (Abb. 3.19c). Die potentiell unprozessierte inaktive Cysteinpeptidase (mit 40 kDa) konnte nur im Gesamtproteinextrakt von Gerstenblättern, jedoch nicht in den Plastiden nachgewiesen werden (Hollmann, 2016). Über eine mögliche Lokalisation dieser Form konnten *in silico*- und fluoreszenzmikroskopische Analysen Aufschluss geben.

Durch die *in silico*-Analyse mithilfe der gesamten Aminosäuresequenz wurde für HvPAP14 das ER bzw. der sekretorische Weg als wahrscheinlichste Lokalisation vorhergesagt (Tab. 3.1). Zudem gab es auch einige Vorhersagen für die Chloroplasten, Mitochondrien und den extrazellulären Raum. Die mikroskopische Analyse des HvPAP14:RFP-Fusionsproteins in lebenden, transient transformierten Zwiebelepidermiszellen bestätigte die vorhergesagte Lokalisation in dem ER (Abb. 3.1). Außerdem konnte das HvPAP14:RFP-Signal zusätzlich in punktförmigen vesikelartigen Strukturen nachgewiesen werden. In transient transformierten Gerstenprotoplasten konnte zum einen ebenfalls ein

HvPAP14:RFP-Signal im ER und in vesikelähnlichen Strukturen nachgewiesen werden. Zum anderen waren schwache Signale des Fusionsproteins in den Chloroplasten sichtbar (Abb. 3.2). Diese zeigt strukturelle Ähnlichkeiten zur Thylakoidmembran und nicht zum Stroma der Chloroplasten, was die Ergebnisse der vorherigen immunologischen Untersuchungen von Hollmann (2016) bekräftigt. Interessanterweise war kein Unterschied in der Lokalisation von HvPAP14:RFP-Fusionsproteinen erkennbar, bei denen der C-Terminus samt HDEL-Sequenz fehlte. Dies spricht dafür, dass die Abspaltung der HDEL-Sequenz keinen direkten Einfluss auf die Lokalisation des Fusionsproteins hat und weitere Faktoren die Lokalisation bedingen.

In den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen konnte HvPAP14 außer im ER und in den Chloroplasten auch in vesikulären Strukturen beobachtet werden. Mithilfe einer immunologischen Goldmarkierung konnte HvPAP14 zuvor elektronenmikroskopisch in Microbodies mit einem Durchmesser von 500 nm nachgewiesen werden (Hollmann, 2016), die ggf. mit den beobachteten vesikulären Strukturen übereinstimmen. Auch andere KDEL-CysEP konnten in vesikelartigen Strukturen nachgewiesen werden wie CEP2 aus *A. thaliana*. Diese konnte in Fusion mit GFP in den sogenannten Ricinosomen nachgewiesen werden, die von dem ER abstammen (Hierl *et al.*, 2014). Diese Ricinosomen wurden zuerst in *R. communis* entdeckt und enthalten ebenfalls ein CysEP des KDEL-Typs (Mollenhauer und Totten, 1970; Vigil, 1970; Schmid *et al.*, 1998). Eine andere Art von Vesikeln, die ebenfalls vom ER abstammen, sind die KDEL-Protease-akkumulierenden Vesikel (KV), die in *Vigna mungo* gefunden wurden und dem Transport der Cysteinpeptidase SH-EP in Speichervakuolen dienen (Toyooka *et al.*, 2000). Beide Vesikeltypen werden in engen Zusammenhang zu Remobilisierungs- und Zelltodprozessen gebracht. Die beobachteten vesikelartigen Strukturen bzw. Microbodies sind somit eventuell auf die Lokalisation von HvPAP14 in Ricinosomen, KV oder anderen vom ER-abstammenden Vesikeln zurückzuführen.

Eine Lokalisation in den Chloroplasten konnte bisher für keine andere der KDEL-CysEP gezeigt werden. Der Nachweis von HvPAP14 an der Thylakoidmembran der Chloroplasten wirft die Frage nach dem Transport des vom ER-stammenden Proteins in die Plastiden auf. Der klassische Transport plastidärer Proteine verläuft nach der Synthese im Cytoplasma über die plastidären Importsysteme, den Proteinkomplexen TOC (*translocon on the outer chloroplast membrane*) und TIC (*translocon on the inner chloroplast membrane*). Die zu importierenden Proteine besitzen dafür ein N-terminales, plastidäres Transitpeptid, das meist im Stroma durch die SPP (*stromal processing peptidase*) abgespalten wird (Jarvis und López-Juez, 2013). Zudem liegen sie während dieses Transportes ungefaltet vor. Proteomanalysen der Chloroplasten von *A. thaliana* zeigten aber, dass etwa 30% der Chloroplastenproteine keine erkennbare plastidäre Transitsequenz besitzen. Viele dieser Proteine besitzen jedoch ein Signalpeptid für den kotranslationalen Transport ins ER (Kleffmann *et al.*, 2004). Die enge Beziehung zwischen den Chloroplasten und dem ER konnte bereits gezeigt werden. So gibt es

zwischen den Plastidenhüllmembranen und dem ER Membrankontaktstellen, die dem Austausch von Lipiden zwischen den Kompartimenten dienen. Außerdem konnten an diesen Membrankontaktstellen Protein-Protein-Interaktionen nachgewiesen werden (Whatley *et al.*, 1991; Holthuis und Levine, 2005; Andersson *et al.*, 2007; Sandelius *et al.*, 2007). So wäre möglicherweise auch der Transport oder Austausch von Proteinen im Zusammenhang mit diesen Kontaktstellen denkbar.

Ein alternativer Importweg, der über den Golgi-Apparat führt, konnte bereits für einige plastidäre Proteine gezeigt werden. Bekannt ist dies u.a. für die Carboanhydrase CA1H aus *A. thaliana* (Burén *et al.*, 2011), die α -Amylase Amyl-1 (Kitajima *et al.*, 2009) und die Nukleotidpyrophosphatase/-phosphodiesterase NPP1 aus Reis (Nanjo *et al.*, 2006). Diese Proteine weisen alle eine N-Glykosylierung auf, die im ER beginnt und im Golgi-Apparat noch modifiziert wird, und haben z.T. weitere posttranslationale Modifikationen wie intramolekulare Disulfidbrücken. Da diese Modifikationen für die Funktionalität der Proteine eine entscheidende Rolle spielen, müssen die Proteine während des Imports in die Plastiden bereits gefaltet und modifiziert vorliegen. Bei den Untersuchungen der Amyl-1 konnte in fluoreszenz- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen die Bindung von Vesikeln, die vom Golgi-Apparat abstammten, an Plastiden gezeigt werden. Die Amyl-1 wurde dabei aus den Vesikeln in das Stroma entlassen. Der genaue Mechanismus, wie dabei die Membranen überwunden werden, ist jedoch noch unklar. Eine einfache Membranfusion gilt dabei jedoch als unwahrscheinlich (Kitajima *et al.*, 2009). Die genannten Proteine besitzen auch sehr unterschiedliche Sequenzen, wodurch ein Transitsignal denkbar ist, das erst durch die dreidimensionale Faltung der Proteine entsteht bzw. in engen Zusammenhang mit der Glykosylierung steht. Eine Glykosylierung von HvPAP14 wurde bisher noch nicht nachgewiesen, jedoch liegt die inaktive Proform der HvPAP14 mit etwa 40 kDa über dem berechneten Molekulargewicht von etwa 37 kDa und könnte demzufolge ebenfalls glykosyliert sein. Daher ist für HvPAP14 der alternative Transportweg in die Plastiden über das ER und ggf. auch den Golgi-Apparat nicht auszuschließen. Denkbar wäre hier im Unterschied zum Transport der Amyl-1, dass HvPAP14-haltige Vesikel mit der äußeren Hüllmembran der Chloroplasten fusionieren könnten, wodurch die Cysteinpeptidase zunächst im Intermembranraum vorliegen würde und anschließend durch Vesikel, die von der inneren Hüllmembran abgeschnürt werden, zu den Thylakoiden transportiert werden könnten. Nach der Fusion dieser Vesikel würde HvPAP14 im Thylakoidlumen oder an der luminalen Seite der Thylakoidmembran vorliegen. Intraplastidäre Vesikel, die einem solchen Transport dienen könnten, wurden in Chloroplasten durch Lindquist *et al.* (2016) und Westphal *et al.* (2001) gezeigt. Da durch HvPAP14 auch stromale Proteine abgebaut werden können, muss zudem ein Transport der Cysteinpeptidase von der luminalen Seite über die Thylakoidmembran zur stromalen Seite der Membran stattfinden.

In den Chloroplasten liegt HvPAP14 an die Thylakoidmembran gebunden vor, obwohl es für diese Affinität basierend auf der Aminosäuresequenz keine Hinweise gibt. Dies spricht für eine bisher

unbekannte Interaktion mit Membranmolekülen. Bei der Aufreinigung der rekombinanten HvPAP14 aus *E. coli*-Zellen fiel auf, dass ein großer Anteil der HvPAP14 nicht löslich war, obwohl sie in Fusion mit dem Maltose-bindenden Protein (MBP) synthetisiert wurde. Dies erhöht normalerweise die Löslichkeit von Proteinen. Die Ursache könnte darin liegen, dass das Fusionsprotein in Proteinkörperchen akkumulierte. Aufgrund der starken Ultraschallbehandlung der Zellen, die diese Körperchen deutlich verringern bzw. auflösen würde, ist es jedoch wahrscheinlicher, dass es auch in den *E. coli*-Zellen zu einer Membranbindung kam.

4.1.2 Einfluss der Ionenbedingungen auf HvPAP14

Die Aktivität und Funktionalität von Enzymen ist stark von den umgebenden Bedingungen abhängig, wie dem pH-Wert, den Redoxbedingungen, der Konzentration von Ionen und dem Auftreten von Inhibitoren. So sind durch die biochemische Charakterisierung eines Enzyms Rückschlüsse auf potentielle Lokalisationen in bestimmten Kompartimenten der Zelle sowie auf Lokalisationsänderungen möglich.

Für Papain-ähnliche Cysteinpeptidasen ist bekannt, dass die Abspaltung des inhibitorischen Propeptids und damit die Aktivierung der Enzyme autokatalytisch durch die Veränderung des pH-Wertes verursacht werden kann. Dies gilt auch für die KDEL-CysEP CEP2 aus *A. thaliana* und CysEP aus *R. communis*, die große Sequenzähnlichkeiten zur HvPAP14 aufweisen (Abb. 1.4). Zurückzuführen ist die pH-Abhängigkeit der aktivierenden Prozessierung darauf, dass durch die hohen Protonenkonzentrationen die ionischen Wechselwirkungen zwischen dem inhibitorischen Propeptid und dem aktiven Zentrum gelockert werden. Außerdem kann es zu Änderungen in der Konformation des Propeptids kommen (Maubach *et al.*, 1997; Wiederanders, 2003). Die Aktivierung von CEP2 erfolgt bei einem pH-Wert von 4,5 oder saurer, die der Ricinus-CysEP bei einem pH-Wert von 5 oder weniger (Hierl *et al.*, 2014). Ein sehr ähnliches Verhalten zeigte auch HvPAP14, die bei saurem pH aktiviert wurde, wobei das Optimum bei pH 4-5 lag (Abb. 3.4 und 3.5).

Nachdem die Aktivierung erfolgte, zeigen die CEP2 und die Ricinus-CysEP eine vom pH-Wert unabhängige Aktivität. Diese wurde im Bereich von pH 4-8 bestimmt (Hierl *et al.*, 2014). Für HvPAP14 konnte gezeigt werden, dass sie ebenfalls über einen breiten pH-Bereich (pH 3,5-9) aktiv ist (Abb. 3.6). Der optimale pH-Bereich für die Aktivität der HvPAP14 liegt bei pH 4,5-7. In diesem pH-Bereich ist die Aktivität etwa gleich stark, was bedeutet, dass sie unter physiologischen Bedingungen ebenfalls weitestgehend unabhängig vom pH-Wert ist.

Innerhalb der Chloroplasten gibt es große Unterschiede im pH-Wert, die vor allem von den Photosynthesereaktionen abhängen. Im Dunkeln beträgt der pH-Wert des Stromas und des Thylakoidlumens etwa 7-7,8. Im Licht hingegen wird durch die Fotosyntheseprozesse der Protonengradient aufgebaut,

der die Aktivität der ATP-Synthase ermöglicht. Das Stroma besitzt dabei einen pH-Wert von etwa 8 und das Thylakoidlumen bis zu 5,7 (Kramer *et al.*, 2003; Höhner *et al.*, 2016). Unter Stressbedingungen kann der pH-Wert im Lumen jedoch kurzzeitig noch deutlich unter 5 sinken, was die Wahrscheinlichkeit der Fotoinhibierung erhöht und die Schädigung von Proteinen und anderen Makromolekülen zur Folge haben kann (Kramer *et al.*, 1999; Takizawa *et al.*, 2007). So wird beispielsweise der OEC (*oxygen evolving complex*) des PSII inaktiviert, wenn der pH-Wert des Lumens unter 6 sinkt, da dann Ca^{2+} aus dem Komplex gelöst wird (Krieger und Weis, 1993). Des Weiteren kann die Stabilität von Plastocyanin bei pH-Werten unterhalb von 5,5 durch den Verlust von Cu^{2+} sinken. Da die ATP-Synthase für die Aktivierung eine Ansäuerung von mindestens pH 6,2 benötigt, Schädigungen des Fotosyntheseapparates aber schon bei einem geringfügig niedrigeren pH-Wert auftreten, ist eine starke Regulation notwendig. Diese kann zum einen über die Regulation der Fotosynthese selbst und zum anderen über die Regulation der Protonenkonzentration über Protonen/Ionen-Pumpen erfolgen (Kramer *et al.*, 1999).

Durch den niedrigen pH-Wert im Thylakoidlumen ist es denkbar, dass hier die Aktivierung der HvPAP14 stattfindet. Diese wäre durch eine kurzzeitig stärkere Ansäuerung unter Stressbedingungen noch begünstigt, unter denen auch gehäuft beschädigte Proteine entstehen, die wiederum durch HvPAP14 abgebaut werden könnten. Somit könnte dies ein interner Regulationsprozess sein, der die Menge fehlerhafter Proteine möglichst niedrig hält. Die aktive Form von HvPAP14 kann aufgrund ihrer pH-unabhängigen Aktivität zudem außerhalb des Thylakoidlumens wirken und zum Abbau von stromalen Proteinen wie RbcL, der großen Untereinheit von Rubisco, führen. Wie dazu die Membran passiert werden kann, bleibt dabei jedoch unklar.

Neben dem pH-Wert spielt der Redoxstatus bei der Aktivierung von HvPAP14 eine große Rolle, denn reduzierende Bedingungen begünstigen diese sehr stark. Das reife Enzym zeigt in seiner Aktivität hingegen keine Abhängigkeit von den Redoxbedingungen (Abb. 3.7). Der Redoxstatus eines Proteins kann einen großen Einfluss auf dessen Struktur und Stabilität haben, vor allem wenn es Disulfidbindungen enthält. In der Sequenz von HvPAP14 sind sieben Cysteinreste erhalten, von denen sechs sehr wahrscheinlich drei Cystinbrücken ausbilden können (Abb. 1.4). Nach der Proteinsynthese können diese unter den oxidierenden Bedingungen im ER ausgebildet werden und stabilisieren somit das Protein. In den Chloroplasten herrschen unter Lichteinfluss im Thylakoidlumen ebenfalls oxidierende Bedingungen, im Stroma hingegen reduzierende. Hier dient beispielsweise fotoreduziertes Ferredoxin als Elektronenlieferant, das zusammen mit Thioredoxin die Disulfidbrücken von Proteinen aufbrechen kann. Außerdem sind zahlreiche Antioxidantien, wie Ascorbat und Glutathion, im Stroma enthalten, die auch der Entgiftung von ROS dienen (Chew *et al.*, 2003; Buchanan und Luan, 2005; Potters *et al.*, 2010; Foyer und Noctor, 2016). Im Hinblick auf die Redoxbedingungen wäre die Aktivierung von HvPAP14 im Stroma günstiger. Da jedoch der pH-Wert einen deutlich größeren Einfluss auf die Abspaltung des inhibitorischen Propeptids hat und dies auch unter oxidierenden

Bedingungen funktioniert, bleibt das Thylakoidlumen der wahrscheinlich günstigste Ort für die Aktivierung von HvPAP14 innerhalb der Chloroplasten. Die stärkere Aktivierung unter reduzierenden Bedingungen ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Spaltung der Disulfidbrücken eine leichte Konformationsänderung zur Folge hat, die die Bindung zwischen dem inhibitorischen Propeptid und dem aktiven Zentrum lockern bzw. potentielle Spaltstellen zwischen dem Propeptid und der Protease zugänglicher machen kann. Starke Konformationsänderungen sind jedoch nicht zu erwarten, da das aktive Enzym unabhängig vom Redoxstatus agiert. Das bedeutet, dass die Grundstruktur, vor allem im Bereich des aktiven Zentrums, erhalten bleibt. Die Disulfidbrücken könnten z.T. sterisch abgeschirmt sein, sodass sie nicht reduziert werden können, oder sie sind nicht alle für die Strukturhaltung notwendig. Eine von der Spaltung von Disulfidbrücken abhängige Flexibilität in der Struktur könnte auch eine größere Substratvariabilität ermöglichen.

Die biochemische Charakterisierung von HvPAP14 zeigte, dass auch bestimmte Anionen und Kationen Einfluss auf das Enzym haben können. Die Aktivierung durch die Abspaltung des inhibitorischen Propeptids wird durch Nitrat-, Sulfat- und Phosphationen, die in einer Konzentration von 1 mM vorlagen, begünstigt (Abb. 3.8). Die Nitratkonzentration liegt im Cytoplasma bei 1-5 mM, in der Vakuole kann sie bis zu 70 mM erreichen. Bevor Nitrat in die Plastiden gelangen kann, wird es zu Nitrit reduziert (Crawford, 1995; Long *et al.*, 2015). Auch die Sulfationen sind im millimolaren Bereich im Cytoplasma enthalten. Sie dienen nach der Aufnahme in die Chloroplasten der Synthese von Cysteinen (Pilon-Smits und Pilon, 2006). Die physiologische Konzentration von Phosphationen, die u.a. bei vielen ATP-abhängigen Reaktionen gebildet werden, liegt bei 1 mM (Delhaize *et al.*, 2015). Der Mechanismus der gesteigerten Aktivierung von HvPAP14 ist unklar. Es ist jedoch denkbar, dass durch die Anionen die Wechselwirkungen zwischen dem inhibitorischen Propeptid und dem aktiven Zentrum abgeschwächt werden und dadurch die Abspaltung des Propeptids begünstigt wird.

Die zweiwertigen Zink-, Kupfer- und Eisenionen haben eine stark inhibierende Wirkung auf HvPAP14, wohingegen Calcium- und Magnesiumionen keinen deutlichen Einfluss auf die Aktivierung oder Aktivität des Enzyms haben. Auch EDTA, das zweiwertige Ionen bindet und ggf. dem Enzym entziehen würde, beeinflusst HvPAP14 nicht (Abb. 3.8 und 3.9). Somit ist eine für die Funktion nützliche Bindung von zweiwertigen Ionen sehr unwahrscheinlich. Untersuchungen an Papain konnten zeigen, dass Zink-, Kupfer- und Eisenionen eine hemmende Wirkung auf die Aktivität der Cysteinpeptidase haben. Die Zinkionen hemmen Papain aufgrund ihrer hohen Affinität zu dessen aktiven Zentrum. Sie binden sehr viel stärker als die Substrate und wirken damit als kompetitive Inhibitoren. Diese bevorzugte Bindung ans aktive Zentrum ist von der Ladung und der Größe der Ionen abhängig und gilt nicht für die Kupfer- und Eisenionen, die destabilisierend auf das Protein wirken (Sluyterman, 1967; Sathish *et al.*, 2000; Homaei, 2015). Eine ganz ähnliche Wirkung der Ionen ist auch auf HvPAP14 zu erwarten, wobei Cu^{2+} -Ionen die stärkste Inhibierung verursachen. Die drei Ionen sind essentiell für die Bildung und Aktivität

zahlreicher Metall-Enzym-Komplexe und sind damit auch für die Pflanzen selbst lebensnotwendig. Zn^{2+} -Ionen stabilisieren Ribosomen und sind in Carboanhydrasen, RNA-Polymerasen und zahlreichen Trans-kriptionsfaktoren enthalten (Mousavi *et al.*, 2012). Kupfer kann in lebenden Zellen in zwei Redoxzuständen vorliegen: als Cu^{2+} -Ionen oder Cu^+ -Ionen. Da es auch während es am Protein gebunden ist, oxidiert oder reduziert werden kann, ist es häufig in Oxidoreduktasen enthalten (Waldron *et al.*, 2009; Aguirre und Pilon, 2016). Ein großer Anteil der Kupferionen von pflanzlichen Zellen ist in den Chloroplasten zu finden. Sie liegen dort vor allem gebunden an Plastocyanin und an die Polyphenoloxidase, die beide im Thylakoidlumen lokalisiert sind, oder an die stromale Kupfer-Zink-Superoxiddismutase (CuZnSOD) vor (Jackson *et al.*, 1978; Shikanai *et al.*, 2003; Aguirre und Pilon, 2016). Über 90% der Eisenionen in Blättern sind in den Chloroplasten enthalten. 75-80% davon befinden sich im Stroma, die übrigen an der Thylakoidmembran. Ein Großteil der Eisenionen ist an Ferritin, ein Fe^{2+} -Speicherprotein, gebunden. Sie sind aber auch beispielsweise in Fe-S-Cluster des PSI und des Cytochrom $b_6 f$ -Komplexes enthalten und somit an der Fotosynthese beteiligt (Bughio *et al.*, 1997; Balk und Lobréaux, 2005; Briat *et al.*, 2006). Die HvPAP14-inhibierenden Ionen liegen damit also alle auch in den Chloroplasten vor. Da sie jedoch an Proteine gebunden vorliegen, können sie die Aktivität von Cysteinpeptidasen wie HvPAP14 normalerweise kaum beeinflussen. In Stresssituationen ist hingegen eine Beschädigung der Ionen-bindenden Proteine oder ein Ungleichgewicht zwischen den Ionen und ihren Proteinen denkbar, die zur Freigabe der Ionen und damit zur möglichen Inhibierung von HvPAP14 führen kann.

In einer Analyse plastidärer Proteasen aus Spinat, konnten Protease-Aktivitäten auf Cysteinpeptidasen zurückgeführt werden, die an die Thylakoidmembran binden. Es konnte gezeigt werden, dass sie stabil gegenüber SDS sind und auch in Gegenwart des Detergenz aktiv sein können (Sokolenko *et al.*, 1997). Auf HvPAP14 trifft dies allerdings nicht zu. Die Protease zeigt keinerlei Aktivität nach der Behandlung mit SDS.

Neben dem Verhalten von HvPAP14 in Bezug zu seiner Umgebung wurde auch die Enzymkinetik der Cysteinpeptidase untersucht. Hierzu wurde der Umsatz des fluoreszierenden Substrats Z-FR-AMC bei einem pH-Wert von 4,5 unter reduzierenden Bedingungen gemessen und analysiert. Diese Bedingungen erwiesen sich zuvor als günstig für die Enzymaktivität (Kap. 3.2.2.1 und 3.2.2.2). Aus den ermittelten Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktionen konnte die Michaelis-Konstante K_m berechnet werden, die für diese Reaktion $6 \mu M$ betrug. Das heißt, dass bei einer Substratkonzentration von $6 \mu M$ die Hälfte der HvPAP14 in einem Enzym-Substrat-Komplex gebunden ist. Die Kenntnis des K_m -Wertes bildet die Grundlage für weitere Experimente, bei der die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes durch die Zugabe weiterer Faktoren beeinflusst werden könnte. Die Enzymkinetik hängt stark davon ab, welches Substrat vorliegt. So beträgt beispielsweise der K_m -Wert für den Umsatz von Casein durch Papain $0,6 \mu M$ (Homaei, 2015), bei dem Umsatz von α -N-Benzoyl-L-arginin-p-nitroanilid (BAPA) durch Papain beträgt er $5 mM$ (Mole und Horton, 1973).

4.2 Abbau plastidärer Proteine durch HvPAP14

Die KDEL-CysEP HvPAP14 konnte u.a. in den Chloroplasten lokalisiert werden. Außerdem ist während der Seneszenz die Expression von *HvPAP14* stark hochreguliert und auch die Proteinmenge der aktiven Form ist während der Seneszenz stark angereichert (Hollmann *et al.*, 2014; Hollmann, 2016), was für eine Beteiligung an Remobilisierungsprozessen spricht. Die Chloroplastenproteine, insbesondere die Ribulose-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) und die Proteinkomplexe des Fotosyntheseapparates sind die Hauptquellen des Stickstoffs, der während der Seneszenz freigesetzt und zu anderen Organen transportiert wird. HvPAP14 ist jedoch nicht nur in seneszenten Zellen, sondern in niedrigeren Mengen auch in nicht seneszenten Zellen nachweisbar (Abb. 3.19 und 3.20; Hollmann, 2016). In diesen Zellen könnten sie als Haushaltsprotein andere plastidäre Proteine prozessieren und beispielsweise für den stetigen Abbau von fehlerhaften Proteinen dienen.

In dieser Arbeit konnte der Abbau bzw. die Spaltung des stromalen Proteins RbcL und einiger Thylakoidmembranproteine des PSII und der LHC durch die Cysteinpeptidase HvPAP14 gezeigt werden. Neben einer Verringerung der jeweiligen Proteinmenge konnten in den *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen z.T. auch definierte Abbauprodukte nachgewiesen werden (Tab. 4.1). Die in den *in vivo*-Untersuchungen verwendeten *HvPAP14*-überexprimierenden Protoplasten lagen größtenteils intakt vor. Daher ist aufgrund der ermittelten Substrate davon auszugehen, dass HvPAP14 auch in größerer Menge in die Chloroplasten transportiert werden kann und dort die Proteine hydrolysiert.

Tab. 4.1: Zusammenfassung der Ergebnisse der HvPAP14-Substratanalyse. *In vitro* wurden Stroma- und Thylakoidmembranfraktionen mit aktiver rekombinanter HvPAP14 inkubiert. Für die *in vivo*-Analyse wurden *HvPAP14*-überexprimierende Protoplasten untersucht. Aufgelistet sind die Molekulargewichte von potentiellen HvPAP14-Substraten bzw. von deren Fragmenten, die aus Immundetektionen mit spezifischen Antikörpern nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot ermittelt wurden. DB-Doppelbande.

	intaktes Protein	Fragmente der <i>in vitro</i> -Analyse	Fragmente der <i>in vivo</i> -Analyse
RbcL	53 kDa	50 kDa	50 kDa, 47 kDa, 44 kDa, 41 kDa, 29 kDa, 28 kDa
PSBO	30 kDa	22 kDa	27 kDa, 26 kDa, DB bei 21 kDa
LHCII-Trimer (LHCB1/2/3)	25-26 kDa	mehrere bei 23-25 kDa	kein Abbau
LHCB1	DB bei 26 kDa	DB bei 25 kDa	Abbau, aber keine Fragmente
LHCB4	28 kDa	DB bei 27 kDa	kein Abbau
LHCB5	27 kDa	DB bei 26 kDa, DB bei 25 kDa	25 kDa
LHCA3	25,5 kDa	Abbau, aber keine Fragmente	25 kDa

4.2.1 RbcL als Substrat von HvPAP14

In den Substratanalysen konnte der Abbau von RbcL durch HvPAP14 gezeigt werden. Bei den *in vitro*-Analysen konnte nach der Inkubation von einer stromalen Fraktion aus Gerstenplastiden mit der aktiven HvPAP14 ein etwa 50 kDa großes RbcL-Fragment detektiert werden (Abb. 3.12). Auch *in vivo* trat dieses Abbauprodukt nach der Überexpression des *HvPAP14*-Gens in Protoplasten aus Gerstenprimärblättern auf. Zusätzlich waren RbcL-Fragmente mit einer Größe von etwa 47 kDa, 44 kDa, 41 kDa, 29 kDa und 28 kDa detektierbar (Abb. 3.18). Dies deutet darauf hin, dass HvPAP14 den ersten Schritt des RbcL-Abbaus katalysieren kann, der zum 50 kDa-großen Fragment führt und danach weitere Prozessierungsschritte durch andere plastidäre Peptidasen folgen, die nicht in der *in vitro*-Situation vorlagen und zu den kleineren Fragmenten mit einer Größe von 47-28 kDa führen (Tab. 4.1).

RbcL ist die große Untereinheit der Rubisco, des häufigsten Proteins der Erde (Ellis, 1979). Rubisco hat einen Anteil von bis zu 50% an den löslichen Proteinen in C3-Pflanzen und beinhaltet 20-30% des gesamten Blattstickstoffs (Feller *et al.*, 2008). In Höheren Pflanzen ist es im Stroma der Chloroplasten lokalisiert. Außerdem kommt es in anderen autotrophen Organismen wie fotosynthetischen Bakterien, Cyanobakterien und Algen vor. Rubisco katalysiert zum einen die Carboxylierung von Ribulose-1,5-bisphosphat im Calvin-Zyklus und sorgt somit für die fotosynthetische CO₂-Fixierung. Jährlich werden 10¹¹ t CO₂ fixiert, wodurch Rubisco eine wichtige Rolle im Kohlenstoffkreislauf der Erde einnimmt (Andersson, 2008). Zum anderen kann es die Oxygenierung des Ribulose-1,5-bisphosphat bei der Photorespiration katalysieren (Roy, 1989). Welche der beiden Reaktionen abläuft, hängt stark vom Verhältnis der vorliegenden CO₂- und O₂-Konzentrationen ab (Andersson, 2008). Aufgebaut ist Rubisco aus einem Oktamer aus den großen Untereinheiten RbcL (ca. 53 kDa) und zwei Tetrameren aus den kleinen Untereinheiten RBCS (ca. 14 kDa) auf jeder Seite des RbcL-Oktamers, was eine Faserstruktur ergibt. Je zwei große Untereinheiten bilden zusammen ein katalytisches Zentrum. Als Kofaktor dient jeweils ein Magnesiumion. Die kleinen Untereinheiten hingegen haben keine katalytische Funktion (Chapman *et al.*, 1987; Andersson und Backlund, 2008). RBCS wird im Kern kodiert, RbcL dagegen im plastidären Genom (Roy und Nierzwicki-Bauer, 2012). Die Bindung von CA1P (2-Carboxyarabinitol-1-phosphat), einem natürlichen Inhibitor mit großer Affinität zum aktiven Zentrum, kann Rubisco vor dem Abbau durch Proteasen in den Chloroplasten schützen (Khan *et al.*, 1999).

Trotz umfangreicher Untersuchungen ist der genaue Abbauprozess von Rubisco noch immer unklar. Die bisherigen Untersuchungen deuten darauf hin, dass es nicht nur einen bestimmten Abbauweg gibt, sondern mehrere verschiedene, die von Entwicklungsstadien und Stressbedingungen abhängen können. Häufig wurde der Abbau von RbcL im Zusammenhang mit Seneszenzprozessen untersucht. In natürlich seneszierenden Blättern können meist keine Fragmente des Proteins detektiert werden, da die Hydrolyse in kleine Peptide sehr schnell verläuft. Unter bestimmten Bedingungen können jedoch Abbauprodukte

in Blättern, Blattsegmenten, Zelllysaten oder Chloroplasten akkumulieren (Hildbrand *et al.*, 1994; Nakano *et al.*, 2006; Thoenen *et al.*, 2007).

Ein Großteil der proteolytischen Aktivität gegenüber Rubisco ist in den Vakuolen zu finden und auch Abbauprodukte von RbcL konnten hier nachgewiesen werden (Park *et al.*, 1999). Ganze Chloroplasten können durch Phagozytose in die Vakuole aufgenommen und dort zersetzt werden (Wittenbach *et al.*, 1982; Minamikawa *et al.*, 2001). Außerdem können zuvor stromale Proteine in einem autophagischen Prozess mithilfe von Vesikeln, den RCB (*Rubisco-containing bodies*), von den Plastiden zur Vakuole transportiert werden. Diese Vesikel besitzen eine Doppelmembran und scheinen daher direkt aus den Plastiden hervorzugehen. Neben Rubisco konnten in den RCB weitere stromale Proteine, wie die Glutamin-Synthase, jedoch keinerlei Thylakoidmembranproteine nachgewiesen werden (Chiba *et al.*, 2003; Ishida *et al.*, 2008). In seneszenten Blättern wurde zudem der Abbau von stromalen Proteinen in kleinen, sauren Vesikeln beobachtet: den seneszenzassoziierten Vakuolen (SAV). Diese besitzen im Unterschied zu den RCB nur eine Membran und sind weitestgehend unabhängig von Autophagogenen. In den SAV wurde eine hohe proteolytische Aktivität nachgewiesen, die auf die Cysteinpeptidase SAG12 zurückgeführt wurde (Otegui *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2008; Carrión *et al.*, 2013).

Neben diesen kontrollierten und spezifischen Abbauwegen spielen vakuoläre Peptidasen eine große Rolle, wenn es bei Zelltodprozessen in der ganzen Zelle zum Verlust der Membranintegrität der Kompartimente kommt. An dem massenhaften Abbau von Proteinen sind dann auch KDEL-Cysteinpeptidasen aus Ricinosomen oder den KV beteiligt. In einigen Versuchen konnte die Bildung von Rubisco-Fragmenten in Blattextrakten oder nach der Behandlung von Rubisco mit vakuolären Lysaten gezeigt werden. Diese Situation ist vergleichbar mit dem Verlust der Membranintegrität bei Zelltodprozessen. So wurde beispielsweise durch Zhang *et al.* (2005) ein 50 kDa-Fragment von RbcL im Blattextrakt aus Weizenprimärblättern immunologisch nachgewiesen. Die Bildung des Fragmentes konnte mithilfe von E-64, einem Cysteinpeptidase-Inhibitor, gehemmt werden. Ähnlich große Abbauprodukte (52,1 kDa, 50,9 kDa und 50,1 kDa) ließen sich nach der Inkubation isolierter Rubisco mit Vakuolenlysaten aus Blättern von Weizen (*Triticum aestivum*) beobachten (Bhalla und Dalling, 1986). Ebenso konnte nach der Behandlung von Rubisco mit Extrakten aus Primärblättern der Gerste ein 50 kDa-Fragment detektiert werden (Thomas und Huffaker, 1981). Zudem wurden dabei RbcL-Fragmente mit einer Größe von 42,2 kDa, 37,3 kDa, 33,1 kDa, 22,4 kDa und 18,8 kDa nachgewiesen. Yoshida und Minamikawa (1996) konnten einen stufenweisen Abbau von RbcL, der vom N-Terminus ausgeht, nachweisen. Dazu inkubierten sie Extrakte aus Primärblättern der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*), sowie isolierte Rubisco mit Vakuolenlysaten der Bohne. Experimente mit Inhibitoren bzw. mit der KDEL-CysEP SH-EP aus Mungobohne (*V. mungo*) zeigten, dass der Abbau der 53 kDa großen RbcL durch eine Cysteinpeptidase zu einem 50 kDa-Produkt und weiter zu einem 48 kDa-Produkt führt. Dies kann wiederum durch eine Serinprotease über ein 42 kDa-Produkt zu einem 41 kDa-Produkt

abgebaut werden. All diese Beispiele zeigen, wie der Abbau von RbcL außerhalb der Chloroplasten ablaufen kann.

Auch innerhalb der Chloroplasten gibt es zahlreiche Faktoren, die einen Abbau von Rubisco bzw. RbcL bedingen. So kann eine Oxidation von Rubisco dessen Abbau stark begünstigen oder sogar direkt bewirken. Das Protein wird daher vermehrt unter Stressbedingungen oder während der Seneszenz oxidiert, wenn vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) auftreten. Bereits Pefiarrubia und Moreno (1990) konnten zeigen, dass die oxidierte Form von Rubisco anfälliger für den Abbau durch bekannte Proteasen wie Papain und Trypsin ist als die reduzierte. Außerdem erhöht die Oxidation von bestimmten Cysteinresten von RbcL die Bindung an die Chloroplastenmembranen. Die verringerte Löslichkeit und auch die verringerte Stabilität von Rubisco in seiner oxidierten Form lässt sich auf die Vernetzung der Proteine untereinander durch Disulfidbrücken und die dadurch bewirkte Aggregatbildung zurückführen. Dies kann zum einen als Markierung für den Abbau dienen oder für den Transport von Rubisco aus den Chloroplasten nötig sein (Mehta *et al.*, 1992; Moreno *et al.*, 2008). Neben der verringerten Löslichkeit von Rubisco konnte bei einer induzierten ROS-Bildung in isolierten Chloroplasten aus Gerste (*H. vulgare*) das Auftreten von RbcL-Fragmenten beobachtet werden. Das häufigste Abbauprodukt hatte dabei eine Größe von 36 kDa (Desimone *et al.*, 1996; Desimone *et al.*, 1998). Ishida *et al.* (1997) zeigten, dass RbcL ohne Einfluss von Enzymen direkt durch ROS in ein 37 kDa- und ein 16 kDa-Fragment gespalten werden kann. Ähnliches konnte in Gurkenblattsegmenten beobachtet werden, in denen die ROS-Produktion induziert wurde. Es traten dabei RbcL-Fragmente mit Größen von 45 kDa, 43 kDa, 42 kDa, 37 kDa und 33 kDa auf. Diese waren zudem *in vitro* nach einer Behandlung von Rubisco mit Hydroxylradikalen ($\bullet\text{OH}$) nachweisbar (Nakano *et al.*, 2006). Die Spaltung von Rubisco durch ROS kann auch durch Metallionen wie Fe^{2+} -Ionen katalysiert werden, was an isolierter Rubisco gezeigt wurde (Luo *et al.*, 2002).

RbcL kann in den Chloroplasten auch proteolytisch gespalten werden, die beteiligten Proteasen sind jedoch meist unbekannt. Die Reaktionen, die zur Bildung von unterschiedlichen RbcL-Fragmenten führen, sind abhängig von dem Aktivierungszustand der Rubisco und von den vorherrschenden Bedingungen wie dem pH-Wert, dem Energiezustand, den Redoxbedingungen und Metaboliten. Die aktive Form von Rubisco ist beispielsweise deutlich stabiler gegenüber dem Abbau durch CND41, einer DNA-bindenden Aspartatprotease aus Tabak (*Nicotiana tabacum*), als die inaktive Form (Kato *et al.*, 2004). Unter Hypoxie konnten in Weizen-, Bohnen- und Gurkenblättern RbcL-Abbauprodukte mit einer Größe von 45 kDa und 30 kDa nachgewiesen werden (Hildbrand *et al.*, 1994). Rubisco war dabei anders als beim Abbau unter Beteiligung von ROS nicht verstärkt an die Membranen gebunden. In isolierten, intakten Chloroplasten aus Erbse (*Pisum sativum*) wurden Fragmente mit ähnlichen Größen beobachtet. Nach der Inkubation im Licht waren Abbauprodukte mit einer Größe von 45 kDa, 42 kDa, 37 kDa und 32 kDa detektierbar, im Dunkeln trat nur ein Abbauprodukt von 37 kDa auf. Diese Fragmente besaßen

noch einen intakten N-Terminus, wodurch der Abbau, der zu diesen spezifischen Fragmenten führt, stufenweise vom C-Terminus ausgehend ablaufen muss. Dieser Abbau wird mindestens teilweise durch eine Zink-Metalloprotease katalysiert (Mitsuhashi und Feller, 1992; Bushnell *et al.*, 1993; Roulin und Feller, 1998).

In zahlreichen Untersuchungen konnten auch Fragmente von RbcL detektiert werden, bei denen der N-Terminus fehlt. In Weizenblättern trat bei niedriger Kohlenhydrat- und CO₂-Verfügbarkeit oder auch bei dunkel-induzierter und natürlicher Seneszenz ein 50 kDa-Fragment ohne N-terminale Sequenz auf (Hörtensteiner und Feller, 2002; Rui und Xu, 2004; Thoenen *et al.*, 2007). Interessanterweise findet diese Abspaltung statt, wenn RbcL noch in das Rubisco-Holoenzym integriert ist (Rui und Xu, 2004; Thoenen *et al.*, 2007). Außerdem konnte in Weizenblättern und auch in Lysaten von Weizenchloroplasten ein 44 kDa-Fragment nachgewiesen werden (Kokubun *et al.* 2002; Rui und Xu, 2004). Mithilfe der Chloroplastenlysate konnte gezeigt werden, dass das RbcL spezifisch zwischen den nach außen gewandten Phe-40 und Arg-41 gespalten wird (Kokubun *et al.* 2002). Mae *et al.* (1989) zeigten ein pH-abhängiges Auftreten von Abbauprodukten mit einer Größe von 50,5 kDa, 48,5 kDa, 47 kDa, 46 kDa und 35 kDa. Insgesamt war der N-terminale Abbau von RbcL bei einem pH von 5-6 am stärksten, lief aber durchaus auch bei pH 7,5 ab (Mae *et al.*, 1989; Rui und Xu, 2004). In Segmenten von Haferblättern, die mit dem seneszenzinduzierenden Pilztoxin Victorin inkubiert wurden, konnte neben dem kompletten RbcL hier mit einem Molekulargewicht von 55 kDa ein Abbauprodukt mit 53 kDa nachgewiesen werden (Navarre und Wolpert, 1999). Dieser Prozessierungsschritt, bei dem die ersten 14 Aminosäuren vom N-Terminus abgespalten werden, könnte sehr wahrscheinlich der vorher beschriebenen Prozessierung des RbcL in Weizen entsprechen, die zur Bildung des 50 kDa-Fragments führt. Inhibitorexperimente zeigten, dass diese N-terminale Spaltung von RbcL durch eine bisher unbekannte Cysteinpeptidase katalysiert wird (Mae *et al.*, 1989; Navarre und Wolpert, 1999; Thoenen *et al.*, 2007).

Bei dieser Cysteinpeptidase könnte es sich um HvPAP14 und zu ihr orthologe Proteine handeln. Sowohl in den *in vitro*- als auch in den *in vivo*-Analysen stromaler HvPAP14-Substrate trat ebenfalls ein etwa 50 kDa großes RbcL-Fragment auf (Abb. 3.12 und 3.18). Dafür spricht zudem der pH-Wert, bei dem der Abbau erfolgt. Es wurde gezeigt, dass der Abbau von RbcL am stärksten bei pH 5-6 abläuft, aber auch bei einem pH-Wert von 7,5, der etwa dem physiologischen pH des Stromas entspricht (Mae *et al.*, 1989; Rui und Xu, 2004). HvPAP14 wird in einem sauren Milieu aktiviert und ist in einem pH-Bereich von 4,5 bis 7 am aktivsten, was mit den bekannten Bedingungen für den Abbau von RbcL übereinstimmt. Außerdem tritt das 50 kDa große RbcL-Fragment häufig im Zusammenhang mit Seneszenzprozessen auf. Da es während der Seneszenz zu einer erhöhten HvPAP14-Expression sowie zu einer Anreicherung der aktiven Proteinform kommt (Hollmann *et al.*, 2014; Hollmann, 2016), bekräftigt auch dies die Rolle von HvPAP14 bei dem Abbau von RbcL.

In den *HvPAP14*-überexprimierenden Zellen waren neben dem 50 kDa großen Abbauprodukt weitere Fragmente mit einer Größe von etwa 47 kDa, 44 kDa, 41 kDa, 29 kDa und 28 kDa detektierbar (Abb. 3.18). Dies spricht dafür, dass *HvPAP14* den ersten Schritt der RbcL-Degradation katalysiert, bei dem das Protein ggf. noch im Rubisco-Holoenzym integriert ist. Der weitere Abbau kann anschließend durch weitere Faktoren bewirkt werden, die *in vivo* vorhanden sind, unter den gewählten Bedingungen bei den *in vitro*-Analysen jedoch fehlen. Dies könnten andere Peptidasen sein, die den weiteren Abbau des 50 kDa-Fragments katalysieren, oder bestimmte Modifikationen (z.B. Oxidationen) an dem Protein, die den weiteren Abbau dieses Fragmentes durch *HvPAP14* ermöglichen. Die Beteiligung stromaler Peptidasen ist dabei eher unwahrscheinlich, da diese in der mit *HvPAP14* behandelten Stromafraktion vorhanden gewesen sein müssten. Eventuell sind Peptidasen beteiligt, die an Membranen gebunden vorliegen. Da bereits gezeigt wurde, dass Zink-Metalloproteasen die Spaltung von RbcL katalysieren können, ist das Mitwirken von membrangebundenen Zink-Metalloproteasen wie den FTSH-Proteasen wahrscheinlich. Bei den Metalloprotease-bedingten Abbauprozessen waren vor allem Produkte mit einer Größe von 45 kDa und 32 kDa detektierbar (Bushnell *et al.*, 1993; Roulin und Feller, 1998). Diese entsprechen möglicherweise den ca. 44 kDa und 29 kDa großen RbcL-Fragmenten, die in den *HvPAP14*-überexprimierenden Protoplasten auftreten. Ebenfalls ist ein Transport der RbcL-Fragmente aus den Chloroplasten heraus zum weiteren Abbau in vakuolären Kompartimenten denkbar. Hier könnte, wie bereits durch Yoshida und Minamikawa (1996) gezeigt, eine Serinpeptidase für die weitere Degradation verantwortlich sein. Die dabei detektierten Fragmente mit 48 kDa, 42 kDa und 41 kDa könnten z.T. den in den *HvPAP14*-überexprimierenden Protoplasten nachgewiesenen RbcL-Fragmenten mit einer Größe von ca. 47 kDa und 41 kDa entsprechen.

4.2.2 PSII- und LHC-Proteine als Substrate von *HvPAP14*

Neben RbcL konnten auch Thylakoidmembranproteine des Fotosyntheseapparats als Substrat der *HvPAP14* identifiziert werden. In der *in vitro*-Analyse, bei der Thylakoidmembranfraktionen mit isolierter *HvPAP14* behandelt wurden, konnte der Abbau von PSBO, LHCII-Trimer-Proteinen (im Speziellen LHCB1), LHCB4, LHCB5 und LHCA3 beobachtet werden. In *HvPAP14*-überexprimierenden Protoplasten wurden ebenfalls die Proteine PSBO, LHCB1, LHCB5 und LHCA3 abgebaut (Tab. 4.1). LHCA3 ist Teil des LHCI, der zum PSI gehört. Die anderen Proteine sind alle im PSII-LHCII-Superkomplex enthalten, der sich aus einem meist dimeren PSII-Kernkomplex zusammensetzt, der von LHCII-Trimeren (aus LHCB1, LHCB2 und LHCB3) sowie von monomeren LHCB4 (CP29), LHCB5 (CP26) und LHCB6 (CP24) umgeben wird. Die LHC-Proteine sind integrale Membranproteine. Sie können Pigmente wie Chlorophyll a, Chlorophyll b, Lutein, Violaxanthin, Zeaxanthin und Antheraxanthin binden und so als Antennen der Sammlung von Lichtenergie dienen. Diese wird in Form von Anregungsenergie an den PSII-Kernkomplex weitergeleitet und ermöglicht die Fotosynthese

(Luciński und Jackowski, 2006). Die trimeren LHCII-Komplexe aus LHCB1, LHCB2 und LHCB3 enthalten 50-60% des gesamten Chlorophylls der Pflanzenzellen und nehmen etwa ein Drittel der Thylakoidmembranproteine ein. Damit sind sie die häufigsten Proteine der Thylakoide (Chitnis und Thornber, 1988; Luciński und Jackowski, 2006). Die Zusammensetzung des Trimers variiert, es ist *in vivo* jedoch stets LHCB1 enthalten. LHCB3 ist mit maximal 11% des Apoproteingehalts am wenigsten in den Trimeren vertreten (Jackowski und Jansson, 1998; Jackowski *et al.*, 2001).

Der PSII-Kernkomplex besteht aus einer Vielzahl von Proteinen. Das Zentrum des Komplexes wird von einem Heterodimer aus PsbA (D1) und PsbD (D2) gebildet, an das das Chlorophyll des Reaktionszentrums P680 sowie am Elektronentransport beteiligte Kofaktoren gebunden sind. Die Proteine PsbB und PsbC bilden zusammen mit Chlorophyll a und β -Carotin die inneren Lichtsammelkomplexe CP47 und CP43 (Barber *et al.*, 1997). Sie können zudem mit den extrinsischen PSII-Proteinen PSBO (OEC33), PSBP (OEC23) und PSBQ (OEC17) interagieren, die die Spaltung von Wasser am Mn_4O_5Ca -Cluster des OEC unterstützen, was zur Freisetzung von Elektronen unter Bildung von Sauerstoff führt (Bricker *et al.*, 2012).

Die Bindung zwischen dem PSII-Kernkomplex und dem LHCII-Trimer kann durch eine reversible Phosphorylierung des LHCB1 und des LHCB2 gelöst werden, die von Licht- und Redoxbedingungen abhängig ist. Dadurch kann das LHCII-Trimer an das PSI binden (Allen und Forsberg, 2001; Lunde *et al.*, 2001). Somit gilt das LHCII als Schlüsselkomponente für die Regulierung und Verteilung der Anregungsenergie auf die Fotosysteme als Reaktion auf sich verändernde Lichtbedingungen.

In Pflanzen kann in bestimmten Entwicklungsphasen oder unter bestimmten meist extremen Umweltbedingungen neben dem Abbau von Rubisco auch der Abbau von Thylakoidmembranproteinen induziert werden. In Gerstenblättern der Sorte Lomerit konnte gezeigt werden, dass die Mengen an RbcL und der LHCB-Proteine während der Seneszenz gleichzeitig abnehmen (Krupinska *et al.*, 2012), wohingegen RbcL in den Blättern der Sorte Carina deutlich schneller als die LHCB-Proteine abgebaut wird (Humbeck *et al.*, 1996). Dies deutet darauf hin, dass es sowohl gemeinsame als auch jeweils spezifische Abbauewege gibt. Ein Weg ist die Zersetzung ganzer Chloroplasten nach der Aufnahme in die Vakuole mittels Autophagozytose. Des Weiteren findet der Abbau der Thylakoidmembranproteine wahrscheinlich überwiegend innerhalb der Chloroplasten statt, jedoch ist bisher nur wenig über den genauen Ablauf bekannt. Die Hydrolyse der Membranproteine könnte durch membranständige Proteasen katalysiert werden. Neben den bereits bekannten Peptidasen wie FTSH- und DEG-Proteasen könnte auch HvPAP14 am Abbau der Membranproteine beteiligt sein.

Für die zum OEC gehörende PSII-Untereinheit PSBO konnte ein Abbau durch HvPAP14 gezeigt werden. Durch die Behandlung von Thylakoidfraktionen mit rekombinanter HvPAP14 trat *in vitro* eine etwa 22 kDa große Bande bei deutlicher Abnahme der etwa 30 kDa großen PSBO-Bande auf

(Abb. 3.15). In den *HvPAP14*-überexprimierenden Protoplasten waren Fragmenten mit etwa 27 kDa, 26 kDa und eine Doppelbande bei etwa 21 kDa detektierbar (Abb. 3.18). PSBO ist auf der luminalen Seite durch die reversible Bindung an weitere Untereinheiten des PSII mit der Thylakoidmembran verbunden und stabilisiert das Mn_4O_5Ca -Cluster des OEC. Es ist in allen Organismen zu finden, die oxygene Fotosynthese betreiben (De Las Rivas und Barber, 2004; Ferreira *et al.*, 2004; Roberts *et al.*, 2012). Außerdem konnten GTPase- (Spetea *et al.*, 2004; Lundin *et al.*, 2007) und Carboanhydrase-Aktivitäten von PSBO (Lu *et al.*, 2005) sowie eine mögliche Ca^{2+} -Bindung an das Protein nachgewiesen werden (Heredia und De Las Rivas, 2003; Murray und Barber, 2006). Die pH-Änderungen des Lumens durch wechselnde Lichtbedingungen führen zu Konformationsänderungen des PSBO, beeinflussen jedoch nicht die Stabilität des Proteins (Hashimoto *et al.*, 1996; Shutova *et al.*, 2005). Dagegen hängt die Stabilität des Proteins stark vom Redoxstatus ab. PSBO enthält zwei konservierte Cysteinreste, die unter oxidierenden Bedingungen wie im Thylakoidlumen (bei Licht) eine Disulfidbrücke ausbilden können (Buchanan und Luan, 2005; Nikitina *et al.*, 2008). Diese ist für die Faltung und Stabilität des Proteins von großer Bedeutung. Nach der Reduktion dieser Disulfidbrücke ist der Abbau des PSBO deutlich erhöht (Hashimoto *et al.*, 1997; Hall *et al.*, 2010; Karamoko *et al.*, 2011; Roberts *et al.*, 2012). Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass PSBO durch Serinproteasen der DEG-Familie gespalten werden kann. Die Inkubation von PSBO aus Spinat mit der rekombinanten DEG-Protease HhoA aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 führte zu Spaltungen nahe des N-Terminus unter Bildung von Fragmenten mit Größen von 32 kDa, 29 kDa, 27 kDa, und 24 kDa (Roberts *et al.*, 2012). Außerdem konnte der Abbau von *in vitro*-translatiertem PSBO durch rekombinantes DEG1 aus Arabidopsis gezeigt werden (Chassin *et al.*, 2002). Li *et al.* (2010) beobachteten hingegen in DEG1-defizienten *A. thaliana*-Mutanten PSBO-Abbauprodukte mit einem Molekulargewicht von 25 kDa und 22 kDa, die vermehrt bei hoher Lichtintensität auftraten. In den Wildtyp-Pflanzen, die DEG1 enthielten, waren diese Abbauprodukte nicht detektierbar. Dies spricht insgesamt dafür, dass DEG1 an dem Abbau der Proteinfragmente beteiligt ist, nachdem der Abbau von PSBO durch eine andere Protease initiiert wurde.

Das in der *in vitro*-Analyse nach einem Verdau mit rekombinanter *HvPAP14* detektierbare PSBO-Abbauprodukt mit einem Molekulargewicht von 22 kDa bzw. die in den *HvPAP14*-überexprimierenden Protoplasten auftretenden Fragmente mit einem Molekulargewicht von etwa 27 kDa, 26 kDa und 21 kDa könnten teilweise mit den PSBO-Abbauprodukten der DEG1-defizienten *A. thaliana*-Mutanten mit 25 kDa und 22 kDa übereinstimmen. Das ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass *HvPAP14* bzw. orthologe Peptidasen möglicherweise den Abbau von PSBO initiieren, der dann mithilfe von anderen Peptidasen wie DEG1 fortgesetzt wird.

Ein lichtabhängiger Abbau von PSBO konnte auf Hydroxylradikale zurückgeführt werden (Henmi *et al.*, 2004), die wie andere ROS durch überschüssige Anregungsenergie und Elektronenfreisetzung bei erhöhter Lichteinstrahlung entstehen. Auch andere Proteine sind von dieser Fotoinhibierung betroffen.

Besonders anfällig für oxidative Schäden ist das PsbA-Protein (D1) des PSII-Reaktionszentrums, das bereits unter normalen Lichtbedingungen relativ kurzlebig ist (Aro *et al.*, 2004). Durch die stetigen fotooxidativen Schädigungen am Fotosyntheseapparat unter Lichteinwirkung müssen die betroffenen Proteine abgebaut werden, um durch intakte Proteine ersetzt werden zu können (Aro *et al.*, 1993; Melis, 1999; Nixon *et al.*, 2005). Um die Anregungsenergie im PSII zu vermindern, erfolgt zur Anpassung an die Lichtbedingungen eine Umverteilung der LHCII-Trimere zwischen dem PSII und dem PSI (Ballottari *et al.*, 2007). Außerdem kann die Anpassung über die Veränderungen der LHC-Mengen erfolgen. Bei der Adaptation an Starklicht werden die Proteine des LHCII-Trimers (LHCB1, LHCB2 und LHCB3) und auch LHCB6 (CP24) verstärkt abgebaut (Ballottari *et al.*, 2007). So kann weniger Anregungsenergie an die PSII-Reaktionszentren geleitet und überschüssige Energie bzw. freiwerdende Elektronen verringert werden, die zur Bildung von ROS und damit zu den Schäden führen würden. Die relativen Mengen von LHCB4 (CP29), LHCB5 (CP26) sowie der Proteine des LHCI bleiben hingegen annähernd unverändert (Ballottari *et al.*, 2007). Nur während der Seneszenz scheint auch der Abbau von LHCB4 (CP29) wichtig für den Schutz gegen fotooxidativen Stress zu sein (Humbeck und Krupinska, 2003). Unter normalen Wachstumsbedingungen gelten die LHC-Proteine allerdings als relativ langlebig (Schmid, 2008).

Der Abbau der pigmentbindenden Proteine der Lichtsammelkomplexe hängt außerdem stark von dem Abbau der Chlorophylle ab bzw. wird dadurch erst möglich, da die Chlorophylle zur Stabilität der Komplexe beitragen. Käme es zur Freisetzung ungebundener Chlorophyll-Moleküle, wenn der Abbau der Proteine zuerst erfolgen würde, würden bei Lichteinwirkung durch die ungerichtete Energieübertragung gehäuft ROS entstehen (White und Green, 1987; Horie *et al.*, 2009).

Die Untersuchungen an Thylakoidfraktionen, die mit rekombinanter HvPAP14 behandelt wurden, zeigten einen Abbau des LHCII-Trimers (Abb. 3.15). Die Hauptproteinbande von ca. 26 kDa wurde deutlich verringert und zudem waren Fragmente mit einer Größe von etwa 23-25 kDa detektierbar. Der immunologische Nachweis von LHCB1 zeigte nach der Inkubation mit HvPAP14 jedoch nur eine neu auftretende Doppelbande bei etwa 25 kDa (Abb. 3.15). Somit ist HvPAP14 in der Lage auch LHCB2 bzw. LHCB3 zu spalten. In den *in vivo*-Analysen mit *HvPAP14*-überexprimierenden Protoplasten war ausschließlich der Abbau von LHCB1 nachweisbar (Abb. 3.18). Da hier keine Proteinfragmente detektierbar waren, scheint es zu einem weiteren Abbau mithilfe anderer Proteasen zu kommen.

Es konnte zuvor gezeigt werden, dass eine Serin- oder Cysteinpeptidase am Abbau der LHCII-Proteine unter der Anpassung an Starklicht beteiligt ist. Die betroffene Peptidase ist ATP-abhängig und liegt gebunden an der stromalen Seite der Thylakoidmembran vor. Von dem Abbau betroffen sind besonders dephosphorylierte und als Monomer vorliegende LHCII-Proteine. Für die Erkennung durch die Protease spielen die N-terminalen Domänen der Proteine eine wichtige Rolle (Lindahl *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2000). Untersuchungen an isolierten Thylakoiden durch Georgakopoulos *et al.* (2002)

lieferten ebenfalls Hinweise auf einen Abbau von LHCII durch eine mit den Thylakoiden assoziierte Cysteinpeptidase. Diese Protease ist an das LHCII-Trimer gebunden, hat ein Molekulargewicht von etwa 140 kDa und ist durch EDTA inhibierbar. Bei den genannten Peptidasen scheint es sich aufgrund der abweichenden biochemischen Eigenschaften, Lokalisationen bzw. Molekulargewichte nicht um HvPAP14 zu handeln. *In vivo* konnten im Allgemeinen bisher keine Abbauprodukte der LHC-Proteine detektiert werden, was dafür spricht, dass der Abbau dieser Proteine nach einem initialen proteolytischen Schritt sehr schnell verläuft und wahrscheinlich mehrere Proteasen daran beteiligt sind.

Der proteolytische Abbauprozess im N-terminalen Bereich von LHCB1 konnte auf das Zusammenwirken einer stromalen Serinpeptidase mit einer weiteren an die Thylakoidmembran gebundenen Cysteinpeptidase zurückgeführt werden (Forsberg *et al.*, 2005). Letztere ist unabhängig von ATP und weist unter reduzierenden Bedingungen eine erhöhte Aktivität auf, was Parallelen zu HvPAP14 erkennen lässt. Durch Želisko *et al.* (2005) wurde mithilfe von isolierten Thylakoiden FTSH6-defizienter *A. thaliana* zudem eine seneszenz- oder starklichtbedingte Spaltung des LHCB1 sowie des LHCB3 durch die Metalloprotease FTSH6 gezeigt. Durch umfassendere Analysen mit verschiedenen FTSH6-defizienten *A. thaliana*-Linien konnte die Beteiligung von FTSH6 an dem Abbau von LHCB1 und LHCB3 jedoch nicht bestätigt werden (Wagner *et al.*, 2011).

Die Analyse der Gerstenmutanten Chlorina-117, -126 und -134, die nur Spuren von LHCB1 und keine nachweisbaren Mengen an LHCB3 enthalten (Bossmann *et al.*, 1997), unterstützt die Annahme, dass HvPAP14 eine wichtige Rolle beim Abbau von mindestens einem dieser LHCB-Apoproteine spielt. In den untersuchten Chlorina-Mutanten war im Unterschied zu den Kontrollpflanzen der Gerstensorte Golden Promise eine 61 kDa große HvPAP14-Form detektierbar, die u.a. in den Plastidenmembranen lokalisiert werden konnte (Abb. 3.19a und 3.19c). Bei dieser Form könnte es sich um eine Speicherform handeln. Die Kontrollpflanzen enthielt hingegen größere Mengen der potentiell prozessierten inaktiven 32 kDa-Form der HvPAP14 und der potentiell aktiven HvPAP14-Form mit 26 kDa als die Chlorina-Mutanten. Das lässt darauf schließen, dass der Bedarf an der aktiven Form der HvPAP14 durch das Fehlen der möglichen Substrate in den Chlorina-Mutanten geringer ist. Die Expression des *HvPAP14*-Gens war sowohl in den Golden Promise-Pflanzen als auch in den Chlorina-Mutanten schwach und variierte nur leicht (Abb. 3.19b), was für eine Regulation der HvPAP14 auf Proteinebene spricht. Die LHC-Proteine könnten indirekt an dem Aktivierungsprozess von HvPAP14 beteiligt sein, indem sie im Rahmen des Fotosyntheseprozesses beispielsweise Einfluss auf die Ionenbedingungen nehmen.

Die Aminosäuresequenzen von LHCB1, LHCB2 und LHCB3 weisen eine hohe Ähnlichkeit auf (Jansson, 1994; Luciński und Jackowski, 2006), wodurch der Abbau dieser Proteine möglicherweise nach dem gleichen Mechanismus ablaufen könnte. Sie besitzen zudem zahlreiche konservierte Aminosäurereste, die auch in LHCB4, LHCB5 und LHCB6 zu finden sind (Jansson, 1994; Luciński und Jackowski, 2006). Unter fotoinhibitorischen Bedingungen kann der Abbau von LHCB4 und LHCB5,

ähnlich wie bei PSBO, durch die ATP-unabhängige Serinprotease DEG1 aus *A. thaliana* erfolgen (Zienkiewicz *et al.*, 2012). Da auch bei diesen Proteinen zuvor *in vivo* keine Abbauprodukte nachgewiesen werden konnten, erfolgt wahrscheinlich auch hierbei ein rapider Abbau nach Beginn der Proteolyse, bei dem mehrere Proteasen beteiligt sind. Bei einer dieser Proteasen könnte es sich um HvPAP14 oder einem zu ihr orthologen Protein handeln.

Durch die Behandlung von Thylakoidfraktionen mit der rekombinanten HvPAP14 *in vitro* konnte sowohl die Spaltung von LHCB4 als auch von LHCB5 beobachtet werden. Anstelle des 28 kDa großen LHCB4 war eine Doppelbande bei etwa 27 kDa nachweisbar (Abb. 3.15). Nach dem Abbau des LHCB5 (27 kDa) entstanden Fragmente mit einer Größe von 26 kDa und 25 kDa (Abb. 3.15). Diese waren im Verhältnis zum unprozessierten LHCB5 in deutlich geringerer Menge vorhanden. Dies spricht dafür, dass entweder noch weitere Abbauprodukte durch HvPAP14 entstehen können, die in nicht nachweisbaren Mengen vorliegen, oder dass auch die detektierbaren Fragmente durch HvPAP14 weiter abgebaut werden können. Bei den *in vivo*-Untersuchungen trat in den Protoplasten mit erhöhter HvPAP14-Menge ebenfalls ein LHCB5-Abbauprodukt mit der Größe von 25 kDa auf (Abb. 3.18), was eine mögliche Relevanz von HvPAP14 beim Abbau des Proteins bestätigt. Der Abbau von LHCB4 konnte hingegen nur *in vitro* (Abb. 3.15), aber nicht in den *HvPAP14*-überexprimierenden Gerstenzellen nachgewiesen werden (Abb. 3.18).

Ein weiteres Protein, das durch HvPAP14 geschnitten werden kann, ist LHCA3. Bei den *in vitro*-Untersuchungen mit HvPAP14 kam es nach der Zugabe der Protease zu einer deutlichen Abnahme in der Menge des 25,5 kDa großen LHCA3 (Abb. 3.15). Nachweisbare Abbauprodukte traten jedoch nicht auf. In den *HvPAP14*-überexprimierenden Gerstenprotoplasten nahm ebenfalls die Menge des LHCA3 ab, wenn auch nur geringfügig. Zudem war ein Fragment mit ca. 25 kDa direkt unterhalb der Hauptbande nachweisbar (Abb. 3.18). LHCA3 ist Teil des peripheren Antennenkomplexes des PSI, der neben LHCA3 aus LHCA1, LHCA2 und LHCA4 besteht (Gobets und van Grondelle, 2001; Castelletti *et al.*, 2003). Diese vier Proteine liegen etwa in den gleichen Mengen vor (Jansson, 1994). LHCA1 und LHCA4 bilden zusammen ein Heterodimer, LHCA2 und LHCA3 kommen eher als Homodimer vor, können zusammen aber ebenfalls zu einem Heterodimer assemblieren (Jansson *et al.*, 1996; Schmid *et al.*, 1997; Wientjes und Croce, 2011). Für LHCA3 wurde gezeigt, dass es wahrscheinlich bei der Entgiftung von ROS bei Eisenmangel eine Rolle spielt. Zum einen kann die N-terminale Prozessierung von LHCA3 zur Remodellierung des PSI-LHCI-Superkomplexes beitragen. Die prozessierte Proteinform sorgt dabei für die Stabilität der LHCI-Struktur (Naumann *et al.*, 2005). Zum anderen wurde gezeigt, dass bei Eisenmangel neben anderen LHCI- und PSI-Proteinen besonders LHCA3 und LHCA4 abgebaut werden (Yadavalli *et al.*, 2012). Das LHCA3-Fragment mit ca. 25 kDa, das in den *HvPAP14*-überexprimierenden Protoplasten auftrat, könnte mit der N-terminal prozessierten Form übereinstimmen, die durch Naumann *et al.* (2005) gefunden wurde, was für eine Rolle von HvPAP14 bei der Reaktion auf Eisenmangel sprechen würde.

Durch einen Vergleich der Aminosäuresequenzen der ermittelten HvPAP14-Substrate konnte keine spezifische Erkennungssequenz identifiziert werden. Das spricht für ein breites Spektrum an Aminosäureabfolgen, die durch HvPAP14 gespalten werden können, wie es auch für andere KDEL-CysEP beschrieben wurde (Than *et al.*, 2004; Helm *et al.*, 2008; Hierl *et al.*, 2014). Da meist Fragmente durch HvPAP14 erzeugt werden, ist dennoch ist eine gewisse Substratspezifität vorhanden.

4.3 Funktionen von HvPAP14

In seneszenten Gerstenblättern ist die Expression des *HvPAP14*-Gens stark hochreguliert und es kommt außerdem zu einem deutlichen Anstieg der Proteinmenge der HvPAP14. Die betrifft sowohl die inaktiven Proteinformen als auch die aktive Form (Hollmann *et al.*, 2014; Hollmann, 2016). Dies legt nahe, dass die Cysteinpeptidase eine Rolle bei der Remobilisierung von Nährstoffen während der späten Blattentwicklung spielt. Zu den ermittelten Substraten der HvPAP14 zählen die große Untereinheit von Rubisco (RbcL) und verschiedene Proteine der Lichtsammelkomplexe. Diese Proteine bilden bei den Remobilisierungsprozessen während Seneszenz die Hauptquelle von Stickstoff, was die Wichtigkeit von HvPAP14 bei diesen Prozessen bestätigt.

Auch in nicht seneszenten Blättern und auch in untransformierten Gerstenprotoplasten liegen nachweisbare Mengen von HvPAP14 vor (Abb. 3.16, 3.19 und 3.20). Dadurch scheint HvPAP14 noch eine weitere Funktion einzunehmen, die entwicklungsunabhängig ist. So ist die Cysteinpeptidase wahrscheinlich als Haushaltsprotein am stetigen Umsatz der Chloroplastenproteine und an Regulationen unter Stressbedingungen beteiligt. HvPAP14 könnte beispielsweise durch ROS beschädigte Proteine abbauen, damit diese durch intakte ersetzt werden können. Sie könnte auch bei der Prozessierung von LHCA3 als Reaktion auf Eisenmangel eine Rolle spielen (Kap. 4.2.2, Naumann *et al.*, 2005). Außerdem kann durch HvPAP14 ein Abbau weiterer LHC-Proteine erfolgen. Die Regulation der Menge der LHC-Proteine ist ein wichtiger Faktor bei der Adaptation von Pflanzen an verschiedene Lichtbedingungen. Interessanterweise traten in den Primärblättern von Gerstenpflanzen, die in Licht unterschiedlicher Intensität angezogen wurden, unterschiedliche Proteinformen bzw. verschiedene Mengen der Proteinformen auf (Abb. 3.20). So zeigte sich in etioliert angezogenen Gerstenblättern eine 61 kDa große Form der HvPAP14, die in ergrünt Blättern nicht oder nur in Spuren nachweisbar ist. Die prozessierte 32 kDa-Form war dagegen kaum in etiolierten, aber in größeren Mengen in ergrünt Blättern zu finden. Die Menge der inaktiven unprozessierten HvPAP14-Form mit einer Größe von 40 kDa, die in etiolierten und ergrünt Blättern am stärksten vorhanden war, nahm in den ergrünt Blättern mit steigender Lichtintensität zu. Die potentiell aktive HvPAP14 akkumulierte besonders bei Schwachlicht, nicht jedoch in etiolierten Blättern. Somit scheint es eine lichtabhängige Regulation der HvPAP14 zu geben, bei der es in ergrünt Pflanzen zu einer erhöhten Akkumulation des inaktiven Proteins sowie ein erhöhter Umsatz der aktiven Form mit zunehmender Lichtintensität kommt.

Das Auftreten der verschiedenen HvPAP14-Formen steht höchst wahrscheinlich im engen Zusammenhang mit dem intrazellulären Transport, der Speicherung und Aktivierung der HvPAP14. Die Aktivierung und Aktivität von Proteasen muss streng reguliert werden, um übermäßigen bzw. unkontrollierten Abbau von Proteinen zu vermeiden und damit die Funktion der Kompartimente und die Vitalität der Zelle aufrecht zu erhalten. Eine Protease sollte bei Bedarf am richtigen Ort wirken. Bei der 61 kDa großen HvPAP14-Form handelt es sich möglicherweise um eine Transport- oder Speicherform, an die ein weiteres Molekül kovalent gebunden ist. Dabei könnte es sich beispielsweise um ein weiteres Protein handeln. Vielleicht ermöglicht dies den bisher noch ungeklärten Transport der HvPAP14 aus dem ER in die Chloroplasten. Die unprozessierte 40 kDa große Proform der HvPAP14 wird als inaktive Speicherform durch die HDEL-Sequenz im ER oder vom ER stammenden Vesikeln gehalten. Erst die Abspaltung des C-terminalen Bereichs samt HDEL-Sequenz führt zu der 32 kDa großen Proteinform, die nicht mehr im ER zurückgehalten wird und wie die aktive Form in den Thylakoiden zu finden ist. Die aktive Form mit etwa 26 kDa liegt meist in sehr geringen Mengen vor, was für eine gezielte Aktivierung bei Bedarf und einen schnellen, möglicherweise auch autokatalytischen Abbau spricht.

4.4 Ausblick

Die verschiedenen Proteinformen der HvPAP14 konnten zwar nachgewiesen werden, aber ihre genaue molekulare Zusammensetzung bleibt bisher ungeklärt. Dies gilt besonders für die unerwartete 61 kDa große Form. Durch Proteinsequenzierung könnte die Aminosäurezusammensetzung ermittelt und die exakten Prozessierungsstellen bestimmt werden. Zudem sollten zukünftige Analysen klären, ob und welche posttranslationalen Modifikationen (PTM) bei den verschiedenen HvPAP14-Formen vorliegen. So könnte mithilfe von zuckerspaltenden Enzymen wie der Peptid-N-Glycosidase F oder der Endoglycosidase H geklärt werden, ob die 40 kDa große Form oder eine andere HvPAP14-Form glykosyliert ist. Die Wirkung und Funktion dieser PTM auf den Transport, die Stabilität, die Aktivierung und die Aktivität könnte durch einen Austausch der betroffenen Aminosäuren untersucht werden.

Der Transportweg von HvPAP14 aus dem ER in die Chloroplasten ist bisher noch völlig unklar. Um zu prüfen, ob HvPAP14 über den Golgi-Apparat in die Chloroplasten gelangen kann, könnte das Zellgift Brefeldin A eingesetzt werden, das den Zerfall des Golgi-Apparats bewirkt. Ein Transport, der über das ER verläuft, sollte davon nicht beeinflusst werden.

Außerdem wäre es interessant zu klären, wie HvPAP14 an die Thylakoid-Membran binden kann, da es aufgrund der Aminosäuresequenz keine Hinweise darauf gibt. Wahrscheinlich basiert diese Affinität auf einer Bindung zu einem membranständigen Protein. Dies könnte mithilfe der rekombinanten HvPAP14 in einem auf Affinität basierendem Verfahren, wie einem Pull down-Assay oder ELISA, untersucht werden.

Durch die biochemische Analyse und die Bestimmung der Enzymkinetik der rekombinanten HvPAP14 wurde die Grundlage für weitere Untersuchungen geschaffen. So ließe sich die Wirkung von potentiellen Kofaktoren oder Inhibitoren auf HvPAP14 genau ermitteln. Dafür können beispielsweise Inhibitoren wie die natürlich vorkommenden Cystatine eingesetzt werden, denen bereits ein Einfluss auf andere Papain-ähnliche Cysteinpeptidasen nachgewiesen wurde (Martinez *et al.*, 2009).

Die Substratanalysen zeigten, dass verschiedene Fotosynthesepoteine durch HvPAP14 hydrolysiert werden können. Diese liegen in großen Mengen vor und waren in einem SDS-Acrylamidgel nach einer Coomassie-Färbung sichtbar. Durch zukünftige Analysen sollte die Suche nach Substraten mithilfe von Zellfraktionen, die mit rekombinanter HvPAP14 behandelt werden, und mit *HvPAP14*-überexprimierenden Protoplasten fortgesetzt werden, um die Bedeutung und Funktion von HvPAP14 in der pflanzlichen Zelle noch besser zu verstehen. Diese Suche nach Substraten sollte auch Proteine einschließen, die in geringeren Mengen vorliegen. Die bereits nachgewiesenen Substratfragmente könnten zudem sequenziert werden, um Hinweise auf potentielle Erkennungssequenzen zu bekommen. Um die bisherigen Ergebnisse *in planta* zu überprüfen, sollte der Abbau der ermittelten Substrate in Gerstenpflanzen charakterisiert werden, die das *HvPAP14*-Gen überexprimieren oder HvPAP14-defizient sind.

Zudem könnte getestet werden, ob verschiedene Stressbedingungen den Abbau der HvPAP14-Substrate in Gerstenpflanzen beeinflussen und ob dabei bestimmte Substrate bevorzugt abgebaut werden bzw. vermehrt definierte Abbauprodukte auftreten. Da LHCA3 wahrscheinlich an der Entgiftung von ROS bei Eisenmangel beteiligt ist und von HvPAP14 hydrolysiert werden kann, könnte beispielsweise die Rolle von HvPAP14 bei der Reaktion auf Eisenmangel mithilfe von Pflanzen untersucht werden, die mit unterschiedlichen Eisenmengen gedüngt werden.

Da HvPAP14 als erste KDEL-CysEP in den Chloroplasten lokalisiert wurde, wäre es ein wichtiger Schritt das Vorkommen von HvPAP14-Orthologen in Chloroplasten anderer Spezies zu belegen.

5 Zusammenfassung

Bei einer Analyse von seneszenzabhängig exprimierten Genen der Gerste, stach das Gen der Peptidase HvPAP14 durch eine hohe Expression hervor. HvPAP14 ist eine Papain-ähnliche Cysteinpeptidase des KDEL-Typs und besitzt ein inhibitorisches Propeptid, das zur Aktivierung des Enzyms abgespalten wird, und ein C-terminales ER-Retentionssignal, die HDEL-Sequenz. Die inaktiven und aktiven Proteinformen der HvPAP14 reichern sich während der Seneszenz an. In geringeren Mengen ist die Peptidase aber auch in jungen Blättern zu finden. HvPAP14 konnte mithilfe von immunologischen Analysen in Chloroplasten an der Thylakoidmembran lokalisiert werden. Der Abbau plastidärer Proteine ist essentiell für die Funktionserhaltung der Chloroplasten und spielt eine bedeutende Rolle bei Remobilisierungsprozessen während der Seneszenz. Die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) und die Proteine der Thylakoidmembrankomplexe bilden die Hauptquelle des Stickstoffs, der während der Seneszenz remobilisiert wird. Die ersten Schritte des Abbaus erfolgen in den Chloroplasten, bevor die Proteine meist in vakuolären Kompartimenten weiter abgebaut werden. Häufig ist jedoch noch ungeklärt, welche Proteasen am Abbau der Chloroplastenproteine beteiligt sind. Unter den bekannten plastidären Proteasen sind vor allem Serin- oder Metalloproteasen zu finden, allerdings keine Cysteinpeptidasen. In dieser Arbeit sollte nun die Rolle der HvPAP14 beim Abbau von Chloroplastenproteinen untersucht werden.

Da Cysteinpeptidasen meist in vakuolären Kompartimenten auftreten und das Vorkommen in Chloroplasten unerwartet ist, wurde die subzelluläre Lokalisation von HvPAP14 mithilfe von RFP-Fusionsproteinen in lebenden Zellen untersucht. HvPAP14:RFP war im Endoplasmatischen Retikulum, in vesikulären Strukturen und auch an den Thylakoiden der Chloroplasten lokalisiert. Eine biochemische Charakterisierung rekombinanter HvPAP14 ergab, dass die Prozessierung zur Aktivierung der Protease bei einem pH von 4-5 stattfindet und durch reduzierende Bedingungen sowie in Anwesenheit von NO_3^- , SO_4^{2-} - und PO_4^{3-} -Ionen noch begünstigt wird. Die Aktivität des reifen Enzyms wird von diesen Faktoren unter physiologischen Bedingungen nicht beeinflusst. Zn^{2+} -, Cu^{2+} - und Fe^{2+} -Ionen wirken hingegen inhibitorisch auf die aktivierende Prozessierung und die Aktivität von HvPAP14. Potentielle Substrate der Protease wurden zunächst in *in vitro*-Untersuchungen mithilfe rekombinanter HvPAP14 eingegrenzt. Diese waren neben der im Stroma lokalisierten großen Untereinheit der Rubisco RbcL, die Thylakoidmembranproteine PSBO, LHCB1, LHCB2 bzw. LHCB3 sowie LHCB4, LHCB5 und LHCA3. In HvPAP14-überexprimierenden Protoplasten konnte der Abbau von RbcL, PSBO, LHCB1, LHCB5 und LHCA3 *in vivo* bestätigt werden. Dabei traten definierte Fragmente einzelner Substrate auf. Der Abbau von LHC-Proteinen dient der Anpassung der Pflanzen an hohe Lichtintensitäten. In LHC-defizienten Gerstenpflanzen konnte eine verringerte HvPAP14-Aktivierung beobachtet werden. Zudem gibt es Hinweise auf eine gesteigerte HvPAP14-Aktivität bei zunehmender Lichtintensität. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass HvPAP14 sowohl bei den Remobilisierungsprozessen während der Seneszenz als auch bei der Anpassung an die Lichtbedingungen in nicht-seneszenten Pflanzen eine Rolle spielt.

Abstract

In an analysis of the senescence-associated gene expression in barley, the gene of the peptidase HvPAP14 was found to be highly upregulated. HvPAP14 belongs to the K/HDEL-tailed papain-like cysteine peptidases. It has an inhibitory propeptide that can be cleaved off for activation of the peptidase and a C-terminal ER retention signal, the HDEL sequence. The inactive and active forms of HvPAP14 accumulate during senescence. In lower amounts the peptidase can also be found in young leaves. HvPAP14 could be localized in chloroplasts at the thylakoid membrane by immunological analyses. The degradation of plastid proteins is essential for maintaining the chloroplast functions and has a major importance for nutrient remobilization during senescence. The main sources of the nitrogen that is mobilized during senescence are the Ribulose-1,5-bisphosphate-carboxylase/oxygenase (Rubisco) and the pigment-protein complexes of the thylakoid membrane. The first degradation steps take place in the chloroplasts before the plastid proteins are degraded further in vacuolar compartments. In most cases, the involved proteases are unknown. Among the plastid proteases serine proteases and metalloproteases are known but not cysteine peptidases. Here, the impact of HvPAP14 in the degradation of chloroplast proteins has been examined.

Because cysteine peptidases can usually be found in vacuolar compartments and the occurrence in chloroplasts is unexpected, the subcellular localization of HvPAP14 was analyzed in living cells with RFP-fusion proteins. HvPAP14:RFP was localized in the endoplasmic reticulum, in vesicular structures and also at the thylakoids of the chloroplasts. A biochemical characterization of recombinant HvPAP14 showed that the processing for activation of the protease occurs at a pH of 4-5 and is promoted by reducing conditions and by the presence of NO_3^- , SO_4^{2-} and PO_4^{3-} . Under physiologic conditions the activity is not influenced by these factors. However, Zn^{2+} , Cu^{2+} und Fe^{2+} have an inhibitory effect on the processing for activation and on the activity of HvPAP14. Potential substrates of the protease were first identified by *in vitro*-analyses with recombinant HvPAP14. Beside the stroma localized large subunit of Rubisco RbcL, the thylakoid membrane proteins PSBO, LHCB1, LHCB2 or LHCB3 as well as LHCB4, LHCB5 and LHCA3 were identified as substrates. In *HvPAP14*-overexpressing protoplasts the degradation of RbcL, PSBO, LHCB1, LHCB5 and LHCA3 was confirmed *in vivo*. In some cases, defined fragments of the proteins were detected. The degradation of LHC-proteins serves the plants' adaption to high light intensities. In LHC-deficient barley plants the HvPAP14-activation was reduced. Besides, there is evidence of increased HvPAP14 activity with increasing light intensity. The results suggest that HvPAP14 is involved in both nutrient remobilization processes during senescence and adaptation to light conditions in nonsenescent barley plants.

6 Literaturverzeichnis

- Adam Z, Clarke AK (2002). Cutting edge of chloroplast proteolysis. *Trends Plant Sci.*, 7, 451-456.
- Aguirre G, Pilon M (2016). Copper delivery to chloroplast proteins and its regulation. *Front Plant Sci.*, 6, 1250.
- Allen JF, de Paula WB, Puthiyaveetil S, Nield J (2011). A structural phylogenetic map for chloroplast photosynthesis. *Trends Plant Sci.e*, 16, 645-655.
- Allen JF, Forsberg J (2001). Molecular recognition in thylakoid structure and function. *Trends Plant Sci.*, 6, 317– 326.
- Andersson B, Aro E-M (2001). Photodamage and D1 protein turnover in photosystem II. In: *Advances in Photosynthesis and Respiration - Regulation of Photosynthesis* (Ed.: Aro E-M, Andersson B); Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London; Vol 11, 377–393.
- Andersson I (2008). Catalysis and regulation in Rubisco. *J. Exp. Bot.*, 59, 1555-1568.
- Andersson I, Backlund A (2008). Structure and function of Rubisco. *Plant Physiol. Biochem.*, 46, 275-291.
- Andersson MX, Goksör M, Sandelius AS (2007). Optical manipulation reveals strong attracting forces at membrane contact sites between endoplasmic reticulum and chloroplasts. *J. Biol. Chem.*, 282, 1170-1174.
- Apel K., Hirt H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373-399.
- Aro EM, Suorsa M, Rokka A, Allahverdiyeva Y, Paakkarinen V, Saleem A, Battchikova N, Rintamäki E (2004). Dynamics of photosystem II: a proteomic approach to thylakoid protein complexes. *J. Exp. Bot.*, 56, 347-356.
- Aro EM, Virgin I, Andersson B (1993). Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta*, 1143, 113–134.
- Balk J, Lobréaux S (2005). Biogenesis of iron-sulfur proteins in plants. *Trends Plant Sci.*, 10, 324-331.
- Ballottari M, Dall'Osto L, Morosinotto T, Bassi R (2007). Contrasting behavior of higher plant photosystem I and II antenna systems during acclimation. *J. Biol. Chem.*, 282, 8947-8958.
- Barber J, Nield J, Morris EP, Zheleva D, Hankamer B (1997). The structure, function and dynamics of photosystem two. *Physiol. Plant.*, 100, 817-827.
- Bayer RG, Stael S, Csaszar E, Teige M (2011). Mining the soluble chloroplast proteome by affinity chromatography. *Proteomics*, 11, 1287-1299.
- Beers EP, Jones AM, Dickerman AW (2004). The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in Arabidopsis. *Phytochem.*, 65, 43-58.
- Bhalla PL, Dalling MJ (1986). Endopeptidase and carboxypeptidase enzymes of vacuoles prepared from mesophyll protoplasts of the primary leaf of wheat seedlings. *J. Plant Physiol.*, 122, 289-302.
- Blum T, Briesemeister S, Kohlbacher O (2009). MultiLoc2: Integrating phylogeny and gene ontology terms improves subcellular protein localization prediction. *BMC Bioinform.*, 10, 274.
- Bossmann B, Knoetzel J, Jansson S (1997). Screening of chlorina mutants of barley (*Hordeum vulgare* L.) with antibodies against light-harvesting proteins of PS I and PS II: absence of specific antenna proteins. *Photosynth. Res.*, 52, 127-136.

- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Briat JF, Cellier F, Gaymard F (2006). Ferritins and iron accumulation in plant tissues. In: Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms (Ed.: Barton LL, Abadia J); Springer Netherlands, Dordrecht; 341-357.
- Bricker TM, Roose JL, Fagerlund RD, Frankel LK, Eaton-Rye JJ (2012). The extrinsic proteins of Photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*, 1817, 121-142.
- Briesemeister S, Rahnenführer J, Kohlbacher O (2010). YLoc - an interpretable web server for predicting subcellular localization. *Nucl. Ac. Res.*, 38, 497-502.
- Buchanan BB, Luan S (2005). Redox regulation in the chloroplast thylakoid lumen: a new frontier in photosynthesis research. *J. Exp. Bot.*, 56, 1439-1447.
- Bughio N, Takahashi M, Yoshimura E, Nishizawa NK, Mori S (1997). Light-dependent iron transport into isolated barley chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, 38, 101-105.
- Burén S, Ortega-Villasante C, Blanco-Rivero A, Martínez-Bernardini A, Shutova T, Shevela D, Messinger J, Bako L, Villarejo A, Samuelsson G (2011). Importance of post-translational modifications for functionality of a chloroplast-localized carbonic anhydrase (CAH1) in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, 6, e21021.
- Bushnell TP, Bushnell D, Jagendorf AT (1993). A purified zinc protease of pea chloroplasts, EP1, degrades the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Physiol.*, 103, 585-591.
- Carrión CA, Costa ML, Martínez DE, Mohr C, Humbeck K, Guimét JJ (2013). *In vivo* inhibition of cysteine proteases provides evidence for the involvement of 'senescence-associated vacuoles' in chloroplast protein degradation during dark-induced senescence of tobacco leaves. *J. Exp. Bot.*, 64, 4967-4980.
- Castelletti S, Morosinotto T, Robert B, Caffarri S, Bassi R, Croce R (2003). Recombinant Lhca2 and Lhca3 subunits of the photosystem I antenna system. *Biochem.*, 42, 4226-4234.
- Chapman MS, Suh SW, Cascio D, Smith WW, Eisenberg DS (1987). Sliding-layer conformational change limited by the quaternary structure of plant Rubisco. *Nat.*, 329, 354-356.
- Chassin Y, Kapri-Pardes E, Sinvany G, Arad T, Adam Z (2002). Expression and characterization of the thylakoid lumen protease DegP1 from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 130, 857-864.
- Chew O, Whelan J, Millar AH (2003). Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in *Arabidopsis* mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. *J. Biol. Chem.*, 278, 46869-46877.
- Chi W, Sun X, Zhang L (2012). The roles of chloroplast proteases in the biogenesis and maintenance of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*, 1817, 239-46.
- Chiba A, Ishida H, Nishizawa NK, Makino A, Mae T (2003). Exclusion of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from chloroplasts by specific bodies in naturally senescing leaves of wheat. *Plant Cell Physiol.*, 44, 914-921.
- Chitnis PR, Thornber JP (1988). The major light-harvesting complex of photosystem II: aspects of its molecular and cell biology. *Photosynth. Res.*, 16, 41-63.
- Cohen SN, Chang ACY, Hsu L (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *E. coli* by R-factor-DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 2110-2114.

- Costa ML, Martínez DE, Gomez FM, Carrión CA, Guiamet JJ (2013). Chloroplast protein degradation: Involvement of senescence-associated vacuoles. In: *Plastid Development in Leaves during Growth and Senescence* (Ed.: Biswal B, Krupinska K, Biswal UC); Springer Netherlands, Dordrecht; 417-433.
- Coulombe R, Grochulski P, Sivaraman J, Ménard R, Mort JS, Cygler M (1996). Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment. *EMBO J.*, 15(20), 5492-5503.
- Crawford NM (1995). Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell*, 7, 859-868.
- De Las Rivas J, Barber J (2004). Analysis of the structure of the PsbO protein and its implications. *Photosynth. Res.*, 81, 329-343.
- Delhaize E, Schachtman D, Kochian L, Ryan PR (2015) Mineral nutrient acquisition, transport, and utilization. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Ed.: Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL); John Wiley & Sons, Oxford; 1101-1131.
- Desimone M, Henke A, Wagner E (1996). Oxidative stress induces partial degradation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in isolated chloroplasts of barley. *Plant Physiol.*, 111, 789-796.
- Desimone M, Wagner E, Johannigmeier U (1998). Degradation of active-oxygen-modified ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by chloroplastic proteases requires ATP-hydrolysis. *Planta*, 205, 459-466.
- Ellis RJ (1979). The most abundant protein in the world. *Trends Biochem. Sci.*, 4, 241-244.
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.*, 300, 1005-1016.
- Feller U, Anders I, Mae T (2008). Rubiscolytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated. *J. Exp. Bot.*, 59, 1615-1624.
- Ferreira KN, Iverson TM, Maghlaoui K, Barber J, Iwata S (2004). Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Sci.*, 303, 1831-1838.
- Fluhr R, Lampl N, Roberts TH (2012). Serpin protease inhibitors in plant biology. *Physiol. Plant.* 145, 95-102.
- Forsberg J, Ström J, Kieselbach T, Larsson H, Alexciev K, Engström Å, Åkerlund HE (2005). Protease activities in the chloroplast capable of cleaving an LHCII N-terminal peptide. *Physiol. Plant.*, 123, 21-29.
- Foyer CH, Noctor G (2016). Stress-triggered redox signalling: what's in pROSpect?. *Plant Cell Environ.*, 39, 951-964.
- Georgakopoulos JH, Sokolenko A, Arkas M, Sofou G, Herrmann RG, Argyroudi-Akoyunoglou JH (2002). Proteolytic activity against the light-harvesting complex and the D1/D2 core proteins of photosystem II in close association to the light-harvesting complex II trimer. *Biochim. Biophys. Acta*, 1556, 53-64.
- Gleave AP (1992). A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Mol. Biol.*, 20, 1203-1207.
- Gobets B, van Grondelle R (2001). Energy transfer and trapping in photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta*, 1507, 80-99.

- Goldberg T, Hecht M, Hamp T, Karl T, Yachdav G, Ahmed N, Altermann U, Angerer P, Ansorge S, Balasz K, Bernhofer M, Betz A, Cizmadija L, Do KT, Gerke J, Greil R, Joerdens V, Hastreiter M, Hembach K, Herzog M, Kalemanov M, Kluge M, Meier A, Nasir H, Neumaier U, Prade V, Reeb J, Sorokoumov A, Troshani I, Vorberg S, Waldruff S, Zierer J, Nielsen H, Rost B (2014). LocTree3 prediction of localization. *Nucl. Ac. Res.*, 42, 350-355.
- Grudkowska M, Zagdanska B (2004). Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochim. Pol.*, 51, 609–624.
- Gruissem W, Greenberg BM, Zurawski G, Hallick RB (1986). Chloroplast gene expression and promoter identification in chloroplast extracts. *Methods Enzymol.*, 118, 253-270.
- Guiamét JJ, Pichersky E, Noodén LD (1999). Mass exodus from senescing soybean chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, 40, 986–992.
- Hall M, Mata-Cabana A, Åkerlund HE, Florencio FJ, Schröder WP, Lindahl M, Kieselbach T (2010). Thioredoxin targets of the plant chloroplast lumen and their implications for plastid function. *Proteomics*, 10, 987–1001.
- Hanes CS (1932). Studies on plant amylases: The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. *Biochem. J.*, 26, 1406–1421.
- Hansen G, Hilgenfeld R (2013). Architecture and regulation of HtrA-family proteins involved in protein quality control and stress response. *Cell Mol. Life Sci.*, 70, 761-775.
- Hashimoto A, Ettinger WF, Yamamoto Y, Theg SM (1997). Assembly of newly imported oxygen-evolving complex subunits in isolated chloroplasts: sites of assembly and mechanism of binding. *Plant Cell*, 9, 441–452.
- Hashimoto A, Yamamoto Y, Theg SM (1996). Unassembled subunits of the photosynthetic oxygen-evolving complex present in the thylakoid lumen are long-lived and assembly-competent. *FEBS Lett.*, 391, 29–34.
- Helm M, Schmid M, Hierl G, Terneus K, Tan L, Lottspeich F, Kieliszewski MJ, Gietl C (2008). KDEL-tailed cysteine endopeptidases involved in programmed cell death, intercalation of new cells, and dismantling of extensin scaffolds. *Am. J. Bot.*, 95, 1049-1062.
- Henmi T, Miyao M, Yamamoto Y (2004). Release and reactive-oxygen-mediated damage of the oxygen-evolving complex subunits of PSII during photoinhibition. *Plant Cell Physiol.*, 45, 243-250.
- Heredia P, De Las Rivas J (2003). Calcium-dependent conformational change and thermal stability of the isolated PsbO protein detected by FTIR spectroscopy. *Biochem.*, 42, 11831–11838.
- Hierl G, Höwing T, Isono E, Lottspeich F, Gietl C (2014). *Ex vivo* processing for maturation of Arabidopsis KDEL-tailed cysteine endopeptidase 2 (AtCEP2) pro-enzyme and its storage in endoplasmic reticulum derived organelles. *Plant Mol. Biol.*, 84, 605-620.
- Hierl G, Vothknecht U, Gietl C (2012). Programmed cell death in Ricinus and Arabidopsis: the function of KDEL cysteine peptidases in development. *Physiol. Plant.*, 145, 103-113.
- Hildbrand M, Fischer A, Feller U (1994). Protein catabolism in bean leaf discs: accumulation of a soluble fragment of ribulose1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase under oxygen deficiency. *J. Exp. Bot.*, 45, 1197–1204.
- Hoeglund A, Doennes P, Blum T, Adolph HW, Kohlbacher O (2006). MultiLoc: prediction of protein subcellular localization using N-terminal targeting sequences, sequence motifs, and amino acid composition. *Bioinform.*, 22, 1158-1165.

- Hofstee BH (1952). On the evaluation of the constants V_m and K_M in enzyme reactions. *Sci.*, 116, 329–331.
- Hollmann J (2016). Identifikation und Lokalisation der seneszenzassoziierten Cysteinprotease HvPAP14 in Gerste. Dissertation, CAU Kiel.
- Hollmann J, Gregersen PL, Krupinska K (2014). Identification of predominant genes involved in regulation and execution of senescence-associated nitrogen remobilization in flag leaves of field grown barley. *J. Exp. Bot.*, 65, 3963-3973.
- Holthuis JCM, Levine TP (2005). Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6, 209–220.
- Höhner R, Aboukila A, Kunz HH, Venema K (2016). Proton gradients and proton-dependent transport processes in the chloroplast. *Front Plant Sci.*, 7, 218.
- Homaei A (2015). Enhanced activity and stability of papain immobilized on CNBr-activated sepharose. *Int. J. Biol. Macromol.*, 75, 373-377.
- Horie Y, Ito H, Kusaba M, Tanaka R, Tanaka A (2009). Participation of chlorophyll b reductase in the initial step of the degradation of light-harvesting chlorophyll a/b-protein complexes in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.*, 284, 17449–17456.
- Hörtensteiner S, Feller U (2002). Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *J. Exp. Bot.*, 53, 927–937.
- Humbeck K, Krupinska K (2003). The abundance of minor chlorophyll a/b-binding proteins CP29 and LHCI of barley (*Hordeum vulgare* L.) during leaf senescence is controlled by light. *J. Exp. Bot.*, 54, 375-383.
- Humbeck K, Quast S, Krupinska K (1996). Function and molecular changes in the photosynthetic apparatus during senescence of flag leaves from field-grown barley plants. *Plant Cell Environ.*, 19, 337-344.
- Ishida H, Nishimori Y, Sugisawa M, Makino A, Mae T (1997). The large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase is fragmented into 37-kDa and 16-kDa polypeptides by active oxygen species in the lysates of chloroplasts from primary leaves of wheat. *Plant Cell Physiol.*, 38, 471–479.
- Ishida H, Yoshimoto K, Izumi M, Reisen D, Yano Y, Makino A, Ohsumi Y, Hanson MR, Mae T (2008). Mobilization of rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagic process. *Plant Physiol.*, 148, 142-155.
- Ishidoh K, Kominami E (1995). Procathepsin L degrades extracellular matrix proteins in the presence of glycosaminoglycans *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 217, 624-631.
- Ito K, Akiyama Y (2005). Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. *Annu. Rev. Microbiol.*, 59, 211-231.
- Jackowski G, Jansson S (1998). Characterization of photosystem II antenna complexes separated by non-denaturing isoelectric focusing. *Zeitschr. für Naturforschung C*, 53, 841-848.
- Jackowski G, Kacprzak K, Jansson S (2001). Identification of Lhcb1/Lhcb2/Lhcb3 heterotrimers of the main light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex of photosystem II (LHCII). *Biochim. Biophys. Acta*, 1504, 340–345.
- Jackson C, Dench J, Moore AL, Halliwell B, Foyer CH, Hall DO (1978). Subcellular localisation and identification of superoxide dismutase in the leaves of higher plants. *Eur. J. Biochem.*, 91, 339-344.

- Jansson S (1994). The light-harvesting chlorophyll ab-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1184, 1-19.
- Jansson S, Andersen B, Scheller HV (1996). Nearest-neighbor analysis of higher-plant photosystem I holocomplex. *Plant Physiol.*, 112, 409-420.
- Jarvis P, López-Juez E (2013). Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 14, 787-802.
- Jensen PE, Gilpin M, Knoetzel J, Scheller HV (2000). The PSI-K subunit of photosystem I is involved in the interaction between light-harvesting complex I and the photosystem I reaction center core. *J. Biol. Chem.* 275, 24701-24708.
- Jukanti AK, Heidlebaugh NM, Parrott DL, Fischer IA, McInnerney K, Fischer AM (2008). Comparative transcriptome profiling of near-isogenic barley (*Hordeum vulgare*) lines differing in the allelic state of a major grain protein content locus identifies genes with possible roles in leaf senescence and nitrogen reallocation. *New Phytol.*, 177, 333-349.
- Kapri-Pardes E, Naveh L, Adam Z (2007). The thylakoid lumen protease Deg1 is involved in the repair of photosystem II from photoinhibition in Arabidopsis. *Plant Cell*, 19, 1039-1047.
- Karamoko M, Cline S, Redding K, Ruiz N, Hamel PP (2011). Lumen thiol oxidoreductase1, a disulfide bond-forming catalyst, is required for the assembly of photosystem II in Arabidopsis. *Plant Cell*, 23, 4462-4475.
- Kato Y, Murakami S, Yamamoto Y, Chatani H, Kondo Y, Nakano T, Yokota A, Sato F (2004). The DNA-binding protease, CND41, and the degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in senescent leaves of tobacco. *Planta*, 220, 97-104.
- Kato Y, Sakamoto W (2014). Phosphorylation of photosystem II core proteins prevents undesirable cleavage of D1 and contributes to the fine-tuned repair of photosystem II. *Plant J.*, 79, 312-321.
- Khan S, Andralojc PJ, Lea PJ, Parry MA (1999). 2'-Carboxy-D-arabitolol 1-phosphate protects ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase against proteolytic breakdown. *Eur. J. Biochem.*, 266, 840-847.
- Khrouchtchova A, Hansson M, Paakkarinen V, Vainonen JP, Zhang S, Jensen PE, Scheller HV, Vener AV, Aro EM, Haldrup A (2005). A previously found thylakoid membrane protein of 14kDa (TMP14) is a novel subunit of plant photosystem I and is designated PSI-P. *FEBS Lett.*, 579, 4808-4812.
- Kihara M, Kakegawa H, Matano Y, Murata E, Tsuge H, Kido H, Katunuma N (2002). Chondroitin sulfate proteoglycan is a potent enhancer in the processing of procathepsin L. *Biol. Chem.*, 383, 1925-1929.
- Kitajima A, Asatsuma S, Okada H, Hamada Y, Kaneko K, Nanjo Y, Kawagoe Y, Toyooka K, Matsuoka K, Takeuchi M, Nakano A, Mitsui T (2009). The rice alpha-amylase glycoprotein is targeted from the Golgi apparatus through the secretory pathway to the plastids. *Plant Cell*, 21, 2844-2858.
- Kleffmann T, Russenberger D, von Zychlinski A, Christopher W, Sjolander K, Gruissem W, Baginsky S (2004). The *Arabidopsis thaliana* chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. *Curr. Biol.*, 14, 354-362.
- Kokubun N, Ishida H, Makino A, Mae T (2002). The degradation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase into the 44-kDa fragment in the lysates of chloroplasts incubated in darkness. *Plant Cell Physiol.*, 43, 1390-1395.
- Kramer DM, Cruz JA, Kanazawa A (2003). Balancing the central roles of the thylakoid proton gradient. *Trends Plant Sci.*, 8, 27-32.

- Kramer DM, Sacksteder CA, Cruz JA (1999). How acidic is the lumen. *Photosynth. Res.*, 60, 151-163.
- Kreusch S, Fehn M, Maubach G, Nissler K, Rommerskirch W, Schilling K, Weber E, Wenz I, Wiederanders B (2000). An evolutionarily conserved tripartite tryptophan motif stabilizes the prodomains of cathepsin L-like cysteine proteases. *Eur. J. Biochem.*, 267, 2965-2972.
- Krieger A, Weis E (1993). The role of calcium in the pH-dependent control of photosystem II. *Photosynth. Res.*, 37, 117-130.
- Krojer T, Garrido-Franco M, Huber R, Ehrmann M, Clausen T (2002). Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine. *Nat.*, 416, 455-459.
- Krupinska K (2007). Altern und Alter bei Pflanzen. *BIUZ*, 37, 174-183.
- Krupinska K, Mulisch M, Hollmann J, Tokarz K, Zschiesche W, Kage H, Humbeck K, Bilger W (2012). An alternative strategy of dismantling of the chloroplasts during leaf senescence observed in a high yield variety of barley. *Physiol. Plant.*, 144, 189-200.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nat.*, 227, 680-685.
- Li J, Sun X, Zhang L (2010). Deg1 is involved in the degradation of the PsbO oxygen-evolving protein of photosystem II in *Arabidopsis*. *Chin. Sci. Bull.*, 55, 3145-3148.
- Lindahl M, Yang DH, Andersson B (1995). Regulatory proteolysis of the major light-harvesting chlorophyll a/b protein of photosystem II by a light-induced membrane-associated enzymic system. *Eur. J. Biochem.*, 231, 503-509.
- Lindquist E, Solymosi K, Aronsson H (2016). Vesicles are persistent features of different plastids. *Traffic*, 17, 1125-1138.
- Lineweaver H, Burk D (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 658-666.
- Lohman KN, Gan S, John MC, Amasino RM (1994). Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.*, 92, 322-328.
- Long SR, Kahn M, Seefeld L, Tsay Y-F, Kopriva S (2015) Nitrogen and sulfur. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Ed.: Buchanan BB, Grissem W, Jones RL); John Wiley & Sons, Oxford; 711-768.
- Lowe G (1976). The cysteine proteinases. *Tetrahedron*, 32, 291-302.
- Lu YK, Theg SM, Stemler AJ (2005). Carbonic anhydrase activity of the photosystem II OEC33 protein from pea. *Plant Cell Physiol.*, 46, 1944-1953.
- Luciński R, Jackowski G (2006). The structure, functions and degradation of pigment-binding proteins of photosystem II. *Acta Biochim. Pol.*, 53, 693-708.
- Lunde C, Jensen PE, Haldrup A, Knoetzel J, Scheller HV (2001). The PSI-H subunit of photosystem I is essential for state transitions in plant photosynthesis. *Nat.*, 408, 613-615.
- Lundin B, Hansson M, Schoefs B, Vener AV, Spetea C (2007). The *Arabidopsis* PsbO2 protein regulates dephosphorylation and turnover of the photosystem II reaction centre D1 protein. *Plant J.*, 49, 528-539.
- Luo S, Ishida H, Makino M, Mae T (2002). Fe²⁺-catalyzed sitespecific cleavage of the large subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase close to the active site. *J. Biol. Chem.*, 277, 12383-12387.

- Mae T, Kamei C, Funaki K, Miyadai K, Makino A, Ohira K, Ojima K (1989). Degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in the lysates of the chloroplasts isolated mechanically from wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Plant Cell Physiol.*, 30, 193-200.
- Martínez DE, Costa ML, Gomez FM, Otegui MS, Guiamet JJ (2008). 'Senescence-associated vacuoles' are involved in the degradation of chloroplast proteins in tobacco leaves. *Plant J.*, 56, 196-206.
- Martinez M, Cambra I, Carrillo L, Diaz-Mendoza M, Diaz I (2009). Characterization of the entire cystatin gene family in barley and their target cathepsin L-like cysteine-proteases, partners in the hordein mobilization during seed germination. *Plant Physiol.*, 151, 1531-1545.
- Matile P (1992). Chloroplast senescence. In: *Crop Photosynthesis: Spatial and Temporal Determinants* (Ed.: Baker NR, Thomas H); Elsevier, Amsterdam; 423-440.
- Matsumoto T, Tanaka T, Sakai H, Amano N, Kanamori H, Kurita K, Kikuta A, Kamiya K, Yamamoto M, Ikawa H, Fujii N, Hori K, Itoh T, Sato K (2011). Comprehensive sequence analysis of 24,783 barley full-length cDNAs derived from 12 clone libraries. *Plant Physiol.*, 156, 20-28.
- Maubach G, Schilling K, Rommerskirch W, Wenz I, Schultz JE, Weber E, Wiederanders B (1997). The inhibition of cathepsin S by its propeptide-specificity and mechanism of action. *Eur. J. Biochem.*, 250, 745-750.
- Mehta R, Fawcett T, Porath D, Mattoo A (1992). Oxidative stress causes rapid membrane translocation and *in vivo* degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *J. Biol. Chem.*, 267, 2810-2816.
- Melis A (1999). Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage *in vivo*?. *Trends Plant Sci.*, 4, 130-135.
- Ménard R, Carmona E, Takebe S, Dufour E, Plouffe C, Mason P, Mort JS (1998). Autocatalytic processing of recombinant human procathepsin L. Contribution of both intermolecular and unimolecular events in the processing of procathepsin L *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 273, 4478-4484.
- Michaelis L, Menten ML (1913). Die Kinetik der Invertin-Wirkung. *Biochem. Zeitschr.*, 49, 333-369.
- Minamikawa T, Toyooka K, Okamoto T, Hara-Nishimura I, Nishimura M (2001). Degradation of ribulose-bisphosphate carboxylase by vacuolar enzymes of senescing French bean leaves: immunocytochemical and ultrastructural observations. *Protoplasma*, 218, 144-153.
- Mitsubishi W, Feller U (1992). Effects of light and external solutes on the catabolism of nuclear-encoded stromal proteins in intact chloroplasts isolated from pea leaves. *Plant Physiol.*, 100, 2100-2105.
- Mole JE, Horton HR (1973). Kinetics of papain-catalyzed hydrolysis of R-N-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide. *Biochem.*, 12, 816-822.
- Mollenhauer HH, Totten C (1970). Studies on seeds. V. Microbodies, glyoxysomes, and ricinosomes of castor bean endosperm. *Plant Physiol.*, 46, 794-799.
- Moreno J, García-Murria MJ, Marín-Navarro J (2008). Redox modulation of Rubisco conformation and activity through its cysteine residues. *J. Exp. Bot.*, 59, 1605-1614.
- Mousavi SR, Galavi M, Rezaei M (2012). The interaction of zinc with other elements in plants: a review. *Internat. J. of Agriculture and Crop Sci.*, 4, 1881-1884.
- Munro S, Pelham HR (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell*, 48, 899-907.

- Murray JW, Barber J (2006). Identification of a calcium-binding site in the PsbO protein of photosystem II. *Biochem.*, 45, 4128–4130.
- Nakai K, Horton P (1999). PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem. Sci.*, 24, 34–36.
- Nakano R, Ishida H, Makino A, Mae T (2006). *In vivo* fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by reactive oxygen species in an intact leaf of cucumber under chilling-light conditions. *Plant Cell Physiol.*, 47, 270–276.
- Nanjo Y, Oka H, Ikarashi N, Kaneko K, Kitajima A, Mitsui T, Muñoz FJ, Rodríguez-López M, Baroja-Fernández E, Pozueta-Romero J (2006). Rice plastidial N-glycosylated nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase is transported from the ER-golgi to the chloroplast through the secretory pathway. *Plant Cell*, 18, 2582–2592.
- Naumann B, Stauber EJ, Busch A, Sommer F, Hippler M (2005). N-terminal processing of Lhca3 Is a key step in remodeling of the photosystem I-light-harvesting complex under iron deficiency in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.*, 280, 20431–20441.
- Navarre DA, Wolpert TJ (1999). Victorin induction of an apoptotic/senescence-like response in oats. *Plant Cell*, 11, 237–249.
- Nikitina J, Shutova T, Melnik B, Chernyshov S, Marchenkov V, Semisotnov G, Klimov V, Samuelsson G (2008). Importance of a single disulfide bond for the PsbO protein of photosystem II: protein structure stability and soluble overexpression in *Escherichia coli*. *Photosynth. Res.*, 98, 391–403.
- Nishimura K, Kato Y, Sakamoto W (2016). Chloroplast proteases: Updates on proteolysis within and across suborganellar compartments. *Plant Physiol.*, 171, 2280–2293.
- Nixon PJ, Barker M, Boehm M, de Vries R, Komenda J (2005). FtsH-mediated repair of the photosystem II complex in response to light stress. *J. Exp. Bot.*, 56, 357–363.
- Okamoto T, Nakayama H, Seta K, Isobe T, Minamikawa T (1994). Posttranslational processing of a carboxy-terminal propeptide containing a KDEL sequence of plant vacuolar cysteine endopeptidase (SH-EP). *FEBS Lett.*, 351, 31–34.
- Otegui MS, Noh YS, Martínez DE, Vila Petroff MG, Staehelin LA, Amasino RM, Guamét JJ (2005). Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of *Arabidopsis* and soybean. *Plant J.*, 41, 831–44.
- Park H, Eggink LL, Roberson RW, Hooper JK (1999). Transfer of proteins from the chloroplast to the vacuoles in *Chlamydomonas reinhardtii* (chlorophyta): A pathway for degradation. *J. Phycol.*, 35, 528–538.
- Pefiarrubia L, Moreno J (1990). Increased susceptibility of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase to proteolytic degradation caused by oxidative treatments. *Arch. Biochem. Biophys.*, 281, 319–323.
- Pelham HR, Hardwick KG, Lewis MJ (1988). Sorting of soluble ER proteins in yeast. *EMBO J.*, 7, 1757–1762.
- Petsalaki EI, Bagos PG, Litou ZI, Hamodrakas SJ (2006). PredSL: a tool for the N-terminal sequence-based prediction of protein subcellular localization. *Genomics Proteomics Bioinform.*, 4, 48–55.
- Pilon-Smits EA, Pilon M (2006). Sulfur metabolism in plastids. In: *The Structure and Function of Plastids* (Ed.: Wise RR, Hooper JK); Springer Netherlands, Dordrecht; 387–402.

- Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 975, 384-394.
- Potters G, Horemans N, Jansen MA (2010). The cellular redox state in plant stress biology: charging concept. *Plant Physiol. Biochem.*, 48, 292–300.
- Rawlings ND, Barrett AJ (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.*, 290, 205-218.
- Richau KH, Kaschani F, Verdoes M, Pansuriya TC, Niessen S, Stüber K, Colby T, Overkleef HS, Bogyo M, Van der Hoorn RA (2012). Subclassification and biochemical analysis of plant papain-like cysteine proteases displays subfamily-specific characteristics. *Plant Physiol.*, 158, 1583-1599.
- Riggs P (2001). Expression and purification of maltose-binding protein fusions. *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, 16.6.1-16.6.14.
- Roberts IN, Lam XT, Miranda H, Kieselbach T, Funk C (2012). Degradation of PsbO by the Deg Protease HhoA Is Thioredoxin Dependent. *PLoS ONE*, 7, e45713.
- Roulin S, Feller U (1998). Light-dependent degradation of stromal proteins in intact chloroplasts isolated from *Pisum sativum* L. leaves: requirement for divalent cations. *Planta*, 205, 297–304.
- Roy H (1989). Rubisco assembly: A model system for studying the mechanism of chaperonin action. *Plant Cell*, 1, 1035-1042.
- Roy H, Nierzwicki-Bauer SA (2012). RuBisCO: Genes, structure, assembly, and evolution. In: *The Photosynthetic Apparatus: Molecular Biology and Operation* (Ed.: Bogorad L, Vasil IK); Academic Press, San Diego; 347-364.
- Rui Q, Xu LL (2004). Degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in wheat leaves during dark-induced senescence. *Acta Bot. Sinica*, 46, 137-141.
- Sakamoto W (2006). Protein degradation machineries in plastids. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 599-621.
- Sandelius AS, Andersson MX, Goksor M, Tjellstrom H, Wellander R (2007). Membrane contact sites: physical attachment between chloroplasts and endoplasmic reticulum revealed by optical manipulation. *Chem. Phys. Lipids*, 149, 42-43.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463–5467.
- Sathish HA, Kaul P, Prakash V (2000). Influence of metal ions on structure and catalytic activity of papain. *Ind. J. Biochem. Biophys.*, 37, 18-27.
- Schmid M, Simpson D, Gietl C (1999). Programmed cell death in castor bean endosperm is associated with the accumulation and release of a cysteine endopeptidase from ricinosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 14159-14164.
- Schmid M, Simpson D, Kalousek F, Gietl C (1998). A cysteine endopeptidase with a C-terminal KDEL motif isolated from castor bean endosperm is a marker enzyme for the ricinosome, a putative lytic compartment. *Planta*, 206, 466-475.
- Schmid M, Simpson D, Sarioglu H, Lottspeich F, Gietl C (2001). The ricinosomes of senescing plant tissue bud from the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 5353-5358.
- Schmid VHR (2008). Light-harvesting complexes of vascular plants. *Cell. Mol. Life Sci.*, 65, 3619-3639.

- Schmid VHR, Cammarata KV, Bruns BU, Schmidt GW (1997). *In vitro* reconstitution of the photosystem I light-harvesting complex LHCI-730: heterodimerization is required for antenna pigment organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 7667-7672.
- Shikanai T, Muller-Moule P, Munekage Y, Niyogi KK, Pilon M (2003). PAA1, a P-type ATPase of Arabidopsis, functions in copper transport in chloroplasts. *Plant Cell*, 15, 1333–1346.
- Shutova T, Nikitina J, Deikus G, Andersson B, Klimov V, Samuelsson G (2005). Structural dynamics of the manganese-stabilizing protein. Effect of pH, calcium, and manganese. *Biochem.*, 44, 15182–15192.
- Sluyterman LA (1967). The activation reaction of papain. *Biochim. Biophys. Acta*, 139, 430-438.
- Sokolenko A, Altschmied L, Herrmann RG (1997). Sodium dodecyl sulfate-stable proteases in chloroplasts. *Plant Physiol.*, 115, 827-832.
- Spetea C, Hundal T, Lundin B, Heddad M, Adamska I, Andersson B (2004). Multiple evidence for nucleotide metabolism in the chloroplast thylakoid lumen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 1409–1414.
- Sun X, Peng L, Guo J, Chi W, Ma J, Lu C, Zhang L (2007). Formation of DEG5 and DEG8 complexes and their involvement in the degradation of photodamaged photosystem II reaction center D1 protein in Arabidopsis. *Plant Cell*, 19, 1347-1361.
- Takizawa K, Cruz JA, Kanazawa A, Kramer DM (2007). The thylakoid proton motive force *in vivo*. Quantitative, non-invasive probes, energetics, and regulatory consequences of light-induced pmf. *Biochim. Biophys. Acta*, 1767, 1233-1244.
- Tao K, Stearns NA, Dong J, Wu QL, Sahagian GG (1994). The proregion of cathepsin L is required for proper folding, stability, and ER exit. *Arch. Biochem. Biophys.*, 311, 19-27.
- Teixeira PF, Glaser E (2013). Processing peptidases in mitochondria and chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 1833, 360-370.
- Than ME, Helm M, Simpson DJ, Lottspeich F, Huber R, Gietl C (2004). The 2.0 Å crystal structure and substrate specificity of the KDEL-tailed cysteine endopeptidase functioning in programmed cell death of *Ricinus communis* endosperm. *J. Mol. Biol.*, 336, 1103-1116.
- Thoenen M, Herrmann B, Feller U (2007). Senescence in wheat leaves: Is a cysteine endopeptidase involved in the degradation of the large subunit of Rubisco?. *Acta Physiol. Plant.*, 29, 339–350.
- Thomas H, Huffaker RC (1981). Hydrolysis of radioactively-labelled ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by an endopeptidase from the primary leaf of barley seedlings. *Plant Sci. Lett.*, 20, 251-262.
- Toyooka K, Okamoto T, Minamikawa T (2000). Mass transport of proform of a KDEL-tailed cysteine proteinase (SH-EP) to protein storage vacuoles by endoplasmic reticulum-derived vesicle is involved in protein mobilization in germinating seeds. *J. Cell Biol.*, 148, 453-464.
- Trobacher CP, Senatore A, Holley C, Greenwood JS (2013). Induction of a ricinosomal-protease and programmed cell death in tomato endosperm by gibberellic acid. *Planta*, 237, 665-679.
- van der Hoorn RA, Leeuwenburgh MA, Bogyo M, Joosten MH, Peck SC (2004). Activity profiling of papain-like cysteine proteases in plants. *Plant Physiol.*, 135, 1170-1178.
- van Duijnen PT, Thole BT, Hol WG (1979). On the role of the active site helix in papain, an ab initio molecular orbital study. *Biophys Chem.*, 9, 273-280.
- van Wijk KJ (2015). Protein maturation and proteolysis in plant plastids, mitochondria, and peroxisomes. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 66, 75-111.

- Vigil EL (1970). Cytochemical and developmental changes in microbodies (glyoxysomes) and related organelles of castor bean endosperm. *J. Cell Biol.*, 46, 435-454.
- Wagner R, Aigner H, Pruzinska A, Jänkänpää HJ, Jansson S, Funk C (2011). Fitness analyses of *Arabidopsis thaliana* mutants depleted of FtsH metalloproteases and characterization of three FtsH6 deletion mutants exposed to high light stress, senescence and chilling. *New Phytol.*, 191, 449-458.
- Waldron KJ, Rutherford JC, Ford D, Robinson NJ (2009). Metalloproteins and metal sensing. *Nat.*, 460, 823-830.
- Wang S, Blumwald E (2014). Stress-induced chloroplast degradation in *Arabidopsis* is regulated via a process independent of autophagy and senescence-associated vacuoles. *Plant Cell*, 26, 4875-4888.
- Westphal S, Soll J, Vothknecht UC (2001). A vesicle transport system inside chloroplasts. *FEBS Lett.*, 506, 257-261.
- Whatley JM, McLean B, Juniper BE (1991). Continuity of chloroplast and endoplasmic reticulum membranes in *Phaseolus vulgaris*. *New Phytol.*, 117, 209-217.
- White MJ, Green BR (1987). Polypeptides belonging to each of the three major chlorophyll a+b protein complexes are present in a chlorophyll-b-less barley mutant. *Eur. J. Biochem.*, 165, 531-535.
- Wiederanders B (2003). Structure-function relationships in class CA1 cysteine peptidase propeptides. *Acta Biochim. Pol.*, 50, 691-713.
- Wientjes E, Croce R (2011). The light-harvesting complexes of higher-plant Photosystem I: Lhca1/4 and Lhca2/3 form two red-emitting heterodimers. *Biochem. J.*, 433, 477-485.
- Wittenbach VA, Lin W, Hebert RR (1982). Vacuolar localization of proteases and degradation of chloroplasts in mesophyll protoplasts from senescing primary wheat leaves. *Plant Physiol.*, 69, 98-102.
- Yadavalli V, Neelam S, Rao AS, Reddy AR, Subramanyam R (2012). Differential degradation of photosystem I subunits under iron deficiency in rice. *J. Plant Physiol.*, 169, 753-759.
- Yang DH, Paulsen H, Andersson B (2000). The N-terminal domain of the light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein complex (LHCII) is essential for its acclimative proteolysis. *FEBS Lett.*, 466, 385-388.
- Yang DH, Webster J, Adam Z, Lindahl M, Andersson B (1998). Induction of acclimative proteolysis of the light-harvesting chlorophyll a/b protein of photosystem II in response to elevated light intensities. *Plant Physiol.*, 118, 827-834.
- Yoshida T, Minamikawa T (1996). Successive amino terminal proteolysis of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by vacuolar enzymes from French bean leaves. *Eur. J. Biochem.*, 238, 317-324.
- Yu CS, Chen YC, Lu CH, Hwang JK (2006). Prediction of protein subcellular localization. *Proteins: Struct., Funct. and Bioinformat.*, 64, 643-651.
- Želisko A, García-Lorenzo M, Jackowski G, Jansson S, Funk C (2005). AtFtsH6 is involved in the degradation of the light-harvesting complex II during high-light acclimation and senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 13699-13704.
- Zhang LF, Rui Q, Xu LL (2005). Degradation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in wheat leaves. *J. Integr. Plant Biol.*, 47, 60-66.
- Zienkiewicz M, Ferenc A, Wasilewska W, Romanowska E (2012). High light stimulates Deg1-dependent cleavage of the minor LHCII antenna proteins CP26 and CP29 and the PsbS protein in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 235, 279-288.

Anhang

1. Ermittlung der Reaktionskonstanten des Umsatzes von Z-FR-AMC durch HvPAP14

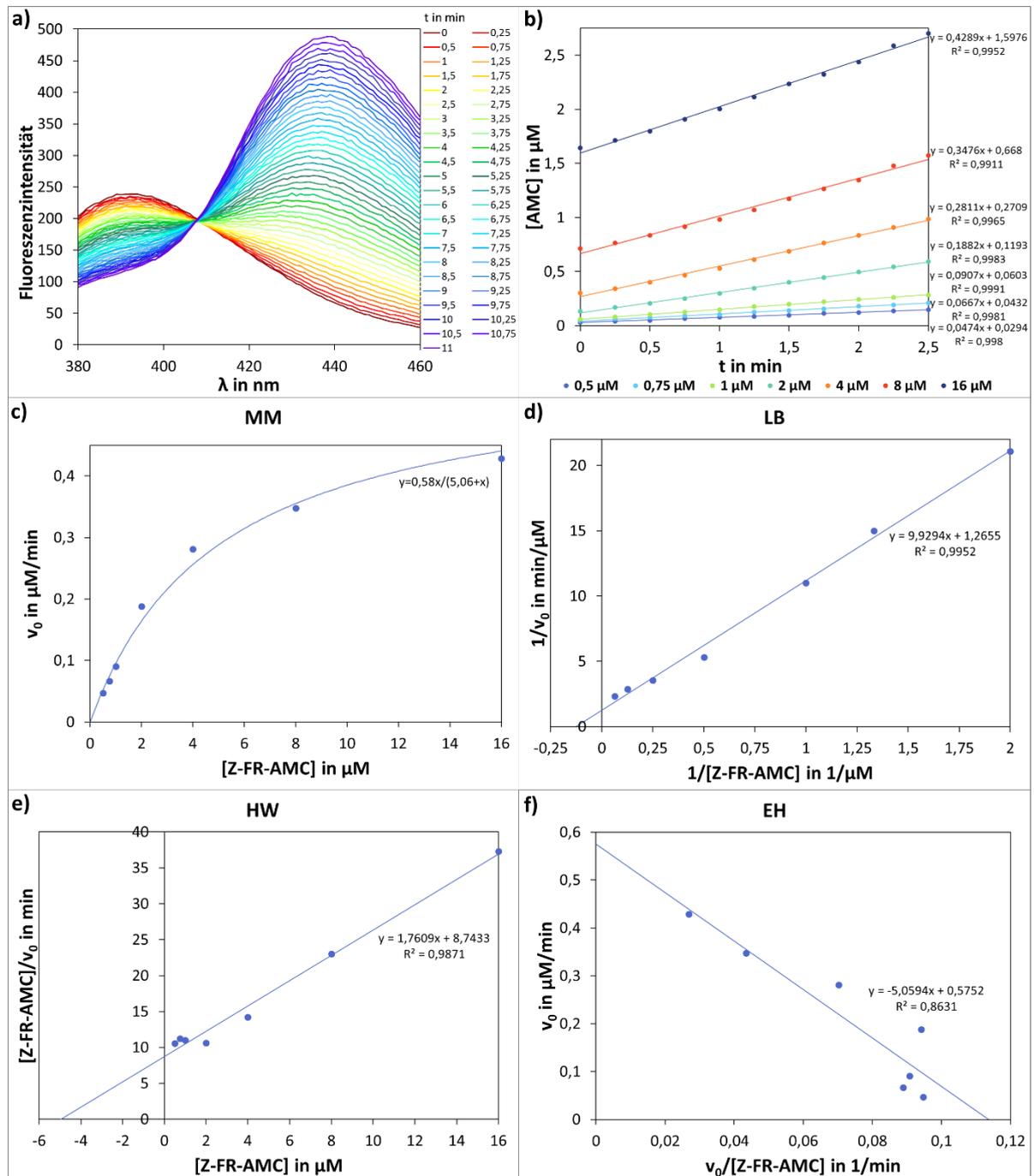


Abb. A.1: Umsatz von Z-FR-AMC durch HvPAP14 und Auftragungen zur Ermittlung der Reaktionskonstanten. (a) Die Emissionsspektren zum zeitlichen Verlauf des Umsatzes von Z-FR-AMC durch HvPAP14 (exemplarisch) wurden in KLR-Lösung bei einer Anregungswellenlänge von 345 nm gemessen. (b) Zur Ermittlung der Anfangsgeschwindigkeiten v_0 der Reaktionen wurden die Konzentrationen des Reaktionsproduktes (AMC), die zuvor mithilfe der Emission bei 440 nm bestimmt wurden, gegen die Reaktionsdauer (t) aufgetragen. Es sind die Werte für die Reaktion von 1 μg HvPAP14/ml mit dem Substrat Z-FR-AMC, das in Anfangskonzentrationen von 0,5-16 μM vorlag, gezeigt. Der Anstieg der Regressionsgeraden entspricht v_0 . (c-d) Die Auftragungen zur Ermittlung der Michaelis-Konstanten K_m und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} erfolgten mithilfe der v_0 nach Michaelis-Menten (c), Lineweaver-Burk (d), Hanes-Woolf (e) und Eadie-Hofstee (f).

2. Sequenzen der verwendeten Konstrukte

2.1 pUbi-HvPAP14N-RPF-HvPAP14C

Die aufgeführte kodierende Sequenz wurde über die Restriktionsschnittstellen von *HindIII* (AAGCTT) und *Sall* (GTCGAC) in Vektor pUbi-ABM kloniert. Die RFP-Sequenz ist rot markiert.

```
AAGCTTATGGCGAGAGCGATCGTGCTTGGCGCCACCATGGCCGCGGCCGCGCTGTTTCATGCTGCTGGCCGCTGCG
CCAGCGCCGCGAGCGCCATGGACTTCGGCGACCACGACCTGGCGTTCGGAGGACTCCCTATGGGCGCTGTACGAG
CGCTGGCGGGAGCAGCACACCGTGGCGCGGACCTGGGCGAGAAGGCCGACGCTTCAACGTGTTTCAGGGAGAAC
GTCCGCCTCATCCACGAGTTCAACCGCGGTGACGCCCCCTACAAGCTCCGCTCAACCGCTTCGGCGACATGACC
GCCGACGAGTTCCGCGCGCCTACGCCTCCTCCCGCTCTCTACCACCGCATGTTACGCCTTAAGGAGGGTGGT
GGCGGTTTTTCATGCACGGCAGCGCTGCCTCCGTCCGGGACGTGCCGCCGTCCGTTGGACTGGCGGCAGAAGGGCGCG
GTGACCGCCGTCAAGGACCAAGGGCAGTGGCGGACGTGCTGGGCTTTCTCGACGATCGCGGCCGTGGAGGGCATC
AACGCTATCCGCTCTAAGAACCTCACGTCTCTGTCCGAGCAGCAGCTCGTGGACTGCGACACGAAGTCCAACGCC
GGCTGCAACGGCGGCCTCATGGACTACGCCTTCCAGTACATCGCCAAGCATGGCGGGGTGGCCGCCGAGGACGCG
TACCCCTACAAGGCCAGGCAGGCCTCCTCCTGCAACAAGAAGCCGTCCGCCGTGGTCAACATCGACGGGTATGAG
GACGTGCCCCGCAACGACGAAACCGCGCTGAAGAAGGGCGGTGGCTGCACAGCCAGTGGCCGTGGCCATCGAGGCT
AGCGGGTTCGACTTCCAGTTCTACTCGGAGGGGGTGTTCGCGGGCAAGTGCGGGACGGAGCTGGACCATGGCGTG
GCGGCGGTGGGGTACGGCACCACCGTGGACGGCACCAAGTATTGGATCGTGAAAAACTCATGGGGGCCGGAGTGG
GGTGAGAAGGGATACATCCGCATGAAGCGCGATGTGGAATTCGGCGGTATGGCTCCTCCGAGGACGTCATCAAG
GAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCGCATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAG
GGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGCGGCCCTGCCCTTCGCTGGGAC
ATCCTGTCCCCTCAGTTCCAGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAG
CTGTCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGGCGTGGTGACCGTGACCCAG
GACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCC
GTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCACCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGC
GAGATCAAGATGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCCGAGGTCAAGACCACCTACATGGCCAAG
AAGCCCGTGCAGCTGCCCGCGCCTACAAGACCGACATCAAGCTGGACATCACCTCCACAACGAGGACTACACC
ATCGTGAACAGTACGAGCGCGCCGAGGGCCGCACTCCACCGCGCCGGTGGATCCAAGGACAAGGAAGGGCTC
TGCGGGATCGCCATGGAGGCGTCTACCCAGTCAAGACCTCAGCCAACCCGAAGCATGCCGGTGCCCATGACGAG
CTCTGAGTCGAC
```

2.2 pUbi-HvPAP14N-RPF-HvPAP14C(Δ HDEL)

Die aufgeführte kodierende Sequenz wurde über die Restriktionsschnittstellen von *HindIII* (AAGCTT) und *Sall* (GTCGAC) in Vektor pUbi-ABM kloniert. Die RFP-Sequenz ist rot markiert.

```
AAGCTTATGGCGAGAGCGATCGTGCTTGGCGCCACCATGGCCGCGGCCGCGCTGTTTCATGCTGCTGGCCGCTGCG
CCAGCGCCGCGAGCGCCATGGACTTCGGCGACCACGACCTGGCGTTCGGAGGACTCCCTATGGGCGCTGTACGAG
CGCTGGCGGGAGCAGCACACCGTGGCGCGGACCTGGGCGAGAAGGCCGACGCTTCAACGTGTTTCAGGGAGAAC
GTCCGCCTCATCCACGAGTTCAACCGCGGTGACGCCCCCTACAAGCTCCGCTCAACCGCTTCGGCGACATGACC
GCCGACGAGTTCCGCGCGCCTACGCCTCCTCCCGCTCTCTACCACCGCATGTTACGCCTTAAGGAGGGTGGT
GGCGGTTTTTCATGCACGGCAGCGCTGCCTCCGTCCGGGACGTGCCGCCGTCCGTTGGACTGGCGGCAGAAGGGCGCG
GTGACCGCCGTCAAGGACCAAGGGCAGTGGCGGACGTGCTGGGCTTTCTCGACGATCGCGGCCGTGGAGGGCATC
AACGCTATCCGCTCTAAGAACCTCACGTCTCTGTCCGAGCAGCAGCTCGTGGACTGCGACACGAAGTCCAACGCC
GGCTGCAACGGCGGCCTCATGGACTACGCCTTCCAGTACATCGCCAAGCATGGCGGGGTGGCCGCCGAGGACGCG
TACCCCTACAAGGCCAGGCAGGCCTCCTCCTGCAACAAGAAGCCGTCCGCCGTGGTCAACATCGACGGGTATGAG
GACGTGCCCCGCAACGACGAAACCGCGCTGAAGAAGGGCGGTGGCTGCACAGCCAGTGGCCGTGGCCATCGAGGCT
AGCGGGTTCGACTTCCAGTTCTACTCGGAGGGGGTGTTCGCGGGCAAGTGCGGGACGGAGCTGGACCATGGCGTG
GCGGCGGTGGGGTACGGCACCACCGTGGACGGCACCAAGTATTGGATCGTGAAAAACTCATGGGGGCCGGAGTGG
GGTGAGAAGGGATACATCCGCATGAAGCGCGATGTGGAATTCGGCGGTATGGCTCCTCCGAGGACGTCATCAAG
GAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCGCATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAG
GGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGCGGCCCTGCCCTTCGCTGGGAC
ATCCTGTCCCCTCAGTTCCAGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAG
CTGTCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGGCGTGGTGACCGTGACCCAG
GACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCC
```

GTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCACCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGC
 GAGATCAAGATGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCCGAGGTCAAGACCACCTACATGGCCAAG
 AAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCGCCTACAAGACCGACATCAAGCTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACC
 ATCGTGGAAACAGTACGAGCGCGCCGAGGGCCGCGCCACTCCACCGGCGCCGGTGGATCCAAGGACAAGGAAGGGCTC
 TGCGGGATCGCCATGGAGGCGTCTACCCAGTCAAGACCTCAGCCAACCCGAAGCATGCCTGAGTCGAC

2.3 pUbi-GFP

Die aufgeführte kodierende Sequenz wurde über die Restriktionsschnittstellen von *Xma*I (CCCGGG) und *Hind*III (AAGCTT) in Vektor pUbi-ABM kloniert.

CCCGGGGGAACAATGAACCGCAACGTGCTGAAAAACACCGGTCTGAAAGAAATATGAGCGCGAAAAGCGAGCGTG
 GAAGGCATTGTGAACAACCATGTGTTTAGCATGGAAGGCTTTGGCAAAGGCAACGTGCTGTTTGCCAACCAAGCTG
 ATGCAGATTTCGCGTGACCAAAGGCGGTCCGCTGCCGTTTGCCTTTGATATTGTGAGCATTGCGTTTCAGTATGGC
 AACCGCACCTTTACCAAATATCCGGATGATATTGCGGATTATTTTGTGCAGAGCTTCCGGCAGGCTTTTTTTAT
 GAACGCAACCTGCGCTTTGAAGATGGTGCATTGTGGATATTTCGAGCGATATTAGCCTGGAAGATGATAAATTT
 CATTATAAAGTGAATATCGCGGTAACGGCTTCCGAGCAACGGTCCGGTGATGCAGAAAGCGATTTCTGGGCATG
 GAACCGAGCTTTGAAGTGGTGTATATGAACAGCGGTGTGCTGGTGGGCGAAGTGGATCTGGTGTATAAACTGGAA
 AGCGGCAACTATTATAGCTGCCATATGAAAACCTTTTATCGCAGCAAAGGCGGTGTGAAAGAATTTCCGGAATAT
 CATTTTATTCATCATCGCCTGGAAAAACCTATGTGGAAGAAGGCAGCTTTGTGGAACAGCATGAAACCGCGATT
 GCGCAGCTGACCACCATTTGGCAAACCGCTGGGCAGCCTGCATGAATGGGTGTAACTGACTGAAAAGCTT

2.4 pUbi-RFP

Die aufgeführte kodierende Sequenz wurde über die Restriktionsschnittstellen von *Eco*RI (GAATTC) und *Sal*I (GTCGAC) in Vektor pUbi-ABM kloniert.

GAATTCGGCGGTATGCGCTCCTCCGAGGACGTATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCGCATGGAGGGCTCC
 GTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTG
 AAGGTGACCAAGGGCGGCCCTGCCCTTCGCTGGGACATCCTGTCCCTCAGTTCAGTACGGCTCCAAGGCC
 TACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCGACTACTTGAAGCTGTCTTCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTG
 ATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAG
 GTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCCTCC
 ACCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGATGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGC
 CACTACGACGCCGAGGTCAAGACCACCTACATGGCCAAGAAGCCGTGCAGCTGCCCGGCCTACAAGACCGAC
 ATCAAGCTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAGCGCGCCGAGGGCCGCCAC
 TCCACCGGCGCCTAAGTCGAC

2.5 pUbi-RBCS-GFP

Die aufgeführte kodierende Sequenz wurde über die Restriktionsschnittstellen von *Bam*HI (GGATCC) und *Hind*III (AAGCTT) in Vektor pUbi-ABM kloniert. Die GFP-Sequenz ist grün markiert.

GGATCCATGGCCCCACCGTGATGGCCTCATCGGCAACCTCCGTCGCTCCTTTCCAGGGGCTCAAGTCCACCGCC
 GGCCTTCCCGTCAGCCGCCGCTCCAACGCTAGCTCGGCCAGCGTCAGCAACGGTGAAGGATCAGGTGCATGCAG
 GTGTGGCCCATCGAGGGCATCAAGAAGTTCGAGACCCTGTCTTACCTTCCACCACTCAGCACGGAGGCCCTCCTT
 AAGCAGGTCGACTACCTGATCCGCTCCAAGTGGGTGCCTTGCTCGAGTTCAGCAAGGTTGGGTTTCATCTCCGT
 GAGCACAACGCATCTCCTGGGTACTACGATGGCCGGTACTGGACAATGTGGAAGCTGCCTATGTTCCGGATGCACC
 GACGCCACACAGGTGCTCAACGAGGTGGAGGAGGTCAAGAAGGAGTACCCTGACGCGTATGTCCGCATCATCGGA
 TTCGACAACATGCGTCAGGTGCAGTGCCTCAGCTTTCATCGCTTTCAAGCCACCAGGCTGCCAGGAGTCGGGCAAG
 GCACCCGGGGGAACAATGAACCGCAACGTGCTGAAAAACACCGGTCTGAAAGAAATATGAGCGCGAAAAGCGAGC

GTGGAAGGCATTGTGAACAACCATGTGTTTTAGCATGGAAGGCTTTGGCAAAGGCAACGTGCTGTTTTGGCAACCAG
 CTGATGCAGATTTCGCGTGACCAAAGGCGGTCCGCTGCCGTTTGCCTTTGATATTGTGAGCATTGCGTTTCAGTAT
 GGCAACCGCACCTTTACCAAATATCCGGATGATATTGCGGATTATTTTTGTGCAGAGCTTTCCGGCAGGCTTTTTT
 TATGAACGCAACCTGCGCTTTGAAGATGGTGGCATTGTGGATATTTCGAGCGATATTAGCCTGGAAGATGATAAA
 TTTTATTATAAAGTGAATATCGCGGTAACGGCTTTCCGAGCAACGGTCCGGTGATGCAGAAAAGCGATTCTGGGC
 ATGGAACCGAGCTTTGAAGTGGTGTATATGAACAGCGGTGTGCTGGTGGGCGAAGTGGATCTGGTGTATAAACTG
 GAAAGCGGCAACTATTATAGCTGCCATATGAAAACCTTTTATCGCAGCAAAGGCGGTGTGAAAGAATTTCCGGAA
 TATCATTATTATTCATCATCGCTGGAAAAACCTATGTGGAAGAAGGCAGCTTTGTGGAACAGCATGAAACCGCG
 ATTGCGCAGCTGACCACCATTGGCAAACCGCTGGGCAGCCTGCATGAATGGGTGTAAACTGACTGAAAGCTT

2.6 pMAL-c5X-HvPAP14

Die aufgeführte kodierende Sequenz wurde über die Restriktionsschnittstellen von *XmnI* (GAANNNTTC) und *SalI* (GTCGAC) in Vektor pMAL-c5X kloniert.

ATGGACTTCGGCGACCACGACCTGGCGTCGGAGGACTCCCTATGGGCGCTGTACGAGCGCTGGCGGGAGCAGCAC
 ACCGTGGCGCGCGACCTGGGCGAGAAGGCCCGACGCTTCAACGTGTTTCAGGGAGAACGTCCGCCTCATCCACGAG
 TTCAACCGCGGTGACGCCCCCTACAAGCTCCGCCTCAACCGCTTCGGCGACATGACCGCCGACGAGTTCCGCCG
 GCCTACGCCTCCTCCCGCTCTCTCACCACCGCATGTTACGCCTTAAGGAGGGTGGTGGCGGTTTCATGCACGGC
 AGCGCTGCCTCCGTCCGGGACGTGCCGCCGTCCGGTGGACTGGCGGCAGAAGGGCGCGGTGACCGCCGTCAAGGAC
 CAAGGGCAGTGCGGCAGCTGCTGGGCTTTCTCGACGATCGCGGCCGTGGAGGGCATCAACGCTATCCGCTCTAAG
 AACCTCACGTCTCTGTCCGAGCAGCAGCTCGTGGACTGCGACACGAAGTCCAACGCCGGCTGCAACGGCGGCCTC
 ATGGACTACGCCTTCCAGTACATCGCCAAGCATGGCGGGGTGGCCGCCGAGGACGCGTACCCCTACAAGGCCAGG
 CAGGCCTCCTCCTGCAACAAGAAGCCGTCCGCCGTGGTACCATCGACGGGTATGAGGACGTGCCCGCCAACGAC
 GAAACCGCGCTGAAGAAGGCGGTGGCTGCACAGCCAGTGGCCGTGGCCATCGAGGCTAGCGGGTTCGCACTTCCAG
 TTCTACTCGGAGGGGGTGTTCGCGGGCAAGTGCGGGACGGAGCTGGACCATGGCGTGGCGGCGGTGGGGTACGGC
 ACCACCGTGGACGGCACCAAGTATTGGATCGTGAAAACTCATGGGGGCCGGAGTGGGGTGAAGAAGGATAACATC
 CGCATGAAGCGCGATGTGAAGGACAAGGAAGGGCTCTGCGGGATCGCCATGGAGGCGTCTACCCAGTCAAGACC
 TCAGCCAACCCGAAGCATGCCGGTGGCCATGACGAGCTCTGAGTCGAC

2.7 pMAL-c5X-HvPAP14(ΔHDEL)

Die aufgeführte kodierende Sequenz wurde über die Restriktionsschnittstellen von *XmnI* (GAANNNTTC) und *SalI* (GTCGAC) in Vektor pMAL-c5X kloniert.

ATGGACTTCGGCGACCACGACCTGGCGTCGGAGGACTCCCTATGGGCGCTGTACGAGCGCTGGCGGGAGCAGCAC
 ACCGTGGCGCGCGACCTGGGCGAGAAGGCCCGACGCTTCAACGTGTTTCAGGGAGAACGTCCGCCTCATCCACGAG
 TTCAACCGCGGTGACGCCCCCTACAAGCTCCGCCTCAACCGCTTCGGCGACATGACCGCCGACGAGTTCCGCCG
 GCCTACGCCTCCTCCCGCTCTCTCACCACCGCATGTTACGCCTTAAGGAGGGTGGTGGCGGTTTCATGCACGGC
 AGCGCTGCCTCCGTCCGGGACGTGCCGCCGTCCGGTGGACTGGCGGCAGAAGGGCGCGGTGACCGCCGTCAAGGAC
 CAAGGGCAGTGCGGCAGCTGCTGGGCTTTCTCGACGATCGCGGCCGTGGAGGGCATCAACGCTATCCGCTCTAAG
 AACCTCACGTCTCTGTCCGAGCAGCAGCTCGTGGACTGCGACACGAAGTCCAACGCCGGCTGCAACGGCGGCCTC
 ATGGACTACGCCTTCCAGTACATCGCCAAGCATGGCGGGGTGGCCGCCGAGGACGCGTACCCCTACAAGGCCAGG
 CAGGCCTCCTCCTGCAACAAGAAGCCGTCCGCCGTGGTACCATCGACGGGTATGAGGACGTGCCCGCCAACGAC
 GAAACCGCGCTGAAGAAGGCGGTGGCTGCACAGCCAGTGGCCGTGGCCATCGAGGCTAGCGGGTTCGCACTTCCAG
 TTCTACTCGGAGGGGGTGTTCGCGGGCAAGTGCGGGACGGAGCTGGACCATGGCGTGGCGGCGGTGGGGTACGGC
 ACCACCGTGGACGGCACCAAGTATTGGATCGTGAAAACTCATGGGGGCCGGAGTGGGGTGAAGAAGGATAACATC
 CGCATGAAGCGCGATGTGAAGGACAAGGAAGGGCTCTGCGGGATCGCCATGGAGGCGTCTACCCAGTCAAGACC
TGAGTCGAC

2.8 pUbi-HvPAP14

Die aufgeführte kodierende Sequenz wurde über die Restriktionsschnittstellen von *HindIII* (AAGCTT) und *Sall* (GTCGAC) in Vektor pUbi-ABM kloniert.

```
AAGCTTATGGCGAGAGCGATCGTGCTTGGCGCCACCATGGCCGCGGCCGCGCTGTTTCATGCTGCTGGCCGCTGCG  
CCAGCGCCGGCGAGCGCCATGGACTTCGGCGACCAACGACCTGGCGTCCGAGGACTCCCTATGGGCGCTGTACGAG  
CGCTGGCGGGAGCAGCACACCGTGGCGCGCGACCTGGGCGAGAAGGCCCGACGCTTCAACGTGTTTCAGGGAGAAC  
GTCCGCCTCATCCACGAGTTCAACCGCGGTGACGCCCCCTACAAGCTCCGCCTCAACCGCTTCGGCGACATGACC  
GCCGACGAGTTCCGCCGCGCCTACGCCTCCTCCCGCGTCTCTCACCACCGCATGTTTCAGCCTTAAGGAGGGTGGT  
GGCGGTTTTTCATGCACGGCAGCGCTGCCTCCGTCCGGGACGTGCCGCCGTCGGTGGACTGGCGGCAGAAGGGCGCG  
GTGACCGCCGTCAAGGACCAAGGGCAGTGCGGCAGCTGCTGGGCTTTCTCGACGATCGCGCCGTGGAGGGCATC  
AACGCTATCCGCTCTAAGAACCTCACGTCTCTGTCCGAGCAGCAGCTCGTGGACTGCGACACGAAGTCCAACGCC  
GGCTGCAACGGCGGCCTCATGGACTACGCCTTCCAGTACATCGCCAAGCATGGCGGGGTGGCCGCCGAGGACGCG  
TACCCCTACAAGGCCAGGCAGGCCTCCTCCTGCAACAAGAAGCCGTCCGCCGTGGTCAACATCGACGGGTATGAG  
GACGTGCCCCGCAACGACGAAACCGCGCTGAAGAAGGCGGTGGCTGCACAGCCAGTGGCCGTGGCCATCGAGGCT  
AGCGGGTCGCACTTCCAGTTCTACTCGGAGGGGGTGTTCGCGGGCAAGTGCGGGACGGAGCTGGACCATGGCGTG  
GCGGGCGTGGGGTACGGCACCACCGTGGACGGCACCAAGTATTGGATCGTAAAAACTCATGGGGGCCGGAGTGG  
GGTGAGAAGGGATACATCCGCATGAAGCGCGATGTGAAGGACAAGGAAGGGCTCTGCGGGATCGCCATGGAGGCG  
TCCTACCCAGTCAAGACCTCAGCCAACCCGAAGCATGCCGGTGGCCATGACGAGCTCTGAGTTCGAC
```

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit - abgesehen von der Beratung durch meine Betreuerin - nach Inhalt und Form meine Arbeit ist und unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft angefertigt wurde. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Ein Teil dieser Arbeit ist in einem Manuskript enthalten, das als Arbeit III Teil der kumulativen Dissertation von Julien Hollmann (CAU, 2016) ist. Dies betrifft die Untersuchungen zur pH-abhängigen Aktivität der Cysteinprotease HvPAP14 sowie die subzelluläre Lokalisation der Protease durch Überexpression eines RFP-Fusionskonstrukts in Gerstenprotoplasten. Der Titel der Dissertation von Julien Hollmann lautet: „Identifikation und Lokalisation der seneszenzassoziierten Cysteinprotease HvPAP14 in Gerste“.

Arbeit III: Hollmann, J., Frank, S., Mulisch, M., Matros, A., Carrión, C., Mock, H-P., Krupinska, K. (2016). The senescence upregulated gene HvPAP14 encodes a cysteine protease associated to thylakoid membranes after activation. *The Plant Journal*, eingereicht am 19.09.2016

Ansonsten wurde diese Arbeit bisher an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt.

Beiträge in Mitteilungsbänden von Tagungen:

Frank S, Hollmann J, Desel C, Krupinska K (2013). Subcellular localization of the senescence associated cysteine proteinase HvPAP14. 6th European Workshop on Plant Senescence, Versailles.

Frank S, Hollmann J, Krupinska K (2015). The senescence-associated cysteine peptidase HvPAP14. 28. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen.

Kiel, den _____

Susann Frank

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich vor allem bei Frau Prof. Dr. Karin Krupinska bedanken, dafür, dass sie mir ermöglichte an diesem Thema zu arbeiten, mir ihr Vertrauen schenkte und mich mit vielen hilfreichen Anregungen und Diskussionen unterstützte.

Für das tolle Arbeitsklima danke ich auch Julien, Christine, Svenja, Andrea, Mirl, Luka, Andrea, Christina, Susanne, Anke, Ulrike, Elisabeth, Rena, Wera und Uwe. Besonders schätze ich eure große Bereitschaft, Probleme gemeinsam anzugehen und den fachlichen und methodischen Austausch. Julien danke ich für die Diskussionen über HvPAP14 und die Welt. Christine danke ich dafür, dass sie mich der Mikroskopie noch näher brachte. Auch der AG Schulz danke ich für die Unterstützung.

Des Weiteren möchte ich mich bei Menschen bedanken, die mich auf dem Weg bis hierher begleitet haben: Susanne Pelka danke ich dafür, dass mein Interesse an Biologie und Chemie noch mehr geweckt hat. Dr. Christian Sievert danke ich für die Unterstützung bei meinen ersten selbstständigen Schritten im Labor. Bei PD Dr. Christoph Plieth möchte ich mich für die unzähligen hilfreichen Tipps bedanken und dafür, dass er mir beibrachte, dass es immer mehr als nur einen Weg gibt, der ans Ziel führt. Prof. Dr. Axel Scheidig danke ich für die Unterstützung während des gesamten Studiums und noch darüber hinaus.

Meinen Freunden und meiner Familie danke ich für die liebe Unterstützung und die nötigen Ablenkungen. Besonders danke ich Jens dafür, dass er ist, wie er ist, und mir immer wieder Kraft gibt. Maren danke ich dafür, dass sie so viel mehr für mich ist als nur eine Schwester. Meiner Mutti danke ich für den bedingungslosen Rückhalt. Millie danke ich, dass sie an meiner Seite ist.