

**Charakterisierung von Cyclophilinen**  
*aus Brassica napus*  
**und ihr Einfluss auf die Virusinfektion**

Dissertation zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften  
der Fakultät Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
Fachbereich Biologie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von  
Patrizia Hanhart  
aus Bad Oldesloe

Hamburg, 2018

Vorsitzender der Prüfungskommission:

Jun.-Prof. Wim Walter

1. Gutachterin:

Prof. Dr. Julia Kehr

2. Gutachter:

Prof. Dr. Stefan Hoth

Disputationstermin: 12.04.2019

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Einfluss von Viren auf Nutzpflanzen	2
1.1.1	Das <i>Turnip mosaic virus</i>	2
1.2	Die systemische Verbreitung von Viren	3
1.2.1	Phloem und Xylem	3
1.2.2	Das Phloem als Transportroute der Viren	5
1.3	Grundlagen der pflanzlichen Immunantwort	6
1.3.1	PTI und ETI	7
1.3.2	Antivirale Strategien	8
1.4	Peptidyl-Prolyl <i>cis/trans</i> Isomerasen	9
1.4.1	CYP-Familien in Pflanzen und anderen Organismen	11
1.4.2	Die Struktur von CYPs ist auch in Pflanzen hochkonserviert	12
1.4.3	CYPs spielen eine wichtige Rolle in der humanen Virusabwehr	13
1.4.4	Die Rolle von CYPs in der pflanzlichen Immunantwort	13
1.5	<i>Arabidopsis thaliana</i> und <i>Brassica napus</i> als Modellorganismen	15
1.6	Zielsetzung	16
<b>2</b>	<b>Material &amp; Methoden</b>	<b>19</b>
2.1	Bioinformatische Methoden	19
2.1.1	Identifizierung von <i>B. napus</i> CYPs	19
2.1.2	Bioinformatische Charakterisierung	19
2.1.3	Sequenzvergleich	20
2.1.4	Phylogenetische Analyse und Genkartierung	20
2.1.5	Expressionsprofil und -analyse von Cyclophilinen	20
2.2	Pflanzenbiologische Methoden	20
2.2.1	Anzucht	20
2.2.2	Virusinfektion von <i>B. napus</i> Pflanzen	21
2.2.3	Gewinnung von Phloem- und Xylemsudat	21
2.2.4	Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial	22
2.2.5	Extraktion von genomischer DNA aus Pflanzenmaterial	22
2.2.6	Genotypisierung von T-DNA-Insertionslinien	22
2.2.7	Bestimmung der T-DNA-Insertionsstelle	23
2.2.8	Extraktion von RNA aus Pflanzenmaterial und Reverse Transkription	24
2.2.9	Semiquantitative RT-PCR zum Nachweis der Genexpression in T-DNA-Insertionslinien	24
2.3	Molekularbiologische Methoden	24
2.3.1	Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifikation von Genabschnitten für die Klonierung	25
2.3.2	Agarose-Gelelektrophorese	26
2.3.3	Restriktionsverdau, Dephosphorylierung und Ligation	26
2.3.4	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	27

2.3.5	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	27
2.3.6	PCR zum Nachweis positiver <i>E. coli</i> Transformanten	28
2.3.7	Plasmidisolierung und -sequenzierung	28
2.3.8	Herstellung von <i>E. coli</i> Dauerkulturen	29
2.4	Proteinbiochemische Methoden	29
2.4.1	SDS-PAGE	29
2.4.2	Nachweis von Redoxzuständen mit einer denaturierenden SDS PAGE	30
2.4.3	Kolloidale Coomassie-Färbung	30
2.4.4	Western Blot	30
2.4.5	Proteinüberexpression	31
2.4.6	Löslichkeitstest	32
2.4.7	Proteinaufreinigung	32
2.4.8	Bestimmung der PPIase Aktivität	33
2.5	Proteomanalytische Methoden	34
2.5.1	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford	34
2.5.2	Proteinpräzipitation	34
2.5.3	2D-Gelelektrophorese	35
2.5.4	MALDI-TOF Massenspektrometrie	36
2.5.5	Proteomanalysen mittels LC-MS/MS	36
2.6	Strukturbiologische Methoden	37
2.6.1	Probenvorbereitung für Kleinwinkelröntgenstreuungsexperimente	37
2.6.2	Dynamische Lichtstreuung	37
2.6.3	Kleinwinkelröntgenstreuung	38
2.6.4	Proteinkristallisation und Röntgenstrukturanalyse	39
2.6.5	Erstellung von Homologiemodellen und Darstellung der Strukturen	41
<b>3</b>	<b>Ergebnisse &amp; Diskussion</b>	<b>43</b>
3.1	Die <i>B. napus</i> Cyclophilinfamilie	43
3.1.1	Die Cyclophilin-ähnliche Domäne innerhalb der BnCYP-Familie	44
3.1.2	Zusätzliche Domänen ermöglichen spezifische Funktionen	46
3.1.3	Zwei Chromosomensätze führen zu einer großen Anzahl an BnCYP-Genen	46
3.1.4	Ein Großteil der BnCYPs wird unter Standardbedingungen exprimiert	47
3.1.5	Die Untergruppe der 18-19 kDa BnCYPs	50
3.2	BnCYPs im Phloem	51
3.2.1	Überprüfung der Reinheit von Phloem- und Xylemproben mittels Western Blot	52
3.2.2	BnCYPs befinden sich im Langstreckentransportsystem Phloem	54
3.2.3	Phloemexsudat zeigt eine PPIase Aktivität	61
3.3	Expression und Aufreinigung rekombinanter CYPs	62
3.3.1	Das Expressionssystem	63
3.3.2	Expression und Löslichkeit als Grundlage für eine effiziente Aufreinigung	64
3.3.3	Die Proteinaufreinigung	66
3.3.4	BnCYPs können unterschiedliche Redoxzustände einnehmen	68

3.4	Nachweis der Enzymaktivität von rekombinanten <i>B. napus</i> und <i>A. thaliana</i> CYPs	69
3.4.1	Der PPIase Assay: Ein Kompromiss aus Genauigkeit und Durchführbarkeit	72
3.4.2	Ein Fazit zur Analyse der Enzymaktivität	73
3.5	Strukturelle Analyse von <i>single-domain B. napus</i> und <i>A. thaliana</i> CYPs	73
3.5.1	SAXS-Messungen zur Bestimmung der Struktur in Lösung	73
3.5.2	Untersuchung von strukturellen Änderungen durch Inhibitorbindung	80
3.5.3	Röntgenstrukturanalyse für die atomare Auflösung	83
3.5.4	Unterschiede in der Aminosäuresequenz der 18-19 kDa BnCYPs befinden sich überwiegend auf der Proteinoberfläche	87
3.5.5	Die Enzymaktivität könnte durch strukturelle Änderungen reguliert werden	88
3.6	Regulation von BnCYPs während der Virusinfektion	91
3.6.1	Infektions- und Kontaminationskontrolle der Proben	92
3.6.2	LC-MS/MS Proteomanalyse	94
3.7	Einfluss der Virusinfektion auf die Genexpression von AtCYPs	96
3.8	Etablierung von <i>A. thaliana</i> Mutanten für Stressexperimente	97
3.8.1	Genotypisierung, Nachweis der T-DNA-Insertionsstelle und Genexpressionsanalyse	98
3.8.2	Unter normalen Wachstumsbedingungen zeigt keine AtCYP-Mutante einen Phänotyp	102
<b>4</b>	<b>Fazit &amp; Ausblick</b>	<b>105</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>111</b>
<b>6</b>	<b>Abstract</b>	<b>113</b>
<b>7</b>	<b>Literatur</b>	<b>115</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>125</b>
8.1	Primer	125
8.2	Vektor pET28a+	126
8.3	Die BnCYP Proteinfamilie	127
8.4	Sequenzvergleich der 91 BnCYP-CLDs	130
8.5	Die AtCYP-Familie und ihre BnCYP Homologe	134
8.6	Aminosäuresequenzen rekombinanter CYPs	136
8.7	Übersicht: rekombinante CYPs, <i>in vitro</i> Experimente und <i>A. thaliana</i> Mutanten	137
<b>9</b>	<b>Aus dieser Arbeit hervorgegangene Veröffentlichungen</b>	<b>138</b>
9.1	Publikationen	138
9.2	Konferenzbeiträge	138
<b>10</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>139</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung</b>	<b>140</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AGO	ARGONAUTE
BSA	Rinderserumalbumin
CC	Geleitzelle
cDNA	komplementäre DNA
CLD	Cyclophilin-ähnliche Domäne
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>
CP	Hüllprotein, <i>coat protein</i>
CsA	Cyclosporin A
cv.	Kultivar
CYP	Cyclophilin
DCL	<i>dicer-like</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige RNA
gDNA	genomische DNA
ER	endoplasmatisches Retikulum
ETI	<i>effector-triggered immunity</i>
ETS	<i>effector-triggered susceptibility</i>
FKBP	FK506-bindendes Protein
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
His <sub>6</sub> -Tag	Polyhistidin-Tag
HR	hypersensitive Reaktion
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilo-Basen
Mbp	Mega-Basenpaare
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	Molekulargewicht
NB-LRR	<i>nucleotide binding (NB) and leucine rich repeat (LRR) domain</i>
NF-AT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NMR	Kernspinresonanz
NSD	<i>normalised spatial discrepancy</i>
nt	Nukleotide
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PPIase	Peptidyl-Prolyl <i>cis/trans</i> Isomerase
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PTI	<i>PAMP-triggered immunity</i>
PTPA	Serin-/Threonin-Phosphatase 2A-Aktivator
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
SA	Salizylsäure
SAR	<i>systemic acquired resistance</i>
SE	Siebelement
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
ssRNA	einzelsträngige RNA
TBSV	<i>Tomato bushy stunt virus</i>
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
tRNA	Transfer-RNA
TuMV	<i>Turnip mosaic virus</i>
UTR	untranslatierter Bereich

**Abkürzungen der Aminosäuren:**

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



# 1 EINLEITUNG

In der Molekularbiologie werden Methoden der Biophysik, Biochemie, Genetik und Bioinformatik kombiniert, um ein Grundverständnis der Prozesse innerhalb einer Zelle zu erlangen. Vor allem die Genexpression und Proteinfunktion stehen im Fokus von Untersuchungen. Um diese aufzuklären, gibt es unterschiedliche experimentelle Ansätze, welche aufgrund der Vorgehensweise unterschieden werden. In der Molekularbiologie werden häufig *in silico*, *in vitro* oder *in vivo* Ansätze verfolgt. Mit „*in silico*“ werden bioinformatische Vorhersagen, Simulationen oder Berechnungen bezeichnet. Im Gegensatz zu diesen, bezeichnen „*in vitro*“ und „*in vivo*“ Arbeiten mit biologischem Material. *In vitro* Untersuchungen finden außerhalb des lebenden Organismus statt, während bei *in vivo* Studien ein Prozess innerhalb eines lebenden Organismus untersucht wird. In Kombination liefern diese Ansätze Erkenntnisse im Sinne der Grundlagenforschung. Für die Pflanzenforschung bedeutet dies, dass über die Grundlagenforschung funktionelle Zusammenhänge aufgeklärt und für die Optimierung von Nutzpflanzen eingesetzt werden können. Dies ist zukünftig eine wichtige Herangehensweise, um die Ernährung der stetig wachsenden Weltbevölkerung gewährleisten zu können. Auch steigt die Nachfrage nach Biomasse als erneuerbare Energiequelle. Als kritischer Faktor bleibt immer die äußere Umwelt, da diese zu Ernteeinbußen in unterschiedlichem Ausmaß führen kann.

Im Gegensatz zu Individuen anderer Organismenreiche sind Pflanzen sessil und darauf angewiesen, an ihrem Standort mit veränderlichen Umweltbedingungen umgehen zu können. Dies betrifft nicht nur abiotische Faktoren wie die Limitierung von Wasser und Nährstoffen oder die Veränderung der klimatischen Bedingungen. Auch biotische Auseinandersetzungen wie Schädigungen durch Pathogene oder Herbivore können Pflanzen beeinträchtigen. Weicht ein Umweltfaktor von dem optimalen Anpassungsbereich der Pflanze ab, steht diese unter Stress. Um sich solchen Schwankungen anzupassen, haben Pflanzen deshalb vielfältige Strategien entwickelt. So besitzen sie z. B. Sensoren, um verschiedene Arten von Stressoren wie Kälte-, Hitze- und osmotischen Stress wahrnehmen zu können (Zhu 2016). Pathogene hingegen können von Pflanzen anhand von pathogenspezifischen Mustern oder Effektoren erkannt werden (Gust *et al.* 2017). In jedem Fall führt die Registrierung eines Signals zu Veränderungen in der Genexpression, dem Metabolismus oder der Physiologie. Da solche Stressantworten mit Wachstum und Entwicklung koordiniert werden müssen, gibt es Überschneidungen zwischen den verschiedenen Signalwegen. Diese zu entschlüsseln ist essentiell, um die Auswirkungen eines Stresses auf die Pflanze im Ganzen verstehen zu können.

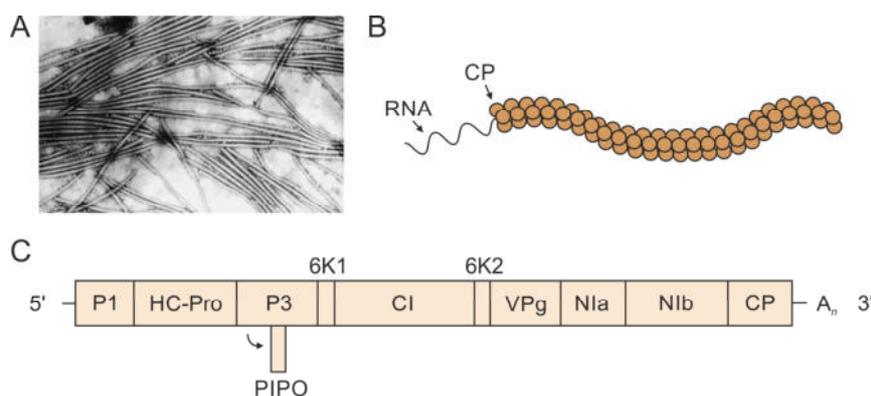
## 1.1 Einfluss von Viren auf Nutzpflanzen

Virusinfektionen sind verantwortlich für die Hälfte aller Krankheiten von Nutzpflanzen und spielen damit eine tragende Rolle für Qualitätsverlust und Ertragsausfall (Palukaitis *et al.* 2013). Gleichzeitig ist es schwierig, effektive Wirkstoffe gegen Viren zu finden, welche auf dem Feld eingesetzt werden können (Palukaitis *et al.* 2017). Auch eine genetische Resistenz, welche durch Kreuzungen oder die Einbringung von Transgenen vermittelt werden kann (Galvez *et al.* 2014), wird von Viren aufgrund ihrer genomischen Plastizität schnell überwunden. Bis heute sind Resistenzen gegen Pilze, Oomyceten und Prokaryoten deutlich besser untersucht als gegen Viren.

Zu den am besten untersuchten Viren gehören Vertreter der größten Gruppe von Pflanzenviren, der +ssRNA-Viren. Dies sind unter anderem *Cucumber mosaic virus* (CMV), welches zur Gattung der *Cucumoviren* gehört und in seiner virulenten Form als ikosaedrisches Kapsid vor allem Gurken- und Kürbisarten befällt, oder *Tobacco mosaic virus* (TMV), ein röhrenförmiges *Tobamovirus*, dessen Wirtsspektrum eine große Anzahl an Nutz- und Zierpflanzen umfasst. Ein weiteres +ssRNA-Virus, welches vor allem *Brassicaceen* wie *A. thaliana* und Nutzpflanzen wie Raps (*B. napus*) und Rübsen (*B. rapa*) infiziert, ist das *Turnip mosaic virus* (TuMV).

### 1.1.1 Das *Turnip mosaic virus*

Das TuMV gehört zur Gattung der *Potyviren* und damit zur Familie der *Potyviridae*. Typischerweise wird dieses Virus über Blattläuse verbreitet, es kann aber auch über Wundstellen in die Pflanze gelangen. Die 10 kb große +ssRNA ist infektiös und wirkt sowohl als Genom als auch als virale mRNA. Sie ist in einem flexiblen, filamentösen, helikalen Kapsid aus Hüllproteinen (*coat protein*, CP) verpackt (Abbildung 1A, B) (Walsh und Jenner 2002). Der Infektionszyklus umfasst nach dem Eindringen des Virus in die Wirtszelle dessen Replikation in viralen Replikationskomplexen, die Verbreitung innerhalb der Pflanze und die anschließende Übertragung durch einen Vektor. Das Virus nutzt hierfür nicht nur wirtseigene Proteine, sondern bringt auch ein eigenes Set an Proteinen mit (Abbildung 1C) (Mäkinen und Hafrén 2014; Wei *et al.* 2010). Der Infektionszyklus von TuMV und dessen Immunabwehr durch den Wirt ist Gegenstand intensiver Forschung, sodass ein Großteil der Infektion auf molekularer Ebene entschlüsselt werden konnte (Ivanov *et al.* 2014; Mäkinen und Hafrén 2014; Patarroyo *et al.* 2012). Ursprünglich wurde dieses Virus wahrscheinlich vor etwa 1000 Jahren von wilden Orchideen auf *Brassicaceen* übertragen und hat sich seitdem über wilde und landwirtschaftlich genutzte *Brassicaceen* weltweit verbreitet (Nguyen *et al.* 2013). Es gibt eine Vielzahl unterschiedlicher Stämme, welche in Kombination mit der Wirtspflanze und den vorherrschenden Umweltbedingungen zu unterschiedlichen Krankheitssymptomen führen. Diese äußern sich vielfältig und umfassen unter anderem Mosaikmuster, Nekrosen und Verkrüppelungen (Walsh und Jenner 2002). Da TuMV *Brassicaceen* und damit auch *A. thaliana* infiziert, stellt es ein gutes Modell für Studien zu Pflanzen-Virus-Interaktionen dar und liefert gleichzeitig die Möglichkeit, die gewonnenen Erkenntnisse auf Nutzpflanzen zu übertragen.



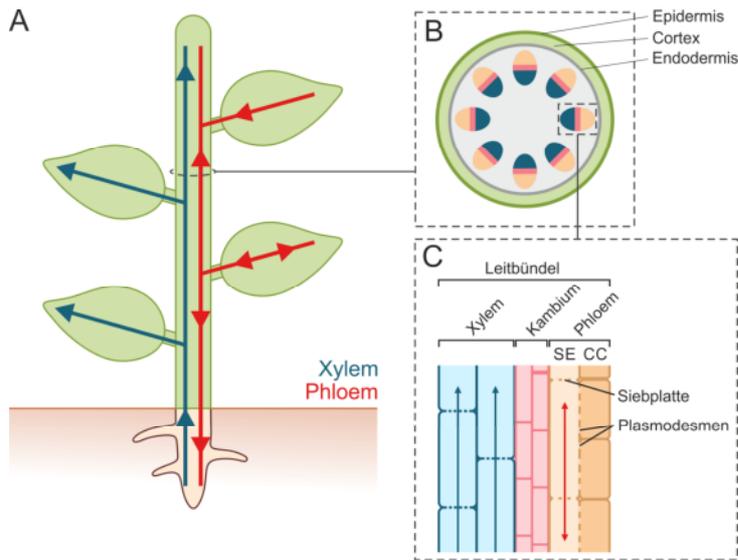
**Abbildung 1: Virionen und Genom des TuMV.** (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme von TuMV-Virionen. Aus Walsh und Jenner (2002). (B) Schematische Darstellung eines TuMV-Virions. (C) Darstellung des TuMV-Genoms, welches nach der Translation zum Polyprotein in 10 Proteine prozessiert wird. Zusätzlich kann durch eine Leserasterverschiebung des Ribosoms während der Translation das Transportprotein P3N-PIPO translatiert werden, bestehend aus dem N-terminalen Teil des P3 Proteins und einem durch die Leserasterverschiebung translatierten überlappenden Leseraster des Proteins PIPO (Pfeil). Das Genom kodiert folgende Proteine: P1 = Serinprotease, HC-Pro = Suppressor und Cysteinprotease, P3 = multifunktionales Protein, P3N-PIPO = Transportprotein, 6K1 = unbekannte Funktion, CI = Helikase, 6K2 = integrales Membranprotein, VPg = genomverknüpftes Protein, NIa = Cysteinprotease, NIb = RNA-abhängige RNA-Polymerase, CP = Hüllprotein.

## 1.2 Die systemische Verbreitung von Viren

Essentiell für die Ausbildung von Krankheitssymptomen ist die Verbreitung innerhalb des Wirts, welche durch Zell-zu-Zell- und Langstreckentransport ermöglicht wird. Studien zum Zell-zu-Zell-Transport zeigten auf, dass Viren für den Transport von ihrem Replikationsort zu den Plasmodesmen sehr unterschiedliche Mechanismen entwickelt haben (Patarroyo *et al.* 2012; Niehl und Heinlein 2011). Im Gegensatz zum Zell-zu-Zell-Transport sind die Mechanismen, welche den Langstreckentransport vermitteln, bis heute nur wenig verstanden. Basierend auf Studien an verschiedenen Virenarten wurden aber auch hierfür unterschiedliche Modelle aufgestellt. Einig sind sich alle Hypothesen darin, dass sich Viren zur systemischen Verbreitung existierende Transportrouten der Vaskulatur zunutze machen (Hipper *et al.* 2013; Folimonova und Tilsner 2018).

### 1.2.1 Phloem und Xylem

Bei der Vaskulatur handelt es sich um ein Transportsystem, das durch den Transport von Wasser, Nährstoffen und Signalmolekülen die Versorgung und Kommunikation zwischen entfernten Geweben ermöglicht. Es befördert Substanzen, die für das pflanzliche Wachstum, die Entwicklung, den Metabolismus sowie Stressantworten wichtig sind. Zudem erfüllt es eine mechanische Stützfunktion. Zwei Komponenten des vaskulären Systems, das Phloem und Xylem, sind in Leitbündeln organisiert (Abbildung 2) und entwickeln sich in dikotylen Pflanzen aus dem zwischen ihnen liegenden Kambium. Zellen des Kambiums gelten deshalb als vaskuläre Stammzellen (Miyashima *et al.* 2013).



**Abbildung 2: Übersicht zur Vaskulatur zweikeimblättriger Pflanzen.** (A) Das Langstreckentransportsystem gliedert sich in die zwei Systeme Xylem und Phloem, welche als Leitgewebe die gesamte Pflanze durchziehen. Zur Veranschaulichung sind ein Sprossquerschnitt (B) und ein Leitbündel (C) schematisch dargestellt. SE = Siebelement, CC = Geleitzellen (*companion cells*).

Das Xylem stellt ein holziges Leitgewebe dar, welches transpirationsgetrieben Wasser und mineralische Nährstoffe und Hormone von den Wurzeln zu überirdigen Organen wie Stängel, Blättern, Blüten und Früchten transportiert und durch abgelagertes Lignin in den Zellwänden zur Stützfunktion beiträgt. Es handelt sich hierbei um abgestorbene Röhrenzellen, welche während der Entwicklung des Xylems einen programmierten Zelltod erfahren haben (Fukuda 2000).

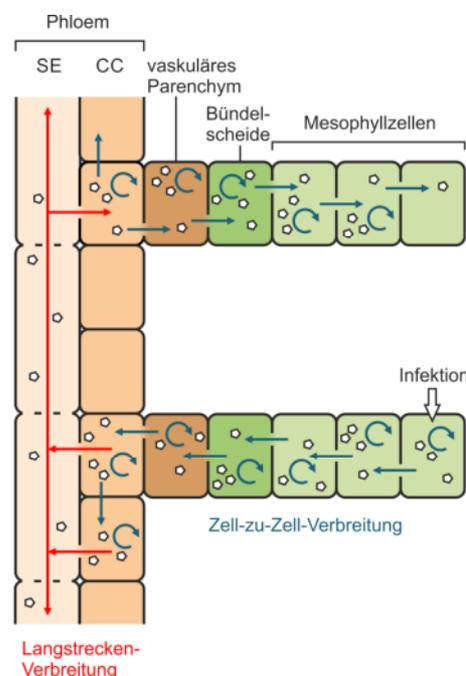
Über das Phloem werden Zucker, Aminosäuren, mineralische Nährstoffe, Phytohormone, Proteine, RNA und Lipide transportiert (Hoad 1995; Ham und Lucas 2014; Kehr 2009; Buhtz *et al.* 2010; Benning *et al.* 2012). Im Gegensatz zum Xylem, dessen Transportleistung vom Transpirationssog bestimmt wird, ist der Transport über das Phloem durch einen osmotischen Gradienten von *source* (dem Ort der Entstehung) zu *sink* (dem Ort des Verbrauchs wie Wurzel, junge Blätter, Blüte und Meristem) charakterisiert (Münch 1930). Der Transport erfolgt über die Siebröhren, welche aus elongierten Siebelementen (SE) bestehen. Während der Entwicklung des Phloems entstehen SEs und Geleitzellen (CCs) aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle durch eine ungleiche Teilung (Esau 1969), bleiben aber über sekundäre Plasmodesmen miteinander verbunden, welche zur CC-Seite hin zusätzliche, weitverzweigte Kanäle besitzen. Während der Reifung wird in den SEs die Vakuole, der Nukleus, das raue ER und der Golgi-Apparat degradiert. Im Gegensatz zu den SEs könne sich die CCs weiter teilen und besitzen eine erhöhte Anzahl an Plastiden, Mitochondrien und Ribosomen (Cronshaw 1981). Mit dem Verlust der Organellen wie dem Nukleus haben die SEs vermutlich auch die Fähigkeit zur Transkription und Translation verloren. Dennoch wurden bereits viele ribosomale Untereinheiten im Phloem identifiziert und es konnte sogar gezeigt werden, dass diese in Komplexen vorliegen (Lin *et al.* 2009; Ma *et al.* 2010; Ostendorp *et al.* 2017). Dass dennoch vermutlich keine Translation stattfinden kann, wird durch die Entdeckung von translationsinhibierenden tRNA-Hälften in den SEs unterstützt (Zhang *et al.* 2009). Die im Phloem enthaltenen Makromoleküle werden demnach vermutlich in den CCs synthetisiert und über Plasmodesmen in SEs gebracht.

### 1.2.2 Das Phloem als Transportroute der Viren

Um das Phloem für sich nutzen zu können, haben Viren spezielle Eigenschaften adaptiert. Die Infektion einer Pflanze mit einem Virus kann durch Eintritt des Virus in eine Wunde oder durch die Übertragung von einem Vektor erfolgen. Nach der Replikation in den ursprünglich infizierten Zellen verbreiten sich Viren über Plasmodesmen von Zelle zu Zelle, wobei das Virus in jeder neu infizierten Zelle durch Replikation vervielfältigt wird (Abbildung 3). Diese Verbreitung über kurze Distanzen ist abhängig von der Modifizierung der Plasmodesmen, da Viren aufgrund ihrer Größe das *size exclusion limit* der Plasmodesmen verändern müssen, damit sie passieren können. Dies können Viren durch eine spezifische Klasse von Proteinen erreichen, die Transportproteine. Verschiedene Virenarten haben hierfür unterschiedliche Mechanismen entwickelt (Patarroyo *et al.* 2012; Niehl und Heinlein 2011).

Dieser Ablauf wiederholt sich solange, bis das Virus die Vaskulatur erreicht. Doch bevor es die SEs für den systemischen Transport betreten kann, muss es auch hier mehrere Zellarten passieren: die Bündelscheide, das vaskuläre Parenchym und die CCs. Auf diesem Weg müssen somit mehrere Grenzen unterschiedlicher Zelltypen durchquert werden. Wie sich gezeigt hat, scheint es an diesen Grenzen unterschiedliche Mechanismen zur Regulation der Plasmodesmen zu geben, sodass Viren hier in ihrer Verbreitung aufgehalten werden können (Ueki und Citovsky 2007).

Den Phloemtranslokationsstrom können Viren dann von den CCs aus erreichen. Nicht nur für den Eintritt in die SEs, sondern auch für die systemische Verbreitung konnten virale Einflussfaktoren entdeckt werden, welche hierfür notwendig sind. Es wird grundsätzlich angenommen, dass Viren entweder als virale Ribonukleoproteinkomplexe oder Virionen transportiert werden. Zudem wird vermutet, dass sich Viren passiv mit dem *source-zu-sink* Strom verbreiten und so systemisch durch das Phloem verbreitet werden (Hipper *et al.* 2013). So konnten verschiedene Modelle für den Transport von Viren in das Phloem, also von den CCs in die SEs, aufgestellt werden. Für einige RNA-Viren wird, ähnlich wie für endogene mRNA beobachtet, ein nicht reguliertes, sequenzunspezifisches Austreten (*leaking*) in die SEs vermutet (Calderwood *et al.* 2016). Eventuell könnten aber auch tRNA-ähnliche Haarnadelstrukturen in der 3'UTR der viralen RNA für ein gerichtetes Transportsystem notwendig sein (Chen *et al.* 2003). Eine weitere Hypothese befasst sich mit der Assoziation von mRNA mit RNA-bindenden Proteinen, welche



**Abbildung 3: Übersicht zur Virusverbreitung in Pflanzen.** Nach Infektion und Replikation erfordert die Verbreitung innerhalb der Pflanze die erfolgreiche Überwindung von Grenzen zwischen verschiedenen Zelltypen. Verändert nach Hipper *et al.* (2013).

den Transport vermitteln. Ein Beispiel hierfür ist das Protein Fibrillarin, welches über seine Interaktion mit viraler RNA oder viralen Transportproteinen am Transport mehrerer Viren beteiligt ist (Kim *et al.* 2007; Semashko *et al.* 2012). Auffällig ist, dass alle diese Modelle virusspezifisch sind, es somit vermutlich keinen allgemeinen Transportmechanismus gibt. Auch müssen für einige dieser Modelle weitere Nachweise erbracht und offene Fragen geklärt werden.

Für *Potyviren* wie TuMV ist noch nicht entschlüsselt, ob diese als virale Ribonukleoproteinkomplexe oder Virionen transportiert werden. Eine Studie hat jedoch virale Replikationskomplexe in Phloem und Xylem entdeckt, sodass vermutet wird, dass das TuMV in dieser Form transportiert werden könnte (Wan *et al.* 2015). Ob dies aber die tatsächliche Transportform oder ein zufälliges Ergebnis ist, bleibt zu beweisen. Auch ob der Transport über das Xylem vollzogen wird, ist fraglich. Denn obwohl Viren im Xylem vor den Abwehrstrategien der Pflanze geschützt wären, wird der Transport über das Phloem als wahrscheinlicher angesehen (Folimonova und Tilsner 2018). Ein Vorteil des Phloems ist, dass Viren die lebendigen CC-SE Komplexe besser manipulieren können. So konnte für TMV gezeigt werden, dass es den mRNA- und Proteingehalt des Phloems verändert. Dadurch beeinflusst das Virus nicht nur Faktoren, welche für den Transport in die SEs benötigt werden, sondern auch die systemische Abwehr (*systemic acquired resistance*, SAR) (Collum *et al.* 2016). Vorteilhaft ist für Viren auch, dass ihre Präsenz im Phloem den Kontakt mit Vektoren und so den Wirtswechsel ermöglicht.

Die vielfältigen Mechanismen der systemischen Infektion unterstreichen deren Komplexität. Hinzu kommt, dass, im Gegensatz zu den vorgestellten Vorgängen, über den Eintritt in das Phloem sowie über die Langstreckentranslokation und den Austritt aus dem Phloem kaum etwas bekannt ist. Interessant ist dabei, dass es teilweise Parallelen zum Transport endogener RNAs gibt. Damit liefert die Erforschung des systemischen Transports von viralen RNAs die Möglichkeit, generelle Prinzipien des RNA-Transports aufzudecken. Dies würde nicht nur neue Strategien ermöglichen, um virale Infektionen von Nutzpflanzen zu bekämpfen, sondern auch zu einem besseren Verständnis der grundlegenden Regulation und Funktion des Phloems beitragen.

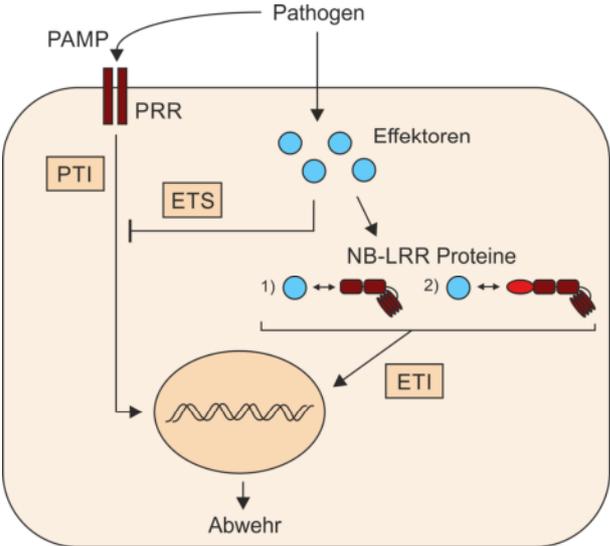
### 1.3 Grundlagen der pflanzlichen Immunantwort

Anhand von *A. thaliana* konnten bereits viele Elemente der pflanzlichen Immunantwort entschlüsselt werden. Wie sich zeigt, haben Pflanzen im ständigen Kampf zwischen Wirt und Pathogen multiple Abwehrstrategien entwickelt. Diese können zum einen zur Immunität jeder einzelnen, infizierten Zelle beitragen, zum anderen aber auch weit entfernte, bislang nicht infizierte Zellen durch systemische Signale auf das Pathogen vorbereiten. So können sich Pflanzen gegen Herbivore zum Beispiel durch die Bildung von Sekundärmetaboliten oder gegen Viren durch die Verwendung des RNAi-Systems zur Wehr setzen. Des Weiteren gibt es eine allgemeine Immunantwort, welche sich gegen eine Vielzahl an Pathogenen richtet. Diese basiert auf der Erkennung der Infektion und dem anschließenden Auslösen von PTI (*PAMP-triggered immunity*) und gegebenenfalls ETI (*effector-triggered immunity*).

### 1.3.1 PTI und ETI

Die induzierte Immunität durch PTI und ETI wird erst durch die Detektion eines Pathogens aktiviert (Abbildung 4). Hierbei werden PTI und ETI aufgrund der jeweils registrierten Moleküle unterschieden. Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) wie zum Beispiel bakterielles Flagellin können auf der Zelloberfläche anhand von Transmembranrezeptoren, den PRRs (*pattern recognition receptors*), erkannt werden. Dadurch wird ein Signal zur Aktivierung der PTI über die Zellwand in die Zelle geleitet. Um dieses Signal zu stoppen, haben Pathogene Effektoren entwickelt, welche sie in die Wirtszelle sekretieren und damit die PTI inhibieren. Dieser Prozess wird ETS (*effector-triggered susceptibility*) genannt (Jones und Dangl 2006). Pflanzen wiederum können solche Effektoren innerhalb der Zelle mittels NB-LRR Proteinen (wie z. B. RPS2 und RPM1) erkennen. Dabei können NB-LRR Proteine den Effektor entweder direkt oder indirekt durch eine Interaktion des Effektors mit einem überwachten Wirtszellprotein erkennen (*Guard Hypothese*) (Caplan *et al.* 2008). Intensiv untersuchte Beispiele sind unter anderem die *Pseudomonas syringae* (*P. syringae*) Effektoren AvrRpt2, AvrB und AvrRpm1 und ihre NB-LRR Proteine RPS2 und RPM1.

PTI und ETI unterscheiden sich in vielen Charakteristika, es gibt aber auch Überschneidungen von molekularen Ereignissen, sodass man auch von einem Signalnetzwerk sprechen kann (Katagiri und Tsuda 2010). Letztendlich werden durch PTI und ETI dann über Kinasekaskaden, Phytohormone und die Steuerung der Genexpression verschiedene Abwehrsysteme in Gang gesetzt wie Zellwandverstärkungen durch Callose und Lignin, die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die Expression von Abwehrgenen, die Synthese von Salizylsäure (SA), die systemische Abwehr (SAR) und die hypersensitive Reaktion (HR), welche zum gesteuerten Absterben infizierter Zellen und damit nekrotischen Läsionen am Infektionsort führt (Jones und Dangl 2006).



**Abbildung 4: Vereinfachtes Modell der PTI und ETI.** Pathogen-spezifische Moleküle (PAMPs) werden an der Plasmamembran durch PRRs erkannt und induzieren dadurch die PTI. Pathogene wiederum sekretieren Effektoren, um der PTI entgegenzuwirken (ETS). Diese Effektoren können durch NB-LRR Proteine entweder direkt (1) oder indirekt über ein bewachtes Protein (2) erkannt werden, was die ETI auslöst. Verändert nach Kazan und Lyons (2014).

### 1.3.2 Antivirale Strategien

Nach einer Virusinfektion werden mehrere Abwehrstrategien induziert. NB-LRR Rezeptoren können virale Proteine erkennen und dadurch die ETI auslösen (Ueda *et al.* 2006; Baures *et al.* 2008). Zudem wurde auch eine antivirale PTI entdeckt, welche auf der Erkennung von doppelsträngigen RNAs (dsRNAs) basiert, aber unabhängig von der bereits gut untersuchten antiviralen RNAi (RNA-Interferenz) ist. Hier wirken dsRNAs als virale PAMPs und lösen dadurch die PTI mit typischen Antworten wie der Aktivierung von Kinasen, der Ethylenproduktion, der Expression von Abwehrgenen und der Inhibierung des Pflanzenwachstums aus. Der Rezeptor, welcher die dsRNA erkennt, konnte allerdings noch nicht identifiziert werden (Niehl *et al.* 2016).

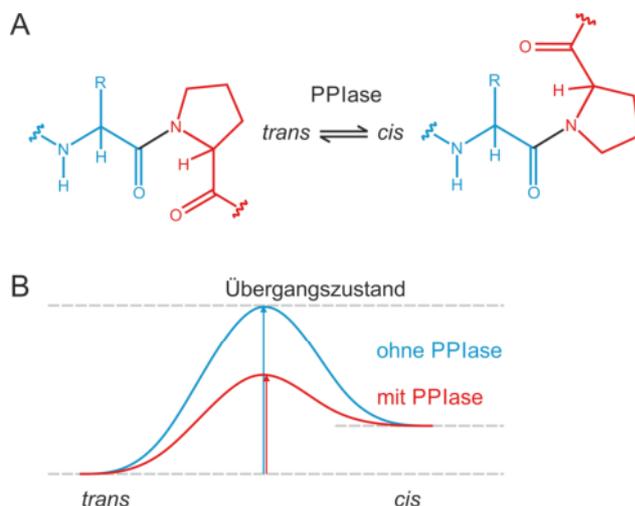
Im Gegensatz zu dieser PTI-Abwehrreaktion ist RNAi ein Mechanismus der Pflanze, welcher nicht nur zur Regulation der pflanzlichen Genexpression, sondern auch zur Immunabwehr von Pathogenen eingesetzt wird. RNAi wird nach einer Virusinfektion spezifisch induziert und an das jeweilige Virus adaptiert. Hierdurch wird die Translation des viralen RNA- oder DNA-Genoms verhindert. Dies geschieht durch kleine RNAs, sogenannte siRNAs (*small interfering RNA*), welche von der Virus-Sequenz abgeleitet, komplementär zum Virusgenom sind. Beteiligt sind hier Proteine der *dicer-like* (DCL) und ARGONAUTE (AGO) Familien. Während DCL-Proteine die doppelsträngige, virale RNA erkennen und diese durch ihre RNase Aktivität in 21-24 nt große siRNAs degradieren, binden AGOs diese siRNAs, bilden daraufhin zusammen mit Cofaktoren den RISC-Komplex (*RNA-induced silencing complex*) und können dadurch die virale RNA als Ziel erkennen. Gleichzeitig wird die einzelsträngige siRNA von endogenen RNA-abhängigen RNA-Polymerasen zu dsRNA synthetisiert, welche wiederum als Substrat für die DCL-Proteine wirkt. Durch diesen Mechanismus wird das Signal amplifiziert und die Immunantwort verstärkt. Durch den RISC-Komplex wird die virale RNA entweder degradiert oder sie erfährt einen translationalen Arrest. Gleichzeitig kann über RNAi aber auch durch endogene kleine RNAs die Genexpression des Wirts reguliert werden, um die Abwehrreaktion zu fördern. Um sich gegen diese Immunantwort zu wehren, haben Viren wiederum Suppressoren entwickelt, die viralen Suppressoren der RNA-Interferenz (VSR). Diese greifen an unterschiedlichen Schritten der antiviralen RNAi an und inhibieren die Abwehrreaktion (Carbonell und Carrington 2015).

Des Weiteren führen Virusinfektionen auch zur Synthese von Hormonen des pflanzlichen Hormon-Signalnetzwerks wie z. B. Salizylsäure, Jasmonsäure und Ethylen. Neben biotischen Stressreaktionen steuern diese Hormone vielfältige Funktionen innerhalb der Pflanze. Vorrangig wird durch eine Virusinfektion die Synthese von SA erhöht, welches Abwehrmechanismen wie PTI/ETI, SAR und RNAi beeinflusst und damit die Virusverbreitung inhibiert. So werden nicht nur lokale Abwehrmechanismen wie ROS und HR in Gang gesetzt, sondern auch systemische Antworten induziert (Alazem und Lin 2015). RNAi und SAR führen dazu, dass distale Zellen auf eine sekundäre Infektion vorbereitet werden (*Priming*) und stellen eine langanhaltende Immunantwort dar, welche für Wochen bis Monate aufrechterhalten wird. Im Gegensatz zu den lokalen Abwehrmechanismen wie PTI und ETI oder die RNAi ist die SAR unspezifisch gegen ein breites Spektrum an Pathogenen gerichtet (Fu und Dong 2013).

## 1.4 Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerasen

Zu einer bedeutenden Klasse von Proteinen, die mit Stressreaktionen assoziiert sind, gehören die Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerasen, kurz PPIasen. Es handelt sich hierbei um ubiquitär vorkommende Proteine, für die sowohl in Tieren, als auch in Pflanzen und sogar in Mikroorganismen gezeigt werden konnte, dass sie eine essentielle Rolle bei den Antworten auf unterschiedliche biotische und abiotische Stressoren einnehmen (Vasudevan *et al.* 2015; Nath und Isakov 2015; Dimou *et al.* 2017).

PPIasen sind Enzyme, welche die *cis/trans* Isomerisierung von Peptidbindungen mit der Aminosäure Prolin katalysieren (Abbildung 5A). Im denaturierten Zustand bevorzugen alle Peptidbindungen die energetisch stabilere *trans*-Konformation. Prolin bildet eine Ausnahme, da hier die N-terminal gelegene Peptidbindung eine niedrigere Differenz der freien Enthalpie zwischen *cis*- und *trans*-Konformation besitzt als die Peptidbindungen anderer Aminosäuren, und deshalb ebenso die *cis*-Konformation annehmen kann (Lu *et al.* 2007). Solche *cis*-Peptidbindungen an Prolin treten häufig an der Proteinoberfläche auf und führen strukturell gesehen zu Kurven (*turns*) in der Tertiärstruktur (Pal und Chakrabarti 1999). *Trans*-Peptidbindungen sind im Gegensatz dazu eher planar, sodass die Umwandlung eine strukturelle Änderung darstellt. Intrinsisch ist diese Isomerisierungsreaktion aufgrund der benötigten Aktivierungsenergie sehr langsam, kann aber durch PPIasen beschleunigt werden (Abbildung 5B).



**Abbildung 5: Isomerisierungsreaktion einer Prolin-Peptidbindung.** (A) Prolin-Peptidbindungen können sowohl in *cis*-, als auch in *trans*-Konformation vorliegen. (B) PPIasen unterstützen die Reaktion, indem sie die Aktivierungsenergie herabsetzen. Die Reaktion kann dann in beide Richtungen ablaufen: *trans*→*cis* oder *cis*→*trans*. Durch diese Enzymaktivität wirken PPIasen als Faltungshelfer. Das Zielprotein kann sich korrekt falten und seine Funktion erfüllen.

Zu den PPIasen gehören die Cyclophiline (CYP), FKBP (FK506-bindendes Protein), Parvuline und PTPAs (Serin/Threonin-Phosphatase 2A-Aktivator) (Abbildung 6). Strukturell gesehen sind diese Familien nicht miteinander verwandt, jede Familie wird durch eine ihr eigene konservierte Domäne repräsentiert. Gemein ist ihnen jedoch die PPIase Aktivität. Um diese ausüben zu können, besitzt das aktive Zentrum selbst zwischen den strukturell divergenten Familien einen ähnlichen Aufbau und einige konservierte Aminosäuren (Fanghanel und Fischer 2004). Da PPIasen durch ihre Enzymaktivität an der Proteinfaltung beteiligt sind, gehören sie auch zur Klasse der Chaperone.

## Einleitung

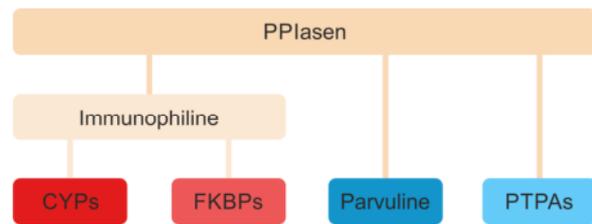
Aufgrund ihrer hohen Konservierung, allgegenwärtigen Präsenz und abundanten Verbreitung innerhalb der Zelle wird für PPIasen grundsätzlich eine vielfältige Funktionsweise und teilweise Redundanz angenommen. Mehrere Studien konnten aber bereits zeigen, dass einzelne PPIasen spezifische Funktionen erfüllen. So kann die Isomerisierung zwischen *cis*- und *trans*-Konformation zum Beispiel nicht nur für die korrekte Faltung notwendig sein, sondern auch als molekularer Schalter dienen. PPIasen können

damit die Funktion ihrer Interaktionspartner an- und ausschalten und sie so regulieren (Lu *et al.* 2007).

Zwei Familien der PPIasen, die CYPs und die FKBP, werden aufgrund ihrer Affinität gegenüber Immunsuppressiva besonders intensiv untersucht. Ursprünglich wurden sie in Säugetieren als Rezeptoren für die Immunsuppressiva Cyclosporin A (CsA) bzw. FK506 entdeckt und deshalb auch als Immunophiline klassifiziert (Handschumacher *et al.* 1984; Harding *et al.* 1989). CsA und FK506 binden im aktiven Zentrum der CYPs bzw. FKBP und blockieren diese, sodass die PPIase Aktivität inhibiert wird. In humanen Zellen inhibiert die Bindung von CsA und FK506 aber nicht nur die Aktivität, sondern schafft gleichzeitig auch eine Bindestelle für Calcineurin. Durch dessen Rekrutierung in einen Komplex mit HsCYPA-CsA bzw. FKBP12-FK506 wird die Phosphataseaktivität von Calcineurin inhibiert, sodass das Phosphorylierungslevel der Calcineurin-Substrate ansteigt. Unter anderem ist davon auch NF-AT betroffen, ein Transkriptionsfaktor der T-Lymphozyten. Dieser kann daraufhin nicht mehr aus dem Cytosol in den Nukleus relokalisieren, sodass die Genexpression von zahlreichen Zytokinen und Zelloberflächenrezeptoren ausbleibt. Letztendlich bedeutet dies die Unterdrückung der Immunantwort (Barik 2006). Aufgrund dieser Eigenschaft wurden CsA und FK506 vor allem zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen in der Transplantationsmedizin verwendet. Sie finden aber auch bei Hepatitis-C-Viruserkrankungen und Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis oder dem atopischen Ekzem Anwendung. Da durch CsA und FK506 aber starke Nebenwirkungen auftreten, wird bis heute nach potenteren Wirkstoffen gesucht (Nath und Isakov 2015).

Parvuline können anhand ihrer Substratspezifität in zwei Klassen unterschieden werden. Einige Parvuline sind spezifisch für Phospho-Serin/Threonin-Prolin Motive, während andere unspezifisch gegenüber ihrem Substrat sind. Zu ersterer Klasse gehört Pin1, welches das bisher am besten untersuchte Parvulin ist. Dieses ist unter anderem an der Zellproliferation, der Apoptose und der Proteinqualitätskontrolle beteiligt (Czajlik *et al.* 2017).

Bei der vierten Familie der PPIasen handelt es sich um PTPAs. Diese besitzen eine PPIase Aktivität und regulieren damit die Aktivität von PP2A, einer Serin/Threonin-Phosphatase, welche an einer Vielzahl von Signalwegen involviert ist (Jordens *et al.* 2006). Sie besitzen damit einen spezifischen Interaktionspartner



**Abbildung 6: Die PPIasen.** Zu den PPIasen gehören CYPs, FKBP, PTPAs und Parvuline. Da CYPs und FKBP Immunsuppressiva binden, werden sie gleichzeitig auch den Immunophilinen zugeordnet.

und greifen über diesen in Pflanzen zum Beispiel in Prozesse wie Pflanzenwachstum und -entwicklung oder Stressantworten ein (Chen *et al.* 2014).

#### 1.4.1 CYP-Familien in Pflanzen und anderen Organismen

Nach der Entdeckung des ersten CYPs, des humanen CYPA, folgten auch bald die ersten pflanzlichen CYP-Gene aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*), Mais (*Zea mays*) und Raps (*Brassica napus*) (Gasser *et al.* 1990). Durch die in den letzten Jahren wachsende Anzahl an Genomsequenzen konnte die CYP-Familie bis heute in vielen Tieren, Pflanzen, Algen, Mikroorganismen und Viren untersucht werden, wobei die photosynthetisch aktiven Organismen die meisten Mitglieder aufweisen (Tabelle 1).

Dadurch, dass CYPs als Faltungshelfer, Chaperone und molekulare Schalter wirken können, sind sie an vielfältigen Funktionen wie der Signalweiterleitung, Apoptose, Genexpression oder Stressantworten auf abiotische und biotische Faktoren beteiligt. Dieses breite Spektrum an Aufgaben zeigt sich auch in Pflanzen. Die meisten Studien zur Funktion pflanzlicher CYPs wurden mit der klassischen Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) durchgeführt. Eine vollständige Aufstellung der AtCYPs und ihrer bisher entschlüsselten Rollen ist in Tabelle A3 im Anhang aufgeführt.

**Tabelle 1: Bekannte CYP-Familien in Säugetieren, Pflanzen, Algen, Mikroorganismen und Viren.**

	<b>Organismus</b>	<b>Anzahl an CYPs</b>	<b>Quelle</b>
<b>Tiere</b>			
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	17	(Galat 2004)
	<i>Drosophila melanogaster</i>	14	(Galat 2004)
	<i>Homo sapiens</i>	19	(Galat 2004)
<b>Pflanzen</b>			
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	29	(Romano <i>et al.</i> 2004; He <i>et al.</i> 2004)
	<i>Glycine max</i>	62	(Mainali <i>et al.</i> 2014)
	<i>Oryza sativa</i>	27	(Ahn <i>et al.</i> 2010)
	<i>Zea mays</i>	39	(Wang <i>et al.</i> 2017)
<b>Algen</b>			
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	25	(Vallon 2005)
<b>Mikroorganismen</b>			
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	11	(Pemberton 2006)
	<i>Aspergillus nidulans</i>	11	(Pemberton 2006)
	<i>Candida albicans</i>	6	(Pemberton 2006)
	<i>Candida glabrata</i>	6	(Pemberton 2006)
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	13	(Pemberton 2006)
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	10	(Pemberton 2006)
	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	2	(Pemberton 2006)
	<i>Eremothecium gossypii</i>	8	(Pemberton 2006)
	<i>Gibberella zeae</i>	10	(Pemberton 2006)
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	6	(Pemberton 2006)
	<i>Leptosphaeria maculans</i>	12	(Singh <i>et al.</i> 2014)
	<i>Neurospora crassa</i>	9	(Pemberton 2006)
	<i>Rhizopus oryzae</i>	16	(Pemberton 2006)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8	(Galat 2004)
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	9	(Galat 2004)
	<i>Ustilago maydis</i>	9	(Pemberton 2006)
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	10	(Pemberton 2006)
<b>Viren</b>			
	Mimivirus	1	(Thai <i>et al.</i> 2008)

Wie auch für Organismen anderer Reiche konnte für Pflanzen gezeigt werden, dass CYPs in unterschiedlichen intrazellulären Kompartimenten wie Cytosol, Nukleus, endoplasmatischem Retikulum (ER) und Chloroplasten vorkommen (Saito *et al.* 1999; Li *et al.* 2007; Ingelsson *et al.* 2009). Des Weiteren sind CYPs innerhalb der Pflanze ubiquitär, da sie in allen pflanzlichen Organen wie Blatt, Blüte, Wurzel und Samen exprimiert werden und sogar im Langstreckentransportsystem Phloem nachgewiesen werden konnten. Aufgrund ihrer Funktion als Faltungshelfer und Chaperone wird vermutet, dass CYPs im Phloem die Rückfaltung von Proteinen nach deren Eintritt in das Phloem unterstützen (Schobert *et al.* 1998; Giavalisco *et al.* 2006; Gottschalk *et al.* 2008; Rodriguez-Medina *et al.* 2011). Zudem wurde für ein CYP aus Tomate, SlCYP1, postuliert, dass dieses über das Phloem transportiert als Signalmolekül für die pflanzliche Entwicklung dient (Spiegelman *et al.* 2017).

### 1.4.2 Die Struktur von CYPs ist auch in Pflanzen hochkonserviert

Die Aktivität der CYPs wird durch die Cyclophilin-ähnliche Domäne (CLD) gestellt. Diese zeichnet sich durch acht  $\beta$ -Stränge in Form eines antiparallelen  $\beta$ -Zylinders und drei  $\alpha$ -Helices aus, wobei sich je eine  $\alpha$ -Helix oben und unten auf dem  $\beta$ -Zylinder befindet. Die Bindung von Substrat und Inhibitoren wurde besonders für humanes CYP A (HsCYPA) intensiv untersucht, sodass essentielle Aminosäuren für die PPIase Aktivität und CsA-Bindung bekannt sind (Zydowsky *et al.* 1992). Diese sind ebenso wie die grundlegende Struktur aus  $\beta$ -Strängen und  $\alpha$ -Helices hochkonserviert und damit auch in pflanzlichen CYPs zu finden.

Cyclophiline können je nach Betrachtungsweise in unterschiedliche Gruppen unterteilt werden. Da sich die Mitglieder in ihrer Domänenstruktur unterscheiden, werden sie häufig nach dieser in *single-domain* und *multi-domain* Formen gegliedert. Erstere besitzen lediglich die CLD, während letztere weitere Domänen besitzen können, wie z. B. TPR-, WD40- oder RNA-bindende Domänen (Romano *et al.* 2004). Diese Domänen sind vor allem dafür bekannt, in Protein-Protein- oder Protein-Nukleotid-Interaktionen beteiligt zu sein. Eine andere Möglichkeit die CYPs zu unterteilen entstammt der Entdeckung einer zusätzlichen Schleife in *C. elegans* CYP-3 durch Dornan *et al.* (1999). Im Gegensatz zu vielen pflanzlichen und *C. elegans* CYPs besitzt HsCYPA keinen *divergent loop*, woher dieser auch seinen Namen bekommen hat. CYPs, welche den *divergent loop* besitzen, werden deshalb auch *divergent* CYPs genannt (Dornan *et al.* 1999). Im Umkehrschluss werden CYPs, welche keinen *divergent loop* tragen, als *non-divergent* CYPs betitelt.

Bisher konnten CYPs aus vier verschiedenen Pflanzenarten mittels Kernspinresonanz (NMR) und Röntgenkristallographie strukturell untersucht werden (Tabelle 2). Dabei zeigten alle Modelle die typische, konservierte Struktur einer CLD aus  $\beta$ -Strängen und  $\alpha$ -Helices. Cat r 1, CsCYP und TaCYPA-1 sind *single-domain* und gleichzeitig auch *divergent* CYPs, während das *multi-domain, non-divergent* AtCYP38 neben einer CLD auch noch eine Helixbündel-Domäne besitzt. CsCYP und TaCYPA-1 konnten zusammen mit dem Inhibitor CsA kristallisiert werden, welcher häufig für *in vitro* Aktivitätsassays oder Kristallisationsansätze verwendet wird. Strukturell betrachtet ist CsA ein zyklisches Peptid aus elf Aminosäuren. Es stammt ursprünglich aus dem Pilz *Tolyocladium inflatum*.

Tabelle 2: Veröffentlichte Strukturen pflanzlicher CYPs.

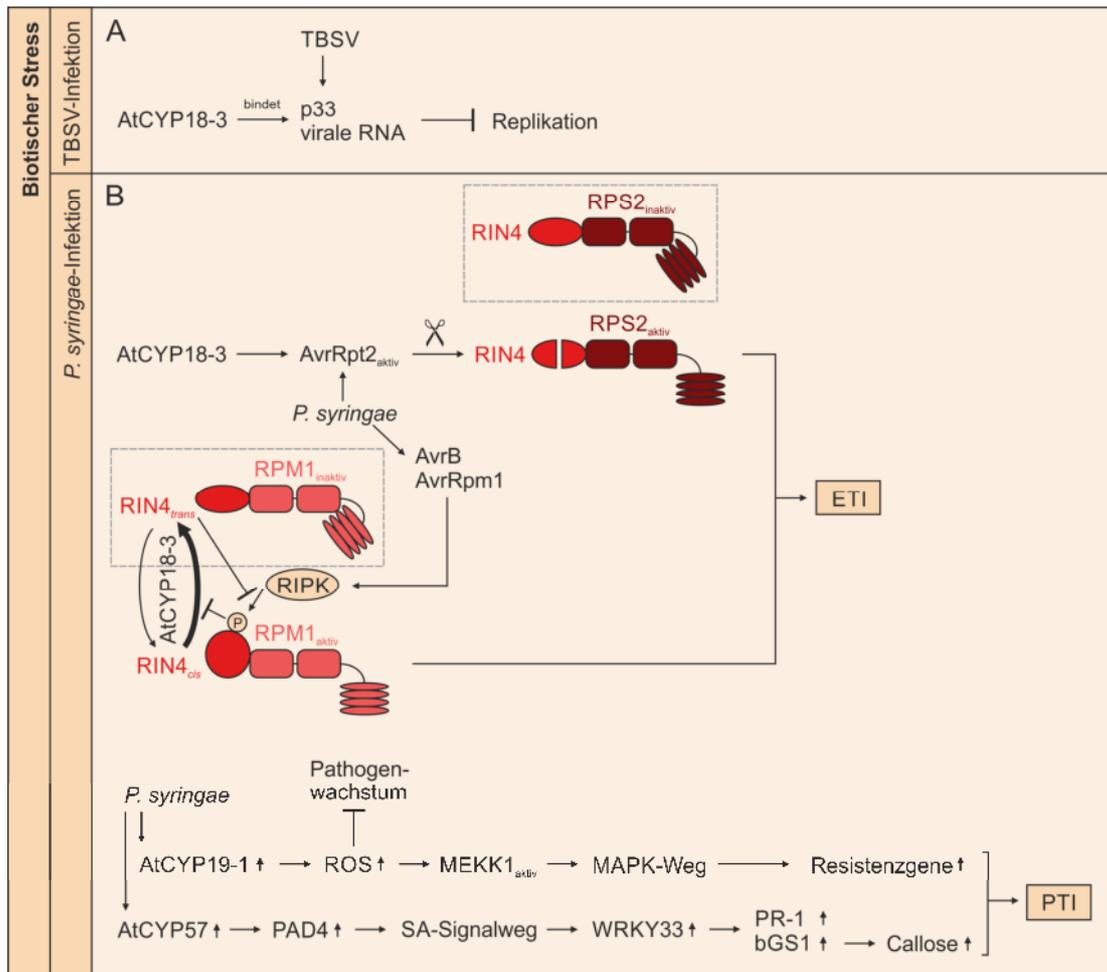
Organismus	CYP	PDB ID	Domänen	Auflösung	Veröffentlicht in
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtCYP38	3RFY	CLD, Helixbündel	2,39 Å	(Vasudevan <i>et al.</i> 2012)
<i>Catharanthus roseus</i>	Cat r 1	2MC9	CLD	NMR	(Ghosh <i>et al.</i> 2014)
<i>Citrus sinensis</i>	CsCYP/CsA	4JJM	CLD	2,09 Å	(Campos <i>et al.</i> 2013)
<i>Triticum aestivum</i>	TaCYPA-1	4E1Q	CLD	1,25 Å	(Sekhon <i>et al.</i> 2013)
	TaCYPA-1/CsA	4HY7	CLD	1,20 Å	

### 1.4.3 CYPs spielen eine wichtige Rolle in der humanen Virusabwehr

Im Gegensatz zu der Virusabwehr in Pflanzen, für welche die Rolle von CYPs noch nicht intensiv untersucht wurde, wird für CYPs in humanen Zellen im Zusammenhang mit Virusinfektionen eine kritische Rolle postuliert. So konnten CYPs als beteiligt an den Infektionen durch verschiedene RNA-Viren wie dem Hepatitis-C-Virus, dem Influenza-A-Virus sowie mehreren *Flaviviren* identifiziert werden. Insbesondere humanes CYPA (HsCYPA) ist in vielfältiger Weise involviert und kann sowohl positiv (z. B. Hepatitis-C-Virus) als auch negativ (z. B. Influenza-A-Virus) auf die Replikation wirken. Deshalb stellen Inhibitoren von CYPs wie CsA ein vielversprechendes Ziel für die Entwicklung antiviraler Medikamente dar (Dawar *et al.* 2017). Da CYPs in vielen Organismen konserviert vorkommen und für sie bereits vielfältige Rollen demonstriert wurden, könnten sie eine allgemeine Rolle in der Immunantwort spielen und somit auch in der pflanzlichen Immunabwehr von Viren an Mechanismen beteiligt sein, welche bisher noch nicht entschlüsselt wurden.

### 1.4.4 Die Rolle von CYPs in der pflanzlichen Immunantwort

In Bezug auf biotische Stressantworten sind vor allem AtCYP18-3, AtCYP19-1 und AtCYP57 zu nennen, welche verschiedene Mechanismen der PTI und ETI in Gang setzen. AtCYP18-3 wurde bereits in unterschiedlichen Interaktionen mit Pathogenen identifiziert. Es bindet nicht nur virale RNA und das virale Replikationsprotein p33 des *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) (Abbildung 7A), sondern aktiviert durch seine PPIase Aktivität auch den durch *Pseudomonas syringae* (*P. syringae*) sekretierten Effektor AvrRpt2 (Abbildung 7B). AvrRpt2 ist eine Cysteinprotease, welche nach ihrer Aktivierung RIN4, einen negativen Regulator des pflanzlichen Immunsystems, schneidet. Der Abbau von RIN4 dient über die Aktivierung von RPS2 als Signal zur Induktion der ETI (*Effector triggered immunity*). So inhibiert AtCYP18-3 nicht nur die Virusreplikation, sondern setzt auch das Immunsystem nach einer bakteriellen Infektion in Gang (Kovalev und Nagy 2013; Coaker *et al.* 2005; Coaker *et al.* 2006). Zusätzlich kann AtCYP18-3 aber auch direkt mit RIN4 interagieren und Prolin an Position 149 isomerisieren, was als molekularer Schalter zur Regulation der ETI dient. Dabei hält AtCYP18-3 RIN4 in der Abwesenheit eines Effektors in der *trans*-Konformation, wodurch das RIN4 beschützende NB-LRR-Protein RPM1 inaktiviert vorliegt. Durch eine pathogen-induzierte Phosphorylierung von RIN4 T166 kann die Isomerisierung verhindert werden. Die *cis*-Konformation führt zu einer veränderten Struktur von RIN4, welches wiederum eine Konformations-



**Abbildung 7: Pflanzliche CYPs sind an biotischen Stressantworten beteiligt.** Hier sind zwei Beispiele für Stressoren und die von ihnen beeinflussten AtCYPs dargestellt. Die Komplexität der Modelle variiert stark und stellt den derzeitigen Kenntnisstand dar. (A) Nach erfolgter TBSV-Infektion kann AtCYP18-3 das virale Replikationsprotein p33 sowie die virale RNA binden und dadurch die Virusreplikation inhibieren. (B) Wird *A. thaliana* hingegen mit *P. syringae* infiziert, kann AtCYP18-3 über zwei verschiedene Wege die ETI aktivieren. Dabei ist RIN4 mit seinen assoziierten NB-LRR-Proteinen RPS2 und RPM1 das bisher am besten beschriebene Beispiel für die *Guard* Hypothese. Im Normalzustand liegen beide NB-LRR-Proteine inaktiv vor (grauer Kasten) und werden erst durch eine Veränderung an RIN4 aktiviert. Gleichzeitig werden durch die *P. syringae* Infektion auch AtCYP19-1 und AtCYP57 stärker exprimiert, welche zur Aktivierung der PTI beitragen. Modelle verändert nach Li *et al.* (2014), Mukhtar *et al.* (2016) und Pogorelko *et al.* (2014).

änderung von RPM1 bedingt und dieses damit aktiviert (Li *et al.* 2014; Mukhtar *et al.* 2016). AtCYP18-3 ist damit ein gutes Beispiel für eine PPIase mit multiplen Interaktionspartnern.

Auch AtCYP19-1 und AtCYP57 sind an der Abwehrreaktion von *P. syringae* Infektionen beteiligt. Beide Gene werden nach einem Pathogenbefall lokal am Infektionsort exprimiert (Abbildung 7B). Für AtCYP19-1 wurde postuliert, dass dieses eine Akkumulation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bewirken könnte. Durch diesen Teil des ROS-Signalweges wird MEKK1 aktiviert, eine MAP-Kinase, welche eine zentrale Rolle in pathogenabhängigen MAPK-Signalwegen spielt. AtCYP57 hingegen beeinflusst die PAD4 und SA-abhängige WRKY33 Expression, was letztendlich zu einer Induktion der Expression von Abwehrgenen wie *PR-1* und *bGS2* führt. Sowohl AtCYP19-1 als auch AtCYP57 beeinflussen somit das

Transkriptionsprofil pathogenabhängiger Resistenzgene und vermitteln dadurch eine höhere Resistenz im Sinne der PTI (Pogorelko *et al.* 2014). Für beide CYPs konnte bisher kein direkter Einfluss auf Interaktionspartner nachgewiesen werden wie es z. B. für AtCYP18-3 beschrieben wurde und sie werden nicht durch pathogene Effektoren stimuliert. Interessanterweise besitzt AtCYP19-1 neben seiner Rolle in der Immunantwort auch eine Funktion in der abiotischen Stressantwort (Salzstress) und der pflanzlichen Samenentwicklung (Yang *et al.* 2009; Stangeland *et al.* 2005). AtCYP19-1 ist damit beispielhaft für den Einfluss eines einzelnen CYPs auf diverse Mechanismen in der Zelle.

## 1.5 *Arabidopsis thaliana* und *Brassica napus* als Modellorganismen

Die am weitesten verbreitete Modellpflanze in der Pflanzenforschung ist die Acker-Schmalwand, *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*). Sie zeichnet sich besonders durch eine kurze Generationszeit und geringe Größe, eine große Anzahl an Nachkommen und die Möglichkeit zur einfachen Erzeugung von Mutanten aus. Im Jahr 2000 wurde das 125 Mbp große Genom entschlüsselt. Dieses stellte die erste vollständige Genomsequenz einer Pflanze dar und lieferte damit ihren Beitrag zur Etablierung von *A. thaliana* als Modellorganismus für die Forschung (Arabidopsis Genome Initiative 2000). Ebenso wie viele Nutzpflanzen gehört *A. thaliana* zur Familie der Kreuzblütengewächse (*Brassicaceen*), sodass Studien an *A. thaliana* als Grundlage zur Verbesserung von Nutzpflanzen herangezogen werden können. Allerdings ist *A. thaliana* im Gegensatz zu vielen Nutzpflanzen diploid ( $2n = 10$ ), weshalb auch einige Nutzpflanzen in den Fokus der Forschung gerückt sind. So ist Raps (*Brassica napus*, *B. napus*) als allotetraploide ( $2n = 38$ ) Pflanze zu einem Modellorganismus für Studien zu evolutionären Folgen der Polyploidisierung geworden (Kagale *et al.* 2014; Schmutzer *et al.* 2015). Ein Vorteil ist hierbei, dass *B. napus* ebenfalls ein Mitglied der *Brassicaceen* und damit zu *A. thaliana* nah verwandt ist. Dies ermöglicht die Übertragung von Erkenntnissen zwischen den beiden Organismen.

*B. napus* (Genom AACC) entstand vor etwa 7500 Jahren aus der Hybridisierung von *Brassica rapa* (AA) und *Brassica oleracea* (CC). Die Genomsequenz wurde im Jahr 2014 veröffentlicht und das Genom ist im Vergleich zu *A. thaliana* mit 1100 Mbp deutlich größer (Chalhoub *et al.* 2014). Mit einer Generationszeit von 3-4 Monaten und einem deutlichen Größenunterschied zu *A. thaliana*, lässt sich *B. napus* dennoch unter recht einfachen Bedingungen im Gewächshaus anziehen und für die Forschung nutzen. Heutzutage ist *B. napus* eine wirtschaftlich bedeutende Nutzpflanze. Die Samen dienen der Gewinnung von Rapsöl als Speiseöl, Futtermittel sowie als nachwachsender Rohstoff für Biokraftstoff. Um die Qualität des Öls stetig zu verbessern und den Anbau ertragreicher zu gestalten, werden fortlaufend optimierte Sorten gezüchtet (Wittkop *et al.* 2009).

Des Weiteren hat sich *B. napus* auch als Modellorganismus für die Studie von Signalen, welche über die Langstreckentransportsysteme systemisch in der Pflanze verbreitet werden, etabliert (Giavalisco *et al.* 2006; Pant *et al.* 2008; Buhtz *et al.* 2010; Kehr *et al.* 2005; Ostendorp *et al.* 2016). Denn im Gegensatz zu *A. thaliana* können aus *B. napus* mit einem vergleichsweise geringen Aufwand hinreichende Mengen reinen Xylem- und Phloemexsudats gewonnen werden, was nachfolgende Analysen stark vereinfacht. Die

Verwandtschaft von *A. thaliana* und *B. napus* bietet den Vorteil, dass Ergebnisse aus Phloemstudien an *B. napus* und phänotypischen Studien von *A. thaliana*-Mutanten miteinander in Kontext gesetzt werden können.

## 1.6 Zielsetzung

Stehen Pflanzen unter Stress, setzen sie unterschiedliche Mechanismen in Gang, um sich den veränderten Umweltfaktoren anzupassen. So besitzen sie auch gegen biotische Stressoren wie Viren vielfältige lokale und systemische Abwehrstrategien. Hierbei spielt das Langstreckentransportsystem Phloem eine wichtige Rolle, indem es die Verbreitung von Signalen ermöglicht. Allerdings können auch Viren diese Transportroute für sich nutzen, um eine systemische Infektion voranzutreiben. Die Kenntnis und das genaue Verständnis solcher grundlegenden Prozesse ist entscheidend, um den Anbau wirtschaftlich bedeutender Nutzpflanzen stetig zu optimieren.

Die Familie der CYPs liefert hier einen guten Ansatzpunkt, da diese aufgrund ihrer Aktivität als Faltungshelfer und Chaperone in vielfältige Prozesse wie Wachstum und Entwicklung aber auch abiotischen und biotischen Stress involviert ist. Ihre Konservierung zwischen verschiedenen Organismen und die hohe Anzahl an Mitgliedern in Pflanzen verdeutlicht diese fundamentale Rolle. Bezüglich der Virusinfektion stehen insbesondere humane CYPs im Fokus der Forschung, da diese unterschiedliche Interaktionen mit Viren eingehen können und somit ein Ziel für antivirale Medikamente sind. Dementsprechend sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob CYPs in Pflanzen eine vergleichbare Rolle spielen. Da CYPs auch im Phloem identifiziert werden konnten, könnten sie zudem an der Weiterleitung von Signalen beteiligt sein oder auch direkt mit viralen Proteinen oder RNAs interagieren. Dies ist besonders interessant, da der Mechanismus für den Langstreckentransport von Viren nur unzureichend untersucht ist.

Um eine Grundlage für Studien zur Rolle von CYPs in *B. napus* zu schaffen, sollte zunächst die CYP-Familie identifiziert und charakterisiert sowie ihre Abundanz im Phloem untersucht werden. Da im Phloem vermutlich keine Translation stattfinden kann und somit Transkriptomstudien für diese Studie nicht zweckdienlich sind, boten sich hierfür Proteomstudien an. Im Zuge dessen wurden sowohl gelbasierte als auch chromatographische Auftrennungsmethoden mit Massenspektrometrie gekoppelt. Da CYPs durch ihre PPIase Aktivität charakterisiert werden und im Phloem als Faltungshelfer postuliert wurden, sollte zudem die Möglichkeit zur *cis/trans* Isomerisierung in Phloemexsudat getestet werden.

Für CYPs werden multiple Funktionen und eine redundante Wirkungsweise vermutet. Um diesbezüglich erste Hinweise zu erhalten, sollten im Anschluss an die grundlegenden Analysen zur Proteinfamilie einzelne Kandidaten ausgewählt, rekombinant hergestellt sowie funktionell und strukturell untersucht werden. Hierfür sollte der PPIase Enzymassay zur Bestimmung der Aktivität und Inhibierung durch CsA sowie zwei verschiedene Methoden zur Strukturaufklärung, die Kleinwinkelröntgenstreuung und die Röntgenstrukturanalyse, integrativ verwendet werden.

Um einen ersten Einblick in die Rolle von CYPs während der Virusinfektion zu gewinnen, sollten zwei verschiedene Ansätze, Phloemproteom- und *in vivo* Studien, verfolgt werden. Hierfür sollte ein Virus verwendet werden, welches weltweit ein wichtiges Pathogen von Nutzpflanzen ist und sich zudem mit den geeigneten Modellorganismen für diese beiden Versuchsansätze untersuchen lässt. All diese Kriterien wurden vom TuMV erfüllt. Nach der TuMV-Infektion sollten Veränderungen in der Abundanz von BnCYPs mittels Proteomstudien an *B. napus* Material sowohl am lokalen Infektionsort, als auch im Transportsystem Phloem herausgearbeitet werden. Um zusätzlich *in vivo* Untersuchungen durchführen zu können, sollten *A. thaliana* Mutanten charakterisiert und nach Möglichkeit in Infektionsversuchen eingesetzt werden. Dieser Ansatz würde es ermöglichen, Informationen über die Rolle der CYPs in der Virusinfektion zu gewinnen, sodass neue Zielproteine oder Marker für die Virusinfektion gefunden werden könnten. Abschließend ist zu sagen, dass das vollständige Verständnis der Mechanismen, die den Ereignissen der Virus-Wirt-Pflanzen-Interaktion zugrunde liegen, entscheidend für die Entwicklung neuer Strategien zur Resistenz von Pflanzen ist.



## 2 MATERIAL & METHODEN

### 2.1 Bioinformatische Methoden

Zur Identifizierung von Cyclophilinen sowie deren Charakterisierung auf bioinformatischer Ebene wurden diverse *in silico* Methoden angewendet. Diese stellten die Grundlage für die Auswahl von Kandidaten, aber auch für *in vitro* und *in vivo* Experimente dar.

#### 2.1.1 Identifizierung von *B. napus* CYPs

Die Identifizierung von *Brassica napus* CYPs erfolgte 2015 mittels einer BLASTp Suche basierend auf *Arabidopsis thaliana* CYP18-1 (*At1g01940*) und CYP19-1 (*At2g16600*) gegen die in der NCBI Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Coordinators 2016) hinterlegte *B. napus* cv. Darmor-bzh Genomsequenz (NCBI Datenbank: PRJEB5043, ID: 259277) (Chalhoub *et al.* 2014). Die Nomenklatur orientiert sich an jener von Romano *et al.* (2004) und He *et al.* (2004). Demnach setzt sich der Name aus „BnCYP“ gefolgt von dem Molekulargewicht und im Falle mehrerer Proteine der gleichen Größe einer fortlaufenden Nummer zusammen. Anzumerken ist, dass das Molekulargewicht der neu synthetisierten Proteine vor Abspaltung jeglicher Signalpeptide verwendet wurde.

Zusätzlich wurden BLASTp Suchen mit allen weiteren bekannten AtCYPs (Romano *et al.* 2004) durchgeführt, resultierten allerdings in keinen weiteren Identifizierungen. Die Aminosäure- und cDNA-Sequenzen der *B. napus* cv. Darmor-bzh Cyclophiline wurden durch das European Nucleotide Archive (unter <http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB5043>) bereitgestellt. Um ein *A. thaliana* Homolog für jedes einzelne BnCYP zu finden, wurde die jeweilige BnCYP-Aminosäuresequenz als Eingabe für die BLAST Suche auf UniProtKB (<http://www.uniprot.org/>) (UniProt Consortium 2015) verwendet.

#### 2.1.2 Bioinformatische Charakterisierung

Alle identifizierten Proteine wurden mit InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) (Mitchell *et al.* 2015) auf die Anwesenheit einer CLD und potentiell zusätzlicher Domänen hin untersucht. *Multi-domain* Proteine wurden mit CoreDRAW (Corel) gezeichnet. Theoretische Parameter wie der isoelektrische Punkt, das Molekulargewicht und der Extinktionskoeffizient wurden mit dem ExPASy Programm ProtParam (Gasteiger *et al.* 2005) berechnet. Eine Vorhersage der subzellulären Lokalisation konnte mit LocTree3 (<https://roslab.org/services/loctree3/>) (Goldberg *et al.* 2014) und von nuklearen Signalpeptiden mit dem NLS mapper ([http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS\\_Mapper\\_form.cgi](http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi)) (Kosugi *et al.* 2009) erfolgen.

### 2.1.3 Sequenzvergleich

Multiple Sequenzvergleiche von Genom- oder Aminosäuresequenzen wurden mit ClustalOmega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Sievers *et al.* 2011) durchgeführt. Für die anschließende Präsentation wurden diese mit Jalview 2.9.0b2 (Waterhouse *et al.* 2009) bearbeitet. Neben der Erstellung einer Konsensussequenz ermöglichte dies auch die Annotierung einer Sekundärstruktur basierend auf der Struktur von humanem CYPA (pdb ID: 4N1M).

### 2.1.4 Phylogenetische Analyse und Genkartierung

Der phylogenetische Baum wurde mit ClustalW2 Phylogeny ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/phylogeny/clustalw2\\_phylogeny/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/phylogeny/clustalw2_phylogeny/)) auf der Grundlage eines Sequenzvergleichs aller 91 Cyclophilinproteine berechnet. Anschließend wurde dieser mit iTOL (<http://itol.embl.de/>) (Letunic und Bork 2007, 2011) dargestellt.

Daten für die Genkartierung stammten aus dem *Brassica napus* Genome Browser (<http://www.genoscope.cns.fr/brassicanapus/cgi-bin/gbrowse/colza/>, Genoscope - Centre National de Séquençage). Die bildliche Darstellung erfolgte mit CorelDRAW (Corel).

### 2.1.5 Expressionsprofil und -analyse von Cyclophilinen

Transkriptomdaten von Cyclophilinen aus *Brassica napus* cv. Drakkar wurden von Khalid Amari und Manfred Heinlein (Universität de Strasbourg, CNRS, Institut de biologie moléculaire des plantes, Straßburg, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Die Methode ist in Hanhart *et al.* (2017) beschrieben.

Die Analyse differentiell exprimierter AtCYPs wurde mit dem Perturbations Tool aus Genevestigator v6.01.05 (Hruz *et al.* 2008) durchgeführt. Als Datengrundlage dienten Microarray Daten einer TuMV-Infektionsstudie von *A. thaliana* (Experiment: AT-00324) (Yang *et al.* 2007). Als signifikante Änderungen wurden Daten mit einem  $\log_2(\text{Fold Change})$  von  $x \leq -0,58$  und  $x \geq 0,58$  und einer p-value Schwelle von 0,05 angenommen.

## 2.2 Pflanzenbiologische Methoden

In dieser Arbeit wurden Untersuchungen an *Brassica napus* und *Arabidopsis thaliana* durchgeführt. Die hierfür verwendeten Linien sind in Tabelle 3 aufgeführt.

### 2.2.1 Anzucht

*Brassica napus* cv. Drakkar wurde unter kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus in 19 cm Töpfen auf Erde (LAT-Terra Standard P, Industrie-Erdenwerk Archut) angezogen. Hierfür wurde ein 16 h/8 h Tag/Nacht-Zyklus mit 70 % Luftfeuchtigkeit und 22 °C (Tag) bzw. 18 °C (Nacht) verwendet.

Tabelle 3: Verwendete Pflanzenlinien.

Name	Quelle
<i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotyp Col-0	AG Kragler, MPI Golm, Deutschland
<i>Arabidopsis thaliana</i> GABI_578C07, SALK_001615C, SALK_024971C, SALK_028513C, SALK_049034C, SALK_050945C, SALK_063724C, SALK_067272, SALK_095698C, SALK_121820C, SALK_129937C	Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC), Loughborough, United Kingdom
<i>Arabidopsis thaliana</i> SALK_001615 und GABI_159E05	Andrea Viehhauser, AG Karl-Josef Dietz, Universität Bielefeld
<i>Brassica napus</i> cv. Drakkar	AG Kehr, Universität Hamburg

Gedüngt wurden die Pflanzen mit 2 g/l Osmocote Exact Standard High K (Scotts, Niederlande). *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Col-0 wurde in 7 cm Töpfen ebenfalls auf Erde angezogen, wobei 65 % Erde mit 25 % Sand und 10 % Blähton versetzt wurde. Nach einer Stratifizierung bei 4 °C für 48 h wuchsen die Pflanzen bei einem 16 h/8 h Tag/Nacht-Zyklus mit 50 % Luftfeuchtigkeit bei 22 °C.

### 2.2.2 Virusinfektion von *B. napus* Pflanzen

Die Virusinfektion erfolgte in Kooperation mit Khalid Amari und Manfred Heinlein (Université de Strasbourg, CNRS) am Institut de biologie moléculaire des plantes (Straßburg, Frankreich). *B. napus* cv. Drakkar Pflanzen wurden dort unter einem 16 h/8 h Tag/Nacht-Zyklus bei 22 °C/18 °C angezogen und 3 Wochen alte Pflanzen infiziert. Für die Infektion wurde das *Turnip Mosaic Virus* (TuMV) Isolat UK1 verwendet (NCBI Accession: EF028235; UniProt ID: Q5TLC8), welches zusätzlich ein lösliches GFP kodiert (TuMV-GFP) (Garcia-Ruiz *et al.* 2010). Zur Herstellung einer Viruslösung wurde etwa 1 g Blattmaterial in 5 ml 10 mM Natriumphosphat-Puffer pH 6,5 gemörsert. Anschließend wurde die Blattoberfläche mittels *rub*-Inokulation mit der Viruslösung behandelt. Für die Mock-Behandlung wurden Pflanzen exakt gleich behandelt, mit dem einzigen Unterschied, dass nicht infiziertes Blattmaterial gemörsert und in Natriumphosphat-Puffer gelöst für die *rub*-Inokulation verwendet wurde. Vor der Probenahme (Blattmaterial oder Phloemexsudation) wurde die systemische Infektion anhand der GFP-Fluoreszenz mit einer UV-Lampe (BLAK-RAY non-UV semiconductor inspection lamp, UVP) überprüft.

### 2.2.3 Gewinnung von Phloem- und Xylemexsudat

Phloemexsudat wurde kurz vor der Blüte an der Infloreszenz von *B. napus* Pflanzen wie in Giavalisco *et al.* (2006) beschrieben gesammelt. Hierfür wurde die Infloreszenz mit Sterican® Einmalkanülen (B. Braun, G 21 x 1"/ø 0,80 x 25 mm) punktiert. Nach Verwerfen des ersten Tropfens konnten nachfolgende Tropfen mit einer Pipette aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß auf Eis überführt werden. Es wurden jeweils mehrere Pflanzen beprobt. Nach der Beprobung wurde das Phloemexsudat bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Das Protokoll für die Extraktion von Xylemexsudat basiert auf Buhtz *et al.* (2004). Zunächst wurden 4-5 Wochen alte *B. napus* Pflanzen mit einer Rasierklinge 5-10 cm über der Erde abgeschnitten. Die

Schnittstelle wurde mit ddH<sub>2</sub>O gespült und anschließend mit einem Filterpapier getrocknet. Das austretende Xylemexsudat mehrerer Pflanzen wurde mit einer Pipette aufgenommen und für die anschließende Proteinfällung direkt in 90 % (v/v) Aceton, 10 % (v/v) Methanol, 10 mM DTT (siehe Abschnitt 2.5.1) gegeben. Dabei wurden 3 ml Xylemexsudat zu 7 ml Fälllösung gegeben (Buhtz *et al.* 2004).

### 2.2.4 Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial

Für die Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial wurde 100 mg Blatt- oder Infloreszenzstängelmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert und in 800 µl 50 mM MOPS/KOH pH 7,5, 5 % Glycerol, 0,55 % PVPP, 0,5 % Nonidet P-40, 5 mM L-Ascorbinsäure, 5 mM DTT, 1x Proteaseinhibitor (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail, Roche), 1x Phosphataseinhibitor (PhosStop, Phosphatase Inhibitor Cocktail, Roche) aufgenommen. Unlösliche Bestandteile wurden bei 4 °C und 14.000 x g pelletiert, sodass der Überstand abgenommen und für nachfolgende Analysen direkt weiterverwendet werden konnte.

### 2.2.5 Extraktion von genomischer DNA aus Pflanzenmaterial

Genomische DNA (gDNA) wurde aus *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Col-0 und *Brassica napus* cv. Drakkar mit einem Protokoll, welches sich an eine bereits publizierte Methode anlehnt, extrahiert (Edwards *et al.* 1991). Die gesamte Extraktion wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Zunächst wurden etwa 100 bis 200 mg Pflanzenmaterial in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit einem Plastikstößel gemörsert. Nach der Zugabe von 200 µl Extraktionspuffer (200 mM Tris/HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5 % SDS) wurde der Ansatz für 5 s gevortext und anschließend bei 20000 x g für 5 min zentrifugiert. Danach wurden 150 µl des Überstands in 150 µl Isopropanol überführt und die gDNA für mindestens 5 min bei -20 °C präzipitiert. Mit einer anschließenden Zentrifugation bei 20000 x g für 5 min konnte die gDNA pelletiert werden. Das Pellet wurde anschließend mit 300 µl 80 % (v/v) Ethanol gewaschen. Hierfür wurde der Ansatz nach Zugabe des Ethanols für 2 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Pellet luftgetrocknet. Die gDNA wurde in 50 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und für 10 min bei 50 °C und 1100 rpm inkubiert, bevor sie bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert wurde.

### 2.2.6 Genotypisierung von T-DNA-Insertionslinien

T-DNA-Insertionen können mithilfe einer Genotypisierung verifiziert werden. Hierfür wird zunächst gDNA benötigt, welche dann für eine Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt wird. Zum Nachweis des Wildtyp- und des durch die T-DNA-Insertion veränderten Allels wurden zwei verschiedene Primerpaare verwendet. Das Primerpaar LP und RP ermöglicht die Amplifikation des Wildtypallels, während LB und RP die T-DNA-Insertion bestätigen. Zur Kontrolle wurde die Reaktion für jede untersuchte Linie zusätzlich mit gDNA des Wildtyps *A. thaliana* Col-0 sowie ddH<sub>2</sub>O durchgeführt.

Es wurden 10 SALK-Linien, 1 GABI-Linie sowie ein GABI Kat-Set (GABI\_578C07), bestehend aus 18 Linien, untersucht (Tabelle 4). Die gDNA wurde, wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben, aus Blattmaterial extrahiert. Zunächst wurde ein 10 µl PCR-Ansatz mit je 500 nM Primer 1 und Primer 2 (Tabelle 4), 200 nM dNTPs, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µl gDNA und 0,25 U Taq DNA-Polymerase (AG Kehr, Universität Hamburg) in Taq DNA-Polymerase-Puffer mit (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Thermo Scientific) vorbereitet. Dieser wurde in einem T3000 Thermocycler (Biometra) erst bei 95 °C für 180 s denaturiert. Danach wurde das folgende Programm mit 35 Zyklen durchlaufen: erst eine Denaturierung bei 95 °C für 30 s, gefolgt von der Hybridisierung der Primer bei 45 °C für 30 s und einer anschließenden Elongation bei 72 °C für 180 s. Zuletzt wurde eine finale Elongation bei 72 °C für 300 s durchgeführt. Zur Visualisierung wurden die PCR-Produkte auf einem Agarosegel (siehe Abschnitt 2.3.2) nach ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt.

**Tabelle 4: Übersicht der Linien und verwendeten Primer für die Genotypisierung von T-DNA-Insertionslinien.** Die Primersequenzen sind im Anhang in Tabelle A1 zu finden.

CYP	Linie	Reaktion	Primer 1	Primer 2
AtCYP18-3	SALK_121820C, SALK_050945C	LP+RP	SALK_121820_LP	SALK_121820_RP
		LB+RP	LBb1.3	SALK_121820_RP
AtCYP18-4	GABI_578C07	LP+RP	GABI_578C07_LP	GABI_578C07_RP
		LB+RP	o8474	GABI_578C07_RP
AtCYP19-1	SALK_063724C, SALK_095698C	LP+RP	SALK_063724_LP	SALK_063724_RP
		LB+RP	LBb1.3	SALK_063724_RP
AtCYP19-3	SALK_067272	LP+RP	SALK_067272_LP3	SALK_067272_RP3
		LB+RP	LBb1.3	SALK_067272_RP3
		LP+RP	SALK_067272_LP4	SALK_067272_RP4
		LB+RP	LBb1.3	SALK_067272_RP4
AtCYP20-2	SALK_024971C	LP+RP	SALK_024971_LP	SALK_024971_RP
		LB+RP	LBb1.3	SALK_024971_RP
	SALK_129937C	LP+RP	SALK_129937_LP	SALK_129937_RP
		LB+RP	LBb1.3	SALK_129937_RP
AtCYP20-3	SALK_001615C	LP+RP	SALK_001615_LP	SALK_001615_RP3
		LB+RP	LBb1.3	SALK_001615_RP3
	GABI_159E05	LP+RP	GABI_159E05_LP	GABI_159E05_RP
		LB+RP	o8474	GABI_159E05_RP
AtCYP26-2	SALK_028513C, SALK_049034C	LP+RP	SALK_049034_LP	SALK_049034_RP
		LB+RP	LBb1.3	SALK_049034_RP

### 2.2.7 Bestimmung der T-DNA-Insertionsstelle

Für die Bestimmung der Lage der T-DNA-Insertion wurden die Banden der PCR-Reaktion des Primerpaars LB und RP ausgeschnitten (Abschnitt 2.2.6), die DNA mit dem GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) extrahiert und deren Konzentration mit dem NanoDrop One (Thermo Scientific) bestimmt. Die extrahierte DNA wurde mit dem LB Primer (LBb1.3 für SALK-Linien, o8474 für GABI-Linien) nach den Bestimmungen der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) versetzt (5 ng/µl PCR-Produkt in 15 µl Gesamtvolumen plus 2 µl 10 µM Primer) und durch diese sequenziert. Die Insertionsstelle konnte danach durch einen multiplen Sequenzvergleich der Sequenzierung mit der

Gensequenz aus der Datenbank der Arabidopsis Information Resource (TAIR) (Berardini *et al.* 2015) mithilfe des Online Tools ClustalOmega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Sievers *et al.* 2011) identifiziert werden. Die Zeichnung der Exon-Intron-Struktur erfolgte maßstabsgetreu (50 bp = 1 mm) mit CorelDraw (Corel).

### 2.2.8 Extraktion von RNA aus Pflanzenmaterial und Reverse Transkription

Zunächst wurde Gesamt-RNA aus 100 mg Blattmaterial mit dem für Pflanzenmaterialien adaptierten innuPREP Plant RNA Kit (Analytik Jena) extrahiert. Die anschließende Reverse Transkription erfolgte mit dem QuantiNova Reverse Transcription Kit (Qiagen).

### 2.2.9 Semiquantitative RT-PCR zum Nachweis der Genexpression in T-DNA-Insertionslinien

Für die semiquantitative RT-PCR wurde 0,2 µg cDNA in einem 10 µl PCR-Ansatz eingesetzt. Die PCR wurde mit der Taq-Polymerase wie in Abschnitt 2.2.6 vorbereitet und durchgeführt. Lediglich die Temperatur für die Hybridisierung der Primer wurde angepasst (Tabelle 5). Anschließend wurden die PCR-Produkte auf einem Agarosegel (siehe Abschnitt 2.3.2) elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt.

**Tabelle 5: Übersicht der Linien und verwendeten Primer für die semiquantitative RT-PCR.** Die Primersequenzen sind im Anhang in Tabelle A1 zu finden.

CYP	Linie	Primer 1	Primer 2	Temperatur (°C)
AtCYP18-3	SALK_121820C, SALK_050945C	AtCYP18-3-NH_f	AtCYP18-3-NH_r	49
AtCYP19-1	SALK_063724C, SALK_095698C	AtCYP19-1-NH_f	AtCYP19-1-NH_r	45
AtCYP19-3	SALK_067272	AtCYP19-3-NH_f	AtCYP19-3-NH_r	48

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

Für *in vitro* Analysen zur Bestimmung von Funktion und Struktur eines Proteins wird hochreines, rekombinant hergestelltes Protein benötigt. Dieses lässt sich nach der Klonierung in einen Vektor, welcher weitere Eigenschaften wie einen Tag für die spezifische Aufreinigung und eine Proteaseschnittstelle zum Entfernen des Tags vermittelt, und anschließendes Einbringen in Expressionszellen herstellen. Für die Klonierung von Cyclophilinen (Übersicht der klonierten Gene in Tabelle 6) wurden daher folgende Schritte durchgeführt: Nach der Amplifikation des Gens von gDNA per Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde dieses sowie der Vektor einem Restriktionsverdau unterzogen, welcher im Anschluss die Ligation des Gens in den Vektor ermöglichte. Die anschließende Transformation in kompetente *E. coli*

Zellen ermöglichte die Vervielfältigung dieses Konstrukts, sodass es wieder isoliert und via Sequenzierung in seiner Richtigkeit bestätigt werden konnte.

### 2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifikation von Genabschnitten für die Klonierung

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode, mit welcher Genabschnitte vervielfältigt werden können, was durch das Enzym DNA-Polymerase ermöglicht wird. Die in Tabelle 6 aufgeführten Cyclophilogene aus *B. napus* bzw. *A. thaliana* besitzen keine Introns, sodass die Amplifikation von gDNA (Abschnitt 2.2.5) erfolgte. Vor der Amplifikation wurden die Gensequenzen auf ihre Codonverwendung mit dem Graphical Codon Usage Analyser ([http://gcua.schoedl.de/sequential\\_v2.html](http://gcua.schoedl.de/sequential_v2.html)) (Fuhrmann *et al.* 2004) überprüft.

Für die PCR wurde ein 50 µl PCR-Ansatz mit je 500 nM Primer 1 und Primer 2 (Tabelle 6), 200 µM dNTPs, 5 µl gDNA und 1 U Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase (Thermo Scientific) in Phusion HF-Puffer (Thermo Scientific) vorbereitet. Dieser Ansatz durchlief nun entweder eine normale oder eine sogenannte Touch-down PCR. Die Touch-down PCR ist eine abgewandelte Form eines typischen PCR-Programms bestehend aus mehreren Zyklen von Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation. Hierbei wird mit einer Primerhybridisierungstemperatur 10 °C über der optimalen Temperatur begonnen und davon ausgehend diese in jedem Schritt 1 °C niedriger gewählt, bis die optimale Temperatur erreicht ist (Korbie und Mattick 2008). Die PCR wurde in einem T3000 Thermocycler (Biometra) durchgeführt. Das PCR Programm ist in Tabelle 7 beschrieben. Im Vergleich hierzu ist ein normales Phusion-PCR-Programm in Tabelle 8 aufgeführt. Die verwendete Art der PCR ist Tabelle 6 zu entnehmen. Zur Kontrolle wurde für jede Reaktion ein Ansatz mit ddH<sub>2</sub>O anstatt gDNA vorbereitet und parallel mitgeführt. Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel (siehe Abschnitt 2.3.2) elektrophoretisch aufgetrennt, anschließend aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) extrahiert.

**Tabelle 6: Übersicht der Gene, Primer und PCR-Bedingungen für die Klonierung.** Die Primersequenzen sind im Anhang in Tabelle A1 zu finden. Teilweise konnten zur Amplifikation von zwei Isoformen die gleichen Primer verwendet werden. Die Unterscheidung der Isoformen war nur nach einer Sequenzierung möglich (Abschnitt 2.3.7).

Gen	Primer 1	Primer 2	Temp. (°C)	Art der PCR
<i>BnCYP18-2 (BnaC01g03590D)</i>	BnCYP18-2-NH_f	BnCYP18-2-NH_r	61	normal
<i>BnCYP18-3 (BnaA01g02340D)</i>	BnCYP18-2-NH_f	BnCYP18-2-NH_r	61	normal
<i>BnCYP18-4 (BnaC03g60160D)</i>	BnCYP18-4-NH_f	BnCYP18-4-NH_r	66→56	Touch-down
<i>BnCYP18-5 (BnaA09g08780D)</i>	BnCYP18-8-NH_f	BnCYP18-8-NH_r	47	normal
<i>BnCYP18-6 (BnaA06g37360D)</i>	BnCYP18-6-NH_f	BnCYP18-6-NH_r	71→61	Touch-down
<i>BnCYP18-8 (BnaC09g09060D)</i>	BnCYP18-8-NH_f	BnCYP18-8-NH_r	47	normal
<i>BnCYP19-1 (BnaA09g35540D)</i>	BnCYP19-1-NH_f	BnCYP19-1-NH_r	71→61	Touch-down
<i>AtCYP18-3 (At4g38740)</i>	AtCYP18-3-NH_f	AtCYP18-3-NH_r	61	normal
<i>AtCYP18-4 (At4g34870)</i>	AtCYP18-4-NH_f	AtCYP18-4-NH_r	50	normal
<i>AtCYP19-1 (At2g16600)</i>	AtCYP19-1-NH_f	AtCYP19-1-NH_r	56	normal
<i>AtCYP19-3 (At3g56070)</i>	AtCYP19-3-NH_f	AtCYP19-3-NH_r	61	normal

**Tabelle 7: Touch-down PCR-Programm.** Die freien Stellen (unterstrichen) für die Primerhybridisierungstemperatur zeigen an, dass diese je nach Produkt individuell gewählt werden muss. Die verwendeten Temperaturen sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Schritt	Beschreibung	Temp. (°C)	Zeit (s)	zurück zu Schritt	Zyklen	ΔTemp. (°C)
1	Denaturierung	98	30			
2	Denaturierung	98	10			
3	Primerhybridisierung	<u>—</u>	30			- 1,0
4	Elongation	72	15	2	10	
5	Denaturierung	98	10			
6	Primerhybridisierung	<u>—</u>	30			
7	Elongation	72	15	5	25	
8	Elongation	72	5 min			

**Tabelle 8: Programm einer Phusion-PCR.** Die verwendeten Primerhybridisierungstemperaturen sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Schritt	Beschreibung	Temp. (°C)	Zeit (s)	zurück zu Schritt	Zyklen
1	Denaturierung	98	30		
2	Denaturierung	98	10		
3	Primerhybridisierung	<u>—</u>	30		
4	Elongation	72	15	2	35
5	Elongation	72	5 min		

### 2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren können mit der Agarose-Gelelektrophorese in Kombination mit einem UV-sensitiven Farbstoff einfach sichtbar gemacht werden. Für ein Agarosegel wurde 1,5 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) gelöst und mit 0,005 % (v/v) GelRed® (Biotium) versetzt. Die Proben wurden mit DNA-Probenpuffer (Gel Loading Dye Purple, New England Biolabs) versetzt, auf das Gel aufgetragen und bei 100 V für 1 h in TAE-Puffer nach ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt. Zusätzlich wurde ein Größenstandard, der GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, in der Bildbeschriftung abgekürzt mit M), aufgetragen. Im Anschluss konnten dann die Nukleinsäuren mit dem Dokumentationssystem AG-LA140 LIAS Slite 140 (Avegene Life Science) sichtbar gemacht werden.

### 2.3.3 Restriktionsverdau, Dephosphorylierung und Ligation

Um die Ligation der hergestellten Genabschnitte in den pET28a+-Vektor (Novagen, Vektorkarte im Anhang Abbildung A1) zu ermöglichen, mussten zunächst sowohl PCR-Produkt als auch Vektor mit den Restriktionsenzymen NdeI und XhoI (New England Biolabs) behandelt werden. Dazu wurden in einem 50 µl Ansatz entweder das gesamte extrahierte PCR-Produkt oder 2 µg Plasmid-DNA mit je 10 U der Restriktionsenzyme NdeI und XhoI in CutSmart Buffer (New England Biolabs) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Der Vektor wurde im Anschluss zusätzlich mit 5 U Antarctic Phosphatase (New England Biolabs) für 1 h bei 37 °C dephosphoryliert. Um die eingesetzten Enzyme zu inaktivieren, wurden die Ansätze bei 65 °C für 20 min (PCR-Produkt) bzw. 70 °C für 20 min (Vektor) inkubiert. Für die Ligation

wurden Vektor und Insert im Verhältnis 1:5 eingesetzt und mit 1 U T4 DNA-Ligase (Thermo Scientific) in insgesamt 20 µl bei 21 °C über Nacht ligiert.

### 2.3.4 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Klonierung und die Proteinexpression wurden zwei verschiedene *E. coli* Stämme verwendet, XL10-Gold bzw. BL21-Gold (DE3) (Tabelle 9). Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurden 200 µl LB-Flüssigmedium (5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Trypton, 10 g/l NaCl) mit drei Kolonien inokuliert und bei 26 °C und 120 rpm über Nacht inkubiert. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,5 wurde die Kultur für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 1200 x g bei 4 °C für 10 min pelletiert. Das Pellet wurde in 64 ml eisgekühltem TB-Puffer (10 mM PIPES/KOH pH 7,0, 250 mM KCl, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 55 mM MnCl<sub>2</sub>) resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und erneut bei 1200 x g bei 4 °C für 10 min pelletiert. Diese Pellets wurden in 16 ml TB-Puffer mit 7 % DMSO aufgenommen, 10 min auf Eis inkubiert, zu je 100 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend konnten die chemisch kompetenten Zellen bei -80 °C gelagert werden.

**Tabelle 9: Verwendete Bakterienstämme und deren Genotyp.**

Name	Genotyp	Hersteller	Zweck
<i>Escherichia coli</i> BL21-Gold (DE3)	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ) <i>dcm</i> <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA</i> Hte	Agilent	Proteinexpression
<i>Escherichia coli</i> XL10-Gold	Tet <sup>r</sup> Δ( <i>mcrA</i> )183 Δ( <i>mcrCB</i> - <i>hsdSMR</i> - <i>mrr</i> )173 <i>endA1</i> <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> Hte [F' <i>proAB lacI</i> <sup>q</sup> ZΔM15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> ) Amy Cam <sup>r</sup> ]	Agilent	Klonierung

### 2.3.5 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Rekombinante DNA, wie die in dieser Arbeit hergestellten pET28a+-Konstrukte, kann mittels Transformation in *E. coli* eingebracht werden. Hierfür wurden 100 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und dann sofort mit 2 µl Ligationsansatz oder 100 ng Plasmid vermischt. Nach einer weiteren 30-minütigen Inkubation auf Eis wurde ein Hitzeschock für 30 s bei 42 °C durchgeführt und die Zellen anschließend sofort wieder für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 900 µl SOC-Flüssigmedium (5 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Trypton, 0,6 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 20 mM Mg<sup>2+</sup>, 20 mM Glucose) wurden die Zellen bei 37 °C und 250 rpm für 1 h inkubiert. Diese Bakteriensuspension wurde bei 6000 x g für 2 min abzentrifugiert. 800 µl des Überstands wurden verworfen, die pelletierten Zellen in den restlichen 200 µl resuspendiert, davon 100 µl auf LB-Festmedium (5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Trypton, 10 g/l NaCl, 15 g/l Agar) mit 100 µg/ml Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.3.6 PCR zum Nachweis positiver *E. coli* Transformanten

Ob die Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* Zellen erfolgreich war, konnte per PCR nachgewiesen werden. Hierzu wurden zunächst einzelne Kolonien aufgenommen und in 20 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst. Die PCR wurde mit der Taq DNA-Polymerase ähnlich wie in Abschnitt 2.2.6 durchgeführt. Allerdings wurde hier zu einem 20 µl Ansatz 2 µl der Bakteriensuspension anstatt gDNA hinzugefügt. Als Primer wurden T7\_for und T7term\_rev (siehe Tabelle A1 im Anhang) verwendet, welche außerhalb des Inserts auf dem Vektor greifen und somit in jedem Fall ein PCR-Produkt entstehen kann. Ist die Integration des Inserts erfolgreich verlaufen, entsteht somit ein Produkt von etwa 800-900 bp. Ist kein Insert eingebaut worden, wird ein etwa 320 bp großes Produkt amplifiziert. Diese Primerkombination benötigt eine Primerhybridisierungstemperatur von 45 °C und das Produkt eine Elongationszeit von 30 s. Sowohl *E. coli* XL10-Gold, als auch BL21-Gold (DE3) Zellen wurden mit dieser Methode überprüft.

### 2.3.7 Plasmidisolierung und -sequenzierung

Als positiv identifizierte Kolonien des Stamms *E. coli* XL10-Gold wurden erneut auf LB-Festmedium mit 100 µg/ml Kanamycin ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert, sodass davon 5 ml Flüssigkulturen in LB-Medium mit ebenfalls 100 µg/ml Kanamycin angezogen werden konnten. Aus diesen konnte die Plasmid-DNA mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) isoliert werden. Im Anschluss wurde diese durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) sequenziert. Die Richtigkeit der Nukleotidsequenz konnte durch einen multiplen Sequenzvergleich der Sequenzierung mit der Sequenz des Konstrukts mithilfe des Online Tools ClustalOmega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Sievers *et al.* 2011) nachgewiesen werden. Hierdurch konnten auch nahezu identische Isoformen voneinander unterschieden werden. Ob das Gen in einem Leserahmen mit dem Hi<sub>6</sub>-Tag liegt, konnte mit dem ExPASy Translate tool (<https://web.expasy.org/translate/>) (Gasteiger *et al.* 2005) überprüft werden. Die hergestellten Plasmidkonstrukte sind in Tabelle 10 aufgeführt und wurden nach ihrer Bestätigung für die Proteinüberexpression in *E. coli* BL21-Gold (DE3) eingebracht.

**Tabelle 10: Auf dem Vektor pET28a+ basierende Plasmidkonstrukte.**

Gen	Name des Plasmidkonstrukts	Resistenz
<i>BnCYP18-2</i> ( <i>BnaC01g03590D</i> )	pET28a+-BnCYP18-2-NH	} Kan <sup>r</sup>
<i>BnCYP18-3</i> ( <i>BnaA01g02340D</i> )	pET28a+-BnCYP18-3-NH	
<i>BnCYP18-4</i> ( <i>BnaC03g60160D</i> )	pET28a+-BnCYP18-4-NH	
<i>BnCYP18-5</i> ( <i>BnaA09g08780D</i> )	pET28a+-BnCYP18-5-NH	
<i>BnCYP18-6</i> ( <i>BnaA06g37360D</i> )	pET28a+-BnCYP18-6-NH	
<i>BnCYP18-8</i> ( <i>BnaC09g09060D</i> )	pET28a+-BnCYP18-8-NH	
<i>BnCYP19-1</i> ( <i>BnaA09g35540D</i> )	pET28a+-BnCYP19-1-NH	
<i>AtCYP18-3</i> ( <i>At4g38740</i> )	pET28a+-AtCYP18-3-NH	
<i>AtCYP18-4</i> ( <i>At4g34870</i> )	pET28a+-AtCYP18-4-NH	
<i>AtCYP19-1</i> ( <i>At2g16600</i> )	pET28a+-AtCYP19-1-NH	
<i>AtCYP19-3</i> ( <i>At3g56070</i> )	pET28a+-AtCYP19-3-NH	

### 2.3.8 Herstellung von *E. coli* Dauerkulturen

Für eine Dauerkultur wurden 500 µl einer Bakterienkultur, welche bei 37 °C in LB-Flüssigmedium und 100 µg/ml Kanamycin bei 180 rpm über Nacht angezogen wurde, mit 500 µl 50 % (v/v) Glycerol vermischt und bei -80 °C eingefroren und gelagert.

## 2.4 Proteinbiochemische Methoden

Die Herstellung großer Mengen an Protein benötigt ein auf das Protein angepasstes Expressions- und Aufreinigungsprotokoll. Essentielle Punkte sind unter anderem die Wahl eines geeigneten Affinitätstags, eines effizienten bakteriellen Expressionsstamms sowie eines optimalen Puffersystems. Dabei ermöglichen grundlegende Methoden wie die SDS-PAGE in Kombination mit einer Coomassie-Färbung oder einem Western Blot die Visualisierung der Ergebnisse. Nach erfolgreicher Aufreinigung steht das Protein dann für *in vitro* Experimente zur Verfügung.

### 2.4.1 SDS-PAGE

Als Polyacrylamid-Gelelektrophorese ermöglicht die SDS-PAGE (Kurzform für *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) die elektrophoretische Auftrennung von Proteingemischen nach deren Molekülmasse (Laemmli 1970). Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde zur optimalen Auftrennung kleiner Proteine (<30 kDa) eine 15 %-ige SDS-PAGE, bestehend aus einem 15 %-igen Trenngel und einem 4 %-igen Sammelgel, eingesetzt (Zusammensetzung siehe Tabelle 11). Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit SDS-Probenpuffer (60 mM Tris/HCl pH 6,8, 2 % (w/v) SDS, 10 % Glycerol, 0,02 % Bromphenolblau, 10 mM oder 20 mM DTT (siehe Abschnitt 3.3.4)) versetzt und bei 95 °C für 5 min denaturiert. Zusätzlich wurde als Größenstandard entweder der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) oder der PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) aufgetragen (in der Bildbeschriftung mit M abgekürzt). Der Gellauf fand in SDS-Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0,1 % SDS) bei konstanten 200 V für etwa 60 min in einem Mini-PROTEAN® Tetra Cell System (Bio-Rad) statt.

**Tabelle 11: Zusammensetzung SDS-PAGE.**

	15 % Trenngel	4 % Sammelgel
30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	2,5 ml	0,34 ml
1,5 M Tris pH 8,8	1,3 ml	-
1 M Tris pH 6,8	-	0,26 ml
10 % SDS	50 µl	20 µl
ddH <sub>2</sub> O	1,2 ml	1,36 ml
10 % Ammoniumpersulfat	50 µl	20 µl
TEMED	10 µl	2 µl

#### 2.4.2 Nachweis von Redoxzuständen mit einer denaturierenden SDS-PAGE

BnCYP18-4 und BnCYP19-1 wurden auf 0,5 mg/ml verdünnt und mit 10 mM CuSO<sub>4</sub> bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Die Lösung wurde aufgeteilt und unterschiedliche Mengen DTT (0-50 mM) hinzugegeben. Nach der Zugabe von nicht-reduzierendem SDS-Probenpuffer (60 mM Tris/HCl pH 6,8, 2 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerol, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau) wurde eine Geltasche eines 15 %-igen SDS-PAGE-Gels mit jeweils 1 µg Protein beladen. Zur Kontrolle wurde zusätzlich unbehandeltes Protein (weder oxidiert noch reduziert) aufgetragen.

#### 2.4.3 Kolloidale Coomassie-Färbung

Im Anschluss an die SDS-PAGE können die aufgetrennten Proteine über eine Coomassie-Färbung sichtbar gemacht werden. Hierfür wird Coomassie Brilliant Blue G-250 in Form einer sensitiven, kolloidalen Färbelösung eingesetzt (Kang *et al.* 2002). Zuerst wurde das Polyacrylamidgel dreimal für je 10 min mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen, dann mit Färbelösung (0,02 % (w/v) Coomassie CBB G-250, 5 % (w/v) Aluminiumsulfat-(14-18)-Hydrat, 10 % (v/v) Ethanol, 2 % (v/v) ortho-Phosphorsäure) zwischen 2 h bis über Nacht inkubiert und anschließend wieder mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen, um die Färbung des Hintergrunds zu reduzieren.

#### 2.4.4 Western Blot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung eines Proteingemischs via SDS-PAGE kann die Detektion eines spezifischen Proteins mittels Western Blot erfolgen. Das ungefärbte Gel wurde direkt nach der SDS-PAGE mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und danach in Transferpuffer (20 mM Tris, 150 mM Glycin, 0,02 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Ethanol) equilibriert. Die Immobilon®-P PVDF-Membran (Porengröße: 0,45 µm, Merck Millipore) wurde zuerst in 100 % Ethanol p.A. aktiviert und dann wie auch das Whatman-Papier (3 mm Chr, GE Healthcare) in Transferpuffer equilibriert. Für den Semi-Dry-Western Blot wurde ein Sandwich aus folgenden Bestandteilen in einem Fastblot B64 (Biometra) aufgebaut: 5 Lagen Whatman-Papier, PVDF-Membran, Gel, 5 Lagen Whatman-Papier. Die Übertragung der Proteine erfolgte bei 3,5 mA/cm<sup>2</sup> mit maximal 50 V und 10 W für 30 min. Die PVDF-Membran wurde anschließend in TBS-T (10 mM Tris/HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween-20) mit 5 % Milch für 1 h bei Raumtemperatur geblockt. Danach wurde die Membran mit TBS-T gewaschen, bevor der primäre Antikörper (Tabelle 12) hinzugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur mit der Membran inkubiert wurde. Der primäre Antikörper wurde wieder abgenommen und die Membran dreimal für je 5 min mit TBS-T/5 % Milch gewaschen, bevor der sekundäre Antikörper hinzugegeben wurde (Tabelle 12). Nach einer Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper von 1 h bei Raumtemperatur wurde dieser verworfen und die Membran dreimal für je 5 min mit TBS-T gewaschen. Die Detektion konnte nun mit dem Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific) und dem ChemiDoc™ Touch Imaging System (Bio-Rad) erfolgen.

**Tabelle 12: Verwendete Antikörper.** Die primären Antikörper konnten nach dem ersten Einsatz bei -20 °C gelagert und wiederverwendet werden.

Name	Hersteller	Wirt	Einsatz
<b>primäre Antikörper</b>			
anti-GFP	dianova	Maus	1:3000 in TBS-T/5 % Milch
anti-His	dianova	Maus	1:10000 in TBS-T/1 % BSA
anti-PR-2	Agrisera	Kaninchen	1:1000 in TBS-T/5 % Milch
anti-RbcS	Agrisera	Kaninchen	1:1000 in TBS-T/5 % Milch
anti-AtCYP18-3	Charles Gasser	Kaninchen	1:1000 in TBS-T/5 % Milch
anti-TuMV	Leibniz-Institut DSMZ GmbH	Kaninchen	1:1000 in TBS-T/5 % Milch
<b>sekundäre Antikörper</b>			
anti-Mouse-HRP	Jackson ImmunoResearch	Ziege	1:10000 in TBS-T/5 % Milch
anti-Rabbit-HRP	Jackson ImmunoResearch	Ziege	1:10000 in TBS-T/5 % Milch

#### 2.4.5 Proteinüberexpression

Durch eine Proteinüberexpression können große Mengen an Protein hergestellt werden, welche dann für die anschließende Aufreinigung bereitstehen. Für die Expression wurden mit den hergestellten pET28a+-Konstrukten transformierte *E. coli* BL21-Gold (DE3) Expressionszellen verwendet, welche ein auf dem lac-Operator basierendes T7-Expressionssystem besitzen. Dieses ermöglicht die gerichtete Transkription des in den pET28a+-Vektor eingebrachten Gens.

Zur Bestimmung der optimalen Expressionsdauer wurde zunächst ein Expressionstest durchgeführt. Im ersten Schritt wurde die Bakterienkultur einer stark bewachsenen Platte 2YT-Festmedium (10 g/l Hefeextrakt, 16 g/l Trypton, 5 g/l NaCl, 15 g/l Agar) mit 100 µg/ml Kanamycin in 4 ml 2YT-Flüssigmedium (10 g/l Hefeextrakt, 16 g/l Trypton, 5 g/l NaCl) aufgenommen, sodass dreimal 50 ml 2YT-Flüssigmedium mit 50 µg/ml Kanamycin mit 200 µl dieser Bakteriensuspension angeimpft werden konnten. Diese Flüssigkulturen wurden bei 37 °C bis zum Erreichen einer  $OD_{600} = 1,0$  inkubiert. Zur Kontrolle wurde 1 ml Kultur abgenommen. Anschließend konnte die Expression mit 1 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) induziert werden. Nach Start der Induktion wurde je eine Kultur bei 18 °C, 24 °C und 37 °C inkubiert und bis zu 5 h nach Induktion jede Stunde 1 ml Kultur abgenommen. Zusätzlich wurde die Kultur über Nacht weiter inkubiert, sodass auch nach 24 h 1 ml Kultur abgenommen werden konnten. Die 1 ml Kulturen wurden bei 4 °C und 6000 x g für 2 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zunächst in 100 µl Tris-Puffer (1 M Tris/HCl pH 7,4) gelöst, dann mit 100 µl 6x SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95 °C für 10 min aufgeköcht. Hiervon wurden 2 µl auf eine SDS-PAGE aufgetragen.

Eine Überexpression für die Proteinaufreinigung wurde in 200 ml Kulturvolumen angesetzt. Animpfen, Inkubation und Induktion erfolgte analog wie im Expressionstest beschrieben. Abweichend davon wurde die 400 ml Kultur mit 1,6 ml Bakteriensuspension angeimpft und nach Start der Induktion bei 37 °C für 3 h inkubiert. Nach 3-stündiger Induktion wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und konnten bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert werden. Zur Kontrolle wurden auch hier 1 ml Kulturen vor und nach der Induktion wie im Expressionstest beschrieben abgenommen und bearbeitet.

#### 2.4.6 Löslichkeitstest

Um einen optimalen Puffer für die Proteinaufreinigung zu finden, wurde ein Löslichkeitstest durchgeführt. Zunächst wurde hierfür eine 50 ml Flüssigkultur wie in Abschnitt 2.4.5 beschrieben angeimpft, induziert und nach 3 h Expression geerntet. Ab hier wurden alle Schritte auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. Als Waschschritt wurde das Pellet in 5 ml 10 mM Tris/HCl pH 8,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA resuspendiert (Lindwall *et al.* 2000). Die Bakterienlösung wurde zu je 100 µl aliquotiert, bei 10000 x g für 2 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Somit standen die Pellets für den Löslichkeitstest bereit. Insgesamt wurden 13 unterschiedliche Puffer getestet (aufgelistet in Abbildung 18). Ein Pellet wurde in 300 µl Puffer mit 1 mM PMSF gelöst. Zur Zellyse wurde 0,1 mg/ml Lysozym hinzugegeben und der Ansatz für 60 min inkubiert. Danach wurden die Zellen zusätzlich mit dem Bioruptor Pico (diagenode) mit 5 Zyklen aus je 30 s Puls und 30 s Pause aufgeschlossen. Danach wurden diese bei 20000 x g für 20 min abzentrifugiert, sodass danach Pellet und Überstand getrennt voneinander mit einer SDS-PAGE analysiert werden konnten.

#### 2.4.7 Proteinaufreinigung

Für verschiedene *in vitro* Experimente wie funktionelle und strukturelle Analysen wird hochreines Protein benötigt. Dieses konnte für die in dieser Arbeit untersuchten pflanzlichen CYPs durch eine Kombination von Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie erreicht werden. Dafür wurde das Pellet der Expression (Abschnitt 2.4.5) zunächst in 40 ml Lysispuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,4, 300 mM NaCl, 2 mM Imidazol) resuspendiert und mit einer Tablette Proteaseinhibitor (cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche) und einer Spatelspitze DNase I (AppliChem) versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte in zwei Schritten: Zuerst durch eine Behandlung mit 1 mg/ml Lysozym für 1 h auf einem Rotationsschüttler und eine darauffolgende Sonifizierung (Branson Sonifier 250) bestehend aus 8 Zyklen zu je 30 s Puls und 20 s Pause mit 50 % *Duty Cycle* und *Output Control* = 5. Das Lysat wurde bei 43000 x g für 20 min abzentrifugiert und der Überstand durch einen 0,45 µm Filter (Filtropur S, Sarstedt) filtriert, sodass das geklärte Lysat für die Ni-NTA-Affinitätschromatographie verwendet werden konnte.

Für die Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurde eine PD10 Leersäule (GE Healthcare) mit 2 ml Ni-NTA-Agarosegranulat (Qiagen) befüllt. Dieses wurde zuerst mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und danach mit Lysispuffer equilibriert. Im nächsten Schritt wurde das Lysat mit dem Agarosegranulat für 1 h auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Danach wurde der Durchlauf von der Säule aufgenommen und diese mit dreimal 5 ml Waschpuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,4, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol) gewaschen (W1-W3). Die His<sub>6</sub>-markierten Proteine konnten in 4 Fraktionen zu je 3 ml Elutionspuffer 1 (20 mM Tris/HCl pH 7,4, 300 mM NaCl, 200 mM Imidazol) von der Matrix eluiert werden (E1-E4). Ein letzter Elutionsschritt mit Elutionspuffer 2 (20 mM Tris/HCl pH 7,4, 300 mM NaCl, 1 M Imidazol) diente dazu, gebundenes, verbliebenes Protein nachzuweisen (E5).

Um anschließend das Imidazol sowie den His<sub>6</sub>-Tag vor der Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) zu entfernen, wurde eine Dialyse durchgeführt. Hierfür wurden 12 ml Eluat,

bestehend aus den vereinigten Fraktionen E1-E4, in einem Dialyseschlauch (Spectra/Por®3, MWCO: 3,5 kDa, Spectrum Laboratories) in 1 l SEC-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7,4, 300 mM NaCl) über Nacht dialysiert. Danach wurden 20 U Thrombin (GE Healthcare) zu dem Eluat hinzugegeben und über Nacht auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Anschließend wurde das Probenvolumen mit einem Vivaspin 20 Konzentrator (MWCO: 10000, Sartorius) auf unter 2 ml Volumen eingengt und auf eine mit SEC-Puffer equilibrierte HiLoad™ 16/600 Superdex™ 75 pg (GE Healthcare) Gelfiltrationssäule geladen. Die SEC wurde mit der ÄKTAprime plus (GE Healthcare) bei einer Flussrate von 0,3 ml/min durchgeführt.

Um bei einem unvollständigen Thrombinverdau geschnittenes von ungeschnittenem Protein zu trennen, wurde abschließend eine weitere Ni-NTA-Affinitätschromatographie, nach dem oben beschriebenen Protokoll durchgeführt. Das aufgereinigte Protein befand sich danach im Durchlauf und wurde entweder direkt verwendet (z. B. für Strukturanalysen, siehe Abschnitt 2.6.1 und 2.6.4) oder auf 10 mg/ml mit einem Vivaspin 20 (MWCO: 10000, Sartorius) oder Vivaspin 500 Konzentrator (MWCO: 5000, Sartorius) aufkonzentriert, mit 5 % (v/v) Glycerol und 0,1 mM AeBSF versetzt, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Um die einzelnen Schritte der Aufreinigung zu prüfen und zu dokumentieren, wurde eine SDS-PAGE eingesetzt. Alle Schritte der gesamten Proteinaufreinigung wurden auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt und der pH der Puffer aufgrund der Temperaturabhängigkeit des pH-Wertes von Tris-Puffern bei 4 °C eingestellt.

#### 2.4.8 Bestimmung der PPIase Aktivität

Die Aktivität einer PPIase lässt sich mit dem von Fischer *et al.* beschriebenen, Protease-gekoppelten PPIase Assay bestimmen (Fischer *et al.* 1984). Dabei kann sowohl ein Proteingemisch als auch aufgereinigtes Protein eingesetzt werden. Dementsprechend wurden sowohl frisches Phloemexsudat (1-10 µl) als auch rekombinant hergestellte BnCYPs und AtCYPs mit dem PPIase Assay untersucht. Aufgereinigtes Protein wurde zuerst in Assay Puffer (35 mM HEPES pH 8,0) auf Stammlösungen von 2,5 µM und 250 nM vorverdünnt. Ausgehend von diesen wurde 0,5 bis 50 nM Protein eingesetzt. Nach 5-minütiger Inkubation wurden direkt vor Start der Messung 12 µM  $\alpha$ -Chymotrypsin (aus einer 2,4 mM Stammlösung, gelöst in 1 mM HCl) und 80 µM Substrat (aus einer 8 mM Stammlösung) zugegeben. Die Messung wurde gestartet, das Substrat nach 2 s zugegeben und der gesamte Ansatz für 4 s gemixt, womit dann das Gesamtvolumen von 1 ml erreicht wurde. Als Substrat wurde N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-Nitroanilid (Suc-AAPF-pNA) in 470 mM LiCl und 100 % 2,2,2-Trifluorethanol gelöst (Kofron *et al.* 1991). Die Absorption wurde bei 390 nm mit einem Intervall von 2 s für insgesamt 300 s aufgezeichnet. Der gesamte Versuch wurde bei 4 °C durchgeführt. Für jede Proteinkonzentration wurden 3 Replikate aufgenommen. Die Daten wurden mit der Reaktionsgleichung 1. Ordnung  $y = y_0 + a e^{-kt}$  (mit  $k$  als beobachtete Ratenkonstante  $k_{\text{obs}}$ ) angenähert. Die Ratenkonstante der katalysierten Isomerisierungsreaktion ( $k_{\text{Isomerase}}$ ) konnte durch die Subtraktion von  $k_0$  von  $k_{\text{obs}}$  bestimmt werden (mit  $k_0$  als Ratenkonstante der spontanen, unkatalysierten *cis/trans*-Isomerisierungsreaktion). Diese Daten wurden

gegen die Proteinkonzentration aufgetragen und mit einer linearen Regression angenähert, bei welcher die Steigung der katalytischen Aktivität  $k_{\text{cat}}/K_m$  entspricht.

Um die Inhibierung der PPIase Aktivität durch CsA zu bestimmen, wurde der PPIase Assay leicht modifiziert. Die Proteinkonzentration wurde mit 5 nM konstant gehalten. Die CsA Konzentration wurde hingegen von 0 bis 1000 nM variiert. 10 mM CsA (Sigma-Aldrich) wurde in 100 % DMSO angesetzt und ebenfalls mit 100 % DMSO zu geeigneten Stammlösungen verdünnt. Nach der Zugabe von CsA zum Ansatz wurde nach Bedarf 100 %-iges DMSO hinzugefügt, um dessen Anteil bei allen Messungen mit 0,1 % konstant zu halten. Der Ansatz wurde anschließend für 5 min inkubiert, bevor die Reaktion wie oben beschrieben gestartet wurde. Da die PPIase Aktivität ohne CsA der maximalen Aktivität ( $k_{\text{max}}$ ) entspricht, konnte die Inhibierung mit  $y = (k_{\text{max}} - k_{\text{Isomerase}})/k_{\text{max}}$  berechnet und gegen die CsA-Konzentration aufgetragen werden. Nach logarithmieren der  $x$ -Achse ergab sich damit ein Graph mit sigmoidalem Kurvenverlauf, dessen Datenpunkte mit  $y = A_1 + (A_2 - A_1)/(1 + (x/x_0)^p)$  angenähert werden konnten, um den  $IC_{50}$  zu bestimmen.

## 2.5 Proteomanalytische Methoden

Über Methoden zur Analyse des gesamten Proteoms können auch Erkenntnisse über einzelne Kandidatenproteine gewonnen werden. Dementsprechend wurden aus unterschiedlichen Proben Proteine extrahiert oder gefällt, ihre Proteinkonzentration bestimmt und die Zusammensetzung per Gelelektrophorese oder Flüssigchromatographie zunächst aufgetrennt und anschließend massenspektrometrisch ausgewertet.

### 2.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration von Proteinextrakten wurde der Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) verwendet, welcher auf dem kolorimetrischen Bradford Assay basiert (Bradford 1976). Dieser wurde zur Bestimmung geringer Proteinkonzentrationen mit einer Standardreihe von 0 bis 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  BSA nach Herstellerangaben durchgeführt und die Absorption bei 595 nm gemessen.

### 2.5.2 Proteinpräzipitation

Für die Fällung von Proteinen wurde 90 % (v/v) Aceton, 10 % (v/v) Methanol, 10 mM DTT zu einer Proteinlösung im Verhältnis 1:4 (Proteinlösung:Fälllösung) gegeben und die Proteine bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  über Nacht präzipitiert. Am nächsten Tag konnte das Präzipitat bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  und  $14.000 \times g$  für 15 min pelletiert werden. Das Pellet wurde zweimal mit 100 % Aceton gewaschen, danach luftgetrocknet und anschließend bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.5.3 2D-Gelelektrophorese

Die 2D-Gelelektrophorese, welche aus zwei Schritten, einer isoelektrischen Fokussierung und einer nachfolgenden SDS-PAGE, besteht, ermöglichte eine gelbasierte Analyse des Phloem- und Blattproteoms. Für die Vorbereitung der Phloemproben wurden Proteine aus 500 bis 600 µl Phloemexsudat (Abschnitt 2.2.3) gefällt (Abschnitt 2.5.2). Im Vergleich dazu wurden aus den Blattproben zuerst Proteine aus 200 mg Blattmaterial extrahiert (Abschnitt 2.2.4) und anschließend ebenfalls mit der Aceton/Methanol/DTT-Fällung präzipitiert. Danach wurden die erhaltenen Proteinpellets beider Proben in 100 µl (Phloem) bzw. 400 µl (Blatt) Resuspensionspuffer (50 mM MOPS/KOH pH 7,5, 0,5 % Nonidet P-40, 5 mM DTT, 1x Proteaseinhibitor (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail, Roche)) aufgenommen. Eine zweite Präzipitation wurde mit dem 2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare) nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt und die hierbei erhaltenen Proteinpellets in jeweils 20 µl Rehydratisierungspuffer (7 M Urea, 2 M Thiourea, 4 % CHAPS) gelöst. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem 2-D Quant Kit (GE Healthcare) wurden für die Rehydratisierung der Immobiline DryStrip IPG-*Strips* (pH 3-10, 7 cm, GE Healthcare) 100 µg Phloem- bzw. 200 µg Blattprobe eingesetzt. Die Rehydratisierungslösung setzte sich aus der Probe in Rehydratisierungspuffer, 1 mM DTT und 1,3 µl IPG-Puffer pH 3-10 (GE Healthcare) zusammen und wurde mit DeStreak Reagent (GE Healthcare) auf ein Gesamtvolumen von 130 µl aufgefüllt. Die Rehydratisierung der *Strips* erfolgte bei Raumtemperatur für 16-20 h in einer Immobiline DryStrip IPGbox (GE Healthcare). Für die isoelektrische Fokussierung wurden die *Strips* entsprechend der Anleitung des Ettan IPGphor3 (GE Healthcare) in ein Keramiktray eingesetzt und mit Mineralöl (Immobiline DryStrip Cover Fluid, GE Healthcare) überschichtet. Das Programm der isoelektrischen Fokussierung bestand aus mehreren Schritten (siehe Tabelle 13). Zusätzlich wurde die elektrische Stromstärke auf 50 µA/*Strip* begrenzt. Nach der isoelektrischen Fokussierung konnten die *Strips* bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert werden.

Für die Vorbereitung der *Strips* für die SDS-PAGE wurden diese zunächst in jeweils 3 ml 6 M Urea, 75 mM Tris/HCl pH 8,8, 29,3 % (v/v) Glycerol, 2 % (w/v) SDS, 0,002 % (w/v) Bromphenolblau, 15 mM DTT auf einem Wippschüttler im Dunkeln für 15 min equilibriert. Nach dem Waschen mit ddH<sub>2</sub>O wurden die *Strips* dann in jeweils 3 ml 6 M Urea, 75 mM Tris/HCl pH 8,8, 29,3 % (v/v) Glycerol, 2 % (w/v) SDS, 0,002 % (w/v) Bromphenolblau, 15 mM Iodacetamid auf einem Wippschüttler im Dunkeln für 15 min inkubiert. Zuletzt wurden die *Strips* einmal mit SDS-Laufpuffer gespült, bevor sie mit Agarose (0,5 % Agarose und 0,002 % (w/v) Bromphenolblau in SDS-Laufpuffer) auf einer 15 %-igen SDS-PAGE fixiert wurden und die SDS-PAGE wie bereits beschrieben durchgeführt wurde (Abschnitt 2.4.1).

**Tabelle 13: Programm der isoelektrischen Fokussierung.**

Schritt	Modus	Spannung (V)	Vh
1	Step	300	1000
2	Gradient	1000	300
3	Gradient	5000	4500
4	Step	5000	2000

#### 2.5.4 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie können Proteine anhand der *Peptide Mass Fingerprint* Methode identifiziert werden. Dazu wurde eine Proteinbande, bzw. ein *Spot*, aus einem SDS-PAGE Gel ausgestochen und in ein silikonisiertes Reaktionsgefäß (Protein LoBind Tubes, Eppendorf) überführt. Das Gelstück wurde mit 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  für 5 min gewaschen. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Gelstück mit einer Lösung aus 50 % (v/v) Acetonitril und 50 % (v/v) 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  für etwa 30 bis 60 min entfärbt. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Gelstück in 100 % Acetonitril für 10 min dehydriert. Nach Entfernen des Acetonitrils wurde das Gelstück an der Luft getrocknet. Anschließend wurde ein In-Gel Trypsinverdau mit 0,01  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Trypsin (Promega) in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  zunächst für 20 min bei Raumtemperatur angesetzt, bevor weitere 20  $\mu\text{l}$  50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  hinzugegeben und der Trypsinverdau für 4 h bis über Nacht bei 37 °C vollzogen werden konnte.

Für den Probenauftrag auf ein AnchorChip 600-384 Target (Bruker) wurde zunächst 2  $\mu\text{l}$  TA30 (30 % Acetonitril, 70 % ddH<sub>2</sub>O, 0,1 % Trifluoressigsäure) aufgetragen. Hierzu wurde 1  $\mu\text{l}$  Probe gegeben. Zusätzlich wurde ein Peptidstandard (Peptide Calibration Standard, Bruker) aufgetragen. Nachdem die Probe bzw. der Peptidstandard getrocknet waren, wurden diese mit 1  $\mu\text{l}$  HCCA-Matrix (alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid, 10 mg in 1 ml TA30) überschichtet. Anschließend konnten die Proben mit dem Ultraflex III MALDI-TOF-TOF Massenspektrometer (Bruker) im linearen, positiven Reflektormodus analysiert werden. Nach Kalibrierung mithilfe des Peptidstandards wurden Spektren in einem Messbereich von 600 bis 4000 Da mit einer Laserintensität von 20 % und 2000-3000 *Shots* aufgenommen.

Die Auswertung der Spektren erfolgte mit mMass (Niedermeyer und Strohaln 2012). Nach der Auswahl der Signale konnten diese im Sinne der *Peptide Mass Fingerprint* Methode den BnCYP-Isoformen zugeordnet werden. Hierfür wurden die Aminosäuresequenzen der BnCYPs im Programm theoretisch verdaut und die erhaltene Signalliste mit den ausgewählten Signalen abgeglichen. Dabei wurden zusätzlich variable Modifikationen wie eine Oxidation an Methionin, eine Carbamidomethylierung an Cystein oder eine Phosphorylierung an Serin, Threonin oder Tyrosin genutzt sowie eine Toleranz von 0,5 Da und ein *Miscleavage* von 2. Für signifikant identifizierte Proteine wurde eine Sequenzabdeckung von mindestens 40 % sowie die Zuordnung von mindestens 5 Peptiden erwartet. Wurden diese Kriterien nur mit der Phosphorylierung als zusätzlicher variabler Modifikation erreicht, wurde auch das Ergebnis ohne Phosphorylierung dargestellt. Konnte ein Protein unter diesen Bedingungen erfolgreich identifiziert werden, so werden zum Vergleich auch die Ergebnisse der Isoformen präsentiert.

#### 2.5.5 Proteomanalysen mittels LC-MS/MS

LC-MS/MS-Analysen kombinieren eine Flüssigchromatographie mit einer anschließenden massenspektrometrischen Messung. Zur Untersuchung des Blatt- und Phloemproteoms per LC-MS/MS wurden mehrere Proben bearbeitet (Blatt n = 3, Phloem n = 4). Hierfür wurde zunächst Gesamtprotein wie in Abschnitt 2.2.3, 2.2.4 und 2.5.2 beschrieben extrahiert und präzipitiert. Die anschließende Probenvorbereitung, LC-MS/MS-Messungen und Datenprozessierung mit Progenesis QI for proteomics

(Progenesis QI for Proteomics Version 3.0, Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK) wurden von Krzysztof Bajdzienko und Patrick Giavalisco (Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Potsdam) durchgeführt und sind ausführlich in Hanhart *et al.* (2017) beschrieben.

Für die Auswertung der Daten zur Virusinfektion wurden die Abundanzen der Replikate zunächst nach dem Koeffizienten der Varianz ( $CV = \text{Standardabweichung}/\text{Mittelwert}$ ) gefiltert. Anschließend wurden die Daten mit MetaboAnalyst 4.0 (Chong *et al.* 2018) ausgewertet. Hierfür wurden die Daten log-transformiert, mittels Pareto-Skalierung skaliert und es wurde eine PCA-Analyse durchgeführt. Danach wurden die Fold Changes (TuMV/Mock) und p-values berechnet, aus welchen in OriginPro 2016 (OriginLab Corporation) mit der Volcano Plot App ein Volcano Plot erstellt werden konnte.

## 2.6 Strukturbiologische Methoden

Um grundlegende Prozesse zu untersuchen ist es essentiell, einen Blick auf die Struktur einzelner Bestandteile zu werfen. Im übertragenen Sinn bedeutet dies für die Molekularbiologie, dass durch die Betrachtung von Makromolekülen auf struktureller Ebene ein Rückschluss auf die Funktion gezogen werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurden dafür zwei verschiedene Methoden eingesetzt. Die Röntgenstrukturanalyse, welche Informationen aus einem starren Proteinkristall gewinnt, sowie die Kleinwinkelröntgenstreuung (*small-angle x-ray scattering*, SAXS), bei welcher Makromoleküle in Lösung betrachtet werden können.

### 2.6.1 Probenvorbereitung für Kleinwinkelröntgenstreuungsexperimente

Für die strukturelle Untersuchung in Lösung wurden BnCYP18-4, BnCYP18-5, BnCYP19-1 und AtCYP19-3 ausgewählt. Die Proteine wurden wie in Abschnitt 2.4.5 und 2.4.7 beschrieben exprimiert und aufgereinigt und befanden sich demnach in 20 mM Tris/HCl pH 7,4, 300 mM NaCl. Im Anschluss an die Aufreinigung wurden die Proteine mit 0,1 mM AeBSF und 2 mM DTT versetzt und mit Vivaspin 20 und Vivaspin 500 Konzentratoren (MWCO: 5000, Sartorius) aufkonzentriert. Währenddessen wurde die Proteinkonzentration mehrmals durch Absorptionsmessungen bei 280 nm mit dem NanoDrop One (Thermo Scientific) bestimmt und Proben bei etwa 1, 2, 5 und 10 mg/ml abgenommen. Der Durchlauf der Konzentratoren wurde aufgefangen und ebenfalls für Kleinwinkelröntgenstreuungsexperimente genutzt.

### 2.6.2 Dynamische Lichtstreuung

Mit der dynamischen Lichtstreuung (DLS) kann die Größenverteilung von Partikeln in Lösung bestimmt werden. Dementsprechend wurde die Dispersität aufgereinigter CYPs mittels DLS untersucht. Hierfür wurde die Proteinprobe zunächst bei 20000 x g und 4 °C für 30 min abzentrifugiert. Anschließend wurden 15 µl der Proteinlösung mit dem Spectrolight 300 (Xtal Concepts) in einer Quartzküvette bei 660 nm

gemessen und die Streuintensität bei  $90^\circ$  für 20 s nach Herstellerangaben aufgenommen. Die Messung wurde 20-mal wiederholt. Die Auswertung erfolgte automatisiert durch die geräteeigene Software.

### 2.6.3 Kleinwinkelröntgenstreuung

Die Kleinwinkelröntgenstreuung (SAXS) bietet die Möglichkeit, Veränderungen in der äußeren Form eines Komplexes zu untersuchen. Da Proteine hierfür in Lösung gemessen werden, können außerdem flexible Bereiche untersucht werden. Wichtig für diese Messungen ist, dass es zu jeder Probe einen identischen Puffer gibt, da dessen Streudaten im Zuge der Datenauswertung von den Streudaten der Probe subtrahiert werden (siehe Probenvorbereitung Abschnitt 2.6.1).

Die SAXS Aufnahmen wurden an der EMBL Messstation P12 am Speicherring PETRA III (DESY, Hamburg) durchgeführt. Die Parameter der Datenaufnahme sind in Tabelle 14 zusammengefasst. Für die Aufnahme der Streudaten wurde ein 2D Photonen-zählender Pilatus 2 M Pixel Detektor (Dectris) mit einem Impulsübertragungsbereich von  $0,03 \text{ nm}^{-1} < s < 4,8 \text{ nm}^{-1}$  ( $s = 4\pi\sin\theta/\lambda$ , mit  $2\theta$  als Streuwinkel und  $\lambda$  als Wellenlänge der Strahlung) verwendet. Sofern möglich wurden CYPs mit bis zu vier verschiedenen Proteinkonzentrationen zwischen 1 und 8 mg/ml eingesetzt. Zusätzlich wurde 5 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA) in 50 mM HEPES pH 7,5 gemessen, um die gesamte Messreihe zu kalibrieren und den Versuchsaufbau zu prüfen. Direkt vor der Messung wurden alle Proben bei  $20000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  für mindestens 20 min zentrifugiert. Anschließend wurden sowohl die Proteinlösungen, als auch die dazugehörigen Puffer als Referenz abwechselnd den Röntgenstrahlen ausgesetzt (Reihenfolge Puffer-Probe-Puffer), für jeweils 20 Expositionen von je 45 ms. Die Puffermessungen vor und nach jeder Probe sind für die Subtraktion des Puffersignals vom Gesamtsignal der Probe notwendig. Die Prozessierung und damit Datenreduktion der Rohdaten aus den Aufnahmen in ein eindimensionales Streuintensitätsprofil ( $I(s)$  vs.  $s$ ) erfolgte automatisiert mit der an der Messstation etablierten Software SASFLOW (Franke *et al.* 2012)). Auch wurde hierbei die gemessene Intensität mit purem  $\text{H}_2\text{O}$  als Referenz auf eine absolute Skala gesetzt. Im Anschluss wurden die Streuintensitäten jeder Messung aus den 20 Einzelexpositionen gemittelt und die Streuamplitude des Referenzpuffers von der Streuamplitude der Probenlösung subtrahiert. Die entstandenen Kurven wurden mit PRIMUSqt (Franke *et al.* 2017) weiter prozessiert, wobei die Auswertung auf Grundlage der höchsten gemessenen Konzentration (3,1 mg/ml BnCYP18-4, 4,2 mg/ml BnCYP18-5, 7,1 mg/ml BnCYP19-1, 7,7 mg/ml AtCYP19-3) durchgeführt wurde. Mit dem in PRIMUSQT implementierten AUTORG konnte über die Guinier-Annäherung der  $R_g$  und mit GNOM anhand der Verteilungsfunktion des Partikelabstands ( $P(r)$ -Funktion) die maximale Distanz ( $D_{\max}$ ) bestimmt werden. Mit der Guinier-Annäherung und der  $P(r)$ -Funktion konnte auch  $I(0)$  bestimmt werden, aus welcher mit

$$MW_{I(0)} = I(0) \frac{MW_{\text{BSA}}}{I(0)_{\text{BSA}}}$$

das  $MW_{I(0)}$  des Proteins berechnet wurde (mit  $MW_{\text{BSA}}$  = Molekulargewicht von BSA (66,2 kDa) und  $I(0)_{\text{BSA}}$  = Vorwärtsstreuung der BSA-Messung).

Im Anschluss wurde DAMMIF online (Franke und Svergun 2009) ausgeführt, mit welchem für jedes Protein 20 *ab initio* Modelle generiert wurden. Im Rahmen von DAMMIF online werden SUPCOMB und DAMSEL ausgeführt, welche die normalisierte räumliche Abweichung (*normalised spatial discrepancy*, kurz NSD) der 20 Modelle berechnen und Ausreißer entfernen. Dadurch wird die Auswahl des wahrscheinlichsten Modells ermöglicht und ein Maß für die Qualität der Modelle geliefert (Franke *et al.* 2017). Den Vergleich zwischen Proteinen in Lösung mit deren Kristalldaten ermöglichte CRY SOL online (Svergun *et al.* 1995). CRY SOL berechnet dafür Streudaten aus hochaufgelösten Kristallstrukturen und vergleicht diese mit den experimentellen Streudaten. Dabei gibt  $\chi^2$  an, wie passend die Annäherung der berechneten Kurve an die experimentellen Streudaten ist. Ein Modell, welches die Daten gut annähert, hat einen  $\chi^2$ -Wert von etwa 1. Lag keine Kristallstruktur vor, wurde diese mit I-TASSER basierend auf einer homologen Kristallstruktur berechnet (Abschnitt 2.6.5).

**Tabelle 14: SAXS Parameter der Datengewinnung und Prozessierung.**

<b>Datengewinnung</b>	
Messstation	EMBL Messstation P12, PETRA III, DESY (Blanchet <i>et al.</i> 2015)
Wellenlänge (nm)	0,124
Probe-zu-Detektor Distanz (m)	3,1
$s$ -Bereich ( $\text{nm}^{-1}$ )	0,03–4,8
Expositionszeit (s)	$0,05 \times 20$
Konzentrationsreihe (mg/ml)	1-8
Temperatur ( $^{\circ}\text{C}$ )	10 $^{\circ}\text{C}$
<b>Verwendete Software</b>	
Erste Datenreduktion und -prozessierung	SASFLOW Pipeline (Franke <i>et al.</i> 2012)
Guinier, $P(r)$	PRIMUSqt aus ATSAS 2.8.3 (Franke <i>et al.</i> 2017)
<i>Ab initio</i> Modell	DAMMIF (Franke und Svergun 2009)
<i>Rigid body</i> Modell	I-TASSER (Yang <i>et al.</i> 2015)
Vergleich mit Kristalldaten	CRY SOL (Svergun <i>et al.</i> 1995)
Präsentation von 3D-Modellen	PyMOL (Schrödinger)

#### 2.6.4 Proteinkristallisation und Röntgenstrukturanalyse

Die Versuche zur Proteinkristallisation und Röntgenstrukturanalyse wurden in Kooperation mit Marcel Garbe (AG Kehr, Universität Hamburg) und Sven Falke (AG Betzel, Universität Hamburg) durchgeführt. Zunächst wurden mehrere kommerziell erhältliche Kristallisationstests mit der *sitting drop vapor diffusion* Kristallisationstechnik durchgeführt: JCSG-*plus*<sup>TM</sup> HT-96 (Molecular Dimensions), AmSO<sub>4</sub> Suite (Qiagen) sowie Morpheus® HT-96 (Molecular Dimensions). In diesen wurden in unterschiedlichen Ansätzen 5-25 mg/ml Protein eingesetzt und teilweise CsA (Sigma-Aldrich oder Novartis) hinzugegeben. Die Ansätze konnten im Hochdurchsatz mit einem Honeybee 961 Kristallisationsroboter (Genomic Solutions) pipettiert werden. Anschließend wurden die Platten für mehrere Wochen bei 20  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

Für die erfolgreiche Kristallisation von BnCYP19-1 wurde CsA (Sigma-Aldrich) in 100 % DMSO gelöst und wie in Campos *et al.* (2013) beschrieben in einem molaren Verhältnis von 2:1 (CsA:Protein) zu 10 mg/ml BnCYP19-1 gegeben. Der Cyclophilin:CsA Komplex wurde vor dem Einsatz für die

Kristallisation zentrifugiert. Die für die Kristallisation erfolgreiche Reservoirolösung bestand aus 2,4 M Natriummalonat pH 7,0. Innerhalb von 3 Wochen waren Kristalle sichtbar, welche durch die langsame Zugabe von Glycerol bis zu einer Endkonzentration von 12 % (v/v) kryokonserviert wurden, sodass aus diesen an der EMBL Messstation P14 am PETRA III (DESY, Hamburg) Beugungsdaten gewonnen werden konnten. Die Daten wurden mit einer Röntgenstrahlwellenlänge von 1,0332 Å von einem auf einer Schlaufe (MiTeGen micromesh, 400 µm Durchmesser und 25 µm Maschenweite) fixierten Kristall bei -173 °C gewonnen. Hierfür wurde ein einzelner Kristall dem Röntgenstrahl ausgesetzt und mit einem Rotationsschritt von 0,1° gedreht, sodass bei jedem Rotationsschritt ein Diffraktionsbild aufgenommen werden konnte. Insgesamt konnten so 3600 Diffraktionsbilder aufgenommen werden.

Für die Datenprozessierung wurden zunächst Raumgruppe und Parameter der Elementarzelle mit iMOSFLM bestimmt (Battye *et al.* 2011). Danach wurden die Beugungsdaten mittels SCALA, einem Bestandteil der CCP4 suite, reduziert und skaliert (Winn *et al.* 2011). Anschließend wurde die resultierende mtz-Datei mit dem Programm FREEFLAG in eine einzigartige mtz-Datei konvertiert (Brunger 1992). Der Proteindatenbankeintrag von CsCYP (PDB ID: 4JJM) lieferte die Phaseninformation für den

**Tabelle 15: Datengewinnungs- und Verfeinerungskriterien.** Die folgenden Kriterien wurden für die Auswertung der Beugungsdaten verwendet. Es wurden Beugungsdaten eines einzelnen Kristalls für die Datenprozessierung verwendet. Die Zahlen in Klammern beziehen sich auf die äußere Hülle.

<b>Datengewinnung</b>	
Messtation	EMBL Messstation P14, PETRA III, DESY
Wellenlänge (Å)	1,0332
Parameter der Elementarzelle (Å/°)	a = 86,58, b = 86,58, c = 119,52 $\alpha = 90, \beta = 90, \gamma = 90$
Raumgruppe	I4 <sub>1</sub> 22
Auflösung (Å)	70,12-1,98 (2,08-1,98)
Gesamtanzahl der Reflexionen	90890
Anzahl an einzigartigen Reflexionen	16197
Redundanz	5,6 (5,9)
Vollständigkeit (%)	99,9 (98,3)
Lösemittelgehalt (%)	59,9
R <sub>merge</sub>	10,1 (46,6)
I/ $\sigma(I)$	9,2 (3,59)
CC <sub>1/2</sub>	99,7 (89,3)
<b>Verfeinerung</b>	
R (%)	19,8
R <sub>frei</sub> (%)	23,5
Anzahl der Proteinatome	1279
Anzahl der Wassermoleküle	50
Anzahl an Liganden	3
Anzahl an Ligandenatomen	93
B-Faktor Protein	32,83
B-Faktor Wasser	31,08
B-Faktor CsA/Malonat/Ion	32,23/52,92/33,73
R.m.s.d. Bindungslänge	0,018
R.m.s.d. Bindungswinkel	2,011
<b>Ramachandran Plot</b>	
Bevorzugte Region	95,8 %
Erlaubte Region	4,2 %
Ausreißer	0 %

molekularen Austausch (*molecular replacement*), sodass die initialen Atomkoordinaten zunächst mit MOLREP berechnet (Vagin und Teplyakov 1997) und anschließend für iterative Verbesserungen mit REFMAC verwendet werden konnten (Murshudov *et al.* 1997). Des Weiteren wurden manuelle Verbesserungen mit COOT durchgeführt (Emsley und Cowtan 2004). Zuletzt wurden die Qualität der Verbesserungen sowie die Koordinaten mit PROCHECK (Laskowski *et al.* 1993) und dem REDO Server (Joosten *et al.* 2014) überprüft. Die Bindestellen für Magnesium, Malonat und CsA wurden über PDBsum (Laskowski *et al.* 2018) ermittelt. Zusätzlich wurde die Metallbindestelle mit CMM (CheckMyMetal, [https://csgid.org/csgid/metal\\_sites](https://csgid.org/csgid/metal_sites)) validiert (Zheng *et al.* 2017). Die Daten der Prozessierung sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

### 2.6.5 Erstellung von Homologiemodellen und Darstellung der Strukturen

Die Tertiärstruktur von *B. napus* und *A. thaliana* Cyclophilinen wurde auf Grundlage der BnCYP19-1 Kristallstruktur mit SWISS-MODEL (Biasini *et al.* 2014; Bienert *et al.* 2017) modelliert. Zum Vergleich wurde auch I-TASSER (Yang *et al.* 2015) ausgeführt. Die I-TASSER Modelle wurden auch für den Vergleich mit den *ab initio* Oberflächenmodellen verwendet. Die Darstellung der Modelle erfolgte mit PyMOL (Schrödinger).



### 3 ERGEBNISSE & DISKUSSION

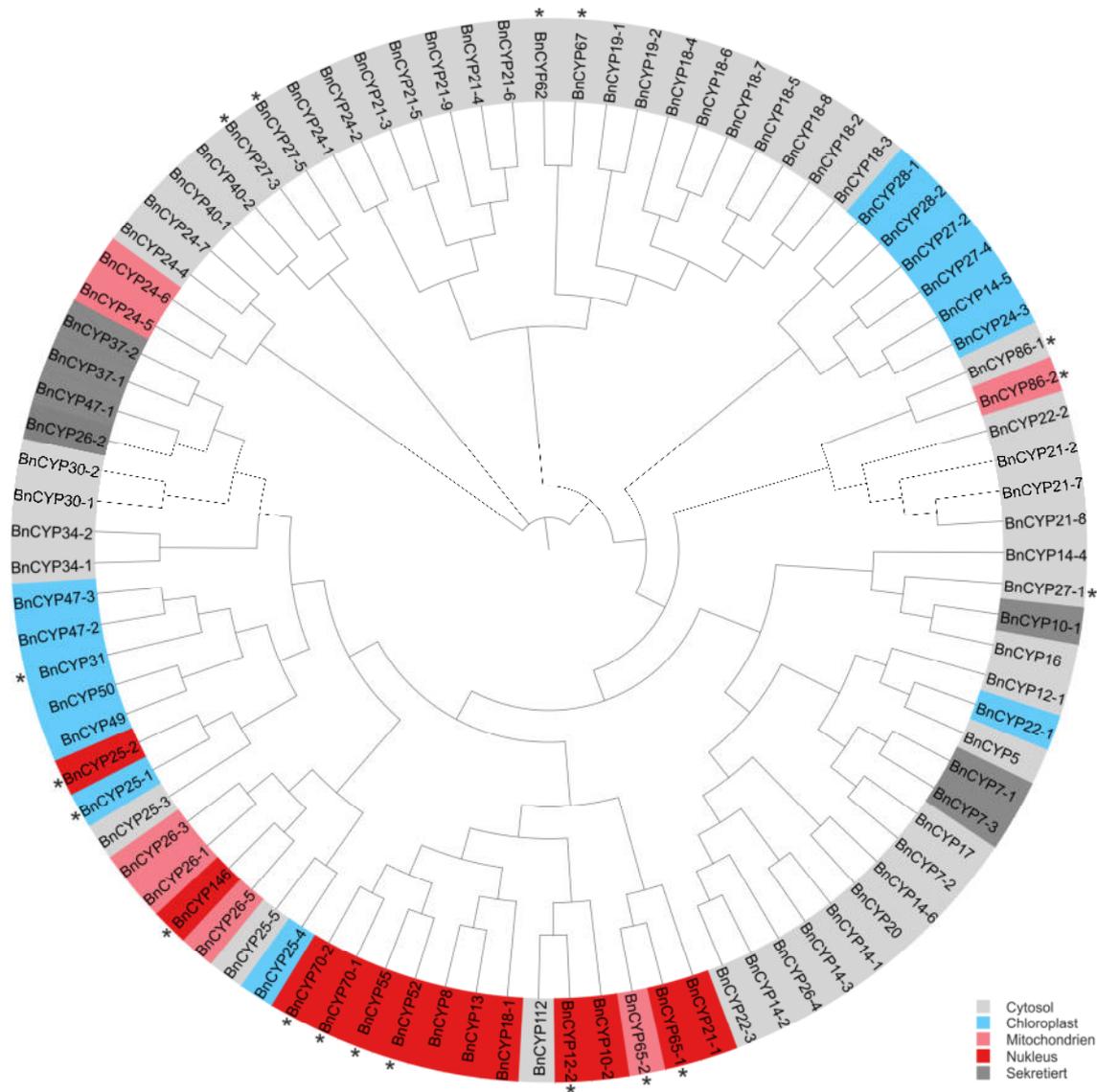
Während die Familie pflanzlicher CYPs aus der Modellpflanze *A. thaliana* sowie den Nutzpflanzen *Glycine max* (Soya), *Oryza sativa* (Reis) und *Zea mays* (Mais) bereits beschrieben wurde (Romano *et al.* 2004; He *et al.* 2004; Mainali *et al.* 2014; Ahn *et al.* 2010; Wang *et al.* 2017), war über die CYP-Familie aus *B. napus* (Raps) noch nichts bekannt. In dieser Arbeit werden zunächst bioinformatische Untersuchungen vorgestellt, welche zur Identifizierung und Charakterisierung der CYP-Familie aus *B. napus* führten. Zudem konnten einzelne Mitglieder in den pflanzlichen Kompartimenten Blatt und Phloem identifiziert werden, sodass basierend auf diesen Erkenntnissen Kandidaten für funktionelle und strukturelle Untersuchungen ausgewählt werden konnten. Anschließend wurden Versuche zur Entschlüsselung des Einflusses von CYPs auf die Virusinfektion durchgeführt. Die Ergebnisse werden im Folgenden präsentiert.

#### 3.1 Die *B. napus* Cyclophilinfamilie

Um putative Mitglieder der Proteinfamilie der *B. napus* CYPs zu identifizieren, wurden BLASTp Suchen mit den bereits bekannten AtCYPs durchgeführt. Hierbei konnten 94 Gene identifiziert werden. Dabei gibt es drei Fälle, in welchen je zwei Gene ein identisches Protein kodieren (siehe Abschnitt 3.1.3), sodass insgesamt 91 unterschiedliche CYP-Proteine entdeckt wurden. Damit besitzt *B. napus* die bisher größte CYP-Familie. Die BnCYPs sind mit Gennamen, GenBank Nummer, Molekulargewicht, Gesamtlänge, vorhergesagten Domänen, isoelektrischem Punkt und Exons im Anhang in Tabelle A2 gelistet.

Um die Verwandtschaft einzelner Mitglieder der BnCYP-Familie zu betrachten, wurde eine phylogenetische Analyse durchgeführt (Abbildung 8). Dabei ist zunächst auffällig, dass für die Untergruppen zumeist die gleiche Lokalisation vorhergesagt ist. Bei genauerer Betrachtung wird aber auch deutlich, dass es innerhalb der Untergruppen in vielen Fällen zwei sehr nah verwandte BnCYPs gibt. Diese Paare zeigen nur geringe Abweichungen in der Aminosäuresequenz und haben die größte Ähnlichkeit zu demselben AtCYP (aufgeführt in Tabelle A3 im Anhang). Zudem stammt jedes Gen von einem anderen Vorläufer-Genom (Abschnitt 3.1.3). Deshalb werden diese Paare im Folgenden als „Isoformen“ bezeichnet.

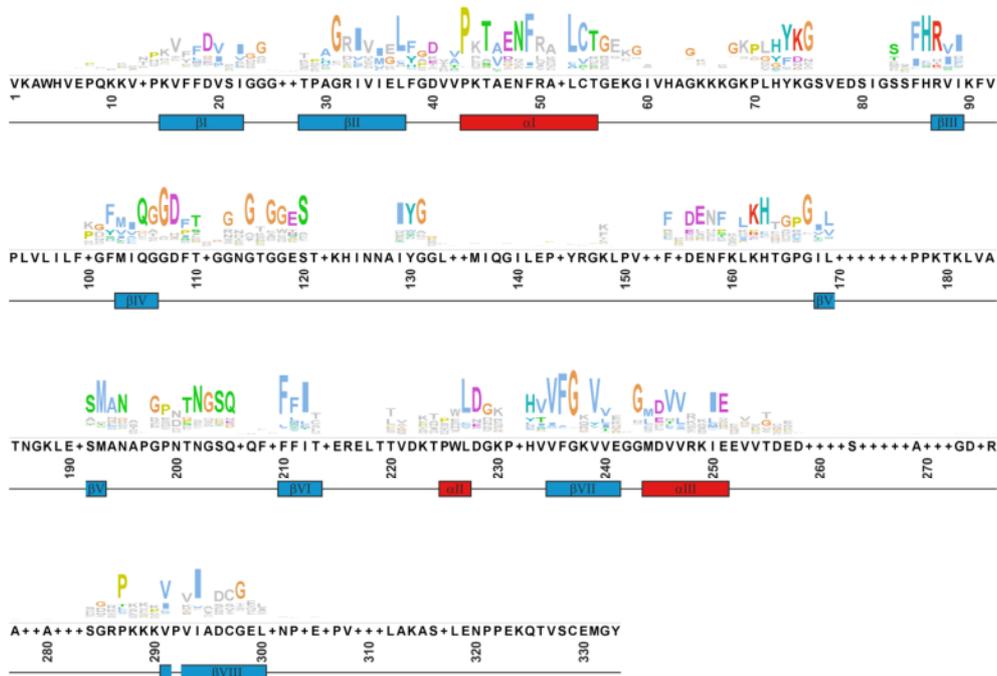
Über die Lokalisation der Proteinfamilie lässt sich sagen, dass in allen Kompartimenten der Zelle einzelne Vertreter anzutreffen sind. Ein Großteil der BnCYPs, nämlich 50 BnCYPs, sind vermutlich cytosolisch lokalisiert. Des Weiteren sind 14 BnCYPs putativ in den Chloroplasten, 7 in den Mitochondrien und 13 im Nukleus zu finden. Für 7 BnCYPs wurde vorhergesagt, dass diese eventuell sekretiert werden (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Phylogenetischer Baum der BnCYPs.** Wie durch den Farbcode illustriert, ist die Proteinfamilie über alle intrazellulären Organellen verteilt. Zusätzlich wurden für einige BnCYPs Kernlokalisierungssequenzen vorhergesagt (markiert mit \*). Diese BnCYPs könnten demnach zwischen Cytosol und Nukleus relokalisieren (verändert nach Hanhart *et al.* 2017).

### 3.1.1 Die Cyclophilin-ähnliche Domäne innerhalb der BnCYP-Familie

Alle 91 putativen CYPs tragen eine vollständige oder verkürzte Cyclophilin-ähnliche Domäne (CLD). Eine vollständige CLD ist ca. 18-19 kDa groß. Es ist bisher nicht bekannt, ob eine verkürzte CLD (<17 kDa) die typische PPIase Aktivität ausüben kann, selbst wenn alle dafür notwendigen Aminosäuren vorhanden sind. Bei Betrachtung der Konsensussequenz aller 91 CLDs wird deutlich, dass besonders für die Sekundärstruktur relevante Bereiche sowie einzelne Aminosäuren, welche für die PPIase Aktivität wichtig sind, hoch konserviert sind (Abbildung 9). Zu den am stärksten untersuchten Aminosäuren gehören W121, R55, F60 und H126 aus HsCYPA. W121 ist für die CsA-Bindung notwendig, während R55, F60 und H126 für die PPIase Aktivität fundamental sind (Zydowsky *et al.* 1992). Interessant ist, dass



**Abbildung 9: Konsensussequenz der *B. napus* CLD.** BnCYP-Proteinsequenzen wurden auf die Länge der vorhergesagten Sequenz der CLD gekürzt (siehe Tabelle A2 im Anhang) und ihre Konsensussequenz aus einem Alignment aller 91 CLDs ermittelt. Zusätzlich ist die Sekundärstruktur von HsCYPA präsentiert. Hieran wird deutlich, dass die konservierten Bereiche vor allem Sekundärstrukturelemente repräsentieren. Lücken in der Konsensussequenz stellen Insertion dar, welche nur wenige Mitglieder dieser großen Proteinfamilie besitzen (verändert nach Hanhart *et al.* 2017).

das bisher als hochkonserviert betrachtete W121 in nur 34 der 91 BnCYPs präsent ist (entspricht W225 in Abbildung 9). R55, F60 und H126 (R87, F102, H233 in Abbildung 9) hingegen, welche für die PPIase Aktivität stehen, sind stärker konserviert. Dies zeigt, dass Aminosäurereste, welche für die Bindung von Substraten oder Inhibitoren notwendig sind, nicht so stark konserviert sind, wie Reste, welche für die Enzymaktivität notwendig sind.

Ein Motiv, welches bereits beschrieben wurde und unter allen AtCYPs konserviert ist, konnte auch in 62 BnCYPs gefunden werden. Es handelt sich um das Motiv VXGXV, welches in  $\beta$ -Strang VII liegt (Romano *et al.* 2004). Auch in der Konsensussequenz der BnCYPs ist es hochkonserviert zu finden, die entsprechenden Aminosäuren sind hier V234, G236 und V238 in Abbildung 9. In der dreidimensionalen Struktur liegt es vom aktiven Zentrum aus betrachtet auf der Rückseite des Proteins im zentralen  $\beta$ -Zylinder. Eine besondere Rolle in der Proteinfunktion wird diesem Motiv deshalb nicht zugesprochen. Stattdessen dient die Beibehaltung dieses Motivs wie auch die anderer struktureller Elemente vermutlich der Aufrechterhaltung der Struktur während der Evolution.

Einige Mitglieder der Proteinfamilie besitzen ungewöhnliche Insertionen oder Deletionen. In Romano *et al.* (2004) wurde für AtCYPs im Vergleich mit HsCYPA eine Insertion zwischen  $\alpha$ -Helix I und  $\beta$ -Strang III (die sogenannte  $\alpha$ -I/ $\beta$ -III *junction* oder der *divergent loop*) beschrieben. Hier sind in mehreren AtCYPs 7 bis 11 Aminosäuren inseriert. Betrachtet man die BnCYPs, wird an dieser Position eine Insertion von 7 bis 15 Aminosäuren gefunden (Abbildung 9 Position 58 bis 72). Am häufigsten ist hier

aber eine Insertion von 7 Aminosäuren, welche zum Beispiel von den meisten 18-19 kDa BnCYPs getragen wird. Diese Insertion wird auch als der *divergent loop* beschrieben (Dornan *et al.* 1999), für welchen in Kombination mit der Bildung einer Disulfidbrücke eine Regulation der PPIase Aktivität postuliert wurde (Campos *et al.* 2013).

Des Weiteren konnte für 16 BnCYPs eine Insertion von 3 Aminosäuren zwischen  $\beta$ -Strang I und  $\beta$ -Strang II (Abbildung 9 Position 25-27) identifiziert werden, während 30 BnCYPs an dieser Stelle eine Deletion besitzen. Auch zeigen einige BnCYPs eine Insertion oder Deletion zwischen  $\beta$ -Strang IV und  $\beta$ -Strang V (Abbildung 9 Position 133-152). Diese Insertion kann aus 1 bis 19 Aminosäuren bestehen. Eine weitere Insertion konnte für BnCYPs mittleren und hohen Molekulargewichts identifiziert werden. Diese liegt zwischen  $\beta$ -Strang VI und  $\alpha$ -Helix II (Abbildung 9 Position 216-221).

Für eine genaue Betrachtung der Insertionen einzelner BnCYPs ist ein multipler Sequenzvergleich der CLDs aller 91 BnCYPs im Anhang zu finden (Abbildung A2). Strukturell betrachtet sitzen alle beschriebenen Insertionen und Deletionen in Schleifen (*loops*). Während die Struktur der Domäne bestehend aus  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Strängen also hochkonserviert ist, stellen die Schleifen Bereiche höherer Variabilität dar. Eine solche Variabilität innerhalb von Schleifen tritt häufig zwischen Mitgliedern von Proteinfamilien, welche insgesamt eine hochkonservierte Struktur besitzen, auf (Fiser *et al.* 2000).

### 3.1.2 Zusätzliche Domänen ermöglichen spezifische Funktionen

Während die meisten CYPs nur eine einzelne Domäne, die CLD, besitzen, gibt es 12 BnCYPs, die zusätzliche, funktionelle Domänen aufweisen. Somit kann auch die Proteinfamilie der BnCYPs in zwei Klassen, die *single-domain* und die *multi-domain* BnCYPs unterteilt werden. *Single-domain* BnCYPs können neben ihrer CLD noch ein Signalpeptid oder eine Transmembrandomäne tragen und damit zwischen 18 und 30 kDa groß sein. *Multi-domain* BnCYPs mit einem höheren Molekulargewicht besitzen hingegen Domänen, welche z. B. für Interaktionen mit anderen Proteinen, DNA oder RNA sorgen. Alle identifizierten Domänen sind im Anhang in Tabelle A2 in der dargestellten Domänenstruktur der BnCYPs zu finden.

Die Kombination von CLD und weiteren Domänen scheint unter *Brassicaceen* konserviert zu sein, da es in *A. thaliana* ähnliche *multi-domain* CYPs gibt wie in *B. napus*. Tabelle A3 im Anhang fasst die bisher untersuchten Funktionen der AtCYPs zusammen. Aufgrund der hohen Homologie könnten die BnCYPs ähnliche Funktionen erfüllen, was aber experimentell bestätigt werden müsste.

### 3.1.3 Zwei Chromosomensätze führen zu einer großen Anzahl an BnCYP-Genen

Die Entstehung von *B. napus* ist auf ein Hybridisierungsereignis von *B. oleracea* und *B. rapa* zurückzuführen. In diesem Zuge kam es zu einer Allopolyploidisierung, sodass *B. napus* die Chromosomensätze beider Ursprungsarten doppelt trägt. Von den insgesamt 19 unterschiedlichen Chromosomen des Hybrids gehören 9 Chromosomen zum C-Subgenom, welches ursprünglich aus *B. oleracea* stammt, und 10 Chromosomen zum A-Subgenom, vererbt von *B. rapa* (Chalhoub *et al.* 2014). Eine solche Polyploidie ist

für Pflanzen häufig vorteilhaft. Sie wachsen schneller, zeigen eine erhöhte Vitalität oder sind resistenter gegen Umwelteinflüsse. Für *B. napus* bedeutet die Allopolyploidisierung zudem, dass es von vielen Genen zwei homologe Varianten gibt. Fällt also eine Genkopie durch eine Mutation aus, ist eine weitere funktionell identische Kopie vorhanden, welche die zuge dachte Aufgabe übernehmen könnte. Diese Annahme könnte auch für die CYP-Familie gelten. Betrachtet man die Verteilung der Gene auf den beiden Chromosomensätzen, fällt zuerst auf, dass auf allen 19 Chromosomen *BnCYP*-Gene liegen, wobei je Chromosom unterschiedlich viele *CYP*-Gene zu finden sind (Abbildung 10).

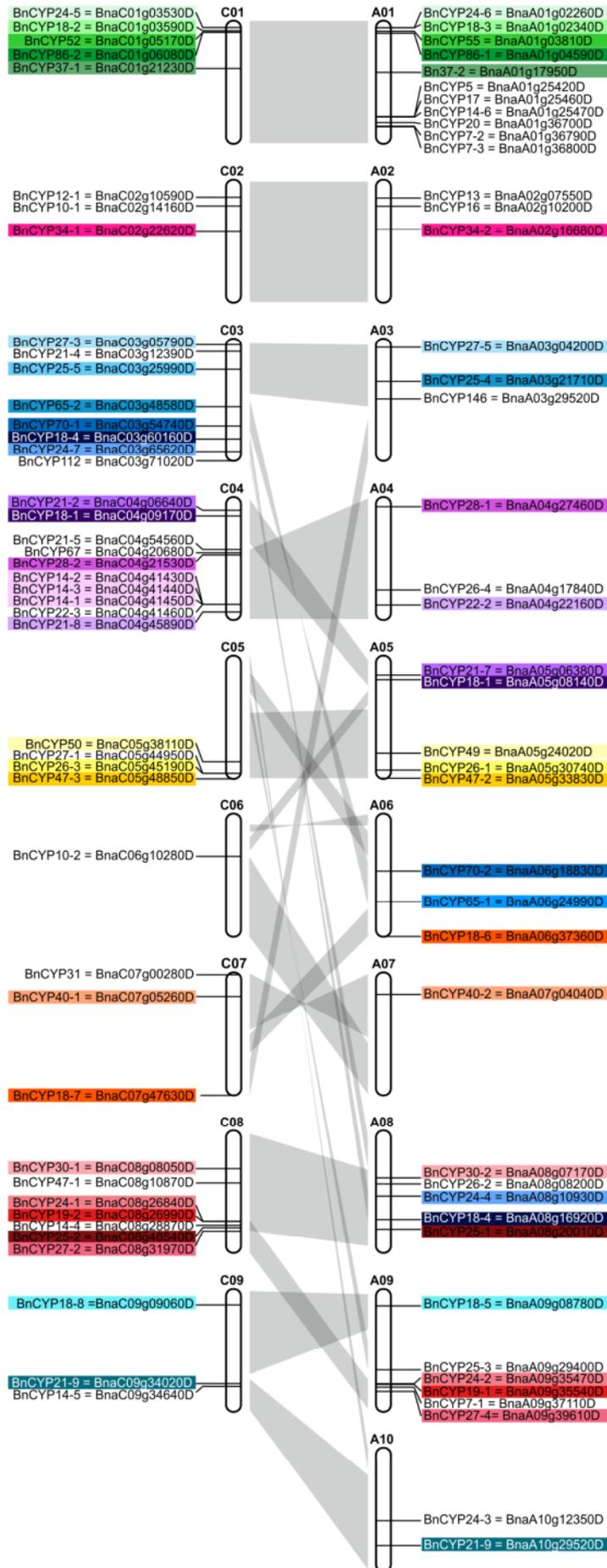
Wie in Abbildung 10 auch zu sehen ist, gibt es in vielen Fällen zwei zueinander homologe Gene auf dem A- und C-Subgenom, welche auch meist in homologen Segmenten der A- und C-Chromosomen liegen. Anhand der homologen Segmente und der daraus resultierenden Verteilung homologer Gene wird deutlich, dass die Chromosomen der Eltern nah verwandt zueinander, aber nicht identisch aufgebaut sind. Wie bereits zuvor angesprochen, gibt es drei *BnCYP*-Proteine, welche von jeweils zwei unterschiedlichen Genen kodiert werden. Dies sind *BnCYP18-1* (*BnaA05g08140D* und *BnaC04g09170D*), *BnCYP18-4* (*BnaA08g16920D* und *BnaC03g60160D*) und *BnCYP21-9* (*BnaA10g29520D* und *BnaC09g34020D*). Ein Sequenzvergleich dieser Gene zeigte kleine Unterschiede in der Nukleotidsequenz, durch welche sich die Aminosäuresequenz allerdings nicht ändert, da in diesen Fällen verschiedene Codons für die gleiche Aminosäure kodieren. Für jedes dieser Proteine existiert demnach in jedem Subgenom eine Genkopie (siehe Abbildung 10, weiß markiert).

Neben den dargestellten Genen wurden im Rahmen der bioinformatischen Identifizierung von *BnCYPs* auch Gene mit einer ungewissen chromosomalen Lokalisation gefunden. Die *CYP*-Gene *BnaAnng41240D* (*BnCYP12-2*), *BnaAnng15590D* (*BnCYP21-3*), *BnaAnng17350D* (*BnCYP21-6*) und *BnaAnng12550D* (*BnCYP62*) konnten dem A-Subgenom zugeordnet werden. Genauso konnten *BnaCnng42430D* (*BnCYP8*), *BnaCnng08980D* (*BnCYP21-1*), *BnaCnng32070D* (*BnCYP22-1*) und *BnaCnng32180D* (*BnCYP26-5*) dem C-Subgenom zugeteilt werden. Die Information über das zugehörige Chromosom fehlt allerdings bei diesen acht Genen.

### 3.1.4 Ein Großteil der *BnCYPs* wird unter Standardbedingungen exprimiert

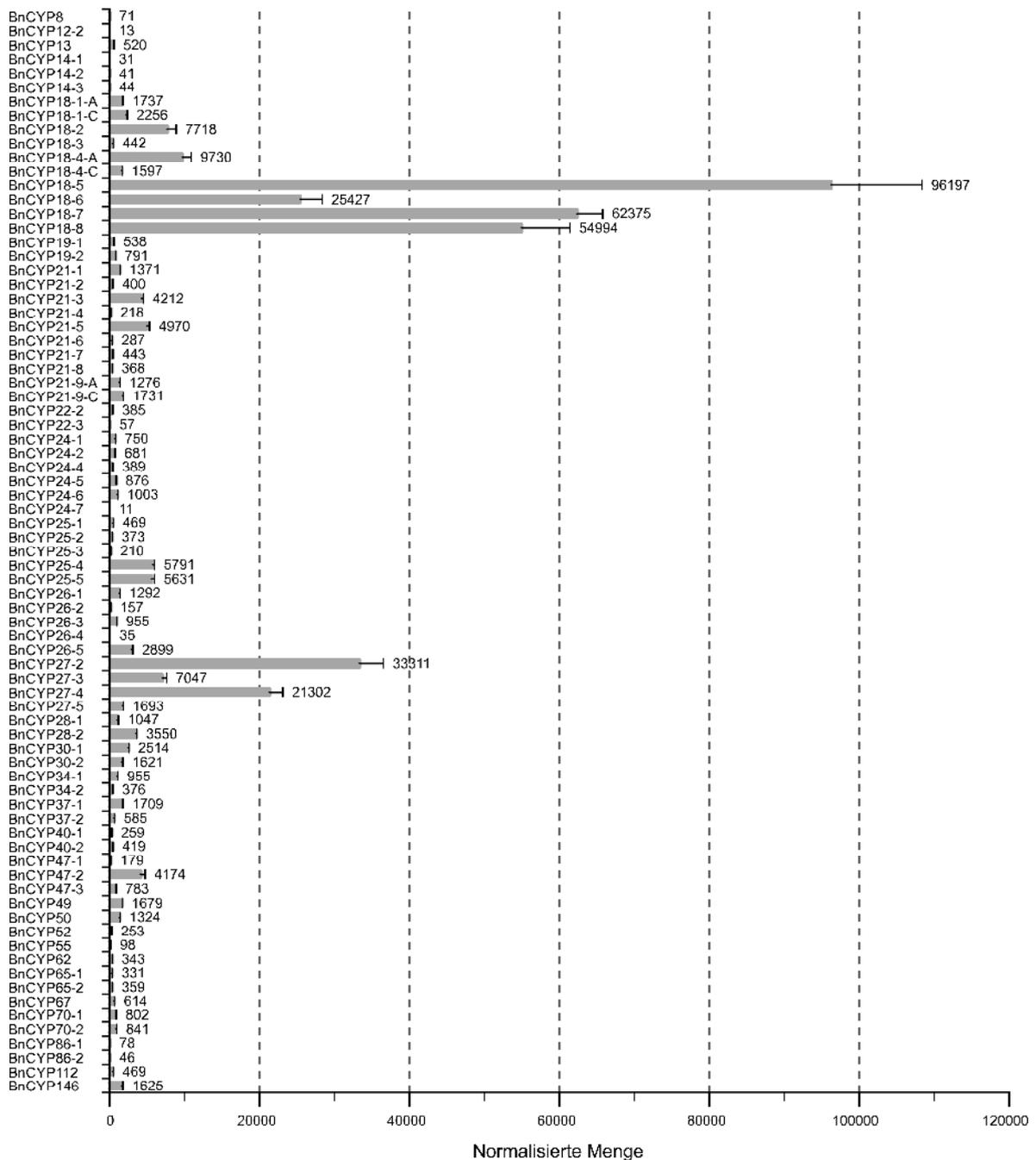
Während die bioinformatische Identifizierung der *BnCYPs* auf Grundlage der von Chalhoub *et al.* 2014 veröffentlichten Genomsequenz des *B. napus* Kultivars Darmor-bzh erfolgte, wurden alle nachfolgend vorgestellten Analysen mit dem Kultivar Drakkar durchgeführt, da für dieses die Probennahme von Phloemexsudat etabliert ist (Giavalisco *et al.* 2006).

Um zunächst zu zeigen, dass die bioinformatisch gefundenen *BnCYP*-Gene in der Pflanze exprimiert werden, wurden Transkriptomdaten hinsichtlich der Expression von *BnCYPs* ausgewertet. Das Expressionsprofil der *BnCYP*-Familie zeigte 77 Gene, deren mRNA unter Standardbedingungen in Blättern identifiziert werden konnte (Abbildung 11). Dies zeigt, dass ein großer Teil der putativen *BnCYPs* tatsächlich exprimiert wird. *BnCYP*-Gene, deren Expression nicht nachgewiesen werden konnte, könnten



**Abbildung 10: Verteilung der *BnCYP*-Gene auf den Chromosomen des A- und C-Subgenoms.** Die Chromosomen sind nicht entsprechend ihrer realen Größe, sondern standardisiert dargestellt. Homologe Segmente (grau) sind zur vereinfachten Übersicht grob dargestellt, weshalb es teilweise Überschneidungen gibt. Befinden sich Segmente in umgekehrter Orientierung zueinander, ist dies mit überkreuzten Banden dargestellt. Zusätzlich soll die Farbkodierung den Überblick über homologe Gene erleichtern. Hierfür wurde den Chromosomen des C-Subgenoms jeweils eine Farbe zugeordnet, sodass homologe Gene auf dem A-Subgenom leichter identifiziert werden können. Zusätzlich sind Gene, welche für identische Proteine kodieren, weiß gekennzeichnet (verändert nach Hanhart *et al.* 2017).

dennoch in anderen Organen oder unter anderen experimentellen Bedingungen, wie z. B. unter unterschiedlichen Stressoren, transkribiert werden. Unter den nicht-exprimierten *BnCYPs* sind besonders viele Vertreter mit einer partiellen CLD zu finden. Interessant ist auch, dass im Fall von *BnCYP18-1*, *BnCYP18-4* und *BnCYP21-9* die Transkription beider Genkopien des A- und C-Subgenoms bestätigt werden konnte.



**Abbildung 11: Expressionsprofil der *BnCYP*-Familie.** Analysiert wurde die Gesamt-RNA aus Blatt und die Pflanzen wurden dafür unter Standardbedingungen angezogen. Kodieren zwei Gene ein identisches Protein, ist deren Transkript mit -A oder -C entsprechend der chromosomalen Lokalisation des Gens gekennzeichnet. Die Rohdaten sind in Supplementary Table S2 in Hanhart *et al.* (2017) zu finden.

In der Abundanz der Transkripte lagen starke Unterschiede vor. Zu den am höchsten exprimierten Genen im Blatt gehörten die 18 und die 27 kDa BnCYPs, wobei *BnCYP18-5* mit Abstand am Stärksten exprimiert wurde. Isoformen zeigten teilweise unterschiedliche Abundanzen wie z. B. die Paare *BnCYP18-2/BnCYP18-3* oder *BnCYP27-3/BnCYP27-5*.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Allopolyploidisierung von *B. napus* zu zwei Isoformen vieler BnCYPs geführt hat. Diese zeigen eine hohe Sequenzähnlichkeit zueinander und es liegt jeweils ein Genhomolog auf dem A- und C-Subgenom. Häufig sind beide Isoformen exprimiert, teilweise in unterschiedlicher Stärke, und diese sind durch ihre Ähnlichkeit im phylogenetischen Baum zu Paaren gruppiert. Funktionell könnten sie sich entweder gegenseitig ersetzen oder aufgrund ihrer geringen Unterschiede für bestimmte Aufgaben spezialisiert sein.

### 3.1.5 Die Untergruppe der 18-19 kDa BnCYPs

Für eine genauere Untersuchung im Zusammenhang mit der biotischen Stressantwort ist vor allem eine der größten Untergruppen der BnCYP-Familie interessant, da für ihre AtCYP-Homologe eine solche Rolle bereits beschrieben wurde. Dies sind die 18-19 kDa BnCYPs. Im Vergleich aller zehn Mitglieder dieser Gruppe stellt BnCYP18-1 eine Ausnahme dar, denn BnCYP18-1 zeigt eine Sequenzidentität von nur 43-46 % zu den anderen neun 18-19 kDa BnCYPs und besitzt mehrere Introns (siehe Tabelle A2 im Anhang). Zudem wird BnCYP18-1 im Zellkern vermutet, während für die anderen 18-19 kDa BnCYPs eine cytosolische Lokalisation vorhergesagt wurde (Abbildung 8). Insgesamt ist BnCYP18-1 damit zu den anderen 18-19 kDa BnCYPs relativ unähnlich und wurde deshalb von der Betrachtung der 18-19 kDa BnCYPs ausgeschlossen. Zur Vereinfachung wird im Folgenden auch ohne BnCYP18-1 von der Gruppe der 18-19 kDa BnCYPs gesprochen.

Wie bereits im phylogenetischen Baum zu sehen war (Abbildung 8), gibt es innerhalb der Untergruppen häufig zwei sehr nah verwandte Isoformen. Dementsprechend lässt sich auch die Gruppe der 18-19 kDa BnCYPs weiter unterteilen. Wie ein Sequenzvergleich verdeutlicht (Abbildung 12), sind die dargestellten BnCYPs sehr ähnlich zueinander, gliedern sich aber in vier Gruppen von Isoformen. Dabei gibt es zwei Isoformenpaare, welche sich in nur einem Aminosäureaustausch unterscheiden. Dies sind zum einen BnCYP18-2 und BnCYP18-3. Der einzige Unterschied zwischen diesen beiden Isoformen besteht in einem Aminosäureaustausch von Alanin (BnCYP18-2) zu Valin (BnCYP18-3) an Position 96. Zum anderen sind dies BnCYP18-5 und BnCYP18-8. Hier befindet sich entweder Lysin (BnCYP18-5) oder Arginin (BnCYP18-8) an Position 44. BnCYP18-4, BnCYP18-6 und BnCYP18-7 zeigen im Vergleich zu den bereits beschriebenen Paaren größere Unterschiede, sind aber dennoch stark identisch zueinander, ebenso wie BnCYP19-1 und BnCYP19-2. Im Vergleich zu den 18 kDa BnCYPs besitzen die 19 kDa BnCYPs einen verlängerten C-Terminus.

Wie Sequenzvergleiche mit AtCYPs zeigen konnten, besitzen zusammengehörende Isoformen auch die größte Homologie zu demselben AtCYP (Abbildung 12). Dies führt zum einen zu der Frage, ob diese sehr ähnlichen Isoformen wie z. B. BnCYP18-5 und BnCYP18-8 redundant wirken. Zum anderen zeigt dies,



noch keine vollständige Datenbank putativer Proteine gab, wurde für die Datenbanksuche zur Identifizierung der Proteine aus dem 2D-Gel größtenteils *A. thaliana* als Referenz verwendet. Dies gelingt aufgrund der nahen Verwandtschaft von *B. napus* und *A. thaliana* und so konnten CYPs in 9 unterschiedlichen *Spots* der 2D-Gele identifiziert werden. Um welche BnCYPs es sich dabei handelt, konnte aufgrund der fehlenden *B. napus* Datenbank jedoch nicht eindeutig bestimmt werden. Ein Abgleich der in Giavalisco *et al.* (2006) identifizierten Peptidsequenzen mit den 91 putativen BnCYPs führte zu keiner Identifizierung einzelner Isoformen, die aufgeführten Peptidsequenzen stimmen mit keiner Sequenz der 91 BnCYPs überein (Sequenzen aufgeführt in Giavalisco *et al.* (2006), Supplementary Table S1). Um herauszufinden, welche der 91 BnCYPs im Phloem vorkommen, wurde deshalb zunächst eine 2D-Gelelektrophorese mit anschließender massenspektrometrischen Identifizierung ausgewählter *Spots* ähnlich zu Giavalisco *et al.* (2006) durchgeführt und anschließend durch Proteomanalysen mittels Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS) komplettiert. Um zu zeigen, dass diese BnCYPs eindeutig im Phloem lokalisiert sind, wurde zudem die Reinheit der Phloemproben auf Proteinebene nachgewiesen.

### 3.2.1 Überprüfung der Reinheit von Phloem- und Xylemproben mittels Western Blot

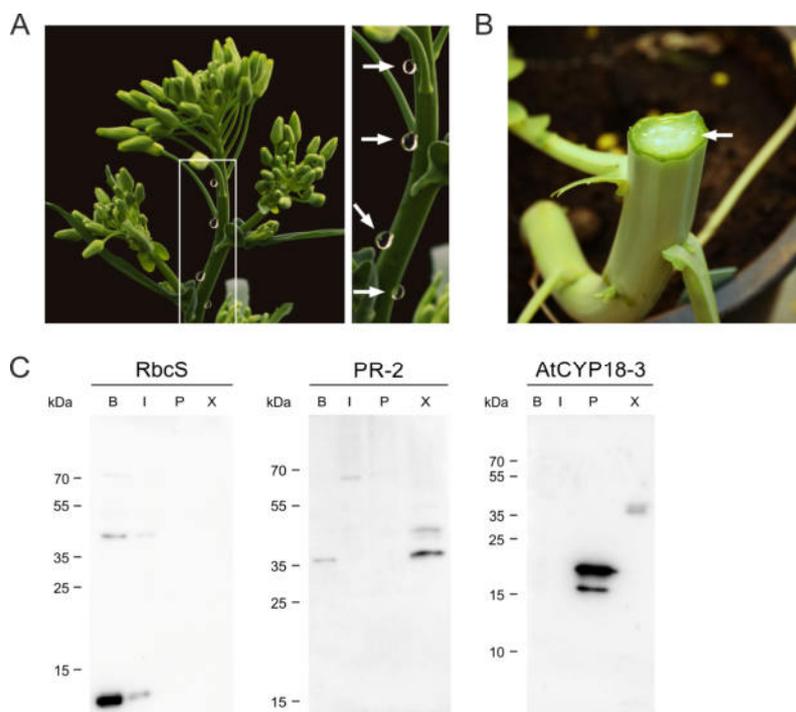
Eine gängige Methode, um die Reinheit von Phloemexsudat zu testen, ist der Nachweis von gewebespezifischer mRNA über eine RT-PCR. Mit dieser wird nicht nur eine Kontamination durch zerstörte Zellen, sondern auch durch Blütenpollen überprüft. Diese Art des Nachweises ist gut etabliert und hat sich bewährt (Giavalisco *et al.* 2006). Des Weiteren bietet auch der Saccharosegehalt einen guten Anhaltspunkt für reine Phloemproben (Giavalisco *et al.* 2006). Im Gegensatz zu diesen Methoden, bietet ein Western Blot die Möglichkeit, die Reinheit der Probe auf Proteinebene zu überprüfen. In Giavalisco *et al.* (2006) zeigte dieser, dass die kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (Rubisco) in Proteinextrakten aus Blatt- und Stängelmaterial, aber nicht in Phloemproben nachgewiesen werden konnte. Daraus lässt sich rückschließen, dass die Phloemprobe frei von zellulären Kontaminationen war. Eine Kontamination mit Xylemexsudat wurde hier per Western Blot aber nicht überprüft.

Da die nachfolgenden Analysen dieser Arbeit auf Proteinextrakten aufbauen, sollte deshalb ein Nachweissystem etabliert werden, mit welchem Kontaminationen von umgebenden Geweben wie Zellen und Xylem identifiziert werden können. Denn sowohl Phloem- als auch Xylemexsudat wird durch eine Verwundung (Punktierung oder Schnitt) gewonnen (Abbildung 13A, B), sodass dessen Reinheit nachgewiesen werden muss. Durch Anwendung des Western Blots können Proteinproben, welche für anschließende Analysen verwendet werden sollen, direkt getestet werden und es ist keine andersartige Aufarbeitung wie z. B. eine RNA-Extraktion notwendig.

Das Ergebnis ist in Abbildung 13C dargestellt. Neben Proteinextrakten aus Phloem- und Xylemexsudat, wurden auch Proteinextrakte aus Blatt- und Infloreszenzstängelmaterial aufgetragen. Für den Nachweis wurde jeweils ein Antikörper spezifisch für Blatt/Stängel, Phloem und Xylem ausgewählt, um

Kontaminationen zwischen diesen Geweben aufzuzeigen. Hierbei konnten aufgrund der nahen Verwandtschaft zwischen *B. napus* und *A. thaliana* Antikörper verwendet werden, welche ursprünglich für die Detektion von *A. thaliana* Proteinen entwickelt wurden. Wie auch in Giavalisco *et al.* (2006) wurde zunächst ein Antikörper gegen die kleine Untereinheit der Rubisco (RbcS,  $MW_{\text{theor}} = 15 \text{ kDa}$ ) verwendet. Diese konnte bisher weder im Phloem- noch im Xylemproteom nachgewiesen werden und bietet sich damit als Kontrolle an (Giavalisco *et al.* 2006; Kehr *et al.* 2005). Wie erwartet, konnte die RbcS nur in Proben aus Blatt und Stängel detektiert werden, in diesen zeigten sich zudem auch unspezifische Banden höheren Molekulargewichts. Im Gegensatz dazu konnte in den Phloem- und Xylemproben keine Bande detektiert werden. Damit konnte gezeigt werden, dass weder die Phloem-, noch die Xylemproben eine Kontamination durch umliegende, zerstörte Zellen aufweisen.

Ein Protein, welches im Xylemproteom identifiziert wurde (Kehr *et al.* 2005), nicht aber im Phloemproteom (Giavalisco *et al.* 2006) und damit zur Kontrolle von Xylemkontaminationen in Phloemproben herangezogen werden kann, ist PR-2 (auch  $\beta$ -1,3-Glucanase 2 genannt). Mit einem Antikörper gegen PR-2 konnte ein Signal im Bereich von knapp über 35 kDa in Blatt und Xylem nachgewiesen werden und entspricht damit dem erwarteten MW von 37 kDa. In der Stängelprobe findet sich eine Bande unerwartet hohen Molekulargewichts, die Phloemprobe zeigt hingegen keine Bande. Zum Nachweis von PR-2 wurde ein polyklonaler Antikörper ausgewählt, welcher für PR-2 bzw. die  $\beta$ -1,3-Glucanase 2 aus *A. thaliana*, kodiert durch *At3g57260*, produziert wurde. Im Xylemproteom von *B. napus* konnte hingegen die  $\beta$ -1,3-Glucanase 3, welche in *A. thaliana* von *At3g57240* kodiert wird, identifiziert werden (Kehr *et al.* 2005). Ein Sequenzvergleich dieser beiden Proteine zeigte eine Sequenzidentität von 65 %, sodass vermutet werden konnte, dass der polyklonale Antikörper auch an die



**Abbildung 13: Nachweis reinen Phloem- und Xylemexsudats mittels Western Blot.** (A) Nach Punktierung des Infloreszenzstängels tritt Phloemexsudat aus. (B) Xylemexsudat wird durch einen Schnitt 5-10 cm über der Erde gewonnen. (C) Für den Nachweis reinen Phloem- und Xylemexsudats werden drei Antikörper benötigt: gegen RbcS (15 kDa), PR-2 (37 kDa) und AtCYP18-3 (18 kDa). Für die Western Blots mit RbcS und PR-2 wurde eine 12 % SDS-PAGE, für ROC1 eine 15 % SDS-PAGE durchgeführt. Die Spuren wurden mit jeweils 20  $\mu\text{g}$  Blatt- und Infloreszenzstängelsextrakt sowie 10  $\mu\text{l}$  Phloem- und Xylemexsudat beladen. B = Blatt, I = Infloreszenzstängel, P = Phloem, X = Xylem.

$\beta$ -1,3-Glucanase 3 aus dem Xylem bindet. Dies konnte mit dem Western Blot auch eindeutig gezeigt werden.

Um das Nachweissystem zu komplettieren, sollte auch eine Möglichkeit zur Überprüfung reiner Xylemproben etabliert werden. Wie bereits gezeigt werden konnte, befinden sich Cyclophiline in großen Mengen im Phloem, aber nicht im Xylem, sodass sie geeignete Kandidaten darstellen, um Phloemkontaminationen in Xylemproben zu zeigen. Mit einem Antikörper gegen AtCYP18-3 konnten in der Phloemprobe zwei starke Signale auf erwarteter Höhe detektiert werden. Der verwendete Antikörper ist polyklonal, sodass er vermutlich nicht nur AtCYP18-3 und dessen *B. napus*-Homolog, sondern auch andere Mitglieder der 18-19 kDa CYPs detektiert, was das Signal verstärkt. Dass in Blatt- und Stängelproben kein Signal zu sehen ist, liegt vermutlich an der deutlich geringeren Abundanz der CYPs in diesen Geweben, wie auch nachfolgend in Abschnitt 3.2.2 für Blattproben zu sehen ist. Interessanterweise ist in der Xylemprobe eine unspezifische Bande höheren Molekulargewichts zu beobachten. Da bisher keine CYPs im Xylem detektiert wurden, ist diese Entdeckung ein spannender Ansatz für Analysen zur Rolle der CYPs im Xylem und könnte in nachfolgenden Arbeiten behandelt werden.

Mit dem hier etablierten Western Blot gegen RbcS, PR-2 und AtCYP18-3 stand demnach ein Nachweissystem zur Verfügung, welches nicht nur die Reinheit von Phloemproben, sondern gleichzeitig auch von Xylemproben auf Proteinebene zeigen kann.

### 3.2.2 BnCYPs befinden sich im Langstreckentransportsystem Phloem

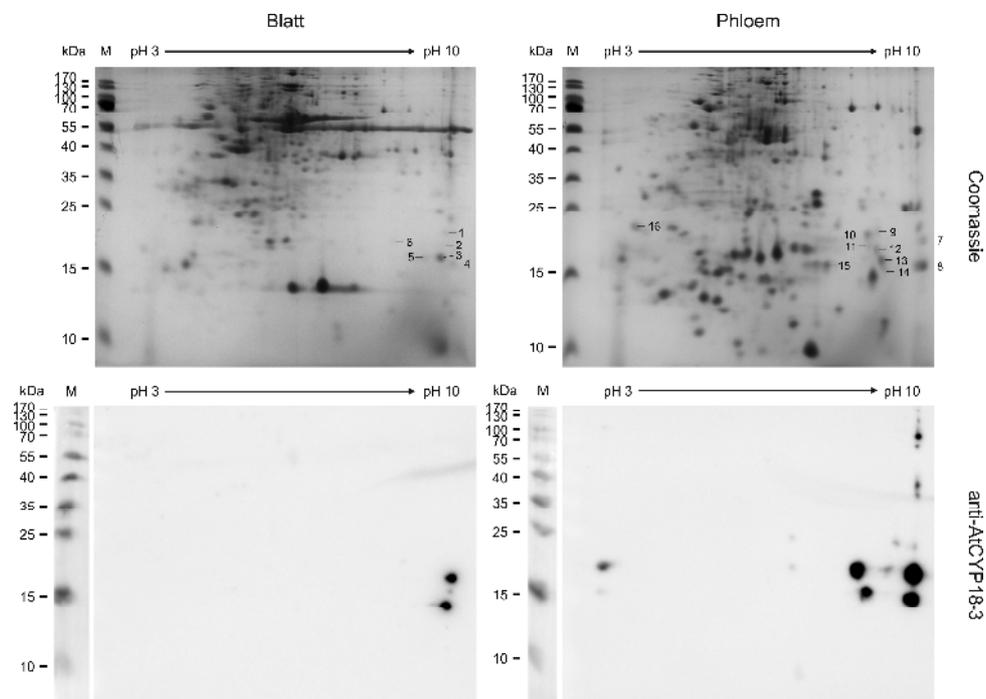
Zur Identifizierung von BnCYPs in *B. napus* Phloemproben wurde zunächst eine 2D-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierbei werden die Proben zuerst mittels isoelektrischer Fokussierung in einem immobilisierten pH-Gradienten nach ihrem pI und anschließend mit einer SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Danach können einzelne Bereiche (*Spots*) aus dem Gel ausgestochen und die enthaltenen Proteine per MALDI-TOF-MS mit der *Peptide Mass Fingerprint* Methode identifiziert werden. Zusätzlich zu den Phloemproben wurden Blattproben untersucht, um auch hier exprimierte BnCYPs auf Proteinebene nachweisen und mit den Ergebnissen der Genexpression (siehe Abschnitt 3.1.4) vergleichen zu können. Die Wachstumsbedingungen der Pflanzen, von welchen Proben genommen wurden, entsprachen den Standardbedingungen.

Wie die theoretische Bestimmung des pI zeigte, besitzen insbesondere die *single-domain* BnCYPs einen eher basischen pI (siehe Tabelle A2 im Anhang). Dies deckt sich mit der Beobachtung aus Giavalisco *et al.* (2006), wo CYPs in einem 2D-Gel im neutralen bis basischen Bereich von etwa 15 bis 20 kDa identifiziert werden konnten. Da diese Kriterien denen der 18-19 kDa BnCYPs entsprechen, wurden Western Blots von 2D-Gelen der Blatt- und Phloemproben mithilfe eines polyklonalen Antikörpers gegen AtCYP18-3 durchgeführt. Diese sollten Hinweisen auf die *single-domain* BnCYPs liefern und eine Auswahl der massenspektrometrisch zu analysierenden *Spots* aus den Coomassie-gefärbten SDS-Gelen ermöglichen. Es wurden aber nicht nur *Spots* ausgewählt, welche zu den Signalen der Western Blots passten, sondern auch umliegende *Spots*, um möglichst viele 18-19 kDa große BnCYPs zu identifizieren.

Das Ergebnis ist in Abbildung 14 dargestellt. Die Coomassie-Färbung zeigt unverkennbar, dass sich Blatt- und Phloemproteom von ihrer Zusammensetzung her stark unterscheiden. In dem Bereich, in welchem CYPs erwartet wurden, sind in 2D-Gele der Phloemproben mehr *Spots* sichtbar, als im selben Bereich der 2D-Gele von Blättern. Der polyklonale Antikörper scheint sich nicht nur gegen ein einzelnes BnCYP zu richten, sondern mehrere zu erkennen. Die Phloemproben zeigten hier gegenüber den Blattproben deutlich mehr Signale im Bereich der 18-19 kDa CYPs. Zusätzlich waren in den Phloemproben mehrere Signale im basischen Bereich bei höheren Molekulargewichten sowie im sehr sauren Bereich zwischen 15 und 20 kDa zu sehen.

Die massenspektrometrische Analyse ermöglichte den Nachweis von BnCYPs in 6 *Spots* der Blattproben. Im Phloem hingegen konnten in 10 unterschiedlichen *Spots* BnCYPs nachgewiesen werden. Allerdings konnten keine CYPs in den *Spots* höheren Molekulargewichts (>35 kDa) identifiziert werden. Vermutlich handelt es sich hier demnach um eine unspezifische Bindung des Antikörpers. Dass BnCYPs im basischen Bereich bei etwa 15 bis 25 kDa in mehr *Spots* identifiziert werden konnten, als durch den Western Blot zu vermuten war, könnte daran liegen, dass der Antikörper gegen AtCYP18-3 aufgrund der großen Anzahl an Modifikationen, wie z. B. Phosphorylierungen (siehe weiter unten), nicht mehr binden kann.

In Tabelle 16 sind die detektierten BnCYPs aufgeführt. Als variable Modifikationen wurden für die Identifizierung der CYPs eine Oxidation an Methionin sowie eine Carbamidomethylierung an Cystein, welche durch das im Zuge der 2D-Gelelektrophorese eingesetzte Iodacetamid entsteht, ausgewählt. Hierdurch konnten den einzelnen BnCYPs mehr Signale eindeutig zugeordnet werden, als ohne die



**Abbildung 14: 2D-Gele von Blatt- und Phloemproteinextrakten.** Während durch die Coomassie-Färbung das gesamte Proteom angefärbt wird, detektiert der verwendete Antikörper *single-domain* BnCYPs. Einige Proteinspots sind sehr schwach, sodass sie in dieser Darstellung kaum zu sehen sind. Während der Durchführung des Versuchs ermöglichte ein Lichttisch bessere Lichtverhältnisse, sodass diese *Spots* deutlich erkennbar waren.

Auswahl dieser Modifikationen. Die meisten Vertreter aus der Gruppe der 18-19 kDa BnCYPs konnten identifiziert werden. Ausnahmen stellen hier nur drei BnCYPs dar. So konnten weder BnCYP18-1, noch die beiden Isoformen BnCYP18-2 und BnCYP18-3 gefunden werden. Eine Erklärung könnte sein, dass sich diese in einem anderen Bereich des SDS-Gels befinden und mit dem verwendeten Antikörper nicht entdeckt werden konnten. Möglicherweise könnten sie aber auch unter anderen Wachstumsbedingungen oder unter Stress exprimiert werden und dann auch erst ins Phloem gelangen.

Wie bereits in Abschnitt 3.1.3 diskutiert wurde, führt der zweifache Chromosomensatz dazu, dass es von den meisten CYP-Genen zwei Varianten gibt, und sich die durch diese Gene kodierten Isoformen teilweise in nur wenigen Aminosäuren unterscheiden. Dies stellt eine Schwierigkeit für die massenspektrometrische Analyse dar, da sich solche zwei Isoformen nur durch wenige Peptide unterscheiden lassen. Im Fall der 18-19 kDa BnCYPs ist dies teilweise auch nur durch ein einziges Peptid möglich, wie am Beispiel von BnCYP18-5 und BnCYP18-8 erläutert werden soll. Da der einzige Unterschied zwischen diesen beiden Isoformen in dem Austausch einer einzigen Aminosäure besteht, führt dies dazu, dass sie sich nach dem Trypsinverdau auch nur in einem Peptid unterscheiden. In solchen Fällen konnten in den Analysen (siehe Tabelle 16) nicht immer beide Isoformen bestätigt, sondern teilweise nur eine der beiden Isoformen identifiziert werden. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die andere, nicht eindeutig nachgewiesene Isoform dennoch in der Probe enthalten ist und das entscheidende Peptid lediglich nicht gefunden werden konnte.

Auffällig ist, dass einige Isoformenpaare (BnCYP18-5/18-8 und BnCYP19-1/19-2) bzw. -trios (BnCYP18-4/18-6/18-7) in mehreren *Spots* detektiert wurden. BnCYP18-5 und BnCYP18-8 zum Beispiel konnten in 6 der 10 *Spots* der Phloem-2D-Gele identifiziert werden. Dabei unterscheiden sich BnCYP18-5 und BnCYP18-8 der verschiedenen *Spots* vermutlich in ihren posttranslationalen Modifikationen. Denn diese können in einem 2D-Gel nicht nur einen Einfluss auf den pI, sondern auch auf das Molekulargewicht haben. Um einen ersten Hinweis auf mögliche posttranslationale Modifikationen von BnCYPs zu gewinnen, wurde zusätzlich zu den bei der Auswertung bereits angewendeten Modifikationen auch eine Phosphorylierung als variable Modifikation an Serin, Threonin oder Tyrosin ausgewählt. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass es einige *Spots* gibt, in welchen eindeutig keine phosphorylierten Peptide zu finden sind. Im Gegensatz hierzu erhöhte sich die Anzahl an identifizierten Peptiden und damit auch die Sequenzabdeckung aber in den meisten Fällen durch die zusätzlich identifizierten, phosphorylierten Peptide. Und damit konnten sogar bis zu 93 % eines Proteins identifiziert werden (BnCYP18-8 in *Spot* 13).

Vergleicht man die identifizierten BnCYPs aus den Blatt- und Phloem-2D-Gelen, so gibt es einige BnCYPs, welche in beiden Gelen an derselben Position auftauchen. So entspricht zum Beispiel *Spot* 3 aus dem Gel der Blattprobe *Spot* 8 aus dem Gel der Phloemprobe. In beiden *Spots* konnten BnCYP18-5 und BnCYP18-8 detektiert werden und dabei konnte in keiner der beiden Proben eine Phosphorylierung nachgewiesen werden. Des Weiteren scheint *Spot* 1 (Blatt) *Spot* 7 (Phloem) zu entsprechen, da in beiden Proben BnCYP18-4, BnCYP18-6 und BnCYP18-7 nachgewiesen werden konnten. Allerdings konnten in

**Tabelle 16: Massenspektrometrischer Nachweis von BnCYPs aus Blatt- und Phloemproben.** Für jeden *Spot* konnte das wahrscheinlichste Isoformenpaar bzw. -trio gefunden werden. Da diese sehr ähnlich zueinander sind und damit gleichzeitig in demselben *Spot* vorhanden sein können, wurde für jede Isoform die Anzahl an identifizierten Peptiden ( $n$ ) und die Sequenzabdeckung (Seq.) bestimmt. Zudem ist die Anzahl der Peptide ( $n_{\text{eindeutig}}$ ), welche für die jeweilige Isoform einzigartig sind und diese damit eindeutig identifizieren, aufgeführt. Anschließend wurden die Proben auch auf phosphorylierte Peptide ( $n_{\text{phos}}$ ) hin untersucht. Wurden keine phosphorylierten Peptide detektiert, sind die entsprechenden Felder leer.

	<i>Spot</i>	BnCYP	Modifikationen								
			Oxidation (M), Carbamidomethyl (C)			Oxidation (M), Carbamidomethyl (C), Phosphorylierung (S, T, Y)					
			$n$	$n_{\text{eindeutig}}$	Seq. (%)	$n$	$n_{\text{phos}}$	$n_{\text{eindeutig}}$	Seq. (%)		
Blatt	1	BnCYP18-4	5	0	25						
		BnCYP18-6	8	1	50						
		BnCYP18-7	8	1	50						
	2	BnCYP18-4	8	3	50						
		BnCYP18-6	6	0	30						
		BnCYP18-7	7	1	38						
	3	BnCYP18-5	20	1	90						
		BnCYP18-8	20	1	90						
	4	BnCYP19-1	10	1	36	14	4	4	51		
		BnCYP19-2	9	0	32	12	3	2	52		
		BnCYP18-5	6	0	28	15	9	0	58		
		BnCYP18-8	6	0	28	15	9	0	58		
	BnCYP24-1	7	0	45	16	9	1	55			
	BnCYP24-2	7	0	45	17	10	2	55			
6	BnCYP19-1	12	3	53	17	5	7	55			
	BnCYP19-2	10	1	42	15	4	5	64			
Phloem	7	BnCYP18-4	9	3	38	12	3	3	58		
		BnCYP18-6	14	1	84	16	2	3	84		
		BnCYP18-7	14	2	84	15	1	2	84		
	8	BnCYP18-5	15	0	82						
		BnCYP18-8	16	1	86						
	9	BnCYP18-4	4	0	21						
		BnCYP18-6	9	1	57						
		BnCYP18-7	8	0	49						
	10	BnCYP18-4	7	1	34	8	1	1	49		
		BnCYP18-6	12	1	69						
		BnCYP18-7	12	1	69						
		BnCYP18-5	5	1	27	9	4	2	43		
		BnCYP18-8	4	0	21	9	5	2	43		
		BnCYP19-1	4	1	30	9	5	5	69		
		BnCYP19-2	6	3	45	7	1	3	56		
	11	BnCYP18-4	4	3	33	5	1	3	40		
	BnCYP18-6	4	1	34	5	1	1	41			
	BnCYP18-7	3	0	26	4	1	0	33			
12	BnCYP19-1	4	2	26	15	11	6	68			
	BnCYP19-2	2	0	10	9	7	0	38			
13	BnCYP18-5	18	0	87	20	2	0	87			
	BnCYP18-8	20	2	91	22	2	2	93			
14	BnCYP18-5	12	0	61	21	9	0	78			
	BnCYP18-8	12	0	61	22	10	1	87			
15	BnCYP18-5	11	0	47							
	BnCYP18-8	12	1	51							
16	BnCYP18-5	7	0	63	18	11	2	80			
	BnCYP18-8	7	0	63	18	11	2	80			

der Phloemprobe 1-3 phosphorylierte Peptide identifiziert werden, welche in der Blattprobe eindeutig nicht zu finden waren.

Neben den bereits beschriebenen Identifizierungen bieten *Spot* 15 und 16 den größten Spielraum für Spekulationen. In beiden sind BnCYP18-5 und BnCYP18-8 zu finden und sie tauchen nur in den Phloem-, nicht aber in den Blattproben auf. In *Spot* 15 konnte kein einziges phosphoryliertes Peptid identifiziert werden. Der veränderte pI spricht deshalb für anderweitige posttranslationale Modifikationen. Im Gegensatz dazu konnten in *Spot* 16 phosphorylierte Peptide in einem ähnlichen Maß wie in *Spot* 14 detektiert werden. Dass der pI vom basischen in den sauren Bereich verlagert wird, kann demnach nicht der starken Phosphorylierung zugesprochen werden, sondern resultiert vermutlich auch aus anderen, zusätzlichen Modifikationen. Diese Beobachtungen bieten die Möglichkeit, anhand von ausführlicheren Analysen die Rolle unterschiedlicher posttranslationaler Modifikationen der hochabundanten BnCYPs BnCYP18-5 und BnCYP18-8 zu untersuchen. Ein erster Schritt in diese Richtung könnte mittels MALDI LIFT-TOF/TOF-MS-Messungen getätigt werden. Diese könnten Aufschluss darüber geben, um welche Modifikationen es sich handelt und an welcher Aminosäure diese positioniert sind.

Insgesamt konnten mithilfe der 2D-Gelelektrophorese und anschließender massenspektrometrischer Bestimmung 9 verschiedene BnCYPs nachgewiesen werden. Dieser experimentelle Ansatz wurde durch den Western Blot ermöglicht, war dadurch aber gleichzeitig auf die 18-19 kDa BnCYPs beschränkt. Deshalb wurde im Folgenden eine komplementäre Technik angewendet, die ebenfalls die Untersuchung des gesamten Proteoms ermöglicht, sodass im Anschluss Daten über einzelne CYPs extrahiert werden konnten. Hierbei handelt es sich um LC-MS/MS-Analysen. Diese sollten, wie auch die 2D-Gele, nicht nur mit Phloemexsudat, sondern zum Vergleich auch mit Proteinextrakt aus Blattgewebe durchgeführt werden. Auch hierfür wurden Pflanzen unter Standardbedingungen angezogen.

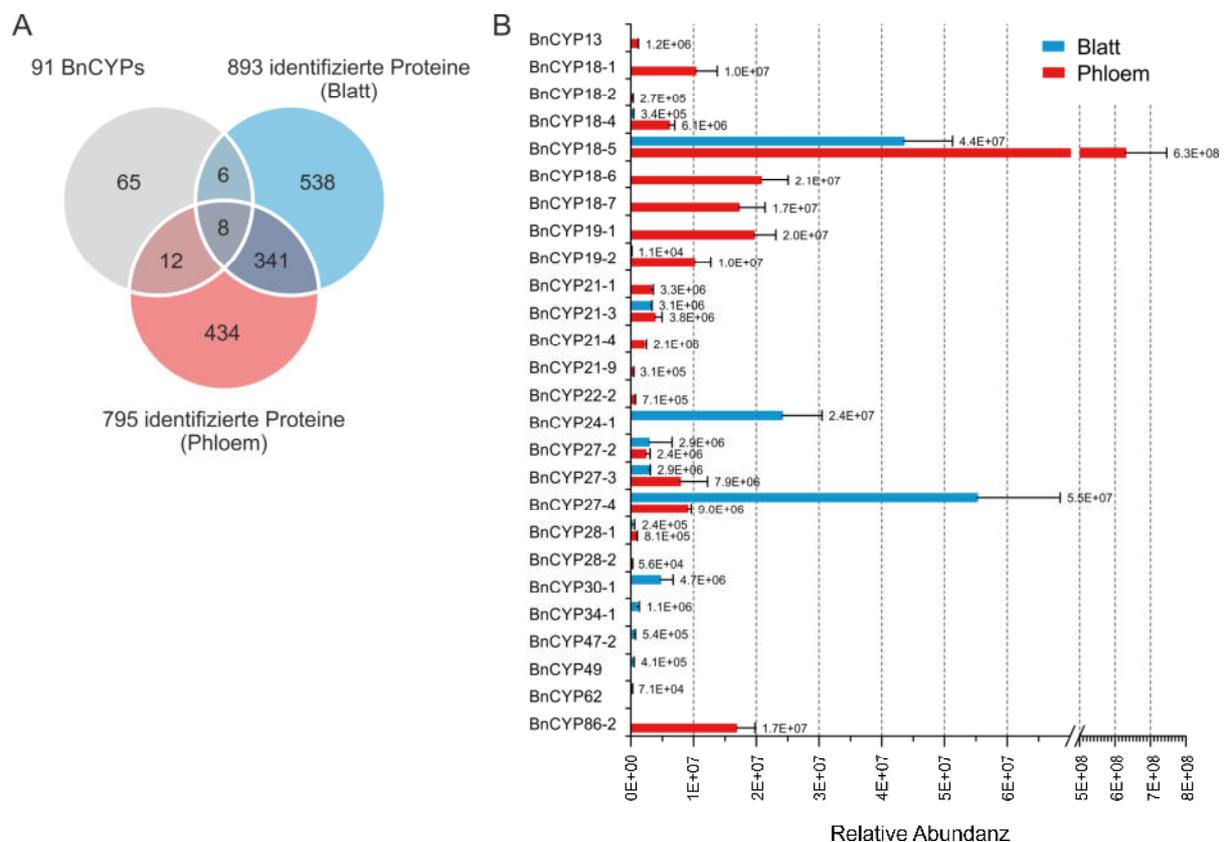
Insgesamt konnten 795 Proteine (Phloem) bzw. 893 Proteine (Blatt) identifiziert werden. Dass sich Phloem- und Blattproteom voneinander unterscheiden, wird besonders durch die Schnittmenge von 349 Proteinen ersichtlich, welche unter 50 % beider Proteome ausmacht. Im Vergleich mit den 91 bioinformatisch entdeckten BnCYPs, kommen 8 BnCYPs sowohl im Phloem- als auch im Blattproteom vor (Abbildung 15A). Des Weiteren wurden 6 blattspezifische und 12 phloemspezifische BnCYPs gefunden, sodass per LC-MS/MS die Expression von insgesamt 26 der 91 BnCYPs auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte.

Betrachtet man die Abundanzen der BnCYPs in den beiden Proben (Abbildung 15B), so ist offensichtlich, dass BnCYP18-5 mit Abstand das abundanteste CYP im Phloem ist. Auch im Blatt ist BnCYP18-5 hochabundant, wobei BnCYP24-1 und BnCYP27-4 ähnliche Abundanzen zeigen. Die meisten identifizierten BnCYPs sowohl in Phloem- als auch in Blattproben sind *single-domain* CYPs. Es konnte nur ein einziges *multi-domain* CYP in Blattextrakt gefunden werden. Dieses ist das vermutlich chloroplastidär lokalisierte BnCYP47-2, welches neben der CLD und einem Signalpeptid eine zusätzliche PsbQ-ähnliche Domäne besitzt. BnCYP47-2 ist mit 86 % Sequenzidentität ein Homolog des bereits kristallisierten AtCYP38. Spannend ist auch die Entdeckung von BnCYP86-2 im Phloem. Für dieses Protein wurde trotz dessen hohen Molekulargewichts neben der CLD keine weitere Domäne vorhergesagt, sodass hieraus kein

Rückschluss auf mögliche Funktionen gezogen kann. Das ähnlichste AtCYP ist AtCYP95, welches zu BnCYP86-2 aber nur zu 67 % ähnlich ist und somit fraglich ist, ob BnCYP86-2 eine ähnliche Funktion wie AtCYP95 besitzt.

Da auch LC-MS/MS eine Massenspektrometrie-basierte Methode ist, tritt hier in Anbetracht der in *B. napus* vorkommenden Isoformen das gleiche Problem wie bei der Analyse der 2D-Gele auf. Werden keine eindeutigen Peptide für die einzelnen Isoformen identifiziert, kann nicht ausgeschlossen werden, dass beide Isoformen vorliegen. So könnte anstatt dem im Phloem als hochabundant identifizierten BnCYP18-5 auch dessen Isoform BnCYP18-8 oder auch ein Gemisch beider Isoformen vorliegen. Vollständige Listen aller identifizierten Peptide aus Blatt- und Phloemextrakt sind in Supplementary Table S5 und S6 in Hanhart *et al.* (2017) aufgeführt.

Werden die beiden methodischen Ansätze, 2D-Gelelektrophorese und LC-MS/MS, direkt miteinander verglichen, so lässt sich feststellen, dass mittels LC-MS/MS mehr BnCYPs entdeckt werden konnten, als mit der 2D-Gelelektrophorese. Dies bezieht sich vor allem auf BnCYPs außerhalb der 18-19 kDa Gruppe. Dafür konnten aber per 2D-Gelelektrophorese im Blatt mehr Vertreter der 18-19 kDa Gruppe identifiziert werden, als per LC-MS/MS, wo nur BnCYP18-4 und BnCYP18-5 nachgewiesen werden konnten. Demnach besitzen beide Methoden ihre eigenen Vorteile und können gut einander



**Abbildung 15: Ergebnis der LC-MS/MS-Analyse zur Identifizierung von BnCYPs.** (A) Wie das Venn-Diagramm zeigt, sind von den insgesamt 26 identifizierten BnCYPs 6 in Blatt-, 12 in Phloem- und 8 in beiden Proben zu finden. (B) Die Verteilung hoch abundanter BnCYPs unterscheidet sich in den untersuchten Proben Blatt und Phloem. Die Rohdaten sind in Supplementary Table S3 und S4 in Hanhart *et al.* (2017) zu finden.

unterstützend angewendet werden. Im Vergleich mit den Daten aus Giavalisco *et al.* (2006) konnten BnCYP Isoformenpaare identifiziert und teilweise auch voneinander unterschieden werden. Auch konnten deutlich mehr BnCYPs detektiert werden. Phloemproteomstudien anderer dikotyler sowie monokotyler Pflanzen konnten CYPs ebenfalls im Phloem identifizieren, allerdings wurde nur in wenigen Fällen das exakte CYP bestimmt (Tabelle 17). Auffällig ist hierbei, dass auch in diesen Studien CYPs mit einer Größe von etwa 18-19 kDa gefunden wurden, was anhand der Größe auf den 1D- oder 2D-Gelen sowie den AtCYP-Homologen erkennbar ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen damit die bisher ausführlichste Studie von CYPs im Phloem dar.

**Tabelle 17: Übersicht bisher identifizierter Phloem CYPs.** In diesen Studien wurden unterschiedliche Detektionsmethoden wie LC-MS/MS oder eine einfache SDS-PAGE (1D) oder 2D-Gelelektrophorese (2D) mit anschließender Massenspektrometrie (MS) oder Western Blot (WB) angewendet. Teilweise wurden die CYPs nicht genauer bestimmt und deshalb keine Accession ID oder kein AtCYP-Homolog angegeben.

Spezies	Methode	Identifizierte CYPs	Accession ID	AtCYP-Homolog	Quelle
<i>Brassica napus</i>	2D+MS	CYPs in 9 Spots detektiert	AAA62706, CSRP, P24525, At2g16600, At2g21130	-	(Giavalisco <i>et al.</i> 2006)
<i>Brassica oleracea</i>	LC-MS/MS	2 CYPs	-	AtCYP19-2, AtCYP19-4	(Anstead <i>et al.</i> 2013)
<i>Cucurbita maxima</i>	LC-MS/MS	1 CYP	FG227112_2	AtCYP19-1 oder AtCYP40	(Lin <i>et al.</i> 2009)
<i>Cucumis sativus</i>	1D+WB	1 Bande	-	-	(Schobert <i>et al.</i> 1998)
<i>Lupinus albus</i>	2D+MS	CYPs in 5 Spots detektiert	-	-	(Rodriguez-Medina <i>et al.</i> 2011)
<i>Oryza sativa</i>	1D+LC-MS, 2D-LC-MS	1 CYP	Os02g0121300	AtCYP19-2	(Aki <i>et al.</i> 2008)
<i>Ricinus communis</i>	2D+MS 1D+WB	1 CYP RcCYP1	Q8VX73 -	- -	(Barnes <i>et al.</i> 2004) (Gottschalk <i>et al.</i> 2008)
<i>Robinia pseudoacacia</i>	1D+WB	1 Bande	-	-	(Schobert <i>et al.</i> 1998)
<i>Tilia platyphyllos</i>	1D+WB	1 Bande	-	-	(Schobert <i>et al.</i> 1998)
<i>Triticum aestivum</i>	1D+WB	1 Bande	-	-	(Schobert <i>et al.</i> 1998)
<i>Yucca filamentosa</i>	1D+WB	1 Bande	-	-	(Schobert <i>et al.</i> 1998)

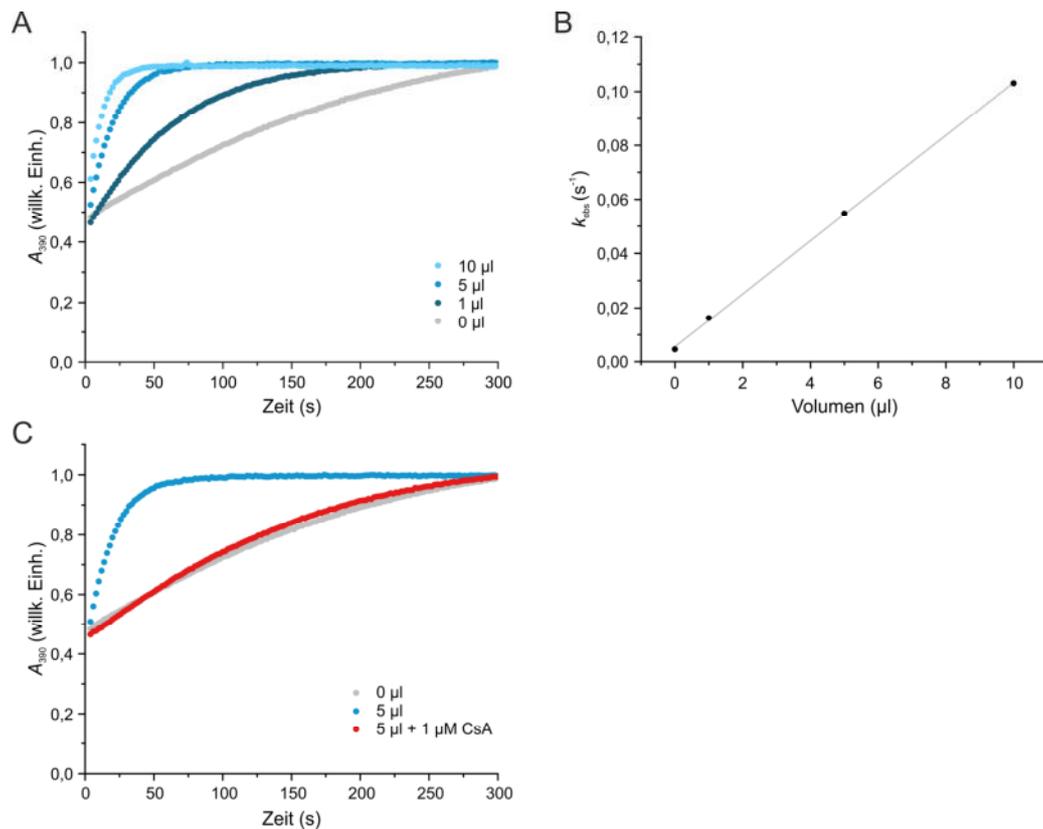
Im Vergleich mit den Genexpressionsdaten (Abschnitt 3.1.3) decken sich die Ergebnisse der Proteomstudien insofern, als dass BnCYP18-5 und BnCYP18-8 sowohl auf dem mRNA-, als auch auf dem Proteinlevel zu den am höchsten exprimierten BnCYPs gehören. Dass nicht alle BnCYPs per 2D-Gelelektrophorese und LC-MS/MS gefunden wurden, spricht nicht unbedingt dafür, dass keine Translation der Transkripte erfolgt ist. Die Sequenzierung von RNA ist eine deutlich sensitivere Methode, als die verwendeten proteomanalytischen Methoden. Häufig korrelieren Transkriptom- und Proteomdaten

nicht gut miteinander, da diese durch unterschiedliche biologische und technische Faktoren beeinflusst werden. In Bezug auf die angewendeten Proteomstudien sind als technische Faktoren vor allem die Auswahl der Signale (*peak detection*), die Peptididentifizierung (Sensitivität vs. Falsch-Positive Identifizierungen) und deren Quantifizierung während der massenspektrometrischen Auswertung zu nennen. Als biologischer Faktor hingegen schafft die Regulation der Translation eine Diskrepanz zwischen Transkripten und synthetisierten Proteinen. Dies kann u. a. durch RNA-Sekundärstrukturen, die Verwendung verschiedener Codons oder die Halbwertszeit eines Proteins geschehen. Ohne eine tiefere Untersuchung lassen sich quantitative Transkriptom- und Proteomstudien also nur bedingt miteinander vergleichen (Maier *et al.* 2009).

Innerhalb dieser Arbeit wurden Proben untersucht, welche von Pflanzen, die unter Standardbedingungen angezogen wurden, gewonnen wurden. Ob sich die Expression von BnCYPs unter Stress, wie nicht-optimalen Umweltbedingungen oder Pathogenbefall, verändert, bleibt demnach noch zu klären. Im späteren Verlauf dieser Arbeit wurde die Virusinfektion als Stressor eingesetzt. Hierfür wurden zusätzliche LC-MS/MS-Analysen von virusbefallenem Material durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abschnitt 3.6 präsentiert. Dass aber selbst unter Standardbedingungen so viele CYPs im Phloem gefunden wurden, lässt eine essentielle Funktion dieser Proteinfamilie vermuten. Eventuell könnten sie durch ihre PPIase Aktivität am Proteintransport oder an der Langstreckensignalweiterleitung beteiligt sein. In diesem Zusammenhang stellt sich deshalb zunächst die Frage, ob PPIasen ihre Aktivität im Phloem ausüben können.

### 3.2.3 Phloemexsudat zeigt eine PPIase Aktivität

Ein Standardassay zur Bestimmung der Isomerisierungsaktivität von PPIasen wurde von Fischer *et al.* (1984) etabliert, der sogenannte Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomeraseassay (PPIase Assay). Meistens wurden aufgereinigte oder rekombinant exprimierte Proteine mit dieser Methode untersucht, aber sie kann auch mit einem Proteingemisch angewendet werden. Um die Frage zu beantworten, ob es aktive PPIasen im Phloemexsudat von *Brassicaceen* gibt, wurde *B. napus* Phloemexsudat gesammelt und im PPIase Assay eingesetzt. Interessanterweise resultierte die Zugabe von frischem Phloemexsudat in einer erhöhten Isomerisierungsreaktion (Abbildung 16A). Diese Beobachtung wurde auch bereits zuvor für Phloemexsudat aus *Ricinus communis*, einem Mitglied der Familie der *Euphorbiaceen*, beschrieben (Gottschalk *et al.* 2008). Die beobachteten Ratenkonstanten zeigten einen linearen Anstieg, welcher mit Erhöhung der Menge an Phloemexsudat korrelierte (Abbildung 16B). Durch die Zugabe von CsA, einem bekannten Cyclophilininhibitor, konnte die Aktivität vollständig reduziert werden (Abbildung 16C). Basierend auf diesen Daten liegt der Schluss nahe, dass CYPs im Phloemexsudat in ihrer nativen, gefalteten Form vorliegen. Denn nur nativ gefaltete PPIasen zeigen eine Enzymaktivität. Zudem zeigt dies, dass die PPIase Aktivität des Phloemexsudats durch CYPs zustande kommt und nicht auf andere aktive PPIasen wie die FKBP zurückzuführen ist, obwohl die Aktivität von FKBP ebenfalls mit dem PPIase Assay bestimmt



**Abbildung 16:** *B. napus* Phloemexsudat zeigt Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomeraseaktivität. (A) Zunehmende Mengen an Phloemexsudat führten zu einer steigenden Aktivität, wie anhand der normalisierten Rohdaten zu sehen ist. (B) Die Ratenkonstanten  $k_{\text{obs}}$  zeigten einen linearen Anstieg der Aktivität. (C) Die Aktivität konnte durch die Zugabe von CsA reduziert werden.

werden kann. Zu diesem Ergebnis passt auch, dass in dem LC-MS/MS Phloem-Datensatz (Abschnitt 3.2.2) nur ein einziges FKBP, ein Homolog zu dem *A. thaliana* FKBP62, identifiziert werden konnte. Im Gegensatz zu der CYP-Familie ist die FKBP-Proteinfamilie demnach im Phloem nur schwach vertreten.

Nachdem 91 verschiedene BnCYPs identifiziert werden konnten und 20 davon per LC-MS/MS im Phloem nachgewiesen wurden, bleibt die Frage nach der Funktion von CYPs im Phloem. Der PPIase Assay mit Phloemexsudat hat gezeigt, dass es im Phloem aktive PPIasen gibt. Um herauszufinden, ob die abundantesten BnCYPs im Phloem, die 18-19 kDa großen Vertreter, für die gemessene Aktivität verantwortlich sind, sollten einzelne Kandidaten bezüglich ihrer Aktivität *in vitro* untersucht werden. Um dies zu ermöglichen, musste zunächst die Expression und Aufreinigung etabliert werden.

### 3.3 Expression und Aufreinigung rekombinanter CYPs

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb durch die Etablierung eines Aufreinigungsprotokolls die Grundlage für umfassende *in vitro* Studien an 18-19 kDa großen Cyclophilinen gelegt. Die Wahl fiel hierbei

auf einzelne, im Phloem identifizierte Kandidaten sowie deren Isoformen. Um in nachfolgenden Arbeiten *in vitro* Ergebnisse von BnCYPs auf *in vivo* Ergebnisse mit *A. thaliana* Mutanten übertragen zu können, wurden nicht nur *B. napus* CYPs untersucht, sondern auch deren Homologe aus *A. thaliana* ausgewählt. In Tabelle 18 sind die ausgewählten CYPs aus *B. napus* und *A. thaliana* aufgeführt. Hierbei sind insbesondere die Isoformen BnCYP18-5 und BnCYP18-8 interessant, da diese in den LC-MS/MS Analysen in der Summe ein Vielfaches der Abundanz anderer BnCYPs zeigten. Dies lässt eine essentielle Funktion vermuten.

**Tabelle 18:** Übersicht aller klonierten *B. napus* und *A. thaliana* CYPs.

<b>Protein</b>	<b><i>A. thaliana</i>-Homolog</b>
BnCYP18-2	AtCYP18-4
BnCYP18-3	AtCYP18-4
BnCYP18-4	AtCYP18-3
BnCYP18-5	AtCYP19-1
BnCYP18-6	AtCYP18-3
BnCYP18-8	AtCYP19-1
BnCYP19-1	AtCYP19-3

### 3.3.1 Das Expressionssystem

Insgesamt wurden 11 Cyclophiline aus *B. napus* und *A. thaliana* über die Restriktionsenzyme NdeI und XhoI erfolgreich in den pET28a+-Vektor eingebracht. Nach der Ligation wurden zunächst *E. coli* XL10-Gold Zellen mit den Konstrukten transformiert. Diese Zellen zeichnen sich durch hohe Transformationsraten aus und eignen sich damit sehr gut für die Transformation eines Ligationsansatzes. Im Anschluss wurden die Plasmide isoliert und sequenziert. Die Sequenzierung ist bei der Arbeit mit *B. napus* essentiell, um Isoformen, welche aufgrund ihrer hohen Sequenzidentität mit den gleichen Primern amplifiziert werden, voneinander unterscheiden zu können. Die Aminosäuresequenzen der rekombinanten CYPs sind im Anhang in Abschnitt 8.6 aufgeführt.

Erst nach der Sequenzierung und der damit einhergehenden Bestätigung der Gensequenzen wurden die pET28a+-Konstrukte in *E. coli* BL21-Gold (DE3) Expressionszellen eingebracht. Der Stamm *E. coli* BL21-Gold (DE3) wurde aus zwei Gründen ausgewählt. Zum einen spielt die Codonverwendung zwischen dem Ursprungs- und dem Expressionsorganismus eine wichtige Rolle für eine effiziente Expression. Zum anderen muss der Stamm das gewählte Expressionssystem unterstützen. Beide Voraussetzungen werden von dem Stamm *E. coli* BL21-Gold (DE3) erfüllt.

Für die Proteinüberexpression wurde das von Studier und Moffatt entwickelte T7 Expressionssystem verwendet (Studier und Moffatt 1986). Dieses ermöglicht eine induzierbare Expression des Zielgens durch die Zugabe von IPTG. IPTG inhibiert den *lac*-Repressor und lässt dadurch die Transkription der T7 RNA-Polymerase zu. Diese transkribiert daraufhin das Zielgen, welches auf dem pET28a+-Vektor zwischen T7-Promotor und -Terminator liegt.

Das rekombinante Protein besitzt neben dem Zielprotein, hier einem CYP, einen über einen Linker angeknüpften N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag. Zudem ist innerhalb des Linkers eine Thrombinschnittstelle vorhanden. Beides dient dazu, die Aufreinigung über eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie und das anschließende Abschneiden des Tags zu ermöglichen. Zusätzlich kann durch den His<sub>6</sub>-Tag vor dessen Abspaltung der Nachweis des rekombinanten Proteins per Western Blot mit einem Antikörper gegen den His<sub>6</sub>-Tag erfolgen.

### 3.3.2 Expression und Löslichkeit als Grundlage für eine effiziente Aufreinigung

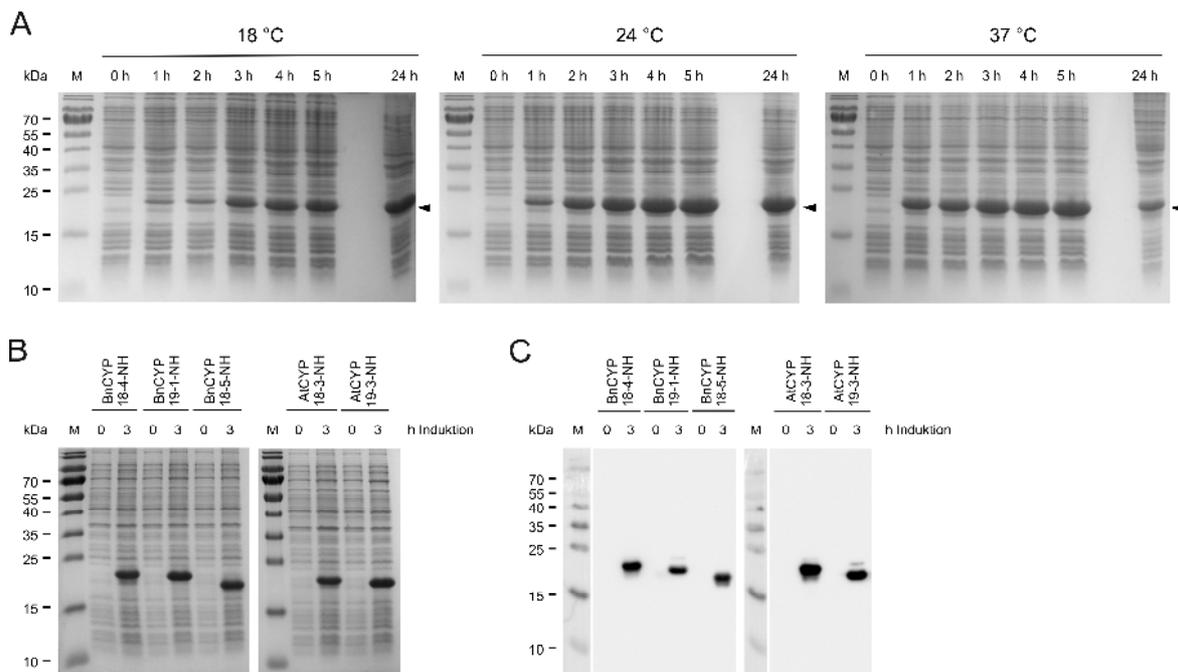
Aus dem Katalog klonierter BnCYPs wurden BnCYP18-4, BnCYP18-5 und BnCYP19-1 als Vertreter für verschiedene Isoformenpaare ausgewählt (Tabelle 19). Diese sollten exprimiert und mit ihnen *in vitro* Experimente durchgeführt werden. Entsprechend zu den BnCYPs wurden die Homologe AtCYP18-3 und AtCYP19-3 bearbeitet. Das *A. thaliana* Homolog zu BnCYP18-5, AtCYP19-1, konnte hierfür allerdings nicht rechtzeitig fertiggestellt werden und wird deshalb in den folgenden Versuchen nicht mit aufgeführt.

**Tabelle 19: Übersicht aufgereinigter CYPs, deren theoretisches Molekulargewicht  $MW_{\text{theor}}$  und isoelektrischen Punkt  $pI_{\text{theor}}$ .**

Protein	mit His <sub>6</sub> -Tag		nach Verdau	
	$MW_{\text{theor}}$	$pI_{\text{theor}}$	$MW_{\text{theor}}$	$pI_{\text{theor}}$
BnCYP18-4	20,5 kDa	8,7	18,6 kDa	8,4
BnCYP18-5	20,5 kDa	8,6	18,7 kDa	8,3
BnCYP19-1	21,8 kDa	8,3	19,9 kDa	7,8
AtCYP18-3	20,5 kDa	8,3	18,7 kDa	7,9
AtCYP19-3	21,1 kDa	8,3	19,2 kDa	7,9

Die Etablierung einer Aufreinigung beginnt mit der Anpassung der Expressionsbedingungen. Hierbei werden Faktoren wie der Expressionsstamm, die Temperatur oder die Induktionsdauer variiert, um eine optimale Expression zu erreichen. In Abbildung 17A ist ein solcher Expressionstest für unterschiedliche Temperaturen (18 °C, 24 °C und 37 °C) am Beispiel von BnCYP18-4 gezeigt. Wie hier zu sehen ist, wurde das Protein in *E. coli* BL21-Gold (DE3) Zellen in großen Mengen exprimiert. Die maximale Menge an Protein wurde nach 3 h erreicht. Dies stimmt auch mit der in Studier und Moffatt (1986) empfohlenen Induktionsdauer von 3 h überein.

Die Induktion mit 1 mM IPTG bei einer OD<sub>600</sub> von 0,4, 0,6 oder 1,0 zeigte keine Unterschiede, sodass für die folgenden Versuche bei einer OD<sub>600</sub> von 1,0 induziert wurde. Sowohl das gezeigte BnCYP18-4, als auch BnCYP18-5, BnCYP19-1, AtCYP18-3 und AtCYP19-3 zeigten in allen Testreihen sehr ähnliche

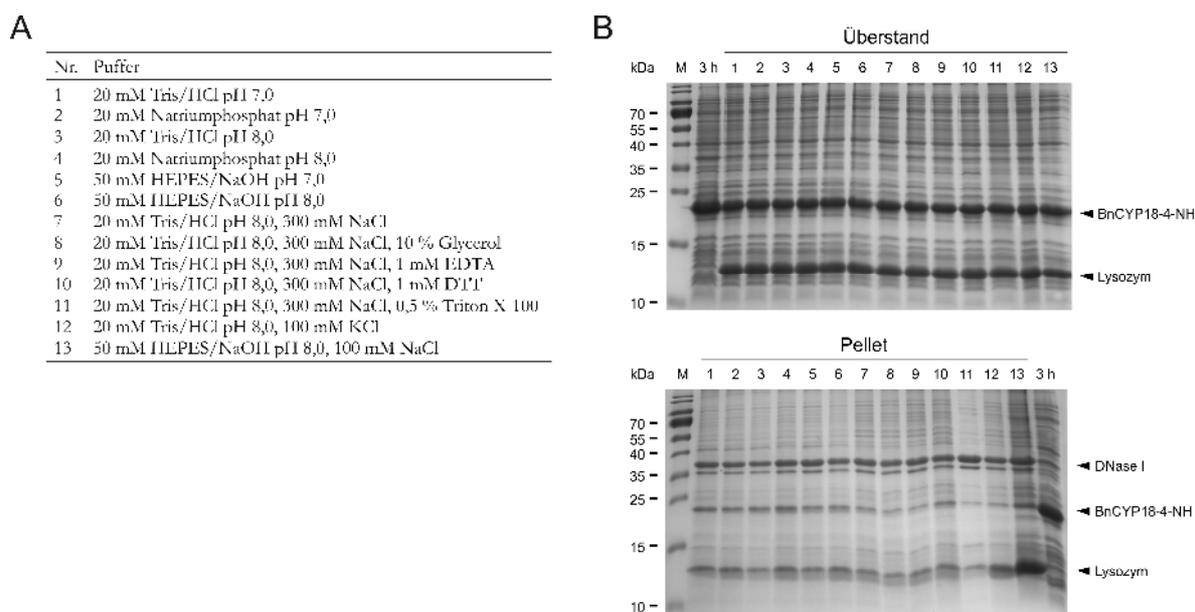


**Abbildung 17: Expression von rekombinanten CYPs.** (A) Für jedes CYP wurde ein Expressionstest bei 18 °C, 24 °C und 37 °C durchgeführt. Hier ist die SDS-PAGE von BnCYP18-4 stellvertretend für alle untersuchten CYPs gezeigt. Ein Pfeil markiert das exprimierte Protein. (B) SDS-PAGE aller rekombinanten CYPs nach 0 h und 3 h Expression bei 37 °C. (C) Ein Western Blot mit einem Antikörper gegen den His<sub>6</sub>-Tag bestätigt die Expression der rekombinanten Fusionsproteine.

Ergebnisse. Deshalb konnte ein einheitliches Protokoll ausgearbeitet werden (Induktion bei  $OD_{600} = 1,0$ , Expression bei 37 °C für 3 h). Wie eine Expression nach diesem Protokoll für alle fünf CYPs aussah, ist in Abbildung 17B zusammengefasst. Dass es sich bei der nach der Expression auftretenden, starken Bande um ein rekombinantes Protein mit einem His<sub>6</sub>-Tag handelt, konnte mit einem Western Blot bestätigt werden (Abbildung 17C).

Nach erfolgreicher Expression wird das Protein im nächsten Schritt während der Zellyse in einem Puffer aufgenommen. Dieser muss vor allem ein Kriterium erfüllen: Das Protein muss darin löslich sein. Um herauszufinden, welcher Puffer, pH oder zusätzliche Additive dafür notwendig sind, wurde ein Löslichkeitstest durchgeführt. Dieser wird in Abbildung 18 wieder exemplarisch für alle bearbeiteten CYPs anhand von BnCYP18-4 gezeigt. Die Auswahl orientierte sich dabei an Puffern, welche sich für die Aufreinigung von pflanzlichen CYPs bereits bewährt hatten (Gasser *et al.* 1990; Vasudevan *et al.* 2012; Campos *et al.* 2013; Kaur *et al.* 2015). Es wurden drei verschiedene Puffer, zwei pH-Werte sowie die Additive NaCl, Glycerol, EDTA, DTT, Triton X-100 und KCl in unterschiedlichen Kombinationen getestet. Wichtig ist hierbei, dass der pH-Wert des Puffers nicht exakt gleich zu dem pI des Proteins ist, da dieses dann eine neutrale Ladung besitzt und somit minimal löslich ist. Die  $pI_{\text{theor}}$ -Werte sind deshalb zur Übersicht in Tabelle 19 aufgeführt. Puffer Nr. 13 wurde in Campos *et al.* (2013) für den PPIase Assay verwendet und sollte hier mit getestet werden.

Im Zuge des Versuchs wird eine Zentrifugation bei 20.000 x g für 20 min durchgeführt. Diese sorgt dafür, dass Zellfragmente und unlösliche Proteine im Pellet gesammelt werden. Im Gegensatz zu diesen sollte



**Abbildung 18: Löslichkeitstest von BnCYP18-4.** (A) Übersicht der verwendeten Puffer für den Löslichkeitstest. (B) SDS-PAGE des Löslichkeitstests von BnCYP18-4, welches repräsentativ für alle bearbeiteten CYPs gezeigt wird. Die Nummern stehen für die verwendeten Puffer aus (A). Als Vergleich für die BnCYP18-4-NH-Bande dient das unbehandelte Gesamtzellpellet nach 3 h Induktion (= 3 h).

sich das lösliche Protein im Überstand befinden. Deshalb wurde neben dem Überstand zur Kontrolle auch immer das Pellet betrachtet, da dieses zeigt, ob ein Teil des Proteins unlöslich ist.

BnCYP18-4 zeigte eine gute Löslichkeit in allen getesteten Puffern (Abbildung 18). Nahezu das gesamte Protein befand sich im Überstand und nur ein geringer Anteil im Pellet. BnCYP19-1 zeigte ein ähnliches Ergebnis, auch dieses war in sämtlichen Puffern löslich. Daraufhin wurde eine generell gute Löslichkeit der sehr ähnlichen 18-19 kDa BnCYPs und AtCYPs angenommen und der Puffer für die Proteinaufreinigung (20 mM Tris/HCl pH 7,4, 300 mM NaCl) für alle CYPs verwendet. Diese zeigten in diesem Puffer sowohl vor, als auch nach dem Verdau trotz Änderung des pI eine sehr gute Löslichkeit.

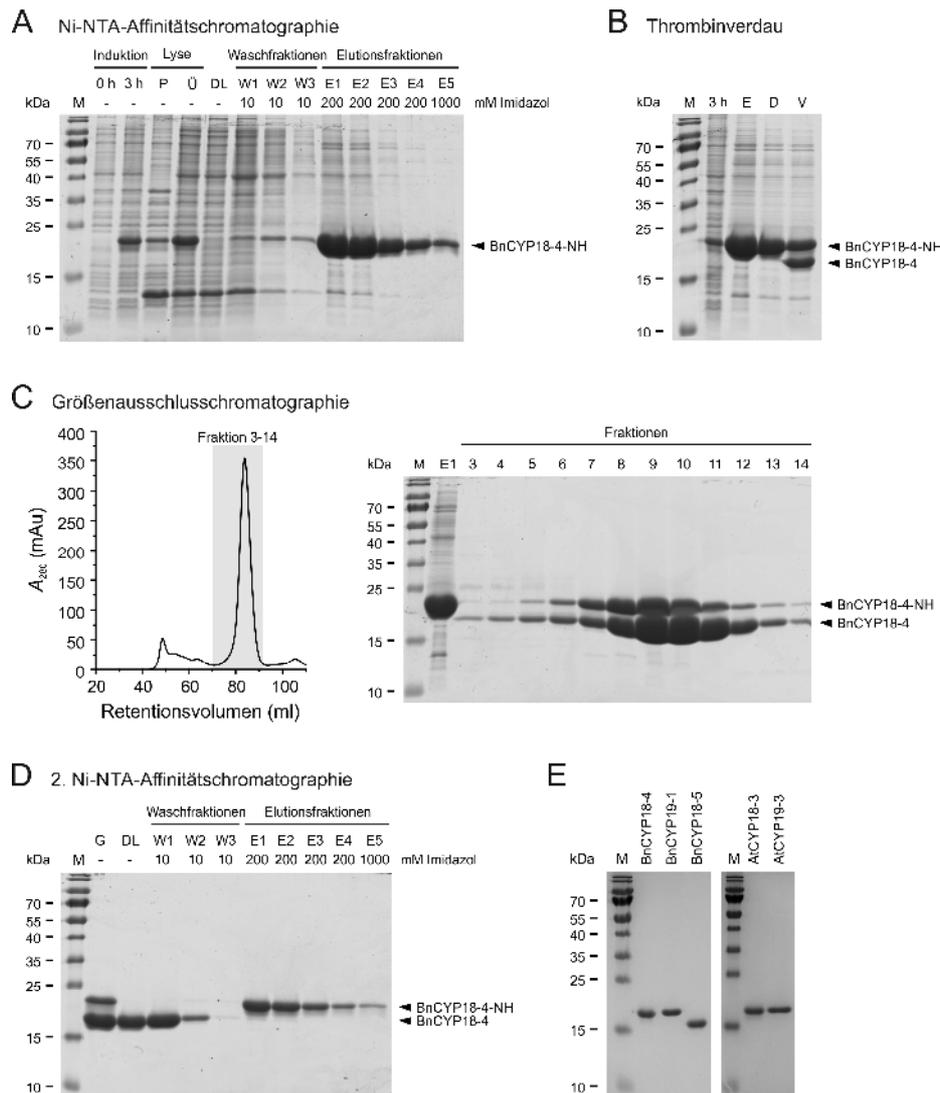
### 3.3.3 Die Proteinaufreinigung

Neben der Expression und Löslichkeit ergab auch die Etablierung der Proteinaufreinigung für alle bearbeiteten CYPs sehr ähnliche Ergebnisse, sodass ein Standardprotokoll für die Aufreinigung aller 18-19 kDa großen BnCYPs und AtCYPs erarbeitet werden konnte. Dieses kombiniert Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie. Eine Übersicht aller Schritte und ihrer Ergebnisse ist in Abbildung 19 für BnCYP18-4 wieder exemplarisch für alle aufgereinigten CYPs dargestellt.

Nach der Expression und Lyse wurde als erster Schritt der Aufreinigung eine Ni-NTA Affinitätschromatographie durchgeführt (Abbildung 19A). Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschen der Säulenmatrix mit 10 mM Imidazol zum Großteil entfernt. Im Gegensatz zu diesen konnte das rekombinante Protein aufgrund des His<sub>6</sub>-Tags an zweiwertige Nickelionen der Ni-NTA-Matrix

binden. Um das His<sub>6</sub>-getaggte Protein nach dem Waschen spezifisch zu eluieren, wurden 200 mM Imidazol eingesetzt. Nach der SDS-PAGE war gut zu erkennen, dass damit eine große Menge an BnCYP18-4-NH eluiert werden konnte (E1-E4). Lediglich ein kleiner Anteil an Protein verblieb an die Matrix gebunden, was durch eine Elution mit 1000 mM Imidazol gezeigt werden konnte (E5).

Nach der Affinitätschromatographie wurde das zur Elution benötigte Imidazol durch Dialyse entfernt, da dieses den anschließenden Thrombinverdau behindert. Trotzdem zeigte der Verdau nur etwa 50 % Effektivität (Abbildung 19B). Auch verlängerte Inkubationszeiten brachten hier keine Verbesserung.



**Abbildung 19: Übersicht der Aufreinigung von BnCYP18-4.** (A) SDS-PAGE der ersten Ni-NTA-Affinitätschromatographie. 0 h = vor Induktion, 3 h = nach 3 h Induktion, P = Lysat Pellet, Ü = Lysat Überstand, DL = Durchlauf, W = Waschfraktion, E = Elutionsfraktion. (B) Analyse der Proben nach Dialyse und Thrombinverdau per SDS-PAGE. 3 h = nach 3 h Induktion, E = vereinigte Elutionsfraktionen 1-5 der 1. Ni-NTA, D = E nach 24 h Dialyse, V = E nach 16 h Thrombinverdau. (C) Chromatogramm und SDS-PAGE der Größenausschlusschromatographie. E1 = Elutionsfraktion 1 der ersten Ni-NTA-Affinitätschromatographie, 3-14 = Fraktionen der Größenausschlusschromatographie. (D) SDS-PAGE der zweiten Ni-NTA-Affinitätschromatographie. G = vereinigte Fraktionen 6-14 der Größenausschlusschromatographie, DL = Durchlauf, W = Waschfraktion, E = Elutionsfraktion. (E) Alle fünf ausgewählten CYPs konnten mit diesem Protokoll erfolgreich aufgereinigt werden und zeigen eine einzelne Bande auf der SDS-PAGE. Es wurde jeweils 1 µg Protein aufgetragen.

Möchte man Protein ohne His<sub>6</sub>-Tag aufreinigen, ist dies natürlich ein Nachteil, da etwa die Hälfte an Protein verloren geht. Allerdings bietet dies dafür den Vorteil, dass Proteine mit und ohne His<sub>6</sub>-Tag parallel aufgereinigt werden können. Denn für einige *in vitro* Versuche, wie einen Far-Western Blot oder einen Pulldown-Assay, ist Protein mit Tag notwendig.

Nach dem Verdau folgte eine Größenausschlusschromatographie (Abbildung 19C). In den Fraktionen 3 bis 14 sind BnCYP18-4 und BnCYP18-4-NH enthalten. Die Auftrennung reichte nicht aus, um Protein mit Tag (BnCYP18-4-NH) und Protein ohne Tag (BnCYP18-4) voneinander zu trennen, da der Unterschied zwischen diesen beiden nur 1,9 kDa beträgt. Um diese Trennung zu erreichen, wurde deshalb eine zweite Ni-NTA-Affinitätschromatographie durchgeführt (Abbildung 19D). BnCYP18-4, also Protein ohne Tag, kann nicht mehr an die Ni-NTA-Matrix binden und befand sich somit im Durchlauf sowie den ersten Waschfraktionen. Im Gegensatz dazu hatte BnCYP18-4-NH an die Matrix gebunden und konnte erneut mit 200 mM Imidazol eluiert werden.

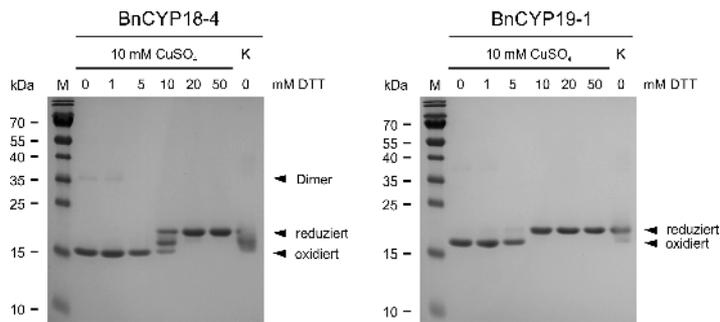
Das präsentierte Protokoll für die Proteinaufreinigung hat sich für alle fünf CYPs bewährt. In Abbildung 19E sind die aufgereinigten BnCYPs und AtCYPs gezeigt. Aufgrund der großen Ähnlichkeit wird angenommen, dass sich mit diesem Standardprotokoll auch andere 18-19 kDa große BnCYPs und AtCYPs aufreinigen lassen.

### 3.3.4 BnCYPs können unterschiedliche Redoxzustände einnehmen

Interessanterweise tauchten während dem gesamten Verlauf der Expression und Aufreinigung von BnCYPs und AtCYPs immer wieder Doppelbanden auf den SDS-PAGE-Gelen auf. Diese schienen unabhängig von Puffer und Methode zu sein und ließen sich auch nicht durch die Behandlung der Probe erklären. Tatsächlich lässt sich dieses Phänomen aber dem Redoxzustand des Proteins zuschreiben. In vorausgehenden Studien konnte für CYPs (AtCYP20-3 aus *A. thaliana*, CsCYP aus *Citrus sinensis*, SmCYP aus *Schistosoma mansoni*) gezeigt werden, dass verschiedene Cysteinpaare Disulfidbrücken bilden können (Laxa *et al.* 2007; Campos *et al.* 2013; Gourlay *et al.* 2007). Es wurde auch gezeigt, dass diese in ihrer oxidierten Form eine Verschiebung der Bande in der SDS-PAGE bewirken und damit der Redoxzustand des Proteins analysiert werden kann (Laxa *et al.* 2007). Vergleicht man die in dieser Arbeit untersuchten BnCYPs und AtCYPs, sind unter diesen vier Cysteine konserviert, welche hinsichtlich ihrer Lage in der Tertiärstruktur potentiell Disulfidbrücken bilden könnten. Ähnlich zu dem in Laxa *et al.* beschriebenen Experiment wurde deshalb ein gelbasierter Proteinmobilitätsversuch durchgeführt.

Hierfür wurde ein Reduktionsmittel (DTT) zu aufgereinigtem, vorher oxidiertem Protein titriert. Dies beeinflusste dessen elektrophoretische Mobilität in einer denaturierenden SDS-PAGE, hier gezeigt am Beispiel von BnCYP18-4 und BnCYP19-1 (Abbildung 20). Daraus lässt sich schließen, dass die Oxidation zu der Ausbildung von Disulfidbrücken führt. Oxidiertes Protein scheint kompakter zu sein und schneller zu migrieren als die reduzierte, komplett entfaltete Variante.

Interessant ist auch, dass nur oxidiertes Protein Dimere bilden kann. Die Dimerbanden in Abbildung 20 sind für BnCYP18-4 bei 0 und 1 mM DTT sehr schwach ausgeprägt, bei höheren DTT-Konzentrationen



**Abbildung 20: Nachweis von Redoxzuständen mit einer denaturierenden SDS-PAGE.** BnCYP18-4 und BnCYP19-1 wurden hinsichtlich der zuvor beobachteten Bildung von Doppelbanden in der SDS-PAGE in einem Proteinmobilitätsexperiment untersucht. Hierfür wurden die Proteine vor der Reduktion mit DTT mit  $\text{CuSO}_4$  oxidiert. Zum Vergleich wurde eine unbehandelte Proteinprobe aufgetragen (K = unbehandelte Kontrolle).

sind sie nicht zu sehen. Daraus kann geschlossen werden, dass nur ein sehr kleiner Anteil an oxidiertem Protein dazu tendiert, Dimere zu bilden. Für BnCYP19-1 lässt sich nicht eindeutig sagen, ob eine sehr schwache Bande vorhanden ist. Um dies genauer zu untersuchen, müsste man entweder eine höhere Proteinkonzentration auftragen oder einen Western Blot durchführen, da dieser sensitiver ist, als eine Coomassie-Färbung.

Hinsichtlich der Frage, weshalb in vorherigen Experimenten hin und wieder Doppelbanden aufgetaucht sind, gibt die DTT-Konzentration die Antwort. Standardmäßig sind in SDS-Probenpuffer 10 mM DTT enthalten. Wie in Abbildung 20 aber zu sehen ist, scheinen 10 mM DTT das oxidierte BnCYP18-4 Protein nicht vollständig reduzieren zu können. Nach einer Erhöhung der DTT-Konzentration im SDS-Probenpuffer auf 20 mM sind in den nachfolgenden Versuchen keine Doppelbanden mehr aufgetreten.

Dass unbehandelte Proben aus einem Gemisch von reduziertem und oxidiertem Protein bestehen, stimmt auch mit den Ergebnissen aus Campos *et al.* (2013) für CsCYP überein. Auch dort wurde ohne die Zugabe von Oxidations- oder Reduktionsmitteln eine Mischung von oxidierten und reduzierten Cysteinen nachgewiesen. Der Nachweis wurde hier massenspektrometrisch erbracht und es konnte gezeigt werden, dass zwei Cysteine (C40 und C168) eine Disulfidbrücke bilden können.

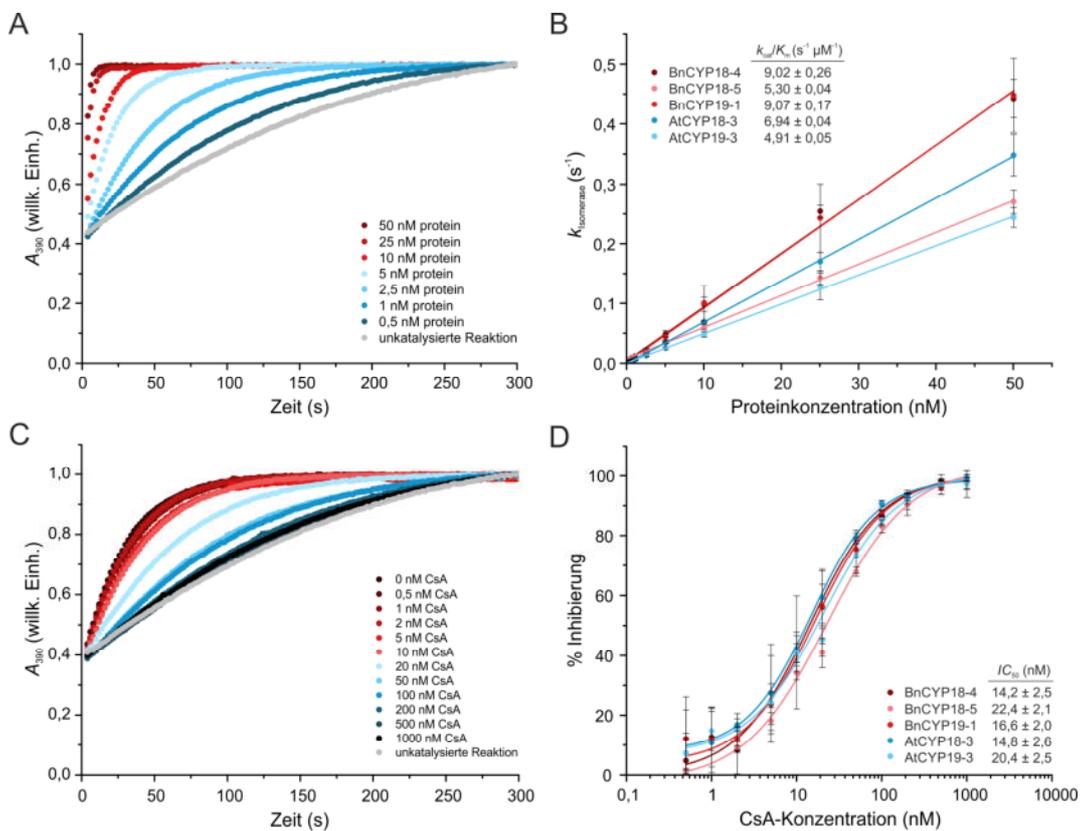
Anhand des hier durchgeführten Versuchs ließ sich somit zeigen, dass in BnCYP18-4 und BnCYP19-1 Disulfidbrücken gebildet werden können. Auffällig ist hierbei, dass BnCYP18-4 drei Banden auf dem Gel zeigte, während bei BnCYP19-1 nur zwei Banden zu sehen waren. Hier scheint es einen Unterschied zwischen den beiden Proteinen zu geben, der mit diesem Versuch allerdings nicht erklärt werden konnte. Zudem wurde für CYPs eine disulfidbrückenabhängige Redoxregulation postuliert (Campos *et al.* 2013). Da für die Diskussion der Redoxregulation aber sowohl die Aktivität als auch die Struktur mit einbezogen werden müssen, wird diese an späterer Stelle detailliert diskutiert (Abschnitt 3.5.5).

### 3.4 Nachweis der Enzymaktivität von rekombinanten *B. napus* und *A. thaliana* CYPs

Die heterolog exprimierten und aufgereinigten BnCYP18-4, BnCYP18-5 und BnCYP19-1 sowie AtCYP18-3 und AtCYP19-3 wurden nun hinsichtlich ihrer PPIase Aktivität untersucht. Hierfür konnte

der PPIase Assay für die Messung von 0 bis 50 nM Protein etabliert werden. Dabei stieg die gemessene Absorption schneller, je mehr CYP enthalten war (Abbildung 21A). Dies führte dazu, dass der Reaktionsverlauf bei Konzentrationen >50 nM nicht mehr mit einer Reaktionsgleichung 1. Ordnung angenähert werden konnte, da die Reaktion innerhalb weniger Sekunden vollständig abgelaufen war. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits von Fischer *et al.* (1984) beschrieben. Gleichzeitig ist die Reaktion temperaturabhängig. Mit höherer Temperatur läuft die Reaktion schneller ab und das Plateau ist selbst bei niedrigen Proteinkonzentrationen innerhalb weniger Sekunden erreicht. Deshalb wurde der Assay konstant bei 4 °C durchgeführt, um einerseits die Aufnahme der Reaktion zu ermöglichen und andererseits die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Messungen gewährleisten zu können.

Alle fünf ausgewählten CYPs zeigten eine Isomeraseaktivität in dem etablierten PPIase Assay. Aus den Rohdaten (Abbildung 21A) konnten die Ratenkonstanten der PPIasen ( $k_{\text{Isomerase}}$ ) berechnet werden. Diese zeigten gegen die Konzentration aufgetragen einen linearen Anstieg (Abbildung 21B). BnCYP18-4 und



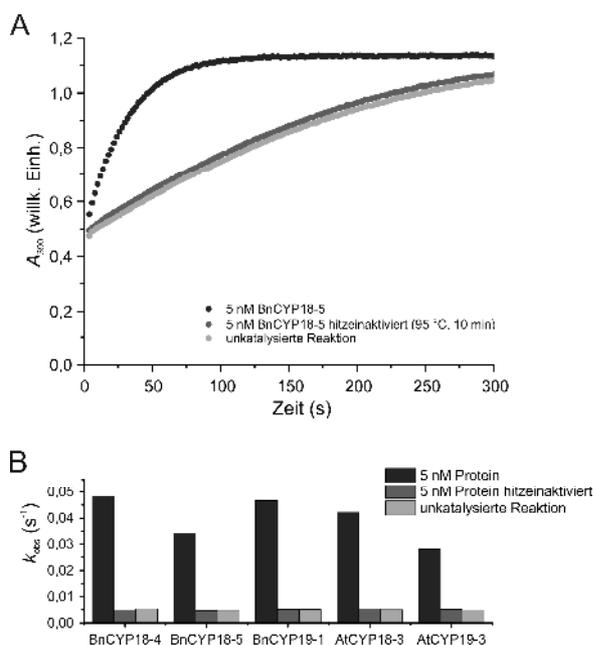
**Abbildung 21: Bestimmung der Enzymaktivität und Inhibierungskinetik von rekombinanten BnCYPs und AtCYPs.**

(A) Die PPIase Aktivität kann durch die Aufnahme der Absorption des umgesetzten Substrats bestimmt werden. Gezeigt sind repräsentative, normalisierte Rohdaten von BnCYP18-4 gemessen in einem Konzentrationsbereich von 0,5 bis 50 nM. (B) Der Einfluss der Proteinkonzentration auf die Ratenkonstanten der Isomerisierungsreaktion führt zu einem linearen Anstieg. Alle Fits haben einen korr.  $R^2$ -Wert >0,99. BnCYP18-4 und BnCYP19-1 besitzen eine nahezu identische Aktivität, sodass deren Fits übereinanderliegen. (C) Um die Inhibierung der PPIase Aktivität zu bestimmen wurde die Inhibitorkonzentration variiert. Gezeigt sind repräsentative, normalisierte Rohdaten der Inhibierung von 5 nM BnCYP18-4 durch CsA mit Inhibitorkonzentrationen von 0,5 bis 1000 nM. (D) Die PPIase Aktivität zeigt in der Dosis-Wirkungs-Kurve eine Konzentrationsabhängigkeit gegenüber der CsA-Konzentration (korr.  $R^2$  >0,99).

BnCYP19-1 besaßen mit  $9,0 \pm 0,26 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$  und  $9,07 \pm 0,17 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$  eine nahezu identische katalytische Aktivität. Im Vergleich dazu hat BnCYP18-5 mit  $5,30 \pm 0,04 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$  eine etwas geringere Aktivität, ähnlich zu AtCYP18-3 mit  $6,94 \pm 0,04 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ . Die Aktivität von AtCYP19-3 wurde bereits in einer vorherigen Studie untersucht, zeigte dort einen  $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Wert von  $2,7 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$  (Kaur *et al.* 2015) und war damit nur halb so hoch wie in dem hier durchgeführten PPIase Assay mit  $4,91 \pm 0,05 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ . Dieser Unterschied könnte daraus resultieren, dass der Versuch hier unter optimierten Bedingungen durchgeführt wurde. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die ermittelten Aktivitäten im gleichen Rahmen wie die anderer pflanzlicher CYPs aus *A. thaliana*, *Ricinus communis*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Spinacia oleracea* sowie *Citrus sinensis* bewegen (zusammengefasst in Kaur *et al.* 2015). Im Vergleich dazu besitzt HsCYPA eine katalytische Aktivität von  $1,4 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$  und ist damit auch ähnlich aktiv (Daum *et al.* 2009).

Die Zugabe von CsA resultierte in reduzierten Isomerisierungsraten (Abbildung 21C), welche anhand einer Dosis-Wirkungs-Kurve visualisiert werden können (Abbildung 21D). Aus der Dosis-Wirkungs-Kurve konnte auch der  $IC_{50}$  bestimmt werden. Mit dem durchgeführten Versuch konnte somit nachgewiesen werden, dass CsA für alle fünf untersuchten Cyclophiline als Inhibitor wirkt. Dabei resultierten CsA-Konzentrationen über 500 nM in einer kompletten Inhibierung der Reaktion. Der  $IC_{50}$  der Inhibitionskinetik zeigte, dass BnCYP18-4 ( $14,2 \pm 2,5 \text{ nM}$ ), BnCYP18-5 ( $22,4 \pm 2,1 \text{ nM}$ ), BnCYP19-1 ( $16,6 \pm 2,0 \text{ nM}$ ), AtCYP18-3 ( $14,8 \pm 2,6 \text{ nM}$ ) und AtCYP19-3 ( $20,4 \pm 2,5 \text{ nM}$ ) CsA mit nur geringen Affinitätsunterschieden gebunden haben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die untersuchten CYPs alle eine ähnliche Aktivität und Inhibierungskinetik besitzen. Zur Kontrolle wurden die Proteine zusätzlich durch Hitze denaturiert ( $95 \text{ }^\circ\text{C}$  für 10 min) und danach im PPIase Assay eingesetzt. Wie für BnCYP18-5 in Abbildung 22A gezeigt, konnte das denaturierte Enzym keine Isomerisierung mehr durchführen, es war inaktiv. Die Reaktion verlief daher genauso wie die der unkatalysierten Isomerisierungsreaktion. Diesen Aktivitätsverlust durch

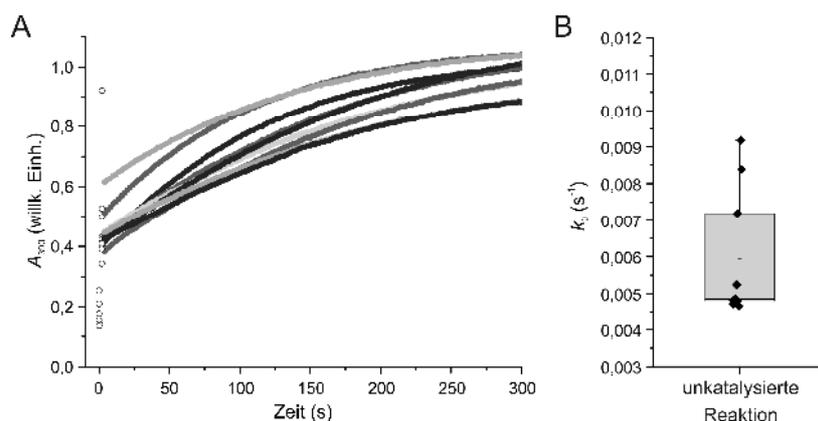


**Abbildung 22: Die Hitzeinaktivierung der rekombinanten CYPs führt zum Verlust der PPIase Aktivität.** (A) Durch die Hitzeinaktivierung sank die gemessene Absorption der Isomerisierungsreaktion von BnCYP18-5 auf das Level der unkatalysierten Reaktion. Dieses Verhalten zeigten alle getesteten CYPs, BnCYP18-5 ist deshalb exemplarisch dargestellt. Denaturiert kann die PPIase das Substrat demnach nicht mehr isomerisieren. Nur nativ gefaltete PPIasen zeigen eine Enzymaktivität. (B) Ratenkonstanten der fünf untersuchten CYPs vor und nach Hitzeinaktivierung.

die Denaturierung zeigten alle getesteten CYPs, was nicht nur anhand der Rohdaten, sondern auch durch die daraus berechneten Ratenkonstanten  $k_{\text{obs}}$  deutlich wird (Abbildung 22B). Letztendlich lässt sich aus diesem Versuch rückschließen, dass die rekombinanten CYPs vor ihrer Denaturierung in ihrer nativen, gefalteten, aktiven Form vorlagen.

### 3.4.1 Der PPIase Assay: Ein Kompromiss aus Genauigkeit und Durchführbarkeit

Kleine Unterschiede im PPIase Assay müssen vorsichtig behandelt werden, was im Folgenden am Beispiel der unkatalysierten Reaktion verdeutlicht werden soll. In Abbildung 23A sind die Rohdaten mehrerer Messungen der unkatalysierten Reaktion gezeigt ( $n = 9$ ), welche an unterschiedlichen Tagen aufgenommen wurden. Es ist offensichtlich, dass eine einzelne Messung nicht repräsentativ ist. Auch die berechneten Ratenkonstanten zeigen mit ihrer starken Streuung das gleiche Bild (Abbildung 23B). Die Schwankungen sind tagesabhängig und könnten unter anderem durch das Substrat verursacht werden. Denn nur das *cis*-Isomer des Substrats wird im Assay umgesetzt, welches mit einem Anteil von 40 bis 60 % in Lösung vorliegt. Laut Kofron *et al.* (1991) könnte diese Varianz durch Spuren von Feuchtigkeit in der hygroskopischen Substrat-DMSO-Stammlösung entstehen. Messungen katalysierter Reaktionen mehrerer Tage können deshalb nicht direkt miteinander verglichen werden. Sie müssen immer auf die Kontrolle, die unkatalysierte Reaktion, bezogen werden. Gleichzeitig wird hiermit auch klar, dass für eine zuverlässige Auswertung des Assays mehrere Replikate gemessen werden müssen. Die Herausforderung besteht also darin, eine Vereinbarkeit zwischen der Anzahl an Replikaten und der Durchführbarkeit zu finden. Als Kompromiss wurden deshalb jeweils drei Replikate aufgenommen, um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten und zugleich die Durchführung des mehrstündigen Assays in einem angemessenen Rahmen zu halten.



**Abbildung 23: Eine Mehrfachmessung der unkatalysierten Reaktion verdeutlicht die Varianz des PPIase Assays.** Bei der unkatalysierten Reaktion wird keine PPIase hinzugegeben, sodass die spontane Isomerisierungsreaktion gemessen werden kann. (A) Die mehrfache Wiederholung der Messung ( $n = 9$ ) an unterschiedlichen Messtagen verdeutlicht die Varianz bereits beim Anblick der Rohdaten. Hierbei ist auch deutlich zu sehen, dass die ersten 2 Messpunkte maskiert werden müssen (markiert mit  $\circ$ ). (B) Folglich zeigt die Ratenkonstante der unkatalysierten, spontanen Isomerisierungsreaktion ( $k_0$ ) eine hohe Varianz im Box-Plot.

### 3.4.2 Ein Fazit zur Analyse der Enzymaktivität

Abschließend lässt sich in Bezug auf die Fragestellung, ob einzelne BnCYP Kandidaten eine PPIase Aktivität vorweisen können, Folgendes zusammenfassen: Alle drei getesteten BnCYPs, BnCYP18-4, BnCYP18-5 und BnCYP19-1, besitzen eine PPIase Aktivität, die durch CsA inhibiert werden kann. Hervorzuheben ist, dass die gemessenen Aktivitäten sehr ähnlich zueinander sind, was für eine ähnliche Wirkungsweise sprechen könnte. Hinzu kommt, dass alle drei BnCYPs im Phloemexsudat nachgewiesen werden konnten und so der Schluss nahelegt, dass die gemessene Aktivität des Phloemexsudats durch ein Gemisch von CYPs zustande kommt. Hieraus ergibt sich die Frage, ob die CYPs aufgrund ihrer essentiellen Funktion als Faltungshelfer redundant sind oder sich zum Beispiel durch unterschiedliche Interaktionspartner voneinander unterscheiden könnten. Um diese Frage beantworten zu können, ist eine Kenntnis der Struktur entscheidend, da nur so kleine, aber maßgebende Unterschiede aufgelöst werden können. Dementsprechend wurden die drei ausgewählten CYPs in den folgenden Experimenten strukturell untersucht.

## 3.5 Strukturelle Analyse von *single-domain B. napus* und *A. thaliana* CYPs

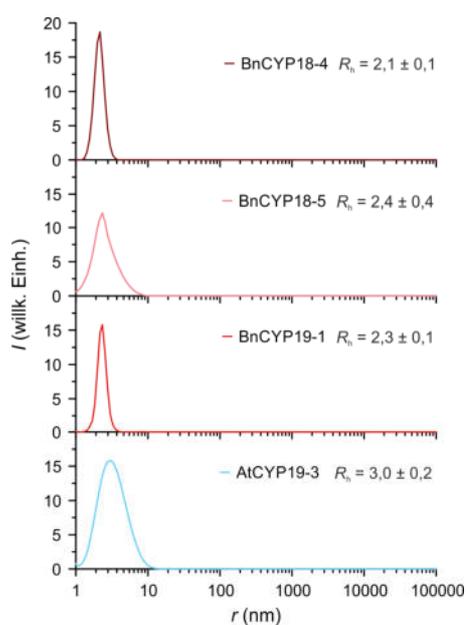
Für die strukturelle Analyse eines Proteins sind zwei Faktoren ausgesprochen wichtig: eine möglichst exakte Beschreibung der Struktur und deren Flexibilität. Um dies zu gewährleisten, bietet sich die Kombination von zwei unterschiedlichen Methoden an, zum einen die Proteinkristallographie zur exakten Strukturbestimmung und zum anderen die Kleinwinkelröntgenstreuung (SAXS), bei der das Protein in einem nativ ähnlichen Zustand ist. Mit beiden Methoden können Daten aus der Beugung von Röntgenstrahlen an einer Elektronenverteilung gewonnen werden. Einen der größten Unterschiede zwischen den beiden Methoden stellt die benötigte Probe dar. Im Gegensatz zur Proteinkristallisation bietet SAXS nämlich die Möglichkeit, die Struktur von Proteinen in Lösung zu untersuchen, wodurch auch dynamische Prozesse in einer variablen Umgebung betrachtet werden können. Die Methoden unterscheiden sich jedoch in der Auflösung. Während durch die Analyse von Proteinkristallen eine brillante Auflösung von bis zu 0,1 nm erreicht werden kann, erreicht SAXS eine Auflösung von bis zu 1-2 nm (Feigin *et al.* 1987). Somit erlaubt eine Kombination dieser Methoden eine hohe Auflösung (Kristallisation) mit gleichzeitiger Aufklärung der Dynamik (SAXS).

### 3.5.1 SAXS-Messungen zur Bestimmung der Struktur in Lösung

Passend zu den Daten aus dem PPIase Assay wurden dieselben drei BnCYPs, BnCYP18-4, BnCYP18-5 und BnCYP19-1, sowie das Homolog zu BnCYP19-1, AtCYP19-3, mit SAXS strukturell untersucht. Grundlegend für die Bestimmung der Struktur von Makromolekülen in Lösung mit SAXS ist eine hohe Probenqualität, da alle einzelnen Bestandteile der Lösung zur detektierten Streuintensität beitragen. Neben dem zu untersuchenden Protein sind dies vor allem Pufferkomponenten und Wasser, aber auch eventuell

vorhandene Kontaminationen und Aggregate. Letztere führen zu einer deutlichen Verschlechterung der Datenqualität (Jeffries *et al.* 2016). Nach der Proteinaufreinigung muss deshalb im Zuge der Probenvorbereitung ausgeschlossen werden, dass sich Kontaminationen oder Aggregate in der Lösung befinden. Genauso muss der Oligomerisierungsgrad des Proteins untersucht und eine Monodispersität der Probe nachgewiesen werden.

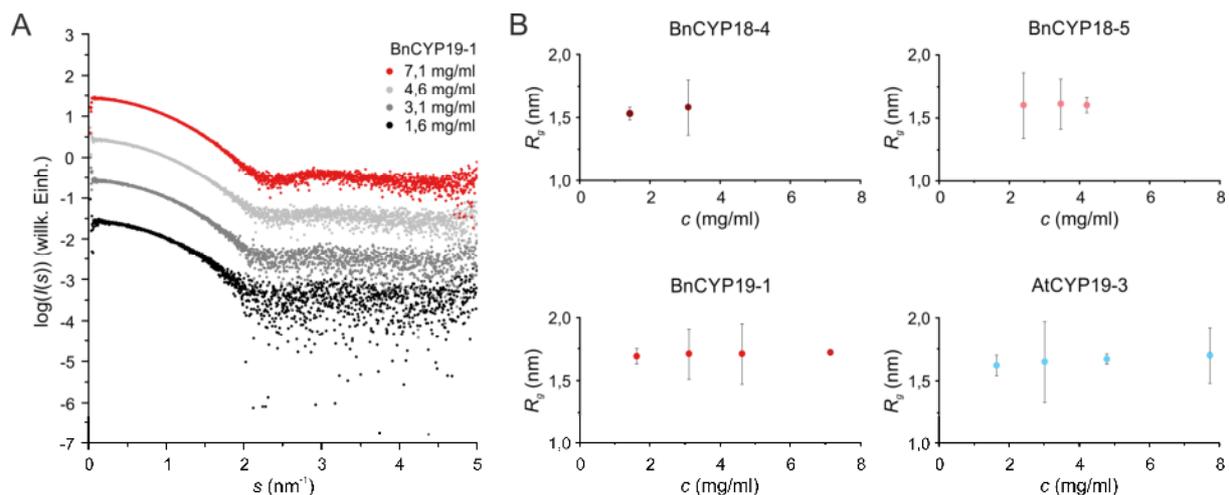
Um die Datenqualität sicherzustellen wurden die Proben deshalb vor der SAXS-Messung per SDS-PAGE und dynamischer Lichtstreuung (*Dynamic Light Scattering*, DLS) überprüft. Die SDS-PAGE der für SAXS vorbereiteten Proteine zeigte, wie nach der Aufreinigung üblich, eine einzelne Proteinbande und schloss damit Kontaminationen durch andere Proteine aus (wie in Abbildung 19E). Im Gegensatz zu dem gelbasierten Nachweis per SDS-PAGE, ist der Nachweis über die Streuung von Licht an Partikeln sensitiver und bietet den Vorteil, dass Oligomere, welche durch die Denaturierung der Probe auf der SDS-PAGE nicht sichtbar sind, detektiert werden können. Dies ist für SAXS besonders wichtig, da das Protein für solch eine größensensitive Methode monodispers vorliegen muss. Mit DLS können Radien bis zu wenigen nm gemessen werden. Somit können auch kleine Proteine wie die CYPs mit DLS auf Monodispersität überprüft werden, bewegen sich aber am unteren Rand des Auflösungsbereichs (Stetefeld *et al.* 2016). Abbildung 24 zeigt die Größenverteilungen der hydrodynamischen Radien ( $R_h$ ) der vier Proben mit einer Proteinkonzentration von 4,2 bis 4,8 mg/ml. Hier ist deutlich zu sehen, dass in keiner der Proben Kontaminationen, unterschiedliche Oligomerisierungszustände oder große Aggregate enthalten waren. Der berechnete  $R_h$  bewegt sich für alle vier CYPs zwischen 2 und 3 nm. Somit konnte der Nachweis reiner, monodisperser Proben erfolgreich erbracht werden. Auch DLS-Analysen unterschiedlicher Proteinkonzentrationen mit bis zu 20 mg/ml zeigten keine Oligomerisierung oder Aggregatbildung, was verdeutlicht, dass Cyclophiline selbst bei hohen Konzentrationen monodispers vorliegen und nicht zu Polydispersität tendieren.



**Abbildung 24: Größenverteilung des  $R_h$  für SAXS-Proben von BnCYP18-4, BnCYP18-5, BnCYP19-1 und AtCYP19-3.** Die mit DLS ermittelte Größenverteilung des  $R_h$  zeigt eindeutig, dass alle vier Proben monodispers und sehr ähnlich zueinander sind. Die Proben enthalten weder Kontaminationen, noch neigen sie zu unterschiedlichen Oligomerisierungszuständen oder Aggregatbildung.

Obwohl bereits gezeigt werden konnte, dass pflanzliche CYPs auch bei hohen Konzentrationen monodispers vorliegen, muss für SAXS-Experimente neben der Probenqualität immer noch die -quantität Beachtung finden. Denn es gibt neben der bereits untersuchten Aggregatbildung weitere konzentrationsabhängige Effekte, welche das Streuprofil beeinflussen. Hierbei ist vor allem eine interpartikuläre Wechselwirkung, welche entweder als Anziehung oder Abstoßung von Partikeln zueinander wirken kann, zu nennen. Sowohl eine Aggregatbildung als auch interpartikuläre Effekte beeinflussen das Streuprofil, insbesondere bei sehr kleinen Streuwinkeln, und zeigen mit steigender Proteinkonzentration einen stärkeren Einfluss. Des Weiteren ändert sich auch das Signal-zu-Rausch Verhältnis mit der Konzentration und ist ein wichtiges Maß für die Qualität der Streudaten. Für jedes Protein wurden deshalb bis zu vier unterschiedliche Proteinkonzentrationen zwischen 1 und 8 mg/ml eingesetzt. Wie in Abbildung 25A am Beispiel von BnCYP19-1 gezeigt ist, verliefen die Streukurven aller Konzentrationen gleich, wobei sich das Signal-zu-Rausch Verhältnis mit steigender Konzentration gerade im Bereich größerer Winkel deutlich verbesserte. Das gleiche Verhalten konnte auch für BnCYP18-4, BnCYP18-5 und AtCYP19-3 beobachtet werden.

Neben der Beurteilung der Streukurve bietet auch der Gyrationradius ( $R_g$ ) die Möglichkeit, konzentrationsabhängige Effekte aufzuzeigen. Hierbei würde die Abnahme des  $R_g$  auf eine interpartikuläre Abstoßung bzw. die Zunahme des  $R_g$  auf eine interpartikuläre Anziehung oder Aggregatbildung hinweisen (Jacques und Trehwella 2010). Keines der vier CYPs zeigte eine solche Konzentrationsabhängigkeit des  $R_g$  (Abbildung 25B). Genauso zeigten weder die Vorwärtsstreuung  $I(0)$  noch das daraus berechnete Molekulargewicht eine Konzentrationsabhängigkeit. Somit konnte die Auswertung mit den Daten der höchsten Qualität, welche denen der höchsten Konzentration mit dem besten Signal-zu-Rausch Verhältnis entsprachen, durchgeführt werden. Dies sind die Messungen von

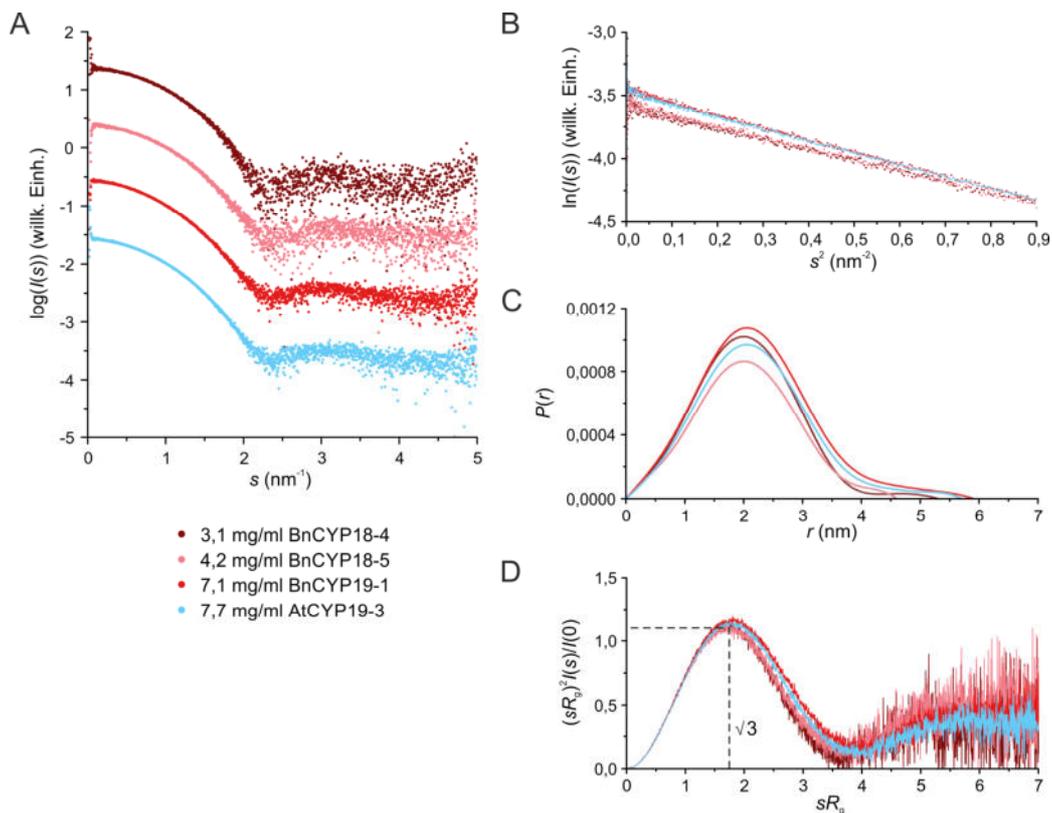


**Abbildung 25: Analyse konzentrationsabhängiger Effekte per SAXS.** (A) Streukurven von 1,6 bis 7,1 mg/ml BnCYP19-1. Alle Konzentrationen zeigen den gleichen Kurvenverlauf, wobei das Signal-zu-Rausch Verhältnis mit steigender Konzentration abnimmt. Rot markiert ist die Streukurve, mit welcher die weitere Auswertung durchgeführt wurde. Für die Darstellung wurden die Kurven mit einem Offset von 1 willk. Einh. nach oben verschoben. (B) Ein Indiz für konzentrationsabhängige Effekte liefert der Graph  $R_g$  vs.  $c$ . Hier kann für keines der vier CYPs eine Konzentrationsabhängigkeit des  $R_g$  beobachtet werden.

3,1 mg/ml BnCYP18-4, 4,2 mg/ml BnCYP18-5, 7,1 mg/ml BnCYP19-1 und 7,7 mg/ml AtCYP19-3.

Die Streukurven aller vier CYPs waren sehr ähnlich zueinander und zeigten einen typischen Kurvenverlauf für globuläre Proteine (Kikhney und Svergun 2015), wobei BnCYP18-4 und BnCYP18-5 aufgrund ihrer geringeren Konzentration ein schlechteres Signal-zu-Rausch Verhältnis zeigten, als BnCYP19-1 und AtCYP19-3 (Abbildung 26A). In der Auftragung nach Guinier (Guinier 1939) zeigten die Daten bei sehr kleinen Winkeln einen linearen Verlauf (Abbildung 26B). Dieser ist ein weiteres Indiz dafür, dass weder interpartikuläre Wechselwirkungen noch Polydispersität die Streukurve beeinflussen. In Tabelle 20 sind die für die Guinier-Annäherung verwendeten Parameter wie die Grenzen  $s_{\min}$  und  $sR_g \max$  sowie das Qualitätsmaß  $R^2$  angegeben. Für eine Kugel uniformer Streudichte gilt für die Guinier-Annäherung ein oberes Limit ( $sR_g \max$ ) von  $<1,3$  (Feigin *et al.* 1987). Dieses konnte für die Annäherung der CYP-Daten angelegt werden und spricht damit bereits für eine gleichmäßige, globuläre Form.

Auch die  $P(r)$ -Funktion, welche eine Verteilung aller Elektronenpaardistanzen eines Partikels darstellt, zeigt mit ihrem glockenförmigen Verlauf eine typische Verteilung für globuläre Proteine (Abbildung 26C). Allerdings war hier bereits ersichtlich, dass es eine geringe Anzahl an größeren Distanzen gab, was für



**Abbildung 26: Vergleich der mit SAXS untersuchten CYPs.** Die Auswertung erfolgte mit den Messdaten von 3,1 mg/ml BnCYP18-4, 4,2 mg/ml BnCYP18-5, 7,1 mg/ml BnCYP19-1 und 7,7 mg/ml AtCYP19-3. (A) Vergleich der für die Auswertung verwendeten Streukurven. (B) Die lineare Guinier-Region liefert sowohl einen Nachweis für die Qualität der Proben, als auch den  $R_g$  und die Vorwärtsstreuung  $I(0)$ . Vor der Darstellung wurden die Daten aufeinander skaliert. (C) Die  $P(r)$ -Funktion zeigt einen glockenförmigen Verlauf. (D) Der dimensionslose Kratky Plot ermöglicht einen direkten Vergleich der Form verschiedener Proteine, unabhängig von deren Größe und Konzentration.

einen kleinen, verlängerten, aus der globulären Form herausragenden Bereich spricht. Die über die Guinier-Annäherung und die  $P(r)$ -Funktion unabhängig voneinander bestimmten  $R_g$ - und  $I(0)$ -Werte (siehe Tabelle 20) lagen sehr nah beieinander und zeigten hiermit eine starke Selbstkonsistenz der Streuprofile (Trehwella *et al.* 2017).

Mit einem dimensionslosen Kratky Plot (Kratky 1982) kann aus den Streudaten der Anteil an gefalteten bzw. flexiblen Bereichen bestimmt werden. Wie es für globuläre Proteine typisch ist, zeigte dieser für alle vier CYPs einen glockenförmigen Kurvenverlauf mit einem Maximum von 1,1 bei  $sR_g = \sqrt{3}$  (Abbildung 26D). Allerdings war für die beiden größeren CYPs, BnCYP19-1 und AtCYP19-3, eine leichte Verschiebung des Maximums nach rechts oben zu sehen. Dies weist darauf hin, dass diese Proteine in

**Tabelle 20: Zusammenfassung der SAXS Probendetails und deren Auswertung.** Diese Tabelle bietet eine Übersicht aller relevanten Daten der untersuchten Proteine und ihrer SAXS-Auswertung.

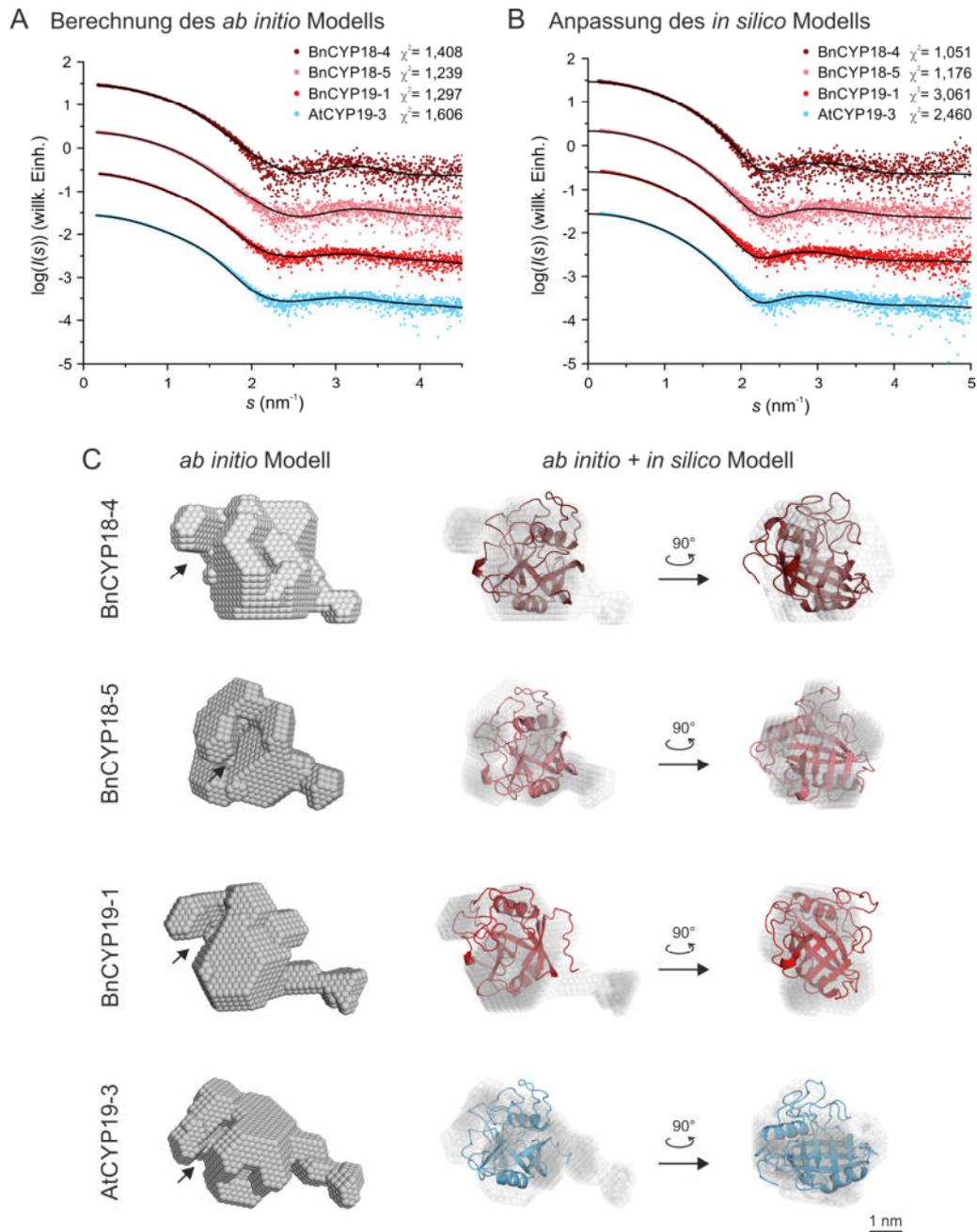
	BnCYP18-4	BnCYP18-5	BnCYP19-1	AtCYP19-3
<b>Probendetails</b>				
<b>Gen ID</b>	<i>BnaC03g60160D</i>	<i>BnaA09g08780D</i>	<i>BnaA09g35540D</i>	<i>At3g56070</i>
<b>UniProt ID</b>	A0A078DMP0	A0A078IDN6	A0A078GRH6	Q28867
<b>Extinktionskoeffizient</b>	8480	11460	9970	9970
<b>MW<sub>theor</sub> (kDa)</b>	18,6	18,7	19,9	19,2
<b>Konzentrationsreihe (mg/ml (μM))</b>	1,4 (77)	2,4 (129)	1,6 (81)	1,6 (85)
	3,1 (166)	3,5 (186)	3,1 (157)	3,0 (157)
		4,2 (225)	4,6 (233)	4,8 (249)
			7,1 (359)	7,7 (402)
<b>Verwendete Konzentration (mg/ml)</b>	3,1	4,2	7,1	7,7
<b>Strukturelle Parameter</b>				
<b>DLS</b>				
<b><math>R_h</math> (nm)</b>	2,1 ± 0,1	2,4 ± 0,4	2,3 ± 0,1	3,0 ± 0,2
<b>Guinier-Analyse</b>				
<b><math>I(0)</math></b>	0,027 ± 0,00005	0,028 ± 0,000054	0,031 ± 0,000039	0,031 ± 0,000037
<b><math>R_g</math> (nm)</b>	1,58 ± 0,22	1,60 ± 0,06	1,72 ± 0,02	1,70 ± 0,22
<b><math>s_{min}</math> (nm<sup>-1</sup>)</b>	0,12	0,16	0,17	0,15
<b><math>sR_g</math> max</b>	1,30	1,30	1,30	1,30
<b><math>R^2</math></b>	0,90	0,94	0,96	0,96
<b>MW<sub>I(0)</sub> (MW<sub>I(0)</sub>/MW<sub>theor</sub>)</b>	14,9 (0,80)	15,4 (0,82)	17,1 (0,86)	17,1 (0,89)
<b><math>P(r)</math>-Analyse</b>				
<b><math>I(0)</math></b>	0,030 ± 0,00007	0,023 ± 0,00004	0,027 ± 0,00004	0,028 ± 0,00003
<b><math>R_g</math> (nm)</b>	1,56 ± 0,005	1,57 ± 0,003	1,72 ± 0,003	1,68 ± 0,002
<b><math>D_{max}</math> (nm)</b>	5,3	4,6	5,9	5,7
<b>Porod Volumen <math>V_p</math> (nm<sup>-3</sup>)</b>	28,36	33,12	29,00	33,12
<b>MW<sub>I(0)</sub> (MW<sub>I(0)</sub>/MW<sub>theor</sub>)</b>	15,8 (0,85)	12,7 (0,68)	14,1 (0,71)	14,7 (0,77)
<b>Qualität</b>	0,84	0,87	0,83	0,80
<b>Modellerstellung</b>				
<b>DAMMIF</b>				
<b>Symmetrie, Anisotropie</b>	P1, nicht bekannt	P1, nicht bekannt	P1, nicht bekannt	P1, nicht bekannt
<b><math>\chi^2</math></b>	1,408	1,239	1,297	1,606
<b>mittlerer NSD</b>	0,887 ± 0,037	1,009 ± 0,053	1,084 ± 0,100	0,928 ± 0,048
<b>Kristallstruktur als Basis für das Homologiemodell</b>	CsCYP mit CsA	CsCYP mit CsA	CsCYP mit CsA	CsCYP mit CsA
<b>PDB ID</b>	4JJM	4JJM	4JJM	4JJM
<b>CRYSOL</b>				
<b><math>\chi^2</math></b>	1,051	1,176	3,061	2,460

ihrer Form hauptsächlich globulär sind, aber im Vergleich zu den kleineren CYPs auch einen sehr kleinen Anteil an Flexibilität aufweisen (Durand *et al.* 2010).

Die Ergebnisse konnten durch eine Wiederholung des Experiments bestätigt werden. Hierfür wurden BnCYP18-4 und BnCYP19-1 insgesamt an drei verschiedenen Messzeiten ( $n = 3$ ) und BnCYP18-5 an zwei Messzeiten ( $n = 2$ ) unabhängig voneinander untersucht. Bei der letzten verfügbaren Messzeit konnte zusätzlich AtCYP19-3 gemessen werden ( $n = 1$ ).

Zur Erstellung von *ab initio* Modellen wurden mit DAMMIF jeweils 20 Modelle generiert. Ein Modell wird hierbei aus *dummy atom models*, also Kugeln, welche Volumenelemente repräsentieren, rekonstruiert. Ein Maß für die Qualität der Modelle ist die NSD (normalisierte räumliche Abweichung, Engl.: *normalised spatial discrepancy*), welche auch die Auswahl des wahrscheinlichsten Modells ermöglicht. Die Modelle waren, jedes CYP für sich betrachtet, sehr ähnlich zueinander, was durch den geringen Fehler der mittleren NSD bestätigt wurde (Tabelle 20). Das wahrscheinlichste Modell ist demnach jenes mit der geringsten NSD (Franke *et al.* 2017). Zusätzlich wurde aus jedem Modell eine theoretische Streukurve berechnet und diese mit den experimentellen Streudaten verglichen (Abbildung 27A). Der  $\chi^2$ -Wert gibt dabei an, wie ähnlich sich die Streukurven sind und sollte idealerweise bei 1 liegen. Für die ausgewählten Modelle liegt dieser nahe an 1. Die *ab initio* Modelle der vier CYPs sind in Abbildung 27C gezeigt. Alle vier Modelle zeigten eine ähnliche, kompakte, globuläre Form mit einer „Höhle“ (linke Seite, schwarzer Pfeil) sowie einem elongierten Bereich (rechte Seite). Durch die Überlagerung von *ab initio* und *in silico* Modell zeigt sich, dass die „Höhle“ das aktive Zentrum darstellt, an welches Substrate oder Inhibitoren binden können.

Die Ähnlichkeit von *in silico* und *ab initio* Modell wurde mit CRY SOL evaluiert. CRY SOL berechnet Streukurven aus *in silico* Modellen und vergleicht diese mit den experimentellen Streudaten (Abbildung 27B). Auch bei diesem Vergleich ist der  $\chi^2$ -Wert ein Maß für die Ähnlichkeit. Auffällig war hier, dass die *in silico* Modelle von BnCYP18-4 und BnCYP18-5 sehr gut zu den Streudaten passten. Das Qualitätsmaß  $\chi^2$  lag für beide Vergleiche sehr nah an 1. Im Gegensatz dazu zeigten die 19 kDa großen BnCYP19-1 und AtCYP19-3 eine geringere Ähnlichkeit zwischen *ab initio* und *in silico* Modell. Des Weiteren zeigte das *in silico* Modell, dass N- und C-Terminus parallel zueinander auf der gleichen Seite liegen. Nach der Überlagerung mit dem *ab initio* Modell befinden sich diese in der Nähe des elongierten Bereichs. Es konnte aber kein Teil des *in silico* Modells passend in diesen gelegt werden, weshalb die Vermutung nahe liegt, dass ein Teil des Proteins in Lösung flexibler ist, als im Kristall. Eine Untersuchung der Flexibilität beider Termini mit SREFLEX (basierend auf dem *in silico* Modell) und CORAL (basierend auf dem *ab initio* Modell) lieferte keine besseren Modelle, zeigte aber dennoch, dass der C-Terminus flexibel sein könnte, der N-Terminus dagegen nicht. Zudem bestand der größte Unterschied zwischen den untersuchten 18 und 19 kDa CYPs in der Länge des C-Terminus. Demnach könnte die Diskrepanz zwischen *in silico* Modell und den Streudaten durch einen hochflexiblen C-Terminus zustande kommen, welcher durch das *in silico* Modell nicht vollständig dargestellt werden kann und dieses deshalb stärker von den Streudaten abweicht, als die Modelle der kleineren CYPs mit deren kürzeren C-Termini.



**Abbildung 27: SAXS Modelle von BnCYP18-4, BnCYP18-5, BnCYP19-1 und AtCYP19-3.** (A) Vergleich von experimentellen Streudaten und der berechneten Streukurve des besten *ab initio* Modells. (B) Vergleich von *in silico* Modell mit experimentellen Streudaten. (C) Überlagerte *ab initio* und *in silico* Modelle. Das *in silico* Modell wird dabei so positioniert, dass es in das *ab initio* Modell passt.

Die hier gewonnenen Ergebnisse liefern einen ersten Beitrag zu der strukturellen Aufklärung von *B. napus* und *A. thaliana single-domain* CYPs. Gleichzeitig stellen diese die ersten SAXS-Daten von CYPs dar und bestätigen anhand der sehr ähnlichen globalen Faltung der vier untersuchten CYPs die artenübergreifende, hohe Konservierung der Domäne. Eine neue, bisher nicht beschriebene Erkenntnis ist, dass der

C-Terminus flexibel zu sein scheint. Weitere flexible Bereiche konnten ohne die Zugabe eines Interaktionspartners nicht identifiziert werden.

### 3.5.2 Untersuchung von strukturellen Änderungen durch Inhibitorbindung

Um zu untersuchen, ob die Bindung eines Interaktionspartners, Substrats oder Inhibitors Auswirkungen auf die Struktur von Cyclophilinen hat, es also flexible Bereich gibt, wurden weitere SAXS Messungen mit BnCYP18-4, BnCYP18-5, BnCYP19-1 und AtCYP19-3 durchgeführt. Als Inhibitor wurde der kompetitive, reversibel bindende Inhibitor Cyclosporin A (CsA) verwendet, welcher bereits im PPIase Assay zum Einsatz kam. Hierbei ist zu erwähnen, dass für die Versuche zwei verschiedene Varianten von CsA zur Verfügung standen, eine in Pulverform (von Sigma-Aldrich) und eine bereits gelöste (Sandimmun von Novartis). Generell ist CsA in Wasser schwer, in organischen Lösemitteln hingegen gut löslich. Wie Vorversuche mit BnCYP18-4 und BnCYP19-1 zeigten, kann CsA (Sigma-Aldrich) in DMSO gelöst mit nur maximal 40  $\mu\text{M}$  eingesetzt werden. Dies entspricht einer Endkonzentration von 20 % DMSO im Ansatz. Bei höheren Konzentrationen an DMSO begann das Protein zu präzipitieren. Im Präparat Sandimmun hingegen liegt CsA in 34 % (v/v) Ethanol und Macroglycerolricinoleat/Polyoxyl-40-hydriertem Rizinusöl bereits gelöst vor. Durch diese Kombination wird die Löslichkeit erhöht, sodass eine deutlich höhere Molarität eingesetzt werden kann. Deshalb wurde für die SAXS-Messungen CsA in Form des Präparats Sandimmun verwendet.

Um den Enzym-Inhibitor-Komplex untersuchen zu können, muss der Inhibitor im Überschuss eingesetzt werden, damit das Gleichgewicht in die entsprechende Richtung gebracht wird. Aus dem PPIase Assay (Abschnitt 3.4) ist ersichtlich, dass ein 100-facher Überschuss eine komplette Inhibierung des Enzyms zur Folge hat. Dementsprechend müssten optimalerweise 40 mM CsA eingesetzt werden, um auch bei der höchsten Proteinkonzentration einen Überschuss an Inhibitor zu erreichen. Da die sehr hohe Viskosität des Präparats dem entgegen stand und dieses deshalb verdünnt werden musste, konnten schlussendlich nur 1,6 mM CsA eingesetzt werden und somit kein Überschuss erreicht werden. Innerhalb einer Konzentrationsreihe wurde die Menge an CsA und Puffer konstant gehalten, nur die Proteinkonzentration wurde verändert und bewegte sich analog zu den bereits präsentierten SAXS-Daten aus Abschnitt 3.5.1 zwischen 1 und 8 mg/ml bzw. 70 bis 400  $\mu\text{M}$ . Dadurch kommt es mit der Veränderung der Proteinkonzentration auch zu einer Verschiebung des Gleichgewichts, sodass zwischen den Messungen mit variierenden Mengen an freiem Protein und Inhibitor zu rechnen ist.

Im Vergleich zu den SAXS Messungen aus Abschnitt 3.5.1, kam es durch das Präparat Sandimmun zu einer Veränderung der Pufferzusammensetzung (Tabelle 21). Das darin enthaltene Rizinusöl bildete Mizellen, welche anhand ihres charakteristischen Kurvenverlaufs in den Rohdaten zu sehen sind (Abbildung 28A). Da diese aber sowohl in der Messung von Protein mit CsA als auch in der dazugehörigen Referenzmessung von Puffer mit CsA auftraten, konnte die aus ihnen resultierende Streuung vollständig subtrahiert werden und taucht somit in den prozessierten Daten nicht mehr auf (Abbildung 28B).

Tabelle 21: Pufferzusammensetzung der per SAXS gemessenen Proben.

CYP (aus Abschnitt 3.5.1)	CYP + CsA
20 mM Tris, pH 7,4	16 mM Tris, pH 7,4
300 mM NaCl	240 mM NaCl
1 mM DTT	0,8 mM DTT
	1,6 mM Cyclosporin A
	1,4 % (v/v) Ethanol
	etwa 2,5 % (v/v) Rizinusöl

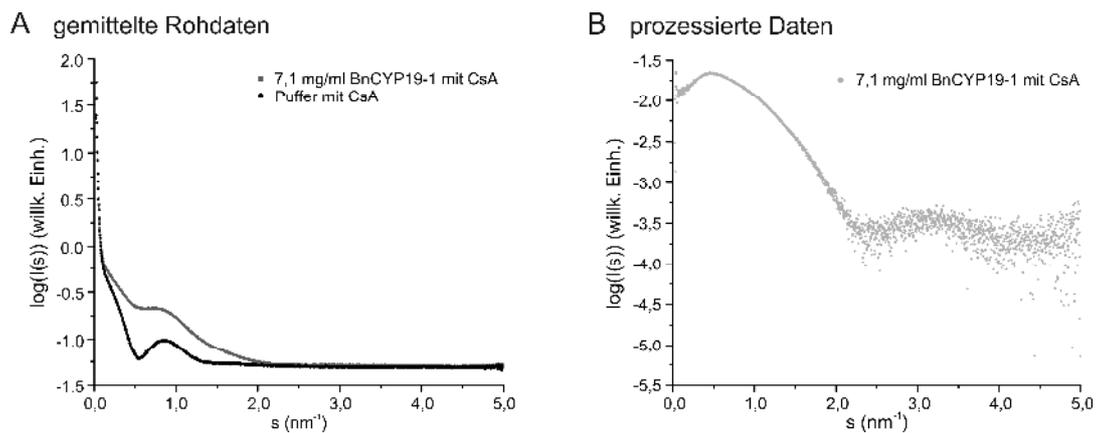
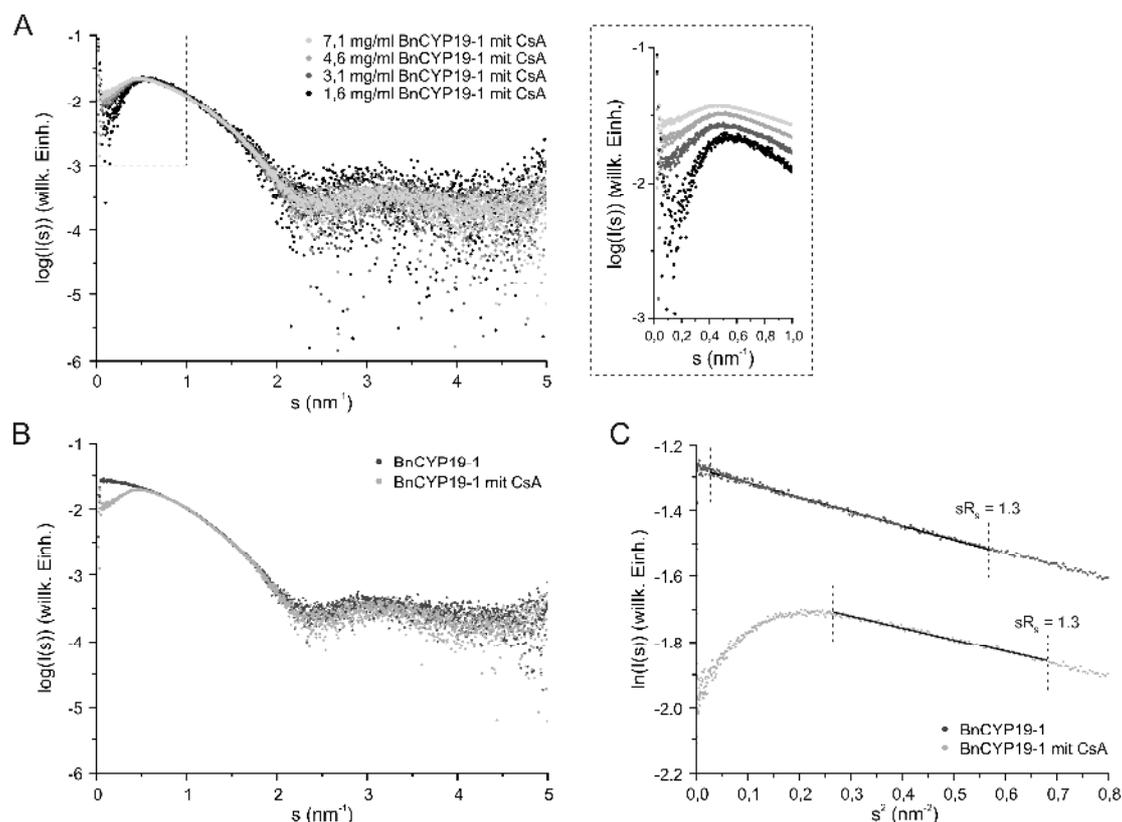


Abbildung 28: Exemplarische Darstellung von Roh- sowie prozessierten Streudaten der SAXS-Messungen mit CsA.

(A) Gezeigt sind die gemittelten Rohdaten von je 20 Einzelmessungen 7,1 mg/ml BnCYP19-1 mit 1,6 mM CsA bzw. als Referenz Puffer mit 1,6 mM CsA. (B) Diese werden im Rahmen der Prozessierung voneinander subtrahiert und ergeben die endgültige Streukurve.

Die Streudaten aller vier untersuchter CYPs zeigten im verwendeten Konzentrationsbereich bei sehr kleinen Winkeln eine deutliche interpartikuläre Abstoßung (exemplarisch für BnCYP19-1 gezeigt in Abbildung 29A). Da zusammen mit CsA allerdings auch Ethanol und Rizinusöl zugegeben wurde, kann ohne weitere Versuche nicht geklärt werden, woher dieser Effekt rührt. Um dieses Rätsel zu lösen, bieten sich zwei verschiedene SAXS-Strategien an: Zum einen könnten Ethanol und Rizinusöl separat eingesetzt werden, sodass deren Effekt auf das Protein beobachtet werden kann. Zum anderen könnte aber auch ein Puffertausch nach Bildung des CYP:CsA-Komplexes mithilfe einer Entsalzungssäule und anschließender SAXS-Messung des eluierten Komplexes durchgeführt werden. In diesem Fall wären durch den Puffertausch weder Ethanol, noch Rizinusöl in der Probe enthalten. Erst wenn nachgewiesen ist, dass die zusätzlichen Komponenten keine Auswirkungen auf das CYP haben, kann man davon ausgehen, dass jegliche Änderungen der Streuung durch CsA verursacht werden. Und erst dann sind die Daten robust auswertbar. Auffällig war auch, dass die Abstoßung mit steigender Proteinkonzentration geringer wurde. Dies widerspricht dem Grundsatz, dass bei einer größeren Teilchenmenge auch eine höhere Dichte und damit Abstoßung vorliegen müsste.



**Abbildung 29: Konzentrationsreihe von BnCYP19-1 mit CsA und Vergleich mit Daten ohne Inhibitor.** (A) Streukurven der BnCYP19-1 Konzentrationsreihe. Der Ausschnitt zeigt die Abstoßung bei sehr kleinen Winkeln, wobei hier zum besseren Vergleich der Daten diese mit einem Offset von jeweils 0,005 willk. Einh. nach oben verschoben wurden. (B) Vergleich von 7,1 mg/ml BnCYP19-1 mit und ohne CsA. (C) Guinier Plot von 7,1 mg/ml BnCYP19-1 mit und ohne CsA. Zur besseren Ansicht wurde der Graph von BnCYP19-1 mit einem Offset von 0,3 willk. Einh. nach oben verschoben.

Vergleich man die Streukurven mit und ohne CsA, so zeigten diese im restlichen Kurvenverlauf keine starken Unterschiede (Abbildung 29B). Die Streuung und damit auch die Form war erwartungsgemäß ähnlich. Die Auftragung nach Guinier zeigte durch den Abstoßungseffekt bedingt unterschiedlich angelegte Begrenzungen, um einen linearen Bereich bei möglichst kleinen Winkeln annähern zu können (Abbildung 29C). Dies wirkte sich auf den  $R_g$  sowie dessen Fehler und damit auch auf das Qualitätsmaß  $R^2$  aus (Tabelle 22), was zeigt, dass die Datenqualität durch die Zugabe von CsA deutlich abgenommen hat. Ohne zu klären, weshalb es zur interpartikulären Abstoßung kommt, war deshalb eine weitere Auswertung der Daten nicht gewinnbringend.

**Tabelle 22: Guinier-Analyse von BnCYP18-4, BnCYP18-5, BnCYP19-1 und AtCYP19-3 mit und ohne CsA.** Die Werte der Analyse ohne CsA stammen aus Tabelle 20 und sind hier zum Vergleich noch einmal aufgeführt.

Protein	ohne CsA		mit CsA	
	$R_g$	$R^2$	$R_g$	$R^2$
BnCYP18-4	$1,58 \pm 0,22$	0,90	$1,48 \pm 2,03$	0,72
BnCYP18-5	$1,60 \pm 0,06$	0,94	$1,44 \pm 3,77$	0,70
BnCYP19-1	$1,72 \pm 0,02$	0,96	$1,57 \pm 1,29$	0,78
AtCYP19-3	$1,70 \pm 0,22$	0,96	$1,56 \pm 0,43$	0,78

Als ein erstes Ergebnis dieser Studie lässt sich dennoch herausarbeiten, dass sich die globale Faltung der vier untersuchten CYPs durch die Zugabe von CsA nicht stark veränderte. Es wird vermutet, dass das aktive Zentrum nicht sehr flexibel ist. Ob sich aber andere Bereiche des Proteins durch die Bindung eines größeren Interaktionspartners, als es CsA mit 1,2 kDa ist, verändern, bleibt zu untersuchen.

### 3.5.3 Röntgenstrukturanalyse für die atomare Auflösung

Nachdem also gezeigt werden konnte, dass sich die untersuchten *single-domain* CYPs in ihrer allgemeinen Proteinform nur geringfügig voneinander unterscheiden und die CsA-Bindung vermutlich kaum Auswirkungen auf die Faltung hat, sollten Unterschiede auf atomarer Ebene mithilfe der Röntgenstrukturanalyse untersucht werden. Im Gegensatz zu SAXS werden hierfür Proteinkristalle benötigt. Für die Kristallisation wurden zwei verschiedene *single-domain* BnCYPs, BnCYP18-4 und BnCYP19-1, sowie deren Homologe AtCYP18-3 und AtCYP19-1 ausgewählt. Durch diesen Ansatz sollte es möglich sein, den Einfluss einzelner Aminosäuren auf verschiedene Bereiche des Proteins wie das aktive Zentrum zu studieren.

Die Bildung von Proteinkristallen ist von mehreren Faktoren abhängig. Wichtig sind neben der Proteinkonzentration auch Pufferkomponenten (Puffersubstanz, pH, Salze, weitere Additive), Präzipitant, die Umgebungstemperatur sowie die Kristallisationsmethode. Des Weiteren können auch Liganden zugegeben werden, welche dann die Kristallisation fördern (Co-Kristallisation) (Benvenuti und Mangani 2007; Bergfors 2009). Die richtige Kombination an Bedingungen zu finden stellt eine große Herausforderung dar und folgt dem Versuch-und-Irrtum-Prinzip. Eine große Anzahl an Bedingungen kann mit kommerziell erhältlichen Kristallisationstests überprüft werden. Wichtig für die Anwendung solcher Kristallisationstests im Hochdurchsatzverfahren ist vor allem, dass die benötigte Proteinmenge im µg-Bereich bereitgestellt werden kann. Dies stellte durch das etablierte Aufreinigungprotokoll für alle vier CYPs kein Problem dar.

Die Kristallisationstests wurden in Kombination mit der *sitting drop vapor diffusion* Kristallisationstechnik verwendet. Diese macht sich zwei separierte Lösungen zunutze, zum einen die Reservoirolösung, in welcher sich der Kristallisationspuffer mit dem Präzipitanten befindet, und zum anderen die Proteinlösung, welche 1:1 mit der Reservoirolösung gemischt ist. Durch das Einstellen eines Equilibriums zwischen der Proteinlösung und der Reservoirolösung wird der Proteinlösung Wasser entzogen und die Konzentration von Protein, Präzipitant, Salzen und weiteren Bestandteilen der Proteinlösung erhöht, womit die Kristallbildung gefördert wird (Bergfors 2009).

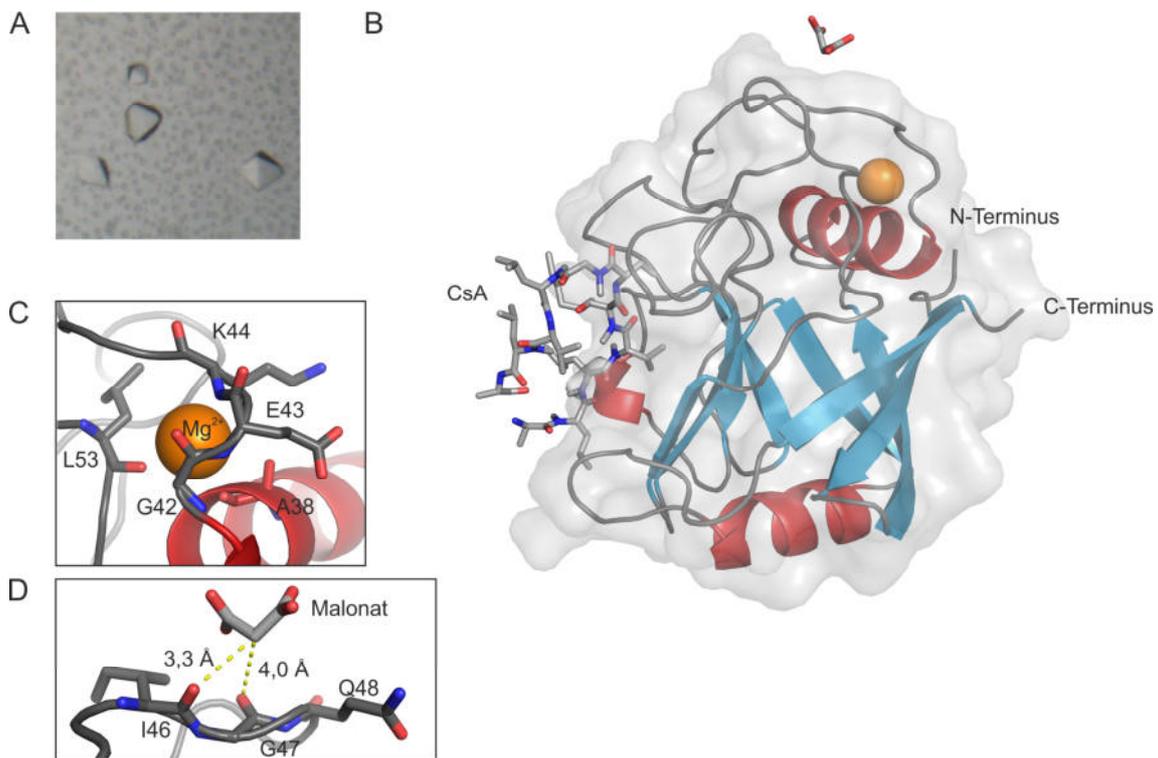
BnCYP18-4, BnCYP19-1, AtCYP18-3 und AtCYP19-1 wurden in mehreren Versuchsreihen in den beschriebenen Kristallisationstests mit der *sitting drop vapor diffusion* Kristallisationstechnik eingesetzt. Dabei wurden unterschiedlichen Proteinkonzentrationen verwendet und eine Co-Kristallisation durch Zugabe des Inhibitors CsA getestet. Für BnCYP18-4, AtCYP18-3 und AtCYP19-3 konnte auch nach 9 Monaten (BnCYP18-4) bzw. 3 Monaten (AtCYP18-3, AtCYP19-3) keine Kristallbildung mit den beschriebenen Kristallisationstests beobachtet werden. Es konnten aber die Bildung von Phasenseparationen,

Präzipitaten und Nadelstrukturen induziert werden. Phasenseparationen und Nadelstrukturen sind ein Hinweis darauf, dass eine Kristallbildung unter optimierten Bedingungen möglich sein könnte. Deshalb könnte hier ausgehend von den gewonnenen Erkenntnissen eine Optimierung der Konditionen, wie andere Temperaturen und höhere Proteinkonzentrationen oder eine Variation der Puffer, Präzipitanten und Salze, getestet werden. Des Weiteren könnten die gewonnenen Nadelstrukturen in Anlehnung an die sogenannte *Seeding* Technik als Nukleationskeim verwendet werden und damit die Kristallbildung in neuen Ansätzen fördern (Thaller *et al.* 1981).

Zudem konnte beobachtet werden, dass alle vier CYPs unter Zugabe von CsA eine größere Neigung zur Phasentrennung zeigten. Die Co-Kristallisation mit CsA scheint sich demnach positiv auszuwirken. Wie bereits in Abschnitt 3.5.2 beschrieben, stand CsA von zwei verschiedenen Herstellern zur Verfügung. Wurde CsA von Sigma-Aldrich in DMSO gelöst und dieses in hohen Konzentrationen eingesetzt, war dies dafür verantwortlich, dass die CYPs ausfielen (siehe Abschnitt 3.5.2). Dies konnte auch in den ersten Versuchsreihen zur Kristallisation beobachtet werden. Für die anschließenden Experimente wurde deshalb CsA von Novartis verwendet und dieses ist dementsprechend auch für zukünftige Experimente zu bevorzugen.

Im Gegensatz zu BnCYP18-4, AtCYP18-3 und AtCYP19-3 konnte BnCYP19-1 im Komplex mit CsA erfolgreich kristallisiert und aus einem dieser Kristalle die Struktur bestimmt werden. Der per Röntgenstrukturanalyse untersuchte Kristall entstammt Puffer F9 des JCSG-*plus*<sup>TM</sup> HT-96 Kits (2,4 M Natriummalonat pH 7,0). In diesem Ansatz wurden 20 mg/ml Protein mit CsA (Sigma-Aldrich) co-kristallisiert. Nach 3 Wochen Inkubation bei 20 °C wuchsen Kristalle mit bis zu einer Größe von 200x200x200  $\mu\text{m}^3$ . Diese zeigten zwei unterschiedliche Formen, eine doppelte Pyramide und eine tetraedrische Pyramide mit stumpfen Spitzen (Abbildung 30A). Beide Formen wurden auch unter weiteren erfolgreichen Kristallisationsbedingungen beobachtet. Der per Röntgenstrukturanalyse untersuchte Kristall besaß eine bipyramidale Form.

Aus diesem Kristall konnte eine monomere Struktur mit einer Auflösung von 1,98 Å gewonnen werden, welche in der PDB Datenbank unter der ID 6HMZ veröffentlicht wurde. Wie gezeigt werden konnte (Abbildung 30B), wird die Tertiärstruktur von BnCYP19-1 von acht  $\beta$ -Strängen in Form eines antiparallelen  $\beta$ -Zylinders und drei  $\alpha$ -Helices gebildet und repräsentiert damit die typische Struktur einer CLD. Hierbei befinden sich die  $\alpha$ -Helices I und III ( $\alpha$ I und  $\alpha$ III) auf den gegenüberliegenden Öffnungen des  $\beta$ -Zylinders. Für die dritte  $\alpha$ -Helix,  $\alpha$ II, wurde gezeigt, dass diese sehr kurz ist und nur aus einer einzigen Umdrehung besteht. Sie befindet sich im aktiven Zentrum und ist vermutlich, basierend auf den erhobenen Daten, an der CsA-Bindung beteiligt. Die N- und C-Termini wurden, vom aktiven Zentrum aus betrachtet, nebeneinander auf der Rückseite des Proteins lokalisiert. Am C-Terminus fehlen 10 Aminosäuren, welche anhand der Elektronendichte nicht definiert werden konnten. Denn ist ein Teil eines Proteins sehr flexibel, kann an dieser Stelle keine eindeutige Elektronendichte detektiert werden. Somit konnte auch per Röntgenstrukturanalyse nachgewiesen werden, dass der C-Terminus sehr flexibel und unstrukturiert ist. Am N-Terminus konnten aus demselben Grund die ersten drei Aminosäuren des

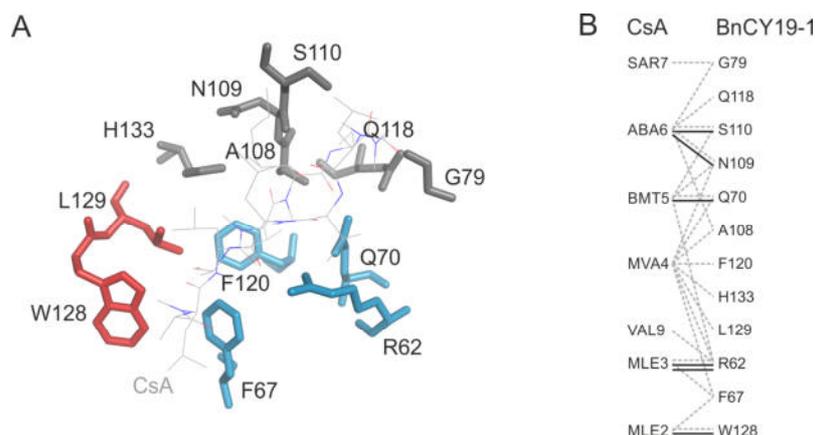


**Abbildung 30: Röntgenstrukturanalyse eines BnCYP19-1-Kristalls.** (A) BnCYP19-1-Kristalle mit CsA in 2,4 M Natriummalonat pH 7,0. (B) Aufgelöste Kristallstruktur von BnCYP19-1 im Komplex mit CsA. Zusätzlich konnten ein Magnesiumion (C) und ein Malonatmolekül identifiziert werden (D).

rekombinanten Konstrukts (GSH) nicht detektiert werden, weshalb die Struktur in der PDB-Datei mit dem Start-Methionin des Proteins beginnt.

BnCYP19-1 zeigte in seiner Kristallstruktur eine bisher noch nicht beschriebene Magnesium-Bindestelle (Abbildung 30C). Der Bindungsabstand ist mit  $\geq 2,6 \text{ \AA}$  grenzwertig, da eine typisch ionische Bindung von Magnesium zu Sauerstoff etwa  $2,1 \text{ \AA}$  lang ist (Zheng *et al.* 2017). Auch mit dem CMM Tool (CheckMyMetal), welches Metallbindestellen in Makromolekülen validiert, wird diese Bindestelle als unwahrscheinlich gewertet. Mit PDBsum hingegen werden drei Wasserstoffbrücken ( $2,6-3,0 \text{ \AA}$ ) und mehrere elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den gezeigten Aminosäuren und  $\text{Mg}^{2+}$  prognostiziert. Des Weiteren wurde ein Malonatmolekül identifiziert, welches mit  $3,3$  und  $4,0 \text{ \AA}$  zwei schwache Wasserstoffbrücken mit I46 und G47 ausbilden kann (Abbildung 30D) (Jeffrey 1997).

Das aktive Zentrum wird von kurzen  $\beta$ -Strängen gebildet, auf welchen das CsA „aufliegt“. Neben vier Aminosäuren der  $\beta$ -Stränge sind sechs Aminosäuren der darüber liegenden Schleifen an der CsA-Bindung beteiligt. Auch die  $\alpha$ -Helix II ist mit W128 und L129 vertreten, sodass insgesamt 12 Aminosäuren für die Bindung des Inhibitors sorgen (Abbildung 31A). Für HsCYPA sind vor allem W121, R55, F60 und H126 als wichtige Aminosäuren im aktiven Zentrum beschrieben (Zydowsky *et al.* 1992; Liu *et al.* 1991). Wie anhand der gewonnenen Daten ersichtlich ist, sind diese auch in BnCYP19-1 an der CsA-Bindung im aktiven Zentrum beteiligt (Abbildung 31B, W128, R62, F67, H133). Insgesamt sind sechs Wasserstoffbrückenbindungen (Tabelle 23) sowie mehrere elektrostatische Wechselwirkungen an der CsA-Bindung



**Abbildung 31: Die CsA-Bindestelle im aktiven Zentrum von BnCY19-1.** (A) An der CsA-Bindung sind sowohl Aminosäuren der  $\beta$ -Stränge (blau) und Schleifen (grau), als auch der  $\alpha$ -Helix  $\alpha$ II (rot) beteiligt. (B) Neben der Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen (schwarz) wird die Bindung von CsA auch durch elektrostatische Wechselwirkungen (grau, unterbrochen) unterstützt.

beteiligt. Interessant ist S110, welches bisher nicht als an der CsA-Bindung beteiligt beschrieben wurde. Betrachtet man die strukturell bereits aufgeklärten pflanzlichen *single-domain* CYPs sowie das humane CYP<sub>A</sub>, tragen weder HsCYP<sub>A</sub>, noch CsCYP oder TaCYP<sub>A</sub>-1 an dieser Stelle ein Serin, sondern besitzen alle an dieser Position ein Alanin (ein Sequenzvergleich befindet sich in Campos *et al.* (2013)). S110 führt in BnCY19-1 zu einer zusätzlichen Wasserstoffbrücke. Es könnte vermutet werden, dass sich hierdurch die Bindungseigenschaften für Substrate verändern. Im PPIase Assay konnten geringe Unterschiede zwischen den untersuchten CYPs in deren Affinität zu CsA beobachtet werden (Abschnitt 3.4). Diese waren allerdings nicht signifikant und können durch die zusätzliche Wasserstoffbrücke nicht erklärt werden, da durch diese eine stärkere Bindung zu vermuten wäre, welche aber nicht zu beobachten war. Dennoch könnte diese Wasserstoffbrücke die Bindung anderer Substrate begünstigen, denn die Position von S110 in der Tertiärstruktur lässt einen Einfluss auf eher größere Substrate vermuten. Neben BnCY19-1 tragen auch dessen Isoform BnCY19-2 sowie die Isoformen BnCY18-2 und BnCY18-3 ein Serin an Position 110 (Abbildung 12).

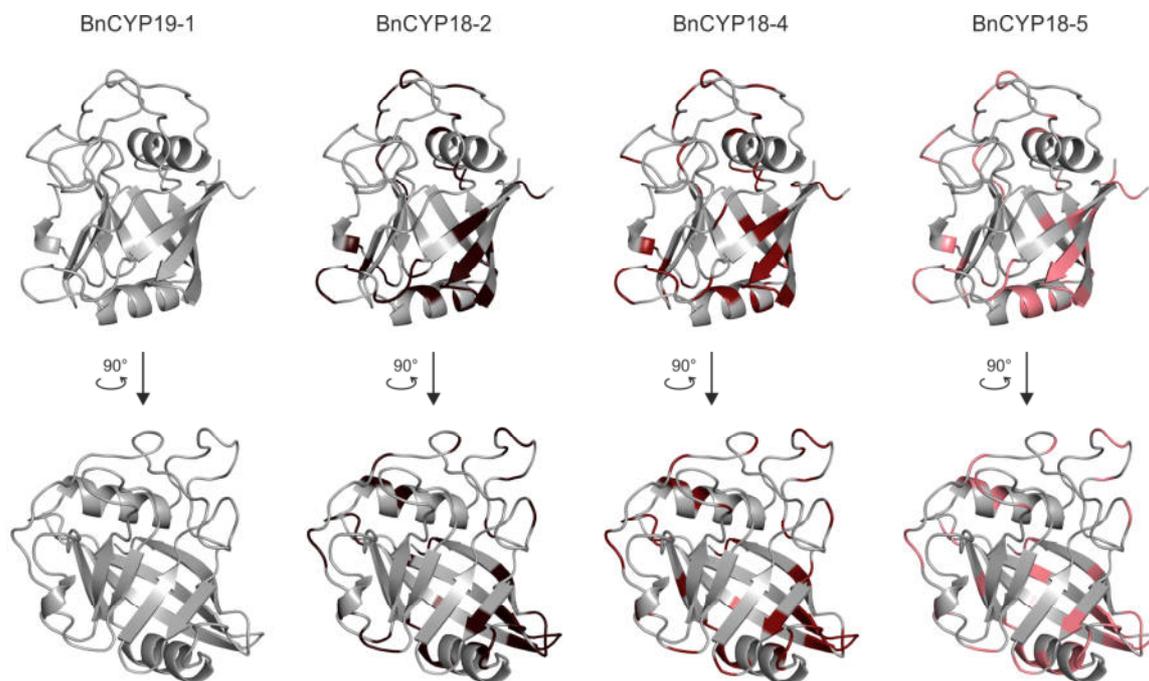
**Tabelle 23: Liste der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen BnCY19-1 und CsA.** Die Daten wurden mit PDBsum ermittelt.

CsA Aminosäure/Atom	BnCY19-1 Aminosäure/Atom	Distanz (Å)
MLE3/O	R62/NH1	3.1
MLE3/O	R62/NH2	3.0
BMT5/O	Q70/NE2	3.0
ABA6/N	N109/O	3.1
ABA6/O	S110/OG	2.9
MLE2/O	W128/NE1	2.9

### 3.5.4 Unterschiede in der Aminosäuresequenz der 18-19 kDa BnCYPs befinden sich überwiegend auf der Proteinoberfläche

Dass die Kristallstruktur von BnCYP19-1 erfolgreich aufgeklärt werden konnte, ermöglichte eine Untersuchung der 18-19 kDa BnCYPs auf atomarer Ebene. Als Vertreter für die unterschiedlichen Isoformenpaare wurden BnCYP18-2, BnCYP18-4 und BnCYP18-5 ausgewählt. Ein Vergleich der *in silico* Modelle dieser BnCYPs mit der aufgelösten Struktur von BnCYP19-1 zeigte, dass sich die 18-19 kDa BnCYPs in ihrer Tertiärstruktur nicht nennenswert unterscheiden. Interessant ist jedoch, dass Unterschiede in der Aminosäuresequenz zwischen diesen Kandidaten überwiegend auf der Oberfläche der Proteine, insbesondere im Bereich von Schleifen, zu finden sind (Abbildung 32). Zudem zeigen die Seitenketten in den meisten Fällen nach außen und es ist deutlich zu sehen, dass Aminosäureaustausche an ähnlichen Positionen auftreten. Das aktive Zentrum hingegen zeigt keine Unterschiede.

Dies bestätigt die bisherigen Erkenntnisse, dass das aktive Zentrum sowie die grundlegende Struktur hochkonserviert ist. Ein starker Aktivitätsunterschied dieser PPIasen ist deshalb nicht zu erwarten und konnte im PPIase Assay mit dem sehr kleinen Substrat (0,6 kDa) sowie CsA (1,2 kDa) auch nicht gezeigt werden (Abschnitt 3.4). Sowohl Substrat als auch CsA passen vollständig in das aktive Zentrum, sodass sich Unterschiede auf der Proteinoberfläche auf diese nicht auswirken. Dies ist vermutlich ein Grund dafür, weshalb anhand des Aktivitätsassays noch keine Aussage darüber getroffen werden konnte, ob sich



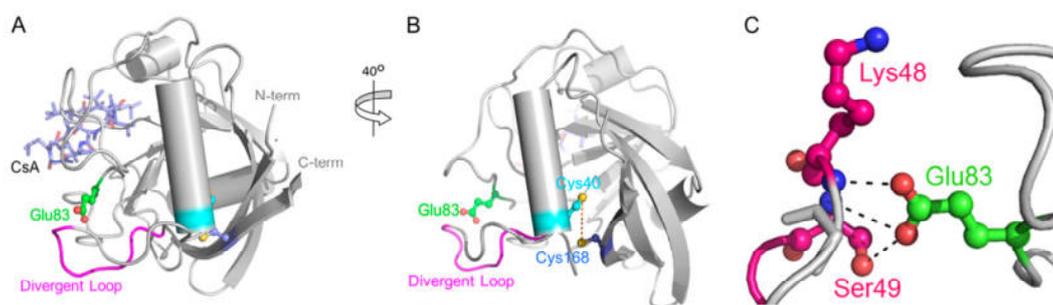
**Abbildung 32:** Übersicht zu Unterschieden zwischen BnCYP18-2, BnCYP18-4, BnCYP18-5 und BnCYP19-1. Dargestellt ist die BnCYP19-1-Kristallstruktur (grau) und farblich markiert sind Unterschiede in der Aminosäuresequenz zu BnCYP18-2, BnCYP18-4 und BnCYP18-5. Auffällig ist, dass sich die Unterschiede zum größten Teil auf der Proteinoberfläche befinden und es im aktiven Zentrum keine Austausche gibt (unterer Teil der Abbildung, Mitte). Dieses ist, wie auch die Tertiärstruktur, stark konserviert. Zu beachten ist, dass der C-Terminus von BnCYP19-1 nicht vollständig aufgelöst werden konnte. Dieser stellt im Vergleich zu den anderen BnCYPs ebenfalls einen Unterschied dar.

die CYPs redundant zueinander verhalten. Eine veränderte Proteinoberfläche lässt hingegen darauf schließen, dass sich hier eine Spezifität der strukturell sehr ähnlichen Proteine wiederfindet. Denn Aminosäuren auf der Oberfläche könnten die Bindung von größeren Interaktionspartnern regulieren. Da für alle untersuchten CYPs sehr ähnliche Enzymaktivitäten gemessen wurden, kann die Isomerisierungsreaktion nach der Bindung eines passenden Interaktionspartners vermutlich ablaufen, ohne dass die Reaktion selber einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt. Deshalb können die durch die Strukturanalyse gewonnenen Daten nach der Identifizierung von Interaktionspartnern dazu genutzt werden, Bindungsstellen leichter zu identifizieren, spezifische Aminosäuren zu finden und damit eine Aussage über die Redundanz oder Funktion der BnCYPs zu erhalten.

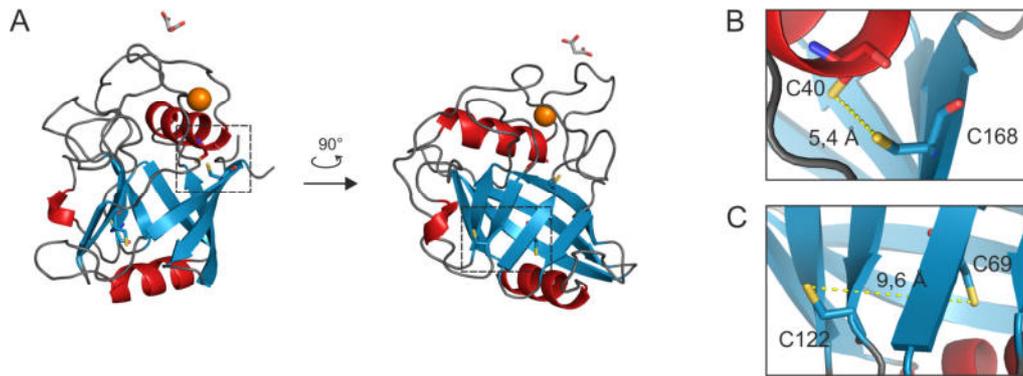
### 3.5.5 Die Enzymaktivität könnte durch strukturelle Änderungen reguliert werden

Eine Eigenschaft von Enzymen ist die Regulation ihrer Aktivität aufgrund struktureller Änderungen. Für CYPs wurde anhand von CsCYP aus *Citrus sinensis* eine Disulfidbrücken- und *divergent loop*-basierte Regulationsmöglichkeit postuliert (Campos *et al.* 2013). Nach diesem Modell (Abbildung 33) findet eine Änderung der Aktivität folgendermaßen statt: Die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen C40 und C168 resultiert in einer Konformationsänderung der  $\alpha$ -Helix I, was wiederum zu einer Veränderung innerhalb des *divergent loops* führt. Zwei Aminosäuren, K48 und S49, welche innerhalb des *divergent loops* liegen, sind im reduzierten Zustand über Wasserstoffbrücken mit dem gegenüberliegenden E83 verbunden (Abbildung 33C) und öffnen dadurch das aktive Zentrum. Die durch die Oxidation eintretende Konformationsänderung führt zu einer Trennung dieser Wasserstoffbrücken, sodass das aktive Zentrum geschlossen wird. Durch diesen Mechanismus basiert die Regulation der Aktivität auf der Oxidation und Reduktion von Cysteinen.

Betrachtet man nun zunächst die Disulfidbrücken, so sind bei einem Vergleich von CsCYP mit den 18-19 kDa BnCYPs vier konservierte Cysteine zu finden. In der untersuchten BnCYP19-1-Kristallstruktur liegen diese Cysteinepaare an zwei unterschiedlichen Positionen vor (Abbildung 34A). C40 und C168 sind auf der rückwärtigen Seite des BnCYP19-1 nahe den Termini lokalisiert. C69 und C122 befinden sich



**Abbildung 33: Modell zur Konformationsänderung von CsCYP durch die Bildung einer Disulfidbrücke.** Die Cysteine C40 (Cys40) und C168 (Cys168), der *divergent loop* sowie E83 (Glu83) sind in der Gesamtstruktur hervorgehoben (A, B). Die Cysteine liegen mit einem Abstand von 5,4 Å in ihrer reduzierten Form vor. E83 (Glu83) bildet Wasserstoffbrücken mit K48 (Lys48) und S49 (Ser49) des *divergent loops* (aus Campos *et al.* (2013)).

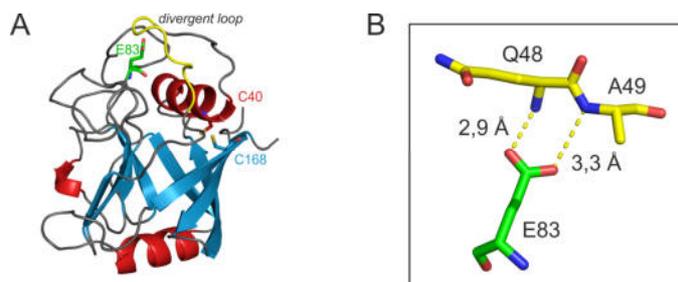


**Abbildung 34: Die vier Cysteine von BnCYP19-1.** (A) Ein Cysteinpaar befindet sich auf der Rückseite des Proteins nahe der Termini, das andere innerhalb des aktiven Zentrums. (B) Detailansicht von C40 und C168 sowie (C) C69 und C122.

hingegen im aktiven Zentrum auf der vorderen Seite. Bei einer näheren Betrachtung konnte gezeigt werden, dass beide Cysteinpaare in ihrer reduzierten Form vorlagen (Abbildung 34B, C). Diese Beobachtung wird durch die Tatsache unterstützt, dass während der Kristallbildung reduzierende Pufferbedingungen herrschten. Somit besitzt BnCYP19-1 das für das Modell entscheidende Cysteinpaar C40/C168 in derselben räumlichen Anordnung wie CsCYP.

Das zusätzliche Cysteinpaar C69/C122 hat vermutlich keinen Einfluss auf die Aktivität, trotz dessen Lage im aktiven Zentrum. Denn in Campos *et al.* (2013) wurde der Redoxzustand beider Cysteinpaare massenspektrometrisch untersucht, wobei nur für das Paar C40/C168 eine Disulfidbrücke nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu konnte das Paar C69/C122 nur in der reduzierten Form detektiert werden. Auch strukturell gesehen ist unwahrscheinlich, dass C69 und C122 eine Disulfidbrücke bilden, da die Seitenketten beider Aminosäuren auf dem  $\beta$ -Faltblatt in entgegengesetzter Richtung liegen (Abbildung 34C).

Bezüglich der Verbindung des aktiven Zentrums mit dem *divergent loop* über E83, K48 und S49 lässt sich für BnCYP19-1 feststellen, dass dieses an Position 49 kein Serin, sondern ein Alanin besitzt. Dadurch können anstatt den postulierten drei Wasserstoffbrücken vermutlich nur zwei Wasserstoffbrücken gebildet werden (Abbildung 35). Die anderen 18-19 kDa BnCYPs besitzen an dieser Position ein Serin oder Lysin und an Position 48 ein Serin, Lysin oder Arginin (Abbildung 12), sodass bei ihnen wie auch bei CsCYP



**Abbildung 35: Die Interaktion zwischen dem *divergent loop* und dem aktiven Zentrum.** (A) C40 (rot), C168 (blau), E83 (grün) und der *divergent loop* (gelb) sind auch in BnCYP19-1 zu finden. (B) E83 bildet vermutlich zwei Wasserstoffbrücken mit Q48 und A49, wobei letztere eher schwach ist.

vermutlich drei Wasserstoffbrücken ausgebildet werden können. Aber auch zwei Wasserstoffbrücken sind vermutlich hinreichend, um die Schleife, in welcher sich E83 befindet, an der richtigen Stelle zu positionieren. Denn Mutationen an Position 83, welche die Bildung von Wasserstoffbrücken komplett verhinderten, führten zu einer verringerten PPIase Aktivität (Campos *et al.* 2013). Dies zeigt, dass die Verbindung des aktiven Zentrums mit dem *divergent loop* über E83 essentiell für die Regulation des Enzyms ist.

Bei Betrachtung des *divergent loops* fällt auf, dass dieser neben seiner hochkonservierten Konsensussequenz (XXGKXLH) einen variablen Bereich darstellt. Auch innerhalb der Gruppe der 18-19 kDa BnCYPs ist außer G50, K51, L53 und H54 keine weitere Aminosäure konserviert (Abbildung 12). Auffällig ist zudem, dass sich die Variabilität auch zwischen den Arten niederschlägt, da sich die AtCYPs von ihren BnCYP-Homologen in den variablen Aminosäuren des *divergent loops* unterscheiden. Dass dieser Bereich veränderlich ist, könnte einerseits dafür sprechen, dass den nicht-konservierten Aminosäuren keine Funktion zufällt und sie somit über die Evolution gesehen nicht beibehalten wurden. Da der Bereich aber in der Nähe des aktiven Zentrums liegt, könnte er andererseits auch an der Substraterkennung beteiligt sein, sodass Unterschiede in der Sequenz eine Selektion bewirken könnten. Um dies zu klären, wäre aber die Kenntnis über Interaktionspartner der einzelnen BnCYPs und AtCYPs sowie deren Bindungsstellen notwendig.

Deshalb lässt sich zu diesem Zeitpunkt nur festhalten, dass das von Campos *et al.* (2013) vorgeschlagene Modell von CsCYP vermutlich auch auf BnCYP19-1 und die anderen 18-19 kDa BnCYPs und AtCYPs angewendet werden kann. Unterstützt wird diese Annahme zudem durch den gelbasierten Nachweis der Disulfidbrückenbildung in Abschnitt 3.3.4. Hier konnte bereits gezeigt werden, dass BnCYP18-4 und BnCYP19-1 in der Lage sind, Disulfidbrücken auszubilden. Ob aber eine oder zwei Disulfidbrücken vorliegen, konnte anhand des durchgeführten Assays nicht geklärt werden.

Dem Modell entsprechend sind CYPs in ihrer reduzierten Form aktiv und werden durch die Bildung von Disulfidbrücken inaktiviert. Diese Redoxregulation konnte bereits durch Aktivitätsassays für die *single-domain divergent* CYPs CsCYP und AtCYP19-3 gezeigt werden (Campos *et al.* 2013; Kaur *et al.* 2015). Auch die Mutation der Cysteine C40 und C168 zu Serinen und die damit erzwungene Konformation des reduzierten Zustands, resultierte in der Erhaltung der PPIase Aktivität (Campos *et al.* 2013). Für die untersuchten BnCYPs und AtCYPs bedeutet dies, dass die Untersuchung ihrer PPIase Aktivität unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen einen interessanten Ansatz für die Erweiterung des Redoxmodells darstellt. Denn die Unterschiede im *divergent loop* zwischen diesen nah verwandten CYPs könnten sich auf die Enzymaktivität auswirken. Bei den in dieser Arbeit bereits durchgeführten Aktivitätsassays unter normalen Bedingungen zeigten alle eine ähnliche Aktivität. Bei diesen lag vermutlich ein Gemisch aus oxidiertem und reduziertem Enzym vor, ähnlich der unbehandelten Probe des gelbasierten Nachweises. Die gezielte Oxidation bzw. Reduktion der Enzyme vor ihrem Einsatz im PPIase Assay könnte deshalb neue Erkenntnisse bringen.

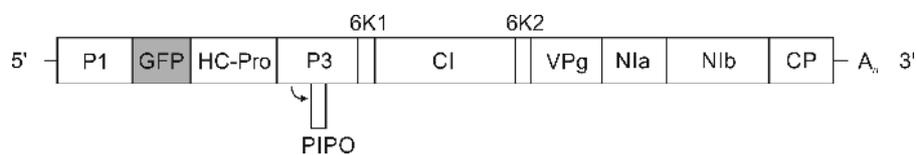
### 3.6 Regulation von BnCYPs während der Virusinfektion

Wie in Abschnitt 1.4.3 und 1.4.4 bereits präsentiert wurde, sind nicht nur humane CYPs an der Virusinfektion beteiligt, sondern es konnte auch für pflanzliche CYPs bereits gezeigt werden, dass diese an der Immunantwort auf eine bakterielle Pathogeninfektion beteiligt sind. Obwohl zudem gezeigt werden konnte, dass AtCYPs mit viralen Komponenten interagieren (Kovalev und Nagy 2013), gibt es bis heute keine weiterführenden Erkenntnisse zu ihrer Rolle während der Virusinfektion in Pflanzen. CYPs gelten aufgrund ihrer PPIase Aktivität als Faltungshelfer und könnten entweder direkt mit dem Virus interagieren oder wie z. B. im Fall der bakteriellen Infektion in der Immunantwort wirken. In jeder dieser Rollen könnten sie einen positiven oder negativen Einfluss auf die Virusinfektion ausüben. Da Viren zudem das Phloem als systemische Transportroute nutzen ist auch interessant, ob CYPs einen Einfluss auf die systemische Verbreitung von Viren besitzen. Wie bereits gezeigt werden konnte, sind CYPs im Phloem hochabundant und können ihre PPIase Aktivität ausüben (Abschnitt 3.2). Dies unterstützt die Hypothese, nach welcher sie am Transport ungefalteter Proteine über die Plasmodesmen in das Phloem beteiligt sein könnten. Der Transport des TuMV über die Plasmodesmen ist noch nicht vollständig entschlüsselt, sodass eine Unterstützung durch CYPs nicht ausgeschlossen werden kann. Andererseits könnten diese aber auch am Transport anderer Proteine beteiligt sein und damit z. B. Signale weiterleiten. Zur Untersuchung dieser Fragestellung bietet sich *B. napus* an, da Phloemexsudat von *B. napus* im Vergleich zu *A. thaliana* in ausreichendem Maß gewonnen werden kann und gleichzeitig direkt an einer relevanten Nutzpflanze gearbeitet wird. Da das Probenvolumen des Phloemexsudats limitierend war, konnte keine differentielle 2D-Gelelektrophorese durchgeführt werden. Deshalb wurden die Proben mittels LC-MS/MS proteomanalytisch untersucht, da für diese geringere Proteinmengen ausreichen. Um Informationen über die Rolle der CYPs während der Virusinfektion zu gewinnen, sollten nicht nur Proteomstudien von Phloemproben, sondern auch von Blattproben, welche den lokalen Infektionsort repräsentieren, durchgeführt werden. Durch die Beobachtung von Veränderungen in der Abundanz sollten somit Hinweise auf die Funktion der CYPs erhalten werden.

Die Symptome einer TuMV-Infektion von *B. napus* gestalten sich divers. *B. napus* Kultivare besitzen unterschiedlich starke Resistenzen gegen die TuMV-Infektion, sodass je nach Kultivar verschiedene Symptome auftreten. So zeigen empfindliche Kultivare ein Mosaikmuster, während andere Kultivare mit einer hypersensitiven Immunantwort reagieren, welche zu einer Nekrose führt. Da sich Virus und Pflanze aber vermutlich im Sinne der Co-Evolution parallel zueinander weiterentwickelt haben, ist die Stärke der Symptome nicht nur von dem infizierten *B. napus* Kultivar, sondern auch von dem TuMV-Stamm abhängig, da einige Stämme virulenter sind als andere. Der in dieser Arbeit verwendete TuMV-Stamm UK1 führte zu einem Mosaikmuster in *B. napus* Drakkar Blättern. Die Pflanzen wurden aber kaum in ihrem Wachstum behindert, infizierte und Mock-behandelte Pflanzen zeigten keine Unterschiede in ihrer Größe. Auch die Menge an gewonnenem Phloemexsudat war nach beiden Behandlungen ähnlich.

### 3.6.1 Infektions- und Kontaminationskontrolle der Proben

Zum einfachen Nachweis der Infektion wurde ein Viruskonstrukt verwendet, welches eine GFP-Genkopie beinhaltet (Abbildung 36), sodass während der Replikation lösliches GFP zusätzlich zu den viruseigenen Proteinen synthetisiert wird. Ein GFP-Signal zeigt deshalb den Replikationsort des Virus an. Die Pflanzen konnten somit auf eine systemische Infektion hin untersucht werden. Der Virus repliziert aktiv in allen pflanzlichen Organen von Blatt bis Blüte und zeigt damit eine systemische Verbreitung (Abbildung 37). Das GFP-Signal der Blätter entsprach einem Mosaikmuster und es war deutlich zu sehen, dass die Infloreszenz, an welcher die Phloemproben gewonnen wurden, zum Zeitpunkt der Probennahme infiziert war. Gleichzeitig war auch zu sehen, dass die Mock-behandelten Proben keinerlei GFP-Signal zeigten und somit nicht versehentlich durch eine Übertragung des Virus während der Anzucht infiziert wurden (Abbildung 37).



**Abbildung 36:** Schematische Darstellung des verwendeten TuMV-GFP-Konstrukts. Zwischen P1 und HC-Pro wurde eine GFP-Genkopie inseriert.

Ein Western Blot bestätigte dieses Ergebnis. Für diesen wurde zum Nachweis der Infektion sowohl ein TuMV-, als auch ein GFP-Antikörper verwendet. Hierbei ist anzumerken, dass der TuMV-Antikörper mit aus Pflanzenextrakt gewonnenem Virus hergestellt wurde. Dies führt dazu, dass es viele Hintergrundbanden gibt, die nicht virus-, sondern pflanzenspezifisch sind. Dennoch waren zwei virusspezifische Banden in den Proteinextrakten aus infiziertem Blattmaterial deutlich sichtbar. Die prominenteste Bande stellt vermutlich das CP dar, welches ein MW von 33 kDa besitzt, und auch in Phloemexsudat der infizierten Pflanzen detektiert werden konnte. Dieses Ergebnis konnte durch die Verwendung des GFP-Antikörpers bestätigt werden. Nur in den Proben der infizierten Pflanzen konnte ein Signal, welches in etwa dem MW von GFP mit 26 kDa entspricht, detektiert werden. Somit konnte der Nachweis der Infektion erbracht werden. Zudem zeigte dieser Versuch aber auch, dass die Proben der Mock-behandelten Pflanzen während der Probennahme und Proteinextraktion nicht mit infiziertem Material kontaminiert wurden. Denn auch durch eine starke Überbelichtung konnten in den Mock-behandelten Proben keine TuMV- oder GFP-spezifischen Signale detektiert werden.

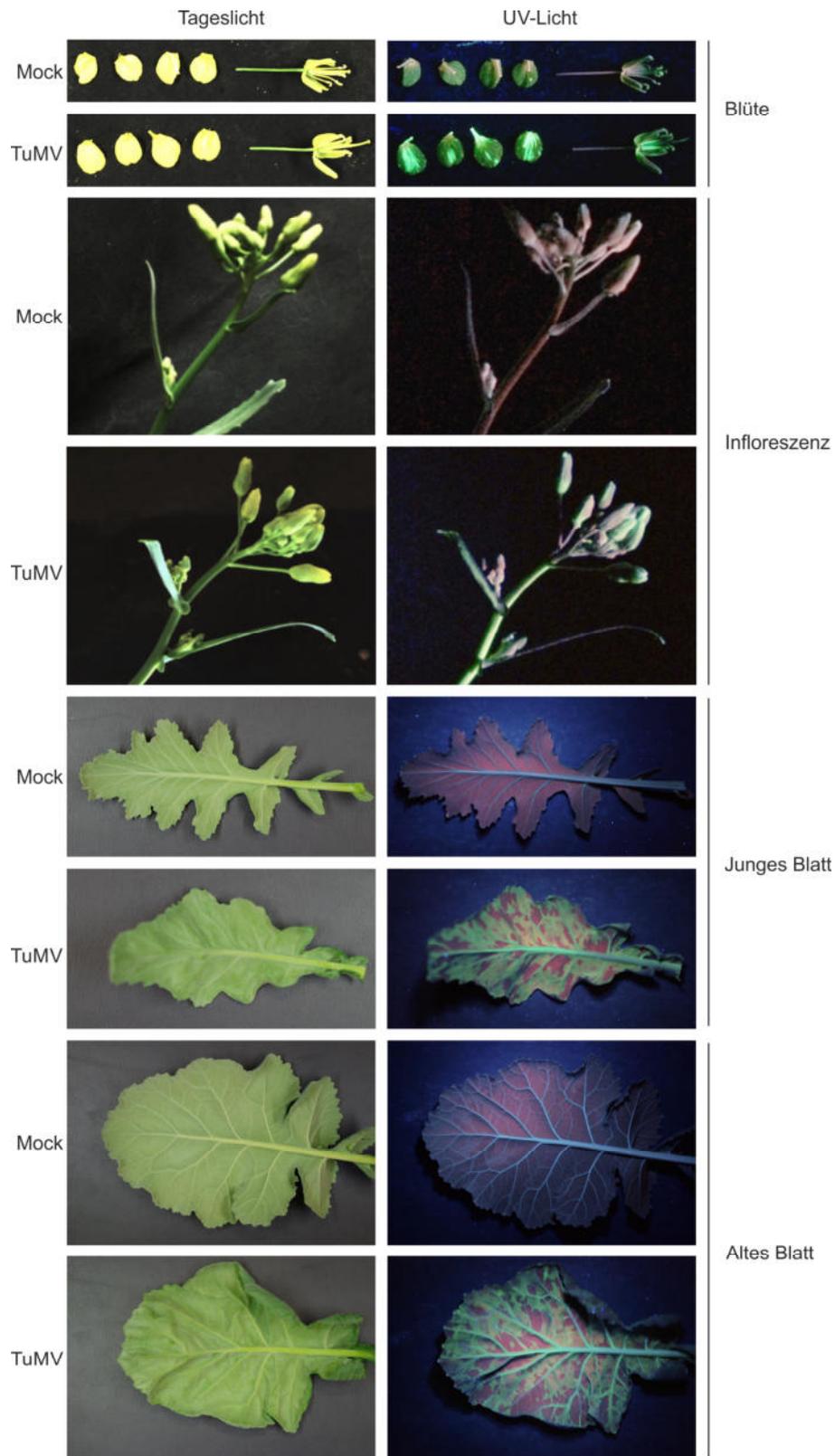
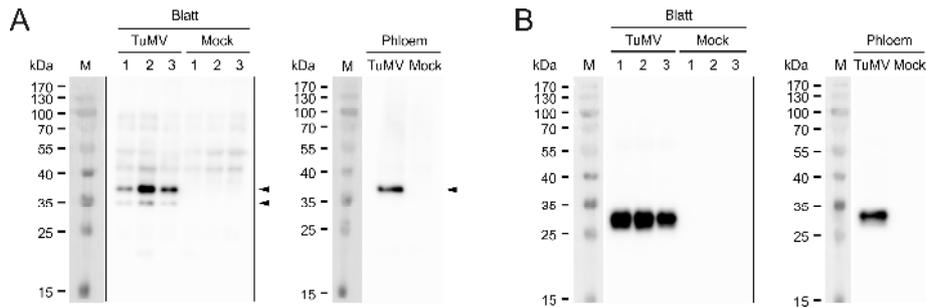


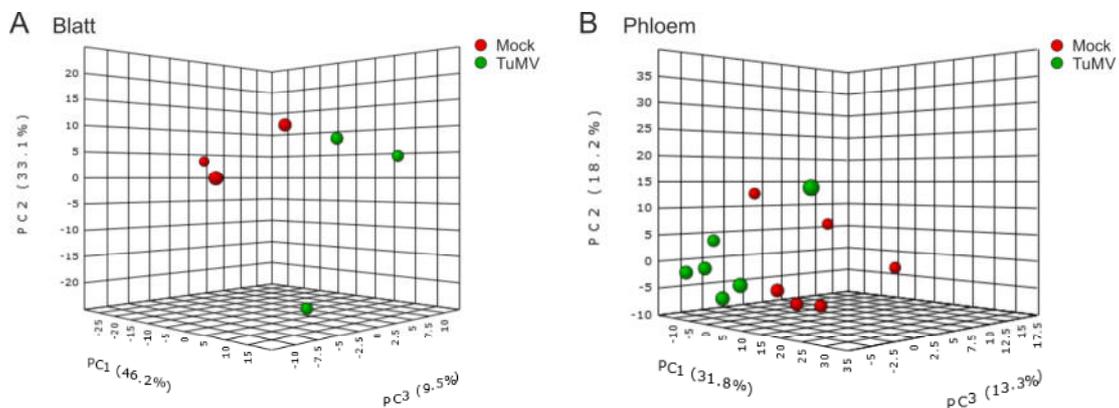
Abbildung 37: Das *Turnip mosaic virus* verbreitet sich innerhalb *B. napus* cv. Drakkar systemisch. Anhand des während der Replikation gebildeten GFPs kann die Virusinfektion unter UV-Licht verfolgt werden. Die Bilder wurden 52 Tage nach der Infektion aufgenommen.



**Abbildung 38: Western Blot der LC-MS/MS Proben zum Nachweis der TuMV-Infektion.** Zum Nachweis der Virusinfektion wurden die Proben mit zwei verschiedenen Antikörpern analysiert: (A) anti-TuMV und (B) anti-GFP. Die TuMV-spezifischen Banden sind gekennzeichnet (Pfeil). Aufgetragen wurden die für die LC-MS/MS-Analyse verwendeten sechs Proteinextrakte aus Blatt (TuMV und Mock, jeweils 1-3) sowie zusätzlich Phloemexsudat, welches parallel zu den verwendeten Proben gewonnen wurde. Aufgrund des geringen Probenvolumens konnten nicht die für die LC-MS/MS-Analyse verwendeten Phloemexsudate getestet werden. Parallel gesammelte Exsudate zeigten eine durchweg reine Probennahme, sodass hier exemplarisch ein Western Blot gezeigt ist. Jede Spur wurde mit 20 µg Proteinextrakt aus Blatt bzw. 10 µl Phloemexsudat beladen.

### 3.6.2 LC-MS/MS Proteomanalyse

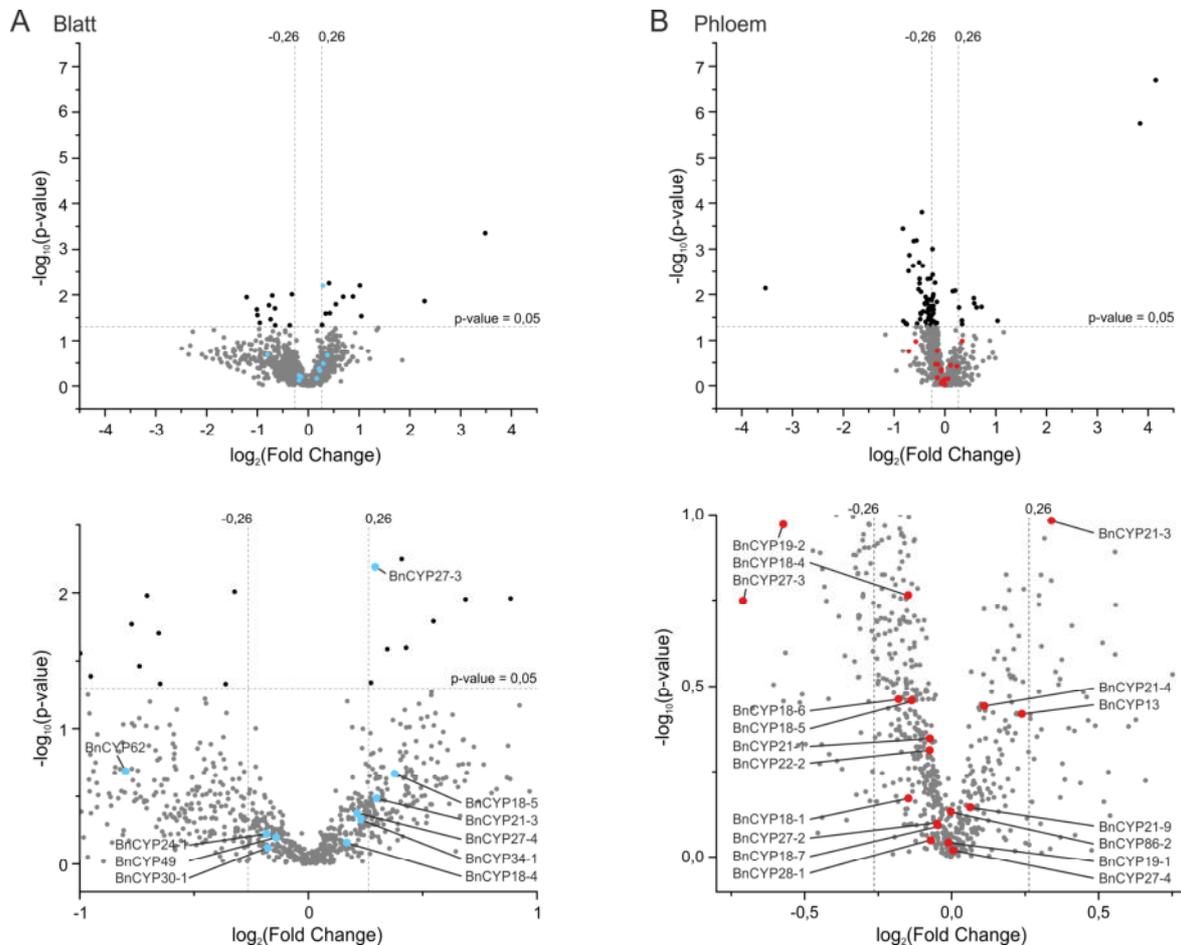
Betrachtet man differentielle Datensätze, so muss zunächst die Datenqualität überprüft werden. Dies kann für die gewonnenen LC-MS/MS-Daten mit einer dreidimensionalen PCA dargestellt werden (Abbildung 39). Insgesamt lässt sich für die Blatt- und Phloemdatensätze feststellen, dass sich die Mock- und TuMV-Daten sehr stark ähneln und innerhalb einer Gruppe stärker divergieren, als zwischen den Gruppen. Dies zeigt, dass das Proteom durch die TuMV-Infektion keine starken Änderungen erlebt. Zusätzlich könnten die geringen Unterschiede in den Datensätzen der Blattproben daher stammen, dass die Infektion der Blätter einem Mosaikmuster entspricht. Wie in Abbildung 37 zu sehen ist, wechseln sich infizierte (grün) und nicht-infizierte (rot) Bereiche ab. Für die Proteinextraktion wurde nicht dezidiert nur infiziertes Gewebe verwendet, sondern das gesamte Blatt gemörsert und ein Teil hiervon für die Extraktion in



**Abbildung 39: Dreidimensionale PCA-Analyse der Blatt- und Phloemdaten.** (A) Blatt. (B) Phloem. Mock = Mock-behandelte Probe, TuMV = TuMV-infizierte Probe.

in Puffer aufgenommen. Dementsprechend könnte ein Gemisch aus infiziertem und nicht-infiziertem Gewebe verwendet worden sein, was zu einer verringerten Divergenz zwischen den Mock- und TuMV-Datensätzen führen würde. Bezüglich der Phloemproben ist anzumerken, dass diese an unterschiedlichen Tagen gesammelt wurden. Da sich die Menge an Licht oder auch die Umgebungstemperatur auf die Komposition des Phloemproteoms auswirken könnte, könnte dies einen Faktor darstellen, der zu Varianz führt. Am stärksten unterschieden sich die Phloemdaten auf der z-Achse und zeigten damit einen hinreichenden Unterschied zueinander.

Dass sich die Datensätze sehr stark ähneln, spiegelt auch der Volcano Plot wieder (Abbildung 40). Dieser macht auf einen Blick deutlich, dass es sehr schwierig ist, signifikante Änderungen zu finden. Die Daten der Blattproben waren weniger differentiell zueinander (Abbildung 40A), als die der Phloemproben (Abbildung 40B) und der  $\log_2(\text{Fold Change})$  war insgesamt sehr niedrig. Um einen Eindruck möglicherweise regulierter Proteine zu bekommen, wurden die Grenzen so gesetzt, dass sie einer Änderung von 20 % entsprechen. Besonders die Analyse des Blattdatensatzes zeigte, dass die meisten



**Abbildung 40: Volcano Plot der Blatt- und Phloemdaten.** Der Volcano Plot ermöglicht die graphische Darstellung der differentiellen Blatt- (A) und Phloemdaten (B). Die untere Abbildung stellt einen Ausschnitt des Volcano Plots zur besseren Darstellung der BnCYPs dar. Mit dem Fold Change wird die Veränderung TuMV/Mock angegeben. Die Grenzen des  $\log_2(\text{Fold Change})$  entsprechen einer Änderung von 20 %. Als signifikant wurden nur Änderungen mit einem  $\text{p-value} \leq 0,05$  gewertet, was einer Fehlerquote von 5 % entspricht.

Proteine innerhalb dieser Grenzen zu finden sind. Insgesamt konnten durch die LC-MS/MS-Analyse der Virusinfektion 10 BnCYPs im Blatt und 18 im Phloem identifiziert werden (Abbildung 40). Nur wenige zeigten durch die Virusinfektion Änderungen in ihrer Abundanz, wobei mit der Ausnahme eines BnCYPs auch keine weiteren signifikant waren. Mit einem Fold Change von 1,22 und einem p-value von 0,006 konnte nur BnCYP27-3 im Blatt als signifikant von der Virusinfektion beeinflusst identifiziert werden. Die Änderung in der Abundanz von BnCYP27-3 resultiert vermutlich eher daher, dass die Virusreplikation am Chloroplasten deren Funktion und Struktur und somit auch die Abundanz vieler chloroplastidärer Proteine beeinflusst, als aus einer spezifischen Regulierung dieses Proteins (Zhao *et al.* 2016). Dass im Blatt vor allem chloroplastidäre Proteine beeinflusst werden, konnten auch Genexpressionsdaten aus *A. thaliana* demonstrieren (Yang *et al.* 2007). Aber auch RNA-Seq Daten aus *B. napus* Blattmaterial konnten dies bestätigen. Nach diesen könnten die vermutlich chloroplastidär lokalisierten Isoformen BnCYP27-2 und BnCYP27-4 sowie die vermutlich cytosolisch lokalisierten Isoformen BnCYP34-1 und BnCYP34-2 herunterreguliert sein (Khalid Amari, unpublizierte Daten).

Die statistische Analyse hat zudem gezeigt, dass im Phloem keine BnCYPs signifikant reguliert sind. Der Virus scheint somit keine systemischen Veränderungen von CYPs hervorzurufen. Passend zu bereits publizierten Daten aus Blattmaterial zeigte sich aber auch im Phloem ein Einfluss des Virus auf die Abundanz von ribosomalen und proteasomalen Untereinheiten sowie Proteinen, die an unterschiedlichen Prozessen des Stoffwechsels beteiligt sind (Yang *et al.* 2007).

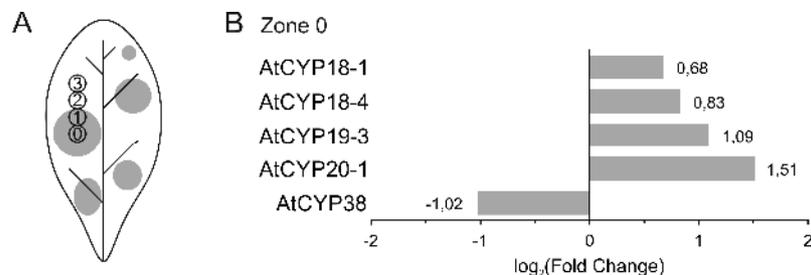
Um die Funktion der CYPs unabhängig von ihrer Abundanz zu untersuchen, sollten nun im Sinne der Pflanzenbiologie verschiedene Mutanten wie Knockout-, Knockdown- oder Überexpressionsmutanten herangezogen und Infektionsexperimenten ausgesetzt werden. Da allerdings bis zum Ende der Arbeiten keine *B. napus* Mutanten erstellt werden konnten, musste hierfür auf nah verwandte Mutanten der *Brassicaceen* zurückgegriffen werden. Dies ist durch die Verfügbarkeit von *A. thaliana* T-DNA-Insertionslinien möglich (siehe Abschnitt 3.8).

### 3.7 Einfluss der Virusinfektion auf die Genexpression von AtCYPs

Wie zuvor erwähnt, wurde bereits eine Genexpressionsstudie zu einer TuMV-Infektion von *A. thaliana* Col-0 in Yang *et al.* (2007) veröffentlicht. In dieser Studie wurde die Genexpression in vier Zonen ausgehend von der Infektionsstelle analysiert (Abbildung 41A). Insgesamt zeigte sich, dass der Einfluss des Virus auf die Genexpression dort besonders stark ist, wo die Viruskonzentration hoch ist. Mit abnehmender Viruskonzentration nahm auch die Anzahl an regulierten Genen und die Stärke der Regulation ab. Vorrangig wurden Gene, die an der Immunantwort beteiligt sind, sowie welche, die proteasomale und ribosomale Untereinheiten kodieren, hochreguliert. Runterreguliert wurden hingegen Gene, die dem Stoffwechsel, der Zellwand und dem Chloroplasten zugeordnet werden. Zudem konnte das TuMV die Immunantwort nicht systemisch induzieren (Yang *et al.* 2007).

Wurden diese Daten auf AtCYPs hin untersucht, zeigte sich, dass außerhalb von Zone 0 kein AtCYP als signifikant reguliert identifiziert werden konnte. Die Abundanz der AtCYPs wird demnach nur lokal am

primären Infektionsort durch den Virus beeinflusst. Aber auch hier waren die AtCYPs nicht stark reguliert (Abbildung 41B). Dies entspricht auch den zuvor diskutierten *B. napus* Proteomdaten. Die Abundanz der CYPs in *Brassicaceen* ändert sich demnach durch die Virusinfektion sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nur in sehr geringem Maß.



**Abbildung 41: Räumliche Analyse des Einflusses der TuMV-Infektion auf die Genexpression von AtCYPs.** (A) Schematische Repräsentation der vier präparierten Zonen auf einem *A. thaliana* Blatt. Graue Bereiche stellen Infektionszentren dar, die durch die GFP-Fluoreszenz detektiert werden konnten. Zone 0 befindet sich im Epizentrum der Infektion. Zone 1 liegt angrenzend an Zone 0 noch innerhalb der GFP Fluoreszenz. In Zone 2 befand sich peripher zum Infektionsort, sodass noch eine schwache GFP-Fluoreszenz vorlag. Zone 3 besaß keinen direkten Kontakt zur GFP-Fluoreszenz. Verändert nach Yang *et al.* (2007). (B) Darstellung der signifikant regulierten AtCYPs aus Zone 0 ( $p$ -value  $\leq 0,05$ ).

### 3.8 Etablierung von *A. thaliana* Mutanten für Stressexperimente

Um die Funktion eines Proteins innerhalb der Pflanze zu entschlüsseln, werden häufig *in vivo* Experimente durchgeführt. Diese dienen dazu, Veränderungen direkt in der Pflanze zu studieren, sodass anhand des Phänotyps Rückschlüsse auf die Funktion eines Gens gezogen werden können. In Hinblick auf CYPs ist vor allem interessant, ob diese unter normalen Anzucht- und vor allem aber unter Stressbedingungen einen Einfluss auf den Phänotyp besitzen. Zur gezielten Untersuchung eines bestimmten Gens werden Mutanten genutzt, welche beispielsweise durch die Einbringung von T-DNA in das Genom von *A. thaliana* über *Agrobacterium tumefaciens* erstellt werden können. Durch die Insertion der T-DNA innerhalb eines funktionellen Gens kann dessen Funktion entweder vollständig (Knockout) oder teilweise (Knockdown) beeinträchtigt sein. Eine Kollektion solcher Mutanten wird vom SALK-Institut zur Verfügung gestellt (O'Malley *et al.* 2015).

Die Auswahl der Mutanten richtete sich nach den bisherigen Ergebnissen dieser Arbeit. Aus den *B. napus* Proteom und RNA-Seq Daten stellten AtCYP20-2, AtCYP20-3 und AtCYP26-2 potentielle, an der Virusinfektion beteiligte Kandidaten dar. Zusätzlich wurden die *single-domain* CYPs AtCYP18-4 und AtCYP19-3 aus den *A. thaliana* Genexpressionsdaten ausgewählt sowie AtCYP18-3 und AtCYP19-1, da diese in der Literatur als an der Immunantwort beteiligt beschrieben sind. Zudem ist die Untersuchung der cytosolisch lokalisierten *single-domain* CYPs insofern interessant, als dass diese innerhalb dieser Arbeit

bereits *in vitro* strukturell und funktionell untersucht wurden, sodass die Ergebnisse miteinander verknüpft werden können.

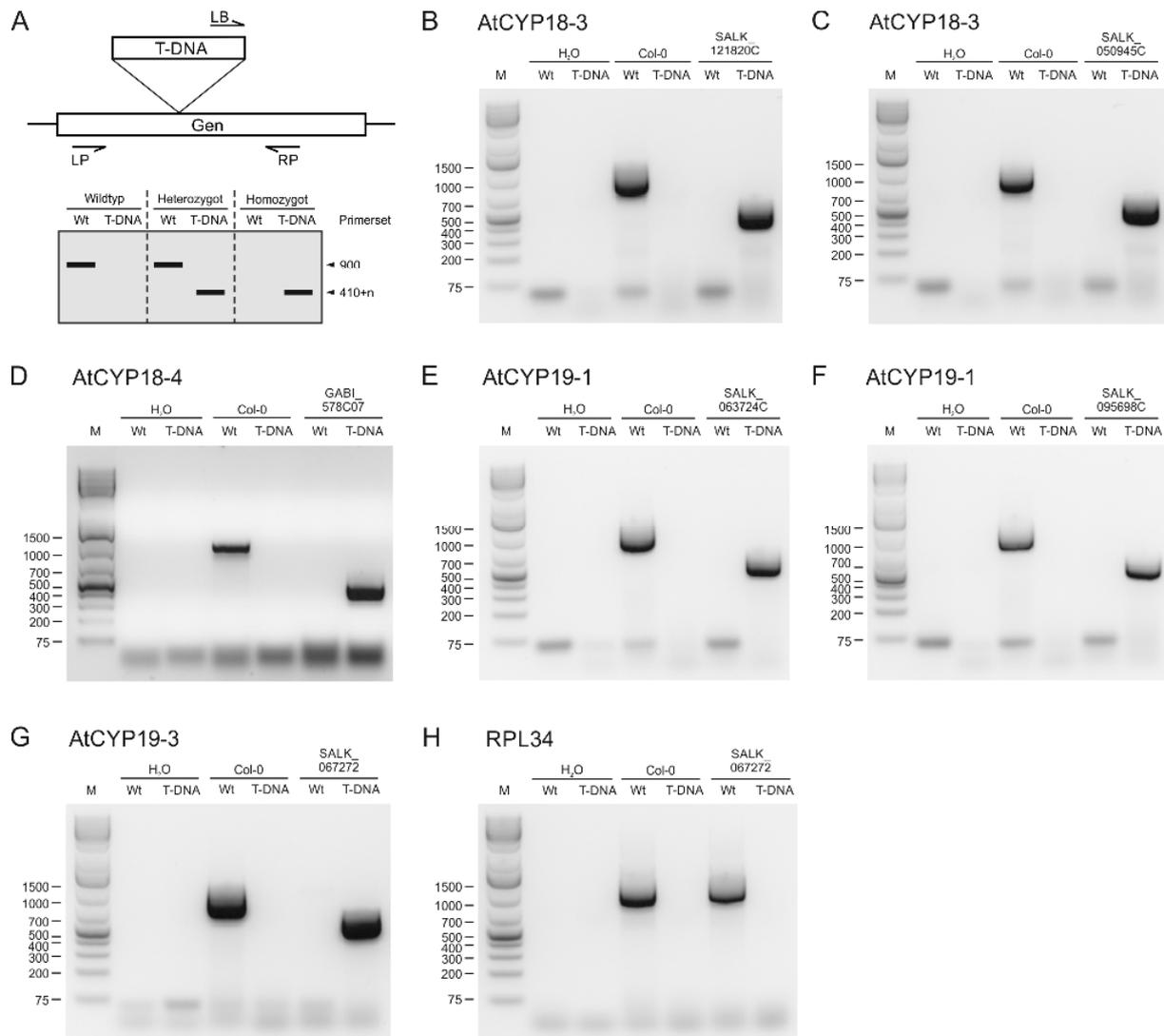
Da für die Untersuchung von Phänotypen nach Möglichkeit zwei unabhängige T-DNA-Insertionslinien verwendet werden sollten, wurden, wenn möglich, entsprechend zwei Linien pro Gen ausgewählt (Tabelle 24). Ungefähr 50 % der SALK-Linien tragen eine zweite T-DNA Insertion an einer anderen Stelle, sodass sich nur durch die Verwendung mehrerer Mutanten ausschließen lässt, dass eine zweite Insertion den beobachteten Effekt verursacht. Bevor Aussagen über den Phänotyp von Mutanten getroffen werden können, müssen diese zunächst auf die T-DNA-Insertion und deren Lage hin überprüft werden. Zudem muss auch nachgewiesen werden, ob die T-DNA-Insertion die Expression des Zielgens beeinflusst, es sich also um Knockdown- oder Knockout-Mutanten handelt.

**Tabelle 24: Untersuchte *A. thaliana* Mutanten.**

AtCYP	Gen	Linie	verwendet in	BnCYP-Homolog
AtCYP18-3	<i>At4g38740</i>	SALK_050945C	Trupkin <i>et al.</i> 2012	BnCYP18-4/18-6/18-7
		SALK_121820C	Trupkin <i>et al.</i> 2012	
AtCYP18-4	<i>At4g34870</i>	GABI_578C07	-	BnCYP18-2/18-3
AtCYP19-1	<i>At2g16600</i>	SALK_095698C	-	BnCYP18-5/18-8
		SALK_063724C	Pogorelko <i>et al.</i> 2014	
AtCYP19-3	<i>At3g56070</i>	SALK_067272	-	BnCYP19-1/19-2
AtCYP20-2	<i>At5g13120</i>	SALK_024971C	Sirpiö <i>et al.</i> 2009, Park <i>et al.</i> 2013	BnCYP27-3/27-5
		SALK_129937C	Edvardsson <i>et al.</i> 2007	
AtCYP20-3	<i>At3g62030</i>	GABI_159E05	-	
		SALK_001615C	Dominguez-Solis <i>et al.</i> 2008, Park <i>et al.</i> 2013	
AtCYP26-2	<i>At1g74070</i>	SALK_049034C	-	BnCYP34-1/34-2
		SALK_028513C	-	

### 3.8.1 Genotypisierung, Nachweis der T-DNA-Insertionsstelle und Genexpressionsanalyse

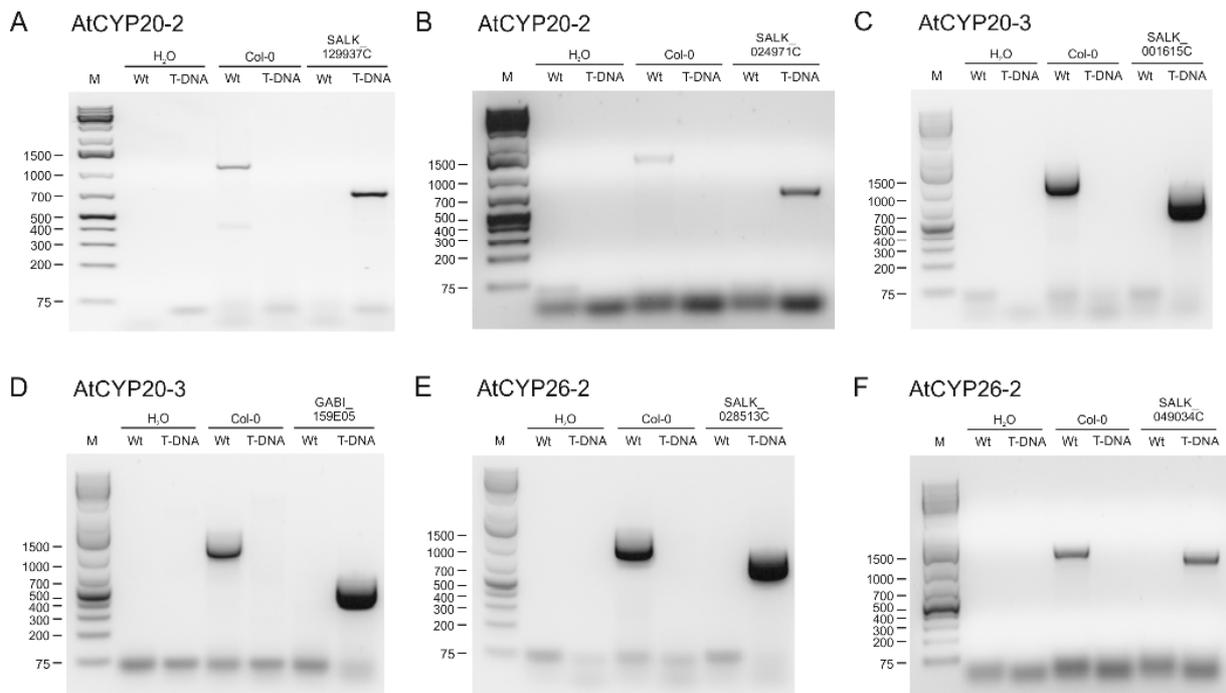
Für die Genotypisierung der T-DNA Insertionslinien wurden zwei verschiedene Kombinationen aus gen- und T-DNA-spezifischen Primern verwendet, welche den Nachweis des Wildtypallels und dessen durch die T-DNA-Insertion veränderte Variante ermöglichen (schematisch dargestellt in Abbildung 42A). Das Bandenmuster zeigt somit eindeutig, ob ein homozygoter Wildtyp, eine heterozygote Mutante oder eine homozygote Mutante vorliegen. Die Ergebnisse der Genotypisierung sind in Abbildung 42 für die cytosolisch lokalisierten AtCYPs und in Abbildung 43 für die chloroplastidär lokalisierten AtCYPs zusammengefasst. Es konnten für alle SALK-Linien sowie die beiden GABI-Linien homozygote Mutanten identifiziert werden. Für Linie SALK\_067272 sind beim SALK Institut (<http://signal.salk.edu/>) zwei Sequenzierungen zu finden, was eine Insertion der T-DNA an zwei unterschiedlichen Stellen im Genom vermuten lässt. Diese Sequenzierungen betreffen zwei verschiedene Gene, *AtCYP19-3* (*At3g56070*) und *RIP34* (*At3g11010*). Wie Abbildung 42G und H zeigen, konnte allerdings nur in



**Abbildung 42: Ergebnisse der Genotypisierung von SALK- und GABI-Linien, deren Zielprotein im Cytosol lokalisiert ist.** (A) Schematische Darstellung der verwendeten Primer und deren Produkte auf einem Agarosegel. Die genspezifischen Primer LP und RP amplifizieren das Wildtypallel des untersuchten Gens mit einer Produktgröße von etwa 900 bp. Im Gegensatz hierzu wird bei Einsatz des T-DNA-spezifischen Primers LB in Kombination mit dem genspezifischen Primer RP eine vorhandene T-DNA-Insertion nachgewiesen (Produkt 410+n bp). (B-H) Ergebnisse der getesteten Linien. Für die Linie SALK\_067272 wurden zwei betroffene Gene vermutet, allerdings zeigt das Ergebnis eindeutig keine T-DNA-Insertion in *RPL34* (H). Die Abkürzungen Wt und T-DNA stehen für die in der PCR eingesetzten Primerkombinationen: Wt = Primer LP und RP, T-DNA = Primer LB und RP.

*AtCYP19-3* eine T-DNA-Insertion nachgewiesen werden. *RPL34* enthielt keine T-DNA-Insertion und somit wird angenommen, dass in dieser Linie nur eine einzige T-DNA-Insertion vorlag.

Nachdem der Nachweis erbracht wurde, dass eine T-DNA-Insertion vorlag, galt es im nächsten Schritt die Lage dieser Insertion zu bestimmen und nachzuweisen, ob diese Auswirkungen auf die Expression des Zielgens hat. Die Lage der T-DNA-Insertion konnte für alle Linien erfolgreich bestimmt werden (Abbildung 44). Dabei konnte die T-DNA in unterschiedlichen Bereichen der Gene wie der Promotorregion, der 5'UTR, der 3'UTR, im Exon oder im Intron lokalisiert werden (Tabelle 25).



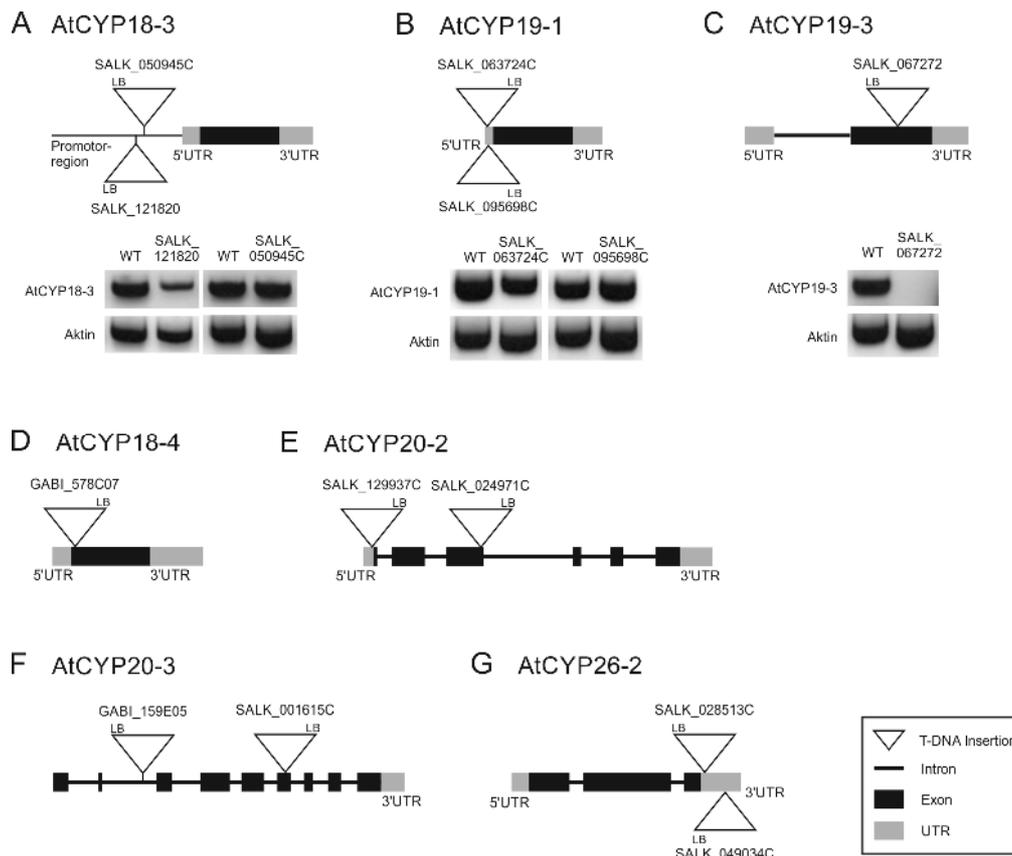
**Abbildung 43: Ergebnisse der Genotypisierung von SALK- und GABI-Linien, deren Zielprotein im Chloroplasten lokalisiert ist.** (A-F) Ergebnisse der getesteten Linien. Die Abkürzungen Wt und T-DNA stehen für die in der PCR eingesetzten Primerkombinationen: Wt = Primer LP und RP, T-DNA = Primer LB und RP.

Die Genexpressionsanalyse von SALK\_121820 und SALK\_050945C, welche eine T-DNA-Insertion in der Promotorregion von *AtCYP18-3* besitzen, zeigte einen Knockdown des *AtCYP18-3*-Gens in SALK\_121820 (Abbildung 44A). In SALK\_050945C konnte dagegen keine Veränderung der Genexpression beobachtet werden. Beide Linien wurden bereits in Trupkin *et al.* (2012) untersucht, wo die semiquantitative RT-PCR ein ähnliches Ergebnis zeigte. Auch in dieser Arbeit entsprach die Expression in SALK\_050945 nahezu der des Wildtyps. Allerdings wurde aus den Daten geschlossen, dass *AtCYP18-3* in beiden Linien verringert exprimiert wird, es sich also um Knockdown-Linien handelt.

Wie in Abbildung 44B zu sehen ist, zeigten weder SALK\_063724C noch SALK\_095698C eine verringerte Expression des *AtCYP19-1*-Gens. Die T-DNA-Insertion befand sich in beiden Linien in der 5'UTR und beeinflusste die Genexpression offensichtlich nicht. Im Gegensatz zu dieser Beobachtung wird SALK\_063724 (*AtCYP19-1*) in Pogorelko *et al.* (2014) als eine Knockout-Mutante beschrieben. Der Nachweis wurde hier per qPCR erbracht und widerspricht dem Ergebnis aus Abbildung 44B.

Für *AtCYP19-3* konnte hingegen erfolgreich eine Knockout-Mutante identifiziert werden. In SALK\_067272 befand sich die T-DNA-Insertion im Exon, was zu einem Knockout des *AtCYP19-3*-Gens führt (Abbildung 44C). Diese Linie wurde bisher in keiner Publikation beschrieben.

Da diese Ergebnisse mit einer semiquantitativen RT-PCR gewonnen wurden, würde sich eine Wiederholung des Nachweises mit einer quantitativen RT-PCR (qPCR) anbieten, um das exakte Expressionslevel zu bestimmen.



**Abbildung 44: Lage der T-DNA-Insertion und Nachweis der Expression des Cyclophilins.** Die Insertionsstelle der T-DNA konnte für alle Linien erfolgreich bestimmt werden, nicht aber der Nachweis der Genexpression: (A-C) Für drei Gene, *AtCYP18-3*, *AtCYP19-1* und *AtCYP19-3*, konnte eine RT-PCR erfolgreich durchgeführt werden. (D-G) Für die Gene *AtCYP18-4*, *AtCYP20-2*, *AtCYP20-3* und *AtCYP26-2* hingegen muss der Nachweis über eine RT-PCR noch erbracht werden.

Die Erstellung von Primern zur Amplifikation von CYP-Genen ist nicht trivial, denn sie enthielten Bereiche, deren Sequenz entweder palindromisch war oder mehrere Läufe gleicher Basen aufwies. Wird in einem solchen Bereich ein Primer erstellt, führt dies dazu, dass der Primer in der späteren PCR-Reaktion eine hohe Affinität zu sich selbst besitzt und starke Dimere ausbildet. Dies behindert die Amplifikation des Gens während der PCR. Zudem wurden für einige Primerpaare, die solche Bereiche vermieden, Nebenprodukte entdeckt. Dies führte dazu, dass die RT-PCR zur Genexpressionsanalyse bis zum Abschluss der Arbeiten nicht für alle Linien beendet werden konnte (Abbildung 44D-G). Hier ist der Nachweis des Knockouts bzw. Knockdowns noch zu erbringen.

Da aber einige der verwendeten Linien bereits in Veröffentlichungen verwendet wurden, bieten diese einen Anhaltspunkt, ob es sich auch bei den noch nicht untersuchten Linien um Knockout- oder Knockdown-Mutanten handelt. SALK\_001615C wurde bereits in Dominguez-Solis *et al.* (2008) untersucht. In dieser Veröffentlichung wird die T-DNA-Insertion im 5. Exon von *AtCYP20-3* dargestellt. Wie in Abbildung 44F zu sehen ist, konnte die Insertion innerhalb dieser Arbeit aber im 6. Exon nachgewiesen werden. Da in Dominguez-Solis *et al.* (2008) die Anzahl an Exons fehlerhaft ist (7 anstatt 9 Exons), könnte es sich dennoch um die gleiche Insertionsstelle handeln. Auch wurde in dieser

Veröffentlichung die Genexpression von *AtCYP20-3* in SALK\_001615C untersucht und es konnte gezeigt werden, dass das Gen durch die T-DNA-Insertion nicht mehr exprimiert wird. Es handelt sich damit um eine Knockout-Linie.

Die Linien SALK\_129937C und SALK\_024971C stellen *AtCYP20-2*-Mutanten dar. Für SALK\_129937 konnte in Edvardsson *et al.* 2007 gezeigt werden, dass diese ein Knockdown des *AtCYP20-2*-Gens ist. SALK\_024971C wurde erstmalig in Sirpiö *et al.* 2009 verwendet. Allerdings wurde die Genexpression von *AtCYP20-2* in dieser Veröffentlichung weder gezeigt noch diskutiert. Später wurde aber in Park *et al.* (2013) gezeigt, dass es sich hier um eine Knockout-Mutante handelt.

Die Linien GABI\_578C07 (*AtCYP18-4*), GABI\_159E05 (*AtCYP20-3*), SALK\_049034C und SALK\_028513C (beide *AtCYP26-2*) wurden in der Literatur noch nicht beschrieben.

**Tabelle 25: Übersicht der T-DNA-Insertionsstellen.**

Gen	Linie	Position der Insertion	Insertion liegt in/im
<i>AtCYP18-3</i> ( <i>At4g38740</i> )	SALK_121820	-307	Promotor
	SALK_050945C	-247	Promotor
<i>AtCYP18-4</i> ( <i>At4g34870</i> )	GABI_578C07	27	Exon
<i>AtCYP19-1</i> ( <i>At2g16600</i> )	SALK_063724C	-40	5'UTR
	SALK_095698C	-35	5'UTR
<i>AtCYP19-3</i> ( <i>At3g56070</i> )	SALK_067272	304	Exon
<i>AtCYP20-2</i> ( <i>At5g13120</i> )	SALK_129937C	-3	5'UTR
	SALK_024971C	702	Exon
<i>AtCYP20-3</i> ( <i>At3g62030</i> )	GABI_159E05	594	Intron
	SALK_001615C	1522	Exon
<i>AtCYP26-2</i> ( <i>At1g74070</i> )	SALK_028513C	+18	3'UTR
	SALK_049034C	+157	3'UTR

### 3.8.2 Unter normalen Wachstumsbedingungen zeigt keine *AtCYP*-Mutante einen Phänotyp

Alle zwölf Mutanten zeigten unter normalen Wachstumsbedingungen keinen offensichtlichen Phänotyp. Selbst die beiden als Knockout bzw. Knockdown identifizierten Mutanten SALK\_067272 und SALK\_121820 wuchsen identisch zum Wildtyp. Diese Beobachtung wird auch durch die Literatur unterstützt. Denn bisher wurden Phänotypen nur unter Stressbedingungen beschrieben, was wiederum die Rolle der CYPs in der Stressantwort verdeutlicht. Dass weder Knockdown noch Knockout einen Effekt auf den Phänotyp zeigen, könnte zudem darauf hindeuten, dass sich *AtCYP*s aufgrund ihrer hohen Sequenzähnlichkeit komplementieren können. Eine solche, auf den Phänotyp wirkende Redundanz könnte deshalb *in vivo* anhand von Mehrfachmutanten untersucht werden. Nach der Genexpressionsanalyse der verbleibenden Linien könnten demnach Knockout- und Knockdown-Einzelmutanten gekreuzt werden, um Doppelmutanten zu erstellen. Interessant wären im Zusammenhang mit der Immunantwort vor allem solche, deren betroffenen Gene bereits als mit der Pathogenabwehr assoziiert beschrieben wurden. Interessant ist diese Vorgehensweise vor allem, da bisher noch keine *CYP*-Doppelmutanten publiziert wurden. Es gibt aber Studien zu einer Immunophilin-Doppelmutante, in

welcher AtCYP20-2 und AtFKBP13 ausgeschaltet sind. Diese zeigte unter normalen Anzuchtbedingungen, Kältestress und Lichtstress ebenso wie die Einzelmutanten keinen Phänotyp. AtCYP20-2 und AtFKBP13 sind im Thylakoidlumen des Chloroplasten lokalisiert und nehmen dort eine wichtige Rolle als Bestandteil des NAD(P)H-Dehydrogenasekomplexes (AtCYP20-3) und in der Akkumulierung des Rieske Proteins, einer Untereinheit des Cytochrom  $b_6/f$  Komplexes, (AtFKBP13) ein. Zudem sind sie die einzigen aktiven PPIasen in diesem Kompartiment. Dass ihr Knockout zu keinem Defizit geführt hat, lässt darauf rückschließen, dass ihre Funktion unabhängig von ihrer PPIase Aktivität ist und von anderen Immunophilinen kompensiert werden kann. Denn außer AtCYP20-2 und AtFKBP13 sind noch 14 weitere Immunophile, davon 4 CYPs und 10 FKBP s im Thylakoidlumen lokalisiert (Ingelsson *et al.* 2009; Sirpio *et al.* 2009; Gupta *et al.* 2002). Somit zeigt diese Mutante, dass Immunophile zumindest im Thylakoidlumen vermutlich redundant zueinander sind.

Bislang konnte der Einfluss von CYPs auf den Phänotyp unter Lichtstress, oxidativem Stress sowie einer bakteriellen Infektion als biotischem Stress gezeigt werden. So zeigten SALK\_121820 und SALK\_050945C, beides Mutanten des *AtCYP18-3*-Gens, unter variierten Lichtbedingungen (Wellenlängen im blauen, dunkelroten oder roten Bereich) Veränderungen in der Entfaltung der Cotyledonen und der Hypokotyllänge (Trupkin *et al.* 2012). SALK\_001615C hingegen, wie bereits beschrieben ein Knockout des *AtCYP20-3*-Gens, reagierte hypersensitiv gegenüber oxidativem Stress, welcher durch starkes Licht, hohe Salzkonzentrationen und osmotischen Schock induziert wurde (Dominguez-Solis *et al.* 2008). Und SALK\_063724, publiziert als Knockout des *AtCYP19-1*-Gens, wurde als hypersensitiv gegenüber *P. syringae*-Infektionen beschrieben (Pogorelko *et al.* 2014).

In Hinblick auf die an *B. napus* untersuchte Virusinfektion steht nun vor allem diese im Fokus weiterer Untersuchungen. Da AtCYP19-3 bereits mit der Virusinfektion assoziiert wurde (Kovalev und Nagy 2013) und mit der Linie SALK\_067272 eine Knockout-Mutante identifiziert werden konnte, stellt diese den wichtigsten Kandidaten der etablierten Mutanten für Infektionsexperimente dar. Im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit konnten aber keine Infektionsexperimente durchgeführt werden, sodass mit den etablierten Mutanten eine Grundlage für nachfolgende Studien gelegt wurde. Zwar scheinen CYPs durch die Virusinfektion nur in geringem Maß reguliert zu sein, sie könnten aber dennoch essentielle Funktionen ausüben, sodass sich ein Verlust während einer Infektion phänotypisch auswirken könnte. Des Weiteren stellen auch abiotische Stressoren eine Möglichkeit dar, um die Rolle von CYPs innerhalb der Pflanze zu untersuchen. Denn neben Licht- und oxidativem Stress konnten auch unter Hitze- und Wasserstress Veränderungen in der Genexpression der AtCYPs beobachtet werden (siehe Tabelle A3 im Anhang).



## 4 FAZIT & AUSBLICK

Die erfolgreiche Kultivierung von Nutzpflanzen wie *B. napus* ist für die Gesellschaft von großer Bedeutung, um den wachsenden Bedarf an Nahrungsmitteln und Biomasse zu decken. Doch sich ändernde oder schädliche Umwelteinflüsse sowie Infektionen der Pflanzen führen nicht selten zu Qualitätsminderungen oder Ernteeinbußen. Um dem entgegenzuwirken ist unter anderem die Entwicklung neuer Sorten, die eine erhöhte Toleranz oder Resistenz gegen solche Stressoren aufweisen, von entscheidender Bedeutung. Kenntnisse über Stressreaktionen können aber auch für die Anzucht von Nutzpflanzen an Standorten angewendet werden, welche keine optimalen Wachstumsbedingungen aufweisen wie z. B. sehr trockene Regionen. Grundlegend ist dabei das Verständnis der Vorgänge innerhalb der Pflanze. Da CYPs bereits mit Stressantworten assoziiert wurden, stellte sich die Frage, ob diese einen Ansatzpunkt für tolerantere oder gar resistente Sorten darstellen. Um diesen Sachverhalt umfassend zu klären, ist es entscheidend, den Einfluss von CYPs auf abiotische und biotische Stressantworten sowie die damit verbundene Signalweiterleitung auf molekularer Ebene aufzuklären.

Innerhalb der vorliegenden Arbeit lag der Fokus auf biotischen Interaktionen mit Viren. Da humane CYPs auf vielfältige Weise mit Viren interagieren können und somit ein Ziel für antivirale Medikamente sind, könnten CYPs aufgrund ihrer hohen Konservierung in Pflanzen ähnliche Rollen erfüllen. Diese Arbeit sollte deshalb einen Einblick in den Einfluss von CYPs während einer Virusinfektion der Nutzpflanze *B. napus* geben. Die größten CYP-Proteinfamilien wurden bisher für photosynthetisch aktive Organismen wie Grünalgen und Pflanzen beschrieben. Dies lässt vermuten, dass sie in Pflanzen eine zentrale Bedeutung in wesentlichen physiologischen Prozessen einnehmen. Dennoch ist bis heute die physiologische Rolle der meisten CYPs in Pflanzen nicht entschlüsselt. Innerhalb dieser Arbeit konnte der CYP-Familie aus *B. napus* anhand einer bioinformatischen Datenbanksuche basierend auf bekannten *A. thaliana* CYPs eine erstaunlich große Anzahl an *Bn*CYP-Genen zugeordnet werden. So konnten 94 Gene der CYP-Familie in Raps identifiziert werden, die 91 unterschiedliche CYP-Proteine kodieren und damit die bisher größte CYP-Proteinfamilie darstellen (Abschnitt 3.1). Eine Transkriptomanalyse bestätigte die Expression von 77 verschiedenen *Bn*CYPs im Blatt (Abschnitt 3.1.4). Die Abundanz von CYP-Transkripten im Phloem wurde innerhalb dieser Arbeit nicht untersucht, da Siebelemente vermutlich keine funktionierende Transkriptionsmaschinerie besitzen und zunächst die Rolle der Proteine im Phloem untersucht werden sollte. Nichtsdestotrotz könnte auch die mRNA eine Funktion ausüben und z. B. über das Phloem als Signal weitergeleitet werden (Kehr und Buhtz 2008). Eine Studie mobiler mRNAs aus *A. thaliana* zeigte, dass die Transkripte von fünf CYPs (AtCYP18-2, AtCYP19-1, AtCYP20-2, AtCYP38, AtCYP57) mobil sind, sodass vermutet wird, dass diese über das Phloem transportiert in entfernten Organen eine Funktion ausüben könnten (Thieme *et al.* 2015). Allerdings ist die Studie von mRNAs in

*B. napus* mit dessen zweifachem Chromosomensatz über eine RT-PCR oder qPCR aufgrund der großen Anzahl sehr ähnlicher Sequenzen problematisch. Denn wie auch die Klonierung der BnCYPs zeigte (Abschnitt 3.3.1), binden Primer häufig an mehrere Isoformen, sodass diese nicht getrennt voneinander betrachtet werden können. Neben der mRNA kann aber auch das Protein selber als Langstreckensignal wirken, wie für SICYP1 in Tomate (*Solanum lycopersicum*) demonstriert wurde. Wie gezeigt wurde, wird es von jungem Gewebe in die Wurzel transportiert und erfüllt dort eine Funktion in der Auxin-abhängigen Wurzelentwicklung (Spiegelman *et al.* 2015). Das nächste BnCYP-Homolog zu SICYP1 ist BnCYP18-5. Da sich die 18-19 kDa BnCYPs sehr ähnlich und wie die RNA-Seq Daten zeigten konstitutiv anwesend sind, ist es unwahrscheinlich, dass ein einzelnes CYP in Raps als Signal solch eine spezifische Funktion erfüllt. Auch die große Anzahl an BnCYPs mit 91 Vertretern und die Identifizierung von 20 teilweise sehr ähnlichen BnCYPs im Phloem unter Standardbedingungen spricht zunächst gegen eine solche Rolle in Raps. Ohne weitere Studien zu den Auswirkungen kleiner Unterschiede in der Sequenz scheint es zunächst wahrscheinlich, dass sich die BnCYPs ersetzen können, insbesondere die auf dem A- und C-Subgenom kodierten Isoformen.

Wie bereits erwähnt, konnten innerhalb dieser Arbeit 20 BnCYP-Proteine per LC-MS/MS im Phloem identifiziert werden, wobei 12 BnCYPs ausschließlich im Phloem gefunden wurden und nicht im Blattextrakt (Abschnitt 3.2.2). Auch die 2D-Gele zeigten im Bereich der 18-19 kDa BnCYPs deutlich mehr *Spots*. Diese große Anzahl an BnCYPs im Phloem unterstützt die Annahme einer fundamentalen, spezifischen Rolle in diesem spezialisierten Kompartiment. Zudem weist die Identifizierung gleicher BnCYPs in unterschiedlichen *Spots* der 2D-Gele darauf hin, dass es im Phloem neben Phosphorylierungen noch weitere posttranslationale Modifikationen geben könnte, welche sich auch deutlich von denen im Blatt unterscheiden. Fraglich ist in diesem Zusammenhang vor allem, ob die BnCYPs bereits mit unterschiedlichen Modifikationen in das Phloem gelangen, oder ob sie erst nach ihrem Eintritt in das Phloem modifiziert werden. Eine tiefgreifende Analyse mittels MALDI LIFT-TOF/TOF-MS-Messungen könnte weitere Modifizierungen zusätzlich zu Phosphorylierungen aufdecken und somit Hinweise auf die Funktion geben. Auch könnten mit diesem methodischen Ansatz phloemspezifische Modifizierungen identifiziert werden.

Zur Rolle der CYPs im Phloem besteht die Hypothese, dass diese als Faltungshelfer an dem Transport ungefalteter Proteine über die Plasmodesmen in das Phloem beteiligt sind (Schobert *et al.* 1998; Giavalisco *et al.* 2006; Gottschalk *et al.* 2008; Rodriguez-Medina *et al.* 2011). Dies wird durch den Nachweis einer aktiven *cis/trans* Isomerisierungsreaktion in *Ricinus communis* Phloemexsudat unterstützt (Gottschalk *et al.* 2008). Innerhalb der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch Phloemexsudat aus *B. napus* eine *cis/trans* Isomerisierungsaktivität besitzt (Abschnitt 3.2.3), was zeigt, dass BnCYPs im Phloem in ihrer nativen Form vorliegen und aktiv sind. Diese Erkenntnis stützt somit die Hypothese. Ob CYPs hier unspezifisch Interaktionen eingehen oder spezifische Partner besitzen, die sie nach ihrem Transport in das Phloem in ihrer Rückfaltung unterstützen, bleibt zu untersuchen. Hierfür wäre die *in vitro* Analyse einzelner CYPs in Hinblick auf Unterschiede in Sequenz, Struktur und Funktion notwendig.

Für eine genauere Untersuchung einzelner Kandidaten im Zusammenhang mit der biotischen Stressantwort wurde die Untergruppe der 18-19 kDa BnCYP ausgewählt, da für ihre AtCYP-Homologe eine solche Rolle bereits beschrieben wurde (siehe Abschnitt 1.4.4) und innerhalb dieser Arbeit viele Vertreter dieser Gruppe im Phloem von Raps identifiziert werden konnten (Abschnitt 3.2.2). BnCYPs dieser Größe haben eine vollständige CLD ohne zusätzliche Signalpeptide, Transmembrandomänen oder andere Domänen und besitzen alle für die PPIase Aktivität hoch konservierten Aminosäuren, sodass vermutet wird, dass sie aktive PPIasen darstellen. Mit der Ausnahme von BnCYP18-1 sind sich die anderen 9 Mitglieder dieser Gruppe sehr ähnlich. Eine Untersuchung einzelner Mitglieder könnte deshalb Erkenntnisse bezüglich der postulierten redundanten Wirkungsweise bringen. Aus diesem Grund wurden mehrere Mitglieder dieser Gruppe sowie ihre AtCYP-Homologe kloniert. Im Anschluss wurden BnCYP18-4, BnCYP18-5 und BnCYP19-1 exprimiert, aufgereinigt (Abschnitt 3.3) und intensiv funktionell und strukturell untersucht. Zusätzlich zu den BnCYPs wurden auch die homologen AtCYPs analysiert, um die Ergebnisse dieser beiden *Brassicaceen* in einen Kontext zueinander setzen zu können und weitere Informationen über kleinste Unterschiede zu erhalten. Während die Untersuchung der PPIase Aktivität einzelner Kandidaten einen Hinweis auf ihre Funktion als Faltungshelfer liefern könnte, ist vor allem auch interessant, weshalb hoch identische Isoformen im Phloem vorkommen und ob diese redundant wirken. Auch ist fraglich, ob geringe Unterschiede in der Aminosäuresequenz bereits eine Auswirkung auf die Funktion, sei es die PPIase Aktivität oder die Wechselwirkung mit Interaktionspartnern, mit sich bringen. Wie gezeigt werden konnte, besitzen alle untersuchten BnCYPs und AtCYPs eine PPIase Aktivität und können durch CsA inhibiert werden, wobei sich sowohl die Aktivitäten als auch die Inhibitoraffinitäten nur in geringem Maß voneinander unterscheiden (Abschnitt 3.4). Dies lässt darauf schließen, dass nicht die Geschwindigkeit der Isomerisierungsreaktion einen limitierenden Schritt bei der Faltung darstellt, sondern vermutlich die Erkennung eines Substrats. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass sich die BnCYPs in ihrem aktiven Zentrum kaum voneinander unterscheiden, es aber Aminosäureaustausche in den Randbereichen um das aktive Zentrum gibt, welche sich auf Interaktionen auswirken könnten (Abschnitt 3.5.4). Davon unabhängig könnten die untersuchten BnCYPs durch einen Redoxmechanismus in ihrer Aktivität reguliert werden. Ob alle getesteten CYPs einer solchen Regulierung unterliegen, könnte durch eine Wiederholung des PPIase Assays unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen geklärt werden. Da auch bereits gezeigt werden konnte, dass BnCYP18-4 und BnCYP19-1 Disulfidbrücken bilden können (Abschnitt 3.3.4), sollte dies auch für die anderen BnCYPs und AtCYPs getestet werden. Eine Kombination aus gelbasiertem Nachweis und Enzymaktivitätsassay bietet demnach die Möglichkeit, den Einfluss von Disulfidbrücken auf die Aktivität zu untersuchen.

Strukturell gesehen sind CYPs stark konserviert, sodass auch für BnCYPs und AtCYPs eine starke Ähnlichkeit in der Gesamtstruktur erwartet wurde. Sowohl die SAXS-Daten als auch die Kristallstruktur bestätigten dies. Während die SAXS-Daten dieser Arbeit die ersten veröffentlichten *ab initio* Modelle von CYPs darstellen, repräsentiert die Kristallstruktur von BnCYP19-1 die erste *single-domain* CYP-Struktur aus *Brassicaceen*, da aus *A. thaliana* bisher nur ein *multi-domain* CYP kristallisiert wurde (Vasudevan *et al.* 2012). Interessanterweise konnte mit beiden Methoden zum ersten Mal gezeigt werden, dass CYPs einen

flexiblen, ungeordneten C-Terminus besitzen. Neben BnCYP19-1 wurden auch Kristallisationsversuche mit BnCYP18-4, AtCYP18-3 und AtCYP19-3 durchgeführt, welche bisher zu keiner erfolgreichen Kristallbildung geführt haben. In allen Ansätzen hat sich jedoch CsA als ein auf die Kristallisation positiv wirkender Ligand erwiesen. Während BnCYP19-1 mit CsA beider Hersteller (Novartis und Sigma-Aldrich, siehe Abschnitt 3.5.3) eine Kristallbildung zeigte, konnten auch CsCYP und TaCYPA-1 mit CsA kristallisiert werden (Campos *et al.* 2013; Sekhon *et al.* 2013). Auf Grundlage der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse könnten hier weitere Optimierungen der Konditionen (Temperatur, Proteinkonzentration, Puffer, Präzipitant und Salze) getestet werden und vermutlich in Kombination mit der *Seeding* Technik (Thaller *et al.* 1981) zur Kristallbildung führen. Da TaCYPA-1 zudem auch ohne CsA kristallisiert werden konnte (Sekhon *et al.* 2013), könnte auch weiterhin eine Kristallisation ohne CsA fokussiert werden, um strukturelle Änderungen durch den Inhibitor ausschließen zu können. Da die Bindung von CsA in TaCYPA-1 allerdings zu keinen signifikanten Konformationsänderungen führte und auch die SAXS-Daten von BnCYP18-4, BnCYP18-5, BnCYP19-1 und AtCYP19-3 mit CsA keine starken Änderungen in der globalen Faltung der Proteine in Lösung zeigten (Abschnitt 3.5.2), scheint es keine strukturellen Änderungen durch die Inhibitorbindung zu geben. Kann weder mit noch ohne CsA erfolgreich kristallisiert werden, könnten weitere Substrate wie zum Beispiel Dipeptide mit Prolin eine Option darstellen.

Obwohl die Gesamtstruktur von CYPs hochkonserviert ist, scheinen einzelne Aminosäuren durchaus einen Einfluss auf die Funktion auszuüben. Wie anhand einer AtCYP18-3 Mutante gezeigt wurde, führt eine Punktmutation (S58F) dazu, dass dieses AtCYP eine bisher unbekannte Funktion erhält und anders als die Wildtyp-Form reagiert (Ma *et al.* 2013; Li *et al.* 2014). Diese Position ist in allen *single-domain* CYPs stark konserviert und liegt strukturell betrachtet an keiner für die Struktur oder Funktion beschriebenen essentiellen Stelle. Zudem ist der Aminosäurerest in der Kristallstruktur von BnCYP19-1 nach innen gerichtet, was Interaktionen unwahrscheinlich macht. Dennoch konnte gezeigt werden, dass diese Mutante einen Einfluss auf das Stängelwachstum und die Pathogenabwehr von *P. syringae* hat (Ma *et al.* 2013; Li *et al.* 2014). Dieses Beispiel demonstriert eindrucksvoll, dass der Austausch einzelner Aminosäuren innerhalb der hochkonservierten CYP-Familie spezifische Funktionen vermitteln kann. In diesem Sinne liefert die vorliegende Arbeit eine solide Grundlage für weiterführende Analysen der 18-19 kDa BnCYPs und insbesondere für ihre Rolle im Phloem. Denn wie die Daten dieser Arbeit zeigen, stellen diese *single-domain* CYPs vermutlich funktionierende PPIasen im Phloem dar. Dass eine große Anzahl sehr ähnlicher Proteine im Phloem enthalten ist, wirft vor allem die Frage auf, weshalb hier nicht selektiert wurde und lässt vermuten, dass ihre Funktion entweder so essentiell ist, dass diese auch bei dem Ausfall eines Mitglieds aufrechterhalten werden muss (wie z. B. ihre Rolle als Faltungshelfer), oder so spezifisch, dass unterschiedliche Mitglieder verschiedene Interaktionspartner besitzen. Um hierauf eine Antwort zu finden, müssen als nächstes Interaktionspartner und die für deren Bindung verantwortlichen Bindestellen identifiziert werden.

Im Anschluss könnten SAXS Studien zur Untersuchung der Bindung von Interaktionspartnern durchgeführt werden. Nach der Identifizierung von Interaktionspartnern wäre dies ein wichtiger Schritt,

um spezifische Interaktionen der sehr ähnlichen CYPs näher zu untersuchen. Hierbei wären vor allem Versuche mit Interaktionspartnern, welche größer als CsA oder das Substrat des PPIase Assays sind, interessant, um nicht nur die Bindung im aktiven Zentrum, sondern vor allem den Einfluss von Aminosäureaustauschen in naheliegenden Regionen zu bestimmen. Wie der Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener 18-19 kDa BnCYPs mit der in dieser Arbeit aufgelösten BnCYP19-1 Kristallstruktur gezeigt hat, liegen Unterschiede vor allem im Bereich von Schleifen außerhalb konservierter struktureller Bereiche und des aktiven Zentrums (Abschnitt 3.5.4). Häufig entstehen funktionelle Unterschiede zwischen Mitgliedern einer Proteinfamilie durch strukturelle Unterschiede auf der Proteinoberfläche. Ist die Gesamtstruktur stark konserviert, kommt strukturelle Variabilität vor allem durch Substitutionen, Insertionen und Deletionen einzelner Aminosäuren vor. Deshalb bestimmen häufig die Schleifen die Spezifität eines Proteins in einem konservierten Proteingerüst (Fiser *et al.* 2000).

Die Rolle eines Proteins zu entschlüsseln ist besonders bei multifunktionalen Proteinen ohne kovalent bindende Interaktionspartner nicht trivial. Da bereits für einzelne CYPs aus *A. thaliana* gezeigt wurde, dass diese an unterschiedlichen Funktionen innerhalb der Pflanze beteiligt sind (siehe Tabelle A3 im Anhang), müssen solche Wege zunächst separat untersucht werden. Um einen ersten Schritt in diese Richtung zu tätigen, wurde innerhalb dieser Arbeit untersucht, ob CYPs ähnlich wie in humanen Zellen einen Einfluss auf die Virusinfektion von Pflanzen zeigen. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt, welche einen ersten Einblick in die Rolle der CYPs gewähren sollten. Der erste Ansatz sah Proteomstudien von Proben des Blatts als lokalen Infektionsort und des Phloems als systemisches Transportsystems vor und sollte somit einen Vergleich von unterschiedlichen Stadien der Infektion ermöglichen. Die statistische Analyse zeigte, dass durch die TuMV-Infektion im Blatt ein chloroplastidäres BnCYP, im Phloem aber kein BnCYP in seiner Abundanz signifikant verändert wurde (Abschnitt 3.6.2). Wurden zudem die gesamten Daten betrachtet, schien die Infektion nur wenige Proteine zu beeinflussen. Die Grenzen im Volcano Plot (Abbildung 40) sind mit einer Änderung von 20 % niedrig gesetzt, um einen Eindruck der geringen Änderungen zu vermitteln. Auf der Suche nach stark regulierten Proteinen wäre hier eine 100-fache Änderung angebracht, was einer Verdopplung oder Halbierung entspräche. Es ist deutlich zu sehen, dass in einem solchen Fall nur sehr wenige Proteine als signifikant reguliert gelten würden. Dieses Ergebnis ist für *Potyviren* typisch, da auch eine Proteomstudie zur Infektion des *Soybean mosaic virus* in Sojablättern nur 28 durch das Virus regulierte Proteine entdeckt hat (Yang *et al.* 2011). Dies zeigt, dass durch *Potyviren* induzierte Effekte auf Proteomebene nicht so stark ausgeprägt sind wie auf Transkriptomebene. Denn auf dieser konnten nach einer TuMV-Infektion von *A. thaliana* 556 regulierte Gene identifiziert werden (Yang *et al.* 2007). Ein direkter Vergleich der Methoden ist aber, wie bereits zuvor diskutiert, nur bedingt möglich (Abschnitt 3.2.2). Trotzdem zeigten sowohl die Proteom- als auch die Transkriptomdaten der *Potyvirus*-Infektion im Vergleich zu der Infektion anderer Viren, dass diese keine starken Veränderungen hervorruft. Im Vergleich zeigte z. B. die Infektion von *A. thaliana* mit einem *Geminivirus*, dem *Cabbage leaf curl virus*, über 5000 differentiell exprimierte Gene (Ascencio-Ibanez *et al.* 2008).

Dass das Virus keine Veränderungen in der Abundanz von CYPs in dem systemischen Langstreckentransportsystem Phloem hervorzurufen scheint, lässt nicht ausschließen, dass CYPs nicht an dessen Eintritt in das Phloem, Transport durch das Phloem oder Austritt aus dem Phloem beteiligt sind. Da für AtCYP18-3 bereits die Bindung viraler RNA und Proteine des TBSV, einem *Tombusvirus*, gezeigt werden konnte (Kovalev und Nagy 2013), könnte ein ähnlicher Versuch mit den in dieser Arbeit exprimierten und aufgereinigten BnCYPs und AtCYPs durchgeführt werden und so erste Hinweise auf eine direkte Interaktion liefern.

Der zweite Ansatz zur Bestimmung der Rolle von CYPs während der Virusinfektion umfasste phänotypische Analysen von Knockout- oder Knockdown-Mutanten. Um diese *in vivo* Untersuchungen durchführen zu können, wurden T-DNA-Mutanten der Modellpflanze *A. thaliana* genotypisiert und die T-DNA-Insertionsstelle bestimmt. Eine Genexpressionsanalyse der betroffenen Gene konnte bis zum Ende der Arbeiten nicht für alle Linien fertiggestellt werden, sodass dies vor ihrem Einsatz in Stressexperimenten beendet werden sollte. Wie bereits diskutiert (Abschnitt 3.8.2), zeigte keine Mutante unter normalen Wachstumsbedingungen einen Phänotyp. Für weiterführende Studien zum Einfluss von CYPs während der Virusinfektion könnten diese Mutanten nun Infektionsexperimenten mit TuMV unterzogen werden. Zudem zeigt die Literatur (siehe Tabelle A3 im Anhang), dass CYPs auch an anderen abiotischen und biotischen Stressreaktionen beteiligt sein können, sodass durchaus andere Stressoren wie Hitze-, Wasser- oder Salzstress in Betracht gezogen werden sollten. In Zusammenhang mit der Anzucht von Nutzpflanzen auf dem Feld wäre in diesem Sinne auch interessant, wie sich eine Kombination von Stressoren auf die Pflanzen auswirkt. Hierfür könnten die CYP-Mutanten neben der Virusinfektion zusätzlich einem abiotischen Stress ausgesetzt werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Hitze- und Trockenstress zusammen mit einer TuMV-Infektion zu einer verringerten Resistenz von Pflanzen führen können (Prasch und Sonnewald 2013). Um zudem eine redundante Wirkungsweise der AtCYPs auszuschließen, könnten durch Kreuzung der Einzelmutanten Mehrfachmutanten generiert und ebenso in Stressexperimenten eingesetzt werden.

Abschließend ist zu sagen, dass sich zukünftige Studien auf die funktionelle Charakterisierung einzelner Kandidaten fokussieren sollten, um die vielfältigen Aufgaben von CYPs in der Pflanze zu untersuchen. Diese Arbeit bietet dafür eine gute Grundlage, weshalb zur Übersicht im Anhang in Tabelle A4 noch einmal eine vollständige Zusammenfassung der Klonierung, Experimente und Mutanten dieser Arbeit zu finden ist. Je nach gewählter Fragestellung könnten dementsprechend *in vivo* und *in vitro* Studien von *A. thaliana* und *B. napus* CYPs durchgeführt und kombiniert werden. Anschließend an diese Arbeit wäre die Aufklärung der Rolle von CYPs innerhalb des Phloems von besonderem Interesse, da diese an der Proteinneufaltung nach dem Transport in das Phloem oder an der Signalweiterleitung beteiligt sein könnten. Hierbei könnte die Identifikation von Interaktionspartnern wie RNA, DNA oder Proteinen und posttranslationaler Modifikationen erste Hinweise auf ihre Funktion liefern. Zur Aufklärung des Einflusses von CYPs während der Virusinfektion würden sich zudem weiterführende Experimente mit den in dieser Arbeit etablierten Mutanten anbieten. Insgesamt würden diese experimentellen Ansätze zum Verständnis der CYPs in der Pflanzenbiologie beitragen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Da Pflanzen sessil sind, haben sie Strategien entwickelt, um auf abiotische und biotische Stressfaktoren reagieren zu können. Kenntnisse über diese Mechanismen sind für die Anzucht und Optimierung von Nutzpflanzen interessant, um den steigenden Bedarf an Nahrungsmitteln und Biomasse zu decken. Da Virusinfektionen für die Hälfte aller Krankheiten von Nutzpflanzen verantwortlich sind, stellen diese einen großen Faktor hinsichtlich der Produktqualität und -quantität dar. Zu einer der größten Gruppen der Pflanzenviren, den +ssRNA-Viren, gehört das *Turnip mosaic virus* (TuMV). Es infiziert Nutzpflanzen wie Raps (*B. napus*) und Rübsen (*B. rapa*) und nutzt das Langstreckentransportsystem Phloem für die systemische Verbreitung innerhalb des Wirts. Da CYPs ein wichtiges Ziel für die Herstellung wirksamer Medikamente gegen Virusinfektionen humaner Zellen sind, stellt sich die Frage, ob pflanzliche CYPs einen ähnlich Einfluss auf die Virusinfektion und deren systemische Verbreitung zeigen.

In dieser Arbeit führten bioinformatische Untersuchungen der *B. napus* Genomsequenz zur Identifizierung von 94 Genen, welche 91 unterschiedliche CYP-Proteine kodieren und damit die bisher größte CYP-Proteinfamilie darstellen. Diese große Anzahl ist auf den Ursprung von *B. napus* zurückzuführen und eine phylogenetische Analyse offenbarte dementsprechend in vielen Fällen zwei sehr ähnliche Isoformen. Im Rahmen weiterer *in silico* Analysen konnte gezeigt werden, dass BnCYPs in allen intrazellulären Kompartimenten anzutreffen sind und es in der CLD Bereiche hochkonservierter Aminosäuren gibt, welche vor allem Sekundärstrukturelemente und die Enzymaktivität aufrechterhalten.

Zum Nachweis der 91 putativen BnCYPs wurden sowohl auf Transkriptom- als auch auf Proteomebene Analysen unter normalen Wachstumsbedingungen durchgeführt. So konnte zum einen die Expression von 77 verschiedenen *BnCYPs* anhand einer Transkriptomanalyse bestätigt werden. Zum anderen konnte sowohl mit der 2D-Gelelektrophorese, als auch mittels LC-MS/MS gezeigt werden, dass in Blatt- und Phloemproben mehrere BnCYPs vorhanden sind und diese posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen tragen können. Dass zudem eine vorhandene PPIase Aktivität im Phloemexsudat nachgewiesen werden konnte, untermauert die postulierte Hypothese zur Rolle von CYPs im Phloem, nach welcher diese als Faltungshelfer an dem Transport ungefalteter Proteine über die Plasmodesmen in das Phloem beteiligt sein könnten. Fraglich ist aber, ob die sehr ähnlichen BnCYPs in dieser Funktion redundant sind oder spezifische Interaktionspartner besitzen. Basierend auf den grundlegenden Analysen wurden deshalb mehrere Kandidaten aus dem Bereich der 18-19 kDa BnCYPs und AtCYPs für funktionelle und strukturelle Untersuchungen ausgewählt. Wie gezeigt werden konnte, besaßen alle untersuchten CYPs eine PPIase Aktivität und konnten durch CsA inhibiert werden, wobei sich sowohl die Aktivitäten als auch die Inhibitoraffinitäten nur in geringem Maß voneinander unterschieden. Zudem konnte gezeigt werden, dass BnCYP18-4 und BnCYP19-1 Disulfidbrücken bilden können. Damit

könnten die BnCYPs dem für CsCYP postulierten Mechanismus zur Regulation der PPIase Aktivität folgen.

Zur Bestimmung der Struktur und deren Auswirkungen auf die Funktion wurden SAXS- und Kristallisationsversuche mit anschließender Röntgenstrukturanalyse durchgeführt. Mit SAXS konnten die ersten *ab initio* Modelle von CYPs generiert werden. Diese zeigten eine Ähnlichkeit in der Gesamtstruktur aller untersuchten BnCYPs und AtCYPs sowie einen bisher noch nicht beschriebenen flexiblen C-Terminus. Mit der Röntgenstrukturanalyse konnte mit einer Auflösung von 1,98 Å die Kristallstruktur von BnCYP19-1 aufgelöst werden, der ersten pflanzlichen *single-domain* CYP Struktur der *Brassicaceen*. Diese bestätigte ebenfalls die insgesamt hohe Konservierung der CLD. Ein Vergleich der Kristallstruktur mit den Sequenzen der 18-19 kDa BnCYPs zeigte, dass sich Unterschiede überwiegend auf der Proteinoberfläche im Bereich von Schleifen befinden. Diese lassen vermuten, dass trotz der hohen strukturellen Konservierung eine Spezifität der Funktion bestehen könnte.

Im Rahmen der Virusinfektion durchgeführte Proteomstudien von *B. napus* Blatt- und Phloemproben zeigten, dass durch die TuMV-Infektion insgesamt nur sehr wenige Proteine signifikant reguliert wurden. Während im Phloem kein einziges BnCYP als signifikant reguliert identifiziert werden konnte, konnte im Blatt nur ein chloroplastidäres BnCYP, BnCYP27-3, identifiziert werden. Da die Funktion aber auch unabhängig von der Änderung der Abundanz sein kann, wurden *A. thaliana* Knockout- oder Knockdown-Mutanten für Stressexperimente etabliert. Hierfür wurden die T-DNA-Mutanten zunächst genotypisiert, die T-DNA-Insertionsstelle bestimmt und die Genexpressionsanalyse für 5 der 12 Linien fertiggestellt, sodass diese Mutanten für nachfolgende Infektionsexperimente bereitstehen. Letztendlich hat damit die Kombination verschiedener *in silico*, *in vitro* und *in vivo* Methoden dazu beigetragen, dass mit dieser Arbeit grundlegende Studien zur Charakterisierung der CYPs aus *B. napus* durchgeführt werden und erste Ansätze zur Aufklärung ihres Einflusses auf die Virusinfektion erfolgen konnten.

## 6 ABSTRACT

Since plants are sessile, they have developed strategies to react to abiotic and biotic stress factors. Knowledge of these mechanisms is of interest for the cultivation and optimisation of crops to meet the growing demand for food and biomass. Since virus infections are responsible for half of all crop diseases, they are a major factor concerning product quality and quantity. The *Turnip mosaic virus* (TuMV) belongs to one of the largest groups of plant viruses, the +ssRNA viruses. It infects crops such as rape (*B. napus*) and turnip (*B. rapa*), and uses the long-distance transport system phloem for systemic distribution within the host. As CYPs are an important target for the production of effective drugs against viral infections of human cells, the question arises whether plant CYPs have a similar effect on viral infection and its systemic spread.

In this work, bioinformatic investigations of the *B. napus* genome sequence led to the identification of 94 genes that encode 91 different CYP proteins and thus represent the largest CYP protein family known to date. This large number results from the origin of *B. napus* and indeed a phylogenetic analysis revealed in many cases two very similar isoforms. Further *in silico* analyses have shown that BnCYPs are localised to all intracellular compartments and that there are sections of highly conserved amino acids in the CLD that maintain secondary structure and enzyme activity.

To provide evidence for the expression of the 91 putative BnCYPs, analyses were performed at both transcriptome and proteome levels under normal growth conditions. By transcriptome analysis the expression of 77 different BnCYPs was confirmed. On the other hand, 2D gel electrophoresis as well as LC-MS/MS have shown that leaf and phloem samples contain several BnCYPs, which may carry posttranslational modifications such as phosphorylations. The fact that PPIase activity could also be detected in phloem exudate supports the postulated hypothesis on the role of CYPs in the phloem, according to which they could be involved as folding helpers in the transport of unfolded proteins via plasmodesmata into the phloem. However, the question whether the very similar BnCYPs are redundant in this function or have specific interaction partners remains. Based on the basic analyses, several candidates from the 18-19 kDa range of BnCYPs and AtCYPs were selected for functional and structural investigations. As could be shown, all CYPs examined had PPIase activity and could be inhibited by CsA, and both, the activities and the inhibitor affinities, differed only slightly from each other. It has also been shown that BnCYP18-4 and BnCYP19-1 can form disulfide bridges. Thus, BnCYPs could follow the mechanism postulated for CsCYP to regulate PPIase activity.

To determine the structure and its impact on protein function, SAXS and crystallization experiments with subsequent X-ray structure analysis were performed. The first *ab initio* models of CYPs could be generated with SAXS. These showed a similar overall structure of all examined BnCYPs and AtCYPs as well as a

## Abstract

flexible C-terminus not yet described. By the X-ray structure analysis, the crystal structure of BnCYP19-1, the first plant single-domain CYP structure of the *Brassicaceae*, could be resolved at a resolution of 1.98 Å. This also confirmed the overall high conservation of the CLD. A comparison of the crystal structure with the sequences of the 18-19 kDa BnCYPs showed that differences are predominantly found on the protein surface in the region of loops. This suggests that a specificity in function may exist despite the high structural conservation.

Proteome studies of *B. napus* leaf and phloem samples carried out after virus infection showed that very few proteins were significantly regulated by TuMV. While not a single BnCYP could be identified as significantly regulated in the phloem, in the leaf only BnCYP27-3 which is supposed to be located in chloroplasts could be identified. However, since protein function may be unrelated to the change in abundance, *A. thaliana* knockout or knockdown mutants were established for stress experiments. For this purpose, T-DNA mutants were genotyped and their T-DNA insertion site determined. The gene expression analysis could be completed for 5 of the 12 lines, so that these mutants are available for subsequent infection experiments. As a summary, the combination of different *in silico*, *in vitro* and *in vivo* methods contributed to this work's basic studies on the characterization of CYPs from *B. napus* and enabled first approaches to elucidate their influence on virus infection.

## 7 LITERATUR

- Ahn JC *et al.* (2010) Classification of rice (*Oryza sativa* L. Japonica nipponbare) immunophilins (FKBPs, CYPs) and expression patterns under water stress. *BMC Plant Biol* 10, 253
- Aki T *et al.* (2008) Nano scale proteomics revealed the presence of regulatory proteins including three FT-Like proteins in phloem and xylem saps from rice. *Plant Cell Physiol* 49, 767-790
- Alazem M und Lin NS (2015) Roles of plant hormones in the regulation of host-virus interactions. *Mol Plant Pathol* 16, 529-540
- Anstead JA, Hartson SD und Thompson GA (2013) The broccoli (*Brassica oleracea*) phloem tissue proteome. *BMC Genomics* 14, 764
- Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796-815
- Ascencio-Ibanez JT *et al.* (2008) Global analysis of Arabidopsis gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during *Geminivirus* infection. *Plant Physiol* 148, 436-454
- Aumuller T, Jahreis G, Fischer G und Schiene-Fischer C (2010) Role of prolyl *cis/trans* isomers in cyclophilin-assisted *Pseudomonas syringae* AvrRpt2 protease activation. *Biochemistry* 49, 1042-1052
- Bannikova O *et al.* (2013) Identification of RNA targets for the nuclear multidomain cyclophilin atCyp59 and their effect on PPIase activity. *Nucleic Acids Res* 41, 1783-1796
- Barik S (2006) Immunophilins: for the love of proteins. *Cell Mol Life Sci* 63, 2889-2900
- Barnes A *et al.* (2004) Determining protein identity from sieve element sap in *Ricinus communis* L. by quadrupole time of flight (Q-TOF) mass spectrometry. *J Exp Bot* 55, 1473-1481
- Battye TG *et al.* (2011) iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Cryst D* 67, 271-281
- Baures I *et al.* (2008) The Rx gene confers resistance to a range of *potexviruses* in transgenic Nicotiana plants. *Mol Plant Microbe Interact* 21, 1154-1164
- Benning UF, Tamot B, Guelette BS und Hoffmann-Benning S (2012) New aspects of phloem-mediated long-distance lipid signaling in plants. *Front Plant Sci* 3, 53
- Benvenuti M und Mangani S (2007) Crystallization of soluble proteins in vapor diffusion for x-ray crystallography. *Nat Protoc* 2, 1633-1651
- Berardini TZ *et al.* (2015) The Arabidopsis information resource: Making and mining the "gold standard" annotated reference plant genome. *Genesis* 53, 474-485
- Bergfors TM (2009) Protein crystallization. 2 edn. *International University Line*, La Jolla, CA, USA
- Biasini M *et al.* (2014) SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res* 42, W252-258
- Bienert S *et al.* (2017) The SWISS-MODEL repository-new features and functionality. *Nucleic Acids Res* 45, D313-D319

## Literatur

- Blanchet CE *et al.* (2015) Versatile sample environments and automation for biological solution X-ray scattering experiments at the P12 beamline (PETRA III, DESY). *J Appl Crystallogr* 48, 431-443
- 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
- Brunger AT (1992) Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* 355, 472-475
- Buhtz A *et al.* (2004) Xylem sap protein composition is conserved among different plant species. *Planta* 219, 610-618
- Buhtz A, Pieritz J, Springer F und Kehr J (2010) Phloem small RNAs, nutrient stress responses, and systemic mobility. *BMC Plant Biol* 10, 64
- Calderwood A, Kopriva S und Morris RJ (2016) Transcript abundance explains mRNA mobility data in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 28, 610-615
- Campos BM *et al.* (2013) A redox 2-Cys mechanism regulates the catalytic activity of divergent cyclophilins. *Plant Physiol* 162, 1311-1323
- Caplan J, Padmanabhan M und Dinesh-Kumar SP (2008) Plant NB-LRR immune receptors: from recognition to transcriptional reprogramming. *Cell Host Microbe* 3, 126-135
- Carbonell A und Carrington JC (2015) Antiviral roles of plant ARGONAUTES. *Curr Opin Plant Biol* 27, 111-117
- Chalhoub B *et al.* (2014) Early allopolyploid evolution in the post-neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science* 345, 950-953
- Chen IH, Meng M, Hsu YH und Tsai CH (2003) Functional analysis of the cloverleaf-like structure in the 3' untranslated region of *bamboo mosaic potexvirus* RNA revealed dual roles in viral RNA replication and long distance movement. *Virology* 315, 415-424
- Chen J *et al.* (2014) Arabidopsis PHOSPHOTYROSYL PHOSPHATASE ACTIVATOR is essential for PROTEIN PHOSPHATASE 2A holoenzyme assembly and plays important roles in hormone signaling, salt stress response, and plant development. *Plant Physiol* 166, 1519-1534
- Chong J *et al.* (2018) MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Res* 46, W486-W494
- Coaker G, Falick A und Staskawicz B (2005) Activation of a phytopathogenic bacterial effector protein by a eukaryotic cyclophilin. *Science* 308, 548-550
- Coaker G *et al.* (2006) Eukaryotic cyclophilin as a molecular switch for effector activation. *Mol Microbiol* 61, 1485-1496
- Collum TD, Padmanabhan MS, Hsieh YC und Culver JN (2016) Tobacco mosaic virus-directed reprogramming of auxin/indole acetic acid protein transcriptional responses enhances virus phloem loading. *Proc Natl Acad Sci USA* 113, E2740-2749
- Coordinators NR (2016) Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* 44, D7-19
- Cronshaw J (1981) Phloem structure and function. *Annu Rev Plant Physiol* 32, 465-484
- Czajlik A, Kovacs B, Permi P und Gaspari Z (2017) Fine-tuning the extent and dynamics of binding cleft opening as a potential general regulatory mechanism in parvulin-type peptidyl prolyl isomerases. *Sci Rep* 7, 44504
- Daum S *et al.* (2009) Isoform-specific inhibition of cyclophilins. *Biochemistry* 48, 6268-6277
- Dawar FU *et al.* (2017) Cyclophilin A: a key factor in virus replication and potential target for anti-viral therapy. *Curr Issues Mol Biol* 21, 1-20

- Deng W *et al.* (1998) *Agrobacterium* VirD2 protein interacts with plant host cyclophilins. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 7040-7045
- Dimou M, Venieraki A und Katinakis P (2017) Microbial cyclophilins: specialized functions in virulence and beyond. *World J Microbiol Biotechnol* 33, 164
- Dominguez-Solis JR *et al.* (2008) A cyclophilin links redox and light signals to cysteine biosynthesis and stress responses in chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 16386-16391
- Dornan J *et al.* (1999) Biochemical and structural characterization of a divergent loop cyclophilin from *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 274, 34877-34883
- Durand D *et al.* (2010) NADPH oxidase activator p67(phox) behaves in solution as a multidomain protein with semi-flexible linkers. *J Struct Biol* 169, 45-53
- Earley KW und Poethig RS (2011) Binding of the cyclophilin 40 ortholog SQUINT to Hsp90 protein is required for SQUINT function in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 286, 38184-38189
- Edvardsson A, Eshaghi S, Vener AV und Andersson B (2003) The major peptidyl-prolyl isomerase activity in thylakoid lumen of plant chloroplasts belongs to a novel cyclophilin TLP20. *FEBS Lett* 542, 137-141
- Edvardsson A *et al.* (2007) Immunophilin AtFKBP13 sustains all peptidyl-prolyl isomerase activity in the thylakoid lumen from *Arabidopsis thaliana* deficient in AtCYP20-2. *Biochemistry* 46, 9432-9442
- Edwards K, Johnstone C und Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* 19, 1349
- Emsley P und Cowtan K (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Cryst D* 60, 2126-2132
- Esau K (1969) The phloem, vol 5. Encyclopedia of Plant Anatomy. Gebr. Borntraeger, Berlin, Deutschland
- Fanghanel J und Fischer G (2004) Insights into the catalytic mechanism of peptidyl prolyl *cis/trans* isomerases. *Front Biosci* 9, 3453-3478
- Feigin LA, Svergun DI und Taylor GW (1987) Structure analysis by small-angle X-ray and neutron scattering. Springer, Boston, MA
- Fischer G, Bang H und Mech C (1984) Determination of enzymatic catalysis for the *cis-trans*-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides. *Biomed Biochim Acta* 43, 1101-1111
- Fiser A, Do RK und Sali A (2000) Modeling of loops in protein structures. *Protein Sci* 9, 1753-1773
- Folimonova SY und Tilsner J (2018) Hitchhikers, highway tolls and roadworks: the interactions of plant viruses with the phloem. *Curr Opin Plant Biol* 43, 82-88
- Franke D, Kikhney AG und Svergun DI (2012) Automated acquisition and analysis of small angle X-ray scattering data. *Nucl Instrum Methods Phys Res* 689, 52-59
- Franke D *et al.* (2017) ATSAS 2.8: a comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions. *J Appl Crystallogr* 50, 1212-1225
- Franke D und Svergun DI (2009) DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *J Appl Crystallogr* 42, 342-346
- Fu A *et al.* (2007) A chloroplast cyclophilin functions in the assembly and maintenance of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 15947-15952
- Fu ZQ und Dong X (2013) Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annu Rev Plant Biol* 64, 839-863

## Literatur

- Fuhrmann M *et al.* (2004) Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. *Plant Mol Biol* 55, 869-881
- Fukuda H (2000) Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. *Plant Mol Biol* 44, 245-253
- Galat A (2004) Function-dependent clustering of orthologues and paralogues of cyclophilins. *Proteins* 56, 808-820
- Galvez LC, Banerjee J, Pinar H und Mitra A (2014) Engineered plant virus resistance. *Plant Sci* 228, 11-25
- Garcia-Ruiz H *et al.* (2010) Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during *Turnip Mosaic Virus* infection. *Plant Cell* 22, 481-496
- Gasser CS, Gunning DA, Budelier KA und Brown SM (1990) Structure and expression of cytosolic cyclophilin/peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase of higher plants and production of active tomato cyclophilin in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 9519-9523
- Gasteiger E *et al.* (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: The proteomics protocols handbook. *Humana press*, pp 571-607
- Ghosh D *et al.* (2014) Primary identification, biochemical characterization, and immunologic properties of the allergenic pollen cyclophilin Cat r 1. *J Biol Chem* 289, 21374-21385
- Giavalisco P *et al.* (2006) Towards the proteome of *Brassica napus* phloem sap. *Proteomics* 6, 896-909
- Goldberg T *et al.* (2014) LocTree3 prediction of localization. *Nucleic Acids Res* 42, W350-355
- Gottschalk M *et al.* (2008) *Ricinus communis* cyclophilin: functional characterisation of a sieve tube protein involved in protein folding. *Planta* 228, 687-700
- Gourlay LJ *et al.* (2007) The three-dimensional structure of two redox states of cyclophilin A from *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem* 282, 24851-24857
- Grebe M *et al.* (2000) A conserved domain of the Arabidopsis GNOM protein mediates subunit interaction and cyclophilin 5 binding. *Plant Cell* 12, 343-356
- Guinier A (1939) La diffraction des rayons X aux très petits angles: application à l'étude de phénomènes ultramicroscopiques. In: *Annales de physique*, vol 11. pp 161-237
- Gullerova M, Barta A und Lorkovic ZJ (2006) AtCyp59 is a multidomain cyclophilin from *Arabidopsis thaliana* that interacts with SR proteins and the C-terminal domain of the RNA polymerase II. *RNA* 12, 631-643
- Gupta R, Mould RM, He Z und Luan S (2002) A chloroplast FKBP interacts with and affects the accumulation of Rieske subunit of cytochrome *bf* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15806-15811
- Gust AA, Pruitt R und Nurnberger T (2017) Sensing danger: key to activating plant immunity. *Trends Plant Sci* 22, 779-791
- Ham BK und Lucas WJ (2014) The angiosperm phloem sieve tube system: a role in mediating traits important to modern agriculture. *J Exp Bot* 65, 1799-1816
- Handschumacher RE *et al.* (1984) Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 226, 544-547
- Hanhart P *et al.* (2017) Bioinformatic and expression analysis of the *Brassica napus* L. cyclophilins. *Sci Rep* 7, 1514
- Harding MW, Galat A, Uehling DE und Schreiber SL (1989) A receptor for the immunosuppressant FK506 is a *cis-trans* peptidyl-prolyl isomerase. *Nature* 341, 758-760
- He Z, Li L und Luan S (2004) Immunophilins and parvulins. Superfamily of peptidyl prolyl isomerases in Arabidopsis. *Plant Physiol* 134, 1248-1267

- Hipper C, Brault V, Ziegler-Graff V und Revers F (2013) Viral and cellular factors involved in phloem transport of plant viruses. *Front Plant Sci* 4, 154
- Hoad GV (1995) Transport of hormones in the phloem of higher plants. *J Plant Growth Regul* 16, 173-182
- Hruz T *et al.* (2008) Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv Bioinformatics* 2008,
- Iki T, Yoshikawa M, Meshi T und Ishikawa M (2012) Cyclophilin 40 facilitates HSP90-mediated RISC assembly in plants. *EMBO J* 31, 267-278
- Ingelsson B, Shapiguzov A, Kieselbach T und Vener AV (2009) Peptidyl-prolyl isomerase activity in chloroplast thylakoid lumen is a dispensable function of immunophilins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 50, 1801-1814
- Ivanov KI, Eskelin K, Lohmus A und Makinen K (2014) Molecular and cellular mechanisms underlying potyvirus infection. *J Gen Virol* 95, 1415-1429
- Jackson K und Soll D (1999) Mutations in a new *Arabidopsis* cyclophilin disrupt its interaction with protein phosphatase 2A. *Mol Gen Genet* 262, 830-838
- Jacques DA und Trehwella J (2010) Small-angle scattering for structural biology-expanding the frontier while avoiding the pitfalls. *Protein Sci* 19, 642-657
- Jeffrey GA (1997) An introduction to hydrogen bonding. *Oxford university press*, New York
- Jeffries CM *et al.* (2016) Preparing monodisperse macromolecular samples for successful biological small-angle X-ray and neutron-scattering experiments. *Nat Protoc* 11, 2122-2153
- Jones JD und Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444, 323-329
- Joosten RP, Long F, Murshudov GN und Perrakis A (2014) The PDB\_REDO server for macromolecular structure model optimization. *IUCr* 1, 213-220
- Jordens J *et al.* (2006) The protein phosphatase 2A phosphatase activator is a novel peptidyl-prolyl *cis/trans*-isomerase. *J Biol Chem* 281, 6349-6357
- Kagale S *et al.* (2014) Polyploid evolution of the *Brassicaceae* during the Cenozoic era. *Plant Cell* 26, 2777-2791
- Kamauchi S, Nakatani H, Nakano C und Urade R (2005) Gene expression in response to endoplasmic reticulum stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J* 272, 3461-3476
- Kang DH, Gho YS, Suh MK und Kang CH (2002) Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bull Korean Chem Soc* 23, 1511-1512
- Katagiri F und Tsuda K (2010) Understanding the plant immune system. *Mol Plant Microbe Interact* 23, 1531-1536
- Kaur G *et al.* (2015) Characterization of peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase- and calmodulin-binding activity of a cytosolic *Arabidopsis thaliana* cyclophilin AtCyp19-3. *PLoS One* 10, e0136692
- Kehr J (2009) Long-distance transport of macromolecules through the phloem. *F1000 Biol Rep* 1, 31
- Kehr J und Buhtz A (2008) Long distance transport and movement of RNA through the phloem. *J Exp Bot* 59, 85-92
- Kehr J, Buhtz A und Giavalisco P (2005) Analysis of xylem sap proteins from *Brassica napus*. *BMC Plant Biol* 5, 11
- Kikhney AG und Svergun DI (2015) A practical guide to small angle X-ray scattering (SAXS) of flexible and intrinsically disordered proteins. *FEBS Lett* 589, 2570-2577

## Literatur

- Kim JH *et al.* (2013) Loss of all three calreticulins, CRT1, CRT2 and CRT3, causes enhanced sensitivity to water stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep* 32, 1843-1853
- Kim SH *et al.* (2007) Interaction of a plant virus-encoded protein with the major nucleolar protein fibrillarin is required for systemic virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 11115-11120
- Kofron JL *et al.* (1991) Determination of kinetic constants for peptidyl prolyl *cis-trans* isomerases by an improved spectrophotometric assay. *Biochemistry* 30, 6127-6134
- Korbie DJ und Mattick JS (2008) Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc* 3, 1452-1456
- Kosugi S, Hasebe M, Tomita M und Yanagawa H (2009) Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 10171-10176
- Kovalev N und Nagy PD (2013) Cyclophilin A binds to the viral RNA and replication proteins, resulting in inhibition of tombusviral replicase assembly. *J Virol* 87, 13330-13342
- Kratky O (1982) Small-angle X-ray scattering. In: Glatter O, Kratky O (eds). *Academic Press*, London, pp 361-386
- Krzywicka A *et al.* (2001) *KIN241*: a gene involved in cell morphogenesis in *Paramecium tetraurelia* reveals a novel protein family of cyclophilin-RNA interacting proteins (CRIPs) conserved from fission yeast to man. *Mol Microbiol* 42, 257-267
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Laskowski RA *et al.* (2018) PDBsum: Structural summaries of PDB entries. *Protein Sci* 27, 129-134
- Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS und Thornton JM (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr* 26, 283-291
- Laxa M, Konig J, Dietz KJ und Kandlbinder A (2007) Role of the cysteine residues in *Arabidopsis thaliana* cyclophilin CYP20-3 in peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase and redox-related functions. *Biochem J* 401, 287-297
- Lee SS *et al.* (2015) Rice cyclophilin OsCYP18-2 is translocated to the nucleus by an interaction with SKIP and enhances drought tolerance in rice and *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ*,
- Letunic I und Bork P (2007) Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics* 23, 127-128
- Letunic I und Bork P (2011) Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic Acids Res* 39, W475-478
- Li H *et al.* (2007) A WD40 domain cyclophilin interacts with histone H3 and functions in gene repression and organogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 2403-2416
- Li H und Luan S (2011) The cyclophilin AtCYP71 interacts with CAF-1 and LHP1 and functions in multiple chromatin remodeling processes. *Mol Plant* 4, 748-758
- Li M *et al.* (2014) Proline isomerization of the immune receptor-interacting protein RIN4 by a cyclophilin inhibits effector-triggered immunity in *Arabidopsis*. *Cell Host Microbe* 16, 473-483
- Liebthal M *et al.* (2016) Redox-dependent conformational dynamics of decameric 2-cysteine peroxiredoxin and its Interaction with cyclophilin 20-3. *Plant Cell Physiol* 57, 1415-1425
- Lin MK *et al.* (2009) Analysis of the pumpkin phloem proteome provides insights into angiosperm sieve tube function. *Mol Cell Proteomics* 8, 343-356

- Lindwall G, Chau M, Gardner SR und Kohlstaedt LA (2000) A sparse matrix approach to the solubilization of overexpressed proteins. *Protein Eng* 13, 67-71
- Lippuner V *et al.* (1994) Cloning and characterization of chloroplast and cytosolic forms of cyclophilin from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 269, 7863-7868
- Liu J *et al.* (1991) Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66, 807-815
- Lu KP, Finn G, Lee TH und Nicholson LK (2007) Prolyl *cis-trans* isomerization as a molecular timer. *Nat Chem Biol* 3, 619-629
- Ma X, Song L, Yang Y und Liu D (2013) A gain-of-function mutation in the ROC1 gene alters plant architecture in *Arabidopsis*. *New Phytol* 197, 751-762
- Ma Y *et al.* (2010) Pumpkin eIF5A isoforms interact with components of the translational machinery in the cucurbit sieve tube system. *Plant J* 64, 536-550
- Maier T, Guell M und Serrano L (2009) Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett* 583, 3966-3973
- Mainali HR, Chapman P und Dhaubhadel S (2014) Genome-wide analysis of cyclophilin gene family in soybean (*Glycine max*). *BMC Plant Biol* 14, 282
- Mäkinen K und Hafrén A (2014) Intracellular coordination of potyviral RNA functions in infection. *Front Plant Sci* 5, 110
- Mitchell A *et al.* (2015) The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. *Nucleic Acids Res* 43, D213-221
- Miyashima S, Sebastian J, Lee JY und Helariutta Y (2013) Stem cell function during plant vascular development. *EMBO J* 32, 178-193
- Motohashi K *et al.* (2003) Chloroplast cyclophilin is a target protein of thioredoxin. *J Biol Chem* 278, 31848-31852
- Mukhtar MS, McCormack ME, Argueso CT und Pajerowska-Mukhtar KM (2016) Pathogen tactics to manipulate plant cell death. *Curr Biol* 26, R608-R619
- Münch E (1930) Stoffbewegungen in der Pflanze. *Gustav Fischer Verlag*, Jena, Deutschland
- Murshudov GN, Vagin AA und Dodson EJ (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Cryst D* 53, 240-255
- Nath PR und Isakov N (2015) Insights into peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase structure and function in immunocytes. *Immunol Lett* 163, 120-131
- Nguyen HD *et al.* (2013) Turnip mosaic potyvirus probably first spread to Eurasian brassica crops from wild orchids about 1000 years ago. *PLoS One* 8, e55336
- Niedermeyer TH und Strohm M (2012) mMass as a software tool for the annotation of cyclic peptide tandem mass spectra. *PLoS One* 7, e44913
- Niehl A und Heinlein M (2011) Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata. *Protoplasma* 248, 75-99
- Niehl A, Wyrsh I, Boller T und Heinlein M (2016) Double-stranded RNAs induce a pattern-triggered immune signaling pathway in plants. *New Phytol* 211, 1008-1019
- O'Malley RC, Barragan CC und Ecker JR (2015) A user's guide to the Arabidopsis T-DNA insertion mutant collections. *Methods Mol Biol* 1284, 323-342

## Literatur

- Ostendorp A *et al.* (2016) Protocol: optimisation of a grafting protocol for oilseed rape (*Brassica napus*) for studying long-distance signalling. *Plant Methods* 12, 22
- Ostendorp A *et al.* (2017) Functional analysis of *Brassica napus* phloem protein and ribonucleoprotein complexes. *New Phytol* 214, 1188-1197
- Pal D und Chakrabarti P (1999) *Cis* peptide bonds in proteins: residues involved, their conformations, interactions and locations. *J Mol Biol* 294, 271-288
- Palukaitis P, Groen SC und Carr JP (2013) The Rumsfeld paradox: some of the things we know that we don't know about plant virus infection. *Curr Opin Plant Biol* 16, 513-519
- Palukaitis P, Yoon JY, Choi SK und Carr JP (2017) Manipulation of induced resistance to viruses. *Curr Opin Virol* 26, 141-148
- Pant BD, Buhtz A, Kehr J und Scheible WR (2008) MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. *Plant J* 53, 731-738
- Park SW *et al.* (2013) Cyclophilin 20-3 relays a 12-oxo-phytodienoic acid signal during stress responsive regulation of cellular redox homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 9559-9564
- Patarroyo C, Laliberte JF und Zheng H (2012) Hijack it, change it: how do plant viruses utilize the host secretory pathway for efficient viral replication and spread? *Front Plant Sci* 3, 308
- Pemberton TJ (2006) Identification and comparative analysis of sixteen fungal peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase repertoires. *BMC Genomics* 7, 244
- Pogorelko GV *et al.* (2014) Characterization of three *Arabidopsis thaliana* immunophilin genes involved in the plant defense response against *Pseudomonas syringae*. *Gene* 538, 12-22
- Prasch CM und Sonnewald U (2013) Simultaneous application of heat, drought, and virus to *Arabidopsis* plants reveals significant shifts in signaling networks. *Plant Physiol* 162, 1849-1866
- Rodriguez-Medina C *et al.* (2011) Macromolecular composition of phloem exudate from white lupin (*Lupinus albus* L.). *BMC Plant Biol* 11, 36
- Romano PG, Horton P und Gray JE (2004) The *Arabidopsis* cyclophilin gene family. *Plant Physiol* 134, 1268-1282
- Saito T *et al.* (1999) Expression of a gene for cyclophilin which contains an amino-terminal endoplasmic reticulum-targeting signal. *Plant Cell Physiol* 40, 77-87
- Sakuma Y *et al.* (2006) Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 18822-18827
- Schmutzer T *et al.* (2015) Species-wide genome sequence and nucleotide polymorphisms from the model allopolyploid plant *Brassica napus*. *Sci Data* 2, 150072
- Schobert C *et al.* (1998) Identification of immunologically related proteins in sieve-tube exudate collected from monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Planta* 206, 245-252
- Schubert M *et al.* (2002) Proteome map of the chloroplast lumen of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 277, 8354-8365
- Sekhon SS *et al.* (2013) Structural and biochemical characterization of the cytosolic wheat cyclophilin TaCypA-1. *Acta Cryst D* 69, 555-563
- Semashko MA *et al.* (2012) The extreme N-terminal domain of a *borderivirus* TGB1 movement protein mediates its localization to the nucleolus and interaction with fibrillarin. *Biochimie* 94, 1180-1188
- Shapiguzov A, Edvardsson A und Vener AV (2006) Profound redox sensitivity of peptidyl-prolyl isomerase activity in *Arabidopsis* thylakoid lumen. *FEBS Lett* 580, 3671-3676

- Sievers F *et al.* (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 7, 539
- Singh K, Zouhar M, Mazakova J und Rysanek P (2014) Genome wide identification of the immunophilin gene family in *Leptosphaeria maculans*: a causal agent of Blackleg disease in Oilseed Rape (*Brassica napus*). *OMICS* 18, 645-657
- Sirpio S, Holmstrom M, Battchikova N und Aro EM (2009) AtCYP20-2 is an auxiliary protein of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex. *FEBS Lett* 583, 2355-2358
- Sirpio S *et al.* (2008) AtCYP38 ensures early biogenesis, correct assembly and sustenance of photosystem II. *Plant J* 55, 639-651
- Spiegelman Z *et al.* (2015) A tomato phloem-mobile protein regulates the shoot-to-root ratio by mediating the auxin response in distant organs. *Plant J* 83, 853-863
- Spiegelman Z, Omer S, Mansfeld BN und Wolf S (2017) Function of Cyclophilin1 as a long-distance signal molecule in the phloem of tomato plants. *J Exp Bot* 68, 953-964
- Stangeland B *et al.* (2005) Molecular analysis of *Arabidopsis* endosperm and embryo promoter trap lines: reporter-gene expression can result from T-DNA insertions in antisense orientation, in introns and in intergenic regions, in addition to sense insertion at the 5' end of genes. *J Exp Bot* 56, 2495-2505
- Stetefeld J, McKenna SA und Patel TR (2016) Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev* 8, 409-427
- Studier FW und Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189, 113-130
- Svergun DI, Barberato C und Koch MHJ (1995) CRYSOLE - a program to evaluate x-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J Appl Crystallogr* 28, 768-773
- Thai V *et al.* (2008) Structural, biochemical, and *in vivo* characterization of the first virally encoded cyclophilin from the Mimivirus. *J Mol Biol* 378, 71-86
- Thaller C *et al.* (1981) Repeated seeding technique for growing large single crystals of proteins. *J Mol Biol* 147, 465-469
- Thieme CJ *et al.* (2015) Endogenous Arabidopsis messenger RNAs transported to distant tissues. *Nat Plants* 1, 15025
- Tomasic Paic A und Fulgosi H (2015) Chloroplast immunophilins. *Protoplasma*,
- Trewhella J *et al.* (2017) 2017 publication guidelines for structural modelling of small-angle scattering data from biomolecules in solution: an update. *Acta Cryst D* 73, 710-728
- Trupkin SA, Mora-Garcia S und Casal JJ (2012) The cyclophilin ROC1 links phytochrome and cryptochrome to brassinosteroid sensitivity. *Plant J* 71, 712-723
- Ueda H, Yamaguchi Y und Sano H (2006) Direct interaction between the tobacco mosaic virus helicase domain and the ATP-bound resistance protein, N factor during the hypersensitive response in tobacco plants. *Plant Mol Biol* 61, 31-45
- Ueki S und Citovsky V (2007) Spread throughout the plant: Systemic transport of viruses. In: Waigmann E, Heinlein M (eds) *Viral Transport in Plants*, vol 7. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 85-118
- UniProt Consortium (2015) UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res* 43, D204-212
- Vagin A und Teplyakov A (1997) MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J Appl Crystallogr* 30, 1022-1025

## Literatur

- Vallon O (2005) Chlamydomonas immunophilins and parvulins: survey and critical assessment of gene models. *Eukaryot Cell* 4, 230-241
- Vasudevan D, Fu A, Luan S und Swaminathan K (2012) Crystal structure of *Arabidopsis* cyclophilin38 reveals a previously uncharacterized immunophilin fold and a possible autoinhibitory mechanism. *Plant Cell* 24, 2666-2674
- Vasudevan D *et al.* (2015) Plant immunophilins: a review of their structure-function relationship. *Biochim Biophys Acta*,
- Walsh JA und Jenner CE (2002) *Turnip mosaic virus* and the quest for durable resistance. *Mol Plant Pathol* 3, 289-300
- Wan J, Cabanillas DG, Zheng H und Laliberte JF (2015) *Turnip mosaic virus* moves systemically through both phloem and xylem as membrane-associated complexes. *Plant Physiol* 167, 1374-1388
- Wang Q *et al.* (2017) Systematic analysis of the maize cyclophilin gene family reveals ZmCYP15 involved in abiotic stress response. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 128, 543-561
- Waterhouse AM *et al.* (2009) Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25, 1189-1191
- Wei T *et al.* (2010) Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. *PLoS Pathog* 6, e1000962
- Winn MD *et al.* (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Cryst D* 67, 235-242
- Wittkop B, Snowdon RJ und Friedt W (2009) Status and perspectives of breeding for enhanced yield and quality of oilseed crops for Europe. *Euphytica* 170, 131-140
- Yang C *et al.* (2007) Spatial analysis of *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to *Turnip mosaic virus* infection. *Mol Plant Microbe Interact* 20, 358-370
- Yang H, Huang Y, Zhi H und Yu D (2011) Proteomics-based analysis of novel genes involved in response toward *Soybean mosaic virus* infection. *Mol Biol Rep* 38, 511-521
- Yang J *et al.* (2015) The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods* 12, 7-8
- Yang O *et al.* (2009) The *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factor AtbZIP24 regulates complex transcriptional networks involved in abiotic stress resistance. *Gene* 436, 45-55
- Zhang S, Sun L und Kragler F (2009) The phloem-delivered RNA pool contains small noncoding RNAs and interferes with translation. *Plant Physiol* 150, 378-387
- Zhang Y *et al.* (2013) The cyclophilin CYP20-2 modulates the conformation of BRASSINAZOLE-RESISTANT1, which binds the promoter of *FLOWERING LOCUS D* to regulate flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25, 2504-2521
- Zhao J, Zhang X, Hong Y und Liu Y (2016) Chloroplast in plant-virus interaction. *Front Microbiol* 7, 1565
- Zheng H *et al.* (2017) CheckMyMetal: a macromolecular metal-binding validation tool. *Acta Cryst D* 73, 223-233
- Zhu JK (2016) Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell* 167, 313-324
- Zydowsky LD *et al.* (1992) Active site mutants of human cyclophilin A separate peptidyl-prolyl isomerase activity from cyclosporin A binding and calcineurin inhibition. *Protein Sci* 1, 1092-1099

## 8 ANHANG

### 8.1 Primer

**Tabelle A1: Übersicht der verwendeten Primer.** Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) hergestellt. Die für die Klonierung benötigte NdeI bzw. XhoI Restriktionsschnittstelle sowie der GATC-Anhang ist gekennzeichnet (unterstrichen). Die unterschiedliche Codonverwendung von *B. napus*, *A. thaliana* und *E. coli* führt dazu, dass Stop-Codons in den Organismen mit unterschiedlicher Effizienz verwendet werden. Um dies zu optimieren, wurden die Stop-Codons teilweise ausgetauscht (Basenaustausch fett markiert).

Name	Sequenz 5'-3'	Zweck	
AtCYP18-3-NH_f	<u>GATCCATATG</u> GCGTTCCTAAGGTATAC	Klonierung	
AtCYP18-3-NH_r	<u>GATCCTCGAGT</u> TAAGAGAGCTGACCACAATC		
AtCYP18-4-NH_f	<u>GATCCATATG</u> TCGAACCCTAGAG		
AtCYP18-4-NH_r	<u>GATCCTCGAGT</u> TAAGAAAGCTGACCAC		
AtCYP19-1-NH_f	<u>GATCCATATG</u> GCAACAAACCCATAAG		
AtCYP19-1-NH_r	<u>GATCCTCGAGT</u> TAAGAAATCTGACCACAATC		
AtCYP19-3-NH_f	<u>GATCCATATG</u> GCGAATCCTAAAAGTCTTC		
AtCYP19-3-NH_r	<u>GATCCTCGAGT</u> TATGAACTTGGGTTCCTTGAGC		
BnCYP18-4-NH_f	<u>GATCCATATG</u> GCGTTCCTAAAAGTTTTTC		
BnCYP18-4-NH_r	<u>GATCCTCGAGCT</u> AAGAGAGCTGACCAC		
BnCYP18-6-NH_f	<u>GATCCATATG</u> GCGTTCCTAAAAGGTG		
BnCYP18-6-NH_r	<u>GATCCTCGAGCT</u> AAGAGAGCTGTCCACAATC		
BnCYP18-8-NH_f	<u>GATCCATATG</u> GTTAACCCATAAG		
BnCYP18-8-NH_r	<u>GATCCTCGAGCT</u> AAAAGCTGACCACAG		
BnCYP19-1-NH_f	<u>GATCCATATG</u> GCAAACCCGAAGGTC		
BnCYP19-1-NH_r	<u>GATCCTCGAGCT</u> ATTCCTTGTTTGAAACTTCTG		
BnCYP18-2-NH_f	<u>GATCCATATG</u> ATGGCTAACCCAAGAGTCTTC		
BnCYP18-2-NH_r	<u>GATCCTCGAGCT</u> AAGCAACCTGACCACAATC		
T7_for	CATATGATCAGGGTAACGGGAGAAG		
T7term_rev	GCTAGTTATTGCTCAGCGG		
GABI_159E05_LP	TTCAACGGTTTTTAGGCACAAC		<i>Arabidopsis thaliana</i> Mutanten
GABI_159E05_RP	GTTGGTTCCTTGGAGTTTGTGG		
GABI_578C07_LP	ATTCAGCTCAAAACCTCCCTC		
GABI_578C07_RP	GCTTACCATCTAACACGACG		
LBB1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC		
o8474	ATAATAACGCTGCGGACATCTACATTTT		
SALK_001615_LP	TTCTGTGTAGATTGGGTTCGG		
SALK_001615_RP3	CTCTCCGCAGGCATAGATTC		
SALK_024971_LP	TCACCTACCATTTTTTGCCAAC		
SALK_024971_RP	ACAGCTAGTTGCATACCCAC		
SALK_049034_LP	TGCCACAAACCTCTCTTATG		
SALK_049034_RP	ATGCCAGGTTATGTCCAACAC		
SALK_063724_LP	CCGAAAACACACGAACGATAG		
SALK_063724_RP	ACTGAGATCCATTCGTGTTTCG		
SALK_067272_LP3	AGTGAAATCTGCCCAATTCG		
SALK_067272_RP3	GGTGCTCATAGAGTGGTAATC		
SALK_067272_LP4	TCAGAACTAAACCTTCGTC		
SALK_067272_RP4	GTATCAATTATACGGACCTATATTC		

Tabelle A1: Fortsetzung.

Name	Sequenz 5'-3'	Zweck
SALK_121820_LP	ACTGAGATCCGTTTCGTGTTTG	<i>Arabidopsis thaliana</i> Mutanten
SALK_121820_RP	CTCTCTCTGACTCTAGGCC	
SALK_129937_LP	TTGAGCATGTTACCAATTCATG	
SALK_129937_RP	TGTTATTTTCGATTGCGGTTTC	

## 8.2 Vektor pET28a+

### pET-28a(+) sequence landmarks

T7 promoter	370-386
T7 transcription start	369
His•Tag coding sequence	270-287
T7•Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites ( <i>Bam</i> H I - <i>Xho</i> I)	158-203
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	773-1852
pBR322 origin	3286
Kan coding sequence	3995-4807
f1 origin	4903-5358

The maps for pET-28b(+) and pET-28c(+) are the same as pET-28a(+) (shown) with the following exceptions: pET-28b(+) is a 5368bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-28c(+) is a 5367bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*H I at 198.

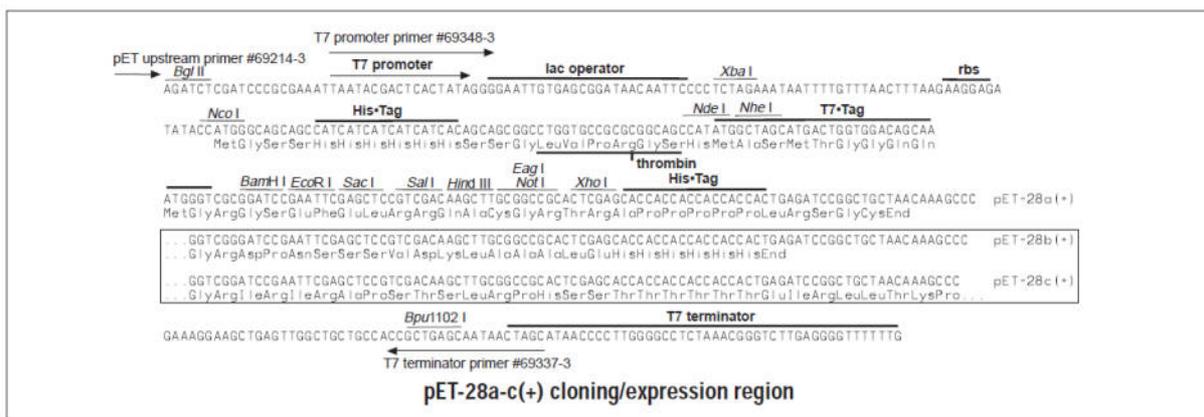
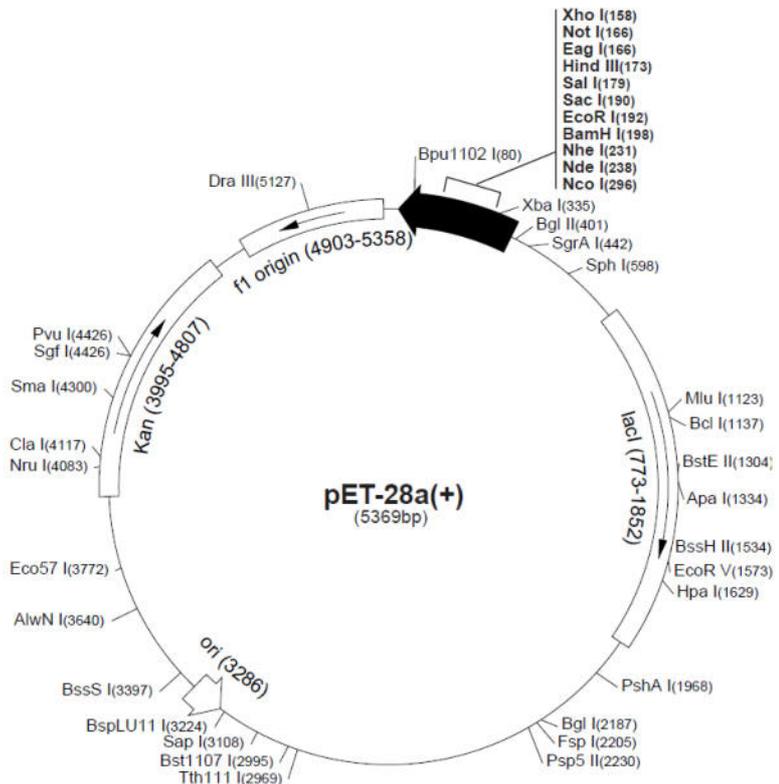


Abbildung A1: Vektorkarte des Expressionsvektors pET28a+ (Novagen). Cyclophilinsequenzen wurden über die Schnittstellen *Nde*I und *Xho*I eingebracht, sodass der N-terminale His<sub>6</sub>-Tag sowie die Thrombinschnittstelle genutzt werden konnten. Ein Stop-Codon am 3'-Ende des Gens verhindert einen zusätzlichen C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag. Nach diesem Prinzip wurden alle in dieser Arbeit hergestellten Plasmide erstellt.

### 8.3 Die BnCYP Proteinfamilie

**Tabelle A2: Die BnCYP Proteinfamilie besteht aus 91 Mitgliedern.** Zur Übersicht sind Nomenklatur, Genname, GenBank Nummer, Molekulargewicht, Gesamtlänge, vorhergesagte CLD, isoelektrischer Punkt und Exons der BnCYP Familie aufgelistet. Zusätzlich ist die Domänenstruktur angegeben. Diese ist auf die Aminosäureanzahl skaliert. Die CLD, ein Signalpeptid (SP) und eine Transmembrandomäne (TM) sind farblich markiert, weitere Domänen sind direkt im Modell angegeben (verändert nach: (Hanhart *et al.* 2017)).

Name	Genname	GenBank	kDa	pI <sub>theor</sub>	Exons	AS	CLD	Domänen
BnCYP5	BnaA01g25420D	CDY37322.1	5,7	8,7	1	49	2-42	
BnCYP7-1	BnaA09g37110D	CDY06069.1	7,2	10,7	3	66	1-66	
BnCYP7-2	BnaA01g36790D	CDY60385.1	7,3	4,5	1	64	1-61	
BnCYP7-3	BnaA01g36800D	CDY60386.1	7,3	4,9	1	65	1-64	
BnCYP8	BnaCnng42430D	CDY63671.1	8,2	9,1	2	71	9-65	
BnCYP10-1	BnaC02g14160D	CDX96235.1	1,1	4,7	2	92	6-55	
BnCYP10-2	BnaC06g10280D	CDY30664.1	1,5	6,7	2	94	1-68	
BnCYP12-1	BnaC02g10590D	CDY02830.1	1,5	9,8	5	109	52-96	
BnCYP12-2	BnaAnng41240D	CDY72459.1	12,8	9,0	3	117	43-116	
BnCYP13	BnaA02g07550D	CDY32693.1	13,1	8,3	4	116	8-64	
BnCYP14-1	BnaC04g41450D	CDX97794.1	14,0	5,6	1	127	1-123	
BnCYP14-2	BnaC04g41430D	CDX97796.1	14,2	5,8	1	127	1-124	
BnCYP14-3	BnaC04g41440D	CDX97795.1	14,2	6,0	1	127	1-123	
BnCYP14-4	BnaC08g28870D	CDX71987.1	14,3	6,1	1	131	1-109	
BnCYP14-5	BnaC09g34640D	CDX80278.1	14,4	9,4	3	133	84-132	
BnCYP14-6	BnaA01g25470D	CDY37327.1	14,9	4,6	3	138	2-137	
BnCYP16	BnaA02g10200D	CDY28828.1	16,1	4,4	3	148	3-124	
BnCYP17	BnaA01g25460D	CDY37326.1	17,3	7,7	3	161	68-134	
BnCYP18-1	BnaC04g09170D/ BnaA05g08140D	CDX75068.1 / CDX84155.1	18,2	8,9	5	164	7-163	
BnCYP18-2	BnaC01g03590D	CDX69094.1	18,2	8,9	1	172	1-171	
BnCYP18-3	BnaA01g02340D	CDX75468.1	18,2	8,9	1	172	1-172	
BnCYP18-4	BnaA08g16920D/ BnaC03g60160D	CDX90292.1 / CDY12100.1	18,3	8,3	1	172	2-172	
BnCYP18-5	BnaA09g08780D	CDY47469.1	18,4	8,3	1	171	1-171	
BnCYP18-6	BnaA06g37360D	CDY22414.1	18,4	8,3	1	172	2-171	
BnCYP18-7	BnaC07g47630D	CDX72741.1	18,4	8,3	1	172	2-171	
BnCYP18-8	BnaC09g09060D	CDY26779.1	18,4	8,3	1	171	1-171	
BnCYP19-1	BnaA09g35540D	CDY27248.1	19,6	7,7	1	182	1-174	
BnCYP19-2	BnaC08g26990D	CDX72175.1	19,7	7,0	1	183	1-174	
BnCYP20	BnaA01g36700D	CDY70394.1	20,9	8,2	1	192	15-191	
BnCYP21-1	BnaCnng08980D	CDY38037.1	21,0	9,2	5	193	22-191	
BnCYP21-2	BnaC04g06640D	CDX91486.1	21,6	8,2	7	200	23-200	
BnCYP21-3	BnaAnng15590D	CDY58941.1	21,7	8,9	6	201	28-199	
BnCYP21-4	BnaC03g12390D	CDX71155.1	21,7	9,3	7	201	26-199	
BnCYP21-5	BnaC04g54560D	CDY55458.1	21,7	8,9	6	201	28-199	
BnCYP21-6	BnaAnng17350D	CDY61026.1	21,8	9,3	7	201	26-199	

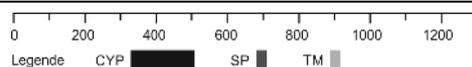


Tabelle A2: Fortsetzung.

Name	Genname	GenBank	kDa	pI <sub>theor</sub>	Exons	AS	CLD	Domänen
BnCYP21-7	BnaA05g06380D	CDX74892.1	21,8	8,2	7	204	27-204	
BnCYP21-8	BnaC04g45890D	CDX93307.1	21,9	8,2	6	205	28-205	
BnCYP21-9	BnaC09g34020D/ BnaA10g29520D	CDX80340.1 / CDY52123.1	22,0	8,9	7	204	31-202	
BnCYP22-1	BnaCnng32070D	CDY57430.1	22,0	6,5	4	191	133-176	
BnCYP22-2	BnaA04g22160D	CDY18371.1	22,3	8,1	7	207	26-207	
BnCYP22-3	BnaC04g41460D	CDX97793.1	23,0	5,7	2	215	55-212	
BnCYP24-1	BnaC08g26840D	CDX72190.1	24,0	6,5	8	224	53-222	
BnCYP24-2	BnaA09g35470D	CDY27255.1	24,0	6,5	8	224	53-222	
BnCYP24-3	BnaA10g12350D	CDY33029.1	24,3	9,2	4	222	86-140	
BnCYP24-4	BnaA08g10930D	CDX76307.1	24,4	6,5	7	223	42-215	
BnCYP24-5	BnaC01g03530D	CDX69100.1	24,6	7,1	7	224	44-215	
BnCYP24-6	BnaA01g02260D	CDX75476.1	24,6	7,1	7	224	43-215	
BnCYP24-7	BnaC03g65620D	CDY17501.1	24,6	6,2	7	225	44-217	
BnCYP25-1	BnaA08g20010D	CDY46429.1	25,4	8,4	8	226	26-198	
BnCYP25-2	BnaC08g48540D	CDY52765.1	25,5	8,4	8	226	23-198	
BnCYP25-3	BnaA09g29400D	CDY16206.1	25,6	6,5	8	226	20-200	
BnCYP25-4	BnaA03g21710D	CDX83335.1	25,9	8,9	6	231	79-230	
BnCYP25-5	BnaC03g25990D	CDX95718.1	25,9	8,9	6	231	79-230	
BnCYP26-1	BnaA05g30740D	CDY24675.1	26,3	8,7	7	234	74-230	
BnCYP26-2	BnaA08g08200D	CDX76580.1	26,3	6,5	4	239	151-213	
BnCYP26-3	BnaC05g45190D	CDY05284.1	26,3	9,0	7	234	74-230	
BnCYP26-4	BnaA04g17840D	CDY29643.1	26,3	6,1	1	248	77-245	
BnCYP26-5	BnaCnng32180D	CDY57615.1	26,5	8,7	7	236	76-232	
BnCYP27-1	BnaC05g44950D	CDY05308.1	27,1	4,9	3	247	6-200	
BnCYP27-2	BnaC08g31970D	CDX76611.1	27,4	8,7	7	253	81-249	
BnCYP27-3	BnaC03g05790D	CDX70495.1	27,8	9,6	7	257	80-252	
BnCYP27-4	BnaA09g39610D	CDY11395.1	27,9	9,0	7	258	86-254	
BnCYP27-5	BnaA03g04200D	CDX78508.1	27,9	9,7	7	256	79-251	
BnCYP28-1	BnaA04g27460D	CDY58761.1	28,1	8,8	7	258	86-254	
BnCYP28-2	BnaC04g21530D	CDX93994.1	28,6	8,9	7	261	89-257	
BnCYP30-1	BnaC08g08050D	CDY12400.1	30,4	6,3	2	280	68-267	
BnCYP30-2	BnaA08g07170D	CDY41762.1	30,5	5,9	2	281	75-270	
BnCYP31	BnaC07g00280D	CDY05775.1	32,0	4,8	7	277	59-173	
BnCYP34-1	BnaC02g22620D	CDY45858.1	34,5	9,1	3	320	92-314	
BnCYP34-2	BnaA02g16680D	CDY49138.1	34,5	9,1	3	320	91-314	
BnCYP37-1	BnaC01g21230D	CDY35601.1	37,4	6,1	5	340	161-319	
BnCYP37-2	BnaA01g17950D	CDY42959.1	37,5	6,6	5	340	161-316	
BnCYP40-1	BnaC07g05260D	CDX71247.1	40,3	6,3	8	361	3-175	
BnCYP40-2	BnaA07g04040D	CDY36653.1	40,3	6,0	8	361	3-175	
BnCYP47-1	BnaC08g10870D	CDY43466.1	47,1	8,2	7	418	157-312	
BnCYP47-2	BnaA05g33830D	CDY37518.1	47,2	5,1	7	433	254-433	
BnCYP47-3	BnaC05g48850D	CDY49057.1	47,4	5,0	6	436	257-436	
BnCYP49	BnaA05g24020D	CDX97677.1	49,8	6,6	12	459	273-438	

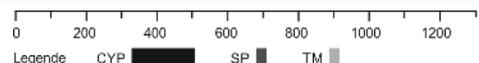


Tabelle A2: Fortsetzung.

Name	Genname	GenBank	kDa	pI <sub>theor</sub>	Exons	AS	CLD	Domänen
BnCYP50	BnaC05g38110D	CDX98564.1	51,0	5,7	12	470	284-445	
BnCYP52	BnaC01g05170D	CDX68936.1	52,4	8,6	11	467	6-186	
BnCYP55	BnaA01g03810D	CDX75321.1	55,3	7,7	10	492	6-185	
BnCYP62	BnaAnng12550D	CDY53714.1	62,0	10,7	13	556	4-177	
BnCYP65-1	BnaA06g24990D	CDY08725.1	65,0	8,0	11	597	335-508	
BnCYP65-2	BnaC03g48580D	CDY36499.1	65,1	7,3	11	597	335-508	
BnCYP67	BnaC04g20680D	CDX93909.1	67,3	10,6	15	612	77-251	
BnCYP70-1	BnaC03g54740D	CDY08708.1	70,1	6,0	13	622	465-619	
BnCYP70-2	BnaA06g18830D	CDX99192.1	70,2	6,0	13	622	465-619	
BnCYP86-1	BnaA01g04590D	CDX75243.1	86,9	11,8	13	765	3-174	
BnCYP86-2	BnaC01g06080D	CDX68845.1	87,0	11,7	13	765	3-174	
BnCYP112	BnaC03g71020D	CDY10512.1	112,6	5,9	18	992	1-176	
BnCYP146	BnaA03g29520D	CDX74095.1	146,1	6,0	13	1268	1108-1264	

0 200 400 600 800 1000 1200

Legende CYP SP TM

### 8.4 Sequenzvergleich der 91 BnCYP-CLDs

	10	20	30	40	50	60	70	80	90								
hCYPA	-----	MVNPTVFFDI	AVD	---EPLGRVSEFLFADKVPKTAENFRA-	LSTGEKGF	---	G	-----	YKG	-----	SCFH	I					
BnCYP18-5	-----	MVNPKVYFDMT	VGD	---KAAGRIVMELYADTVPETAEENFRA-	LCTGEKGI	---	GK	SGKPLHYKG	-----	SAFHRV	I	I					
BnCYP18-8	-----	MVNPKVYFDMT	VGD	---KAAGRIVMELYADTVPETAEENFRA-	LCTGERGI	---	GK	SGKPLHYKG	-----	SAFHRV	I	I					
BnCYP18-2	-----	MANPRVFFDMT	LDG	---APAGRIVMELYKDTTPNTAEENFRA-	LCTGEKGV	---	GK	KGKPLHFKG	-----	SAFHRV	I	I					
BnCYP18-3	-----	MANPRVFFDMT	LDG	---APAGRIVMELYKDTTPNTAEENFRA-	LCTGEKGV	---	GK	KGKPLHFKG	-----	SAFHRV	I	I					
BnCYP18-4	-----	AFPKVFFDMT	VGD	---KPAGRIVMELYTDKTPKTAENFRA-	LCTGEKGV	---	GS	KGKPLHFKG	-----	SSFHRV	I	I					
BnCYP18-6	-----	AFPKVFFD	INING	---QAAGRIVMELYTDKTPKTAENFRA-	LCTGEKGV	---	GR	KGKPLHFKG	-----	SSFHRV	I	I					
BnCYP18-7	-----	AFPKVFFD	SING	---QAAGRIVMELYTDKTPKTAENFRA-	LCTGEKGV	---	GR	KGKPLHFKG	-----	SSFHRV	I	I					
BnCYP19-1	-----	MANPKVFFD	LI	---MKAGRVMELFADVTTPRTADNFRA-	LCTGEKGI	---	GQ	AGKALHYKG	-----	SAFHR	I	I					
BnCYP19-2	-----	MANPKVFFD	LI	---MKAGRVMELFADVTTPRTADNFRA-	LCTGEKGI	---	GQ	AGKALHYKG	-----	SAFHR	I	I					
BnCYP24-5	-----	ETTHRHF	LDVD	---QRLGRIVIGLYGTVPKTVENFRA-	LCTGEKGV	---	TS	SGKPLHYKG	-----	TPFHR	I	I					
BnCYP24-6	-----	FEITHRVF	LDVD	---QRLGRIVIGLYGTVPKTVENFRA-	LCTGEKGV	---	SS	SGKPLHYKG	-----	TPFHR	I	I					
BnCYP24-4	-----	DCQVTHRHF	LD	---QRLGRIVIGLYGNVVPKTVENFRA-	LCTGEKGV	---	AS	SGKPLHYKG	-----	TOFHR	I	I					
BnCYP24-7	-----	DYQVTHRHF	LD	---QRLGRIVIGLYGNVVPKTVENFRA-	LCTGEKGV	---	AS	SGKPLHYKG	-----	TOFHR	I	I					
BnCYP12-1	-----	NSKEITHKVF	DVEVGG	---KEARRIVMGLFGKTVPKTAGTLYP-	LTF	---			---								
BnCYP24-1	-----	VTHKVF	DI	---SPAGRILIGLFGKIVPKTAENFRA-	LCTGEKGV	---	GN	MGKPLYFGK	-----	SSFHR	I	I					
BnCYP24-2	-----	VTHKVF	DI	---SPAGRILIGLFGKIVPKTAENFRA-	LCTGEKGV	---	GN	MGKPLYFGK	-----	STFHR	I	I					
BnCYP21-3	-----	KEITHKVF	DVE	---KEAGRIVIGLFGKTVPKTAENFRA-	LCTGEKGV	---	GK	SGKPLHYKG	-----	SKFHR	I	I					
BnCYP21-5	-----	KEITHKVF	DVE	---KEAGRIVIGLFGKTVPKTAENFRA-	LCTGEKGV	---	GK	SGKPLHYKG	-----	SKFHR	I	I					
BnCYP21-9	-----	KEITHKVF	DVE	---KEAGRIVIGLFGKTVPKTAENFRA-	LCTGEKGI	---	GK	KGKALHYKG	-----	SSFHR	I	I					
BnCYP21-4	-----	SKEKITHKVF	DVE	---KEAGRIVMGLFGKTVPKTAENFRA-	LCTGEKGV	---	GK	KGKALHYKG	-----	SSFHR	I	I					
BnCYP21-6	-----	SKEKITHKVF	DVE	---KEAGRIVMGLFGKTVPKTAENFRA-	LCTGEKGM	---	GK	KGKALHYKG	-----	SSFHR	I	I					
BnCYP22-2	-----	WHVRPPNPKNP	VVFFDVS	IGG---IPAGRIMKELFADIPKTAENFRQ-	FCTGE	LR---		KAGKPLGYKE	-----	COFHR	I	I					
BnCYP21-2	-----	WHVRPPNPKNP	VVFFDVS	IGG---IPAGRIMKELFADIPKTAENFRQ-	FCTGE	LR---		KAGKPLGYKE	-----	COFHR	I	I					
BnCYP21-7	-----	WHVRPPNPKNP	VVFFDVS	IGG---IPAGRIMKELFADIPKTAENFRQ-	FCTGE	LR---		KAGKPLGYKE	-----	COFHR	I	I					
BnCYP21-8	-----	WHVRPPNPKNP	VVFFDVS	IGG---IPAGRIMKELFADIPKTAENFRQ-	FCTGE	LR---		KAGKPLGYKE	-----	COFHR	I	I					
BnCYP27-3	-----	AEPQSKITHKVF	DI	---SVGNPVGKLAGRIVIGLFGDDVPQTVENFRA-	LCTGEKGF	---	G	-----	YKG	-----	STFHR	I					
BnCYP27-5	-----	AEPQSKITHKVF	DI	---SVGNPVGKLAGRIVIGLFGDDVPQTVENFRA-	LCTGEKGF	---	G	-----	YKG	-----	STFHR	I					
BnCYP28-1	-----	PPQAKVTHKVF	DVE	---EVAGRIVMGLFGDDVPKTVENFRA-	LCTGEKGY	---	G	-----	YKG	-----	SSFHR	I					
BnCYP28-2	-----	PPQAKVTHKVF	DVE	---EVAGRIVMGLFGDDVPKTVENFRA-	LCTGEKGY	---	G	-----	YKG	-----	SSFHR	I					
BnCYP27-2	-----	EPQAKVTNKVF	DVE	---EVAGKIVMGLFGDDVPKTVENFRV-	LCTGEKGY	---	G	-----	YKG	-----	SSFHR	I					
BnCYP27-4	-----	EPQAKVTNKVF	DVE	---EVAGKIVMGLFGDDVPKTVENFRV-	LCTGEKGY	---	G	-----	YKG	-----	SSFHR	I					
BnCYP14-5	-----	MEPQAKVTNKVF	DVE	---EVAGRIVMGLFGEVMPKTVENYRV-	LCTGKN	---			---								
BnCYP24-3	-----	EPQAKVTNKVF	DVE	---EVGGRIVMGLFGEVMPKTVENYRV-	LCTATGTF	---	T	-----	TPV	-----							
BnCYP86-1	-----	KKNPQVMY	MDVC	---DPAETMVFELFPDVAPKTSENFRA-	LCTGEKGI	---	GPR	SGKPLHYKG	-----	SSFHR	I	I					
BnCYP86-2	-----	KKNPQVMY	MDVC	---DPAETMVFELFPDVAPKTSENFRA-	LCTGEKGI	---	GPR	SGKPLHYKG	-----	SSFHR	I	I					
BnCYP40-1	-----	KSKCFMD	S	---ELEGRIIEI	LYDDLV	PKTAENFRS-	LCTGEKGI	---	GPNTGVP	LHYKG	-----	SRFHR	I				
BnCYP40-2	-----	KSKCFMD	S	---ELEGRIIEI	LYDDLV	PKTAENFRS-	LCTGDKGI	---	GPNTGVP	LHYKG	-----	SRFHR	I				
BnCYP62	-----	SKKKNPTVF	LDVS	IGG---DPLERIVIELFAHLVPKTAENFRA-	LCTGEAGL	---	GKT	SKPLHFKG	-----	SSFHR	I	I					
BnCYP67	-----	SSKKNPTVF	LDVS	IGG---DPLERIVIELFAHLVPKTAENFRA-	LCTGEAGL	---	GKT	SKPLHFKG	-----	SSFHR	I	I					
BnCYP26-4	-----	KANPKVFFD	MAVRG	---KAVGRIVMELFADTTPRTAEENFRA-	LCTGEKGM	---	GK	KGKPLHYKG	-----	SIIHMC							
BnCYP14-2	-----																
BnCYP22-3	-----																
BnCYP14-1	-----																
BnCYP14-3	-----																
BnCYP7-3	-----																
BnCYP7-2	-----																
BnCYP49	-----	TFQ	AEAGG	DQRKSAT	I	QVV	IDGYSAP	LTAGNFAK	---	LVTSG	---	AYDG	---	TKLNTV			
BnCYP50	-----	TFQ	AESGG	DQRKSAT	I	QVV	IDGYSAP	LTAGNFAK	---	LVTSG	---	AYDG	---	AKLNTV			
BnCYP31	-----																
BnCYP22-1	-----																
BnCYP47-2	-----																
BnCYP47-3	-----																
BnCYP10-1	-----																
BnCYP14-4	-----																
BnCYP7-1	-----	MANNPRVF	LD	---SVSS---KTVGR	II	IFGSAETS	LT	EARPSRHS	LYGNQR	I	LVHAP	HEGV	PSVWTG				
BnCYP17-1	-----																
BnCYP20	-----	LFLL	LAPANPKVFF	YMT	VDA---KPAGMIVMELFADTTPRTAEENFRA-	LCTGEKCT	---	G	KL	KGKPLHYKG	-----	SIIHMD					
BnCYP16	-----																
BnCYP27-1	-----	PMS	TNPRVF	LE	IAVNF---RPVGRIVIELFADTTPKTAENFRA-	LCTGEKGI	---	G	ESG	IPLHYKG	-----	SIIHMT					
BnCYP26-2	-----	WT	SGL---														
BnCYP47-1	-----																
BnCYP37-1	-----																
BnCYP37-2	-----																
BnCYP25-4	-----																
BnCYP25-5	-----																
BnCYP26-5	-----																
BnCYP146	-----																
BnCYP26-1	-----																
BnCYP26-3	-----																
BnCYP25-3	-----	VKALS	HEPE	L	GSARVV---FQTSYGDIEFGFYPTVAPKTV	VDHIFK	---	LVR	LG---	GYNT	---	NHIF	RV				
BnCYP25-1	-----																
BnCYP25-2	-----																
BnCYP10-2	-----																
BnCYP12-2	-----																
BnCYP112	-----																
BnCYP65-1	-----																
BnCYP65-2	-----																
BnCYP21-1	-----	SSS	FQAS	I	TASMSVTL---HTNLGD	KCEIF	---	FC	DEVPKSAENF	LA	---	CASE	---	YDD	---	TIFHR	I
BnCYP52	-----																
BnCYP55	-----																
BnCYP70-1	-----																
BnCYP70-2	-----																
BnCYP8	-----																
BnCYP13	-----																
BnCYP18-1	-----																
BnCYP30-1	-----																
BnCYP30-2	-----																
BnCYP5	-----																
BnCYP14-6	-----																
BnCYP34-1	-----																
BnCYP34-2	-----																

	100	110	120	130	140	150	160	170	180							
hCYP4	PGFM	MCQGGDFTR	HNGTGGK	SIYGE			KFEDENFI	LKHTGPGIL								
BnCYP18-5	PKFM	MCQGGDFTA	NGTGGG	SIYGM			KFKDENFV	VKKHTGPGIL								
BnCYP18-8	PKFM	MCQGGDFTA	NGTGGG	SIYGM			KFKDENFV	VKKHTGPGIL								
BnCYP18-2	PGFM	MCQGGDFTA	NGTGGG	SIYGD			KFKDENFA	KKHTGAGIL								
BnCYP18-3	PGFM	MCQGGDFTA	NGTGGG	SIYGD			KFKDENFV	VKKHTGAGIL								
BnCYP18-4	PNFM	MCQGGDFTA	NGTGGG	SIYGE			KFADENFER	KHTGPGIL								
BnCYP18-6	PSFM	MCQGGDFTA	NGTGGG	SIYGD			KFEDENFER	KHTGPGNL								
BnCYP18-7	PNFM	MCQGGDFTA	NGTGGG	SIYGD			KFEDENFER	KHTGPGNL								
BnCYP19-1	PGFM	MCQGGDFTR	NGTGGG	SIYGA			KFQDENFK	LKHTGPGIL								
BnCYP19-2	PGFM	MCQGGDFTR	NGTGGG	SIYGA			KFQDENFK	LKHTGPGIL								
BnCYP24-5	SGFVI	QGGDIH	GDGKGSE	SIYGG			TFPDENFK	IKHSHAGVV								
BnCYP24-6	SGFVI	QGGDIH	GDGKGSE	SIYGG			TFPDENFK	IKHSHAGVV								
BnCYP24-4	SGFVV	QGGDIH	GDGKGSE	STYGG			TFPDENFK	AKHSHAGVV								
BnCYP24-7	SGFVV	QGGDIH	GDGKGSE	STYGG			TFPDENFK	VKXSHAGVV								
BnCYP12-1																
BnCYP24-1	PSFMI	QGGDFTR	GDGRGGE	SIYGD			KFADENFK	LKHTGPGVL								
BnCYP24-2	PSFMI	QGGDFTR	GDGRGGE	SIYGD			KFADENFK	LKHTGPGVL								
BnCYP21-3	PSFMI	QGGDFTH	GNGMGGE	SIYGO			KFADENFK	LKHTGPGLL								
BnCYP21-5	PSFMI	QGGDFTH	GNGMGGE	SIYGO			KFADENFK	LKHTGPGLL								
BnCYP21-9	PSFML	QGGDFTH	GNGMGGE	SIYGE			TFADENFK	LKHTGPGFL								
BnCYP21-4	PSFML	QGGDFTD	GNGMGGE	SIYGE			KFADENFK	LKHTGPGYL								
BnCYP21-6	PSFML	QGGDFTD	GNGMGGE	SIYGE			KFADENFK	LKHTGPGYL								
BnCYP22-2	KDFMI	QSGDFLK	NDGNGCM	SIYGH			KFDDENFT	AKHTGPGLL								
BnCYP21-2	KDFMI	QSGDFLK	NDGSGCM	SIYGH			KFDDENFT	AKHTGPGLL								
BnCYP21-7	KDFMI	QSGDFLK	NDGSGCM	SIYGH			KFDDENFT	AKHTGPGLL								
BnCYP21-8	KDFMI	QSGDFLK	NDGSGCM	SIYGH			KFDDENFT	AKHTGPGLL								
BnCYP27-3	RDFMI	QGGDFDK	NGTGGK	SVYGR			TFKDFENF	NLSHVGPVV								
BnCYP27-5	RDFMI	QGGDFDK	NGTGGK	SVYGR			TFKDFENF	NLSHVGPVV								
BnCYP28-1	KDFMI	QGGDFTE	NGTGGI	SIYGA			KFEDENFT	LKHTGPGIL								
BnCYP28-2	KDFMI	QGGDFTE	NGTGGI	SIYGA			KFEDENFT	LKHTGPGIL								
BnCYP27-2	KDFMI	QGGDFTE	NGTGGI	SIYGA			KFEDENFT	LKHTGPGIL								
BnCYP27-4	KDFMI	QGGDFTE	NGTGGI	SIYGA			KFEDENFT	LKHTGPGIL								
BnCYP14-5																
BnCYP24-3																
BnCYP86-1		KGSSAQAGDFVS	RDGTAGE	SIYAG			KFPDESPK	LRHDERGLL								
BnCYP86-2		KGSSAQAGDFVN	RDGTAGE	SIYAG			KFPDESPK	LRHDERGLL								
BnCYP40-1	KGFM	IQGGDISA	YDGTGGG	SIYGL			KFQDENFD	LKHERKGM								
BnCYP40-2	KGFM	IQGGDISA	NDGTGGG	SIYGL			KFQDENFD	LKHERKGM								
BnCYP62	KGFM	MAQGGDFSN	NGTGGG	SIYGG			KFPDENFE	LDHEEGVLL								
BnCYP67	KGFM	MAQGGDFSN	NGTGGG	SIYGG			KFPDENFE	LDHEEGVLL								
BnCYP26-4	PDYII	GGGDFTYERKYGGE		SIYAG		G	FFEDENFI	KKHTGPGIL								
BnCYP14-2	PDYII	GGGDFTYERKYGGE		SIYAG		G	FFEDENFI	KKHTGPGIL								
BnCYP22-3	PDYII	GGGDFTYERKYGGE		SIYAG		G	FFEDENFI	KKHTGPGIL								
BnCYP14-1	PDYMI	GGGDFTYERKYGGE		SIYAG		G	FFEDENFI	KKHTGPGIL								
BnCYP14-3	PDYII	GGGDFTYERKYGGE		SIYAG		G	FFEDENFI	KKHTGPGIL								
BnCYP7-3																
BnCYP7-2																
BnCYP49		NQAVIT	EDGSG	K	V	DSVSVPL	LEVMP	SGQFEP	LYRTP	LSVQD	GE	LPVLP	LSVYGAV			
BnCYP50		NQAVIT	EDGSG	K	V	ESVSVPL	LEVMP	SGQFEP	LYRTP	LSVQD	GE	LPVLP	LSVYGAV			
BnCYP31		DEVVQ	TRDPD	SHAEGFI	DPSTE	KYWW							CTM			
BnCYP22-1		KT														
BnCYP47-2		DGEVV	QTDGPE	PAEGFI	DPSTE	KVRTVPL	LEIM	VEGNT	PFY	GST	LEE	LG	LYKAQV	MLPF	NAFGTM	
BnCYP47-3		DGEVV	QTDGPE	PAEGFI	DPSTE	KVRTVPL	LEIM	VEGK	TPFY	GST	LEE	LG	LYKAQV	MLPF	NAFGTM	
BnCYP10-1																
BnCYP14-4		PDHIF	WFGDI	THGN	GLGGE	SIYGO					F	PKEDCI	RKHDPGPI			
BnCYP7-1																
BnCYP17-1		PGYT	LCCGDI	IGGWE	EPVAN	ES										
BnCYP20		PCYMI	AGGDI	DGGK	NRGE	CIYGSR					FF	EVENFI	KKHTGPGIL			
BnCYP16		PDHWF	GGYMT	QGN	GF	GGE	WI	YGD			F	PDEEC	RKHDR	IQVS		
BnCYP27-1		PNFI	WYGGDT	THGC	GGGGE	SIYGO					L	ADNNY	KRKHDPGKI			
BnCYP26-2																
BnCYP47-1																
BnCYP37-1																
BnCYP37-2																
BnCYP25-4		KHAVI	QAGHSAQF	DAVKDWA		LQ					RNN	LHTS	LKQEE			
BnCYP25-5		KHSV	QAGHSAQF	DAVKDWA		LQ					KNS	LHTS	LKHEE			
BnCYP26-5		KNYLV	QAGHSQSS	IPVEE	WT	SK	GK				LRGR	LNT	SPKHEA			
BnCYP146		KNYLV	QAGHSQSS	IPVEE	WT	SK	GK				LRGR	LNT	SPKHEA			
BnCYP26-1		KNYLV	QAGHSSSS	IPVEE	WT	AK	GK				LRGR	LNT	SPKHEA			
BnCYP26-3		KNYLV	QAGHSSSS	IPVEE	WT	AK	GK				LRGR	LNT	SPKHEA			
BnCYP25-3		KGVA	QVADV	ASGRS	APMNE	EQRKE		AEKT			IVG	EFSDVK	HVRGIL			
BnCYP25-1		KGVA	QVADV	PNGRS	APMNE	EQQK		AYKT			IPG	EFSDVK	HVRGIL			
BnCYP25-2		KGVA	QVADV	PNGRS	APMNE	EQQKV		AYKT			ILG	EFSDVK	HVRGIL			
BnCYP10-2		KDSI	AVTGDPT	GTGT	GGD	SIFQ										
BnCYP12-2		KDFTA	QTDGPT	GTGL	GGD	SIY										
BnCYP112		KDFTA	QTDGPT	GTGL	GGD	SIYKFLYGE		QARF			FRDE	IHL	LKHSKT	GTV		
BnCYP65-1		RNFMI	QGGDPT	GTGK	GGE	SIWGP					FKDE	PNSK	QLHS	GRGVV		
BnCYP65-2		RNFMI	QGGDPT	GTGK	GGE	SIWGP					FKDE	PNSK	LLHS	GRGVV		
BnCYP21-1		KGFM	QGGDPT	GTGK	GGE	SIWKK					FNDE	I	RDS	LKH	NARGML	
BnCYP52		PGFLV	QGGDPT	GS	GTGGE	SIYGGV					FADE	HRS	LRFN	NHRGIV		
BnCYP55		PGFLV	QGGDPT	GS	GTGGE	SIYGGV					FADE	HRS	LRFN	NHRGIV		
BnCYP70-1		KGFMV	QTDGDP	L	GDGT	GGQ	SI	WGRE			FEDE	HKS	LRH	DRPFTV		
BnCYP70-2		KGFMV	QTDGDP	L	GDGT	GGQ	SI	WGRE			FEDE	HKS	LRH	DRPFTV		
BnCYP8	P	LVLI	LFHDF	VQGGDCT	GTGR	GQ	SI	YGI			L					
BnCYP13		KDFI	VQGGDPT	GTGR	GQ	SI	LSVK				LA	EV	I			
BnCYP18-1		KDFI	VQGGDPT	GTGR	GQ	SI	YGSK				FEDE	I	KPE	LKHT	GAGIL	
BnCYP30-1		PGQFF	LAGRQGL	RRDT		AEVGP	L	N	LPRNTD		VVNS	KSF	LLPH	ARPLVS	LC	LSEN
BnCYP30-2		PGQFF	LAGRQGL	RRDT		AEDGP	L	S	LPRNTD		VVNS	KSF	LLPH	ARPLVS	LC	LSEN
BnCYP5																
BnCYP14-6																
BnCYP34-1																
BnCYP34-2																

Anhang

	190	200	210	220	230	240	250	260	270	
hCYP4	-----	SMANA - GPNTNGSQ	----	FF I CTA	----	KTEWLDGK	-	HVVF GKVK	-	EGMNI VEAMERFGSRN
BnCYP18-5	-----	SMANA - GSNTNGSQ	----	FF I CTE	----	KTSWLDGK	-	HVVF GQVV	-	EGMDVVRDI EKVGSDS
BnCYP18-8	-----	SMANA - GSNTNGSQ	----	FF I CTE	----	KTSWLDGK	-	HVVF GQVV	-	EGMDVVRDI EKVGSDS
BnCYP18-2	-----	SMANS - GPNTNGSQ	----	FF I CTA	----	ETSWLDGK	-	HVVF GKVV	-	EGMEVVKAI EKVGSSS
BnCYP18-3	-----	SMANS - GPNTNGSQ	----	FF I CTA	----	ETSWLDGK	-	HVVF GKVV	-	EGMEVVKAI EKVGSSS
BnCYP18-4	-----	SMANA - GPNTNGSQ	----	FF I CTV	----	KTDWLDGK	-	HVVF GQVV	-	EGLDVVKA I EKVGASAS
BnCYP18-6	-----	SMANA - GANTNGSQ	----	FF I CTV	----	KTDWLDGK	-	HVVF GQVV	-	EGLDVVKA I EKVGSSS
BnCYP18-7	-----	SMANA - GANTNGSQ	----	FF I CTV	----	KTDWLDGK	-	HVVF GQVV	-	EGLDVVKA I EKVGSSS
BnCYP19-1	-----	SMANS - GPNTNGSQ	----	FF I CTD	----	KTAWLDGK	-	HVVF GKVV	-	DGYNVVKAMEKVGSER
BnCYP19-2	-----	SMANS - GPNTNGSQ	----	FF I CTD	----	KTAWLDGK	-	HVVF GKVV	-	DGYNVVKAMEKVGSER
BnCYP24-5	-----	AMANT - GPDSNGSQ	----	FF I TTV	----	KASWLEGE	-	HVVF GKVI	-	QGMDNVFA I EGGAGTY
BnCYP24-6	-----	AMANT - GPDSNGSQ	----	FF I TTV	----	KASWLEGE	-	HVVF GKVI	-	QGMDNVFA I EGGAGTY
BnCYP24-4	-----	AMANT - GPDSNGSQ	----	FF I TTI	----	KATWLEGE	-	HVVF GKVI	-	QGMDNVFA I EGGAGTY
BnCYP24-7	-----	AMGNT - GPDSNGSQ	----	FF I TTI	----	KATWLEGE	-	HVVF GKVI	-	QGMDNVFA I EGGSGTC
BnCYP12-1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BnCYP24-1	-----	SMANS - GPDSNGSQ	----	FF I TTV	----	TTGWLDGH	-	HVVF GKVL	-	SGMEVVRKI EA - QGQS
BnCYP24-2	-----	SMANS - GPDSNGSQ	----	FF I TTV	----	TTGWLDGH	-	HVVF GKVL	-	SGMEVVRKI EA - QGQS
BnCYP21-3	-----	SMANS - GEDTNGSQ	----	FF I TTV	----	TTSWLDGR	-	HVVF GKVV	-	QGMVVVKI EA - EGKQ
BnCYP21-5	-----	SMANS - GEDTNGSQ	----	FF I TTV	----	TTSWLDGR	-	HVVF GKVV	-	QGMVVVKI EA - EGKQ
BnCYP21-9	-----	SMANA - GQDTNGSQ	----	FF I TTV	----	TTSWLDGR	-	HVVF GKVV	-	SGMDVVVKI EA - EGNQ
BnCYP21-4	-----	SMANA - GEDTNGSQ	----	FF I TTV	----	TTSWLDGR	-	HVVF GKVV	-	TGMVVVKI EA - EGSQ
BnCYP21-6	-----	SMANA - GEDTNGSQ	----	FF I TTV	----	TTSWLDGR	-	HVVF GKVV	-	TGMVVVKI EA - EGSQ
BnCYP22-2	-----	SMANS - GPDTNGCQYSY LFF I SCA	----	-----	KCEWLDNK	-	HVVF GRV LGDGL LVVRKI ENVAVGP	-	-----	-----
BnCYP21-2	-----	STANS - GPDTNGCQ	----	FF I SCS	----	KCDWLDNK	-	HVVF GRV LGDGL LVVRKI ENVAVGP	-	-----
BnCYP21-7	-----	SMANS - GPDTNGCQ	----	FF I SCS	----	KCDWLDNK	-	HVVF GRV LGDGL LVVRKI ENVAVGP	-	-----
BnCYP21-8	-----	SMANS - GPDTNGCQ	----	FF I SCA	----	KCDWLDNK	-	HVVF GRV LGDGL LVVRKI ENVAVGP	-	-----
BnCYP27-3	-----	SMANA - GPNTNGSQ	----	FF I CTV	----	KTSWLDGR	-	HVVF GQVI	-	EGMDVVRLI EEQETDR
BnCYP27-5	-----	SMANA - GPNTNGSQ	----	FF I CTV	----	KTSWLDGR	-	HVVF GQVI	-	EGMDVVRLI EEQETDR
BnCYP28-1	-----	SMANA - GPNTNGSQ	----	FF I CTI	----	KTSWLDNK	-	HVVF GQVI	-	EGMK LVRR LESQETRA
BnCYP28-2	-----	SMANA - GPNTNGSQ	----	FF I CTI	----	KTSWLDNK	-	HVVF GQVI	-	EGMK LVRR LESQETRA
BnCYP27-2	-----	SMANA - GPNTNGSQ	----	FF I CTV	----	KTPWLDNK	-	HVVF GQVI	-	EGMK LVRT LESQETRA
BnCYP27-4	-----	SMANA - GPNTNGSQ	----	FF I CTV	----	KTPWLDGK	-	HVVF GQVI	-	KGMK LVRT LESQETRA
BnCYP14-5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BnCYP24-3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BnCYP86-1	-----	SMDVA - ERDKFGSH	----	FHI TFR	----	PNHQLDRK	-	NVVF GKLI	-	QGKEV LKKI I ERVGDEE
BnCYP86-2	-----	SMDVA - ERDK LGS	----	FHI TFR	----	PNHQLDRK	-	NVVF GKLI	-	QGKEV LKKI I ERVGDEE
BnCYP40-1	-----	SMANS - GPNTNGSQ	----	FF I TTT	----	RTSHLDGK	-	HVVF GRVT	-	KGMGVVRS I EHVSTEE
BnCYP40-2	-----	SMANS - GPNTNGSQ	----	FF I TTT	----	RTSHLDGK	-	HVVF GRVT	-	KGMGVVRS I EHVSTEE
BnCYP62	-----	SMANC - GPNTNGSQ	----	FF I LFK	----	RQPHLDGK	-	HVVF GKVV	-	KGMEVVKME LVGTSD
BnCYP67	-----	SMANC - GPNTNGSQ	----	FF I LFK	----	RQPHLDGK	-	HVVF GKVV	-	KGMEVVKME LVGTSD
BnCYP26-4	-----	SMNNS - GPDTNGSQ	----	F L I S L T	----	ENWEFDDL	-	HVVF GQVV	-	EGLDVVRI I SHEPLK
BnCYP14-2	-----	SMNNS - GPDTNGSQ	----	F L I S L T	----	ENWE LDDL	-	HVVF GQVV	-	EGLDVVRI I SHEPLK
BnCYP22-3	-----	SMNNS - GPDTNGSQ	----	F L I S L T	----	ENWE LDDL	-	HVVF GQVV	-	EGLDVVRI I SHEPLK
BnCYP14-1	-----	SMNNG - GPDTNGSQ	----	F L I S L T	----	ENWE LDDV	-	HVVF GQVV	-	EGLDVVRI I SHEPRR
BnCYP14-3	-----	SMNNS - GPDTNGSQ	----	F L I S L T	----	ENWE LDDV	-	HVVF GQVV	-	EGLDVVRI I SHEPRR
BnCYP7-3	-----	MNNS - GPDTNESQ	----	F I I C L T	----	ENRE LDDV	-	HVVF GQVV	-	EGLDVVRI I SKEHVR
BnCYP7-2	-----	MNNS - GPDTNESQ	----	F M I C L T	----	ENWQLDDV	-	HVVF GQVV	-	EGLDVVRI I LNEPLR
BnCYP49	-----	AMAHSENSEESPYQFFFY LYDKRNSGLGSLFDEGO	----	-----	F S V F G	-	YTTAGRDI LGQI KTGD I KS	-	-----	-----
BnCYP50	-----	AMAHSENSEESPYQFFFY LYDKRNSGLGSLFDEGO	----	-----	F S V F G	-	YTTAGRDI LGQI KTGD	-	-----	-----
BnCYP31	-----	AMAREGFENDESS - Q - VFWLLTERELTPSNSNI LDGR	----	-----	Y D V F G	-	GGYVTHNEDF LAD LKVDNVTEQHD	-	-----	-----
BnCYP22-1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BnCYP47-2	-----	AMAREEFENDSGSS - Q - VFWLLKESELTPSNSNI LDGR	----	-----	Y A V F G	-	YVTQNEDF LAD LKVGVDV I ESI QVVSGLDN	-	-----	-----
BnCYP47-3	-----	AMAREEFENDSGSS - Q - VFWLLKESELTPSNSNI LDGR	----	-----	Y A V F G	-	YVTQNEDF LAD LKVGVDV I ESI QVVSGLDN	-	-----	-----
BnCYP10-1	-----	GQPN -	----	RSQF L L H S K	----	EAPDYDEEP	-	HVVF GKVV	-	SGFDV I R L V E R M V G N E
BnCYP14-4	-----	STGTN -	----	GSQF M L H M K	----	V S P D Y D D G	-	H I A F G R V L	-	D G L D V M A R V G K M V G N E
BnCYP7-1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BnCYP17-1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BnCYP20	-----	SKWNRG - RNSTG	----	SQFMI HAK	----	ANSDLDNE	-	CVVF GQVV	-	QGMVVVTS I MA LSTNT
BnCYP16	-----	SQW -	----	A I M L N	----	NQT	-	-----	-----	-----
BnCYP27-1	-----	LSMTRN - DESTTYDYYESQFMI LMR	----	-----	ASPDLDGE	-	QQMVGGTN	-	-----	GY
BnCYP26-2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BnCYP47-1	-----	GWGSGPE	----	FF I S L A	----	NHHEWKQS	-	YTVF GSVLPEDMVAERI	-	AGLPTRTD VW
BnCYP37-1	-----	AWGSGPE	----	FF I S L A	----	NHHEWKQS	-	YTVF GSVLPEDMVAERI	-	AGLPT I ADVW
BnCYP37-2	-----	AWGSGPE	----	FF I S L A	----	NHHEWKQS	-	YTVF GSVLPEDMVAERI	-	AGLPT I ADVW
BnCYP25-4	-----	YMGVTPKAKNE - QGGFEFF I VSS	----	-----	Q I T D L N E K	-	LTVF GRVV - KGQDVVKE I EEVE I DE	-	-----	-----
BnCYP25-5	-----	YMGVTPKAKNE - QGGFEFF I VSS	----	-----	Q I T D L N E K	-	LTVF GRVV - KGQDVVKE I EEVE I DE	-	-----	-----
BnCYP26-5	-----	FMLGTPKTKGNNNKDFELLI TTA	----	-----	P I P D L N D Q	-	L I V F G R V L - K G E D V V Q E I E E V D T D E	-	-----	-----
BnCYP146	-----	FMLGTPKTKGNNNKDFELLI TTA	----	-----	P I P D L N D Q	-	L I V F G R V L - K G E D V V Q E I E E V D T D E	-	-----	-----
BnCYP26-1	-----	FMLGTPKKNKGN - NKDFELLI TTA	----	-----	P I P D L N D Q	-	L I V F G R V L - K G E D V V Q E I E E V D T D E	-	-----	-----
BnCYP26-3	-----	FMLGTPKKNKGN - NKDFELLI TTA	----	-----	P I P D L N D Q	-	L I V F G R V L - K G E D V V Q E I E E V D T D E	-	-----	-----
BnCYP25-3	-----	SMGRYEDPNASQSS - FSMLLG	----	-----	D A P H L D R Q	-	Y A V F G K V T - K G D E T L R K L E E V P T R R E G I F	-	-----	-----
BnCYP25-1	-----	SMGRHDDPNSSGSS - FSMLLG	----	-----	D A P H L D G K	-	Y A V F G K V T - K G D E T L R K L E E V P T R R E G I F	-	-----	-----
BnCYP25-2	-----	SMGRHDDPNSSGSS - FSMLLG	----	-----	D A P H L D G K	-	Y A V F G K V T - K G D E T L R K L E E V P T R R E G I F	-	-----	-----
BnCYP10-2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BnCYP12-2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BnCYP112	-----	SMASA - GENLNASQ	----	FYFTLR	----	DDL D Y L D G K	-	H T V F G E I A E G	-	L D T L T R I N E A Y V D A
BnCYP65-1	-----	SMANS - GPHTNGSQ	----	FF I L Y K	----	SATHLNYK	-	H T V F G G V V G G	-	L S T L A M E S V P V D E
BnCYP65-2	-----	SMANS - GPHTNGSQ	----	FF I L Y K	----	SATHLNYK	-	H T V F G G V V G G	-	L S T L A M E S V P V D E
BnCYP21-1	-----	SMANS - GPNTNGSQ	----	FF I T Y A	----	KOPHLNGL	-	Y T I F G K V I H G	-	F E V L D I M E K T Q T G A
BnCYP52	-----	AMANESSPNTNGSQ	----	FF F T L D	----	K C D W L D K K	-	H T I F G K V T G D S I F N L L R L G E I D T G K	-	-----
BnCYP55	-----	AMANESSPNTNGSQ	----	FF F T L D	----	K C D W L D K K	-	H T I F G K V T G D S I F N L L R L G E I D T G K	-	-----
BnCYP70-1	-----	SMANA - GQNTNGSQ	----	FF I TTV	----	ATP W L D N K	-	H T V F G R V V K G	-	M D V V Q G I E K V K T D K
BnCYP70-2	-----	SMANA - GQNTNGSQ	----	FF I TTV	----	ATP W L D N K	-	H T V F G R V V K G	-	M D V V Q G I E K V K T D K
BnCYP8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BnCYP13	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BnCYP18-1	-----	SMANA - GPNTNGSQ	----	FF I T L A	----	P A P S L D G K	-	H T I F G R V C R G	-	M E V I K R L G S V Q T D N
BnCYP30-1	-----	DDDDT - RLDPEYRNVF L I T T G P G	----	-----	P C P Q L D G G	-	N I V F G T V L - E G L D V V T S I A A V P T F K P S E K I R Q F N D F A E F L G D E R	-	-----	-----
BnCYP30-2	-----	DDDDT - RLDPEYRNVF L I T T G P G	----	-----	P C P Q L D G G	-	N I V F G T V L - E G L D V V T S I A A V P T F K P S E K I R Q F N D F A E F L G D E R	-	-----	-----
BnCYP5	-----	TMWDC - RPNTNGSQ	----	Q F M I C L R	----	K I V E F D R S	-	A S C L A	-	-----
BnCYP14-6	-----	TMWNC - RENTNGS	----	Q F M I C L K	----	I V E F D Q E	-	C V A F G Q V V	-	E G L D V I Q N I E K E V G R P D L
BnCYP34-1	-----	NGK LEVQEEI - AVGPNGTE	----	F V I T A V	----	D S P E L E E S	-	V L V I G E V L	-	E G M G V V E K M R E V K T V R D N T - S S P Y F K V A K V I G D K R
BnCYP34-2	-----	NGK LEVQEEI - AVGPNGTE	----	F V I T A V	----	D T P E L E E S	-	V L V I G E V L	-	E G M G V V E K M R E V K T V R D N T - S S P Y F K V A K V I G D K R

```

      280      290      300      310      320      330
hCYPA  -----GKTSKKI-TIADCGQLE-----
BnCYP18-5 -----GRTSKKV-VIADCGQL-----
BnCYP18-8 -----GRTSKKV-VIADCGQL-----
BnCYP18-2 -----GTTKKKV-VVADCGQV-----
BnCYP18-3 -----GTTKKKV-VVADCGQVA-----
BnCYP18-4 -----GKPSKPV-VVADCGQLS-----
BnCYP18-6 -----GKPSKPV-VIADCGQL-----
BnCYP18-7 -----GKPSKPV-VIADCGQL-----
BnCYP19-1 -----GVTSEPV-VIEDCGEIKNE-----
BnCYP19-2 -----GATSEPV-VIEDCGELKNQ-----
BnCYP24-5 -----SGKPRKKV-VIADSGEI-----
BnCYP24-6 -----SGKPRKKV-VIADSGEI-----
BnCYP24-4 -----SGKPRKKV-VIADSGEI-----
BnCYP24-7 -----SGKPRKKV-VIADSGEI-----
BnCYP12-1 -----
BnCYP24-1 -----SGEPKGV-ILLDSGEV-----
BnCYP24-2 -----SGEPKGV-ILLDSGEV-----
BnCYP21-3 -----SGTPKSKV-VIADSGEL-----
BnCYP21-5 -----SGTPKSKV-VIADSGEL-----
BnCYP21-9 -----SGTPKSKV-VIADSGEL-----
BnCYP21-4 -----SGTPKSKV-VIADSGEL-----
BnCYP21-6 -----SGTPKSKV-VIADSGEL-----
BnCYP22-2 -----NRPK LAV-VITECGEM-----
BnCYP21-2 -----NRPK LAV-VITECGEM-----
BnCYP21-7 -----NRPK LSV-VITECGEM-----
BnCYP21-8 -----NRPK LAV-VITECGEM-----
BnCYP27-3 -----GDRPRKKV-VIADCGQL-----
BnCYP27-5 -----GDRPRKKV-VIADCGQL-----
BnCYP28-1 -----MDVPPKAC-RIYACGEL-----
BnCYP28-2 -----MDVPPKAC-RIYACGEL-----
BnCYP27-2 -----FDVPPKGC-RIYACGEL-----
BnCYP27-4 -----FDVPPKGC-RIYACGEL-----
BnCYP14-5 -----
BnCYP24-3 -----
BnCYP86-1 -----GKPTVTV-KIIRCGE-----
BnCYP86-2 -----GKPTVTV-KIISCGE-----
BnCYP40-1 -----NACPSLDV-VIHDCGVIP-----
BnCYP40-2 -----NACPSLDV-VIHDCGVIP-----
BnCYP62 -----GKPTSNV-KIIDCGEV-----
BnCYP67 -----GKPTSNV-KIIDCGEV-----
BnCYP26-4 -----DKLSKPV-VI-DCG-----
BnCYP14-2 -----DKFSKPV-VI-DCG-----
BnCYP22-3 -----DKFSKPV-VI-DCG-----
BnCYP14-1 -----DKLSRPV-VI-DC-----
BnCYP14-3 -----DKLSRPV-VI-DC-----
BnCYP7-3 -----DKLSRPV-VIADCGLI-----
BnCYP7-2 -----DKLSRPV-VI-DCG-----
BnCYP49 -----
BnCYP50 -----
BnCYP31 -----
BnCYP22-1 -----
BnCYP47-2 -----LVNPSYKI--AG-----
BnCYP47-3 -----LVNPSYKI--AG-----
BnCYP10-1 -----FVP-----
BnCYP14-4 -----FVYPS-TQ-----
BnCYP7-1 -----
BnCYP17-1 -----
BnCYP20 -----SIPVA-VISNCGQI-----
BnCYP16 -----
BnCYP27-1 -----P LQPV-TIADCGQVFPEAETMVVALQLRVAELENPPEKQTVSCEMGY
BnCYP26-2 -----
BnCYP47-1 -----NSVNV-----
BnCYP37-1 -----NSVNVSV--LE-----
BnCYP37-2 -----NSVNV-----
BnCYP25-4 -----HYQPKAPI-EIMSVTL LQD-----
BnCYP25-5 -----HYQPKAPI-EIMSVTL LQD-----
BnCYP26-5 -----HYQKAKI-GIISVIL-----
BnCYP146 -----HYQKSKQI-GIISVIL-----
BnCYP26-1 -----HFQKSKQI-GIISVIL-----
BnCYP26-3 -----HFQKSKQI-GIISVIL-----
BnCYP25-3 -----VMPTEI-TILSTYYYDTKMESCE-----
BnCYP25-1 -----VMPTEI-TILSTYYYDTKMES-----
BnCYP25-2 -----VMPTEI-TILSTYYYDTKMES-----
BnCYP10-2 -----
BnCYP12-2 -----
BnCYP112 -----KNRPYKNI-RIKHTYILEDPFEDPTQLADMI-----
BnCYP65-1 -----TDRPLEE-KIIEANVFVNPYTEPEEE-----
BnCYP65-2 -----TDRPLEE-KIIEANVFVNPYTEPEEE-----
BnCYP21-1 -----GDRPLAEI-RLNRVTIHANPL-----
BnCYP52 -----DDRLDPAPKILSVEVLWNPFDIVPRVLAKASH-----
BnCYP55 -----DDRLDPAPKILSVEVLWNPFDIVPRVLAKAS-----
BnCYP70-1 -----NDRPYQDV-KILNVT-----
BnCYP70-2 -----NDRPYQDV-KILNVT-----
BnCYP8 -----
BnCYP13 -----
BnCYP18-1 -----TDRPLEE-KILRTKVV-----
BnCYP30-1 AQNARSLWNRPLKTV-FISDCGE-----
BnCYP30-2 AQNARSLWNRPLKTV-FISDCGELK-----
BnCYP5 -----
BnCYP14-6 -----SGVPNKLV-VIADCGQI-----
BnCYP34-1 AVVAERGFNRPYTKV-QVTNCGFI-----
BnCYP34-2 AVVAERGFNRPYTKV-QVTNCGFI-----

```

**Abbildung A2: Multipler Sequenzvergleich der CLD aller 91 BnCYPs.**

Vor dem Sequenzvergleich wurde die Proteinsequenz jedes BnCYPs auf die Sequenz der putativen CLD gekürzt (siehe Tabelle A2). Der Vergleich macht deutlich, dass große Teile konserviert sind, es aber in kleinen Untergruppen auch Insertionen oder Deletionen gibt. Markiert sind wichtige Aminosäuren für die PPIase Aktivität (rot) und die CsA-Bindung (blau) sowie das VXGXV Motiv (gelb). Zusätzlich ist die Aminosäuresequenz von HsCYPA angegeben (aus Hanhart *et al.* 2017).

## 8.5 Die AtCYP-Familie und ihre BnCYP Homologe

**Tabelle A3: Die Arabidopsis CYP Familie, deren Lokalisation und Funktion sowie *B. napus* Homologe.** Die Lokalisation wurde entweder bioinformatisch vorhergesagt (p) oder experimentell bestimmt (e). Die Homologe sind der Ähnlichkeit nach sortiert (erste Position = Homolog mit der höchsten Sequenzidentität). SP = *secretory pathway*, TL = Thylakoidlumen (verändert nach Hanhart *et al.* 2017).

AtCYP	Gen	Subzelluläre Lokalisation*	Stichwörter zur Funktion	BnCYP-Homolog (% Sequenzidentität)
AtCYP18-1	At1g01940	Cytosol <sub>p</sub> (Romano <i>et al.</i> 2004; He <i>et al.</i> 2004)	Hitzestress (Sakuma <i>et al.</i> 2006)	BnCYP21-1 (98 %)
AtCYP18-2	At2g36130	Cytosol <sub>p</sub> (Romano <i>et al.</i> 2004; He <i>et al.</i> 2004)	prä-mRNA Prozessierung, Pathogenantwort (He <i>et al.</i> 2004; Lee <i>et al.</i> 2015)	BnCYP18-1 (95 %), BnCYP13 (79 %), BnCYP8 (56 %)
AtCYP18-3	At4g38740	Cytosol <sub>p</sub> (Romano <i>et al.</i> 2004; He <i>et al.</i> 2004)	Wachstum, Hormon-Signalweg, Pathogenantwort, Salzstress (He <i>et al.</i> 2004; Trupkin <i>et al.</i> 2012; Kovalev und Nagy 2013; Deng <i>et al.</i> 1998; Ma <i>et al.</i> 2013; Coaker <i>et al.</i> 2005; Coaker <i>et al.</i> 2006; Aumuller <i>et al.</i> 2010)	BnCYP18-4 (93 %), BnCYP18-6 (92 %), BnCYP18-7 (92 %)
AtCYP18-4	At4g34870	Cytosol <sub>p</sub> (Romano <i>et al.</i> 2004; He <i>et al.</i> 2004)	Pathogenantwort, Salzstress, Hormonantwort (He <i>et al.</i> 2004; Deng <i>et al.</i> 1998)	BnCYP18-2 (83 %), BnCYP18-3 (83 %), BnCYP17-1 (74 %), BnCYP10-1 (35 %)
AtCYP19-1	At2g16600	Cytosol <sub>p</sub> (Romano <i>et al.</i> 2004; He <i>et al.</i> 2004)	Samenentwicklung, Pathogenantwort, Hormonantwort, Salzstress (Pogorelko <i>et al.</i> 2014; He <i>et al.</i> 2004; Stangeland <i>et al.</i> 2005; Yang <i>et al.</i> 2009)	BnCYP18-5 (92 %), BnCYP18-8 (92 %), BnCYP26-4 (66 %), BnCYP22-3 (65 %), BnCYP20 (62 %), BnCYP14-1 (62 %), BnCYP14-2 (62 %), BnCYP14-3 (60 %), BnCYP14-6 (52 %), BnCYP16 (50 %), BnCYP7-1 (36 %)
AtCYP19-2	At2g21130	Cytosol <sub>p</sub> (Romano <i>et al.</i> 2004; He <i>et al.</i> 2004)	-	BnCYP7-3 (59 %), BnCYP27-1 (46 %)
AtCYP19-3	At3g56070	Cytosol <sub>p</sub> (Romano <i>et al.</i> 2004; He <i>et al.</i> 2004)	Pathogenantwort, Ca <sup>2+</sup> -Signalweg (Kovalev und Nagy 2013; Kaur <i>et al.</i> 2015)	BnCYP19-1 (91 %), BnCYP19-2 (90 %), BnCYP5 (48 %)
AtCYP19-4	At2g29960	Cytosol und SP <sub>e</sub> (Saito <i>et al.</i> 1999; Grebe <i>et al.</i> 2000)	Zellpolarität, Salzstress, Hormonantwort (He <i>et al.</i> 2004; Saito <i>et al.</i> 1999; Grebe <i>et al.</i> 2000)	BnCYP21-5 (93 %), BnCYP21-3 (92 %), BnCYP12-1 (56 %), BnCYP14-4 (52 %)
AtCYP20-1	At5g58710	SP <sub>p</sub> (Romano <i>et al.</i> 2004; He <i>et al.</i> 2004)	UPR ( <i>unfolded protein response</i> ) im ER, ER-Stress, multiple Signalwege (Kamauchi <i>et al.</i> 2005; Jackson und Soll 1999)	BnCYP21-9 (97 %), BnCYP21-4 (92 %), BnCYP21-6 (92 %)
AtCYP20-2	At5g13120	TL <sub>e</sub> (Schubert <i>et al.</i> 2002; Ingelsson <i>et al.</i> 2009)	Pathogenantwort, Licht- und oxidativer Stress, Untereinheit des NAD(P)H-Dehydrogenase-Komplexes, Hormon-Signalweg, Proteinfaltung im TL, Blühinduktion (He <i>et al.</i> 2004; Shapiguzov <i>et al.</i> 2006; Ingelsson <i>et al.</i> 2009; Sirpio <i>et al.</i> 2009; Edvardsson <i>et al.</i> 2007; Zhang <i>et al.</i> 2013)	BnCYP27-3 (86 %), BnCYP27-5 (86 %), BnCYP7-2 (51 %)
AtCYP20-3	At3g62030	Stroma <sub>e</sub> (Schubert <i>et al.</i> 2002; Ingelsson <i>et al.</i> 2009; Lippuner <i>et al.</i> 1994)	Licht- und oxidativer Stress, Redoxregulation, Cysteinbiosynthese, JA-Signalweg, Pathogenantwort (Dominguez-Solis <i>et al.</i> 2008; Park <i>et al.</i> 2013; Deng <i>et al.</i> 1998; Motohashi <i>et al.</i> 2003; Laxa <i>et al.</i> 2007; Liebthal <i>et al.</i> 2016)	BnCYP27-2 (89 %), BnCYP27-4 (89 %), BnCYP28-1 (85 %), BnCYP28-2 (85 %), BnCYP14-5 (81 %), BnCYP24-3 (79 %)
AtCYP21-1	At4g34960	SP <sub>p</sub> (Romano <i>et al.</i> 2004; He <i>et al.</i> 2004)	-	BnCYP24-5 (95 %), BnCYP24-6 (95 %), BnCYP24-4 (85 %), BnCYP24-7 (83 %)
AtCYP21-2	At3g55920	SP <sub>p</sub> (Romano <i>et al.</i> 2004; He <i>et al.</i> 2004)	Wasserstress (Kim <i>et al.</i> 2013)	BnCYP24-1 (92 %), BnCYP24-2 (92 %)
AtCYP21-3	At2g47320	Mitochondrien <sub>p</sub> (Romano <i>et al.</i> 2004; He <i>et al.</i> 2004)	-	BnCYP25-4 (83 %), BnCYP25-5 (83 %)
AtCYP21-4	At3g66654	Mitochondrien <sub>p</sub> (Romano <i>et al.</i> 2004; He <i>et al.</i> 2004)	Dunkel-Behandlung (He <i>et al.</i> 2004)	BnCYP26-3 (89 %), BnCYP26-1 (88 %), BnCYP146 (87 %), BnCYP26-5 (86 %)
AtCYP22	At2g38730	Cytosol <sub>p</sub> (Romano <i>et al.</i> 2004; He <i>et al.</i> 2004)	-	BnCYP21-2 (93 %), BnCYP21-7 (93 %), BnCYP21-8 (92 %), BnCYP22-2 (92 %)

Tabelle A3: Fortsetzung.

AtCYP	Gen	Subzelluläre Lokalisation*	Stichwörter zur Funktion	BnCYP-Homolog (% Sequenzidentität)
AtCYP23	At1g26940	SP <sub>p</sub> (Romano <i>et al.</i> 2004; He <i>et al.</i> 2004)	-	BnCYP25-3 (92 %), BnCYP25-2 (87 %), BnCYP25-1 (86 %)
AtCYP26-1	At3g22920	Cytosol <sub>p</sub> (Romano <i>et al.</i> 2004; He <i>et al.</i> 2004)	-	-
AtCYP26-2	At1g74070	TL <sub>p</sub> (Romano <i>et al.</i> 2004; He <i>et al.</i> 2004; Tomasic Paic und Fulgosi 2015)	Saccharose-responsiv (He <i>et al.</i> 2004)	BnCYP34-1 (84 %), BnCYP34-2 (83 %)
AtCYP28	At5g35100	TL <sub>e</sub> (Schubert <i>et al.</i> 2002; Tomasic Paic und Fulgosi 2015)	Dunkel-Behandlung, CO <sub>2</sub> -Stress (He <i>et al.</i> 2004)	BnCYP30-1 (86 %), BnCYP30-2 (85 %)
AtCYP37	At3g15520	TL <sub>e</sub> (Schubert <i>et al.</i> 2002; Tomasic Paic und Fulgosi 2015)	Dunkel-Behandlung (He <i>et al.</i> 2004)	BnCYP49 (87 %), BnCYP50 (87 %)
AtCYP38	At3g01480	TL <sub>e</sub> (Schubert <i>et al.</i> 2002; Ingelsson <i>et al.</i> 2009)	keine PPIase Aktivität, PsbQ-ähnliche Domäne, Photosystem II: Faltung von Untereinheiten und deren Assemblierung, Dunkel-Behandlung, Lichtstress (He <i>et al.</i> 2004; Vasudevan <i>et al.</i> 2012; Shapiguzov <i>et al.</i> 2006; Edvardsson <i>et al.</i> 2003; Fu <i>et al.</i> 2007; Sirpio <i>et al.</i> 2008)	BnCYP47-2 (86 %), BnCYP47-3 (84 %), BnCYP22-1 (69 %), BnCYP31 (51 %)
AtCYP40	At2g15790	Cytosol <sub>p</sub> (Romano <i>et al.</i> 2004; He <i>et al.</i> 2004)	RISC-Komplex, vegetative Phase (Iki <i>et al.</i> 2012; Earley und Poethig 2011)	BnCYP40-2 (93 %), BnCYP40-1 (92 %)
AtCYP57	At4g33060	Cytosol/Nukleus <sub>p</sub> (Romano <i>et al.</i> 2004; He <i>et al.</i> 2004)	Pathogenantwort, RNA-interagierende Region (Pogorelko <i>et al.</i> 2014; Romano <i>et al.</i> 2004; He <i>et al.</i> 2004)	BnCYP55 (86 %), BnCYP52 (80 %)
AtCYP59	At1g53720	Nukleus <sub>e</sub> (Gullerova <i>et al.</i> 2006)	Cyclophilin-RNA-interagierendes Protein (CRIP), Zinc-finger Motiv, prä-mRNA Prozessierung, Transkription (Krzywicka <i>et al.</i> 2001; Bannikova <i>et al.</i> 2013; Gullerova <i>et al.</i> 2006)	BnCYP12-2 (97 %), BnCYP112 (85 %), BnCYP10-2 (69 %)
AtCYP63	At3g63400	Nukleus <sub>p</sub> (Romano <i>et al.</i> 2004; He <i>et al.</i> 2004)	RNA-Metabolismus (Romano <i>et al.</i> 2004)	BnCYP62 (65 %), BnCYP67 (65 %)
AtCYP65	At5g67530	Cytosol <sub>p</sub> (Romano <i>et al.</i> 2004; He <i>et al.</i> 2004)	Ubiquitin-abhängiger Proteinabbau (Romano <i>et al.</i> 2004)	BnCYP65-1 (92 %), BnCYP65-2 (92 %), BnCYP26-2 (33 %), BnCYP47-1 (27 %), BnCYP37-1 (26 %), BnCYP37-2 (26 %)
AtCYP71	At3g44600	Nukleus <sub>e</sub> (Li <i>et al.</i> 2007)	Entwicklung, Genrepression und Organogenese, Genexpression, Hormonantwort, KNOX-responsiv (Li <i>et al.</i> 2007; He <i>et al.</i> 2004; Li und Luan 2011)	BnCYP70-1 (91 %), BnCYP70-2 (91 %)
AtCYP95	At4g32420	Nukleus <sub>p</sub> (Romano <i>et al.</i> 2004; He <i>et al.</i> 2004)	RNA-Metabolismus (Romano <i>et al.</i> 2004)	BnCYP86-1 (69 %), BnCYP86-2 (67 %)

## 8.6 Aminosäuresequenzen rekombinanter CYPs

Hier sind die Aminosäuresequenzen aller klonierten, rekombinanten Fusionsproteine im fasta-Format aufgeführt. Die Konstrukte beinhalten einen N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag sowie eine Thrombinschnittstelle. Nach dem Verdau mit Thrombin bleibt ein N-terminaler Anhang von 3 Aminosäuren übrig (GSH-). Die Sequenz nach Verdau ist grau hinterlegt.

>BnCYP18-2

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMMANPRVFFDMTLDGAPAGRIVMELYKDTTPNTAENFRALCTGEKGVGKKGKPLH  
FKGSFHRVIPGFMCQGGDFTAGNGTGGESIYGDKFKDENFAKKHTGAGILSMANSGPNTNGSQFFICTAETSWL  
DGKHVVFQVVEGMEVVKAIEKVGSSSGTTKKKVVVADCGQVA-

>BnCYP18-3

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMMANPRVFFDMTLDGAPAGRIVMELYKDTTPNTAENFRALCTGEKGVGKKGKPLH  
FKGSFHRVIPGFMCQGGDFTAGNGTGGESIYGDKFKDENFVKKHTGAGILSMANSGPNTNGSQFFICTAETSWL  
DGKHVVFQVVEGMEVVKAIEKVGSSSGTTKKKVVVADCGQVA-

>BnCYP18-4

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMAFPKVFFDMTVDGKPAGRIVMELYTDKTPKTAENFRALCTGEKGVGSKGKPLHF  
KGSSFHRVIPNFMCQGGDFTAGNGTGGESIYGEKFDENFERKHTGPGILSMANAGPNTNGSQFFICTVKTDLWLD  
GKHVVFQVVEGLDVVKAIEKVGSSSGKPSKPVVADCGQLS-

>BnCYP18-5

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMVNPKVYFDMTVGDKAAGRIVMELYADTVPETAENFRALCTGEKIGKSGKPLHY  
KGSFHRVIPKFMCQGGDFTAGNGTGGESIYGMKFKDENFVKKHTGPGILSMANAGSNTNGSQFFICTEKTSLWLD  
GKHVVFQVVEGMDVVRDIEKVGSDSGRTSKKVVIADCGQL-

>BnCYP18-6

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMAFPKVFFDININGQAAGRIVMELYTDKTPKTAENFRALCTGEKGVGRKKGKPLHF  
KGSSFHRVIPSFMCQGGDFTAGNGTGGESIYGDKFEDENFERKHTGPGNLSMANAGANTNGSQFFICTVKTDLWLD  
GKHVVFQVVEGLDVVKAIEKVGSSSGKPSKPVVADCGQLS-

>BnCYP18-8

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMVNPKVYFDMTVGDKAAGRIVMELYADTVPETAENFRALCTGERGIGKSGKPLHY  
KGSFHRVIPKFMCQGGDFTAGNGTGGESIYGMKFKDENFVKKHTGPGILSMANAGSNTNGSQFFICTEKTSLWLD  
GKHVVFQVVEGMDVVRDIEKVGSDSGRTSKKVVIADCGQL-

>BnCYP19-1

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMANPKVFFDILIGMKAGRIVMELFADVTPTADNFRALCTGEKIGIQAGKALHY  
KGSFHRVIPGFMCQGGDFTTRGNGTGGESIYGAKFQDENFKLKHHTGPGILSMANSGPNTNGSQFFICTDKTAWLD  
GKHVVFQVVDGYNVVKAMEKVGSEKVTSEPVVIEDCGEIKNETSEVSNKE-

>AtCYP18-3

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMAFPKVYFDMTIDGQPAGRIVMELYTDKTPRTAENFRALCTGEKGVGGTGKPLHF  
KGSKFHRVIPNFMCQGGDFTAGNGTGGESIYGSKFEDENFERKHTGPGILSMANAGANTNGSQFFICTVKTDLWLD  
GKHVVFQVVEGLDVVKAIEKVGSSSGKPTKPVVADCGQLS-

>AtCYP18-4

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMSNPRVFFDMSLSGTPIGRIEMELFADTTPNTAENFRALCTGEKGMGKLGKPLHF  
KGSIFHRVIPGFMCQGGDFTAKNGTGGESIYGAKFKDENFIKKHTGAGILSMANSGPNTNGSQFFICTDKTSLWLD  
GKHVVFQVVKGLDVVKAIEKVGSDSGKTSKVVITITDCGQLS-

>AtCYP19-1

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMATNPKVYFDMTVGGKSAGRIVMELYADTTPETAENFRALCTGERGIGKQKPLHY  
YKGSFHRVIPKFMCQGGDFTAGNGTGGESIYGSKFEDENFIKKHTGPGILSMANAGANTNGSQFFICTEKTSLWLD  
DGKHVVFQVVEGLNVVRDIEKVGSDSGRTSKPVVVIADCGQIS-

>AtCYP19-3

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMANPKVFFDILIGMKAGRIVMELFADVTPTANNFRALCTGENGIGKAGKALHY  
KGSFHRVIPGFMCQGGDFTTRGNGTGGESIYGSKFEDENFKLKHHTGPGILSMANSGPNTNGSQFFICTEKTSLWLD  
GKHVVFQVVDGYNVVKAMEDVGSMDGNPSERVVIEDCGELKNPSS-

## 8.7 Übersicht: rekombinante CYPs, *in vitro* Experimente und *A. thaliana* Mutanten

**Tabelle A4:** Eine vollständige Zusammenfassung von Klonierung, Experimenten und Mutanten dieser Arbeit. Erfolgreich abgeschlossene Experimente sind mit ✓ gekennzeichnet, per LC-MS/MS nicht identifizierte oder nicht erfolgreich kristallisierte Proteine mit ✗. Grau hinterlegt sind die AtCYPs in der Spalte der LC-MS/MS Analyse, da hier nur Phloemexsudat von *B. napus* untersucht wurde.

Protein	Kloniert in pET28a+	Aufreinigung etabliert	Identifiziert im Phloem per LC-MS/MS	PPiase Assay	PPiase Assay mit CsA	SAXS-Messungen	Kristallstruktur	<i>A. thaliana</i> Mutante
BnCYP18-2	✓	✓	✓					Homolog: AtCYP18-4
BnCYP18-3	✓	✓	✗					Homolog: AtCYP18-4
BnCYP18-4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	Homolog: AtCYP18-3
BnCYP18-5	✓	✓	✓	✓	✓	✓		Homolog: AtCYP19-1
BnCYP18-6	✓		✓					Homolog: AtCYP18-3
BnCYP18-8	✓		✗					Homolog: AtCYP19-1
BnCYP19-1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Homolog: AtCYP19-3
AtCYP18-3	✓	✓		✓	✓		✗	✓
AtCYP18-4	✓							✓
AtCYP19-1	✓							✓
AtCYP19-3	✓	✓		✓	✓	✓	✗	✓
AtCYP20-2								✓
AtCYP20-3								✓
AtCYP26-2								✓

## 9 AUS DIESER ARBEIT HERVORGEANGENE VERÖFFENTLICHUNGEN

### 9.1 Publikationen

**Hanhart P**, Thieß M, Amari K, Bajdzienko K, Giavalisco P, Heinlein M und Kehr J (2017) Bioinformatic and expression analysis of the *Brassica napus* L. cyclophilins. *Scientific Reports*, 7(1), 1514.

Ostendorp A, Pahlow S, Krübel L, **Hanhart P**, Garbe MY, Deke J, Giavalisco P und Kehr J (2017) Functional analysis of *Brassica napus* phloem protein and ribonucleoprotein complexes. *New Phytologist*, 214(3), 1188-1197. doi.org/10.1111/nph.14405

**Hanhart P**, Falke S, Garbe MY, Thieß M, Betzel C und Kehr J (in Vorbereitung) Enzyme activity and structural features of three single-domain phloem cyclophilins from *Brassica napus*.

### 9.2 Konferenzbeiträge

**Hanhart P**, Thieß M, Amari K, Bajdzienko K, Giavalisco P, Heinlein M und Kehr J (2017) Phloem cyclophilins identified in oilseed rape (*Brassica napus*). 30. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen. 21.-24.02.2017, Dabringhausen, Deutschland. (Poster)

**Hanhart P**, Thieß M, Amari K, Bajdzienko K, Falke S, Garbe MY, Betzel C, Giavalisco P, Heinlein M und Kehr J (2017) Cyclophilins might act as molecular chaperones in the phloem long-distance transport system of oilseed rape. EMBO Workshop: Intercellular communication in development and disease. 10-15.07.2017, Berlin, Deutschland. (Poster)

**Hanhart P**, Garbe MY, Falke S, Thieß M, Betzel C und Kehr J (2018) Structural and functional analysis of stress-related chaperones in *B. napus* and *A. thaliana*. 31. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen. 20-23.02.2018, Dabringhausen, Deutschland. (Poster)

## 10 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Patrizia Hanhart

## 11 DANKSAGUNG

Was Ansprachen anbelangt bin ich keine Freundin großer, ausschweifender Worte. Deshalb möchte ich mich gerne kurz und knapp aber trotzdem von ganzem Herzen bei folgenden Personen bedanken, die mich während meiner Promotion unterstützt haben - egal ob fachlich, freundschaftlich oder emotional.

Meinen Betreuern:

Julia Kehr,  
Stefan Hoth.

Meinen Kooperationspartnern:

Manfred Heinlein,  
Khalid Amari,  
Patrick Giavalisco,  
Christian Betzel,  
Sven Falke,  
Melissa A. Graewert.

Meinen Arbeitskollegen:

Melanie Thieß,  
Sandra Heinrich,  
Lena Krübel,  
Dem gesamten DELIGRAH-Team,  
insbesondere Gunnar Baermann,  
Der gesamten AG Kehr  
sowie auch der AG Hoth.

Meinen Studenten und Freunden:

Jennifer Deke,  
Marcel Y. Garbe,  
Nicole Pritzlaff,  
Urszula Zarzenska.

Meinen Freunden:

Felix Ballhausen,  
Carolin Sterk,  
Katharina Ebell.

Meiner Familie:

Wiesława und Stephan Hanhart,  
Tobias Hanhart,  
Hildburg und Gerd Knop.

Ein besonderer Dank gilt Jan Knop, ohne den ich diese ereignisreiche Zeit nicht annähernd so erfolgreich überstanden hätte.

Danke!