

Wirt-Virus Wechselwirkungen bei der
Infektion durch *Acanthocystis turfacea*
Chlorella Virus 1: Regulation der
Genexpression früher Gene und
des Ubiquitin-Systems

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

Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim

Institut für Biologie

vorgelegt von
Kamila Katarzyna Lindner
aus Góra

2021

Dekan: Prof. Dr. Uwe Beifuss

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Artur Pfitzner
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Andreas Schaller
3. Berichterstatter: Prof. Dr. Waltraud Schulze

Eingereicht am: 7.12.2020

Mündliche Prüfung am: 20.04.2021

Die vorliegende Arbeit wurde am 4.03.2021 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als “Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften” angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	2
1 Einleitung	3
1.1 <i>Chlorella heliozoae</i> und ATCV-1	3
1.1.1 <i>Chlorella heliozoae</i>	4
1.1.2 <i>Acanthocystis turfacea</i> <i>Chlorella</i> Virus 1	6
1.1.3 Wirt-Virus Wechselwirkungen	13
1.2 Regulation der Genexpression	15
1.2.1 Bakterielle Transkriptionsinitiation	15
1.2.2 Transkriptionsinitiation der Eukaryonten	17
1.2.3 Promotor-gesteuerte Transkriptionsregulation bei Chloroviren	24
1.3 Ubiquitin-System	26
1.3.1 Konjugation von Ubiquitin an Proteine	27
1.3.2 Folgen der Ubiquitinierung	34
1.4 Zielsetzung	36
2 Ergebnisse – Regulation der Expression früher viraler Gene	37
2.1 proZ798L als Beispiel für die Regulation früher Promotoren	37
2.1.1 proZ798L induziert die Genexpression in Algen, Pflanzen und humanen Zellen	39
2.1.2 Hex-Motiv ist essenziell für die proZ798L-Aktivität	46
2.1.3 Die Aktivität von proZ798L hängt von den Transkripti- onsfaktoren des Wirtes ab	50

2.2	Frühe Promotoren mit TATA- und Hex-Motiv werden wie proZ798L reguliert	56
2.2.1	Charakterisierung ausgewählter Promotoren	56
2.2.2	Frühe virale Promotoren sind aktiv in Algen	59
2.2.3	Frühe virale Promotoren mit TATA- und Hex-Motiv sind in Protoplasten aktiv	62
2.2.4	Promotoren ohne Hex-Motiv zeigen keine Aktivität in Algen und Protoplasten	64
2.2.5	Die Aktivität der frühen Promotoren mit Hex-Motiv lässt sich auf die Bindung von GBF zurückführen	71
2.2.6	Charakterisierung von ORF Z174L und Z765R	80
3	Ergebnisse – virale Komponenten des Ubiquitin-Systems	88
3.1	Z203L – virales Ubiquitin	92
3.1.1	ORF Z203L kodiert für ein Ubiquitin	92
3.1.2	Z203L wird von der humanen E3-Ligase RNF11 als Ubiquitin erkannt	94
3.1.3	Z203L fungiert als Signalprotein zum Abbau am Proteasom	96
3.2	Z292L – virale E3-Ligase	101
3.2.1	ORF Z292L weist Ähnlichkeiten zu E3-Ligasen auf . . .	101
3.2.2	Z292L gehört zu den Dimer-bildenden Ligasen	102
3.2.3	Z292L ist <i>in vitro</i> eine aktive E3-Ligase	104
3.2.4	Z292L interagiert mit Proteinen aus <i>C. reinhardtii</i> . . .	105
3.2.5	Z292L bindet spezifisch an Enolase aus Algen	108
3.3	Z339L – ein virales SKP1-Protein	112
3.3.1	ORF Z339L kodiert für ein SKP1-Protein	112
3.3.2	Z339L interagiert spezifisch mit bekannten Interaktionspartnern von SKP1-Proteinen	114
3.3.3	Z339L fungiert als ein Transkriptionsaktivator in Hefe	116
3.3.4	Z339L interagiert mit <i>Chlorella</i> -Proteinen <i>in vivo</i>	121
4	Diskussion	123
4.1	Promotor-gesteuerte Regulation der viralen Genexpression . . .	123

4.1.1	Die Spezies-übergreifende Aktivität von proZ798L wird von G-Box bindenden Faktoren reguliert	124
4.1.2	Neuer GBF-abhängiger Mechanismus zur Regulation früher viraler Promotoren von ATCV-1	126
4.1.3	GBF-abhängiger Mechanismus zur Regulation früher Promotoren – einer von vielen bei ATCV-1?	129
4.2	Virale Komponenten des Ubiquitin-Systems	131
4.2.1	Das virale Ubiquitin Z203L	131
4.2.2	Z292L – virale RING E3 Ligase	133
4.2.3	Z339L – virales SKP1-Protein	137
4.3	Wechselwirkungen zwischen ATCV-1 und seinem Wirt	140
5	Materialien	143
5.1	Chemikalien	143
5.2	Enzyme	143
5.3	Kits	143
5.4	Biologische Materialien	144
5.4.1	Viren	144
5.4.2	Bakterien	144
5.4.3	Hefen	145
5.4.4	Algen	145
5.4.5	Zellkultur	146
5.4.6	Pflanzen	146
5.5	Gene und Proteine	146
5.5.1	Reportergene	146
5.5.2	Andere Gene und Proteine	149
5.6	Vektoren	150
5.6.1	pBluescript II KS(+)	150
5.6.2	T-Vektor	150
5.6.3	pGEX-3X	150
5.6.4	pDEST22, pDEST32 und pDONR201	151
5.6.5	pBT3-N und pBT3-N Δ	152
5.6.6	pGBT9	153
5.6.7	pRW95-3	154

5.6.8	pGAD-HA	155
5.6.9	pGAD424	155
5.6.10	pPR3-N	156
5.6.11	pUC18	157
5.6.12	pUC35S	157
5.6.13	pUC18-GUS	158
5.6.14	pBIN19 und pTAK35S	159
5.6.15	pARG7	160
5.6.16	pOPT-mVenus-Paro	161
5.6.17	pEYFP-Mem	161
5.7	Synthetische Oligonukleotide	162
5.7.1	Oligonukleotide – Sequenzierung	162
5.7.2	Oligonukleotide – Amplifikation der DNA-Sequenzen	163
5.7.3	Oligonukleotide – Minimalpromotoren	165
5.8	Größenmarker	167
5.9	Antiseren	167
5.10	Software	168
6	Methoden	169
6.1	Molekularbiologische Methoden	169
6.1.1	Polymerasekettenreaktion	169
6.1.2	Sequenzspezifische Restriktion von DNA	170
6.1.3	Ligation	170
6.1.4	Transformation von Bakterien	170
6.1.5	DNA-Isolation	173
6.1.6	Agarose-Gelelektrophorese	176
6.1.7	Extraktion der DNA aus dem Gel	176
6.1.8	Modifizierung der DNA-Fragmenten	177
6.1.9	Bestimmung der DNA-Konzentration	177
6.1.10	Sequenzierung	178
6.1.11	Synthese der dsDNA aus Oligos	178
6.2	Proteinbiochemische Methoden	179
6.2.1	Aufreinigung der Proteine	179
6.2.2	SDS-PAGE	182
6.2.3	Western Blot	183

6.2.4	Coomassie-Färbung	186
6.2.5	Bradford-Test	186
6.2.6	ASL-Assay	187
6.2.7	GUS-Assay	188
6.2.8	Interaktionstests in Algenzellen	188
6.2.9	<i>in vitro</i> Ubiquitinierung-Assay	189
6.3	Experimente mit Hefen	190
6.3.1	Anzucht von <i>S. cerevisiae</i>	190
6.3.2	Transformation von Hefen	191
6.3.3	Erstellen von Gefrierkulturen	192
6.3.4	Interaktionstest in Hefe	192
6.4	Arbeiten mit Algen und Viren	195
6.4.1	Kultivierung von <i>C. reinhardtii</i> und <i>C. heliozoae</i>	195
6.4.2	Bestimmung der Algen-Zellzahl in der Kultur	196
6.4.3	Transformation von <i>C. reinhardtii</i>	196
6.4.4	Vermehrung von Chloroviren	197
6.4.5	Plaque-Assay	197
6.5	Experimente mit Pflanzen	198
6.5.1	Anzucht von Pflanzen	198
6.5.2	Agrobakterien-Infiltration von Pflanzen	198
6.5.3	Isolation und Transformation von Protoplasten	200
6.6	Kultivierung und Transfektion von HEK293-Zellen	202
6.6.1	Kultivierung von HEK293-Zellen	202
6.6.2	Transfektion von HEK293-Zellen	203
6.6.3	Kryokonservierung von HEK293-Zellen	203

Literatur	217
------------------	------------

Abkürzungsverzeichnis	218
------------------------------	------------

A Anhang	221
-----------------	------------

A.1	DNA-Sequenzen - Promotoren	221
A.2	Vektorkarten	223
A.3	Eichgeraden	225

A.4 Rohdaten	226
Erklärung	249
Lebenslauf	250
Wissenschaftliche Beiträge	251
Danksagungen	252

Zusammenfassung

Acanthocystis turfacea *Chlorella* Virus 1 (ATCV-1) ist ein Virus der Gattung Chloroviren, das die einzellige Grünalge *Chlorella heliozoae* infiziert. Die Infektion mit ATCV-1 verläuft tödlich für die Algenzelle und basiert auf der korrekten Expression der 860 hypothetischen Virusgene. Diese Gene werden in frühe, früh/späte und späte Gene unterteilt und werden je nach deren Proteinfunktion zur unterschiedlichen Zeitpunkten exprimiert. Die Genexpression wird von den entsprechenden viralen Promotoren reguliert und kann von viralen oder wirtseigenen Transkriptionsfaktoren beeinflusst werden. Die Stabilität aller Proteine wird von dem Ubiquitin-System des Wirtes reguliert. In dieser Studie wurde die Expression der frühen viralen Gene und des durch ATCV-1 regulierten Ubiquitin-vermittelten Proteinabbaus untersucht.

Durch die Untersuchungen der Promotoren der frühen Gene von ATCV-1 (Z174L, Z765R, Z798L) wurden Consensus-Sequenzen identifiziert (u. a. Hex-Motiv und TATA-Box), die von viralen, aber vor allem von Transkriptionsfaktoren des Wirtes, gebunden werden können. Eine direkte Regulation der frühen Promotoren mit Hex-Motiv wurde durch die *in vivo* Interaktionen mit G-Box bindenden Faktoren bestätigt. Neben diesem neuen Regulationsmechanismus zur Expression früher viraler Gene wurden Hinweise auf weitere Mechanismen zur Regulation früher Gene mit anderen Consensus-Sequenzen (AATGACA) gefunden. Im zweiten Teil dieser Studie konnten drei virale Proteine als Proteine des Ubiquitin-Systems identifiziert werden: ein virales Ubiquitin (Z203L), eine virale RING E3-Ligase (Z292L) und ein virales SKP1-Protein (Z339L). Mit Hilfe dieser Proteine ist ATCV-1 in der Lage, in das Ubiquitin-System des Wirtes einzugreifen. Während die E3-Ligasen für die spezifische Ubiquitinierung der Zielproteine (z. B. Z292L bei Enolase) verantwortlich sind, sorgt die zusätzliche Expression eines viralen Ubiquitins für eine ausreichende Menge an Signalprotein.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen ein breites Spektrum an Wirt-Virus Wechselwirkungen auf der Ebene der Genregulation und beim Proteinabbau. ATCV-1 kann die Wirtsfaktoren zur Einleitung seiner Genexpression nutzen und mithilfe der im viralen Genom enthaltenen Komponenten des Ubiquitin-Systems, den Proteinabbau des Wirtes umprogrammieren.

Abstract

Acanthocystis turfacea *Chlorella* Virus 1 (ATCV-1) is a virus of the genus Chloroviruses that infects the unicellular green alga *Chlorella heliozoae*. The infection with ATCV-1 is lethal for the algae and requires the correct expression of the 860 hypothetical virus genes. These genes are divided into early, early/late and late genes which are expressed at different times, depending on their protein function. Gene expression is regulated by their corresponding viral promoters and can be controlled by viral or host-specific transcription factors. The stability of proteins is regulated by the host's ubiquitin system. This study investigated the expression of early viral genes and the ubiquitin-mediated protein degradation regulated by ATCV-1.

By investigating the promoters of the early genes of ATCV-1 Z174L, Z765R and Z798L respectively, consensus sequences were identified including a Hex motif and a TATA box that can be bound by viral, but most importantly, host transcription factors. By *in vivo* interactions with G-box binding factors, a direct regulation of the early promoters, including aforementioned Hex motif, could be demonstrated. Along with this new regulatory mechanism for the expression of early viral genes, evidence for additional mechanisms for the regulation of early genes with different consensus sequences, such as AATGACA, were found. In the second part of this study, three novel viral proteins were identified as proteins of the ubiquitin system: a viral ubiquitin (Z203L), a viral RING E3 ligase (Z292L) and a viral SKP1 protein (Z339L). Experiments have shown that ATCV-1 is able to interfere with the host's ubiquitin system using these proteins. Although the E3 ligases are responsible for the specific ubiquitination of the target proteins (e.g. Z292L in the case of enolase), the additional expression of a viral ubiquitin ensures a sufficient amount of the signal protein is present.

The results of this study demonstrate a wide range of host-virus interactions at the level of gene regulation and protein degradation. ATCV-1 can use host factors to initiate its own gene expression and, with the help of the components of the ubiquitin system encoded in the viral genome, reprogram the host's protein degradation.

Kapitel 1

Einleitung

Algen stellen eine sehr erfolgreiche, aber auch diverse Organismengruppe dar, die sowohl im Meer als auch im Süßwasser weit verbreitet ist. Als einer der vorherrschenden Primärproduzenten in aquatischen Lebensräumen, gehören Algen zu den Hauptsauerstofflieferanten und übernehmen ca. 50 % der globalen Sauerstoffproduktion [R. L. Chapman 2010]. Zusammen mit dem tropischen Regenwald bilden sie somit die “Grüne Lunge” der Erde. Durch ihre hohe Photosyntheserate tragen Algen wesentlich zur CO₂-Fixierung in den Ozeanen bei aber auch zur Stabilisierung der Atmosphäre und stellen als Phytoplankton einen großen Teil der Nahrungskette dar. Algen werden auch in Bioreaktoren verwendet, wo sie zur Erzeugung von Biokraftstoffen oder zur Produktion von Nahrungsmitteln eingesetzt werden. In dieser Arbeit werden die Wechselwirkungen zwischen Algen und Viren, anhand von *Acanthocystis turfacea* *Chlorella* Virus 1 (ATCV-1) und seinem Wirt *Chlorella heliozoae*, untersucht. Die Studien sollen nicht nur zum näheren Verständnis der Virusinfektion von *Chlorella*-Algen beitragen, sondern auch Erkenntnisse zur Gen- und Proteinregulation der Algen und Viren bringen.

1.1 *Chlorella heliozoae* und ATCV-1

Algen (lat. *algae*) ist kein systematischer Begriff sondern beschreibt pflanzenartige Protisten, die Photosynthese betreiben können. Die klassische Taxonomie unterscheidet Algen anhand der Zusammensetzung ihrer Photosynthesepigmente sowie den Produkten (u. a.: *Rhodophyta* (Rotalgen), *Chlorophyta*

(Grünalgen), *Phaeophyta* (Braunalgen), *Euglenophyta*, *Chrysophyta* und *Dinophyta*) [Guiry *et al.*, 2020]. Die Gruppe der Algen umschließt viele (zwischen 30.000 und 1 Million) sehr diverse Arten (von einzelligen Organismen bis zu 60 m großen Makroalgen) von denen nur 12205 genau beschrieben worden sind [A. D. Chapman 2009; Guiry 2012].

1.1.1 *Chlorella heliozoae*

Chlorella heliozoae (*C. heliozoae*) gehört zu den Grünalgen (*Chlorophyta*). Die Abteilung der *Chlorophyta* bildet zusammen mit den höheren Pflanzen die systematische Gruppe der *Viridiplantae* (Abbildung 1.1 A). Die Grünalgen stellen somit die am nächsten verwandte Organismengruppe zu den höheren Pflanzen dar. Sie besitzen die gleichen Photosynthesepigmente (Chlorophyll A und B), den gleichen Satz an Carotinoiden, Stärke als Reservestoff und Cellulose als Baustein der Zellwand. Aus diesem Grund wurden einzellige Grünalgen schon früh als gutes Forschungsobjekt zur Untersuchungen u. a. der Photosynthese erkannt. Als bekanntestes Beispiel gilt hier *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*, Abteilung *Chlorophyta*, Klasse der *Chlorophyceae*). Die Alge wurde 1945 von G. M. Smith aus Bodenproben in der Nähe von Amherst in Massachusetts isoliert. *C. reinhardtii* gilt bis heute als Modellorganismus aller einzelliger Algen und ist mit vielen mutanten Labor-Stämmen vertreten, die allesamt auf die erste Kultur zurückzuführen sind [Harris 2001]. *Chlorella*-Stämme wurden wesentlich früher beschrieben. Schon 1890 startete Beyerinck die ersten Versuche zu Kultivierung von *Chlorella vulgaris* und definierte die neue Gattung der *Chlorella*-Algen [Beyerinck 1890]. *Chlorella vulgaris*, sowie die nahe verwandten Spezies: *Chlorella heliozoae* und *Chlorella variabilis* (auch NC64A genannt), gehören zu den sog. Zoochlorellen. Diese Algen leben endosymbiontisch in Ciliaten (z. B. *Chlorella variabilis* in *Paramecium busaria* oder *Chlorella vulgaris* in *Climacostomum virens*), Heliozoen (z. B. *Chlorella heliozoae* in *Acanthocystis turfacea*) oder Invertebraten [Pröschold *et al.*, 2010] (Abbildung 1.1 B und C).

A

Taxonomie	
Reich	<i>Plantae</i>
	<i>Viridiplantae</i>
Abteilung	<i>Chlorophyta</i>
Unterabteilung	<i>Chlorophytina</i>
Klasse	<i>Trebouxiophyceae</i>
Ordnung	<i>Chlorellales</i>
Familie	<i>Chlorellaceae</i>
Gattung	<i>Chlorella</i>

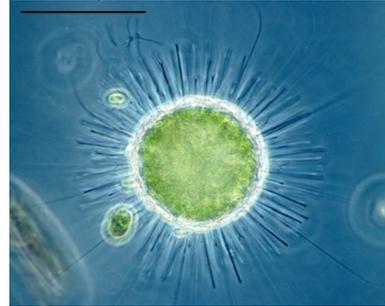
B**C**

Abbildung 1.1 *Chlorella heliozoae* – Taxonomische Abstammung und Morphologie. **A.** Systematische Zuordnung der Gattung der *Chlorella*-Algen **B.** *A. turfacea* mit symbiotischen *C. heliozoae*. Balken = 25 μm [Bubeck *et al.*, 2005]. **C.** Ausgewählte Zoochlorellen Arten isoliert aus ihren Symbionten: *C. vulgaris* aus *C. virens* (links), *C. variabilis* aus *P. bursaria* (mittig), *C. heliozoae* aus *A. turfacea* (rechts). Balken = 10 μm . Verändert nach [Pröschold *et al.*, 2010].

Chlorella heliozoae wurde 1982 von Uwe Gert Schlösser aus einem Teich des Sumpfbereichs im Terra Nova National Park in Neufundland (Kanada) isoliert und erhielt damals den Namen *Chlorella* SAG 3.83. Die genauere Beschreibung und systematische Einordnung fand erst im Jahr 2011 statt. Die Arbeitsgruppe um Thomas Pröschold untersuchte 17 Spezies von Zoochlorellen, u. a. *C. heliozoae* und befasste sich nicht nur mit der rRNA-Sequenzanalyse sondern auch mit der Morphologie, Physiologie und der Sensitivität gegenüber Viren. Sie benannten die SAG 3.83 Alge um und definierten alle ihre spezifischen Merkmale. Demnach hat die Zelle der grünen Alge einen Durchmesser von ca. 5 – 12 μm , ist kugel- oder elipsoid-förmig und besitzt dünne Zellwände (Abbildung 1.1 C, rechts). Die Alge enthält einen Mantel- oder Untertassen-förmigen Chloroplasten mit einem einzigen Pyrenoiden. Die Fortpflanzung erfolgt mit Hilfe von 2 – 4 (selten 8) Autosporien, die gleichzeitig freigesetzt werden. Die

Kultivierung von *C. heliozoae* bedarf Ammoniums als Stickstofflieferant und der Vitamine B₁ und B₁₂. Zudem ist *Chlorella heliozoae* die einzige bekannte Algenspezies, die von dem ATCV-1 infiziert wird [Pröschold *et al.*, 2010].

1.1.2 *Acanthocystis turfacea Chlorella Virus 1*

Acanthocystis turfacea Chlorella Virus 1 (ATCV-1) wurde 2005 von der Arbeitsgruppe Pfitzner entdeckt. Die ersten Proben wurden aus einem Teich in Stuttgart (Deutschland) isoliert und anschließend beschrieben. Das isolierte Virus infizierte *Chlorella heliozoae* aber keine andere der getesteten *Chlorella*-Spezies (Plaques-Bildung). Zum Vergleich wurde das *Paramecium busaria Chlorella Virus 1* (PBCV-1) herangezogen, das die nah verwandte *Chlorella variabilis* infiziert und als Modellvirus für die Gattung der Chloroviren gilt. Das ATCV-1 besitzt, wie auch PBCV-1, ein ikosaeder-förmiges Kapsid mit einem Durchmesser von 140 – 190 nm und filamentöse Strukturen, die von den Ecken des Ikosaeders ausgehen (Abbildung 1.2 A). Das Kapsid ist aus einem 50 kDa Hüllprotein aufgebaut und enthält ein doppelsträngiges DNA (dsDNA) Genom (Abbildung 1.2 B). Anhand dieser Merkmale sowie der Sequenzanalyse der DNA-Polymerase wurde ATCV-1 als Virus der Gattung *Chlorovirus* aus der Familie der *Phycodnaviridae* identifiziert (Abbildung 1.2 C) [Bubeck *et al.*, 2005]. Mittlerweile sind viele weitere ATCV-ähnliche Viren überall auf der Welt entdeckt worden. Zwölf davon wurden sequenziert und weisen kleine Unterschiede im Genom auf, weswegen sie als getrennte Spezies behandelt werden [NCBI-Genbank 2020]. Des Weiteren wurden auch bei PBCV-1 weitere verwandte Viren gefunden (17 Spezies), wovon 10 sequenziert wurden [ICTV-Taxonomy 2020; NCBI-Genbank 2020].

Die Chloroviren stellen eine morphologisch nah verwandte, jedoch genetisch diverse Gruppe von Viren dar, welche unterschiedliche *Chlorella*-Spezies infizieren können [Fitzgerald *et al.*, 2007]. Die Gattung der Chloroviren besteht aus vier Spezies, die unterschiedlichen Wirte infizieren: *Chlorella variabilis* (PBCV, NC64A Viren), *Chlorella Pbi* (Pbi-Viren), symbiotische *Chlorella* aus *Hydra viridis* (HVCV) und *Chlorella heliozoae* (ATCV) [Bubeck *et al.*, 2005]. Das PBCV-1 Virus wurde im Jahre 1983 von James Van Etten entdeckt und beschrieben [van Etten *et al.*, 1983a]. Bis heute stellt es das Modellvirus für die

Chloroviren dar und ist das am besten verstandene *Chlorella*-Algen infizierende Virus. Auf Basis der Studien von PBCV-1 konnte der, für alle Chloroviren gemeinsame, Infektionszyklus untersucht und beschrieben werden [van Etten 2003].

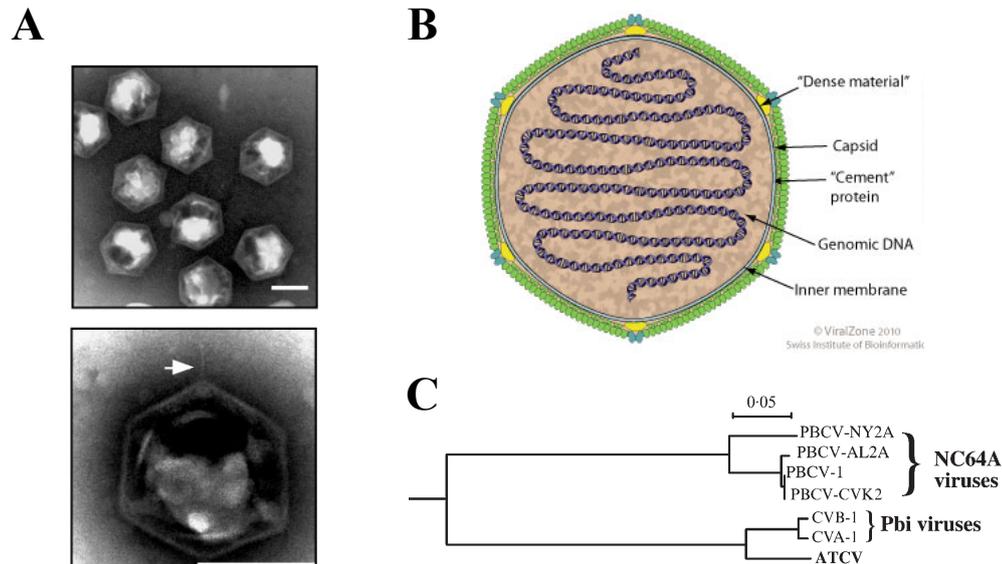


Abbildung 1.2 Morphologische Merkmale und Taxonomie von ATCV-1.

A. Elektronenmikroskop-Aufnahmen von mehreren ATCV Viruspartikeln (oben) sowie von einem einzigen Partikel mit sichtbaren filamentösen Strukturen an den Ecken des Kapsids (unten). Balken = 100 nm [Bubeck *et al.*, 2005]. **B.** Schematische Darstellung des Kapsids der *Phycodnaviridae*. Die wichtigsten Bestandteile des Viruspartikels sind markiert: Kapsid, genomische DNA, innere Membran sowie Füllproteine und Dichtungsmaterial [Hulo *et al.*, 2010]. **C.** Kladogramm. Verwandtschaft von ATCV-1 mit den Chloroviren ermittelt anhand der Sequenzvergleiche von DNA-Polymerasen aus unterschiedlichen Spezies: PBCV und Pbi Viren [Bubeck *et al.*, 2005].

Infektionszyklus

Der Infektionszyklus in *Chlorella*-Algen ist ein schneller Prozess. Das Virus bindet irreversibel an der Zellwandoberfläche der Algen [Meints *et al.*, 1984]. Die Bindung erfolgt an den filamentösen Strukturen an den Ecken des Virus und resultiert im Auflösen der Zellwand (Abbildung 1.3 A). Die virale DNA sowie die DNA-assoziierten Proteine werden anschließend ins Zellinnere freigelassen, das leere Kapsid verbleibt an der Zelloberfläche (Abbildung 1.3 B). Es wird angenommen, dass die genomische DNA schnell in den Nukleus gelangt,

wo die frühe Transkription stattfindet (5 bis 10 min nach der Infektion, frühe Gene). Die DNA-Replikation findet bereits 60 – 90 min nach der Infektion statt, direkt gefolgt von der Transkription der späten Gene [Schuster *et al.*, 1986; van Etten *et al.*, 1984].

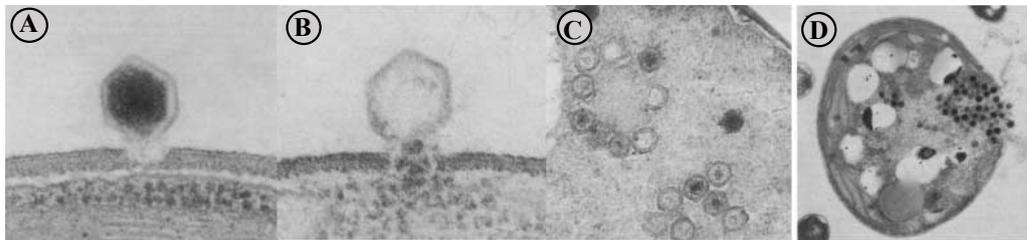
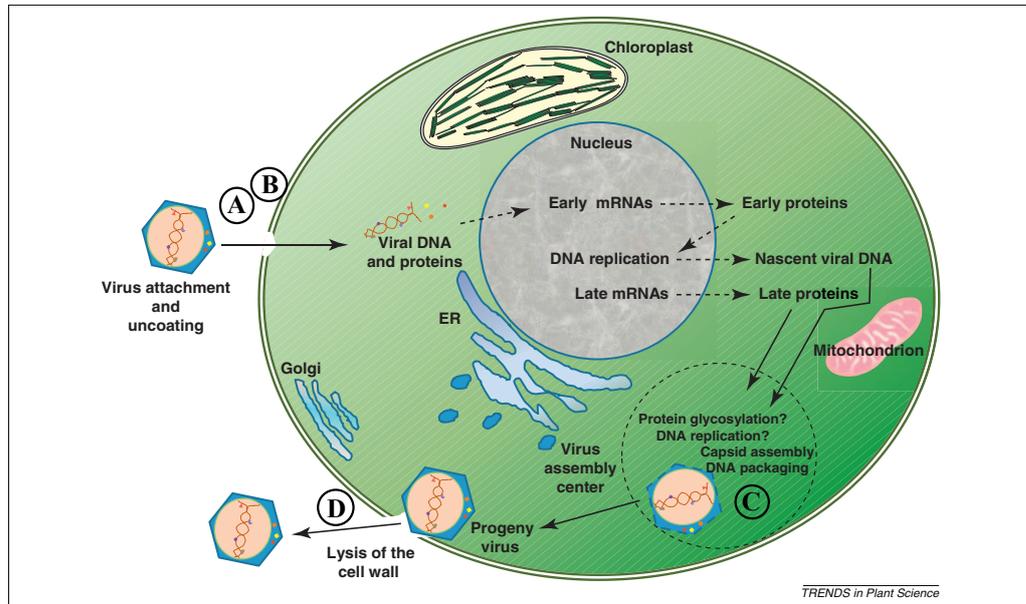


Abbildung 1.3 Schematischer Ablauf der Virusinfektion von Chloroviren.

Das Virus bindet an der Zelloberfläche der Algen und löst diese auf (A). Das leere Kapsid verbleibt an der Zelloberfläche (B). Die genomische DNA gelangt in den Nucleus, wo die frühe Transkription stattfindet, gefolgt von der DNA-Replikation und der späten Transkription. Die translatierten Proteine sowie die replizierte virale DNA gelangen in die Assemblierungszentren, wo die Viruspartikel zusammgebaut werden (C). Die Viruspartikel werden durch Lyse der Zelle freigelassen (D). Durchgezogene Linien markieren nachgewiesene Vorgänge, gestrichelte deuten Hypothesen und Annahmen an. Verändert nach [Kang *et al.*, 2005] und [van Etten *et al.*, 2012].

Bereits zwei Stunden nachdem das Virus die Zelloberfläche erreicht hat, werden die ersten Kapside in den Assemblierungszentren im Cytoplasma der Wirtszelle sichtbar. Dort werden sie mit den replizierten DNA-Molekülen befüllt und zu Viruspartikel zusammgebaut (Abbildung 1.3 C). Die Lyse der Zelle und

somit die Freilassung von ca. 1000 Viruspartikel erfolgt 5 – 8 Stunden nach der Infektion (Abbildung 1.3 D). Etwa 30 % bis 50 % der Viruspartikel sind infektiös [Kang *et al.*, 2005; Meints *et al.*, 1986; van Etten *et al.*, 1983b].

Genom

Die Familie der *Phycodnaviridae* gehört zu dem monophyletischen Stamm der *Nucleocytoviricota*, den sog. *Nucleo-Cytoplasmic Large DNA Viruses* (NCLDV). Diese Viren zeichnen sich nicht nur durch ein recht großes Genom aus, sondern besitzen bestimmte Gene (*NCLDV core genes*), die nur in dieser Virusgruppe auftreten. Diese Gene stammen aus unterschiedlichen Quellen. So finden sich Gene bakterieller und eukaryotischer Abstammung, aber auch welche die von Bakteriophagen stammen [Koonin *et al.*, 2010]. Auch ATCV-1 besitzt Gene, die für Viren unüblich sind, dazu gehört z. B.: ein Aquaglyceroporin oder ein Kalium-Ionen Transporter. Sequenzvergleiche zeigen, dass über 80 % der ATCV-1 Gene auch in PBCV-1 vorhanden sind [Fitzgerald *et al.*, 2007].

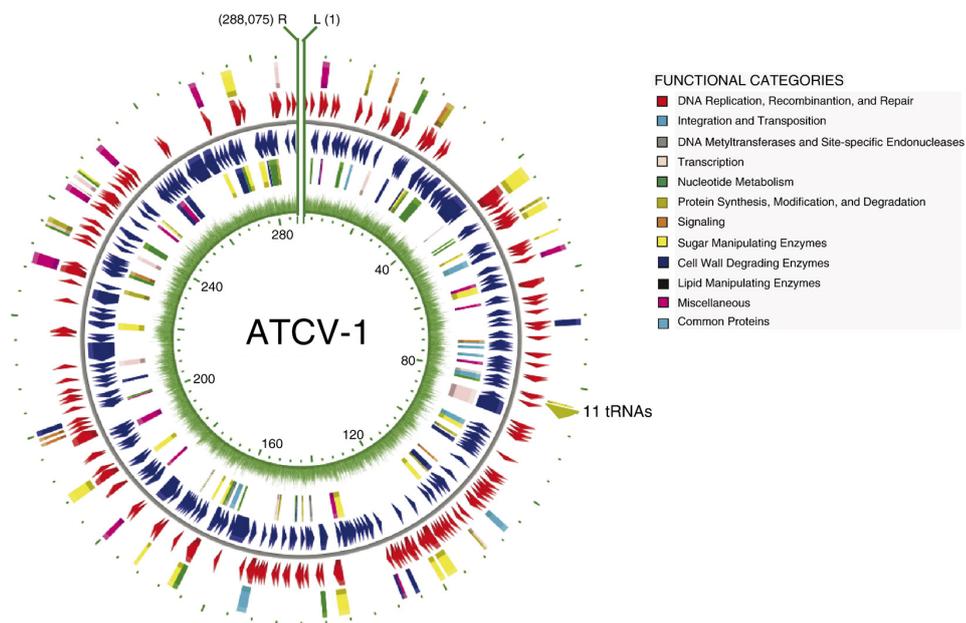


Abbildung 1.4 Genomkarte von ATCV-1.

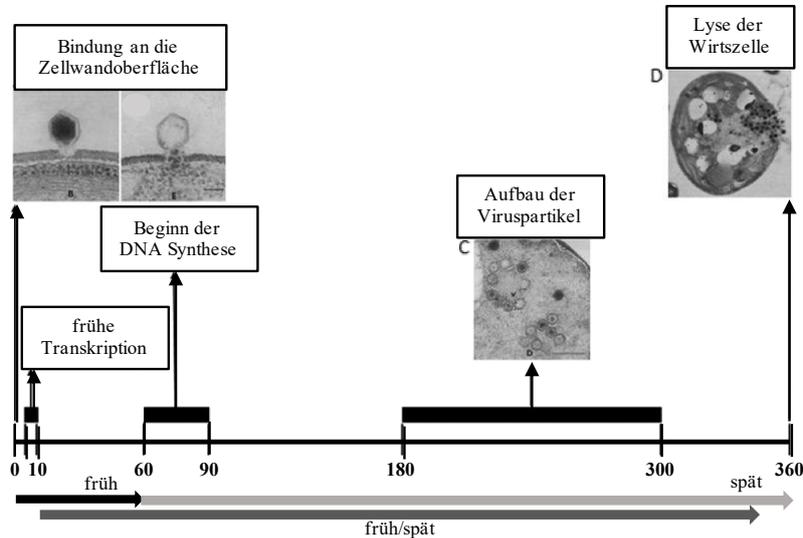
Das Genom von ATCV-1 ist linear, die Enden sind oben grün gekennzeichnet, L und R zeigen die Orientierung der ORFs im Virusgenom. Die ORFs sind nach Kategorien farblich markiert. Verändert nach [Fitzgerald *et al.*, 2007].

Das dsDNA-Genom von ATCV-1 ist 288.047 bp groß, linear und beinhaltet 860 offene Leserahmen (ORF), die auf Basis der Sequenzvergleiche und Vorhersagen über Proteindomänen für 329 hypothetische Proteine codieren können [Fitzgerald *et al.*, 2007]. Wie auch bei PBCV-1, können die ORF bestimmten Kategorien zugeordnet werden: DNA-Replikation; Rekombination und Reparatur; Integration und Transposition; Synthese, Modifikation und Degradation der Proteine; Manipulation des Lipidstoffwechsels; Signaling; Zellwand-Degradation; DNA-Restriktion und Modifikation; Nukleotidmetabolismus oder Transkription (Abbildung 1.4) [Fitzgerald *et al.*, 2007].

Das Genom der Chloroviren codiert für eine Vielfalt von Proteinen, welche die genannten Funktionen erfüllen und während des Infektionszyklus zu einem bestimmten Zeitpunkt transkribiert werden müssen. Je nachdem wann diese Gene transkribiert werden, können diese in frühe, früh/späte und späte Gene unterschieden werden. Alle Gene, die im Zuge der frühen Transkription entstehen und vor der DNA-Synthese exprimiert werden, werden als frühe Gene (*early genes*) bezeichnet. Die während der späten Transkription exprimierten Gene, werden als späte Gene (*late genes*) bezeichnet. Gene, deren Expression während dem gesamten Infektionszyklus stattfindet, bezeichnet man als früh/späte Gene (*early/late or intermediate genes*) (Abbildung 1.5 A). Die Gene dieser drei Expressionsgruppen werden entsprechend von frühen, früh/späten und späten Promotoren gesteuert [Kang *et al.*, 2005; Yanai-Balser *et al.*, 2010].

Die frühen Gene und deren Expression wurden von der Arbeitsgruppe Takashi Yamada genauer untersucht. Die Arbeitsgruppe beschrieb sehr frühe Gene – *immediate early genes*. Die *immediate early genes* werden sehr früh (5 – 10 min) nach dem Infektionsbeginn exprimiert. Die Arbeitsgruppe identifizierte zum ersten Mal mehrere ORFs von PBCV-1 als sehr frühe Gene und wies deren Expression nach. Sie untersuchten auch Promotoren dieser Gene und fanden Gemeinsamkeiten. Als *immediate early genes* wurden mehrere ORFs identifiziert: beispielweise mehrere Transkriptionsfaktoren (TFIIB – A107L, TF – A379L), Helikasen (A241L, A456L, A548L) und Nukleolin (A208L) [Kawasaki *et al.*, 2004].

A



B

früh				früh/spät	
DNA Replikation		Nukleotidmetabolismus		Integration und Transposition der DNA	
DNA Polymerase A185R	Z798L	Thioredoxin A427L	Z413L	GIY-YG Endonukleasen A134L, A287R,	Z271R, Z331R
Superfamily III Helicase A456R	Z066L	Proteinsynthese		A315L, A495R,	Z378L, Z387R,
		SKP1 Protein A039L	Z339L	A651L	Z490L u.v.m
		E3 Ubiquitin Ligase A481L	Z292L	Nukleotidmetabolismus	
Transkription		Zuckerstoffwechsel		Glutaredoxin A438L	Z134L, Z143L
TFIIB A107L	Z716R	mehrere Glycosyltransferasen A064L, A111R	Z120R, Z178L		
TFIID A552R	Z502R			spät	
RNase III A464R	Z063L			Strukturproteine	
PBCV-1	ATCV-1	PBCV-1	ATCV-1	Kapsidprotein A430L	Z280L
				PBCV-1	ATCV-1

Abbildung 1.5 Expression der frühen, früh/späten und späten Gene von Chloroviren am Beispiel des PBCV-1 Infektionszyklus.

A. Schematische Darstellung der zeitlichen Abfolge der Expression von frühen, früh/späten und späten Genen. Markiert sind die wichtigsten Phasen der Virusinfektion. Verändert nach [Yanai-Balser *et al.*, 2010]. **B.** Aufteilung ausgewählter ORFs von PBCV-1 nach deren Funktion und Expressionsphase. Die entsprechende ORFs aus dem ATCV-1 sind in den Tabellen auf der rechter Seite zu finden [Yanai-Balser *et al.*, 2010] und [Fitzgerald *et al.*, 2007].

Ein paar Jahre später erweiterte die Arbeitsgruppe des Nebraska Center for Virology diese Studien und untersuchte die mRNA-Expression aller ORFs von PBCV-1 mit Hilfe von Microarray-Analysen. Sie ordneten alle ORFs des PBCV-1 einer der drei Expressionsgruppen zu. In der frühen Phase der Genexpression (5 – 60 min nach Infektionsbeginn) werden vor allem ORFs exprimiert deren Funktionen mit DNA-Replikation (z. B.: A185R – δ DNA-Polymerase, A456L – Superfamily III Helicase), Transkription (z. B.: für Transkriptionsfaktoren: A107L – TFIIB, A552R – TFIID oder A464R – RNase III), Nukleotid Metabolismus (z. B. A427L – Thioredoxin), Protein-Synthese (z. B.: A039L – SKP1 Protein, A481L – E3-Ligase) oder Zuckerstoffwechsel (z. B.: mehrere Glycosyltransferase) zusammenhängen. Als früh/späte Gene wurden vor allem ORFs identifiziert, die früh im Infektionszyklus exprimiert werden, deren Expressionsrate aber während des gesamten Infektionszyklus hoch bleibt. Hier wurden ORFs gefunden, deren Funktion mit der DNA-Replikation oder dem Nukleotidmetabolismus (z. B. A438L – Glutaredoxin) zusammenhängt. Vor allem aber wurden ORFs gefunden, die für Proteine codieren, deren Funktion mit Integration und Transposition der DNA zusammenhängt (z. B. mehrere GIY-YIG Endonukleasen). Im letzten Schritt wurden Gene identifiziert, die spät exprimiert werden (60 min nach dem Infektionsbeginn) und überwiegend für strukturelle Proteine codieren (z. B.: A430L – Kapsidprotein) [Yanai-Balser *et al.*, 2010].

Entsprechende Analoga zu diesen ORFs sind auch in dem Genom von ATCV-1 zu finden. Durch Sequenzanalysen und Vergleiche mit den Datenbanken wurden einige ORFs von ATCV-1 identifiziert und deren Proteinfunktion wurde zumindest hypothetisch beschrieben. So finden sich auch im Genom von ATCV-1 ORFs, die u. a. für DNA-Polymerase (Z798L), Helicase (Z066L), RNase (Z063L) codieren aber auch für Proteine der Ubiquitin-Familie (SKP1-Protein Z339L, E3-Ligase Z292L), Transkriptionsfaktoren (Z289L, Z502L oder Z716R), Glutaredoxin (Z134L) und GIY-YIG Endonukleasen (Abbildung 1.5 B) [Fitzgerald *et al.*, 2007].

1.1.3 Wirt-Virus Wechselwirkungen

Die virale Vermehrung findet in der Wirtszelle statt und ist vom Wirt abhängig [Lwoff 1957]. Viren verändern dafür selektiv Funktionen der Wirtszellen. Dabei greifen virale Proteine in verschiedene zelluläre Signalwege und Prozesse ein wie z. B.: Genexpression, Proteinsynthese, Zellzyklus-Modulierung oder Apoptose [Masson *et al.*, 2014]. Die Anwesenheit von viralen Proteinen und DNA führt in den meisten Fällen zur Aktivierung der antiviralen Abwehrmechanismen des Wirtes. Diese resultieren im Ausschalten der infizierten Wirtszellen [Gaur *et al.*, 2014; Whitaker-Dowling *et al.*, 1999].

In der Tat erlangten Viren erst anhand der von ihnen bei Pflanzen verursachten Symptomen die Aufmerksamkeit der Wissenschaftler. Im Jahr 1885 identifizierte Adolf Mayer die Blattfleckenkrankheit der Tabakpflanze als kontagiös. Er isolierte den Saft einer mit Blattfleckenkrankheit infizierter Pflanze und steckte damit gesunde Pflanzen an. Zusammen mit Martinus Beijernick konnte er kleine Mikroben als Ursache beobachten, diese allerdings nicht identifizieren. Erst Jahre später konnte Martinus Beijernick die Infektion auf “*contagium vivum fluidum*” zurückführen, also eine “infektiöse lebende Flüssigkeit”, was die erste Phase der Beschreibung von Viren darstellte [Beijernick 1898]. Mittlerweile nach über 130 Jahren Forschung sind Viren ausführlich charakterisiert worden. Das Studium der Interaktionen zwischen Wirt und Virus wurde auf die molekulare Ebene erweitert und ist nicht nur auf die durch Viren hervorgerufene Krankheiten und deren Verbreitung begrenzt [Gaur *et al.*, 2014]. Die molekularen Aspekte der Virusinfektion beziehen sich nicht nur auf die Virusvermehrung und die Abwehrmechanismen des Wirtes, sondern auch auf den Weg zur Lyse der Zelle bei erfolgreicher Infektion (lytischer Zyklus) oder die Freisetzung der Viruspartikel ohne die Zelle des Wirtes zu zerstören (lysogener Zyklus). Hierbei spielen diverse Protein-Protein und Protein-DNA Interaktionen zwischen dem Wirt und dem Virus eine essenzielle Rolle.

Das Genom der NCLDV weist 180 bis zu 560 kb auf und codiert für mehrere Hundert Gene. Dennoch werden für die erfolgreiche Vermehrung der Viruspartikel einige Wirtsproteine benötigt [Iyer *et al.*, 2001]. Das beste Beispiel der Abhängigkeit der NCLDV Viren vom Wirt, ist die Transkription.

Das Genom von PBCV und ATCV Viren codiert für mehrere Proteine des Transkriptionsinitiations-Komplexes, für Helikasen, Topoisomerasen und anderen Proteine zur Freilegung der DNA vor der Replikation. Eine RNA-Polymerase ist allerdings im Genom dieser Viren nicht enthalten [van Etten 2003]. Somit muss die gesamte virale Transkription, u. a. die Komponenten des Transkriptionsinitiations-Komplexes und die Promotoren, an den Wirt angepasst sein.

Die Anpassung der Viren an den Wirt zeigt sich aber nicht nur im Imitieren oder Nutzen der Wirtsproteine durch das Virus. Ein gezielter Angriff und die Umprogrammierung der Zellvorgänge des Wirtes erfordert auch eine gewisse Anpassung an die gegebenen Mechanismen, um diese dann verändern zu können. Der Infektionszyklus der Chloroviren dauert 5 bis 8 Stunden. In dieser Zeit leitet das Virus nicht nur die Expression eigener Gene ein, sondern verteidigt sich erfolgreich gegenüber dem Abwehrmechanismus des Wirtes. Die Infektion mit PBCV-1 inhibiert ebenfalls schnell die Proteinsynthese des Wirtes [van Etten 2003]. Die Möglichkeiten zur Regulation der Wirtsproteine sind für das Virus begrenzt. Der Abbau oder die Inaktivierung der Abwehrproteine mit Hilfe posttranslationaler Modifikationen ist eine davon. Im Genom der NCLDV befinden sich mehrere Gene, die für Proteine des Ubiquitin-Systems codieren. PBCV-1 besitzt ORFs, die für zwei E3-Ligasen codieren, während ATCV-1 zusätzlich Sequenzen für ein eigenes virales Ubiquitin besitzt [Fitzgerald *et al.*, 2007; Yanai-Balser *et al.*, 2010].

1.2 Regulation der Genexpression

Das Genom von ATCV-1 codiert für 329 hypothetische Proteine, die unterschiedliche Funktionen erfüllen und während des Infektionszyklus zu einem bestimmten Zeitpunkt transkribiert werden müssen [Fitzgerald *et al.*, 2007]. Die dafür codierenden Gene werden von Promotoren gesteuert [Fitzgerald *et al.*, 2008]. Diese Promotoren werden ihrerseits von regulatorischen Proteinen beeinflusst. Diese stammen entweder vom Virus selbst oder sind schon vor der Virusinfektion in der Wirtszelle vorhanden. Vor allem sind frühe virale Promotoren nicht nur auf die RNA-Polymerase sondern auch auf die Wirts-Faktoren angewiesen, da zum Infektionsbeginn nur wenige viruseigene Proteine synthetisiert werden [van Etten 2003].

Phylogenetische Analysen zeigen, dass im Genom der NCLDV nicht nur Gene eukaryotischen Ursprungs enthalten sind, sondern auch welche, die aus Bakterien oder Bakteriophagen stammen [Iyer *et al.*, 2001]. Aus diesem Grund sind nicht nur die Mechanismen der Regulation der Genexpression des Wirtes für das Verständnis der viralen Genregulation von Bedeutung, sondern auch die der Prokaryonten. Es gibt insgesamt drei unterschiedliche Arten der Regulation der Transkriptionsinitiation: über Holoenzyme in Prokaryonten, über den Transkriptionsinitiations-Komplex in Eukaryonten und eine Mischung der beiden Arten, die in Archeen vorzufinden ist.

1.2.1 Bakterielle Transkriptionsinitiation

Die bakterielle Transkription wird relativ einfach reguliert. In Bakterien gibt es eine einzige DNA abhängige RNA-Polymerase, die zusammen mit dem Sigma-Faktor (σ -Faktor) einen Komplex bildet, das sog. Holoenzym [Browning *et al.*, 2004]. Der σ -Faktor hat drei Funktionen: die Erkennung des Promotors, die Positionierung der RNA-Polymerase an dem Promotor und die Entwindung der DNA-Helix nahe des Transkriptionsstarts (*transcript start site*, TSS, +1). Die Bakterien verfügen meistens über mehrere σ -Faktoren die unterschiedliche Promotoren binden können. Auf Basis der Sequenvergleiche werden die bakteriellen σ -Faktoren in zwei Familien gruppiert: die σ^{54} - und σ^{70} -Familie.

Während jedes Bakterium über ein oder mehrere Faktoren der σ^{70} -Familie verfügt, so sind die σ^{54} -Faktoren nicht essenziell. Vielmehr stellt die Gruppe der σ^{54} -Faktoren eine Anpassung an bestimmte Umweltbedingungen wie Stickstoffmangel, Hitzestress dar oder dient als generelle Stressantwort [Wosten 1998].

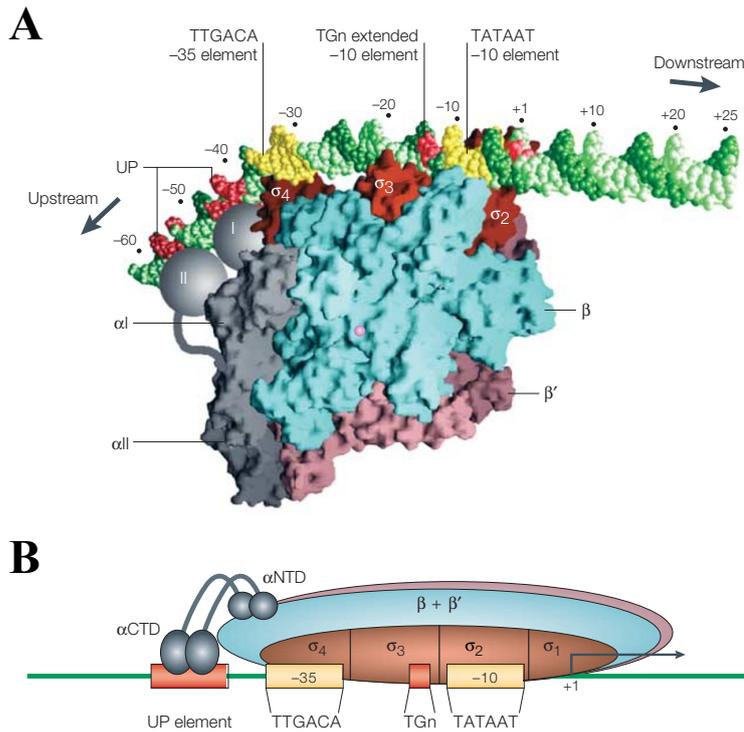


Abbildung 1.6 RNA-Polymerase Holoenzym und die Interaktionen am Promotor. Modell des Holoenzym basierend auf den kristallographischen Studien (**A**) und eine schematische Darstellung des Holoenzym am Promotor (**B**). Der DNA-Strang ist grün markiert. Die Consensus-Sequenzen des σ^{70} -Faktors sind gelb (-35- und -10-Sequenzen) und hellrot (TGn- und UP-Element) dargestellt. RNA-Polymerase mit ihren Untereinheiten ist blau und pink markiert, αNTD und αCTD grau, der σ -Faktor mit seinen Untereinheiten rot [Browning *et al.*, 2004].

Zusätzlich kann die Aktivität des Promotors durch Transkriptionsfaktoren verändert werden, indem die Holoenzym-Bindung am Promotor verhindert (Repressoren) oder verstärkt wird (Aktivatoren) [Babu 2003]. In *E. coli* wurden über 300 Gene identifiziert, die für Proteine mit einer Fähigkeit DNA zu binden codieren [Browning *et al.*, 2004]. Die Transkriptionsfaktoren werden in 11 Familien eingeteilt, je nachdem über welche Domänen sie verfügen [Babu 2003].

Der σ^{70} -Faktor ist der bekannteste und am besten untersuchte Faktor seiner Familie. Ein Promotor, der von einem σ -Faktor gebunden wird, muss über bestimmte Consensus-Sequenzen verfügen. So sollten die Bindungssequenzen für die σ -Untereinheiten an der richtigen Positionen vorhanden sein. Die zwei wichtigsten sind: -35- und -10-Promotorelemente. Das -35-Element mit der TTGACA-Sequenz befindet sich 35 Nukleotide stromaufwärts des Transkriptionstarts und wird von der σ_4 -Untereinheit gebunden. Das -10-Element mit der TATAAT-Sequenz (Pribnow-Box, 10 Nukleotide stromaufwärts des TSS) wird von der σ_2 -Untereinheit gebunden. Das TGn-Element wird von der σ_3 -Untereinheit des Faktor gebunden. Das sog. UP-Element wird von der terminalen Domäne der RNA-Polymerase gebunden, die C-terminale Domäne (α CTD) bindet den Promotor, während die N-terminale Domäne (α NTD) mit den β -Untereinheiten der RNA-Polymerase verbunden ist (Abbildung 1.6) [Browning *et al.*, 2004].

Interessanterweise verfügt auch *C. reinhardtii* über einen einzigen σ^{70} -like-Faktor für den das Gen *CrRpoD* codiert. Der σ^{70} -like-Faktor der Algen befindet sich in den Chloroplasten und ist in der Lage, *in vitro* die Transkription zu katalysieren, indem es sowohl die bakterielle RNA-Polymerase als auch die bakteriellen Promotoren mit -35- und -10-Elementen bindet [Bohne *et al.*, 2006].

1.2.2 Transkriptionsinitiation der Eukaryonten

Die Transkriptionsinitiation der Eukaryonten, zu denen *Chlorella*-Algen gehören, ist sehr komplex. Um die Transkriptionsmaschinerie aufsetzen zu können, muss erstmal die Histon-verpackte DNA entpackt werden. Der Transkriptionsinitiations-Komplex (basaler Transkriptionsapparat), bestehend aus der RNA-Polymerase und mehreren Transkriptionsfaktoren (*general transcription factors*, GTFs), bindet spezifisch an den Promotor und initiiert die Transkription. In Eukaryoten gibt es mehrere Tausend Transkriptionsfaktoren und fünf unterschiedliche RNA-Polymerasen [Haberle *et al.*, 2016].

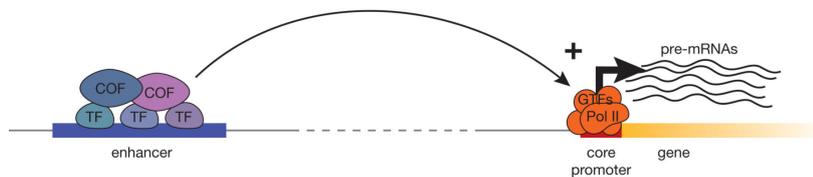
Die fünf eukaryotischen RNA-Polymerasen (I – V) haben unterschiedliche Funktionen. Die RNA-Polymerase I transkribiert ribosomale DNA [Engel *et al.*, 2013]. Die RNA-Polymerase III transkribiert kurze nicht-translatierbare Gene, die für tRNAs, 5S rRNAs und snRNA codieren [Han *et al.*, 2018]. Die zwei letzten RNA-Polymerasen (IV und V) sind ausschließlich in Pflanzen zu finden und dienen der Transkription von siRNAs [Zhou *et al.*, 2015]. Die RNA-Polymerase II ist für Transkription von Genen, die für Proteine codieren, verantwortlich und somit ein wichtiger Teil der Transkriptionsinitiationskontrolle. Die RNA-Polymerase II ist allerdings (wie auch die anderen Polymerasen) nicht in der Lage, den Transkriptionsstart oder den Promotorkern alleine zu finden [Haberle *et al.*, 2016].

Das wird mit Hilfe von verschiedenen Transkriptionsfaktoren bewerkstelligt. Diese binden gezielt und sehr spezifisch bestimmte Sequenzen des Promotors, die sich im u. a. Promotorkern (*core promoter*) befinden. Weiterhin gibt es allgemeine Transkriptionsfaktoren (*general transcription factors*), die in jedem Transkriptionsinitiation-Komplex vorkommen. Dazu gehören die 6 Transkriptionsfaktoren: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF und TFIIH, die aus mehreren Proteinen bestehen können und die schrittweise den Pre-Initiationskomplex mit der noch inaktiven RNA-Polymerase II bilden (*pre-initiation complex*, PIC) [Haberle *et al.*, 2016]. Die Bindung der GTFs wie auch weiterer Transkriptionsfaktoren an den Promotor ist essenziell für die Regulation der Initiation [Lewin 2002]. Die Stärke der Genexpression wird zusätzlich durch die *Enhancer* und *Silencer* beeinflusst. Als *Enhancer* wird ein Bereich der DNA bezeichnet, der spezielle Transkriptionsfaktoren rekrutiert und stromaufwärts (*upstream*) des Promotorkerns liegt. Durch die vermittelte Bindung an Co-Faktoren und Mediatoren wird die Aktivität der RNA-Polymerase und die Genexpression beeinflusst (Abbildung 1.7) [Krishnamurthy *et al.*, 2009].

Obwohl die Initiation der Transkription ein komplexer Prozess ist, welcher die schrittweise Bindung vieler Transkriptionsfaktoren umfasst, sind primär die Promotoren für die strikte Regulation der Genexpression verantwortlich. Je nachdem welche der Consensus-Sequenzen im Promotor vorhanden sind, erfolgt die Bindung entsprechender Transkriptionsfaktoren. Eukaryotische Promotoren bestehen nicht nur aus dem Promotorkern, der das Minimum der

DNA-Sequenz darstellt, die zur Aktivierung der Transkription notwendig ist. Weiter stromaufwärts (ca. 200 bp) befindet sich das sog. cis-Element (*cis-regulatory element*, CRE, *Enhancer* oder *Silencer*) [Graw 2006; Haberle *et al.*, 2016; Krishnamurthy *et al.*, 2009]. Während am Promotorkern stets die gleichen, allgemeinen Transkriptionsfaktoren binden können, binden an dem regulatorischen cis-Element spezifische Transkriptionsfaktoren (Abbildung 1.8 A) [Butler 2002; Lewin 2002].

A



B

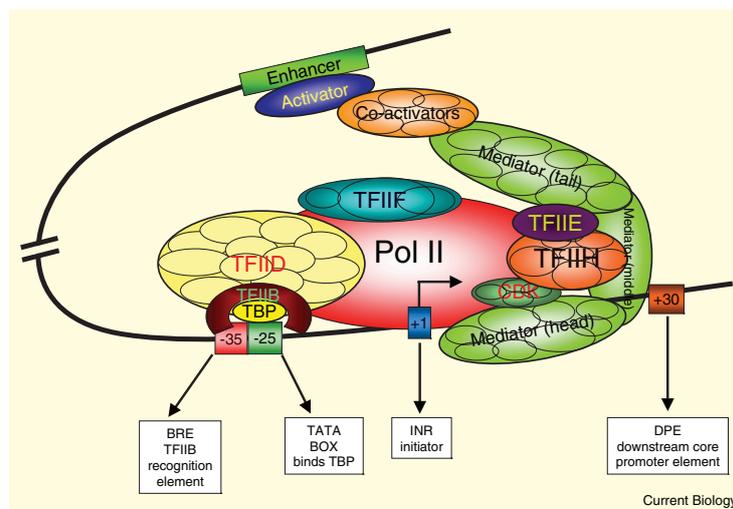


Abbildung 1.7 Pre-Initiationskomplex in Eukaryonten.

A. Der eukaryotische Promotor, bestehend aus dem cis-Element (*Enhancer*) und Promotorkern (*core promoter*) [Haberle *et al.*, 2016]. **B.** Die Consensus-Sequenzen des Promotorkerns sind markiert: Position -35 (BRE-Element für die Bindung an TFIIB), -25 (TATA-Box, Bindung von TBP), +1 (Transkriptionsstart) und +30 (DPE-Element). Die RNA-Polymerase (rot) wird von mehreren GTFs gebunden: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF und TFIIH. Die Bildung von Pre-Initiationskomplex wird in Metazoen durch *Enhancer* (cis-Elemente) unterstützt (entspricht der *upstream* Aktivationssequenz der Hefen). Diese rekrutieren Co-Aktivatoren und Mediatoren, welche die RNA-Polymerase direkt binden können [Krishnamurthy *et al.*, 2009].

1.2.2.1 Basale Transkriptionsfaktoren am Promotorkern

Zu den basalen Transkriptionsfaktoren gehören Faktoren, die an der Bildung des basalen Transkriptionsapparates beteiligt sind: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF und TFIIH. Vor allem sind die TFIIB und TFIID für ihre spezielle Bindung am Promotor bekannt (Abbildung 1.8 A und B). Der Transkriptionsfaktor TFIID besteht aus mehreren Untereinheiten: dem TATA-Bindeprotein (TBP) und 14 TBP assoziierten Faktoren (*TBP-associated factors*, TAF1 – TAF14).

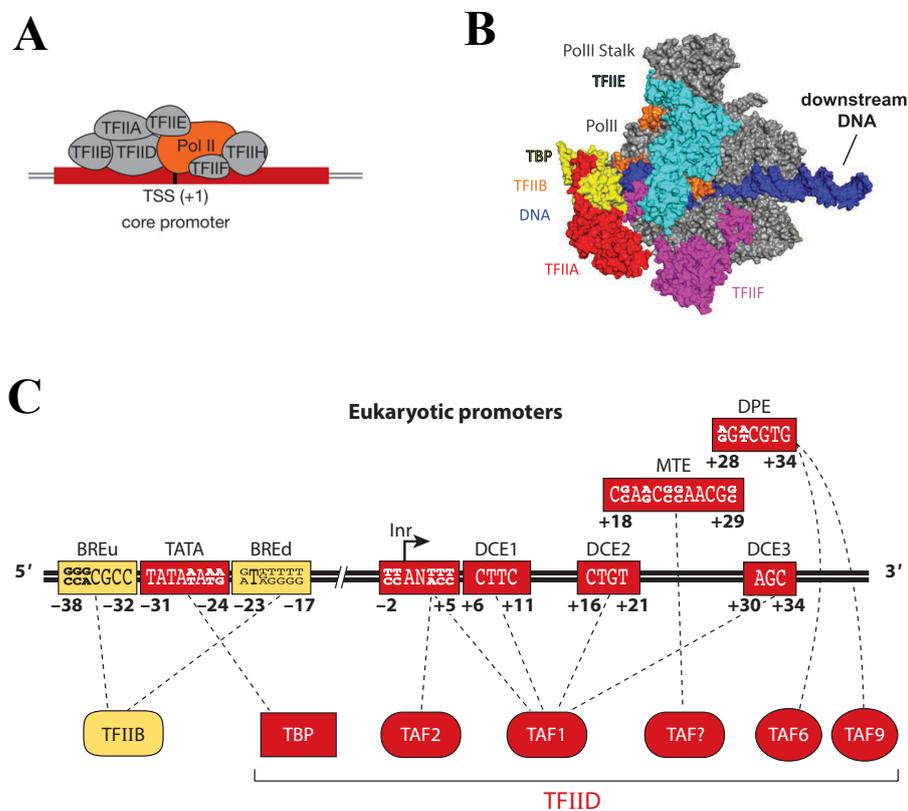


Abbildung 1.8 Eukaryotischer Promotorkern mit allen vorkommenden Consensus-Sequenzen.

A. Schematische Darstellung des Pre-Initiationskomplexes am Promotorkern [Haberbale *et al.*, 2016]. **B.** Modell des Pre-Initiationskomplexes am Promotorkern basierend auf den kristallographischen Studien [He *et al.*, 2016; Schier *et al.*, 2020]. **C.** Promotorkern mit markierten Consensus-Sequenzen für die Bindung von TFIIB (gelb) und TFIID (rot): Initiator-Element (Inr), *Downstream Promoter Element* – DPE, *Motiv Ten Element* – MTE, *Downstream Core Element* (DCE) und BRE-Consensus-Sequenzen [Decker *et al.*, 2013].

Das TATA-Bindeprotein TBP, bindet die Consensus-Sequenz $TATA_{T}^{AA}A_{TG}^{AA}$, die sog. TATA-Box. Die TATA-Box ist das bekannteste und zuerst entdeckte Element des Promotorkerns. Die Untereinheiten des Transkriptionsfaktors binden weitere Consensus-Sequenzen des Promotorkerns: das Initiator-Element (Inr), *Downstream Promoter Element* – DPE, *Motiv Ten Element* – MTE, sowie die DCE-Elemente (*Downstream Core Element* (Abbildung 1.8 B, rot markiert)). Die Consensus-Sequenzen (*TFIIB Recognition Element*, TRE oder BRE genannt) werden von dem Transkriptionsfaktor IIB gebunden und befinden sich auf den beiden Seiten der TATA-Box (Abbildung 1.8 C, gelb markiert) [Decker *et al.*, 2013; Krishnamurthy *et al.*, 2009]. Diese bestimmten Consensus-Sequenzen sind nicht immer gleichzeitig in jedem Promotor vorhanden. Die TATA-Box z. B. ist in den meisten eukaryotischen Promotoren vorhanden und tritt zusammen mit dem Inr-Element auf. Humane Promotoren mit dem BRE-Element andererseits, enthalten überwiegend keine TATA-Box [Gershenson *et al.*, 2004].

1.2.2.2 Transkriptionsfaktoren

Die spezifischen Transkriptionsfaktoren binden das jeweilige cis-Element und wirken auf den basalen Transkriptionsapparat. Die Bindung an den basalen Transkriptionsapparat ist entweder direkt oder wird von weiteren Co-Faktoren und Mediatoren vermittelt. Über diese kann auch die Regulation von Transkriptionsfaktoren erfolgen [Krishnamurthy *et al.*, 2009]. Die spezifischen Transkriptionsfaktoren sind eine sehr große Proteingruppe und werden nach ihren charakteristischen DNA-bindenden Domänen aufgeteilt und benannt. Je nach der enthaltenen Domäne, wurden im Jahre 2006 fünf Superfamilien von Transkriptionsfaktoren unterschieden: Helix-Turn-Helix, Zinkfinger, Homöodomäne, Leucin-Zipper und Helix-Loop-Helix [Graw 2006]. Mittlerweile wurden die Familiengruppen erweitert und unterteilt. Um die immense Vielfalt zu beschreiben und zu katalogisieren wurden Datenbanken erstellt, wie z. B. PlantRegMap, das sich auf die pflanzlichen Transkriptionsfaktoren spezialisiert hat [Jin *et al.*, 2016; Tian *et al.*, 2019]. Die Mitarbeiter des Center for Bioinformatics der Peking University sammelten Daten zu 58 unterschiedlichen Familien der Transkriptionsfaktoren von 165 Spezies. Bei höheren Pflanzen ist die

Anzahl der identifizierter TFs recht groß: bei *A. thaliana* wurden rund 2296 TFs identifiziert und in 58 Familien unterteilt. *Nicotiana tabacum* verfügt sogar über 5176 TFs aus 57 unterschiedlichen Familien. Bei einzelligen Algen wurden deutlich weniger Transkriptionsfaktoren gefunden. *C. reinhardtii* besitzt 230 TFs, eingeteilt in 29 Familien [Riano-Pachon *et al.*, 2008]. *C. variabilis*, die nahe Verwandte des ATCV-1 Wirtes besitzt 163 TFs (28 Familien) (PlantRegMap, Juli 2020). Im Vergleich dazu gibt es über 1600 humane Transkriptionsfaktoren [Lambert *et al.*, 2018].

Leucin-Zipper Transkriptionsfaktoren der Pflanzen

Die Familie der Leucin-Zipper Transkriptionsfaktoren (*basic Leucine Zipper*, bZIP) wurde schon 1988 entdeckt [Landschulz *et al.*, 1988]. Die Faktoren besitzen die sog. bZIP-Domäne, diese besteht aus einer basischen Region und einem Leucin Zipper Motiv. Der basische Region ist ca. 16 Aminosäuren lang und ermöglicht die Bindung an die DNA. Der Leucin-Zipper ist ein α -helikales Motiv mit mindestens 4 Leucinen, die sich alle 7 Aminosäuren wiederholen. Mit Hilfe des Leucin-Zipper ist ein Faktor in der Lage, Dimere zu bilden und sich im Form eines Reißverschlusses (*zipper*) um die DNA zu legen (Abbildung 1.9 A und B). Neben der bZIP-Domäne besitzen alle Transkriptionsfaktoren eine Aktivator-domäne [Ellenberger 1994; Jakoby *et al.*, 2002].

Obwohl alle bZIP-Faktoren eine bZIP-Domäne enthalten, unterscheiden sie sich voneinander und wurden anhand ihrer basischen Region, der Position von der bZIP-Domäne und weiteren Domänen und Motiven untergliedert. In *Arabidopsis* gibt es demnach 13 Gruppen von bZIP-Transkriptionsfaktoren. Darunter befindet sich u. a. die Gruppe der bekannten pflanzlichen TGA-Faktoren (*TGACG motif binding factor*, TGA), die an der Abwehr von Pathogenen beteiligt sind. Eine weitere Gruppe stellen die G-Box bindenden Faktoren dar (*G-box binding factor*, GBF) (Abbildung 1.9 C) [Dröge-Laser *et al.*, 2018; Jakoby *et al.*, 2002]. Anhand der Sequenzvergleiche konnten in Algen ebenfalls Transkriptionsfaktoren mit der bZIP-Domäne identifiziert werden. In *C. reinhardtii* konnten 19 Proteine und in *C. variabilis* 13 Proteine mit der bZIP-Domäne gefunden werden [Tian *et al.*, 2019] (PlantRegMap, Juli 2020).

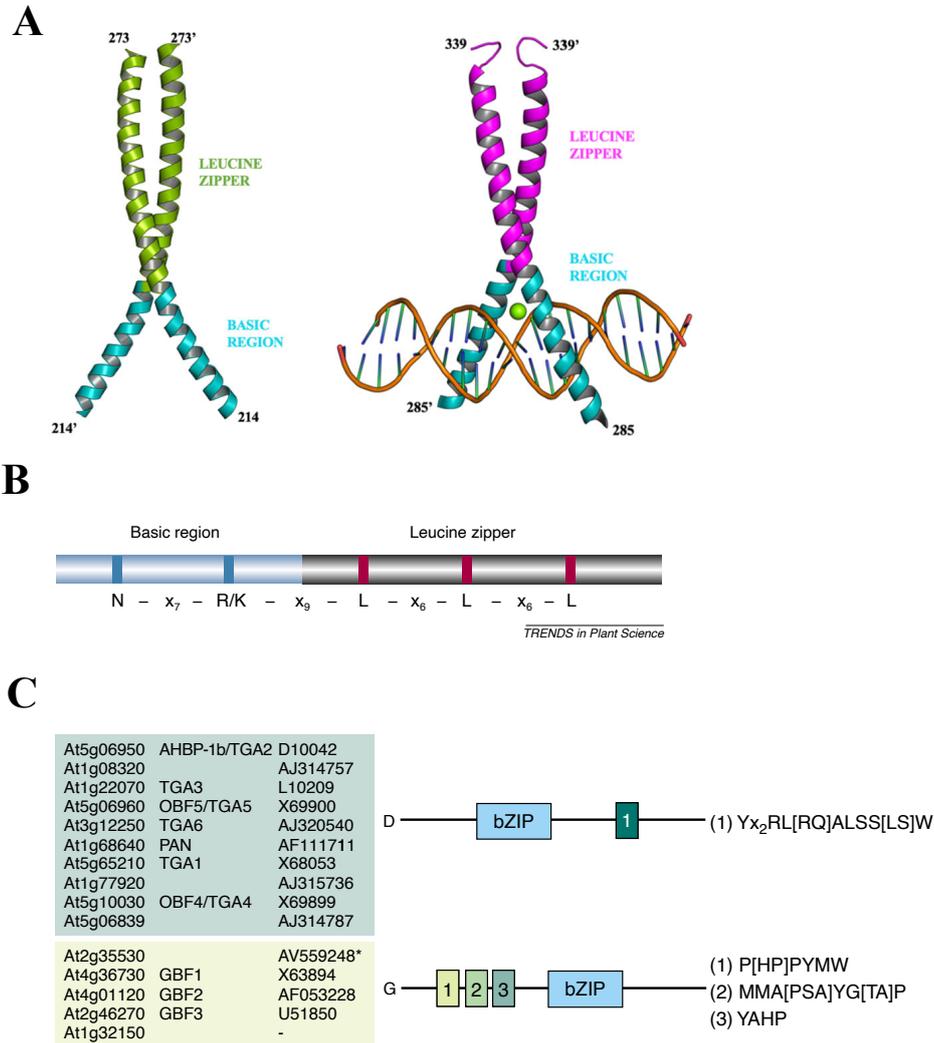


Abbildung 1.9 Die Struktur von bZIP-Transkriptionsfaktoren.

A. Schematische Darstellung der dreidimensionalen Struktur der bZIP-Domäne am Beispiel des Transkriptionsfaktors CREB3 und der DNA-Bindung [Sabaratnam *et al.*, 2019]. **B.** Schematische Darstellung der bZIP-Domäne. Die basische Region ist blau markiert, der Leucin-Zipper grau. Die konservierten Aminosäuren sind blau und rot markiert [Jakoby *et al.*, 2002]. **C.** Ausgewählte Klassen der bZIP-Transkriptionsfaktoren mit den konservierten Aminosäure-Sequenzen: TGA-Faktoren (grün, oben) und GBF (hellgrün, unten). Die Position der bZIP-Domäne ist blau markiert [Jakoby *et al.*, 2002].

Pflanzliche bZIP-Faktoren binden bevorzugt an cis-Elemente mit der ACGT-Sequenz im Kern [Armstrong *et al.*, 1992]. Die spezifische Bindung zwischen den unterschiedlichen bZIP-Proteinfamilien wird von den umliegenden Sequenzen des ACGT-Motivs bestimmt. Unter den bekannten Sequenzen, die von

bZIP-Faktoren gebunden werden können, gibt es die A-Box (TACGTA), die C-Box (GACGTC) und die G-Box (CACGTG) [Franco-Zorrilla *et al.*, 2014; Izawa *et al.*, 1993]. Allerdings gibt es bei den bZIP-Faktoren weitere Consensus-Sequenzen die nachweislich gebunden werden können. TGA-Faktoren binden bevorzugt das *as1*-Element (*activation sequence-1*), das aus zwei TGACG-Sequenzen besteht [Katagiri *et al.*, 1989]. Sowohl die GBF als auch einer der TGA-Faktoren (TGA1) aus *Arabidopsis* sind in der Lage, zusätzlich das Hex-Motiv TGACGTGG zu binden [Schindler *et al.*, 1992].

1.2.3 Promotor-gesteuerte Transkriptionsregulation bei Chloroviren

Die virale Transkription wird mit Hilfe der Transkriptionsmaschinerie des Wirtes bewerkstelligt. Die im Genom von ATCV-1 enthaltenen frühen Gene codieren für Proteine, die Komponenten dieses Apparates imitieren [Fitzgerald *et al.*, 2007]. Dadurch ist eine gezielte Transkriptionskontrolle theoretisch möglich. Die im Genom enthaltenen Gene müssen aber schon reguliert werden, bevor die einzelnen viralen Transkriptionsfaktoren exprimiert werden (Abschnitt 1.1.2). Die Transkription der viralen Gene findet temporär statt [Kawasaki *et al.*, 2004; Yanai-Balser *et al.*, 2010]. Der Expressionszeitpunkt der frühen, späten und früh/späten Gene wird durch ihre Promotoren bestimmt, weswegen ihre Promotoren sich voneinander unterscheiden müssen [Oliveira *et al.*, 2017].

Über die Promotoren der Chloroviren ist noch nicht viel bekannt. Die ersten umfangreicheren Untersuchungen zu den Promotoren der Chloroviren wurden von Kawasaki und Mitarbeitern durchgeführt. Sie identifizierten nicht nur sehr frühe virale Gene von PBCV-1, sondern fanden auch konservierte Sequenzen innerhalb der Promotoren dieser Gene. In fast allen sehr frühen Genen treten zwei Sequenzen auf: eine TATA-Box mit der Sequenz TATAAAT und die ATGACAA-Sequenz (Abbildung 1.10, oben links) [Kawasaki *et al.*, 2004].

Im Jahre 2008 identifizierte die Arbeitsgruppe von James van Etten mehrere Consensus-Sequenzen, die innerhalb der Promotoren von drei Spezies der

Chloroviren auftreten: ARNTTAANA, AATGACA und GTNGATAYR. Die untersuchten Sequenzen befinden sich 150 bis 50 bp vor dem Transkriptionsstart. Die Untersuchungen innerhalb eines Virus zeigte mehrere konservierte Nukleotide. Die $AA_T^C TTAANA$ -Sequenz ist in der Promotorregion von 91 der 366 untersuchten Gene zu finden. Die $GT_T^C GATA_T^C A^G$ -Sequenz wurde bei 49 der 366 PBCV-1 Gene gefunden. Lediglich die AATGACA-Sequenz, die auch innerhalb der unterschiedlichen Spezies stark konserviert und bei 60 PBCV-1 Genen vorhanden ist, konnte eindeutig der Gruppe früher Promotoren zugeordnet werden (Abbildung 1.10 links) [Fitzgerald *et al.*, 2008].

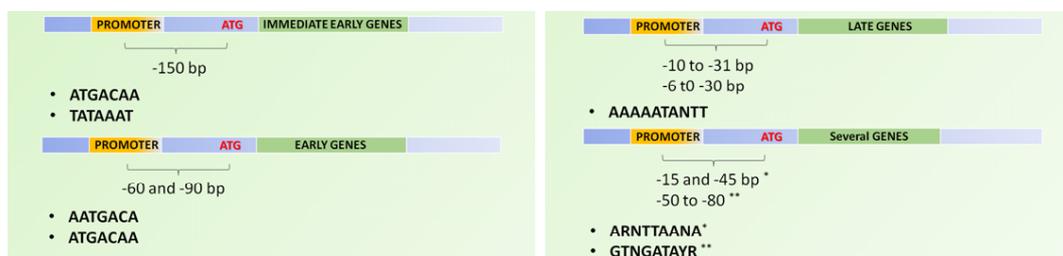


Abbildung 1.10 Aufbau der Promotoren von *Phycodnaviridae*. Virale Consensus-Sequenzen und ihre Aufteilung auf die frühe, späte und früh/späte Gene bei Chloroviren [Oliveira *et al.*, 2017].

Die Arbeitsgruppe von James van Etten startete anschließend noch einen Versuch und ordnete alle PBCV-1 Gene einer der Expressionsgruppen zu. Die Suche nach Consensus-Sequenzen in Promotorregionen war nur bei den frühen Promotoren erfolgreich. So wurde die AATGACA-Sequenz erneut identifiziert, sowie ihre leicht veränderte Variante: ATGACAA. Diese Sequenzen wurden bei 50 PBCV-1 frühen und früh/späten Genen gefunden (Abbildung 1.10) [Yanai-Balser *et al.*, 2010]. Die einzige Sequenz die in Zusammenhang mit späten Genen gebracht wurde, ist die im Promotor des *kcv*-Gens des PBCV-1 auftretende AAAAATAATT-Sequenz. Das *kcv*-Gen codiert für einen K^+ -Kanal und ist in 17 untersuchten Spezies der Chloroviren enthalten. Die AAAAATAATT-Sequenz trat unverändert in den Promotorregionen aller dieser Chlorovirus-Spezies auf [Kang *et al.*, 2004].

1.3 Ubiquitin-System

Um die Abwehrmechanismen des Wirtes zu umgehen und um die Proteinfunktionen mancher wirtseigener Proteine zu verändern, haben Viren viele Strategien entwickelt. Die Manipulation des Proteinabbaus und der Proteinregulation mit Hilfe von Ubiquitin und dem damit verbundenen Ubiquitin-System gehört zu den erfolgreichsten Anpassungsstrategien, welche die virale Replikation unterstützen [Isaacson *et al.*, 2009].

Ubiquitin wurde schon im Jahre 1975 von Gideon Goldstein entdeckt und als *ubiquitous immunopoietic polypeptide* beschrieben, also ein Protein, das ubiquitär in allen lebenden Zellen vorkommt [Goldstein *et al.*, 1975]. Ab 1980 beschäftigten sich vor allem Avram Hershko, Aaron Ciechanover und Irwin Rose mit der ATP-abhängigen Proteindegradation und bekamen im Jahre 2004 einen Nobelpreis in Chemie für die Entdeckung der Ubiquitin-vermittelten Proteindegradation [Ciechanover *et al.*, 1980; Hershko *et al.*, 1980]. Im Jahre 1983 isolierte die Arbeitsgruppe um Avram Hershko mehrere Komponenten des Ubiquitin-Systems. So wurden drei Enzyme, genannt E1, E2 und E3 entdeckt, die für die Aktivierung und Transport des Ubiquitins bis zum Zielprotein notwendig sind [Ciechanover *et al.*, 1982; Hershko *et al.*, 1983]. Die Markierung eines Proteins mit Ubiquitin resultiert meistens in dessen Abbau am Proteasom [Baumeister *et al.*, 1998; Voges *et al.*, 1999].

In den letzten 40 Jahren beschäftigten sich sehr viele Arbeitsgruppen mit dem Ubiquitin-System. Neben dem primären Ziel der Ubiquitinierung, dem Abbau am Proteasom, wurden unterschiedliche Arten der Ubiquitinierung und dadurch resultierend unterschiedliche regulatorische Funktionen der Ubiquitinierung entdeckt [Hicke 2001]. Zudem wurde die Rolle des Ubiquitin-Systems bei der Regulation der Autophagie, Transkription, DNA-Reparatur, Endocytose, Virusbefall und vielen anderen Vorgängen beschrieben, die entscheidend für das Fortbestehen der Zelle sind [Baumeister *et al.*, 1998; Geng *et al.*, 2012; Isaacson *et al.*, 2009; Kampen *et al.*, 1992; Varshavsky 2006].

1.3.1 Konjugation von Ubiquitin an Proteine

Die kovalente Bindung von Ubiquitin an das Zielprotein (Substrat) bedarf mehrerer Reaktionen (Abbildung 1.11). In ersten Schritt muss das Ubiquitin aktiviert werden. Diese Reaktion ist ATP-abhängig und wird von einem Ubiquitinaktivierenden Enzym (E1) katalysiert [Ciechanover *et al.*, 1980; Liu *et al.*, 2020]. Zwischen dem Cystein im aktiven Zentrum des E1-Enzyms und der Carboxylgruppe des C-terminalen Glycins von Ubiquitin entsteht eine Thioesterbindung. In zweiten Schritt wird das so gebundene Ubiquitin durch Transesterifizierung vom E1-Enzym auf ein Cystein des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (E2) übertragen. Im dritten Schritt wird das an das E2-Enzym gebundene Ubiquitin zum Ubiquitin-ligierenden Enzym (E3-Ligase, E3) transportiert und auf das Zielprotein (Substrat) übertragen [Hershko *et al.*, 1983; Liu *et al.*, 2020]. Die Übertragung des Ubiquitins auf das Substrat wird vom E3-Enzym vermittelt und kann auf zwei Weisen geschehen. Das Ubiquitin kann direkt vom E2-Enzym auf das Zielprotein übertragen werden. Alternativ wird das Ubiquitin zunächst vom E3-Enzym gebunden und anschließend auf das Substrat übertragen. In beiden Fällen entsteht eine Isopeptid-Bindung zwischen dem C-terminalen Glycin (Gly76) und der ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes am Zielprotein. Für das Spalten dieser Isopeptid-Bindung wird, falls erforderlich, eine weitere Enzymgruppe benötigt – die Deubiquitinierenden Enzyme (DUB) [Liu *et al.*, 2020; Pickart *et al.*, 2004; Wilkinson 1997].

Das Resultat dieser Enzymkaskade ist eine Monoubiquitinierung des Zielproteins. Durchläuft ein Protein mehrmals die Enzymkaskade hat das eine Multi- und Polyubiquitinierung zur Folge (Abbildung 1.11 unten rechts). Die Position des Lysins, über welches die Verlinkung der Ubiquitin-Moleküle erfolgt, spielt zusammen mit der Art der Ubiquitinierung eine entscheidende Rolle. So wurde relativ früh in der Geschichte entdeckt, dass eine Polyubiquitinierung am Lys48 eine Degradation des Proteins am Proteasom zur Folge hat [Chau *et al.*, 1989]. Eine Monoubiquitinierung sowie die Multiubiquitinierung spielen bei der Proteinregulation eine Rolle und sind u. a. für die Histonregulation, die Endozytose oder für die Freisetzung der Viruspartikel entscheidend [Hicke 2001].

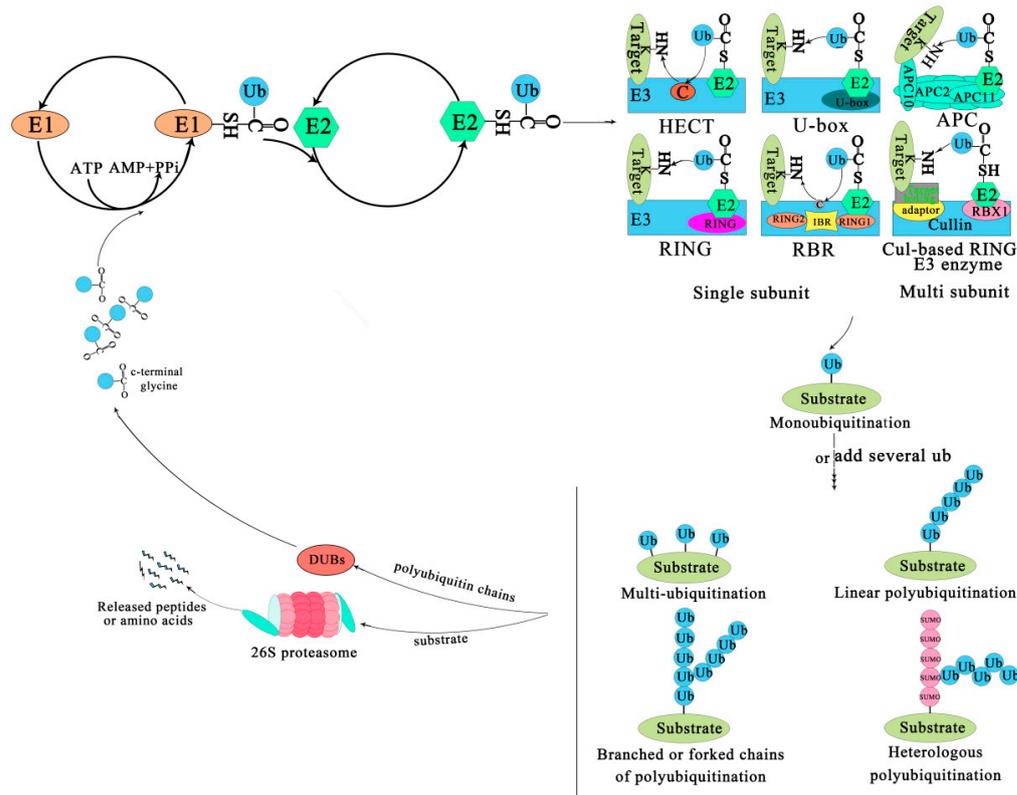


Abbildung 1.11 Schematische Darstellung des Ubiquitin-Systems.

Für die Ubiquitinierung eines Substrates werden drei Enzyme benötigt: ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1), ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2) und ein Ubiquitin-ligierendes Enzym (E3). Die Deubiquitinierenden Enzyme (DUB) spalten die Isopeptid-Bindung zwischen dem Ubiquitin und dem Substrat. Die spezifische Bindung am Substrat wird über die E3-Ligasen vermittelt. Die Familie der E3-Ligasen kann in: U-box, RING, HECT und Cullin-RING Ligasen (CRLs) sowie deren abgewandte Formen RBR- und APC-Ligasen unterteilt werden. Einmaliges Durchlaufen des Zyklus resultiert in einer Monoubiquitinierung, mehrfaches in Poly- oder Multitubiquitinierung. Das Ubiquitin kann über jedes funktionelle Lysin angeheftet werden und sogar mit SUMO-Proteinen kombiniert werden. Eine Polyubiquitinierung führt meistens zum Abbau am Proteasom. Mono- und Multiubiquitinierung haben regulatorische Funktionen [Liu *et al.*, 2020].

1.3.1.1 Ubiquitin und Ubiquitin-ähnliche Proteine

Ubiquitin (Ub) ist ein kleines ubiquitär vorkommendes Protein mit einem Molekulargewicht von 8,5 kDa, das aus 76 Aminosäuren besteht [Goldstein *et al.*, 1975]. Das Protein besteht aus 5 β -Faltblätter, einer 3,5 α -Helix sowie einer kurzen 3_{10} -Helix (Abbildung 1.12 A). Der C-Terminus des Proteins reicht als bewegliches Ende aus dem Molekül heraus. Über das Glycin an der Positi-

on 76 wird das Ubiquitin an die Zielproteine gebunden. Das N-terminale Ende sowie die sieben funktionellen Lysin-Reste dienen der Bindung von Ubiquitin-Molekülen aneinander (Abbildung 1.12 B und C). Die hydrophoben Aminosäuren an den Positionen 8, 44 und 70 (Leu8, Ile44, Val70) werden zur Bindung von Ubiquitin-bindenden Domänen (*ubiquitin-binding domain*, UBD) benötigt [Kampen *et al.*, 1992; Pickart *et al.*, 2004].

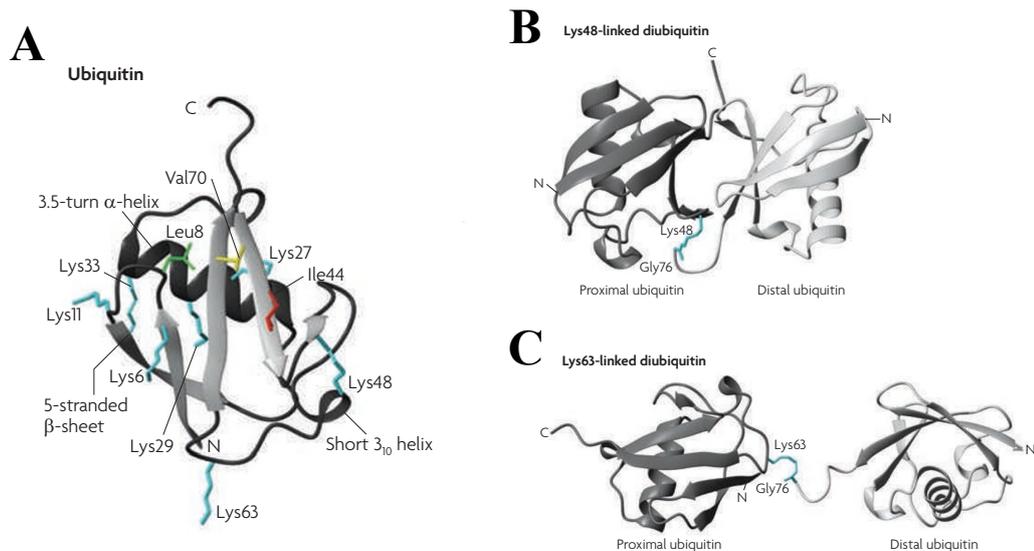


Abbildung 1.12 Ubiquitin.

A. Struktur des Ubiquitins. Ubiquitin enthält 5 β -Faltblätter und eine 3,5 α -Helix sowie eine kurze 3_{10} -Helix. Die wichtigsten funktionellen Aminosäuren sind markiert. Sieben funktionelle Lysine (blau), die zur Bildung von Ubiquitin-Ketten dienen, sind markiert. Die hydrophobe Aminosäuren: Leu8 (grün), Ile44 (rot) und Val70 (gelb), die zur Bindung von Ubiquitin-bindenden Domänen benötigt. Das funktionelle Glycin (Gly76) befindet sich am C-Terminus. Die Isopeptid-Bindungen zwischen zwei Ubiquitinen sind für die zwei häufigsten Ubiquitinierungsformen dargestellt: über das Lysin an der Position 48 (Lys48, **B.**) und über das Lysin an der Position 63 (Lys63, **C.**). Die Isopeptid-Bindung ist blau markiert. Verändert nach [Dikic *et al.*, 2009].

Ubiquitin ist in allen eukaryotischen Zellen vorhanden und stark konserviert. Das Ubiquitin von *C. reinhardtii* unterscheidet sich in nur einer Aminosäure von dem Ubiquitin höherer Pflanzen. Das Ubiquitin aus tierischen Zellen oder aus Hefe weicht in nur drei Aminosäuren von dem Ubiquitin der Algen ab [Kampen *et al.*, 1995]. Manche prokaryotische Zellen verfügen über strukturell ähnliche Proteine, wie z. B. ThiS (*Thiamine biosynthesis protein ThiS*).

ThiS ist eigentlich an der Biosynthese von Thiamin beteiligt und seine Sequenz stimmt in nur 14 % mit der Ubiquitin-Sequenz überein [Nicholson *et al.*, 2001].

Für das Ubiquitin codieren meistens mehrere Gene. In tierischen, sowie in Hefezellen (*S. cerevisiae*) codieren jeweils 4 Gene in zwei Formen für das Protein. Die erste Variante codiert für ein einzelnes Ubiquitin zusammen mit einem ribosomalen Protein am C-Terminus. Die zweite Form des Gens besteht aus mehreren Ubiquitin-Sequenzen (Polyubiquitin) [Kimura *et al.*, 2010; Oezkaynak *et al.*, 1984]. Die zwei Formen der Ubiquitin-Gene kann man auch in Pflanzen beobachten. Im Genom von *A. thaliana* befinden sich Sequenzen für mindestens 12 Ubiquitin-Gene [Callis 2014; Callis *et al.*, 1995]. In *C. reinhardtii* wurden bis jetzt zwei Ubiquitin-Gene identifiziert [Kampen *et al.*, 1995]. In viralen Genomen sind auch vereinzelt Gene zu finden, die für ein Ubiquitin codieren, wie z. B. *v-ubi* bei AcMNPV-Virus (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) [Guarino 1990].

Neben Ubiquitin gibt es weitere Proteine, die als Signalmoleküle bei posttranslationalen Modifikationen verwendet werden. Die wichtigsten davon sind SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) und Nedd8 (*neuronal-precursor-cell-expressed developmentally downregulated protein-8*) [Welchman *et al.*, 2005]. Posttranslationale Modifikationen mit SUMO benötigen entsprechende SUMO-Enzymkaskaden und werden wie Ubiquitin an das Zielprotein kovalent gebunden [Colby *et al.*, 2006]. Die Proteine sind ebenfalls weit verbreitet und in Protozoen, Metazoen, Pilzen und Pflanzen zu finden [Melchior 2000].

1.3.1.2 E3-Ligasen

Die spezifische Bindung zwischen dem Zielprotein und dem Ubiquitin wird von den E3-Ligasen vermittelt. Die Familie der E3-Ligasen ist eine große und diverse Gruppe von Proteinen, die zunächst in zwei Klassen unterteilt wurden: RING (*really interesting new gene*) und HECT (*homologous to the E6AP carboxyl terminus*). Die RING E3-Ligasen wurden anhand ihrer Domänen charakterisiert: RING und U-Box-Domänen. Diese Ligasen binden das Substrat und vermitteln die Übertragung von Ubiquitin, ohne selbst Ubiquitin zu binden. Im Gegensatz dazu bindet die Gruppe der HECT E3-Ligasen das Ubiquitin, bevor

es an das Substrat überreicht wird [Pickart 2001]. Die RING E3-Ligasen stellen die größte Gruppe der Ubiquitin-Ligasen dar und zählen über 600 Proteine. Sie agieren allein oder als ein Multi-Proteinkomplex mit Cullinen (Cullin-RING Ligasen, CRL). Mittlerweile wurden weitere Klassen der E3-Ligasen beschrieben, die RBR E3-Ligasen (RING-IBR-RING) stellen eine getrennte Familie der Ligasen dar, welche die Eigenschaften der beiden ursprünglichen Klassen vereint. Mit Hilfe des APC-Komplex (*anaphase-promoting complex*) ist eine Übertragung von Ubiquitin auf den Substrat ebenfalls möglich (Abbildung 1.11 oben rechts) [Liu *et al.*, 2020; Zheng *et al.*, 2017].

RING E3-Ligasen

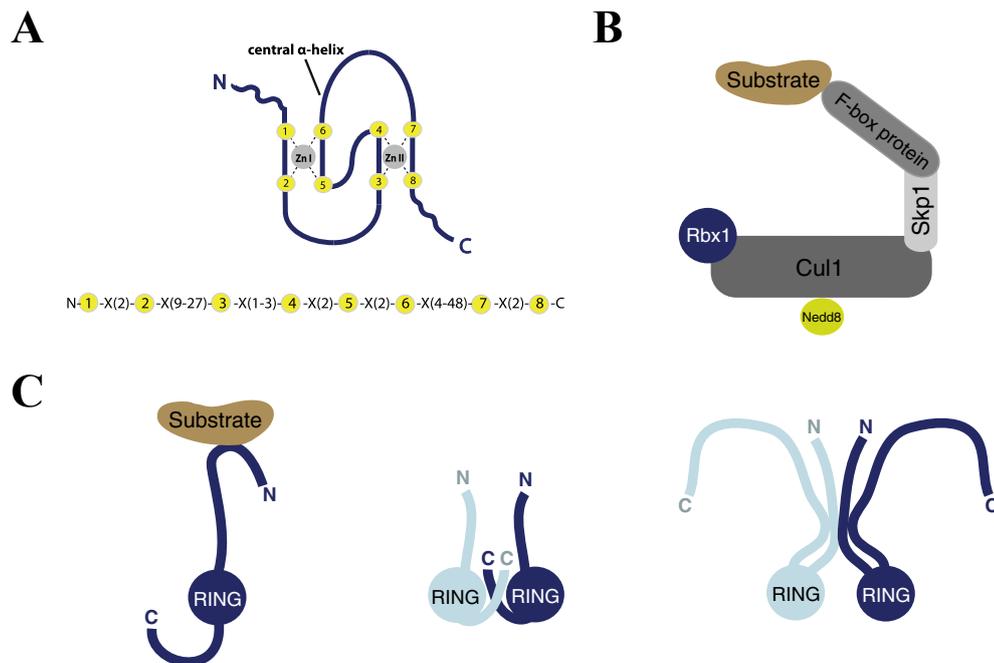


Abbildung 1.13 RING-Fingerdomäne und RING E3-Ligase Typen.

A. Schematische Darstellung des RING-Fingermotivs mit konservierten Aminosäuren (gelb markiert) und den gebundenen Zink-Ionen (Zn I, Zn II). Schematische Darstellung des RING E3-Ligase (Rbx1) Multi-Protein-Komplexes mit Nedd8, Cul1, SKP1 und F-Box Komponenten (**B.**), sowie den monomeren und dimeren Formen der RING E3-Ligasen mit der Position der RING-Domäne (**C.**). Verändert nach [Metzger *et al.*, 2014].

RING E3-Ligasen werden anhand ihrer RING-Fingerdomäne identifiziert. Die Domäne enthält eine Consensus-Sequenz: C-X₂-C-X₉₋₂₇-C-X₁₋₃-H-X₂₋₃-C-X₂-C-X₄₋₄₈-C-X₂-C [Freemont *et al.*, 1991; Metzger *et al.*, 2014]. Sie stellt eine Untergruppe der sog. Zinkfinger Proteindomänen (ZnF) dar, die mit Hilfe von Cystein- und Histidin-Resten zwei Zink-Ionen (Zn²⁺) binden können (Abbildung 1.13 A). Die RING-Domäne der E3-Ligase interagiert mit dem E2-Enzym. Die spezifische Bindung von Substrat wird von einer Vielzahl anderer Domänen kontrolliert, welche die E3-Ligasen enthalten können. Darunter befinden sich auch Domänen, die für die Dimerbildung verantwortlich sind oder für die Bindung an Culline. Dadurch können RING E3-Ligasen als Monomere, Dimere oder in Form eines Multi-Protein-Komplexes als Cullin-RING Ligase agieren (Abbildung 1.13 B und C) [Metzger *et al.*, 2014].

Die Familie der Cullin-RING Ligasen ist eine große Gruppe der RING E3-Ligasen. Der Multi-Protein-Komplex besteht aus bestimmten Komponenten (Abbildung 1.14 A und B). Die Culline (Cullin 1 – 7 und PARC) stellen das Grundgerüst des Komplexes dar und sind in allen Eukaryoten zu finden. Die meisten Organismen besitzen nur bestimmte Culline, z. B. *Arabidopsis* verfügt über Culline 1 – 5 [Sarikas *et al.*, 2011]. In Algen sind Culline weitgehend unerforscht. Die unterschiedlichen Culline interagieren mit weiteren Proteinen, welche die Bindung zum Substrat selbst oder zum F-Box Protein vermitteln. Je nachdem welches Cullin im Komplex vorkommt, werden unterschiedliche Proteine gebunden. Für die vorliegende Arbeit sind vor allem die SKP1 bindende CRL von Bedeutung. Die SKP1-Proteine (*S-phase kinase-associated protein 1*) besitzen nicht nur die namensgebende SKP1-Domäne, sondern auch die BTB/POZ-Domäne (*broad complex tramtrack bric-à-brac/pox virus and zinc finger*) und können somit sowohl mit Cullin 1 (SCF E3-Ligasen), als auch mit Cullin 3 (BTB E3-Ligasen) interagieren [Hua *et al.*, 2011]. Sie sind für ihre Bindung an F-Box Proteine bekannt und in der Lage, Dimere zu bilden [Ng *et al.*, 1998]. Durch die Bildung von SKP1-Dimeren kommt es zur Bildung von SCF E3-Ligase Dimeren (SCF-Dimere) (Abbildung 1.14 C) [Hua *et al.*, 2011].

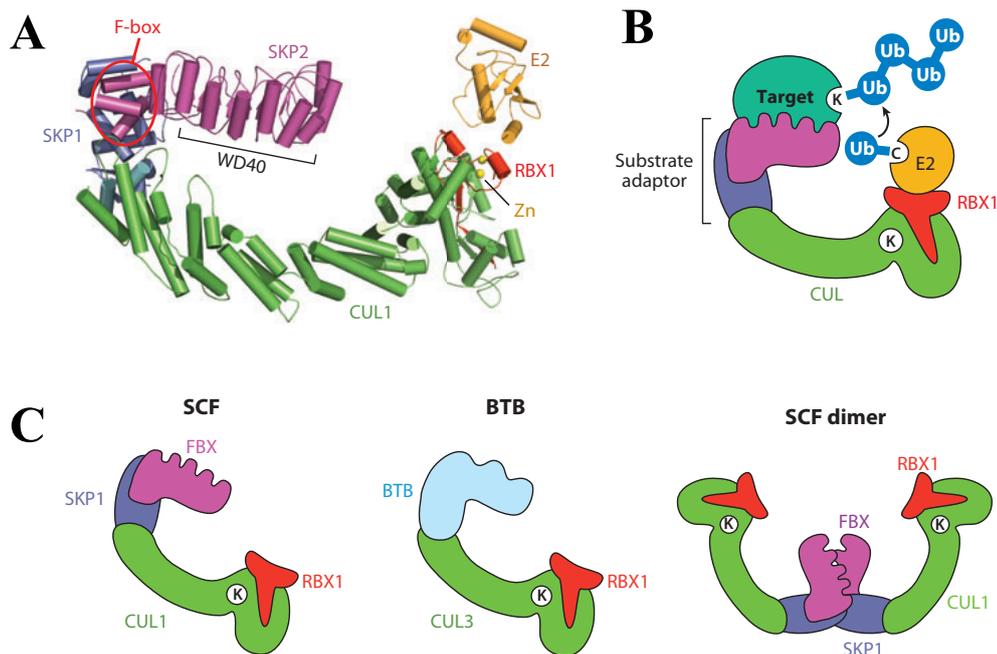


Abbildung 1.14 Darstellung ausgewählter Cullin-RING Ligasen.

A. Dreidimensionale Darstellung einer SCF E3-Ligase am Beispiel der humanen SCF-Ligase (SCF^{SKP2}). **B.** Schematische Darstellung einer CRL E3-Ligase. Das Gerüst-Protein Cullin vermittelt die Bindung zwischen dem von RING E3-Ligase (RBX1) gebundenem E2-Ubiquitin-Komplex und den Substrat bindenden Proteinen. **C.** Schematische Darstellung unterschiedlicher SKP1-Protein-basierten Formen der CRL E3-Ligase: SCF, BTB und SCF-Dimer [Hua *et al.*, 2011].

Die Bindung von Substrat wird durch spezifische Bindung der E3-Ligase direkt oder durch die Rekrutierung unterschiedlicher Mediatoren bewerkstelligt. Je nachdem welche der E3-Ligasen am E2-Enzym binden, wird das Ubiquitin unterschiedlich am Substrat angehängt (Mono-, Multi- oder Polyubiquitinierung, Bindung an verschiedenen Lysin). Dadurch werden unterschiedliche regulatorische Mechanismen eingeleitet. Die E3-Ligasen stellen somit die kritische Komponente des Ubiquitin-Systems dar [Zheng *et al.*, 2017].

1.3.2 Folgen der Ubiquitinierung

Der erste Prozess der mit der Ubiquitinierung in Verbindung gebracht wurde, war der **Abbau am Proteasom** [Baumeister *et al.*, 1998]. Das 26S Proteasom der Eukaryoten ist ein riesiger Protein-Komplex mit einem Molekulargewicht von 2500 kDa. Es besteht aus mehreren Untereinheiten: die proteolytisch aktive 20S Einheit hat die Form eines Hohlzylinders und befindet sich zwischen zwei regulatorischen 19S Einheiten. Die 19S Einheiten erkennen die ubiquitinierten Proteine und das Ubiquitin wird mit Hilfe von DUB entfernt. Anschließend wird das Protein entfaltet und in einer ATP-abhängigen Reaktion am aktiven Zentrum des Proteasoms abgebaut [Hough *et al.*, 1987; Steverding 2012; Voges *et al.*, 1999]. Eine Polyubiquitinierung mit mindestens vier Ubiquitinen führt zum Abbau am Proteasom [Thrower 2000]. Vor allem die Verlinkungen der Ubiquitin-Moleküle über das Lysin an den Positionen 48 und 63 werden mit dem Abbau assoziiert [Chau *et al.*, 1989; Saeki *et al.*, 2009]. Ein gezielter Abbau von falsch gefalteten, beschädigten oder ausgedienten Proteinen durch das Proteasom spielt eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus, der Apoptose und der Genregulation [Steverding 2012]. Es ist daher nicht verwunderlich, dass auch Viren in den Abbau von Proteinen eingreifen. Vor allem wird die Degradation der Wirts-Abwehrproteine angestrebt. Das bekannteste Beispiel dafür ist das humane Tumorsuppressor-Protein p53, das u. a. Apoptose-auslösend wirkt und bei einer Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus gezielt abgebaut wird [Sato *et al.*, 2009].

Eine Ubiquitinierung die keine proteolytische Funktionen erfüllt, dient meist der Regulation. Hierfür werden die Lysine an den Positionen 33 und 63 bevorzugt [Liu *et al.*, 2020]. Durch die Ubiquitinierung werden unterschiedliche Mechanismen in der Zelle gesteuert. Eine Monoubiquitinierung ist eine bekannte posttranslationale Modifikation und dient als Signal bei der Kontrolle der Transkription, der Endozytose und wird bei der Virus-Freisetzung benötigt [Hicke 2001]. Die Ubiquitinierung spielt bei der **Regulation der Transkription** nicht nur bei der Freilegung der DNA über die Histone eine Rolle, sondern beeinflusst auch direkt die Komponenten des Transkriptionsinitiations-Komplexes. Die Monoubiquitinierung von Histonen 2A und 2B wurde im Jahr 1981 zum ersten Mal beschrieben [Busch *et al.*, 1981]. Die Ubiquitinierung

von Histon 2A wird überwiegend mit der Repression der Transkription in Verbindung gebracht. Die Menge an humanem ubiquitinierten Histon 2B steht in direkten Zusammenhang mit der erhöhten Transkriptionsrate [Davie *et al.*, 1990]. Auch in Algen gibt es Beispiele für die Monoubiquitinierung von Histon 2B [Shimogawara *et al.*, 1992]. Es sind mehrere Transkriptionsfaktoren bekannt, die während der Transkriptionsinitiation ubiquitiniert werden und dadurch aktiviert oder inhibiert werden [Geng *et al.*, 2012]. Die Ubiquitinierung von bestimmten Proteinen reguliert deren **endozytotischen Transport**. Die Monoubiquitinierung der Membranproteine ist ein bekanntes Signal zum Abbau an den Lysosomen [Geng *et al.*, 2012; Hicke 2001].

Die Funktionen der Ubiquitinierung sind sehr divers und spielen auf sehr vielen Ebenen eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellabläufe. Diverse Viren codieren für die Komponenten des Ubiquitin-Systems und nutzen u. a. die oben beschriebenen Mechanismen, um die Wirtszelle umzuprogrammieren und die Vermehrung von Viren während der **Virusinfektion** zu sichern. Vor allem werden die E3-Ligasen, sowie Deubiquitinierende Enzyme imitiert oder modifiziert, da sie eine entscheidende Rolle bei der Substrat-spezifischen Ubiquitinierung und Deubiquitinierung spielen [Isaacson *et al.*, 2009; Randow *et al.*, 2009]. Die Freisetzung von Retroviren ist z. B. völlig vom Ubiquitin-System abhängig, was am Beispiel des Humanen T-lymphotropen Virus 1 (HTLV-1) beschrieben wurde. Die Freisetzung der Membran-umschlossenen HTLV-1 Viruspartikel ist nur dann möglich, wenn das GAG-Polyprotein von der Nedd4 E3-Ligase ubiquitiniert wird [Blot 2004]. Auch Chloroviren codieren für Komponenten des Ubiquitin-Systems. Das virale Protein A039L aus dem PBCV-1 Virus codiert für das SKP1-Protein, das eine SCF-ähnliche Ligase bilden kann [Noel *et al.*, 2014]. Im Genom von ATCV-1 wurden anhand von DNA-Sequenzvergleichen mehrere hypothetische Komponenten des Ubiquitin-System identifiziert: ein Ubiquitin (Z203L), eine RING E3-Ligase (Z292L), ein SKP1-Protein (Z339L) und ein Deubiquitinierendes Enzym (Z717R) [Fitzgerald *et al.*, 2007].

1.4 Zielsetzung

Ziel der durchgeführten Studie ist, die Wechselwirkungen zwischen Algen und Viren, am Beispiel von *Acanthocystis turfacea* *Chlorella* Virus 1 (ATCV-1) und seinem Wirt *Chlorella heliozoae* zu untersuchen. Hierfür wurden besonders zwei Prozesse studiert: die Promotor-gesteuerte Genexpression und die vom Virus induzierte Ubiquitinierung der Proteine des Wirtes.

Um die Regulation der viralen Genexpression zu untersuchen, wurden Studien zur Aktivität der viralen Promotoren in unterschiedlichen Spezies durchgeführt, sowie für die Aktivität verantwortliche Transkriptionsfaktoren identifiziert. Die spezifische Bindung der Transkriptionsfaktoren an die Consensus-Sequenzen der Promotoren sollte beschrieben werden. Für die Studien zur Regulation der Proteine über Ubiquitinierung wurden drei virale Proteine des ATCV-1 ausgewählt, deren hypothetische Funktion mit dem Ubiquitin-System im Zusammenhang stehen. Die Proteine sollten charakterisiert werden, deren Funktion überprüft und ihre potenziellen Interaktionspartner sollten identifiziert werden. Diese Studien sollen nicht nur zum näheren Verständnis der Infektion durch Chloroviren beitragen, sondern auch Erkenntnisse zur Gen- und Proteinregulation der Algen, aber auch Viren liefern.

Kapitel 2

Ergebnisse – Regulation der Expression früher viraler Gene

2.1 proZ798L als Beispiel für die Regulation früher Promotoren

Die DNA-Polymerase ist eines der wichtigsten Proteine in der frühen Phase der Virusinfektion. Die Expression des Polymerase-Gens findet am Anfang der Virusinfektion statt, dadurch wird die Replikation des Virusgenoms ermöglicht. Der Promotor der DNA-Polymerase eignet sich daher als sehr gutes Beispiel zur Untersuchung der Aktivität früher viraler Promotoren und deren Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren des Wirtes. Bei ATCV-1 codiert ORF Z798L für die DNA-Polymerase Typ B. Daher gilt dessen Promotor proZ798L als früh. Die Promotoren von ATCV-1 und anderen Phycodnaviren wurden bislang wenig untersucht. Die frühen Promotoren von PBCV-1 sind ca. 150 bp lang [Oliveira *et al.*, 2017]. Um keine wichtigen Sequenzen aus den Untersuchungen auszuschließen, wurde für die folgenden Experimente die Länge des Promotors der DNA-Polymerase proZ798L auf ca. 300 bp definiert und direkt vor das Startcodon ATG am 5'-Ende des Nichtmatrizenstranges des Gens gesetzt. proZ798L beinhaltet mehrere Consensus-Sequenzen, die für Promotoren allgemein bekannt sind. Diese kommen sowohl in prokaryotischen als auch in eukaryotischen Promotoren vor und befinden sich im Bereich von ca. 100 bp direkt vor dem Transkriptionsstart. So befinden sich in der Sequenz von proZ798L Zielsequen-

zen für Transkriptionsfaktoren aus Bakterien, wie die -35- und -10-Sequenzen, die für die Erkennung und Bindung des σ -Faktors verantwortlich sind. Zusätzlich enthält die Sequenz von proZ798L auch Zielsequenzen für eukaryotische Transkriptionsfaktoren, wie eine Variante der TATA-Box (TATATAAG) oder die TGACGTGG-Sequenz, die von bestimmten bZIP-Transkriptionsfaktoren erkannt und gebunden werden können (Abbildung 2.1 B).

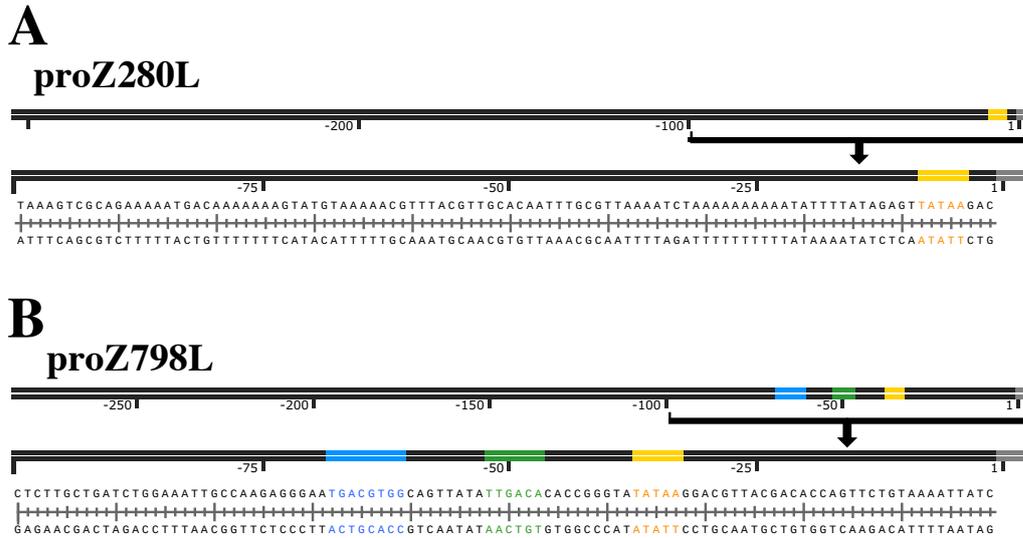


Abbildung 2.1 DNA-Sequenzen von proZ280L (A) und proZ798L (B). Schematische Darstellung des 300bp-Bereichs *upstream* von Z280L und Z798L, sowie des 100bp-Bereichs mit markierten Consensus-Sequenzen für bekannte Transkriptionsfaktoren: TATA-/Pribnow-Box (orange), bZIP-TF (blau), -35-Bereich (grün), Transkriptionsstart (grau).

Der offene Leserahmen ORF Z280L codiert für das VP50-Kapsidprotein. Es ist per Definition ein spätes Gen und wird hier zum Vergleich herangezogen. Die Länge des Z280L-Promotors wird ebenfalls auf ca. 300 bp stromaufwärts des Gens definiert. Im Gegensatz zu proZ798L beinhaltet der Promotor von Z280L lediglich eine Variante der TATA-Box (TATAAG), welche mit der von proZ798L zum Teil übereinstimmt (Abbildung 2.1 A).

2.1.1 proZ798L induziert die Genexpression in Algen, Pflanzen und humanen Zellen

Die Promotoren von ATCV-1 wurden bisher wenig untersucht. Für die Charakterisierung des Polymerase-Promotors wurden zuerst grundlegende Tests zur Aktivität des Promotors durchgeführt.

2.1.1.1 proZ798L aktiviert das *ARG7*-Gen in *C. reinhardtii*

Um die Aktivität des Promotors von ORF Z798L in Algen zu untersuchen, wurde der Promotor des Z798L vor das Reportergen *ARG7* in den pARG7 Vektor kloniert. *ARG7* codiert für Argininosuccinat-Lyase, ein Enzym das den letzten Schritt der Arginin-Biosynthese katalysiert. Dadurch können nur Algen, welche das im Vektor enthaltene ASL besitzen auf TAP-Medium ohne Zusatz von Arginin wachsen. Zusammen mit dem *C. reinhardtii* Stamm 302 cw15arg⁻, der eine defekte ASL enthält und Arginin nicht mehr synthetisieren kann, stellt es ein geeignetes System zur Promotoranalyse dar. Die so selektierten mutanten Algenklone wurden kultiviert und auf die ASL-Aktivität durch Wachstumstest und Nachweis der Argininbildung getestet. Zum Vergleich wurde der späte Promotor proZ280L herangezogen, sowie eine negative Kontrolle mit dem pARG7 Vektor ohne Promotor (0) und positive Kontrollen mit konstitutiv aktiven Promotoren aus Algen (proARG7) und aus dem CaMV-Virus (35S) (Abbildung 2.2 A).

Algen, welche das *ARG7*-Gen unter der Kontrolle von proZ798L exprimieren, wuchsen auf TAP-Medium ohne Arginin und bildeten kleine hellgrüne Kolonien. Das Wachstum und der Phänotyp der Algen-Kolonien ist vergleichbar mit dem der positiven Kontrolle proARG7. Im Gegensatz dazu wuchsen deutlich weniger Algenkolonien an, wenn das *ARG7*-Gen unter der Kontrolle von proZ280L steht. Das deutet auf eine geringe Aktivität des Z280L-Promotors in den Algen hin. Die wenigen mutanten Kolonien, welche angewachsen sind, ließen sich nicht kultivieren und starben ab, was weitere Tests unmöglich machte (Abbildung 2.2 B). Die Algen die *ARG7* unter der Kontrolle des proZ798L exprimieren, zeigen auch eine deutlich höhere Transformationseffizienz als die Algen, welche mit dem proZ280L-Konstrukten transformiert wurden oder sogar als die positiven Kontrollen (Abbildung 2.2 C).

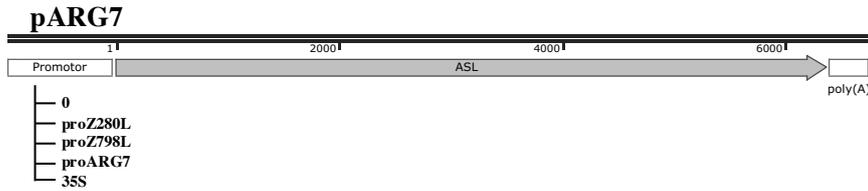
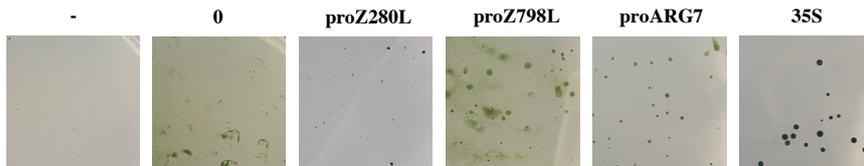
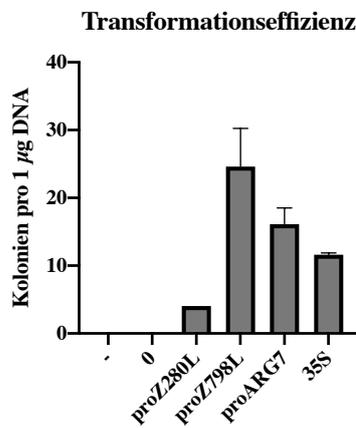
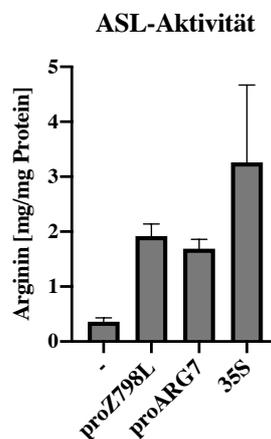
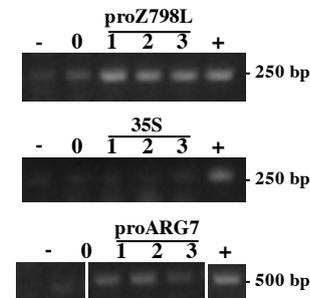
A**B****C****D****E**

Abbildung 2.2 proZ798L aktiviert das *ARG7*-Gen in *C. reinhardtii*.

A. Schematische Darstellung verwendeter Konstrukte im pARG7 Vektor mit den untersuchten Promotoren: proZ280L und proZ798L, sowie der negativen Kontrolle ohne Promotor (0) und positiven Kontrollen (proARG7, 35S-Promotor). **B.** Algen-Kolonien 14 Tage nach der Transformation von *C. reinhardtii* mit entsprechenden Konstrukten, sowie negativer Kontrolle (transformierte Zellen ohne DNA, -). **C.** Transformationseffizienz der einzelnen Transformationen mit den untersuchten Konstrukten [Kolonien pro µg DNA]. **D.** Nachweis der Aktivität von ASL (ASL-Assay, Abschnitt 6.2.6) in den untersuchten Mutanten. Negative Kontrolle (-) entspricht den untransformierten *C. reinhardtii*. **E.** Nachweis der Vektor-DNA im Genom von positiven Algenklonen.

Die Aktivität von proZ798L in Algen konnte auch mit Hilfe eines Enzymtests auf Arginininosuccinat-Lyase Aktivität (ASL-Assay, Abschnitt 6.2.6) nachgewiesen werden. Die Menge an gebildetem Arginin aus den Proteinproben von Algen, die *ARG7* unter Kontrolle von proZ798L exprimieren, ist vergleichbar mit der positiven Kontrolle proARG7 (Abbildung 2.2 D). Der positive Nachweis der im Algengenom integrierten Vektor-DNA (pARG7::proARG7, pARG7::proZ798L und pARG7::35S) untermauert diese Ergebnisse und beweist, dass die Expression des *ARG7*-Gens tatsächlich auf die Aktivität der getesteten Promotoren zurückzuführen ist (Abbildung 2.2 E).

2.1.1.2 proZ798L steuert *uidA*-Expression in Protoplasten

Die Aktivität der Promotoren in den Pflanzen wurde auf zwei Ebenen analysiert; zum einen wurde eine transiente Expression der Reportergene nach Protoplasten-Transformation untersucht. Zum anderen wurde eine Pflanzenlinie erzeugt, die stabil über mehrere Generationen das gewünschte Reportergen unter der Kontrolle des Promotors von Z798L exprimierte. Die Protoplasten wurden aus *N. benthamiana* Pflanzen isoliert. Für die stabile Genexpression wurden *N. tabacum* Pflanzen der Sorte Samsun NN verwendet, die mit Hilfe von Agrobakterien transformiert wurden. Für die Bestimmung der Aktivität viraler Promotoren in Protoplasten wurde der gewünschte Promotor vor das Reportergen *uidA* (GUS, β -Glucuronidase) in den pUC18-GUS Vektor kloniert. Dadurch stand das Reportergen unter Kontrolle des jeweiligen Promotors und wurde nur dann exprimiert, wenn der Promotor aktiv war (Abbildung 2.3 A). Für die stabile Expression in Tabak wurde der binäre Vektor pTAK35S verwendet, der das gleiche Reportergen beinhaltet wie der pUC18-GUS Vektor. Hier wurde der Promotor ebenfalls vor das Reportergen kloniert und der Vektor mit Hilfe von Agrobakterien in die Pflanzen eingebracht.

Das Protoplasten-System weist einen starken Hintergrund auf (ca. 0,75 μ g MU). Die Aktivität des Promotors proZ798L liegt dennoch deutlich über den Werten des gemessenen Hintergrunds (1,4 μ g MU). Im Vergleich zur Aktivität des 35S-Promotors (2,1 μ g MU), welcher in Pflanzengewebe als sehr starker Promotor beschrieben wird, ist die proZ798L-Aktivität geringer. Der Promotor von Z280L zeigt keine Aktivität in den Protoplasten (Abbildung 2.3 B).

Eine stabile Expression des GUS-Gens unter der Kontrolle von proZ798L könnte Hinweise auf mögliche Gewebespezifitäten liefern und so weitere Details zur Funktionsweise des Promotors in höheren Pflanzen geben. Im Gegensatz zu der starken Aktivität des Polymerase-Promotors in den isolierten Protoplasten kann keine GUS-Aktivität in den Blättern der stabil transformierten Tabakpflanzen gemessen werden. Der 35S-Promotor (+) zeigt eine sehr starke Aktivität, was anhand einer starken Expression des Reportergens deutlich wird (Abbildung 2.3 C). Ein Nachweis der eingebrachten Vektor-DNA zeigt, dass drei von vier Pflanzenlinien (H3, H7 und H9) die eingebrachten Konstrukte stabil im Genom integriert und über mehrere Generationen behalten haben (Abbildung 2.3 D).

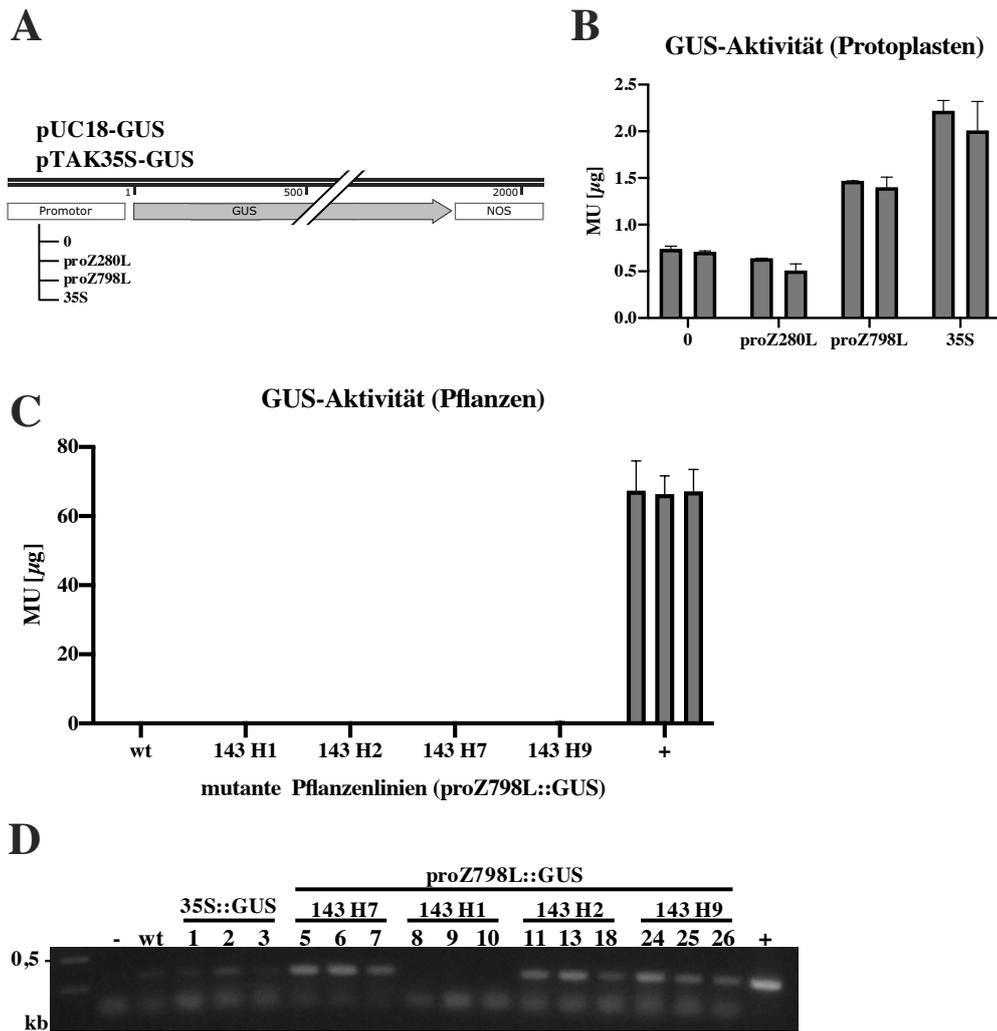


Abbildung 2.3 Nachweis der GUS-Aktivität in Protoplasten und Pflanzen.
A. Schematische Darstellung verwendeter Konstrukte im pUC18-GUS und pTAK35S Vektor mit den untersuchten Promotoren: proZ280L und proZ798L, sowie der negativen Kontrolle ohne Promotor (0) und positiver Kontrolle (35S). **B.** GUS-Aktivität gemessen in Protoplasten aus *N. benthamiana* (in µg MU pro ml Proteinextrakt pro 2 h). **C.** GUS-Aktivität gemessen in transgenen Pflanzenlinien (in µg MU pro ml Proteinextrakt pro 2 h). **D.** Nachweis der Vektor-DNA in transgenen Pflanzenlinien durch PCR.

2.1.1.3 proZ798L aktiviert die Expression von eYFP-Reportergen in HEK293-Zellen

Die Aktivität der viralen Promotoren in humanen Zelllinien wurde mit Hilfe von einem eYFP-Reportergen untersucht. Hierfür wurde der pEYFP-Mem Vektor verwendet, der unverändert zu einer sehr starken Expression von *eYFP* in den Zellen führte. Für den Versuch wurde der vektoreigene CMV-Promotor durch die zu testenden Promotoren ersetzt, so dass das Reportergen unter Kontrolle des jeweiligen Promotors stand (Abbildung 2.4 A). Als negative Kontrolle für die Tests wurden Zellen verwendet, die ohne Zusatz von DNA transfiziert wurden (-). Getestet wurde sowohl der Promotor proZ798L als auch der spätere Promotor von Z280L. Die Aktivität der Promotoren wurde mit Hilfe des Lichtmikroskops und Anregung der vorhandenen fluoreszierenden Proteine mit UV-Licht ausgewertet. Die vorhandene Fluoreszenz sowie deren Stärke hängt unmittelbar mit der Aktivität der getesteten Promotoren zusammen. Zusätzlich wurde das Reporterprotein mit immunologischen Methoden nachgewiesen.

Bereits zwei Tage nach der Transfektion konnte man die ersten fluoreszierenden Zellen unter UV-Licht erkennen, nach weiteren zwei Tagen nahm die Menge des synthetisierten eYFP in den transfizierten HEK293-Zellen zu. Die Zellen, die eYFP unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimieren, zeigen schon nach zwei Tagen sehr starke Signale. Die Expression des *eYFP*-Gens unter der Kontrolle des Polymerase-Promotors und somit auch die eYFP-Proteinsynthese ist schwach, kann allerdings gut beobachtet werden. Unter der Kontrolle von proZ280L wird kein eYFP synthetisiert, was darauf hindeutet, dass der Promotor im Gegensatz zu proZ798L in den humanen Zellen inaktiv bleibt (Abbildung 2.4 B). Diese Ergebnisse können mit Hilfe immunologischer Nachweise des eYFP-Proteins in der Zellysaten aus den transfizierten Zellen bestätigt werden. Das synthetisierte eYFP-Protein kann in den Zellysaten erfolgreich nachgewiesen werden, welche *eYFP* unter der Kontrolle von proZ798L- oder CMV-Promotor exprimieren. In den ohne Zusatz von DNA transfizierten HEK293-Zellen oder in den Zellen die *eYFP* unter der Kontrolle des Promotors proZ280L exprimieren, kann kein eYFP mit Hilfe der Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 2.4 C).

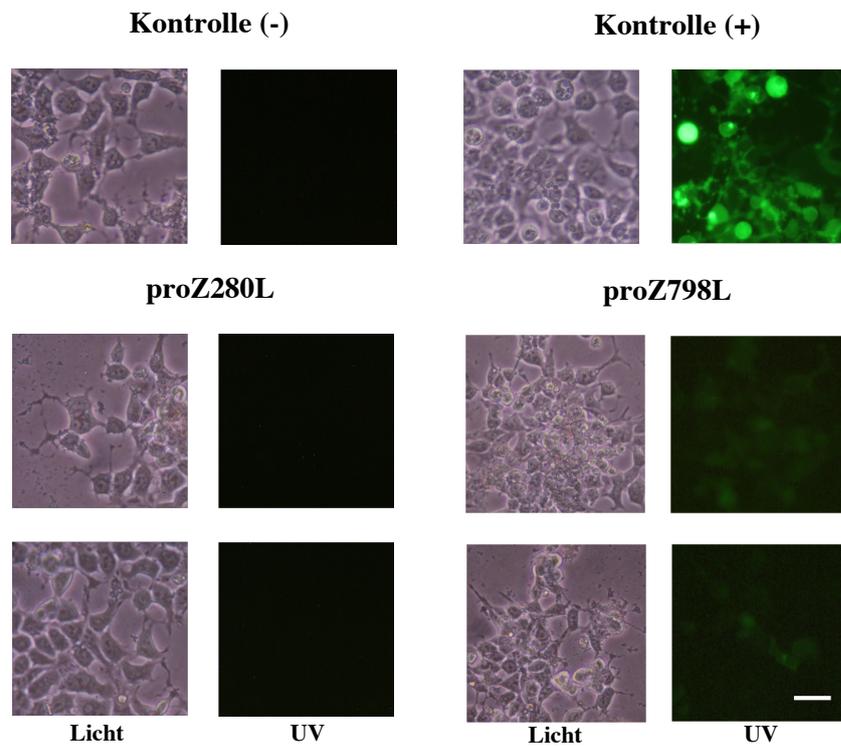
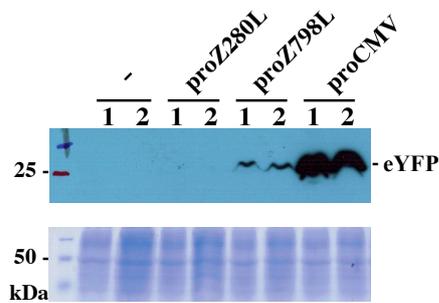
A**B****C**

Abbildung 2.4 Nachweis der Expression von *eYFP* in der humanen Zelllinie HEK293. **A.** Schematische Darstellung verwendeter Konstrukte im pEYFP-Mem Vektor mit den untersuchten Promotoren: proZ280L, proZ798L und positiver Kontrolle (CMV-Promotor) **B.** Mikroskopaufnahmen transgener Zelllinien unter sichtbarem Licht und nach Anregung im UV-Bereich, als negative Kontrolle dienen transfizierte Zellen ohne Zusatz von Vektor-DNA. Maßstab 20 μm **C.** Nachweis des eYFP-Proteins in den Proteinlysaten 2 Tage nach der Transfektion. Immunodetektion von eYFP mit dem GFP-Antikörper. Coomassie-Färbung der Proteine dient als Ladekontrolle.

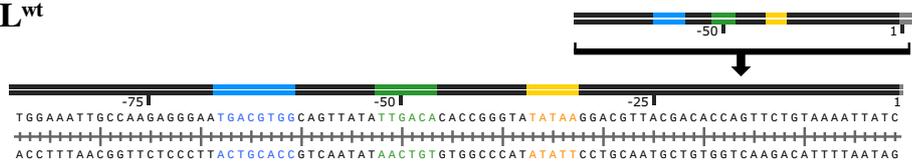
2.1.2 Hex-Motiv ist essenziell für die proZ798L-Aktivität

Nachdem die Aktivität von proZ798L in allen untersuchten Spezies nachgewiesen wurde, erfolgte eine detaillierte Charakterisierung des proZ798L. In erster Linie sollten die Sequenzbereiche des Promotors definiert werden, welche für die Aktivität von Bedeutung sind. ATCV-1 infiziert Eukaryoten, weswegen zuerst bekannte *cis*-Elemente für die Transkription eukaryotischer Gene untersucht wurden. Dabei fiel ein Element besonders auf, das sog. "Hex-Motiv". Eine Mutation in der Consensus-Sequenz des Hex-Motivs sollte Aufschluss darüber geben wie wichtig diese Sequenz für die Aktivität des Promotors in den Algen und Pflanzen ist. Hierfür wurden mutante Promotorvarianten synthetisiert: zum einen eine kurze Variante des Promotors mit nur 88 bp (Minimalpromotor, mp), die alle wichtige Bereiche unverändert enthält – mpZ798L^{wt}. Zum anderen wurde eine mutante Kurzvariante des Promotors verwendet, die eine Punktmutation im Hex-Motiv enthält – mpZ798L^{A-66G}. Das Adenin wurde hier an der Position -66 durch ein Guanin ersetzt (Abbildung 2.5).

proZ798L



mpZ798L^{wt}



mpZ798L^{A-66G}

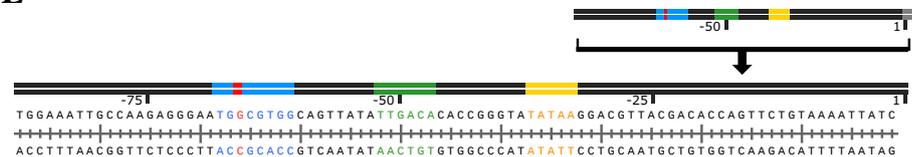


Abbildung 2.5 Sequenzen der Z798L Minimalpromotor-Varianten.

Darstellung des ca. 300bp-Bereichs *upstream* von ORF Z798L (proZ798L), sowie des 88bp-Bereichs in wildtypischer (mpZ798L^{wt}) und mutanter Form (mpZ798L^{A-66G}). Consensus-Sequenzen für bekannte Transkriptionsfaktoren sind markiert: TATA-/Pribnow-Box (orange), Hex-Motiv (blau), -35-Bereich (grün), Transkriptionsstart (grau). Die eingebrachte Punktmutation ist rot hervorgehoben.

2.1.2.1 Punktmutation im TGACGTGG-Motiv hemmt die Aktivität von proZ798L in Algen

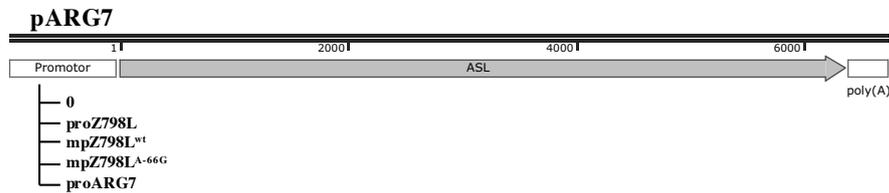
Die generierten Kurzvarianten des Promotors proZ798L (Abbildung 2.5) wurden ebenfalls in den pARG7 Vektor kloniert und konnten somit die Expression des *ARG7*-Gens in *C. reinhardtii* steuern. Es wurden wie im vorherigen Kapitel dieselben Kontrollen verwendet: die negative Kontrolle ohne Promotor (0) und die positive Kontrolle mit dem Algenpromotor proARG7 (Abbildung 2.6 A).

Die Transformationseffizienz der mutanten Algenklone, die *ARG7* unter Kontrolle des Polymerase-Promotors exprimieren, ist auf die Hälfte reduziert, wenn der Promotor in seiner wildtypischen Kurzform verwendet wird (von 35 auf 14 Kolonien pro μg in die Transformation eingesetzter DNA). Demnach ist die wildtypische Kurzform des Promotors mpZ798L^{wt} in Algen ebenfalls aktiv. Beim Großteil der transformierten Algenzellen wird das *ARG7*-Gen in ausreichender Menge exprimiert, sodass diese Zellen auf dem TAP-Medium ohne Zusatz von Arginin Kolonien bilden können. Der Promotor proZ798L zeigt wiederholt sehr starke Aktivität. Diese ist auch deutlich höher als die Aktivität des konstitutiv aktiven ARG7-Promotors. Die mutante Form des Polymerase-Promotors mit der Substitution des Adenins (mpZ798L^{A-66G}) scheint zu keiner Expression des *ARG7*-Gens zu führen (Abbildung 2.6 B). Weiterhin wuchsen die wenigen Kolonien, die unter der Kontrolle von mpZ798L^{A-66G} *ARG7* exprimierten nicht an. Somit waren auch keine weiteren Tests mehr möglich.

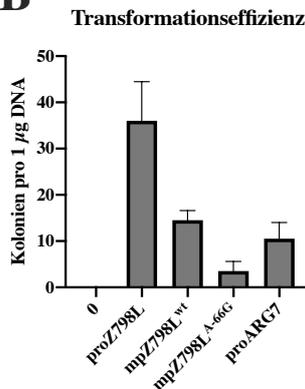
Die verbleibenden Algenkolonien die *ARG7* unter der Kontrolle von aktiven Formen des Polymerase-Promotors exprimierten, wuchsen an und wurden in die ASL-Assays eingesetzt. Anhand des ASL-Assays konnte die Menge an gebildetem Arginin bestimmt werden. Für die Tests wurden Proteinlysate aus den entsprechenden Algenkolonien verwendet. Die Proteinlysate aus den Algenkolonien, die *ARG7* unter der Kontrolle der beiden wildtypischen Promotoren exprimieren, zeigen in den ASL-Assays eine starke Akkumulation an umgesetztem Arginin. Diese ist vergleichbar mit der gebildeten Mengen an Arginin bei der positiven Kontrolle und beträgt 1,3 und 4,1 mg Arginin pro mg isoliertem Protein (Abbildung 2.6 C). Der positive Nachweis der eingebrachten Vektor-DNA zusammen mit den vorangegangenen Sequenzierungen der einge-

setzten DNA beweist, dass die Expression des *ARG7*-Gens unter der Kontrolle der jeweiligen Mutanten des Z798L-Promotors steht (Abbildung 2.6 D).

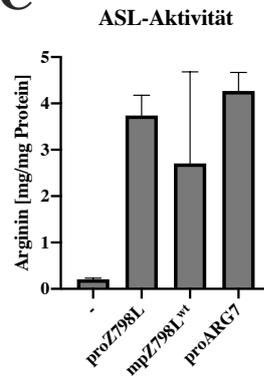
A



B



C



D

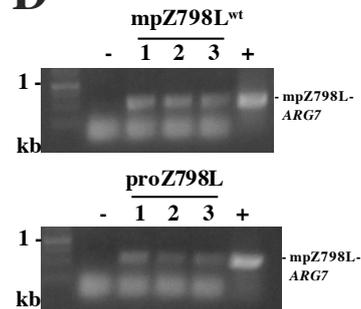


Abbildung 2.6 Punktmutation im TGACGTGG-Motiv wirkt sich negativ auf die Aktivität des Polymerase-Promotors aus.

A. Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte im pARG7 Vektor mit den untersuchten Z798L-Promotorvarianten: proZ798L, mpZ798L^{wt}, mpZ798L^{A-66G}, negativen Kontrolle ohne Promotor (0) und positiver Kontrolle (proARG7). **B.** Transformationseffizienz der einzelnen Transformationen von *C. reinhardtii* mit den untersuchten Konstrukten [Kolonien pro µg DNA]. **C.** Nachweis der Aktivität von ASL in den untersuchten Mutanten (Abschnitt 6.2.6). Negative Kontrolle (-) entspricht den untransformierten *C. reinhardtii*. **D.** Nachweis der Vektor-DNA im Genom von positiven Algenklonen.

2.1.2.2 Punktmutation im TGACGTGG-Motiv hemmt die Aktivität von proZ798L in Protoplasten

Die Aktivität der mutanten proZ798L-Varianten in Protoplasten wurde auch hier mit Hilfe des GUS-Reportersystems geprüft. Die verwendeten Mutanten von proZ798L wurden schon vorher ausführlich beschrieben (Abbildung 2.5). Die Promotoren wurden vor das GUS-Gen *uidA* kloniert und im pUC18-GUS Vektor in die Protoplasten transformiert. Der leere Vektor diente als negative Kontrolle (0) und der 35S-Promotor als positive Kontrolle (Abbildung 2.7 A).

Wie auch schon in den Aktivitätstests in Algen zeigt die Mutante mit der Punktmutation im TGACGTGG-Motiv mpZ798L^{A-66G} in den Pflanzen keine Aktivität. Die wildtypische kurze Variante des Promotors – mpZ798L^{wt} – zeigt hingegen eine sehr schwache aber messbare Aktivität (Abbildung 2.7 B).

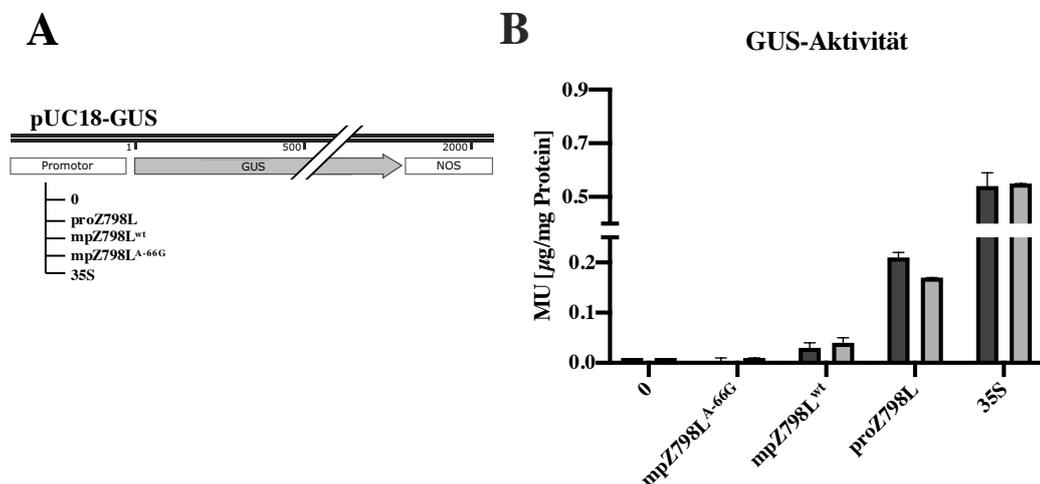


Abbildung 2.7 Punktmutation im TGACGTGG-Motiv wirkt sich negativ auf die Aktivität des Z798L-Promotors in Protoplasten aus.

A. Schematische Darstellung verwendeter Konstrukte im pUC18-GUS Vektor mit den untersuchten Z798L-Promotorvarianten: proZ798L, mpZ798L^{wt}, mpZ798L^{A-66G}, negativer Kontrolle ohne Promotor (0) und positiver Kontrolle (35S). **B.** GUS-Aktivität (GUS-Assay, Abschnitt 6.2.7) gemessen in Protoplasten aus *N. benthamiana* (in μg MU pro μg isoliertem Protein).

2.1.3 Die Aktivität von proZ798L hängt von den Transkriptionsfaktoren des Wirtes ab

Die vorangegangenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Aktivität des proZ798L unmittelbar von dem Hex-Motiv TGACGTGG abhängt. Das Hex-Motiv ist somit essenziell für die Aktivität des Promotors in Algen und Pflanzen. Gleichzeitig stellt es eine potenzielle Zielsequenz für die Bindung der bZIP-Transkriptionsfaktoren dar. Im nächsten Schritt sollten die Interaktionen des Promotors proZ798L mit den bZIP-Transkriptionsfaktoren näher untersucht werden, sowie die Bedeutung des TGACGTGG-Motivs für die Bindung an Transkriptionsfaktoren im Allgemeinen.

2.1.3.1 proZ798L interagiert mit AtGBF1 in Hefe

Um die DNA-Protein-Interaktionen zu testen, eignet sich das Hefe-1-Hybrid System sehr gut. Die potenziellen Interaktionspartner werden in zwei Vektoren kloniert und in Hefen transformiert. Binden nun die getesteten Transkriptionsfaktoren an den zu untersuchenden Promotor und kommen somit in räumliche Nähe, so kommt es zur Expression des Reportergens. Hier wurden zwei Vektoren verwendet: pRW95-3, in dem die Promotorsequenzen kloniert wurden und pGAD424 zur Expression der Gene der Transkriptionsfaktoren. Die ersten Tests wurden mit dem frühen Promotor von Z798L und dem späten Promotor proZ280L durchgeführt, sowie auch mit der negativen Kontrolle mit leerem Vektor ohne Promotor (0) und dem 35S-Promotor (Abbildung 2.8 A).

Die Interaktionen mit den Promotoren wurden mit ausgewählten Mitgliedern der bZIP-Transkriptionsfaktorfamilie untersucht. Diese gehören drei Gruppen der Familie an (TGA-TF, GBF-TF und CREB-TF) und stammen zusätzlich aus unterschiedlichen Spezies (Algen, Pflanzen und Mensch). Getestet wurden zwei G-Box bindende Faktoren aus Algen: der *G-box binding factor* aus *Chlamydomonas reinhardtii* (CrGBF) und die DNA-Bindedomäne aus dem *G-box-binding factor* aus *Chlorella variabilis* (CvGBF BD). Unter den pflanzlichen Faktoren befinden sich sowohl Mitglieder der GBF-Familie: der *G-box-binding factor 1* aus *Arabidopsis thaliana* (AtGBF1) als auch der TGA-Familie: *TGACG-sequence-specific DNA-binding protein* TGA-1A aus *Nicotiana taba-*

cum (NtTGA1a) und Transkriptionsfaktor TGA6 aus *Arabidopsis thaliana* (AtTGA6). Alle Proteine wurden als Fusionsproteine mit der GAD-Domäne des Vektors synthetisiert (Abbildung 2.8 A).

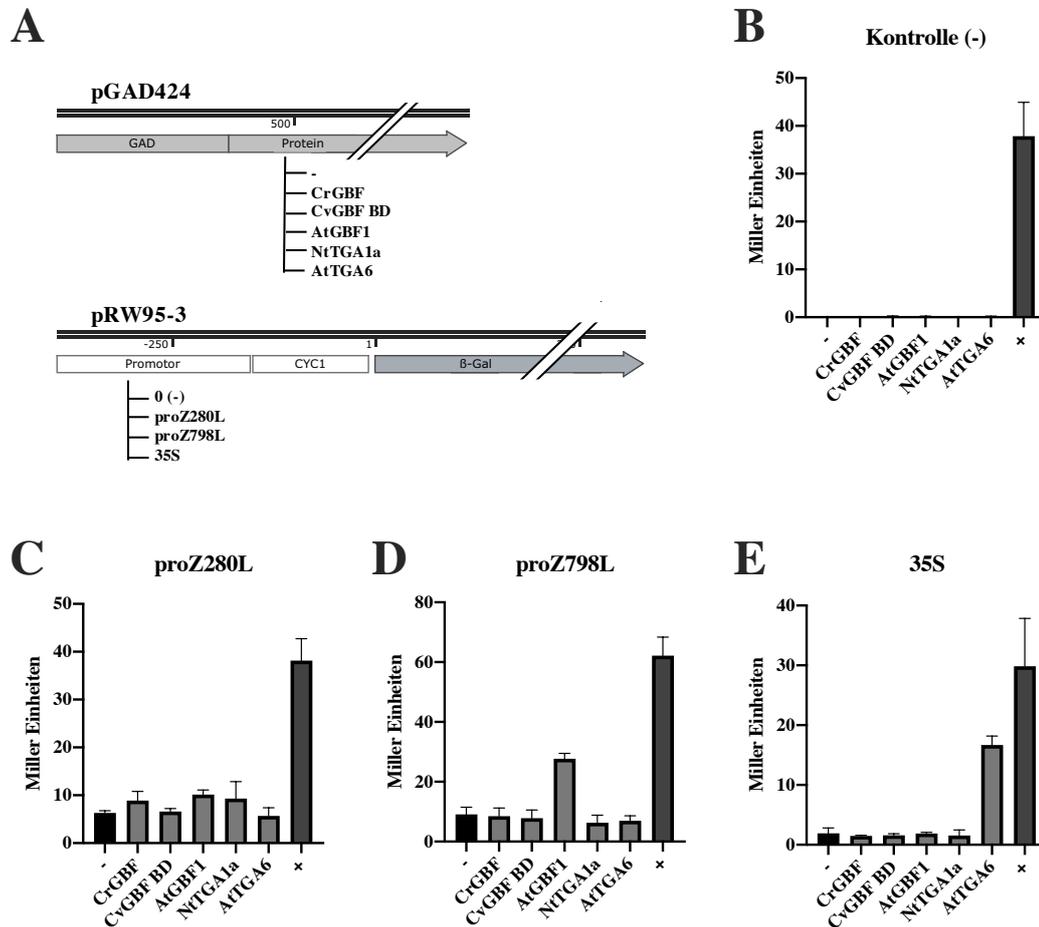


Abbildung 2.8 proZ798L interagiert mit AtGBF1 in Hefe.

A. Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte in den pGAD424 und pRW95-3 Vektoren zur Untersuchung der Protein-DNA-Interaktion in Hefe. Die in den pGAD424 Vektor klonierten Transkriptionsfaktoren gehören zu den Gruppen der GBF- (AtGBF1, CrGBF und CvGBF BD) und TGA- (NtTGA1a, AtTGA6) Transkriptionsfaktoren. Als negative Kontrolle dient jeweils der leere Vektor, die positive Kontrolle (+) zeigt die NIMIN1 und NPR1 Interaktion an. Die untersuchten Proteine zeigen unterschiedliche Bindungsmuster in Bezug auf die getesteten Promotoren: negativ Kontrolle ohne Promotor (**B.**), der Promotor von Z280L (**C.**), Promotor von DNA-Polymerase Z798L (**D.**) und der 35S-Promotor (**E.**).

Im Vorfeld der eigentlichen Tests wurde sichergestellt, dass die zu testenden GAD-Fusionsproteine nicht mit dem leeren pRW95-3 Vektor interagieren können und somit eine Hintergrundbildung ausgeschlossen ist. Es wurde auch bei jedem Test sichergestellt, dass dieser funktional ist, indem eine positive Kontrolle (+) mit zwei stark interagierenden Proteinen mitgeführt wurde (NIMIN1 und NPR1) (Abbildung 2.8 B).

Der späte Promotor von Z280L zeigt einen Hintergrund bei der Bindung an den leeren Vektor, der sich auch in Anwesenheit von potenziellen Interaktionspartnern aus der Familie der bZIP-Transkriptionsfaktoren nicht stark verändert (Abbildung 2.8 C). Auch der frühe Promotor Z798L zeigt einen konstanten Hintergrund in allen Interaktionstests. Allerdings hebt sich die Intensität der Bindung von AtGBF1 deutlich vom Hintergrund ab und ist im Bereich von 30 Miller Einheiten auch sehr stark. Der Promotor mit dem Hex-Motiv TGACGTGG wird also stark von dem pflanzlichen Transkriptionsfaktor AtGBF1 gebunden, jedoch nicht von den Transkriptionsfaktoren aus Algen oder den TGA-Faktoren (Abbildung 2.8 D). Im Gegensatz dazu bindet der TGA6-Faktor aus *Arabidopsis thaliana* an den 35S-Promotor, welcher das *as1*-Element beinhaltet (Abbildung 2.8 E).

2.1.3.2 proZ798L interagiert mit GBF in Protoplasten

Um die Interaktionen zwischen dem proZ798L und GBF-Proteinen in einem Organismus zu überprüfen, der näher mit Algen verwandt ist, wurden die Experimente mit ausgewählten Transkriptionsfaktoren in Protoplasten wiederholt. Da proZ798L in Hefen eine sehr starke Bindung an AtGBF1 zeigte, wurde es erneut getestet. Zusätzlich wurde auch die an GAD fusionierte DNA-Bindedomäne aus *Chlorella*-Algen (CvGBF BD) getestet, um zu überprüfen ob in Pflanzen eine Interaktion stattfindet und um ggf. die Wirkung der Bindung zu beschreiben. Die ausgewählten Proteine wurden in einen Expressionsvektor unter Kontrolle des konstitutiv aktiven 35S-Promotors kloniert (pUC35S). Die getesteten Promotoren proZ280L, proZ798L und 35S befanden sich weiterhin in dem pUC18-GUS Vektor (Abbildung 2.9 A).

Sowohl die negative Kontrolle ohne Promotor als auch der proZ280L zeigen keine Aktivität in den Protoplasten. Die fehlende Aktivität kann auch nicht mit der zusätzlichen Expression der G-Box bindenden Faktoren in den Protoplasten verändert werden. Die Co-Transformation von AtGBF1 und GAD-CvGBF BD zeigt keine Wirkung auf die Aktivität des Z280L-Promotors (Abbildung 2.9 B und C).

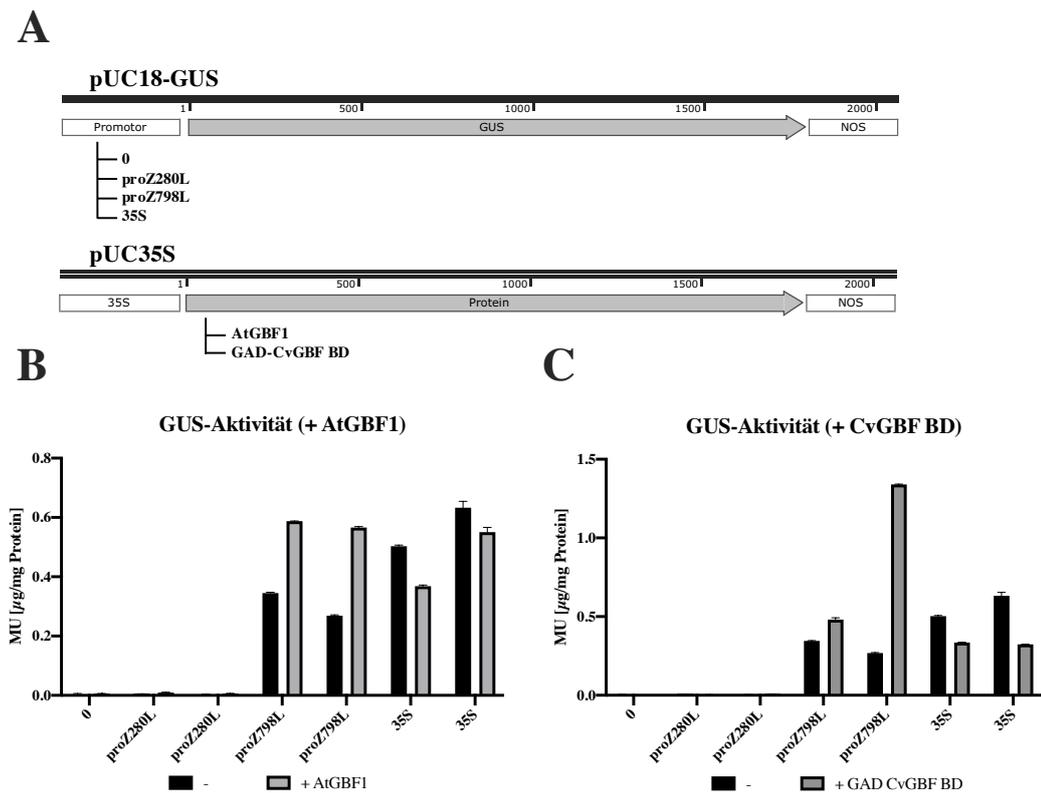


Abbildung 2.9 Einfluss von GBF-Transkriptionsfaktoren auf die Aktivität von proZ798L in Protoplasten.

A. Schematische Darstellung verwendeter Konstrukte im pUC18-GUS Vektor mit den untersuchten Promotoren. Die getesteten GBFs (AtGBF1 und die DNA-Bindedomäne aus dem CvGBF) sind in den pUC35S Expressionsvektor kloniert. Interaktionen zwischen den viralen Promotoren und AtGBF1 (**B.**) oder CvGBF BD (**C.**). GUS-Aktivität (GUS-Assay, Abschnitt 6.2.7) gemessen in Protoplasten aus *N. benthamiana* (in µg MU pro µg isoliertem Protein).

Die Co-Transformation von proZ798L mit AtGBF1 zeigt einen deutlichen Anstieg der umgesetzten Menge MU auf fast das Doppelte im Vergleich zu den einfach transformierten Protoplasten. Das deutet darauf hin, dass das

AtGBF1 nicht nur in der Lage ist, an den Promotor in Protoplasten zu binden, sondern auch dessen Aktivität erheblich zu erhöhen (Abbildung 2.9 B). Die Co-Transformation mit der GBF-DNA-Bindedomäne aus *Chlorella* zeigt auch einen deutlichen Anstieg der umgesetzten Menge von MU in den GUS-Assay Proben und somit eine erhöhte Expressionsrate von GUS-Gen in den Protoplasten (Abbildung 2.9 C). Die G-Box-Faktoren binden also an den proZ798L-Promotor und erhöhen dessen Aktivität, zumindest in pflanzlichen Zellen.

Im Gegensatz dazu wird die Aktivität des 35S-Promotors durch die Anwesenheit der beiden GBF-Transkriptionsfaktoren gehemmt. In beiden Fällen sinkt die umgesetzte Menge an MU in den untersuchten Proben. Das deutet darauf hin, dass die GBF-Faktoren zwar an den Promotor binden können, diese Bindung jedoch einen negativen Einfluss auf die Expressionsrate des GUS-Gens hat (Abbildung 2.9 B und C).

2.1.3.3 Für die Bindung von bZIP-TF an proZ798L ist die TGACGTGG-Sequenz wichtig

Um die Bedeutung des TGACGTGG-Motivs für die Bindung an die Transkriptionsfaktoren zu ermitteln, wurden die Y1H-Tests in Hefe mit den Deletionsmutanten von proZ798L: mpZ798L^{wt} und mpZ798L^{A-66G} wiederholt (Abbildung 2.5). Die beiden Minimalpromotoren wurden in den pRW95-3 Vektor kloniert und im Vergleich zu proZ798L getestet (Abbildung 2.10 A). Hierfür wurden die gleichen Transkriptionsfaktoren verwendet wie in den vorherigen Y1H-Tests (Abschnitt 2.1.3.1). Zusätzlich wurde ein humaner Transkriptionsfaktor aus der CREB-Familie getestet, das *cyclic AMP-responsive element-binding protein* (CREB3L3), das die höchste Ähnlichkeit zu den G-Box bindenden Faktoren aus den Algen zeigt.

Durch das Verkürzen des proZ798L auf das Minimum (Minimalpromotor) wird der Hintergrund in den Y1H-Test deutlich reduziert. Die Deletionsmutante mpZ798L^{wt} bindet allerdings immer noch stark an den G-Box bindenden Faktor aus *A. thaliana* (Abbildung 2.10 C). Im Gegensatz dazu wird bei der Punktmutante mpZ798L^{A-66G} fast kein Hintergrund gemessen, zudem ist die Bin-

dung an AtGBF1 nicht mehr vorhanden (Abbildung 2.10 D). Der wildtypische Minimalpromotor von Z798L zeigt somit eine höhere Spezifität aber auch eine schwächere Bindung an den G-Box-Transkriptionsfaktor aus *Arabidopsis* als die lange Variante (Abbildung 2.10 B), wobei die Bindung immer noch stark ist. Der mutante mpZ798L mit dem veränderten Hex-Motiv wird nicht mehr von dem AtGBF1 Faktor gebunden.

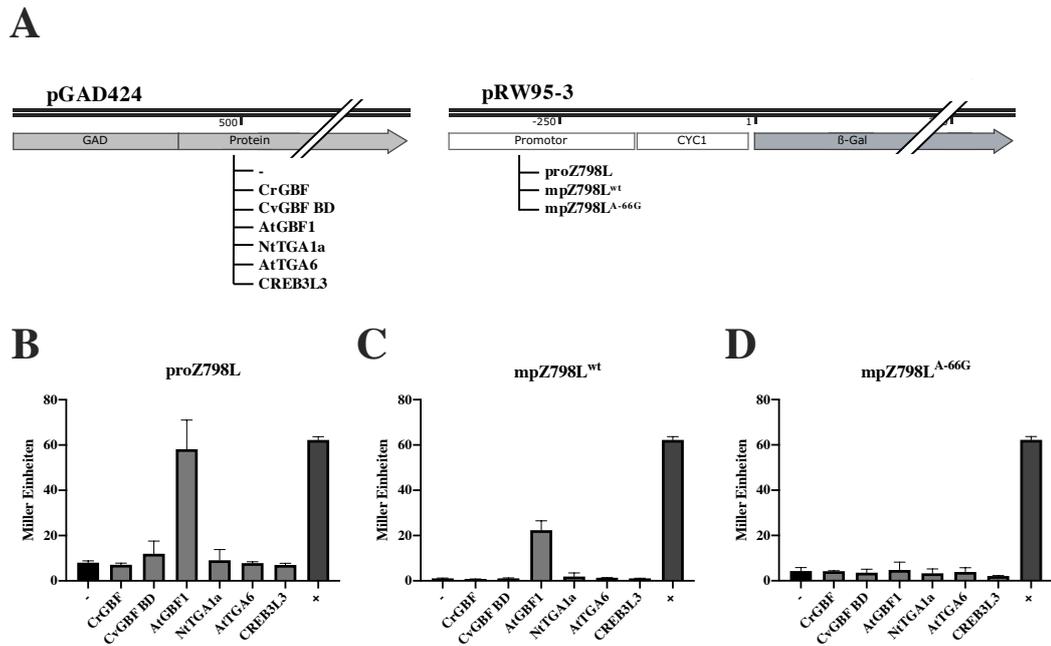


Abbildung 2.10 Punktmutation im TGACGTGG-Motiv wirkt sich negativ auf die Bindung von TFs an proZ798L aus.

A. Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte in den pGAD424 und pRW95-3 Vektoren zur Untersuchung der Protein-DNA-Interaktion in Hefe. Die in den pGAD424 klonierten Transkriptionsfaktoren gehören zu den Gruppen der GBF-TF (AtGBF1, CrGBF und CvGBF BD), TGA-TF (NtTGA1a, AtTGA6) und CREB-(CREB3L3) Transkriptionsfaktoren. Als negative Kontrolle dient jeweils der leere Vektor. Im Vergleich zu proZ798L (**B**) zeigt die untersuchte Deletionmutante: mpZ798L^{wt} (**C**) sowie die Punktmutante mpZ798L^{A-66G} (**D**) unterschiedliche Bindungsstärke an die TF.

2.2 Frühe Promotoren mit TATA- und Hex-Motiv werden wie proZ798L reguliert

Die Aktivität von proZ798L wurde weitgehend beschrieben und die mit dem Promotor interagierenden Transkriptionsfaktoren konnten identifiziert werden. Somit wurde ein Mechanismus zur Regulation der Expression von Genen gefunden, die ein Hex-Motiv in ihrem Promotor enthalten. Diese Art der Genregulation wird wahrscheinlich zur Regulation weiterer Gene verwendet. Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob es weitere ATCV-1 Gene gibt, die über das Hex-Motiv reguliert werden.

2.2.1 Charakterisierung ausgewählter Promotoren

Die Hex-Sequenz ist ein wichtiges Element von proZ798L. Es ist sowohl für die Aktivität des Promotors als auch für die Interaktionen mit G-Box bindenden Transkriptionsfaktoren essenziell. Aus diesem Grund wurden weitere ATCV-1 Promotoren gesucht, die diese Consensus-Sequenz beinhalten. Damit die Experimente validierbar sind, wurden Promotoren bekannter früher Genen ausgewählt, welche diese Consensus-Sequenz nicht beinhalten. Zudem wurden auch Promotoren später Gene untersucht oder aber Promotoren, die konstitutiv aktiv sind.

Die Suche nach dem TGACGTGG-Motiv im Genom von ATCV-1 ergibt insgesamt 11 Treffer. Die Sequenzen sind im gesamten Genom verteilt. Vereinzelt treten diese TGACGTGG-Sequenzen in einem codierenden Bereich auf und können keinem Promotor zugeordnet werden. Die übrigen sieben Motive liegen in Promotorregionen von codierenden Bereichen für hypothetische Gene: Z174L, Z326R, Z338R, Z765R, Z798L und Z852L. ORF Z338L und Z852L können nicht identifiziert werden. Ihre Funktion bleibt weitgehend unerforscht, daher kann auch nicht bestimmt werden ob es sich hier um frühe oder späte Gene handelt. Die verbleibenden drei offenen Leserahmen weisen Ähnlichkeiten zu Proteinen auf, die früh in der Infektion exprimiert werden. Diese Proteine sind meistens an der Regulation der Genexpression beteiligt. ORF Z174L enthält eine Domäne, die Ähnlichkeiten zu einem *Effector of Transcription* aufweist.

Z765R codiert wahrscheinlich für einen Transkriptionsfaktor und Z326R weist Ähnlichkeiten zu einem *Viral Late Transkription Faktor 3* (VLTF3) auf. Diese möglichen Funktionen sowie der Aufbau der Promotoren von diesen Genen zeigen Ähnlichkeiten zu dem Promotor von Z798L. Deswegen wurden die Promotoren dieser drei hypothetischen Proteinen genauer untersucht.

Die Promotorregion von Z174L (proZ174L) wird auf 279 bp vor dem Transkriptionsstart definiert. Der 279 bp Bereich beinhaltet drei Consensus-Sequenzen, die für Interaktionen mit eukaryotischen Proteinen bekannt sind. Die Kozak-Sequenz (*Kozak consensus sequence* [Kozak 1987]) befindet sich für gewöhnlich in unmittelbarer Nähe des Transkriptionsstarts und dient der Erkennung am Ribosomen. Die Sequenz ist wichtig für den Start der Translation und somit für die Proteinbiosynthese. Beim Promotor von Z174L befindet sich die Kozak-Sequenz 261 bp vor von dem Transkriptionsstart (von -261 bis -252 bp), was darauf hindeutet, dass sie einem anderen Gen gehört. Des Weiteren beinhaltet der Promotor von Z174L die Hex-Sequenz TGACGTGG (von -135 bis -128 bp), sowie eine TATA-Box 84 bp vor dem Transkriptionsstart (Abbildung 2.11 C). Die Promotorregion von Z326R (proZ326R) wird auf 308 bp vor dem Transkriptionsstart definiert. Dieser Bereich beinhaltet lediglich die Zielsequenz für die G-Box-bindenden Transkriptionsfaktoren (-124 bis -116 bp). Eine TATA-Box ist nicht vorhanden (Abbildung 2.11 D). Die Promotorregion von Z765R (proZ765R) wird auf 228 bp vor dem Transkriptionsstart erweitert. Dieser Bereich beinhaltet die Consensus-Sequenz TGACGTGG doppelt; 125 bp und 106 bp vor dem Transkriptionsstart. Im Promotor von Z765R tritt eine bestimmte 19 Nukleotid lange Sequenz doppelt auf: CTGACGTGGTTGTCATTTG. Diese Sequenz enthält das Hex-Motiv und deutet auf eine Duplikation der Sequenz hin. Die TATA-Box befindet sich im Bereich von -69 bis -64 bp (Abbildung 2.11 E).

Zusätzlich wird ein Promotor eines bekannten frühen Gens ausgewählt. Der ORF Z063L codiert für eine Ribonuklease III (RNase III), ein Enzym das RNA binden und schneiden kann [Fitzgerald *et al.*, 2007]. Der Promotor von Z063L (proZ063L) wird hier auf den Bereich 438 bp vor Transkriptionsstart erweitert.

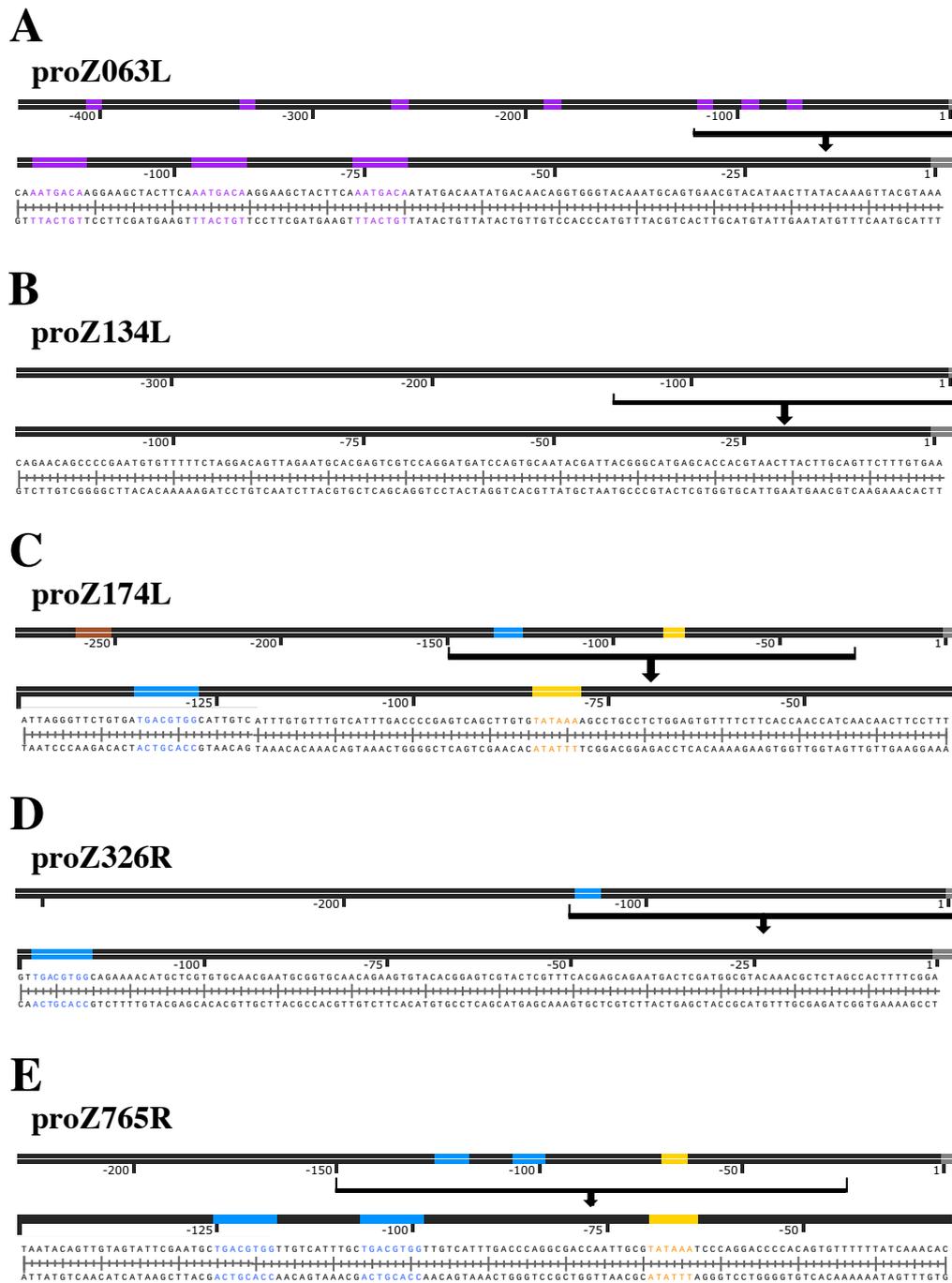


Abbildung 2.11 DNA-Sequenzen von proZ063L (A), proZ134L (B), proZ174L (C), proZ326R (D) und proZ765R (E). Schematische Darstellung der amplifizierten Promotorregionen mit markierten Consensus-Sequenzen für bekannte Transkriptionsfaktoren: TATA-Box (orange), Hex-Motiv (blau), Kozak-Sequenz (braun), Transkriptionsstart (grau) und Sequenz für frühe Promotoren in den Chloroviren (lila). Die markierten Bereiche (120 bp) sind detailliert dargestellt.

Der Bereich beinhaltet weder eine TATA-Box noch die Zielsequenzen für die G-Box bindenden Transkriptionsfaktoren. proZ063L enthält eine AATGACA-Sequenz, die in frühen Promotoren von Chloroviren vermehrt auftritt. Definiert wurde sie auf Basis der Untersuchungen des Genoms von PBCV-1. Diese Sequenz dient daher zur Erkennung von frühen Promotoren der Chloroviren [Fitzgerald *et al.*, 2008]. In dem 438 bp Bereich des proZ063L ist sie insgesamt 7 mal enthalten, wobei lediglich die drei Wiederholungen im Bereich von 150 bp vor dem Transkriptionsstart relevant sind (Abbildung 2.11 A). Die AATGACA-Sequenz ist allerdings auch in dem Promotor von Z280L vorhanden, der keinerlei Aktivität in den vorangegangenen Tests zeigte und als später Promotor definiert wird. Ein weiterer, getesteter Promotor ist proZ134L, der sich vor dem ORF Z134L befindet. ORF Z134L codiert für ein Glutaredoxin (GrxC), ein Gen das als früh/spät aktiv bezeichnet wird und somit konstitutive Aktivität während der Virusinfektion zeigt. Dieser Promotor enthält keine bekannten Promotorelemente (Abbildung 2.11 B).

2.2.2 Frühe virale Promotoren sind aktiv in Algen

Um die Aktivität der Promotoren in *C. reinhardtii* zu untersuchen, wurden die entsprechenden Promotorregionen von proZ063L, proZ174L, proZ326R, und proZ765R vor das Reportergen *ARG7* in den pARG7 Vektor kloniert. Das ermöglichte eine direkte Auswertung der Promotoraktivität. Die mutanten Algenklone, welche auf dem Medium ohne Arginin wachsen konnten, wurden einzeln kultiviert und auf die Aktivität der Argininosuccinat-Lyase durch Wachstumstests und Nachweis der Argininbildung getestet. Als Kontrollen dienten der pARG7 Vektor ohne Promotor (0), der konstitutiv aktive Algenpromotor des *ARG7*-Gens (proARG7), sowie der schon positiv getestete Z798L-Promotor (Abbildung 2.12 A).

Die Transformationseffizienz wird aus der Kolonienzahl pro 1 µg eingesetzter DNA errechnet. Alle ausgewählten frühen Promotoren des ATCV-1 zeigen eine hohe Transformationseffizienz und somit auch, dass diese Promotoren in den Algen aktiv sind. Die Promotoren mit der Sequenz TGACGTGG weisen eine Transformationseffizienz auf, die vergleichbar ist, mit der Effizienz des

Polymerase-Promotors und der positiven Kontrolle. Die Effizienz der Algen-transformation, die das *ARG7*-Gen unter Kontrolle des Z063L-Promotors exprimieren, ist deutlich höher als die Effizienz der anderen Promotoren. Der Promotor von Z326R, zeigt trotz vorhandener Hex-Sequenz keine Aktivität in den Algen und die Transformation resultierte in nur wenigen Kolonien. Diese sind nicht weiter angewachsen (Abbildung 2.12 B).

Die Aktivität der Promotoren von Z063L, Z174L, Z765R, sowie Z798L und *ARG7*, lässt sich mit Hilfe von ASL-Assays ebenfalls nachweisen. Die Promotoren von Z174L und Z765R zeigen eine hohe Aktivität, die der Aktivität von proZ798L gleicht. Die Aktivität des Z063L-Promotors ist deutlich höher als die von proZ798L. Die nachgewiesene Menge von Arginin ist in den Algenproben mit *ARG7* unter der Kontrolle von proZ063L fast doppelt so groß wie die von proZ798L-Proben (Abbildung 2.12 C). Die deutlich erhöhten Werte des zweiten Tests (Abbildung 2.12 C, rechts) sind auf die Versuchsdurchführung zurückzuführen. So gibt es Unterschiede in der Expressionsstärke der Algenzellen allgemein, die jedoch von den Promotoren unabhängig sind.

Der Nachweis der im Algengenom integrierten Vektor-DNA erfolgte hier über zwei Schritte. Mit Hilfe sequenzspezifischer Primer wurde nicht nur der entsprechende Promotor nachgewiesen, sondern auch das *ARG7*-Gen. Der Nachweis der Vektor-DNA war für alle getesteten Konstrukte erfolgreich und bestätigt, dass die Aktivität des *ARG7*-Gens auf die davor klonierte Promotorregionen zurückzuführen ist (Abbildung 2.12 D).

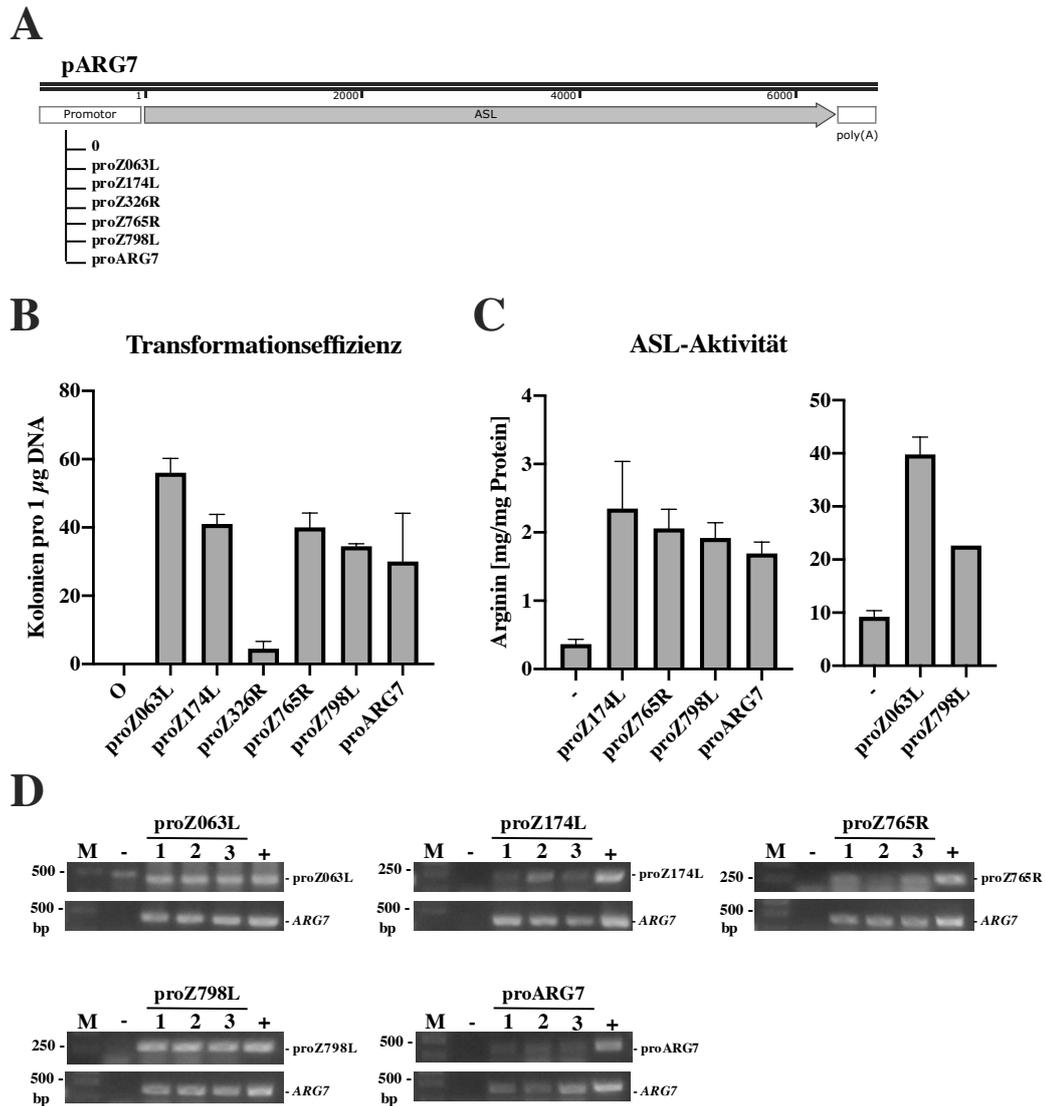


Abbildung 2.12 Frühe virale Promotoren sind aktiv in Algen.

A. Schematische Darstellung verwendeter Konstrukte im pARG7 Vektor mit den untersuchten Promotoren: proZ063L, proZ174L, proZ326R und proZ765R, sowie der negativen Kontrolle ohne Promotor (0) und positiven Kontrollen (proARG7, proZ798L). **B.** Transformationseffizienz der einzelner Transformationen mit den untersuchten Konstrukten [Kolonien pro µg DNA]. **C.** Nachweis der Aktivität von ASL (ASL-Assay, Abschnitt 6.2.6) in den untersuchten Mutanten. Negative Kontrolle (-) entspricht den untransformierten *C. reinhardtii*. **D.** Nachweis der Vektor-DNA im Genom von positiven Algenklonen.

2.2.3 Frühe virale Promotoren mit TATA- und Hex-Motiv sind in Protoplasten aktiv

Die Aktivität der Promotoren in Protoplasten wurde, wie schon zuvor, mit Hilfe eines GUS-Assay bestimmt. Die Protoplasten wurden mit der entsprechenden Vektor-DNA transformiert. Die daraus entstandenen Proteinproben wurden auf GUS-Aktivität über den Nachweis von gebildetem MU getestet (Abschnitt 6.2.7). Das *uidA*-Gen, das für die β -Glucuronidase codiert befindet sich in dem pUC18-GUS Vektor und wird von dem davor klonierten Promotor reguliert. Für den Test der Aktivität wurden alle bisher untersuchten Promotoren verwendet und in zwei unabhängigen Transformationen transient in die Protoplasten gebracht (Abbildung 2.13 A).

Der Promotor von Z063L, dem frühen Gen von ATCV-1, der für die RNase III codiert, zeigt keine Aktivität in den Pflanzen. Die leicht erhöhten Werte sind hier auf dem Niveau von der negativen Kontrolle ohne Promotor (Hintergrund). Gleichermaßen verhalten sich auch die Promotoren von dem späten Gen, der für das Kapsid des Virus codiert (Z280L), sowie von dem früh/späten Gen von Glutharedoxin (Z134L). Auch der Promotor von Z326R, der eine Hex-Sequenz jedoch keine TATA-Box beinhaltet, bleibt inaktiv (Abbildung 2.13 B). Mit Hilfe von GUS-Assays lässt sich, neben der Aktivität von dem proZ798L, auch die Aktivität von den Promotoren proZ174L und proZ765R nachweisen. Beide Promotoren zeigen eine sehr starke Aktivität, die zu entsprechender Anreicherung von MU in den getesteten Proben führt. Die Menge an MU, die in den Proben synthetisiert wird, deren *uidA*-Expression von dem proZ174L reguliert wird, liegt im Bereich von durchschnittlich 1,7 μ g nach 2 h Inkubation. Das ist nur geringfügig weniger als die MU-Menge, die bei der *uidA*-Expression unter der Kontrolle des 35S-Promotors gebildet wird. Die Anreicherung von MU bei den Algenproben, deren *uidA*-Expression von dem proZ765R reguliert wird, liegt im Bereich von durchschnittlich 1,4 μ g. Beide Promotoren zeigen eine höhere Aktivität als der Polymerase-Promotor. Die Anreicherung von MU kann auch über die Fluoreszenz unter UV-Licht beobachtet werden (Abbildung 2.13 B). Sowohl proZ174L als auch proZ765R beinhalten eukaryotische Promotorelemente, die bei dem Polymerase-Promotor für die Aktivität essenziell sind.

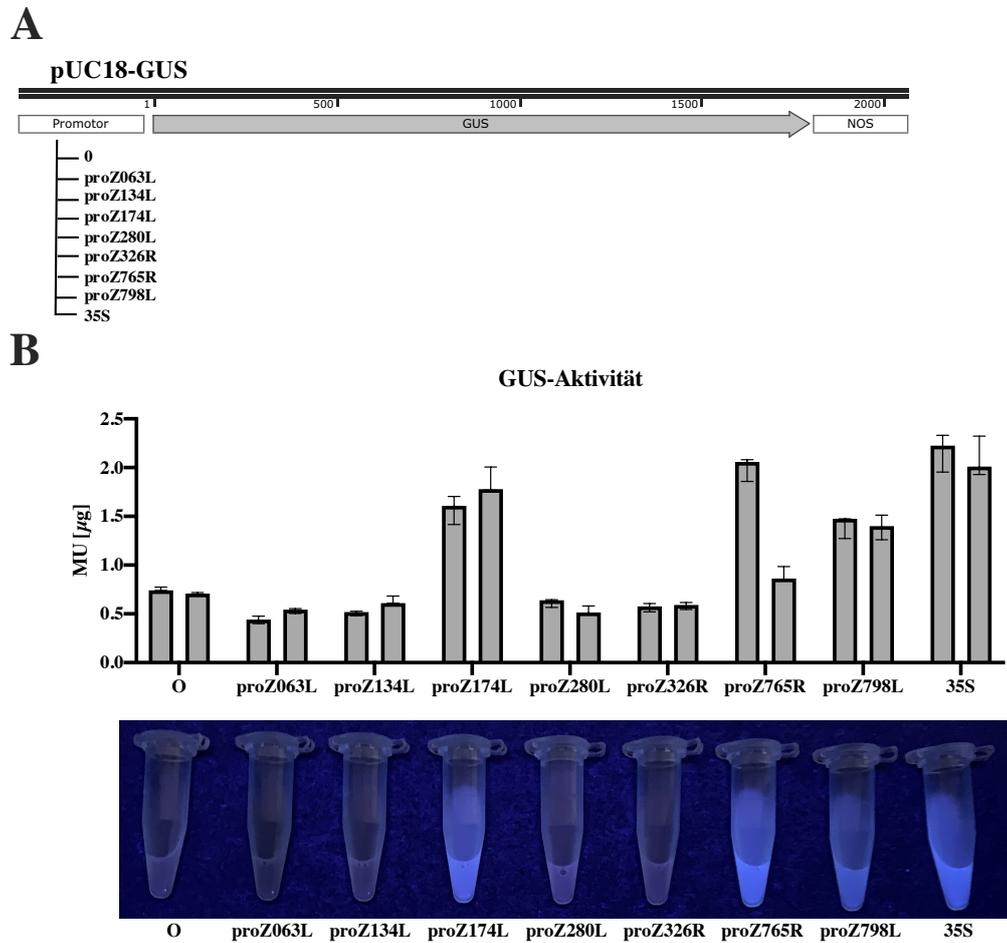


Abbildung 2.13 Frühe virale Promotoren zeigen Aktivität in Protoplasten.
A. Schematische Darstellung verwendeter Konstrukte im pUC18-GUS Vektor mit den untersuchten Promotoren: proZ063L, proZ174L, proZ280L, proZ326R und proZ765R, sowie der negativen Kontrolle ohne Promotor (0) und positiven Kontrollen (35S, proZ798L). **B.** GUS-Aktivität (GUS-Assay, Abschnitt 6.2.7) gemessen in Protoplasten isoliert aus *N. benthamiana* (in µg MU pro ml Proteinextrakt), sowie Nachweis der GUS-Aktivität unter UV-Licht bei 395 nm.

2.2.4 Promotoren ohne Hex-Motiv zeigen keine Aktivität in Algen und Protoplasten

Die Bedeutung des Hex-Motivs für die Aktivität der Promotoren in Algen und Pflanzen wurde für zwei weitere Promotoren bestätigt. Als nächstes sollte nachgewiesen werden, dass auch bei den Promotoren proZ174L und proZ765R die Hex-Sequenz für die Aktivität in Pflanzen und Algen essenziell ist. Hierfür wurden zwei Promotorvarianten synthetisiert. Zum einem wurde eine kurze Variante der beiden Promotoren mit unveränderter Nukleotidsequenz synthetisiert. Diese verkürzte Version sollte vor allem Aufschluss darüber geben, wie lang die Promotoren von ATCV-1 sind. Zudem diene es als Kontrolle der mutanten Form des Promotors. Zum anderem sollte eine weitere kurze Variante der Promotoren mit den deletierten TGACGTGG-Sequenzen synthetisiert werden. Diese verkürzten Promotorvarianten sollten über die Bedeutung der Hex-Sequenz für die Promotor-Aktivität Aufschluss geben. Die verkürzten Varianten eines Promotors, die nur die wesentlichen Promotorelemente beinhalten werden Minimalpromotor genannt.

Die kurze Variante von proZ174L umfasst 75 Nukleotide zwischen -144 und -70 bp vor dem Transkriptionsstart und wird als Minimalpromotor mpZ174L^{wt} bezeichnet. Die mutante Variante mpZ174L^{del} umfasst denselben Promotorbereich, beinhaltet allerdings kein Hex-Motiv mehr. Der Bereich zwischen -135 und -128 bp ist deletiert. Die Länge des Minimalpromotors verkürzt sich somit auf 67 Basenpaare (Abbildung 2.14 A).

Analog wird auch der Minimalpromotor von Z765R gestaltet. Die kurze Variante von proZ765R umfasst 80 Nukleotide zwischen -134 und -55 bp und wird als mpZ765R^{wt} bezeichnet. Die mutante Variante davon mit den deletierten Hex-Sequenzen, mpZ765R^{del}, umfasst lediglich 59 Nukleotide. Die beiden Bereiche zwischen -125 und -118 bp, sowie -106 und -99 bp sind deletiert (Abbildung 2.14 B).

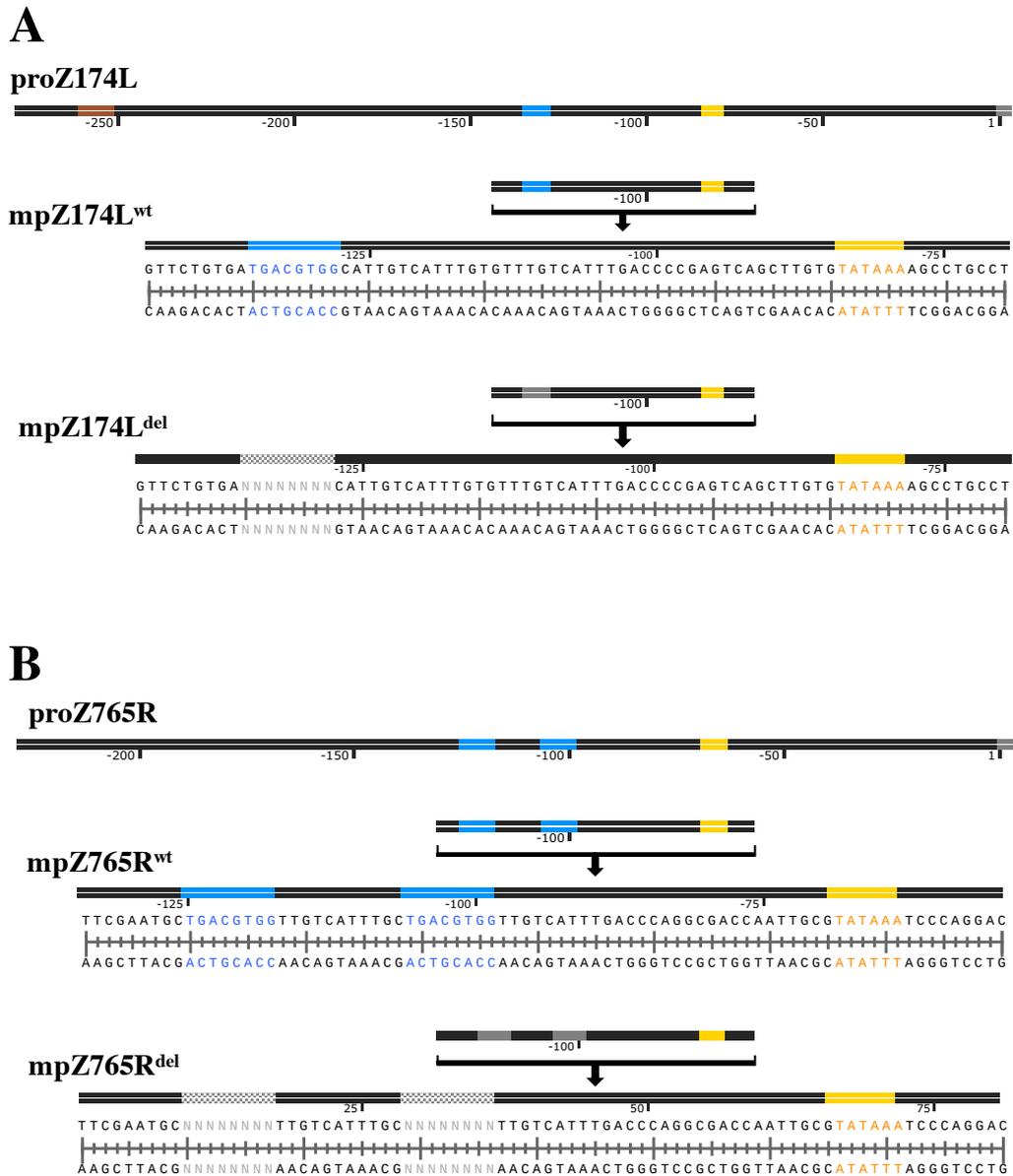


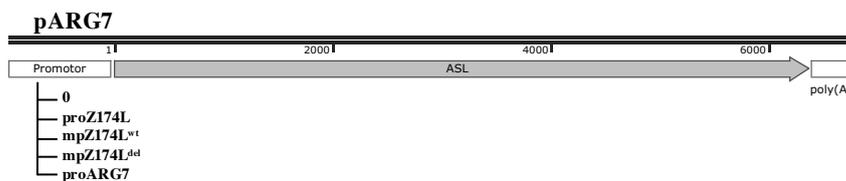
Abbildung 2.14 Sequenzen der Z174L und Z765RL Minimalpromotor-Varianten. Die Consensus-Sequenzen für bekannte Transkriptionsfaktoren sind markiert: TATA-Box (orange), Hex-Motiv (blau), Kozak-Sequenz (braun) sowie Transkriptionsstart (grau). Die markierten Bereiche sind detailliert dargestellt. **A.** Sequenzen von Z174L Minimalpromotor-Varianten. Darstellung des 279bp-Bereichs *upstream* von ORF Z174L (proZ174L), sowie des 75bp-Bereichs in wildtypischer (mpZ174L^{wt}) und mutanter Form (mpZ174L^{del}). **B.** Sequenzen von Z765R Minimalpromotor-Varianten. Darstellung des 228bp-Bereichs *upstream* von ORF Z765L (proZ765L), sowie des 80bp-Bereichs in wildtypischer (mpZ765R^{wt}) und mutanter Form (mpZ765R^{del}).

2.2.4.1 Deletion des Hex-Motivs führt zum Verlust der Promotoraktivität in Algen

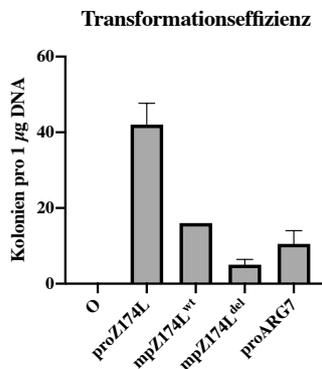
Die generierten Varianten der Promotoren von Z174L und Z765R (Abbildung 2.14) wurden in den pARG7 Vektor kloniert und konnten die Aktivität des *ARG7*-Gens regulieren. In allen Versuchsreihen wurden die gleichen Kontrollen verwendet: die negative Kontrolle ohne Promotor (0) und die positive Kontrolle mit dem konstitutiv aktiven proARG7. Sowohl bei den Minimalpromotoren von Z174L (Abbildung 2.15 A) als auch bei proZ765R (Abbildung 2.16 A), wurden die langen Promotorvarianten zum Vergleich herangezogen.

proZ174L

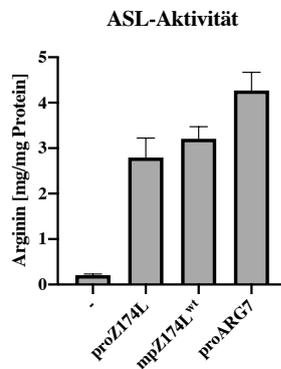
A



B



C



D

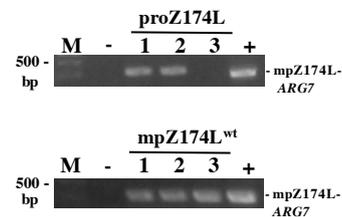


Abbildung 2.15 Deletion des Hex-Motivs wirkt sich negativ auf die Aktivität des Z174L-Promotors aus.

A. Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte im pARG7 Vektor mit den untersuchten Z174L-Promotorvarianten: proZ174L, mpZ174L^{wt}, mpZ174L^{del}, negativer Kontrolle ohne Promotor (0) und positiver Kontrolle (proARG7). **B.** Transformationseffizienz der einzelnen Transformationen von *C. reinhardtii* mit den untersuchten Konstrukten [Kolonien pro µg DNA]. **C.** Nachweis der Aktivität von ASL in den untersuchten Proteinproben (Abschnitt 6.2.6). Negative Kontrolle (-) entspricht den untransformierten *C. reinhardtii*. **D.** Nachweis der Vektor-DNA im Genom von mutanten Algenklonen.

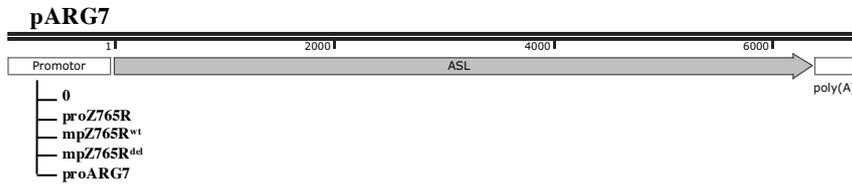
Nach der erfolgreichen Transformation der Algen mit der entsprechenden Vektor-DNA, wurde zuerst die Transformationseffizienz in Abhängigkeit von der eingesetzten DNA ermittelt. Der proZ174L-Promotor zeigt erneut eine sehr starke Aktivität in Algen. Diese resultiert in einer hohen Transformationseffizienz von durchschnittlich 42 Kolonien pro 1 µg eingesetzter DNA. Die Aktivität der Kurzvarianten des Promotors ist deutlich geringer. Die Effizienz der Algentransformation mit der wildtypischen Kurzvariante mpZ174L^{wt} vor dem *ARG7*-Gen ist deutlich geringer als die der langen Variante (16 Kolonien pro 1 µg eingesetzter DNA). Die mutante Kurzvariante zeigt nur eine geringe Transformationseffizienz. Die Expression von dem *ARG7*-Gen unter der Kontrolle des mpZ174L^{del}, ist nicht ausreichend, um das Wachstum der Algen auf dem selektiven Medium zu ermöglichen (Abbildung 2.16 B). Die Algenkolonien konnten nicht kultiviert werden und konnten somit auch nicht in den ASL-Assays getestet werden.

Die ASL-Aktivität konnte mit Hilfe der ASL-Assays ermittelt werden. Die Proteinproben aus je drei hochgewachsenen Algenkolonien in denen das *ARG7*-Gen unter der Kontrolle des proZ174L und mpZ174L^{wt} exprimiert wurde, wurden in den Assays eingesetzt. Die ASL-Aktivitätsassays zeigen eine vergleichbare Akkumulation von Arginin in beiden Proben (ca. 3 mg Arginin pro mg Protein). Das deutet auf die ähnliche Stärke der beiden wildtypischen Promotorvarianten in den Algenzellen hin (Abbildung 2.15 C).

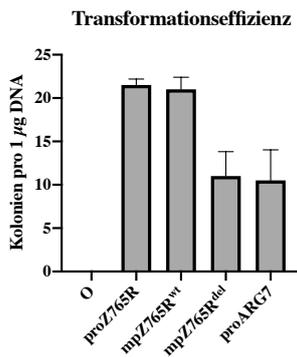
Die im Algengenom integrierte Vektor-DNA wurde mit Hilfe von sequenzspezifischen Primern nachgewiesen. Es wurde nicht nur der entsprechende Promotor nachgewiesen, sondern auch das *ARG7*-Gen. Die Primer binden im Promotorbereich und im Gen. Das amplifizierte Fragment beinhaltet einen Teil des Promotors sowie des *ARG7*-Gens und weist das entsprechende Konstrukt nach (ca. 400 bp). Der Nachweis der Vektor-DNA war für alle im ASL-Assay getesteten Konstrukte erfolgreich (im ASL-Assay wurden nur die zwei aus dem DNA-Test positive Algenstämme getestet). Der Nachweis der DNA bestätigt, dass die Aktivität des *ARG7*-Gens auf die davor klonierten Promotorregionen zurückzuführen ist (Abbildung 2.12 D).

proZ765R

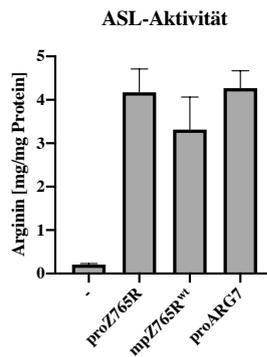
A



B



C



D

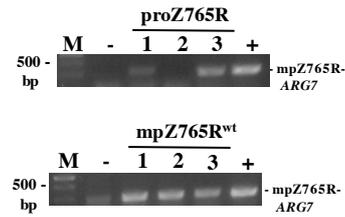


Abbildung 2.16 Deletion des Hex-Motivs wirkt sich negativ auf die Aktivität des proZ765R aus.

A. Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte im pARG7 Vektor mit den untersuchten Z765R-Promotorvarianten: proZ765R, mpZ765R^{wt}, mpZ765R^{del}, negativer Kontrolle ohne Promotor (0) und positiver Kontrolle (proARG7). **B.** Transformationseffizienz der einzelnen Transformationen von *C. reinhardtii* mit den untersuchten Konstrukten [Kolonien pro µg DNA]. **C.** Nachweis der Aktivität von ASL in den untersuchten Mutanten (Abschnitt 6.2.6). Negative Kontrolle (-) entspricht den untransformierten *C. reinhardtii*. **D.** Nachweis der Vektor-DNA im Genom von mutanten Algenklonen.

Der proZ765R-Promotor zeigt eine ähnliche Aktivität wie der Promotor von Z174L. Die Transformationseffizienz der Proben die *ARG7* unter der Kontrolle von proZ765R exprimieren ist doppelt so hoch wie die der positiven Kontrolle. Die wildtypische Kurzvariante des Promotors mpZ765R^{wt} zeigt eine vergleichbare Transformationseffizienz. Das deutet auf eine ebenso hohe Aktivität in den Algenzellen hin. Im Gegensatz dazu ist die Aktivität des mutanten Promotors, mpZ765R^{del}, deutlich reduziert (Abbildung 2.16 B). Die hohe Aktivität der wildtypischen Kurzvariante des Promotors spiegelt sich in den Ergebnissen der ASL-Assays wider. Hier ist die Aktivität der beiden Mutanten gleich groß und auf dem Niveau der positiven Kontrolle (ca. 4 mg Arginin). Die mutante

Kurzvariante des Promotors (mpZ765R^{del}) zeigt hier eine sehr große Transformationseffizienz. Diese ist vergleichbar mit der Aktivität von proARG7 (Abbildung 2.16 B). Allerdings starben die Kolonien innerhalb weniger Wochen nach der Zählung ab und liessen sich nicht weiter kultivieren (Abbildung 2.16 C).

Die im Algengenom integrierte Vektor-DNA wurde mit Hilfe der sequenzspezifischen Primer nachgewiesen. Diese wurden entsprechend der Primer zur Detektion von Z174L-Promotorvarianten ausgewählt. Der Nachweis der Vektor-DNA ist für alle im ASL-Assay getesteten Konstrukte erfolgreich gewesen (im ASL-Assay wurden nur die zwei aus dem DNA-Test positive Algenstämme getestet). Der Nachweis der DNA bestätigt, dass die Aktivität des *ARG7*-Gens auf die davor klonierte Promotorregionen zurückzuführen ist (Abbildung 2.16 D).

2.2.4.2 Deletion vom Hex-Motiv führt zum Verlust der Promotoraktivität in Pflanzen

Wie schon in Algen wurden die Promotoren auch in pflanzlichen Zellen getestet (Protoplasten von *N. benthamiana*). Die Vektor-DNA wurde mit Hilfe der transienten Transformation in die Zellen eingebracht. Mit entsprechenden Konstrukten in dem pUC18-GUS Vektor wurde sichergestellt, dass das *uidA*-Gen unter der Kontrolle eines bestimmten Promotors exprimiert wurde. Hierfür wurden die Minimalpromotoren vor das Reportergen kloniert. Zum Vergleich wurden die langen Varianten des proZ174L (Abbildung 2.17 A), sowie des proZ765R (Abbildung 2.18 A) herangezogen. Als negative Kontrolle diente ein Konstrukt ohne Promotor, als positive Kontrolle der ARG7-Promotor aus *C. reinhardtii*.

proZ174L

Die Menge an umgesetztem MU in den Proteinproben aus Protoplasten, bei denen das Reportergen unter der Kontrolle der mutanten Kurzvarianten von proZ174L exprimiert wird, ist vergleichbar mit der negativen Kontrolle. Es wird kein MU umgesetzt, was auf fehlende GUS-Aktivität zurückzuführen ist. Somit zeigen beide Minimalpromotoren, mit und ohne Hex-Motiv, keine messbare Aktivität in pflanzlichen Zellen. Allein das Verkürzen des Promotors führt

zur dessen Inaktivierung. Die lange Variante des Promotors bleibt aktiv und zeigt eine doppelt so hohe Aktivität wie der 35S-Promotor (Abbildung 2.17 B).

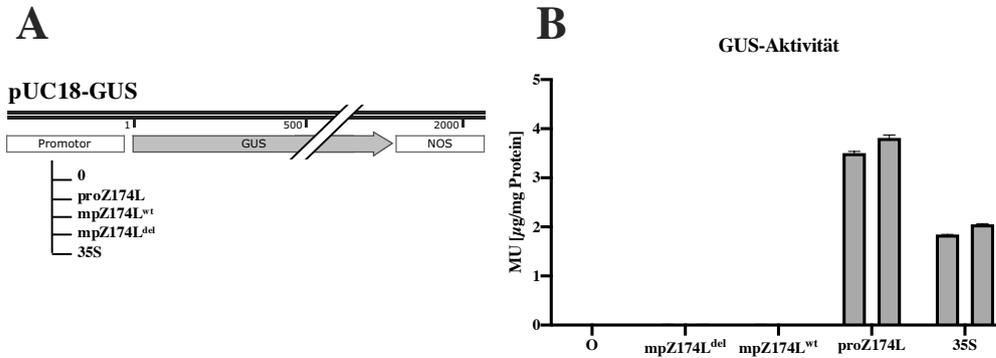


Abbildung 2.17 Kurzvarianten von proZ174L sind inaktiv in Protoplasten. **A.** Schematische Darstellung verwendeter Konstrukte im pUC18-GUS Vektor mit den untersuchten Z174L-Promotorvarianten: proZ174L, mpZ174L^{wt}, mpZ174L^{del}, negativer Kontrolle ohne Promotor (0) und positiver Kontrolle (35S). **B.** GUS-Aktivität (GUS-Assay, Abschnitt 6.2.7) gemessen in Protoplasten aus *N. benthamiana* (in µg MU pro µg isoliertem Protein).

proZ765R

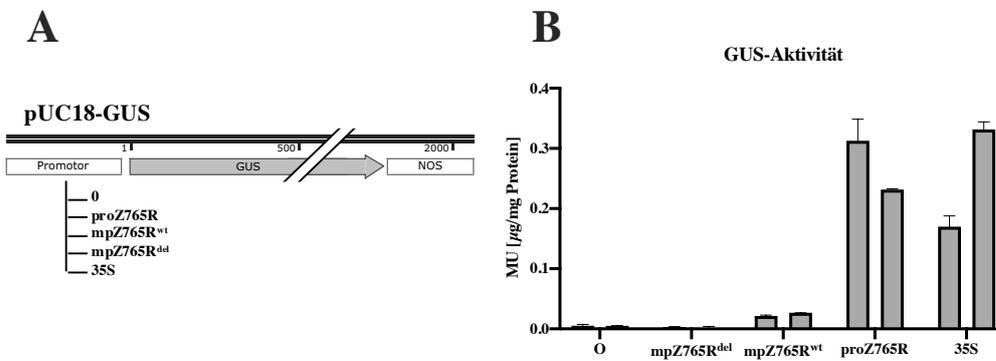


Abbildung 2.18 TGACGTGG-Motive sind essenziell für die Aktivität des Z765R-Promotors in Protoplasten. **A.** Schematische Darstellung verwendeter Konstrukte im pUC18-GUS Vektor mit den untersuchten Z765R-Promotorvarianten: proZ765R, mpZ765R^{wt}, mpZ765R^{del}, negativer Kontrolle ohne Promotor (0) und positiver Kontrolle (35S). **B.** GUS-Aktivität (GUS-Assay, Abschnitt 6.2.7) gemessen in Protoplasten aus *N. benthamiana* (in µg MU pro µg isoliertem Protein).

Der Promotor von Z765R hingegen, ist auch in seiner kurzen Form in den pflanzlichen Zellen aktiv. Das Verkürzen des Promotors führt zur Minderung der Aktivität, dennoch kann eine niedrige Umsetzung des Substrates nachgewiesen werden (0,2 µg MU). Die Deletionsmutante mpZ765R^{del} zeigt keine Aktivität in Pflanzen. Das fehlende Hex-Motiv ist demnach essenziell für die Aktivierung des pflanzlichen Transkriptionsinitiations-Komplexes (Abbildung 2.18 B).

2.2.5 Die Aktivität der frühen Promotoren mit Hex-Motiv lässt sich auf die Bindung von GBF zurückführen

Die vorangegangenen Experimente beweisen, dass die Promotoren von Z174L und Z765R ähnlich wie der Polymerase-Promotor reguliert werden. Die beiden Promotoren sind sowohl in Algen als auch in Pflanzen aktiv und diese Aktivität hängt unmittelbar von dem Hex-Motiv ab. Da das Hex-Motiv als die Zielsequenz für die Bindung der G-Box bindenden Faktoren fungiert, sollte im nächsten Schritt die Interaktion des Promotors mit den potenziellen Transkriptionsfaktoren geklärt werden. Vor allem sollte geklärt werden, ob die Promotoren von Z174L und Z765R, wie auch schon proZ798L, von den G-Box bindenden Faktoren gebunden werden können und welche Auswirkung diese Bindung auf die Aktivität dieser Promotoren hat. Hierfür wurden zwei unabhängige Systeme verwendet; zum einen das Y1H-System in Hefe, zum anderen der GUS-Reportergen-Assay in den pflanzlichen Zellen, ein den Algen näher verwandtes System.

2.2.5.1 Promotoren mit TGACGTGG-Sequenz interagieren mit bZIP-Transkriptionsfaktoren in Hefe

Um die Bindung von Transkriptionsfaktoren an den Promotoren nachzuweisen, wurde das Hefe-1-Hybrid System verwendet. Dies ermöglicht die Detektion der Bindung von Proteinen an die DNA in einem vom *Chlorella*-Wirt unabhängigen System. Zudem konnten auch die wildtypische und mutante Minimalpromotoren untersucht werden und die genaue Bindungsvoraussetzungen definiert werden.

TGACGTGG-Sequenz ist für die Bindung von AtGBF1 ausreichend

Um die Bindung der Proteine an die Promotoren definieren zu können, wurden entsprechende Konstrukte erstellt. Wie schon bei den Untersuchungen des Polymerase-Promotors (Abschnitt 2.1.3.1), wurden die TFs als GAL4-Fusionsproteine mit dem pGAD424 Vektor getestet. Die zu untersuchenden viralen Promotoren: proZ063L, proZ134L, proZ174L, proZ326R und proZ765R, wurden in den pRW95-3 Vektor kloniert (Abbildung 2.19 A). Im Vorfeld der eigentlichen Tests wurde sichergestellt, dass die zu testenden GAD4-Fusionsproteine nicht mit dem leeren pRW95-3 Vektor interagieren können und unspezifische Bindungen ausgeschlossen sind (Abbildung 2.19 B). Um die Funktionalität des Tests zu gewährleisten und um die Ergebnisse besser validieren zu können, wurde bei jedem Test eine positive Kontrolle (+) mit zwei stark interagierenden *Arabidopsis*-Proteinen mitgeführt (NIMIN1 und NPR1).

Alle bZIP-Transkriptionsfaktoren zeigen in den Interaktion-Tests keine Bindung an Promotoren die keine Hex-Sequenz aufweisen. So wird weder der frühe Promotor von der RNase III (proZ063L, Abbildung 2.19 C) noch der früh/späte Promotor des Glutharedoxins (proZ134L, Abbildung 2.19 D) von keinem der getesteten Faktoren gebunden. Anders verhalten sich die Transkriptionsfaktoren in Bezug auf die Promotoren mit einem Hex-Motiv. Für die Bindung von AtGBF1 am Promotor reicht allein schon eine einzige Hex-Sequenz aus. Das ist am Beispiel des Promotors von Z326R zu sehen (Abbildung 2.19 F). Trotz einem ausgeprägten Hintergrund, kann man die starke Bindung von AtGBF1 an den Promotor erkennen (85 Miller Einheiten). Die Sequenz von proZ326R enthält keine TATA-Box, so ist die starke Interaktion allein auf die Bindung an dem Hex-Motiv zurückzuführen. Gleichermäßen verhält sich der Transkriptionsfaktor AtGBF1 in Bezug auf den Z174L-Promotor, der ebenfalls gebunden wird (Abbildung 2.19 E). Der proZ765R wird von mehreren TF gebunden. An dem Promotor binden nicht nur G-Box bindende Proteine, wie AtGBF1, sondern auch Vertreter der pflanzlichen Familie der TGA-Faktoren: TGA1a aus *N. tabacum* und TGA6 aus *A. thaliana*. Ähnliche Bindungsmuster können auch bei dem Z174L-Promotor beobachten werden. Die Bindung von NtTGA1a und AtTGA6 an den Promotor ist jedoch sehr schwach (Abbildung 2.19 G und E).

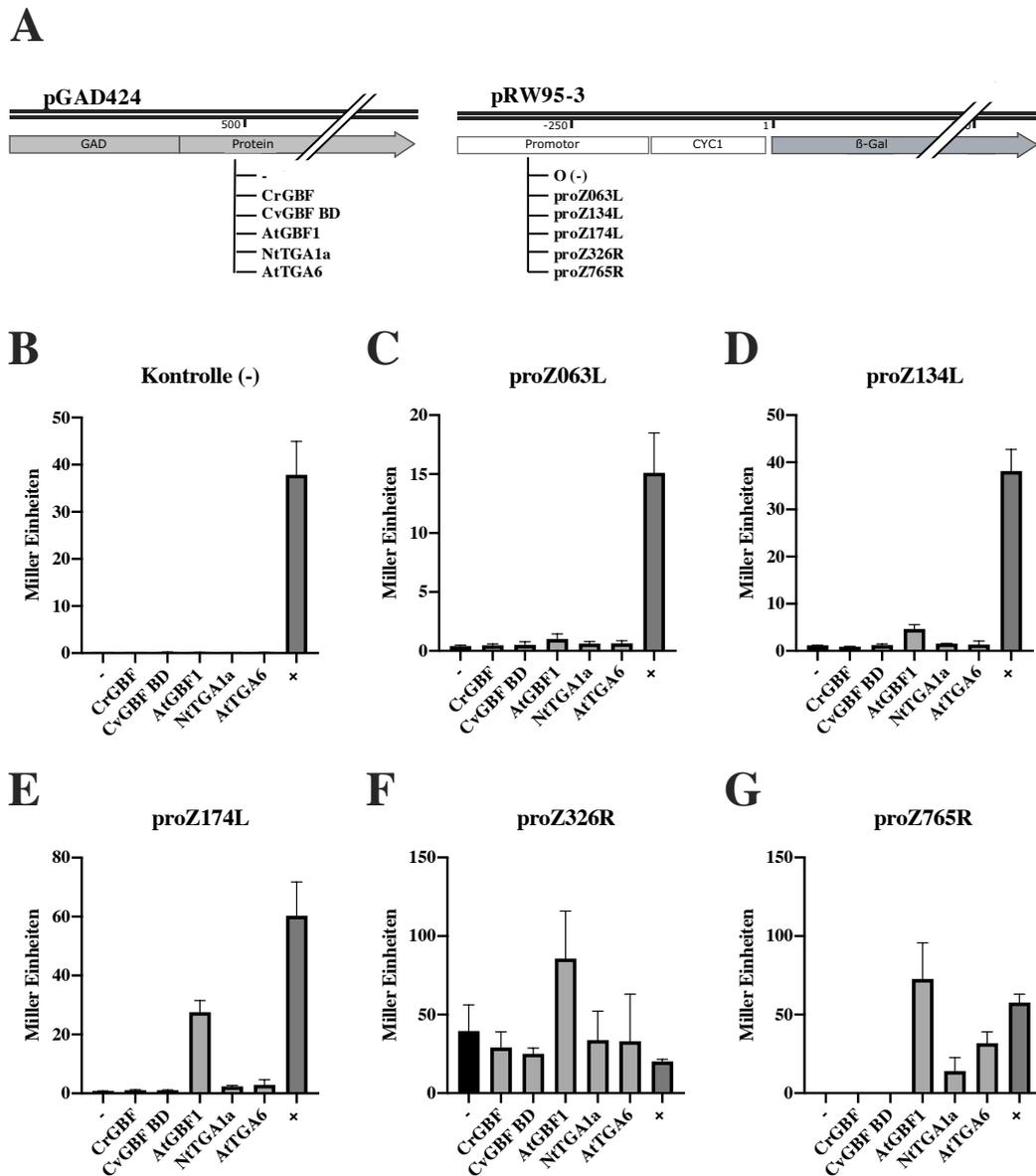


Abbildung 2.19 Virale Promotoren interagieren mit G-Box Faktoren in Hefe.
A. Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte in den pGAD424 und pRW95-3 Vektoren zur Untersuchung der Protein-DNA-Interaktion in Hefe. Die in den pGAD424 Vektor klonierten Transkriptionsfaktoren gehören zu den Gruppen der GBF (AtGBF1, CrGBF und CvGBF BD) und TGA (NtTGA1a, AtTGA6) Transkriptionsfaktoren. Als negative Kontrolle dient jeweils der leere Vektor, die positive Kontrolle (+) zeigt die NIMIN1-NPR1 Interaktion an. Die untersuchten TFs zeigen unterschiedliche Bindungsmuster in Bezug auf die getesteten Promotoren: negative Kontrolle ohne Promotor (**B.**), der Promotor von Z063L (**C.**), Z134L (**D.**), Z174L (**E.**), Z326R (**F.**) und Z765R (**G.**).

bZIP-Transkriptionsfaktoren zeigen keine Bindung an Deletionsmutanten ohne Hex-Motiv

Um die Bedeutung der TGACGTGG-Sequenz für die Bindung von den Transkriptionsfaktoren an den Promotoren zu definieren, wurden die wildtypischen und mutanten Minimalpromotoren von proZ174L und proZ765R verwendet (Abbildung 2.14). Diese wurden in den pRW95-3 Vektor kloniert und entsprechend ihren langen Varianten getestet. Zusätzlich wurde hier die Interaktion mit dem humanen bZIP-Transkriptionsfaktor CREB3L3 untersucht (Abbildung 2.20 A).

Die Transkriptionsfaktoren zeigen eine ähnliche Affinität zu den wildtypischen Kurzvarianten der Promotoren von Z174L und Z765R, wie auch zu den langen Varianten der Promotoren. Die Bindung von den Transkriptionsfaktoren wird verstärkt. Die Bindung des Faktors AtGBF1 an den Z174L-Promotor ist auf das 10-fache gestiegen. Auch die sehr schwache Bindung der TGA-Faktoren an den Promotor ist bei den kurzen Varianten des Promotors stärker (Abbildung 2.20 B und C). Die Bindung von dem AtGBF1 Faktor an die wildtypische Kurzvariante des Z765R Promotors ist ebenfalls nachweisbar. Diese ist um das 3-fache stärker als die Bindung an die lange Variante des Promotors. Zwischen der Bindung der TGA-Faktoren an die wildtypischen Varianten des Promotors werden keine Veränderungen wahrgenommen. Diese bleibt bei beiden Varianten gleich stark und beträgt 20 Miller Einheiten bei NtTGA1a und 44 Miller Einheiten bei AtTGA6 (Abbildung 2.20 E und F). Das Verkürzen der Sequenz der Promotoren ist mit steigender Spezifität der Bindung verbunden und zeigt auch höhere Affinität zu den Sequenzen.

Keiner der getesteten Transkriptionsfaktoren bindet an die mutanten Varianten der Promotoren, mpZ174L^{del} und mpZ765R^{del} (Abbildung 2.20 D und G). Die Deletion des Hex-Motivs verhindert somit die Bindung von GBF- und TGA-Transkriptionsfaktoren an die Promotoren. Der humane Transkriptionsfaktor CREB3L3 zeigt keine Interaktionen mit den getesteten viralen Promotoren.

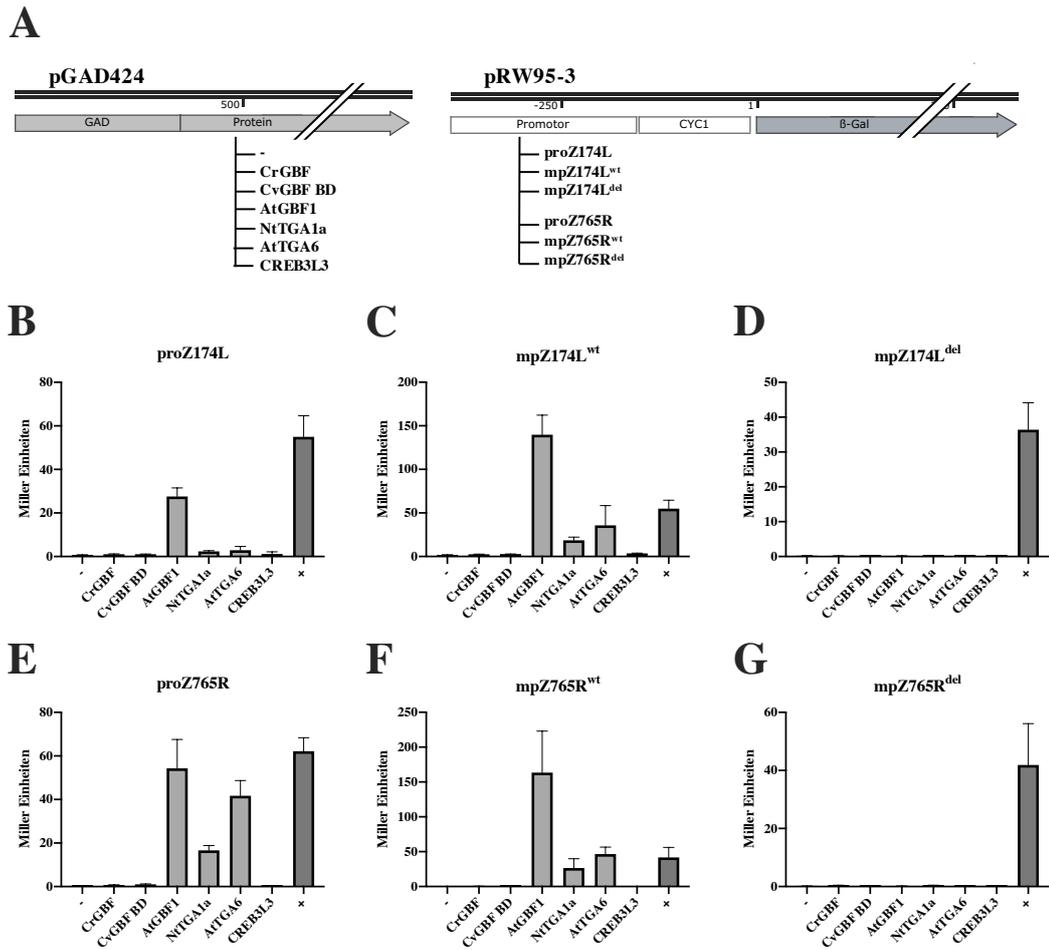


Abbildung 2.20 Deletion des Hex-Motivs wirkt sich negativ auf die Bindung von TFs an die Promotoren aus.

A. Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte in den pGAD424 und pRW95-3 Vektoren zur Untersuchung der Protein-DNA-Interaktion in Hefe. Die in den pGAD424 klonierten Transkriptionsfaktoren gehören zu den Gruppen der GBF-TF (AtGBF1, CrGBF und CvGBF BD), TGA-TF (NtTGA1a, AtTGA6) und CREB (CREB3L3) Transkriptionsfaktoren. Als negative Kontrolle dient jeweils der leere Vektor. Die untersuchten Kurzvarianten: *mpZ174L^{wt}* (**C**) und *mpZ765R^{wt}* (**F**) sowie die Deletionsmutanten *mpZ174L^{del}* (**D**) und *mpZ765R^{del}* (**G**) zeigen unterschiedliche Bindungsstärke an die TF im Vergleich zu *proZ174L* (**B**) und *proZ765R* (**E**).

2.2.5.2 G-Box bindende Faktoren beeinflussen die Aktivität der viralen Promotoren in Protoplasten

Um die Interaktionen von Transkriptionsfaktoren mit den viralen Promotoren in einem Algen näher verwandten Organismus zu testen, wurden die Interaktionsexperimente mit zwei ausgewählten GBF in den Protoplasten durchgeführt. Hierfür wurden ebenfalls die zwei GBF verwendet, die schon eine Interaktion mit dem viralen Promotor von proZ798L zeigten: AtGBF1 und CvGBF. Beide Gene wurden in den pUC35S Vektor kloniert. Bei dem GBF aus *Chlorella* wurde die DNA-Bindedomäne aus *Chlorella* zusätzlich als Fusion mit der GAD-Domäne exprimiert (Abbildung 2.22 A). Das verwendete AtGBF1 umfasst das vollständige Protein und das Konstrukt beinhaltet keine zusätzlichen Domänen (Abbildung 2.21 A). Die getesteten Promotoren verbleiben in dem pUC18-GUS Vektor, so dass die Veränderungen in der Aktivität leicht nachzuweisen sind. Es wurden alle ausgewählten Promotoren getestet, auch die Promotoren die keine Aktivität zeigten sowie die negative Kontrolle ohne Promotor (Abbildung 2.21 B und Abbildung 2.22 B). Somit konnte überprüft werden, ob die Aktivität der Promotoren durch die GBF-Faktoren induzierbar ist. Die im Test verwendeten Promotoren: proZ063L, proZ134L, proZ174L, proZ326R und proZ765R wurden schon im vorangegangenen Kapitel ausführlich beschrieben (Abschnitt 2.2.1).

AtGBF1

Die Co-Transformation von AtGBF1 mit den Promotor-GUS Konstrukten: proZ063L, proZ134L und proZ326R bringt keine Veränderungen in der Aktivität von GUS. Der GBF1-Transkriptionsfaktor aus *Arabidopsis* wirkt sich also nicht auf die Aktivität der Promotoren aus (Abbildung 2.21 C, D und F). Diese Promotoren beinhalten weder das Hex-Motiv noch die TATA-Box und zeigten schon in den vorangegangenen Experimenten keine Aktivität in Protoplasten.

Der Einfluss von AtGBF1 auf die Aktivität von Promotoren wird erst im Bezug auf die Promotoren mit TGACGTGG und TATA-Box sichtbar. Die Co-Transformation von AtGBF1 zusammen mit dem Promotor von Z174L bewirkt einen geringen Abfall der Aktivität des Promotors (Abbildung 2.21 E). Die Überexpression des Transkriptionsfaktors in den pflanzlichen Zellen, die GUS

unter der Kontrolle des proZ765R exprimieren, führt zu einem hohen Anstieg der Expression des *uidA*-Gens. Der G-Box bindende Faktor aus *Arabidopsis* ist also nicht nur in der Lage, an den Promotor von Z765R zu binden, sondern kann auch seine Aktivität erhöhen (Abbildung 2.21 G).

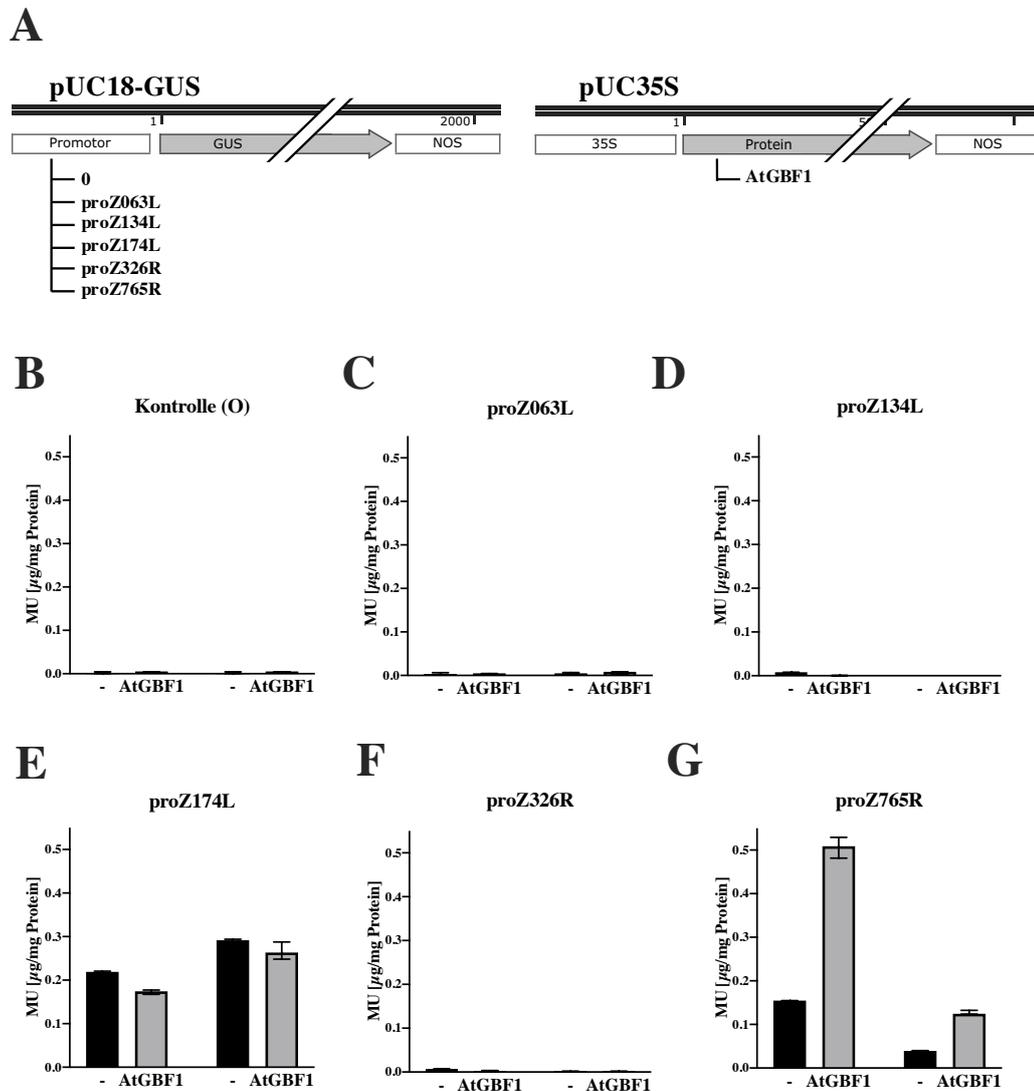


Abbildung 2.21 Einfluss von AtGBF1 auf die Aktivität der Promotoren in Protoplasten.

A. Schematische Darstellung verwendeter Konstrukte im pUC18-GUS Vektor mit den untersuchten Promotoren. Der getestete GBF-Faktor aus *Arabidopsis* (AtGBF1) ist in dem pUC35S Expressionsvektor kloniert. Dargestellt sind Interaktionen zwischen AtGBF1 und den viralen Promotoren: proZ063L (**C**), proZ134L (**D**), proZ174L (**E**), proZ326R (**F**), proZ765R (**G**), sowie die negative Kontrolle ohne Promotor (**B**). GUS-Aktivität (GUS-Assay, Abschnitt 6.2.7) gemessen in Protoplasten aus *N. benthamiana* (in µg MU pro µg isoliertem Protein).

CvGBF DNA-Bindedomäne

Der Einfluss von der DNA-Bindedomäne aus *Chlorella* auf die viralen Promotoren hängt ebenfalls mit den Hex- und TATA-Box-Sequenzen zusammen. Virale Promotoren ohne diese Sequenzen werden von dem Protein nicht gebunden und eine Veränderung der Aktivität ist somit nicht möglich. Zu diesen Promotoren gehören: proZ063L, proZ134L und proZ326R, welche in vorangegangenen Experimenten in Protoplasten bereits keine Aktivität zeigten (Abbildung 2.22 C, D und F).

Einen Anstieg der Aktivität der Promotoren von Z174L und Z765R kann auch bei der Co-Transformation mit CvGBF BD messen werden. Die *uidA*-Expressionsrate steigt sowohl bei proZ174L (Abbildung 2.22 E) als auch bei Z765R (Abbildung 2.22 G) stark an, wenn der Transkriptionsfaktor aus *Chlorella* mit exprimiert wird. Die Aktivität von proZ174L bei der Co-Transformation mit der GBF DNA-Bindedomäne aus *Chlorella* steigt um das 3-fache an. Bei proZ765R steigt die Aktivität von GUS um mindestens das 5-fache. Demzufolge ist die DNA-Bindedomäne aus CvGBF in der Lage, die Promotoren von proZ174L und proZ765R zu binden. Diese Bindung verursacht eine Steigerung der Aktivität der Promotoren in Protoplasten.

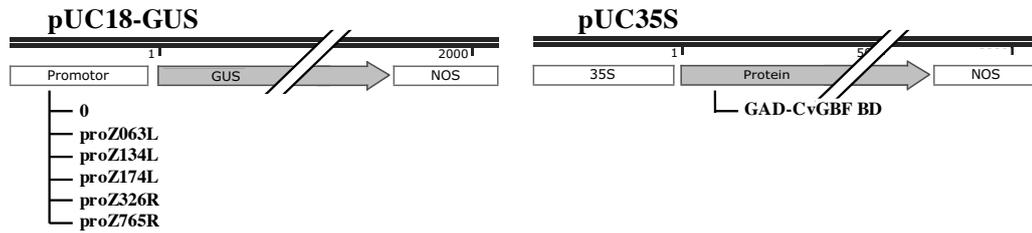
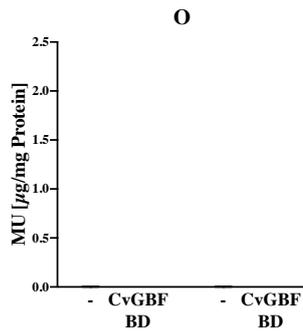
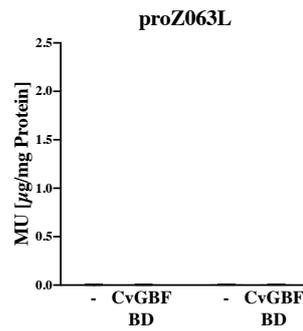
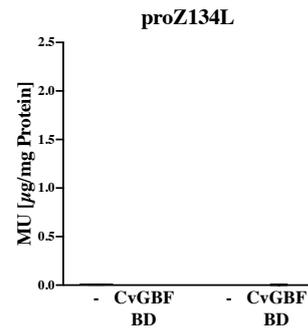
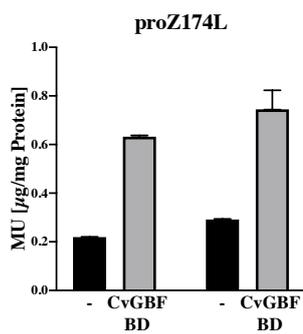
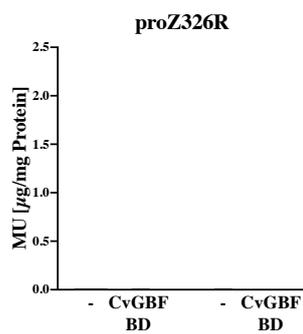
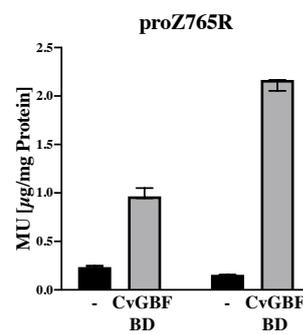
A**B****C****D****E****F****G**

Abbildung 2.22 Einfluss von CvGBF BD auf die Aktivität der Promotoren in Protoplasten.

A. Schematische Darstellung verwendeter Konstrukte im pUC18-GUS Vektor mit den untersuchten Promotoren. Die getestete DNA-Bindedomäne des GBF-Faktors aus *Chlorella* (CvGBF BD) ist in dem pUC35S Expressionsvektor kloniert. Dargestellt sind Interaktionen zwischen CvGBF BD und den viralen Promotoren: proZ063L (**C**), proZ134L (**D**), proZ174L (**E**), proZ326R (**F**), proZ765R (**G**), sowie die negative Kontrolle ohne Promotor (**B**). GUS-Aktivität (GUS-Assay, Abschnitt 6.2.7) gemessen in Protoplasten aus *N. benthamiana* (in µg MU pro µg isoliertem Protein).

2.2.6 Charakterisierung von ORF Z174L und Z765R

Die Funktion und Aufgaben der DNA-Polymerase von ATCV-1 sind klar definiert und beschrieben. Die Funktionen von ORFs Z765R und Z174L sind weitgehend unbekannt. Im letzten Schritt wurden die Proteine Z174L und Z765R genauer untersucht. Anhand der Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen wurden mögliche Funktionen definiert. Zusätzlich wurden diese Funktionen der hypothetischen Proteine experimentell untersucht. In erster Linie sollten die Proteine charakterisiert werden, um zu zeigen, dass die beiden Proteine tatsächlich früh während der Virusinfektion exprimiert werden.

2.2.6.1 Das Z174L enthält eine GIY-YIG Domäne

ORF Z174L codiert für ein regulatorisches Protein

Die ersten Protein-Sequenzvergleiche von ORF Z174L ergaben, dass dieses Protein in 10 von 12 dokumentierten ATCV-Spezies enthalten ist (über 95 % Identität), sowie in 12 PBCV-Spezies (60-61 % Identität). Des Weiteren können mit Hilfe des BLAST Algorithmus [Altschul *et al.*, 1990] mehrere Übereinstimmungen mit den Effektoren der Transkription (*Effector of Transcription*, EOT) aus anderen Spezies gefunden werden, wie z. B. *Chlorella*-Algen – *Auxenochlorella protothecoides* (29,14%), Pflanzen – *Ipomoea nil* (25,70 %), *Malus domestica* (32,14 %) oder der ORF A379L aus dem nahe verwandten PBCV-1 (41,75 %). Der ORF A379L wurde von der Arbeitsgruppe Yamada als ein sehr frühes Gen (*immediate early gene*) identifiziert und besitzt Ähnlichkeiten zu den Transkriptionsfaktoren [Kawasaki *et al.*, 2004]. Die Sequenz von Z174L weist Ähnlichkeiten zu der GIY-YIG Domäne der GIY-YIG Superfamilie auf. Proteine der GIY-YIG Superfamilie sind an vielen zellulären Prozessen beteiligt, wie der DNA-Reperatur und Rekombination, dem Restriktionsverdau fremder DNA oder dem Transfer mobiler Genelemente. Die GIY-YIG Domäne besteht aus ca. 100 AS, mit zwei kurzen Erkennungssequenzen GIY und YIG im N-terminalen Bereich. Zudem befindet sich noch ein Arginin-Rest (R) im zentralen Bereich, sowie ein Glutaminsäure-Rest (E) in dem C-terminalen Bereich [Dunin-Horkawicz *et al.*, 2006]. Auf Basis dieser Merkmale kann der ORF Z174L der GIY-YIG Superfamilie zugeordnet werden. Die Anwendung des MPI Bioinformatik Toolkit Suche (HHpred) bestätigt

diese Hypothese [Zimmermann *et al.*, 2018]. In der Aminosäure-Sequenz vom ORF Z174L wird ein Bereich gefunden, der große Ähnlichkeiten zu den Proteinen der GIY-YIG Proteinfamilie aufweist (Abbildung 2.23). Es konnten im Vergleich zu ähnlichen Proteinen aus PBCV-1 (ORF A379L) und aus der *Chlorella*-Alge *A. protothecoides* (GIYc Protein) Sequenzbereiche gefunden werden, welche Ähnlichkeiten mit den Consensus-Sequenzen der GIY-YIG Proteinfamilie zeigen (Abbildung 2.23, schwarze Markierung). Diese Sequenzen zeigen viele konservierte Bereiche sowie einzelne konservierte Aminosäuren auf bestimmten Positionen (Abbildung 2.23, markiert mit *). Durch Vergleiche mit den Genbanken, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem ORF Z174L um eine GIY-YIG Endonuklease handelt, da die meiste Übereinstimmungen in der Sequenz genau mit diesen Enzymen stattfand. Allerdings kann es nicht ausgeschlossen werden, dass das Protein auch einen Effekt auf die Transkription hat und in der Lage ist, die Transkription der Gene zu beeinflussen.

ApGIYc	-----MALAGRPERELAHTSFLSWYRRLWRGCKWYTFLLTPAPASDGGSGTEGRSVGP--N	52
Z174L	MAINYSPLAFDFPRREKIHPGMFSYYKRVFKGTVWRPFLLPNASLOGALDEGHRHNVNGD	60
A379L	MSAKYSIAPFDYFPREKISPSFFSKYRKFRGAKWDLFAVPSDCGP--SFNERIANSNSK	58
	. ** .:.* *:::.* * * * . : : . .	
ApGIYc	CQAQPGIYEFALCHPRFAEKRVKVVYVGGKTNMRRRQATHAAG-----ASHLAPLMHFAL	106
Z174L	ILSVPVAVYEFIAIK-HIGGKRFKTYLGTTRNAKQRHTKYLIN-----GDHIAQFLESAY	113
A379L	LLEIPAVYEFVAVSLPTGGKRYKVYLGQTVMKQRHGQYIDSNIVLRPTNHIYHLMKESL	118
	*.:****: . ** *.:** * * :*: : . .*: :. : :	
ApGIYc	QQGYTILTRFKYLAT-----ILKESQLLCRYDYAWNNAVQNGPRRTV--M	148
Z174L	KNGFVYRRIRYIIPRANLNTRDTLAAVLAEQTETRFGLKYNNAWNARTNGAAM--TR	171
A379L	DSGLFIHRRIRYIVPHANLTEITRAKADLMGLMWETRLGSDYAWNTKNNTPRNMNTR	178
	..* : *::*: *:::* *::****: *	
ApGIYc	LHPRTSCFCVVNGLSVQSQKLERGGGAGQGVAPDGLPATPLAGAAAGVLIIPPAPRALKG	208
Z174L	MPVKTSFLCMFSKVKWLKNPEARKF-----MG-----	198
A379L	TAKKSTYMCMFASKVKFEYNDPNAKY-----FYKI-----	207
	::: :*. . . : :	
ApGIYc	DSLSS	213
Z174L	-----	198
A379L	-----	207

Abbildung 2.23 Analyse der Aminosäure-Sequenz von Z174L im Vergleich zu anderen GIY-YIG-Proteinen.

Die Aminosäuren sind nach ihren Eigenschaften aufgeteilt und farbig dargestellt: hydrophob und aromatisch (rot), sauer (blau), basisch (magenta); AS mit Hydroxyl-, Amin-, oder Amidgruppen oder sind polar (grün). Die Übereinstimmung der Aminosäuren wird mit Sternchen angezeigt (*), konservierte Substitutionen mit Doppelpunkt (:), halb-konservierte Substitutionen mit ähnlichen Struktur mit Punkt (.). Schwarz markiert sind die wichtigsten, funktionellen Aminosäuren der GIY-YIG-Domäne. Erstellt mit Clustal Omega [Sievers *et al.*, 2011].

Z174L beeinflusst die Aktivität von Promotoren in Protoplasten

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Promotoren stellen ein breites und umfangreiches Spektrum innerhalb der Promotoren von ATCV-1 dar. Die Funktion von Z174L kann nicht eindeutig geklärt werden ohne den Einfluss des Proteins auf die Promotoren zu kennen. Deswegen wurde im ersten Schritt geklärt, ob das Z174L einen Einfluss auf die virale Promotoraktivität hat. Zudem könnte auf diese Weise auch die Aktivität des Z174L als Endonuklease geklärt werden.

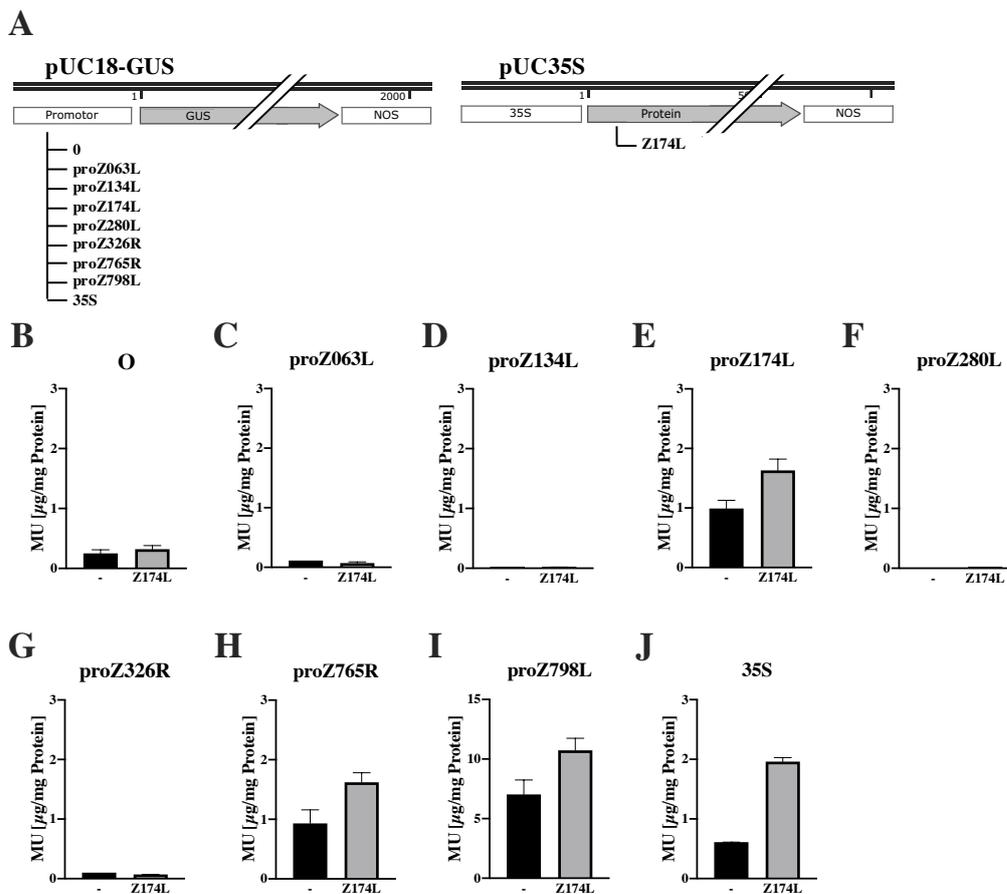


Abbildung 2.24 Einfluss von Z174L auf die Aktivität von viralen Promotoren in Protoplasten.

A. Schematische Darstellung verwendeter Konstrukte im pUC18-GUS Vektor mit den untersuchten Promotoren. Das getestete Z174L ist im pUC35S Expressionsvektor kloniert. Interaktionen zwischen Z174L und der negativen Kontrolle (**B**), sowie den viralen Promotoren sind dargestellt: proZ063L (**C**), proZ134L (**D**), proZ174L (**E**), proZ280L (**F**), proZ326R (**G**), proZ765R (**H**), proZ798L (**I**) und 35S (**J**). GUS-Aktivität (GUS-Assay, Abschnitt 6.2.7) gemessen in Protoplasten aus *N. benthamiana* (in μg MU pro μg isoliertem Protein).

Die Experimente wurden in Protoplasten durchgeführt, durch die Verwandtschaft zu Algen wurde auch sichergestellt, dass die Umgebung (Zelle) alle eventuell benötigten Co-Faktoren liefern konnte. Die verwendeten Promotoren wurden in den pUC18-GUS Vektor kloniert und konnten die Expression des *widA*-Gens in Protoplasten steuern. Das Gen Z174L wurde in den pUC35S Vektor kloniert, der eine konstante Expression des Gens ermöglichte (Abbildung 2.24 A). Als negative Kontrolle diente ein GUS-Konstrukt ohne Promotor (Abbildung 2.24 B).

Die Co-Transformation vom Protein Z174L mit den entsprechenden Promotoren hat einen Einfluss auf alle in Protoplasten aktiven Promotoren. Die Aktivität aller in Protoplasten aktiven Promotoren wird erhöht. So steigert Z174L die Aktivität vom 35S-Promotor aus CaMV (Abbildung 2.24 J), aber auch die Aktivität der ATCV-1 Promotoren Z765R und Z798L (Abbildung 2.24 H und I). Das Protein steigert auch die Aktivität des eigenen Promotors (Abbildung 2.24 E). Die Co-Transformation von Z174L mit den Promotor-GUS Konstrukten: proZ063L, proZ134L, proZ280L und proZ326R bringt keine Veränderungen in der Aktivität von GUS (Abbildung 2.24 C, D, F und G).

Z174L hemmt die Aktivität von proZ798L in Algen

Um die Funktion vom Protein Z174L in Algen zu überprüfen, wurden Co-Transformationen mit ausgewählten repräsentativen Promotoren durchgeführt. Um die Aktivität des Promotors in den Algen zu testen, wurde der Promotorbereich in den pARG7 Vektor kloniert. Dadurch stand die Expression des Reportergens unter der Kontrolle von dem davor klonierten Promotor. Für die Tests in Algen wurden Promotoren von der Polymerase (proZ798L), des VP50-Kapsidproteins (proZ280L) sowie als positive Kontrolle der proARG7-Promotor verwendet. Das Z174L hatte in den Vortests in den Protoplasten eine positive verstärkende Wirkung auf die Aktivität des Z798L-Promotors. Zugleich zeigte es keine Wirkung auf die Aktivität des proZ280L. Als negative Kontrolle diente das Vektor-Konstrukt ohne Promotor vor dem *ARG7*-Gen (O). Das Z174L-Gen wurde in den pOPT Vektor als Fusion mit dem Reporterprotein mVenus kloniert (Abbildung 2.25 A).

Um die Veränderungen in der Aktivität des Polymerase-Promotors zu messen, wurden Algen (*C. reinhardtii* Stamm 302 cw15arg⁻) entsprechend transformiert. Als negative Kontrolle dienten hier Algen, die allein mit dem Promotor-*ARG7* Konstrukt transformiert wurden (-). Zum Vergleich wurden Algen herangezogen, die sowohl das entsprechende Promotor-*ARG7* Konstrukt in ihrem Genom beinhalten als auch mVenus oder das *mVenus::Z174L*-Fusionsprotein exprimieren. So ist es möglich nicht nur den Einfluss von Z174L auf die Promotoren zu sehen, sondern auch die Auswirkungen der Co-Transformation mit Proteinen allgemein. Die Aktivität der Promotoren kann auf diese Weise über die Anzahl der Kolonien zwei Wochen nach der Transformation der Algenzellen mit Hilfe der Transformationseffizienz bestimmt werden.

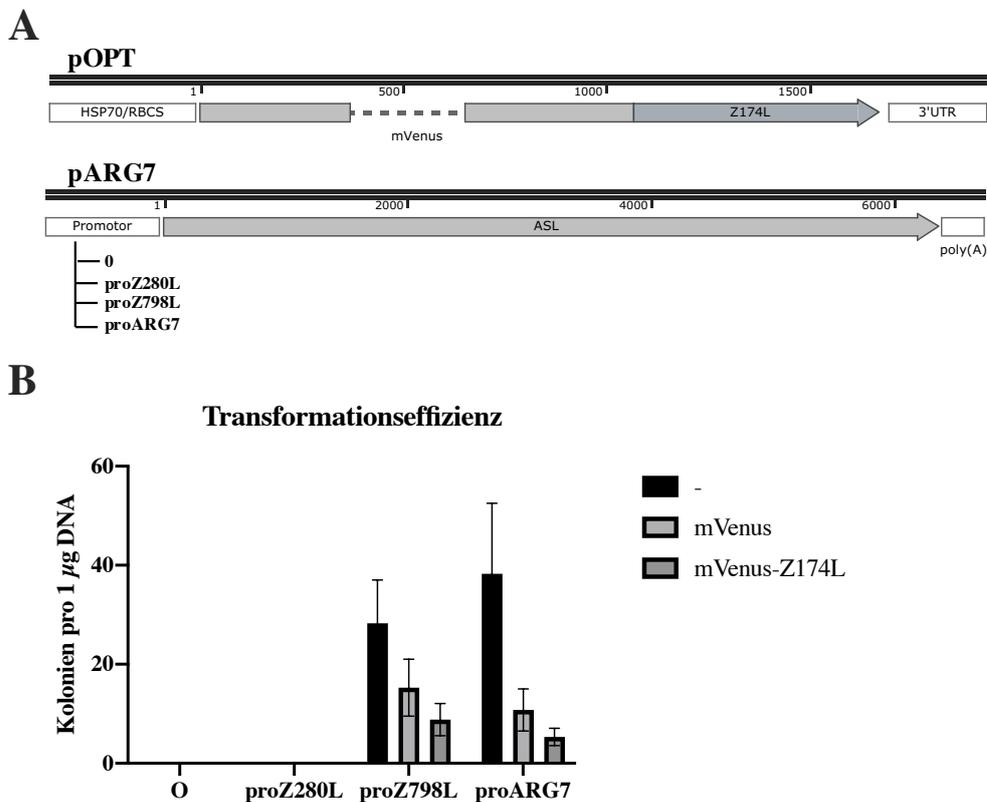


Abbildung 2.25 Z174L hemmt die Aktivität von Promotoren in Algen.

A. Schematische Darstellung verwendeter Konstrukte im pARG7 Vektor mit den untersuchten Promotoren: proZ280L und proZ798L, sowie der negativen Kontrolle ohne Promotor (0) und der positiven Kontrolle proARG7. Das getestete Z174L ist im pOPT Expressionsvektor kloniert. **B.** Transformationseffizienz der einzelnen Transformationen von *C. reinhardtii* mit den untersuchten Konstrukten [Kolonien pro µg DNA].

Die Co-Transformation mit dem Konstrukt ohne Promotor und proZ280L-*ARG7* zeigt keine Veränderung der Aktivität. Der Promotor von dem Kapsidprotein Z280L bleibt inaktiv. Die Co-Transformation mit dem proZ798L und dem proARG7 zeigt eine Abnahme der Transformationseffizienz, nicht nur im Bezug auf Z174L sondern im Allgemeinen. Die Co-Transformation mit dem mVenus-Z174L senkt weiter die Effizienz der Transformation. Die Co-Transformation hat einen negativen Einfluss auf die Transformation der Algen, die Anzahl der Kolonien ist sowohl bei proZ798L als auch bei den proARG7 Konstrukten erheblich geringer im Vergleich zur Transformation mit nur einem Vektor. Nichtsdestotrotz bewirkt die Anwesenheit von Z174L eine weitere Senkung der Transformationseffizienz, die mit der Funktion von Z174L zusammenhängt (Abbildung 2.25 B).

2.2.6.2 Z765R – ein viraler Transkriptionsfaktor

ORF Z765R codiert für einen Transkriptionsfaktor

Das Gen Z765R tritt in allen bekannten ATCV-1 Spezies auf. Die Sequenzen weisen eine hohe Identität zwischen den Spezies auf (72,70 – 99,65 %). Mit Hilfe des BLAST Algorithmus [Altschul *et al.*, 1990] können auch Übereinstimmungen zu Proteinen aus vier Arten des PBCV gefunden werden (38,41 – 40 % Identität). Diese Proteine zeigen Ähnlichkeiten zu den Transkriptionsfaktoren. Der ORF A107L von PBCV-1 zeigt übereinstimmende Sequenzbereiche zu dem Transkriptionsfaktor IIB und gleichzeitig zu Z765R. Die Suche zeigt keine weitere Ähnlichkeiten mit den Sequenzen der Genbanken (BLAST Algorithmus [Altschul *et al.*, 1990]). Die Suche nach bekannten Domänen mit Hilfe der MPI Bioinformatik Toolkit Suche (HHpred) liefert Hinweise auf die Funktion von proZ765R. ORF Z765R zeigt Ähnlichkeit zum humanen Transkriptionsinitiations-Faktor TFIID (Abbildung 2.26) [Zimmermann *et al.*, 2018]. Der Transkriptionsfaktor TFIID ist eine wichtige Komponente des eukaryotischen Transkriptionsinitiations-Komplexes (*eukaryotic transcription preinitiation complex*, PIC). Proteine dieser Art werden in der frühen Phase der Virusinfektion benötigt.

```

Z765R      -----LAKAQAKELAKVEKAEAKAAE 30
TFIID      SREEFRHLELIVKNSATYNGPKHSLTQISQSM LLDLCEKLKEKEDKLARLEKAINPLLD 1500
              * : .:***:*** :

Z765R      K-----ARIAAEKAM-----TKA 43
TFIID      DDDQVAFSFLDNIIVTQKMMAVPDSWPFHHPV NKKFVPDYKVIIVNPM DLETIRKKNISKH 1560
              .      .*::* *      :*

Z765R      AEKARK-----EAEKETQKLMKAAMKAEKAEKEIQKLVEKIVK 82
TFIID      KYQSRSEFLDDVNLILANSVKYNGPESQYTKTAQEIVNVCYQTLTEYDEH LTQLEKIDICT 1620
              ::: : * :*:::.. : : : : : * :* .

Z765R      ---TAIRKAV-----AEDLKEEKLLRKIEMARKKLEAMKKAQEKILKK 124
TFIID      AKEAALFEAELES LDPMTGPGYTPQPPDLYDTN---TSLMSRDA-SVF---QDES NMS 1672
              :*::* ** : : .:.*:*. .: : *:: .

Z765R      ALKVPPLDDEDIVEEDEF-E-----E-----IDEDDDYEEDEDED DDDYEEDE 165
TFIID      VLDIPSATPEKQVTQEGEDGDGLADEEEGT VQQPQASVLYEDLLMSEGEDDE----EDA 1728
              .*: * * * : * : : * : * .*:*: *

Z765R      DEDDMSENEFEDEEVS-----LEIKVNPEYEFFHYNENGEA 201
TFIID      GSDEEGDNPFSAIQLES GSDSDVVGSGGIRPKQPRMLQENTRMDMENEES MMSYEGDGE 1788
              ..*: .:* * .:* :* :* : * : * : *

Z765R      -----DIHWSAFKTRKEIEDLDNEPEKTEEVDEIDLYADLEAALMEDE TEDIAEPV- 252
TFIID      ASHGLED SNISYGSYEPPDPKSN T-----QDTSFSSIGGYEVSEEEEEEEEEEQ RSGPSV 1843
              :* :*: . : : : : .:.*. * * * :* * : *

Z765R      -DEGEWTD DDDSDDEDEECEIDMSTGFW--NSNA 282
TFIID      LSQVHLS EDEEDSED----FHSIAGSDLD SDE 1872
              .: . :*:*.** :. :* :*:

```

Abbildung 2.26 Vergleich der Aminosäuren-Sequenzen von Z765R mit TFIID. Die Aminosäuren sind nach ihren Eigenschaften aufgeteilt und farbig dargestellt: hydrophob und aromatisch (rot), sauer (blau), basisch (magenta); AS mit Hydroxyl-, Amin-, oder Amidgruppen oder sind polar (grün). Die Übereinstimmung der Aminosäuren wird mit Sternchen angezeigt (*), konservierte Substitutionen mit Doppelpunkt (:), halb-konservierte Substitutionen mit ähnlichen Struktur mit Punkt (.). Erstellt mit Clustal Omega [Sievers *et al.*, 2011].

Z765R beeinflusst die Aktivität viraler Promotoren in Protoplasten

Um die mögliche Bindung an Promotoren sowie die Auswirkungen zu überprüfen, wurden die Interaktionstests in Protoplasten durchgeführt. Die Verwandtschaft zu Algen stellte eine vergleichbare Zellumgebung dar und lieferte die benötigten Co-Faktoren. Die verwendeten Promotoren wurden in den pUC18-GUS Vektor kloniert und konnten die Expression des *uidA*-Gens in Protoplasten steuern. Das Gen Z765R wurde in den pUC35S Vektor kloniert, der eine konstante Expression des Gens ermöglichte (Abbildung 2.27 A). Als negative Kontrolle diente ein GUS-Konstrukt ohne Promotor (Abbildung 2.27 B). Die Co-Transformation von dem Protein Z765R mit den entsprechenden Promotoren scheint einen Einfluss auf alle in Protoplasten aktiven Promotoren zu haben. So steigert Z765R leicht die Aktivität vom 35S-Promotor aus dem

CaMV (Abbildung 2.27 J), aber auch die Aktivität des ATCV-1 Promotors Z174L (Abbildung 2.27 E). Das Protein steigert auch die Aktivität des eigenen Promotors (Abbildung 2.27 H). Z765R hat einen negativen Einfluss auf die Aktivität des Z798L-Promotors (Abbildung 2.27 I). Die Co-Transformation von Z765R mit den Promotor-GUS Konstrukten: proZ063L, proZ134L, proZ280L und proZ326R bringt keine Veränderungen in der Aktivität von GUS (Abbildung 2.27 C, D, F und G).

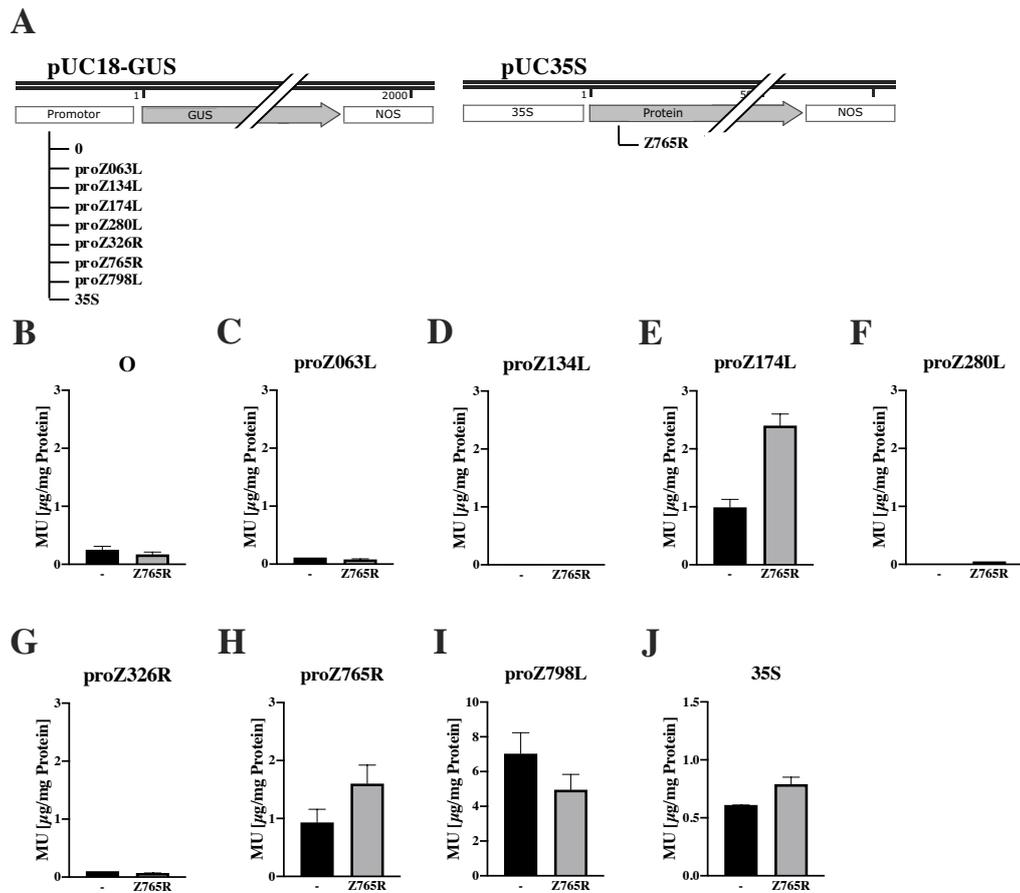


Abbildung 2.27 Einfluss von Z765R auf die Aktivität von viralen Promotoren in Protoplasten.

A. Schematische Darstellung verwendeter Konstrukte im pUC18-GUS Vektor mit den untersuchten Promotoren. Das getestete Z765R ist in dem pUC35S Expressionsvektor kloniert. Interaktionen zwischen Z765R und der negativen Kontrolle (**B**), sowie den viralen Promotoren sind dargestellt: proZ063L (**C**), proZ134L (**D**), proZ174L (**E**), proZ280L (**F**), proZ326R (**G**), proZ765R (**H**), proZ798L (**I**) und 35S (**J**). GUS-Aktivität (GUS-Assay, Abschnitt 6.2.7) gemessen in Protoplasten aus *N. benthamiana* (in µg MU pro µg isoliertem Protein).

Kapitel 3

Ergebnisse – virale Komponenten des Ubiquitin-Systems

Während der Virusinfektion werden große Mengen an Proteinen synthetisiert. Diese sind nicht nur viralen Ursprungs, sondern gehören auch zum Abwehrmechanismus des Wirtes. Die Regulation aller Proteine erfolgt zuerst durch die Promotor-gesteuerte Genregulation. Sind die Proteine erstmals in den Zellen vorhanden, werden posttranslationale Modifikationen zur Regulation herangezogen.

Sowohl das Virus als auch der Wirt haben Strategien entwickelt, um das eigene Überleben zu sichern und um sich gegenseitig zu kontrollieren. Einer dieser Strategien basiert auf dem Ubiquitin-Proteasom-System. Der Wirt ist in der Lage, virale Proteine mit Ubiquitin zu markieren, um diese dann am Proteasom abzubauen und somit die Virusinfektion zu stoppen. Ein Virus kann seinerseits den wirtseigenen Mechanismus der Ubiquitinierung nutzen um anti-virale Proteine abzubauen.

Die Markierung mit Ubiquitin ist ein sehr verbreiteter Mechanismus in eukaryotischen Zellen und ist somit auch bei den Chloroviren ein beliebtes Ziel für die virale Gegenwehr. Das ATCV-1 verfügt über drei hypothetische Proteine: ORF Z203L, Z292L und Z339L, deren Funktion mit der Markierung der Proteine zum Abbau am Proteasom im Zusammenhang stehen könnte. In diesem Kapitel wird die Funktion dieser drei Proteine untersucht.

Das Proteasom ist für eine Infektion mit ATCV-1 notwendig

Eine Markierung mit Ubiquitin ist eine weitverbreitete posttranslationale Modifikation und führt nicht ausschließlich zum Abbau des markierten Proteins. Daher sollte im ersten Schritt geklärt werden, ob das Ubiquitin-Proteasom-System während der Infektion von *C. heliozoae* eine Rolle spielt. Hierfür wurde dieses System während der Infektion mit dem ATCV-1 inhibiert. Durch die Verwendung von Proteasominhibitoren wie MG-115 und MG-132 kann eine Hemmung des Proteasoms in den Wirtszellen erzielt werden. So können Proteine zwar mit dem Ubiquitin markiert werden, die Degradation am Proteasom ist aber nicht mehr möglich.

MG-132 und MG-115 sind bekannte, synthetische Proteasom-Inhibitoren. MG-132 ist ein Peptid-Aldehyd und einer der ersten entwickelten 26S Proteasom-Inhibitoren. MG-132 reagiert mit der Hydroxygruppe des katalytischen Threonins unter Bildung eines kovalenten Addukts, eines Halbacetals. Die Halbacetalbildung ist reversibel, weshalb keine dauerhafte Inhibierung des Proteasoms erfolgt [Steverding 2012]. Der Inhibitor MG-115 gehört ebenfalls zu den Peptid-Aldehyden und blockiert reversibel das Proteasom. Seine Wirkungsweise ist dem MG-132 gleich.

Um das Proteasom während der Infektion zu inhibieren wurden Plaque-Assays auf einem Inhibitor-haltigen Medium durchgeführt. Als negative Kontrolle diente ein Plaque-Assay ohne Zusätze im Medium (Abbildung 3.1, schwarzer Balken). Durch die Zugabe von 50 μ M MG-132, beziehungsweise 50 μ M MG-115 wurde die proteolytische Aktivität des Proteasoms inhibiert. Als positive Kontrolle wurde 50 μ M 5-Fluoruracil (5-FU) verwendet. 5-FU wird während der Transkription anstelle von Uracil eingebaut und inhibiert somit die Vermehrung von doppelsträngigen DNA-Viren.

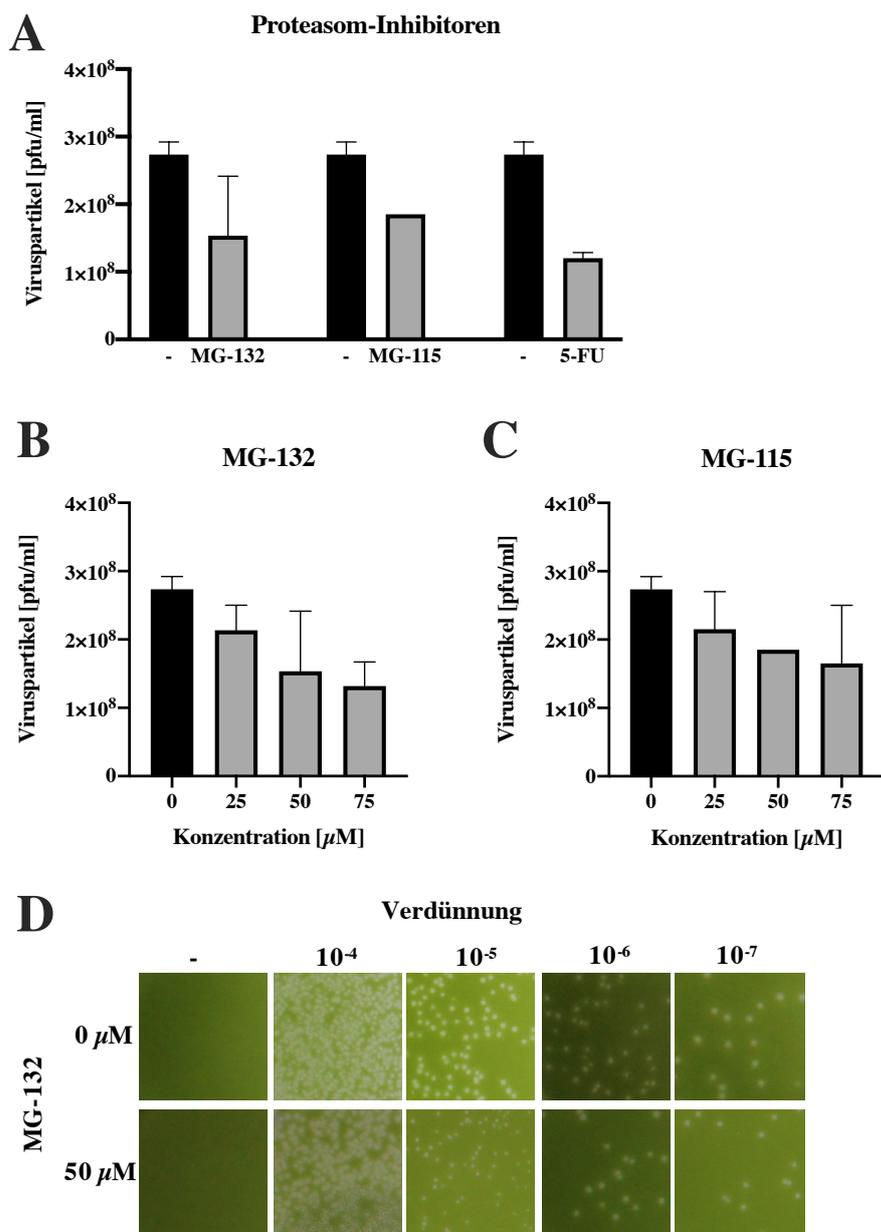


Abbildung 3.1 MG-132 hemmt die Infektion von *Chlorella*-Algen mit ATCV-1. A. Anzahl der Plaques gezählt nach der Virusinfektion (Verdünnung 10^{-6}) in Anwesenheit von 50 μ M MG-132, 50 μ M MG-115 und 50 μ M 5-Fluoruracil (5-FU). B. Anzahl der Plaques gezählt nach der Virusinfektion (Verdünnung 10^{-6}) in Anwesenheit von unterschiedlichen Mengen von MG-132 (0 μ M, 25 μ M, 50 μ M und 75 μ M). C. Anzahl der Plaques gezählt nach der Virusinfektion (Verdünnung 10^{-6}) in Anwesenheit von unterschiedlichen Mengen von MG-115 (0 μ M, 25 μ M, 50 μ M und 75 μ M). D. Plaque-Assay mit Zusatz von 50 μ M MG-132 und ohne Zusätze im Medium. Dargestellt sind alle Verdünnungsstufen des eingesetzten Virus.

Die Zugabe von den beiden Proteasom-Inhibitoren wirkt sich negativ auf die Virusinfektion aus. Diese ist vergleichbar mit dem Einfluss des Virusinfektions-Hemmstoffs 5-FU. Die Anzahl der gezählten Plaques (bei Verdünnung 10^{-6}) wird bei allen drei Stoffen um fast die Hälfte reduziert (Abbildung 3.1, A). Wird die Konzentration der Proteasom-Inhibitoren verändert, kann eine proportionale Veränderung in der Anzahl der gezählten Plaques beobachtet werden. Je stärker konzentriert der Inhibitor eingesetzt wird, desto stärker wird die Infektion gehemmt. MG-132 zeigt eine stärkere Wirkung als der MG-115 Proteasom-Inhibitor (Abbildung 3.1, B und C). Diesen Effekt kann man für alle Verdünnungsstufen des Experiments beobachten (Abbildung 3.1, D).

Die Inhibierung des Proteasoms zeigt eine negative Wirkung auf die Infektion von *C. heliozoae* mit dem ATCV-1. Das Ubiquitin-Proteasom-System ist also ein wichtiger Bestandteil der viralen Infektion und dient auch bei ATCV-1 als Angriffsziel.

3.1 Z203L – virales Ubiquitin

3.1.1 ORF Z203L kodiert für ein Ubiquitin

Auf Basis der Vergleiche der Aminosäuresequenz von ORF Z203L mit den Sequenzen aus den Genbanken (BLAST Algorithmus [Altschul *et al.*, 1990]), kann diese als ein Ubiquitin identifiziert werden. Das Z203L ist innerhalb der Chloroviren eine Besonderheit, denn das nahe verwandte PBCV-1 enthält keine Sequenz für ein Ubiquitin-ähnliches Protein in seinem Genom. Sogar innerhalb der ATCV-Virusfamilie ist ein Ubiquitin-ähnliches Gen nur in drei weiteren ATCV-Spezies vorhanden. Dieses ist in allen drei Spezies gleich und stimmt mit der Sequenz von Z203L zu 99 % überein. Die in Amerika gefundenen ATCV-Spezies enthalten ein Serin an der Position 20 (anstatt von Alanin). Das Ubiquitin an sich ist ein sehr konserviertes Protein innerhalb aller eukaryotischen Spezies. Es finden sich auch bei dem viralen Protein Z203L nur wenige Unterschiede zu den Ubiquitinen aus anderen Spezies. Diese betreffen auch keine funktionellen Lysine K48 und K63 (Abbildung 3.2 A, schwarze Pfeile). Lediglich das am C-Terminus funktionell aktive Glycin wird bei Z203L von einem Asparagin (N77) verdeckt. Die Ähnlichkeit von Z203L zu den Ubiquitinen ist auch an der Struktur des Proteins zu erkennen (Abbildung 3.2 B). Z203L ist ein kleines kompaktes Molekül (blau) mit einem freistehenden C-terminalen Ende (rot). Die Sequenz von Ubiquitin ist stark konserviert, so dass die Struktur des Z203L, trotz kleinen Abweichungen, der der regulären Ubiquitinen gleicht. Damit sollte auch die Funktionalität des Proteins weitgehend erhalten bleiben.

Auf Basis der kleinen Unterschieden in den Sequenzen lässt sich die Verwandtschaft von Z203L bestimmen. Das virale Ubiquitin-verwandte Protein zeigt die größte Ähnlichkeit zu dem humanen Ubiquitin, aber auch nahe Verwandtschaft zu den Ubiquitinen aus Algen (Abbildung 3.2 C).

A

C.variabilis	MQIFVKTLTGKTITLEVESSDSIENVKSKIQDKEGIPPDQQRLLIFAGKQLEDGHTLADYN	60
Z203L	MQIFVKTLTGKTITLEVESADTIEAVKAKIQDKEGIPPDQQRLLIFAGKQLEDGRTLSDYN	60
H.sapiens	MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLLIFAGKQLEDGRTLSDYN	60
A.thaliana	MQIFVKTLTGKTITLEVESSDTIDNVKAKIQDKEGIPPDQQRLLIFAGKQLEDGRTLADYN	60
N.tabacum	MQIFVKTLTGKTITLEVESSDTIDNVKAKIQDKEGIPPDQQRLLIFAGKQLEDGRTLADYN	60
C.reinhardtii	MQIFVKTLTGKTITLEVESSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLLIFAGKQLEDGRTLADYN	60
	***** :*: *:*:*****:***	

C.variabilis	IQKESTLHLVRLRGG-	76
Z203L	IQKESTLHLVRLRGGN	77
H.sapiens	IQKESTLHLVRLRGG-	76
A.thaliana	IQKESTLHLVRLRGG-	76
N.tabacum	IQKESTLHLVRLRGG-	76
C.reinhardtii	IQKESTLHLVRLRGG-	76

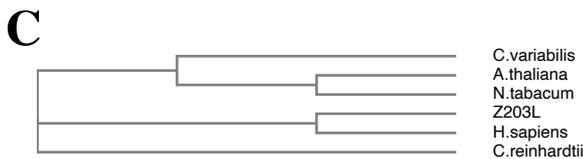
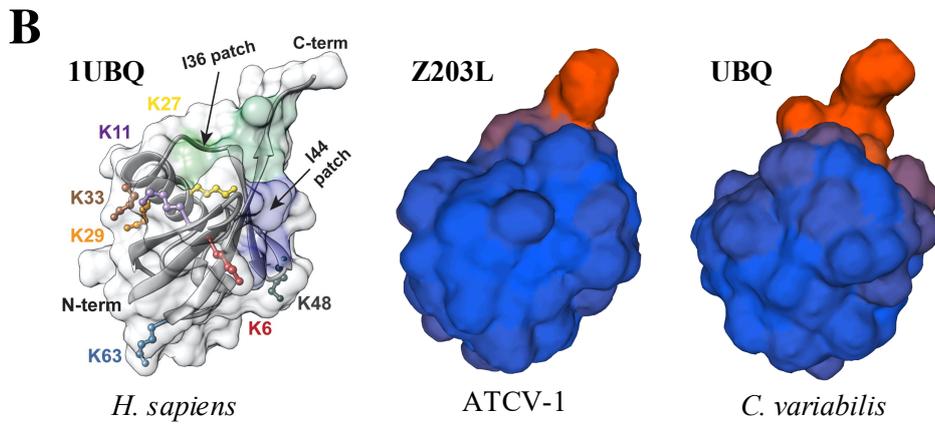


Abbildung 3.2 Analyse der Sequenz von Z203L im Vergleich zu pflanzlichen und humanen Ubiquitinen.

A. Die Aminosäuren sind nach ihren Eigenschaften aufgeteilt und farbig dargestellt: hydrophob und aromatisch (rot), sauer (blau), basisch (magenta); AS mit Hydroxyl-, Amin-, oder Amidgruppen oder polar (grün). Die Übereinstimmung der Aminosäuren wird mit Sternchen angezeigt (*), konservierte Substitutionen mit Doppelpunkt (:).

B. Darstellung der strukturellen Ähnlichkeit zwischen Z203L (mittig) und Ubiquitinen anderer Spezies. Humanes Ubiquitin 1UBQ befindet sich links [Deol *et al.*, 2019], Ubiquitin aus *C. variabilis* (UBQ) rechts. Die Struktur von Z203L ist ohne Asn77 dargestellt. Die mögliche Struktur von Z203L und UBQ wurde mit SWISS-MODEL erstellt [Waterhouse *et al.*, 2018].

C. Kladogramm zur Darstellung phylogenetischen Verwandtschaft von ORF Z203L zu Ubiquitinen anderer Spezies. Erstellt mit Clustal Omega [Sievers *et al.*, 2011].

3.1.2 Z203L wird von der humanen E3-Ligase RNF11 als Ubiquitin erkannt

Die Sequenzvergleiche von Z203L mit den Proteinen der Ubiquitin-Familie liefern eindeutige Hinweise darauf, dass es sich bei dem Z203L um ein virales Ubiquitin handelt. Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob das Z203L sich in Anwesenheit der ubiquitinierenden Enzymen auch als Ubiquitin verhält.

Die Funktion von Z203L als Ubiquitin wurde mit Hilfe von *in vitro* Ubiquitinierung-Assay überprüft (Abschnitt 6.2.9). In Anwesenheit von einem Ubiquitin aktivierenden Enzym, einem Ubiquitin konjugierendem Enzym, ATP und $MgCl_2$ ist eine E3-Ligase in der Lage, Zielproteine zu ubiquitinieren. Ist kein Substrat (Zielprotein) vorhanden, so bildet die E3-Ligase Ubiquitin-Ketten. Diese lassen sich einfach auf einem SDS-PAGE Gel nachweisen indem das gebundene Ubiquitin mit Hilfe von spezifischen Antikörpern detektiert wird. Für die *in vitro* Assays wurden humane Enzyme verwendet. Das humane E1-Ubiquitin aktivierende Enzym (UBE1, 121 kDa) und das E2-Ubiquitin konjugierende Enzym (UBE2D2, 17 kDa) sind weitgehend unspezifisch. Die E3-Ligasen hingegen sind für die Weiterreichung von dem aktivierten Ubiquitin an das entsprechende Zielprotein verantwortlich. Die E3-Ligase *Ring Finger Protein* 11 (RNF11, 19,9 kDa) wurde ausgewählt, weil sie weniger spezifisch agiert als die meisten E3-Ligasen. Ein humanes Ubiquitin, ein GST-Protein sowie zwei Varianten von GST-Z203L Fusionsproteinen wurden getestet.

Um das virale Protein nachweisen zu können, wurden zwei N-terminale GST-Fusionen des Proteins synthetisiert und über eine Chromatographiesäule mit Glutathion-Säulenmaterial aufgereinigt. Der C-Terminus von Z203L, der über das funktionell aktive Glycin verfügt, ist von einem Asparagin (N77) verdeckt. Um die mögliche Blockierung der aktiven Seite des Ubiquitins zu vermeiden, wurde eine Deletionsmutante des Z203L synthetisiert, die kein Asparagin an der Position 77 besitzt (GST-Z203L^{delN77}). Die wildtypische Z203L-Variante bleibt für den Test unverändert (GST-Z203L^{wt}). Zusätzlich wurde als Kontrolle noch ein GST-Protein eingesetzt um potenzielle falsch positive Ergebnisse ausschließen zu können (Abbildung 3.3 A).

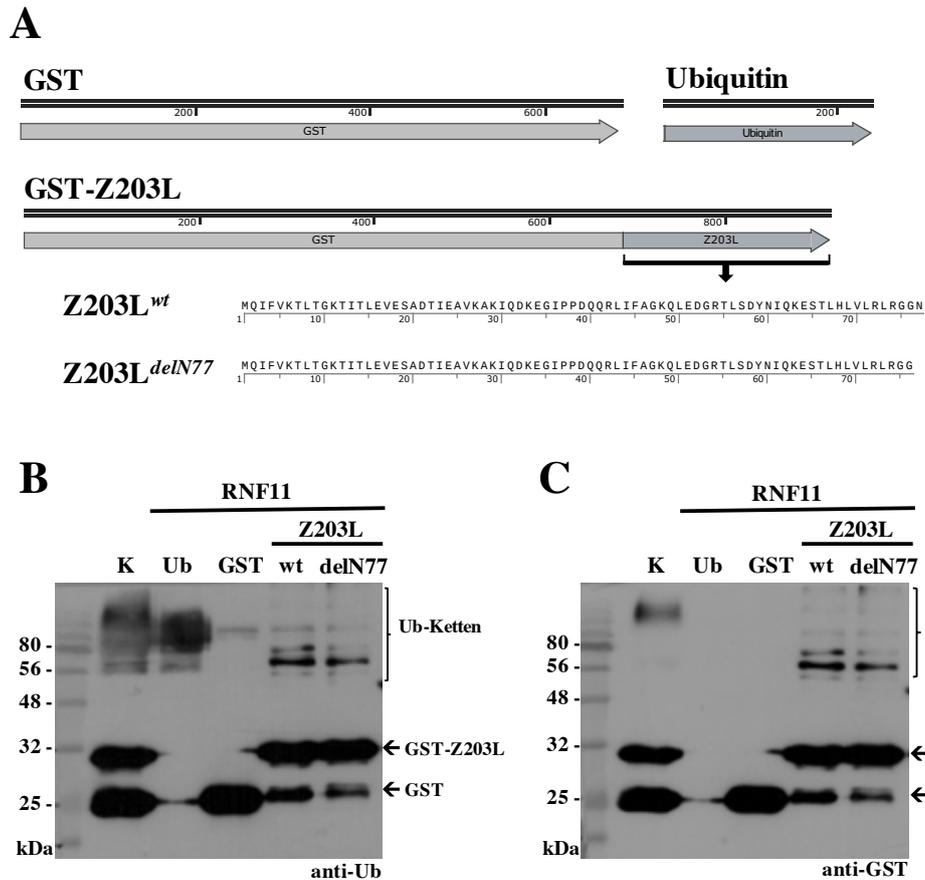


Abbildung 3.3 *in vitro* Ubiquitinierung-Assay mit dem viralen Z203L.

A. Schematische Darstellung verwendeter GST-Konstrukte (Expression in *E. coli* BL21CodonPlus im pGEX-3X Vektor). Neben dem humanen Ubiquitin (Ub) wurde GST sowie GST-Z203L Fusionsproteine in zwei Varianten verwendet: wildtypisch (GST-Z203L^{wt}) und mit Deletion von Asparagin an der Position 77 (GST-Z203L^{delN77}). **B.** und **C.** Nachweis der Bildung von Ubiquitinketten mit dem Z203L unter Verwendung von humaner E3-Ligase (RNF11). Immunodetektion mit dem Ubiquitin- (links) und nach dem Abwaschen des Antikörpers mit dem GST-Antikörper (rechts).

Die humane E3-Ligase ist in der Lage, sowohl die mutante Variante von Z203L, als auch das wildtypische Z203L zur Bildung von Ubiquitinketten (Ub-Ketten) zu verwenden. Beim Nachweis mit dem GST-Antikörper, sowie beim Nachweis mit dem Ub-Antikörper können im Bereich zwischen 50 und ca. 200 kDa mehrere gebundene Ubiquitine detektiert werden (Abbildung 3.3 B und C). Mit Hilfe des immunologischen Nachweis mit dem Ubiquitin-Antikörper kann auch die Bildung von Ubiquitinketten bei der Verwendung von humanem Ubiquitin

detektiert werden (Abbildung 3.3 B). Diese unterscheidet sich allerdings nur wenig von der Kontrolle (K), die alle benötigten Komponenten des Tests jedoch keine E3-Ligase enthält. Die Verwendung von GST in dem Ubiquitinierung-Assay bringt kein positives Ergebnis und führt nicht zur Kettenbildung (Abbildung 3.3 B und C).

3.1.3 Z203L fungiert als Signalprotein zum Abbau am Proteasom

Sowohl die Sequenzvergleiche mit Proteinen der Ubiquitin-Familie wie auch die *in vivo* Tests deuten darauf hin, dass es sich bei dem Z203L um ein funktionelles Ubiquitin handelt. Im nächsten Schritt, sollte geklärt werden, ob das Z203L auch als Ubiquitin *in vitro* identifiziert werden kann. Vor allem, sollte der Abbau am Proteasom genauer untersucht werden und die Frage geklärt werden, ob Z203L vom Proteasom erkannt wird.

3.1.3.1 Z203L-Fusionsproteine können nicht akkumulieren

Damit ein Protein am Proteasom abgebaut werden kann, muss es mit vier bis sieben Ubiquitinen markiert werden. Um zu testen ob eine Markierung mit dem Z203L auch zum Abbau am Proteasom führt, wurden Fusionsproteine synthetisiert. Ein Reporterprotein, das mit einem angehängten Ubiquitin in Pflanzen überexprimiert wird, sollte abgebaut werden, sofern es keine wichtige Funktion erfüllt.

Destabilisierung von GST in *N. benthamiana*

Zwei GST-Varianten wurden in die *N. benthamiana* Pflanzen mit Hilfe der Agrobakterien-Infiltration eingebracht, um so möglichst hohe Syntheserate der Proteinen zu erhalten. Hierfür wurden sie in den pTAK35S Vektor kloniert und unter der Kontrolle von dem starken 35S-Promotor gestellt. Neben dem GST-Reporterprotein wurde ein GST-Z203L-Fusionsprotein in die *N. benthamiana* Blätter eingebracht (Abbildung 3.4 A). Für den Test wurde in einem Blatt *GST* und in einem zweiten Blatt derselben Pflanze das *GST-Z203L* Fusionsgen überexprimiert. Dies wurde für insgesamt drei Pflanzen wiederholt.

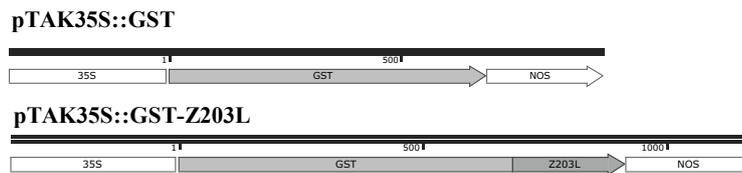
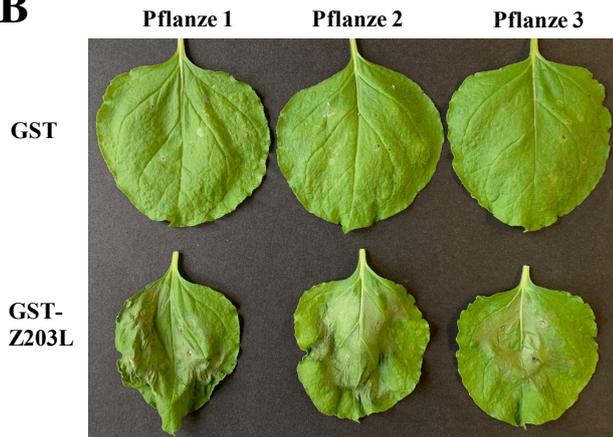
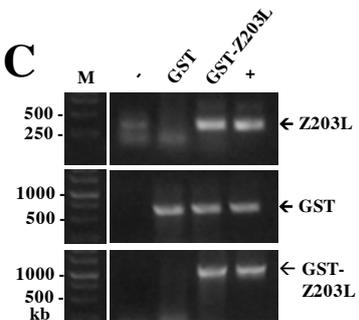
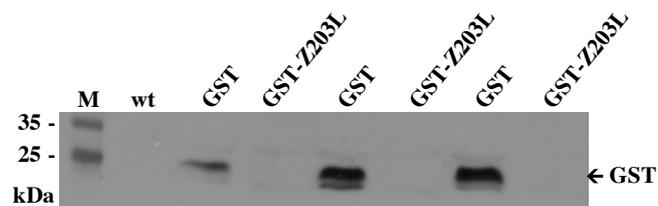
A**B****C****D**

Abbildung 3.4 Expression von *GST-Z203L* führt zu Bildung von Nekrosen.
A. Schematische Darstellung verwendeter GST-Konstrukte in dem pTAK35S Vektor. Sowohl GST als auch GST-Z203L wurden mit Hilfe der Agrobakterien in die *N. benthamiana* Blätter eingebracht und nach drei Tagen ausgewertet. **B.** Nachweis der Nekrosenbildung in den infiltrierten Bereichen der Blätter im Vergleich zur GST-Kontrolle. **C.** Nachweis der Plasmid-DNA in den zur Infiltration verwendeten Agrobakterien. **D.** Nachweis von GST in den infiltrierten Blättern. Immunodetektion mit dem GST-Antikörper.

Die Expression des *GST*-Gens verursacht keine phänotypische Veränderungen in dem infiltrierten Blattmaterial. Die Überexpression von *GST-Z203L* führt bereits nach drei Tagen zur Bildung von Nekrosen im infiltrierten Blattmaterial (Abbildung 3.4 B). Der Nachweis der Synthese der GST-Proteine in den Blättern erfolgte in zwei Schritten. Zum einen wurde die in den Agrobakterien enthaltene Plasmid-DNA mit Hilfe von sequenzspezifischen Primern für *GST*,

Z203L und für *GST-Z203L* nachgewiesen (Abbildung 3.4 C). Zum anderen wurde das synthetisierte GST über einen spezifischen Antikörper (anti-GST) detektiert. Obwohl die infiltrierten Blätter, die zu exprimierende Plasmid-DNA mit dem *GST-Z203L* Konstrukt enthalten, kann hier kein GST-Protein nachgewiesen werden. Das GST kann nur in den Proben nachgewiesen werden, die GST ohne dem angehängten Z203L synthetisieren (Abbildung 3.4 D).

Destabilisierung von GFP in *N. benthamiana*

Das synthetisierte GST-Z203L führt zum Absterben von Gewebe in den infiltrierten Blattbereichen. Dies kann mehrere Ursachen haben und liegt entweder an zytotoxischen Eigenschaften des Z203L oder an einer Auslastung des Proteinsynthese- und Proteinabbau-Mechanismus. Um die beiden Mechanismen zu umgehen und das Verhalten des GST-Z203L-Proteins dennoch studieren zu können, wurden Konstrukte viralen Ursprungs verwendet.

Hierfür wurden die Proteine von Interesse (GFP- sowie GFP-Z203L-Fusionsprotein) in das Genom des Kartoffelvirus X (*Potato Virus X*, PVX) kloniert und in den pTAK35S Vektor eingebracht. Das Gen wurde hier vor das Hüllprotein (*coat protein*, CP) des PVX Virus kloniert und durch einen zusätzlichen CP-Promotor reguliert. Das Konstrukt enthält zudem alle Gene, die im Genom des PVX enthalten sind. Die Plasmide wurden mit Hilfe der Agrobakterien-Infiltration in das Blattgewebe eingebracht und sind so konstruiert, dass eine erfolgreiche Expression der Gene zur Bildung von Viruspartikeln führt. Die Viruspartikel enthalten nicht nur alle benötigten, viralen Gene sondern auch die Proteine von Interesse. In diesem Fall sind das GFP und ein GFP-Fusionsprotein mit dem viralen Z203L (Abbildung 3.5 A).

Die Synthese von Viruspartikeln mit dem GFP führt nach kurzer Zeit zur Bildung von Nekrosen. Die sehr starke Expression des *GFP*-Gens kann unter ultraviolettem Licht gut beobachtet werden (Abbildung 3.5 B, rechts). Die Expression von dem *GFP-Z203L* Fusionsgen kann unter UV-Licht nicht nachgewiesen werden. Die infiltrierten Blätter gleichen den wildtypischen Blätter, die nicht infiltriert wurden (Abbildung 3.5 B). Mit Hilfe der spezifischen Primer (für *GFP* und für Z203L) lässt sich die eingebrachte Plasmid-DNA direkt im

Pflanzengewebe nachweisen. Sowohl das *GFP*-Gen als auch das *GFP-Z203L* Fusionsgen sind in dem infiltrierten Blattgewebe enthalten (Abbildung 3.5 C).

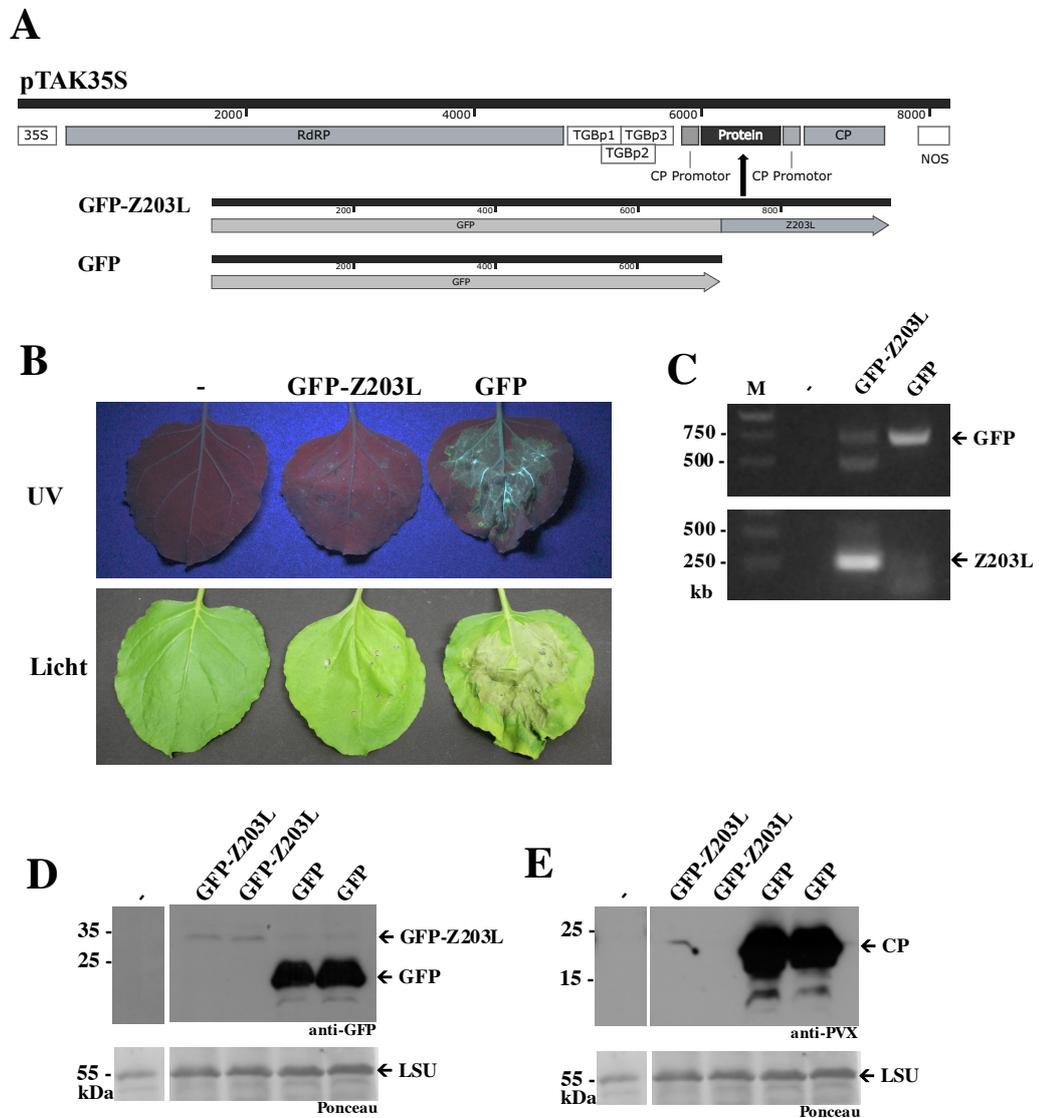


Abbildung 3.5 Z203L verhindert die Bildung von PVX-Viruspartikeln.

A. Schematische Darstellung verwendeter GFP-Konstrukte zur Expression von PVX-Virusgenom in *N. benthamiana* (im pTAK35S Vektor, Agrobakterien-Infiltration). Das exprimierte Genom enthält eine virale Replikase (RdRP), den *Triple Gene Block* (TGBp1-3) sowie das virale Hüllprotein (CP). **B.** Nachweis der Bildung von Nekrosen in dem mit Virusgenom infiltrierten Blattgewebe, sowie Nachweis des synthetisierten GFPs unter ultraviolettem Licht (GFP-Kontrolle) **C.** Nachweis der Plasmid-DNA in den infiltrierten Blättern. **D.** Nachweis von GFP in den infiltrierten Blättern. Immunodetektion mit dem GFP-Antikörper. **E.** Nachweis von viralem Hüllprotein (CP) des PVX-Virus in dem Blattgewebe. Immunodetektion mit dem PVX-Antikörper.

Die starke *GFP*-Expression kann auch mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Die große Mengen an GFP kann nicht nur unter UV-Licht detektiert werden, sondern auch mit Hilfe des GFP-Antikörpers (Abbildung 3.5 D). Zusätzlich kann auch das PVX nachgewiesen werden. Mit Hilfe von speziellen Antikörpern lässt sich das virale Hüllprotein detektieren, das sehr stark in den untersuchten GFP-synthetisierenden Proben akkumuliert (Abbildung 3.5 E). Die Expression von *GFP* bei den Proben, die das Fusionsgen *GFP-Z203L* exprimieren, erscheint nicht so stark ausgeprägt wie bei *GFP*-exprimierenden Blättern. Nichtsdestotrotz können kleine Mengen von *GFP-Z203L*-Fusionsprotein in dem Blattgewebe immunologisch detektiert werden (Abbildung 3.5 D). Das virale Hüllprotein lässt sich in den *GFP-Z203L* exprimierendem Gewebe nicht nachweisen. Somit findet hier auch keine Viruspartikel-Synthese statt. Die Expression von *Z203L*-Fusionsproteinen führt vermutlich zu frühem Zelltod und verhindert damit die Virusinfektion, wie es aus den vorherigen Experimenten mit GST zu erwarten war (Abbildung 3.5 E). Obwohl für alle Tests die gleichen Mengen an Blattgewebe untersucht wurden, wurde die Membran zusätzlich mit Ponceau-Lösung angefärbt. Somit wurden gleiche Mengen an pflanzeneigenen LSU in den Proteinproben nachgewiesen (Abbildung 3.5 D und E, unten).

3.2 Z292L – virale E3-Ligase

3.2.1 ORF Z292L weist Ähnlichkeiten zu E3-Ligasen auf

Die Suche in den Genbanken liefert Hinweise drauf, dass ORF Z292L für eine E3-Ligase kodiert [Altschul *et al.*, 1990]. Ein Z292L-ähnliches Gen kann in sechs weiteren ATCV-Stämmen gefunden werden. Die Übereinstimmung der Sequenz zwischen den verwandten Proteinen und Z292L beträgt über 80 %. In PBCV-Viren befinden sich ebenfalls orthologe Gene, deren Sequenz der vom ORF Z292L ähnelt. In 11 PBCV-Spezies kann ein ORF identifiziert werden, der ebenfalls eine RING-Fingerdomäne besitzt und dessen Sequenz mit der des Z292L zum Teil übereinstimmt (zwischen 41 und 47 %). Das PBCV-1 enthält einen offenen Leserahmen mit der RING-Fingerdomäne, der ORF A481L. Die Sequenz von A481L stimmt mit der des Z292L zu 38 % überein und wird in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht.

Auf Basis dieser Sequenzvergleiche kann im C-terminalen Bereich des Z292L eine RING-Fingerdomäne identifiziert werden (Abbildung 3.6 A, grün markiert). Vergleicht man die RING-Fingerdomäne des Z292L (zwischen Aminosäure 118 und 193) mit den RING-Fingerdomänen von bekannten, humanen E3-Ligasen wie RNF11 (*RING finger protein 11*) oder RNF38 (*RING finger protein 38*), können Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz gefunden werden [Zimmermann *et al.*, 2018]. Vor allem ist die Consensus-Sequenz der RING-Fingerdomäne stark konserviert. Diese ist zur Bindung von Metallionen (Zn^{2+}) notwendig und tritt bei allen RING E3-Ligasen auf. Es gibt eine Vielzahl an Proteinen pflanzlichen aber auch tierischen Ursprungs, welche die Zink-bindende Domäne besitzen. Diese Proteine spielen bei der Ubiquitinierung eine Rolle als E3-Ligase (Abbildung 3.6 B).

A

```

MCSAERMYDVLTRLYKSSSSLVFKNKKSDFQIIIRPDIEASQGFYMSFDVVIYMDPA
1|      10|      20|      30|      40|      50|

NEPLLKCLQNYADAAGFNPNANEEFLVASFEIDKRSRSDDEDVNEFCALISDVEGIS
60|      70|      80|      90|      100|      110|

ICPCGERFIHDDGDMCTFCDLFATDEKLETLCSICMDSCRMHAVTMGCCGNKVHK
120|      130|      140|      150|      160|      170|

MCDAEWYMKGNKTCAFRCRAALPERETQVTTISDIVASIAATAVEQRLAGNNAQISESL
180|      190|      200|      210|      220|      228|

```

B

Z292L	CSICMDSCRMHAVTMGCCGNKVHKMCDAEWYMKGNKTCAFRC	43
A481L	CPICMEKCYNMHGKIMKCCGTLHTKCDNKWYVTGNKKCVMC	43
RNF11	CVICMDFVYGDPIRFLPCMHIYHLDCIDDWLM-RSFTCPSC	42
RNF38	CVVCMCDFESRQLLRVLPCHFEHAKCVDKWLK-ANRTCPICR	42
	* :** . . . * * * . * . * *	

Abbildung 3.6 Sequenz von Z292L im Vergleich zu RING-Fingerdomäne.

A. Aminosäuresequenz von Z292L. Die RING-Fingerdomäne ist grün markiert.

B. Die Aminosäuren sind nach ihren Eigenschaften aufgeteilt und farbig dargestellt: hydrophob und aromatisch (rot), sauer (blau), basisch (magenta); AS mit Hydroxyl-, Amin-, oder Amidgruppen oder polar (grün). Die Übereinstimmung der Aminosäuren wird mit Sternchen angezeigt (*), konservierte Substitutionen mit Doppelpunkt (:), halb-konservierte Substitutionen mit ähnlichen Struktur mit Punkt (.). Erstellt mit Clustal Omega [Sievers *et al.*, 2011].

3.2.2 Z292L gehört zu den Dimer-bildenden Ligasen

Die Sequenzvergleiche liefern Hinweise darauf, dass Z292L als eine E3-Ligase fungieren kann. Auch der ORF aus dem PBCV-1 Virus enthält die für die E3-Ligasen wichtige RING-Fingerdomäne. Allein in *Arabidopsis* gibt es über 1000 E3-Ligasen, 499 davon besitzen eine RING-Fingerdomäne [Mazzucotelli *et al.*, 2006]. Die E3-Ligasen sind nicht nur auf Basis der Struktur dieser Domäne aufgeteilt, sondern auch nach deren Funktionsweise. Die E3-Ligasen können als Monomere, Dimere oder als Teil des SCF-Komplexes agieren. Im ersten Schritt sollte geklärt werden zu welcher Ligasen-Art das Z292L dazugehört. Hierfür wurden Hefe-2-Hybrid Tests durchgeführt um die potenziellen Interaktionspartner zu identifizieren. Ausgewählt wurden Proteine, die ein Teil

des SCF-Komplexes bilden und die von der E3-Ligase bekanntermaßen ebenfalls gebunden werden (Cullin 1 und Cullin 3 aus *A. thaliana*). Um zu klären, ob Z292L als Monomer oder als Dimer agieren kann, wurde die Fähigkeit des Z292L-Proteins getestet, sich selbst binden zu können. Zusätzlich wurde auch, das aus dem PBCV-1 stammende Ortholog von Z292L, das A481L auf die gleichen Eigenschaften getestet. Für die Tests wurde ein bekanntes Vektor-basierendes System verwendet und alle Testkomponenten wurden in die entsprechenden pGBT9 und pGAD424 Vektoren kloniert (Abbildung 3.7 A).

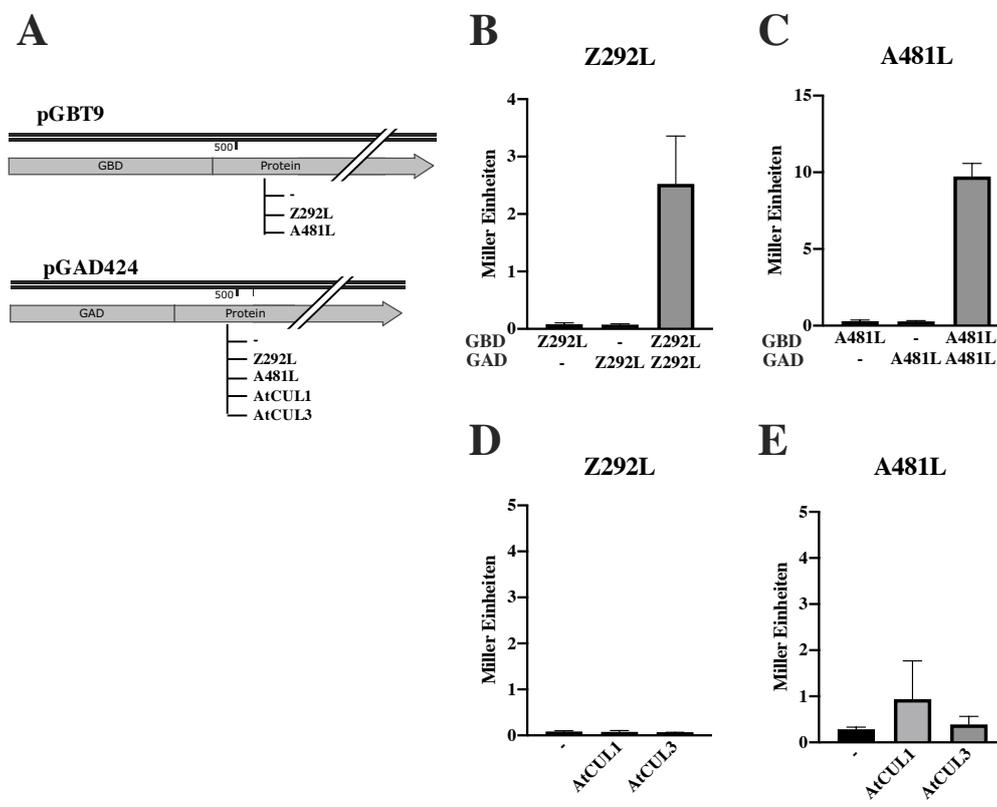


Abbildung 3.7 Z292L und A481L bilden Dimere in Hefe.

A. Schematische Darstellung verwendeter Konstrukte in den pGAD424 und pGBT9 Vektoren zur Untersuchung der Protein-Protein-Interaktion in Hefe. Die in den pGBT9 Vektor klonierten viralen Proteine stellen hypothetische RING E3-Ligasen dar: Z292L (aus ATCV-1) und A481L (aus PBCV-1). Die in den pGAD424 Vektor klonierten Proteine gehören zu den potenziellen Bindungspartner von E3-Ligasen (AtCUL1 und AtCUL3). Sowohl die Dimerbildung der viralen Proteine (**B** und **C**), als auch die Bindung an die Culline wurde getestet (**D** und **E**).

Die Interaktionsstudien in Hefe zeigen eine Tendenz des Z292L zu Dimerbildung (Abbildung 3.7 B). Das A481L zeigt ebenfalls die Eigenschaft sich selbst binden zu können (Abbildung 3.7 C). In Bezug auf die Komplex-Bildung mit den Proteinen der Cullinfamilie, kann bei Z292L keine Interaktion verzeichnet werden (Abbildung 3.7 D). Bei Z292L handelt es sich demnach um ein Dimer-bildendes Protein. Bei dem aus dem PBCV-1 stammenden Ortholog A481L kann eine schwache Interaktion mit Cullin 1 gemessen werden (Abbildung 3.7 E).

3.2.3 Z292L ist *in vitro* eine aktive E3-Ligase

Die Interaktionstests in Hefe zeigen, dass das Z292L-Protein Dimere bilden kann und theoretisch als eine E3-Ligase ohne Anwesenheit von Cullinen agieren könnte. Um das zu überprüfen wurden *in vitro* Ubiquitinierung-Assays durchgeführt. Hier wurde die Eigenschaft des Z292L getestet, in Anwesenheit von E1- und E2-Enzymen, Ubiquitinketten zu bilden. Eine GST-Fusion des Z292L-Proteins wurde synthetisiert, aufgereinigt und in den Assays eingesetzt. Die Fähigkeit Ubiquitinketten zu bilden wurde mit verschiedenen Ubiquitin-Varianten getestet. Um das virale Ubiquitin Z203L nachweisen zu können, wurden zwei N-terminale GST-Fusionen des Proteins synthetisiert und über eine Säule aufgereinigt (GST-Z203L^{wt} und GST-Z203L^{delN77}). Ein humanes Ubiquitin sowie das GST-Protein allein wurden zur Kontrolle herangezogen (Abbildung 3.8 A).

Mit Hilfe des GST-Antikörpers ist es möglich, nicht nur das GST-Z292L, sondern auch das virale Ubiquitin nachzuweisen, das ebenfalls als Fusion mit dem GST synthetisiert wurde. Es ist ebenfalls möglich die Ubiquitin-Ketten nachzuweisen, die aus mehreren GST-Z203L-Proteinen bestehen. Das Z292L-Protein ist in der Lage, sowohl die mutante Variante von Z203L, als auch das wild-typische Z203L zur Bildung von Ubiquitinketten (Ub-Ketten) zu verwenden. Sowohl das GST-Protein als auch das humane Ubiquitin werden vom Z292L nicht verwendet (Abbildung 3.8 C). Dieses Ergebnis ist ebenfalls nach dem Nachweis von Ubiquitin mit dem etwas weniger spezifischen Ubiquitin-Antikörper zu erkennen (Abbildung 3.8 B).

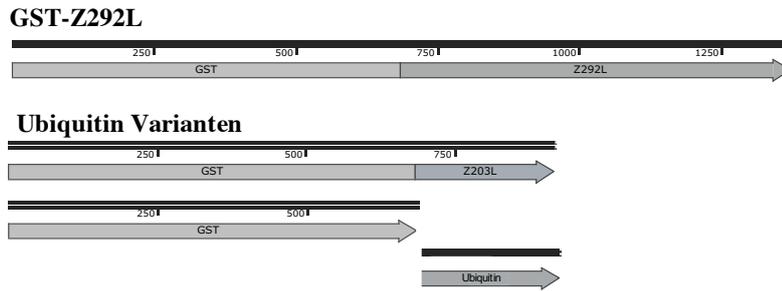
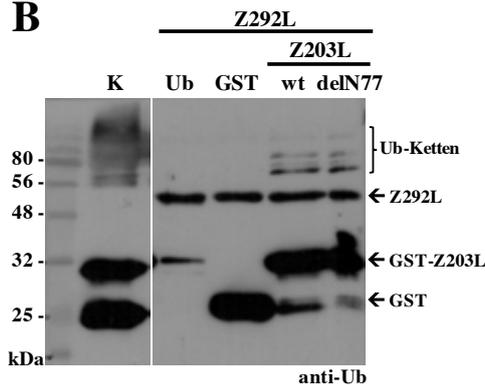
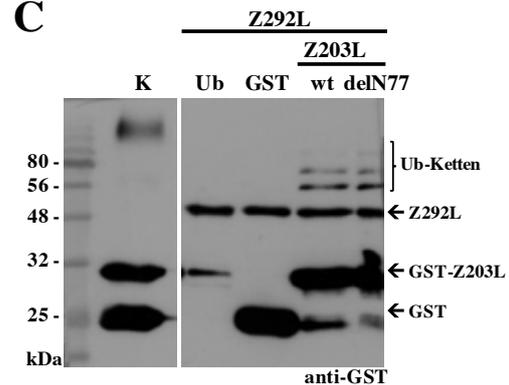
A**B****C**

Abbildung 3.8 *in vitro* Ubiquitinierung-Assay mit dem viralen Z292L.

A. Schematische Darstellung verwendeter GST-Konstrukte (Expression in *E. coli* BL21-CodonPlus im pGEX-3X Vektor). Neben dem humanen Ubiquitin (Ub) wurde GST- sowie GST-Z203L-Fusionsproteine in zwei Varianten verwendet: wildtypisch (GST-Z203L^{wt}) und mit Deletion von Asparagin an der Position 77 (GST-Z203L^{delN77}). Als E3-Ligase wurde das virale Protein Z292L verwendet.

Nachweis der Bildung von Ubiquitinketten mit dem Z203L unter Verwendung von humaner E3-Ligase (RNF11). Immunodetektion mit dem Ubiquitin- (**B**) und nach dem Abwaschen des Antikörpers mit dem GST-Antikörper (**C**).

3.2.4 Z292L interagiert mit Proteinen aus *C. reinhardtii*

Das virale Z292L besitzt Eigenschaften, die es als eine E3-Ligase identifizieren. Für eine erfolgreiche Ubiquitinketten-Bildung muss es nicht nur in der Lage sein, Ubiquitin und dessen Derivate zu binden, sondern auch das E2-konjugierende Enzym. Nichtsdestotrotz ist es die Bindung an die Zielproteine die wichtigste Fähigkeit der E3-Ligasen. Während die Bindung an die E2-Enzyme oder Ubiquitin für alle E3-Enzyme gemeinsam ist, so unterscheiden sich E3-Ligasen in der spezifischen Bindung von Zielproteinen.

Im nächsten Schritt sollte die spezifische Interaktion des Z292L mit potenziellen Zielproteinen identifiziert werden. Hierfür wurden mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid Systems die Interaktion von Z292L mit allen in der cDNA-Bank enthaltenen Proteinen getestet. Zum einen wurde eine cDNA-Bank von der Alge *C. reinhardtii* (im pGAD-HA Vektor) verwendet, zum anderen wurde die Suche nach Interaktionspartnern mit cDNA von *A. thaliana* durchgeführt (im pPR3-N). Das Z292L-Gen befand sich im entsprechenden *bait*-Vektor: pGBT9 oder pBT3-N. Die Suche nach Interaktionspartner von Z292L im pflanzlichen Transkriptom ergab keine Treffer. In Alge konnten dagegen drei interagierende Proteine identifiziert werden: eine 2-phospho-D-glycerat Hydrolase (Enolase, ENO), eine Formiat-Acetyltransferase (Pyruvat-Formiat-Lyase, PFL) und eine Acyl-Coenzym A Oxidase (ACX). Die cDNA-Banken enthalten Fragmente der Transkripte eines Organismus. Nicht immer entsprechen diese Fragmente dem gesamten Protein. Meist enthalten sie viele zufällig fragmentierte Sequenzen, die nur einen Teil der Domänen des Proteins enthalten. So wurde auch bei der Enolase und der Formiat-Acetyltransferase eine Interaktion zwischen dem Z292L und einem Fragment des genannten Proteins nachgewiesen. Nach entsprechender Vorbereitung wurde die DNA der positiven Hefeklonen der interagierenden Proteinen isoliert und identifiziert. Die DNA-Sequenzen wurden in den pGAD424 Vektor kloniert, um die gefundene Interaktion zu überprüfen (Abbildung 3.9 A). Die Bindung an die ENO und PFL wurde mit dem gleichen Fragment des Enzyms überprüft, das in der *Chlamydomonas* cDNA-Bank vorhanden war. Für die ACX wurde ein entsprechendes Ortholog aus dem Genom von *Arabidopsis* verwendet.

Die Bindung von Z292L an die Enolase konnte bestätigt werden (Abbildung 3.9 B). Die Enolase ist ein Enzym aus der Glycolyse und für die Spaltung von 2-Phosphoglycerat zu einem Wassermolekül und Phosphoenolpyruvat (PEP) verantwortlich. Bereits ein kleines Fragment des Proteins (zwischen Aminosäure 94 und 186) zeigt eine Bindung mit Z292L. Die Interaktionen mit der Formiat-Acetyltransferase und der Acyl-Coenzym A Oxidase erwiesen sich als falsch positiv oder konnten zumindest nicht erneut nachgewiesen werden (Abbildung 3.9 C und D).

Um zu überprüfen ob auch das verwandte Protein aus PBCV-1 an die gleichen Zielproteinen binden kann, wurde die Interaktion von A481L mit den drei identifizierten Proteinen getestet. Dieses bindet jedoch an keines der gefundenen Proteine, weder aus *C. reinhardtii* noch aus *A. thaliana* (Abbildung 3.9 E).

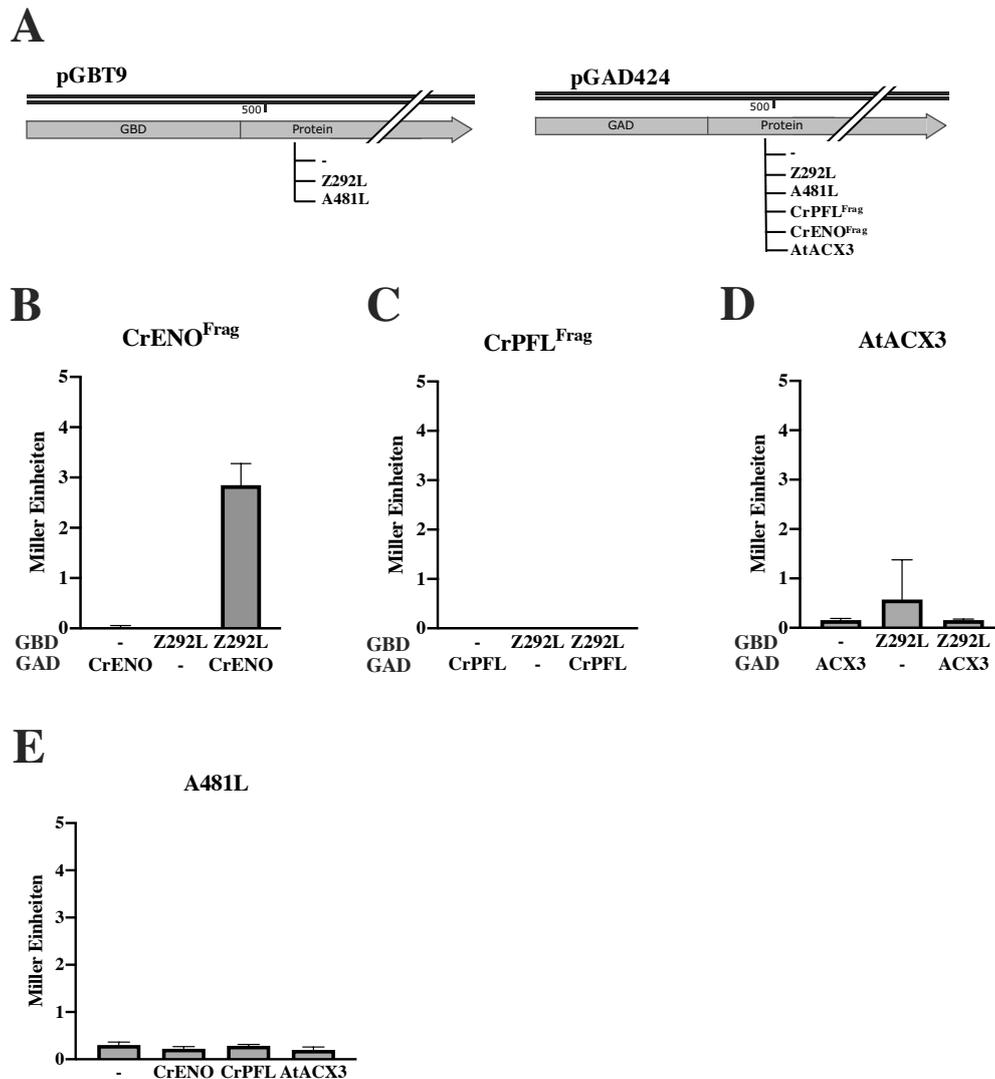


Abbildung 3.9 Z292L interagiert mit Proteinen in Hefe.

A. Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte in den pGAD424 und pGBT9 Vektoren zur Untersuchung der Protein-Protein-Interaktion in Hefe. Die in den pGBT9 Vektor klonierten viralen Proteine stellen hypothetische RING E3-Ligasen dar: Z292L (ATCV-1) und A481L (PBCV-1). Die in den pGAD424 Vektor klonierten Proteine sind im cDNA-Screen identifizierte Bindungspartner von Z292L (CrENO, CrPFL und AtACX3). **B.** Interaktion zwischen Z292L und CrENO^{Frag}. **C.** Interaktion zwischen Z292L und CrPFL^{Frag}. **D.** Interaktion zwischen Z292L und AtACX3. **E.** Interaktion zwischen A481L und den Interaktionspartner von Z292L.

3.2.5 Z292L bindet spezifisch an Enolase aus Algen

Chlorella-Algen besitzen nur eine Enolase, deren Sequenz nicht vollständig sequenziert wurde. Im Genom von *C. reinhardtii* ist ein Gen bekannt, dessen Sequenz der von der Enolase ähnelt. Durch alternatives Spleißen können zwei Varianten des translatierten Proteins entstehen. Die entsprechenden codierenden Bereiche werden *ENO* und *PGH1* genannt. Beide wurden als Enolase identifiziert und unterscheiden sich nur in der Länge der Sequenz. Die später gefundene PGH1-Variante der Enolase besitzt am N-Terminus 105 Aminosäuren mehr, ab Aminosäure 106 ist die Sequenz der beiden Proteine identisch. Das mit Z292L interagierende Enolase-Fragment ist größtenteils in den beiden Varianten vorhanden und zeigt konservierte Bereiche, die mit den Sequenzen der Enolasen aus *Arabidopsis* übereinstimmen (Abbildung 3.10 A, schwarzer Balken).

In Genom von *Arabidopsis* gibt es Gene, die insgesamt für drei unterschiedliche Enolasen codieren. Die Enolase 1 ist in Chloroplasten lokalisiert (ENO1), die Enolase 2 (AtENO2, AtLOS2) in Cytoplasma, Mitochondrien und Nukleus. Die dritte Enolase (AtENO3, AtENOC) ist ausschließlich im Nukleus aktiv. Die Enolase 2 wird als bifunktionelle Enolase bezeichnet. Sie spielt nicht nur bei dem Metabolismus eine Rolle, sondern fungiert auch als ein positiver Regulator der Gene, die bei Kältestress exprimiert werden (Transkriptionsaktivator) [Lee 2002]. Die DNA-Sequenz von Enolase 2 aus *A. thaliana* stimmt am meisten mit der Sequenz der Enolase aus Algen überein. Im Bereich des C-Terminus zeigen die Sequenzen der Enolasen einen stark konservierten Bereich (Abbildung 3.10 A, markiert mit *). Die Gensequenzen der beiden Enolasen, welche die größten funktionellen Ähnlichkeiten und Aminosäuren-Übereinstimmungen aufweisen, wurden in den pGAD424 Vektor kloniert um ihre Interaktionen mit Z292L unter Verwendung des Hefe-2-Hybrid Systems zu testen (Abbildung 3.10 B).

Das Z292L interagiert ausschließlich mit der Enolase aus *Chlamydomonas reinhardtii*. Trotz der großen Ähnlichkeit in Sequenz und Funktion bindet keine der *Arabidopsis* Enolasen an das virale Protein Z292L (Abbildung 3.10 C). Im Vergleich dazu zeigt das A481L aus dem PBCV-1 keine Interaktion mit den Enolasen, auch nicht mit der Enolase aus Algen (Abbildung 3.10 D).

3.2.5.1 Inhibierung der Enolase verlangsamt die Virusinfektion

Der Nachweis der *in vitro* Funktion von Z292L als E3-Ligase sowie die Bindung des Proteins an die Enolase aus Algen liefern Hinweise drauf, dass die wirtseigene Enolase während der Virusinfektion eine wichtige Rolle spielt. Eine Ubiquitinierung ist ein bekannter Mechanismus zur Regulation von Enolasen und wurde in mehreren Spezies dokumentiert [Didiasova *et al.*, 2019]. Die Enolase ist eines der Schlüsselenzyme der Glycolyse und somit des Kohlenhydrat-Stoffwechsels. Das, zusammen mit der Tatsache, dass es in Algen nur eine Enolase gibt, macht die Enolase zu einem geeigneten Zielprotein für den viralen Angriff. Um herauszufinden, ob die Enolase tatsächlich eine Rolle bei der Virusinfektion spielt, wurde diese gehemmt. Fluorid ist ein bekannter Enolase-Inhibitor, der das aktive Zentrum des Enzyms bindet. Im aktiven Zentrum des Enzyms befinden sich zwei Metallionen Mg^{2+} die vom Fluorid gebunden werden können. Ist das der Fall, kann kein weiteres Substrat an dem Enzym binden und das Protein verliert seine Funktion [Qin *et al.*, 2006].

Um die Enolase während der Virusinfektion zu inhibieren, wurden Plaque-Assays in Anwesenheit von NaF durchgeführt. Die Zugabe von 75 mM NaF wirkt sich negativ auf die Virusinfektion aus. Die Zugabe der gleichen Menge von NaCl zeigt eine vergleichsweise geringe Wirkung (Abbildung 3.11 A). Verändert sich die Konzentration des Enolase-Inhibitors kann eine proportionale Veränderung in der Anzahl der gezählten Plaques beobachtet werden. Je stärker konzentriert der Inhibitor eingesetzt wird, desto stärker wird die virale Infektion gehemmt. Bereits bei einer Konzentration von 25 mM sinkt die Anzahl der gezählten Plaques um die Hälfte (Abbildung 3.11 B). Diesen Effekt kann für alle Verdünnungsstufen des Experiments beobachten werden (Abbildung 3.1 C).

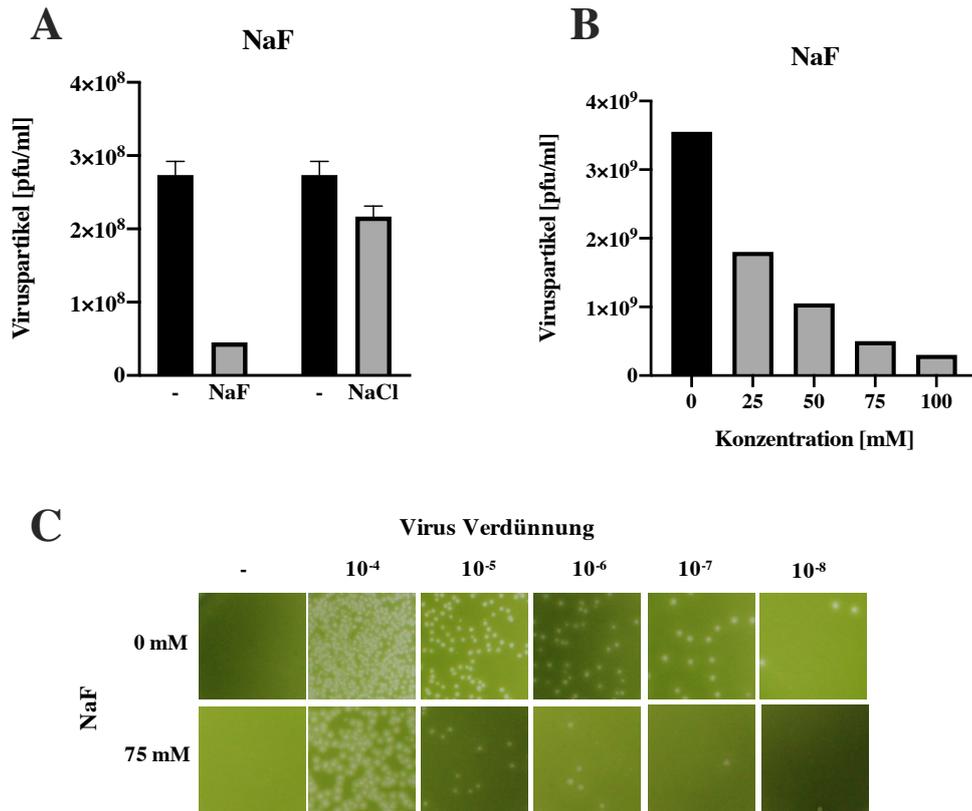


Abbildung 3.11 Fluorid hemmt die Infektion von *Chlorella*-Algen mit ATCV-1.
A. Anzahl der Plaques gezählt nach der Virusinfektion (Verdünnung 10⁻⁶) in Anwesenheit von 75 mM NaF und 75 mM NaCl.
B. Anzahl der Plaques gezählt nach der Virusinfektion (Verdünnung 10⁻⁶) in Anwesenheit von unterschiedlichen Konzentrationen von NaF (0 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM und 100 mM).
C. Plaque-Assay mit Zusatz von 75 mM NaF und ohne Zusätze im Medium. Dargestellt sind alle Verdünnungsstufen des eingesetzten Virus.

3.3 Z339L – ein virales SKP1-Protein

3.3.1 ORF Z339L kodiert für ein SKP1-Protein

Nach dem Vergleichen der Sequenz von Z339L mit den Sequenzen der Genbanken (HHpred [Zimmermann *et al.*, 2018]) kann Z339L eindeutig der Familie der SKP1-Proteinen zugeordnet werden. Die Familie der SKP1-Proteine ist stark konserviert und agiert im SCF-Komplex als eine E3-Ligase. Die Spezifität des gesamten SCF-Komplexes ist von der Bindung des SKP1-Proteins an ein bestimmtes F-Box-Protein abhängig. Das F-Box-Protein wiederum bindet spezifisch das zu ubiquitinierende Zielprotein. Die SKP1-Proteine stellen zusammen mit den Cullinen das Grundgerüst des SCF-Komplexes. Das Z339L besitzt zwei Domänen, die in allen SKP1-Proteinen vorhanden sind: die BTB/POZ-Domäne (Abbildung 3.12 A, weiß) und die SKP1-Domäne (Abbildung 3.12 A, grau). Diese Domänen sind essenziell für die Bindung von Cullinen.

Das Z339L weist große Ähnlichkeiten zu den SKP1-Proteinen aus *C. reinhardtii* oder *A. thaliana* (Abbildung 3.12 B). In allen ATCV-Spezies befindet sich ein orthologes Gen mit Übereinstimmungen der Sequenz zu Z339L von über 78 % (BLAST Algorithmus [Altschul *et al.*, 1990]). Im Gegensatz dazu besitzen nur drei der PBCV-Spezies ein orthologes Gen zu Z339L, die Protein-Sequenzen stimmen zu 30 % überein. Das am nächsten verwandte Z339L-Ortholog ist das A039L aus dem PBCV-1 (Abbildung 3.12 C).

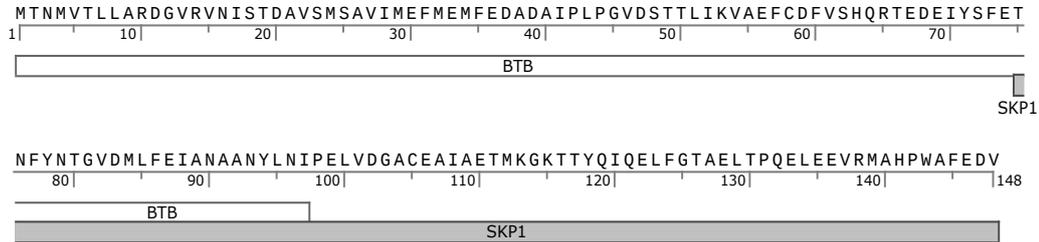
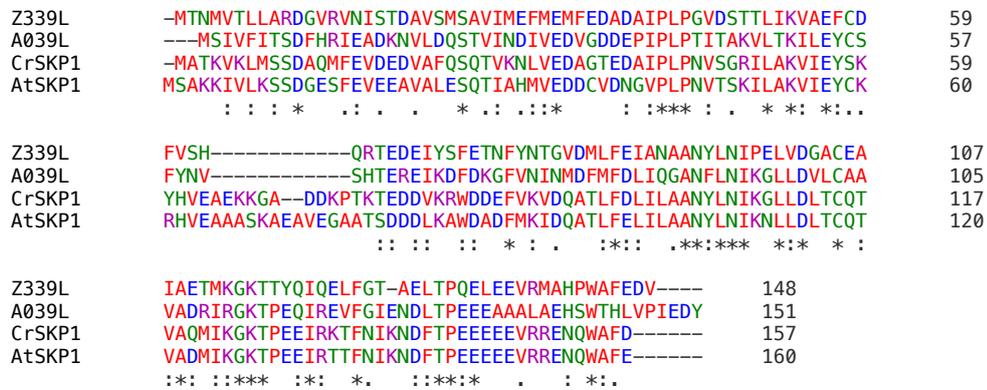
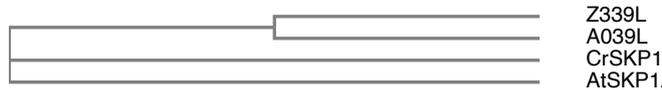
A**B****C**

Abbildung 3.12 ORF Z339L kodiert für ein SKP1-Protein.

A. Aminosäuresequenz von Z339L. Markiert sind konservierte Sequenz-Bereiche: BTB/POZ-Domäne (weiß) und SKP1-Domäne (grau). **B.** Vergleich der Aminosäuresequenz von Z339L zu bekannten Proteinen aus der SKP1-Familie. Die Aminosäuren sind nach ihren Eigenschaften aufgeteilt und farbig dargestellt: hydrophob und aromatisch (rot), sauer (blau), basisch (magenta); AS mit Hydroxyl-, Amin-, oder Amidgruppen oder polar (grün). Die Übereinstimmung der Aminosäuren wird mit Sternchen angezeigt (*), konservierte Substitutionen mit Doppelpunkt (:), halb-konservierte Substitutionen mit ähnlichen Struktur mit Punkt (.). Erstellt mit Clustal Omega [Sievers *et al.*, 2011]. **C.** Kladogramm zur Darstellung phylogenetischen Verwandtschaft von ORF Z339L zu A039L und SKP1-Proteinen auch *A. thaliana* und *C. variabilis*. Erstellt mit Clustal Omega [Sievers *et al.*, 2011].

3.3.2 Z339L interagiert spezifisch mit bekannten Interaktionspartnern von SKP1-Proteinen

Die Sequenzvergleiche liefern Hinweise darauf, dass ORF Z339L für ein SKP1-ähnliches Protein codiert. Durch die zwei enthaltenen Domänen, sollte Z339L in der Lage sein, an Cullin 1 und 3 zu binden. Die SKP1-Proteine bilden im Allgemeinen häufig Dimere. Die Dimer-Bildung ist für die Bindung an die Proteine des SCF-Komplexes allerdings nicht notwendig.

Um diese Bindung nachzuweisen, wurde das Hefe-2-Hybrid System verwendet. Sowohl Z339L als auch das verwandte A039L wurden in einen geeigneten Vektor kloniert (pBT3-N Δ oder pGBT9). Da die getesteten Culline aus *A. thaliana* stammen (AtCUL1 und AtCUL3 im pGAD424), wurde zur Kontrolle auch ein SKP1-Protein aus *Arabidopsis* getestet (AtSKP1) (Abbildung 3.13 A).

Das virale Protein Z339L zeigt eine schwache Bindung an Cullin 1 und ebenfalls an Cullin 3 (Abbildung 3.13 B). Im Gegensatz dazu zeigt das Protein aus PBCV-1 keine Interaktionen mit den Cullinen (Abbildung 3.13 C). Die Interaktion zwischen den *Arabidopsis*-Proteinen kann nachgewiesen werden, ist allerdings ebenfalls schwach (Abbildung 3.13 D). Keines der potenziellen viralen SKP1-Proteinen bildet Dimere (Abbildung 3.13 E und F).

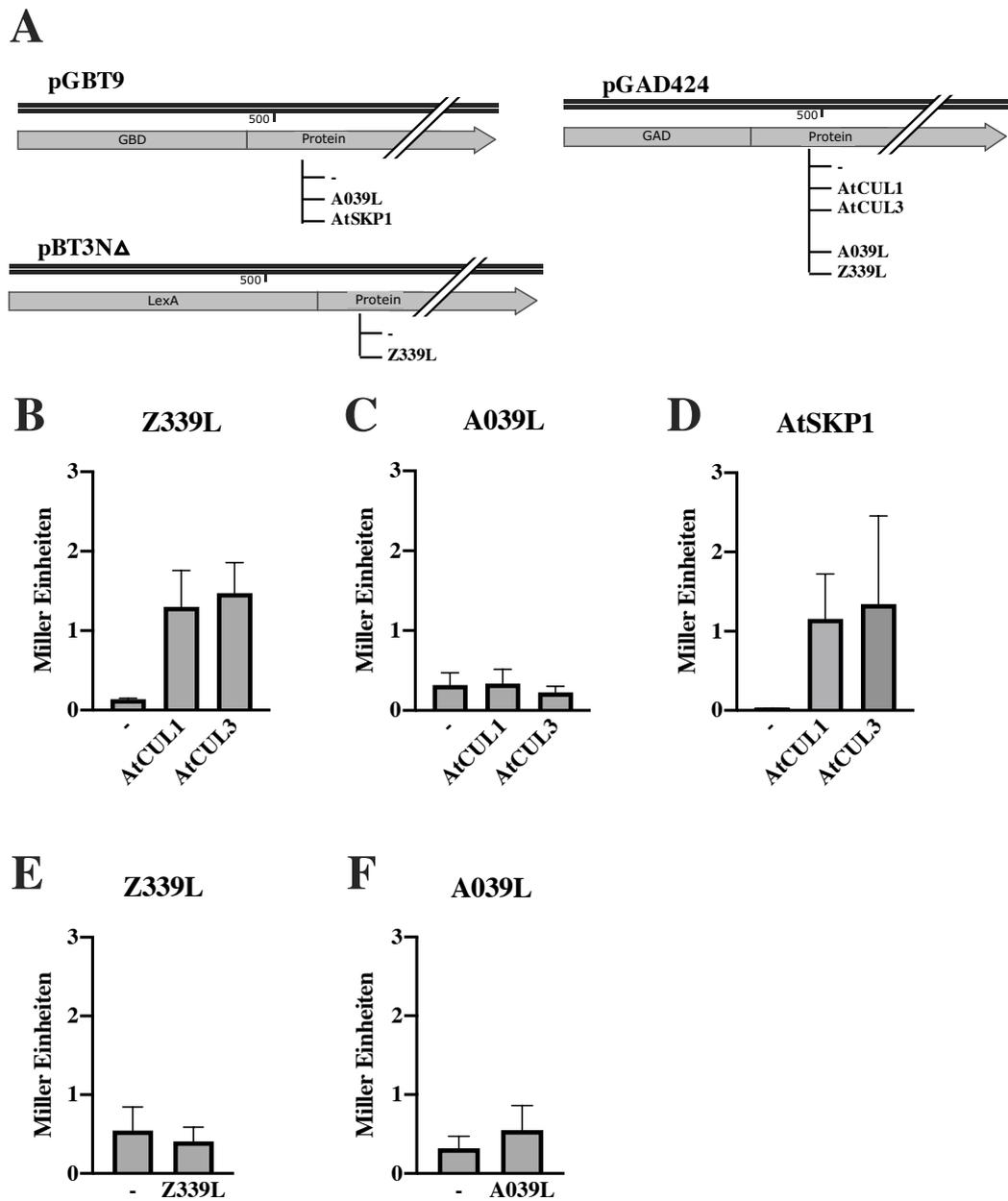


Abbildung 3.13 Z339L bindet Culline aus *Arabidopsis*.

A. Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte in den pBT3-N Δ , pGBT9 und pGAD424 Vektoren zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen in Hefe. Getestet wurde die Interaktion von potenziellen viralen SKP1-Proteinen: Z339L (**B.**), A039L (**C.**) und von SKP1-Protein aus *Arabidopsis* (**D.**) mit den Cullinen 1 und 3 aus *Arabidopsis* sowie die Dimerbildung der viralen Proteine: Z339L (**E.**) und A039L (**F.**).

3.3.3 Z339L fungiert als ein Transkriptionsaktivator in Hefe

Die Hefe-2-Hybrid Tests liefern Hinweise drauf, dass das virale Z339L an die Gerüst-Proteine der SCF-Ligase binden kann. Zusätzlich kann eine starke Aktivierung des Reportergens im Hefestamm *S. cerevisiae* HF7c festgestellt werden. Das Z339L ist als Fusionsprotein mit der GAL4-Bindedomäne in der Lage, die Expression des *LacZ*-Gens zu induzieren, das in dem Hefestamm HF7c unter der Kontrolle des GAL1-Promotors steht.

3.3.3.1 Z339L aktiviert GAL1-Promotor

Um die Transkriptionsaktivierung der Reportergene in Hefe zu untersuchen, wurden entsprechende Konstrukte erstellt und die Versuchsreihe wiederholt (Abbildung 3.14 A). Die Transaktivierung wurde erneut in Anwesenheit der GAL4-Bindedomäne sowie der GAL4-Aktivierungsdomäne untersucht. Hierfür wurden das Z339L in den pGBT9 sowie in den pGAD424 Vektor kloniert. Die Transformation der Hefe erfolgte jeweils mit dem Z339L enthaltenden Vektor sowie mit dem leeren Vektor. Hierbei kommt es nur dann zur Aktivierung des *LacZ*-Gens, wenn sich das Z339L in dem pGBT9 Vektor befindet, also als GBD-Z339L Fusionsprotein synthetisiert wird. Wird das Z339L als GAD-Z339L Fusionsprotein synthetisiert, kommt es nicht zur Aktivierung der Reportergene. Auch nicht wenn die GBD-Domäne in einem anderen Vektor mitgeliefert und co-transformiert wird (Abbildung 3.14 B).

Um zu testen, ob das Z339L ausschließlich die GAL4-Bindedomäne zur Transaktivierung benötigt, wurde das Split-Ubiquitin Vektorsystem verwendet. Dieses wird zur Untersuchung der Interaktionen von Membranproteinen verwendet und enthält keine GAL4-DNA-Bindedomäne. Die in dem pBT3-N Vektor enthaltene LexA-VP16-Cub Bindedomänen sorgen dafür, dass das synthetisierte Protein in die Membranen wandert. Entsprechend verändert (Abschnitt 5.6.5), wird mit Hilfe des Vektors pBT3-N Δ ein Fusionsprotein aus der LexA-Domäne und Z339L synthetisiert. In einem geeigneten Hefestamm (*S. cerevisiae* NMY51) ist die Expression der Gene im pBT3-N Vektor vergleichbar

mit der Expression im pGBT9 Vektor. Im Gegensatz zu der Expression von *GAD-Z339L* führt die Expression von *LexA-Z339L* nicht zur Aktivierung der Reportergene. Das Protein GBD-Z339L benötigt auch nicht die Anwesenheit der GAD-Domäne (keine Co-Transformation mit pGAD424 Vektor) um das Reportergen zu aktivieren (Abbildung 3.14 C).

Die Aktivierung von dem *LacZ*-Reportergen ist eine Eigenschaft, die nur das ATCV-1 Protein Z339L besitzt. Weder das virale A039L aus dem PBCV-1 Virus noch das *Arabidopsis* SKP1-Protein zeigen im Hefe-2-Hybrid System eine vergleichbare Aktivität, wenn sie als GBD-Fusionsproteine synthetisiert werden (Abbildung 3.14 D).

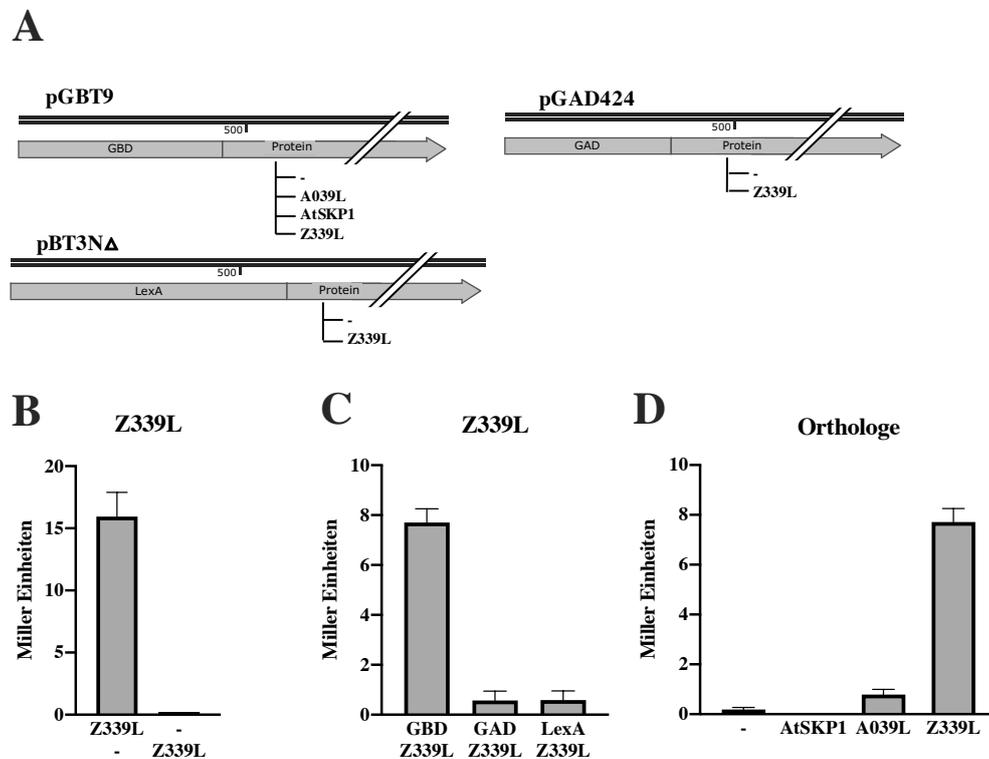


Abbildung 3.14 Z339L fungiert als Transkriptionsaktivator in Hefe.

A. Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte in den pBT3-N Δ , pGBT9 und pGAD424 Vektoren zur Untersuchung der *LacZ*-Promotor Aktivierung in Hefe. Getestet wurde die Aktivierung des Reportergens durch Z339L in Anwesenheit verschiedener Domänen (**B** und **C**) sowie die Wirkung verschiedener Z339L-verwandten Proteinen: AtSKP1 und A039L (**D**).

3.3.3.2 Für die Transkriptionsaktivierung werden die GAL4-DNA-Bindedomäne und die SKP1-Domäne benötigt

Die Aktivierung der Hefe-Gene ist eine Besonderheit von Z339L und scheint eine spezifische Funktion zu haben. Nichtsdestotrotz liegt die Vermutung nahe, dass diese Aktivität im Zusammenhang mit der SKP1-Funktion des Proteins steht und dass das Protein in Hefen entweder selbst an den *LacZ*-Promotor oder an bestimmte Regulatoren des *LacZ*-Promotors binden kann. Das Z339L besitzt zwei Domänen, die für potenzielle Interaktionen mit anderen Proteinen notwendig sind. Zuerst sollte geklärt werden, ob eine dieser Domänen eine Rolle bei der Aktivierung des *LacZ*-Reportergens hat.

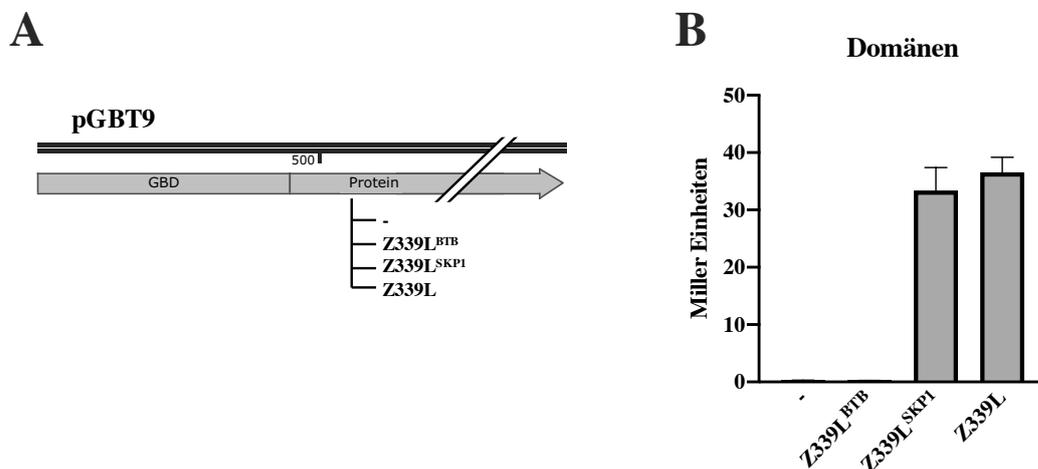


Abbildung 3.15 SKP1-Domäne des Z339L ist für die Transaktivierung notwendig. **A.** Schematische Darstellung verwendeter Konstrukte im pGBT9 Vektor mit den verwendeten Deletionsmutanten des Z339L: Z339L^{BTB} und Z339L^{SKP1}. **B.** Getestet wurde das Aktivierungspotenzial der einzelnen Domänen im Vergleich zum wildtypischen Z339L.

Um herauszufinden welche der beiden Domänen bei der Aktivierung des Reportergens eine Rolle spielt, wurden Deletionsmutanten des Z339L-Proteins synthetisiert. Zum einen wurde eine Z339L-Variante verwendet die lediglich die BTB-Domäne beinhaltet (Z339L^{BTB}), zum anderen wurde eine zweite Z339L-Variante erstellt, welche die SKP1-Domäne des Protein enthält (Z339L^{SKP1}) (Abbildung 3.12 A). Die entsprechenden Z339L-Varianten wurden anschließend in den pGBT9 Vektor kloniert und als GBD-Fusionsprotein synthetisiert (Abbildung 3.15 A).

Die Aktivierung des Reportergens durch Z339L ist ausschließlich auf die SKP1-Domäne des Proteins zurückzuführen. Die Z339L-Deletionsmutante, die lediglich die BTB/POZ-Domäne beinhaltet, ist nicht in der Lage, die Transkription des Reportergens in Hefe zu aktivieren (Abbildung 3.15 B).

3.3.3.3 Z339L interagiert nicht mit F-Box-Proteinen

Die GAL-Gene der Hefe codieren für die Proteine die unmittelbar am Zuckerrabbau beteiligt sind. Das *GAL1*-Gen codiert für das Enzym Galaktokinase und ist für den ersten Schritt des Galaktoseabbaus verantwortlich. Die Aktivierung des GAL1-Promotors ist daher strikt reguliert und hängt von der Anwesenheit von Galaktose bzw. Glucose ab. Der Promotor ist inaktiv wenn Glucose im Medium vorhanden ist. In Anwesenheit von Galaktose wird das Gen aktiviert um den Galaktoseabbau zu ermöglichen. Um diese Regulation zu gewährleisten, werden bestimmte regulatorische Proteine benötigt, wie die im Hefe-2-Hybrid System verwendeten zwei Hälften des GAL4-Transkriptionsfaktors. In wildtypischen Hefestämmen wird das GAL4-Protein in Hefe in Anwesenheit von Glucose von dem *Glucose Repression-Resistant* GRR1-Protein gebunden und ist dadurch inaktiv. Ist Galaktose in der Zelle vorhanden, so übernimmt das *Mitochondrial Distribution and Morphology* (MDM30, DSG1) Protein die regulatorische Rolle. Das GAL4-Protein wird dann von Gal80, dem SAGA-Komplex und Mediatoren gebunden und die RNA-Polymerase II startet die Genexpression. Sowohl das GRR1 als auch das DSG1 sind bekannte F-Box-Proteine.

Um zu überprüfen an welcher Stelle das Z339L in die Regulation des GAL1-Promotors eingreift, wurde zunächst die Bindung von Z339L an die GRR1-like Proteine getestet. Das GRR1 ist ein negativer Regulator des GAL4-Transkriptionsfaktors. Der Abbau des GRR1-Proteins durch eine E3-Ligase könnte zur Transkriptionsaktivierung des *LacZ*-Gens führen. Zudem wurden auch Hinweise gefunden, dass die *Chlorella* sowie *Chlamydomonas*-Algen über ein GRR1-Protein verfügen. Die Bindung von Z339L an die Proteine der GRR1-Familie wurde mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid Systems untersucht. Hierfür wurden sowohl

das virale SKP1-Protein Z339L als auch das AtSKP1 aus *Arabidopsis* in den pBT3NΔ Vektor kloniert. Das entsprechende GRR1 aus Hefe sowie das GRH1 aus *Arabidopsis* wurden entsprechend in den pGAD424 Vektor kloniert. Als negative Kontrolle diente jeweils der leere Vektor. Die positive Kontrolle (+) diente als Nachweis, dass der Test funktional war (Abbildung 3.16 A).

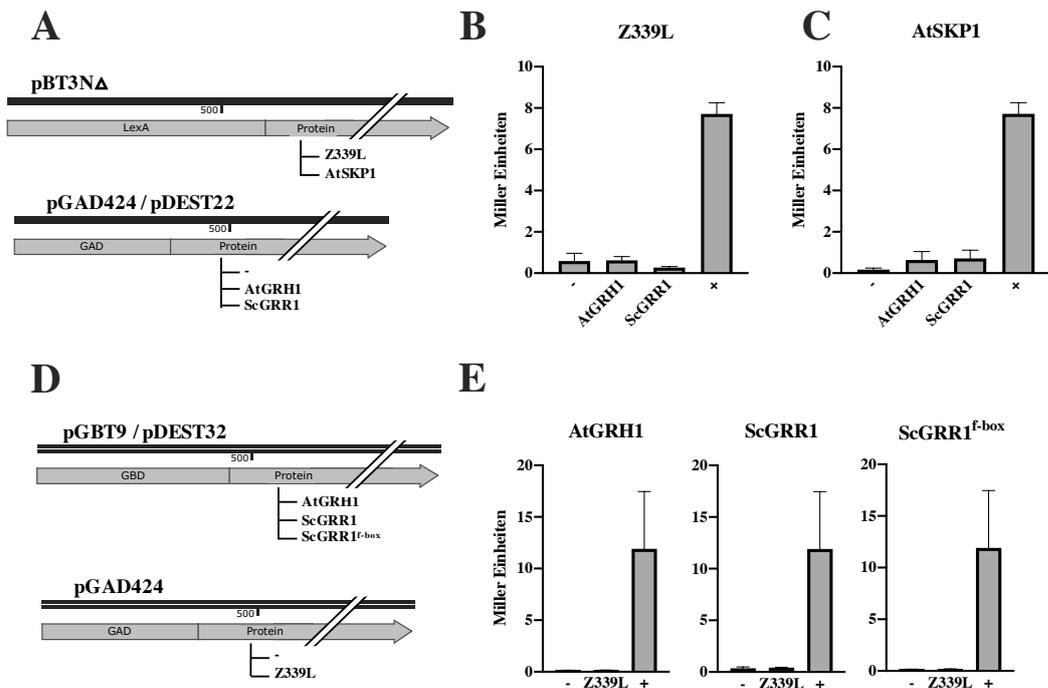


Abbildung 3.16 Z339L interagiert nicht mit Proteinen der GRR1-Familie.

A. Schematische Darstellung verwendeter Konstrukte in dem pBT3-NΔ und in dem pGAD424 Vektor zur Untersuchung von Interaktionen zwischen Z339L (**B.**) und AtSKP1 (**C.**) mit den F-Box-Proteinen ScGRR1 und AtGRH1. **D.** Schematische Darstellung verwendeter Konstrukte in dem pGBT9 und in dem pGAD424 Vektor zur Untersuchung von Interaktionen zwischen Z339L (**E.**) mit der F-Box-Domäne des ScGRR1 Proteins sowie den wildtypischen Formen der Proteine ScGRR1 und AtGRH1. (-) und (+) zeigen die negative und positive Kontrollen an.

Während das pflanzliche Protein eine sehr schwache Interaktion sowohl mit dem ScGRR1 als auch mit dem AtGRH1 zeigt, kann keine Bindung von Z339L an das GRR1-Protein nachgewiesen werden (Abbildung 3.16 B und C).

Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurde die Testreihe in Bezug auf das virale Z339L erweitert und wiederholt. Zusätzlich wurde aus dem Protein ScGRR1 die F-Box-Domäne isoliert und als Fragment in den pGBT9 Vektor kloniert.

Diese Domäne ist direkt für die Bindung der F-Box-Proteine an SKP1 verantwortlich. Als Kontrolle wurde das wildtypische Protein aus Hefe getestet sowie das verwandte Protein aus *Arabidopsis* (AtGRH1). Das Z339L befand sich entsprechend in dem pGAD424 Vektor (Abbildung 3.16 D). Das virale Protein Z339L interagiert nicht mit der F-Box-Domäne des GRR1-Proteins. Die fehlende Bindung an die wildtypischen Proteine aus Hefe und *Arabidopsis* konnte bestätigt werden (Abbildung 3.16 E). Als positive Kontrolle für den Hefe-2-Hybrid Test wurde jeweils das im pGBT9 Vektor klonierte Z339L verwendet.

3.3.4 Z339L interagiert mit *Chlorella*-Proteinen *in vivo*

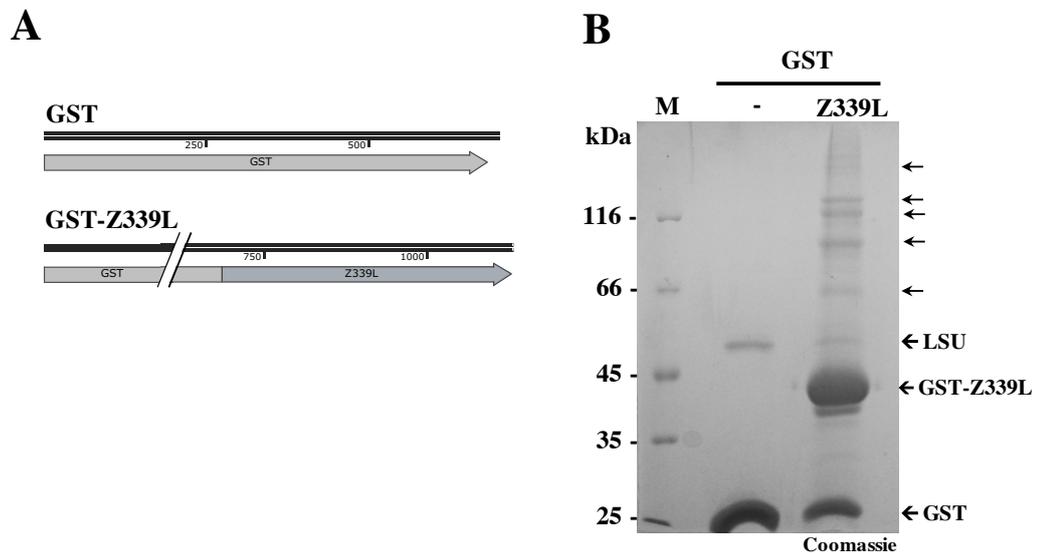


Abbildung 3.17 Z339L interagiert mit mehreren Wirtsproteinen.

A. Schematische Darstellung verwendeter Konstrukte die für den Interaktionstest in *Chlorella heliozoae* verwendet wurden. **B.** Nachweis der von GST-Z339L gebundenen Proteine mit Hilfe von Coomassie-Färbung.

Obwohl das Z339L laut Sequenz und der Bindung an Culline als ein SKP1-Protein identifiziert werden konnte, konnte keine Bindung mit weiteren bekannten Interaktionspartnern von SKP1-Proteinen ermittelt werden. Das Z339L interagiert nur schwach mit den Proteinen von *Arabidopsis*. Die Suche nach den potenziellen Interaktionspartnern im Genom von *Chlamydomonas* ergab auch keine Treffer.

Deswegen wurde ein Versuch gestartet, mit Hilfe der Co-Präzipitation, die Bindung von Z339L an den *Chlorella heliozoae* Proteinen nachzuweisen. Hierfür wurde das Z339L als C-terminale GST-Fusion synthetisiert und aufgereinigt (Abbildung 3.17 A). Das aufgereinigte GST-Z339L sowie das GST alleine wurde mit Proteinlösung von *Chlorella*-Alge versetzt und die entstandenen Interaktionen mit Formaldehyd fixiert. Die GST-Z339L gebundenen Interaktoren wurden über eine Säulenmatrix aufgereinigt, isoliert und anschließend auf einem SDS-Gel sichtbar gemacht. Die Auftrennung der GST-Z339L gebundenen Proteine brachte mindestens vier Proteine hervor, die an das virale Z339L-Protein binden. Die gefundenen Proteine besitzen ein geschätztes Molekulargewicht von: 66 kDa, 90 kDa, 120 kDa und 130 kDa (Abbildung 3.17 B).

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Promotor-gesteuerte Regulation der viralen Genexpression

Der allgemeine Ablauf einer viralen Infektion ist gut untersucht und dokumentiert worden. Zur Infektion von Algen mit Chloroviren liegen zwar Befunde vor, aber die Details sind völlig unverstanden [Kang *et al.*, 2005]. Es ist bekannt, dass die Expression der viralen Gene zeitabhängig stattfindet. Bei PBCV-1 wurden fast alle Gene als frühe, früh/späte oder späte identifiziert und die Promotoren wurden durch Sequenzvergleich grob definiert und beschrieben [Fitzgerald *et al.*, 2008; Kawasaki *et al.*, 2004]. Über Regulationsmechanismen der Promotor-gesteuerten Genexpression liegen noch keine experimentellen Daten vor. Die wenigen Studien zu diesem Thema wurden sehr gut von der Arbeitsgruppe von Grazielle Oliveira zusammengefasst. Sie beschreiben die Promotorlänge und die enthaltenen Consensus-Sequenzen (Abbildung 1.10) [Oliveira *et al.*, 2017]. Bei ATCV-1 ist das Thema der Promotororganisation noch nicht erforscht. Auch wenn ATCV-1 Gene mit Hilfe der Sequenzvergleichen identifiziert und auf Basis ihrer möglichen Funktion in Gruppen untergliedert wurden, findet man in der Literatur keine Studien zu den Promotoren und den damit interagierenden Transkriptionsfaktoren. Im Folgenden werden die ersten experimentell gewonnenen Erkenntnisse zum Thema der Promotororganisation der frühen Gene von Phycodnaviren am Beispiel von ATCV-1 beschrieben.

4.1.1 Die Spezies-übergreifende Aktivität von proZ798L wird von G-Box bindenden Faktoren reguliert

Der Promotor der viralen DNA-Polymerase (proZ798L) stellt ein geeignetes Objekt für das Studium der frühen Promotoren dar. Die erfolgreiche Expression der DNA-Polymerase ist für die Replikation der viralen DNA im Wirt notwendig. Die Promotororganisation proZ798L sollte also vorrangig aufgeklärt werden, vor allem weil dieser Promotor in vielen verschiedenen Spezies aktiv ist, wie die Ergebnisse dieser Studie aufzeigen. Der Polymerase-Promotor ist nicht nur in den Algenzellen aktiv, sondern auch in den Protoplasten von *N. benthamiana* und in einer menschlichen Tumorzelllinie. In Blättern von transgenen *N. tabacum* Pflanzen ist der Promotor allerdings inaktiv. Dies könnte darauf hindeuten, dass eine Verpackung der viralen DNA-Sequenzen in das Chromatin, welche in der Natur nicht vorkommt, zu einer Unzugänglichkeit der regulatorischen Elemente führt. Die Expression in menschlichen Zellen stellt eine weitere Besonderheit dieses Promotors dar. In der Literatur konnten zwar Beweise für die Anwesenheit der genomischen DNA von ATCV-1 in menschlichen Rachenraum gefunden werden, aber eine Expression der viralen Gene konnte nicht nachgewiesen werden [Yolken *et al.*, 2014].

Der Polymerase-Promotor führt zur Expression der Reportergene in Algen, Pflanzen und in tierischen Zellen. Dabei spielt es keine Rolle, ob die lange oder die kurze Variante des Promotors verwendet wird. Der Minimalpromotor von der Polymerase ist in Algen und Pflanzen ebenfalls aktiv. Dies lässt sich auf im Promotor enthaltene Consensus-Sequenzen zurückführen, die von konservierten Transkriptionsfaktoren aus unterschiedlichen Spezies gebunden werden können. Eine TATA-Box allein reicht hierfür nicht aus, was anhand der Experimente zu proZ280L festgestellt werden kann. Es werden weitere Consensus-Sequenzen benötigt, an die Transkriptionsfaktoren binden können. Das sog. Hex-Motiv mit der Sequenz TGACGTGG erfüllt dieses Kriterium, da daran eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren binden kann, die in eukaryotischen Zellen weit verbreitet ist. Die G-Box bindenden Faktoren, sind zusammen mit den TGA-Faktoren dafür bekannt, an bestimmte Motive zu binden, welche zumindest die Sequenz ACGT beinhalten. Dabei binden beide Gruppen die-

ser Faktoren an das TGACGTGG-Motiv. In den menschlichen Zellen kann man weitere Vertreter dieser Familie finden, die CREB-Faktoren, welche sogar nachweislich an der Expression früher Gene humaner Viren (*Human Immunodeficiency Virus Type 1*) beteiligt sind [Rohr *et al.*, 2003].

In der vorliegenden Arbeit konnte in der Tat, nicht nur der Zusammenhang zwischen der Aktivität des Polymerase-Promotors und der Consensus-Sequenz TGACGTGG dokumentiert werden, auch die direkte Interaktion von GBF aus *Arabidopsis* und aus *C. variabilis* mit diesem Promotor konnte nachgewiesen werden. Sowohl in Algen als auch in Protoplasten von *N. benthamiana* kann die Aktivität von proZ798L nicht mehr gemessen werden, wenn Veränderungen im Hex-Motiv vorgenommen wurden. Der Austausch eines einzigen Nukleotids (TGACGTGG \rightarrow TGGCGTGG) wirkt sich negativ auf die Promotoraktivität aus und auch auf die Bindung des G-Box bindenden Faktors an den Promotor. Die Interaktionen, die in Hefe oder in Protoplasten auftreten, sind in den Promotorvarianten mit verändertem Hex-Motiv nicht mehr detektierbar. Zudem konnte durch Studien in Protoplasten eine durch die GBF bedingte Veränderung der Aktivität des Polymerase-Promotors festgestellt werden. Auch wenn die aktivierende Wirkung des GBF-Fragmentes aus *C. variabilis* nicht der DNA-Bindedomäne an sich, sondern eher der Wirkung der dran fusionierten GAD-Domäne zu verdanken ist, gilt die Bindung der DNA-Bindedomäne an den viralen Promotor als bestätigt. Die Promotor-aktivierende Wirkung des GBF aus Algen ist folglich sehr wahrscheinlich, da schon das verwandte GBF1 aus *Arabidopsis* die Aktivität des Promotors erheblich steigert. Lediglich die Bindung von CREB-Faktoren an den Promotor konnte nicht bestätigt werden, allerdings wurde nur einer der vielen im menschlichen Genom enthaltenen CREB-Faktoren getestet. Die durchgeführten Experimente zur Aktivität des Polymerase-Promotors bringen klare Hinweise auf die Abhängigkeit dieses viralen Promotors von zellulärem GBF. Diese Faktoren müssen vom Wirt stammen, denn im Genom von ATCV-1 ist bis jetzt keine Sequenz für einen GBF oder TGA-Faktor bekannt.

Die in dem Promotor identifizierten Consensus-Sequenzen deuten nicht nur auf die Aktivität des Promotors in pflanzlichen und tierischen Zellen hin, sondern

liefern auch Hinweise dafür, dass dieser Promotor ebenfalls in den prokaryotischen Zellen aktiv sein könnte. Neben den bekannten Sequenzen für die eukaryotische TATA-Box, befindet sich in diesem Promotor auch eine Sequenz für die Pribnow-Box und die -35-Sequenz. Zusammen bilden die beiden Sequenzen die Bindestelle für den bakteriellen σ -Faktor. Auch wenn sich die -35-Sequenz nicht an der Position -35 befindet, bleibt der Abstand zur Pribnow-Box erhalten, so dass die Bindung des σ -Faktors an dieser Stelle dennoch möglich ist. In früheren Studien der Arbeitsgruppe Pfitzner konnte keine Aktivität von proZ798L in den *E. coli* nachgewiesen werden [Stegen 2011]. Eine Bindung des σ -Faktors aus Algen an den Polymerase-Promotor konnte allerdings später zumindest indirekt nachgewiesen werden [Bluthardt 2017]. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse auf eine konstitutive Aktivität des Polymerase-Promotors in den eukaryotischen Zellen hin. Die Tatsache, dass der Promotor nicht in prokaryotischen Zellen aktiv ist, sich aber von den σ -Faktoren aus Algen beeinflussen lässt, weist auf eine mögliche zusätzliche Aktivität des Promotors in den Chloroplasten der Algen hin. Durch eine Expression der Polymerase in weiteren Zellkompartimenten während der Virusinfektion könnte die Replikation der viralen DNA auf die gesamte Zelle erweitert werden. Virale DNA konnte allerdings bis jetzt bei anderen Chloroviren nur im Cytoplasma und Nucleus nachgewiesen werden [Milrot *et al.*, 2015]

4.1.2 Neuer GBF-abhängiger Mechanismus zur Regulation früher viraler Promotoren von ATCV-1

Die Abhängigkeit der Aktivität des Polymerase-Promotors von den Wirtsfaktoren wirft natürlich die Frage auf, ob es im Genom von ATCV-1 weitere Promotoren gibt, welche auch über die GBF-Faktoren reguliert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere virale Gene gefunden, deren Promotoren mindestens einmal die Consensus-Sequenz TGACGTGG beinhalten. Zwei davon, proZ174L und proZ765R, besitzen auch eine TATA-Box Sequenz und sind interessanterweise ebenfalls in Algen und Protoplasten von *N. benthamiana* aktiv. Diese Gene wurden bis jetzt nur anhand ihrer Sequenzen identifiziert und sind nicht weiter beschrieben worden. Diese Studie liefert die ersten experi-

mentellen Hinweise zur Bestätigung der potenziellen Funktion dieser Proteine. Beide Proteine zeigen regulatorische Funktionen in Bezug auf aktive virale Promotoren in Pflanzen oder Algen und codieren für Transkriptionsfaktoren. Die entsprechenden orthologen Gene aus dem nahe verwandten PBCV-1 liefern Hinweise drauf, dass es sich bei diesen Genen um frühe Gene handelt, was auch in Bezug auf deren Funktion anzunehmen wäre [Kawasaki *et al.*, 2004].

Die Aktivität der beiden Promotoren proZ174L und proZ765R hängt ebenfalls von dem Hex-Motiv ab und ist auf die Bindung von GBF zurückzuführen. Allerdings konnte anhand weiterer Tests zu den Promotoren mit dem Hex-Motiv festgestellt werden, dass eine TATA-Box für die Promotoraktivität in Algen und Pflanzen unerlässlich ist. Der Promotor von Z326R besitzt keine TATA-Box und enthält nur das Hex-Motiv. Dieser Promotor zeigt keine Aktivität in eukaryotischen Zellen, kann aber von den GBF-Faktoren gebunden werden. Die Aktivität der viralen Promotoren in Algen und Pflanzen und die Bindung an GBF hängt also von der TGACGTGG-Sequenz ab. Die Anzahl der im Promotor enthaltener TGACGTGG-Sequenzen hat aber keinen Einfluss auf die Stärke der Promotoraktivität. Der Promotor proZ765R, der zwei TGACGTGG-Sequenzen beinhaltet, zeigt weder eine stärkere Aktivität noch eine stärkere Bindung an die G-Box bindenden Faktoren im Vergleich zu den anderen Promotoren. Allerdings wird proZ765R als einziger Promotor von den pflanzlichen TGA-Faktoren gebunden. Die Bindung von TGA-Faktoren an den Promotor von Z174L kann erst nach dem Verkürzen der Promotorsequenz nachgewiesen werden. Während die Aktivität der Promotoren in den Algenzellen stets unverändert bleibt, führt das Verkürzen der Promotorsequenzen in Pflanzen zur Verminderung der Aktivität. Die verkürzten Promotor-Varianten sind teilweise sehr kurz und umfassen 75 – 88 bp. So ist es möglich, dass die komplexe Transkriptionsinitiations-Maschinerie der Pflanzen nur schlecht an die kurzen Promotor-Varianten binden kann. Zusätzlich zeigen die Ergebnisse der Y1H-Tests, dass die Bindung von allen bZIP-Faktoren an den Minimalpromotor von Z174L gesteigert wird. Dies liefert eine weitere Erklärung für die fehlende Aktivität des Minimalpromotors in den Pflanzenzellen. Durch die erhöhte Affinität des Minimalpromotors zu den TGA-Faktoren, werden diese vermehrt gebunden. Die Annahme, dass die G-Box bindenden Faktoren für die

Aktivität der Promotoren verantwortlich sind, kann hiermit erneut bestätigt werden. Binden mehr TGA-Faktoren an dem Minimalpromotor von Z174L als G-Box bindende Faktoren, sinkt die Aktivität. Diese Art von kompetitiver Inhibition kann jedoch in Algenzellen nicht stattfinden. Denn während es in Pflanzen um die 10 TGA- und vier G-Box bindende Faktoren gibt, besitzen *Chlorella*-Algen nur einen einzigen GBF [Dröge-Laser *et al.*, 2018; Gatz 2013]. Die Bindung der DNA-Bindedomäne dieses Faktors aus *Chlorella* an die drei Promotoren (proZ174L, proZ765R und proZ798L) wurde in Protoplasten von *N. benthamiana* nachgewiesen. Der durch GBF verursachter Aktivitätsanstieg konnte bei proZ765R und bei proZ798L beobachtet werden, was dafür spricht, dass diese Promotoren von einem einzigen GBF in Algen reguliert werden.

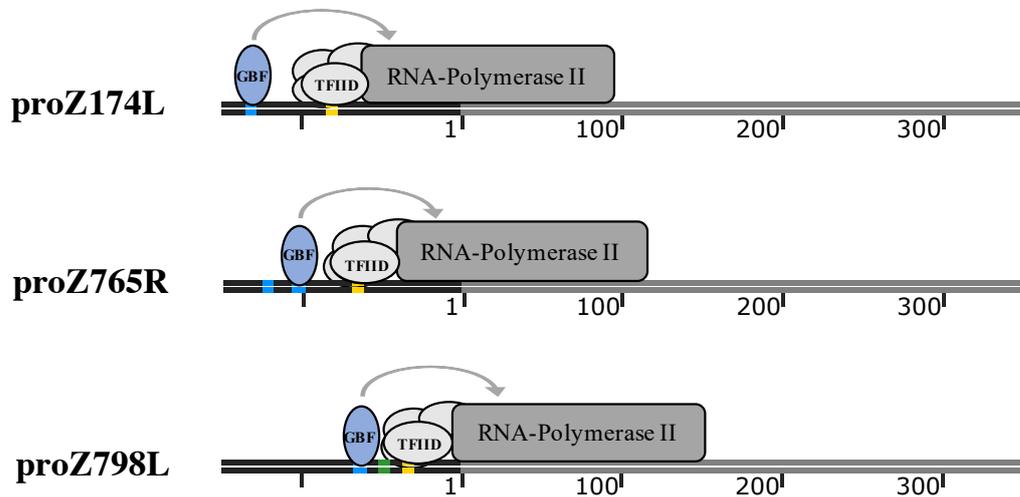


Abbildung 4.1 Schematische Darstellung des GBF-abhängigen Mechanismus zur Regulation der Expression von ATCV-1 Promotoren.

Der TFIID Faktor bindet über die TATA-Box den Promotor und rekrutiert weitere TF und die RNA-Polymerase II. Durch die Bindung von GBF an das Hex-Motiv wird die Expression der Gene weiter verstärkt. Der Promotorbereich ist schwarz, der Genbereich grau dargestellt. Die Consensus-Sequenzen für bekannte Transkriptionsfaktoren sind markiert: TATA-/Pribnow-Box (orange), Hex-Motiv (blau), -35-Bereich (grün).

Die Ergebnisse dieser Studie dokumentieren eine klare Korrelation zwischen der Aktivität der frühen viralen Promotoren von ATCV-1 und dem GBF des Wirtes (Abbildung 4.1). Die Promotor-gesteuerte Transkription der frühen Gene Z174L, Z765R und Z798L wird von GBF aktiviert. Somit hängt die Expression mehrerer wichtiger viraler Gene von der Anwesenheit eines Wirtsfaktors ab. Da

die GBF zumindest innerhalb der DNA-Bindedomäne sehr stark konserviert sind, ist eine Expression der frühen Gene von ATCV-1 in anderen Organismen ebenfalls möglich. Ähnliche Interaktionen zwischen bestimmten Transkriptionsfaktoren des Wirtes und frühen viralen Promotoren wurden an sich schon beschrieben. So hängt die Aktivität des frühen Gens des Insekten-infizierenden Baculovirus auch von der im Promotor enthaltenen G-Box-Sequenz CACGTG ab [Kogan *et al.*, 1994]. Im Tomatengoldmosaikvirus (*Tomato Golden Mosaic Virus*) wurde ebenfalls die Anwesenheit der G-Box-Sequenz CACGTG zusammen mit der TATA-Box beschrieben. Diese Consensus-Sequenzen spielen bei der Infektion eine Rolle und Mutationen in diesen Sequenzen verminderten die Effizienz der DNA-Replikation [Eagle *et al.*, 1997]. In der Literatur werden weitere Beispiele für eine bZIP-TF-abhängige Regulation der Genexpression während der Virusinfektion beschrieben. Die Aktivität des allgemein bekannten 35S-Promotors, der in vielen Expressionsvektoren für die Expression der Reportergene in Pflanzen sorgt, wird vor allem durch die Bindung von TGA-Faktoren an das im Promotor enthaltene *as1*-Element verursacht [Covey *et al.*, 1981; Hohn *et al.*, 1982]. Die Rolle der TGACGTGG-Sequenz bei der Regulation viraler Genexpression wurde bisher noch nicht entdeckt. Die Tatsache, dass ATCV-1 für die Expression seiner frühen Gene die GBF des Wirtes nutzt, ist in vorliegender Arbeit zum ersten Mal experimentell erfasst und beschrieben worden.

4.1.3 GBF-abhängiger Mechanismus zur Regulation früher Promotoren – einer von vielen bei ATCV-1?

Einige frühe Promotoren von ATCV-1 werden über wirtseigene G-Box bindende Faktoren aktiviert, sofern die Consensus-Sequenzen für das Hex-Motiv und die TATA-Box vorhanden sind. Allerdings gibt es offensichtlich ATCV-1 Gene, die durch andere Wirtsproteine reguliert werden. Allein in dieser Arbeit konnte ein weiterer früher Promotor von ATCV-1 identifiziert werden, der über keine Consensus-Sequenz für GBF verfügt, aber in *C. reinhardtii* eine starke Aktivität zeigte. Der Promotor gehört zu dem ORF Z063L, der für eine RNase III codiert und dessen enzymatische Aktivität bereits von der Arbeitsgruppe Pfitzner nachgewiesen wurde [Schörg 2013]. Der Promotor von Z063L beinhal-

tet keine TATA-Box. Jedoch tritt mehrfach eine Consensus-Sequenz in dem Promotor auf, welche mit den frühen Promotoren in PBCV-1 assoziiert wird. Die AATGACA-Sequenz ist innerhalb von 100 bp vor dem Transkriptionsstart des Z063L dreimal vorhanden. Ob diese Sequenz von Transkriptionsfaktoren gebunden werden kann, ist bis jetzt unbekannt. Sollte diese Sequenz aber in der Tat von Transkriptionsfaktoren gebunden werden, sind diese nur in den Algen vorhanden. Eine Aktivität in pflanzlichen Zellen zeigte dieser Promotor nicht. Aus diesem Grund muss es einen weiteren Mechanismus zur Regulation dieses Promotors geben. Zumal diese Sequenz mit den frühen Promotoren assoziiert wurde und sowohl in PBCV-1 als auch in ATCV-1 (132-mal im Genom) mehrmals vorhanden ist.

Auch die späten und früh/späten Promotoren von ATCV-1 bedürfen einer Regulierung. Hier sind weder Consensus-Sequenzen identifiziert worden, noch konnten Hinweise auf die Regulierung der Promotoren gefunden werden. Da die zugehörigen Gene aber während der Infektion erst spät exprimiert werden, erfolgt in diesem Fall die Regulation vermutlich durch die viralen Transkriptionsfaktoren, wie z. B. die potenziellen späten Transkriptionsfaktoren Z289L oder Z326R [Fitzgerald *et al.*, 2007]. Ebenfalls bleibt die Regulation von Promotoren mit einer TGACGTGG-Sequenz ohne TATA-Box unklar. Auch wenn derartige Promotoren durchaus von GBF gebunden werden können, zeigen sie keinerlei Aktivität in Algen und Pflanzen. Dies deutet auf weitere Consensus-Sequenzen hin, die allein von viralen Transkriptionsfaktoren gebunden werden können. Während in dieser Arbeit zur Aktivität und Organisation der Promotoren von ATCV-1 ein Regulationsmechanismus zur Expression früher Gene definiert und wichtige Hinweise zur Wirt-Virus Wechselwirkungen gesammelt werden konnten, muss die Aufklärung der späten Genregulation weiteren Experimenten überlassen werden.

4.2 Virale Komponenten des Ubiquitin-Systems

Der Erfolg einer Virusinfektion hängt nicht nur von der erfolgreichen Expression der viralen Gene ab. Die daraus synthetisierten Proteine gehen weitere Interaktionen mit den viralen aber auch wirtseigenen Proteinen ein und regulieren so den weiteren Verlauf der Infektion. Die Halbwertszeiten dieser Proteine, wie auch die damit interagierenden Proteine, werden u. a. über das Ubiquitin-System reguliert. Üblicherweise werden während der Virusinfektion Proteine abgebaut, die eine anti-virale Wirkung haben. Allerdings stellt der Abbau am Proteasom auch einen der zentralen Regulationsmechanismen der Zelle dar. Eine Vielzahl an Wirtsproteinen wird ebenfalls abgebaut. Diese Proteine sind an der allgemeinen Regulation der zellulären Prozesse beteiligt und deren Anwesenheit ist für die Infektion irrelevant. Die Inhibierung des Proteasoms der *C. heliozoae* während der Infektion mit ATCV-1 resultierte in einer reduzierter Anzahl an infektiösen Viruspartikel ohne den molekularen Haushalt der Zelle zu stören. Ein intaktes Proteasom ist also für die Virusinfektion mit ATCV-1 unerlässlich. Da ATCV-1 nur für wenige Proteine des Ubiquitin-Systems codiert, muss es das bereits vorhandene Ubiquitin-System der *Chlorella*-Alge nutzen. Um zu klären auf welcher Ebene das Virus das Ubiquitin-System der *Chlorella*-Alge beeinflusst und welche Regulationsmechanismen dahinter stehen, wurden die hypothetischen viralen Komponenten des Ubiquitin-Systems genauer untersucht.

4.2.1 Das virale Ubiquitin Z203L

ATCV-1 ist eines der wenigen Viren, das für ein eigenes Ubiquitin codiert. Der enthaltene codierende Bereich ist im Gegensatz zu den üblichen Ubiquitin-Genen auf die Sequenz eines einzelnen Ubiquitins beschränkt. Die Sequenz der Ubiquitine ist sehr konserviert, was auch auf das virale Z203L zutrifft. Die Ähnlichkeit der Ubiquitine ist vor allem aber an der Struktur zu sehen, die unmittelbar mit der Funktion des Proteins zusammenhängt. So ist das Z203L aus ATCV-1 auch ein kleines, kompaktes Molekül mit einem freistehenden C-terminalen Ende. Das C-terminale Ende stellt einen der wenigen Unterschiede zu den anderen Ubiquitinen dar und deutet auf ein Überbleibsel der dualen Struktur des Gens vor der Akquisition aus dem Algen genom hin. Das funktio-

nelle Glycin (Gly76) wird von einem zusätzlichen Asparagin verdeckt (Asn77, N77). Dieses C-terminale Asparagin stört jedoch die Funktionalität des Proteins nicht, obwohl das Abdecken des funktionellen Glycins an sich normalerweise die Funktion eines Ubiquitins verhindert. Das virale Z203L erfüllt die Funktion eines Ubiquitins sowohl in den *in vitro* Ubiquitinierung-Assays als auch in den *in vivo* Studien zur Expression von Ubiquitin-Fusionsproteinen. Offensichtlich wird das virale Z203L von den pflanzlichen deubiquitinierenden Enzymen ebenso prozessiert, wie das üblicherweise bei dem eigenen Ubiquitin erfolgt. Alle ribosomalen Varianten sowie die Polyubiquitin-Proteine werden vor der Aktivierung durch die E1-Enzyme von den deubiquitinierenden Enzymen prozessiert [Callis 2014; Grou *et al.*, 2015]. In den *in vitro* Ubiquitinierung-Assays wird das virale Z203L von E1, E2 und E3-Enzymen entsprechend aktiviert, gebunden und anscheinend auch davor prozessiert. Hier muss eines der humanen Enzyme in der Lage sein, das zusätzliche Asparagin abzuspalten oder das Ubiquitin kann unter vereinfachten Bedingungen auch über ein Asparagin verlinkt werden. Die Fähigkeit zur Proteinspaltung oder eine Carboxypeptidaseaktivität wurde allerdings bei keinem dieser Enzyme dokumentiert. Aus welchem Grund sich das zusätzliche Asparagin an dem viralen Z203L befindet, konnte nicht geklärt werden. Sollte dieses Asparagin ein Überbleibsel der dualen Struktur der Ubiquitin-Gene darstellen und vom *Chlorella*-Genom aufgenommen worden sein, so konnten keine Hinweise dafür im Genom dieser Algen gefunden werden.

Sowohl die Destabilisierung von Ubiquitin-gebundenen Reporterproteinen (GFP und GST) nach der Infiltration in *N. benthamiana* als auch die *in vitro* Studien sprechen klar dafür, dass Z203L ein funktionelles Ubiquitin darstellt. Dieses wird von pflanzlichen und humanen Komponenten des Ubiquitin-System prozessiert, aktiviert, gebunden und zur Bildung von Ubiquitin-Ketten verwendet. Eine direkte Expression des Proteins gekoppelt an ein Reporterprotein führt immer zu dessen Abbau. Auch die sehr starke Genexpression der an Z203L gebundenen Reportergene führt lediglich zum schwachen Nachweis der synthetisierten Fusionsproteine, die fortlaufend abgebaut werden. Dies führt letztendlich zum Zerstören des Blattgewebes und zur Bildung von Nekrosen im infiltrierten Blattmaterial. Wird das virale Ubiquitin an Proteine gekoppelt,

die innerhalb eines viralen Genoms synthetisiert werden, führt das sogar zum Abbruch der Infektion, weil die entsprechende Zelle abstirbt.

ORF Z203L codiert also für ein funktionelles Ubiquitin, das als zusätzliches Ubiquitin in den Wirtszellen exprimiert und synthetisiert werden kann. Dieses virale Ubiquitin findet sicherlich Verwendung in dem Ubiquitin-System des Wirtes. Die Tatsache, dass ATCV-1 für ein funktionelles Ubiquitin codiert ist einzigartig innerhalb der Familie der *Phycodnaviridae*. Dies deutet allerdings auch an, dass das Z203L lediglich eine unterstützende Funktion bei der Virusinfektion erfüllt und keine essenzielle Bedeutung hat. Durch die Synthese weiterer Ubiquitin-Moleküle kann vermutlich die Degradation der anti-viralen Proteine schneller und effizienter erfolgen, als ausschließlich unter Verwendung des wirtseigenen Ubiquitins.

4.2.2 Z292L – virale RING E3 Ligase

ORF Z292L von ATCV-1 weist starke Ähnlichkeiten zu E3-Ligasen auf. Vor allem die im Protein enthaltene C-terminale RING-Fingerdomäne deutet auf die Funktion des Z292L als eine E3-Ligase hin. Diese Domäne ist stark konserviert und ein fester Bestandteil aller RING E3-Ligasen (Abbildung 1.13). Da Z292L keine Interaktionen mit den Cullinen 1 und 3 (aus *Arabidopsis*) zeigt, dafür aber Dimere bildet, kann es nicht innerhalb des Multi-Protein-Komplexes agieren und stellt folglich eine Dimer-bildende E3-Ligase dar. In den *in vitro* Ubiquitinierung-Assays agiert Z292L als eine funktionsfähige E3-Ligase und kann unter geeigneten Bedingungen Ubiquitin-Ketten bilden. Z292L kann allerdings nur das virale Ubiquitin Z203L zur Kettenbildung verwenden, was auf eine ausgeprägte Spezifität des Enzyms hindeutet. Dabei stört, wie auch schon bei den vorherigen Tests mit der E3-Ligase RNF11, das zusätzliche Asparagin nicht.

Die Bindung an die Komponenten des Multi-Protein-Komplexes ist im Falle des Z292L-Proteins überwiegend spezifisch, was sogar auf das Ubiquitin zutrifft. Aus diesem Grund konnten vermutlich keine Interaktionspartner und Zielproteine in dem Proteom von *Arabidopsis* gefunden werden. In *C. reinhard-*

tii hingegen konnte ein Zielprotein des Z292L identifiziert werden, nämlich die Enolase (ENO). Die Enolase ist eines der Enzyme der Glykolyse und für den letzten reversiblen Schritt verantwortlich. Die Enolasen katalysieren die Dehydratisierung von 2-Phospho-D-Glycerat (2-PG) zu Phosphoenolpyruvat (PEP) und Wasser. Ubiquitinierte Enolasen sind in vielen Organismen zu finden z. B. wurde die Ubiquitinierung von Enolasen bei Pflanzenarten wie *Prunus persica* (Pflirsich) oder bei *A. thaliana* als allgemeiner Regulationsmechanismus dokumentiert [Kang *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2020]. Bei den Grünalgen (*Haematococcus pluvialis*) steigt die Konzentration der Enolase unter Stressbedingungen wie oxidativem Stress an [Wang *et al.*, 2004]. Einen ähnlichen Mechanismus der Stress-bedingten Regulation der Enolase (ENO1) während des oxidativen Stresses (Sauerstoffmangel) findet man in menschlichen Tumorzellen [Sedoris *et al.*, 2010]. Hier wird die Enolase nach der Behandlung mit anti-Tumor Substanzen ubiquitiniert und abgebaut [Mandili *et al.*, 2012]. Andererseits führt die Ubiquitinierung der Enolase nicht immer zwangsläufig zu deren Abbau. Die Konzentration und Lokalisation der Enolase spielt bei dem Lebenszyklus des Parasiten *Plasmodium falciparum* eine Rolle. Hier dient die Ubiquitinierung als Signal zum Transport der Enolase in die Vakuolen [Bhowmick *et al.*, 2009; Shevade *et al.*, 2013].

Während *Arabidopsis* insgesamt vier für Enolasen codierende Gene besitzt, die in unterschiedlichen Zellkompartimenten exprimiert werden, enthält das Genom der einzelligen Algen, wie *C. reinhardtii* oder *C. variabilis*, nur eine einzige Sequenz für eine cytosolische Enolase [Kang *et al.*, 2013; Polle *et al.*, 2014; Prabhakar *et al.*, 2009]. Durch das alternative Spleißen im Falle von *C. reinhardtii* können zwei Varianten des Proteins entstehen, die beide als eine Enolase fungieren: ENO und PGH1. Obwohl das Enolase-Fragment CrENO^{Frag} aus dem Interaktionstest in beiden Protein-Varianten vorhanden ist, ist es in voller Länge nur bei dem PGH1-Protein zu finden. Hiermit kann also eindeutig die Interaktion von Z292L mit der PGH1-Variante der Enolase nachgewiesen werden. Die Sequenz des Enolase-Fragments ist aber auch zu 90 % in der ENO-Variante enthalten. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass beide Enolase-Varianten von Z292L gebunden werden können. Obwohl beide Varianten als eine Enolase identifiziert wurden, kann eine zusätzliche Funktion eines der Proteine als Transkriptionsfaktor nicht ausgeschlossen werden.

Arabidopsis verfügt z. B. über ein Gen für die cytosolische Enolase 2, das ebenfalls zwei Varianten durch alternatives Spleißen bilden kann: MBP-1 (*c-Myc Binding Protein 1*) und ENOc. Während die längere Variante des Proteins ENOc eine funktionelle Variante der Enolase darstellt, ist die kürzere Variante MBP-1 als Transkriptionsfaktor (Suppressor des *c-myc* Gens) bekannt [Kang *et al.*, 2013; Polle *et al.*, 2014]. So besitzt die ENO-Variante des Algen-Proteins möglicherweise nicht nur eine Enolase-Funktion, sondern agiert ebenfalls als Transkriptionsfaktor.

Die spezifische Bindung von Z292L an die Enolase deutet auf eine wichtige Rolle der Enolase während der ATCV-1 Infektion von *C. heliozoae* hin. In der Tat konnte dies auch durch die Inhibierung der Enolase während der Virusinfektion bestätigt werden. Eine Hemmung des aktiven Zentrums der Enolase mit Fluorid wirkte sich negativ auf die Anzahl der infektiösen Viruspartikel aus, die nach der Virusinfektion entstanden sind. Eine funktionsfähige Enolase ist also essenziell für die erfolgreiche Virusinfektion. Dass Enolase für die virale Vermehrung wichtig sein kann, konnte schon am Beispiel des humanen Hepatitis B Virus beobachtet werden. Die fehlende Expression des *ENO1*-Gens wirkt sich negativ auf die Replikation des Virus aus, was wiederum darauf schließen lässt, dass die Enolase ebenfalls für Virusreplikation wichtig ist [Xiang-Chun *et al.*, 2017].

Eine Z292L-ähnliche Sequenz ist in sechs ATCV-Spezies und in fast allen sequenzierten PBCV-Spezies zu finden. Die Tatsache, dass dieses Protein in so vielen Chloroviren-Spezies vertreten ist, zeigt dass es eine wichtige Rolle in dem Infektionszyklus dieser Viren spielen muss. Es ist anzunehmen, dass trotz Ähnlichkeiten in der Proteinsequenz und der potenziellen Funktion als E3-Ligase, diese Proteine auch unterschiedliche Funktionen während der Infektion erfüllen könnten. Das A481L aus PBCV-1 bildet z. B. in Gegensatz zu Z292L nicht nur Dimere, sondern zeigt auch schwache Interaktionen mit den Cullinen 1 und 3 aus *Arabidopsis*. Es könnte also sowohl als Dimer, als auch in einem Multi-Protein-Komplex wie eine SCF E3-Ligase agieren. A481L aus PBCV-1 bindet auch im Y2H-Assay nicht an die Enolase aus *C. reinhardtii* und hat vermutlich andere Zielproteine.

Die Synthese einer Dimer-bildenden E3-Ligase sorgt für eine überwiegend unabhängige Arbeitsweise des Enzyms. Z292L agiert außerhalb von Multi-Protein-Komplexen und muss lediglich auf die Hilfe der E1- und E2-Enzyme zurückgreifen. Diese sind allerdings unspezifisch und stets in der Zelle vorhanden. Durch das Nutzen von viralem Ubiquitin wird die Ubiquitinierung spezifischer und unabhängiger von Wirt. Die Enolase aus Algen stellt ein wichtiges Protein mit mehreren bedeutsamen Funktionen dar, nicht nur bei der Glycolyse sondern möglicherweise auch bei der Regulation der Transkription mancher Gene. Da die Anwesenheit der funktionsfähigen Enolase während der Infektion mit ATCV-1 unerlässlich ist, wird die Enolase sehr wahrscheinlich nicht zum Abbau markiert. Eine Mono-Ubiquitinierung mit dem Ziel die Lokalisation der Enolase zu verändern und diese in den Nucleus zu transportieren, würde nicht nur mit den beschriebenen Arten der Ubiquitinierung der Enolase übereinstimmen, sondern auch mit den Ergebnissen dieser Arbeit (Abbildung 4.2).

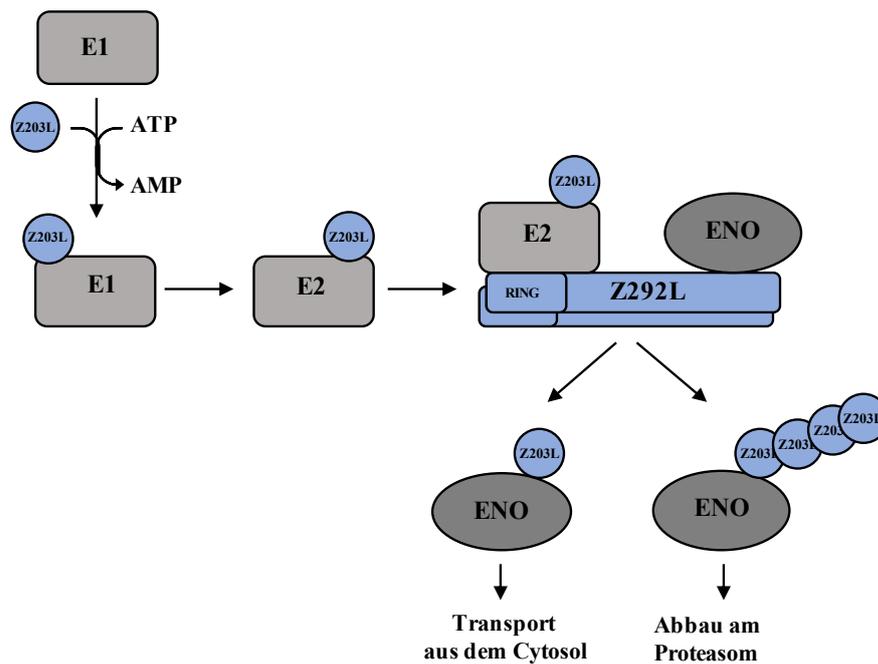


Abbildung 4.2 Schematische Darstellung der Ubiquitinierung der Enolase mit Hilfe der viralen E3-Ligase Z292L.

Das Zielprotein Enolase (ENO) wird unter Verwendung von E1- und E2-Enzymen von der viralen RING E3-Ligase Z292L mono- oder polyubiquitiniert. Dabei werden sowohl virale Proteine, wie das Ubiquitin Z203L (blau markiert), als auch die wirtseigenen Komponenten des Ubiquitin-Systems verwendet (grau markiert).

Allerdings, basierend auf den Ergebnissen, kann eine Polyubiquitinierung als Zielsignal zum Abbau nicht ausgeschlossen werden. Durch die temporäre Expression aller viralen Gene werden auch die wirtseigenen Interaktionspartner zeitabhängig benötigt. So könnte eine Enolase auch nur zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Infektion von ATCV-1 benötigt werden und danach direkt abgebaut werden. Dies würde zur Inhibierung des Kohlenhydratabbaus in der Zelle führen und damit zur Anreicherung von Verbindungen, die für den Aufbau von Desoxyribonukleotiden der Viruspartikel benötigt werden. Über Z292L wäre ATCV-1 folglich in der Lage, den Kohlenhydratstoffwechsel in der Alge gezielt zu seinem Vorteil zu verändern. Der Wirtsmetabolismus könnte zum Teil abgeschaltet werden und viele Ressourcen stünden nur noch für die Produktion der Viruspartikel zur Verfügung. Diese Art der Umprogrammierung der Wirtszelle ist bisher bei großen DNA-Viren nicht beschrieben worden. Beide dieser möglichen Wege eröffnen ganz neue Aspekte der Wirt-Virus-Interaktionen, auch für das Studium tierischer und menschlicher Viren (Abbildung 4.2).

4.2.3 Z339L – virales SKP1-Protein

Das virale Protein Z339L kann anhand der Aminosäuresequenz als ein SKP1-Protein identifiziert werden. Die Sequenz der SKP1-Proteine ist stark konserviert innerhalb aller sequenzierter ATCV-Spezies. In PBCV-1 wurde bereits das A039L-Protein als SKP1-Protein identifiziert. Seine Bindung an zwei PBCV-Proteine mit F-Box-ähnlichen Domänen wurde bereits beschrieben [Noel *et al.*, 2014]. In Rahmen dieser Studie wird A039L vergleichend zu Z339L weiter charakterisiert. Wie alle SKP1-Proteine, besitzen A039L und Z339L sowohl eine SKP1-Domäne, als auch die BTB/POZ-Domäne. Nachgewiesenerweise kann aber nur das Protein aus ATCV-1 mit Cullin 1 und Cullin 3 aus *Arabidopsis* interagieren. Eine Dimer-Bildung kann bei keinem der viralen Proteine detektiert werden. Das Z339L ist also theoretisch in der Lage, innerhalb des Multi-Protein-Komplexes als eine SCF E3-Ligase mit den wirtseigenen Proteinen zu agieren (Abbildung 4.3).

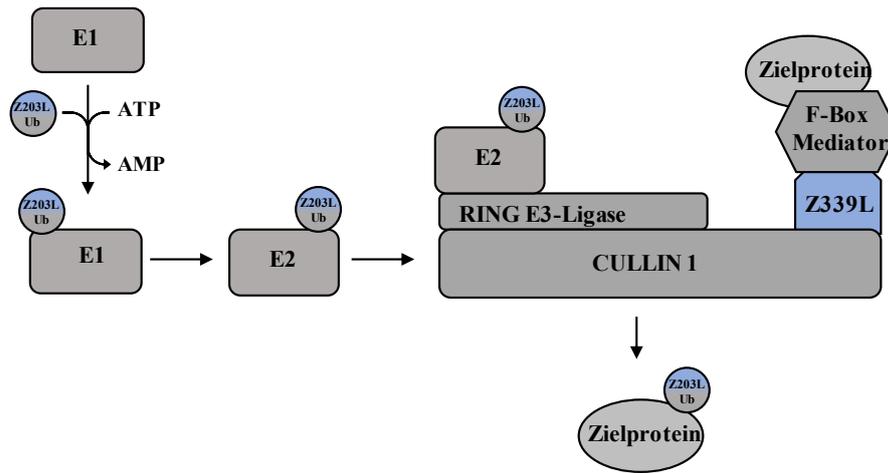


Abbildung 4.3 Schematische Darstellung der Ubiquitinierung von Wirtsproteinen durch eine SCF-Ligase mit integriertem viralem SKP1-Protein Z339L.

Dabei werden sowohl virale Proteine (blau markiert), wie das Ubiquitin Z203L oder SKP1-Protein Z339L, als auch die wirtseigenen Komponenten des Ubiquitin-Systems verwendet (grau markiert).

In der Tat konnte in dieser Studie auch die *in vivo* Interaktion zwischen dem viralen Z339L und mehreren Proteinen aus *C. heliozoae* nachgewiesen werden (Abbildung 3.17). Das Molekulargewicht dieser Interaktionspartner entspricht dem Molekulargewicht einiger Komponenten des SCF-Komplexes. So ist das hypothetische Cullin 1 (CHLNCRAFT22706, 86 kDa) oder Cullin 3 (CHLNCRAFT138949 80,9 kDa) aus *C. variabilis* ungefähr 80 – 90 kDa groß, was den gefundenen Proteingrößen entsprechen würde. Die genaue Sequenz der Proteine aus *C. heliozoae* kann jedoch nicht bestimmt werden, denn das Genom dieser Alge wurde noch nicht sequenziert.

Neben den Interaktionen mit Komponenten der SCF E3-Ligase zeigt das Z339L weitere interessante Funktionen in Hefe. Als Fusionsprotein mit einer GAL4-DNA-Bindedomäne (GBD) wirkt das Z339L am GAL1-Promotor im Hefestamm HF7c aktivierend und leitet die Expression des Reportergens ein. Eine Aktivierung der Transkription konnte nur mit der GBD-Domäne erzielt werden. Eine Fusion von Z339L mit einer anderen DNA-bindenden Domäne, wie *LexA*, verursachte keine Transkriptionsaktivierung. Dieser Effekt ist für das Z339L einzigartig und konnte weder für AtSKP1 noch für A039L nachgewiesen werden. Zudem ist diese Transkriptionsaktivierung allein auf die SKP1-

Domäne zurückzuführen, was wiederum auf die Beteiligung von Cullin 1 und F-Box-Proteinen hindeutet (Abbildung 4.4 A).

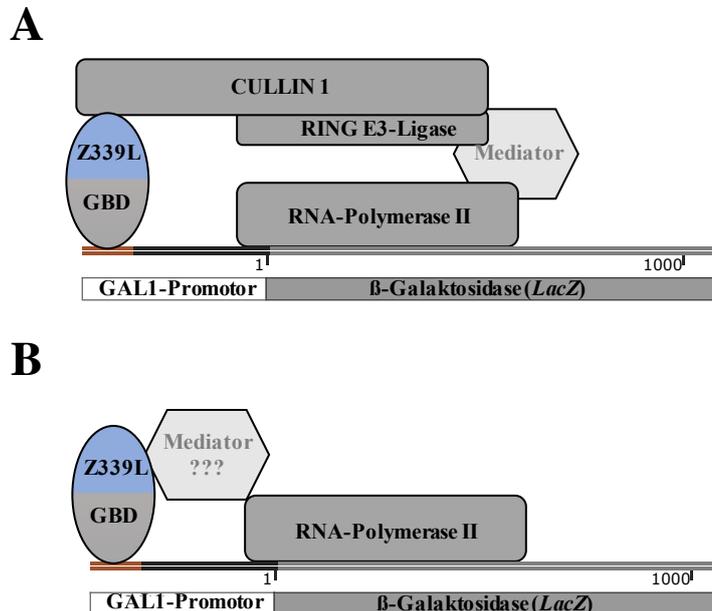


Abbildung 4.4 Schematische Darstellung der Regulation von der Genexpression durch Z339L in Hefe.

Das virale Protein Z339L (blau markiert) fusioniert an die GAL4-DNA-Bindedomäne leitet die Expression der dahinter geschalteten Gene ein. Z339L agiert entweder innerhalb des SCF E3-Ligase-Komplexes (**A.**) oder rekrutiert weitere Transkriptionsfaktoren oder Mediatoren, welche die RNA-Polymerase II binden können (**B.**).

Der bekannteste Mechanismus zur Transkriptionsregulation mit Hilfe der E3-Ligasen in Hefe ist die Glucose-abhängige Genexpression mit *Glucose Repression-Resistant Protein 1* (GRR1). GRR1 agiert zusammen mit dem SCF-Komplex (SCF^{GRR1}) und steuert nicht nur die Glucose-abhängige Genexpression der *GAL*-Gene (Abbau von GAL4), sondern spielt auch eine Rolle bei der Zellzyklusregulation (Abbau von Zellzyklusregulatoren) und bei der von Aminosäuren gesteuerten Genexpression [Li 1997; Spielwoy *et al.*, 2004; Traven *et al.*, 2006]. Allerdings kann keine Bindung des viralen Z339L-Proteins an das GRR1-Protein aus Hefe oder an den entsprechenden pflanzlichen Proteine (GRH1 aus *Arabidopsis*) detektiert werden. Auch die Interaktion mit der F-Box-Domäne ($GRR1^{f-box}$) aus Hefe konnte nicht gezeigt werden. Auch wenn die Bindung von Z339L an F-Box-Proteine am wahrscheinlichsten erscheint, ist es auch möglich, dass Z339L selbst für die Transkriptionsaktivierung ver-

antwortlich ist (Abbildung 4.4 B). In der Tat wurde das humane SKP1-Protein zuerst als ein Elongationsfaktor der RNA-Polymerase II beschrieben [Sowden *et al.*, 1995].

Die Ergebnisse dieser Studie beweisen, dass ATCV-1 über ein funktionsfähiges SKP1-Protein verfügt. Dieses fungiert als eine Komponente der SCF E3-Ligase in Algen und als Transkriptionsaktivator in Hefe. Die SKP1-Proteine rekrutieren die Zielproteine der SCF E3-Ligasen selbst oder vermitteln die Bindung der Zielproteine über die F-Box-Proteine. Über das virale SKP1-Protein ist ATCV-1 also in der Lage, die Ziele der E3-Ligasen des Wirtes zu verändern.

4.3 Wechselwirkungen zwischen ATCV-1 und seinem Wirt

In der vorliegenden Arbeit konnten neue Erkenntnisse zu wichtigen Wechselwirkungen zwischen dem ATCV-1 und seinem Wirt gewonnen werden. Diese wurden zum ersten Mal experimentell durch Untersuchungen der Promotoraktivität und Proteinfunktion in lebenden Organismen gewonnen und beziehen sich nicht ausschließlich auf die Sequenzvergleiche mit den vorhandenen Datenbanken. Die hier beschriebenen Wechselwirkungen finden auf der molekularen Ebene zwischen der viralen DNA, den viralen Proteinen und den Wirtsproteinen statt. Das Virus verfügt über eine breite Palette von Anpassungen, die auf die Regulation, das Modulieren und eine Mimikry der Wirtsproteinen ausgelegt ist. Gleichzeitig ist das virale Genom von ATCV-1 trotz seiner enormen Größe auf das Wesentliche beschränkt. Dies ist nicht nur an der Promotororganisation zu sehen, sondern auch an den codierenden Bereichen, die teilweise Sequenzen für Minimalproteine enthalten.

Die Promotoren von ATCV-1 sind maximal 150 bp lang, enthalten aber dennoch alle für die Expression in Algen wichtige Sequenzen, wie z. B. die TATA-Box oder das Hex-Motiv. Diese Consensus-Sequenzen sind so kompakt positioniert, dass der Kernpromotor auf ca. 80 bp begrenzt werden kann. Zudem sieht man anhand des Promotors der DNA-Polymerase, dass auch überlappende Se-

quenzen auftreten können und diese bei der Genregulation eine Verwendung finden. So lässt sich der proZ798L nicht nur durch die eukaryotischen Transkriptionsfaktoren aktivieren (GBF, TGA), sondern kann auch von bakteriellen σ -Faktoren gebunden werden. Dies stellt eine enorme Anpassung an den Wirt dar, der neben der normalen eukaryotischen Genom-Organisation auch über bakterielle Faktoren in den Plastiden verfügt, die bei einer Virusinfektion freigesetzt werden. Die Anpassung an die eukaryotischen Mechanismen zur Regulation der Genexpression ist teilweise so gut, dass eine Expression auf Grund von stark konservierten Transkriptionsfaktoren in anderen Nicht-Wirtsorganismen erfolgen kann. Durch das Anpassen des Polymerase-Promotors an mehrere Regulationsmechanismen kann sichergestellt werden, dass eines der wichtigsten Proteine der Virusinfektion, in allen Zellkompartimenten sicher synthetisiert werden kann. Diese Beschaffenheit des Promotors kann unabhängig von der Infektion genutzt werden. Die starke Expression der Gene, welche unter der Kontrolle des proZ798L stehen, kann auch in Vektorsystemen zur Expression in Algen und sogar in Pflanzen verwendet werden. Vor allem in Algen bereitet die Expression von heterologen Genen heutzutage noch Schwierigkeiten, diese können mit den viralen Promotoren gelöst werden. Hier kann auch die verkürzte Variante des Promotors verwendet werden, wie die starken Minimalpromotoren von Z174L und Z765R.

Die virale Mimikry ist, wie schon erwähnt, ebenfalls am Aufbau der Proteine zu sehen. ATCV-1 verfügt über Proteine, die den Wirtsproteinen sehr ähnlich sind, wie z. B. das virale Ubiquitin Z203L oder das virale SKP1-Protein Z339L. Diese Proteine ähneln den Wirtsproteinen so sehr, dass sie zusammen mit den Wirtsproteinen als Komponenten des Ubiquitin-Systems agieren können und zusammen Komplexe bilden können. Die spezifische Bindung des viralen SKP1-Proteins ist allein auf sein Zielprotein beschränkt. Die Bindung an basale Komponenten der SCF-Ligase wie Cullin 1 und 3 hingegen, greift über die Wirtszelle hinaus (*A. thaliana*, *S. cerevisiae*). Das virale Z203L kann von humanen Enzymen konjugiert werden. Seine spezifische Bindung wird ausschließlich über die virale E3-Ligase Z292L vermittelt. Die virale E3-Ligase Z292L stellt eine andere Anpassungsstrategie des ATCV-1 dar, als die anderen beiden Proteine. Während Z339L und Z203L Interaktionen mit mehreren Wirtsproteinen und Proteinen aus anderen Spezies eingehen, agiert Z292L vor-

wiegend mit viralen Proteinen. Über das Z292L, wird eine zumindest teilweise Unabhängigkeit des Virus vom Wirt erreicht, mit dem Ziel möglichst ungehindert bestimmte Proteine zu ubiquitinieren. Anhand der Zielproteinen von Z292L oder Z339L wird schnell klar, dass diese Proteine über ihre Interaktionen zu enormen Veränderungen in den zellulären Stoffwechselwegen führen können.

In der eukaryotischen Zelle gibt es mehrere Möglichkeiten zur Regulation des Proteoms. ATCV-1 ist in der Lage, in zwei dieser sehr wichtigen Bereiche einzugreifen und dadurch die Wirts-Stoffwechselwege, das Ubiquitin-System und die eigene Genexpression zu regulieren. Die Interaktionen zwischen Virus und Wirt stellen eine fein regulierte Basis der Infektion dar und greifen sogar darüber hinaus. Der in dieser Arbeit beschriebene neue GBF-abhängige Mechanismus zur Regulation früher viraler Promotoren von ATCV-1 und die Umprogrammierung des Ubiquitin-Systems mit Hilfe von den E3-Ligasen Z292L und Z339L stellen bestimmt nur einen Teil, der vielen möglichen Wechselwirkungen zwischen dem ATCV-1 und *Chlorella heliozoae* dar. Zudem sind dies die ersten experimentellen molekularen Studien zu Wirtsinfektion in Algenzellen und können deshalb als Basis für das Verständnis von Phycodnavirus-Infektionen im Allgemeinen dienen.

Kapitel 5

Materialien

5.1 Chemikalien

Standardchemikalien wurden von den Firmen: Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Calbiochem[®] (Darmstadt), Duchefa Biochemie (Haarlem) bezogen und entsprechend den Herstellerangaben gelagert. Das zur Herstellung von Puffern, Nährmedien und Lösungen verwendete bidestillierte Reinstwasser ($18,3 \frac{M\Omega}{cm}$) wurde von der HERCO Filtrationsanlage gereinigt (D7611, HERCO Wassertechnik GmbH, Freiberg). Steriles Wasser für molekulare Reaktionen wurde von der Firma Carl Roth bezogen. Die Verbrauchsmaterialien wurden von der Firma Sarstedt AG & Co (Nürnbrecht) bezogen.

5.2 Enzyme

Enzyme wurden von den Firmen: Thermo Fischer Scientific Inc. (St. Leon-Rot), New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main) und Ubiquigent[®] (Dundee) erworben und entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt.

5.3 Kits

Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien - NucleoSpin[®] Plasmid, MARCHERY-NAGEL GmbH & Co. KG CatNr 750588.250

Isolation von DNA aus Agarosegelen - PCR and Gel Extraction Mini Prep Kit, Genaxxon Bioscience GmbH CatNr: S5380

Isolation von DNA aus Viren und Pflanzen - Miniprep Kit, ZymoBIOMICS™ Catalog No: D4300S Lot No: ZRC201433

5.4 Biologische Materialien

5.4.1 Viren

Acanthocystis turfacea *Chlorella* Virus - 1

Genotyp: wildtyp, NCBI Taxonomy ID: 322019, Herkunft: Laborbestand [Bubeck *et al.*, 2005]

Paramecium busaria *Chlorella* Virus - 1

Genotyp: wildtyp, NCBI Taxonomy ID: 10506, Herkunft: James van Etten, Nebraska Center for Virology and Department of Plant Pathology, University of Nebraska

5.4.2 Bakterien

Escherichia coli DH5 α

Genotyp: Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺) phoA supE44 λ thi-1; recA1; gyrA96 relA1; Herkunft: Laborbestand

Escherichia coli BL21-CodonPlus

Genotyp: *E. coli* B F⁻ ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal \times (DE3) endA Hte [argU proL Cam^r] [argU ileY leuW Strep/Spec^r]; Herkunft: Novagen® (Merck, Darmstadt)

Agrobacterium tumefaciens LBA4404

Genotyp: Ach5 pTiAch5 Δ T, Rif^R; Herkunft: Laborbestand

***Agrobacterium tumefaciens* GV3101**

Genotyp: pMP90RK, Gen^R, RifGen^R; Herkunft: Laborbestand

5.4.3 Hefen

***Saccharomyces cerevisiae* NMY51**

Genotyp: MATa, *his3delta200*, *trp1-901*, *leu2-3*, *112*, *ade2*, LYS2::(*lexAop*)₄-HIS3, *ura3*::(*lexAop*)₈-lacZ (*lexAop*)₈-ADE2 GAL4)

Herkunft: Dualsystems Biotech AG (Zürich, CH)

***Saccharomyces cerevisiae* HF7c**

Genotyp: MATa, *ura3-52*, *his3-200*, *lys2-801*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3*, *112*, *gal4-542*, *gal80-538*, LYS 2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, URA3:::(GAL 17mers) 3-Cyc1_{TATA}-lacZ; Herkunft: Clontech, Heidelberg

***Saccharomyces cerevisiae* Y06902 - GRR1 Deletionsmutanten**

Genotyp: BY4741; MATa; *ura3Δ0*; *leu2Δ0*; *his3Δ1*; *met15Δ0*; YJR090c::kanMX4

Herkunft: Scientific Research and Development GmbH, Oberursel, DE

***Saccharomyces cerevisiae* Y15277 - DSG1 Deletionsmutanten**

Genotyp: BY4742; MATα; *ura3Δ0*; *leu2Δ0*; *his3Δ1*; *lys2Δ0*; YLR368w::kanMX4

Herkunft: Scientific Research and Development GmbH, Oberursel, DE

5.4.4 Algen

***Chlamydomonas reinhardtii* 302 cw15arg⁻**

Herkunft: Michael Schroda, Max Planck Institute of Molekular Plant Physiology, Potsdam-Glom

***Chlorella heliozoae* SAG 3.83, wildtyp**

Herkunft: U. G. Schlösser, 1982, Kanada, Neufundland, Sumpftümpel in Terra Nova Nationalpark

Chlorella variabilis NC64, wildtyp

Herkunft: James van Etten, Nebraska Center for Virology and Department of Plant Pathology, University of Nebraska

5.4.5 Zellkultur

HEK293

Herkunft: Hr. Möller, Institut für Biologie, Universität Hohenheim

5.4.6 Pflanzen

Nicotiana benthamiana L., wildtyp

Herkunft: Prof. K.-W. Mundry, Universität Stuttgart

Nicotiana tabacum L., Samsun NN

Herkunft: Tobacco Institute, North Carolina, USA

Arabidopsis thaliana L., Heynh. Columbia (Col-0)

Herkunft: Fred Auzebel, Massachusetts General Hospital

5.5 Gene und Proteine

5.5.1 Reportergene

5.5.1.1 Argininosuccinat-Lyase

Argininosuccinat-Lyase (ASL) ist ein Enzym, das den letzten Schritt der Argininbiosynthese katalysiert, nämlich die Spaltung von Argininosuccinat in Fumarat und Arginin. In Algen codiert das Gen *ARG7* für die ALS. Dieses ist in *C. reinhardtii* 7,7 kb groß und enthält 13 codierende Bereiche sowie 12 Introns [Purton *et al.*, 1995]. Dieses Gen, samt seinen 5' UTR und 3' UTR, wird in Algen-Expressionsvektoren eingesetzt, um das fehlende oder mutierte *ARG7*-Gen der auxotrophen Algenzellen zu komplementieren. Das ermöglicht

eine einfache Selektion. Zudem kann die Aktivität des Enzyms quantitativ bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde das *ARG7*-Gen im pARG7 Vektor zusammen mit dem *C. reinhardtii* 302 cw15arg⁻ Stamm zur Promotoranalyse verwendet (ASL-Assay, Abschnitt 6.2.6).

5.5.1.2 GFP

Das *green fluorescent protein* **GFP** ist ein 27 kDa großes, aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliertes Protein [Shimomura *et al.*, 1962]. GFP fluoresziert bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht (395 nm und 475 nm) grün und wird oft als Fusionsprotein zur Lokalisation der Proteine in der Zelle eingesetzt. Zudem ist GFP ein stabiles Protein dessen Fluoreszenz sowie Stabilität durch diverse Mutationen verbessert werden konnte. Das *yellow fluorescent protein* **YFP** ist eine Variante von GFP. Durch den Austausch des Threonins an der Position 203 durch eine aromatische Aminosäure (F203Y), kommt es zur Verschiebung des Anregungsmaximums (auf 514 nm) aber auch zur Verschiebung des Emissionsmaximums (auf 527 nm), wodurch das Protein im gelben Bereich fluoresziert. Die verbesserte Variante des YFP, das *enhanced YFP* (**eYFP**) zeigt eine erhöhte Maturation, schwache Dimerbildung und hohe Säureempfindlichkeit [Ormo *et al.*, 1996]. Die **mVenus** Variante des eYFP (F46L, A206K) zeigt eine schwächere Säureempfindlichkeit als die eYFP-Variante [Kremers *et al.*, 2006].

5.5.1.3 Glutathion-S-Transferase

Die Glutathion-S-Transferase (GST) ist ein Enzym, das die Bindung von Glutathion an organische Verbindungen katalysiert. In der vorliegenden Arbeit wurde die hohe Affinität von GST für das Glutathion genutzt. Das Protein wurde als ein Protein-Tag zur Aufreinigung der gesuchten Proteine mit Hilfe von Affinitätschromatographie verwendet. Mit Hilfe von *pulldown* Assays ist es möglich nicht nur das gebundene Protein aufzureinigen, sondern auch dessen Interaktionspartner.

5.5.1.4 β -Glucuronidase

β -Glucuronidase (GUS) ist ein Enzym, das β -Glucuronide spalten kann. In *E. coli* codiert das Gen *uidA* für die β -Glucuronidase. In der vorliegenden Arbeit wurde das Enzym zur Promotoranalyse verwendet, indem das *uidA*-Gen unter der Kontrolle der zu untersuchenden Promotoren gebracht wurde (pUC18-GUS). Der GUS-Assay basiert auf der Eigenschaft der β -Glucuronidase, 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (MUG) zu 4-Methylumbelliferon (MU) zu hydrolysieren. Bei der Anregung mit ultraviolettem Licht (360 nm) fluoresziert MU im Bereich von 455 nm. Die Intensität dieser Fluoreszenz lässt auf die Umsatzrate der β -Glucuronidase schließen und somit auf die Aktivität der untersuchten Promotoren (GUS-Assay, Abschnitt 6.2.7).

5.5.1.5 β -Galactosidase

β -Galactosidase (β -Gal) ist ein Enzym, das endständige, glycosidisch gebundene β -D-Galactose von Biomolekülen hydrolytisch spalten kann. In *E. coli* codiert das Gen *LacZ* für die β -Galactosidase. Das Protein wurde in der vorliegenden Arbeit für die Blau/Weiß-Selektion in Bakterien und zur Identifizierung der Protein-Interaktionen in Hefen verwendet. Die Aktivität des Enzyms wurde mit Hilfe des, nach der Spaltung vom Substrat (oNPG, X-Gal), entstehenden Farbstoffs bestimmt.

5.5.1.6 Silencing suppressor p19

RNA silencing suppressor p19 ist ein 19 kDa großes, virales Protein, das als Unterdrücker des RNA-vermittelten *Gene Silencing* dient. Das *post-transcriptional gene silencing* (PTGS) ist ein Abwehrmechanismus von infizierten Pflanzen, welcher die Akkumulation der viralen RNA verhindert. Für das Protein codiert das *ORF4*-Gen in dem Genom des *Tomato bushy stunt virus* (TBSV). In der vorliegenden Arbeit wurde p19 zur Verbesserung der Expression der Gene verwendet, die mittels Agrobakterieninfiltration in Pflanzengewebe eingebracht wurden.

5.5.2 Andere Gene und Proteine

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Gene sind in der Tabelle 5.1 aufgelistet. Die Proteine, die allein auf Basis ihrer Sequenzhomologien identifiziert wurden, sind in Klammer dargestellt.

Tabelle 5.1 Verwendete Gene, mit zugehörigen Proteinen, Spezies und der GeneID Nummer der NCBI Datenbank.

Name	Protein	Spezies	GeneID:
Z174L	Z174L (<i>Effector of transcription</i>)	ATCV-1	5471015
Z203L	Z203L (Ubiquitin)	ATCV-1	5470669
Z292L	Z292L (E3-Ligase)	ATCV-1	5470783
Z339L	Z339L (SKP1-Protein)	ATCV-1	5470446
Z765R	Z765R (Transkriptionsfaktor)	ATCV-1	5470371
A039L	A039L (SKP1-Protein)	PBCV-1	918396
A481L	A481L (E3-Ubiquitin-Ligase)	PBCV-1	918171
AtENO2	Enolase 2 / TF	<i>A. thaliana</i>	818226
AtENO3	cytosolische Enolase, AtENOC	<i>A. thaliana</i>	817505
AtGRH1	<i>GRR1-like protein 1</i>	<i>A. thaliana</i>	828045
AtCUL1	Cullin 1	<i>A. thaliana</i>	825648
AtCUL3	Cullin 3	<i>A. thaliana</i>	839226
AtACX3	Acyl-CoA Oxidase 3	<i>A. thaliana</i>	837140
AtGBF1	<i>G-box binding factor 1</i>	<i>A. thaliana</i>	829826
AtTGA6	TGACG motif-binding factor 6	<i>A. thaliana</i>	820405
AtNPR1	regulatory protein NPR1 (NIM1)	<i>A. thaliana</i>	842733
AtNIMIN	NIM1-interacting 1	<i>A. thaliana</i>	837800
NtTGA1a	TGACG-sequence-specific DNA-bindingprotein TGA-1A	<i>A. thaliana</i>	107771743
CrENO ^{Frag}	Enolase, PGH1, AS ₉₄₋₁₈₃	<i>C. reinhardtii</i>	5728533
CrPFL ^{Frag}	Pyruvat-Formiat-Lyase, AS ₄₃₈₋₅₆₇	<i>C. reinhardtii</i>	5715645
CrGBF	(<i>G-box binding factor</i>)	<i>C. reinhardtii</i>	5715609
CvGBF BD	(<i>G-box binding factor</i>) AS ₁₄₆₋₂₀₈	<i>C. variabilis</i>	17354908
ScGRR1	<i>Glucose Repression-Resistant 1</i>	<i>S. cerevisiae</i>	853552
CREB3L3	<i>cAMP responsive element binding protein 3 like 3</i>	<i>H. sapiens</i>	84699

5.6 Vektoren

Alle Vektorkarten befinden sich im Anhang A.2. Die nicht selbst klonierten vektorbasierten Konstrukte sind als solche gekennzeichnet (Angabe der Quelle) oder stammen aus dem Laborbestand der AG Pfitzner (Pfitzner).

5.6.1 pBluescript II KS(+)

Der Vektor pBluescript II KS (+) ermöglicht eine gezielte Genexpression in Bakterien und wird üblicherweise als Klonierungsvektor eingesetzt (Stratagene, USA). Der Vektor ist 2958 bp groß und enthält den Replikationsursprung des Bakteriophagen M13 (ori) sowie den Replikationsursprung fl (+) ori. Die *multiple cloning site*, multiple Klonierungsstelle (MCS) liegt innerhalb der codierenden Region für das α -Fragment der β -Galaktosidase (*lacZ α*) und ermöglicht eine Blau/Weiß-Selektion der rekombinanten Bakterienklone. Der Vektor enthält zudem eine Ampicillinresistenz (Amp^R).

5.6.2 T-Vektor

Der T-Vektor ist ein linearisierter pBluescript KS II (+) Vektor mit angehängten Thymin-Überhängen. Vor allem dient er der TA-Klonierung von PCR-Produkten [Holton *et al.*, 1991]. Die Taq-Polymerasen neigen dazu, ein zusätzliches Nukleotid (meistens Adenosin) an das amplifizierte Fragment anzuhängen, welches mit dem Thymin des T-Vektors hybridisieren kann. Hierfür wurde der pBluescript II KS(+) mit *EcoRV* verdaut und mit einer terminalen Desoxynucleotidyl-Transferase (TdT) in Gegenwart von Didesoxythymidintriphosphat (ddTTP) behandelt, um die Desoxythymidine an die 3'-OH Enden des glatt geschnittenen Vektors anzuhängen.

5.6.3 pGEX-3X

Der Vektor pGEX-3X ist ein bakterieller Expressionsvektor und 4952 bp groß (Dualsystems Biotech, Zürich). Der Vektor ermöglicht eine Expression des Zielproteins als eine C-terminale Fusion der Gluthathion-S-Transferase mit einer Faktor-Xa-Erkennungsequenz zwischen den Fusionsproteinen. Die Genexpression wird über den *tac*-Promotor gesteuert und wird durch ein internes *lacI*-

Gen reguliert. Die Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) induziert die Genexpression. Der Vektor enthält zudem eine Ampicillinresistenz (Amp^R). pGEX-3X wurde in der vorliegenden Arbeit zur Expression der GST-Fusionsproteine in *E. coli* Stamm BL21-CodonPlus verwendet. Alle verwendeten Konstrukte, die auf dem pGEX-3X Vektor basieren, sind in der Tabelle 5.2 aufgelistet.

Tabelle 5.2 Verwendete Plasmide basierend auf pGEX-3X. Für die Klonierung verwendete Restriktionsschnittstellen sowie Bezugsquellen sind mit angegeben.

Name	Klonierung	Quelle
pGEX-3X::Z203L ^{wt}	<i>Bst</i> BI/ <i>Sma</i> I	Lindner
pGEX-3X::Z203L ^{delN77}	<i>Bst</i> BI/ <i>Sma</i> I	Lindner
pGEX-3X::Z292L	<i>Sma</i> I/ <i>Eco</i> RI	[Stark 2014]
pGEX-3X::Z339L	<i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI	[Saur 2015]

5.6.4 pDEST22, pDEST32 und pDONR201

Die Vektoren **pDEST22** und **pDEST32** ermöglichen die Gateway[®] Klonierung und Expression der gewünschter Gene in Hefe. Im pDEST22 werden die Proteine als C-terminale Fusion der GAL4-Aktivierungsdomäne synthetisiert. Im pDEST32 werden die Proteine als C-terminale Fusion der GAL4-DNA-Bindedomäne synthetisiert. Beide Vektoren enthalten zudem Zielsequenzen (*att*B1, *att*B2) die homologe Rekombination in Hefe ermöglichen, sofern die gewünschte Insert-DNA in einem Helferplasmid vorliegt. Die Expression des Fusionsgens wird in Hefen von dem konstitutiv aktiven ADH1-Promotor reguliert, der ADH1-Terminator sorgt für eine erfolgreiche Termination der Transkription. Der **pDONR201** Vektor ist ein Helferplasmid für die Gateway[®] Klonierung und liefert das Gen von Interesse, das mit den *att*B-Sequenzen entsprechend den pDEST-Vektoren flankiert wird. pDEST22 enthält eine Ampicillinresistenz (Amp^R) zur Selektion in Bakterien (DH5 α) und einen TRP1-Marker, der auxotrophen Hefestämmen (HF7c) das Wachstum auf selektivem Medium ohne Tryptophan ermöglicht. pDEST32 enthält eine Gentamicinresistenz (Gen^R) und den LEU2-Marker. Alle verwendeten Konstrukte, die auf den pDEST22, pDEST32 und pDONR201 Vektoren basieren, sind in der Tabelle 5.3 aufgelistet.

Tabelle 5.3 Verwendete Plasmide basierend auf pDEST22, pDEST32 und pDONR201. Für die Klonierung verwendete Methode sowie Bezugsquellen sind mit angegeben.

Name	Klonierung	Quelle
pDONR201::ScGRR1		Invitrogen
pDEST22::ScGRR1	<i>attB1/attB2</i>	Lindner
pDEST32::ScGRR1	<i>attB1/attB2</i>	Lindner

5.6.5 pBT3-N und pBT3-N Δ

Der **pBT3-N** Vektor ist ein Teil des *DUALmembrane* System zur Untersuchung der Protein-Protein Interaktionen (Split-Ubiquitin Interaktionstest) in Hefen an denen Membranproteine beteiligt sind (Dualsystems Biotech, Zürich). Der Vektor codiert für den Transkriptionsfaktor LV (LexA-VP16), sowie für die C-terminale Hälfte des Ubiquitins (Cub). Der Vektor ermöglicht eine C-terminale Fusion des Zielproteins am LexA-VP15 und Cub. pBT3-N enthält zudem eine Kanamycinresistenz (Kan^R) zur Selektion in *E. coli* (DH5 α) und einen LEU2-Marker, der auxotrophen Hefestämmen (NMY51) das Wachstum auf selektivem Medium ohne Leucin ermöglicht. Um den Vektor auch zu Interaktionsexperimenten nutzen zu können, die nicht auf dem Split-Ubiquitin-System basieren, wurde der Vektor entsprechen verändert. Die Elemente VP16 und Cub wurden aus dem Vektor entfernt (*ApaI/NcoI*). In dem so veränderten Vektor entsteht ein Fusionsprotein lediglich aus dem Protein von Interesse und der LexA DNA-Bindedomäne. Dieser Vektor wird als **pBT3-N Δ** bezeichnet und wurde als Alternative zum pGBT9 verwendet. Alle verwendeten Konstrukte, die auf dem pBT3-N Vektor basieren, sind in der Tabelle 5.4 aufgelistet.

Tabelle 5.4 Verwendete Plasmide basierend auf pBT3-N Δ . Für die Klonierung verwendete Restriktionsschnittstellen sowie Bezugsquellen sind angegeben.

Name	Klonierung	Quelle
pBT3-N Δ	<i>ApaI/NcoI</i>	Lindner
pBT3-N Δ ::Z339L	<i>ApaI/NcoI</i>	[Witte 2014]
pBT3-N::Z292L	<i>NcoI/NotI</i>	Lindner

5.6.6 pGBT9

Der Vektor pGBT9 wurde für Hefe-2-Hybrid Tests in Hefen verwendet (Clontech Laboratories, Inc., USA). Der Vektor ist 5524 bp groß und ermöglicht eine C-terminale Fusion des Zielproteins mit der GAL4-DNA-Bindedomäne. Die Expression des Fusionsgens wird in Hefen von dem konstitutiv aktiven ADH1-Promotor reguliert. Der ADH1-Terminator sorgt für erfolgreiche Termination der Transkription. pGBT9 enthält eine Ampicillinresistenz (Amp^R) zur Selektion in Bakterien (*E. coli* Stamm DH5 α) und einen TRP1-Marker, der auxotrophen Hefestämmen (HF7c) das Wachstum auf selektivem Medium ohne Tryptophan ermöglicht. Alle verwendeten Konstrukte, die auf dem pGBT9 Vektor basieren, sind in der Tabelle 5.5 aufgelistet.

Tabelle 5.5 Verwendete Plasmide basierend auf pGBT9. Für die Klonierung verwendete Restriktionsschnittstellen sowie Bezugsquellen sind angegeben.

Name	Klonierung	Quelle
pGBT9::Z203L	<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I	Lindner
pGBT9::Z292L	<i>Sal</i> I/ <i>Sma</i> I	[Stark 2014]
pGBT9::A481L	<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I	Lindner
pGBT9::AtENO2	<i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I	Lindner
pGBT9::Z339L	<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I	Lindner
pGBT9::Z339L ^{SKP1}	<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I	Lindner
pGBT9::Z339L ^{BTB}	<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I	Lindner
pGBT9::AtSKP1	<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I	Lindner
pGBT9::A039L	<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I	Lindner
pGBT9::AtGRH1	<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I	[Witte 2014]
pGBT9::AtCul1	<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I	Lindner
pGBT9::AtCul3	<i>Sma</i> I/ <i>Sma</i> I	Lindner
pGBT9::ScGRR1 ^{f-box}	<i>Xba</i> I/ <i>Sal</i> I	Lindner
pGBT9::AtNIMIN 1	<i>Bam</i> HI/ <i>Bam</i> HI	Pfützner

5.6.7 pRW95-3

Der pRW95-3 Vektor ermöglicht die Analyse der DNA-Protein Interaktionen mit Hilfe des Hefe-Ein-Hybrid Systems in Hefe (Clontech Laboratories, USA). Der Vektor basiert auf den Vektoren pLacZi und pCB86; ein 4,9 kb großes Fragment des pLacZi Vektors wurde in den pCB86 Vektor kloniert [Luo *et al.*, 1996]. pRW95-3 ist 8,3 kb groß und enthält die MCS die sich vor dem CYC1-Promotor und dem *LacZ*-Reportergen befindet. Es ist ein sog. *bait*-Vektor und wird zur Insertion von DNA-Fragmenten verwendet, an denen die Proteine binden können. Der Vektor enthält zudem eine Ampicillinresistenz (Amp^R) zur Selektion in *E. coli* (DH5 α) und einen TRP1-Marker, der auxotrophen Hefestämmen (HF7c) das Wachstum auf selektivem Medium ohne Tryptophan ermöglicht. Alle verwendeten Konstrukte, die auf dem pRW95-3 Vektor basieren, sind in der Tabelle 5.6 aufgelistet.

Tabelle 5.6 Verwendete Plasmide basierend auf pRW95-3. Für die Klonierung verwendete Restriktionsschnittstellen sowie Bezugsquellen sind angegeben.

Name	Klonierung	Quelle
pRW95-3::proZ063L	<i>EcoRI/SalI</i>	Lindner
pRW95-3::proZ134L	<i>EcoRI/SalI</i>	Lindner
pRW95-3::proZ174L	<i>EcoRI/SalI</i>	Lindner
pRW95-3::proZ174L ^{wt}	<i>EcoRI/SalI</i>	Lindner
pRW95-3::proZ174L ^{del}	<i>EcoRI/SalI</i>	Lindner
pRW95-3::proZ280L	<i>EcoRI/SalI</i>	Lindner
pRW95-3::proZ326R	<i>EcoRI/SalI</i>	Lindner
pRW95-3::proZ765R	<i>BglII/SmaI</i>	[Wahl 2019]
pRW95-3::proZ765R ^{wt}	<i>EcoRI/SalI</i>	Lindner
pRW95-3::proZ765R ^{del}	<i>EcoRI/SalI</i>	Lindner
pRW95-3::proZ798L	<i>BglII/SmaI</i>	[Wahl 2019]
pRW95-3::proZ798L ^{wt}	<i>EcoRI/SalI</i>	Wahl
pRW95-3::proZ798L ^{A-66G}	<i>EcoRI/SmaI</i>	Lindner
pRW95-3::35S	<i>BglII/SmaI</i>	[Wahl 2019]

5.6.8 pGAD-HA

Der pGAD-HA Vektor ist ein Vektor, der zur Untersuchung der Protein-Protein Interaktionen verwendet wird. Der Vektor wurde von der Firma Dualsystems Biotech AG (Zürich) mit einer integrierten *C. reinhardtii* cDNA-Bank bezogen. Die Expression des Fusionsgens wird in Hefen von dem konstitutiv aktiven ADH1-Promotor reguliert, der ADH1-Terminator sorgt für eine erfolgreiche Termination der Transkription. Das Protein von Interesse wird als eine C-terminale Fusion der GAL4-Aktivator-domäne synthetisiert und mit einem HA-Tag versehen. Der Vektor enthält zudem eine Ampicillinresistenz (Amp^R) zur Selektion in *E. coli* (DH5 α) und einen LEU2-Marker, der auxotrophen Hefestämmen (HF7c) das Wachstum auf selektivem Medium ohne Leucin ermöglicht. Alle verwendeten Konstrukte, die auf dem pGAD-HA Vektor basieren, sind in der Tabelle 5.7 aufgelistet.

Tabelle 5.7 Verwendete Plasmide basierend auf pGAD-HA. Für die Klonierung verwendete Restriktionsschnittstellen sowie Bezugsquellen sind mit angegeben.

Name	Klonierung	Quelle
pGAD-HA::CrENO ^{Frage} .	cDNA-Bank	Dualsystems Biotech AG
pGAD-HA::CrPFL ^{Frage} .	cDNA-Bank	Dualsystems Biotech AG

5.6.9 pGAD424

Der Vektor pGAD424 wird für Hefe-2-Hybrid Tests in Hefen verwendet (Clontech Laboratories, USA). Der Vektor ist 6659 bp groß und ermöglicht eine C-terminale Fusion des Zielproteins an die GAL4-Aktivator-domäne. Die Expression des Fusionsgens wird in Hefen von dem konstitutiv aktiven ADH1-Promotor reguliert, der ADH1-Terminator sorgt für eine erfolgreiche Termination der Transkription. Zudem beinhaltet das GAL4-Fusionsprotein ein Kernlokalisationssignal. Der Vektor enthält eine Ampicillinresistenz (Amp^R) zur Selektion in Bakterien (*E. coli* Stamm DH5 α) und einen LEU2-Marker, der auxotrophen Hefestämmen (HF7c) das Wachstum auf selektivem Medium ohne Leucin ermöglicht. Alle verwendeten Konstrukte, die auf dem pGAD424 Vektor basieren, sind in der Tabelle 5.8 aufgelistet.

Tabelle 5.8 Verwendete Plasmide basierend auf pGAD424. Für die Klonierung verwendete Restriktionsschnittstellen sowie Bezugsquellen sind mit angegeben.

Name	Klonierung	Quelle
pGAD424::Z203L	<i>Bam</i> HI// <i>Sal</i> I	Lindner
pGAD424::Z292L	<i>Sal</i> I/ <i>Sma</i> I	[Stark 2014]
pGAD424::A481L	<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I	Lindner
pGAD424::AtENO2	<i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I	Lindner
pGAD424::AtENOc	<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I	Lindner
pGAD424::AtACX3	<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I	Lindner
pGAD424::CrPFL	<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I	Pfitzner
pGAD424::Z339L	<i>Sal</i> I/ <i>Eco</i> RI	Lindner
pGAD424::A039L	<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I	Lindner
pGAD424::AtSKP1	<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I	Lindner
pGAD424::AtCul1	<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I	Lindner
pGAD424::AtCul3	<i>Mfe</i> I/ <i>Sma</i> I	Pfitzner
pGAD424::AtCul4	<i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I	Lindner
pGAD424::AtGRH1	<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I	[Witte 2014]
pGAD424::CrGBF	<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I	Pfitzner
pGAD424::CvGBF BD	<i>Sma</i> I/ <i>Sac</i> I	Pfitzner
pGAD424::AtGBF1	<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I	Pfitzner
pGAD424::CREB3L3	<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I	Lindner
pGAD424::AtNPR1	<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I	Pfitzner
pGAD424::NtTGA1a		Pfitzner
pGAD424::AtTGA6		Pfitzner

5.6.10 pPR3-N

Der **pPR3-N** Vektor ist ein Teil des DUALmembrane System zur Untersuchung der Protein-Protein Interaktionen (Split-Ubiquitin Interaktionstest) in Hefen an denen Membranproteine beteiligt sind. Der Vektor wurde von der Firma Dualsystems Biotech mit einer integrierten *Arabidopsis thaliana* cDNA-Bank geliefert. Er beinhaltet die N-terminale Hälfte des Hefe-Ubiquitins (NubG) welche bei Expression eine N-terminale Fusion mit dem Protein von Interesse bildet. Der Vektor enthält zudem eine Ampicillinresistenz (Amp^R)

zur Selektion in Bakterien (DH5 α) und einen TRP1-Marker, der auxotrophen Hefestämmen (NMY51) das Wachstum auf selektivem Medium ohne Tryptophan ermöglicht.

5.6.11 pUC18

Der pUC18 Vektor ist ein 2686 bp großer, mit hoher Kopienzahl replizierender Klonierungsvektor. Die multiple Klonierungsstelle liegt innerhalb der codierenden Region für das α -Fragment der β -Galaktosidase (*LacZ* α) und ermöglicht eine Blau/Weiß-Selektion der rekombinanten Bakterienklone in entsprechenden Bakterienzellen (Komplementation des *LacZ*-Gens, DH5 α). Der Vektor enthält zudem eine Ampicillinresistenz (Amp^R).

5.6.12 pUC35S

Der pUC35S Vektor ist ein modifizierter pUC18 Vektor und wurde für die Genexpression in Protoplasten von *N. benthamiana* optimiert. Der Vektor wurde um eine Genexpressions-Kaskade erweitert. So befindet sich innerhalb der MCS des pUC18 Vektors, ein 35S-RNA-Promotor des CaMV-Virus (1,5 kb; *Hind*III/*Bam*HI) und ein Poly(A)-Signal des Nopalinsynthasegens, der NOS-Terminator (253 bp, *Sac*I/*Eco*RI). Der so modifizierte Vektor erlaubt eine konstante Expression des Gen (stromabwärts des 35S-Promotors). Alle verwendeten Konstrukte, die auf dem pUC35S Vektor basieren, sind in der Tabelle 5.9 aufgelistet.

Tabelle 5.9 Verwendete Plasmide basierend auf pUC35S. Für die Klonierung verwendete Restriktionsschnittstellen sowie Bezugsquellen sind angegeben.

Name	Klonierung	Quelle
pUC35S::AtGBF1	<i>Sma</i> I/ <i>Sac</i> I	Pfitzner
pUC35S::Z174L	<i>Bam</i> HI/ <i>Ecl</i> 136II	[Bluthardt 2020]
pUC35S::CvGBF BD	<i>Sma</i> I/ <i>Sac</i> I	[Wucherer 2018]
pUC35S::Z765R	<i>Sma</i> I/ <i>Ecl</i> 136II	[Bluthardt 2020]

5.6.13 pUC18-GUS

Der **pUC18-GUS** ist ein modifizierter pUC18 Vektor, der für die Analyse der Promotoraktivität in Protoplasten von *N. benthamiana* optimiert wurde. In der MCS des pUC18 Vektors befindet sich das *uidA*-Reporter gen (*Bam*HI/*Sac*I) und ein Poly(A)-Signal des Nopalinsynthasegens, der sogenannte NOS-Terminator (253 bp, *Sac*I/*Eco*RI). Der Vektor enthält keinen eigenen Promotor zur Expression des *uidA*-Gens. Alle verwendeten Konstrukte, die auf dem pUC18-GUS Vektor basieren, sind in der Tabelle 5.10 aufgelistet.

Tabelle 5.10 Verwendete Plasmide basierend auf pUC18-GUS. Für die Klonierung verwendete Restriktionsschnittstellen sowie Bezugsquellen sind angegeben.

Name	Klonierung	Quelle
pUC18-GUS::proZ063L	<i>Bam</i> HI/ <i>Sma</i> I	[Wahl 2019]
pUC18-GUS::proZ134L	<i>Pst</i> I/ <i>Sma</i> I	[Sperling 2008]
pUC18-GUS::proZ174L	<i>Hind</i> III/ <i>Sma</i> I	[Wucherer 2018]
pUC18-GUS::proZ174L ^{wt}	<i>Hind</i> III/ <i>Sma</i> I	Lindner
pUC18-GUS::proZ174L ^{del}	<i>Hind</i> III/ <i>Sma</i> I	Lindner
pUC18-GUS::proZ280L	<i>Pst</i> I/ <i>Sma</i> I	[Sperling 2008]
pUC18-GUS::proZ326R	<i>Hind</i> III/ <i>Sma</i> I	[Wucherer 2018]
pUC18-GUS::proZ765R	<i>Bam</i> HI/ <i>Sma</i> I	[Wahl 2019]
pUC18-GUS::proZ765R ^{wt}	<i>Hind</i> III/ <i>Sma</i> I	[Bluthardt 2020]
pUC18-GUS::proZ765R ^{del}	<i>Hind</i> III/ <i>Sma</i> I	Lindner
pUC18-GUS::proZ798L	<i>Hind</i> III/ <i>Sma</i> I	[Sperling 2008]
pUC18-GUS::proZ798L ^{wt}	<i>Hind</i> III/ <i>Sma</i> I	Pfitzner
pUC18-GUS::proZ798L ^{A-66G}	<i>Hind</i> III/ <i>Sma</i> I	Pfitzner
pUC18-GUS::35S	<i>Hind</i> III/ <i>Sma</i> I	Pfitzner

5.6.14 pBIN19 und pTAK35S

Der binäre **pBIN19** Vektor wurde zur stabilen Integration der ausgewählten Gene in das Pflanzengenom mit Hilfe von Agrobakterien verwendet. Er enthält eine modifizierte T-DNA aus dem Ti-Plasmid von *A. tumefaciens*, die von *left border* (LB) und *right border* (RB) flankiert wird und dadurch den Einbau des flankierten Bereichs in das Pflanzengenom ermöglicht. Der flankierte Bereich umfasst die Kanamycinresistenz des Vektors sowie dessen MCS. Der Vektor enthält neben der Kanamycinresistenz (Neo^R, Kan^R) zur Selektion in *E. coli* (DH5α) und Pflanzen (*N. benthamiana*, *N. tabacum*), eine Tetracyclinresistenz (Tet^R) zur Selektion in Agrobakterien (*A. tumefaciens* LBA4404 und GV3101). Der **pTAK35S** ist ein modifizierter pBIN19 Vektor, der um eine weitere Genexpressions-Kaskade erweitert wurde. Innerhalb der MCS befindet sich ein 35S-RNA-Promotor des CaMV-Virus (1,5 kb; *Hind*III/*Bam*HI) und ein Poly(A) Signal des Nopalinsynthasegens, der NOS-Terminator (253 bp, *Sac*I/*Eco*RI). Der **pBIN61** Vektor wurde lediglich als Hilfsplasmid zur Minderung der Pflanzenabwehr (RNA-Silencing) verwendet und dient der Expression des p19 *silencing suppressors*. Der Vektor ist 13.476 bp groß und, wie auch pBIN19, ein binärer Vektor zur Genexpression in Pflanzen. Er verfügt über gleiche Resistenzen wie der pBIN19 Vektor. Alle verwendeten Konstrukte, die auf dem pBIN19 sowie dem pBIN61 Vektor basieren, sind in der Tabelle 5.11 aufgelistet.

Tabelle 5.11 Verwendete Plasmide basierend auf pBIN19. Für die Klonierung verwendete Restriktionsschnittstellen, verwendeter Agrobakterienstamm und die Bezugsquellen sind angegeben.

Name	Stamm	Klonierung	Quelle
pTAK35S::proZ798L	LBA4404	<i>Hind</i> III/ <i>Eco</i> RI	Pfitzner
pTAK35S::GST	GV3101	<i>Bam</i> HI/ <i>Sac</i> I	Pfitzner
pTAK35S::GST-Z203L ^{wt}	GV3101	<i>Bam</i> HI/ <i>Sac</i> I	Pfitzner
pTAK35S::GST-Z203L ^{del}	GV3101	<i>Bam</i> HI/ <i>Sac</i> I	Pfitzner
pTAK35S::CxA-GFP	LBA4404	<i>Pml</i> I/ <i>Not</i> I	[Tyler 2015]
pTAK35S::CxA-GFP-Z203L	LBA4404	<i>Pml</i> I/ <i>Sal</i> I	[Tyler 2015]
pBIN61::p19	GV3101	<i>Bam</i> HI/ <i>Sac</i> I	Pfitzner

5.6.15 pARG7

Der pARG7 Vektor basiert auf dem pUC18 und dem pCB740 Vektor und wurde modifiziert um Promotoraktivität in den Algen analysieren zu können. Die *ARG7*-Genexpressionskaskade (5'-UTR-*ARG7*-3'-UTR) aus dem pCB740 (*Bam*HI/*Hind*III) wurde in die MCS von pUC18 Vektor eingesetzt. Somit ist eine Expression von *ARG7* in den *C. reinhardtii* zur Komplementation des mutanten *ARG7*-Gens möglich. Der Vektor ist 11658 bp groß und enthält zudem eine Ampicillinresistenz (Amp^R) zur Selektion in Bakterien (DH5 α). Alle verwendeten Konstrukte, die auf dem pARG7 Vektor basieren, sind in der Tabelle 5.12 aufgelistet.

Tabelle 5.12 Verwendete Plasmide basierend auf pARG7. Für die Klonierung verwendete Restriktionsschnittstellen sowie Bezugsquellen sind angegeben.

Name	Klonierung	Quelle
pARG7::0	<i>Sal</i> I/ <i>Sal</i> I	Pfitzner
pARG7::proZ063L	<i>Hind</i> III/ <i>Psi</i> I	Lindner
pARG7::proZ174L	<i>Hind</i> III/ <i>Psi</i> I	[Krix 2020]
pARG7::proZ174L ^{wt}	<i>Hind</i> III/ <i>Psi</i> I	Lindner
pARG7::proZ174L ^{del}	<i>Hind</i> III/ <i>Psi</i> I	Lindner
pARG7::proZ280L	<i>Hind</i> III/ <i>Psi</i> I	Pfitzner
pARG7::proZ326R	<i>Hind</i> III/ <i>Psi</i> I	Lindner
pARG7::proZ765R	<i>Hind</i> III/ <i>Psi</i> I	Lindner
pARG7::proZ765R ^{wt}	<i>Hind</i> III/ <i>Psi</i> I	Lindner
pARG7::proZ765R ^{del}	<i>Hind</i> III/ <i>Psi</i> I	Lindner
pARG7::proZ798L	<i>Hind</i> III/ <i>Psi</i> I	Pfitzner
pARG7::proZ798L ^{wt}	<i>Hind</i> III/ <i>Psi</i> I	Pfitzner
pARG7::proZ798L ^{A-66G}	<i>Hind</i> III/ <i>Psi</i> I	Pfitzner
pARG7::35S	<i>Hind</i> III/ <i>Psi</i> I	[Stapf 2019]
pARG7::proARG7	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	Pfitzner

5.6.16 pOPT-mVenus-Paro

Der pOPT-mVenus-Paro (pOPT) Vektor ist für die Genexpression in *C. reinhardtii* Algen optimiert. Unter der Kontrolle eines starken HSP70/RBCS-Promotors wird das Reporter-gen *mVenus* exprimiert. Das Protein von Interesse wird als eine C-terminale Fusion von mVenus synthetisiert und mit einem Strep-Tag versehen. Der Vektor ist 6704 bp groß und enthält eine Ampicillin-resistenz (Amp^R) zur Selektion in *E. coli* (DH5 α) sowie eine Paromomycin-resistenz (*aphIII*) zur Selektion in Algen (*C. reinhardtii*). Alle verwendeten Konstrukte, die auf dem pOPT Vektor basieren, sind in der Tabelle 5.13 aufgelistet.

Tabelle 5.13 Verwendete Plasmide basierend auf pOPT. Für die Klonierung verwendete Restriktionsschnittstellen sowie Bezugsquellen sind angegeben.

Name	Klonierung	Quelle
pOPT::Z174L	<i>EcoRI/EcoRV</i>	[Krix 2020]

5.6.17 pEYFP-Mem

Der pEYFP-Mem ermöglicht die Expression der eYFP-Fusionsproteine in humanen Zelllinien und ist 4793 bp groß. Der Vektor codiert für eine erweiterte Variante des YFP, die zusätzlich 20 N-terminale Aminosäuren des Neuromodulins enthält. So verändertes eYFP-Mem Protein wird in die Zellmembranen eingebaut. Die Expression des *eYFP-Mem*-Gens wird von dem CMV-Promotor gesteuert (sehr frühe Promotor des Cytomegalovirus), dessen Aktivität zusätzlich durch den CMV-*Enhancer* verstärkt wird. Der Vektor enthält eine Kanamycinresistenz (Kan^R) zur Selektion in *E. coli* (DH5 α), sowie eine Neomycinresistenz (Neo^R) zur Selektion in humanen Zellen (HEK293). Alle Konstrukte, die auf dem pEYFP-Mem Vektor basieren, sind in der Tabelle 5.14 aufgelistet.

Tabelle 5.14 Verwendete Plasmide basierend auf pEYFP-Mem. Für die Klonierung verwendete Restriktionsschnittstellen sowie Bezugsquellen sind angegeben.

Name	Klonierung	Quelle
pEYFP-MEM::proZ280L	<i>NdeI/HindIII</i>	[Nowak 2019]
pEYFP-MEM::proZ798L	<i>NdeI/HindIII</i>	[Nowak 2019]

5.7 Synthetische Oligonukleotide

5.7.1 Oligonukleotide – Sequenzierung

Die zur Sequenzierung von Gensequenzen verwendeten Oligonukleotide werden von den Firmen Eurofins MWG Operon (Ebersberg) und Microsynth Seqlab (Belgach) zur Verfügung gestellt (Tabelle 5.15) oder selbständig entworfen und von der Firma Invitrogen bezogen (Tabelle 5.16).

Tabelle 5.15 Namen und Sequenzen der Oligonukleotide von Firmen Eurofins MWG Operon und Microsynth Seqlab.

Name	Sequenz	Name	Sequenz
M13 (-49)	GTAAAACGACGGCCAGT	Gal4-BD	TCATCGGAAGAGAGTAG
M13r	CAGGAAACAGCTATGAC	malE	GGTCGTCAGACTGTCGATG
M13	TGTAAAACGACGGCCAG	GEXfwd	ATAGCATGGCCTTTGCAGG
Gal4-AD	TACCACTACAATGGATG	Gex3-rev	GCTTACAGACAAGCTGTGAC

Tabelle 5.16 Liste der Oligonukleotide, die zur Sequenzierung und bei Colony Screen verwendet wurden. Name des Oligonukleotids, DNA-Sequenz und die *annealing* Temperatur (T.) [°C] sind angegeben.

Name	Sequenz	T.
pUC18 GUS seq	GTTTCTACAGGACGTAACAT	51
pGAD-HAfw	TCATATGAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	55
pGAD-HArev	ATCCCGTATCGATGCCACCCCTCTAGA	58
5 ARG7 promotor	GAGTGCGAGAACGCGCAGC	52
3 ARG7 promotor	CCATGCTACATCATAACGAGCTCG	52
5 ARG	TGACGCGACGTCGCACTTCGATCCT	58
3 ARG	CTTCTTAGTGTTGTCAGCAGGCGCAGC	58
pOPT2 seq5	GCTGTACAAGATCGAGGGCAGG	53
pOPT2 seq3	ACGCGTATTTAAATTACGTACCTGCAG	52
3Seq pOPT in mVenus	GCTCACCCCTGCCCTCGAT	50
5 mpZ174L cs	GTCATTTGTGTTTGTGTCATTTGACCC	49
5 mpZ765R cs	GTCATTTGACCCAGGCGAC	48
5 mpZ798L cs	CAGTTATATTGACACACCGGGTA	48
3pRW953 LacZ seq	ATAGGTTACGTTGGTGTAGATGGG	51
3pRW953 TRP seq	CTACTCAGTGCAGCTTCACAGAA	50
5 GFP <i>Xba</i> I <i>Bam</i> HI	TCTAGAGGATCCATGGTGTGAGCAAGGGCGAGGAG	63
3 GFP <i>Sac</i> I	GAGCTCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC	59
5-GST seq	ATGTCCCCTATACTAGGTTATTGG	54
3-GST seq	TTTTGGAGGATGGTCGCCAC	59

5.7.2 Oligonukleotide – Amplifikation der DNA-Sequenzen

Alle Oligonukleotide, die zur Amplifikation bestimmter DNA-Sequenzen verwendet wurden, wurden selbst entworfen oder stammen aus dem Laborbestand. Die Oligonukleotide, die zur Amplifikation der Proteine benutzt wurden, die mit dem viralen Ubiquitin-System in Zusammenhang stehen, sind in Tabelle 5.17 aufgelistet.

Tabelle 5.17 Liste der Oligonukleotide, die zur Amplifikation der Ubiquitin-System bezogenen Gensequenzen verwendet wurden. Name des Oligonukleotids, DNA-Sequenz und die *annealing* Temperatur (T.) [°C] sind angegeben.

Name	Sequenz	T.
5 <i>Bam</i> HI203	GGGATCCGAGCTATGATGCAGATATTCGCTAAG	64
3 <i>Sac</i> I <i>Sal</i> I203	AGAGCTCGTCGACTTATTTTCCTCCGCGAAG	66
5 A039L <i>Sma</i> I <i>Bam</i> HI	ACCCGGGGGATCCGTATGAGTATCGTATTTATTACAT	60
3 A039L <i>Sal</i> I <i>Sac</i> I	AGAGCTCGTCGACTTAATAATCTTCAATTGGCACCAA	58
5 A481L <i>Sma</i> I <i>Bam</i> HI	ACCCGGGGGATCCGTATGGAAATTATTAATAAATAACG	59
3 A481L <i>Sal</i> I <i>Sac</i> I	AGAGCTCGTCGACTTATTCGTGTTCCGGTATTGTTAAT	58
5 GRR1fbox <i>Bam</i> X <i>ba</i>	GGGATCCAATCTAGATCAAATCAAACATATGTACG	56
3 GRR1fbox <i>Sal</i> I	ACGTGACCTAGTCCACCAACAAATGAAAAATT	54
5 Z292L <i>Nco</i> I pBT3N	ACCATGGTTAAAGAGACTCCGAAATTTGTGCATT	65
3 Z292L <i>Not</i> I pBT3N	AGCGGCCGCATGTGTTCCGCAGAGCGCATG	56
5AtCul1 <i>Bam</i> H12	GGGATCCTGATGGAGCGCAAGACTATT	56
3AtCul1 <i>Sal</i> I	GGGATCCTGATGCAGACTGGAATTA	53
5baz339	GGGATCCTAGGAATGACCAACATGGTTACC	63
3z339 <i>Eco</i> Sal	GGAATTCGTGACTTATACGTCTTTCGAACG	62
5z339L 214 SKP1	GGGATCCTAGGATCATTCGAAACGAACTTTT	61
3z339L BTB 291	GGAATTCGTGACTTAAATGTTGAGATAATTTGC	60
5 AtENO2	CGAATTCCCGGGCATGGCCTACTATCACCGTTGTAA	63
3 AtENO2	GCTCGAGTCGACTTTAGTAGGGTTCCAACAGGTTTGC	63
5 AtACX3 <i>Bam</i> HI	GGGATCCGCTCTAGAATGTCTGGATAATCGTGCCTC	63
3 AtAXC3 <i>Sal</i> I	CCGTGACCTAAACTGAAGACCAAGCATT	56
5 AtENOc <i>Bam</i> HI	GGGATCCGCTCTAGAATGTCTGTGCAAGAGTATTTA	59
3 AtENOc <i>Sal</i> I	CCGTGACTTAGAGAGATAGTTTCCAATC	56
5enolasechla	CGGATCCAGATGTCCGTCCAGGAGTAC	59
3enolasechla	GGTCGACGAGCTCTTACCAGCCGATGTGG	62
5pfchla	CAGATCTCTATGTTAACACCCTTAAGCTATCC	55
3pfchla	GGTCGACGATATCTTACATGGTGTCTGGAAGG	61

Die Oligonukleotide die zur Amplifikation der Promotorregionen verwendet wurden, befinden sich in der Tabelle 5.18. Die Oligonukleotide die zur Amplifikation der Transkriptionsfaktoren verwendet wurden, befinden sich in der Tabelle 5.19.

Tabelle 5.18 Liste der Oligonukleotide, die zur Amplifikation der DNA-Sequenzen der Promotorregionen verwendet wurden. Name des Oligonukleotids, DNA-Sequenz und die *annealing* Temperatur (T.) [°C] sind angegeben.

Name	Sequenz	T.
5Z063P	AGGATCCGGTACCACATACTGCAAGTG	56
3Z063P	ACCCGGGTTTACGTAAC TTTGTATA	49
5 pZ134L <i>Bam</i> HI <i>Kpn</i> I	TGGATCCGGTACCCTGCTTCTAAACCGATGACTT	61
3 pZ134L <i>Sma</i> I	ACCCGGGTTTCACAAAGAACTGCAAGTAAGTT	57
5 pZ174L <i>Bam</i> HI <i>Kpn</i> I	TGGATCCGGTACCATAGTGAAAGGCGCAGTTGCC	62
3 pZ174L <i>Sma</i> I	ACCCGGGGGTTGGGTGTTGGGAATTTGC	63
5 pZ280L <i>Bam</i> HI <i>Kpn</i> I	TGGATCCGGTACCGGAATTCGCAGAGCTCATCAG	65
3 pZ280L <i>Sma</i> I	ACCCGGGGTCTTATAACTCTATAAAAATATTTTTTT	52
5 prZ280L <i>Nde</i> I <i>Xba</i> I	CATATGTCTAGAGCAGAGCTCATCAGGGAAGTC	59
3 prZ280L <i>Bgl</i> 2	AAGATCTGTCTTATAACTCTATAAAAATATTTTTTTT	48
5 pZ326R <i>Bam</i> HI <i>Kpn</i> I	TGGATCCGGTACCACATCGGATGCAAACCAGGTG	63
3 pZ326R <i>Sma</i> I	ACCCGGGTCCGAAAAGTGGCTAGAGCG	61
5Z765P	TGGATCCGGTACCTGCACACAGGGTTCAACT	61
3Z765P	ACCCGGGAATCGGAAGTTGTGGGCAGA	59
5 pZ798L <i>Bam</i> HI <i>Kpn</i> I	TGGATCCGGTACCGTGGCAGGGAGAAGGTGAG	64
3 pZ798L <i>Sma</i> I	ACCCGGGGATAATTTTACAGAACTGGTGTCTGAAC	59
5 prZ798L <i>Nde</i> I <i>Xba</i> I	CATATGTCTAGAGTGGCAGGGAGAAGGTGA	58
3 prZ798L <i>Bgl</i> 2	AAGATCTGATAATTTTACAGAACTGGTG	49
5 35S <i>Bam</i> HI/ <i>Kpn</i> I	TGGATCCGGTACCTGAGACTTTTCAACAAAGGGT	58
3 35S <i>Sma</i> I	ACCCGGGTGTTCTCTCAAATGAAATGAAC	57

Tabelle 5.19 Liste der Oligonukleotide, die zur Amplifikation der Gensequenzen von Transkriptionsfaktoren verwendet wurden. Name des Oligonukleotids, DNA-Sequenz und die *annealing* Temperatur (T.) [°C] sind angegeben.

Name	Sequenz	T.
z174orf5	GGGATCCATGGCCATCAACTACT	52
z174orf3	GCCCGGGAGCCATAAACTTCCG	57
z765orf5	GGGATCCATGGCTAAGCTCACCA	54
z765orf3	CCCCGGGAAGCATTGCTATTCC	53
5 Z765R pOPT2 f. <i>EcoRI</i>	GAATTCATGGCTAAGCTCACCACCTC	54
3 Z765R pOPT2 f. <i>SmaI</i>	CCCGGGCTAAGCATTGCTATTCCAAAACCCAGT	61
5 CREB3L3 <i>BamHI</i>	AGGATCCACATGAATACGGATTTAGCTGCTGGA	58
3 CREB3L3 <i>SalI EcoRV</i>	AGATATCGTCGACTCACAGCTCGTCTCCCGCCG	64
5ChlaGBoxB	AGGATCCCAATGAACGGAACTCAGCCG	58
3ChlaGBoxSI	AGTCGACTTACGATTCGGTGGGGCCAG	59

5.7.3 Oligonukleotide – Minimalpromotoren

Um die Kurzvarianten der viralen Promotoren und deren Mutanten zu erstellen, wurden spezielle Oligonukleotide entworfen, die gezielte Mutationen enthielten. Diese Oligonukleotide wurden verwendet, um die mutanten Kurzvarianten des Z174L-Promotors (Tabelle 5.20), Promotors von Z765R- (Tabelle 5.21) und Z798L-Promotors (Tabelle 5.22) zu klonieren.

Tabelle 5.20 Oligonukleotide zur Erstellung mutanter Gensequenzen von proZ174L-Promotor. Name des Oligonukleotids und die DNA-Sequenz sind angegeben.

Name	Sequenz
5 mini-proZ174L wt	GAGCTCAAGCTTGTTCTGTGATGACGTGGCATT GTCATTTGTGTTTGTGATTTGACCCCGAGTCAG CTTGTGTATAAAAGCCTGCCTCCCGGGCATATG
3 mini-proZ174L wt	CATATGCCCGGGAGGCAGGCTTTTATACACAAG CTGACTCGGGGTCAAATGACAAACACAAATGAC AATGCCACGTCATCACAGAACAAGCTTGAGCTC
5 mini-proZ174L del	GAGCTCAAGCTTGTTCTGTGACATTGTCATTTG TGTTTGTGATTTGACCCCGAGTCAGCTTGTGTA TAAAAGCCTGCCTCCCGGGCATATG
3 mini-proZ174L del	CATATGCCCGGGAGGCAGGCTTTTATACACAAG CTGACTCGGGGTCAAATGACAAACACAAATGAC AATGTCACAGAACAAGCTTGAGCTC

Tabelle 5.21 Oligonukleotide zur Erstellung mutanter Gensequenzen von proZ765R-Promotor. Name des Oligonukleotids und die DNA-Sequenz sind angegeben.

Name	Sequenz
5 80bp pZ765R	GAGCTCTTCGAATGCTGACGTGGTTGTCATTTG CTGACGTGGTTGTCATTTGACCCAGGCGACCAA TTGCGTATAAATCCCAGGACCATATG
3 80bp pZ765R	CATATGGTCCTGGGATTTATACGCAATTGGTGC CCTGGGTCAAATGACAACCACGTCAGCAAATGA CAACCACGTCAGCATTCTGAAGAGCTC
5 mpZ765R dmdm KL	GAGCTCAAGCTTTTCGAATGCTTGTTCATTTGCT TGTCATTTGACCCAGGCGACCAATTGCGTATAA ATCCCAGGACCCCGGGCATATG
3 mpZ765R dmdm KL	CATATGCCCCGGGTCTGGGATTTATACGCAAT TGGTCGCCTGGGTCAAATGACAAGCAAATGACA AGCATTTCGAAAAGCTTGAGCTC

Tabelle 5.22 Oligonukleotide zur Erstellung mutanter Gensequenzen von proZ798L-Promotor. Name des Oligonukleotids und die DNA-Sequenz sind angegeben.

Name	Sequenz
polproswt	AAGCTTGGAAATTGCCAAGAGGGAATGACGTGG CAGTTATATTGACACACCCGGTATATAAGGACG TTACGACACCAGTTCTGTAAAATTATCCCGGG
polproaswt	CCCGGATAATTTTACAGAACTGGTGTGCGTAAC GTCCTTATATAACCCGGTGTGTCAATATAACTGC CACGTCATTCCCTCTTGGCAATTTCCAAGCTT
polprosmut	AAGCTTGGAAATTGCCAAGAGGGAATGGCGTGG CAGTTATATTGACACACCCGGTATATAAGGACG TTACGACACCAGTTCTGTAAAATTATCCCGGG
polproasmut	CCCGGATAATTTTACAGAACTGGTGTGCGTAAC GTCCTTATATAACCCGGTGTGTCAATATAACTGC CACGCCATTCCCTCTTGGCAATTTCCAAGCTT

5.8 Größenmarker

DNA-Größenmarker

Gene Ruler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific: 10000, 8000, **6000**, 5000, 4000, 3500, **3000**, 2500, 2000, 1500, **1000**, 750, 500, 250 bp.

Protein-Molekulargewichtsmarker

PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific: 250, 130, 100, **70**, 55, 35, **25**, 15, **10** kDa.

Color Prestained Protein Standard, Broad Range, New England Biolabs: 245, 190, 135, 100, **80**, 58, 46, 32, **25**, 22, 17, 11 kDa.

PageRuler™ Unstained Protein Ladder, Thermo Scientific: 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, **50**, 40, 30, 25, 20, 15, 10 kDa.

5.9 Antiseren

anti-VP55 rabbit polyclonal; Verdünnung 1:500; Verwendung: Detektion von VP50 Kapsidprotein von ATCV-1

anti-GFP (FL) rabbit polyclonal IgG, sc-8334 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg); Verdünnung 1:1000 ($250 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$); Verwendung: Detektion von GFP, eYFP und mVenus

anti-GST Serum rabbit polyclonal, 3994.1 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe); Verdünnung 1:1000; Verwendung: Nachweis von GST

anti-Ub (FL76) rabbit polyclonal, sc-9133 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg); Verdünnung 1:500 ($200 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$); Verwendung: Nachweis von Ubiquitin

anti-Z292L one rabbit SuperFast serum antibody (Davids Biotechnologie, Inc, Heidelberg); Verdünnung 1:1000; Verwendung: Nachweis von Z292L

anti-Z339L one rabbit SuperFast serum antibody (Davids Biotechnologie, Inc, Heidelberg); Verdünnung 1:1000; Verwendung: Nachweis von Z339L

***α*-PVX** one rabbit SuperFast serum antibody (Davids Biotechnologie, Inc, Heidelberg); Verdünnung 1:2500; Verwendung: Nachweis des Hüllproteins von Kartoffelvirus X

***α*-rabbit IgG-HRP** (Rockland Immunochemicals, Inc. Limerick); Verdünnung 1:5000; Verwendung: Nachweis von primären Antikörper aus Kaninchen (rabbit)

5.10 Software

Tabelle 5.23 Verwendete Software

Verwendung	Software
Tabellenkalkulation	Microsoft Excel, GraphPad Prism 8
Bildbearbeitung	GIMP 2.10, Microsoft PowerPoint
Erstellung von Diagrammen	GraphPad Prism 8
Darstellen der DNA-Sequenzen	SnapGene Viewer
Vergleich der DNA-Sequenzen	BLAST Algorithmus [Altschul <i>et al.</i> , 1990]
Darstellen der Proteinsequenzen	Clustal Omega [Sievers <i>et al.</i> , 2011]
Vergleich der Proteinsequenzen	Clustal Omega, HHpred [Zimmermann <i>et al.</i> , 2018]
Primer Design, Planung von Klonierungen	Serial Cloner, SnapGene Viewer
Dokumentation	L ^A T _E X, Vorlage – DissOnlineLatex [Törner <i>et al.</i> , 2011]

Kapitel 6

Methoden

6.1 Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Methoden wurden überwiegend nach Sambrook durchgeführt [Sambrook *et al.*, 1989]. Die DNA-Isolation aus dem pflanzlichen Material wurde nach Rogers durchgeführt [Rogers *et al.*, 1989].

6.1.1 Polymerasekettenreaktion

<u>Ansatz</u>		<u>Programm</u>		
≥ 10 µl	DNA	1.	120 s	94 °C
2 µl	10× PCR-Puffer mit MgCl ₂	2.	30 s	94 °C
0,5 µl	10 mM dNTPs	3.	30 s	var.
0,5 µl	10 mM 5'-Primer	4.	var.	72 °C
0,5 µl	10 mM 3'-Primer	5.	60 s	72 °C
0,2 µl	DNA-Polymerase	35 Zyklen	(2 – 4)	
ad. 20 µl	H ₂ O			

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurde zur Amplifizierung definierter DNA-Fragmente verwendet [Saiki *et al.*, 1988]. Die Reaktionen wurden im programmierbaren Thermoblock mit Peltier-Element und beheizbaren Deckel durchgeführt. Für die Reaktion wurde das PCR-Standardprogramm verwendet, die benötigten Oligonukleotide und deren Anlagerungstemperatur sind den Tabellen auf den Seiten 163 – 165 zu entnehmen. Die Polymerisationszeit wurde an die Länge der DNA-Fragmente angepasst.

Verwendet wurde eine Taq-DNA-Polymerase (Laborbestand) oder eine Repro-Fast DNA-Polymerase (Genaxxon BioScience).

6.1.2 Sequenzspezifische Restriktion von DNA

Aufgereinigte DNA wurde durch sequenzspezifische Restriktionsendonukleasen nach Angaben der Hersteller mit empfohlenen Puffern und Reaktionsbedingungen geschnitten. 1 – 2 µg DNA wurden eingesetzt und für mindestens 1 h bei entsprechender Temperatur inkubiert. Falls erforderlich wurde das Enzym inaktiviert.

6.1.3 Ligation

Die Ligation der DNA-Fragmente erfolgte nach Angaben des Herstellers mit Hilfe der T4-DNA-Ligase. Die Ligationen wurden so angesetzt, dass ein 5-facher Überschuss an Insert-DNA gegenüber der Vektor-DNA vorlag. Die linearisierte Vektor-DNA wurde mit dem Insert, T4-DNA-Ligase und Puffer nach Herstellerangaben versetzt und bei 37 °C inkubiert. Die Ligationsansätze wurden direkt zur Transformation von *E. coli* verwendet.

6.1.4 Transformation von Bakterien

6.1.4.1 Anzucht von Bakterien

LB-Medium pH 7,5

10 $\frac{g}{l}$ Pepton

5 $\frac{g}{l}$ Hefeextrakt

10 $\frac{g}{l}$ NaCl

ggf. 15 $\frac{g}{l}$ Microagar (festes Medium)

TB-Medium

20 $\frac{g}{l}$ Pepton

24 $\frac{g}{l}$ Hefeextrakt

4 $\frac{ml}{l}$ Glycerin

ad 0,9l H₂O

nach dem Autoklavieren

ad 1l Phosphatpuffer

Phosphatpuffer

170 mM KH₂PO₄

720 mM K₂HPO₄

Das Luria-Bertani (LB) Medium wurde für die Kultivierung aller Bakterienstämme verwendet, in besonderen Fällen auch für Anzucht von Agrobakterien.

Das *Terrific Broth* (TB) Medium wurde ausschließlich zur Kultivierung des *E. coli* Stamms DH5 α verwendet. Alle *E. coli* Stämme wurden unter ihren Optimalbedingungen in einem Brutschrank bei 37 °C kultiviert. Die Kultivierung im flüssigen Medium erfolgte unter konstantem Schütteln (150 rcf). Für Selektionsmedium wurden Antibiotika in bestimmten Konzentrationen verwendet (siehe Tabelle 6.1).

Tabelle 6.1 Konzentration von Antibiotika im Selektionsmedium

Antibiotikum	Konzentration	Antibiotikum	Konzentration
Ampicillin	50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	Gentamycin	50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$
Kanamycin	50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	Rifampicin	50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$
Nalidixin	10 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$		

6.1.4.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Chemisch kompetente *E. coli* DH5 α

INOUE-Puffer pH 6,7

250 mM KCl

15 mM CaCl₂ · 2 H₂O

10 mM PIPES pH 6,7

55 mM MnCl₂ · 4 H₂O

Die Transformation kompetenter Bakterien basiert auf der Inoue Methode zur Herstellung kompetenter Zellen [Im 2011]. Direkt aus einer Gefrierkultur wurde eine 100 ml Kultur in LB-Medium angezogen. Nachdem die Kultur eine Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,5 erreicht hatte, wurde sie zentrifugiert (10 min, 3000 rcf, 4 °C) und in 16 ml eiskaltem INOUE-Puffer resuspendiert. Nach erneutem zentrifugieren (10 min, 3000 rcf, 4 °C) wurde der Bakterien-Niederschlag in 4 ml eiskaltem INOUE-Puffer resuspendiert und für 10 min bei 4 °C mit 600 μl DMSO versetzt. Die kompetenten Bakterien wurden aliquotiert (je 100 μl) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei –70 °C.

Chemisch kompetente *E. coli* BL21-CodonPlus

Um kompetente BL21-CodonPlus Bakterien zu herstellen, wurde eine 100 ml Kultur in LB-Medium mit Nalidixin angezogen. Nachdem die Kultur eine

Zelldichte von $OD_{600} = 0,6$ erreicht hatte, wurde diese zentrifugiert (10 min, 3000 rcf, 4°C) und in 16 ml eiskaltem 50 mM CaCl_2 resuspendiert. Nach erneutem zentrifugieren (10 min, 3000 rcf, 4°C) wurde der Bakterien-Niederschlag in 4 ml eiskaltem 50 mM CaCl_2 mit 15 % Glycerin resuspendiert. Die kompetenten Bakterien wurden anschließend aliquotiert (je 100 μl) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C .

6.1.4.3 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation wurden 100 μl kompetenter Bakterien (DH5 α , BL21-CodonPlus) auf Eis aufgetaut, mit Plasmid-DNA versetzt (reine Plasmid-DNA oder Ligationansatz) und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 30 s bei 42°C inkubiert und nachfolgend für 2 min auf Eis gekühlt. Die Bakterien wurden mit 900 μl TB-Medium versetzt und für 1 h bei 37°C kultiviert. Die Bakterien wurden zentrifugiert (1 min, 10 000 rcf, RT). Der Bakterien-Niederschlag wurde in 100 μl TB-Medium resuspendiert und auf einer LB-Mediumplatte, mit entsprechenden Antibiotika und Zusätzen verteilt (siehe Blau/Weiß-Selektion). Die transformierten Bakterien wurden unter Optimalbedingungen kultiviert bis einzelne Kolonien sichtbar wurden.

6.1.4.4 Identifizierung positiver Bakterienklone

Blau/Weiß-Selektion

Zusätzlich zur Selektion auf Antibiotika-Resistenzen wurde eine Blau/Weiß-Selektion der mutanten Bakterienklone während der Transformation durchgeführt. Blau/Weiß-Selektion basiert auf der Kombination von einem geeigneten Vektor (z. B.: pBluescript II KS(+), pUC18) und einem geeigneten Bakterienstamm (z. B. DH5 α). Während sich die MCS des Vektors im codierenden Bereich des N-terminalen α -Fragments der β -Galaktosidase befindet, ist das komplementäre C-terminale Fragment des Enzyms im Genom der Bakterien enthalten. Durch Zusatz von IPTG (40 μM im Medium) wurde die Genexpression induziert, als Substrat für die β -Galaktosidase diente X-Gal (40 $\frac{\text{mg}}{\mu\text{l}}$). War die Ligation erfolgreich und das gewünschte Insert wurde in die MCS des Vektor eingesetzt, so konnte keine Komplementation der β -Galaktosidase stattfinden und die Kolonien blieben weiß. Diese wurden dann für weitere Tests verwendet.

Colony Screen

Die ausgewählten Bakterienkolonien nach der Transformation wurden auf eine neue Platte mit Selektivmedium übertragen und bei 37 °C kultiviert. Ein Teil der Kolonien wurde in einem dünnwandigen Reaktionsgefäß in 10 µl H₂O resuspendiert und in einem programmierbaren Thermoblock mit Hilfe von Hitzezufuhr aufgeschlossen (siehe Programm). Anschließend wurde eine PCR mit 10 µl Template-DNA aus den aufgeschlossenen Bakterien durchgeführt.

Programm

5 min	96 °C
90 s	50 °C
90 s	96 °C
1 min	45 °C
1 min	96 °C
1 min	40 °C

6.1.4.5 Herstellung von Gefrierkulturen

Um eine Stammkultur herzustellen, wurden 200 µl steriles Glycerin und 800 µl Bakterienkultur in ein Reaktionsgefäß gegeben, sorgfältig vermischt und bei -70 °C gelagert.

6.1.5 DNA-Isolation

6.1.5.1 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Lösung I

25 mM Tris-HCl pH 8,0
10 mM EDTA pH 8,0
50 mM Glucose
100 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ RNase A

Lösung III

3 M Na-Acetat pH 4,8

Lösung II

200 mM NaOH
1 % SDS

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl pH 8,0
1 mM EDTA pH 8,0

Von einer Bakterienkultur wurden 5 ml in ein Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (1 min, 12 000 rcf, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen und der Zelleniederschlag in 100 µl Lösung I resuspendiert. Es folgte eine Zugabe von 200 µl Lösung II. Die Probe wurde gemischt und 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurden 150 µl eiskalter Lösung III zugegeben, die Probe wurde erneut gemischt und zentrifugiert (10 min, 12 000 rcf, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1 ml 100 % Ethanol versetzt, 10 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert (10 min, 12 000 rcf, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

6.1.5.2 Isolation von Plasmid DNA aus Hefen

SCE-Puffer

1,2 M Sorbit

100 mM Na-Citrat

10 mM EDTA pH 8

SDS-Lösung

2 % SDS

50 mM Tris-HCl pH 8,0

10 mM EDTA pH 8,0

SCE-Puffer mit Lyticase

2 $\frac{\text{U}}{\text{ml}}$ Lyticase

8 % β -Mercaptoethanol

in SCE-Puffer

Die Plasmid-DNA wurde aus 5 ml einer Hefekultur (Selektivmedium) isoliert. Hierfür wurde die Kultur zunächst zentrifugiert (3 min, 5000 rcf, 4 °C), mit H₂O gewaschen, in 200 µl SCE-Puffer mit Lyticase resuspendiert und 40 min bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz wurde mit 200 µl SDS-Puffer versetzt, 10 min bei RT inkubiert und mit 100 µl 5 M Kaliumacetat versetzt. Die Proteinfällung erfolgte bei 4 °C für 40 min. Der Ansatz wurde dann zentrifugiert (10 min, 10 000 rcf, 4 °C). Um die DNA zu fällen, wurde der Überstand mit 400 µl Isoopropanol versetzt und erneut zentrifugiert (10 min, 10 000 rcf, 4 °C). Die ausgefallene Plasmid-DNA wurde getrocknet und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

6.1.5.3 Isolation von genomischer DNA aus Algen oder Pflanzen

DNA-Extraktionspuffer pH 7,5

350 mM Sorbitol

10 mM Tris

5 mM EDTA

Zell-Lysis-Puffer

200 mM Tris

50 mM EDTA

2 M NaCl

2 % CTAB

Mikroprep-Puffer

2,5 Teile DNA-Extraktionspuffer

2,5 Teile Zell-Lysis-Puffer

1 Teil 5 % N-Laurylsarcosin

Zu 50 mg Algen- oder 100 mg Blattmaterial wurden 200 µl frisch angesetzten Mikroprep-Puffer zugegeben und mit einem Kunststoffpistil homogenisiert. Dazu wurden weitere 550 µl Mikroprep-Puffer gegeben und die Probe wurde gut gemischt. Der Ansatz wurde für 2 h bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden 750 µl Chloroform : Isoamylalkohol (24:1) zugegeben, der Ansatz wurde gut gemischt und zentrifugiert (5 min, 10 000 rcf, 4 °C). Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen an kaltem Isopropanol versetzt, durch Invertieren gemischt und zentrifugiert (5 min, 10 000 rcf, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 50 µl TE-Puffer resuspendiert.

6.1.5.4 DNA-Isolation aus Chloroviren

Um die DNA eines Virus freizusetzen wurden die Proben zuerst mit Proteinase K versetzt, welche die Proteine des Kapsids abbaut. Dazu wurde eine Virusprobe wie im Proteinase K Ansatz beschrieben vorbereitet und für mindestens 12 h bei 55 °C inkubiert.

Proteinase K Ansatz

Virusprobe $1,0 \cdot 10^{-8} \frac{\text{pfu}}{\text{ml}}$

0,5 % SDS

20 mM EDTA pH 8,0

150 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Proteinkinase

10 mM Tris-HCl pH 7,5

Nach 12 h wurde die freigesetzte DNA durch Phenolextraktion und Ethanol-fällung gereinigt. Dazu wurde die freigesetzte DNA 10:1 mit 3 M Na-Acetat pH 5,2 versetzt und auf ein günstiges Volumen mit H₂O gebracht. Der Ansatz wurde 2:1 mit Phenol versetzt, gut gemischt und zentrifugiert (2 min, 12 000 rcf, RT). Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 1:1 mit Chloroform : Isoamylalkohol (24:1) versetzt, durch Invertieren gemischt und erneut zentrifugiert (2 min, 12 000 rcf, RT). Die wässrige Phase wurde erneut in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1 ml Ethanol versetzt und für 30 min bei -20 °C gefällt. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert (2 min, 12 000 rcf, 4 °C), der Überstand wurde verworfen, die gefällte DNA mit 70%igen Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10 µl TE-Puffer aufgenommen.

6.1.6 Agarose-Gelelektrophorese

<u>TAE-Puffer</u>	<u>6× DNA-Ladepuffer</u>
40 mM Tris	10 mM Tris-HCl pH 7,5
1 mM EDTA pH 8,0	0,03 % Bromphenolblau
20 mM Essigsäure	60 % Glycerin
	60 mM EDTA pH 8,0

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese wurden die DNA-Fragmente der Molekulargröße nach aufgetrennt. Das vorher aufgekochte und abgekühlte Agarosegel (1 % Agarose in TAE-Puffer) wurde mit Ethidiumbromid (10 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$) versetzt, in eine Gelkammer mit Kamm gegossen und zum Auspolymerisieren stehen gelassen. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit DNA-Ladepuffer versetzt. Zur Bestimmung der Größe wurde ein Größenmarker aufgetragen. Das Auftrennen von DNA-Fragmenten erfolgte in einer Elektrophorese-Aparatur bei 90 – 120 V.

6.1.7 Extraktion der DNA aus dem Gel

Nach der Gelelektrophorese wurde die DNA auf einer UV-Platte sichtbar gemacht. Die gewünschten DNA-Fragmente wurden ausgeschnitten und nach Angaben des Herstellers mit dem Gel Extraktion Mini Prep Kit aufgereinigt.

6.1.8 Modifizierung der DNA-Fragmenten

6.1.8.1 Dephosphorylierung

Zur Dephosphorylierung der DNA wurde die Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) verwendet. Die linearisierte Vektor-DNA wurde mit SAP und SAP-Puffer nach Herstellerangaben versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die SAP bei 65 °C für 15 min inaktiviert.

6.1.8.2 Phosphorylierung

Zur Phosphorylierung der DNA wurde die T4-Polynukleotide Kinase (PNK) eingesetzt. Diese ist in der Lage, DNA-Enden zu phosphorylieren. Hierfür wurde die DNA zusammen mit PNK und PNK-Puffer nach Herstellerangaben 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend für 20 min bei 65 °C inaktiviert.

6.1.8.3 Anhängen der A-Überhänge

Für die Ligation der PCR-Amplifikate mit dem T-Vektor wurden Adenosin-Überhänge benötigt. Diese wurden mit Hilfe der Taq-Polymerase an glatte Enden der DNA generiert. Hierfür wurde das gereinigte PCR-Produkt nach Herstellerangaben mit Taq-Polymerase ($5 \frac{\text{U}}{\mu\text{l}}$), PCR-Puffer mit 15 mM MgCl₂ und dATP (2 mM) versetzt und 25 min bei 72 °C inkubiert.

6.1.8.4 Generieren von glatten Enden

Die T4-DNA-Polymerase wurde benutzt um glatte Enden zu erzeugen. Diese Polymerase katalysiert die DNA-Synthese in 5' → 3' Richtung und besitzt eine Exonuklease-Aktivität in 3' → 5' Richtung. Die 3'-Überhänge wurden entfernt, während die 5'-Überhänge aufgefüllt wurden. Die T4-DNA-Polymerase wurde nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die DNA wurde mit der T4-DNA-Polymerase, Puffer und dNTPs (1 mM) versetzt, bei 11 °C für 20 min inkubiert und bei 75 °C für 10 min inaktiviert.

6.1.9 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration wurde mit Hilfe des Photometers bestimmt. Die zu messende DNA wurde 1:50 mit H₂O verdünnt und in eine UVette[®] überführt.

Die Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet: Konzentration in $\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} = \frac{(\lambda_{260} - \lambda_{320}) \times F}{V}$, wobei λ der Absorption bei der angegebenen Wellenlänge entspricht, F dem Faktor 25 für DNA und V der Verdünnung.

6.1.10 Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA wurde mit Hilfe externer Firmen: Eurofins Genomics (Ebersberg) und Microsynth (Belgach) nach deren Vorgaben vorgenommen. Hierfür verwendete DNA wurde mit dem NucleoSpin[®] Plasmid Kit aufgereinigt.

6.1.11 Synthese der dsDNA aus Oligos

Annealing-Puffer

20 mM Tris-HCl pH 8,0

2 mM EDTA pH 8,0

100 mM NaCl

Um aus den synthetisierten Oligos doppelsträngige DNA zu erzeugen, wurden die komplementären Oligos (50 mM) mit dem *Annealing*-Puffer versetzt. Um ein möglichst langsames Abkühlen zu gewährleisten, wurden die Proben in einem mit Wasser gefüllten Becherglas aufgeköcht und auf RT abgekühlt. Die abgekühlte doppelsträngige DNA wurde anschließend mit dem PCR and Gel Extraction Mini Prep Kit gereinigt und in 40 μl TE-Puffer aufgenommen. 1 μl des Eluats wurde in die anschließende Reaktion zur Phosphorylierung der DNA-Enden eingesetzt und in den T-Vektor ligiert.

6.2 Proteinbiochemische Methoden

6.2.1 Aufreinigung der Proteine

Abhängig davon aus welchen Zellen Proteine isoliert wurden und wofür sie eingesetzt werden sollten, wurden unterschiedliche Methoden zur Isolierung und Aufreinigung von Proteinen verwendet.

6.2.1.1 Isolation von GST-Fusionsproteinen aus *E. coli*

Für die Überexpression von Fusionsproteinen, die für *in vitro* Experimente eingesetzt wurden, wurde der *E. coli* Stamm BL21-CodonPlus verwendet. Die Kultivierung und Transformation der BL21-CodonPlus Bakterien erfolgt wie bei dem *E. coli* Stamm DH5 α und wurde im Abschnitt 6.1.4 beschrieben. Zusammen mit einem geeigneten Vektor wie pGEX-3X (zur Expression von GST-Fusionsproteinen) stellt es ein effizientes und mit IPTG induzierbares System zur Synthese großer Menge von Proteinen dar, die anschließend über eine Säule gereinigt werden können.

PBS pH 7,5

40 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄

Elutionspuffer

5 mM Glutathion

50 mM Tris-HCl pH 8,0

Um große Mengen an Proteinen isolieren zu können, wurde eine größere Bakterienkultur angelegt. Dafür wurde zuerst eine 5 ml Bakterienkultur über Nacht bei 37 °C angezogen. 1 ml dieser Kultur wurde mit 100 ml frischem LB-Medium (+ Antibiotika) versetzt und so lange bei 37 °C inkubiert bis sich die Bakterien in der exponentiellen Phase ihres Wachstums befanden (ca. 3 h, OD₆₀₀ zwischen 0,6 und 1). Anschließend wurde die Genexpression mit IPTG (1 mM) induziert. Nach 2 h bei 37 °C wurde die Induktion mit Hilfe von Zentrifugation (20 min, 5000 rcf, 4 °C) gestoppt. Der Bakterien-Niederschlag (ca. 1 g) wurde in 10 ml PBS-Lösung mit Zusatz von 100 μ M PMSF und 100 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Lysozym resuspendiert und 20 min bei RT inkubiert. Die so aufgeschlossene Bakterienzellen wurden mit 1 % Triton X-100 und 20 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ DNaseI versetzt und 30 min bei RT inkubiert. Um die Proteine von Überresten der Zellen zu trennen, wurde die Suspension zentrifugiert (30 min, 5000 rcf, 4 °C). Der Überstand enthielt die isolierten

Proteine und wurde auf Eis gelagert. Alle Schritte der Reinigung erfolgten bei 4 °C. Zur einfacheren Reinigung auf der Säule wurde der Protein-Überstand mit 10 ml Triton/PBS-Lösung (1 % Triton X-100 in PBS) verdünnt.

Die Chromatographiesäule wurde mit 2 ml Glutathion-Säulenmaterial beladen und mit 10 ml PBS sowie 6 ml Triton/PBS-Lösung gewaschen. Auf die so vorbereitete Säulen-Matrix wurde die verdünnte Proteinlösung gegeben und die Matrix wurde erneut mit 10 ml PBS gewaschen. Die GST-Fusionsproteine wurden mit 3 ml Elutionspuffer von der Säulen-Matrix getrennt. Der Durchfluss wurde aufgefangen (6 × 500 µl). Anschließend wurde die Säule mit 5 M NaCl, H₂O und 70 % Ethanol gewaschen.

Zur Überprüfung des Erfolges der Proteinisolation wurden vermehrt 50 µl Proben entnommen: vor der Zugabe von IPTG, nach Inkubation mit IPTG, nach dem Auftragen auf die Säule sowie an allen Schritten der Elution. Diese Proben wurden für die SDS-PAGE vorbereitet und zum Nachweis der Proteinsynthese aufgetrennt. Erst wenn der Beweis positiv ausgefallen ist, wurden weitere Experimente durchgeführt. Zur genaueren Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine Spektralanalyse bei OD₂₈₀ herangezogen.

6.2.1.2 Isolation von Proteinen aus *C. reinhardtii*

Um intakte Proteine aus *C. reinhardtii* Zellen zu isolieren, wurden die Zellen direkt von der Platte in ein Reaktionsgefäß überführt, mit H₂O versetzt und die OD₇₂₀ wurde gemessen. Zur Proteinisolierung wurde eine Menge an Algen verwendet, die der OD₇₂₀ = 20 entspricht. Diese wurde drei Mal mit H₂O gewaschen (5 min, 1500 rcf, 4 °C). Anschließend wurde der Zelniederschlag mit 200 µl 10 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,5 versetzt und resuspendiert. Die Suspension wurde drei Mal abwechselnd: 2 min in flüssigem Stickstoff eingefroren und in Wasserbad bei RT aufgetaut. Die so aufgeschlossenen Algenzellen wurden zentrifugiert (20 min, 14 000 rcf, 4 °C). Der Überstand enthielt die isolierten Proteine und wurde in ASL-Assays oder zur Auftrennung in einer SDS-PAGE eingesetzt. Zur Bestimmung der Proteinmenge wurde ein Bradford-Test durchgeführt.

6.2.1.3 Isolation von Proteinen aus *C. heliozoae*

Um die Proteine aus *Chlorella*-Algen zu isolieren wurde eine gut gewachsene Kultur angezogen ($OD_{720} = 4$). 50 ml dieser Kultur wurden zentrifugiert (15 min, 5000 rcf, 22 °C). Der Zelleniederschlag wurde in 5 ml PBS resuspendiert und mit PMSF (4 mM) versetzt. Die Probe wurde in ein verschließbares Reaktionsgefäß mit 100 mg sterilen Glaskügelchen überführt. Mit Hilfe von DisruptorGenie wurde die Algensuspension 5 min geschüttelt, für 5 min auf Eis inkubiert und mit 10 ml PBS verdünnt. Anschließend wurden die Algenzellen mit Hilfe von Ultraschall unter ständiger Kühlung auf Eis aufgeschloßen (3 Mal für 20 s bei 100 % Amplitude) und zentrifugiert (10 min, 12 000 rcf, 4 °C). Die isolierten Proteine befanden sich im Überstand.

6.2.1.4 Proteinisolation aus Pflanzenmaterial

Proteinisolation aus Blattmaterial

Die gewünschte Menge von Blattmaterial (100 mg) wurde mit der doppelten Menge an Puffer (Na-Phosphatpuffer, GUS-Lysepuffer) versetzt und homogenisiert. Um die verbleibenden Blatt- und Zellreste vom Proteinextrakt zu trennen wurden die Proben zentrifugiert (20 min, 14 000 rcf, 4 °C). Der Überstand enthielt die isolierten Proteine.

Proteinisolation aus Protoplasten

Die Protoplasten (2 Tage nach der Transformation) wurden vorsichtig vom Boden einer 6-well-Platte gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach dem Zentrifugieren (3 min, 100 rcf, 4 °C) wurde der Überstand verworfen. Die Protoplasten wurden in 100 µl GUS-Lysepuffer resuspendiert, gemischt und erneut zentrifugiert (5 min, 14 000 rcf, 4 °C). Im Überstand befanden sich die isolierten Proteine. Zur Bestimmung der Proteinmenge wurde ein Bradford-Test durchgeführt.

6.2.1.5 Proteinisolation aus HEK293-Zellen

<u>Proteinaseinhibitor Cocktail (50×)</u>	<u>RIPA-Lysepuffer</u>
500 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Aprotinin	50 mM Tris-HCl pH 7,4
800 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Benzamidin	150 mM NaCl
500 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Pepstatin	1 % Triton X-100
500 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ Phenanthrolin	1 % SDS
50 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ PMSF	1 mM EDTA
500 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Leupeptin	1 mM Na_3VO_4 (aktiviert)
in 100 % Ethanol	2 % Proteaseinhibitor Cocktail

Für die Proteinisolation aus den HEK293-Zellen wurden die Zellen vom Medium befreit und mit kaltem, sterilem PBS gewaschen. Nach Zugabe von 500 μl PBS wurden die Zellen vom Boden der 6-*well*-Platte gelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (1 min, 1000 rcf, 4 °C). Der Zellschlag wurde in 40 μl RIPA-Lysepuffer resuspendiert, kräftig geschüttelt, für 30 min bei 4 °C inkubiert und zentrifugiert (15 min, 12 000 rcf, 4 °C). Im Überstand befanden sich die isolierten Proteine.

6.2.2 SDS-PAGE

Lösung I pH 8,9

18,3 g Tris
115 μl TEMED
ad 100 ml H_2O

Lösung III pH 6,8

6,1 g Tris
230 μl TEMED
ad 100 ml H_2O

Lösung II (Acrylamid)

Rotiphorese Gel 30

Elektrophoresepuffer

50 mM Tris-HCl pH 8,3
384 mM Glycin
0,1 % SDS

Das Auftrennen der Proteine nach dem Molekulargewicht erfolgte mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese [Laemmli 1970] auf einem Polyacrylamidgel. Das Gel bestand aus zwei Komponenten (Trenn- und Sammelgel), die in die

dafür vorgesehene Vorrichtung der Gelelektrophoresekammer gegossen wurden. Diese befand sich zwischen einer Glasplatte und einer Aluminiumoxidplatte, die von zwei Spacern (1 mm Dicke) getrennt wurden. Nach dem Auspolymerisieren von dem Trenngel wurde der Probenkamm eingesetzt und das Sammelgel gegossen.

Trenngel 15 %

1,75 ml Lösung I

3,5 ml Lösung II

1,68 ml H₂O

70 µl 10 % SDS

175 µl 10 % APS

Sammelgel

470 µl Lösung II

875 µl Lösung III

2,12 ml H₂O

35 µl 10 % SDS

87,5 µl 10 % APS

5× SDS-Ladepuffer

313 mM Tris-HCl pH 6,8

10 % SDS

50 % Glycerin

0,5 % Bromphenolblau

Das auspolymerisierte Gel wurde in die Elektrophoresekammer gestellt und mit dem Elektrophoresepuffer überschichtet. Nach dem Entfernen vom Kamm wurden die Proben aufgetragen. Die isolierten Proteinextrakte wurden mit SDS-Puffer (1:5) und DTT (200 mM) versetzt und für 10 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (1 min, 12 000 rcf, 4 °C) und auf das Gel geladen (20 µl). Als Größenkontrolle wurde ein Größenmarker aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 120 V.

6.2.3 Western Blot

6.2.3.1 Transfer der Proteine

Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (porablot NCP, MARCHERY-NAGEL) übertragen, um diese dann mit spezifischen Antikörpern detektieren zu können.

<u>Anordnung der Komponenten</u>	<u>Towbin-Puffer</u>
Lochplatte (- Pol)	25 mM Tris
Schwammtuch	192 mM Glycin
2× Chromatographie-Papier	20 % Methanol
Trenngel	
Nitrocellulosemembran	
2× Chromatographie-Papier	
Schwammtuch	
Lochplatte (+ Pol)	

Um die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran zu übertragen, wurde das Sammelgel vom Trenngel getrennt. Das Trenngel wurde in die Westernblot Apparatur (Criterion TM Blotter, Bio-Rad, München) zusammen mit allen erforderlichen Komponenten in der oben beschriebenen Anordnung eingesetzt und mit Towbin-Puffer überschichtet. Der Proteintransfer erfolgte bei 120 V für 30 min.

6.2.3.2 Immunodetektion von Proteinen

<u>TBS</u>	<u>Lösung A</u>
20 mM Tris-HCl pH 7,5	50 mg Luminol
500 mM NaCl	200 ml Tris-HCl pH 6,8
<u>TTBS</u>	<u>Lösung B</u>
20 mM Tris-HCl pH 7,5	11 mg para-Hydroxycoumarinsäure
500 mM NaCl	ad. 10 ml DMSO
0,05 % Tween 20	
<u>Blockierlösung</u>	<u>ECL-Reagenz</u>
5 % Magermilchpulver	2 ml Lösung A
in TTBS	200 µl Lösung B
	0,6 µl 37 % H ₂ O ₂

Um unspezifisches Binden des Antikörpers zu reduzieren, wurde die Nitrocellulosemembran nach dem Transfer über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schwenken

inkubiert. Die Membran wurde für 1 h bei RT mit dem primären Antikörper hybridisiert. Die Verdünnung der Antikörper wurde entsprechend der Angaben für primäre Antikörper angesetzt (Abschnitt 5.9). Nach der Inkubation wurde die Membran vier Mal mit TTBS gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 1 h bei RT mit dem sekundären Antikörper versetzt (Verdünnung 1:5000 in Blockierlösung), drei Mal mit TTBS und zwei Mal mit TBS gewaschen. Durch die an dem sekundären Antikörper gekoppelte Merretichperoxidase (HRP) konnten die Proteine spezifisch über die Oxidation von Luminol nachgewiesen werden. Hierfür wurde die Membran für 1 min mit dem ECL-Reagenz versetzt, in Klarsichtfolie verpackt und auf einen Röntgenfilm (Fuji Super RX, Fuji, Düsseldorf) gelegt. Das Exponieren hing vom benutzten primären Antikörper ab. Sollte der Nachweis nicht wie gewünscht erfolgen oder sollte die Nitrocellulosemembran zum Nachweis mit anderem Antikörper verwendet werden, wurde der Antikörper von der Membran entfernt. Dazu wurde die Membran zwei Mal mit 100 mM Glycin-HCl Lösung pH 2,5 und zwei Mal mit TBS gewaschen und anschließend über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schwenken inkubiert. Danach konnte die Membran erneut zu Hybridisierung mit dem primären Antikörper verwendet werden.

6.2.3.3 Ponceau-Färbung

Mit der Ponceau-Färbung wurden die Proteine auf der Nitrocellulosemembran angefärbt. Die Membran wurde hierfür für 5 min in Ponceau-Färbelösung (0,1 % Ponceau S in 5 % Essigsäure) inkubiert und anschließend mit Wasser gewaschen um überschüssige Farbstoffreste zu entfernen. Ponceau S reagiert mit allen Proteinen, wodurch es sich gut als Ladekontrolle eignet. Vor allem stark akkumulierende zelleigene Proteine, wie z. B. die große Untereinheit (LSU) von RuBisCO (Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase, ca. 55 kDa), lassen sich besonders gut nachweisen.

6.2.4 Coomassie-Färbung

<u>Färbelösung</u>	<u>Schnellentfärber</u>
10 % Essigsäure	0,7 % Essigsäure
45 % Methanol	50 % Methanol
0,25 % Coomassie Brilliantblau	

Um die Proteine direkt auf dem Trenngel nachweisen zu können, wurden diese mit Coomassie Brilliant Blue Farbstoff R-250 angefärbt. Hierfür wurde das Gel für mindestens 3 h in der Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe des Schnellentfärbers überschüssiger Farbstoff entfernt.

6.2.5 Bradford-Test

Der Bradford-Test ist eine photometrische Methode zur Bestimmung der Proteinmenge in den Proben und wurde 1976 von Marion Bradford entwickelt [Bradford 1976]. Hierfür wurde auf Basis einer vorher erstellten Eichgerade die Proteinkonzentration der getesteten Proben ermittelt. Für die Eichgerade wurden bestimmte Mengen (0 µg, 1 µg, 2 µg, 3 µg, 4 µg, 5 µg and 6 µg) von BSA in 200 µl H₂O, 0,2 M Na₂CO₃ oder 0,1 M Na-Phosphatpuffer gelöst und mit 800 µl Roti-Nanoquant-Lösung (1 zu 5 mit H₂O verdünnt) versetzt. Der im Roti-Nanoquant-Lösung enthaltene Triphenylmethanfarbstoff (Coomassie-Brillant-Blau G-250) bildet in saurer Lösung Komplexe mit kationischen und unpolaren Seitenketten der Proteine. Durch Komplexbildung verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs auf 595 nm. Durch photometrische Bestimmung der Absorption der vorher erstellten BSA-Lösungen und der Proben kann die Konzentration der Proteinen bestimmt werden. Dazu wurden 2 µl Proteinproben mit 198 µl H₂O verdünnt und mit 800 µl verdünnter Roti-Nanoquant-Lösung versetzt. Die Absorption der BSA-Eichgerade (Abbildung A.15) sowie der getesteten Proben wurde mit Hilfe des Fluorometers für jedes einzelne Experiment bestimmt und auf 1 ml Proteinextrakt hochgerechnet ($\times 500$).

6.2.6 ASL-Assay

Argininosuccinat-Lösung

20 mM Argininosuccinat

50 mM Tris-HCl pH 7,5

Ninhydrin-Lösung

5 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ Ninhydrin

100 % Methanol

Rosselet-Reagenz

$\frac{1}{2}$ Ninhydrin-Lösung

$\frac{1}{4}$ 1 M NaOH

$\frac{1}{4}$ 100 % Glycerin

Der ASL-Assay wurde verwendet, um die Aktivität der Argininosuccinat-Lyase in den untersuchten Proben zu bestimmen. Diese wurde auf Basis der vorher erstellten Eichgerade (Abbildung A.14) ermittelt. Für die Eichgerade werden bestimmte Mengen (zwischen 0 μg und 50 μg) von Arginin in 100 μl 100 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,5 gelöst und mit 400 μl Rosselet-Reagenz versetzt. Die Proben wurden anschließend für 30 min bei RT inkubiert. Mit Rosselet-Lösung versetzt, fluoresziert Arginin bei 510 nm nach Anregung bei 360 nm. Die Auswertung erfolgte am Fluorometer in einer 96-*well*-Mikroplatte (3-facher Ansatz je 100 μl). Um die Menge an gebildetem Arginin in den Proteinproben zu ermitteln, die bei der Spaltung von Argininosuccinat durch die Argininosuccinat-Lyase entstanden ist, wurden 20 μl Proteinextrakt (siehe Abschnitt 6.2.1.2) mit 75 μl 100 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,5 und 5 μl Argininosuccinat-Lösung versetzt. Die Proben wurden 4 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion gestoppt (5 min bei 95 °C) und zentrifugiert (3 min, 10 000 rcf, RT). 100 μl des Überstandes wurden mit 400 μl Rosselet-Reagenz 30 min bei RT inkubiert. Die Auswertung erfolgte wie bei der Eichgerade am Fluorometer und wurde entsprechend auf 1 ml Proteinextrakt hochgerechnet ($\times 250$).

6.2.7 GUS-Assay

<u>GUS-Lysepuffer</u>	<u>MUG-Lösung</u>
50 mM Na-Phosphatpuffer	5 mM MUG
10 mM EDTA pH 8,0	GUS Lysepuffer
0,1 % N-Laurylsarcosyl	
0,1 % Triton X-100	
10 mM β -Mercaptoethanol	

Der GUS-Assay wurde verwendet, um die Aktivität von β -Glucoronidase in den Proteinproben zu bestimmen. Diese wurde auf Basis von der vorher erstellten Eichgerade (Abbildung A.15) errechnet. Für die Eichgerade wurden bestimmte Mengen (zwischen 0 ng und 350 ng) von MU (4-Methylumbelliferon) in 0,2 M Na_2CO_3 gelöst und unter dem Fluoreszenzmikroskop oder im Fluorometer ausgewertet (3-facher Ansatz je 100 μl). Nach der Anregung mit ultraviolettem Licht fluoresziert MU im Bereich von 455 nm. Um die Menge an umgesetztem MU in den Proteinproben zu ermitteln, wurden 100 μl Proteinextrakt (siehe Abschnitt 6.2.1.4) mit 20 μl MUG-Lösung (4-Methylumbelliferyl β -D-galactopyranoside) versetzt und 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde 280 μl 0,2 M Na_2CO_3 zugegeben. Die Proben wurden wie die Proben der Eichgerade ausgewertet und entsprechend auf 1 ml Proteinextrakt hochgerechnet ($\times 40$).

6.2.8 Interaktionstests in Algenzellen

Um die Interaktionen zwischen den Proteinen aus Algen und den viralen Proteinen nachweisen zu können, wurde die Säulenchromatographie verwendet. Die Proteinextrakte (15 ml) aus *Chlorella*-Algen wurden mit 500 μl isolierten GST-gekoppelten Virus-Protein (GST oder GST-Z339L) versetzt und für 24 h bei 4 °C unter leichtem Schwenken inkubiert. Um die Bindungen zwischen den Proteinen zu konservieren, wurden die Proben mit Formalaldehyd (1 %) versetzt und für 10 min inkubiert. Anschließend wurde die Proteinprobe mit 5 ml PBS verdünnt und auf die vorbereitete Chromatographiesäule (2 ml Glutathion-Säulenmaterial) geladen. Die GST-Fusionsproteine, sowie deren Interaktions-

partner, wurden mit 3 ml Elutionspuffer von der Säulen-Matrix gelöst. Der Durchfluss wurde aufgefangen (je 500 µl). Anschließend wurde die Säule mit 5 M NaCl, H₂O und 70 % Ethanol gewaschen.

6.2.9 *in vitro* Ubiquitinierung-Assay

Ansatz

50 mM Tris-HCl pH 7,4

5 mM MgCl₂

2 mM ATP

50 ng UBE1 [6His-tagged] (E1)

500 ng UBE2D2 [UbcH5b] (E2)

400 ng RNF11 oder 5 µl aufgereinigtes Z292L (E3)

2 µg Ubiquitin oder 5 µl aufgereinigtes Z203L

ggf. 5 µl aufgereinigtes Substrat

ad 30 µl H₂O

Der *in vitro* Assay wurde benutzt, um die Ubiquitinierungs-Fähigkeit von unterschiedlichen E3-Enzymen oder hypothetischen Proteinen des Ubiquitin-Systems zu überprüfen. In Anwesenheit von einem Ubiquitin-aktivierenden Enzym, einem Ubiquitin-konjugierenden Enzym, einer E3-Ligase, ATP, MgCl₂ und Ubiquitin kann eine *in vitro* Ubiquitinierung durchgeführt werden [Qingzhen *et al.*, 2011]. Sind alle Komponenten vorhanden, werden Ubiquitinketten gebildet. Hierfür wurden humane Enzyme benutzt, die möglichst unspezifisch agieren und wie oben beschrieben angesetzt. Anschließend wurde der Ansatz für 2 h bei 37 °C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurde der Ansatz mit dem 5× SDS-Ladepuffer und DTT (200 mM) versetzt (siehe Abschnitt 6.2.2).

6.3 Experimente mit Hefen

Alle verwendeten Medien und Lösungen, die zur Anzucht von biologischen Material verwendet wurden, wurden entweder autoklaviert oder sterilfiltriert (Filter 45 nm). Die Methoden zur Anzucht und Transformation der Hefen stammen aus dem Protokoll der Firma ClonTech, von der die verwendeten Vektoren bezogen wurden.

6.3.1 Anzucht von *S. cerevisiae*

SD-Medium pH 5,8

1,7 $\frac{g}{l}$ Hefegrundnährungsmedium
5 $\frac{g}{l}$ $(NH_4)_2SO_4$
ggf. 15 $\frac{g}{l}$ Micro Agar (Festmedium)
autoklavieren
2 % Glucose
1 % *drop in* Lösungen

100× *drop in* Lösungen

2 $\frac{g}{l}$ L-Histidin/HCl Monohydrat
2 $\frac{g}{l}$ L-Methionin
10 $\frac{g}{l}$ L-Leucin
3 $\frac{g}{l}$ L-Lysin/HCl
2 $\frac{g}{l}$ L-Tryptophan
2 $\frac{g}{l}$ L-Uracil
2 $\frac{g}{l}$ L-Adenin-Hemisulfat

YPAD-Medium pH 5,8

20 $\frac{g}{l}$ Pepton
5 $\frac{g}{l}$ Hefeextrakt
40 $\frac{mg}{l}$ Adenin
ggf. 15 $\frac{g}{l}$ Micro Agar (Festmedium)
autoklavieren
2 % Glucose

Das *Synthetic Defined* (SD) Medium wurde zur Kultivierung von auxotrophen Hefestämmen auf Selektivmedium verwendet. Um selektive Bedingungen zu schaffen, wurden ausgewählte und auf die verwendeten Vektoren angepasste *drop in* Lösungen dem sterilen Medium zugegeben. Das *Yeast extract-Peptide-Adenine-Dextrose* (YPAD) Medium ist ein Vollmedium und bedarf keinen Zusatz von *drop in* Lösungen. Alle verwendeten Hefestämme (*S. cerevisiae* NMY51 und HF7c) wurden stets unter ihren optimalen Bedingungen in einem Brutschrank bei 30 °C kultiviert. Die flüssigen Kulturen wuchsen zusätzlich unter konstantem Schütteln bei 200 rcf.

6.3.2 Transformation von Hefen

Träger-DNA

2 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ Lachssperma-DNA

Lösung A pH 8,35

10 mM Bicine pH 8,35

1 M Sorbitol

3 % PEG 4000

Lösung B pH 8,35

200 mM Bicine pH 8,35

40 % PEG 4000

Lösung C pH 8,35

10 mM Bicine pH 8,35

150 mM NaCl

6.3.2.1 Herstellung chemisch kompetenter *S. cerevisiae*

Für die Herstellung von kompetenten Hefezellen wurde eine 100 ml Kultur in YPAD-Medium angezogen. Nachdem die Kultur eine Zelldichte von ca. $OD_{600} = 0,6$ erreicht hatte, wurde sie zentrifugiert (10 min, 3000 rcf, RT), in 20 ml Lösung A gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min, 3000 rcf, RT). Der Zelleniederschlag wurde in 4 ml Lösung A resuspendiert und aliquotiert (je 100 μl). Die kompetenten Hefezellen wurden anschließend langsam auf -70°C gekühlt und bei -70°C gelagert.

6.3.2.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Die kompetenten Hefezellen werden mit 500 ng Plasmid-DNA und 25 μl Träger-DNA versetzt und 3 min bei 37°C aufgetaut. Nachdem die Zellen aufgetaut sind, wurde 1 ml Lösung B hinzugegeben und die Zellen wurden 1 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (1 min, 8000 rcf, 4°C), mit 800 μl Lösung C gewaschen und erneut zentrifugiert (1 min, 8000 rcf, 4°C). Der Zelleniederschlag wurde in 80 μl Lösung C resuspendiert, auf SD-Selektivmedium verteilt und bei 30°C für 3 Tage kultiviert.

6.3.2.3 LR-Rekombination

Mit Hilfe von LR-Rekombination und entsprechend ausgewählten Vektoren ist es möglich, eine Gateway[®] Klonierung direkt in Hefen durchzuführen. Die Vektoren (z. B.: pDEST22, pDEST32) müssen Zielsequenzen (*attB1*, *attB2*) enthalten, die homologe Rekombination in Hefe ermöglichen. Sofern die gewünschte Insert-DNA in einem Helferplasmid vorliegt, wird diese mit Hilfe

der homologer Rekombination in den Zielvektor überführt. Hier wurde der pDONR201 Vektor als Helferplasmid für die Gateway[®] Klonierung verwendet. Der Vektor lieferte das Gen von Interesse, das mit den *att*-Sequenzen entsprechend den pDEST Vektoren flankiert wurde. Für die LR-Rekombination wurde je 1 µl Vektor-DNA verwendet und direkt mit Träger-DNA zu den Hefen gegeben. Anschließend folgte eine Transformation der Hefen.

6.3.3 Erstellen von Gefrierkulturen

Um eine Stammkultur herzustellen, wurden 200 µl steriles Glycerin und 800 µl Hefekultur in ein Reaktionsgefäß gegeben, sorgfältig vermischt und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

6.3.4 Interaktionstest in Hefe

Die Interaktionstests in Hefen basieren auf den Eigenschaften des GAL4-Transkriptionsfaktors der für die Expression des Reportergens im Genom des verwendeten Hefestamms sorgt. Der GAL4-Transkriptionsfaktor wird in zwei Domänen gespalten. Diese befinden sich in unterschiedlichen Vektoren und werden als Fusionsproteine mit den zu untersuchenden Proteinen exprimiert. Der sog. *bait*-Vektor kodiert für die GAL4-Bindedomäne (GAL4-BD), der *prey*-Vektor kodiert für den zweiten Teil des GAL4-Transkriptionsfaktors, die Aktivierungsdomäne (GAL4-AD). Durch Co-Transformation der beiden Vektoren in den Hefestamm HF7c werden die entsprechenden Fusionsproteine exprimiert. Kommt es zu einer Interaktion der beiden zu untersuchenden Proteinen, kommen so die zwei Domänen des GAL4-Transkriptionsfaktors in räumliche Nähe. Durch die DNA-Bindedomäne ist der GAL4-Faktor nun in der Lage, am entsprechenden Promotor zu binden, die Aktivierungsdomäne sorgt für eine hohe Expression des Reportergens. Wird die Interaktion zwischen zwei Proteinen untersucht, handelt es sich um ein Hefe-Zwei-Hybrid System (*yeast-two-hybrid*, Y2H). Wird eine DNA-Protein Interaktion auf diese Weise untersucht spricht man von einem Hefe-Ein-Hybrid System (*yeast-one-hybrid*, Y1H). Die vorhandene Interaktion zwischen den Komponenten wird anhand der Aktivität des Reporterproteins gemessen [Fields *et al.*, 1989].

6.3.4.1 Quantitativer Test zum Nachweis der Aktivität von β -Galaktosidase

Für jeden Interaktionstest wurde eine 5 ml Hefekultur angeimpft und es wurden zwei getrennte Ansätze mitgeführt. Nachdem die Kultur eine geeignete Zelldichte erreicht hatte ($OD_{600} = 0,6 - 1$), wurde 1 ml der Kultur zentrifugiert (1 min, 8000 rcf, 4 °C). Der Zelleniederschlag wurde in 100 μ l Z-Puffer resuspendiert. Die Hefezellen wurden durch schnellen Temperaturwechsel aufgeschlossen: 3 \times abwechselnd für 60 s bei -196 °C (flüssiger Stickstoff) und 90 s bei 37 °C (Wasserbad). Nach dem Aufschließen wurden die Zellen mit 750 μ l Z/MSH-Puffer und 150 μ l oNPG-Lösung (o-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid) versetzt und bis zu 2 h bei 37 °C inkubiert (Inkubationszeit). Die Reaktion wurde mit 400 μ l 1 M Na_2CO_3 gestoppt und die Proben wurden zentrifugiert (1 min, 12 000 rcf, 4 °C). Anschließend wurde die Absorption der Proben bei 420 nm gemessen. Die Aktivität der β -Galaktosidase wurde in Miller Einheiten angegeben. Diese konnte mit folgender Formel berechnet werden: Miller Einheiten = $\frac{1000 \times OD_{420}}{t \times V \times OD_{600}}$, wobei t für die Inkubationszeit steht und V für das eingesetzte Volumen (hier 1 ml).

Z-Puffer pH 7,0

60 mM $Na_2HPO_4 \cdot 7 H_2O$

40 mM $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$

10 mM KCl

1 mM $MgSO_4$

Z/MSH-Puffer

0,27 % Mercaptoethanol

in Z-Puffer

oNPG-Lösung

4 $\frac{mg}{ml}$ oNPG

in Z-Puffer

6.3.4.2 cDNA-Bank Screen

cDNA-Bank Screen ist eine Methode, um Interaktionspartner von einem Protein zu identifizieren. Hierfür wurde eine schon transgene Hefelinie erneut mit der im Vektor enthaltenen cDNA-Datenbank einer bestimmten Spezies transformiert. Auf diese Weise können gleichzeitig mehrere potenzielle Interaktionspartner getestet werden. Durch die Auswahl eines geeigneten Selektivmediums wachsen nur Hefeklonen an, die interagierende Proteine exprimieren.

2× YPAD-Medium pH 5,8

40 $\frac{\text{g}}{\text{l}}$ Pepton
40 $\frac{\text{g}}{\text{l}}$ Hefeextrakt
40 $\frac{\text{mg}}{\text{l}}$ Adenin
4 % Glucose

10× TE-Puffer pH 7,5

100 mM Tris-HCl
10 mM EDTA

LiOAc/TE-Lösung

110 mM LiOAc
1× TE-Puffer pH 7,5

PEG/LiOAc-Lösung

150 mM LiOAc
40 % PEG 4000
1× TE-Puffer pH 7,5

Transformationsansatz

7 μl Plasmid-DNA (7 μg)
100 μl Träger-DNA (200 μg)
2,5 ml PEG/LiOAc-Lösung

Für die Transformation wurde über Nacht eine 100 ml Hefekultur angezogen und zentrifugiert (5 min, 700 rcf, RT). Der Zellschlag wurde in 2× YPAD-Medium resuspendiert ($\text{OD}_{600} = 0,15$) und bis einer Zelldichte von 0,6 bei 30 °C kultiviert. Anschließend wurden die Zellen auf vier Gefäße verteilt, zentrifugiert (5 min, 800 rcf, RT), einmal mit H₂O gewaschen, einmal mit LiOAc/TE-Lösung gewaschen und je in 600 μl LiOAc/TE-Lösung resuspendiert. So vorbereitete Zellen wurden mit dem Transformationsansatz versetzt, gut gemischt und bei RT für 45 min inkubiert. Die Zellen wurden je mit 160 μl DMSO versetzt, für 20 min bei 42 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert (5 min, 800 rcf, RT). Der Zellschlag wurde in 3 ml 2× YPAD-Medium resuspendiert und für 90 min bei 30 °C inkubiert. Nach dem Inkubieren wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 800 rcf, RT), in insgesamt 4,8 ml 0,9 % NaCl-Lösung resuspendiert und gleichmäßig auf SD-Selektivmedium verteilt. Die Kultivierung erfolgte bei 30 °C für 3 – 4 Tage.

6.4 Arbeiten mit Algen und Viren

Die Methoden zur Kultivierung von Algen (*C. reinhardtii*, sowie auch *C. heliozoae*) basieren auf den Erkenntnissen von Hooper [Hooper 1989]. Die Methoden zur Anzucht von *Chlorella* Sp. wurden wie unten angegeben angepasst. Alle verwendeten Medien und Lösungen die zur Anzucht von biologischem Material verwendet wurden, wurden entweder autoklaviert oder sterilfiltriert.

6.4.1 Kultivierung von *C. reinhardtii* und *C. heliozoae*

TAP-Salze

15 $\frac{\text{g}}{\text{l}}$ NH_4Cl

4 $\frac{\text{g}}{\text{l}}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

2 $\frac{\text{g}}{\text{l}}$ $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

Hunter trace elements

50 $\frac{\text{g}}{\text{l}}$ $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

22 $\frac{\text{g}}{\text{l}}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

11,4 $\frac{\text{g}}{\text{l}}$ H_3BO_3

5 $\frac{\text{g}}{\text{l}}$ $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$

5 $\frac{\text{g}}{\text{l}}$ $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

1,6 $\frac{\text{g}}{\text{l}}$ $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

1,6 $\frac{\text{g}}{\text{l}}$ $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

1,1 $\frac{\text{g}}{\text{l}}$ $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_3$

Phosphatlösung

288 $\frac{\text{g}}{\text{l}}$ K_2HPO_4

144 $\frac{\text{g}}{\text{l}}$ KH_2PO_4

TAP-Medium pH 7,5

2,42 g Tris

25 ml TAP Salze

0,325 ml Phosphatlösung

1 ml Hunter trace elements

1 ml Essigsäure

ggf. 15 g Phyto Agar (Festmedium)

ad. 1 l H_2O

Vitaminlösung

20 $\frac{\text{g}}{\text{l}}$ Vitamin B1

2 $\frac{\text{g}}{\text{l}}$ Vitamin B12

Das *Tris-Acetate-Phosphate* (TAP) Medium wurde zur Kultivierung von *C. reinhardtii* verwendet. Um *C. heliozoae* im TAP-Medium kultivieren zu können wurden nach dem autoklavieren 0,5 $\frac{\text{mg}}{\text{l}}$ Vitamin B1 und 5 $\frac{\text{mg}}{\text{l}}$ Vitamin B12 zugesetzt. Die Algen wurden bei 22 °C und einem Tag/Nacht-Rhythmus (16 h hell, 8 h dunkel) kultiviert. Nach der Transformation zur Expression bestimmter Plasmide und zum Schutz vor Kontaminationen wurden dem Medium bestimmte Antibiotika zugegeben (Tabelle 6.2).

Tabelle 6.2 Konzentration von Substanzen im TAP Selektionsmedium

Substanz	Konzentration	Substanz	Konzentration
Arginin	50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	Ampicillin	100 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$
Tetracyclin	40 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	Paromomycin	20 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$

6.4.2 Bestimmung der Algen-Zellzahl in der Kultur

Zur Bestimmung der Zellzahl einer Algenkultur wurde eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer verwendet. Diese Zählkammer zeichnet sich mit einer unterteilten Zählfläche von 4×4 Großquadraten mit einer Kantenlänge von jeweils 1 mm aus. Jedes der 16 großen Quadrate ist wiederum in 16 kleinere Quadrate unterteilt. Die Algenkultur wurde mit Wasser verdünnt (1:10) und auf die Zählfläche aufgetragen. Unter einem Lichtmikroskop wurden die Algen auf der Fläche von 16 kleinen Quadrate ausgezählt. Um die Anzahl der Zellen pro Milliliter zu erhalten wurde die ausgezählte Algenanzahl mit der Verdünnung und dem Faktor 5000 multipliziert. Der Faktor 5000 ergibt sich aus dem Volumen der 16 Quadrate ($0,2 \mu\text{l}^2$) hochgerechnet auf 1 ml.

6.4.3 Transformation von *C. reinhardtii*

Zur Transformation von *C. reinhardtii* wurde eine abgewandelte Form der Glaskügelchenmethode von der Arbeitsgruppe Kindle verwendet [Kindle 1990]. Nachdem die Algenkultur eine hohe Dichte erreicht hatte, wurde diese zentrifugiert (10 min, 1000 rcf, RT). Der Zelniederschlag wurde in TAP-Medium resuspendiert und die Konzentration auf 1×10^8 Zellen pro ml eingestellt. 100 μl der Algensuspension wurden zusammen mit 1 μg Plasmid-DNA zu den vorbereiteten 0,1 g Glasperlen (säurebehandelt, sterilisiert) gegeben. Der Reaktionsansatz wurde für exakt 20 s stark geschüttelt. Anschließend wurde 100 μl TAP-Medium zugegeben und gemischt. Der gesamte Ansatz wurde auf TAP-Medium gleichmäßig verteilt. Die Zusätze im TAP-Medium entsprechen dem verwendeten Plasmid. Die Algen wurden für ca. 14 Tage bei 22 °C und einem Tag/Nacht-Rhythmus kultiviert.

6.4.4 Vermehrung von Chloroviren

Um Virensuspensionen mit einer hoher Konzentration von ATCV-1 zu erhalten, wurden diese mit Hilfe eines entsprechenden Wirts vermehrt. Hierfür wurde eine gut gewachsene Algenkultur (3×10^8 Zellen pro ml) mit Virus infiziert (1:1) und für 3 Tage bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Viruspartikel von den übriggebliebenen Algenzellen durch Zentrifugation getrennt (10 min, 1000 rcf, RT). Der Überstand wurde aliquotiert und bei 8°C gelagert. Zur Ermittlung der Konzentration wurde zeitnah ein Plaque-Assay durchgeführt.

6.4.5 Plaque-Assay

Die Anzahl der Viruspartikel in der Virussuspension wurde mit Hilfe von Plaque-Assays ermittelt. Hierfür wurde eine Virusinfektion auf festem Medium mit unterschiedlichen Verdünnungen der Virussuspension angesetzt. Dadurch kam es zur Plaque-Bildung auf dem hochgewachsenen Algenrasen. Durch das Auszählen der Plaques konnte die Anzahl der infektiösen Viruspartikel pro Milliliter Suspension ermittelt werden (sog. *plaque forming unit*, pfu). Hierfür wurde $60\ \mu\text{l}$ einer sehr gut gewachsenen Algenkultur (*C. heliozoae*, 1×10^9 Zellen pro ml) mit $20\ \mu\text{l}$ der Virusverdünnung (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} und 10^{-8}) und mit $520\ \mu\text{l}$ warmen, flüssigen TAP-Medium mit 0,75 % Agar versetzt und gleichmäßig auf einer 6-well-Platte verteilt. Zur Kontrolle wurde immer ein Ansatz ohne Virus durchgeführt. Nach dem Trocknen wurden die Platten verschlossen und bei 22°C und einem Tag/Nacht-Rhythmus 10 Tage lang kultiviert. Die Anzahl der pfu pro Milliliter Medium wurde ermittelt indem die ausgezählten Plaques entsprechend hochgerechnet wurden (Anzahl der Plaques \times Verdünnung \times 50). Um den Einfluss bestimmter Substanzen auf die Virusinfektion zu untersuchen, wurden diese dem TAP-Medium in einer bestimmter Konzentration zugegeben (Tabelle 6.3).

Tabelle 6.3 Konzentration der Substanzen in dem TAP-Medium

Reagenz	Konzentration	Reagenz	Konzentration
NaCl	$75 \frac{\text{mg}}{\mu\text{l}}$	MG-115	$50\ \mu\text{M}$
NaF	$75 \frac{\text{mg}}{\mu\text{l}}$	MG-132	$50\ \mu\text{M}$
5-FU	$50\ \mu\text{M}$		

6.5 Experimente mit Pflanzen

6.5.1 Anzucht von Pflanzen

MS-Medium pH 5,7

2,3 $\frac{\text{g}}{\text{l}}$ MS-Salze

10 $\frac{\text{g}}{\text{l}}$ Saccharose

8 $\frac{\text{g}}{\text{l}}$ Phyto Agar

Das Murashige-Skoog (MS) Medium wurde zur Anzucht von mutanten Pflanzenlinien verwendet [Murashige *et al.*, 1962]. Mit Zugabe von Antibiotika (Kanamycin, 400 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$) war eine Selektion der transgenen Keimlinge auf das inserierte Plasmid mit Kanamycinresistenz möglich. Um die Pflanzen auf dem MS-Medium keimen zu lassen, mussten die Samen zunächst sterilisiert werden. Hierfür wurden die Samen für 1 min in 70 % Ethanol, 20 min in 5 % Natrium-Dichloroisocyanurat Dihydrat und anschließend drei Mal in H₂O gewaschen. Folglich wurden die Samen auf Kanamycin-haltigem MS-Medium verteilt und zur Stratifikation für drei Tage bei 4 °C inkubiert. Die Keimung erfolgte in einem Brutschrank bei konstanter Temperatur (22 °C) und einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16 h Licht und 8 h Dunkelheit. Nachdem die Keimlinge auf Antibiotika-haltigem Medium gewachsen sind, wurden diese in Einzeltöpfen mit gedämpfter Erde umgetopft. Die wildtypischen Pflanzenlinien wurden auf MS-Medium ohne Kanamycin aufgezogen und anschließend in Einzeltöpfe mit gedämpfter Erde umgetopft. Die Pflanzen wuchsen bei RT und normalen Tag/Nacht-Rhythmus im Gewächshaus oder in einem Brutschrank bei einem konstantem Tag/Nacht Rhythmus von 16 h Licht und 8 h Dunkelheit.

6.5.2 Agrobakterien-Infiltration von Pflanzen

Für die Infiltration der Pflanzen wurden zwei Agrobakterien Stämme verwendet: *A. tumefaciens* LBA4404 und *A. tumefaciens* GV3101. Für die Infiltration von *A. thaliana* wurde ausschließlich der GV3101 Stamm verwendet. Mit Hilfe von Agrobakterien konnten Gene ins Pflanzengenom integriert und exprimiert werden. Durch das Verwenden von Plasmiden mit bekannten Reportergenen konnte auch die Promotoraktivität in pflanzlichem Gewebe analysiert werden.

6.5.2.1 Anzucht von Agrobakterien

Min-A Medium

20 ml Min-A Salze
100 μ l 20 % MgSO₄
1 ml 20 % Glucose
ad. 100 μ l H₂O

Min-A Salze

52,5 $\frac{\text{g}}{\text{l}}$ K₂HPO₄
22,5 $\frac{\text{g}}{\text{l}}$ KH₂PO₄
5 $\frac{\text{g}}{\text{l}}$ (NH₂)₄SO₄
2,5 $\frac{\text{g}}{\text{l}}$ Tri-Natriumcitrat · 2 H₂O

Das Minimalmedium Min-A wurde zur Kultivierung von Agrobakterienstämmen GV3101 und LBA4404 verwendet. Alle *A. tumefaciens* Stämme wurden unter ihren Optimalbedingungen bei 30 °C in einem Brutschrank kultiviert. In flüssigem Medium wurden die Kulturen zusätzlich konstant geschüttelt (150 rcf). Für Selektivmedium wurden Antibiotika in bestimmten Konzentrationen verwendet (siehe Tabelle 6.4).

Tabelle 6.4 Konzentration von Antibiotika im Selektionsmedium

Antibiotikum	Konzentrationen
Kanamycin	50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$
Gentamycin	50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$
Rifampicin	50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$

6.5.2.2 Herstellung elektrokompenter Agrobakterien GV3101

Um kompetente Agrobakterien (Stamm GV3101) herzustellen, wurde eine 50 ml Kultur in LB-Medium mit Rifampicin angezogen. Nachdem die Kultur eine Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,6 erreicht hatte, wurde diese zentrifugiert (10 min, 3000 rcf, 4 °C) und in 16 ml eiskaltem H₂O resuspendiert. Nach erneutem zentrifugieren (10 min, 3000 rcf, 4 °C) wurde der Bakterien-Niederschlag in 4 ml 10 % Glycerinlösung resuspendiert. Die kompetenten Bakterien wurden anschließend aliquotiert (je 50 μ l) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei –70 °C.

6.5.2.3 Transformation von Agrobakterienstamm GV3101

Die Transformation von Agrobakterien erfolgte mit Hilfe von Elektroporation mit einem GenePulserTM und Pulse Controller (BioRad, München) [Mersereau *et al.*, 1990]. Die Agrobakterien wurden auf Eis aufgetaut, mit Plasmid-DNA

versetzt und in eine eiskalte Elektroporationsküvette gegeben. Die Elektroporation erfolgte bei 2 kV, 25 μ F (Kapazität), 200 Ω Widerstand und bei einer Zeitkonstante von 5 ms. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml LB-Medium versetzt und für 2 h bei 30 °C kultiviert. Die Bakterien wurden zentrifugiert (1 min, 10 000 rcf, RT). Der Bakterien-Niederschlag wurde in 100 μ l LB-Medium resuspendiert und auf einer Min-A Mediumplatte mit entsprechenden Antibiotika verteilt. Die transformierten Bakterien wurden unter Optimalbedingungen kultiviert bis einzelne Kolonien sichtbar wurden.

6.5.2.4 Agrobakterien-Infiltration von *N. benthamiana*

Infiltrationspuffer

10 mM MgCl₂

100 μ M Acetosyringon

Für die Infiltration von *N. benthamiana* wurden Agrobakterienkulturen in Min-A Medium angezogen. Nachdem die Kultur eine Zelldichte von OD₆₀₀ = 2 erreicht hatte, wurde diese zentrifugiert (10 min, 3000 rcf, 4 °C). Der Zellschlag wurde in Infiltrationsmedium resuspendiert und die OD₆₀₀ auf 0,7 eingestellt. Die Bakterien wurden 2 h bei RT im Dunklen inkubiert und mit Hilfe von einer Spritze auf der Blattunterseite vorsichtig infiltriert. Wurden unterschiedliche transgene Agrobakterienstämme co-infiltriert, wurden diese 1:1 gemischt.

6.5.3 Isolation und Transformation von Protoplasten

Enzymlösung

0,5 % Cellulase R-10

0,125 % Macerozym R-10

400 mM Mannitol

10 mM CaCl₂

20 mM KCl

20 mM MES pH 7,5

0,1 % BSA

W5-Lösung

154 mM NaCl

125 mM CaCl₂

5 mM KCl

2 mM MES pH 7,5

0,1 % BSA

PEG-Lösung

40 % PEG 4000

100 mM CaCl₂

200 mM Mannitol

MMG-Lösung

400 mM Mannitol

15 mM MgCl₂

4 mM MES pH 7,5

0,1 % BSA

WI-Lösung

20 mM KCl

500 mM Mannitol

4 mM MES pH 7,5

0,1 % BSA

6.5.3.1 Isolation

Zur Isolierung von Protoplasten wurden junge (6 – 8 Wochen) *N. benthamiana* Pflanzen verwendet. Die Protoplasten wurden aus Blattmaterial isoliert. Hierfür wurden 0,5 g Blattmaterial mit einer scharfen Klinge in Streifen geschnitten (0,5 mm Dicke). Die geschnittenen Blätter wurden mit 10 ml Enzymlösung überschichtet und über Nacht bei 22 °C im Dunkeln inkubiert. Die freigesetzten Protoplasten wurden durch leichtes Schwenken des Gefäßes freigesetzt und durch ein 0,1 mm Sieb von den Blattüberresten getrennt. Die Protoplasten wurden in einem Ausschwingrotor zentrifugiert (3 min, 100 rcf, RT). Der Protoplasten-Niederschlag wurde in 4 ml eiskalter W5-Lösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (3 min, 100 rcf, 4 °C) wurde der Protoplasten-Niederschlag in 2 ml eiskalter W5-Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Protoplasten zentrifugiert (3 min, 100 rcf, RT) und der Protoplasten-Niederschlag wurde in MMG-Lösung resuspendiert (Konzentration 2×10^6 Protoplasten pro ml MMG-Lösung) und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis inkubiert.

6.5.3.2 Transformation

Für die Transformation der Protoplasten wurden 100 µl von Protoplasten in MMG-Lösung (2×10^5 insgesamt) mit 1 µg Plasmid-DNA und 110 µl PEG-Lösung versetzt und für max. 10 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde schrittweise mit je 500 µl W5-Lösung verdünnt und zentrifugiert (2 min, 100 rcf, 4 °C). Der Protoplasten-Niederschlag wurde in 1 ml WI-Lösung resuspendiert und in ein *well* der 6-*well*-Platte überführt. Die transformierten Protoplasten wurden für zwei Tage bei 22 °C im Dunkeln inkubiert.

6.6 Kultivierung und Transfektion von HEK293-Zellen

Alle verwendeten Medien und Lösungen, die zur Kultivierung von biologischen Material verwendet wurden, wurden entweder autoklaviert oder sterilfiltriert (Filter 45 nm).

6.6.1 Kultivierung von HEK293-Zellen

<u>Zellkulturmedium</u>	<u>PBS</u>
D-MEM-Medium/Ham 's F-12	136,9 mM NaCl
10 % FCS (<i>fetal bovine serum</i>)	8,1 mM Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O
1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung	2,68 mM KCl
	1,47 mM KH ₂ PO ₄
<u>Trypsin/EDTA-Lösung</u>	
0,05 % Trypsin	
0,02 % EDTA (w/v)	
in PBS w/o Ca ⁺⁺ w/o Mg ⁺⁺	

Zum Passagieren der HEK293-Zellen wurde zuerst das Zellkulturmedium entfernt. Die Zellen wurden mit warmen PBS gewaschen und für max. 5 min mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung versetzt. Nachdem sich alle Zellen vom Boden der Flasche gelöst haben, wurde die Trypsin/EDTA-Lösung mit 5 ml Zellkulturmedium verdünnt und in einer Zentrifuge mit einem Ausschwenkrotor zentrifugiert (5 min, 1000 rcf, 37 °C). Der Zellschlag wurde in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in einer Zellkulturflasche verteilt und in einem CO₂-Brutschrank bei 37 °C unter Zusatz von 5 % CO₂ kultiviert. Je nach Bedarf wurde das Medium ein bis zwei Mal pro Woche erneuert. Die Zellen wurden in Gefäßen für adhärente Zellen in drei unterschiedlichen Größen kultiviert: 6-*well*-Platten (8,87 cm² Wachstumsfläche, 2 ml Arbeitsvolumen), kleinen Flaschen (25 cm² Wachstumsfläche, 5 ml Arbeitsvolumen) und großen Flaschen (75 cm² Wachstumsfläche, 20 ml Arbeitsvolumen).

6.6.2 Transfektion von HEK293-Zellen

<u>2× HBS pH 7,1</u>	<u>DNA-Ansatz</u>
50 mM HEPES	5 µg DNA
280 mM NaCl	307,5 mM CaCl ₂
1,5 mM Na ₂ HPO ₄	ad 100 µl H ₂ O

Für die Transfektion wurden Zellen in den 6-*well*-Platten kultiviert. Zwei Stunden vor der Transfektion wurde das Zellkulturmedium gewechselt. Für die Transfektion wurde der DNA-Ansatz in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. Unter konstantem Schütteln wurden schrittweise 100 µl 2× HBS zugegeben. Der Ansatz wurde für 30 min bei RT inkubiert und danach gleichmäßig auf die HEK293-Zellen eines *Wells* verteilt. Die Zellen wurden anschließend im CO₂-Brutschrank kultiviert. Nach zwei oder vier Tagen wurden die Zellen zur Auswertung vorbereitet.

6.6.3 Kryokonservierung von HEK293-Zellen

Für die Herstellung einer Gefrierkultur von HEK293-Zellen wurde das Medium von einer kleinen, gut gewachsenen Zellkultur abgenommen. Die Zellen wurden mit warmen PBS gewaschen und für max. 5 min mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung versetzt. Nachdem sich alle Zellen vom Boden der Flasche gelöst haben, wurde die Trypsin/EDTA-Lösung mit 5 ml Zellkulturmedium verdünnt und in einer Zentrifuge mit einem Ausschwenkrotor zentrifugiert (5 min, 1000 rcf, 37 °C). Der Zellniederschlag wurde in 10 ml Zellkulturmedium mit 10 % DM-SO resuspendiert. Die Zellsuspension wurde aliquotiert, in Kryogefäßen verteilt und langsam bei -70 °C eingefroren. Nach mindestens 24 h konnten die Gefrierkulturen in dem Behälter mit flüssigem Stickstoff eingelagert werden.

Um eine Gefrierkultur zu verwenden, wurde diese direkt in einem Wasserbad aufgetaut (37 °C) und in einer kleinen Zellkulturflasche mit vorgewärmtem Medium versetzt. Nach ca. 2 h und erneut nach 24 h wurde das Medium gewechselt.

Literatur

- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers und D. J. Lipman (1990).** “Basic local alignment search tool”. *Journal of Molecular Biology* 215.3, S. 403–410.
- Armstrong, G. A., B. Weisshaar und K. Hahlbrock (1992).** “Homodimeric and heterodimeric leucine zipper proteins and nuclear factors from parsley recognize diverse promoter elements with ACGT cores.” *The Plant Cell* 4.5, S. 525–537.
- Babu, M. M. (2003).** “Evolution of transcription factors and the gene regulatory network in *Escherichia coli*”. *Nucleic Acids Research* 31.4, S. 1234–1244.
- Baumeister, W., J. Walz, F. Zühl und E. Seemüller (1998).** “The Proteasome: Paradigm of a Self-Compartmentalizing Protease”. *Cell* 92.3, S. 367–380.
- Beijernick, M. W. (1898).** “Ueber ein Contagium vivum fluidum als Ursache der Fleckenkrankheit der Tabaksblaetter.” *Verhandelingen der Koninklijke Akademie vall Wetensellappen te Amsterdam*.
- Beyerinck, M. W. (1890).** “Culturversuche mit Zoochlorellen, Licheuengonidien und anderen niederen Algen”. *Botanische Zeitung*.
- Bhowmick, I. P., N. Kumar, S. Sharma, I. Coppens und G. K. Jarori (2009).** “Plasmodium falciparum enolase: stage-specific expression and subcellular localization”. *Malaria Journal* 8.1, S. 179.
- Blot, V. (2004).** “Nedd4.1-mediated ubiquitination and subsequent recruitment of Tsg101 ensure HTLV-1 Gag trafficking towards the multivesicular body pathway prior to virus budding”. *Journal of Cell Science* 117.11, S. 2357–2367.
- Bluthardt, N. (2017).** “Einfluss von Transkriptionsfaktoren auf die Aktivität von ATCV-1 Promotoren.” Bachelorarbeit. Universität Hohenheim.
- **(2020).** “Analyse der Aktivitaet viraler Promotoren von *Acanthocystis turfacea* Chlorella Virus 1 (ATCV-1).” Masterarbeit. Universität Hohenheim.

- Bohne, A.-V., V. Irihimovitch, A. Weihe und D. B. Stern (2006).** "Chlamydomonas reinhardtii encodes a single sigma70-like factor which likely functions in chloroplast transcription". *Current Genetics* 49.5, S. 333–340.
- Bradford, M. M. (1976).** "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Analytical Biochemistry* 72.1-2, S. 248–254.
- Browning, D. F. und S. J. W. Busby (2004).** "The regulation of bacterial transcription initiation". *Nature Reviews Microbiology* 2.1, S. 57–65.
- Bubeck, J. A. und A. J. P. Pfitzner (2005).** "Isolation and characterization of a new type of chlorovirus that infects an endosymbiotic Chlorella strain of the heliozoon Acanthocystis turfacea". *Journal of General Virology* 86, S. 2871–2877.
- Busch, H. und I. L. Goldknopf (1981).** "Ubiquitin - protein conjugates". *Molecular and Cellular Biochemistry* 40.3.
- Butler, J. E. (2002).** "The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression". *Genes & Development* 16.20, S. 2583–2592.
- Callis, J. (2014).** "The Ubiquitination Machinery of the Ubiquitin System". *The Arabidopsis Book* 12, e0174.
- Callis, J., T. Carpenter, C. W. Sun und R. D. Vierstra (1995).** "Structure and evolution of genes encoding polyubiquitin and ubiquitin-like proteins in Arabidopsis thaliana ecotype Columbia." *Genetics* 139 (2), S. 921–939. ISSN: 0016-6731.
- Chapman, A. D. (2009).** *Numbers of Living Species in Australia and the World, 2nd edition.* Report for the Australian Biological Resources Study Canberra, Australia.
- Chapman, R. L. (2010).** "Algae: the world's most important plants - an introduction". *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* 18.1, S. 5–12.
- Chau, V., J. Tobias, A. Bachmair, D. Marriott, D. Ecker, D. Gonda und A. Varshavsky (1989).** "A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein". *Science* 243.4898, S. 1576–1583.
- Ciechanover, A., S. Elias, H. Heller und A. Hershko (1982).** "Covalent affinity" purification of ubiquitin-activating enzyme." *The Journal of biological chemistry* 257 (5), S. 2537–2542. ISSN: 0021-9258.
- Ciechanover, A., H. Heller, S. Elias, A. L. Haas und A. Hershko (1980).** "ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77.3, S. 1365–1368.

- Colby, T., A. Matthäi, A. Boeckelmann und H.-P. Stuible (2006).** “SUMO-Conjugating and SUMO-Deconjugating Enzymes from Arabidopsis”. *Plant Physiology* 142.1, S. 318–332.
- Covey, S. N. und R. Hull (1981).** “Transcription of cauliflower mosaic virus DNA. Detection of transcripts, properties, and location of the gene encoding the virus inclusion body protein”. *Virology* 111.2, S. 463–474.
- Davie, J. R. und L. C. Murphy (1990).** “Level of ubiquitinated histone H2B in chromatin is coupled to ongoing transcription”. *Biochemistry* 29.20, S. 4752–4757.
- Decker, K. B. und D. M. Hinton (2013).** “Transcription Regulation at the Core: Similarities Among Bacterial, Archaeal, and Eukaryotic RNA Polymerases”. *Annual Review of Microbiology* 67.1, S. 113–139.
- Deol, K. K., S. Lorenz und E. R. Strieter (2019).** “Enzymatic Logic of Ubiquitin Chain Assembly”. *Frontiers in Physiology* 10.
- Didiasova, M., L. Schaefer und M. Wygrecka (2019).** “When Place Matters: Shuttling of Enolase-1 Across Cellular Compartments”. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 7.
- Dikic, I., S. Wakatsuki und K. J. Walters (2009).** “Ubiquitin-binding domains - from structures to functions”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10.10, S. 659–671.
- Dröge-Laser, W., B. L. Snoek, B. Snel und C. Weiste (2018).** “The Arabidopsis bZIP transcription factor family -an update”. *Current Opinion in Plant Biology* 45, S. 36–49.
- Dunin-Horkawicz, S., M. Feder und J. M. Bujnicki (2006).** “Phylogenomic analysis of the GIY-YIG nuclease superfamily”. *BMC Genomics* 7.1.
- Eagle, P. A. und L. Hanley-Bowdoin (1997).** “cis elements that contribute to geminivirus transcriptional regulation and the efficiency of DNA replication.” *Journal of virology* 71.9, S. 6947–6955.
- Ellenberger, T. (1994).** “Getting a grip on DNA recognition: structures of the basic region leucine zipper, and the basic region helix-loop-helix DNA-binding domains”. *Current Opinion in Structural Biology* 4.1, S. 12–21.
- Engel, C., S. Sainsbury, A. C. Cheung, D. Kostrewa und P. Cramer (2013).** “RNA polymerase I structure and transcription regulation”. *Nature* 502.7473, S. 650–655.
- Fields, S. und O.-k. Song (1989).** “A novel genetic system to detect protein-protein interactions”. *Nature* 340.6230, S. 245–246.
- Fitzgerald, L. A., P. T. Boucher, G. M. Yanai-Balser, K. Suhre, M. V. Graves und J. L. van Etten (2008).** “Putative gene promoter sequences in the chlorella viruses”. *Virology* 380.2, S. 388–393.

- Fitzgerald, L. A., M. V. Graves, X. Li, J. Hartigan, A. J. Pfitzner, E. Hoffart und J. L. van Etten (2007).** “Sequence and annotation of the 288-kb ATCV-1 virus that infects an endosymbiotic chlorella strain of the heliozoon *Acanthocystis turfacea*”. *Virology* 362.2, S. 350–361.
- Franco-Zorrilla, J. M., I. López-Vidriero, J. L. Carrasco, M. Godoy, P. Vera und R. Solano (2014).** “DNA-binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111.6, S. 2367–2372.
- Freemont, P. S., I. M. Hanson und J. Trowsdale (1991).** “A novel cysteine-rich sequence motif”. *Cell* 64.3, S. 483–484.
- Gatz, C. (2013).** “From Pioneers to Team Players: TGA Transcription Factors Provide a Molecular Link Between Different Stress Pathways”. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26.2, S. 151–159.
- Gaur, R. K., T. Hohn und P. Sharma (2014).** *Plant Virus-Host Interaction. Molecular Approaches and Viral Evolution.*
- Geng, F., S. Wenzel und W. P. Tansey (2012).** “Ubiquitin and Proteasomes in Transcription”. *Annual Review of Biochemistry* 81.1, S. 177–201.
- Gershenson, N. I. und I. P. Ioshikhes (2004).** “Synergy of human Pol II core promoter elements revealed by statistical sequence analysis”. *Bioinformatics* 21.8, S. 1295–1300.
- Goldstein, G., M. Scheid, U. Hammerling, D. H. Schlesinger, H. D. Niall und E. A. Boyse (1975).** “Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72.1, S. 11–15.
- Graw, J. (2006).** *Genetik*. 4. Aufl. Springer Verlag Heidelberg Berlin.
- Grou, C. P., M. P. Pinto, A. V. Mendes, P. Domingues und J. E. Azevedo (2015).** “The de novo synthesis of ubiquitin: identification of deubiquitinases acting on ubiquitin precursors”. *Scientific Reports* 5.1.
- Guarino, L. A. (1990).** “Identification of a viral gene encoding a ubiquitin-like protein.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87.1, S. 409–413.
- Guiry, M. D. (2012).** “How many species of algae are there?” *Journal of Phycology* 48.5, S. 1057–1063.
- Guiry, M. D., in Guiry, M. D. Guiry und G. M. Guiry (2020).** *AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway.* Hrsg. von <http://www.algaebase.org> und searched on 17 July 2020. URL: http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=153777.

- Haberle, V. und B. Lenhard (2016).** “Promoter architectures and developmental gene regulation”. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 57, S. 11–23.
- Han, Y., C. Yan, S. Fishbain, I. Ivanov und Y. He (2018).** “Structural visualization of RNA polymerase III transcription machineries”. *Cell Discovery* 4.1.
- Harris, E. H. (2001).** “Chlamydomonas as a model organism”. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52.1, S. 363–406.
- He, Y., C. Yan, J. Fang, C. Inouye, R. Tjian, I. Ivanov und E. Nogales (2016).** “Near-atomic resolution visualization of human transcription promoter opening”. *Nature* 533.7603, S. 359–365.
- Hershko, A., A. Ciechanover, H. Heller, A. L. Haas und I. A. Rose (1980).** “Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77.4, S. 1783–1786.
- Hershko, A., H. Heller, S. Elias und A. Ciechanover. (1983).** “Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown.” *The Journal of biological chemistry* 258 13, S. 8206–14.
- Hicke, L. (2001).** “Protein regulation by monoubiquitin”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2.3, S. 195–201.
- Hohn, B. und T. Hohn (1982).** “Cauliflower Mosaic Virus: A Potential Vector for Plant Genetic Engineering”. *Molecular Biology of Plant Tumors*. Elsevier, S. 549–560.
- Holton, T. A. und M. W. Graham (1991).** “A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors”. *Nucleic Acids Research* 19.5, S. 1156–1156.
- Hooper, J. K. (1989).** “The Chlamydomonas Sourcebook. A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use.” *Science* 246.4936, S. 1503–1504.
- Hough, R., G. Pratt und M. Rechsteiner (1987).** “Purification of two high molecular weight proteases from rabbit reticulocyte lysate.” *The Journal of biological chemistry* 262 (17), S. 8303–8313. ISSN: 0021-9258.
- Hua, Z. und R. D. Vierstra (2011).** “The Cullin-RING Ubiquitin-Protein Ligases”. *Annual Review of Plant Biology* 62.1, S. 299–334.
- Hulo, C., E. de Castro, P. Masson, L. Bougueleret, A. Bairoch, I. Xenarios und P. L. Mercier (2010).** “ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity”. *Nucleic Acids Research* 39.suppl_1, S. D576–D582.
- ICTV-Taxonomy (21. Sep. 2020).** *Virus Taxonomy 2019 Release*. Hrsg. von I. C. on Taxonomy of Viruses. URL: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>.

- Im, H. (2011).** “The Inoue Method for Preparation and Transformation of Competent *E. coli*: “Ultra Competent” Cells”. *BIO-PROTOCOL* 1.20.
- Isaacson, M. K. und H. L. Ploegh (2009).** “Ubiquitination, Ubiquitin-like Modifiers, and Deubiquitination in Viral Infection”. *Cell Host & Microbe* 5.6, S. 559–570.
- Iyer, L. M., L. Aravind und E. V. Koonin (2001).** “Common Origin of Four Diverse Families of Large Eukaryotic DNA Viruses”. *Journal of Virology* 75.23, S. 11720–11734.
- Izawa, T., R. Foster und N.-H. Chua (1993).** “Plant bZIP Protein DNA Binding Specificity”. *Journal of Molecular Biology* 230.4, S. 1131–1144.
- Jakoby, M., B. Weisshaar, W. Dröge-Laser, J. Vicente-Carbajosa, J. Tiedemann, T. Kroj und F. Parcy (2002).** “bZIP transcription factors in Arabidopsis”. *Trends in Plant Science* 7.3, S. 106–111.
- Jin, J., F. Tian, D.-C. Yang, Y.-Q. Meng, L. Kong, J. Luo und G. Gao (2016).** “PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants”. *Nucleic Acids Research* 45.D1, S. D1040–D1045.
- Kampen, J. von und M. Wetterm (1992).** “Ubiquitin-abhängige Degradation und Modifikation von Proteinen”. *Naturwissenschaften* 79, S. 163–170.
- Kampen, J. von, U. Nieländer und M. Wetterm (1995).** “Expression of ubiquitin genes in *Chlamydomonas reinhardtii*: involvement in stress response and cell cycle”. *Planta* 197.3, S. 528–534.
- Kang, M., D. D. Dunigan und J. L. van Etten (2005).** “Chlorovirus: a genus of Phycodnaviridae that infects certain chlorella-like green algae”. *Molecular Plant Pathology* 6.3, S. 213–224.
- Kang, M., M. Graves, M. Mehmel, A. Moroni, S. Gazzarrini, G. Thiel, J. R. Gurnon und J. L. van Etten (2004).** “Genetic diversity in chlorella viruses flanking *key*, a gene that encodes a potassium ion channel protein”. *Virology* 326.1, S. 150–159.
- Kang, M., H. Abdelmageed, S. Lee, A. Reichert, K. S. Mysore und R. D. Allen (2013).** “AtMBP-1, an alternative translation product of LOS2, affects abscisic acid responses and is modulated by the E3 ubiquitin ligase AtSAP5”. *The Plant Journal* 76.3, S. 481–493.
- Katagiri, F., E. Lam und N.-H. Chua (1989).** “Two tobacco DNA-binding proteins with homology to the nuclear factor CREB”. *Nature* 340.6236, S. 727–730.
- Kawasaki, T., M. Tanaka, M. Fujie, S. Usami und T. Yamada (2004).** “Immediate early genes expressed in chlorovirus infections”. *Virology* 318.1, S. 214–223.

- Kimura, Y. und K. Tanaka (2010).** “Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis”. *Journal of Biochemistry* 147.6, S. 793–798.
- Kindle, K. L. (1990).** “High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87.3, S. 1228–1232.
- Kogan, P. H. und G. W. Blissard (1994).** “A baculovirus gp64 early promoter is activated by host transcription factor binding to CACGTG and GATA elements.” *Journal of virology* 68 (2), S. 813–822. ISSN: 0022-538X.
- Koonin, E. V. und N. Yutin (2010).** “Origin and Evolution of Eukaryotic Large Nucleo-Cytoplasmic DNA Viruses”. *Intervirology* 53.5, S. 284–292.
- Kozak, M. (1987).** “An analysis of 5-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs”. *Nucleic Acids Research* 15.20, S. 8125–8148.
- Kremers, G. J., J. Goedhart, E. B. van Munster, J. Theodorus W. und G. Jr (2006).** “Cyan and Yellow Super Fluorescent Proteins with Improved Brightness, Protein Folding, and FRET Forster Radius”. *Biochemistry* 45, S. 6570–6580.
- Krishnamurthy, S. und M. Hampsey (2009).** “Eukaryotic transcription initiation”. *Current Biology* 19.4.
- Krix, V. (2020).** “Analyse der Promotoraktivität von Genen des *Acanthocystis turfacea* Chlorella Virus 1 (ATCV-1) in *Chlamydomonas reinhardtii*.” Bachelorarbeit. Universität Hohenheim.
- Laemmli, U. K. (1970).** “Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4”. *Nature* 227.5259, S. 680–685.
- Lambert, S. A., A. Jolma, L. F. Campitelli, P. K. Das, Y. Yin, M. Albu, X. Chen, J. Taipale, T. R. Hughes und M. T. Weirauch (2018).** “The Human Transcription Factors”. *Cell* 172.4, S. 650–665.
- Landschulz, W. H., P. Johnson und S. McKnight (1988).** “The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins”. *Science* 240.4860, S. 1759–1764.
- Lee, H. (2002).** “LOS2, a genetic locus required for cold-responsive gene transcription encodes a bi-functional enolase”. *The EMBO Journal* 21.11, S. 2692–2702.
- Lewin, B. (2002).** *Molekularbiologie der Gene*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin.
- Li, F. N. (1997).** “Grr1 of *Saccharomyces cerevisiae* is connected to the ubiquitin proteolysis machinery through Skp1: coupling glucose sensing to gene expression and the cell cycle”. *The EMBO Journal* 16.18, S. 5629–5638.

- Liu, W., X. Tang, X. Qi, X. Fu, S. Ghimire, R. Ma, S. Li, N. Zhang und H. Si (2020)**. “The Ubiquitin Conjugating Enzyme: An Important Ubiquitin Transfer Platform in Ubiquitin-Proteasome System”. *International Journal of Molecular Sciences* 21.8, S. 2894.
- Luo, Y., S. Vijaychand, J. Stile und L. Zhu (1996)**. “Construction of a Reporter Plasmid that Allows Expression Libraries to be Exploited for the One-Hybrid System.” *Benchmarks* 20.4, S. 568–573.
- Lwoff, A. (1957)**. “The Concept of Virus”. *Microbiology* 17.2, S. 239–253.
- Mandili, G., A. Khadjavi, V. Gallo, V. G. Minero, L. Bessone, F. Carta, G. Giribaldi und F. Turrini (2012)**. “Characterization of the protein ubiquitination response induced by Doxorubicin”. *FEBS Journal* 279.12, S. 2182–2191.
- Masson, P., C. Hulo, E. de Castro, R. Foulger, S. Poux, A. Bridge, J. Lomax, L. Bougueleret, I. Xenarios und P. L. Mercier (2014)**. “An Integrated Ontology Resource to Explore and Study Host-Virus Relationships”. *PLoS ONE* 9.9. Hrsg. von M. L. Baker, e108075.
- Mazzucotelli, E., S. Belloni, D. Marone, A. D. Leonardis, D. Guerra, N. D. Fonzo, L. Cattivelli und A. Mastrangelo (2006)**. “The E3 Ubiquitin Ligase Gene Family in Plants: Regulation by Degradation”. *Current Genomics* 7.8, S. 509–522.
- Meints, R. H., K. Lee, D. E. Burbank und J. L. van Etten (1984)**. “Infection of a chlorella-like alga with the virus, PBCV-1: Ultrastructural studies”. *Virology* 138.2, S. 341–346.
- Meints, R. H., K. Lee und J. L. van Etten (1986)**. “Assembly site of the virus PBCV-1 in a Chlorella-like green alga: Ultrastructural studies”. *Virology* 154.1, S. 240–245.
- Melchior, F. (2000)**. “SUMO-Nonclassical Ubiquitin”. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16.1, S. 591–626.
- Mersereau, M., G. J. Pazour und A. Das (1990)**. “Efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation”. *Gene* 90.1, S. 149–151.
- Metzger, M. B., J. N. Pruneda, R. E. Klevit und A. M. Weissman (2014)**. “RING-type E3 ligases: Master manipulators of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitination”. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843.1, S. 47–60.
- Milrot, E., Y. Mutsafi, Y. Fridmann-Sirkis, E. Shimoni, K. Rechav, J. R. Gurnon, J. L. van Etten und A. Minsky (2015)**. “Virus-host interactions: insights from the replication cycle of the large *Paramecium bur-saria* chlorella virus”. *Cellular Microbiology* 18.1, S. 3–16.

- Murashige, T. und F. Skoog (1962)**. “A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures”. *Physiologia Plantarum* 15.3, S. 473–497.
- NCBI-Genbank (21. Sep. 2020)**. *NCBI Genbank, Taxonomy Browser*. Hrsg. von U. S. N. L. of Medicine. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=181083&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock>.
- Ng, R. W., T. Arooz, C. H. Yam, I. W. Chan, A. W. Lau und R. Y. Poon (1998)**. “Characterization of the cullin and F-box protein partner Skp1”. *FEBS Letters* 438.3, S. 183–189.
- Nicholson, L. K., C. Wang, J. Xi und T. P. Begley (2001)**. “Solution structure of ThiS and implications for the evolutionary roots of ubiquitin”. *Nature Structural Biology* 8.1, S. 47–51.
- Noel, E. A., M. Kang, J. Adamec, J. L. van Etten und G. A. Oyler (2014)**. “Chlorovirus Skp1-Binding Ankyrin Repeat Protein Interplay and Mimicry of Cellular Ubiquitin Ligase Machinery”. *Journal of Virology* 88.23, S. 13798–13810.
- Nowak, C. J. A. (2019)**. “Analyse viraler Gene in der humanen Zelllinie HEK293.” Bachelorarbeit. Universität Hohenheim.
- Oezkaynak, E., D. Finley und A. Varshavsky (1984)**. “The yeast ubiquitin gene: head-to-tail repeats encoding a polyubiquitin precursor protein”. *Nature* 312.5995, S. 663–666.
- Oliveira, G., A. Andrade, R. Rodrigues, T. Arantes, P. Boratto, L. Silva, F. Dornas, G. Trindade, B. Drumond, B. L. Scola, E. Kroon und J. Abrahão (2017)**. “Promoter Motifs in NCLDVs: An Evolutionary Perspective”. *Viruses* 9.1, S. 16.
- Ormo, M., A. B. Cubitt, K. Karen, L. A. Gross, Y. Roger und S. J. Remington (1996)**. “Crystal Structure of the Aequorea victoria Green Fluorescent Protein”. *Science* 273, S. 1392–1395.
- Pickart, C. M. (2001)**. “Mechanisms Underlying Ubiquitination”. *Annual Review of Biochemistry* 70.1, S. 503–533.
- Pickart, C. M. und M. J. Eddins (2004)**. “Ubiquitin: structures, functions, mechanisms”. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1695.1-3, S. 55–72.
- Polle, J., P. Neofotis, A. Huang, W. Chang, K. Sury und E. Wiech (2014)**. “Carbon Partitioning in Green Algae (Chlorophyta) and the Enolase Enzyme”. *Metabolites* 4.3, S. 612–628.
- Prabhakar, V., T. Löttgert, T. Gigolashvili, K. Bell, U.-I. Flügge und R. E. Häusler (2009)**. “Molecular and functional characterization of the plastid-localized Phosphoenolpyruvate enolase (ENO1) from *Arabidopsis thaliana*”. *FEBS Letters* 583.6, S. 983–991.

- Pröschold, T., T. Darienko, P. C. Silva, W. Reisser und L. Krienitz (2010).** “The systematics of *Zoochlorella* revisited employing an integrative approach”. *Environmental Microbiology* 13.2, S. 350–364.
- Purton, S. und J. Rochaix (1995).** “Characterisation of the ARG7 gene of *Chlamydomonas reinhardtii* and its application to nuclear transformation”. *European Journal of Phycology* 30, S. 141–148.
- Qin, J., G. Chai, J. M. Brewer, L. L. Lovelace und L. Lebioda (2006).** “Fluoride Inhibition of Enolase: Crystal Structure and Thermodynamics.” *Biochemistry* 45.3, S. 793–800.
- Qingzhen, Z., L. Lijing und X. Qi (2011).** “In Vitro Protein Ubiquitination Assay”. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, S. 163–172.
- Randow, F. und P. J. Lehner (2009).** “Viral avoidance and exploitation of the ubiquitin system”. *Nature Cell Biology* 11.5, S. 527–534.
- Riano-Pachon, D. M., L. G. G. Corrêa, R. Trejos-Espinosa und B. Mueller-Roeber (2008).** “Green Transcription Factors: A *Chlamydomonas* Overview”. *Genetics* 179.1, S. 31–39.
- Rogers, S. O. und A. J. Bendich (1989).** “Extraction of DNA from plant tissues.” In: *Gelvin S.B., Schilperoort R.A., Verma D.P.S. (eds) Plant Molecular Biology Manual*.
- Rohr, O., C. Marban, D. Aunis und E. Schaeffer (2003).** “Regulation of HIV-1 gene transcription: from lymphocytes to microglial cells”. *Journal of Leukocyte Biology* 74.5, S. 736–749.
- Sabaratnam, K., M. Renner, G. Paesen, K. Harlos, V. Nair, R. J. Owens und J. M. Grimes (2019).** “Insights from the crystal structure of the chicken CREB3 bZIP suggest that members of the CREB3 subfamily transcription factors may be activated in response to oxidative stress”. *Protein Science* 28.4, S. 779–787.
- Saeki, Y., T. Kudo, T. Sone, Y. Kikuchi, H. Yokosawa, A. Toh-e und K. Tanaka (2009).** “Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome”. *The EMBO Journal* 28.4, S. 359–371.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis und H. A. Erlich (1988).** “Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase”. *Science* 239 (4839), S. 487–491.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis (1989).** *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*.
- Sarikas, A., T. Hartmann und Z.-Q. Pan (2011).** “The cullin protein family”. *Genome Biology* 12.4, S. 220.

- Sato, Y., T. Kamura, N. Shirata, T. Murata, A. Kudoh, S. Iwahori, S. Nakayama, H. Isomura, Y. Nishiyama und T. Tsurumi (2009).** “Degradation of Phosphorylated p53 by Viral Protein-ECS E3 Ligase Complex”. *PLoS Pathogens* 5.7. Hrsg. von B. Sugden, e1000530.
- Saur, M. (2015).** “Expression and target proteins of Z339L, a viral SKP1 Protein from *Acanthocystis turfacea* Chlorella Virus.” Masterarbeit. Universität Hohenheim.
- Schier, A. C. und D. J. Taatjes (2020).** “Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery”. *Genes & Development* 34.7-8, S. 465–488.
- Schindler, U., H. Beckmann und A. R. Cashmore (1992).** “TGA1 and G-box binding factors: two distinct classes of Arabidopsis leucine zipper proteins compete for the G-box-like element TGACGTGG.” *The Plant Cell* 4.10, S. 1309–1319.
- Schörg, B. F. (2013).** “Vergleichende Analyse zweier Suppressoren des "Gene Silencings in Pflanzen am Beispiel eines DNA- und eines RNA-Virus.” Diplomarbeit. Universität Hohenheim.
- Schuster, A. M., L. Girton, D. E. Burbank und J. L. van Etten (1986).** “Infection of a Chlorella-like alga with the virus PBCV-1: Transcriptional studies”. *Virology* 148.1, S. 181–189.
- Sedoris, K. C., S. D. Thomas und D. M. Miller (2010).** “Hypoxia induces differential translation of enolase/MBP-1”. *BMC Cancer* 10.1.
- Shevade, S., N. Jindal, S. Dutta und G. K. Jarori (2013).** “Food Vacuole Associated Enolase in Plasmodium Undergoes Multiple Post-Translational Modifications: Evidence for Atypical Ubiquitination”. *PLoS ONE* 8.8. Hrsg. von R. Waller, e72687.
- Shimogawara, K. und S. Muto (1992).** “Purification of Chlamydomonas 28-kDa ubiquitinated protein and its identification as ubiquitinated histone H2B”. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 294.1, S. 193–199.
- Shimomura, O., F. Johnson und Y. Saiga (1962).** “Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, *Aequorea*.” *National Science Foundation*.
- Sievers, F., A. Wilm, D. Dineen, T. J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Söding, J. D. Thompson und D. G. Higgins (2011).** “Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega”. *Molecular Systems Biology* 7.1, S. 539.
- Song, Y., X. Shi, Y. Zou, J. Guo, N. Huo, S. Chen, C. Zhao, H. Li, G. Wu und Y. Peng (2020).** “Proteome-wide identification and functional analysis of ubiquitinated proteins in peach leaves”. *Scientific Reports* 10.1.

- Sowden, J., K. Morrison, J. Schofield, W. Putt und Y. Edwards (1995).** “A Novel cDNA with Homology to an RNA Polymerase II Elongation Factor Maps to Human Chromosome 5q31 (TCEB1L) and to Mouse Chromosome 11 (Tceb1l)”. *Genomics* 29.1, S. 145–151.
- Sperling, N. (2008).** “Transkriptionsregulation von Genen des ATCV (Acanthocystis turfacea Chlorella Virus).” Diplomarbeit. Universität Hohenheim.
- Spielewoy, N., K. Flick, T. I. Kalashnikova, J. R. Walker und C. Wittenberg (2004).** “Regulation and Recognition of SCF_{Grr1} Targets in the Glucose and Amino Acid Signaling Pathways”. *Molecular and Cellular Biology* 24.20, S. 8994–9005.
- Stapf, L. (2019).** “Analyse der Promotoraktivitaet von Genen des Acanthocystis turfacea Chlorella Virus 1.” Masterarbeit. Universität Hohenheim.
- Stark, J. (2014).** “Characterisation of expression and interaction partners of Z292L, a viral RING finger ubiquitin ligase from Acanthocystis turfacea chlorella virus,” Masterarbeit. Universität Hohenheim.
- Stegen, B. (2011).** “Analyse der Promotoraktivität von *Acanthocystis turfacea Chlorella Virus* - Genen in *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Chlamydomonas reinhardtii*.” Diplomarbeit. Universität Hohenheim.
- Steverding, D. (2012).** “Proteasom-Inhibitoren”. *Chemie in unserer Zeit* 46.4, S. 218–227.
- Thrower, J. S. (2000).** “Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal”. *The EMBO Journal* 19.1, S. 94–102.
- Tian, F., D.-C. Yang, Y.-Q. Meng, J. Jin und G. Gao (2019).** “Plant-RegMap: charting functional regulatory maps in plants”. *Nucleic Acids Research*.
- Törner, G., V. Gondek, A. Braune und H. Kerstan (2011).** *Vorlage DissOnlineLatex, Vorlage zur Erstellung digitaler Dissertationen*. Hrsg. von D.-P. DissOnlineTutor. Universität Duisburg-Essen, Standort Duisburg, Fachbereich Mathematik.
- Traven, A., B. Jelcic und M. Sopta (2006).** “Yeast Gal4: a transcriptional paradigm revisited”. *EMBO reports* 7.5, S. 496–499.
- Tyler, L. (2015).** “Z203L - ein physiologisch aktives Ubiquitin in eukaryotischen Zellen?” Bachelorarbeit. Universität Hohenheim.
- van Etten, J. L., D. E. Burbank und D. K. R. H. Meints (1983a).** “Virus Infection of Culturable Chlorella-Like Algae and Development of a Plaque Assay”. *Science* 219.4587, S. 994–996.
- van Etten, J. L. (2003).** “Unusual Life Style of Giant Chlorella Viruses”. *Annual Review of Genetics* 37.1, S. 153–195.

- van Etten, J. L., D. E. Burbank, J. Joshi und R. H. Meints (1984).** “DNA synthesis in a *Chlorella*-like alga following infection with the virus PBCV-1”. *Virology* 134.2, S. 443–449.
- van Etten, J. L., D. E. Burbank, Y. Xia und R. H. Meints (1983b).** “Growth cycle of a virus, PBCV-1, that infects *Chlorella*-like algae”. *Virology* 126.1, S. 117–125.
- van Etten, J. L. und D. D. Dunigan (2012).** “Chloroviruses: not your everyday plant virus”. *Trends in Plant Science* 17.1, S. 1–8.
- Varshavsky, A. (2006).** “The early history of the ubiquitin field”. *Protein Science* 15.3, S. 647–654.
- Voges, D., P. Zwickl und W. Baumeister (1999).** “The 26S Proteasome: A Molecular Machine Designed for Controlled Proteolysis”. *Annual Review of Biochemistry* 68.1, S. 1015–1068.
- Wahl, B. (2019).** “Analyse der Aktivität früher, viraler Promotoren von *Acanthocystis turfacea* *Chlorella* Virus 1 (ATCV-1) am Beispiel der Gene Z765R und Z798L.” Masterarbeit. Universität Hohenheim.
- Wang, S.-B., F. Chen, M. Sommerfeld und Q. Hu (2004).** “Proteomic analysis of molecular response to oxidative stress by the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae)”. *Planta* 220.1, S. 17–29.
- Waterhouse, A., M. Bertoni, S. Bienert, G. Studer, G. Tauriello, R. Gumienny, F. T. Heer, T. A. de Beer, C. Rempfer, L. Bordoli, R. Lepore und T. Schwede (2018).** “SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes”. *Nucleic Acids Research* 46.W1, W296–W303.
- Welchman, R. L., C. Gordon und R. J. Mayer (2005).** “Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6.8, S. 599–609.
- Whitaker-Dowling, P. und J. S. Youngner (1999).** “VIRUS-HOST CELL INTERACTIONS”. *Encyclopedia of Virology*. Elsevier, S. 1957–1961.
- Wilkinson, K. D. (1997).** “Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes”. *The FASEB Journal* 11.14, S. 1245–1256.
- Witte, S. (2014).** “Research Report”. Universität Hohenheim.
- Woesten, M. (1998).** “Eubacterial sigma-factors”. *FEMS Microbiology Reviews* 22.3, S. 127–150.
- Wucherer, V. (2018).** “Einfluss von G-Box-Bindefaktoren auf die Aktivität viraler Promotoren der ORFs Z174L und Z326R von *Acanthocystis turfacea* *Chlorella* Virus - 1 in Protoplasten.” Bachelorarbeit. Universität Hohenheim.

- Xiang-Chun, D., Y. Xiao-qing, Y. Ting-Ting, L. Zhen-Hui, L. Xiao-Yan, L. Xia, H. Yan-Chao, Y. Yi-Xuan und M. Li-Na (2017).** “Alpha-enolase regulates hepatitis B virus replication through suppression of the interferon signalling pathway”. *Journal of Viral Hepatitis* 25.3, S. 289–295.
- Yanai-Balser, G. M., G. A. Duncan, J. D. Eudy, D. Wang, X. Li, I. V. Agarkova, D. D. Dunigan und J. L. van Etten (2010).** “Microarray Analysis of Paramecium bursaria Chlorella Virus 1 Transcription.” *JOURNAL OF VIROLOGY* 84.1, S. 532–542.
- Yolken, R. H. et al., (2014).** “Chlorovirus ATCV-1 is part of the human oropharyngeal virome and is associated with changes in cognitive functions in humans and mice”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111.45, S. 16106–16111.
- Zheng, N. und N. Shabek (2017).** “Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation”. *Annual Review of Biochemistry* 86.1, S. 129–157.
- Zhou, M. und J. A. Law (2015).** “RNA Pol IV and V in gene silencing: Rebel polymerases evolving away from Pol II’s rules”. *Current Opinion in Plant Biology* 27, S. 154–164.
- Zimmermann, L., A. Stephens, S.-Z. Nam, D. Rau, J. Kübler, M. Lozajic, F. Gabler, J. Söding, A. N. Lupas und V. Alva (2018).** “A Completely Reimplemented MPI Bioinformatics Toolkit with a New HHpred Server at its Core”. *Journal of Molecular Biology* 430.15, S. 2237–2243.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ad.	auffüllen auf
AG	Arbeitsgruppe
AS	Aminosäure
as-1	<i>activation sequence 1</i>
ATP	Adenosintri-phosphat
ATCV	<i>Acanthocystis turfacea Chlorella Virus</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
bZIP	<i>basic leucine zipper</i> , Leucin-Zipper Transkriptionsfaktoren
beta-Gal	auch β -Gal, β -Galactosidase
BSA	Bovines Serumalbumin
BTB	<i>broad complex tramtrack bric-à-brac</i>
C	Cytosin
CaMV	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i> , Blumenkohlmosaikvirus
CREB	<i>cyclic AMP-responsive element-binding protein</i>
CTAB	Hexadecyltrimethyl-ammoniumbromid
d	<i>day</i> , Tag
Da	Dalton, Einheit für Molekulargewichte
del	Deletion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphate
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	lat. <i>et alia</i> , und andere
5-FU	5-Fluorouracil
G	Guanin
GBF	G-Box bindender Faktor
GFP	<i>green fluorescent protein</i>

GRR1	<i>Glucose Repression-Resistant 1</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
GUS	β -Glucoronidase
h	<i>hour</i> , Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny1)-ethansulfonsäure
IgG	Immunoglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
kb	Kilobasen
L.	Nomenklatur nach Carl von Linné
LSU	Große Untereinheit von RuBisCo
M	Molar
MCS	<i>multiple cloning site</i> , multiple Klonierungsstelle
mp	Minimalpromotor
MU	4-Methylumbeliferon
ME	Miller Einheiten
MW	Mittelwert
min	Minute
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NIMIN	Protein NIM1-INTERACTING 1
NPR1	<i>Nonexpresser of PR genes 1</i>
OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
oNPG	o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Polyacrylamidgelelektrophorese
PBCV	<i>Paramecium busaria Chlorella Virus</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PCR	Polymerasekettenreaktion
pro	Promotor
RuBisCo	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
RNA	Ribonukleinsäure
RING	<i>really interesting new gene</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur

s	Sekunde
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumlaurylsulfat
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TGA	TGACG <i>motif-binding factor</i>
TE	Tris-EDTA
TF	Transkriptionsfaktor
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol
TSS	<i>transcript start site</i> , Transkriptionsstart
U	<i>Unit</i>
Ub	Ubiquitin
UV	Ultraviolett
var.	variabel
wt	Wildtypisch
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
Y1H	<i>yeast-one-hybrid</i> , Hefe-Ein-Hybrid System
Y2H	<i>yeast-two-hybrid</i> , Hefe-Zwei-Hybrid System
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>

Nicht übersetzbare und englische Begriffe sind *kursiv* dargestellt.

Anhang A

A.1 DNA-Sequenzen - Promotoren

proZ063L

ACATACTGCAAGTGACAAAGGAAGCTGCTTCAAATGACAAAAGAAGCTGGCTTCAGACTAC
ACTGCCTGGCCACAGACTGCAAGTGACAAAGGAAGCTGCTTCAAATGACAAAAGAAGCTGG
CTTCAGACTACACTGCCTGGCCACAGACTGCAAGTGACAAAGGAAGCTTCTTCAAATGACA
AAAGAACTGGCTTCAGACTACACTGCCTGGCCACAGACTGCAAGTGACAAAGGAAGCTTC
TTCAAATGACAAAAGAACTGGCTTCAGACTACACTGCCTGGCCACAGACTTCAGGCGACA
AAGGAAGCTACTTCAAATGACAAGGAAGCTACTTCAAATGACAAGGAAGCTACTTCAAATG
ACAATATGACAATATGACAACAGGTGGGTACAAAATGCAGTGAACGTACATAACTTATACAA
AGTTACGT

proZ134L

CTGCTTCTAAACCGATGACTTCATTGCGCTCTTTGAATGTCTCGTTAGCCATGAGCTGGAT
AAGAGCGCCGCTCATTGTTTAATCCAAGGAAACAAATTTTCTTGTAATCCTCCCAGGAAA
CTTGAGAGACAGCATAAACCCAGGTCACGATAGCGTACAGCCACATCAGCTTCCGAGAAC
TCCGTCGGGGACGTTGTATATCTTCGACACGAACTTGTGCACATATGATTTCGTCACCAGAA
CAGCCCCGAATGTGTTTTCTAGGACAGTTAGAAATGCACGAGTCGTCCAGGATGATCCAGT
GCAATACGATTACGGGCATGAGCACCACGTAACCTTACTTGCAGTTCTTTGTGAA

proZ174L

ATAGTGAAAGGCGCAGTTGCCACCATGGACCCAAAACGAAGAAGGTAAATTACGAGACCA
CGATTTACACGGTATACTACAATCTAACCGACCGTACCGTGATGCTCAAGGACTATGCCAA
CCAGAATATTAGGGTTCTGTGATGACGTGGCATTGTCATTTGTGTTTGTGATTTGACCCCG
AGTCAGCTTGTGTATAAAAGCCTGCCTCTGGAGTGTTCCTTCCACCAACCATCAACAACCTT
CCTTTGCTAAGCAAGCAAATTCCCAACACCCAACC

proZ280L

ATCAGGGAAGTCGTCGGGTATGAGGGGGGCATCGTGTTTTGACACGAGCAAGCCTGACGGAA
CACCTGTGAAAATCATGGACTGTTCCAAGGCGCACGGTCTTGGGTGAAACCGGAGCTGTC
CCTGAGGGAACTGTAGAACTTGTCTTTGAAGATTTCTCTGACAATTATGAGAGATATTGC
AAAAGTCACAGAATTGATACATAAAGTCGCAGAAAAATGACAAAAAAGTATGTAAAAACG
TTTACGTTGCACAAATTCGCTTAAAATCTAAAAAATAATTTTATAGAGTTATAAGAC

proZ326R

ACATCGGATGCAAACCAGGTGTTCAAGGTGAAGTCAGTAAAGAATAACAACACGGTTTTTCC
AAAAGTACCTGTACGATGTGCGAAAAGGTGGTAAATAAGACCACTATGAACGCGCTCATTTC
GGCAAACGAACAGGAGTCCGGTGAAAGAGACATACACATGCAAGTGCGGGCGGACGTGCGGAC
GTTGACGTGGCAGAAAACATGCTCGTGTGCAACGAATGCGGTGCAACAGAAGTGTACACGG
AGTCGTAICTGTTTTACGAGCAGAATGACTCGATGGCGTACAAACGCTCTAGCCACTTTTC
GGA

proZ765R

TGCACACAGGGTTCAACTCATTGGCGATTTTGACACGTAATGTGTAATCGTATCTTAT
CTTATCTTAATTTGCAATAATACAGTTGTAGTATTGCAATGCTGACGTGGTTGTCATTTGC
TGACGTGGTTGTCATTTGACCCAGGCGACCAATTGCGTATAAATCCCAGGACCCACAGTG
TTTTTTATCAAACACTTCAAACCTGTCTGCCACAACCTCCGATT

proZ798L

GTGGCAGGGAGAAGGTGAGCACACGCGGGCCGTGAACCCGTCGACGGGCGAAGTGTTCGTG
GCCGTGAACCTCAGGTAATACAGGCCCGCTGAAAGTAGAAACCCCTGCTCGGAGATGCAACGG
AAGCCAAAGAAAACTGGGGTGGTGCAGGACATCTTTCGAAGACCTCGTCAAAGAAAT
GGCTCTTGCTGATCTGGAAATGCCAAGAGGGAATGACGTGGCAGTTATATTGACACACCG
GGTATATAAGGACGTTACGACACCAGTTCTGTAAAATTATC

proARG7

CGAGGAGGAGGTGCAAGGGGGATACCAGCGCGTGTTCCTCAGGGCCTGTGTGGGACACCGA
AACGTGGTAAAAGAGACCCGCCCGCAACTGTGTATGTGGAGTAGCGTGGCGTGTGCGGCC
GGACCGACAAGGCAGCTTGTGGACTGCCCCACGTTGCAGAGTCAGCTGACAACGACACGTG
CGCCTTCCTGTCAATGCCCCGTGCGCACGCACGTCTCCGCACTCCCAACAAATTGACAGCG
ACACGTGCGCCTTCCTATAAGCCTATGCCCGCACACGCTCCCGCGCCCTCAGGTGTGCGGC
CAGACCACAGACCGGTTGGTCCACGAGTGCAGGAGGATGAGGCGGGCGGCTGCGGCGGGC
CCGGCGGGGCGCCGCGGCGAGGAGGACGGCCTGGGACTGGGCATCACAGGTGGGTGGCAGG
CTGGCAGGGACTCACGCATGGGCCCTTGTACGTGACTGCGGTTCTGCATGGCTAGTGGCTCA
CGCGCTGCGCACGTTACGTACGGCTTGTGGGCATGCAGTGCCCTTGACGTGAGGCTGCGCT
GCCTTGCTGCTGCCGCTTGCCTCGCTCCCTGCACACACTGCAGCCGGCTTCGGGCGCTAC
TTCACCGCGGGCTACGAGTGCAGAACGCGCAGCAGCTCAACAGGCTGCTGGGGTACAAGG
CGCTGTGAGAGCGCGCCGAGGGGAGTGTGTTTATATTGTGGTTGTTTGGGCCGTGGGCG
CGGGCTGCATGTGCGTATTGCACGCGTACAGCATTGGTACTGGTCAGGTGTAAGCGGCCG
GCAGTGCGCCGCGAGGCGCTGCAGCGAGTTGTGGGGCATGCGTCATGCGCAGACGGCCCT
GGACGACAAGGCGTTGAGTTGGCCTTGGAGGTGTGGGACGACGTGGGGTTTGTGCCGTCA
AAGCACAGAACAGAAGGCGTGACCGTTTTACGAGCTCGTATGATGTAGCATGGATTGAAT

CaMV 35S

TGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATC
TGTCACCTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCG
ATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCC
ACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGAT
TGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCCTATCCTTCGCAAGACC
CTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGAACA

A.2 Vektorkarten

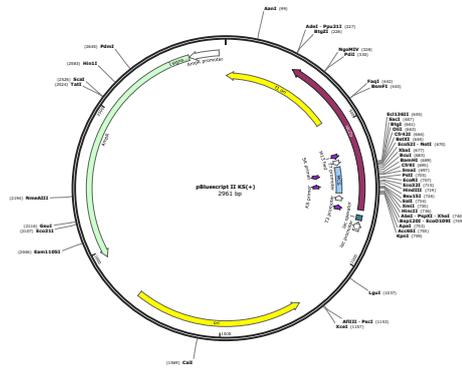


Abbildung A.1 pBluescript KS II(+)

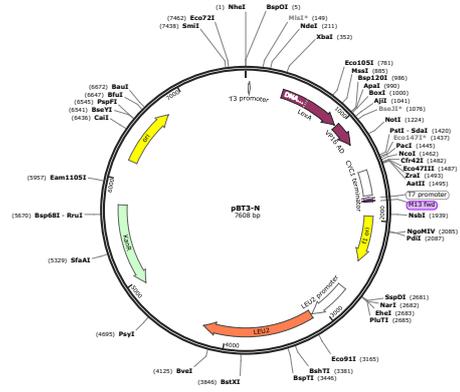


Abbildung A.4 pBT3-N

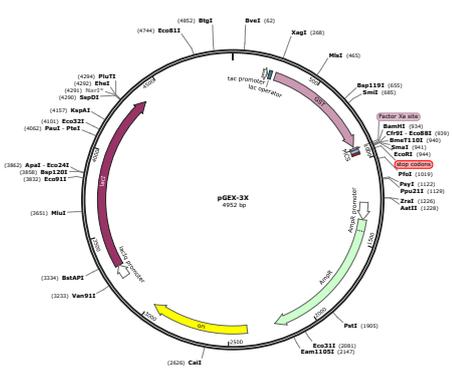


Abbildung A.2 pGEX3X

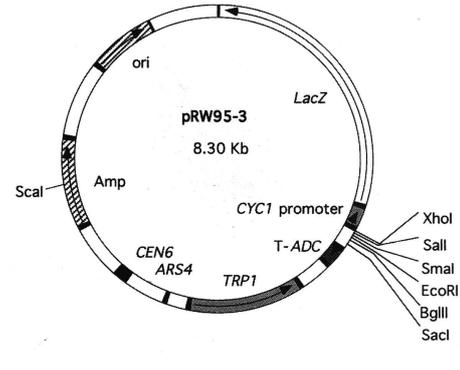


Abbildung A.5 pRW95-3

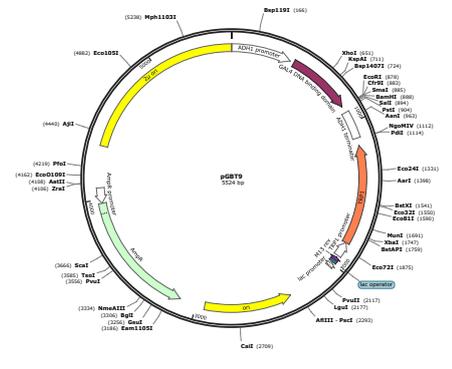


Abbildung A.3 pGBT9

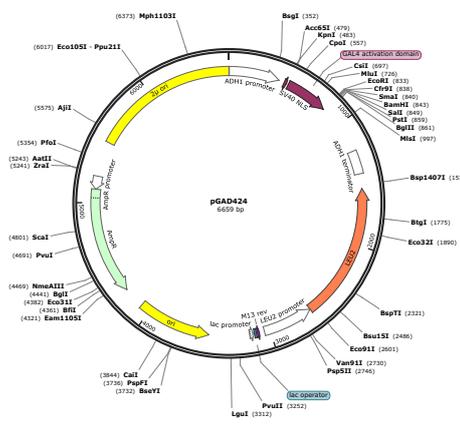


Abbildung A.6 pGAD424

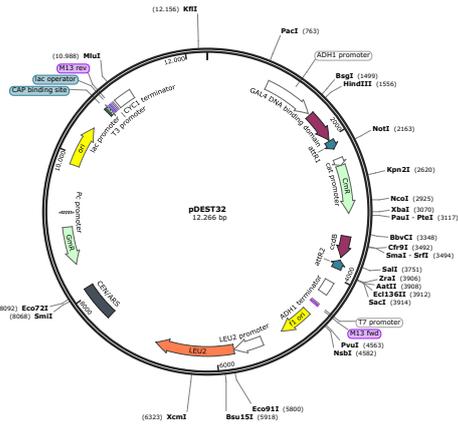


Abbildung A.7 pDEST32

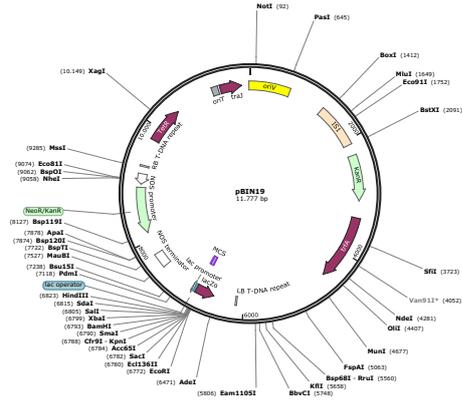


Abbildung A.10 pBIN19

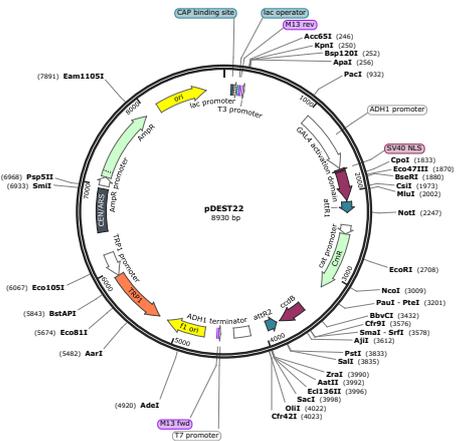


Abbildung A.8 pDEST22

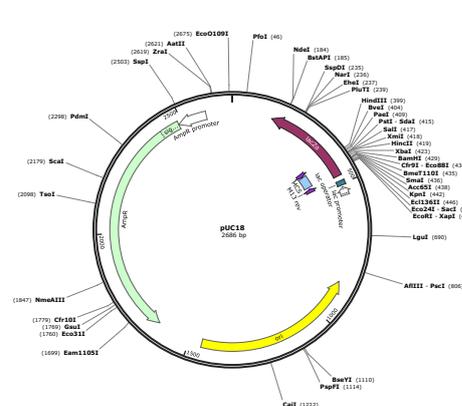


Abbildung A.11 pUC18

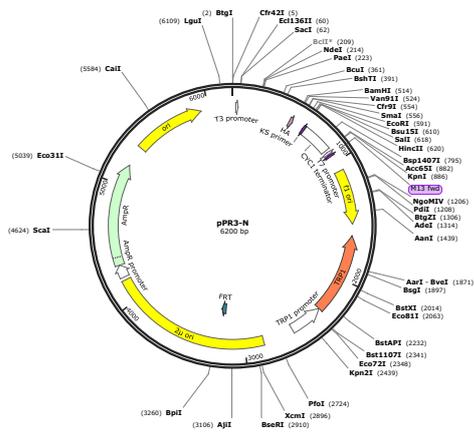


Abbildung A.9 pPR3-N

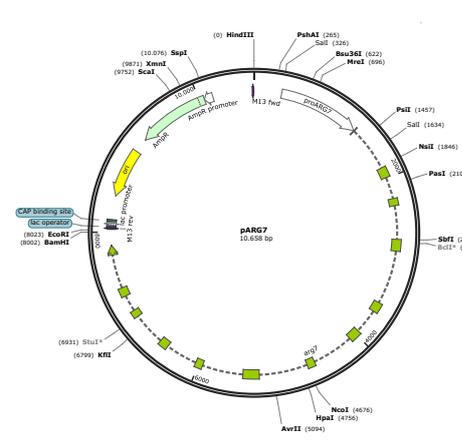


Abbildung A.12 pARG7

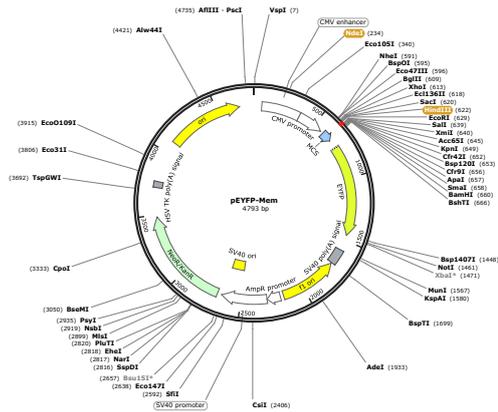


Abbildung A.13 pEYFPMem

A.3 Eichgeraden

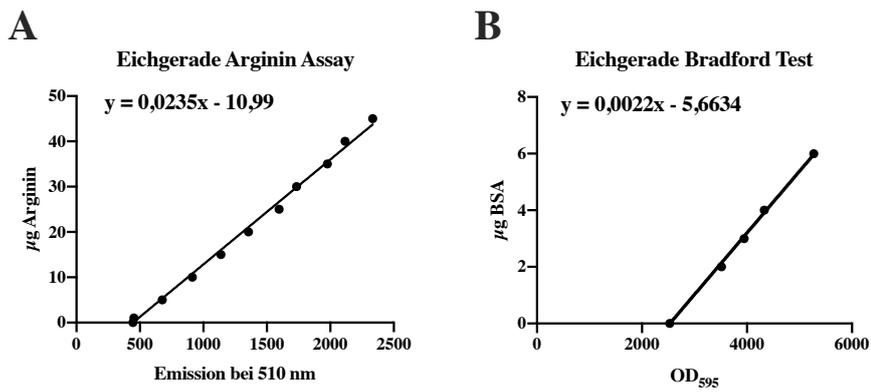


Abbildung A.14

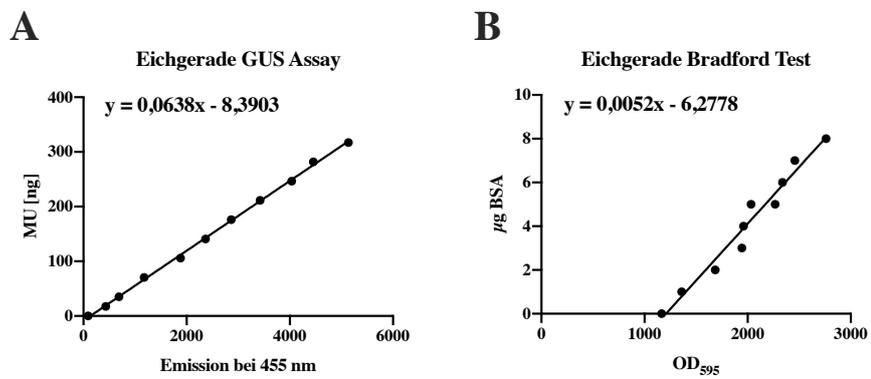


Abbildung A.15

A.4 Rohdaten

Rohdaten - Kapitel 2.1

Tabelle A.1 Rohdaten -
Abbildung 2.2 C

pARG7::	Kolonien	MW	SD
-	0, 0	0	0
0	0, 0	0	0
proZ280L	20, 20	4	0
proZ798L	143, 103	24,6	5,66
proARG7	89 , 72	16,1	2,40
35S	59 , 57	11,6	0,28

Tabelle A.2 Rohdaten -
Abbildung 2.6 B

pARG7::	5 µg DNA	1 µg	SD
0	0, 0	0,0	0,0
proZ798L	30, 42	36,0	8,5
mpZ798L ^{wt}	16, 13	14,5	2,1
mpZ798L ^{A-66G}	2, 5	3,5	2,1
proARG7	13, 8	10,5	3,5

Tabelle A.3 Rohdaten - Abbildung 2.2 D

pARG7::	Arginin	Bradford	Wert $\frac{\text{mg}}{\text{mg}}$	MW	SD
-	596, 594	4731, 4741	0,31	0,36	0,07
	623, 607	4507, 4447	0,41		
proZ798L	1190, 1272	4770, 4813	1,84	1,92	0,22
	1206, 1288	4477, 4507	2,17		
	1199, 1224	4928, 4778	1,74		
proARG7	1196, 1250	5307, 4898	1,60	1,69	0,17
	1189, 1242	4885, 4503	1,88		
	1153, 1185	5141, 4690	1,60		
35S	1493 1494	4239, 4187	3,34	3,26	1,41
	1126 1274	5416, 5501	1,36		
	1181 1272	4694, 4904	1,82		

Tabelle A.4 Rohdaten - Abbildung 2.3 B

pUC18-GUS::	GUS-Messung	Werte µg	MW	SD
0	421 435 422	0,74 0,77 0,74	0,75	0,02
	413 409 406	0,72 0,71 0,70		
proZ280L	382 353 384	0,64 0,57 0,64	0,62	0,04
	333 359 325	0,51 0,58 0,49		
proZ798L	709 630 709	1,47 1,27 1,47	1,41	0,12
	680 724 625	1,40 1,51 1,26		
35S	1045 897 1003	2,33 1,95 2,22	2,17	0,19
	919 1041 887	2,01 2,32 1,93		

Tabelle A.5 Rohdaten - Abbildung 2.3 C

Pflanzenlinie	GUS-Messung	Werte ng	MW	SD
wt	172 177 169	0,10 0,12 0,10	0,11	0,01
49 E1	26482 29901 26537	67,25 75,97 67,39	70,20	5,00
49 E2	26137 28189 25648	65,12 71,60 66,37	67,70	3,44
49 E3	26447 28940 26236	67,16 73,52 66,62	69,10	3,84
143 H7 35	183 200 189	0,13 0,17 0,15	0,15	0,02
143 H7 36	174 183 167	0,11 0,13 0,09	0,11	0,02
143 H7 37	180 180 164	0,12 0,12 0,08	0,11	0,02
143 H1 8	220 225 220	0,23 0,24 0,23	0,23	0,01
143 H1 9	136 136 141	0,01 0,01 0,02	0,02	0,01
143 H1 10	140 138 135	0,02 0,02 0,01	0,02	0,01
143 H2 11	237 240 237	0,27 0,28 0,27	0,27	0,00
143 H2 13	122 119 132	-0,02 -0,03 0,00	-0,02	0,02
143 H2 18	125 124 135	-0,02 -0,02 0,01	-0,01	0,02
143 H9 24	200 185 203	0,17 0,14 0,18	0,16	0,02
143 H9 25	330 305 340	0,51 0,44 0,53	0,49	0,05
143 H9 26	130 120 133	0,00 -0,03 0,00	-0,01	0,02

Tabelle A.6 Rohdaten - Abbildung 2.6 C

pARG7::	Arginin	Bradford	Wert $\frac{\text{mg}}{\text{mg}}$	MW	SD
-	531 526	4031 4001	0,23	0,21	0,03
	503 536	3938 4151	0,19		
proZ798L	1279 1287	3672 3692	3,93	3,74	0,44
	1108 1147	3424 3904	3,23		
	1278 1296	3521 3789	4,05		
mpZ798L ^{wt}	855 808	4800 3318	1,31	2,70	1,97
	1214 1209	3643 3443	4,10		
proARG7	1269 1391	3602 3881	3,95	4,27	0,40
	1315 1362	3575 3820	4,14		
	1281 1334	3530 3520	4,72		

Tabelle A.7 Rohdaten - Abbildung 2.7 B

pUC18-GUS::	GUS-Messung	Bradford	Wert $\frac{\text{ng}}{\text{ng}}$	MW	SD
0	106 107 114	2942	0,01 0,01 0,01	0,01	0,00
	112 111 114	3231	0,01 0,01 0,01	0,01	0,00
mpZ798L ^{A-66G}	92 103 94	3050	0,00 0,01 0,00	0,00	0,00
	107 100 105	2982	0,01 0,00 0,01	0,01	0,00
mpZ798L ^{wt}	150 161 152	3139	0,03 0,04 0,03	0,03	0,00
	171 162 180	2998	0,04 0,04 0,05	0,04	0,00
proZ798L	496 532 487	3141	0,21 0,22 0,20	0,21	0,01
	428 391 432	3160	0,17 0,15 0,17	0,16	0,01
35S	1053 1158 1058	2973	0,53 0,59 0,54	0,55	0,03
	1101 976 1094	3004	0,55 0,48 0,55	0,53	0,04

Tabelle A.8 Rohdaten - Abbildung 2.8 B und C

pRW95-3	pGAD424	OD ₆₀₀	OD ₄₂₀	t	ME	MW	SD		
-	-	0,8	0,009 0,009	120	0,1	0,1	0,0		
		0,944	0,01 0,01	120	0,1				
		0,9	0,01 0,01	120	0,1				
		CrGBF	0,699	0,01 0,01	120	0,1	0,1	0,0	
			0,796	0,01 0,011	120	0,1			
			0,851	0,011 0,012	120	0,1			
		CvGBF BD	0,654	0,011 0,011	120	0,1	0,2	0,1	
			0,74	0,011 0,012	120	0,1			
			0,622	0,02 0,021	120	0,3			
		AtGBF1	1,086	0,03 0,03	120	0,2	0,2	0,0	
			0,845	0,021 0,021	120	0,2			
			0,625	0,016 0,016	120	0,2			
		NtTGA1a	0,731	0,015 0,014	120	0,2	0,2	0,0	
			0,726	0,014 0,014	120	0,2			
			0,688	0,014 0,013	120	0,2			
		AtTGA6	0,812	0,014 0,014	120	0,1	0,2	0,1	
			1,003	0,014 0,015	120	0,1			
			0,899	0,026 0,027	120	0,2			
		+	+	0,602	0,928 0,966	46	34,2	37,8	7,1
				0,815	1,234 1,265	46	33,3		
0,71	1,465 1,541			46	46,0				
proZ280L		1,017	0,403 0,433	60	6,9	6,3	0,5		
		0,659	0,256 0,22	60	6,0				
		0,659	0,256 0,22	60	6,0				
		CvGBF BD	1,104	0,39 0,423	60	6,1	6,6	0,6	
			1,172	0,428 0,477	60	6,4			
			1,199	0,528 0,52	60	7,3			
		CrGBF	1,228	0,567 0,567	60	7,7	8,9	1,9	
			1,123	0,505 0,553	60	7,9			
			1,038	0,699 0,684	60	11,1			
		AtGBF1	0,965	0,579 0,578	60	10,0	10,1	1,0	
			1,181	0,819 0,764	60	11,2			
			1,118	0,597 0,645	60	9,3			
		NtTGA1a	1,198	0,418 0,435	60	5,9	9,3	3,5	
			1,205	0,967 0,908	60	13,0			
			1,102	0,602 0,594	60	9,0			
		AtTGA6	1,121	0,376 0,383	60	5,6	5,7	1,7	
			1,121	0,491 0,508	60	7,4			
			1,009	0,485 0	60	4,0			
		+	+	0,864	0,898 0,975	30	36,1	38,1	4,6
				0,946	0,986 0,995	30	34,9		
1,198	1,563 1,556			30	43,4				

Tabelle A.9 Rohdaten - Abbildung 2.8 D und E

pRW95-3	pGAD424	OD ₆₀₀	OD ₄₂₀	t	ME	MW	SD	
proZ798L	-	0,905	0,625 0,658	63	11,3	9,1	2,4	
		0,823	0,353 0,322	63	6,5			
		0,947	0,585 0,559	63	9,6			
	CrGBF1	0,826	0,602 0,579	63	11,3	8,5	2,7	
		0,926	0,340 0,352	63	5,9			
		0,895	0,492 0,445	63	8,3			
	CvGBF BD	0,836	0,584 0,567	63	10,9	7,9	2,7	
		0,857	0,356 0,360	63	6,6			
		0,959	0,345 0,380	63	6,0			
	AtGBF1	0,953	1,124 1,091	43	27,0	27,7	1,8	
		0,862	0,804 1,150	43	26,4			
		0,728	0,702 1,159	43	29,7			
	NtTGA1a	0,951	0,286 0,358	63	5,4	6,3	2,6	
		0,987	0,620 0,522	63	9,2			
		0,909	0,252 0,245	63	4,3			
	AtTGA6	0,815	0,318 0,333	63	6,3	7,0	1,6	
		0,930	0,533 0,501	63	8,8			
		0,849	0,316 0,301	63	5,8			
	+	+	1,008	2,670 2,440	43	58,9	62,1	6,2
			0,887	2,220 2,220	43	58,2		
			0,938	2,650 2,940	43	69,3		
35S	-	0,662	0,065 0,073	120	0,9	1,6	1,1	
		0,253	0,073 0,073	120	2,4			
		0,373	0,117 0,104	120	2,5			
	CrGBF	1,184	0,158 0,157	90	1,5	1,5	0,1	
		1,026	0,146 0,147	90	1,6			
		0,868	0,106 0,106	90	1,4			
	CvGBF BD	0,875	0,123 0,124	90	1,6	1,6	0,3	
		1,011	0,16 0,179	90	1,9			
		1,044	0,124 0,124	90	1,3			
	AtGBF1	0,96	0,148 0,154	90	1,7	1,9	0,2	
		0,769	0,123 0,124	90	1,8			
		0,792	0,153 0,146	90	2,1			
	NtTGA1a	0,767	0,176 0,177	90	2,6	1,5	0,9	
		1,274	0,084 0,084	90	0,7			
		0,829	0,1 0,1	90	1,3			
	AtTGA6	0,81	1,312 1,342	90	18,2	16,7	1,5	
		0,799	1,103 1,08	90	15,2			
		0,714	1,052 1,086	90	16,6			
	+	+	0,847	1,629 1,534	90	20,7	29,8	8,0
			0,904	2,92 2,92	90	35,9		
			0,58	1,625 1,807	90	32,9		

Tabelle A.10 Rohdaten - Abbildung 2.9 B und C

pUC18-GUS::	pUC35::	GUS	Brad.	Wert $\frac{\mu\text{g}}{\text{mg}}$	MW	SD
0	-	91 99 91	3251	0,00 0,01 0,00	0,00	0,00
	AtGBF1	90 90 87	3821	0,01 0,01 0,01	0,01	0,00
	CvGBD BD	70 77 80	3545	0,00 0,00 0,00	0,00	0,00
proZ280L	-	99 95 99	3140	0,01 0,00 0,01	0,00	0,00
	AtGBF1	106 110 105	3095	0,01 0,01 0,01	0,01	0,00
	CvGBD BD	95 91 95	3188	0,00 0,00 0,00	0,00	0,00
proZ280L	-	87 96 91	3209	0,00 0,00 0,00	0,00	0,00
	AtGBF1	89 100 94	3276	0,00 0,01 0,00	0,00	0,00
	CvGBD BD	101 104 102	3261	0,01 0,01 0,01	0,01	0,00
proZ798L	-	761 749 756	3103	0,35 0,34 0,35	0,34	0,00
	AtGBF1	1314 1209 1312	3256	0,59 0,54 0,59	0,57	0,03
	CvGBD BD	1200 1036 1174	3433	0,49 0,42 0,48	0,47	0,04
proZ798L	-	658 582 664	3299	0,27 0,23 0,27	0,26	0,02
	AtGBF1	1309 1187 1317	3332	0,57 0,51 0,57	0,55	0,03
	CvGBD BD	2961 2713 2957	3311	1,34 1,23 1,34	1,30	0,07
35S	-	1015 935 1008	2996	0,51 0,46 0,50	0,49	0,02
	AtGBF1	786 731 779	3041	0,37 0,34 0,37	0,36	0,02
	CvGBD BD	721 665 725	3052	0,34 0,31 0,34	0,33	0,02
35S	-	1279 1217 1320	3051	0,63 0,60 0,65	0,63	0,03
	AtGBF1	1227 1199 1260	3241	0,55 0,54 0,57	0,55	0,01
	CvGBD BD	666 665 664	2939	0,32 0,32 0,32	0,32	0,00

Tabelle A.11 Rohdaten - Abbildung 2.10 C

pRW95-3	pGAD424	OD ₆₀₀	OD ₄₂₀	t	ME	MW	SD	
mpZ798L ^{wt}	-	0,819	0,085 0,079	120	0,83	0,94	0,33	
		0,916	0,143 0,143	120	1,30			
		1,100	0,088 0,089	120	0,67			
	CrGBF1	-	0,985	0,088 0,088	120	0,74	0,70	0,04
			1,055	0,087 0,087	120	0,69		
			1,050	0,092 0,079	120	0,68		
	CvGBF BD	-	0,502	0,042 0,043	120	0,71	0,96	0,38
			0,826	0,137 0,138	120	1,39		
			0,598	0,055 0,056	120	0,77		
	AtGBF1	-	0,947	0,729 0,786	30	26,66	22,39	4,12
			0,940	0,612 0,633	30	22,07		
			1,097	0,607 0,607	30	18,44		
	TGA1a	-	0,899	0,098 0,098	120	0,91	1,88	1,60
			0,664	0,054 0,540	120	3,73		
			1,033	0,124 0,124	120	1,00		
	TGA6	-	0,912	0,153 0,153	120	1,40	1,34	0,11
			0,903	0,153 0,152	120	1,41		
			1,043	0,152 0,152	120	1,21		
	CREB 3L3	-	0,853	0,086 0,087	120	0,85	0,99	0,17
			0,853	0,118 0,125	120	1,19		
1,006			0,115 0,115	120	0,95			
+	+	0,947	1,747 1,709	30	60,82	62,21	1,52	
		0,911	1,690 1,697	30	61,96			
		0,896	1,818 1,614	30	63,84			

Tabelle A.12 Rohdaten - Abbildung 2.10 B und D

pRW95-3	pGAD424	OD₆₀₀	OD₄₂₀	t	ME	MW	SD
mpZ798L ^{A-66G}	-	0,902	0,453 0,423	120	4,05	4,30	1,56
		0,874	0,299 0,304	120	2,87		
		0,717	0,510 0,518	120	5,97		
	CrGBF1	0,607	0,321 0,315	120	4,37	4,26	0,20
		0,991	0,509 0,531	120	4,37		
		1,050	0,505 0,510	120	4,03		
	CvGBF BD	0,998	0,413 0,378	120	3,30	3,56	1,52
		0,965	0,248 0,260	120	2,19		
		0,906	0,562 0,568	120	5,20		
	AtGBF1	0,920	0,332 0,295	120	2,84	4,76	3,45
		0,744	0,785 0,776	120	8,74		
		0,811	0,265 0,258	120	2,69		
	NtTGA1a	0,902	0,574 0,623	120	5,53	3,30	1,94
		0,753	0,151 0,209	120	1,99		
		0,826	0,248 0,223	120	2,38		
	AtTGA6	0,958	0,257 0,268	120	2,28	3,88	1,89
		0,750	0,522 0,553	120	5,97		
		0,672	0,272 0,273	120	3,38		
	CREB3L3	0,805	0,194 0,186	120	1,97	2,10	0,20
		0,874	0,233 0,254	120	2,32		
0,773		0,185 0,186	120	2,00			
+	+	0,947	1,747 1,709	30	60,82	62,21	1,52
		0,911	1,690 1,697	30	61,96		
		0,896	1,818 1,614	30	63,84		
proZ798L	-	0,548	0,594 0,582	120	8,94	8,02	0,81
		0,696	0,600 0,641	120	7,43		
		0,589	0,520 0,565	120	7,68		
	CrGBF	0,929	0,763 0,834	120	7,16	7,13	0,71
		0,928	0,699 0,727	120	6,40		
		0,862	0,824 0,794	120	7,82		
	CvGBF BD	0,888	0,844 0,975	120	8,54	11,94	5,63
		0,934	2,057 2,076	120	18,44		
		0,887	0,955 0,926	120	8,84		
	AtGBF1	1,024	1,504 1,389	30	47,09	58,18	12,84
		0,748	1,678 1,564	30	72,24		
		0,803	1,361 1,299	30	55,21		
	NtTGA1a	1,124	0,816 0,685	120	5,56	9,09	4,77
		0,535	0,919 0,945	120	14,52		
		0,811	0,726 0,673	120	7,19		
	AtTGA6	1,019	1,052 1,027	120	8,50	7,81	0,60
		0,743	0,654 0,687	120	7,52		
		0,729	0,645 0,651	120	7,41		
	CREB3L3	1,060	0,828 0,777	120	6,31	7,04	0,75
		1,038	0,913 0,828	120	6,99		
0,928		0,917 0,823	120	7,81			
+	+	0,947	1,747 1,709	30	60,82	62,21	1,52
		0,911	1,690 1,697	30	61,96		
		0,896	1,818 1,614	30	63,84		

Rohdaten - Kapitel 2.2

Tabelle A.13 Rohdaten - Abbildung 2.12 B

pARG7::	Kolonien	MW	SD
O	0 0	0	0
proZ063L	53 59	56	4,2
proZ174L	39 43	41	2,8
proZ326R	3 6	4,5	2,1
proZ765R	37 43	40	4,2
proZ798L	35 34	34,5	0,7
proARG7	20 40	30	14,1

Tabelle A.14 Rohdaten - Abbildung 2.12 C

pARG7::	Arginin	Bradford	Wert $\frac{\text{mg}}{\text{mg}}$	MW	SD
-	596 594	4731 4741	0,31	0,36	0,07
	623 607	4507 4447	0,41		
proZ174L	1615 1597	4571 4447	3,14	2,35	0,69
	1212 1320	4967 4648	1,91		
	1245 1340	4632 4938	1,99		
proZ765R	1278 1283	5016 4887	1,83	2,06	0,28
	1185 1297	4585 4743	1,98		
	1237 1246	4256 4381	2,37		
proZ798L	1190 1272	4770 4813	1,84	1,92	0,22
	1206 1288	4477 4507	2,17		
	1199 1224	4928 4778	1,74		
proARG7	1196 1250	5307 4898	1,60	1,69	0,17
	1189 1242	4885 4503	1,88		
	1153 1185	5141 4690	1,60		
-	942 970	2933 2840	8,35	9,17	1,16
	1075 1139	2962 2870	9,99		
proZ063L	2227 2481	2802 2885	37,42	39,77	3,31
	2511 2660	2803 2865	43,55		
	2373 2513	2900 2799	38,33		
proZ798L	2190 2293	2998 2988	22,63		

Tabelle A.15 Abbildung 2.15 B und Abbildung 2.16 B

pARG7	Kolonien	MW	SD
O	0 0	0	0,0
proARG7	13 8	10,5	3,5
proZ174L	46 38	42	5,7
mpZ174L ^{wt}	16 16	16	0,0
mpZ174L ^{del}	4 6	5	1,4
proZ765R	22 21	21,5	0,7
mpZ765R ^{wt}	22 20	21	1,4
mpZ765R ^{del}	13 9	11	2,8

Tabelle A.16 Rohdaten - Abbildung 2.13 B

pUC18-GUS	GUS-Messung	Werte ng	MW	SD
O	421 435 422	0,74 0,77 0,74	0,75	0,02
	413 409 406	0,72 0,71 0,70	0,71	0,01
proZ063L	318 288 304	0,48 0,40 0,44	0,44	0,04
	344 348 329	0,54 0,55 0,50	0,53	0,03
proZ134L	334 320 338	0,52 0,48 0,53	0,51	0,02
	370 399 370	0,61 0,68 0,61	0,63	0,04
proZ174L	761 686 799	1,61 1,42 1,70	1,57	0,15
	828 917 824	1,78 2,00 1,77	1,85	0,13
proZ280L	382 353 384	0,64 0,57 0,64	0,62	0,04
	333 359 325	0,51 0,58 0,49	0,53	0,05
proZ326R	369 335 357	0,61 0,52 0,58	0,57	0,04
	363 373 345	0,59 0,62 0,54	0,58	0,04
proZ765R	947 859 938	2,08 1,86 2,06	2,00	0,12
	469 517 464	0,86 0,98 0,85	0,90	0,07
proZ798L	709 630 709	1,47 1,27 1,47	1,41	0,12
	680 724 625	1,40 1,51 1,26	1,39	0,13
35S	1045 897 1003	2,33 1,95 2,22	2,17	0,19
	919 1041 887	2,01 2,32 1,93	2,09	0,21

Tabelle A.17 Rohdaten - Abbildung 2.15 C und Abbildung 2.16 C

pARG7	Arginin	Bradford	Wert $\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{g}}$	MW	SD
-	531 526	4031 4001	0,23	0,21	0,03
	503 536	3938 4151	0,19		
ARG7	1269 1391	3602 3881	3,95	4,27	0,40
	1315 1362	3575 3820	4,14		
	1281 1334	3530 3520	4,72		
proZ174L	1306 1368	4198 4675	2,49	2,79	0,43
	1282 1319	4044 3978	3,10		
mpZ174L ^{wt}	1449 1415	4091 3992	3,51	3,20	0,27
	1316 1398	4235 3984	3,09		
	1229 1282	3947 3999	3,01		
proZ765R	1197 1335	3766 3630	3,79	4,17	0,54
	1535 1493	3785 3819	4,55		
mpZ765R ^{wt}	1207 1309	4344 4194	2,49	3,32	0,75
	1200 1296	3688 3569	3,95		
	1287 1305	3671 4004	3,50		

Tabelle A.18 Rohdaten - Abbildung 2.17 B und Abbildung 2.18 B

pUC18-GUS	GUS-Messung	Bradford	MW	SD
O	93 92 96	3487 3406 3382	0,00	0,00
	102 99 101	3220 3162 3294	0,00	0,00
mpZ174L ^{del}	125 126 124	3147 3015 3263	0,01	0,00
	124 124 125	2970 3062 3169	0,01	0,00
mpZ174L ^{wt}	129 119 121	3466 3129 3369	0,01	0,00
	115 117 116	3173 3062 2994	0,01	0,00
proZ174L	7161 6253 7096	3239 3097 3168	3,37	0,25
	8191 7406 8072	3309 3093 3380	3,73	0,20
35S	4877 4239 4863	4563 3140 3547	1,77	0,14
	4310 4078 4341	3225 3111 3333	2,02	0,07
O	116 109 112	2851 2872 2897	0,01	0,00
	110 108 111	2992 3076 3010	0,00	0,00
mpZ765R ^{del}	102 105 97	3141 3464 3140	0,00	0,00
	101 101 107	3172 3094 3123	0,00	0,00
mpZ765R ^{wt}	141 144 132	3098 3305 3138	0,02	0,00
	151 139 151	3188 3071 3083	0,02	0,00
proZ765R	698 786 715	3215 3264 2947	0,32	0,02
	561 499 564	3316 2925 3266	0,22	0,02
35S	413 456 422	3016 3188 2999	0,17	0,01
	803 689 777	3293 3108 3256	0,32	0,03

Tabelle A.19 Rohdaten - Abbildung 2.19 B und C

pRW95-3	pGAD424	OD ₆₀₀	OD ₄₂₀	t	ME	MW	SD		
-	-	0,8	0,009	0,009	120	0,1	0,1	0,0	
		0,944	0,01	0,01	120	0,1			
		0,9	0,01	0,01	120	0,1			
	CrGBF	0,699	0,01	0,01	120	0,1	0,1	0,0	
		0,796	0,01	0,011	120	0,1			
	CvGBF BD	0,851	0,011	0,012	120	0,1			
		0,654	0,011	0,011	120	0,1	0,2	0,1	
		0,74	0,011	0,012	120	0,1			
	AtGBF1	0,622	0,02	0,021	120	0,3			
		1,086	0,03	0,03	120	0,2	0,2	0,0	
		0,845	0,021	0,021	120	0,2			
	NtTGA1a	0,625	0,016	0,016	120	0,2			
		0,731	0,015	0,014	120	0,2	0,2	0,0	
		0,726	0,014	0,014	120	0,2			
	AtTGA6	0,688	0,014	0,013	120	0,2			
		0,812	0,014	0,014	120	0,1	0,2	0,1	
		1,003	0,014	0,015	120	0,1			
	+		0,899	0,026	0,027	120	0,2		
			0,602	0,928	0,966	46	34,2	37,8	7,1
			0,815	1,234	1,265	46	33,3		
0,71			1,465	1,541	46	46,0			
proZ063L	-	0,638	0,044	0,044	135	0,5	0,4	0,1	
		0,659	0,034	0,033	135	0,4			
		0,66	0,033	0,028	135	0,3			
	CrGBF	0,397	0,028	0,028	135	0,5	0,5	0,1	
		0,388	0,029	0,029	135	0,6			
	CvGBF BD	0,324	0,015	0,015	135	0,3			
		0,369	0,037	0,043	135	0,8	0,5	0,3	
		0,588	0,032	0,032	135	0,4			
	AtGBF1	0,789	0,033	0,032	135	0,3			
		0,322	0,065	0,065	135	1,5	1,0	0,4	
		0,589	0,057	0,056	135	0,7			
	NtTGA1a	0,455	0,051	0,052	135	0,8			
		0,42	0,029	0,03	135	0,5	0,6	0,2	
		0,522	0,06	0,055	135	0,8			
	AtTGA6	0,485	0,035	0,036	135	0,5			
		0,493	0,036	0,041	135	0,6	0,6	0,2	
		0,523	0,032	0,032	135	0,5			
	+		0,615	0,071	0,077	135	0,9		
			0,182	0,331	0,314	135	13,1	15,1	3,4
			0,396	0,689	0,72	135	13,2		
0,425			1,138	1,045	135	19,0			

Tabelle A.20 Rohdaten - Abbildung 2.19 D und E

pRW95-3	pGAD424	OD₆₀₀	OD₄₂₀	t	ME	MW	SD
proZ134L	-	1,079	0,073 0,081	60	1,2	1,2	0,1
		1,070	0,08 0,08	60	1,2		
		1,047	0,065 0,075	60	1,1		
	CrGBF	1,064	0,09 0,09	60	1,4	1,2	0,3
		1,125	0,09 0,089	60	1,3		
		1,185	0,063 0,064	60	0,9		
	CvGBF BD	1,159	0,055 0,055	60	0,8	0,9	0,1
		1,036	0,06 0,061	60	1,0		
		1,182	0,056 0,057	60	0,8		
	AtGBF1	1,070	0,234 0,235	60	3,7	4,6	0,9
		1,135	0,372 0,371	60	5,5		
		1,105	0,312 0,327	60	4,8		
	NtTGA1a	0,718	0,067 0,068	60	1,6	1,5	0,0
		1,000	0,097 0,092	60	1,6		
		1,144	0,098 0,109	60	1,5		
AtTGA6	1,144	0,151 0,152	60	2,2	1,4	0,7	
	0,572	0,032 0,032	60	0,9			
	1,161	0,065 0,065	60	0,9			
+	+	0,864	0,898 0,975	30	36,1	38,1	4,6
		0,946	0,986 0,995	30	34,9		
		1,198	1,563 1,556	30	43,4		
proZ174L	-	0,856	0,033 0,033	100	0,4	0,6	0,2
		0,777	0,058 0,059	100	0,8		
		1,041	0,065 0,060	100	0,6		
	CrGBF	0,818	0,043 0,043	100	0,5	0,9	0,3
		0,880	0,103 0,103	100	1,2		
		0,849	0,088 0,082	100	1,0		
	CvGBF BD	0,878	0,092 0,091	100	1,0	0,9	0,2
		0,645	0,038 0,045	100	0,6		
		0,726	0,076 0,084	100	1,1		
	AtGBF1	0,877	1,673 1,666	60	31,7	27,6	3,9
		0,953	1,832 1,270	60	27,1		
		0,790	1,024 1,245	60	23,9		
	NtTGA1a	0,822	0,177 0,222	100	2,4	2,4	0,4
		0,923	0,222 0,274	100	2,7		
		0,796	0,146 0,170	100	2,0		
AtTGA6	0,817	0,389 0,403	100	4,8	2,9	1,7	
	0,962	0,139 0,155	100	1,5			
	0,853	0,203 0,203	100	2,4			
+	+	0,824	1,975 1,591	35	61,8	60,3	11,5
		0,824	1,975 1,591	35	71,0		
		1,019	1,587 1,848	35	48,2		

Tabelle A.21 Rohdaten - Abbildung 2.19 F und G

pRW95-3	pGAD424	OD ₆₀₀	OD ₄₂₀	t	ME	MW	SD		
proZ326R	-	0,752	0,946	1,034	45	29,3	39,6	16,6	
		0,620	0,866	0,846	45	30,7			
		0,869	2,384	2,211	45	58,8			
	CrGBF	0,489	0,703	0,729	45	32,5	29,1	10,0	
		0,679	1,086	1,167	45	36,9			
		0,326	0,266	0,257	45	17,8			
	CvGBF BD	0,840	0,957	0,881	45	24,3	25,1	3,6	
		0,572	0,750	0,744	45	29,0			
		0,472	0,465	0,466	45	21,9			
	AtGBF1	0,541	1,953	2,046	45	82,1	85,7	30,3	
		0,700	2,030	1,584	45	57,4			
		0,479	2,480	2,590	45	117,6			
	NtTGA1a	0,797	1,919	1,953	45	54,0	33,8	18,4	
		0,466	0,368	0,383	45	17,9			
		0,577	0,764	0,774	45	29,6			
	AtTGA6	0,352	0,201	0,200	45	12,7	33,0	30,0	
		0,581	0,487	0,504	45	19,0			
		0,764	2,388	2,250	45	67,5			
	+	+	0,433	0,419	0,376	45	20,4	20,2	1,4
			0,579	0,464	0,514	45	18,8		
0,670			0,702	0,592	45	21,5			
proZ765R	-	0,764	0,000	0,005	120	0,0	0,0	0,0	
		0,154	0,000	0,000	120	0,0	0,2	0,1	
		0,789	0,026	0,026	120	0,3			
	CvGBF BD	0,825	0,025	0,021	120	0,2			
		0,727	0,001	0,001	120	0,0	0,1	0,1	
		0,765	0,001	0,001	120	0,0			
	AtGBF1	0,697	0,018	0,018	120	0,2			
		0,855	1,562	1,724	25	76,9	72,7	23,0	
		0,696	1,641	1,604	25	93,2			
	NtTGA1a	0,776	0,926	0,931	25	47,9			
		0,834	0,706	0,660	60	13,6	14,1	8,6	
		0,789	0,289	0,261	60	5,8			
	AtTGA6	0,856	1,189	1,165	60	22,9			
		0,774	1,182	1,199	60	25,6	31,9	7,2	
		0,721	1,763	1,673	60	39,7			
	+	+	0,793	1,448	1,431	60	30,3		
			0,909	1,238	1,239	25	54,5	57,7	5,4
			0,978	1,520	1,604	25	63,9		
			0,932	1,282	1,269	25	54,7		

Tabelle A.22 Rohdaten - Abbildung 2.20 B und C

pRW95-3	pGAD424	OD₆₀₀	OD₄₂₀	t	ME	MW	SD	
proZ174L	-	0,856	0,033 0,033	100	0,4	0,6	0,2	
		0,777	0,058 0,059	100	0,8			
		1,041	0,065 0,060	100	0,6			
	CrGBF		0,818	0,043 0,043	100	0,5	0,9	0,3
			0,880	0,103 0,103	100	1,2		
			0,849	0,088 0,082	100	1,0		
	CvGBF BD		0,878	0,092 0,091	100	1,0	0,9	0,2
			0,645	0,038 0,045	100	0,6		
			0,726	0,076 0,084	100	1,1		
	AtGBF1		0,877	1,673 1,666	60	31,7	27,6	3,9
			0,953	1,832 1,270	60	27,1		
			0,790	1,024 1,245	60	23,9		
	NtTGA1a		0,822	0,177 0,222	100	2,4	2,4	0,4
			0,923	0,222 0,274	100	2,7		
			0,796	0,146 0,170	100	2,0		
	AtTGA6		0,817	0,389 0,403	100	4,8	2,9	1,7
			0,962	0,139 0,155	100	1,5		
			0,853	0,203 0,203	100	2,4		
	CREB3L3		0,782	0,033 0,038	100	0,5	1,1	1,1
			0,912	0,048 0,048	100	0,5		
0,965			0,239 0,215	100	2,4			
+	+	0,824	1,975 1,591	35	61,8	55,0	9,7	
		1,019	1,587 1,848	35	48,2			
mpZ174L ^{wt}	-	0,745	0,098 0,128	100	1,5	1,7	0,3	
		0,879	0,205 0,163	100	2,1			
		0,700	0,104 0,112	100	1,5			
	CrGBF		0,893	0,184 0,139	100	1,8	2,1	0,7
			0,672	0,095 0,108	100	1,5		
			0,846	0,256 0,231	100	2,9		
	CvGBF BD		0,824	0,186 0,210	100	2,4	2,5	0,3
			0,713	0,173 0,162	100	2,3		
			0,543	0,154 0,159	100	2,9		
	AtGBF1		0,834	1,932 1,962	15	155,6	155,6	22,5
			0,863	1,740 1,465	15	123,8		
	NtTGA1a		0,748	0,776 0,746	60	17,0	18,7	3,6
			0,916	1,256 1,248	60	22,8		
			0,840	0,814 0,822	60	16,2		
	AtTGA6		0,665	1,436 1,421	35	61,4	35,8	22,6
			0,729	1,176 1,222	60	27,4		
			0,791	0,871 0,887	60	18,5		
	CREB3L3		0,867	0,270 0,271	100	3,1	3,6	0,4
			0,805	0,271 0,334	100	3,8		
			0,805	0,324 0,302	100	3,9		
+	+	0,824	1,975 1,591	35	61,8	55,0	9,7	
		1,019	1,587 1,848	35	48,2			

Tabelle A.23 Rohdaten - Abbildung 2.20 D und E

pRW95-3	pGAD424	OD₆₀₀	OD₄₂₀	t	ME	MW	SD
mpZ174L ^{del}	-	0,520	0,015 0,015	180	0,16	0,19	0,07
		0,556	0,015 0,015	180	0,15		
		0,610	0,030 0,030	180	0,27		
	CrGBF	0,498	0,013 0,013	180	0,15	0,19	0,04
		0,373	0,014 0,015	180	0,22		
		0,403	0,015 0,015	180	0,21		
	CvGBF BD	0,482	0,025 0,025	180	0,29	0,22	0,06
		0,371	0,014 0,014	180	0,21		
		0,508	0,015 0,015	180	0,16		
	AtGBF1	0,414	0,016 0,016	180	0,21	0,17	0,05
		0,495	0,010 0,010	180	0,11		
		0,429	0,015 0,015	180	0,19		
	NtTGA1a	0,328	0,014 0,014	180	0,24	0,22	0,03
		0,470	0,015 0,016	180	0,18		
		0,338	0,015 0,015	180	0,25		
	AtTGA6	0,424	0,015 0,015	180	0,20	0,22	0,02
		0,498	0,021 0,021	180	0,23		
		0,375	0,016 0,016	180	0,24		
	CREB3L3	0,484	0,023 0,023	180	0,26	0,25	0,02
		0,373	0,016 0,015	180	0,23		
0,564		0,027 0,027	180	0,27			
+	+	0,569	1,655 1,690	65	45,22	36,41	7,73
		0,516	1,057 1,169	65	33,18		
		0,517	1,093 0,978	65	30,81		
proZ765R	-	0,559	0,008 0,009	63	0,2	0,3	0,1
		0,958	0,022 0,023	63	0,4		
		0,855	0,022 0,022	63	0,4		
	CrGBF	0,849	0,046 0,037	63	0,8	0,7	0,1
		0,819	0,032 0,032	63	0,6		
		0,877	0,032 0,032	63	0,6		
	CvGBF BD	0,953	0,039 0,040	63	0,7	0,9	0,4
		0,861	0,066 0,073	63	1,3		
		0,879	0,035 0,035	63	0,6		
	AtGBF1	1,041	1,825 1,685	43	39,2	54,3	13,2
		0,954	2,510 2,408	43	59,9		
		1,002	2,750 2,750	43	63,8		
	NtTGA1a	0,858	0,765 0,764	63	14,1	16,6	2,2
		0,972	1,028 1,203	63	18,2		
		0,827	0,824 1,003	63	17,5		
	AtTGA6	0,820	1,739 1,694	43	48,7	41,6	7,0
		0,789	1,415 1,403	43	41,5		
		0,933	1,367 1,418	43	34,7		
	CREB3L3	0,838	0,030 0,030	63	0,6	0,6	0,0
		0,834	0,030 0,029	63	0,6		
0,779		0,029 0,029	63	0,6			
+	+	1,008	2,670 2,440	43	58,9	62,1	6,2
		0,887	2,220 2,220	43	58,2		
		0,938	2,650 2,940	43	69,3		

Tabelle A.24 Rohdaten - Abbildung 2.20 F und G

pRW95-3	pGAD424	OD ₆₀₀	OD ₄₂₀	t	ME	MW	SD
mpZ765R ^{wt}	-	0,318	0,008 0,007	80	0,3	0,3	0,0
		0,343	0,008 0,008	80	0,3		
		0,362	0,007 0,008	80	0,3		
	CrGBF	0,155	0,007 0,007	80	0,6	0,4	0,2
		0,379	0,007 0,007	80	0,2		
		0,296	0,007 0,007	80	0,3		
	CvGBF BD	0,346	0,026 0,026	80	0,9	1,0	0,4
		0,311	0,015 0,015	80	0,6		
		0,216	0,025 0,025	80	1,4		
	AtGBF1	0,132	1,407 1,454	80	135,5	163,4	59,6
		0,241	2,369 2,369	80	122,9		
		0,086	1,514 1,676	80	231,8		
	NtTGA1a	0,177	0,448 0,448	80	31,6	26,5	13,4
		0,190	0,173 0,172	80	11,3		
		0,205	0,600 0,600	80	36,6		
	AtTGA6	0,227	0,800 0,671	80	40,5	46,5	10,0
		0,227	1,037 1,073	80	58,1		
		0,215	0,693 0,714	80	40,9		
	CREB3L3	0,206	0,001 0,001	80	0,1	0,1	0,0
		0,181	0,001 0,001	80	0,1		
0,163		0,001 0,001	80	0,1			
+	+	0,303	1,421 1,406	80	58,3	41,9	14,3
		0,209	0,555 0,584	80	34,1		
		0,061	0,157 0,167	80	33,2		
mpZ765R ^{del}	-	0,511	0,000 0,001	80	0,0	0,1	0,1
		0,322	0,001 0,001	80	0,0		
		0,441	0,009 0,010	80	0,3		
	CrGBF	0,107	0,000 0,000	80	0,0	0,3	0,2
		0,202	0,007 0,007	80	0,4		
		0,292	0,007 0,008	80	0,3		
	CvGBF BD	0,263	0,000 0,000	80	0,0	0,2	0,2
		0,271	0,004 0,004	80	0,2		
		0,339	0,010 0,009	80	0,4		
	AtGBF1	0,434	0,009 0,008	80	0,2	0,2	0,1
		0,266	0,002 0,002	80	0,1		
		0,346	0,003 0,004	80	0,1		
	NtTGA1a	0,293	0,004 0,005	80	0,2	0,3	0,2
		0,317	0,013 0,013	80	0,5		
		0,216	0,004 0,005	80	0,3		
	AtTGA6	0,207	0,005 0,006	80	0,3	0,3	0,0
		0,239	0,005 0,005	80	0,3		
		0,194	0,005 0,005	80	0,3		
	CREB3L3	0,416	0,012 0,012	80	0,4	0,2	0,1
		0,225	0,003 0,004	80	0,2		
0,315		0,004 0,005	80	0,2			
+	+	0,303	1,421 1,406	80	58,3	41,9	14,3
		0,209	0,555 0,584	80	34,1		
		0,061	0,157 0,167	80	33,2		

Tabelle A.25 Rohdaten. Abbildung 2.21 B - G und Abbildung 2.22 B - G

pUC18-GUS::	pUC35S	GUS	Brad.	Wert $\frac{\text{mg}}{\text{mg}}$	MW	SD
O	-	91 99 91	3251	0,00 0,00 0,00	0,01	0,00
	AtGBF1	90 90 87	3821	0,00 0,00 0,00	0,01	0,00
	CvGBF BD	70 77 80	3545	0,00 0,00 0,00	0,00	0,00
proZ063L	-	101 108 100	2922	0,00 0,01 0,00	0,01	0,00
	AtGBF1	98 102 103	2992	0,00 0,00 0,00	0,01	0,00
	CvGBF BD	104 106 100	3024	0,01 0,01 0,00	0,00	0,00
proZ063L	-	98 98 104	3246	0,00 0,00 0,01	0,01	0,00
	AtGBF1	109 98 109	3094	0,01 0,00 0,01	0,02	0,00
	CvGBF BD	106 101 104	3012	0,01 0,00 0,01	0,00	0,00
proZ134L	-	107 98 107	3189	0,01 0,00 0,01	0,02	0,00
	AtGBF1	92 90 92	3246	0,00 0,00 0,00	0,00	0,00
	CvGBF BD	88 88 86	3227	0,00 0,00 0,00	0,00	0,00
proZ134L	-	87 93 86	3061	0,00 0,00 0,00	0,00	0,00
	AtGBF1	91 89 91	3226	0,00 0,00 0,00	0,00	0,00
	CvGBF BD	94 102 94	3132	0,00 0,00 0,00	0,00	0,00
proZ174L	-	531 544 541	3227	0,21 0,22 0,22	0,65	0,00
	AtGBF1	427 433 414	3088	0,17 0,18 0,17	0,52	0,01
	CvGBF BD	1355 1345 1339	3152	0,64 0,63 0,63	0,63	0,00
proZ174L	-	587 575 591	2854	0,29 0,28 0,29	0,87	0,00
	AtGBF1	545 586 519	2874	0,26 0,29 0,25	0,80	0,02
	CvGBF BD	1657 1825 1660	3277	0,74 0,82 0,74	0,77	0,05
proZ326R	-	103 105 105	3213	0,01 0,01 0,01	0,02	0,00
	AtGBF1	96 98 96	3189	0,00 0,00 0,00	0,01	0,00
	CvGBF BD	90 88 95	3317	0,00 0,00 0,00	0,00	0,00
proZ326R	-	93 92 96	3148	0,00 0,00 0,00	0,00	0,00
	AtGBF1	95 94 97	3099	0,00 0,00 0,00	0,00	0,00
	CvGBF BD	93 92 90	3235	0,00 0,00 0,00	0,00	0,00
proZ765R	-	388 392 392	3105	0,15 0,15 0,15	0,46	0,00
	AtGBF1	1059 1155 1114	3180	0,48 0,53 0,51	1,52	0,02
	CvGBF BD	1933 2096 1896	3078	0,97 1,05 0,95	0,99	0,06
proZ765R	-	174 173 163	3305	0,04 0,04 0,03	0,11	0,00
	AtGBF1	355 372 354	3311	0,12 0,13 0,12	0,38	0,00
	CvGBF BD	4068 3863 4069	3008	2,17 2,05 2,17	2,13	0,06

Tabelle A.26 Rohdaten - Abbildung 2.24 und Abbildung 2.27 B - G

pUC18-GUS	pUC35S	GUS	Brad.	M $\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{g}}$	SD
O	-	396 352 317	1654 2176 2341	0,26	0,05
	Z174L	399 358 344	1674 2029 2017	0,33	0,04
	Z765R	404 345 350	2358 2426 2582	0,18	0,03
proZ063L	-	331 327 327	2892 2992 2944	0,11	0,00
	Z174L	284 307 286	3121 3299 3274	0,08	0,01
	Z765R	297 327 304	3175 3632 3106	0,08	0,01
proZ134L	-	127 128 133	2962 3078 3143	0,01	0,00
	Z174L	134 143 126	3317 3248 3380	0,01	0,00
	Z765R	112 118 116	3198 3303 3178	0,00	0,00
proZ174L	-	2001 2291 2012	3167 3057 3007	1,03	0,09
	Z174L	3379 3771 3392	3144 3281 3088	1,69	0,11
	Z765R	4816 5207 4769	3073 3113 3180	2,46	0,12
proZ280L	-	89 99 89	3255 3247 3176	0,00	0,00
	Z174L	102 98 107	3050 3311 3207	0,01	0,00
	Z765R	189 188 193	3028 3110 3131	0,05	0,00
proZ326R	-	299 312 314	2870 2956 2982	0,10	0,00
	Z174L	281 262 288	3275 3389 3362	0,07	0,01
	Z765R	272 259 278	3245 3235 3383	0,07	0,00
proZ765R	-	1369 1120 983	2140 2183 2442	0,96	0,18
	Z174L	2169 1950 1982	2019 2370 2601	1,66	0,10
	Z765R	1567 1323 1326	2159 1770 1895	1,70	0,19
proZ798L	-	3760 3228 2807	1729 1543 1646	7,12	1,08
	Z174L	4688 4298 4289	1518 1597 1650	11,06	0,59
	Z765R	4749 4050 3914	1885 2178 1888	5,19	0,57
35S	-	1367 1239 1378	3137 3094 3401	0,59	0,04
	Z174L	3910 3236 3783	2912 3025 3168	1,89	0,19
	Z765R	1633 1584 1743	3038 3154 3036	0,80	0,04

Tabelle A.27 Rohdaten - Abbildung 2.25 B

pOPT	pARG7	Kolonien	MW	SD
-	O	0 0	0	0
	proZ280L	0 0	0	0
	proZ798L	10 39	24	21
	proARG7	7 48	27	29
mVenus	O	0 0	0	0
	proZ280L	0 0	0	0
	proZ798L	6 42	9	5
	proARG7	7 30	5	2
mVenus:Z174L	O	0 0	0	0
	proZ280L	0 0	0	0
	proZ798L	5 24	12	10
	proARG7	3 7	14	15

Rohdaten - Kapitel 3

Tabelle A.28 Rohdaten - Inhibierung der Virusinfektion mit MG115 und MG132. Algenanzahl $\times 10^8$ gezählt bei der Verdünnung $\times 10^{-5}$ - Abbildung 3.1 A

-	+ MG132	+ MG115	+ 5-FU
2,6	2,55	1,85	2,5
2,65	1,05	1,85	1,95
2,95	1	1,85	1,3

Tabelle A.29 Rohdaten - Inhibierung der Virusinfektion mit MG132. Algenanzahl $\times 10^8$ gezählt bei der Verdünnung $\times 10^{-5}$ - Abbildung 3.1 B

-	25 μ M	50 μ M	75 μ M
2,6	1,85	2,55	1,25
2,65	2,55	1,05	1
2,95	2	1	1,7

Tabelle A.30 Rohdaten - Inhibierung der Virusinfektion mit MG115. Algenanzahl $\times 10^8$ gezählt bei der Verdünnung $\times 10^{-5}$ - Abbildung 3.1 C

-	25 μ M	50 μ M	75 μ M
2,6	1,6	1,85	2,5
2,65	2,7	1,85	0,8
2,95	2,15	1,85	1,65

Tabelle A.31 Rohdaten - Abbildung 3.7 B und C

pGBT9	pGAD424	OD ₆₀₀	OD ₄₂₀	t	ME	MW	SD
-	Z292L	0,726	0,006 0,007	140	0,06	0,07	0,01
		0,619	0,006 0,009	140	0,09		
		0,635	0,006 0,006	140	0,07		
Z292L	-	0,556	0,007 0,007	140	0,09	0,08	0,02
		0,802	0,007 0,006	140	0,06		
		0,670	0,013 0,006	140	0,10		
Z292L	Z292L	0,741	0,259 0,267	140	2,54	2,52	0,83
		0,673	0,154 0,163	140	1,68		
		0,809	0,410 0,348	140	3,35		
Z292L	AtCUL1	0,938	0,006 0,006	140	0,05	0,07	0,03
		0,840	0,006 0,019	140	0,11		
		0,595	0,006 0,006	140	0,07		
Z292L	AtCUL3	0,771	0,007 0,007	140	0,06	0,06	0,00
		0,755	0,007 0,007	140	0,07		
		0,832	0,007 0,007	140	0,06		

Tabelle A.32 Rohdaten - Abbildung 3.7 D und E

pGBT9	pGAD424	OD ₆₀₀	OD ₄₂₀	t	ME	MW	SD
-	Z292L	0,681	0,033 0,028	130	0,34	0,29	0,05
		0,723	0,027 0,022	130	0,26		
		0,835	0,028 0,028	130	0,26		
A481L	A481L	0,85	1,175 1,191	130	10,71	9,73	0,84
		0,771	0,955 0,898	130	9,24		
		0,771	0,955 0,898	130	9,24		
A481L	-	0,794	0,023 0,024	130	0,23	0,30	0,07
		0,756	0,03 0,03	130	0,31		
		0,624	0,029 0,03	130	0,36		
A481L	AtCUL1	0,27	0,022 0,022	130	0,63	0,94	0,83
		0,088	0,022 0,021	130	1,88		
		0,595	0,027 0,021	130	0,31		
A481L	AtCUL3	0,749	0,026 0,026	130	0,27	0,39	0,18
		0,266	0,021 0,02	130	0,59		
		0,756	0,03 0,03	130	0,31		

Tabelle A.33 Rohdaten - Abbildung 3.10 C und D

pGBT9	pGAD424	OD ₆₀₀	OD ₄₂₀	t	ME	MW	SD
Z292L	-	0,883	0,007 0,014	215	0,06	0,07	0,019
		0,831	0,006 0,014	215	0,06		
		0,818	0,013 0,018	215	0,09		
Z292L	CrENO	0,524	0,411 0,421	215	3,69	3,44	0,25
		0,588	0,428 0,445	215	3,45		
		0,675	0,456 0,469	215	3,19		
Z292L	AtENO2	0,899	0,018 0,018	215	0,09	0,05	0,044
		0,744	0,001 0,001	215	0,01		
		0,921	0,008 0,008	215	0,04		
Z292L	AtENOc	0,808	0,000 0,00	215	0,00	0,01	0,023
		0,781	0,000 0,00	215	0,00		
		0,858	0,007 0,008	215	0,04		
A481L	-	0,794	0,023 0,024	130	0,23	0,30	0,07
		0,756	0,030 0,030	130	0,31		
		0,624	0,029 0,030	130	0,36		
A481L	CrENO	0,230	0,008 0,008	135	0,26	0,22	0,05
		0,243	0,008 0,008	135	0,24		
		0,403	0,009 0,009	135	0,17		
A481L	AtENO2	0,793	0,015 0,016	130	0,15	0,24	0,08
		0,671	0,027 0,027	130	0,31		
		0,767	0,027 0,026	130	0,27		
A481L	AtENOc	0,709	0,038 0,033	130	0,39	0,29	0,08
		0,713	0,024 0,025	130	0,26		
		0,842	0,025 0,025	130	0,23		

Tabelle A.34 Rohdaten - Abbildung 3.9 B – F

pGBT9	pGAD424	OD ₆₀₀	OD ₄₂₀	t	ME	MW	SD
Z292L	-	0,884	0,013 0,000	120	0,06	0,02	0,04
		0,953	0,000 0,000	120	0,00		
		0,849	0,000 0,000	120	0,00		
-	CrENO ^{Frage}	0,633	0,000 0,000	120	0,00	0,00	0,00
		0,667	0,000 0,000	120	0,00		
		0,514	0,000 0,000	120	0,00		
Z292L	CrENO ^{Frage}	0,735	0,279 0,233	120	2,90	2,85	0,43
		0,978	0,376 0,386	120	3,25		
		0,896	0,243 0,272	120	2,39		
-	CrPFL ^{Frage}	0,867	0,000 0,000	120	0,00	0,00	0,00
		0,932	0,000 0,000	120	0,00		
		1,069	0,000 0,000	120	0,00		
CrPFL	-	0,829	0,000 0,000	120	0,00	0,00	0,00
		0,718	0,000 0,000	120	0,00		
		0,272	0,000 0,000	120	0,00		
Z292L	CrPFL ^{Frage}	1,329	0,000 0,000	120	0,00	0,00	0,00
		1,084	0,000 0,000	120	0,00		
		0,969	0,000 0,000	120	0,00		
Z292L	-	0,978	0,014 0,013	80	0,17	0,14	0,04
		1,014	0,013 0,013	80	0,16		
		0,947	0,008 0,007	80	0,10		
-	AtACX3	1,053	0,013 0,013	80	0,15	0,12	0,03
		0,859	0,007 0,007	80	0,10		
		0,875	0,007 0,007	80	0,10		
Z292L	AtACX3	0,976	0,008 0,008	80	0,10	0,14	0,04
		0,845	0,009 0,009	80	0,13		
		0,913	0,014 0,013	80	0,18		
A481L	-	0,794	0,023 0,024	130	0,23	0,30	0,07
		0,756	0,030 0,030	130	0,31		
		0,624	0,029 0,030	130	0,36		
A481L	CrENO ^{Frage}	0,23	0,008 0,008	135	0,26	0,22	0,05
		0,243	0,008 0,008	135	0,24		
		0,403	0,009 0,009	135	0,17		
A481L	AtACX3	0,718	0,013 0,017	130	0,16	0,20	0,06
		0,718	0,013 0,017	130	0,16		
		0,494	0,017 0,018	130	0,27		
A481L	CrPFL ^{Frage}	0,579	0,024 0,024	130	0,32	0,28	0,03
		0,653	0,023 0,023	130	0,27		
		0,714	0,024 0,024	130	0,26		

Tabelle A.35 Rohdaten - Abbildung 3.13 B – F

pGBT9	pGAD424	OD ₆₀₀	OD ₄₂₀	t	ME	MW	SD
Z339L	-	1,674	0,055 0,037	180	0,15	0,14	0,01
		1,738	0,047 0,035	180	0,13		
		1,700	0,043 0,038	180	0,13		
Z339L	AtCUL1	0,579	0,083 0,083	90	1,59	1,30	0,45
		0,474	0,065 0,066	90	1,54		
Z339L	AtCUL3	1,200	0,087 0,081	90	0,78	1,47	0,38
		0,567	0,099 0,080	90	1,75		
		0,480	0,075 0,066	90	1,63		
		0,537	0,023 0,077	90	1,03		
A039L	-	1,051	0,086 0,068	150	0,49	0,32	0,15
		1,082	0,045 0,044	150	0,27		
		0,992	0,029 0,028	150	0,19		
A039L	AtCUL1	0,874	0,049 0,037	150	0,33	0,34	0,18
		0,757	0,063 0,055	150	0,52		
A039L	AtCUL3	1,007	0,024 0,024	150	0,16	0,22	0,08
		1,018	0,023 0,023	150	0,15		
		1,120	0,066 0,037	150	0,31		
		1,120	0,036 0,037	150	0,22		
AtSKP1	-	1,222	0,006 0,007	180	0,03	0,03	0,00
		1,241	0,005 0,007	180	0,03		
		1,308	0,008 0,006	180	0,03		
AtSKP1	AtCUL1	0,141	0,014 0,016	90	1,18	1,16	0,57
		0,247	0,037 0,039	90	1,71		
AtSKP1	AtCUL3	0,144	0,006 0,009	90	0,58	1,34	1,11
		1,052	0,146 0,145	90	1,54		
		0,237	0,050 0,050	90	2,34		
		1,137	0,018 0,012	90	0,15		
A039L	-	1,051	0,086 0,068	150	0,49	0,32	0,15
		1,082	0,045 0,044	150	0,27		
		0,992	0,029 0,028	150	0,19		
A039L	A039L	1,318	0,179 0,179	150	0,91	0,55	0,31
		1,338	0,062 0,067	150	0,32		
Z339L	-	1,421	0,086 0,094	150	0,42	0,54	0,30
		1,413	0,188 0,187	210	0,63		
		1,316	0,218 0,218	210	0,79		
Z339L	Z339L	1,230	0,054 0,054	210	0,21	0,41	0,18
		1,360	0,103 0,104	210	0,36		
		1,419	0,075 0,074	210	0,25		
		1,200	0,152 0,153	210	0,61		

Tabelle A.36 Rohdaten - Abbildung 3.14 B – D

pBGT9	pGAD424	OD ₆₀₀	OD ₄₂₀	t	ME	MW	SD
Z339L	-	0,826	0,716 0,786	50	18,18	15,94	1,95
		0,669	0,507 0,495	50	14,98		
		0,747	0,547 0,547	50	14,65		
-	Z339L	0,590	0,006 0,004	50	0,17	0,16	0,01
		0,994	0,008 0,008	50	0,16		
		1,011	0,008 0,007	50	0,15		
GBD-Z339L		0,543	0,257 0,260	60	7,93	7,71	0,55
		0,674	0,280 0,293	60	7,08		
		0,624	0,313 0,294	60	8,11		
GAD-Z339L		0,887	0,021 0,019	60	0,38	0,57	0,38
		0,283	0,017 0,017	60	1,00		
		0,816	0,016 0,016	60	0,33		
LexA-Z339L		0,300	0,011 0,012	60	0,64	0,59	0,37
		0,188	0,010 0,011	60	0,93		
		0,848	0,009 0,011	60	0,20		
-		1,174	0,071 0,047	180	0,28	0,19	0,08
		1,178	0,029 0,034	180	0,15		
		1,164	0,028 0,027	180	0,13		
AtSKP1		1,222	0,006 0,007	180	0,03	0,03	0,00
		1,241	0,005 0,007	180	0,03		
		1,308	0,008 0,006	180	0,03		
A039L		1,267	0,190 0,202	150	1,03	0,78	0,21
		1,290	0,121 0,130	150	0,65		
		1,339	0,135 0,135	150	0,67		
Z339L		0,543	0,257 0,260	60	7,93	7,71	0,55
		0,674	0,280 0,293	60	7,08		
		0,624	0,313 0,294	60	8,11		

Tabelle A.37 Rohdaten - Abbildung 3.15 B

pGBT9	OD ₆₀₀	OD ₄₂₀	t	ME	MW	SD
-	0,282	0,003 0,002	30	0,30	0,27	0,04
	0,676	0,005 0,007	30	0,30		
	0,956	0,007 0,006	30	0,23		
Z339L ^{BTB}	0,780	0,005 0,006	30	0,24	0,23	0,04
	0,948	0,005 0,006	30	0,19		
	0,738	0,005 0,007	30	0,27		
Z339L ^{SKP1}	0,794	0,820 0,831	30	34,66	33,42	3,98
	1,033	1,136 1,134	30	36,62		
	0,500	0,468 0,401	30	28,97		
Z339L	0,771	0,764 0,789	30	33,57	36,57	2,62
	0,915	1,034 1,035	30	37,69		
	0,845	0,946 1,003	30	38,44		

Tabelle A.38 Rohdaten - Abbildung 3.16 B, C und E

pGBT9	pGAD424	OD ₆₀₀	OD ₄₂₀	t	ME	MW	SD
Z339L	-	0,300	0,011 0,012	60	0,64	0,59	0,37
		0,188	0,010 0,011	60	0,93		
		0,848	0,009 0,011	60	0,20		
Z339L	AtGRH1	0,648	0,016 0,016	60	0,41	0,62	0,18
		0,434	0,022 0,017	60	0,75		
		0,596	0,025 0,025	60	0,70		
Z339L	ScGRR1	1,561	0,025 0,022	60	0,25	0,27	0,05
		1,768	0,034 0,036	60	0,33		
		1,223	0,016 0,017	60	0,22		
GBD-Z339L	-	0,543	0,257 0,260	60	7,93	7,71	0,55
		0,674	0,280 0,293	60	7,08		
		0,624	0,313 0,294	60	8,11		
AtGRH1	-	0,947	0,026 0,026	200	0,14	0,15	0,01
		0,848	0,026 0,026	200	0,15		
		0,777	0,030 0,021	200	0,16		
AtGRH1	Z339L	0,984	0,030 0,030	200	0,15	0,16	0,01
		0,909	0,030 0,031	200	0,17		
		0,666	0,022 0,022	200	0,17		
ScGRR1	-	0,647	0,059 0,059	200	0,46	0,35	0,14
		0,692	0,035 0,035	200	0,25		
ScGRR1	Z339L	1,037	0,068 0,086	200	0,37	0,42	0,04
		1,049	0,097 0,088	200	0,44		
		0,886	0,079 0,079	200	0,45		
ScGRR1 ^{f-box}	-	0,335	0,006 0,006	100	0,18	0,16	0,02
		0,438	0,006 0,007	100	0,15		
		0,505	0,007 0,008	100	0,15		
ScGRR1 ^{f-box}	Z339L	0,637	0,011 0,010	100	0,16	0,13	0,06
		0,585	0,010 0,010	100	0,17		
		0,604	0,004 0,004	100	0,07		
GBD-Z339L	-	0,629	0,954 0,972	100	15,31	11,91	5,55
		0,739	1,212 0,991	100	14,91		
		1,029	1,133 0,000	100	5,51		
AtSKP1	-	1,133	0,006 0,007	60	0,10	0,17	0,07
		0,922	0,010 0,010	60	0,18		
		1,000	0,012 0,017	60	0,24		
AtSKP1	AtGRH1	0,738	0,008 0,015	60	0,26	0,63	0,41
		0,178	0,011 0,012	60	1,08		
		0,192	0,006 0,007	60	0,56		
AtSKP1	ScGRR1	0,400	0,028 0,028	60	1,17	0,72	0,39
		0,500	0,016 0,017	60	0,55		
		0,616	0,018 0,014	60	0,43		
GBD-Z339L	-	0,543	0,257 0,260	60	7,93	7,71	0,55
		0,674	0,280 0,293	60	7,08		
		0,624	0,313 0,294	60	8,11		

Erklärung

Eidesstattliche Versicherung über die eigenständig erbrachte Leistung gemäß § 18 Absatz 3 Satz 5 der Promotionsordnung der Universität Hohenheim für die Fakultäten Agrar-, Natur- sowie Wirtschafts- und Sozialwissenschaften

1. Bei der eingereichten Dissertation zum Thema: “Wirt-Virus Wechselwirkungen bei der Infektion durch *Acanthocystis turfacea* *Chlorella* Virus 1: Regulation der Genexpression früher Gene und des Ubiquitin-Systems” handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.

3. Ich habe nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung oder -beratung in Anspruch genommen.

4. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und deren strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärung bestätige ich. Ich versichere an Eides Statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erkläre und nichts verschwiegen habe.

Ort, Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Kamila Katarzyna Lindner
Geburtsdaten 16. Juli 1985 in Góra, Polen
Staatsangehörigkeit Polnisch

Akademischer Werdegang

2014 – 2021 Promotion am Institut für Biologie, Fachgebiet: Allgemeine Virologie; Universität Hohenheim, Stuttgart
2011 – 2014 Master of Science in Biologie, Universität Hohenheim, Stuttgart
2008 – 2011 Bachelor of Science in Biologie, Universität Hohenheim, Stuttgart
2006 – 2008 Diplom Technische Biologie, Universität Stuttgart, Stuttgart, ohne Abschluss
2005 – 2006 Diplom Umweltschutztechnik, Universität Stuttgart, Stuttgart, ohne Abschluss
2001 – 2004 Abitur, I. Adam Mickiewicz Allgemeinbildende Lyzeum in Góra, Polen

Berufliche Tätigkeiten

2019 – 2020 Tätigkeit als wissenschaftliche Angestellte am Institut für Biologie, Fachgebiet: Allgemeine Virologie
2015 – 2018 Tätigkeit als geprüfte wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Biologie, Fachgebiet: Allgemeine Virologie
2010 – 2011 Tätigkeit als studentische Hilfskraft am Institut für Biologie, Fachgebiet: Genetik

Ort, Datum

Unterschrift

Wissenschaftliche Beiträge

Tagungsbeiträge

Lindner, K., Wahl, B., Krix, V., and Pfitzner, A. (2019). Early promoters of ATCV-1 show a broad cross-species activity. 11th Regio Plant Science Meeting 2019, Postervorstellung.

Lindner, K., Saur, M., and Pfitzner, A. (2015). Molecular Mimicry in Algae Viruses. 8th Regio Plant Science Meeting 2015, Postervorstellung.

Lindner, K., Saur, M., and Pfitzner, A. (2015). Molecular Mimicry in Algae Viruses. 2nd Summer Academy in Plant Molecular Biology, Postervorstellung.

Publikationen in Arbeit

Lindner, K., Stark, J., Saur, M., Schleicher, L., Gerber., Witte, S., Tyler, L. Pfitzner, U. M. and Pfitzner, A. J. P. (2021). Ubiquitin-mediated protein degradation and modulation is regulated by ATCV-1.

Lindner, K., Bluthardt, N., Wahl, B., Nowak, C., Wucherer, V., Stapf, L., Pfitzner, U. M. and J. P. (2021). Expression of the early ATCV-1 gene Z798L is regulated by plant transcription factors.

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Allen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt und motiviert haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Artur Pfitzner für die fachliche Betreuung während der gesamten Zeit. Für die Überlassung des interessanten Themas, die hilfreichen Anregungen, die wissenschaftlichen Freiräume und für die konstruktive Kritik bei der Erstellung dieser Arbeit möchte ich mich herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Andreas Schaller danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Arbeit und Frau Prof. Dr. Waltraud Schulze danke ich für die Bereitschaft, Teil der Prüfungskommission meiner mündlichen Prüfung zu sein.

Ein Dank geht natürlich auch an alle Mitglieder der Arbeitsgruppe Pfitzner für das schöne und entspannte Arbeitsklima. Bei Ingrid und Christine möchte ich mich für die Unterstützung bei Klonierungen bedanken und für die zahlreichen Tipps und Tricks. Roxy, Thomas und Thorsten möchte ich für die Versorgung der Pflanzen im Gewächshaus danken.

Meinen Studenten: Angelina, Aylin, Benny, Cindy, Meli, Nadja, Vanessa und Viola danke für die Übernahme zahlreicher Klonierungen und für die Unterstützung bei der Durchführung einiger Experimente. Auch für die netten Gespräche und das angenehme Arbeitsklima möchte ich mich bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Freundinnen Anna, Evi, Karla und Mona. Bei euch möchte ich mich für all die schönen Momente während des Studiums, dieser Arbeit aber auch meiner Freizeit bedanken. Für eure Unterstützung, die aufbauenden Worte und für das kritische Lesen dieser Arbeit möchte ich mich besonders herzlich bedanken.

Abschließend möchte ich mich bei Mario und Ania bedanken, die mir mein Studium durch ihre Unterstützung ermöglicht haben und stets ein offenes Ohr für mich hatten.