

**Biochemische Untersuchungen**  
**zur Funktion, Struktur und Phosphorylierung**  
**des Stressproteins CDeT11-24**  
**aus der trockenoleranten Pflanze**  
***Craterostigma plantagineum***

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Jan Petersen**

aus  
Lüneburg

Bonn 2012

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. Dorothea Bartels

2. Gutachter Herr PD Dr. Hans-Hubert Kirch

Tag der Promotion: 08.03.2013

Erscheinungsjahr: 2014

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Wasser, ein limitierender Faktor für die Landwirtschaft	1
1.2 Anpassungen von Pflanzen an Wassermangel	2
1.3 Austrocknungstoleranz	3
1.4 <i>Craterostigma plantagineum</i> : ein Modellorganismus für Austrocknungstoleranz	4
1.5 Die molekulare Trockenstressantwort	5
1.6 „Late Embryogenesis Abundant“ Proteine	7
1.6.1 Nomenklatur	8
1.6.2 Funktion	9
1.6.3 Struktur	11
1.7 CDeT11-24: ein LEA-like Protein aus <i>Craterostigma plantagineum</i>	12
1.8 Phosphorylierung von Proteinen	15
1.9 Intrinsisch ungeordnete Proteine	17
1.10 Zielsetzung der Arbeit	19
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>20</b>
2.1 Chemikalien	20
2.2 Kits	20
2.3 Geräte	20
2.4 Enzyme und Marker	21
2.5 Sonstige Materialien	22
2.6 Software	22
2.7 Pflanzenmaterial	23
2.7.1 Austrocknung und Bestimmung des relativen Wassergehalts	23
2.8 Bakterienstämme	23
2.9 Vektoren	24
2.10 Primer	24
2.11 Mikrobiologische Methoden	25
2.11.1 Anzucht von Bakterien	25

2.11.2	Glycerin-Stammkulturen	25
<b>2.12</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>25</b>
2.12.1	Plasmid Isolierung im kleinen Maßstab	25
2.12.2	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion	26
2.12.3	Restriktionsverdau von DNA	27
2.12.4	Ligation	27
2.12.5	Herstellung Rubidiumchlorid-kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen	27
2.12.6	Transformation Rubidiumchlorid-kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen	28
2.12.7	DNA-Sequenzierung	29
2.12.8	Bestimmung der DNA-Konzentration	29
2.12.9	Polymerase-Kettenreaktion	29
2.12.10	Ortsgerichtete Mutagenese	30
2.12.11	Kolonie-PCR	30
2.12.12	Agarose-Gelelektrophorese	31
2.12.13	Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel	31
<b>2.13</b>	<b>Allgemeine proteinbiochemische Methoden</b>	<b>31</b>
2.13.1	Fällung von Proteinen mit Aceton	31
2.13.2	Fällung von Proteinen mit TCA	32
2.13.3	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	32
2.13.4	Bestimmung der Proteinkonzentration bei 280 nm	32
<b>2.14</b>	<b>Heterologe Expression von rekombinantem Protein in <i>E. coli</i></b>	<b>33</b>
2.14.1	Native Aufreinigung von rekombinanten Protein aus <i>Escherichia coli</i>	33
2.14.2	Native Aufreinigung von rekombinantem CDeT11-24 ohne 6His-tag	34
<b>2.15</b>	<b>Elektrophorese von Proteinen</b>	<b>35</b>
2.15.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	35
2.15.2	2D-Gelelektrophorese	36
2.15.3	Coomassie-Brillant-Blau-Färbung von Proteinen im Gel	37
2.15.4	Phosphoproteinfärbung mit Pro-Q Diamond	38
2.15.5	Trocknen von Polyacrylamid-Gelen	38
2.15.6	Western Blot	39
2.15.7	Ponceau Färbung	39
2.15.8	Immunologischer Proteinnachweis	39
<b>2.16</b>	<b>Aufreinigung von nativem CDeT-11-24 aus <i>Craterostigma plantagineum</i></b>	<b>40</b>
2.16.1	Kopplung von Proteinen an eine HiTrap NHS-aktivierte Säule	40
2.16.2	Isolierung monospezifischer Antikörper mit einer Antigen-Säule	41
2.16.3	Aufreinigung von „leicht löslichem“ Protein aus <i>Craterostigma plantagineum</i>	42
2.16.4	Immunaффinitätschromatographie	42
2.16.5	Anreicherung von phosphoryliertem CDeT11-24	43
<b>2.17</b>	<b>Circulardichroismus-Spektroskopie</b>	<b>43</b>
<b>2.18</b>	<b>Enzym-Austrocknungs-Assays</b>	<b>43</b>
2.18.1	Citratsynthase-Austrocknungs-Assay	43

2.18.2	Lactatdehydrogenase Austrocknungs-Assay	44
<b>2.19</b>	<b>Protein-Lipid-Interaktion</b>	<b>44</b>
2.19.1	Protein-Lipid-Interaktion in Lösung	45
2.19.2	Protein-Lipid-Interaktion auf Nitrocellulose-Membran	45
<b>2.20</b>	<b>Kinase Aufreinigung</b>	<b>46</b>
2.20.1	Aufreinigung von nativem Gesamtprotein	46
2.20.2	Fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat	46
2.20.3	Ionenaustauschchromatographie mit einer HiTrap SP FF Säule	47
2.20.4	Hydrophobe Interaktionschromatographie	47
2.20.5	Ionenaustauschchromatographie mit der FPLC	48
2.20.6	Anreicherung von Kinasen	49
<b>2.21</b>	<b>Kinase Assays</b>	<b>49</b>
2.21.1	In-Gel-Kinase-Assay	49
2.21.2	<i>In vitro</i> Kinase Assay	51
<b>2.22</b>	<b>Massenspektrometrie</b>	<b>52</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>53</b>
<b>3.1</b>	<b>Aufreinigung und Lipidbindung des CDeT11-24 Proteins</b>	<b>53</b>
3.1.1	<i>In silico</i> Analyse des Lysin-reichen Sequenzelements von CDeT11-24	53
3.1.2	Lipidbindung des rekombinanten Proteins 6His-CDeT11-24	55
3.1.2.1	Klonierung und Aufreinigung des 6His-CDeT11-24 Proteins	55
3.1.2.2	Protein-Lipid-Overlay-Assay und Liposomen-Assay mit rekombinantes 6His-CDeT11-24 Protein	56
3.1.3	Lipidbindung von nativem CDeT11-24 Protein	59
3.1.4	Lipidbindung von rekombinantes CDeT11-24 ohne 6His-Tag	60
3.1.4.1	Klonierung und Aufreinigung von CDeT11-24 ohne 6His-Tag	60
3.1.4.2	Protein-Lipid-Overlay-Assay und Liposomen-Assay mit rekombinantes CDeT11-24 Protein ohne 6His-Tag	62
3.1.5	Lipidbindung von $\Delta$ K-CDeT11-24	64
3.1.5.1	Klonierung und Aufreinigung von $\Delta$ K-CDeT11-24	64
3.1.5.2	Protein-Lipid-Overlay-Assay und Liposomen-Assay mit rekombinantes $\Delta$ K-CDeT11-24	66
3.1.6	Liposomen-Aggregation durch CDeT11-24	67
<b>3.2</b>	<b>Untersuchungen zur Proteinstruktur von CDeT11-24</b>	<b>68</b>
3.2.1	<i>In silico</i> Untersuchungen der CDeT11-24 Proteinstruktur	68
3.2.2	Circulardichroismus-Spektroskopie von phosphoryliertes und nicht-phosphoryliertes CDeT11-24	71
3.2.2.1	Aufreinigung von phosphoryliertes und nicht-phosphoryliertes CDeT11-24 aus <i>Cratogeomys plantagineum</i>	71
3.2.2.2	<i>In vitro</i> Phosphorylierung des 6His-CDeT11-24 Proteins mit Casein Kinase 2	72
3.2.2.3	Circulardichroismus-Spektroskopie von phosphoryliertes und nicht-phosphoryliertes CDeT11-24	73

3.2.3	Circulardichroismus-Spektroskopie von 6His-CDeT11-24 mit Trifluorethanol	74
3.2.4	Circulardichroismus-Spektroskopie von 6His-CDeT11-24 mit SDS	75
3.2.5	Circulardichroismus-Spektroskopie von CDeT11-24 und $\Delta$ K-CDeT11-24	76
3.2.6	Circulardichroismus Spektroskopie von CDeT11-24 und $\Delta$ K-CDeT11-24 mit TFE	77
3.2.7	Circulardichroismus-Spektroskopie von getrocknetem CDeT11-24	79
<b>3.3</b>	<b>Schutzfunktion von CDeT11-24 <i>in vitro</i></b>	<b>80</b>
3.3.1	Citratsynthase-Austrocknung-Assay	80
3.3.2	Lactatdehydrogenase-Austrocknungs-Assay	81
<b>3.4</b>	<b>Identifizierung von CDeT11-24 phosphorylierenden Kinasen</b>	<b>83</b>
3.4.1	In-Gel-Kinase-Assay mit Myelin Basic Protein	83
3.4.2	In-Gel-Kinase-Assay mit 6His-CDeT11-24	84
3.4.3	Aufreinigung von CDeT11-24 Kinasen	85
3.4.3.1	Fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat	86
3.4.3.2	Ionenaustauschchromatographie mit HiTrap SP FF	87
3.4.3.3	Hydrophobe Interaktionschromatographie mit HiTrap Phenyl Sepharose HP	89
3.4.3.4	Ionenaustauschchromatographie mit Mono S	90
3.4.3.5	Spezifische Aktivität der Kinaseanreicherung	94
3.4.3.6	Kinaseanreicherung	95
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>97</b>
<b>4.1</b>	<b>Lipidbindung von CDeT11-24</b>	<b>97</b>
4.1.1	Das CDeT11-24 Protein bindet <i>in vitro</i> an Phosphatidsäure	98
4.1.2	Das Lysin-reiche Sequenzelement ist Bestandteil der Phosphatidsäure Bindung des CDeT11-24 Proteins	99
4.1.3	Die Bindung des 6His-CDeT11-24 Proteins an Phosphatidsäure wird durch den 6His-Tag verursacht	102
4.1.4	Das CDeT11-24 Protein induziert die Aggregation von Liposomen	103
4.1.5	Hypothetische Funktion der CDeT11-24 Bindung an Phosphatidsäure	104
<b>4.2</b>	<b><i>In vitro</i> Schutzfunktion von CDeT11-24</b>	<b>106</b>
4.2.1	Das CDeT11-24 Protein schützt Enzyme vor einem Aktivitätsverlust durch Austrocknung	106
4.2.2	Das Lysin-reiche Sequenzelement ist ausschlaggebend für die Schutzfunktion des CDeT11-24 Proteins	107
<b>4.3</b>	<b>Strukturuntersuchungen des CDeT11-24 Proteins durch CD-Spektroskopie</b>	<b>108</b>
4.3.1	Die Phosphorylierung hat keinen Einfluss auf die intrinsisch ungeordnete Struktur des CDeT11-24 Proteins	108
4.3.2	Das CDeT11-24 Protein hat die Neigung zur „ <i>disorder to order</i> “-Transition	109
4.3.3	Die Struktur des Lysin-reichen Sequenzelements	111
<b>4.4</b>	<b>Isolierung und Identifikation von CDeT11-24 Kinasen</b>	<b>112</b>
4.4.1	Beurteilung der biochemischen Aufreinigung von CDeT11-24 Kinasen	112
4.4.2	Identifizierung von CDeT11-24 Kinasen	114

<b>4.5</b>	<b>CDeT11-24 Kinasen</b>	<b>115</b>
<b>4.6</b>	<b>Ausblick</b>	<b>117</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>119</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>121</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>139</b>
<b>7.1</b>	<b>Vektorkarten</b>	<b>139</b>
<b>7.2</b>	<b>DNA-Sequenzen</b>	<b>144</b>
<b>7.3</b>	<b>Proteinsequenzen</b>	<b>144</b>
<b>7.4</b>	<b>Massenspektrometrische Kinase-Identifizierung</b>	<b>145</b>
7.4.1	Identifizierung der CK2 $\alpha$ -Peptide	145
7.4.2	Identifizierung des cpVIK-Peptids	149
<b>7.5</b>	<b>Danksagung</b>	<b>151</b>
<b>7.6</b>	<b>Teilpublikation</b>	<b>152</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Zunahme von Trockenphasen	1
Abbildung 1.2: AavLEA1-Protein Struktur bei unterschiedlichem Wassergehalt	12
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des CDeT11-24 Proteins	13
Abbildung 1.4: Referenz CD-Spektren von Sekundärstrukturmotiven	18
Abbildung 3.1: <i>In silico</i> Analyse des Lysin-reichen Sequenzelements von CDeT11-24	54
Abbildung 3.2: Klonierungsstrategie und Aufreinigung des 6His-CDeT11-24 Proteins	56
Abbildung 3.3: Lipidbindung von 6His-CDeT11-24	57
Abbildung 3.4: Vorhergesagte Peptide durch einen Kompletterverdau von CDeT11-24 mit Arg-C	58
Abbildung 3.5: Liposomen-Assay des CDeT11-24 Arg-G Verdaus	59
Abbildung 3.6: Lipidbindung von nativem CDeT11-24 aus <i>C. plantagineum</i>	60
Abbildung 3.7: Klonierungsstrategie und Aufreinigung von CDeT11-24	61
Abbildung 3.8: Lipidbindung von CDeT11-24	63
Abbildung 3.9: Klonierungsstrategie und Aufreinigung von $\Delta$ K-CDeT11-24	65
Abbildung 3.10: Lipidbindung von $\Delta$ K-CDeT11-24	66
Abbildung 3.11: Liposomen unter dem Lichtmikroskop	67
Abbildung 3.12: <i>In silico</i> Vorhersage unstrukturierter Sequenzbereiche von CDeT11-24 mit PONDR-Fit	68
Abbildung 3.13: Sekundärstrukturvorhersage des CDeT11-24 Proteins	70
Abbildung 3.14: Aufreinigung von CDeT11-24 aus <i>C. plantagineum</i>	72
Abbildung 3.15: Phosphorylierung von 6His-CDeT11-24 mit CK2	73
Abbildung 3.16: Strukturvergleich von phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem CDeT11-24	74
Abbildung 3.17: Änderung der 6His-CDeT11-24 Sekundärstruktur durch TFE	75
Abbildung 3.18: Änderung der 6His-CDeT11-24 Sekundärstruktur durch SDS	76
Abbildung 3.19: CD-Spektrum von rekombinantem CDeT11-24 und $\Delta$ K-CDeT11-24	77
Abbildung 3.20: Änderung der Sekundärstruktur von CDeT11-24 und $\Delta$ K-CDeT11-24 durch TFE	78
Abbildung 3.21: Änderung der CDeT11-24 Sekundärstruktur durch Austrocknung	79
Abbildung 3.22: Citratsynthase-Austrocknungs-Assay	81
Abbildung 3.23: Lactatdehydrogenase-Austrocknungs-Assay	82
Abbildung 3.24: In-Gel-Kinase-Assay mit <i>C. plantagineum</i> Proteinextrakt und MBP als Substrat	84
Abbildung 3.25: In-Gel-Kinase-Assay mit <i>C. plantagineum</i> Proteinextrakt und 6His-CDeT11-24 als Substrat	85
Abbildung 3.26: Aufreinigungsstrategie von CDeT11-24 phosphorylierenden Kinasen	86
Abbildung 3.27: Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung von 2 % RWC Gesamtextrakt	87
Abbildung 3.28: 2D In-Gel-Kinase-Assay	88
Abbildung 3.29: Ionenaustauschchromatographie mit HiTrap SP FF	88
Abbildung 3.30: Hydrophobe Interaktionschromatographie mit HiTrap Phenyl Sepharose HP	89
Abbildung 3.31: Chromatographische Reinigung der 0,6 M HIC Fraktion durch eine Mono S-Säule	91
Abbildung 3.32: Chromatographische Reinigung der 0,3 M HIC Fraktion durch eine Mono S-Säule	93
Abbildung 3.33: Kinaseanreicherung	96
Abbildung 4.1: Darstellung des „ <i>electrostatic/hydrogen bond switch</i> “ Modells	102



Abbildung 4.2: Hypothetische Funktion von CDeT11-24 innerhalb des ABA-Signalwegs	105
Abbildung 7.1: Massenspektrum der Fragmentierung des Peptids VYTDVNVVRPR	145
Abbildung 7.2: Massenspektrum der Fragmentierung des Peptids EAMAHPYFSQVR	147
Abbildung 7.3: Massenspektrum der Fragmentierung des Peptids ILQNLCGGTNIVK	148
Abbildung 7.4: Massenspektrum der Fragmentierung des Peptids LLEEDPSLVNAR	149

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Gruppierung der LEA-Proteine nach Bray	9
Tabelle 3.1: Relative Kinase Aktivität der <i>C. plantagineum</i> Proteinextrakte	85
Tabelle 3.2: Anreicherung der Aufreinigung von 6His-CDeT11-24 Kinasen	94
Tabelle 7.1: pblast mit dem Peptid VYTQVNVVVRPR	146
Tabelle 7.2: pblast mit dem Peptid EAMAHPYFSQVR	147
Tabelle 7.3: pblast mit dem Peptid EAMAHPYFSQVR	148
Tabelle 7.4: pblast mit dem Peptid LLEEDPSLVNAR	150

# Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
ABA	Abscisinsäure
ABI	<i>ABA-insensitive</i>
ABRE	<i>ABA responsive element</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CAP	<i>cold acclimation protein</i>
CD	Circulardichroismus
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CK2	Casein Kinase 2
CK2 $\alpha$	Casein Kinase 2 $\alpha$ Untereinheit
CL	Cardiolipin
cpm	counts per minute
CS	Citratsynthase
d	Tag
Da	Dalton
DG	Digalactosyldiacylglycerin
DHN	Dehydrin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
DRE	<i>drought responsive element</i>
DTT	1,4 Dithiothreitol
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
FTIR-Spektroskopie	Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie
<i>g</i>	Erdbeschleunigung

g	Gramm
h	Stunde
HEPES	4-2-Hydroxyethyl-1-piperazinethansulfonsäure
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
His-Tag	Polyhistidine- <i>tag</i>
HSP	Hitzeschockprotein
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEX	Ionenaustauschchromatographie
IgG	Immunoglobulin
IGKA	In-Gel-Kinase-Assay
iP	isoelektrischer Punkt
IPG	Immobilisierte pH-Gradient
IPTG	Isopropyl-1-thio-s-D-galactopyranosid
IUP	Intrinsisch-ungeordnete Proteine
Kan	Kanamycin
kDa	Kilo-Dalton
LB	Luria Bertani
LDH	Lactatdehydrogenase
LEA	<i>late embryogenesis abundant</i>
M	molar
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
MAP Kinase	<i>mitogen-activated protein</i> Kinase
MBP	<i>myelin basic protein</i>
MES	2-( <i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
MG	Monogalactosyldiacylglycerin
mg	Milligramm
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
nm	Nanometer
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
OD	Optische Dichte
PA	Phosphatidsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerin
pI	Isoelektrischer Punkt
PI	Phosphatidylinositol
PLO	Protein-Lipid-Overlay

PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
QTL	<i>quantitative trait loci</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RWC	<i>relative water content</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TBST	TBS mit Tween-20
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFE	Trifluorethanol
TM	Schmelztemperatur
TOF	<i>time of flight</i>
Tris	Trishydroxymethyl-aminomethan
Triton	X-100 Octylphenolpolyethylenglycolethern
Tween-20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Unit Enzymeinheit
VIK	<i>VH1-interacting kinase</i>
z.B.	zum Beispiel
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient

# 1 Einleitung

## 1.1 Wasser, ein limitierender Faktor für die Landwirtschaft

Die Erträge der landwirtschaftlichen Pflanzenproduktion werden stark durch abiotische und biotische Stressfaktoren beeinflusst. Hierbei ist die unzureichende Wasserversorgung von Nutzpflanzen eine der Hauptursachen für Ernteausfälle weltweit (Boyer, 1982; Bruce *et al.*, 2001). Prognosen ergeben einen Anstieg der Weltbevölkerung von heute 7 Milliarden auf 9,5 Milliarden Menschen bis 2050 (Population Reference Bureau). Dieser Zuwachs bedeutet, dass in Zukunft 70 bis 100 % mehr Nahrungsmittel produziert werden müssen und stellt die Landwirtschaft vor eine große Herausforderung (World Bank, 2008). Schon heute beträgt der Anteil des globalen Wasserverbrauchs durch die Landwirtschaft 70 %, wodurch sich nur ein geringer Spielraum für einen höheren Verbrauch ergibt (Unesco, 2012). Außerdem zeigen statistische Auswertungen eine Zunahme von Trockenphasen seit 1950, die höchst wahrscheinlich auf anthropogen beeinflusste klimatische Veränderungen beruhen. Modellierungen sagen voraus, dass dieser Trend weiterhin anhalten könnte (Dai, 2010; Abbildung 1.1).

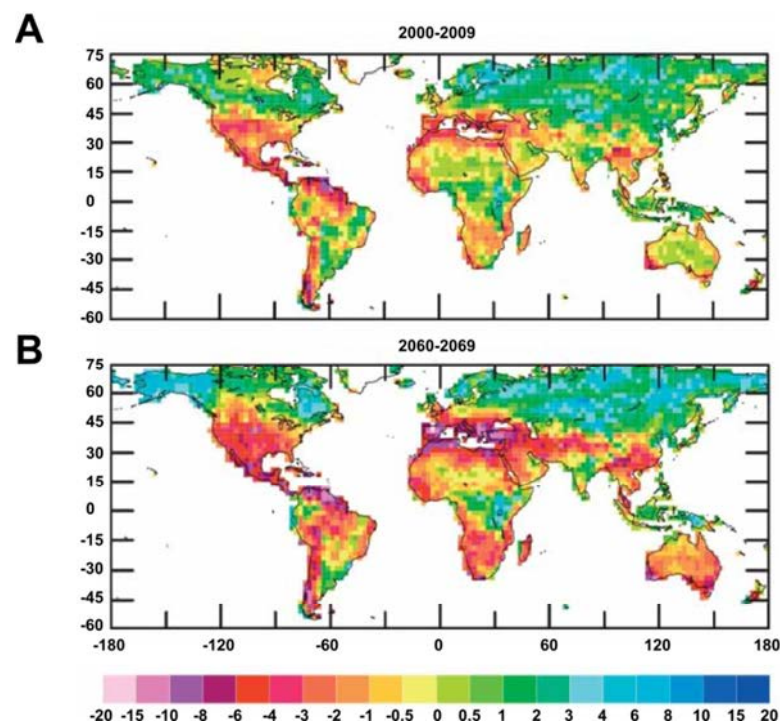


Abbildung 1.1: Zunahme von Trockenphasen. Trockenphasen dargestellt durch den Palmer Drought Index, in Bezug auf den Durchschnitt der Jahre 1950-1979, für 2000-2009 (A) und als Vorhersage durch Modellierung für 2060-2069. (B) Die Zunahme von Trockenphasen (Rot- und Gelbtöne; -20 bis 0) und Feuchtphasen (Grün- und Blautöne; 0 bis 20) ist farblich gekennzeichnet (modifiziert nach Dai, 2010).

Primär erfordert die zukünftige Ernährungssicherung, eine nachhaltigere Land- und Wassernutzung. Zusätzlich können aber auch Nutzpflanzensorten, die neben höheren Erträgen weniger Wasser verbrauchen oder an Wassermangel angepasst sind einen großen Beitrag leisten (Deikman *et al.*, 2012). Um diese durch traditionelle Züchtung mit Hilfe von QTL-Analysen oder biotechnologischen Verfahren bereitzustellen, bedarf es jedoch eines vertieften Wissens darüber, wie Pflanzen auf Wassermangel reagieren (Godfray *et al.*, 2010). Aus diesem Grund ist es von größter Bedeutung, die durch Wassermangel induzierten physiologischen Prozesse in Pflanzen mit den modernen Methoden der Biochemie und Molekularbiologie zu untersuchen.

## 1.2 Anpassungen von Pflanzen an Wassermangel

Wasser ist für alle Pflanzen, essenziell. Durch den aus Wassermangel entstehenden Trockenstress werden wichtige Prozesse, wie die Nährstoffaufnahme, die Photosynthese und das Aufrechterhalten des Turgordrucks gestört (Hilbricht und Bartels, 2003). Auf molekularer Ebene kommt es des Weiteren zur Schädigung von Makromolekülen wie DNA, RNA, Proteinen und Lipidmembranen, deren funktionale Struktur stark von ihrer Hydrathülle abhängt. Ist nicht genügend Wasser vorhanden, können in der Zelle fundamentale metabolische Reaktionen nicht mehr stattfinden. Als Folge darauf werden die pflanzliche Entwicklung und das Wachstum stark beeinträchtigt. Im Extremfall kollabiert das System und die Pflanze ist nicht mehr lebensfähig.

In der Evolution der Pflanzen haben sich daher unterschiedliche Resistenz-Mechanismen gegen Trockenstress ausgebildet. Es werden drei Formen der pflanzlichen Stressresistenz gegen Trockenheit unterschieden: (a) Flucht, (b) Vermeidung und (c) Toleranz (Levitt, 1980). Unter Flucht (a) versteht man eine zeitlich angepasste kurze Vegetationszeit, durch die trockene Phasen vermieden werden (Heschel und Riginos, 2005). Zur Trockenstressvermeidung (b) gehören konstitutive Anpassungen, die verhindern, dass ein Stress Auswirkungen auf die Pflanze hat. Hierzu zählen morphologische Merkmale, wie etwa eine verdickte Cuticula oder tief in die Blattoberfläche eingesenkte Stomata, und Veränderungen des Stoffwechsels wie die C<sub>4</sub>-Photosynthese oder der Crassulaceen-Säurestoffwechsel (CAM; Bartels und Chandler, 2007).

Die dritte Form der Anpassung an Trockenstress ist die Toleranz (c). Sie ist eine adaptive und induzierte Reaktion auf eine Trockenstresssituation. Durch Veränderung der Genexpression und des Stoffwechsels kann durch sie der Turgordruck der Zellen bis zu einem gewissen Grad

aufrechterhalten werden (Bartels und Sunkar, 2005). Wird diese Grenze durch extremen Trockenstress überschritten, erfolgen permanente Schäden, die letal sein können (Larcher, 1987). Eine extreme Form der Trockentoleranz ist die Austrocknungstoleranz, die es Pflanzen ermöglicht, große Wasserdefizite für eine längere Zeit in einem Ruhezustand zu überstehen (Greene *et al.*, 2011).

### 1.3 Austrocknungstoleranz

Austrocknungstolerante Pflanzen besitzen die Fähigkeit, einen fast vollständigen Wasserverlust ( $< 0,1$  g Wasser / g Trockengewicht) zu überdauern, bei dem sich das innere Wasserpotential der Pflanze im Gleichgewicht mit dem der Luft befindet (Alpert, 2005). In diesem Zustand ruhen alle metabolischen Funktionen. Sobald wieder Wasser zur Verfügung steht, wird die Pflanze rehydriert und die normalen physiologischen Funktionen werden wieder aufgenommen (Alpert, 2005). Der Zustand der Austrocknungstoleranz wird durch Zucker, die das Wasser ersetzen, Proteine, die Makromoleküle bzw. Membranen stabilisieren, und Antioxidantien, sowie detoxifizierende Enzyme erreicht (Alpert, 2006).

Im Verlauf der pflanzlichen Evolution war die Ausbildung der Austrocknungstoleranz eine entscheidende Voraussetzung für die Besiedlung der Landmassen (Kappen und Valladares, 1999). Aus diesem Grund ist Austrocknungstoleranz noch heute unter den Kryptogamen, wie Flechten und Moose, weitverbreitet (Oliver *et al.*, 2005; Porembski, 2011). Untersuchungen der Austrocknungstoleranz des Moooses *Tortula ruralis* ergaben, dass diese vor allem auf Reparaturmechanismen während der Rehydrierung beruht und weniger auf die Ausbildung von Schutzfunktionen während der Dehydrierung (Wood und Oliver, 1999). In der Evolution der Gefäßpflanzen ist diese „ursprüngliche“ vegetative Austrocknungstoleranz jedoch größtenteils verloren gegangen und wurde durch Anpassungen zur Regulation der Wasseraufnahme und -abgabe ersetzt, wie wasserabweisende Wachsschichten, Wurzeln, Gefäße und Stomata (Raven und Edwards, 2004; Delaux *et al.*, 2012). Es wird angenommen, dass Gene mit Schutz- und Reparaturfunktionen, der „ursprünglichen“ Austrocknungstoleranz, sowohl für die generelle Trockenstressantwort als auch für die Austrocknungstoleranz der Samen von Gefäßpflanzen rekrutiert worden sind (Oliver *et al.*, 2000). Denn viele Spermatophyten besitzen austrocknungstolerante Samen und Pollen, wodurch sie immer noch die Fähigkeit besitzen, Dürreperioden zu überstehen (Toldi *et al.*, 2009). Ein eindrucksvolles Beispiel hierfür sind die Samen der Dattelpalme (*Phoenix dactylifera*), die noch nach mehr als 2000 Jahren keimungsfähig waren (Sallon



*et al.*, 2008). Die auf das Samenstadium beschränkte Austrocknungstoleranz ist jedoch strengentwicklungsspezifisch und in vegetativen Geweben nicht aktiv (Bartels *et al.*, 1988). Basierend auf phylogenetischen Analysen wird angenommen, dass die Austrocknungstoleranz des Samenstadiums als genetischer Ursprung der vegetativen Austrocknungstoleranz der Gefäßpflanzen diene (Oliver *et al.*, 2000). Diese Art von Re-Evolution hat vermutlich unabhängig voneinander in verschiedenen Pflanzenfamilien stattgefunden (Oliver *et al.*, 2005).

Unter den Gefäßpflanzen sind ca. 373 Arten bekannt, die austrocknungstolerant sind. Davon entfallen 95 Arten auf die Pteridophyta und 278 Arten auf die Angiospermen (218 Arten Monokotyle, 60 Arten Dikotyle; Tuba und Lichtenthaler, 2011). In den Gymnospermen sind keine austrocknungstoleranten Arten beschrieben.

Die Untersuchung austrocknungstoleranter Pflanzen ist ein wichtiger Bestandteil der Erforschung von Trockenstress, da ein Verständnis der zentralen Mechanismen, die zur Austrocknungstoleranz führen, biotechnologische und züchterische Ansätze bietet, an Wassermangel angepasste Nutzpflanzen zu erzeugen (Toldi *et al.*, 2009).

#### **1.4 *Craterostigma plantagineum*: ein Modellorganismus für Austrocknungstoleranz**

Ein bedeutender Modellorganismus zur Untersuchung der pflanzlichen Austrocknungstoleranz ist die Wiederauferstehungspflanze *Craterostigma plantagineum* (Bartels, 2005; Bartels und Hussain, 2011). *C. plantagineum* wird taxonomisch in die Familie der Linderniaceae eingeordnet, in der *Craterostigma* eine eigene Gattung bildet (Rahmanzadeh *et al.*, 2005). Ihr Verbreitungsgebiet erstreckt sich auf felsige Regionen, wie die Inselberge im Osten und Süden Afrikas, die durch starke temporäre Wasserschwankungen mit immer wiederkehrenden Dürren geprägt sind (Fischer, 2004). In anhaltenden Dürreperioden kann *C. plantagineum* bis zu 98 % ihres Wassers verlieren und so in einem Ruhezustand für mehrere Monate überleben. Steht wieder Wasser zur Verfügung, wird die normale physiologische Aktivität innerhalb von Stunden wiederhergestellt (Gaff, 1971).

In den letzten Jahren wurden mehrere Gene identifiziert, deren Expression durch Austrocknung in *C. plantagineum* induziert wird und vermutlich an der Ausbildung der Austrocknungstoleranz beteiligt sind (Bartels *et al.*, 1990; Bockel *et al.*, 1998; Rodrigo *et al.*, 2004). Hierzu zählen Gene, die für regulatorische Proteine, Proteine des Zuckerstoffwechsels, Schutzproteine und detoxifizierende Proteine kodieren (Bartels, 2005).

Die Regulation einiger dieser Gene wurde bereits auf Promotorebene (Michel *et al.*, 1994; Velasco *et al.*, 1998; Hilbricht *et al.*, 2002; Ditzer und Bartels, 2006; van den Dies *et al.*, 2011) und Proteinebene genauer untersucht (Piatkowki *et al.*, 1990; Velasco *et al.*, 1998; Frank *et al.*, 2000; Kirch *et al.*, 2001; Ditzer *et al.*, 2001; Ditzer und Bartels, 2006; Willige *et al.*, 2009). Zusätzlich wurde mit Hilfe einer Transkriptom-Studie die Genexpression von *C. plantagineum* Pflanzen im hydrierten, teildehydrierten, total dehydrierten und rehydrierten Zustand untersucht (Rodriguez *et al.*, 2010). Des Weiteren wurde das Phosphoproteom der Pflanze während der Austrocknung untersucht (Röhrig *et al.*, 2006; Röhrig *et al.*, 2008).

## 1.5 Die molekulare Trockenstressantwort

Die Mechanismen der pflanzlichen Stressantwort zielen darauf ab, den Wasserverbrauch und das Wasserpotential zu verringern, sowie durch Synthese metabolischer und proteinogener Schutzfaktoren Schäden zu reduzieren (Verslues *et al.*, 2006).

Bei Trockenstress kann zunächst ein sehr schneller Anstieg der Abscisinsäure (ABA)-Konzentration beobachtet werden. Das Phytohormon ABA ist ein zentraler Botenstoff für die Signaltransduktion der abiotischen und teilweise auch biotischen Stressantworten. Des Weiteren hat ABA wachstums- und entwicklungsspezifische Funktionen. Zu einer der ersten physiologischen Reaktionen auf eine erhöhte ABA-Konzentration gehört das Schließen der Stomata. Hierdurch wird der Wasserverlust durch Transpiration unterbunden (Schroeder *et al.*, 2001).

Obwohl die Schlüsselenzyme der ABA-Biosynthese gut untersucht sind (Nambara und Marion-Poll, 2005), ist bis heute nicht bekannt, wie Pflanzen Trockenstress bzw. osmotischen Stress wahrnehmen und die ABA-Produktion reguliert wird (Zhang *et al.*, 2006). Untersuchungen der ABA-abhängigen Stressantwort durch exogene ABA-Behandlung ergaben, dass nicht alle trockenstressinduzierten Proteine durch ABA exprimiert werden (Seki *et al.*, 2002). Dies weist darauf hin, dass auch ein ABA-unabhängiger Signalweg bestehen muss (Boudsocq und Lauriere, 2005). Dieser verläuft vermutlich über sekundäre Botenstoffe wie  $\text{Ca}^{2+}$ , Inositol-1,4,5-Triphosphat oder Phosphatidsäure (Bartels und Sunkar, 2005), durch die Signalkaskaden aktiviert werden, die zu einer Änderung von Genexpression und Stoffwechsel führen (Xiong *et al.*, 2002; Testerink und Munnik, 2005).

In Bezug auf die endogene ABA-Perzeption wurde durch die Entdeckung der RCAR ABA-Rezeptoren in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht (Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009). Liegen nur geringe ABA-Konzentration in der Zelle vor, so werden durch

Phosphatasen, wie zum Beispiel *ABA-insensitive 1* (ABI1), Proteine der ABA-Signalkette dephosphoryliert und somit reprimiert (Merlot *et al.*, 2001). Kommt es jedoch zu einer ABA-Akkumulation, ändern die RCAR-Rezeptoren durch Bindung des Phytohormons ihre Konformation (Melcher *et al.*, 2009, Miyazono *et al.*, 2009, Nishimura *et al.*, 2009; Santiago *et al.*, 2009, Yin *et al.*, 2009) und rekrutieren das ABI1 Protein (Nishimura *et al.*, 2010). Hierdurch werden die Zielproteine, wie die SnRK 2 (*sugar non fermenting-related kinase*), nicht mehr dephosphoryliert und liegen in ihrem aktiven Zustand vor, wodurch sie ihrerseits Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und aktivieren. Zu einer Gruppe dieser Transkriptionsfaktoren gehört das *abscisic acid responsive element-binding* (AREB1)-Protein, das durch Phosphorylierung an das *abscisic acid responsive element* (ABRE)-Promotorelement bindet und die Genexpression einleitet (Furihata *et al.*, 2006).

Nach Shinozaki *et al.* (2003) können die durch Austrocknung induzierten Proteine in (a) regulatorische und (b) funktionelle unterteilt werden. Zu den regulatorischen Proteinen (a) gehören: Proteinkinasen, Phosphatasen, Proteine des Phospholipidmetabolismus, Proteine der ABA-Biosynthese und Transkriptionsfaktoren. Durch sie erfolgt die weitere stressbedingte Signaltransduktion und Expression.

Die funktionellen Proteine (b) sind vor allem für den Schutz der Zelle zuständig. Hierzu zählen: Proteasen, detoxifizierende Proteine, Proteine für Wasserkanäle, Proteine der Osmolyt-Biosynthese und Schutzfaktoren für Makromoleküle. Im Folgenden wird auf die Funktion der beiden letztgenannten Proteingruppen näher eingegangen.

Eine wichtige Funktion üben die Proteine der Osmolyt-Biosynthese aus. Sie synthetisieren kompatible Solute (organische Verbindungen, die nicht mit dem Zellstoffwechsel interferieren) wie: Prolin, Glycinbetain, Zucker, Zuckeralkohole und andere (Bartels und Sunkar, 2005). Ihre Funktion besteht in der Erhöhung der Osmolarität und Stabilisierung von Makromolekülen (Hinch und Hagemann, 2004; Krasensky und Jonak, 2012). Prolin und Glycinbetain können des Weiteren wahrscheinlich auch vor oxidativen Schäden, durch reaktive Sauerstoffspezies, schützen (Chen und Murata, 2002; Szabados und Saviouré, 2010). Potts (1994) stellte die Hypothese auf, dass Zucker Proteine vor austrocknungsbedingten Schäden schützen können, indem sie das Wasser ersetzen und Wasserstoffbrücken ausbilden. Neben dieser Schutzfunktion, wird durch Zucker auch die sogenannte Glas-Phase ausgebildet, die ein wichtiger Mechanismus der Austrocknungstoleranz ist. Durch diese hochviskose Flüssigkeit wird ein metastabiler Zustand erzeugt, der sowohl chemische Reaktionen als auch die molekulare Diffusion verlangsamt (Buitink und Leprince, 2008).

Für *C. plantagineum* ist der durch Austrocknung induzierte Zuckermetabolismus gut untersucht. So führt die Dehydrierung zu einer Umwandlung des in Blättern vorliegenden C8-Zuckers 2-Octulose zu Saccharose (Bianchi *et al.*, 1991). In den Wurzeln hingegen liegen große Mengen Stachyose vor, die durch Austrocknung zu Saccharose umgesetzt, aber auch teilweise metabolisiert wird (Norwood *et al.*, 2003).

Zu den proteinogenen Schutzfaktoren für Makromoleküle und Membranen, zählen unter anderem die Hitzeschockproteine (HSP), die als molekulare Chaperone an denaturierte Proteine binden und eine Renaturierung durch Rückfaltung durchführen (Hartl, 1996; Alamillo *et al.*, 1995). Eine weitere Klasse dieser Schutzfaktoren, deren Expression durch Trockenstress induziert wird, sind die *late embryogenesis abundant* (LEA)-Proteine, die im folgenden Kapitel ausführlich beschrieben werden (Abschnitt 1.6).

## 1.6 „Late Embryogenesis Abundant“ Proteine

Vor über 30 Jahren wurde von Dure *et al.* (1981) in Baumwollsamensamen (*Gossypium hirsutum*) eine Gruppe von Proteinen entdeckt, die während der späten Samenreifung gebildet werden. Da eine entwicklungspezifische Expression angenommen wurde, erhielten sie den Namen „*late embryogenesis abundant*“ Proteine. Die meisten LEA-Proteine haben einen hohen Anteil an hydrophilen Aminosäuren. Dies bewirkt, dass sie durch Kochen in Lösung nicht denaturiert werden. Außerdem besitzen sie viele geladene Aminosäuren, wodurch sie meist einen hohen bzw. niedrigen isoelektrischen Punkt haben (Tunnacliffe und Wise, 2007).

Später wurden LEA-Proteine auch in anderen Pflanzenarten identifiziert und es zeigte sich, dass die Expression nicht nur auf die Samenreifung beschränkt ist, sondern auch durch Trockenstress, Salzstress, Kältestress und ABA in vegetativem Gewebe induziert wird (Ingram und Bartels, 1996; Thomashow, 1999). Neben der Induktion durch abiotischen Stress können einige LEA-Proteine zudem auch konstitutiv exprimiert werden (Bies-Ethève *et al.*, 2008). Überraschenderweise konnte gezeigt werden, dass LEA-Proteine nicht nur im Pflanzenreich, sondern auch in Bakterien (Stacy und Aalen, 1998) und Tieren (Hand *et al.*, 2011), wie zum Beispiel austrocknungstoleranten Nematoden, vorkommen können (Browne *et al.*, 2002). Generell ist die Familie der LEA-Proteine sehr heterogen. Dies spiegelt sich unter anderem auch in ihrem Molekulargewicht wider, das zwischen 5,3 und 67,2 kDa liegt (Shih *et al.*, 2008).

### 1.6.1 Nomenklatur

Nach der Entdeckung der LEA-Proteine erfolgte die Einteilung nach charakteristischen Sequenzmotiven in drei Gruppen (Dure, 1989). Obwohl die meisten LEA-Proteine zu diesen Gruppen gehören, wurde das System durch die Identifizierung weiterer LEA-Proteine von Bray (1993) auf sechs Gruppen erweitert. In den letzten Jahren wurden Erweiterungen für diese klassische Nomenklatur vorgeschlagen (Galau *et al.*, 1993; Battaglia *et al.*, 2008) und zusätzlich neue Methoden zur Klassifizierung der LEA-Proteine entwickelt. Hierzu zählen die Einteilung der LEA-Proteine nach *protein family* (Pfam)-Motiven (Bateman *et al.*, 2004) oder aufgrund ihrer Peptidzusammensetzungen anstelle der Aminosäuresequenz (Wise, 2002). Eine Übersicht der LEA-Proteingruppen nach Bray (1993) mit ihren charakteristischen Sequenzmotiven wird im Folgenden erläutert und ist mit den entsprechenden Pfam-Motiven in Tabelle 1 dargestellt.

Die Gruppe 1 der LEA-Proteine besitzen einen hohen Anteil der Aminosäuren Glycin, sowie Glutamin oder Glutamat und eine Konsensussequenz von 20 Aminosäuren, die mit bis zu vier Wiederholungen auftritt. Proteine der Gruppe 2 werden auch Dehydrine genannt und wurden bisher von allen LEA-Proteinen am besten charakterisiert (Battaglia *et al.*, 2008). Sie besitzen eine aus 15 Aminosäuren bestehende Lysin-reiche Sequenz, die K-Segment genannt wird und mit bis zu 11 Wiederholungen auftreten kann (Close *et al.*, 1989). Neben diesem Motiv können zusätzlich noch das N-terminal gelegene Y-Segment (mit bis zu 35 Wiederholungen) und das S-Segment vorkommen (Campbell und Close, 1997). Die Gruppe 3 besitzt eine hohe Diversität und umfasst Proteine, die ein sich wiederholendes Motiv aus 11 Aminosäuren besitzen (Dure, 1993). LEA-Proteine, welche der Gruppe 4 zugeordnet werden, besitzen einen konservierten N-terminalen Bereich von 70-80 Aminosäuren. Die zu der Gruppe 5 zählenden LEA-Proteine haben ein ähnliches Motiv wie die Proteine der Gruppe 3, jedoch variiert die Aminosäurezusammensetzung stark, wodurch sich keine Konsensussequenz ergibt (Wang *et al.*, 2006). Die Proteine der Gruppe 5 werden auch als untypische LEA-Proteine bezeichnet, da sie im Gegensatz zu allen anderen LEA-Proteinen aus vielen hydrophoben Aminosäuren bestehen und durch Kochen in Lösung ausfallen (Baker *et al.*, 1988). Die Gruppe 6 der LEA-Proteine besitzt die wenigsten Mitglieder, die bis zu vier charakteristische Motive besitzen können. Hiervon sind die Motive 1 und 2 am stärksten konserviert (Battaglia *et al.*, 2008).

Tabelle 1.1: Gruppierung der LEA-Proteine nach Bray (1993). In der Tabelle sind die sechs Gruppen der LEA-Proteine mit ihrer Konsensussequenz, der korrespondierenden PFAM-Domäne und dem Molekulargewichtsbereich aufgeführt (modifiziert nach Battaglia *et al.*, 2008).

Gruppe	Konsensus Sequenz	PFAM-Domäne	Molekulargewicht
1	TRKEQ[L/M]G[T/E]EGY[Q/K]EMGRKGG[L/E]	PF00477 (LEA_5)	6,8 - 20,3 kDa
2	K-Segment EKKGIMDKIKEKLPG Y-Segment [V/T]D[E/Q]YGNP S-Segment S <sub>n</sub>	PF00257 (Dehydrin)	5,3 – 66,3 kDa
3	TAQAAKEKAXE	PF02987 (LEA_4)	7,2 – 67,2 kDa
4	AQEKA EKMTA[R/H]DPXKEMAH ERK[E/K][A/E][K/R] N-terminale Sequenz (70-80 Aminosäuren)	PF03760 (LEA_1)	8,4 - 18,8 kDa
5	keine Konsensussequenz	-	5,3 – 38,5 kDa
6	LEDYK(M/R)(QKR)[G/A]YG[T/A]	PF10714 (LEA_6)	7 – 14 kDa

### 1.6.2 Funktion

Allgemein wird angenommen, dass LEA-Proteine die Hydrathülle ersetzen können und so Makromoleküle sowie zelluläre Strukturen vor einer Schädigung durch Wasserverlust schützen (Bray, 1997; Garay-Arroyo *et al.*, 2000). Zur Untersuchung der LEA-Proteinfunktion wurden daher mehrere *in vivo* und *in vitro* Studien durchgeführt. Die genaue physiologische Funktion der LEA-Proteine ist jedoch nach wie vor unklar.

Überexpressionsstudien einiger LEA-Proteine in Pflanzen führten zu einer Erhöhung der Trocken-, Salz- und Kältetoleranz (Sivamani *et al.*, 2000; Rohila *et al.*, 2002; Hara *et al.*, 2003). Für andere LEA-Proteine hingegen konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden (Iturriaga *et al.*, 1992; Kaye *et al.*, 1998). Gleiches gilt für die heterologe Expression von LEA-Proteinen in Hefe und Bakterien. Hier konnte gezeigt werden, dass einige LEA-Proteine einen positiven Effekt auf die Toleranz gegenüber Salz- und osmotischen Stress haben (Imai *et al.*, 1996; Liu und Zheng, 2005). Das K-Segment eines Gruppe 2 LEA-Proteins führte hingegen zu einer Inhibition des Wachstums von *E. coli* (Campos *et al.*, 2006).

Zu den am häufigsten verwendeten *in vitro* Experimenten zur Charakterisierung der Eigenschaften der LEA-Proteine gehören Enzym-Schutz Assays. Hierbei wird ein Enzym zusammen mit dem zu untersuchenden LEA-Protein einem Stress (Hitze, Trockenheit, Kälte) ausgesetzt und anschließend die Enzymaktivität bestimmt. Durch diese Methode konnte für mehrere LEA-Proteine der Gruppen 1-4 gezeigt werden, dass sie Enzyme wie Malatdehydrogenase, Lactatdehydrogenase oder Citratsynthase vor einem Verlust der Enzymaktivität durch Gefrieren oder Austrocknen schützen (Kazuoka und Oeda, 1994; Reyes *et al.*, 2005; Goyal *et al.*, 2005). Die Gruppe 2 LEA-Proteine ERD 10 und 14 aus *Arabidopsis thaliana* konnten Enzyme auch vor einer Deaktivierung und Aggregation durch Hitze schützen (Kovacs *et al.*, 2008a). Im Zusammenhang mit dieser Schutzfunktion wird eine Wirkung als Chaperon diskutiert (Kovacs *et al.*, 2008b). Diese würde jedoch eine direkte Interaktion oder Komplexbildung mit dem zu schützenden Protein voraussetzen, was bisher noch nicht nachgewiesen werden konnte (Tunnacliffe und Wise, 2007). Eine weitere Hypothese zum Funktionsmechanismus der LEA-Proteine ist, dass sie als molekulare Schilde fungieren, wodurch sie eine Kollision teilweise denaturierter Proteine verhindern und somit die Aggregation hydrophober Bereiche unterbinden (Wise und Tunnacliffe, 2004).

Für viele konservierte LEA-Proteinmotive wird vorhergesagt, dass sie eine amphipathische Helix ausbilden (Battaglia *et al.*, 2008). Dieses Strukturelement ist dafür bekannt, mit Lipidmembranen und Proteinen zu interagieren (Epanand *et al.*, 1995). Aus diesem Grund wurde schon früh über eine Membranbindung und Membran schützende Funktion der Gruppe 2 LEA-Proteine spekuliert (Close, 1996). Eine Lipidbindung an anionische Phospholipide wurde erstmals für das Mais (*Zea mays*) Gruppe 2 Protein DHN1 durch Koag *et al.* (2003) nachgewiesen. Die Bindung erfolgt dabei durch die zwei K-Segmente des Proteins (Koag *et al.*, 2009). Das mitochondriale Gruppe 3 LEA-Protein LEAM aus Erbse (*Pisum sativum*) schützt sogar Vesikel aus Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin vor einer Fusionierung durch Austrocknung und Gefrieren (Tolleter *et al.*, 2007; Tolleter *et al.*, 2010). Im Kontrast dazu wurde für LEA-Proteine der Gruppe 2 und 4 eine Fusionierung von Vesikeln beobachtet (Eriksson *et al.*, 2011; Hundertmark *et al.*, 2012).

Des Weiteren wird vermutet, dass LEA-Proteine aufgrund ihres stark hydrophilen Charakters einen Wasserverlust verlangsamen und somit als Hydratationspuffer wirken könnten (McCubbin *et al.*, 1985). Beispielsweise bindet das LEA-Protein AavLEA1 der Nematode *Aphelenchus avenae* 20-mal mehr Wasser als ein globuläres Protein von gleicher Größe (Goyal *et al.*, 2003). Neben den zuvor beschriebenen Funktionen konnte für einzelne LEA-Proteine auch eine Funktion als Radikalfänger (Hara *et al.*, 2003) oder Bindeprotein von

zweiwertigen Kationen, wie Calcium oder Eisen, belegt werden (Krüger *et al.*, 2002, Alsheikh *et al.*, 2003).

### 1.6.3 Struktur

Die einzige verfügbare dreidimensionale Struktur eines LEA-Proteins ist die des LEA14 Proteins aus *A. thaliana* (Singh *et al.*, 2005). Dieses Protein gehört jedoch zu den untypischen hydrophoben LEA-Proteinen der Gruppe 5. Versuche LEA-Proteine aus den anderen Gruppen, die aus vielen hydrophilen Aminosäuren bestehen, zur Strukturanalyse zu kristallisieren, sind bisher gescheitert (McCubbin *et al.*, 1985; Lisse *et al.*, 1996; Goyal *et al.*, 2003).

Aus diesem Grund wurden zur Strukturuntersuchung von LEA-Proteinen spektroskopische Verfahren wie Circular dichroismus-, NMR- oder FTIR-Spektroskopie eingesetzt. Diese strukturellen Untersuchungen von LEA-Proteinen der Gruppen 1-4 in Lösung ergaben einen Anteil von mehr als 50 % Random-Coil-Konformation (Tunnacliffe und Wise, 2007). Aufgrund ihres nur geringen Anteils an  $\alpha$ -Helix- und  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen gehören sie daher zu den intrinsisch ungeordneten Proteinen (Abschnitt 1.9). Interessanterweise konnte mit den Helix-induzierenden chemischen Substanzen TFE und SDS für die LEA-Proteine der Gruppen 1-4 eine Strukturänderung von Random-Coil- zu  $\alpha$ -Helix-Konformation beobachtet werden (Soulages *et al.*, 2002; Lisse *et al.*, 1996; Grelet *et al.*, 2005; Shih *et al.*, 2004). Diese „disorder to order“-Transition ist je nach LEA-Protein, auch innerhalb einer Gruppe, unterschiedlich stark ausgeprägt. So beträgt beispielsweise der  $\alpha$ -Helix-Anteil bei 90 % TFE für die Gruppe 2 LEA-Proteine Cor47 50 % und für Rab18 nur 2 % (Mouillon *et al.*, 2006). Ein Versuch den ausgetrockneten Zustand der Zelle durch Glycerin, Polyethylenglycol und Zucker zu imitieren, führte ebenfalls zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten Strukturänderung der Proteine Cor47 und Lti30 (Mouillon *et al.*, 2008).

Da viele LEA-Proteine während der späten Phase der Embryogenese oder in austrocknungstoleranten Pflanzen exprimiert werden, wurde ihre Struktur auch im ausgetrockneten Zustand untersucht. Für ein Gruppe 3 LEA-Protein aus Rohrkolben (*Typha latifolia*) wurde durch schnelle Austrocknung eine reversible Strukturänderung von Random-Coil- zu  $\alpha$ -Helix-Konformation detektiert. Eine langsame Austrocknung hingegen führte neben der Bildung von  $\alpha$ -Helices auch zu  $\beta$ -Faltblatt-Konformationen (Wolkers *et al.*, 2001). Die Zunahme einer geordneten Sekundärstruktur durch Dehydrierung wurde bisher für LEA-Proteine der Gruppen 1-3 beschrieben (Boudet *et al.*, 2006; Goyal *et al.*, 2003; Shin *et al.*,



2004). Aus diesem Grund wird darüber spekuliert, dass die austrocknungsbedingte Strukturänderung möglicherweise in einem direkten Bezug zur Funktion der LEA-Proteine steht (Tunnacliffe und Wise, 2007).

Sehr gut veranschaulicht wird die austrocknungsbedingte Strukturänderung durch eine von Li und He (2009) durchgeführte molekular-dynamische Dehydrierungs-Simulation eines einzelnen AavLEA1 Proteinfragments (Abbildung 1.2). Das Ergebnis zeigt, dass das Proteinfragment bei einer Wassermolekül-Sättigung von 83,5 % bis 50,4 % vollständig gelöst und unstrukturiert ist. Da unterhalb dieser Konzentration nicht mehr genügend Wassermoleküle zur Verfügung stehen um das Protein komplett zu lösen, fängt es ab ca. 20 % Wassergehalt an seine Struktur zu ändern und zeigt im völlig ausgetrockneten Zustand (2,3 % Wassergehalt) eine haarnadelartige  $\alpha$ -helikale Struktur. Es wird angenommen, dass diese Konformationsänderung primär durch die Ausbildung intermolekularer Wasserstoffbrückenbindungen und sekundär durch elektrostatische Interaktionen erfolgt.

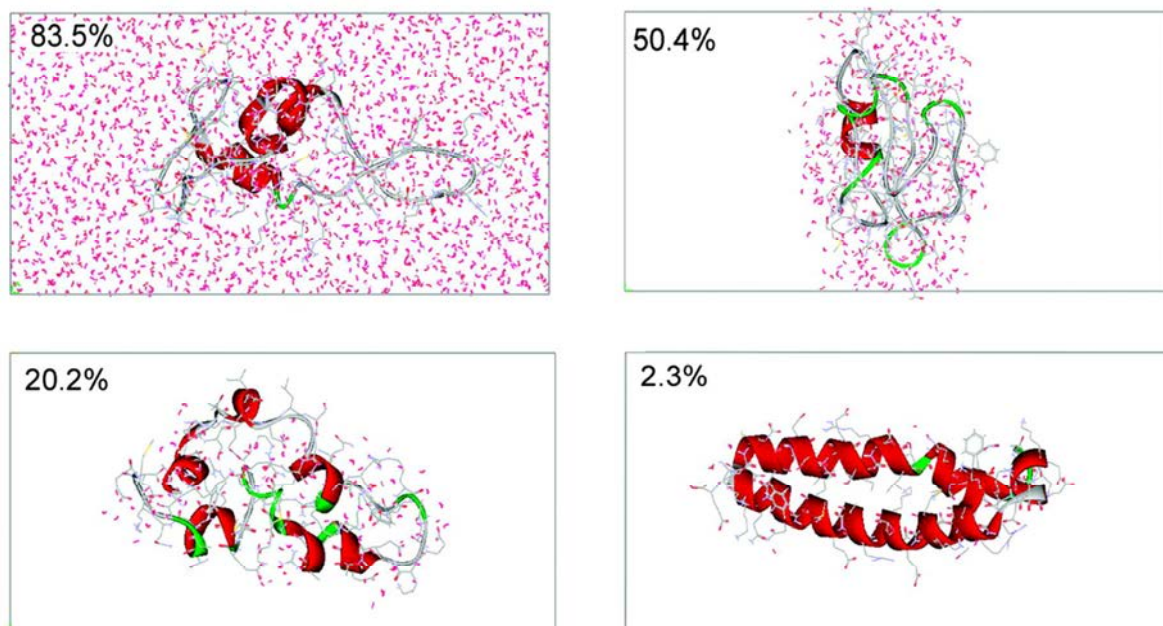


Abbildung 1.2: AavLEA1-Protein Struktur bei unterschiedlichem Wassergehalt. Modellierung der Proteinstruktur von 66 Aminosäuren des AavLEA1 Proteins aus der Nematode *A. avenae* mit unterschiedlichen Gehalten an Wassermolekülen.  $\alpha$ -Helix- (rot),  $\beta$ -Faltblatt- (grün) und Random-Coil-Konformation (grau). Wassermoleküle sind rosa dargestellt (modifiziert nach Li und He, 2009).

## 1.7 CDeT11-24: ein LEA-like Protein aus *Craterostigma plantagineum*

Das während der Austrocknung von *C. plantagineum* gebildete Protein CDeT11-24 (Molekulargewicht 43,2 kDa) besitzt ähnliche Charakteristika, wie die im oberen Abschnitt beschriebenen LEA-Proteine (Abschnitt 1.6). Es besteht aus vielen hydrophilen sowie negativ

geladenen Aminosäuren und hat im N-terminalen Bereich ein Lysin-reiches Sequenzelement, welches eine große Homologie zum K-Segment der Gruppe 2 LEA-Proteine aufweist (vergleiche Abschnitt 1.6.1). Als charakteristisches Merkmal besitzt das CDeT11-24 Protein die *cold acclimation protein* 160 (CAP160)-Domäne (Pfam: PF07918, InterPro IPR012418), die nach dem durch Kälte und Austrocknung induzierten CAP160 Protein aus Spinat (*Spinacia oleracea*) benannt ist (Guy und Haskell, 1987; Kaye *et al.*, 1998). Dieser Bereich enthält auch die durch Velasco *et al.* (1998) beschriebene fünffache Wiederholung der Aminosäureabfolge VAEKL (Abbildung 1.3). Da die CAP160-Domäne kein definiertes Motiv der LEA-Proteine ist, wird das CDeT11-24 Protein nicht der Familie der LEA-Proteine zugeordnet.



Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des CDeT11-24 Proteins. Das Lysin-reiche Sequenzelement ist als schwarzer und die CAP160-Domäne als weißer Balken dargestellt. Innerhalb der CAP160-Domäne sind die fünf VAEKL-Wiederholungen grau eingezeichnet. Weiterhin sind die identifizierten Phosphorylierungsstellen angegeben. N = N-Terminus; C = C-Terminus; S = Serin; T = Threonin (modifiziert nach Röhrig *et al.*, 2006).

Auch das Expressionsmuster des *cdet11-24* Gens ähnelt dem Expressionsmuster vieler LEA-Gene (Bartels *et al.*, 1990). Die Expression des *cdet11-24* Gens wird in den Blättern von *C. plantagineum* durch Austrocknung, Salzstress und ABA induziert (Bartels *et al.*, 1990). Promoter-GUS-Studien in *A. thaliana* zeigen eine durch ABA und Austrocknung induzierte Aktivität des CDeT11-24 Promoters in jungen Pflanzen und Samen (Velasco *et al.*, 1998). Promoteranalysen des *cdet11-24* Gens zeigen, dass fünf cis-Elemente, vier ABRE- und ein *drought responsive element* (DRE)-Element in der Sequenz vorkommen (van den Dries *et al.*, 2011).

Aufgrund der Ähnlichkeit zu den LEA-Proteinen, bezüglich der Aminosäurezusammensetzung und des Expressionsmusters, wird CDeT11-24 auch als LEA-like Protein bezeichnet.

Von Velasco *et al.* (1996) konnte eine Übereinstimmung der *cdet11-24* Genexpression und der CDeT11-24 Proteinakkumulation gezeigt werden. Weiterhin wurde das CDeT11-24

Protein immunhistologisch in allen Geweben der Blätter und Wurzeln von *C. plantagineum* bei Trockenstress detektiert und mit Hilfe von Immunogold-Elektronenmikroskopie-Aufnahmen im Zytoplasma lokalisiert.

Durch bioinformatische Strukturanalysen der CDeT11-24 Proteinsequenz wurde ein hoher Anteil von Random-Coil-Konformation vorhergesagt. Zudem wiesen die Daten darauf hin, dass das Protein größtenteils unstrukturiert ist (Röhrig *et al.*, 2006; Facchinelli, 2009).

Sequenzhomologe von CDeT11-24 in *A. thaliana* sind die Proteine RD29a und RD29b. Diese sind ebenfalls durch abiotischen Stress induzierbar (Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki, 1993) und werden daher sehr häufig als molekulare Stress-Marker verwendet (Jia *et al.*, 2012). Außerdem zeigt das CDeT11-24 Protein eine hohe Homologie zu den Proteinen LbLEA-like 11-24 aus *Lindernia brevidens* und LsLEA-like 11-24 aus *Lindernia subracemosa*, die wie *C. plantagineum* zur Familie der Linderniaceae gehören (Phillips *et al.*, 2008; van den Dries *et al.*, 2011).

Da die Expression des *cdet11-24* Gens in den Wurzeln von *C. plantagineum* nur durch Kulturbedingungen, die eine vollständige Hydratisierung gewährleisten, unterbunden werden konnte, wurde darüber spekuliert, dass das CDeT11-24 Protein an der Perzeption des Wasserstatus beteiligt ist (Velasco *et al.*, 1996). Durch *in vivo* Studien an homologen Proteinen gelang es bisher nicht dem Protein eine eindeutige physiologische Bedeutung zuzuweisen. So führte die heterologe Überexpression des CAP160 Proteins in Tabak zu keiner Erhöhung der Kältestressresistenz (Kaye *et al.*, 1998). Ferner wurde für knock-out Linien der Gene RD29a bzw. RD29b sogar eine gesteigerte Stresstoleranz gegenüber Salz im Vergleich zu Kontrollpflanzen nachgewiesen (Msanne *et al.*, 2011). Das CDeT11-24 Protein wurde bisher weder *in vivo* noch *in vitro* auf seine Funktion hin untersucht.

Im Gegensatz zur frühen Expression des CDeT11-24 Proteins während der Austrocknung, erfolgt eine Phosphorylierung interessanterweise erst in einer späten Phase der Austrocknung (ca. 30 % RWC; Röhrig *et al.*, 2006). Insgesamt konnten acht Phosphorylierungsstellen identifiziert werden (Abbildung 1.3). Weiterführende MALDI-TOF Analysen ergaben, dass das CDeT11-24 Protein jedoch nicht mehrfach, sondern in den meisten Fällen nur einfach phosphoryliert vorliegt. Da die identifizierten Phosphorylierungsstellen alle innerhalb, oder in direkter Nähe von Bereichen liegen, für die eine Random-Coil-Konformation vorhergesagt wurde, wird eine mögliche Interaktion mit anderen Proteinen durch Coiled-Coil-Strukturen diskutiert (Röhrig *et al.*, 2006). Anhand von *C. plantagineum* Kallusexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des CDeT11-24 Proteins über einen ABA-unabhängigen Signalweg vermittelt wird (Facchinelli, 2009).

Eine Phosphorylierung ist auch für die Homologen CAP160, RD29a, LbLEA-like 11-24 und LsLEA-like 11-24 beschrieben (Guy und Haskell, 1989; Reiland *et al.*, 2009, van den Dries *et al.*, 2011). Ein Vergleich der austrocknungstoleranten Art *L. brevidens* mit der nicht-austrocknungstoleranten nah verwandten Art *L. subracemosa* zeigt eine Expression durch Austrocknung in beiden Pflanzen, jedoch war die Phosphorylierung des Proteins LbLEA-like 11-24 wesentlich stärker als die von LsLEA-like 11-24 (van den Dries *et al.*, 2011). Aus diesem Grund wird angenommen, dass die Phosphorylierung des CDeT11-24 Proteins möglicherweise eine wichtige Funktion bei der Ausbildung der Austrocknungstoleranz von *C. plantagineum* vermittelt.

## 1.8 Phosphorylierung von Proteinen

Eine der wichtigsten posttranslationalen Modifikationen ist die Phosphorylierung, bei der reversibel eine Phosphatgruppe an ein Protein angehängt wird. Durch das Einfügen einer oder mehrerer negativer Ladungen kann die Eigenschaft des phosphorylierten Proteins bezüglich der Interaktion mit anderen Proteinen oder Membranen, der Lokalisierung, der Degradation und der Aktivität, sowohl positiv als auch negativ, beeinflusst werden. Dieser Effekt erfolgt durch Konformationsänderungen, die durch die Phosphorylierung ausgelöst werden (Barford *et al.*, 1991) oder kann allein auf einem elektrostatischen Effekt beruhen (Serber und Ferrell, 2007).

Die Phosphorylierung wird durch Proteinkinasen vermittelt, die durch Spaltung eines Nucleosidtriphosphats, in den meisten Fällen ATP, die  $\gamma$ -Phosphatgruppe auf die Aminosäuren Serin, Threonin oder Tyrosin überträgt. In Prokaryoten, Pilzen und Pflanzen kann des Weiteren auch die Aminosäure Histidin phosphoryliert werden (Urao *et al.*, 2000). Pflanzen besitzen sehr viel mehr Kinasen als andere Organismen. So wurden durch computergestützte Analysen bei *A. thaliana* 1053 putative Kinasen annotiert (Peck, 2006), während im Genom von *Homo sapiens* nur 518 Kinasen identifiziert werden konnten (Manning *et al.*, 2002).

Die katalytische Domäne der Proteinkinasen besteht aus 250-300 Aminosäuren (ca. 30 kDa) und ist in allen eukaryotischen Organismen hoch konserviert (Hanks *et al.*, 1988). Sie bildet eine kleine N-terminale  $\beta$ -Faltblatt- und eine größere C-terminale  $\alpha$ -Helix-Subdomäne, zwischen der sich die Nucleotid-Bindetasche und das katalytische Zentrum befinden. Durch Unterschiede bezüglich Ladung und Hydrophobizität innerhalb der katalytischen Domänen ergibt sich die Substratspezifität der Proteinkinasen. Hierdurch werden nur bestimmte

Aminosäuren innerhalb eines definierten Aminosäuresequenzmotivs phosphoryliert (Ubersax und Ferrel, 2007). Die Kinase-Domäne wird meist durch nicht konservierte Regionen flankiert, die zusätzlich die Substratspezifität, sowie die Regulation und Lokalisation der jeweiligen Proteinkinase beeinflusst (Taylor *et al.*, 1990).

Eine wichtige Funktion der Phosphorylierung ist die Weiterleitung von Signalen durch Signaltransduktionsketten. Eine gut untersuchte Einheit bilden die Mitogen-aktivierten Protein (MAP)-Kinase-Kaskaden, die aus drei Proteinkinasen bestehen und in allen eukaryotischen Organismen weitverbreitet sind (Bartels und Sunkar, 2005). In Pflanzen sind MAP-Kinase-Kaskaden an den Signalwegen von Zellteilung, Entwicklung, Hormonantwort und biotischem sowie abiotischem Stress beteiligt (Tena *et al.*, 2001; Nakagami *et al.*, 2005). Hierbei wird durch ein Signal ein Rezeptor aktiviert, der die MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK) aktiviert, die eine MAP-Kinase-Kinase (MAPKK) phosphoryliert, diese wiederum phosphoryliert eine MAP-Kinase (MAPK). Die MAPK akkumuliert daraufhin im Zellkern und reguliert durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren die Expression (Jonak *et al.*, 2002). Des Weiteren können durch die MAPK auch Proteine im Zytoplasma phosphoryliert werden (Ning *et al.*, 2010).

Im Zusammenhang mit Trockenstressantworten sind vor allem MAP-Kinase-Kaskaden identifiziert worden, die an der Signaltransduktion des einhergehenden osmotischen Stresses beteiligt sind (Zhu, 2002; Nakagami *et al.*, 2005). Ein weiteres Beispiel für die Bedeutung der Phosphorylierung bei Trockenstress ist die ABA vermittelte Signaltransduktion (siehe Abschnitt 1.5).

Neben der Phosphorylierung von Proteinen, die in Signalkaskaden involviert sind, werden durch Trockenstress auch weitere Proteine phosphoryliert (Ke *et al.*, 2009). So zeigen Phosphoproteom-Studien von *C. plantagineum* während der Austrocknung eine weitläufige Änderung des zellulären Phosphorylierungsprofils (Röhrig *et al.*, 2008; Facchinelli, 2009). Auffällig waren dabei besonders LEA-Proteine, wie zum Beispiel das Protein CDeT6-19 oder das LEA-like Protein CDeT11-24 für die ein sehr intensives Phosphorylierungssignal detektiert wurde (Röhrig *et al.*, 2006). Eine starke Phosphorylierung von LEA-Proteinen wurde auch in ausgetrockneten Samen von *A. thaliana* beobachtet (Irar *et al.*, 2006). Bezüglich der Phosphorylierung konnte für einige LEA-Proteine der Gruppe 2 bereits eine spezifische Funktion ermittelt werden. So wird durch Phosphorylierung die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungseigenschaften des VCaB45 Proteins aus Sellerie (*Apium graveolens*) um das Hundertfache gesteigert (Heyen *et al.*, 2002). Das Rab17 Protein aus Mais (*Zea mays*) zeigt eine phosphorylierungsabhängige Lokalisation im Nucleus (Riera *et al.*, 2004). Weiterhin

führt die Phosphorylierung innerhalb des K-Segments des Lti30 Proteins aus *A. thaliana* zur Auflösung der Bindung an Vesikel aus anionischen oder zwitterionischen Phospholipiden (Eriksson *et al.*, 2011).

## 1.9 Intrinsisch ungeordnete Proteine

In den letzten Jahren wurde entdeckt, dass ein Teil der Proteine, die im Genom eukaryotischer und prokaryotischer Organismen kodiert sind, nur sehr wenig  $\alpha$ -Helix- und  $\beta$ -Faltblatt-Struktur besitzt und somit keine definierte dreidimensionale Struktur ausbildet (Dunker *et al.*, 2002). Durch das Fehlen einer geordneten Struktur werden diese Proteine intrinsisch ungeordnete Proteine (IUP) genannt. Untersuchungen zeigten, dass viele dieser Proteine an verschiedenen biologischen Funktionen innerhalb von Signalwegen, der Interaktion mit anderen Proteinen oder DNA und an Regulationsmechanismen beteiligt sind (Dunker *et al.*, 2008). Generell verstößt diese Tatsache gegen das Paradigma der Proteinbiochemie, das eine definierte Struktur für das Erfüllen einer Funktion voraussetzt (Wright und Dyson, 1999).

Genomweite *in silico* Vorhersagen ergaben, dass intrinsisch ungeordnete Sequenzbereiche und intrinsisch ungeordnete Proteine in allen Organismen weitverbreitet sind. Beispielsweise besitzen von 7849 untersuchten Proteinsequenzen aus *A. thaliana*, 29 % dieser Proteine intrinsisch ungeordnete Bereiche, die länger als 50 Aminosäuren sind (Dunker *et al.*, 2000).

Die Aminosäurezusammensetzung von IUP wird durch hydrophile und geladene Aminosäuren dominiert (Romero *et al.*, 2001; Dosztanyi *et al.*, 2005). Hydrophobe Aminosäuren sind unterrepräsentiert, wodurch ein hydrophober Kern ausgeschlossen wird, der eine Grundvoraussetzung für eine stabile dreidimensionale Faltung globulärer Proteine ist (Gspöner und Babu, 2009). Außerdem besitzen IUP nur eine geringe Komplexität und eine hohe Flexibilität (Uversky *et al.*, 2000).

IUP zeigen einen Übergang von ungeordneten zu geordneten Strukturen durch die Bindung ihrer Interaktionspartner (Wright und Dyson, 1999). Hierbei sind an den meisten Interaktionen kurze amphipathische Helices beteiligt, die von längeren unstrukturierten Bereichen flankiert sind (Dyson und Wright, 2005). Des Weiteren besitzen viele IUP zwei oder mehrere Funktionen, die gänzlich unabhängig voneinander sind. Diese Eigenschaft wird als *moonlighting* bezeichnet (Tompa *et al.*, 2005; Jeffery, 2009). Ein Beispiel hierfür ist das Anhydrin Protein aus der Nematode *A. avenae*, das sowohl Chaperon- als auch Nukleaseaktivität besitzt (Chakraborty *et al.*, 2010).

Für die Identifizierung von IUP wurden in den letzten Jahren mehrere bioinformatische Vorhersageprogramme entwickelt (Xue *et al.*, 2010). Die experimentelle Charakterisierung von intrinsisch ungeordneten Proteinen erfolgt meist durch CD-Spektroskopie. Diese optische Methode beruht auf der Tatsache, dass Proteine in einem Wellenlängenbereich von 180-260 nm, bei Bestrahlung mit rechts und links circular polarisiertem Licht, ein Absorptionsverhalten zeigen, das von der räumlichen Orientierung der Peptidbindungen abhängig ist (Kelly *et al.*, 2005). Reine Struktur motive wie  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt oder Random-Coil-Konformation zeigen daher ein spezifisches Absorptionsverhalten (Abbildung 1.4). Mit Hilfe von Algorithmen, die auf Strukturdaten bekannter Proteine beruhen, lässt sich aus einem aufgenommenen CD-Spektrum die Zusammensetzung der Sekundärstruktur des untersuchten Proteins bestimmen. Generell zeigen IUP im CD-Spektrum einen negativen Peak der Elliptizität bei einer Wellenlänge von 200 nm und einen Wert von ungefähr 0 bei einer Wellenlänge von 220 nm (Tompa, 2002).

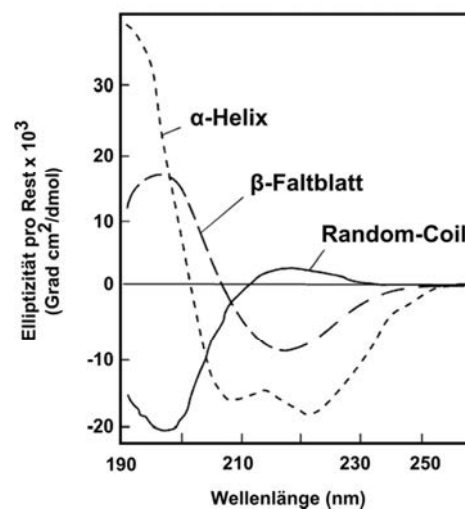


Abbildung 1.4: Referenz CD-Spektren von Sekundärstrukturmotiven. Charakteristische CD-Spektren von  $\alpha$ -Helix (gepunktete Linie),  $\beta$ -Faltblatt (unterbrochene Linie) und Random-Coil-Konformation (durchgehende Linie), (modifiziert nach Mouillon *et al.*, 2008).

## 1.10 Zielsetzung der Arbeit

Bisher wurde die Funktion des CDeT11-24 Proteins und die Funktion der Phosphorylierung nicht untersucht. Es wird jedoch vermutet, dass das Protein eine ähnliche Funktion wie die LEA-Proteine haben könnte. Weiterhin wird in Bezug auf die CDeT11-24 Phosphorylierung eine Änderung der Proteinkonformation diskutiert, durch die möglicherweise eine Funktionsänderung induziert werden könnte. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Funktion, die Struktur und Phosphorylierung des CDeT11-24 Proteins eingehender untersucht.

Für LEA-Proteine der Gruppe 2 konnte eine Bindung an Phospholipide durch das K-Segment nachgewiesen werden. Da das CDeT11-24 Protein im N-terminalen Bereich eine ähnliche Sequenz besitzt, sollen in der vorliegenden Arbeit die Lipidbindungseigenschaft des Proteins durch Protein-Lipid-Overlay- und Liposomen-Assays getestet werden.

Es wird vermutet, dass das CDeT11-24 Protein eine proteinstabilisierende Funktion während der Austrocknung besitzen könnten, wie sie für die LEA-Proteine der Gruppen 1-4 beschrieben wurde. Aus diesem Grund wird untersucht, ob das CDeT11-24 Protein Enzyme vor einem Aktivitätsverlust durch Austrocknung schützt. Um diese These zu belegen, werden Enzym-Austrocknungs-Assays durchgeführt.

Um die Struktur des CDeT11-24 Proteins experimentell zu bestimmen, wird es durch CD-Spektroskopie analysiert. Hierbei soll sowohl phosphoryliertes und als auch nicht-phosphoryliertes Protein analysiert werden. Zusätzlich wird eine mögliche Auswirkung der Helix-induzierenden Substanzen SDS und TFE auf die CDeT11-24 Proteinstruktur getestet.

Die Identifizierung einer CDeT11-24 Kinase könnte dazu beitragen, die Funktion der CDeT11-24 Phosphorylierung und ihre ABA-unabhängige Regulation aufzuklären. Aus diesem Grund wird als zusätzlicher Schwerpunkt in dieser Arbeit versucht durch biochemische Reinigungsmethoden Kinasen zu isolieren, die das CDeT11-24 Protein phosphorylieren.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien mit dem Reinheitsgrad zur Analyse wurden von folgenden Firmen bezogen:

Appllichem (Darmstadt, D), FLUKA (Steinheim, D), Grüssing (Filsum, D), Invitrogen/GibcoBRL (Karlsruhe, D), KMF (Lohmar, D), Merck (Darmstadt, D), Roche (Mannheim, D), Roth (Karlsruhe, D), SERVA (Heidelberg, D), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

### 2.2 Kits

Folgende Kits wurden nach Angaben des Herstellers verwendet:

ECL Western Blotting Detection-Reagent (Amersham Biosciences, Piscataway, USA)

CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas, St. Leon-Rot, D)

GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, St. Leon-Rot, D)

NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Düren, D)

PhosphoProtein Purification Kit (Qiagen, Hilden, D)

Kinase Enrichment Kit (Pierce, Bonn, D)

### 2.3 Geräte

Blotkammer: Criterion Blotter (Bio-Rad, Hercules, USA)

ECL-Reader: Las 1000 + Intelligent Dark Box II  
(Fuji Films, Tokio, J)

Elektroporator: Gene Pulser II Electroporator (Bio-Rad,  
Hercules, USA)

Elektrophoresesysteme: Minigel (Biometra, Göttingen, D)  
Mini PROTEAN II (Bio-Rad, Hercules, USA)  
XCell SureLock Mini-Cell (Invitrogen, Karlsruhe, D)  
Compact S/M (Biometra, Göttingen D)

Elektrophorese-Netzteil: PS 304 (GibcoBRL, Karlsruhe, D)

	Power Pac 300 (Bio-Rad, Hercules, USA)
<i>Fast protein liquid chromatography</i> (FPLC):	BioLogic HR Workstation Chromatographie-Anlage Model 2128 Fraction Collector (Bio-Rad, Hercules, USA)
Gefriertrocknungsanlage:	LDC2 (Christ, Osterode am Harz, D)
Heizblock:	MHR 11 (HLC BioTech, Bovenden, D)
Isoelektrische Fokussiereinheit:	2D Ettan IPGphor II (Amersham Biosciences, Piscataway, USA)
Magnetrührer:	MR 3001 (Heidolph, Schwabach, D)
Orbitalschüttler:	Shaker DOS-10L (neoLab, Heidelberg, D)
Spektrophotometer:	SmartSpec 3000 (BioRad, Hercules, USA) BioSpec-nano (Shimadzu Biotech, Kyoto, J)
Thermocycler:	T3-Thermocycler (Biometra, Göttingen, D)
Scanner:	Typhoon 9200, Image scanner II (Amersham Biosciences, Piscataway, USA)
Schlauchpumpe:	MINIULS 3 (Gilson, Middleton, USA)
Sterilbank:	BSB 4A (Gelaire, Sydney, AU)
Szintillationsmeßgerät:	Tri-Carb 2800 TR (Perkin Elmer,
Ultraschallgerät:	UP200S (Hielscher, Teltow, D)
Ultraschallwasserbad:	Sonorex Super RK 102 P (Bandelin, Berlin, D)
Vakuumpzentrifuge:	Concentrator 5301 (Eppendorf, Hamburg, D)
Vortex:	REAX 2000 (Heidolph, Schwabach, D)
Waagen:	BL 1500 S, BP61 S (Sartorius, Göttingen, D)
Wasserbad:	RM6 RMS (Lauda, Königshofen, D)
Zentrifugen:	Centrifuge 5810 R, Centrifuge 5417 R, Centrifuge 5415 D (Eppendorf, Hamburg, D), Sovall RC 5C plus (DuPont, Newtown, USA)

## 2.4 Enzyme und Marker

Die verwendeten Restriktionsendonucleasen und die T4 DNA Ligase, sowie die dazugehörigen Puffer wurden von Fermentas (St. Leon-Rot, D) bezogen.

Für den tryptischen Verdau von Proteinen wurde die Endoproteinasen Trypsin und Clostripain/Arg-C (Sequencing Grade, modified) der Firma Roche (Mannheim, D) verwendet.

Die für die PCR verwendete *Taq*-Polymerase wurde nach Pluthero (1993) isoliert und zur Verfügung gestellt.

Als DNA Größenstandard wurde der GeneRuler 1 kb (Fermentas, St. Leon-Rot, D) eingesetzt.

Bei der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen wurde der Prestained- und Unstained-Protein-Molecular-Weight-Marker (Fermentas, St. Leon-Rot, D) verwendet.

## 2.5 Sonstige Materialien

Whatman-Papier (Schleicher und Schüll, Dassel, D)

HIS-Select Nickel Affinity Gel (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

PD-10 Entsalzungssäulen (GE-Healthcare, Uppsala, S)

[ $\gamma$  <sup>32</sup>P] ATP (Hartmann Analytic, Braunschweig, D)

Phosphozellulose Filter P81 (GE-Healthcare, Freiburg, D)

Nitrocellulose-Membran Protan BA85 (Schleicher und Schüll, Dassel, D)

Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, USA)

ECL Western Blotting Detection-Reagent (Amersham Biosciences, Piscataway, USA)

Amicon Centrifugal Filter Devices 10K (Millipore, Billerica, USA)

Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, USA)

## 2.6 Software

AIDA Image Analyzer (Raytest, Straubenhardt, D)

Mascot Search (Matrix Science, Boston, USA)

PeptideCutter (ExPASy/ Swiss Institute of Bioinformatics, Zürich, CH)

ProtParam (ExPASy/ Swiss Institute of Bioinformatics, Zürich, CH)

Vector NTI Suite 10.3.0 (Invitrogen, Karlsruhe, D)

## 2.7 Pflanzenmaterial

Die Pflanzen der Art *Craterostigma plantagineum* (Hochst.) wurden ursprünglich von Prof. Volk (Universität Würzburg) in Süd-Afrika gesammelt (Volk und Leippert, 1971).

*C. plantagineum* wurde vegetativ vermehrt. Hierzu wurden die Pflanzen unter sterilen Bedingungen auf MS-Agar für sechs Wochen bei 22 °C, einer Lichtintensität von 80  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und einem Tag/Nacht Zyklus von 13/11 h kultiviert. Nach dieser Zeit wurden die Ableger vereinzelt. Hierbei wurden die größeren Pflanzen in Töpfe mit Tongranulat überführt. Kleinere Pflanzen wurden erneut, unter sterilen Bedingungen, auf frischen MS-Agar ausgesetzt und weiterhin für die vegetative Vermehrung verwendet.

Die in Tongranulat umgesetzten Pflanzen wurden unter nicht-sterilen Bedingungen bei 18 °C, einer Lichtintensität von 80  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und einem Tag/Nacht Zyklus von 13/11 h für ca. 8 Wochen gezogen. Die Pflanzen wurden dabei mit Wasser gegossen, das 0,1 % (v/v) Wuxal (Manna, Ammerbuch-Pfäffingen, D) enthielt.

### MS-Agar:

4,6 g/l MS-Salze; 20 g/l Saccharose (pH 5,8 mit KOH); 8 g/l Select-Agar

### 2.7.1 Austrocknung und Bestimmung des relativen Wassergehalts

Für die Versuche wurden *C. plantagineum* Pflanzen mit unterschiedlichem Wassergehalt verwendet. Zur Bestimmung des relativen Wassergehalts (RWC), wurde ein Blatt entfernt und von diesem exemplarisch der RWC bestimmt. Der Rest der Pflanze wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Das Gewicht des abgetrennten Blatts wurde direkt nach dem Abschneiden (fresh weight, Fwt), nach 24 h Rehydrierung in H<sub>2</sub>O (turgid weight, Twt) und anschließend nach 24 h Austrocknung bei 70 °C (dry weight, Dwt) bestimmt. Der RWC wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{RWC (\%)} = ( [ \text{Fwt} / \text{Dwt} ] - 1 ) / ( [ \text{Twt} / \text{Dwt} ] - 1 ) \times 100 \%$$

## 2.8 Bakterienstämme

*E. coli* DH10B (Lorow und Jessee, 1990)

Genotyp: F<sup>-</sup> *mrc*  $\Delta$  (*mrr-hsdRMS-mrcBC*)  $\Phi$ 80d *lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *endA1* *recA1* *deoR*  $\Delta$ (*ara, leu*)7697 *araD* 139 *galU* *galK* *nupG* *rpsL*  $\lambda$

*E. coli* BL-21 (DE3) (Pharmacia, Freiburg, D)

Genotyp: F<sup>-</sup> *ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm* (DE3)

## 2.9 Vektoren

**pET28a** (Novagen, Darmstadt, D)

Der Expressionsvektor wurde für die Herstellung von Proteinen mit 6His-tag verwendet.

**pJET1.2** (Fermentas, St. Leon-Rot, D)

Der Vektor wurde für allgemeine Klonierungen eingesetzt.

## 2.10 Primer

Die verwendeten Primer (Oligonukleotide) wurden bei der Firma Sigma-Genosys (Steinheim, D) bestellt. Die Primer wurden mit ddH<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt und bei -20 °C gelagert.

<u>Name</u>	<u>Sequenz (5' - 3')</u>	<u>Schnittstelle</u>
CDeT11-24 for <i>NdeI</i>	ATAAC <u>CATATG</u> GAATCGCAATTGCA CCGC	<i>NdeI</i>
CDeT11-24 rev <i>XhoI</i>	ATATT <u>CTCGAG</u> CTGAAGATGATCA CTGC	<i>XhoI</i>
CDeT11-24 for SDM	GGAGATATA <u>CCATATG</u> CAGCAGCC ATC	<i>NdeI</i>
CDeT11-24 rev SDM	GATGGCTGCTG <u>CATATG</u> GTATATC TCC	<i>NdeI</i>
CDeT11-24 A5365C for	CCATCAATAAGA <u>ACCATGGG</u> TCTA GCC	<i>NcoI</i>
CDeT11-24 A5365C rev	GGCTAGAC <u>CCATGGT</u> TCTTATTGAT GG	<i>NcoI</i>

Unterstrichene Bereiche zeigen die Restriktionsschnittstellen an.

## 2.11 Mikrobiologische Methoden

### 2.11.1 Anzucht von Bakterien

Die Kultivierung von *Escherichia coli* (*E. coli*) Zellen auf LB-Agarplatten erfolgte bei 37 °C im Brutschrank. Für die Anzucht von Flüssigkulturen wurde zunächst eine Vorkultur angeimpft und über Nacht inkubiert (250 rpm, 16 h, 37 °C). Mit dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur im Verhältnis 1:50 angeimpft, die dann bei 200 rpm und 37 °C bis zum Erreichen der gewünschten optischen Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) inkubiert wurde.

Dem LB-Medium und LB-Agar wurde, je nach Resistenz des verwendeten Stammes, Kanamycin oder Ampicillin zu gesetzt. Die Antibiotika-Stamm-Lösung (50 mg/ml Kanamycin oder 100 mg/ml Ampicillin) wurde dazu im Verhältnis 1:100 mit dem Medium verdünnt.

#### **LB-Medium:**

10 g/l Bakto-Pepton; 10 g/l NaCl; 5 g/l Bakto-Hefe-Extrakt  
(15 g/l Agar für festes Medium)

### 2.11.2 Glycerin-Stammkulturen

Für die Herstellung von *E. coli* Dauerkulturen wurde eine Kolonie des gewünschten Stammes in LB-Medium mit Antibiotika über Nacht angezogen (250 rpm, 16 h, 37 °C). Am Folgetag wurde die Vorkultur dann im Verhältnis 1:1 mit sterilem Glycerin versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Glycerin-Stammkulturen erfolgt bei -80 °C.

## 2.12 Molekularbiologische Methoden

### 2.12.1 Plasmid Isolierung im kleinen Maßstab (Birnboim und Doly, 1979)

Mit der alkalischen Lyse erfolgte die Isolierung von kleinen Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli*, die zur Restriktionsanalyse und Überprüfung einer Klonierung verwendet wurde. Darüber hinaus wurde die gereinigte Plasmid-DNA auch zur Sequenzierung verwendet.

Als Ausgangsmaterial dienten 3 ml LB-Medium mit Antibiotika, das mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht (220 rpm, 37 °C) inkubiert wurde. Am folgenden

Tag wurde die Kultur abzentrifugiert (5.000 g, 2 min, 4 °C) und das Pellet in 200 µl Lösung A resuspendiert. Die Suspension wurde für 10 min bei RT inkubiert und danach 400 µl Lösung B zugegeben. Zum Mischen wurde die Probe fünfmal invertiert und dann für 5 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden 300 µl Lösung C hinzupipetiert, die Probe erneut fünfmal invertiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (16.000 g, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand (ca. 800 µl) abgenommen, mit 600 µl eiskaltem Isopropanol gefällt (1 h, -20 °C) und die DNA durch Zentrifugation pelletiert (16.000 g, 15 min, 4 °C). Das Pellet wurde zweimal mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und erneut pelletiert (16.000 g, 5 min 4 °C). Der Überstand wurde entfernt, das DNA-Pellet für 5 min auf Eis getrocknet und dann in 50 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst. Der Erfolg der Plasmid-Präparation wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.12.12) kontrolliert.

DNA, die zur Sequenzierung eingesetzt werden sollte, wurde mit Hilfe eines zusätzlichen Fällungsschritts weiter aufgereinigt. Die Proben wurden dazu mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt und mit 100 µl 4 M Ammoniumacetat versetzt. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurden 600 µl Ethanol (RT) zugegeben und anschließend die präzipitierte DNA abzentrifugiert (16.000 g, 15 min, 4 °C). Das Pellet wurde zweimal mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen und abzentrifugiert (16.000 g, 5 min, 4 °C). Nach fünfminütigem Trocknen auf Eis wurde das Präzipitat in 10 mM Tris-HCl pH 8,0 gelöst und der DNA-Gehalt photometrisch (Abschnitt 2.12.8) bestimmt.

**Lösung A:**

25 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM EDTA; 50 mM Glucose; 0,5 % (v/v) RNase A (10 mg/ml)

Die RNase wurde bei -20 °C gelagert.

**Lösung B:**

0,2 M NaOH; 1 % (w/v) SDS

**Lösung C:**

3 M Kaliumacetat; 11,5 % (v/v) Essigsäure pH 5,2

### 2.12.2 Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion wurde verwendet, um DNA-Lösungen von Proteinen sowie anderen Verunreinigungen zu befreien. Hierzu wurde die DNA-Lösung mit einem Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1; [v/v]) in einem Reaktionsgefäß gemischt und abzentrifugiert (16.000 g, 5 min, 4 °C). Die obere wässrige

Phase wurde abgenommen und dann mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) sowie zwei Volumen Ethanol bei -20 °C für 2 h präzipitiert. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation sedimentiert (16.000 g, 15 min, 4 °C) und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (16.000 g, 5 min, 4 °C), wurde das DNA-Pellet für 5 min auf Eis unter dem Abzug getrocknet und danach in ddH<sub>2</sub>O gelöst.

### 2.12.3 Restriktionsverdau von DNA (Maniatis *et al.*, 1989)

Die Reaktionsansätze von je 15 µl zur präparativen oder analytischen Spaltung von DNA wurden wie unten aufgeführt angesetzt und im Wasserbad bei 37 °C für mindestens 2 h inkubiert. Anschließend wurden die DNA-Fragmente des Verdau durch Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.12.12) kontrolliert und bei Bedarf aus dem Gel isoliert (Abschnitt 2.12.13).

<u>Volumen/Konzentration</u>	<u>Komponente</u>
1 µg	DNA
5 U	Restriktionsenzym
1,5 µl	10x Reaktionspuffer
x µl (Endvolumen 15 µl)	ddH <sub>2</sub> O

### 2.12.4 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten in einen linearisierten Vektor erfolgte unter Verwendung der T4 DNA Ligase. Dazu wurde der zu verwendende Vektor mit dem zu inserierenden DNA-Fragment in einem molaren Verhältnis von 3:1 versetzt. Als Positivkontrolle diente der linearisierte Vektor ohne Fragment und als Negativkontrolle ein Ansatz ohne T4 DNA Ligase. Die Ligation erfolgte über Nacht in einem Volumen von 10 µl bei 16 °C.

### 2.12.5 Herstellung Rubidiumchlorid-kompetenter *Escherichia coli* Zellen

Eine Vorkultur von 3 ml LB-Medium wurde mit einer Bakterienkolonie inokuliert und über Nacht (250 rpm, 16 h, 37° C) inkubiert. Am folgenden Tag wurden mit 1 ml dieser Kultur



100 ml LB-Medium angeimpft und unter gleichbleibenden Bedingungen bis zu einer Zelldichte von  $OD_{600} = 0,4$  weiter kultiviert. Die Zellen wurden in 50 ml Zentrifugenröhrchen pelletiert (5.000 g, 10 min, 4 °C), das Pellet in 15 ml kaltem TF-Puffer 1 resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren (5.000 g, 10 min, 4 °C) wurde das Pellet in 25 ml TF-Puffer 1 resuspendiert, wieder auf Eis inkubiert und wie beschrieben abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 2 ml TF-Puffer 2 aufgenommen. Die Zellen wurden in Aliquots von je 50 µl aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Transformation bei -80 °C gelagert.

**TF-Puffer 1:**

30 mM Kaliumacetat pH 5,8; 10 mM  $CaCl_2$ ; 100 mM  $RuCl_2$ ; 50 mM  $MnCl_2$ ; 15 % (v/v) Glycerin

**TF-Puffer 2:**

10 mM MOPS pH 6,5; 75 mM  $CaCl_2$ ; 10 mM  $RuCl_2$ ; 15 % (v/v) Glycerin

Beide Puffer wurden steril filtriert (Porendurchmesser des Filters 0,22 µm).

### 2.12.6 Transformation Rubidiumchlorid-kompetenter *Escherichia coli* Zellen

Für die Transformation von *E. coli* Zellen wurden zunächst die auf Eis aufgetauten Rubidiumchlorid-kompetente Zellen (Abschnitt 2.12.5) mit 1 µl des Ligationsansatzes versetzt und für 1 h auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der Hitzeschock für 45 s bei 42 °C. Direkt im Anschluss wurden die Bakterien für 5 min auf Eis inkubiert, in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz für 1 h im Schüttler (37 °C, 200 rpm) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit Antibiotika zur Selektion ausgestrichen und für ca. 16 h bei 37 °C bebrütet.

**SOC-Medium:**

2 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Selekt-Hefe-Extrakt (GibcoBRL, Karlsruhe, D);  
10 mM NaCl; 10 mM  $MgSO_4$ ; 10 mM  $MgCl_2$

### 2.12.7 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde von der Firma Macrogen Inc. (Seoul, ROK) durchgeführt. Hierzu wurde die isolierte Plasmid-DNA (Abschnitt 2.12.1) mit ddH<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 100 ng/μl eingestellt und zusammen mit den Primern (5 pmol/μl) eingeschickt.

### 2.12.8 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration einer Lösung wurde bei 260 nm in einer Quarzküvette mit dem Spektrophotometer bestimmt. Zur Berechnung diente der Umrechnungsfaktor OD<sub>260</sub> von 1=50 μg/ml (DNA). Alternativ erfolgte die DNA-Konzentrationsbestimmung bei 260 nm mit dem Mikrovolumen-Spektrometer (BioSpec-nano, Shimadzu Biotech, Kyoto, J).

### 2.12.9 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde für die Vervielfältigung definierter DNA Bereiche eingesetzt. Mit Hilfe von Primern, die an spezifische, flankierende Bereiche der Matrizen-DNA binden wird hierbei ein Bereich doppelsträngiger DNA gebildet, der als Startpunkt für das Enzym DNA-Polymerase I dient.

Für einen 20 μl PCR-Ansatz wurden folgende Komponenten eingesetzt:

<u>Volumen</u>	<u>Komponente</u>
2 μl	10 x PCR Puffer
0,4 μl	25 mM MgCl <sub>2</sub>
0,4 μl	10 mM dNTP-Mix
0,5 μl	10 μM Primer 1 (forward)
0,5 μl	10 μM Primer 2 (reverse)
0,4 μl	<i>Taq</i> -Polymerase
1 μl	Matrizen-DNA (7,5 ng/μl)
14,7 μl	ddH <sub>2</sub> O

Standardprogramm für die PCR:

<u>Schritt</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>	
Denaturierung	94 °C	300 s	
Denaturierung	94 °C	30 s	} 35 Zyklen
Primer Hybridisierung	55 °C	30 s	
Polymerisation	72 °C	60 s/1000 bp	
Vervollständigung der Polymerisation	72 °C	300 s	
Lagerung	4 °C	∞	

Neben der Amplifikation gewünschter DNA-Bereiche, wurde die PCR auch dazu verwendet, um durch *in vitro* Mutagenese nicht vorhandene, jedoch für eine Klonierungs-Strategie benötigte Restriktions-Schnittstellen einzufügen.

#### 2.12.10 Ortsgerichtete Mutagenese

Neben der *in vitro* Mutagenese von linearen DNA-Fragmenten nach dem herkömmlichen PCR-Protokoll (Abschnitt 2.12.9), wurden auch Punktmutationen in zirkulären DNA-Fragmenten erzeugt. Hierzu wurden zwei komplementäre Primer verwendet, bei denen die zu mutierende Base mindestens von 15 komplementären Basen am 5'- und 3'-Ende flankiert wurden. Die Amplifikation durch PCR erfolgte mit Hilfe der Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase (NEB, Ipswich, USA) und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Nach der PCR wurde der Ansatz zum Entfernen nicht mutagenisierter Plasmide mit der methylierungsabhängigen Restriktionsendonuclease *DpnI* verdaut (Abschnitt 2.12.3). Der Verdau wurde danach direkt für die Transformation von *E. coli* verwendet.

#### 2.12.11 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde für die Identifizierung positiver Klone nach einer Transformation eingesetzt. Die zu untersuchende Kolonien wurden dazu mit einem sterilen Zahnstocher abgeschabt, kurz in 20 µl PCR-Mix (Abschnitt 2.12.9) suspendiert und danach auf einer LB-Agarplatte (Referenzplatte) platziert. Nach der PCR (Abschnitt 2.12.9) wurde die Größe des

Produkts durch Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.12.12) kontrolliert. Die Referenzplatte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### **2.12.12 Agarose-Gelelektrophorese**

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte in 0,8-2 %igen Agarosegelen in TAE-Puffer, wobei die Agarose-Konzentration in Abhängigkeit von der aufzutrennenden DNA Größe gewählt wurde. Die DNA-Proben wurden mit 0,1 Volumen (10x) DNA-Ladepuffer gemischt und in die Probenaschen gegeben. Die Elektrophorese erfolgte mit einer Spannung von 50-100 V für ca. 30-60 min. Zum Nachweis der DNA wurde das Gel nach der Elektrophorese für 15 min mit Ethidiumbromidlösung (1 mg/l Ethidiumbromid in TAE-Puffer) und anschließend kurz in frischem TAE-Puffer inkubiert. Die Detektion der DNA erfolgte mit UV-Licht (245 nm).

##### **(50x) TAE-Puffer:**

2 M Tris-HCl; 50 mM EDTA; pH 8,0 mit Essigsäure einstellen

##### **(10x) DNA-Ladepuffer:**

2,5 mg/ml Bromphenolblau; 2,5 mg/ml Xylencyanol; 30 % Glycerin (in 1x TAE)

#### **2.12.13 Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel (Vogelstein und Gillespie, 1979)**

Die Isolierung von DNA-Fragmenten nach der elektrophoretischen Auftrennung im Agarosegel erfolgte nach Angaben des Herstellers durch das NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel, Düren, D).

### **2.13 Allgemeine proteinbiochemische Methoden**

#### **2.13.1 Fällung von Proteinen mit Aceton**

Mit Aceton lassen sich sehr geringe Mengen (<1 µg/ml) Protein aus einer Lösung fällen. Zu der Proteinlösung wurden 4 Volumen eiskaltes Aceton zugegeben und für 10 s mit dem Vortex gemischt. Die Präzipitation erfolgte bei -20 °C für 1 h. Die ausgefallenen Proteine

wurden durch Zentrifugation (20.000 g, 10 min, 4 °C) pelletiert, der Überstand verworfen und das Proteinpellet für 5 min unter dem Abzug getrocknet.

### 2.13.2 Fällung von Proteinen mit TCA

Die TCA-Fällung kann bei Proteinlösungen mit Konzentrationen von über 5 µg/ml durchgeführt werden. Ein Vorteil dieser Fällungsmethode liegt in der geringen Vergrößerung des Probevolumens. Für die Fällung wurde die Proteinlösung mit 0,25 Volumen 100 % (w/v) TCA Lösung versetzt und für 10 s mit dem Vortex gemischt. Enthielt die Lösung nur eine sehr geringe Proteinmenge, wurde zusätzlich 0,01 Vol Na-Deoxycholat (2 % w/v) als Co-Präzipitat zugegeben. Die anschließende Fällung erfolgte für 1 h auf Eis. Die ausgefallenen Proteine wurden dann mittels Zentrifugation (20.000 g, 10 min, 4 °C) pelletiert. Um etwaige TCA-Reste zu entfernen, folgten zwei Waschschrte mit kaltem 80 % Aceton, wobei das Protein jeweils durch Zentrifugation (20.000 g, 5 min, 4 °C) pelletiert wurde.

#### 100 % (w/v) TCA Lösung

1 kg TCA + 454 ml dH<sub>2</sub>O

### 2.13.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976)

Von der zu untersuchenden Proteinlösung wurden 10 µl mit 790 µl H<sub>2</sub>O und 200 µl Bradford-Reagenz (Bio-Rad Protein Assay) versetzt. Der Ansatz wurde gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die photometrische Messung der Probe bei 595 nm. Als Leerwert diente der jeweilige Puffer, in dem die Proteine extrahiert wurden. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch Extrapolation mit Hilfe einer vorher erstellten BSA-Eichkurve.

### 2.13.4 Bestimmung der Proteinkonzentration bei 280 nm (Gill und Hippel, 1989)

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration bei einer Wellenlänge von 280 nm wurde zunächst der spezifische molare Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ) des zu untersuchenden Proteins mittels folgender Formel bestimmt:

$$\epsilon (\text{Protein}) = [n(\text{Tyr}) \times \epsilon(\text{Tyr})] + [n(\text{Trp}) \times \epsilon(\text{Trp})] + [n(\text{Cys}) \times \epsilon(\text{Cys})]$$

Als Wert für den molaren Extinktionskoeffizienten wurde  $\epsilon(\text{Tyr}) = 1490 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon(\text{Trp}) = 5500 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  und  $\epsilon(\text{Cys}) = 125 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  eingesetzt.

Anschließend wurde die Extinktion (E) der Proteinlösung bei 280 nm bestimmt. Mit Hilfe des errechneten molekularen Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ), der gemessenen Extinktion (E) und der Schichtdicke ( $d = 1 \text{ cm}$ ) wurde Proteinkonzentration (c) nach folgender Formel berechnet.

$$c = E / \epsilon d$$

## 2.14 Heterologe Expression von rekombinantem Protein in *E. coli*

Für die Überexpression von rekombinantem Protein wurden 10 ml  $\text{LB}_{\text{Kan}}$ -Medium mit einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht angezogen (250 rpm, 37 °C). Mit 5 ml dieser Kultur wurden 100 ml  $\text{LB}_{\text{Kan}}$ -Medium angeimpft und bei 37° C sowie 250 rpm kultiviert. Nachdem die Kultur eine Zelldichte von  $\text{OD}_{600} = 0,6$  erreicht hatte, wurde sie im Dunkeln für 30 min bei 28 °C und 180 rpm vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG für 3 h bei 200 rpm und 28 °C.

Nach der Inkubationszeit wurde die Kultur abzentrifugiert (5.000 g, 15 min, 4° C) und das resultierende Pellet direkt zur Aufreinigung des rekombinanten Proteins aufgeschlossen oder bei -20° C gelagert.

### 2.14.1 Native Aufreinigung von rekombinanten Protein aus *Escherichia coli*

Das Pellet der mit IPTG induzierten Bakterien wurde in 10 ml Puffer A gelöst, zur Lyse mit 1 mg/ml Lysozym versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der weitere Aufschluss der Bakterien durch Ultraschall (6x20 s). Das Entfernen der Zelltrümmer und anderer unlöslicher Zellbestandteile erfolgte durch Zentrifugation (14.000 g, 30 min, 4 °C).

Bei der Aufreinigung von CDeT-11-24 wurde zusätzlich ein Hitzeextraktionsschritt durchgeführt. Hierzu wurde das Lysat nach der ersten Zentrifugation für 10 min in einem Wasserbad bei 100 °C inkubiert, danach 10 min auf Eis abgekühlt und erneut abzentrifugiert (14.000 g, 20 min, 4 °C). Der Überstand wurde dann für die weitere Aufreinigung eingesetzt.

### Metallchelat-Affinitätschromatographie

Zur spezifischen Aufreinigung von rekombinantem Protein mit 6His-tag aus dem Lysat wurde zunächst eine mit 1 ml Ni-NTA Agarose gefüllte Säule (Säulenvolumen: 1 ml) mit 3 ml dH<sub>2</sub>O, 5 ml Ni-Ladepuffer (50 mM NiSO<sub>4</sub>) und 3 ml Puffer A äquilibriert (Flussrate 1 ml/min).

Für die Bindung der 6His-Proteine wurden 10 ml Lysat mit einem Membranfilter (Porengröße 0,45 µm) steril filtriert und dann luftblasenfrei auf die Säule gegeben. Die Bindung erfolgte mit einer Flussrate von 0,5 ml/min für alle weiteren Schritte betrug die Flussrate 1 ml/min. Zum Entfernen unspezifisch gebundener Proteine wurde die Säule mit 10 ml Puffer A und 8 ml Puffer B gewaschen. Die Elution, der an die Säule gebundenen Proteine, erfolgte mit sechsmal 0,5 ml Puffer C. Mit je 10 µl der sechs Eluat-Fractionen wurde eine Bradford-Proteinbestimmung (Abschnitt 2.13.3) durchgeführt. Des Weiteren wurde die Reinheit des rekombinanten Proteins mittels SDS-PAGE (Abschnitt 2.15.1) analysiert.

Die Regeneration der Ni-NTA Agarose erfolgte durch Entfernen der Ni-Kationen mit 3 ml Regenerationspuffer. Zur Lagerung wurde die Säule mit 20 % Ethanol gewaschen.

#### **Puffer A:**

100 mM HEPES pH 7,6; 300 mM NaCl; 10 % (v/v) Glycerin; 0,1 % (v/v) Triton X100;  
5 mM Imidazol

#### **Puffer B:**

100 mM HEPES pH7,6; 300 mM NaCl; 10 % (v/v) Glycerin, 0,1 % (v/v) Triton X100;  
20 mM Imidazol

#### **Puffer C:**

100 mM HEPES pH7,6; 300 mM NaCl; 10 % (v/v) Glycerin; 0,1 % (v/v) Triton X100;  
200 mM Imidazol

#### **Regenerationspuffer:**

20 mM Tris-HCl pH 8; 500 mM NaCl; 100 mM EDTA

### **2.14.2 Native Aufreinigung von rekombinantem CDeT11-24 ohne 6His-tag**

Für die Aufreinigung von CDeT11-24 ohne 6His-tag wurden die Zellen zunächst wie in Abschnitt 2.14.1 beschrieben angezogen bzw. induziert und lysiert. Anschließend wurde das

Lysat mit einem Amicon-Konzentrator auf 1 ml eingengt und gegen 25 mM MES pH 5,5 umgepuffert. Die weitere Aufreinigung wurde mit der Mono S-Säule durchgeführt. Dazu wurde die Säule mit 10 Säulenvolumen 25 mM MES pH; 5,5, 1M NaCl gespült und dann mit 25 mM MES pH 5,5 äquilibriert (Flussgeschwindigkeit 0,2 ml/min). Vor Injektion des konzentrierten Lysats in die Probenschleife, wurde nochmals zum Entfernen unlöslicher Bestandteile zentrifugiert (14.000 g, 5 min, 4 °C). Die chromatographische Auftrennung, mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min, erfolgte durch einen linearen NaCl Gradienten in 25 mM MES pH 5,5 nach folgendem Programm:

Injektion:	3 ml	(0 mM NaCl
Waschen:	5 ml	(0 mM NaCl)
Gradient:	30 ml	(0 mM – 500 mM NaCl)
Waschen:	10 ml	(1 M NaCl)

Nach dem Gebrauch wurde die Säule mit 50 ml ddH<sub>2</sub>O gespült und danach unter 20 % Ethanol gelagert.

Anschließend wurden die gesammelten Fraktionen (zu je 1 ml) zur Überprüfung der Reinheit des isolierten CDeT11-24 Proteins durch SDS-PAGE (Abschnitt 2.15.1) aufgetrennt.

## 2.15 Elektrophorese von Proteinen

### 2.15.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Die verwendeten Gele bestanden dabei aus einem Trenngel mit 12 % und einem Sammelgel mit 4 % Acrylamid.

Vor dem Laden wurden die Proteine mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingebaut und diese dann mit Tris/Glycin Laufpuffer befüllt. Nach dem Laden der Proben erfolgte die Elektrophorese im Sammelgel bei einer Stromstärke von 10 mA, die sobald die Bromphenolblau-Front ins Trenngel gelaufen war, auf 20 mA heraufgesetzt wurde.



<u>Komponente</u>	<u>Trenngel 12 % (6 ml)</u>	<u>Sammelgel 4 % (4 ml)</u>
H <sub>2</sub> O	1,98 ml	2,16 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1,5 ml	-
1 M Tris-HCl pH 6,8	-	375 µl
30 % (w/v) Acrylamid	2,4 ml	405 µl
10 % (w/v) SDS	60 µl	30 µl
Temed	2,4 µl	3 µl
10 % (w/v) Ammonium- persulfat	60 µl	30 µl

**(2x) SDS Probenpuffer:**

120 mM Tris-HCl pH 6,8; 20 % (v/v) Glycerin; 4 % (v/v) SDS; 200 mM DTT; 0,001 % (w/v) Bromphenolblau

**Tris/Glycin Laufpuffer:**

25 mM Tris-HCl; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS

**2.15.2 2D-Gelelektrophorese**

Durch isoelektrische Fokussierung (IEF) und anschließender SDS-PAGE wurden Proteine zunächst in der ersten Dimension gemäß ihrer Ladung (isoelektrischer Punkt) und anschließend in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das Pellet der zu untersuchenden Probe wurde hierzu in 125 µl Rehydrierungslösung durch Pipettieren gelöst und für 3 h bei RT inkubiert. Danach wurde die Probe zum Entfernen unlöslicher Bestandteile abzentrifugiert (20.000 g, 5 min, 4 °C) und der Überstand in den IEF-Streifenhalter pipettiert. Der IPG-Streifen wurde in den Halter transferiert und von beiden Seiten mit 0,5 ml Mineralöl überschichtet. Der Streifenhalter wurde dann mit dem Deckel verschlossen und in das IEF-Gerät eingelegt. Vor der Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld wurde der Streifen zunächst für 14 h rehydriert.

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte anschließend mit einer sequentiellen Spannungsabfolge von:

500V	30 min
1000 V	30 min
5000 V	100 min

Nach der isoelektrischen Fokussierung wurde der Streifen in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und für die Auftrennung in der zweiten Dimension (SDS-PAGE) jeweils für 15 min in Äquilibrationpuffer + DTT (50 mg/5 ml) bzw. Äquilibrationpuffer + Iodacetamid (125 mg/5 ml) auf dem Schüttler inkubiert. Das DTT diente dabei der Spaltung von Disulfid-Brücken und das Iodacetamid der Alkylierung der durch die Spaltung resultierenden Sulfhydryl-Gruppen.

Der IPG-Streifen wurde anschließend auf das Sammelgel eines Polyacrylamid-Gels gelegt. Auf einen Streifen Whatman-Papier wurde dann der Proteingrößenstandard aufgetragen und neben den IPG-Streifen gesteckt. Beides wurde mit geschmolzener IEF-Agarose überschichtet und durch SDS-PAGE aufgetrennt (Abschnitt 2.15.1).

**Rehydrierungslösung:**

7 M Urea; 2 M Thioharnstoff; 2 % (w/v) CHAPS; 0,002 % (w/v) Bromphenolblau; 0,2 % (w/v) DTT; 0,5 % (v/v) IPG Puffer

**Äquilibrationpuffer:**

2 % (w/v) SDS; 50 mM Tris-HCL pH 6,8; 6 M Urea; 30 % (v/v) Glycerin; 0,002 % (w/v) Bromphenolblau

**IEF-Agarose:**

0,5 % (w/v) Agarose; 0,002 % Bromphenolblau in Tris/Glycin Laufpuffer

**2.15.3 Coomassie-Brillant-Blau-Färbung von Proteinen im Gel (Zehr *et al.*, 1989)**

Der Nachweis von Proteinen, die elektrophoretisch in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt wurden, erfolgte durch Anfärben im Gel mit dem Farbstoff Coomassie G250.

Hierzu wurde das Gel nach der Elektrophorese zunächst zweimal für 1 h in 100 ml Fixierlösung inkubiert. Nach dem Entfernen der Fixierlösung wurde das Gel dann dreimal für 10 min mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurden 100 ml Coomassie-Brillant-Blau-Lösung

zugegeben. Die Färbung erfolgte über Nacht. Am nächsten Tag wurde das Gel mehrmals zum Entfärben mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und dokumentiert.

**Fixierlösung:**

10 % (v/v) Essigsäure; 50 % (v/v) Methanol

**Coomassie-Brillant-Blau-Lösung:**

100 g/l Ammoniumsulfat; 1 % (v/v) Phosphorsäure; 0,1 % (w/v) Coomassie G250

Für die Färbung wurden 4 Volumen Coomassie-Lösung mit 1 Volumen Methanol versetzt.

Neben der selbst hergestellten Coomassie-Lösung wurde auch die PageBlue Protein Staining Solution (Fermentas, St. Leon-Rot, USA) verwendet.

#### 2.15.4 Phosphoproteinfärbung mit Pro-Q Diamond

Für den Nachweis von Phosphoproteinen nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Polyacrylamid-Gel in 100 ml Fixierlösung (Abschnitt 2.15.3) für 30 min inkubiert. Die Fixierlösung wurde ausgetauscht und das Gel weiter über Nacht fixiert. Am nächsten Tag wurde das Gel dreimal für 10 min mit 100 ml dH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend in 30 ml ProQ-Diamond (Invitrogen, Karlsruhe, D)/ddH<sub>2</sub>O (1:1) für 1,5 h im Dunkeln gefärbt. Um unspezifisch gebundenen Farbstoff zu entfernen, wurde das Gel dreimal mit 100 ml Entfärbungslösung für jeweils 30 min und anschließend zweimal für 5 min mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Detektion der phosphorylierten Proteine erfolgte mit dem Typhoon 9200 Scanner. Hierbei wurde eine Anregungsquelle von 532 nm und ein Emissions-Filter von 560 nm verwendet.

**Entfärbungslösung:**

50 mM Natriumacetat pH 4; 20 % (v/v) Acetonitril

#### 2.15.5 Trocknen von Polyacrylamid-Gelen

Vor dem Trocknen wurde das Polyacrylamid-Gel zweimal für 15 min in Gel-Trocknungslösung gewaschen. Danach wurde es auf Whatman-Papier transferiert und mit

Zellophanfolie überdeckt auf den Gelrockner gelegt. Die Trocknung erfolgte für 1 h bei 40 °C.

**Gel-Trocknungslösung:**

30 % (v/v) Methanol; 5 % (v/v) Glycerin

**2.15.6 Western Blot (Towbin *et al.*, 1979)**

Für einen immunologischen Nachweis wurden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mittels Elektrophorese auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Der Transfer erfolgte in einer Halbtrockenzelle (Criterion Blotter, Biorad, München, D) gefüllt mit Towbin-Puffer und einer Spannung von 100 V für eine 1 h.

**Towbin-Puffer:**

25 mM Tris-HCl; 0,192 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol

**2.15.7 Ponceau Färbung**

Die reversible Ponceau Färbung wurde zur Kontrolle der Transfereffizienz nach dem Western Blot verwendet. Die Nitrocellulose-Membran wurde hierzu für 10 min in 50 ml Ponceau-Lösung inkubiert und anschließend kurz mit H<sub>2</sub>O gewaschen.

**Ponceau-Lösung:**

0,2 % (w/v) Ponceau S; 3 % (w/v) Trichloressigsäure

**2.15.8 Immunologischer Proteinnachweis (Towbin & Gordon, 1984)**

Nach erfolgreichem Proteintransfer wurde die Nitrocellulose-Membran über Nacht in 50 ml Blockierlösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran einmal kurz und dann dreimal für 10 min mit 50 ml TBS-T Puffer gewaschen. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte für 1 h. Zum Entfernen unspezifisch gebundener Antikörper wurde die Membran danach erneut, wie oben beschrieben, mit TBS-T Puffer gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte für 45 min. Vor der Detektion wurde die Membran erneut mit TBS-T Puffer gewaschen. Die zwei Komponenten der Substratlösung (ECL-Lösung) wurden in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und auf einen Folienschlauch gegeben. Zum Benetzen mit der Substratlösung wurde die Membran dann für 30 s in den Folienschlauch gelegt.

Anschließend wurde die Detektion der Chemilumineszenz mit Hilfe eines Las 1000 und einer Intelligent Dark Box II (Firma Fuji Films, Tokyo, J) durchgeführt.

**TBS-T:**

20 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1 % (v/v) Tween-20

**Blockierlösung:**

4 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T

**Primärer Antikörper:**

Rabbit-anti-CDeT11-24 1:5000 (v/v) in Blockierlösung

**Sekundärer Antikörper:**

Peroxidasegekoppelter Goat-anti-rabbit-Immunglobulin G-Antikörper (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 1:5000 (v/v) in Blockierlösung

## **2.16 Aufreinigung von nativem CDeT-11-24 aus *Craterostigma plantagineum***

Die Isolierung von CDeT11-24 erfolgte *C. plantagineum* Blättern. Hierzu wurde zunächst mit einer HiTrap NHS-aktivierten Säule eine Antigen-Säule hergestellt, um aus dem Kaninchenserum monospezifische CDeT11-24 Antikörper aufzureinigen. Diese wurden dann ebenfalls an eine HiTrap NHS-aktivierte Säule gekoppelt und die resultierende Antikörper-Säule für die Immun-Affinitätschromatographie eingesetzt. Aus dem gereinigten CDeT11-24 wurde weiterhin phosphoryliertes CDeT11-24 mit Hilfe des PhosphoProtein Purification Kits (Qiagen, Hilden, D) angereichert.

### **2.16.1 Kopplung von Proteinen an eine HiTrap NHS-aktivierte Säule**

Die Herstellung von Antigen- und Antikörpersäulen erfolgte durch die Immobilisierung von CDeT11-24 bzw. anti-CDeT11-24 an eine HiTrap NHS-aktivierte Säule. Dabei wurde eine kovalente Bindung zwischen den an Sepharose gebundenen N-Hydroxysuccinimid-Gruppen und den Amin-Gruppen der Proteine durch Ausbildung von Amidbindungen erzeugt.

Der Säulenlauf erfolgte mit einer Schlauchpumpe, bei 4 °C und einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min. Für die Kopplung wurde eine HiTrap NHS-aktivierte Säule mit 6 ml 1 mM HCl aktiviert und anschließend mit 1 ml des zu bindenden Proteins (0,5-10 mg/ml) in

Kopplungspuffer beladen. Für die Bindung wurde die Säule verschlossen und für 4 h bei 4 °C inkubiert. Zum Deaktivieren von überschüssigen NHS-Gruppen und Auswaschen unspezifisch gebundener Proteine wurde die Säule mit 6 ml Puffer A, 6 ml Puffer B und 6 ml Puffer A gewaschen. Danach wurde sie wieder verschlossen und erneut für 4 h bei 4 °C inkubiert. Es folgten drei weitere Waschstschritte mit 6 ml Puffer B, 6 ml Puffer A und 6 ml Puffer B. Um die Säule zu neutralisieren, wurde diese mit 10 ml 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7 gespült. Die Lagerung der Säulen erfolgte unter 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7 mit 0,1 % NaN<sub>3</sub> bei 4 °C.

**Kopplungspuffer:**

200 M NaHCO<sub>3</sub>; 500 M NaCl pH 8,0

**Puffer A:**

500 mM Ethanolamine; 500 mM NaCl pH 8,3

**Puffer B:**

100 mM Natriumacetat pH 4; 500 mM NaCl

### 2.16.2 Isolierung monospezifischer Antikörper mit einer Antigen-Säule

Die Isolierung monospezifischer Antikörper erfolgte durch Affinitätschromatographie mit einer HiTrap NHS-aktivierten Säule (Abschnitt 2.16.1), an die zuvor das Antigen (CDeT11-24) gekoppelt wurde. Zur Durchführung wurde die Säule an eine Schlauchpumpe angeschlossen, die mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min bei 4 °C betrieben wurde.

Zunächst wurde das Kaninchenserum im Verhältnis 1:10 mit 10 mM HEPES pH 8,0 verdünnt und zum Entfernen nicht löslicher Bestandteile abzentrifugiert (20.000 g, 30 min, 4 °C). Die Antigen-Säule wurde mit je 10 ml 10 mM HEPES pH 8 und anschließend mit 10 mM HEPES pH 8, 300 mM KCl äquilibriert. Dann wurde das verdünnte Serum zur Bindung der Antikörper über die Säule gegeben. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden mit 10 ml 10 mM HEPES pH 8 entfernt. Die Elution erfolgte mit 5 ml 100 mM Glycin-HCl pH 2,5. Hierbei wurde das Eluat in einem Reaktionsgefäß mit 500 µl 1 M Tris-HCl pH 8 aufgefangen. Um die Antigen Säule zu regenerieren wurde sie anschließend mit 10 ml 10 mM HEPES pH 8 gewaschen.

Die isolierten monospezifischen Antikörper wurden mit einer PD-10 Entsalzungssäule umgepuffert und durch Zentrifugation mit einem Amicon-Konzentrator eingengt. Danach

wurden sie wie in Abschnitt 2.16.1 beschrieben zur Herstellung der Antikörpersäule verwendet.

### 2.16.3 Aufreinigung von „leicht löslichem“ Protein aus *Craterostigma plantagineum*

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von CDeT11-24 aus *C. plantagineum* diente Pflanzenmaterial mit einem RWC von 2 %. Dabei wurde das pflanzliche Gesamtprotein gefällt und dann das „leicht lösliche“ Protein in PBS renaturiert.

Das Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff fein gemörsert, dann in einem Verhältnis von 1:10 Pflanzenmaterial zu eiskaltem Aceton mit dem Vortex resuspendiert und abzentrifugiert (10.000 g, 1 min, 4 °C). Anschließend wurde das Pellet nochmals mit eiskaltem Aceton gewaschen, wieder abzentrifugiert und in 10 % (w/v) TCA/Aceton gelöst. Das Gemisch wurde für 10 min in ein Ultraschallwasserbad gestellt und dann erneut abzentrifugiert. Es folgten drei Waschschriffe mit 10 % (w/v) TCA/Aceton, zwei Waschschriffe mit 10 % (w/v) TCA und danach zwei Waschschriffe mit 80 % (v/v) Aceton. Dabei wurde nach jedem Waschschriff das Pellet wie oben beschrieben durch Zentrifugation zurückgewonnen.

Das Proteinpellet wurde auf Eis unter dem Abzug getrocknet und anschließend in PBS resuspendiert. Die Inkubation der Protein-PBS-Lösung erfolgte auf Eis für 2 h auf einem Taumelschüttler. Danach wurde die Lösung abzentrifugiert (10.000 g, 20 min, 4 °C) und die im Überstand befindlichen „leicht löslichen“ Proteine mit einem Amicon-Konzentrator eingeeengt.

#### **PBS:**

8 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 1,44 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,24 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

### 2.16.4 Immunaффinitätschromatographie

Die Immunaффinitätschromatographie wurde mit der anti-CDeT11-24 Antikörper-Säule (Abschnitt 2.16.1) und dem „leicht-löslichen“ Protein-Extrakt (Abschnitt 2.16.3) durchgeführt. Dabei wurde die Methode wie in Abschnitt 2.16.2 beschrieben durchgeführt, wobei jedoch anstelle des 10 mM HEPES Puffers, PBS (Abschnitt 2.16.3) verwendet wurde.

### 2.16.5 Anreicherung von phosphoryliertem CDeT11-24

Für die Anreicherung von phosphoryliertem CDeT11-24 nach der Immunaффinitätschromatographie (Abschnitt 2.16.4) wurde das PhosphoProtein Purification Kit (Qiagen, Hilden, D) verwendet. Hierzu wurde zunächst das Eluat mit einer PD-10 Entsalzungssäule und PhosphoProtein Lysis Puffer umgepuffert, das Volumen auf 25 ml eingestellt und die Anreicherung entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

## 2.17 Circular dichroismus-Spektroskopie

Die Circular dichroismus-Spektroskopie wurde in der Arbeitsgruppe von Pia Harryson (Stockholm, S) mit einem JASCO J-810 Spektropolarimeter durchgeführt. Hierzu wurden die Proteinproben 1h vor der Messung auf eine Konzentration von 0,2 mg/ml eingestellt und direkt vor der Messung abzentrifugiert (12.000 g, 2 min, RT) die Messung erfolgte mit einer „Scanrate“ von 20 nm/min bei 25 °C, wobei die Auflösung 0,2 nm und die Empfindlichkeit 20 mdeg betrug.

## 2.18 Enzym-Austrocknungs-Assays

### 2.18.1 Citratsynthase-Austrocknungs-Assay

Citratsynthase (CS) aus Schweineherz (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) wurde zunächst über Nacht gegen zweimal 500 ml Wasser dialysiert. Für die Austrocknung wurden 20 µl einer 120 µg/ml CS-Lösung ohne oder mit 240 µg/ml BSA, 0,2 M Trehalose, 240 µg/ml 6His-CDet11-24, 240 µg/ml CDeT11-24 bzw. 240 µg/ml ΔK-CDeT11-24 eingesetzt. Die Austrocknung wurde für 1 h in einer Vakuumzentrifuge durchgeführt. Anschließend wurden die Proben durch Zugabe von Wasser bis zum Ausgangsvolumen gelöst und für 30 min rehydriert.

#### Bestimmung der Citratsynthase-Aktivität:

Die Bestimmung der CS-Aktivität wurde wie von Srere (1966) beschrieben durchgeführt. Hierzu wurde 1 µl der Probe aus dem Austrocknungs-Assay und 500 µl CS-Assay-Puffer in eine Küvette gegeben und die Absorptionsänderung bei 412 nm für 1 min im Intervall von 5 s bestimmt.



Die CS-Aktivität wurde vor dem ersten und jeweils nach jedem der drei Austrocknungszyklen bestimmt.

**CS-Assay-Puffer:**

50 mM Tris-HCl pH 8,0; 2 mM EDTA; 100  $\mu$ M Oxalacetat; 100  $\mu$ M 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure); 95  $\mu$ M Acetyl-CoA

**2.18.2 Lactatdehydrogenase Austrocknungs-Assay**

Lactatdehydrogenase (LDH) aus Kaninchen (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) wurde zunächst mit zweimal 500 ml ddH<sub>2</sub>O über Nacht dialysiert. Die Austrocknung wurde mit 20  $\mu$ l einer 100  $\mu$ g/ml LDH-Lösung durchgeführt. Neben der Negativkontrolle, die nur LDH enthielt, wurden Proben untersucht, denen entweder 200  $\mu$ g/ml BSA, 0,2 M Trehalose, 200  $\mu$ g/ml 6His-CDet11-24, 200  $\mu$ g/ml CDeT11-24 oder 200  $\mu$ g/ml  $\Delta$ K-CDeT11-24 zugesetzt worden war. Die Dehydrierung erfolgte für 1 h in der Vakuumzentrifuge. Danach wurde die Probe mit Wasser auf ihr Ausgangsvolumen aufgefüllt, gelöst und für 30 min rehydriert.

Bestimmung der Lactatdehydrogenase Aktivität:

Für die Bestimmung der LDH-Aktivität wurden 2  $\mu$ l der Enzymprobe mit 500  $\mu$ l LDH-Assay-Puffer in einer Küvette gemischt und die Absorptionsänderung bei 340 nm für 1 min im Intervall von 5 s bestimmt.

Die Messung wurde jeweils vor und nach den drei Austrocknungszyklen durchgeführt.

**LDH-Assay-Puffer:**

100 mM Natriumphosphat-Puffer pH 6,0; 200 mM NAD; 1 mM Pyruvat

**2.19 Protein-Lipid-Interaktion**

Die für die Protein-Lipid-Interaktion verwendeten Lipide wurden bei der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bestellt.

### 2.19.1 Protein-Lipid-Interaktion in Lösung (Liposomen-Assay)

Für die Herstellung der Liposomen wurde Phosphatidsäure in einer Konzentration von 2 µg/µl in Chloroform gelöst. Die Lösung wurde unter dem Abzug eingedampft und der resultierende getrocknete Lipidfilm mit Liposomen-Assay-Puffer (0,5 µl/µg) durch kurzes Schütteln mit dem Vortex hydratisiert. Nach 1 h Inkubation im Schüttler (250 rpm, 37 °C) wurden die Liposomen für weitere 5 min mit dem Vortex gemischt und durch Zentrifugation pelletiert (20.000 g, 10 min, 24 °C). Die Liposomen wurden dann für die Interaktionsstudie vorsichtig mit Liposomen-Assay-Puffer, der 0,1 µg/µl des zu untersuchenden Proteins enthielt, gemischt und für die Ausbildung einer möglichen Interaktion für 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde das Protein-Liposomen-Gemisch abzentrifugiert (20.000 g, 10 min, 24 °C). Für den Nachweis einer Interaktion wurden der Überstand und das Liposomen-Pellet mittels SDS-PAGE (Abschnitt 2.15.1) aufgetrennt.

Die Untersuchung einer pH-abhängigen Protein-Lipid-Bindung erfolgte durch Verwendung von Liposomen-Assay-Puffer mit pH-Werten von 5, 6, 7, 8, und 9.

Die Spezifität für die Bindung an Phosphatidsäure wurde durch Liposomen mit einem unterschiedlichen Verhältnis von Phosphatidsäure zu Phosphatidylcholin und Liposomen-Assay Puffer mit einem pH-Wert von 7 untersucht. Dabei erfolgte die Herstellung der Liposomen wie oben beschrieben.

#### **Liposomen-Assay-Puffer**

20mM MES; 30 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 1 mM DTT

### 2.19.2 Protein-Lipid-Interaktion auf Nitrocellulose-Membran (Lipid-Protein-Overlay-Assay)

Der Protein-Lipid-Overlay (PLO)-Assay ist eine weitere Methode zur Untersuchung von Protein-Lipid-Interaktionen. Hierzu wird eine Nitrocellulose-Membran, auf die unterschiedliche Phospholipide aufgetragen wurden, zusammen mit dem zu untersuchenden Protein inkubiert. Der Nachweis der Interaktion erfolgt dann durch immunologische Detektion des Proteins mit einem spezifischen Antikörper.

Die verwendete Nitrocellulose-Membran mit den unterschiedlichen Phospholipiden wurde freundlicherweise von Barbara Kalisch (IMBIO, Universität Bonn, D) zur Verfügung gestellt.

Für die Herstellung wurden jeweils 5 µg Monogalactosyldiacylglycerid,

Digalactosyldiacylglycerid, Phosphatidylglycerin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylinositol, Phosphatidylcholin, Phosphatidsäure und Cardiolipin in Chloroform auf einer Nitrocellulose-Membran immobilisiert.

Für die Durchführung des Assays wurde die Membran zunächst mit 5 % w/v BSA in TBS-T (für die verwendeten Lösungen/Antikörper siehe Abschnitt 2.15.8) für 1 h blockiert. Danach wurde die Membran mit dem zu untersuchenden Protein (1 µg/ml) in 5 % BSA in TBS-T über Nacht bei 4 °C auf einem Taumelschüttler inkubiert. Nach viermaligem Waschen für 5 min mit TBS-T wurde die Membran für 1 h mit dem primären Antikörper inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut wie oben beschrieben mit TBS-T gewaschen und für weitere 45 min mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Nach erneutem viermaligem Waschen mit TBS-T wurde das gebundene Protein mit Hilfe von ECL-Reagenz detektiert.

## 2.20 Kinase Aufreinigung

### 2.20.1 Aufreinigung von nativem Gesamtprotein

Für die Aufreinigung von nativem Protein aus *C. plantagineum* Blättern mit einem RWC von 2 %, wurden 1 Volumen in flüssigem Stickstoff gemörserteres Pflanzenmaterial mit 10 Volumen Puffer versetzt und mit dem Vortex gelöst. Danach wurde die Probe für 1 h auf Eis auf dem Taumelschüttler inkubiert. Um eine vollständige Homogenisierung zu gewährleisten, wurde die Probe jeweils nach 20 min für 30 s mit dem Ultra-Turrax dispergiert. Das Extrakt wurde anschließend abzentrifugiert (14.000 g, 20 min, 4 °C), mit Miracloth filtriert und dann erneut abzentrifugiert (14.000 g, 20 min, 4 °C).

#### **Extraktions Puffer:**

50 mM HEPES pH 7,4; 50 mM NaCl; 5 mM EDTA; 5 mM EGTA; 10 mM DTT;  
50 mM β-Glycerophosphat; 10 % (v/v) Glycerin; 7,5 % (w/v) PVPP;  
1/200 Protease Inhibitor; 1/200 Phosphatase Inhibitor

### 2.20.2 Fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat

Das native Proteingesamtextrakt (Abschnitt 2.20.1), wurde zur Fraktionierung mit Ammoniumsulfat gefällt. Dazu wurde entsprechend der Tabelle von Dawson *et al.* (1986) die benötigte Menge fein gemörserteres Ammoniumsulfat, das zum Erreichen einer bestimmten

Konzentration bei vorgegeben Volumen erforderlich war, abgewogen. Die Fällung wurde im Kühlraum auf Eis durchgeführt. Dabei wurde der Proteinlösung das Ammoniumsulfat in kleinen Portionen zugegeben. Nachdem sich das Ammoniumsulfat komplett gelöst hatte, wurde um eine vollständige Präzipitation zu gewährleisten, der Ansatz für 1 h auf Eis unter ständigem Rühren inkubiert. Anschließend wurde das präzipitierte Protein durch Zentrifugation (10.000 g, 15 min, 4 °C) pelletiert. Das Pellet wurde zur weiteren Aufreinigung verwendet und der Überstand bei Bedarf wie oben beschrieben mit Ammoniumsulfat gefällt.

### 2.20.3 Ionenaustauschchromatographie mit einer HiTrap SP FF Säule

Für die Auftrennung wurden die präzipitierten Proteine der Ammoniumsulfat-Fällung (Abschnitt 2.20.2) in IEX-Puffer mit 150 mM NaCl gelöst und zum Entfernen von Ammoniumsulfat mit einer PD-10 Säule entsalzt.

Um nicht lösliche Bestandteile zu entfernen, wurde das Proteinextrakt abzentrifugiert (10.000 g, 10 min, 4 °C). Für die Chromatographie wurde die Säule an eine Schlauchpumpe angeschlossen. Die Auftrennung erfolgte mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min. Die HiTrap SP FF Säule (GE-Healthcare, Freiburg, D) wurde zu Beginn mit jeweils zehn Säulenvolumen 1 M NaCl IEX-Puffer und 150 mM NaCl IEX-Puffer äquilibriert und dann mit dem Proteinextrakt beladen. Danach wurde die Säule zum Entfernen unspezifisch gebundener Protein mit fünf Säulenvolumen 150 mM NaCl IEX-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit fünf Säulenvolumen 650 mM NaCl IEX-Puffer. Danach wurde die Säule mit fünf Volumen 20 % (v/v) Ethanol/200 mM Natriumacetat gespült und anschließend bei 4 °C gelagert.

#### **IEX Puffer:**

25 mM MES pH 6,25; 10 % (v/v) Glycerin; 2 mM DTT; 1/200 Protease Inhibitor; 1/200 Phosphatase Inhibitor

### 2.20.4 Hydrophobe Interaktionschromatographie

Nach der IEX mit der HiTrap SP FF Säule (Abschnitt 2.20.3) wurde das Eluat zunächst mit Hilfe eines Amicon-Konzentrators auf ein Volumen von 5 ml eingengt und gegen HIC-Puffer umgepuffert. Der Proteinlösung wurde dann Ammoniumsulfat zugegeben, sodass die

Endkonzentration 1,2 M betrug. Danach wurde die Probe zum Entfernen unlöslicher Bestandteile abzentrifugiert (10.000 g, 10 min, 4 °C). Zwischenzeitlich wurde die HiTrap Phenyl HP Säule (GE-Healthcare, Freiburg, D) an die Schlauchpumpe angeschlossen und die Äquilibration der Säule mit 10 ml HIC-Puffer ohne Ammoniumsulfat, gefolgt von 10 ml HIC-Puffer mit 1,2 M Ammoniumsulfat bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min durchgeführt. Danach wurde das Proteinextrakt zur Bindung auf die Säule aufgetragen. Nach dem Beladen der Säule mit dem Proteinextrakt wurde sie mit HIC-Puffer der 1,2 M Ammoniumsulfat enthielt gewaschen. Daraufhin erfolgte die schrittweise Elution der gebunden Proteine mit je 5 ml HIC-Puffer der 900, 600, 300 und 0 mM Ammoniumsulfat enthielt. Nach dem Lauf wurde die Säule mit 5 ml 20 % (v/v) Ethanol gespült und dann bei 4 °C gelagert.

#### **HIC-Puffer:**

50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,5; 2 mM DTT, 10 % (v/v) Glycerin, 1/200 Protease Inhibitor, 1/200 Phosphatase Inhibitor

#### **2.20.5 Ionenaustauschchromatographie mit der FPLC**

Vor der Ionenaustauschchromatographie mit der Mono S-Säule (GE-Healthcare, Freiburg, D) wurden die Fraktionen der hydrophoben Interaktionschromatographie (Abschnitt 2.20.4) durch Zentrifugation mit einem Amicon-Konzentrator auf ein Volumen von 1 ml eingengt. Zum Umpuffern der Probe wurde das Konzentrat mit 10 ml IEX-Puffer verdünnt und erneut mit dem Amicon-Konzentrator auf 1 ml eingengt. Die Äquilibration der Mono S-Säule erfolgte mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,2 ml/min mit 30 ml H<sub>2</sub>O, gefolgt von 10 ml IEX-Puffer mit 1 M NaCl und 10 ml IEX Puffer mit 100 mM NaCl. Danach wurde 1 ml der Proteinprobe in die Probenschleife injiziert und die Trennung durchgeführt. Zur Auftrennung wurde ein linearer NaCl-Gradient gefahren, der automatisiert mit der FPLC durchgeführt wurde. Dabei wurden mit dem Fraktionssammler Proben von 1 ml/min aufgefangen. Der Lauf erfolgte nach dem folgenden Protokoll und IEX-Puffer (Abschnitt 2.20.3) versetzt mit NaCl:

Injektion:	3 ml	(100 mM NaCl)
Waschen:	5 ml	(100 mM NaCl)
Gradient:	30 ml	(100 mM – 600 mM NaCl)
Waschen:	10 ml	(1 M NaCl)

Nach dem Gebrauch wurde die Säule mit 50 ml ddH<sub>2</sub>O gespült und danach unter 20 % Ethanol gelagert.

### 2.20.6 Anreicherung von Kinasen (Patricelli *et al.*, 2007)

Die weitere Anreicherung von Kinasen nach dem Mono S-Säulenlauf erfolgte mit dem Kinase Enrichment Kit (Pierce, Bonn, D). Durch Desthiobiotin-ATP und Desthiobiotin-ADP wurden hierbei Kinasen, aber auch andere nukleotid-bindende Proteine, an einem Lysin Rest der Nucleotide-Bindestelle biotinyliert. Die markierten Proteine konnten nach Denaturierung über Streptavidin Agarose angereichert werden.

Vor der Biotinylierungsreaktion wurde die Probe mit einer Zeba Spin Desalting Column (Pierce, Bonn, D) entsalzt und umgepuffert. Hiernach erfolgte die Inkubation mit den Active Probes. Nach der Inkubation wurde der Probe zur Denaturierung 500 µl 8 M Urea/IP Lysis-Puffer und 50 µl Streptavidin Agarose zugegeben. Die Probe wurde für 1 h auf einem Rotator inkubiert und anschließend abzentrifugiert (1.000 g, RT, 1 min). Der Überstand wurde verworfen und in 500 µl 4 M Urea/IP Lysis Puffer gewaschen und wieder abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt.

Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet trockengelegt, in SDS-Probenpuffer gelöst, für 5 min bei 95 °C inkubiert und mittels SDS-PAGE (Abschnitt 2.15.1) aufgetrennt. Nach der Coomassie-Färbung (Abschnitt 2.15.3) wurden die sichtbaren Banden ausgestochen und mittels Massenspektrometrie (MS) identifiziert (Abschnitt 2.22).

## 2.21 Kinase Assays

### 2.21.1 In-Gel-Kinase-Assay (Wooten, 2002)

Für die Durchführung des In-Gel-Kinase-Assays (IGKA) wurde zunächst ein Polyacrylamid-Gel vorbereitet, bei dem abweichend zu dem Standard-Protokoll (Abschnitt 2.15.1), dem Trenngel zur Co-Polymerisation 0,5 mg/ml des Substrat-Proteins (6His-CDeT11-24, Abschnitt 2.14.1) zu gegeben wurde. Nach dem Auspolymerisieren des Trenn- und Sammelgels wurde das Gel mit den in SDS-Probenpuffer gelösten, zu untersuchenden Proben beladen und die elektrophoretische Auftrennung durchgeführt.

Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel unter leichtem Schütteln bei RT wie folgt behandelt:

4 x	15 min	100 ml IGKA-Waschlösung 1
3 x	20 min	100 ml IGKA-Waschlösung 2
1 x	30 min	50 ml Denaturierungspuffer
1 x	60 min	50 ml Denaturierungspuffer
4 x	10 min	100 ml Renaturierungspuffer
1 x	120 min	100 ml Renaturierungspuffer

Durch die ersten beiden Waschschrirte wurde hierbei das SDS entfernt. Die Denaturierung und die Renaturierung dienten der Rückfaltung der im Gel aufgetrennten Proteine. Nach dem letzten Waschrirrit wurde der Renaturierungspuffer erneut ausgetauscht und die Renaturierung über Nacht (16 h, 4 °C) fortgesetzt.

Am folgenden Tag wurde das Gel zweimal für 15 min mit 50 ml Kinase-Puffer bei RT auf einem Taumelschüttler äquiliibriert. Zur Durchführung der Kinasereaktion wurde das Gel mit 20 ml Kinase-Assay-Puffer, der ATP und  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  enthielt, bedeckt und bei 30 °C für 2 h inkubiert. Danach wurde der Kinase-Assay-Puffer durch 100 ml IGKA-Stopp-Lösung ersetzt. Um unspezifisch gebundenes  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  zu entfernen wurde das Gel für 4 h mit IGKA-Stopp-Lösung gewaschen, wobei alle 20 min der Puffer ausgetauscht wurde. Das Gel wurde getrocknet (Abschnitt 2.15.5) und zur Detektion des inkorporierten  $^{32}\text{P}$  mit einem Phospho-Screen bedeckt, der nach 24 h mit dem Typhoon 9200 Scanner ausgelesen wurde.

**IGKA-Waschlösung 1:**

20 % (v/v) Isopropanol; 50 mM Tris-HCl pH 8,0

**IGKA-Waschlösung 2:**

50 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM DTT

**Denaturierungspuffer:**

50 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM DTT; 6 M Guanidinhydrochlorid

**Renaturierungspuffer:**

50 mM Tris-HCl pH 8,0; 5 mM DTT; 0,04 % (v/v) Tween-20; 100 mM NaCl

**Kinase-Assay-Puffer:**

25 mM HEPES pH 7,4; 20 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT; (50 μM ATP, [ $\gamma$ <sup>32</sup>P] ATP)

**IGKA-Stopp-Lösung:**

5 % (w/v) TCA; 1 % (w/v) tetra-Natriumdiphosphat

**2.21.2 *In vitro* Kinase Assay**

Zur Bestimmung der Kinaseaktivität in Lösung wurden *in vitro* Kinase Assays durchgeführt. Hierzu wurden zunächst 12,5 μl der zu untersuchenden Proteinlösung zu 12,5 μl (2x) Kinasepuffer mit 1 mg/ml 6His-CDeT11-24 (Abschnitt 2.14.1) und ohne 6His-CDeT11-24 pipettiert. Die Probe ohne 6His-CDeT11-24 diente hierbei als Negativ-Kontrolle zur Bestimmung der Autophosphorylierungs-Aktivität. Durch die Zugabe von 1 μl ATP-Lösung wurde die Reaktion gestartet. Die Inkubation erfolgte im Wasserbad für 20 min bei 30 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 μl 150 mM Phosphorsäure gestoppt, dann jeweils 25 μl der Probe auf einen P81 Phosphocellulose Filter aufgetragen und in ein Becherglas mit 400 ml 75 mM Phosphorsäure überführt. Das Becherglas wurde auf einen Magnetprüher gestellt und der Inhalt langsam gerührt. Der Austausch der Phosphorsäure erfolgte viermal jeweils nach 5 min. Nach dem Waschen wurden die Filter auf Whatman-Papier getrocknet. Für die Bestimmung der Kinaseaktivität wurden die Filter in Szintillationsröhrchen überführt und in das Szintillationsmessgerät gestellt. Die Detektion des inkorporierten <sup>32</sup>P erfolgte durch die Messung der Cherenkov-Strahlung.

Alternativ zu dem Filterbindungs-Assay wurde das Protein in der Probe mit TCA (Abschnitt 2.13.2) gefällt und mittels SDS-PAGE (Abschnitt 2.15.1) aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Coomassie gefärbt (Abschnitt 2.15.3) und getrocknet (Abschnitt 2.15.5). Auf das getrocknete Gel wurde ein Phospho-Screen gelegt, der zur Detektion nach 24 h mit dem Typhoon 9200 Scanner ausgelesen wurde.

**Kinasepuffer:**

25 mM HEPES pH 7,6; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT; 1 mM EGTA; 5 mM β-Glycerophosphat



## 2.22 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse wurde von der Massenspektrometrie (MS)-Gruppe des Max-Planck-Instituts für Pflanzenzüchtungsforschung in Köln durchgeführt. Dazu wurde nach einer SDS-PAGE (Abschnitt 2.15.1) und anschließender Coomassie-Färbung (Abschnitt 2.15.3) aus der zu untersuchenden Proteinbande ein Gelpartikel ausgestochen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Von der MS-Gruppe wurde dann der tryptische Verdau der Proteine im SDS-Gel nach Shevchenko *et al.* (1996) durchgeführt. Nach der weiteren Aufreinigung des Verdau durch eine ZipTip Pipettenspitze (Millipore, Billerica, USA), wurden die angereicherten Peptide dann für die MS-Analyse verwendet. Die Aufnahme der Spektren erfolgte wahlweise durch MALDI-TOF-MS mit einem UltraflexIII MALDI TOF/TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen, D) oder mit dem LTQ Velos Massenspektrometer (Thermo, Waltham, USA). Für die anschließende Auswertung der Spektren wurde die Software Mascot Search (Matrix Science, Boston, USA) genutzt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Aufreinigung und Lipidbindung des CDeT11-24 Proteins

Für LEA-Proteine der Gruppe 2 konnte eine Bindung an anionische Phospholipide nachgewiesen werden (Koag *et al.*, 2003), die durch das K-Segment, einem charakteristischen Bestandteil dieser Proteinklasse, vermittelt wird (Koag *et al.*, 2009). Die Konsensussequenz des K-Segmentes (EKKGIMDKIKEKLPG) zeigt hierbei eine große Ähnlichkeit zu dem N-terminal gelegenen Lysin-reichen Sequenzelement (EKKSMLAKVKEKAK) des CDeT11-24 Proteins. Aus diesem Grund wurde das Lysin-reiche Sequenzelement zunächst *in silico* untersucht und eine mögliche Lipidbindung von CDeT11-24 getestet.

#### 3.1.1 *In silico* Analyse des Lysin-reichen Sequenzelements von CDeT11-24

Sequenzanalysen des CDeT11-24 Proteins aus *C. plantagineum* und homologen Proteinen aus anderen Pflanzen ergaben, dass das Lysin-reiche Sequenzelement teilweise konserviert ist und in allen untersuchten Proteinen im N-terminalen Bereich auftritt (Abbildung 3.1 A). Hierbei besteht die Homologie der Sequenzen besonders in der Konservierung der positiv geladenen Aminosäuren Lysin bzw. Arginin und der hydrophoben Aminosäuren Methionin, Leucin, Isoleucin, Valin und Phenylalanin. Wie bei CDeT11-24 kommt das Lysin-reiche Sequenzelement bei allen untersuchten Proteinen nur einmal vor, wohingegen bei den Dehydrinen das K-Segment meistens wiederholt (1-11 Mal) auftritt (Soulages *et al.*, 2003).

Um die Abfolge der Aminosäuren räumlich als Helix zu projizieren, wurde eine *helical wheel* (Helixrad)-Projektion mit dem Kernbereich des Lysin-reichen Sequenzelements von CDeT11-24 durchgeführt. Dabei zeigt sich in der Modellierung eine Anordnung der hydrophoben Aminosäuren (M, L, V, I, F) an einer Seite, sowie der positiv geladenen Lysin-Reste an zwei Seiten der Helix (Abbildung 3.1 B). Diese Trennung von hydrophoben und positiv geladenen Aminosäureresten wird als amphipathische Helix bezeichnet und ist ein weitverbreitetes Motiv für die Bindung an Lipidmembranen sowie von Protein-Protein-Interaktionen (Epanand *et al.*, 1995). Das Screening einer Datenbank (*Homo sapiens*; *HeliQuest*; Gautier *et al.*, 2008) nach Helices, die ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften wie das Lysin-reiche Sequenzelement bezüglich der Hydrophobizität (-0,134 bis 0,134), des hydrophoben Moments (0,362 bis 0,562) und der Nettoladung

(+5 bis +7) besitzen, ergab 121 Treffer, von denen 98 % als lipidbindende oder mögliche lipidbindende Helices eingestuft werden.

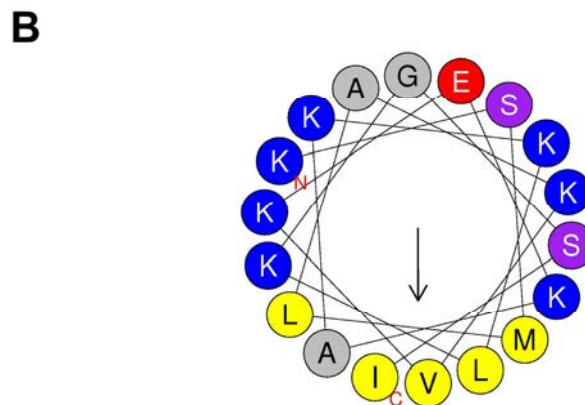
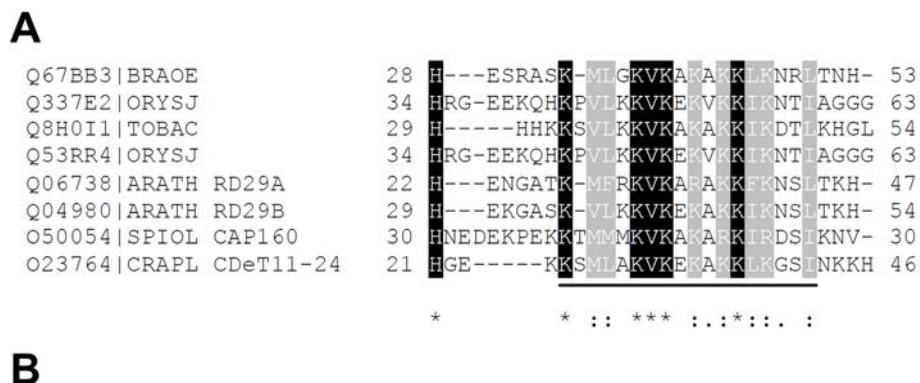


Abbildung 3.1: *In silico* Analyse des Lysin-reichen Sequenzelements von CDeT11-24. (A) Alignment des Lysin-reichen Sequenzelements von CDeT11-24 und homologen Proteinen. UniProt Nummern sind angegeben. Abkürzungen: ARATH, *A. thaliana*; BRAOE, *Brassica oleracea*; CRAPL, *C. plantagineum*; SPIOL, *Spinacia oleracea*; TOBAC, *Nicotiana tabacum*; ORYSJ, *Oryza sativa* Japonica. Legende: \* (Stern) / schwarz, konservierte AS; : (Doppelpunkt) / grau, AS mit ähnlichen Eigenschaften; . (Punkt) weiß, AS mit schwach ähnlichen Eigenschaften. (B) *Helical wheel* Projektion des Lysin-reichen Sequenzelements von CDeT11-24 (unterstrichen in [A]). Farbkodierung: gelb, hydrophobe AS; lila, Serin und Threonin; blau, basische AS; rot, saure AS; grau, Alanin und Glycin. Der Pfeil zeigt die hydrophobe Region an. Die roten Buchstaben geben den N- und C-Terminus an.

Für das Lysin-reiche Sequenzelement wurde eine positive Nettoladung von +6 berechnet, die auf das gehäufte Auftreten der Aminosäure Lysin zurückzuführen ist. Eine Betrachtung der physikalisch-chemischen Eigenschaften der CDeT11-24 Gesamtsequenzen mit dem Programm ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005) ergab eine Gesamtnettoladung von -21,3 und einen isoelektrischen Punkt von pI 4,88. Dementsprechend ist das CDeT11-24 Protein bei einem physiologischen pH-Wert von 7 stark negativ geladen. Die negative Ladung des Proteins beruht dabei vor allem auf dem überdurchschnittlichen Auftreten der negativ geladenen Aminosäuren Glutamat und Aspartat. Bezogen auf die negative Gesamtladung des Proteins stellt das Lysin-reiche Sequenzelement also einen kurzen Abschnitt mit einer hohen positiven Ladung dar, der im Kontrast zu der Gesamtladung des Proteins steht.

### 3.1.2 Lipidbindung des rekombinanten Proteins 6His-CDeT11-24

#### 3.1.2.1 Klonierung und Aufreinigung des 6His-CDeT11-24 Proteins

Für die Untersuchung einer möglichen Lipidbindung von CDeT11-24 wurde zunächst die CDeT11-24 cDNA-Sequenz in den Expressionsvektor pET28a kloniert, um das Protein rekombinant herstellen zu können. Hierzu wurde mit der von Facchinelli (2009) isolierten *cdet11-24* cDNA-Sequenz und den Primern „CDeT11-24 for *NdeI*“ und „CDeT11-24 rev *XhoI*“ eine Mutagenese PCR durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde mit *NdeI* und *XhoI* verdaut und anschließend mittels der erzeugten kompatiblen Enden in den zuvor geschnittenen Expressionsvektor pET28a ligiert (Abbildung 3.2 A). Nach der Induktion des Expressionsstamms BL21 mit IPTG wurden die Bakterien lysiert und hitzebehandelt. Bei der Expression des resultierenden Vektors pET28::6His-CDeT11-24 entsteht ein Fusionsprotein mit 448-Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 46,13 kDa, das an seinem N-Terminus ein 6His-Tag trägt.

In Abbildung 3.2 B ist zu sehen, dass sich nach einstündiger Induktion eine zusätzliche Protein Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa gebildet hat, deren Stärke nach einer weiteren Stunde (2h) zunimmt. Das Protein befindet sich in der SDS-PAGE nicht bei dem erwarteten Molekulargewicht von 46,13 kDa, sondern etwas darüber. Diese Eigenschaft beruht vermutlich auf der Aminosäurezusammensetzung, die eine Beladung des Proteins mit SDS behindert, sowie der Struktur des Proteins und wurde schon zuvor beobachtet (Velasco *et al.*, 1998; Röhrig *et al.*, 2006; Facchinelli, 2009). Durch die anschließende Hitzebehandlung konnte ein Großteil der bakteriellen Proteine entfernt werden, was in der Anreicherung des hitzestabilen CDeT11-24 Proteins und einer starken Verminderung anderer Proteine im Überstand (HE) resultiert (Abbildung 3.2 B). Die weitere Aufreinigung erfolgte durch Metallaffinitätschromatographie mit einer Ni-NTA Säule, von der das gebundene 6His-CDeT11-24 nach mehreren Waschschrritten eluiert wurde.

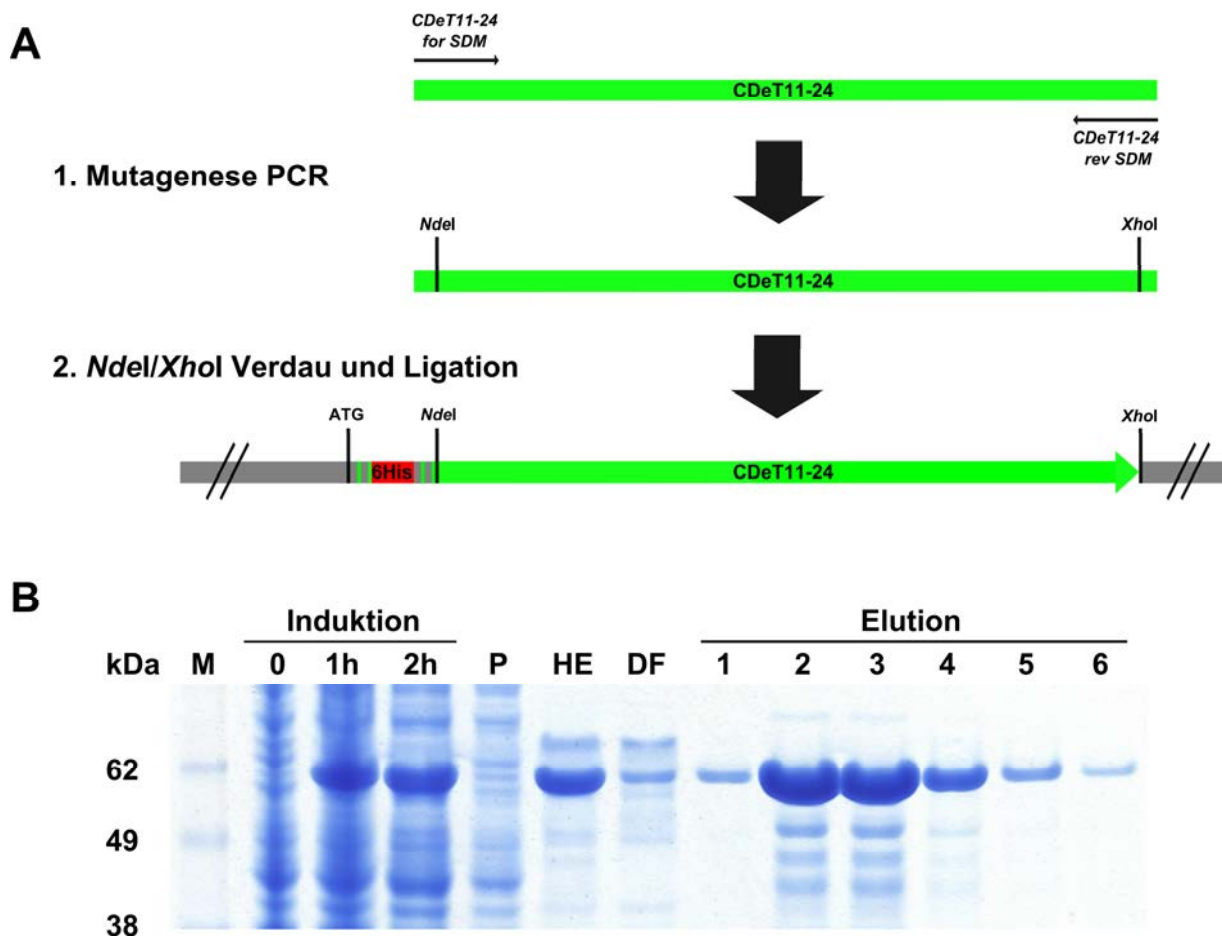


Abbildung 3.2: Klonierungsstrategie und Aufreinigung des 6His-CDeT11-24 Proteins. (A) Schematische Klonierungsstrategie von pET28::6His-CDeT11-24. Die Primer sind durch Pfeile angezeigt. Grün, *cdet11-24* cDNA-Sequenz; rot, 6His-Tag; grau, pET28(a)-Sequenz; grau/grün, kodierende Sequenz, die Bestandteil des Vektors ist. (B) SDS-PAGE (12 %) der bakteriellen Extrakte. Vor (0) und nach Induktion mit IPTG (1h, 2h); P, Pellet des Hitzeextrakts; HE = Überstand des Hitzeextrakts; DF = Durchfluss; 1-6 = Elutionsfraktionen der Metallaffinitätschromatographie.

### 3.1.2.2 Protein-Lipid-Overlay-Assay und Liposomen-Assay mit rekombinantem 6His-CDeT11-24 Protein

Die Lipidbindungseigenschaften von CDeT11-24 wurden zuerst mit Hilfe eines Protein-Lipid-Overlay- (PLO)-Assays untersucht. Hierzu wurde 6His-CDeT11-24 mit einer Nitrocellulose-Membran inkubiert, auf der zuvor die Lipide Monogalactosyldiacylglycerin, Digalactosyldiacylglycerin, Phosphatidylglycerin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylinositol, Phosphatidylcholin, Phosphatidsäure und Cardiolipin immobilisiert worden waren. Anschließend erfolgte die immunologische Detektion einer Lipidbindung des 6His-CDeT11-24 Proteins mit Hilfe spezifischer Antikörper.

Es konnte eine starke Bindung von 6His-CDeT11-24 an Phosphatidsäure beobachtet werden (Abbildung 3.3 A). Zu den Lipiden Phosphatidylglycerin, Phosphatidylethanolamin,

Phosphatidylinositol, Phosphatidylcholin und Cardiolipin zeigt 6His-CDeT11-24 ebenfalls eine leichte Affinität, die jedoch deutlich schwächer ausgeprägt ist als die Bindung an Phosphatidsäure. Mit den Glykolipiden Monogalactosyldiacylglycerin und Digalactosyldiacylglycerin hingegen wurde kein Signal für eine Bindung detektiert.

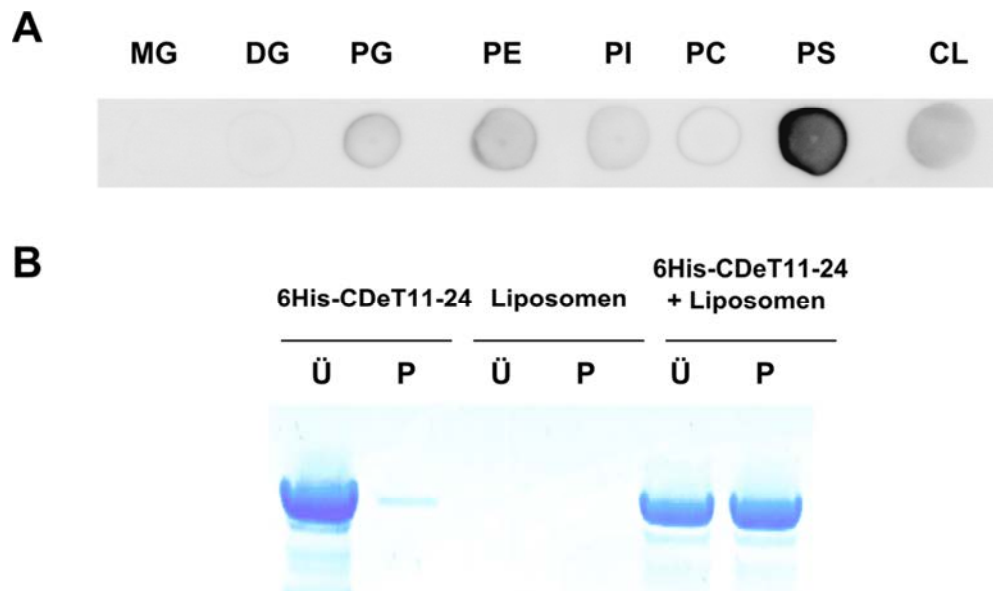


Abbildung 3.3: Lipidbindung von 6His-CDeT11-24. (A) PLO-Assay mit 6His-CDeT11-24. Auf die Membran wurden die Lipide Monogalactosyldiacylglycerin (MG), Digalactosyldiacylglycerin (DG), Phosphatidylglycerin (PG), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidsäure (PS) und Cardiolipin (CL) aufgetragen. (B) SDS-PAGE (12 %) nach Liposomen-Assay mit 6His-CDeT11-24. Der Liposomen-Assay wurde mit 100 % Phosphatidsäure durchgeführt. 6His-CDeT11-24 bzw. Liposomen allein. 6His-CDeT11-24 zusammen mit Liposomen. Ü = Überstand; P = Pellet.

Zur Bestätigung der Lipidbindung von 6His-CDeT11-24 wurden Liposomen-Assays mit 6His-CDeT11-24 durchgeführt. Dabei wurde Phosphatidsäure für die Herstellung der Liposomen verwendet, da es von den getesteten Phospholipiden das stärkste Signal im PLO-Assay gezeigt hatte. Der Assay wurde nach einer Inkubation von 30 min durch Zentrifugation abgestoppt. Findet keine Bindung statt, befindet sich das Protein nur im Überstand. Bindet das Protein jedoch an die Liposomen, wird es mit ihnen zusammen präzipitiert und ist nach der Auftrennung durch SDS-PAGE als Proteinbande in der Pelletfraktion zu sehen. Als Kontrolle wurde eine Probe verwendet, die jeweils nur das Protein oder die Liposomen enthielt. Das resultierende Pellet, das die Liposomen enthielt und der Überstand wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 3.3 B). 6His-CDeT11-24 ist ein lösliches Protein, daher ist bei der Kontrollprobe mit 6His-CDeT11-24 in der Pellet Fraktion nur eine sehr leichte, vermutlich auf Verunreinigungen zurückzuführende, Proteinbande sichtbar. Die Kontrollprobe mit den Liposomen allein zeigt wie erwartet keine Proteinbande. Bei einer

Inkubation von 6His-CDeT11-24 Protein zusammen mit den Liposomen ist sowohl eine Proteinbande im Überstand als auch im Pellet in der SDS-PAGE zu beobachten. Das Protein wurde zusammen mit den Liposomen präzipitiert, wodurch eine Bindung von 6His-CDeT11-24 an Phosphatidsäure bestätigt wird.

Zur Identifizierung der Sequenzbereiche, die an der Lipidbindung beteiligt sind, wurde 6His-CDeT11-24 mit der Protease Arg-C verdaut. Arg-C schneidet innerhalb eines Proteins C-terminal von Arginin, wodurch bei einem vollständigen Verdau von 6His-CDeT11-24 fünf Peptide entstehen würden (Abbildung 3.4). Das Peptid 3 mit der Masse 8,7 kDa enthält das Lysin-reiche Sequenzelement, das aufgrund seiner Homologie zum K-Segment der Dehydrine und der *in silico* Analyse (Abschnitt 3.1.1) am wahrscheinlichsten für eine Protein Lipidinteraktion in Frage kommt.

**Peptid 1 (1-17; 1,9 kDa)**

MGSSHHHHHHSSGLVPR

**Peptid 2 (18-27; 1,2 kDa)**

GSHMESQLHR

**Peptid 3 (28-108; 8,7 kDa)**

PTEQEMMEGQTADHGEEKSMLAKVKEKAKKLGKSINKKHGSSQDDADYD  
EEINTSPA<sup>U</sup>VGAPGMNPPPTQGG<sup>U</sup>EYGG<sup>U</sup>LSE<sup>U</sup>R

**Peptid 4 (109-169; 6,3 kDa)**

DVNI<sup>U</sup>PHPLASTEANL<sup>U</sup>DKPADVQVPPVPEATPEVSDKGLTEDLGSTAGQG  
AKESDV<sup>U</sup>DPLTR

**Peptid 5 (170-448; 28,1 kDa)**

GLKGVNYGGDDSNPLAGQEHQAISDEPKSFPGQENDLPQSHPSSEDEPKK  
FDAANDQPQSMPQDTITGKISSVPAVIVDKAAAAKNVVASKLGYGGNQAQ  
QPADAGATQQKKPLTETAAYKNMVAEKLTPVYEK<sup>U</sup>VAGAGSTVTSK<sup>U</sup>VWGS  
GGTTAGEQAQGGEGTVDGGAAAPNKG<sup>U</sup>VFTKDY<sup>U</sup>LSEK<sup>U</sup>LKPGDEDKALSQAI  
MEKLQLSKKPAAGEGGAVDETKANESSPGVVGSIKGVVGS<sup>U</sup>LIGGGNKINA  
TESAAAAANEQTQALGSGETA<sup>U</sup>AAEA<sup>U</sup>AKVEQ

Abbildung 3.4: Vorhergesagte Peptide durch einen Kompletterverdau von CDeT11-24 mit Arg-C. Angaben der Aminosäurereste beziehen sich auf die Sequenz von 6His-CDeT11-24 mit dem resultierenden Molekulargewicht. Die Arginin-Schnittstellen sind grau hervorgehoben. Das Lysin-reiche Sequenzelement ist unterstrichen.

Wird der CDeT11-24 Arg-C Verdau für den Liposomen-Assay eingesetzt, befinden sich nach Auftrennung in der SDS-PAGE nahezu alle Peptide in der Überstandfraktion (Abbildung 3.5; Ü). Im Liposomenpellet (P) hingegen befindet sich nur eine schwache Bande (Abbildung 3.5; Pfeil A), die der Größe des Peptids 3 von etwa 8,7 kDa entspricht. Des Weiteren ist oberhalb des 3,5 kDa Proteingrößenstandards eine starke Bande (Abbildung 3.5; Pfeil B). Diese Proteinbande ist in der Überstandfraktion nicht zu sehen, was darauf schließen lässt, dass eine

sehr starke Bindung an die Liposomen stattgefunden hat. Bezüglich des Molekulargewichts entspricht diese Bande ungefähr Peptid 1 und Peptid 2 (Gesamt MW 3,1 kDa) mit einer ausgelassenen Schnittstelle. Des Weiteren kann die Bande etwas unterhalb des Peptids A vom Molekulargewicht her Peptid 4 (6,3 kDa) und oberhalb der 30 kDa Markerbande Peptid 5 zugeordnet werden, wenn das untypische Laufverhalten von CDeT11-24 bei der Auftrennung durch SDS-PAGE berücksichtigt wird (Abschnitt 3.1.2.1).

Die Peptide der Pellet Fraktion wurden chromatographisch von Dr. Horst Röhrig aufgereinigt. Anschließend wurden sie massenspektrometrisch analysiert. Das Peptid A (Abbildung 3.5; Pfeil A) konnte nicht identifiziert werden. Peptid B (Abbildung 3.5; Pfeil B) wurde jedoch als Peptid bestehend aus Peptid 1 und Peptid 2 identifiziert. Das Peptid besteht aus 27 Aminosäuren, von denen 20 Aminosäuren durch die Sequenz des Plasmids pET28a kodiert und 7 Aminosäuren Bestandteil der CDeT11-24 Proteinsequenz sind. Das Ergebnis lässt daher darauf schließen, dass es sich um eine unspezifische Lipidbindung handelt, die möglicherweise auf das His-Tag zurückzuführen ist.

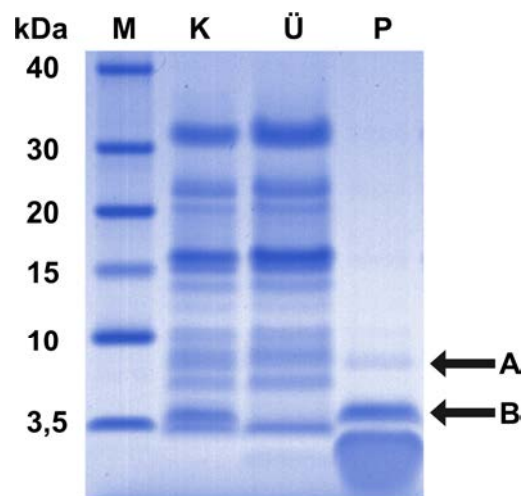


Abbildung 3.5: Liposomen-Assay des CDeT11-24 Arg-G Verdaus. NuPAGE Gradienten-Gel (4-12 %) mit Coomassie-Brillant-Blau-Färbung. K = Kontrolle des Verdaus von 6His-CDeT11-24 mit Arg-C. Ü = Überstand, P = Pellet, des Liposomen-Assays mit dem 6His-CDeT11-24 mit Arg-C Verdaus. Die Pfeile (A und B) weisen auf die Peptide hin, die am stärksten an die Liposomen gebunden haben.

### 3.1.3 Lipidbindung von nativem CDeT11-24 Protein

Da die Ergebnisse der Lipidbindung von 6His-CDeT11-24 möglicherweise auf eine unspezifische Bindung des 6His-Tags, zurückzuführen ist, wurde ein PLO-Assay mit einem Hitzeextrakt aus *C. plantagineum*, das CDeT11-24 enthält, in Zusammenarbeit mit Pierog



(2011) durchgeführt. Der Assay zeigt, dass das native CDeT11-24 Protein stark an Phosphatidsäure und schwach an Cardiolipin bindet. Für alle anderen Lipide konnte kein Signal detektiert werden. Eine Bindung von CDeT11-24 findet also auch statt, wenn der 6His-Tag nicht vorhanden ist (Abbildung 3.6).

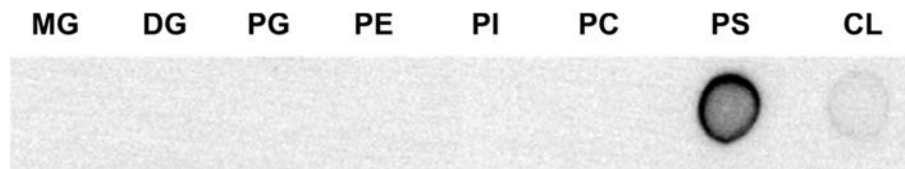


Abbildung 3.6: Lipidbindung von nativem CDeT11-24 aus *C. plantagineum*. Protein-Lipid-Overlay-Assay mit *C. plantagineum* Hitzeextrakt. Auf die Membran wurden die Lipide Monogalactosyldiacylglycerin (MG), Digalactosyldiacylglycerin (DG), Phosphatidylglycerin (PG), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidsäure (PS) und Cardiolipin (CL) aufgetragen.

### 3.1.4 Lipidbindung von rekombinantem CDeT11-24 ohne 6His-Tag

Die vorherigen Ergebnisse haben einen Einfluss des 6His-Tags auf die CDeT11-24 Bindung an Phosphatidsäure gezeigt (Abschnitt 3.1.2.2). Eine spezifische Bindung von nativem CDeT11-24 an Phosphatidsäure konnte aber dennoch bestätigt werden (Abschnitt 3.1.3). Für weitere Untersuchungen wurde daher rekombinantes CDeT11-24 hergestellt, welches keine His-Tag Sequenz trägt.

#### 3.1.4.1 Klonierung und Aufreinigung von CDeT11-24 ohne 6His-Tag

Die Herstellung des CDeT11-24 Konstrukts ohne 6His-Tag erfolgte durch *in vitro* Mutagenese des Plasmids pET28::6His-CDeT11-24. Der Vektor wurde dazu mit den Primern „CDeT11-24 for SDM“ und „CDeT11-24 rev SDM“ amplifiziert, wobei aus der existierenden *NcoI* Restriktionsschnittstelle eine *NdeI* Restriktionsschnittstelle erzeugt wurde. Durch einen anschließenden Verdau mit *NdeI* wurde das 59 bp große DNA Fragment, das codogener Bestandteil des Expressionsvektors ist und unter anderem für das 6His-Tag kodiert, herausgeschnitten. Mittels Ligation wurde dann das Plasmid pET28::CDeT11-24 erzeugt (Abbildung 3.7 A) und in den Expressionsstamm BL21 transformiert. Die Induktion der Bakterien mit IPTG führte zu der Expression des Proteins CDeT11-24, das aus 428 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von 43,97 kDa besitzt.

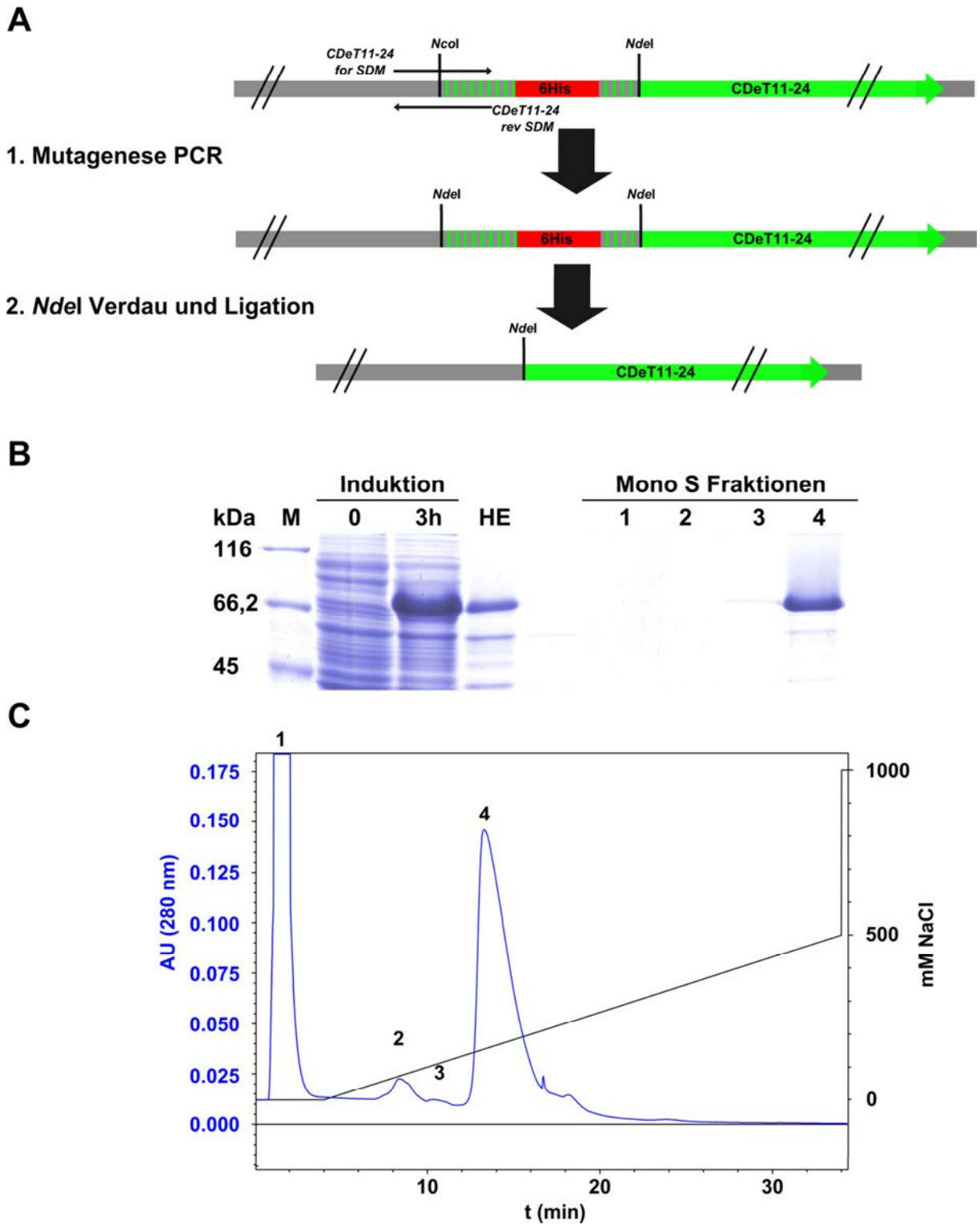


Abbildung 3.7: Klonierungsstrategie und Aufreinigung von CDeT11-24. (A) Schematische Klonierungsstrategie von pET28::CDeT11-24. Die Primer sind durch Pfeile angezeigt. Grün, *CDeT11-24* Sequenz; rot, 6His-Tag; grau, Sequenz pET28a; grau/grün, kodierende Sequenz die Bestandteil des Vektors ist. (B) SDS-PAGE (12 %) nach Induktion und Aufreinigung von CDeT11-24 durch Kationen-Austauschchromatographie. (C) Chromatogram des bakteriellen Hitzeextrakts, aufgetrennt über eine Mono S-Säule. Die Absorption bei 280 nm ist blau dargestellt. Der NaCl-Gradient ist in schwarz eingezeichnet. 0 = vor und 3h = nach Induktion mit IPTG; HE = Überstand des Hitzeextrakts; 1-4 = Fraktionen der Chromatographie.

Da ohne 6His-Tag eine Aufreinigung durch Metallaffinitätschromatographie nicht möglich ist, wurde das CDeT11-24 Protein alternativ durch Kationen-Austauschchromatographie aufgereinigt. Die Bakterien wurden dazu wie zuvor induziert, lysiert und hitzebehandelt (Abbildung 3.7 B). Nach Umpuffern des Überstands (IEX-Puffer, pH 5,5) erfolgte die Auftrennung des Extrakts mit einer MONO S-Säule (Abbildung 3.7 C). Die Peakfraktionen wurden dabei per Hand gesammelt. Bezüglich der Kationen-Austauschchromatographie zeigte sich, dass das CDeT11-24 Protein sehr früh bei 150 mM NaCl von der Säule eluierte. Diese Tatsache beruht auf der negativen Ladung des Proteins, wodurch nur eine schwache Bindung an die Säulenmatrix stattfindet.

#### **3.1.4.2 Protein-Lipid-Overlay-Assay und Liposomen-Assay mit rekombinantem CDeT11-24 Protein ohne 6His-Tag**

Um die Lipidbindung, die mit nativem CDeT11-24 Protein gezeigt wurde (Abschnitt 3.1.3) zu bestätigen, wurde mit dem rekombinanten CDeT11-24 Protein ohne 6His-Tag erneut ein PLO-Assay durchgeführt. Wie schon bei dem Assay mit nativem *C. plantagineum* Hitzeextrakt zeigte sich nach der immunologischen Detektion ein Signal bei Phosphatidsäure (Abbildung 3.8 A). Für alle anderen Lipide wurde kein Signal beobachtet.

Die nachfolgenden Untersuchungen mit Liposomen bestätigen eine Bindung von CDeT11-24 an Phosphatidsäure (Abbildung 3.8 B). Bei einer Phosphatidsäure-Konzentration von 100 % ist eine vollständige Bindung des CDeT11-24 Proteins an die Liposomen zu sehen. Um eine Phosphatidsäure Abhängigkeit zu beweisen, wurden die Bindung auch mit gemischten Liposomen aus Phosphatidylcholin und Phosphatidsäure getestet. Hierbei zeigte sich, dass die Bindung eindeutig abhängig von Phosphatidsäure ist, da sie umso schwächer wurde, desto höher die Phosphatidylcholin-Konzentration der Liposomen war. Schon ab einem Lipidverhältnis von Phosphatidylcholin zu Phosphatidsäure von 50:50 nimmt die Bindung des CDeT11-24 Proteins stark ab.

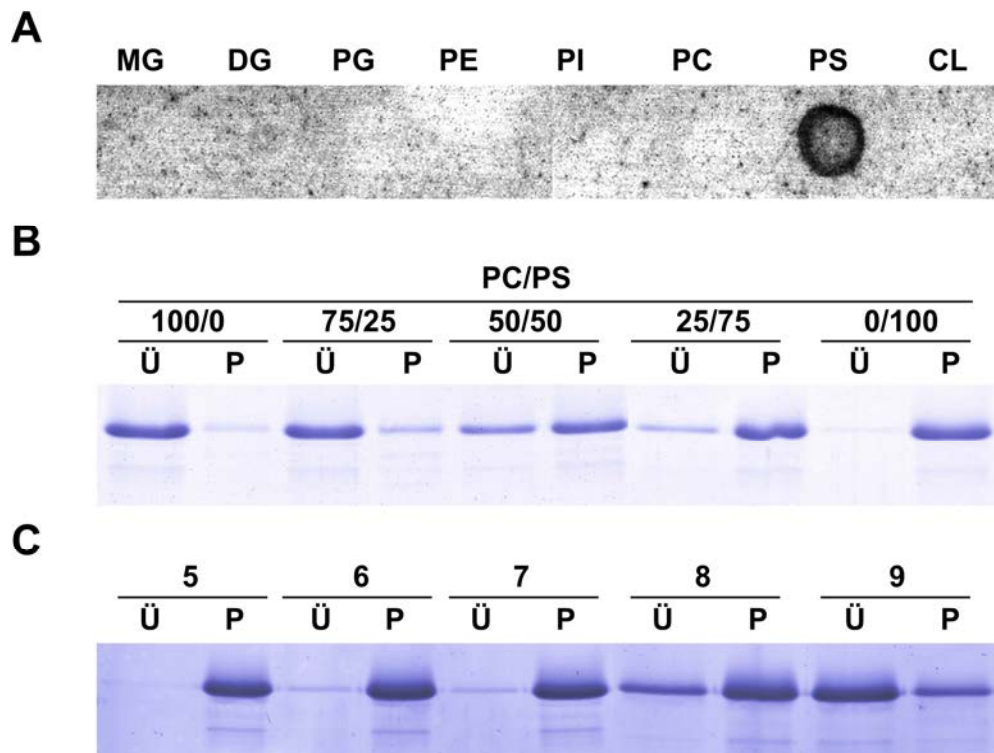


Abbildung 3.8: Lipidbindung von CDeT11-24. (A) Protein-Lipid-Overlay-Assay mit CDeT11-24. Auf die Membran wurden die Lipide Monogalactosyldiacylglycerin (MG), Digalactosyldiacylglycerin (DG), Phosphatidylglycerin (PG), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidsäure (PS) und Cardiolipin (CL) aufgetragen. (B) SDS-PAGE (12 %) des Liposomen-Assays mit CDeT11-24 und Liposomen aus PC/PS gefärbt mit Coomassie-Brillant-Blau. (C) SDS-PAGE (12 %) des Liposomen-Assays mit CDeT11-24 bei pH-Werten von 5, 6, 7, 8 und 9, gefärbt mit Coomassie-Brillant-Blau. Ü = Überstand; P = Pellet.

Neben der Liposomenzusammensetzung kann auch der pH-Wert der Lösung die Bindung beeinflussen, da sowohl die Lipide als auch das Protein bei unterschiedlichen pH-Werten verschiedene Ladungen tragen. Aus diesem Grund wurde die Inkubation des Proteins mit den Liposomen bei unterschiedlichen pH-Werten (5, 6, 7, 8, 9) untersucht (Abbildung 3.8 C). Hierbei wurde beobachtet, dass eine Erniedrigung des pH-Werts, also eine Verschiebung in den sauren Bereich, keinen Einfluss auf die Bindung hat. Durch eine pH-Wert Erhöhung auf pH 8 nimmt die Bindung jedoch deutlich ab. Bei pH 9 ist die Bindung an die Liposomen nur noch sehr schwach. Aus diesem Grund wurden im Folgenden alle Bindungen bei pH 7,0 durchgeführt.

### 3.1.5 Lipidbindung von $\Delta$ K-CDeT11-24

Aufgrund der Homologie des Lysin-reichen Sequenzelements von CDeT11-24 zu dem K-Segment der Dehydrine und den Ergebnissen der *in silico* Analyse (Abschnitt 3.1.1) wird angenommen, dass das Sequenzelement an der Lipidbindung mit beteiligt ist. Zur Überprüfung dieser These wurde von dem CDeT11-24 Protein das Deletionskonstrukt  $\Delta$ K-CDeT11-24 hergestellt, bei dem das Lysin-reiche Sequenzelement fehlt. Die Bindungseigenschaften des Konstrukts wurden anschließend erneut mit Hilfe des PLO- und Liposomen-Assays untersucht.

#### 3.1.5.1 Klonierung und Aufreinigung von $\Delta$ K-CDeT11-24

Für die Herstellung des  $\Delta$ K-CDeT11-24 Konstrukts wurde eine gerichtete Mutagenese PCR von dem Vektor pET28::CDeT11-24 (Abschnitt 3.1.4.1) mit den Primern „CDeT11-24 A5365C for“ und „CDeT11-24 A5365C rev“ durchgeführt. Hierbei wurde das gesamte Plasmid durch PCR amplifiziert und eine zusätzliche *NcoI* Restriktionsschnittstelle eingefügt. Durch einen *NcoI* Verdau wurde anschließend das Lysin-reiche Sequenzelement ausgeschnitten (Abbildung 3.9 A), das Plasmid religiert und für die Transformation des Expressionsstamms verwendet. Das durch IPTG-Induktion exprimierte Protein besitzt ein errechnetes Molekulargewicht von 41,18 kDa und besteht aus 403 Aminosäuren.

Nach der Induktion wurde das Zelllysat erhitzt und abzentrifugiert. Die Proteine im Hitzeextrakt-Überstand wurden zuerst durch Kationen-Austauschchromatographie aufgereinigt. Dabei wurde festgestellt, dass das Protein  $\Delta$ K-CDeT11-24 nicht an die Säule bindet und sich in der Durchflussfraktion befindet (vergleiche Abbildung 3.7 C, Fraktion 1). Die Fraktion enthielt keine Kontamination durch andere Proteine, jedoch eine Verunreinigung durch Nukleinsäuren (Daten nicht gezeigt), die ebenfalls nicht an die Kationenaustauscher-Matrix gebunden haben. Aus diesem Grund wurde als Reinigungsstrategie für das  $\Delta$ K-CDeT11-24 Protein eine Gelchromatographie mit PBS als Laufpuffer durchgeführt (Abbildung 3.9 C). Durch die Chromatographie war es möglich, reines  $\Delta$ K-CDeT11-24 Protein zu isolieren (Abbildung 3.9 B, Fraktionen 18-24).

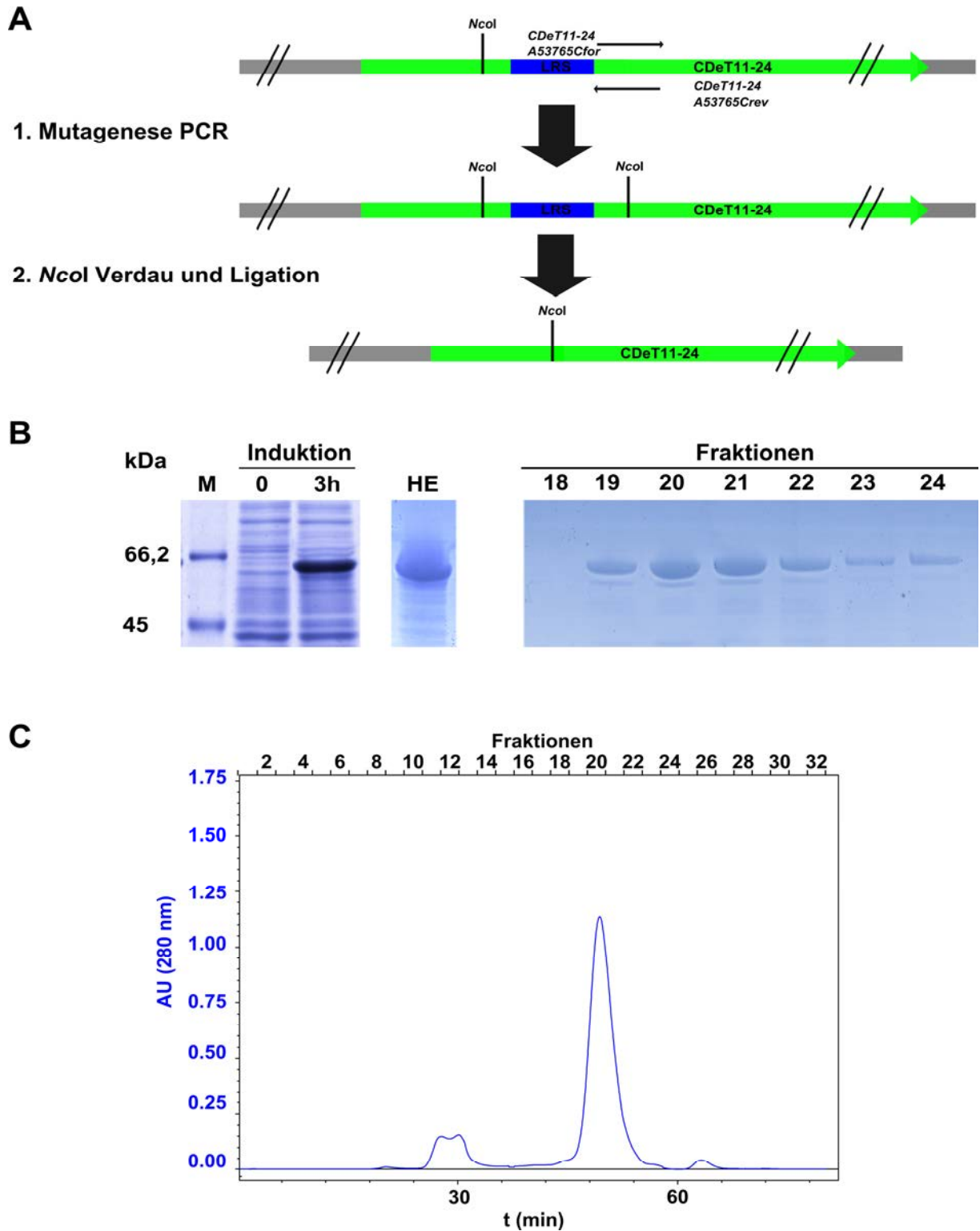


Abbildung 3.9: Klonierungsstrategie und Aufreinigung von  $\Delta K$ -CDeT11-24. (A) Schematische Klonierungsstrategie von pET28:: $\Delta K$ -CDeT11-24. Die Bindungsstellen der verwendeten Primer sind durch Pfeile kenntlich gemacht. Grün, *CDeT11-24* Sequenz; blau, Lysin-reiches Sequenzelement. (B) SDS-PAGE (12 %) der Aufreinigung von  $\Delta K$ -CDeT11-24 durch Gelchromatographie gefärbt mit Coomassie-Brillant-Blau. (C) Chromatogram der Auftrennung des  $\Delta K$ -CDeT11-24 Hitzeextrakts durch Gelchromatographie. Absorption bei 280 nm ist blau dargestellt. 0 = vor und 3h = nach Induktion mit IPTG; HE = Überstand des Hitzeextrakts; 18-24 = Fraktionen der Gelchromatographie.

### 3.1.5.2 Protein-Lipid-Overlay-Assay und Liposomen-Assay mit rekombinantem $\Delta$ K-CDeT11-24

Um zu untersuchen, ob sich die Lipidbindungseigenschaften durch eine Deletion des Lysinreichen Sequenzelements geändert haben, wurde ein PLO-Assay mit  $\Delta$ K-CDeT11-24 (Abschnitt 3.1.5.1) durchgeführt. Mit der immunologischen Detektion konnte kein Signal nachgewiesen werden (Abbildung 3.10 A), was dafür spricht, dass keine Interaktion mit den verwendeten Lipiden und insbesondere mit Phosphatidsäure stattgefunden hat.

Die anschließende Inkubation von  $\Delta$ K-CDeT11-24 Protein mit Liposomen zeigt eine schwache Interaktion mit Liposomen aus 100 % Phosphatidsäure (Abbildung 3.10 B). Das Signal ist im Vergleich zu dem der Bindung von CDeT11-24 mit Lysin-reichen Sequenzelement weniger als halb so stark (Abbildung 3.8 B). Ab einem Lipidverhältnis von PhosphatidylcholinC zu Phosphatidsäure von 25:75 ist die Lipidbindung stark reduziert. Dieses Ergebnis zeigt, dass ohne das Lysin-reiche Sequenzelement die CDeT11-24 Bindung an Phosphatidsäure herabgesetzt ist. Da das Protein aber immer noch schwach bindet, ist anzunehmen, dass neben dem Lysin-reichen Sequenzelement weitere Sequenzabschnitte von CDeT11-24 mit an der Phosphatidsäure Bindung beteiligt sind.

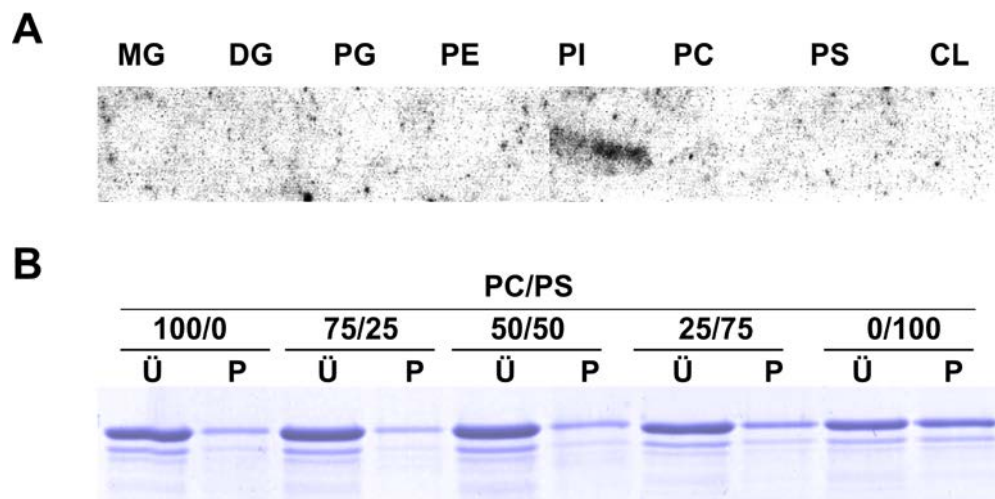


Abbildung 3.10: Lipidbindung von  $\Delta$ K-CDeT11-24. (A) Protein-Lipid-Overlay-Assay mit  $\Delta$ K-CDeT11-24. Auf die Membran wurden die Lipide Monogalactosyldiacylglycerin (MG), Digalactosyldiacylglycerin (DG), Phosphatidylglycerin (PG), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidsäure (PS) und Cardiolipin (CL) aufgetragen. (B) SDS PAGE (12 %) des Liposomen-Assays mit  $\Delta$ K-CDeT11-24 und Liposomen aus PC/PS, gefärbt mit Coomassie-Brillant-Blau. Ü = Überstand; P = Pellet.

### 3.1.6 Liposomen-Aggregation durch CDeT11-24

Für das Dehydrin Lti30 sowie die LEA-Proteine LEA7 und LEA18 aus *A. thaliana* wurde gezeigt, dass sie zusammen mit Liposomen Aggregate bilden (Eriksson *et al.*, 2011; Hundertmark *et al.*, 2012). Um eine mögliche Liposomen-Aggregation durch CDeT11-24 zu untersuchen, wurden Phosphatidsäure-Liposomen zusammen mit CDeT11-24 oder  $\Delta$ K-CDeT11-24 inkubiert und anschließend unter dem Lichtmikroskop untersucht. In der Kontrolle, die nur die Liposomen enthielt, bildeten sich keine Aggregate (Abbildung 3.11). Bei einer Inkubation der Liposomen zusammen mit CDeT11-24 war eine Aggregation der Liposomen zu beobachten. Der Ansatz mit dem Deletionskonstrukt  $\Delta$ K-CDeT11-24 und Liposomen hingegen zeigte keine Aggregatbildung.

Dieses Ergebnis unterstützt die vorherigen Resultate (Abschnitt 3.1.5.2), die gezeigt haben, dass das Lysin-reiche Sequenzelement ein wichtiger Bestandteil für die Bindung von CDeT11-24 an Phosphatidsäure ist.

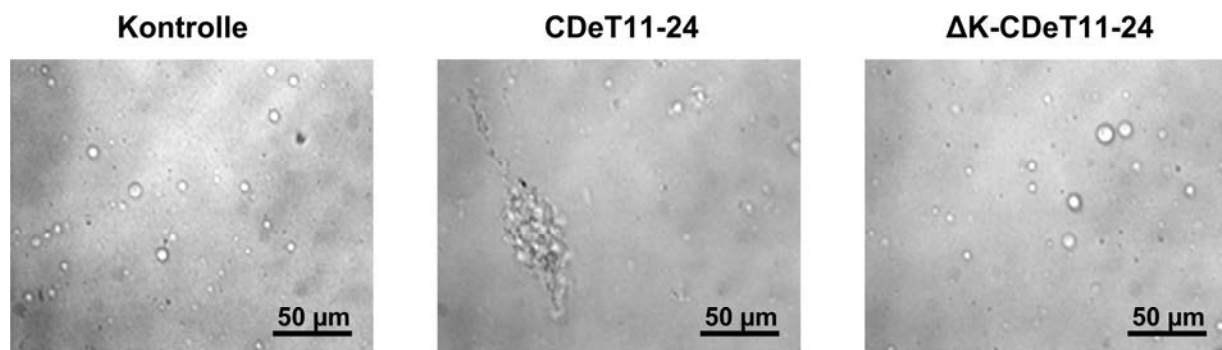


Abbildung 3.11: Liposomen unter dem Lichtmikroskop. Liposomen aus Phosphatidsäure ohne Protein (Kontrolle), mit CDeT11-24 oder  $\Delta$ K-CDeT11-24.



### 3.2 Untersuchungen zur Proteinstruktur von CDeT11-24

LEA-Proteine sind größtenteils unstrukturiert (Battaglia *et al.*, 2008; Hundertmark und Hinch, 2008). Das LEA-like Protein CDeT11-24 wurde in Bezug auf seine Struktur bisher nur durch *in silico* Analysen untersucht. Hierbei wurde das CDeT11-24 Protein ebenfalls als unstrukturiert vorhergesagt (Röhrig *et al.*, 2006; Facchinelli, 2009).

Zur Bestätigung der vorherigen Ergebnisse wurden weiterführende *in silico* Analysen durchgeführt. Zusätzlich dazu wurde die Sekundärstruktur des CDeT11-24 Proteins experimentell mit Hilfe von Circular dichroismus (CD) Spektroskopie untersucht. Hierbei wurden neben Standardmessungen des Proteins in wässriger Lösung auch eine mögliche Strukturänderung bedingt durch Phosphorylierung, strukturgebenden Substanzen wie Trifluorethanol (TFE) oder SDS und Austrocknung getestet.

#### 3.2.1 *In silico* Untersuchungen der CDeT11-24 Proteinstruktur

Eine *in silico* Vorhersage unstrukturierter Bereiche wurde mit Hilfe des Meta-Predictors PONDR-Fit (Xue *et al.*, 2010) durchgeführt. Im Gegensatz zu herkömmlichen Vorhersageprogrammen vereint PONDR-Fit die Ergebnisse mehrere verschiedener Programme und erreicht dadurch eine höhere Genauigkeit. Für den größten Teil der CDeT11-24 Proteinsequenz wurde ein PONDR-Fit Score von über 0,5 ermittelt (Abbildung 3.12). Aminosäurereste mit einem Wert über dieser Grenze gelten im Kontext der sie umgebenden Aminosäuren als ungeordnet. Das Protein CDeT11-24 kann aufgrund der PONDR-Fit Vorhersage somit als stark unstrukturiert angesehen werden. Besonders der N-terminale Bereich (AS 1-230) zeigt keine Ordnung. Diesem Bereich folgen drei Abschnitte von je 20-30 Aminosäuren die einen höheren Ordnungsgrad besitzen (AS 230-250, AS 260-290, AS 330-360) und jeweils durch kurze unstrukturierte Abschnitte getrennt sind.

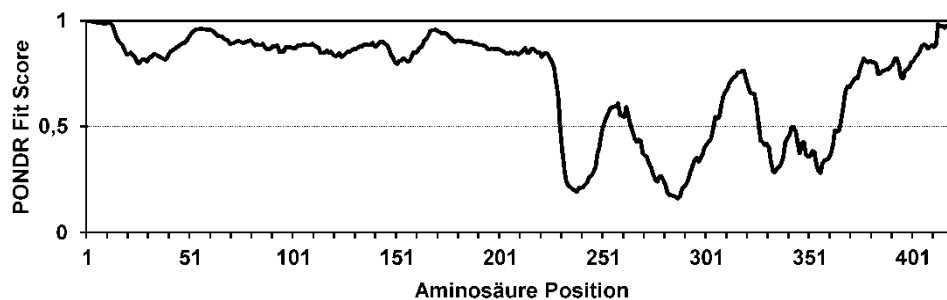


Abbildung 3.12: *In silico* Vorhersage unstrukturierter Sequenzbereiche von CDeT11-24 mit PONDR-Fit. Die Aminosäuresequenz ist gegen die vorhergesagte Strukturierung aufgetragen. Die gestrichelte Linie bei 0,5 auf der Y-Achse gibt den Grenzwert für Strukturierung an. Aminosäurereste mit Werten über dieser Linie gelten als unstrukturiert, Regionen mit Werten darunter als strukturiert.

Für die *in silico* Untersuchung der Sekundärstruktur wurden die Algorithmen SOPMA (Geourjon und Deleage, 1995), Jpred3 (Cole *et al.*, 2008), PSIPRED (McGuffin *et al.*, 2000) und HNN (Guermeur, 1997) verwendet. Bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse wurde dabei auf eine differenziertere Darstellung der einzelnen Motive durch die unterschiedlichen Programme verzichtet und eine vereinfachte Nomenklatur verwendet (H =  $\alpha$ -Helix, C = Coiled-Coil, E =  $\beta$ -Faltblatt, T =  $\beta$ -Schleife).

Die Sekundärstrukturvorhersage der vier Programme ergibt für das CDeT11-24 Protein einen sehr hohen Anteil an Coiled-Coil-Struktur, wobei der längste Abschnitt zwischen dem N-terminal gelegenen Lysin-reichen Sequenzelement und der CAP160-Domäne liegt (Abbildung 3.13). Des Weiteren zeigt sich eine leicht unterschiedliche Vorhersage von  $\alpha$  Helices, die sich jedoch weitestgehend auf die gleichen Bereiche der CDeT11-24 Aminosäuresequenz beziehen. Von allen Programmen wurde ein großer Anteil des Lysin-reichen Sequenzelements als  $\alpha$ -helikal vorhergesagt. Die konservierte CAP160-Domäne hingegen wurde nur von drei der verwendeten Algorithmen teilweise als  $\alpha$ -Helix bestimmt. Ihr folgend gibt es drei weitere Bereiche, die einen hohen Anteil an  $\alpha$ -Helix Struktur besitzen. Hierbei zeigt sich ein Zusammenhang zu der vorherigen PONDR-Fit Analyse, da die Bereiche mit der höchsten Wahrscheinlichkeit für strukturierte Ordnung (AS 230-250, AS 260-290, AS 330-360; Abbildung 3.12) durch die Sekundärstrukturanalysen als  $\alpha$ -helikal vorhergesagt wurden. Innerhalb dieser Sequenzabschnitte befinden sich auch vier von fünf der durch Velasco *et al.* (1998) beschriebenen VAEKL-ähnlichen Motive.

Die Struktur motive  $\beta$ -Faltblatt und  $\beta$ -Schleife sind in Bezug auf den Coiled-Coil oder  $\alpha$ -Helix Anteil eher unterrepräsentiert. Dennoch gibt es Abschnitte (AS 290-300, AS 380-390), die von mindestens drei der verwendeten Algorithmen als  $\beta$ -Faltblatt vorhergesagt wurden.

Die  $\alpha$ -helikale Organisation des Lysin-reichen Sequenzelements und der CAP160-Domäne, die voneinander durch ein langen größtenteils von Coiled-Coil geprägten Sequenzbereich getrennt sind, sowie die drei folgenden  $\alpha$ -helikalen Abschnitte zeigten sich auch in Sekundärstrukturvorhersagen des CDeT11-24 Homologs RD29b aus *A. thaliana* (Daten nicht gezeigt).

	10	20	30	40	50	60	70
Seq	MESQLHRPTEQEMMEGQTAD	<b>HGEKKSMLAKVKEKAKKLGKGSINKKH</b>	GSSQDDADYDEEINTSPAVHGAP				
SOMPA	HHHHCCCCC	HHHHHTCCCCCCC	HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	HECTTCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC			
Jpred3	CCCCCCCCC	HHHHHCCCCCCCCC	HHHHHHHHHHHHHHHHHH	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC			
PSIpred	CCCCCCCCC	HHHHHCCCCCCCCC	HHHHHHHHHHHHHHHHHH	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC			
HNN	CCCCCCCCC	HHHHHCCCCCCCCC	HHHHHHHHHHHHHHHHHH	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC			
	80	90	100	110	120	130	140
Seq	GMNPPPTQGGEGGLSERDVNI	PHPLASTEANLDKPADVQVPP	PPVPEATPEVSDKGLTEDLGS	TAGQGAK			
SOMPA	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC
Jpred3	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC
PSIpred	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC
HNN	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC
	150	160	170	180	190	200	210
Seq	<b>ESD</b> VDPL <b>TR</b> GLKGVNYGGDD	<b>SN</b> PLAGQEHQAI	SDEPK <b>S</b> FPGQENDLPQ	SHPSSEDEPKKFD	AAANDQ	PQSM	
SOMPA	CCCC <b>HHHHH</b>	CC <b>EEEE</b> TCCCCCCCC	<b>HHHHH</b> CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC
Jpred3	<b>EE</b> CC <b>HHHHH</b>	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC
PSIpred	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC
HNN	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	<b>HHH</b> CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC
	220	230	240	250	260	270	280
Seq	PQDTITGK <b>I</b> SSVPAVIVDK	AAAANKV <b>V</b> ASKL	GYGGNQ	AQPADAGATQ	QKKPLTETA	AAEYKNMVAEKL	TP
SOMPA	CCCC <b>HH</b> CCCC	<b>HHHHHHHHHHHH</b>	<b>HEE</b> HH	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	<b>HHHHHHHHHHHHHHHH</b>	
Jpred3	CCCC <b>EEEE</b>	<b>HHHHHHH</b>	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	<b>HHHHHHHHHHHHHH</b>	CC
PSIpred	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	<b>HHHH</b> CCCCCCCC	
HNN	CCCCCCCCC	<b>HHHHHHHHHHHHHHHHHH</b>	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	<b>HHHHHHHHHHHH</b> CC	
	290	300	310	320	330	340	350
Seq	VYEK <b>V</b> AGAG <b>S</b> TVTSK	VWGSGGTTAGEQA	QGEGE	TVDGGAAAP	NKGVFTKDY	<b>LSE</b> KLKPGDEDKALS	QAIM
SOMPA	<b>HHHHHH</b> TTT	<b>CEEEEE</b> ET	CCCCC	ETCCCTT	CCCCCCCCC	TTCC <b>EEEE</b>	<b>HHHHHHH</b> CTTCC <b>HHHHHHHH</b>
Jpred3	<b>CHHHHHH</b> CCC	<b>HEEEEE</b>	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	<b>HHHHHHHH</b>	CCCC <b>HHHHHHHH</b>
PSIpred	CC <b>EEEE</b> CCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	<b>HH</b> CCCCCCCC	<b>HHHHHHHHHH</b>
HNN	<b>CHHE</b> CCCC	<b>CEEEEE</b>	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	<b>EEE</b> <b>HHHHHH</b>	CCCC <b>HHHHHHHH</b>
	360	370	380	390	400	410	420
Seq	<b>E</b> KLQLSKKPAAGEGG	AVDETKANESS	PGVVGSIK	GVVGS	SLIGGG	NKINATES	AAAAANEQTQALGSGETA
SOMPA	<b>HHHHH</b> CCCC	CCCC <b>HH</b>	CCCCCTT	<b>HHHHH</b>	CCCCCCCCC	<b>HH</b> CCCCCT	<b>TEEH</b> <b>HHHH</b> <b>EEEE</b> ET
Jpred3	<b>HHH</b> CCCC	CCCC <b>EEEE</b>	CCCC <b>HHH</b>	CCCCCCCCC	CCCC <b>EEEE</b>	CCCC <b>EE</b>	<b>HHHHHHH</b> CCCC
PSIpred	<b>HHH</b> CCCC	CCCCCCCCC	<b>HHHH</b>	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	<b>EEEE</b>	<b>EEEE</b> CCCC
HNN	<b>HHHHHHHHHH</b>	CCCC <b>HHHHHHHH</b>	<b>CHHHHHH</b>	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	<b>EEEE</b>	<b>EEEE</b> CCCC
Seq	A <b>E</b> AAK <b>V</b> EQ						
SOMPA	TT <b>CC</b> <b>HHH</b>						
Jpred3	CCCCCCCC						
PSIpred	CCCCCCCC						
HNN	CCCC <b>HH</b>						

Abbildung 3.13: Sekundärstrukturvorhersage des CDeT11-24 Proteins. Für die Analyse wurden die Algorithmen SOPMA, Jpred3, PSIpred und HNN verwendet. Das Lysin-reiche Sequenzelement ist schwarz und die CAP160-Domäne grau unterlegt. Die VAEKL ähnlichen Motive (Velasco *et al.*, 1998) sind unterstrichen. Die durch Röhrig *et al.* (2006) identifizierte Phosphorylierungsstellen sind fett dargestellt. Seq = Aminosäuresequenz, H =  $\alpha$ -Helix, C = Coiled-Coil, E =  $\beta$ -Faltblatt, T =  $\beta$ -Schleife.

### 3.2.2 Circular dichroismus-Spektroskopie von phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem CDeT11-24

Röhrig *et al.* (2006) konnten zeigen, dass CDeT11-24 während des Austrocknungsprozesses bei einem RWC von 30 %, phosphoryliert wird. Um zu untersuchen, ob die Phosphorylierung eine Auswirkung auf die Sekundärstruktur des Proteins hat, wurde daher natives phosphoryliertes und nicht-phosphoryliertes CDeT11-24 aus *C. plantagineum* isoliert und mit rekombinatem 6His-CDeT11-24 sowie *in vitro* phosphoryliertem 6His-CDeT11-24 durch CD-Spektroskopie untersucht.

#### 3.2.2.1 Aufreinigung von phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem CDeT11-24 aus *Craterostigma plantagineum*

Für die CD-Analyse von phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem CDeT11-24 wurde natives Protein aus *C. plantagineum* nach der etablierten Methode durch Immunaffinitätsreinigung aufgereinigt (van den Dries *et al.*, 2011). Die Isolation von phosphoryliertem CDeT11-24 Protein erfolgte aus getrockneten *C. plantagineum* Blättern (RWC 2 %) durch Immunaffinitätschromatographie. Hieraus wurde das phosphorylierte CDeT11-24 weiter mit dem PhosphoProtein Purification Kit (Qiagen, Hilden, D) angereichert und die einzelnen Fraktionen durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die phosphospezifische Färbung des Gels wurde mit ProQ-Diamond durchgeführt. Sowohl das auf die Säule aufgetragene Protein der Immunaffinitätschromatographie (L) als auch das Eluat (E), das das phosphorylierte CDeT11-24 Protein enthält, zeigten ein starkes phosphorylierungsspezifisches Signal (Abbildung 3.14 A). Die Gesamtproteinfärbung des Gels mit Coomassie-Brillant-Blau zeigt keine anderen Banden und belegt die Reinheit der Probe (Abbildung 3.14 B). Zur Kontrolle wurde mit der Probe des phosphorylierten CDeT11-24 ein Western-Blot durchgeführt. Dabei konnte die Identität des Proteins mit Hilfe spezifischer CDeT11-24 Antikörper bestätigt werden (Abbildung 3.14 C). Da die Expression von CDeT11-24 durch ABA induziert wird, eine Phosphorylierung hingegen nur durch Austrocknung erfolgt (Facchinelli, 2009), wurde als Ausgangsmaterial für die Immunaffinitätschromatographie von nicht-phosphoryliertem CDeT11-24 in ABA-Lösung gewässerte *C. plantagineum* Blätter verwendet. In Abbildung 3.14 A ist zu sehen, dass das Eluat der Immunaffinitätschromatographie (-P) kein Signal einer Phosphorylierung zeigt. Durch die Gesamtproteinfärbung des Gels wurden im Vergleich zu dem phosphorylierten

CDeT11-24 (+P) jedoch leichte Verunreinigungen detektiert (Abbildung 3.1.4 B). Auch hier wurde die Identität des CDeT11-24 Proteins immunologisch verifiziert (Abbildung 3.1.4 C).

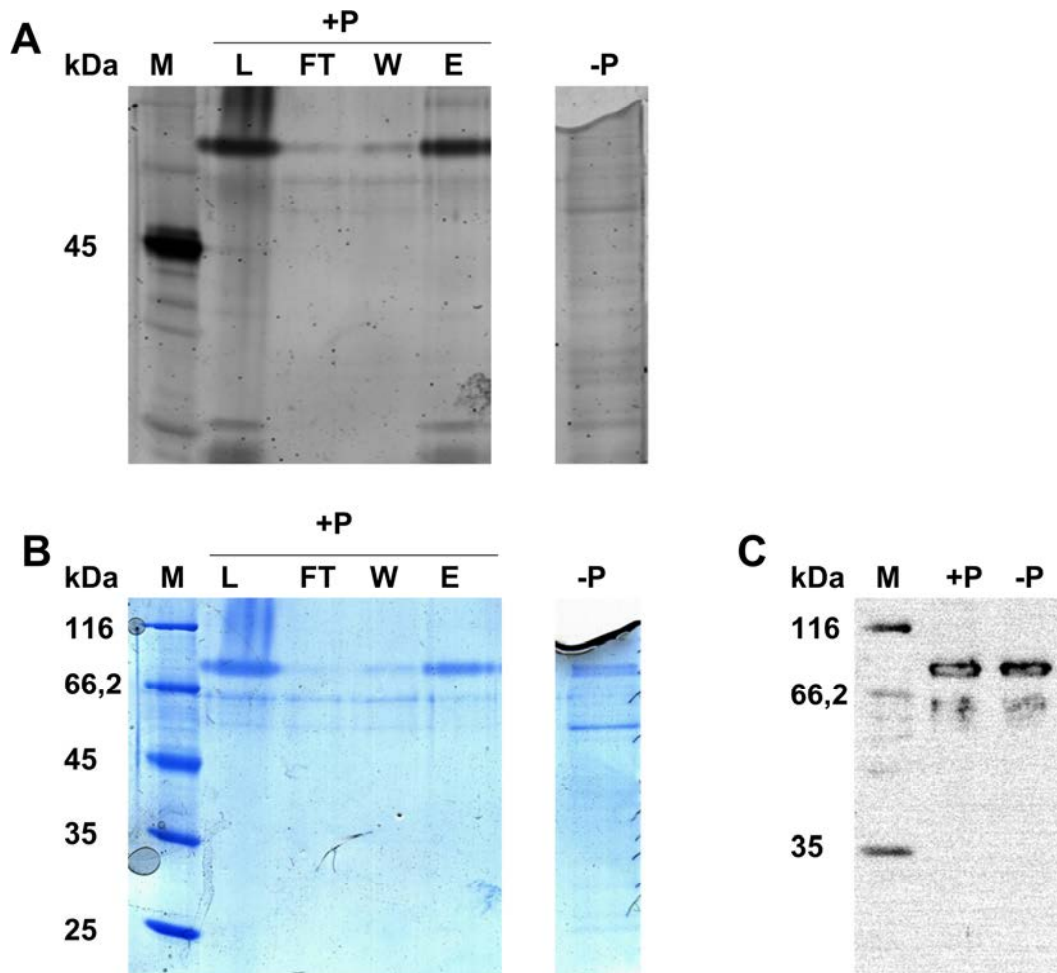


Abbildung 3.14: Aufreinigung von CDeT11-24 aus *C. plantagineum*. (A) SDS-PAGE (12 %) der Phosphoproteinanreicherung der CDeT11-24 Immunaффinitätsreinigung aus *C. plantagineum* Blättern mit 2 % RWC (+P) und Eluat der CDeT11-24 Immunaффinitätsreinigung aus Blättern, die mit ABA induziert wurden (-P). Die Phosphorylierungsfärbung erfolgte mit ProQ Diamond. (B) SDS-PAGE (12 %) von (A), gefärbt mit Coomassie-Brillant-Blau. (C) Immunodetektion von CDeT11-24. M = Marker, L = Eluat der Immunaффinitätschromatographie aus Blättern mit 2 % RWC, das für die Phosphoproteinanreicherung eingesetzt wurde, FT = Durchfluss der Phosphoproteinanreicherung, W = Waschschrift der Phosphoproteinanreicherung, E = Eluat der Phosphoproteinanreicherung.

### 3.2.2.2 *In vitro* Phosphorylierung des 6His-CDeT11-24 Proteins mit Casein Kinase 2

Neben der Aufreinigung von phosphoryliertem CDeT11-24 Protein aus *C. plantagineum*, wurde auch 6His-CDeT11-24 mit der Casein Kinase 2 (CK2) *in vitro* phosphoryliert. Die Phosphorylierung von LEA-Proteinen durch die CK2 konnte unter anderem für Rab17 nachgewiesen werden (Riera *et al.*, 2004). Außerdem wurde die *in vitro* Phosphorylierung

von Dehydrinen mit CK2 bereits zuvor verwendet, um eine mögliche Strukturänderung mittels CD-Spektroskopie zu untersuchen (Mouillon *et al.*, 2008). Aufgereinigtes 6His-CDeT11-24 wurde zusammen mit CK2 und ATP für vier Stunden inkubiert. Hierbei wurde entweder keine oder 250, 500 bzw. 1000 Units CK2 zugegeben (500 U/ $\mu$ l). Die Phosphorylierung wurde durch SDS-PAGE und anschließende phosphorylierungsspezifische Färbung des Polyacrylamidgels mit ProQ-Diamond kontrolliert (Abbildung 3.15 A). Es zeigte sich keine Bande in der Probe ohne CK2. Das Protein wurde nicht phosphoryliert. Mit zunehmender Kinasekonzentration hingegen steigt der Phosphorylierungsgrad des 6His-CDeT11-24 Proteins, was an der zunehmenden Intensität der Proteinbanden zu erkennen ist. Die Gesamtproteinfärbung des Gels mit Coomassie-Brillant-Blau zeigt, dass gleiche Mengen Protein aufgetrennt wurden (Abbildung 3.15 B).

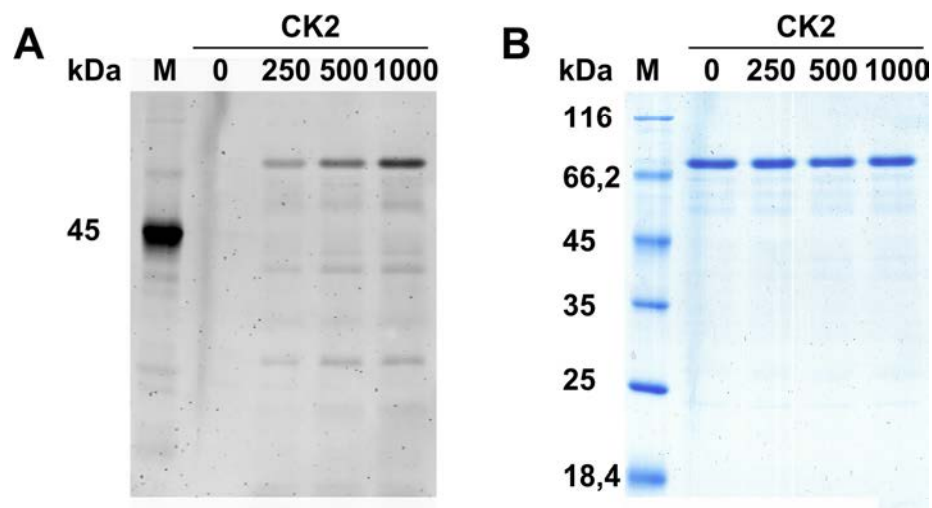


Abbildung 3.15: Phosphorylierung von 6His-CDeT11-24 mit CK2. SDS-PAGE (12 %). CDeT11-24 phosphoryliert mit 0, 250, 500, 1000 Units CK2. (A) Phosphorylierungsfärbung mit ProQ Diamond. (B) Gesamt-Proteinfärbung mit Coomassie-Brillant-Blau.

### 3.2.2.3 Circular dichroismus-Spektroskopie von phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem CDeT11-24

Die experimentelle Untersuchung der CDeT11-24 Sekundärstruktur wurde mittels CD-Spektroskopie in der Arbeitsgruppe von Prof. Harryson (Universität Stockholm) durchgeführt. Hierbei zeigten die CD-Spektren von nicht-phosphoryliertem CDeT11-24 (Abschnitt 3.2.2.1) aus *C. plantagineum* und rekombinanten 6His-CDeT11-24 für beide Proteine ein Minimum der Elliptizität bei 200 nm (Abbildung 3.16). Dieses spricht für einen geringen Anteil von  $\alpha$ -Helix- und  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen (Abschnitt 1.9). Des Weiteren wurde

für beide Proteine ein Maximum bei ca. 222 nm detektiert, welches der charakteristischen Elliptizität von Random-Coiled Strukturen entspricht. Per Definition entsprechen beide Proteine somit einem unstrukturierten Protein (Uversky, 2002).

Weiterhin ist zu beobachten, dass das native nicht-phosphorylierte Protein eine etwas niedrigere Elliptizität im Bereich von 222 nm besitzt. Dieser Unterschied ist vermutlich auf Konzentrationsunterschiede zurückzuführen, da von dem nativen Protein wesentlich geringere Mengen für die CD-Analyse zur Verfügung standen als von dem rekombinanten Protein.

Für die CD-Spektroskopie von nativen phosphorylierten CDeT11-24 (Abschnitt 3.2.2.1) und 6His-CDeT11-24, welches mit CK2 phosphoryliert wurde (Abschnitt 3.2.2.2), zeigen die CD-Spektren ein ähnliches Bild wie für die nicht-phosphorylierten Versionen der beiden Proteine. Bei beiden phosphorylierten Proteinen wurde ein Minimum der Elliptizität bei 200 nm und ein Maximum bei 222 nm detektiert (Abbildung 3.16 B).

Die vorliegenden Ergebnisse sprechen für eine größtenteils unstrukturierte Random-Coil-Konformation in wässriger Lösung. Eine Strukturänderung des CDeT11-24 Proteins durch Phosphorylierung konnte nicht detektiert werden.

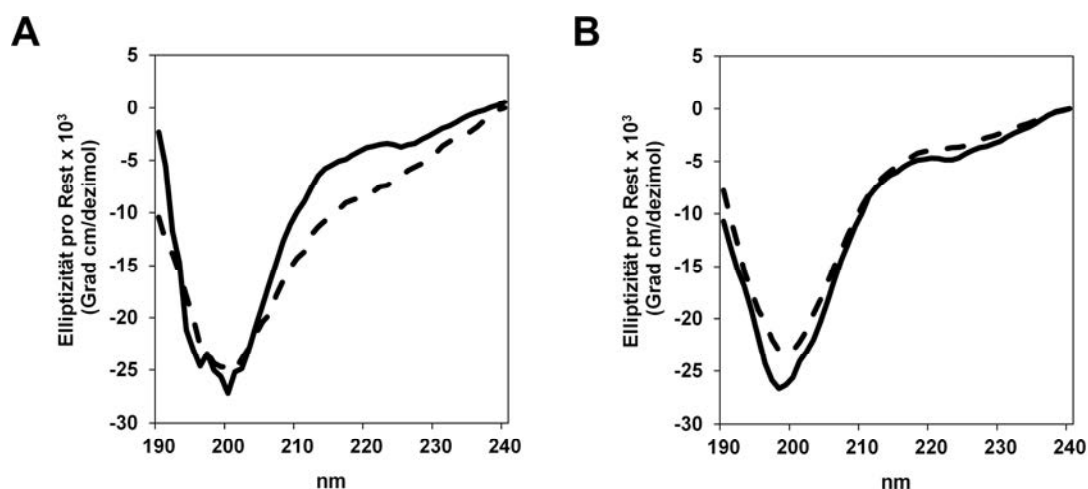


Abbildung 3.16: Strukturvergleich von phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem CDeT11-24. (A) CD-Spektren von nicht-phosphoryliertem rekombinanten 6His-CDeT11-24 (durchgehende Linie) und nativem CDeT11-24 (unterbrochene Linie). (B) CD-Spektren von rekombinanten 6His-CDeT11-24 phosphoryliert mit CK2 (durchgehende Linie) und nativ phosphoryliertem CDeT11-24 (unterbrochene Linie).

### 3.2.3 Circular dichroismus-Spektroskopie von 6His-CDeT11-24 mit Trifluorethanol

Für Dehydrine wurde gezeigt, dass sie durch Zugabe von TFE ihre Sekundärstruktur ändern (Lisse *et al.*, 1996; Soulages *et al.*, 2002; Mouillon *et al.*, 2006). Das Lösungsmittel TFE begünstigt dabei die Ausbildung von  $\alpha$ -helikalen Strukturen. Der genaue Mechanismus

hierfür ist bis heute unbekannt, jedoch deuten Untersuchungen darauf hin, dass durch TFE die Wasserstoffbrücken innerhalb der  $\alpha$ -Helix stabilisiert werden (Luo und Baldwin, 1997). Um zu untersuchen, ob CDeT11-24 dazu neigt seine Sekundärstruktur zu ändern, wurde der Einfluss unterschiedlicher TFE-Konzentrationen auf 6His-CDeT11-24 durch CD-Spektroskopie getestet (Abbildung 3.17 A). Das ursprünglich gemessene Minimum der Elliptizität bei 200 nm ohne TFE verschiebt sich mit zunehmender TFE-Konzentration in den Bereich von 205 nm. Des Weiteren nimmt die Elliptizität im Bereich von 222 nm ab. Die Änderung der Spektren lassen somit auf eine TFE-induzierte Bildung von  $\alpha$ -Helices schließen.

Auswertung der Spektren durch Berechnungen des  $\alpha$ -helikalen Anteils mit CDNN (Böhm *et al.*, 1992) zeigten, dass die Ausbildung von  $\alpha$ -Helix-Strukturen von anfänglich 15 % (ohne TFE) auf bis zu ca. 35 % (mit 40 % TFE) gesteigert wurde (Abbildung 3.17 B). Bezüglich der Strukturänderung wurde ab einer Konzentration von 40 % TFE ein Plateau erreicht, bei dem sich die Struktur nur noch geringfügig änderte.

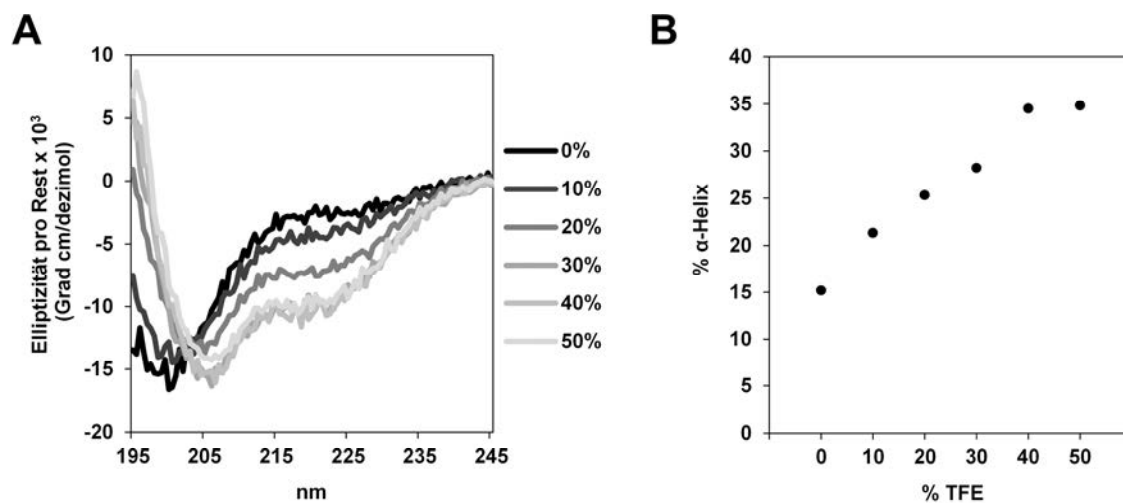


Abbildung 3.17: Änderung der 6His-CDeT11-24 Sekundärstruktur durch TFE. (A) CD-Spektrum von 6His-CDeT11-24 mit steigenden TFE-Konzentrationen (0-50 %). (B) Prozent (%)  $\alpha$ -helikaler Anteil der Sekundärstruktur bezogen auf die TFE-Konzentration von (A).

### 3.2.4 Circular dichroismus-Spektroskopie von 6His-CDeT11-24 mit SDS

Neben TFE ist auch SDS dafür bekannt einen strukturbildenden Einfluss auf die Proteinkonformation von Dehydrinen auszuüben (Ismail *et al.*, 1999; Koag *et al.*, 2003; Tolleter *et al.*, 2007). SDS stabilisiert und induziert  $\alpha$ -Helix-Strukturen in Proteinen, die ein



Potential zur Strukturbildung besitzen. Aus diesem Grund wurde durch CD-Spektroskopie getestet, ob SDS die Sekundärstruktur von 6His-CDeT11-24 beeinflusst.

Wie schon durch die TFE-Titration beobachtet wurde (Abschnitt 3.2.3), zeigte sich auch durch Erhöhung der SDS-Konzentrationen eine Verschiebung des Elliptizitätsminimums bei 200 nm (ohne bzw. mit 0,1 mM SDS) in den Bereich von ca. 205 nm (mit 3,7 mM SDS; Abbildung 3.18). Bezüglich des Spektrums der Probe 6His-CDeT11-24 ohne SDS (0 mM) ist dabei anzumerken, dass das Minimum bei 200 nm möglicherweise aufgrund von Messungenauigkeiten leicht verschoben wurde. Analog zu der Änderung der Spektren bei 200 nm sinkt das für Random-Coil-Strukturen charakteristische 222 nm Maximum. Der Anteil an  $\alpha$ -Helix der 6His-CDeT11-24 Sekundärstruktur nimmt also zu, während gleichzeitig der Random-Coil-Anteil abnimmt. Dabei führten SDS-Konzentrationen von über 0,95 mM nur noch zu minimalen Strukturänderungen. Diese Konzentration liegt unter der kritischen Mizellbildungskonzentration von SDS (CMC = 2,0-2,5 mM; Tolleter *et al.*, 2007). Das CD-Spektrum von 6His-CDeT11-24 mit 1,4 mM zeigt im Vergleich zur Messung mit 3,7 mM SDS keinen Unterschied. Somit kann eine Änderung der 6His-CDeT11-24 Proteinstruktur durch SDS-Mizellen ausgeschlossen werden.

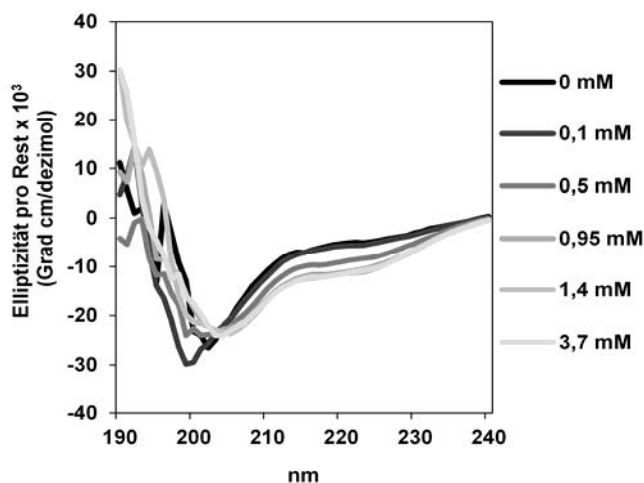


Abbildung 3.18: Änderung der 6His-CDeT11-24 Sekundärstruktur durch SDS. CD-Spektrum von 6His-CDeT11-24 mit steigenden SDS-Konzentrationen (0-3,7 mM).

### 3.2.5 Circular dichroismus-Spektroskopie von CDeT11-24 und $\Delta$ K-CDeT11-24

Für die Untersuchung einer Bindung von CDeT11-24 an Lipide wurden neben dem rekombinanten 6His-CDeT11-24 (Abschnitt 3.1.2.1) auch die Proteinkonstrukte CDeT11-24 (Abschnitt 3.1.4.1) und  $\Delta$ K-CDeT11-24 (Abschnitt 3.1.5.1) erzeugt. Um aufzuklären, ob sie

die gleiche Sekundärstruktur aufweisen wie das 6His-CDeT11-24 bzw. das native CDeT11-24 aus *C. plantagineum* wurden weitere CD-Analysen durchgeführt. Dabei lag die Fragestellung besonders darauf, ob das Lysin-reiche Sequenzelement einen Einfluss auf die Strukturbildung hat. Die Ergebnisse der CD-Analyse von CDeT11-24 Protein und  $\Delta$ K-CDeT11-24 Protein in Lösung zeigen ein nahezu identisches Spektrum (Abbildung 3.19). Wie schon zuvor bei 6His-CDeT11-24 zeigt sich für die CD-Spektren von rekombinanten CDeT11-24 und  $\Delta$ K-CDeT11-24 ein Minimum der Elliptizität bei ca. 200 nm und ein Maximum im Bereich von 222 nm, was auf eine gering ausgeprägte Sekundärstruktur und einen hohen Anteil von Random-Coil hinweist. Berechnungen mit der Software K2D2 (Perez-Iratxeta und Andrade-Navarro, 2008) ergaben für beide Proteine einen  $\alpha$ -Helix-Anteil von ca. 8 %. Die Deletion des Lysin-reichen Sequenzelements führte zu keiner detektierbaren Änderung der Sekundärstruktur und somit des CD-Spektrums.

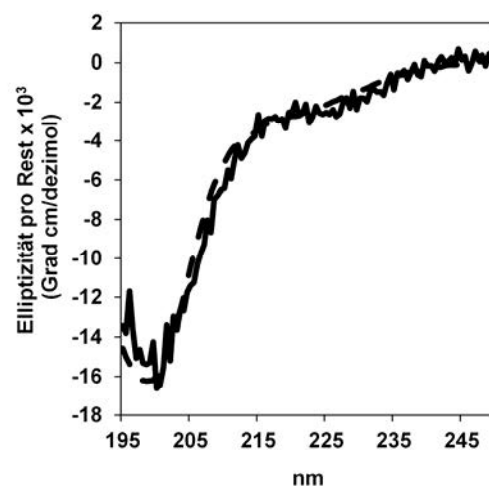


Abbildung 3.19: CD-Spektrum von rekombinatem CDeT11-24 und  $\Delta$ K-CDeT11-24. CDeT11-24 (durchgezogene Linie);  $\Delta$ K-CDeT11-24 (unterbrochene Linie).

### 3.2.6 Circular dichroismus Spektroskopie von CDeT11-24 und $\Delta$ K-CDeT11-24 mit TFE

Da für 6His-CDeT11-24 eine Strukturänderung durch TFE induziert werden konnte (Abschnitt 3.2.3), wurden für die beiden rekombinanten Proteinkonstrukte CDeT11-24 und  $\Delta$ K-CDeT11-24 ebenfalls die CD-Spektren in Abhängigkeit von der TFE-Konzentration ermittelt. Dabei sollte auch getestet werden, ob die Deletion des Lysin-reichen Sequenzbereichs einen Einfluss auf die TFE induzierte Strukturänderung hat.

Die CD-Analyse von CDeT11-24 und  $\Delta$ K-CDeT11-24 mit TFE (Abbildung 3.20 A und B) ergab eine Erniedrigung des Random-Coil- und ein Anstieg des  $\alpha$ -Helix-Anteils. Diese Strukturänderung zeichnet sich durch eine Verschiebung des Elliptizitätsminimums bei 200 nm zu 205 nm bzw. dem Absinken bei 222 nm ab. Die Spektren korrelieren dabei weitestgehend mit denen der CD-Analyse von 6His-CDeT11-24 mit TFE (Abschnitt 3.2.3). TFE induziert bei CDeT11-24 und  $\Delta$ K-CDeT11-24 ebenfalls die Ausbildung von  $\alpha$ -Helix Motiven.

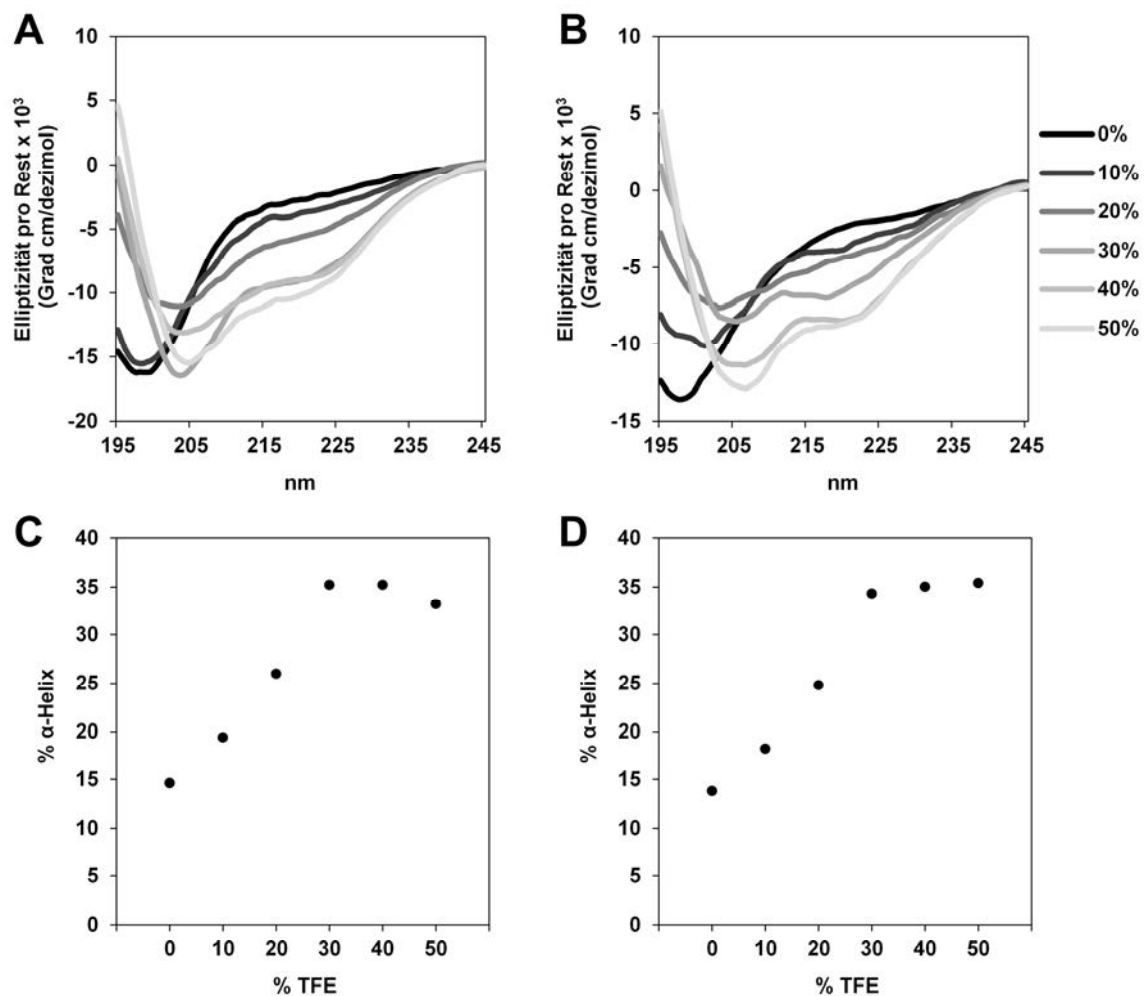


Abbildung 3.20: Änderung der Sekundärstruktur von CDeT11-24 und  $\Delta$ K-CDeT11-24 durch TFE. (A) CD-Spektren von CDeT11-24 titriert mit 0-50 % TFE. (B) CD-Spektren von  $\Delta$ K-CDeT11-24 titriert mit 0-50 % TFE. (C) Prozent (%)  $\alpha$ -helikaler Anteil der Sekundärstruktur bezogen auf die TFE-Konzentration von (A). (D) Prozent (%)  $\alpha$ -helikaler Anteil der Sekundärstruktur bezogen auf die TFE-Konzentration von (B).

Die Berechnung des  $\alpha$ -helikalen Anteils mit CDNN (Böhm *et al.*, 1992) zeigt, dass beide Proteine bei 30 % TFE ihr Maximum von ca. 35 %  $\alpha$ -Helix erreichen (Abbildung 3.20 C und

D). Ein Unterschied in der Sekundärstruktur durch die Deletion des Lysin-reichen Sequenzelements ( $\Delta$ K-CDeT11-24) ließ sich nicht beobachten.

### 3.2.7 Circulardichroismus-Spektroskopie von getrocknetem CDeT11-24

Wie in den Abschnitten 3.2.3, 3.2.4 und 3.2.6 beschrieben, erfolgt bei dem CDeT11-24 Protein durch TFE und SDS eine Transition der Sekundärstruktur von größtenteils Random-Coil zu  $\alpha$ -Helix. Um zu untersuchen, ob das Protein auch durch Austrocknung seine Struktur ändert, wurden CD-Spektren von rekombinantem CDeT11-24 Protein im hydrierten, dehydrierten und rehydrierten Zustand aufgenommen (Abbildung 3.21). Die Spektren im hydrierten und rehydrierten Zustand zeigten keine Veränderung zu der zuvor in Lösung durchgeführten Messung (Abschnitt 3.2.5). Es konnten alle Charakteristika eines unstrukturierten Proteins mit einem sehr hohen Random-Coil-Anteil nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigen die Spektren der ausgetrockneten Proteine eine starke Änderung des CD-Spektrums, bei der die Bildung von  $\alpha$ -Helices induziert wurde. Diese manifestiert sich wie zuvor in der Verschiebung des Minimums bei 200 nm zu 205 nm und dem Absinken des charakteristischen 222 nm Random-Coile Maximums.

Die Ergebnisse zeigen, dass das rekombinante CDeT11-24 Protein in wässriger Lösung als unstrukturiertes Random-Coil Protein vorliegt und durch Austrocknung eine komplexere Sekundärstruktur annimmt.

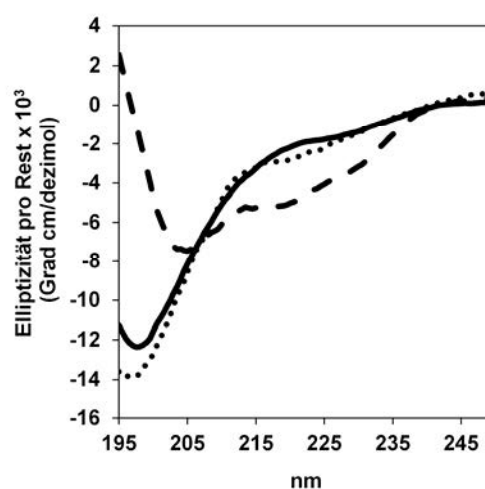


Abbildung 3.21: Änderung der CDeT11-24 Sekundärstruktur durch Austrocknung. (A) CD-Spektren von rekombinanten CDeT11-24 im hydrierten (durchgezogene Linie), dehydrierten (gestrichelte Linie) und rehydrierten (gepunktete Linie) Zustand.

### 3.3 Schutzfunktion von CDeT11-24 *in vitro*

Für einige LEA-Proteine konnte durch Austrocknungs-Assays gezeigt werden, dass sie Enzyme vor einem durch Austrocknung bedingten Aktivitätsverlust schützen (Goyal *et al.*, 2005; Gilles *et al.*, 2007; Haaning *et al.*, 2008). Im nachfolgenden wurde daher eine mögliche Schutzfunktion von CDeT11-24 gegen einen Aktivitätsverlust durch Austrocknung von Citratsynthase und Lactatdehydrogenase untersucht. Zur Durchführung des Assays wurde das jeweilige Enzym zusammen mit dem zu untersuchenden Protein ausgetrocknet, anschließend rehydriert und dann die Enzymaktivität bestimmt.

#### 3.3.1 Citratsynthase-Austrocknung-Assay

Zur Durchführung des Assays wurde Citratsynthase (CS) in Gegenwart von BSA, Trehalose oder den rekombinanten CDeT11-24 Proteinkonstrukten 6His-CDeT11-24, CDeT11-24 und  $\Delta$ K-CDeT11-24 in der SpeedVac ausgetrocknet und anschließend mit Wasser rehydriert. Das molare Verhältnis CS zu CDeT11-24 betrug dabei 1:1,6. Die enzymatische Aktivität der CS wurde jeweils vor der Behandlung und nach jedem Dehydrierungs/Rehydrierungs-Zyklus bestimmt (Abbildung 3.22).

CS allein zeigte nach drei Austrocknungszyklen einen starken Verlust der Enzymaktivität. Schon nach einem Zyklus ging die Hälfte der Aktivität verloren und nach drei Zyklen betrug die Restaktivität nur noch 11 %. Ein etwas geringerer Aktivitätsverlust zeigt sich, wenn BSA als Schutzprotein eingesetzt wurde. Hier betrug die Aktivität nach der Behandlung noch ca. 28 %. Wurde Trehalose, die dafür bekannt ist Proteine zu stabilisieren (Crowe *et al.*, 2001), dem Ansatz zugegeben, lag die Restaktivität bei 58 %. Für den Ansatz mit 6His-CDeT11-24 Protein ist zu sehen, dass die Aktivität nach der Behandlung immer noch 90 % beträgt. CDeT11-24, das entsprechende Protein ohne 6His-Tag, zeigt eine etwas schwächere Schutzfunktion bezüglich der CS-Aktivität (Restaktivität 72 %). Im Vergleich zu den anderen beiden CDeT11-24 Proteinkonstrukten zeigt der Ansatz mit  $\Delta$ K-CDeT11-24 eine stark reduzierte Schutzfunktion (ca. 24 %), die mit der von BSA vergleichbar ist. Die Ergebnisse zeigen, dass CDeT11-24 effektiv Citratsynthase vor einem Aktivitätsverlust durch Austrocknung schützt und dass das Lysin-reiche Sequenzelement ein wichtiger Bestandteil der CDeT11-24 Sequenz bezüglich der *in vitro* Schutzfunktion ist.

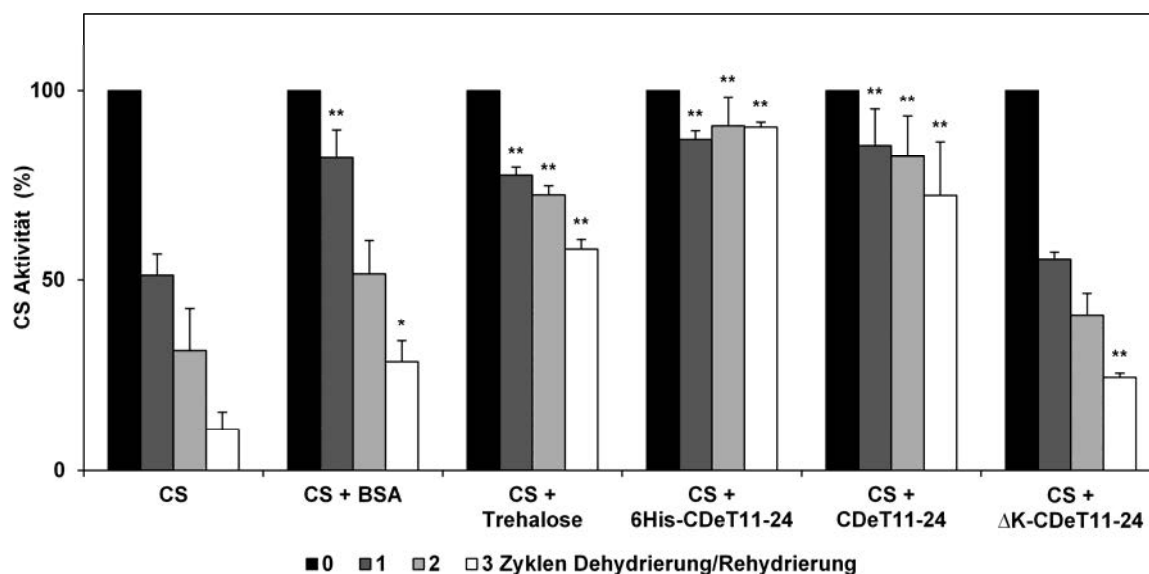


Abbildung 3.22: Citratsynthase-Austrocknungs-Assay. Citratsynthase (CS) Aktivität vor und nach drei Dehydrierungs-/Rehydrierungs-Zyklen; CS (120 µg/ml); CS + BSA (120 µg/ml + 240 µg/ml); CS + Trehalose (120 µg/ml + 0,2 M); CS + 6His-CDeT11-24 (120 µg/ml + 240 µg/ml); CS + CDeT11-24 (120 µg/ml + 240 µg/ml); CS + ΔK-CDeT11-24 (120 µg/ml + 240 µg/ml). Fehlerbalken geben die Standardabweichung an (n=3). Die Signifikanz bezogen auf CS wurde mit dem Students-t-Test ermittelt (\*P <0,05; \*\*P <0,01).

### 3.3.2 Lactatdehydrogenase-Austrocknungs-Assay

Durch den CS-Austrocknungs-Assay (Abschnitt 3.3.1) konnte eine schützende Funktion von CDeT11-24 belegt werden. Aus diesem Grund wurde durch einen weiteren Austrocknungs-Assay untersucht ob die Ergebnisse in Bezug auf die *in vitro* Schutzfunktion auch Gültigkeit für Lactatdehydrogenase besitzen. Hierzu wurde Lactatdehydrogenase (LDH) mit BSA, Trehalose, 6His-CDeT11-24, CDeT11-24 oder ΔK-CDeT11-24 ausgetrocknet und rehydriert. Für den Assay betrug das molare Verhältnis von LDH zu CDeT11-24 1:2. Wie bei dem CS-Austrocknungs-Assay wurde die Aktivität vor der Austrocknung und jeweils nach jedem Dehydrierungs-/Rehydrierungs-Zyklus bestimmt.

Die Aktivität der LDH wurde ohne zusätzliche Substanzen durch drei Austrocknungszyklen stark herabgesetzt, die Restaktivität betrug nur noch 11 % (Abbildung 3.23). Mit BSA konnte nach dem dritten Austrocknungszyklus nur eine geringe Schutzfunktion beobachtet werden (Restaktivität 18 %). Trehalose hingegen zeigt eine sehr starke Schutzfunktion, das heißt die Enzymaktivität wurde durch die Austrocknung nicht beeinflusst und liegt sogar mit ca. 110 % über dem Ausgangswert vor der Behandlung. Auch 6His-CDeT11-24 und CDeT11-24 schützen vor einem Aktivitätsverlust der LDH. Hierbei ist der Schutz von 6His-CDeT11-24

(Restaktivität 86 %) wie zuvor bei dem CS-Austrocknungs-Assay (Abschnitt 3.2.1) wieder etwas höher als der von CDeT11-24 (Restaktivität ca. 67 %).

Wird  $\Delta$ K-CDeT11-24 in der Gegenwart von LDH austrocknet, liegt die Restaktivität nach drei Austrocknungszyklen nur noch bei ca. 23 %. Der Schutz ist somit geringfügig besser als mit BSA. Grundsätzlich zeigt sich, dass sich eine Deletion des Lysin-reichen Sequenzelements negativ auf die *in vitro* Schutzfunktion von CDeT11-24 auswirkt.

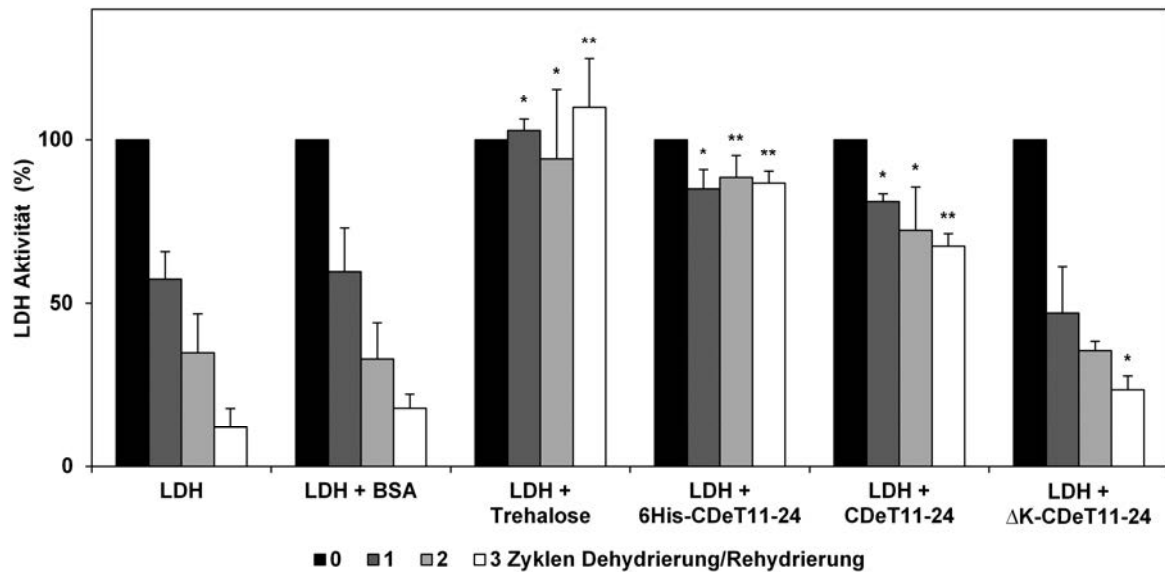


Abbildung 3.23: Lactatdehydrogenase-Austrocknungs-Assay. Lactatdehydrogenase (LDH) Aktivität vor und nach drei Dehydrierungs-/Rehydrierungs-Zyklen. LDH (100  $\mu$ g/ml); LDH + BSA (100  $\mu$ g/ml + 200  $\mu$ g/ml); LDH + Trehalose (100  $\mu$ g/ml + 0,2 M); LDH + 6His-CDeT11-24 (100  $\mu$ g/ml + 200  $\mu$ g/ml); LDH + CDeT11-24 (100  $\mu$ g/ml + 200  $\mu$ g/ml); LDH +  $\Delta$ K-CDeT11-24 + LDH (100  $\mu$ g/ml + 200  $\mu$ g/ml). Fehlerbalken geben die Standardabweichung an (n=3). Die Signifikanz bezogen auf LDH wurde mit dem Students t-Test ermittelt (\*P < 0,05; \*\*P < 0,01).

### 3.4 Identifizierung von CDeT11-24 phosphorylierenden Kinasen

Die Kinetik der Phosphorylierung von CDeT11-24 wurde von Röhrig *et al.* (2006) untersucht. Bereits zu Beginn des Austrocknungsprozesses von *C. plantagineum* kommt es zu einer Induktion der CDeT11-24 Expression. Eine Phosphorylierung konnte jedoch erst bei einem Wassergehalt von unter 30 % RWC beobachtet werden. Durch Experimente mit Kallusgewebe von *C. plantagineum* wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung von CDeT11-24 ABA-unabhängig ist (Facchinelli, 2009). Die späte sowie ABA-unabhängige Phosphorylierung während der Austrocknung wirft die Frage auf, welche Kinase oder Kinasen CDeT11-24 phosphorylieren. Die Identifizierung dieser Proteinkinase/n könnte zu einem besseren Verständnis der Funktion von CDeT11-24 beitragen und einen Ansatz bieten, den ABA-unabhängigen und durch Austrocknung induzierten Signalprozess zu untersuchen.

Aus diesem Grund wurde versucht eine Austrocknungs-abhängige Aktivität von Kinasen in *C. plantagineum* Proteinextrakten nachzuweisen, um anschließend mit Hilfe biochemischer Reinigungsmethoden CDeT11-24 phosphorylierende Proteinkinasen zu isolieren. Als Testmethode für Kinaseaktivität wurde dazu der „In-Gel-Kinase-Assay“ (IGKA; Wooten, 2002) etabliert. Bei diesem Assay wird für die SDS-PAGE der zu untersuchenden Proben ein Polyacrylamidgel verwendet, in das zuvor das Kinase-Substrat einpolymerisiert wurde. Die aufgetrennten denaturierten Proteine werden danach durch mehrere Waschschriffe renaturiert und dann für den eigentlichen Kinase Assay mit  $\gamma\text{-P}^{32}\text{-ATP}$  inkubiert. Anschließend können die aktiven Kinasen radiografisch detektiert werden.

#### 3.4.1 In-Gel-Kinase-Assay mit Myelin Basic Protein

Zur Etablierung des IGKA wurde Myelin Basic Protein (MBP) als Substrat verwendet. MBP wird von vielen Kinasen als Substrat angenommen. Hierzu zählen unter anderem mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen), cAMP-abhängige Proteinkinasen sowie Calmodulin-abhängige Proteinkinasen (Erickson *et al.*, 1990; Carnegie *et al.*, 1973).

Zur Durchführung des Assays wurde aus *C. plantagineum* Pflanzenmaterial mit unterschiedlichem Wassergehalt (100 %, 90 %, 60 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, 2 % RWC) natives Protein isoliert (Abschnitt 2.20.1). Nach der Auftrennung der Proben durch SDS-PAGE und Durchführung des IGKA konnte in den Proteinextrakten von Pflanzen mit einem Wassergehalt von 100 %, 90 % und 60 % RWC eine spezifische Kinaseaktivität detektiert



werden (Abbildung 3.24). Bei einem RWC von 30 % und niedriger konnten hingegen mehrere Signale detektiert werden, die auf die Aktivität mehrerer Kinasen schließen lassen. Die Ergebnisse zeigen, dass während der Austrocknung von *C. plantagineum* mehrere Kinasen aktiviert werden, die MBP phosphorylieren.

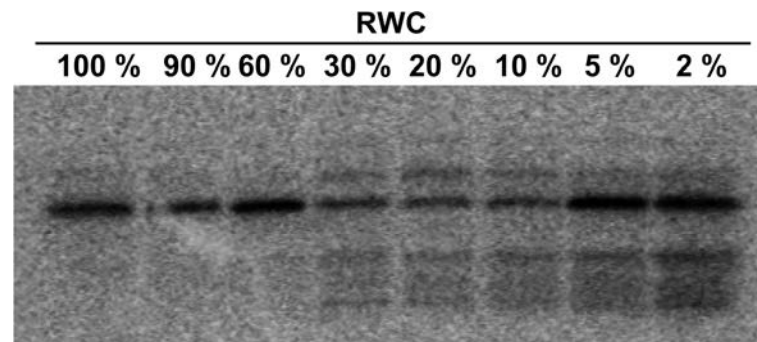


Abbildung 3.24: In-Gel-Kinase-Assay mit *C. plantagineum* Proteinextrakt und MBP als Substrat. Radiogramm des IGKA (12 %) nach der Kinasereaktion. RWC = Relativer Wassergehalt.

### 3.4.2 In-Gel-Kinase-Assay mit 6His-CDeT11-24

Als nächstes wurde rekombinantes 6His-CDeT11-24 als Substratprotein für den IGKA eingesetzt, um spezifische CDeT11-24 Kinasen zu identifizieren. Dazu wurden Proteinproben aus *C. plantagineum* mit einem Wassergehalt von 100 %, 60 %, 30 % und 2 % RWC in einem SDS-Polyacrylamidgel mit dem einpolymerisierten Kinasesubstrat aufgetrennt. Nach dem IGKA konnten mehrere Signale detektiert werden, die zeigen, dass das Substratprotein CDeT11-24 phosphoryliert wurde (Abbildung 3.25). Zwei dieser Signale (Abbildung 3.25, A und B) zeigen eine spezifische Erhöhung der Intensität, die umgekehrt proportional zum abnehmenden RWC ist. Oberhalb der Kinase A in der 2 % RWC Probe wurden weitere schwache Signale detektiert, die auf die Aktivität anderer Kinasen hindeuteten. CDeT11-24 wird im IGKA möglicherweise von mehr als zwei Kinasen phosphoryliert.

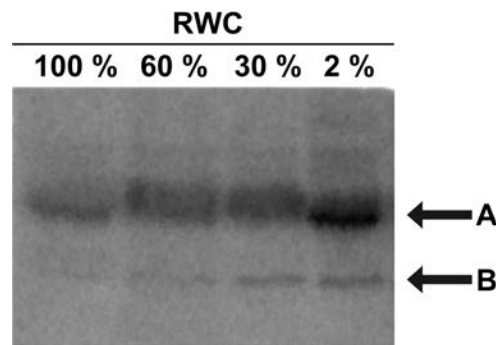


Abbildung 3.25: In-Gel-Kinase-Assay mit *C. plantagineum* Proteinextrakt und 6His-CDeT11-24 als Substrat. Radiogramm des IGKA (12 %). Angaben des RWC (Relativer Wassergehalt). Die Pfeile A und B zeigen die Kinaseaktivität.

Da die detektierten Signale im IGKA jedoch auch durch Autophosphorylierung des pflanzlichen Proteinextrakts entstanden sein könnten, wurden als Kontrolle *in vitro* Kinase Assays durchgeführt. Hierzu wurden von jeder Probe der verwendeten Extrakte zwei Ansätze gemessen (mit und ohne 6His-CDeT11-24). Nach der Reaktion und der Messung der Kinaseaktivität, die hier als *counts per minute* (Zählimpulse pro Minute; cpm) angegeben wird, wurde die Autophosphorylierungsaktivität des Ansatzes ohne Substrat von der Aktivität des Ansatzes mit Substrat abgezogen. Die Messung ergab für alle Proben eine spezifische Aktivität, die auf eine Phosphorylierung von 6His-CDeT11-24 hindeutet (Tabelle 3.1). Die höchste Phosphorylierungsaktivität konnte in der Proteinprobe aus dem Pflanzenextrakt mit einem RWC von 2 % detektiert werden. Dieses Ergebnis stimmt mit dem vorher durchgeführten IGKA überein, bei dem ebenfalls in der 2 % RWC Probe das stärkste Signal detektiert wurde (Abbildung 3.25).

Tabelle 3.1: Relative Kinase Aktivität der *C. plantagineum* Proteinextrakte.

RWC	100 %	60 %	30 %	2 %
Relative Kinase Aktivität (cpm)	225	86	104	562

### 3.4.3 Aufreinigung von CDeT11-24 Kinasen

Die stärkste 6His-CDeT11-24 Phosphorylierung konnte in IGKA und *in vitro* Kinase Assays von Proteinextrakt mit einem Wassergehalt von 2 % RWC detektiert werden (Abschnitt 3.4.2). Aus diesem Grund wurde für die Isolation von CDeT11-24 Kinasen natives Protein aus trockenen *C. plantagineum* Pflanzen (2 % RWC) verwendet. Eine Übersicht der im Folgenden beschriebenen biochemischen Aufreinigung ist in Abbildung 3.26 wiedergegeben. Die Anreicherung erfolgte durch Ammoniumsulfatfällung, Grobreinigung durch Kationen-

Austauschchromatographie (HiTrap SP FF), hydrophobe Interaktionschromatographie (HiTrap Phenyl HP) und eine hochauflösende Kationen-Austauschchromatographie (Mono S). Danach wurde die massenspektrometrische Identifikation der Kinase durchgeführt. Optional wurde zur weiteren Kinaseanreicherung nach der letzten Kationen-Austauschchromatographie ein Kit verwendet. Nach jedem Aufreinigungsschritt wurde die Kinaseaktivität der Fraktionen mit Hilfe von IGKA bzw. *in vitro* Kinase Assays und 6His-CDeT11-24 als Substrat kontrolliert. Die Ergebnisse der Aufreinigung werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

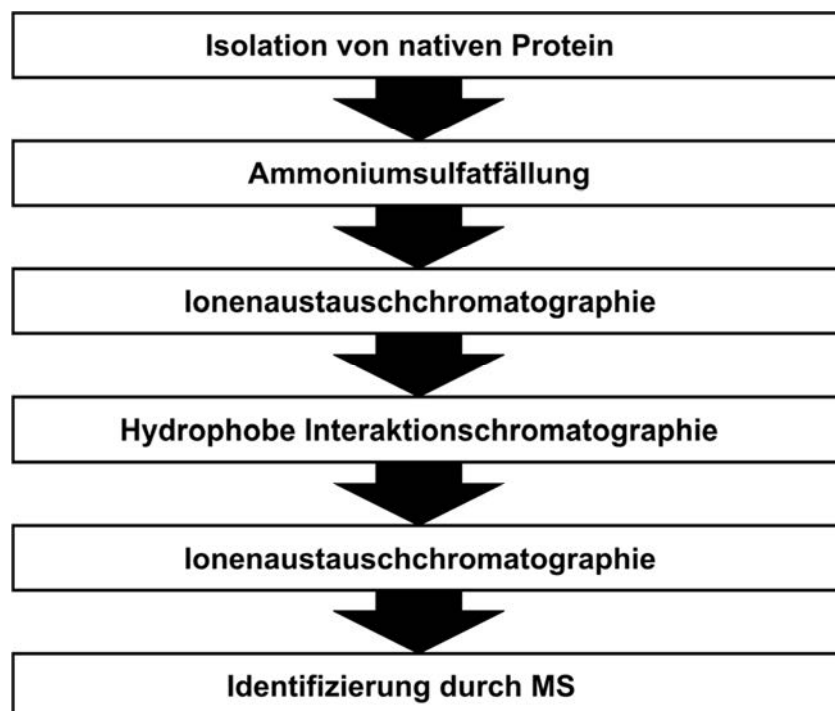


Abbildung 3.26: Aufreinigungsstrategie von CDeT11-24 phosphorylierenden Kinasen

#### 3.4.3.1 Fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat

Als ersten Reinigungsschritt für die Identifizierung von CDeT11-24 Kinasen wurde eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  durchgeführt. Dazu wurde der native Proteinextrakt aus *C. plantagineum* nacheinander mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  bis 20 %, 40 %, 60 % bzw. 80 % gesättigt und das ausgefällte Protein durch Zentrifugation präzipitiert.

Die Fraktionen der Fällung wurden mit dem IGKA auf Kinaseaktivität untersucht. Dabei konnten in den Fällungen mit 40 % und 60 % Ammoniumsulfat-Sättigung Signale detektiert werden (Abbildung 3.27 A). Hierbei zeigte sich, dass die obere Bande sowohl in der 40 % als auch leicht in der 60 % Ammoniumsulfatfällung detektiert wurde. Aus diesem Grund wurde die Methode optimiert, sodass mit einer Fällung von 35-60 % Ammoniumsulfat beide Kinase-Signale zusammen präzipitiert werden konnten. Diese Fällungsfraction wurde dann für die weitere Aufreinigung durch Kationen-Austauschchromatographie eingesetzt.

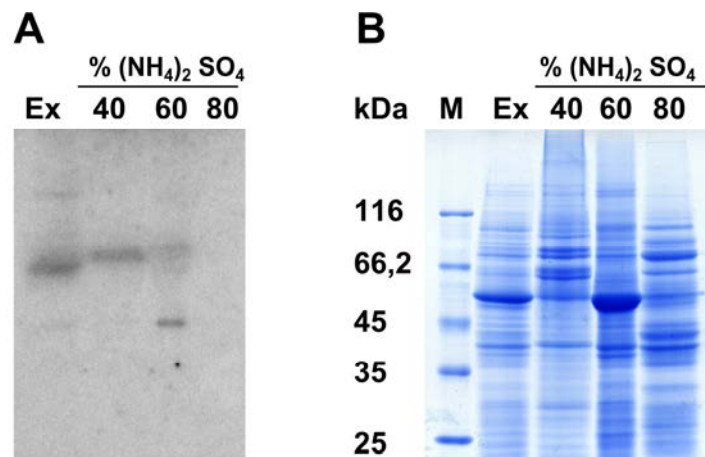


Abbildung 3.27: Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung von 2 % RWC Gesamtextrakt. (A) Radiogramm des IGKA (12 %) mit den Fraktionen der Ammoniumsulfatfällung. (B) SDS-PAGE (12 %) mit Coomassie-Brillant-Blau-Färbung, Proben wie (A). M = Marker, Ex = *C. plantagineum* Proteinextrakt (2 % RWC), 40, 60, 80 = Prozent Ammoniumsulfat der Fällungsschritte.

### 3.4.3.2 Ionenaustauschchromatographie mit HiTrap SP FF

Im nächsten Schritt der Isolation von CDeT11-24 Kinasen wurde eine Ionenaustauschchromatographie durchgeführt. Da für eine Proteinaufreinigung durch Ionenaustauschchromatographie der isoelektrische Punkt des zu isolierenden Proteins ein Entscheidungskriterium für die Auswahl des Säulenmaterials ist, wurde mit nativem *C. plantagineum* Gesamtextrakt (2 % RWC) und CDeT11-24 als Substrat ein 2D IGKA durchgeführt.

Für die Kinasen mit dem stärksten Signal zeigte sich eine isoelektrische Fokussierung im Bereich von pH 7-10 (Pfeil A und Pfeil B, Abbildung 3.28). Beide Proteine wären theoretisch bei einem pH-Wert unter 7 positiv geladen.

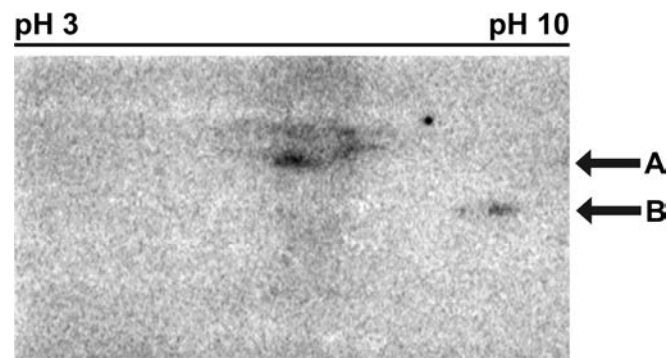


Abbildung 3.28: 2D In-Gel-Kinase-Assay. Für die isoelektrische Fokussierung wurde Protein aus *C. plantagineum* (2 % RWC) eingesetzt. Die Pfeile A und B zeigen die Kinaseaktivität.

Da die Anreicherung der Kinasen zu Beginn der Reinigung zusammen erfolgen sollte, wurde für den nächsten Reinigungsschritt ein Kationen-Austauscher (HiTrap SP FF) und ein Puffer mit einem pH-Wert von 6,25 gewählt (IEX-Puffer, Abschnitt 2.20.3). Die zu isolierenden Proteine wären aufgrund des beobachteten isoelektrischen Punkts bei diesem pH-Wert positiv geladen und würden daher an die verwendete Kationen-Austauschermatrix binden.

Zur Durchführung der Chromatographie wurde die 35-60 % Ammoniumsulfatfällungsfraction (Abschnitt 3.4.3.1) umgepuffert und auf die Säule geladen. Durch einen Waschschriff mit 100 mM NaCl IEX-Puffer wurden zuerst unspezifisch gebundene Proteine entfernt. Danach erfolgte die Elution der gebundenen Proteine mit 600 mM NaCl IEX-Puffer. Die Aktivitätskontrolle der Ionenaustauschchromatographie zeigt, dass die detektierten Signale im Eluat verglichen mit der aufgetragenen Probe (35-60 %) verstärkt wurden (Abbildung 3.29 A; [E]).

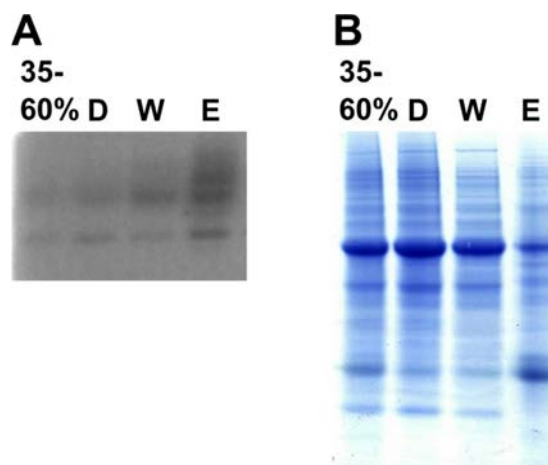


Abbildung 3.29: Ionenaustauschchromatographie mit HiTrap SP FF. (A) Radiogramm des IGKA (12 %) der Ionenaustauschchromatographie. (B) SDS-PAGE (12 %) mit Coomassie-Brillant-Blau-Färbung. 35-60 % = Auftragung, D = Durchfluss, W = Waschschriff, E = Elution.

Die Effizienz der Kationen-Austauschchromatographie ist auch in der Kontrolle der einzelnen Fraktionen durch SDS-PAGE mit Gesamtproteinfärbung durch Coomassie-Brillant-Blau zu sehen (Abbildung 3.29 B).

### 3.4.3.3 Hydrophobe Interaktionschromatographie mit HiTrap Phenyl Sepharose HP

Nach der ersten Kationen-Austauschchromatographie erfolgte die Auftrennung des Eluats durch hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) mit einer HiTrap Phenyl Sepharose HP Säule. Hierzu wurde das aufkonzentrierte Eluat der ersten Kationen-Austauschchromatographie (Abschnitt 3.4.3.2) mit 1,2 M Ammoniumsulfat HIC-Puffer (Abschnitt 2.20.5) umgepuffert und anschließend auf die Säule geladen. Nach einem Waschschriff mit 1,2 mM Ammoniumsulfat HIC-Puffer wurde das an die Säule gebundene Protein schrittweise mit einer sinkenden Salzkonzentration von 0,9 M, 0,6 M, 0,3 M und 0 M Ammoniumsulfat in HIC-Puffer eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend auf Kinaseaktivität getestet. Das komplexe Kinase-Signalmuster der aufgetragenen 600 mM IEX-Fraktion konnte durch die hydrophobe Interaktionschromatographie weiter aufgetrennt werden (Abbildung 3.30 A). Obwohl noch immer sehr viele Proteinbanden in der SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Brillant-Blau-Färbung detektiert werden konnten, zeigt sich dennoch, dass eine Auftrennung stattgefunden hat (Abbildung 3.30 B). Die einzelnen Fraktionen der HIC wurden zur weiteren Aufreinigung für die zweite Kationen-Austauschchromatographie eingesetzt.

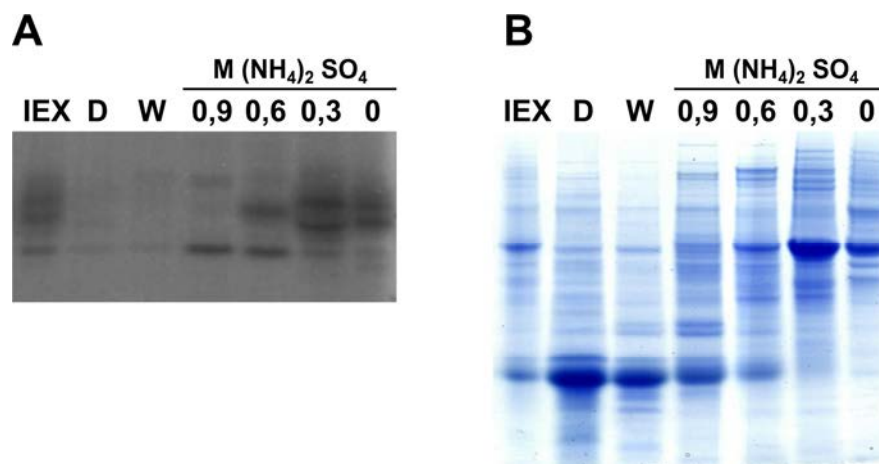


Abbildung 3.30: Hydrophobe Interaktionschromatographie mit HiTrap Phenyl Sepharose HP. (A) Radiogramm des IGKA der HIC-Fractionen mit 6His-CDeT11-24 als Substrat. (B) SDS-PAGE 12 % mit Coomassie-Brillant-Blau-Färbung der HIC-Fractionen. IEX = Auftragung, D = Durchfluss, W = Waschschriff, 0,9; 0,6; 0,3; 0 = Elutionsschritte.

#### 3.4.3.4 Ionenaustauschchromatographie mit Mono S

Der letzte chromatographische Schritt der Kinaseaufreinigung bestand in einer Kationenaustauschchromatographie mit einer Mono S-Säule. Im Gegensatz zur ersten Kationenaustauschchromatographie mit der HiTrap SP FF Säule (Abschnitt 3.4.3.2) besteht die Matrix der Mono S-Säule aus kleineren Partikeln, wodurch sich eine wesentlich höhere Trennschärfe ergibt.

Die Fraktionen der HIC (Abschnitt 3.4.3.3) wurden vor der Chromatographie aufkonzentriert und mit 100 mM NaCl IEX-Puffer umgepuffert. Die Auftrennung der Proben durch die Mono S-Säule erfolgte automatisch mit Hilfe der FPLC und einem linearen Salzgradienten von 100-800 mM NaCl in IEX-Puffer. Anschließend wurden die einzelnen Fraktionen auf Kinaseaktivität getestet. Da nur die Aufreinigungen der 0,6 M und 0,3 M Ammoniumsulfat-HIC Fraktionen zu einer Kinase-Identifizierung führten, werden im Folgenden nur die Ergebnisse dieser Mono S-Läufe gezeigt.

##### Mono S Lauf der 0,6 M HIC Fraktion

Das Chromatogramm der 0,6 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  HIC Fraktion Mono S Auftrennung zeigt, dass der größte Teil der gebundenen Proteine in einem Bereich von 280-480 mM NaCl eluiert wurde (Abbildung 3.31 A). Die Untersuchung der einzelnen Fraktionen auf ihre Kinaseaktivität durch IGKA ergab dabei ein Signal in den Fraktionen 11, 12, 13 und 15, das oberhalb des 35 kDa Proteinstandards lag (Abbildung 3.31 B). Dieses Signal ist am stärksten in der Fraktion 12 und 15. In Fraktion 14 hingegen konnte das Signal nicht detektiert werden. Um die Komplexität der einzelnen Proteinproben zu untersuchen, wurden die Fraktionen in der SDS-PAGE aufgetrennt und eine Gesamtproteinfärbung mit Coomassie-Brillant-Blau durchgeführt (Abbildung 3.31 C). Ein Vergleich der detektierten Proteine oberhalb der 35 kDa Markerbande ergab dabei ein Bandenmuster, das dem der vorher detektierten Kinaseaktivität entspricht (ein leichtes Signal in den Fraktionen 10 bzw. 13, ein starkes Signal für die Fraktionen 11 bzw. 15 und kein Signal in Fraktion 14). Für die Identifizierung der Kinase wurden im Folgenden die positiven Fraktionen erneut durch SDS-PAGE aufgetrennt und in dem Bereich zwischen dem 35 kDa und 45 kDa Markerbande Gelpartikel ausgestochen, die anschließend massenspektrometrisch untersucht wurden. Hierbei konnten drei identifizierte Peptide, mit Hilfe des Programs Mascot, der Casein Kinase 2  $\alpha$  Untereinheit (Anhang 7.4.1) zugeordnet werden.

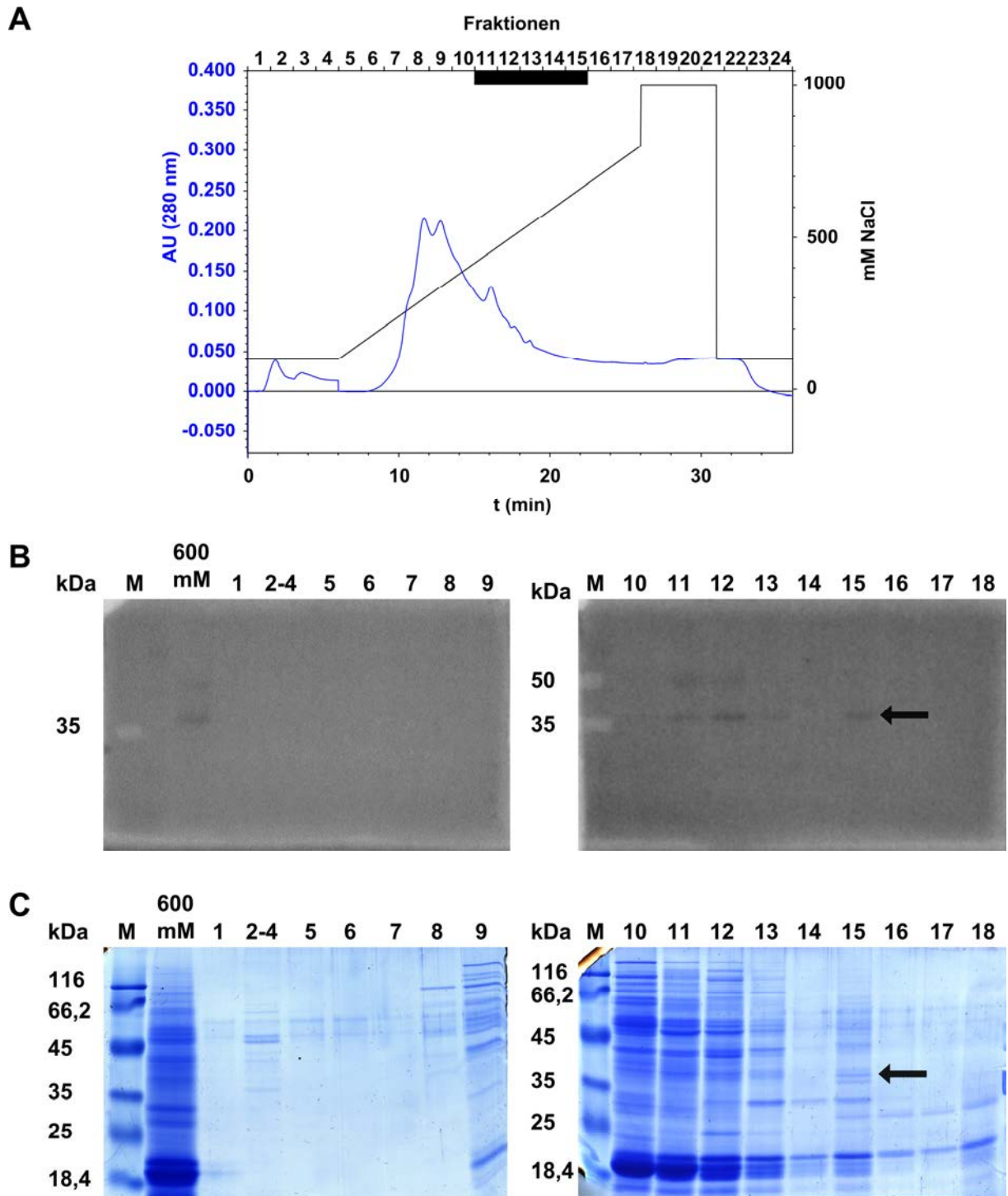


Abbildung 3.31: Chromatographische Reinigung der 0,6 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  HIC Fraktion durch eine Mono S-Säule. (A) Chromatogramm der Auftrennung, dargestellt als Absorptionsspektrum (blau) bei 280 nm unter Angabe des Salzgradienten (schwarz) und der gesammelten Fraktionen. (B) Radiogramm des IGKA (12 %) der Fraktionen aus (A) mit 6His-CDeT11-24 als Substrat. (C) SDS-PAGE (12 %) der Fraktionen aus (A), gefärbt mit Coomassie-Brillant-Blau.



### Mono S Lauf der 0,3 M HIC Fraktion

Für die Auftrennung der 0,3 M HIC Fraktion ergab sich ein Elutionsprofil bei dem der Großteil der an den Kationen-Austauscher gebundenen Proteine ab einer NaCl-Konzentration von 150 mM eluierte (Abbildung 3.32 A). Hierbei zeigte sich ein markantes Maximum der Absorption bei 280 nm im Bereich von ca. 400-480 mM NaCl. Eine Untersuchung der Kinaseaktivität der einzelnen Fraktionen ergab, dass sich das Aktivitätsmaximum ebenfalls in diesem Bereich befindet (Abbildung 3.32 B). Das starke detektierte Signal befindet sich auf der Höhe von 50 kDa. Da die Aktivität im Peak der Elution liegt, zeigt sich in der SDS-PAGE, in der die Proteine mit Coomassie-Brillant-Blau angefärbt wurden, eine Vielzahl von Proteinbanden (Abbildung 3.32 C). Aus diesem Grund konnte das Kinase-Signal nicht eindeutig einer Proteinbande zugeordnet werden. Die massenspektrometrische Analyse der Proteinbanden im Bereich von 50 kDa ergab keine Identifizierung einer Kinase.

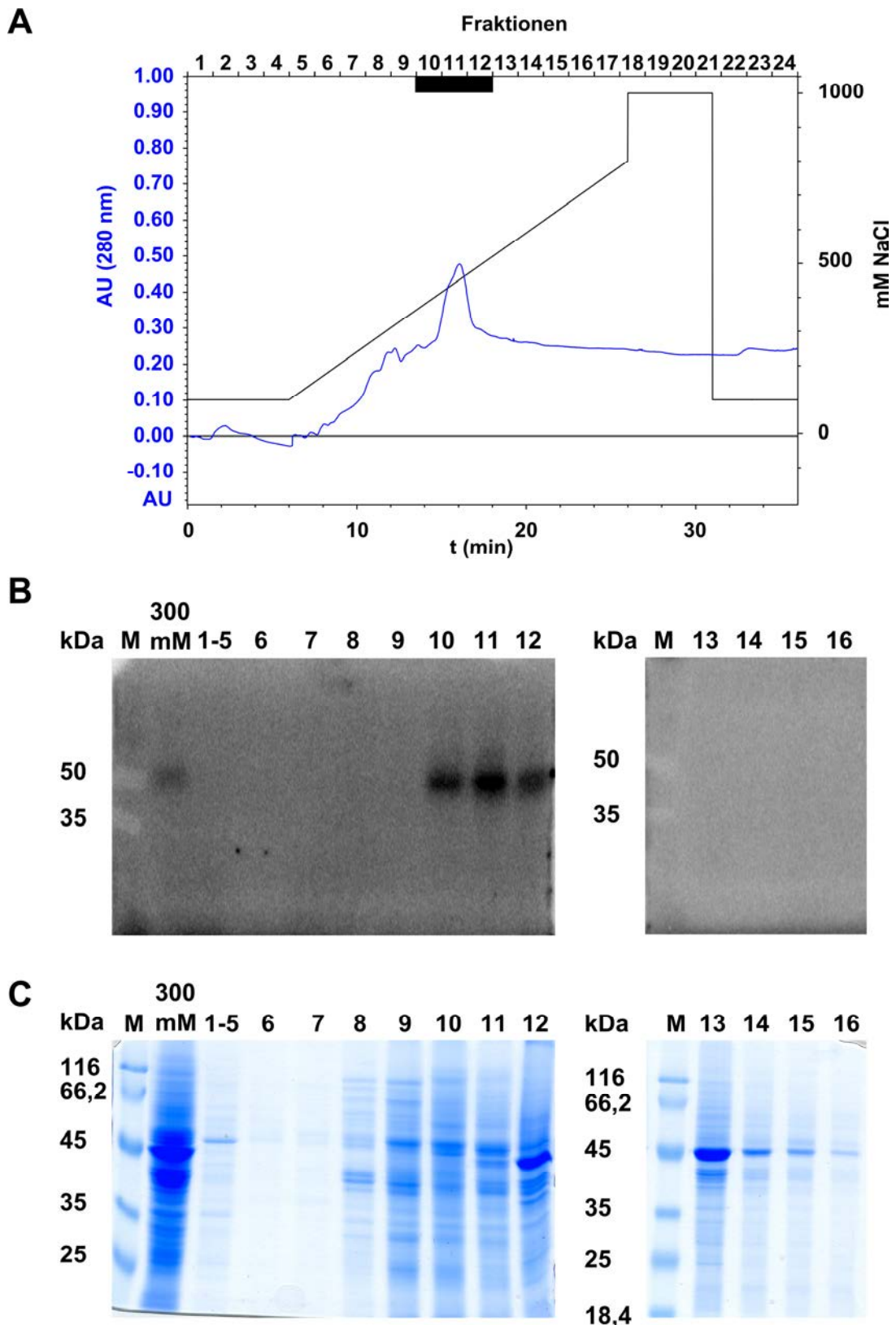


Abbildung 3.32: Chromatographische Reinigung der 0,3 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  HIC Fraktion durch eine Mono S-Säule. (A) Chromatogramm der Auftrennung, dargestellt als Absorptionsspektrum bei 280 nm (blau) unter Angabe des Salzgradienten (schwarz) und der gesammelten Fraktionen. (B) Radiogramm des IGKA (12 %) der Fraktionen aus (A) mit 6His-CDeT11-24 als Substrat. (C) SDS-PAGE (12 %) der Fraktionen aus (A), gefärbt mit Coomassie-Brillant-Blau.

### 3.4.3.5 Spezifische Aktivität der Kinaseanreicherung

Zur Beurteilung der Kinaseanreicherung wurde neben der Aktivitätskontrolle durch IGKA auch die spezifische Aktivität der CDeT11-24 Phosphorylierung in pmol/mg durch *in vitro* Kinase Assays bestimmt (Tabelle 3.2). Die Anreicherung zeigt, dass zwischen der Gesamtproteinextraktion, der Ammoniumsulfatfällung und der ersten Ionenaustauschchromatographie jeweils ca. 50 % der Gesamtaktivität verloren gehen sind. Des Weiteren ist zu sehen, dass sich die spezifische Aktivität nach der hydrophoben Interaktions Chromatographie in die einzelnen Elutionsfraktionen aufspaltet. Daher ist davon auszugehen, dass die detektierte Aktivität von mehreren Kinasen ausgeht. Hierdurch ist eine genaue Berechnung der spezifischen Aktivität erschwert. Aus diesem Grund wurde die Aufreinigung durch die zweite Kationen-Austauschchromatographie nicht mit in die Berechnung einbezogen.

Tabelle 3.2: Anreicherung der Aufreinigung von 6His-CDeT11-24 Kinasen

Aufreinigungs-schritt	Protein (mg)	Gesamt Aktivität (pmol/ min)	Spezifische Aktivität (pmol/ min mg)	Ausbeute (%)	Anreicherung (fach)
Gesamtextrakt	576	1610,9	2,8	100	1
35-60 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	232	884,1	3,8	54,9	1,4
IAC (HiTrap SP FF)	10,6	495,5	46,7	30,8	16,7
HIC 0.9 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2	0,0	0,0	0,0	0,0
HIC 0.6 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,7	9,5	5,6	0,6	2,0
HIC 0.3 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,318	53,3	23,0	3,3	8,2
HIC 0 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,78	71,5	91,6	4,4	32,7

### 3.4.3.6 Kinaseanreicherung

Durch die massenspektrometrische Analyse konnte nur in einer Fraktion des Mono S Laufs mit der 0,6 M HIC Fraktion eine Kinase (CK2 $\alpha$ ) identifiziert werden (Abschnitt 3.4.3.5). Aus diesem Grund wurden aus den Fraktionen der Mono S-Läufe mit einem positiven Signal zusätzlich Kinasen mit dem Kinase Enrichment Kit angereichert.

Die Methode beruht auf der spezifischen Biotinylierung von ATPasen. Die Markierung erfolgt dabei durch das Nukleotid-Derivat Desthiobiotin-ATP oder -ADP, dass durch Aufnahme in das Aktive Zentrum der ATPase die über eine labile Acyl-Phosphat-Bindung gebundene Biotin-Gruppe auf einen Lysin-Rest des Proteins überträgt (Patricelli *et al.*, 2007). Nach Denaturierung des Ansatzes können anschließend mittels Affinitätschromatographie mit Streptavidin die biotinylierten Proteine angereichert werden.

Für die Kinaseanreicherung wurde die Fraktion 12 der 0,3 M HIC Probe nach Auftrennung durch die Mono S-Säule verwendet (Abschnitt 3.4.3.4). In der Kinaseanreicherung zeigt sich, dass aus dem komplexen Proteinmuster der verwendeten Fraktion nur wenige Proteinbanden spezifisch angereichert wurden (Abbildung 3.33, [ATP, ADP]). Die detektierten Banden wurden ausgestochen und zur Identifizierung massenspektrometrisch untersucht. Hierbei konnte in einer Proteinbande (Abbildung 3.33, Pfeil) das Peptid LLEEDPSLVNAR mit einem Molekulargewicht von 1354 Da detektiert werden. Eine Datenbanksuche mit Mascot ergab für dieses Peptid einen Treffer für die *VH1-interacting kinase* (VIK, At1g14000, UniProt Q9XI87, Anhang 7.4.2) einer Ankyrin-Kinase aus *A. thaliana*.

Für die Kinaseanreicherung der anderen positiven Mono S-Fractionen konnte keine Kinase identifiziert werden.

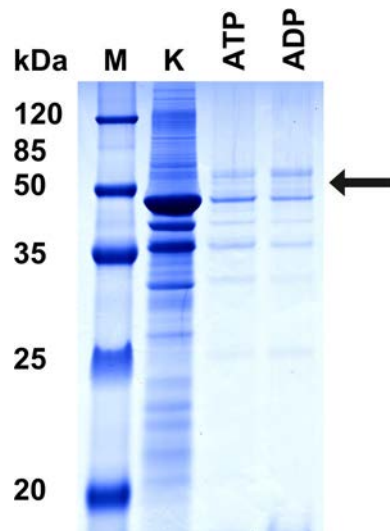


Abbildung 3.33: Kinaseanreicherung. SDS-PAGE (12 %) mit Coomassie-Brillant-Blau-Färbung. Kontrolle der für die Anreicherung verwendeten Fraktion (K) sowie die Eluate der Kinaseanreicherung (ATP, ADP). Der Pfeil markiert die Bande, die durch Massenspektrometrie als Kinase identifiziert wurde.

## 4 Diskussion

Das Stressprotein CDeT11-24 wird in der Wiederauferstehungspflanze *C. plantagineum* während der Austrocknung und durch ABA induziert (Bartels, *et al.*, 1990; Velasco *et al.*, 1998). Aufgrund seiner Ähnlichkeit zu den LEA-Proteinen (Abschnitt 1.6), wird es auch als LEA-like Protein bezeichnet (Abschnitt 1.7). Durch Untersuchungen des Phosphoproteoms von *C. plantagineum* Pflanzen im hydrierten, dehydrierten und rehydrierten Zustand konnte für das CDeT11-24 Protein eine Phosphorylierung nachgewiesen werden. Diese erfolgt bemerkenswerterweise erst in einer späten Phase des Austrocknungsprozesses, bei einem Wassergehalt von unter 30 % RWC (Röhrig *et al.*, 2006). Weiterhin ist die Phosphorylierung im Gegensatz zur Expression des Proteins unabhängig von dem Phytohormon ABA und wird anscheinend durch Austrocknung induziert (Facchinelli, 2009).

Die Funktion des CDeT11-24 Proteins und die Funktion bzw. der Mechanismus der Phosphorylierung sind bislang nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit konnte durch *in vitro* Versuche sowohl eine Lipidbindung an Phosphatidsäure, als auch ein schützender Effekt auf andere Proteine während der Austrocknung durch das CDeT11-24 Protein nachgewiesen werden. Für das Protein konnte weiterhin experimentell, mittels CD-Spektroskopie, eine intrinsisch-ungeordnete Struktur in Lösung belegt werden. Zusätzlich konnte die Transition zu einer teilweise geordneten Sekundärstruktur durch TFE, SDS und Austrocknung beobachtet werden. Im Hinblick auf den Phosphorylierungsmechanismus des CDeT11-24 Proteins wurde durch biochemische Aufreinigung eine mögliche CDeT11-24 Kinase identifiziert. Im nachfolgenden werden die Ergebnisse unter Berücksichtigung der möglichen physiologischen Funktion des CDeT11-24 Proteins während der Austrocknung von *C. plantagineum* diskutiert.

### 4.1 Lipidbindung von CDeT11-24

Für einige LEA-Proteine der Gruppe 2 und 3 konnte bereits eine Bindung an Phospholipide nachgewiesen werden (Koag *et al.*, 2003; Thalhammer *et al.*, 2010). Die Bindung der LEA-Proteine der Gruppe 2 wird dabei durch das K-Segment vermittelt (Koag *et al.*, 2009; Eriksson *et al.*, 2011). Da das CDeT11-24 Protein in seinem N-terminalen Bereich das Lysinreiche Sequenzelement trägt (Abbildung 1.3), welches dem K-Segment sehr ähnlich ist, wurde untersucht, ob das Protein ebenfalls lipidbindende Eigenschaften besitzt.

#### 4.1.1 Das CDeT11-24 Protein bindet *in vitro* an Phosphatidsäure

Die Untersuchung einer möglichen Lipidbindung des CDeT11-24 Proteins erfolgte zunächst mit Hilfe von PLO-Assays. Hierdurch konnte die Bindung des rekombinanten CDeT11-24 Proteins (Abschnitt 3.1.4.1) an Phosphatidsäure nachgewiesen werden (Abbildung 3.8 A). Eine Bindung an negativ-, zwitterionisch- und ungeladenen Lipide wurde nicht detektiert. Weiterhin wurde die Bindung des CDeT11-24 Proteins an Phosphatidsäure auch durch Liposomen-Assays bestätigt (Abbildung 3.8 B). Aufgrund der negativen Ladung des Proteins bei einem physiologischen pH-Wert von 7 (Abschnitt 3.1.1), ist es bemerkenswert, dass es an ein ebenfalls negativ geladenes Phospholipid bindet.

Da nur eine Bindung an Phosphatidsäure detektiert wurde und nicht für die anderen Lipide, kann man von einer hohen Spezifität ausgehen. Die Spezifität der Bindung grenzt das CDeT11-24 Protein zu den LEA-Proteinen der Gruppe 2 deutlich ab, für die eine Bindung an unterschiedliche, negativ geladene Phospholipide beschrieben wurde (Eriksson und Harryson, 2011). Als Beispiel sei auf das DHN1 Protein aus *A. thaliana* verwiesen, dass an Phosphatidsäure, Phosphatidylglycerin und Phosphatidylserin bindet (Koag *et al.*, 2003).

Phosphatidsäure ist als einfachstes Phosphoglycerid ein zentrales Zwischenprodukt der Synthese von Membran- und Speicherlipiden (Athenstaedt und Daum, 1999). Des Weiteren hat Phosphatidsäure in Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren eine große Bedeutung als Signalmolekül (Wang *et al.*, 2006). In Pflanzen ist Phosphatidsäure unter anderem an der durch Stress induzierten Signaltransduktion von Trockenheit, Salz, Kälte, Verletzung und Pathogen-Infektionen beteiligt (Testerink und Munnik, 2005). Zusätzlich besitzt Phosphatidsäure aber auch eine regulatorische Funktion in Bezug auf die Entwicklung und das Wachstum der Pflanze (Wang, 2005). Unter Normalbedingungen liegt die Phosphatidsäure-Konzentration in der pflanzlichen Membran bei ca. 1 % (Welti *et al.*, 2002). Durch das Phytohormon ABA und Stress, wie z.B. Trockenheit, kann jedoch ein rascher Anstieg der Phosphatidsäure-Konzentration beobachtet werden (Katagiri *et al.*, 2001). Die Bildung von Phosphatidsäure erfolgt dabei durch Phospholipasen der Gruppe D (PLD) und Phosphorylierung von Diacylglycerin, durch Diacylglycerin-Kinasen (DGK; Meijer und Munnik *et al.*, 2003). Auch in *C. plantagineum* erfolgt ein Anstieg der Phosphatidsäure-Konzentration durch Austrocknung von 0,17 % im hydrierten Zustand auf 1,37 % im dehydrierten Zustand (unveröffentlichte Daten, Francisco Gasulla). Die Phosphatidsäure-Konzentration erhöht sich also gleichzeitig mit der Akkumulation des CDeT11-24 Proteins. Diese positive Korrelation, als auch die nachgewiesenen spezifische Bindung *in vitro* machen eine Interaktion *in vivo* sehr wahrscheinlich.

Durch die Assays mit gemischten Liposomen aus Phosphatidsäure und Phosphatidylcholin konnte gezeigt werden, dass die Bindungsaffinität des CDeT11-24 Proteins, im Vergleich zu anderen Phosphatidsäure-bindenden Proteinen, nicht sehr hoch ist. Beispielsweise zeigte die von Dubots *et al.* (2010) untersuchte Monogalactosyldiacylglycerin Synthase (MGD1) aus *A. thaliana* immer noch eine vollständige Bindung des eingesetzten Proteins bei einem Phosphatidylcholin zu Phosphatidsäure Verhältnis von 95:5. Unterhalb eines Phosphatidylcholin zu Phosphatidsäure Verhältnisses von 50:50 wurde hingegen weniger als die Hälfte des für den Assay eingesetzten CDeT11-24 Proteins gebunden (Abbildung 3.8 B). Aufgrund der niedrigen Affinität kann davon ausgegangen werden, dass *in vivo* vermutlich lediglich ein geringer Anteil, der in der Zelle vorliegenden CDeT11-24 Proteinmoleküle an Phosphatidsäure bindet. Aus der niedrigen Affinität und hohen Spezifität der CDeT11-24 Bindung an Phosphatidsäure ergibt sich jedoch auch ein Vorteil, nämlich der einer hohen Flexibilität gegenüber Interaktionspartnern. Es ist hervorzuheben, dass gerade diese beobachteten Eigenschaften bezüglich der Affinität und Spezifität, als ein wichtiges Charakteristikum intrinsisch-ungeordneter Proteine diskutiert wird (Dyson und Wright, 2005; Marin und Ott, 2012).

Außerdem ist es denkbar, dass die physiologischen Bedingungen während der Austrocknung in *C. plantagineum*, wie beispielsweise die Ionenkonzentration, der pH-Wert, die Anwesenheit von Osmolyten oder interagierende Proteine, einen zusätzlichen Einfluss auf die Affinität und Spezifität der CDeT11-24 Bindung an Phosphatidsäure haben könnten.

#### **4.1.2 Das Lysin-reiche Sequenzelement ist Bestandteil der Phosphatidsäure Bindung des CDeT11-24 Proteins**

Das N-terminal gelegene Lysin-reiche Sequenzelement ist der einzige positiv geladene Sequenzabschnitt des CDeT11-24 Proteins und besitzt eine hohe Homologie zum K-Segment der Gruppe 2 LEA-Proteine (Abschnitt 3.1.1). Durch die Projektion des Kernbereichs dieses Sequenzabschnitts als Helixrad konnte eine räumliche Trennung sowohl der positiv geladenen polaren Lysin-Reste als auch der hydrophoben Aminosäuren gezeigt werden, die den Merkmalen einer amphipathischen Helix entspricht (Abbildung 3.1 B). Durch diesen Grenzflächenübergang wird sowohl eine Interaktion mit der polaren und hydrophilen Kopfgruppe als auch mit den hydrophoben Fettsäuren eines Lipids begünstigt. Weiterhin zeigte der Vergleich des CDeT11-24 Proteins mit anderen Proteinen der CAP160-Familie (Abschnitt 1.7) eine hohe Homologie im Bereich des Lysin-reichen Sequenzelements



(Abbildung 3.1 A). Diese evolutionäre Konservierung führt zu der Annahme, dass dieser Sequenzbereich eine wichtige funktionelle Bedeutung für diese Proteingruppe besitzt.

Um experimentell zu untersuchen, ob das Lysin-reiche Sequenzelement an der Lipidbindung des CDeT11-24 Proteins beteiligt ist wurde das Deletionskonstrukt  $\Delta$ K-CDeT11-24 erzeugt, heterolog exprimiert und aufgereinigt (Abschnitt 3.1.5.1). Die durch die Deletion des Lysin-reichen Sequenzelements resultierenden veränderten physikalisch-chemischen Eigenschaften des  $\Delta$ K-CDeT11-24 Proteins machten sich bereits bei der Aufreinigung des Proteins bemerkbar. Das Protein zeigte wesentlich schwächere Wechselwirkungen mit der Kationenaustauscher-Matrix der verwendeten MonoS-Säule, als das CDeT11-24 Protein. Aus diesem Grund wurde zusätzlich eine alternative Reinigungsstrategie mittels Gelchromatographie etabliert.

Mit dem PLO-Assay konnte für das  $\Delta$ K-CDeT11-24 Protein keine Lipidinteraktion detektiert werden (Abbildung 3.10 A). Ein anderes Ergebnis zeigte hingegen der Liposomen-Assay (Abbildung 3.10 B). In diesem war eine Bindung des  $\Delta$ K-CDeT11-24 Proteins zu detektieren, welche jedoch im Vergleich zum Gesamtkonstrukt des Proteins, deutlich herabgesetzt war (vergleiche Abbildung 3.8 B). Da nur noch eine verminderte Bindung des  $\Delta$ K-CDeT11-24 Proteins an die Liposomen zu beobachten war, kann davon ausgegangen werden, dass das Lysin-reiche Sequenzelement an der Phosphatidsäure-Bindung des CDeT11-24 Proteins beteiligt ist. Weiterhin ergeben sich Hinweise darauf, dass noch mindestens eine weitere Domäne an Phosphatidsäure bindet.

In der Literatur wurden bisher mehrere Proteine beschrieben, die an Phosphatidsäure binden (Wang *et al.*, 2006). Ein Vergleich der Phosphatidsäure-Bindungsdomänen untereinander ergab jedoch nahezu keine Sequenzübereinstimmungen (Stace und Ktistakis, 2006). Fast alle Bindungsdomänen enthielten allerdings mindestens eine der basischen Aminosäuren Lysin, Arginin oder Histidin (Testerink und Munnik *et al.*, 2005). Eine Ausnahme bildet dabei die Bindungsdomäne der katalytischen Untereinheit der Protein Phosphatase 1 (PP1 $\gamma$ ), deren minimale Bindungssequenz (DFTLMCSFQIL) keine basischen Aminosäuren und somit auch keine positive Ladung enthält (Jones *et al.*, 2005). Dieses Beispiel veranschaulicht, dass für die Identifizierung von weiteren Phosphatidsäure-Bindungsdomänen des CDeT11-24 Proteins auch Bereiche ohne basische Aminosäuren berücksichtigt werden müssen.

Um den selektiven Bindungsmechanismus der Phosphatidsäure-Bindungsdomänen, die Lysin, Arginin oder Histidin enthalten, zu erklären, wurde von Kooijman *et al.* (2007) das auf NMR-Daten basierende „*electrostatic/hydrogen bond switch*“ Modell vorgeschlagen

(Abbildung 4.1). Mit diesem Modell lässt sich ebenfalls die Bindung des Lysin-reichen Sequenzelements an Phosphatidsäure erklären und veranschaulichen.

Durch die Phosphomonoester-Gruppe besitzt die Phosphatidsäure, im Gegensatz zu vielen anderen anionischen Phospholipiden, abhängig von der Membranzusammensetzung zwei Säurekonstanten ( $pK_{s1} = 2 < \text{pH} < 4$ ;  $pK_{s2} = 6 < \text{pH} < 9$ ; Kooijman *et al.*, 2005a). Daher trägt die Kopfgruppe der Phosphatidsäure entweder eine Ladung von  $-1e$  oder  $-2e$ . In dem Modell wird davon ausgegangen, dass der Phosphomonoester daher bei einem neutralen pH-Wert (pH 7) einfach negativ geladen ist ( $-1e$ ). Durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit der Aminogruppe einer basischen Aminosäure wird die Kopfgruppe weiterhin deprotoniert, wodurch die Ladung auf  $-2e$  sinkt (Abbildung 4.1 A). Die Kopfgruppe liegt nun in einem dianionischen Zustand vor, wodurch die elektrostatische Interaktion erhöht wird und die Bindung der Domäne über eine weitere positiv geladene Aminosäure stattfindet. Aufgrund der kegelförmigen Struktur der Phosphatidsäure, die aus der kleinen Kopfgruppe resultiert, können nach der elektrostatischen Bindung hydrophobe Aminosäuren in die Lipid-Doppelschicht inserieren und die Bindung verstärken (Abbildung 4.1 B).

Die Bindung des CDeT11-24 Proteins könnte somit wie folgt in mehreren Phasen ablaufen: 1) Durch einen Lysin-Rest des Lysin-reichen Sequenzelements, erfolgt die Deprotonierung der Phosphatidsäure. 2) Dies bewirkt eine erhöhte elektrostatische Bindung mit einem weiteren Lysin-Rest. 3) Die hydrophoben Aminosäurereste, deren Gruppierung durch die Helixrad-Projektion gezeigt wurde, interagieren mit den Fettsäureresten der Lipid-Doppelmembran, wodurch die Phosphatidsäure-Protein-Interaktion zusätzlich verstärkt wird. Durch das „*electrostatic/hydrogen bond switch*“ Modell lässt sich außerdem erklären, warum das CDeT11-24 Protein bei einem pH Wert von  $> 7$  wesentlich schwächer an die Vesikel bindet als bei einem sauren pH-Wert (Abbildung 3.8 C). Der Grund hierfür liegt möglicherweise in der zweiten Säurekonstante der Phosphatidsäure. Der Phosphomonoester liegt bei  $\text{pH} > 7$  vermehrt in zweifach protonierter Form vor. Daher trägt das Phospholipid keine Ladung, wodurch die initiale elektrostatische Assoziation mit dem positiv geladenen Lysin-reichen Sequenzelement nicht stattfindet.

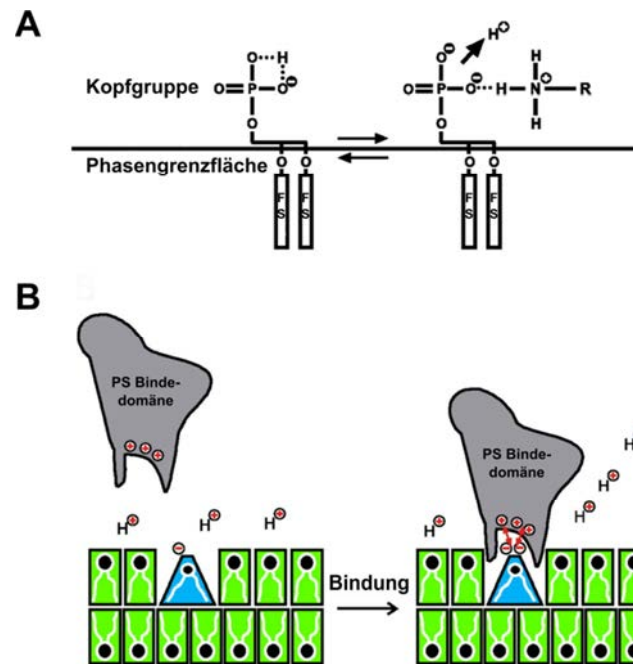


Abbildung 4.1: Darstellung des „*electrostatic/hydrogen bond switch*“ Modells. (A) Phosphatidsäure im ungebundenen Zustand (Ladung  $-1e$ ) und nach Wasserstoffbrückenbindung mit dem primären Amin eines Lysin-Rests (Ladung  $-2e$ ). Intra- und intermolekulare Wasserstoffbrücken sind durch unterbrochene Linien dargestellt. (B) Interaktion einer positiv geladenen Bindungsdomäne (grau) mit Phosphatidsäure (blau, kegelförmig) innerhalb einer Lipid-Doppelmembran mit Phosphatidylcholin (grün, zylindrische). Die Änderung der Phosphatidsäure Ladung ist unter Berücksichtigung des „*electrostatic/hydrogen bond switch*“ Modells angezeigt. Die roten Pfeile geben die Wechselwirkungen zwischen positiven und negativen Ladungen an. PS = Phosphatidsäure; FS = Fettsäure; (modifiziert nach Kooijman *et al.*, 2007).

#### 4.1.3 Die Bindung des 6His-CDeT11-24 Proteins an Phosphatidsäure wird durch den 6His-Tag verursacht

Zu Beginn der experimentellen Untersuchung einer möglichen Lipidbindung des CDeT11-24 Proteins wurde für die Bindungsstudien das rekombinante Proteinkonstrukt 6His-CDeT11-24 verwendet (Abschnitt 3.1.2.2). Die Ergebnisse des PLO-Assays zeigten für das Konstrukt eine schwache Bindung an alle geladenen Phospholipide und eine starke Bindung an Phosphatidsäure (Abbildung 3.3). Um die lipidbindenden Sequenzbereiche zu identifizieren, wurde das 6His-CDeT11-24 Protein mit der Protease ArgC verdaut und für den Liposomen-Assay eingesetzt. Eine Identifizierung der an die Liposomen gebundenen Peptide ergab, dass vor allem ein aus einem Partialverdau hervorgehendes und durch den Expressionsvektor kodierendes Peptid gebunden hat (Abbildung 3.4; 3.5). Die Bindung des 6His-CDeT11-24 über das 6His-Tag kann daher als artifiziell angesehen werden.

Generell ist die Aufreinigung von rekombinantem Protein mit Hilfe des 6His-Tags, eine weitverbreitete Methode (Hengen, 1995). So wurden Proteine mit 6His-Tag auch schon in mehreren Studien zur Untersuchung Phosphatidsäure-bindender Proteine verwendet (Jones *et*

*al.*, 2005; Lu und Benning, 2009; Dubots *et al.*, 2010). Es wurde in diesen Arbeiten zwar durch Kontrollexperimente mit Proteinkonstrukten ohne Affinitäts-Tag belegt, dass das 6His-Tag keinen Einfluss auf die Phosphatidsäure-Bindung hat, dennoch wird der Aminosäure Histidin, wegen ihrer basischen Eigenschaften, aber auch eine bedeutende Rolle bei der Bindung an Phosphatidsäure zugesprochen (Wang *et al.*, 2006).

Interessanterweise konnte in einem Kontrollexperiment mit dem Aldehyd-Dehydrogenase Proteinkonstrukt 6His-ALDH3H1 ebenfalls eine Bindung an Liposomen aus Phosphatidsäure nachgewiesen werden (persönliche Kommunikation mit Herrn Pierog). Es ist zu erwähnen, dass für die Herstellung des 6His-ALDH3H1-Konstrukts eine ähnliche Klonierungsstrategie verwendet wurde, wie für das 6His-CDeT11-24 Protein. Aus diesem Grund trägt das 6His-ALDH3H1 Protein N-terminal auch die aus dem Expressionsvektor pET28 resultierende Aminosäuresequenz MGSSHHHHHSSGLVPRGSHM (Petersen, 2007). Generell kann eine mögliche Bindung des ALDH3H1 Proteins ohne 6His-Tag natürlich nicht ausgeschlossen werden. Dennoch lässt sich unter Berücksichtigung der Arbeiten, in denen dem 6His-Tag hingegen keine bindende Funktion zugewiesen wurde (Jones *et al.*, 2005; Lu und Benning, 2009; Dubots *et al.*, 2010), darüber spekulieren, dass die beobachtete Bindung des 6His-CDeT11-24 und 6His-ALDH3H1 Proteins weniger durch das 6His-Tag allein, sondern nur im Gesamtkontext des 21 Aminosäure langen N-terminalen Peptids erfolgt.

#### 4.1.4 Das CDeT11-24 Protein induziert die Aggregation von Liposomen

Durch die mikroskopische Untersuchung von Liposomen mit rekombinantem CDeT11-24 Protein konnte eine starke Liposomen-Aggregation beobachtet werden (Abbildung 3.11). Dieser Einfluss auf Membranvesikel wurde schon zuvor für einige LEA-Proteine der Gruppe 2 beschrieben (Božović, 2007; Eriksson *et al.*, 2011). Interessanterweise erfolgte keine Aggregatbildung durch das Deletionsprotein  $\Delta$ K-CDeT11-24. Diese Beobachtung unterstreicht die Bedeutung des Lysin-reichen Sequenzelements für die Lipidbindung des CDeT11-24 Proteins.

Durch die beobachtete Aggregation erscheint eine mögliche membranstabilisierende Funktion des CDeT11-24 Proteins während der Austrocknung, wie sie für das LEA-Protein LEAM beschrieben ist (Tolleter *et al.*, 2010), zunächst als sehr unwahrscheinlich.

Es ist jedoch auch möglich, dass die Ursache für den beobachteten Effekt auf die experimentellen Bedingungen des Liposomen-Assays zurückzuführen sind. Ein Einfluss von Phosphatidsäure auf die negative Membran-Krümmung ist belegt (Kooijman *et al.*, 2005b).

Die verwendeten Liposomen aus 100 % Phosphatidsäure stehen daher vermutlich unter einer großen Spannung. Eine Bindung des CDeT11-24 Proteins könnte somit eine spontane Aggregation hervorrufen, die unter *in vivo* Bedingungen nicht erfolgen würde.

Gegen einen reinen *in vitro* Effekt spricht jedoch die Arbeit von Eriksson *et al.* (2011), in der auch eine Aggregation von isolierten Thylakoidmembranen durch das Gruppe 2 LEA-Protein Lti30 beobachtet werden konnte. Um die Bedeutung der Membranaggregation durch das CDeT11-24 eindeutig zu verifizieren, sollten daher zunächst ebenfalls weitere Liposomenbindungs-Assays mit *ex vivo* Membranen durchgeführt werden.

#### 4.1.5 Hypothetische Funktion der CDeT11-24 Bindung an Phosphatidsäure

Anhand der hier erzielten Ergebnisse und der Literatur (Wise und Tunnacliffe, 2004; Kooijman *et al.*, 2007) lassen sich für die CDeT11-24 Phosphatidsäure-Bindung sowohl eine Schutzfunktion als auch eine Signalfunktion postulieren.

Da in der vorliegenden Arbeit eine proteinstabilisierende Funktion des CDeT11-24 Proteins während der Austrocknung experimentell *in vitro* nachgewiesen wurde (Abschnitt 3.3), ist es vorstellbar, dass das Protein ebenfalls integrale und periphere Membranproteine vor eine Schädigung schützt.

Eine zusätzliche schützende Funktion ergibt sich möglicherweise weiterhin aus der Ladung des Proteins, die bei einem physiologischen pH-Wert stark negativ ist. Es ist zu erwarten, dass durch eine Bindung des Proteins, der negativ geladene C-terminale Teil weitestgehend von der ebenfalls negativ geladenen Membran abgestoßen wird. Dabei könnte sich ein sterischer Pufferbereich ausbilden, der eine Schildfunktion für die Membran besitzt. Eine solche molekulare Schildtheorie wurde bereits zur Erklärung der proteinstabilisierenden Funktion der LEA-Proteine aufgestellt (Wise und Tunnacliffe, 2004; Goyal *et al.*, 2005). Aggregierte Proteine des Zytosols könnten so durch die hydrophilen und negativ geladenen Seitenketten des CDeT11-24 Proteins, abgeschirmt werden. Hierdurch könnte eine Schädigung der Membran und Membran assoziierte Proteine verhindert werden. Eine direkte Schutzfunktion auf die Integrität und Stabilität der Membranen ist angesichts der beobachteten Liposomenaggregation hingegen unwahrscheinlich (Abschnitt 3.1.6). Dennoch kann diese aufgrund der experimentellen Bedingungen des *in vitro* Assays nicht ausgeschlossen werden.

Da Phosphatidsäure einen besonderen Stellenwert als Signalmolekül besitzt stellt sich die Frage, ob das CDeT11-24 Protein aufgrund der spezifischen Bindung, vielleicht auch an Signalprozessen innerhalb der Zelle beteiligt ist.

Der Mechanismus der Signalfunktion von Phosphatidsäure liegt primär in der Regulation der Aktivität von zytosolischen Proteinen, durch Rekrutierung dieser an die Membran. Ein gut untersuchtes Beispiel hierfür ist die Proteinphosphatase ABI1, die an der Unterdrückung der ABA-Perzeption beteiligt ist (Abschnitt 1.5; Gosti *et al.*, 1999). Durch das primäre ABA-Signal wird die PLD $\delta$  aktiviert, die die Phosphatidsäure-Konzentration innerhalb der Membran erhöht (Testerink und Munnik, 2005; Abbildung 4.2 A). Hierdurch werden Phosphatidsäure-bindende Proteine an die Membran rekrutiert. Unter anderem auch das Protein ABI1, das daraufhin nicht mehr seine Funktion als negativer Regulator des ABA-Signalwegs im Zytosol erfüllt (Abbildung 4.2 B; Zhang *et al.*, 2004). Durch ABA kommt es ebenfalls zur Expression von Stressproteinen, wie z.B. CDeT11-24 (Bartels *et al.*, 1990). Da das CDeT11-24 Protein, auch an Phosphatidsäure bindet, könnte es mit den anderen Bindeproteinen um die Bindestelle an der Membran konkurrieren. Hierdurch wäre auch eine Feedback-Kontrolle im ABA-Signaltransduktionsweg möglich (Abbildung 4.2 C).

Die These, dass durch die CDeT11-24 Phosphatidsäure Bindung die ABA-Antwort abgeschaltet wird, ist sehr hypothetisch. Allgemein ist daher hervorzuheben, dass zur Klärung der biologischen Funktion des CDeT11-24 Proteins in Hinblick auf seine Phosphatidsäure-Bindung, weiterführende Untersuchungen notwendig sind. Die Identifizierung des CDeT11-24 Proteins als Phosphatidsäurebindepotein bietet jedoch einen ersten Anhaltspunkt und einen sehr guten Ansatz für die Aufklärung der biologischen Funktion des Proteins.

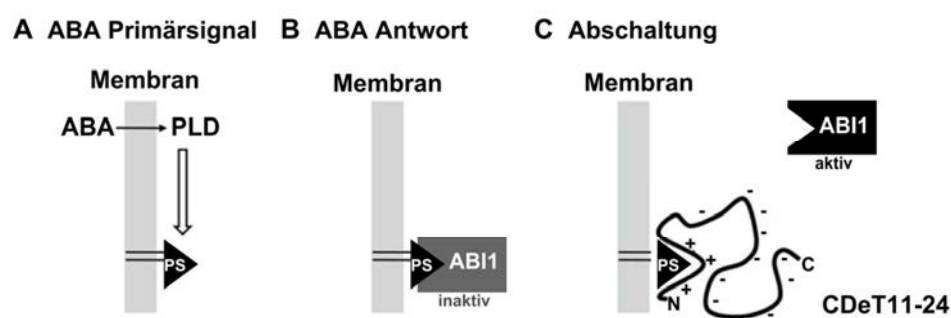


Abbildung 4.2: Hypothetische Funktion von CDeT11-24 innerhalb des ABA-Signalwegs. (A) Durch ABA werden Phospholipasen der Gruppe D (PLD) aktiviert, die Phosphatidsäure (PS) produzieren. Hierdurch erhöht sich die Phosphatidsäure-Konzentration innerhalb der Membran. (B) Phosphatidsäure bindende Proteine, wie zum Beispiel ABI1, werden aus dem Zytosol an die Membran rekrutiert. (C) Das durch ABA exprimierte CDeT11-24 Protein konkurriert mit ABI1 um die Bindung an Phosphatidsäure. Hierdurch wird ABI1 freigesetzt, wodurch es wieder als negativer Regulator im Zytosol wirken kann und die ABA-Antwort abgeschaltet wird (modifiziert nach Zhang *et al.*, 2004 und Petersen *et al.*, 2012).

## 4.2 *In vitro* Schutzfunktion von CDeT11-24

In mehreren Publikationen konnte durch *in vitro* Versuche für bestimmte LEA- und andere hydrophile Proteine ein Schutzeffekt auf die Aktivität von Enzymen bei Austrocknung nachgewiesen werden (Goyal *et al.*, 2005; Grelet *et al.*, 2005; Reyes *et al.*, 2005; Haaning *et al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob das CDeT11-24 Protein ebenfalls eine proteinstabilisierende Funktion während der Austrocknung besitzt.

### 4.2.1 Das CDeT11-24 Protein schützt Enzyme vor einem Aktivitätsverlust durch Austrocknung

Die Ergebnisse der durchgeführten Austrocknungs-Assays mit Citratsynthase und Lactatdehydrogenase zeigen (Abbildung 3.22; 3.23), dass die verwendeten Proteinkonstrukte 6His-CDeT11-24 und CDeT11-24 die Enzymaktivität effizient vor einer Schädigung durch Austrocknung schützen. Die ermittelte Restaktivität der getesteten Enzyme nach drei Austrocknungs-Zyklen ergab dabei einen Schutzeffekt der vergleichbar mit den ermittelten Werten anderer Proteine aus vorangegangenen Studien ist (Goyal *et al.*, 2005; Haaning *et al.*, 2008). Es ist zwar sehr wahrscheinlich, dass die in den Assays verwendeten Enzyme nicht die natürlichen Zielproteine von CDeT11-24 *in vivo* sind. Jedoch ist es naheliegend, dass die Stabilisierung von Proteinen während der Austrocknung von *C. plantagineum* eine Funktion des CDeT11-24 Proteins sein könnte. Hierdurch könnte das Protein bei der Dehydrierung der Pflanze dazu beitragen die Funktion von Proteinen, wie z.B. Enzymen, bei einem niedrigen Wassergehalt aufrechtzuerhalten. Zusätzlich würde eine solche funktionelle Stabilisierung von Proteinen auch eine schnelle Wiederherstellung der physiologischen Aktivität während der Rehydrierung von *C. plantagineum* begünstigen.

Der Mechanismus der beobachteten Schutzfunktion des CDeT11-24 Proteins lässt sich mit Hilfe der für die LEA-Proteine entwickelten molekularen Schildtheorie erklären (Wise und Tunnacliffe, 2004; Goyal *et al.*, 2005), die davon ausgeht, dass das Schutzprotein als physischer Puffer eine Aggregation teilweise denaturierter Proteine miteinander verhindert. Obwohl in den durchgeführten Austrocknungs-Assays nicht das Ausmaß der Proteinaggregation ermittelt wurde, ist zu erwarten, dass sich eine Aggregation umgekehrt proportional zum Erhalt der Enzymaktivität verhält. Daher ist es naheliegend, dass in den Assays mit den Proteinkonstrukten 6His-CDeT11-24 und CDeT11-24 eine Aggregation der getesteten Enzyme nur in einem begrenzten Ausmaß stattgefunden hat.

Ein weiterer Erklärungsansatz der proteinstabilisierenden Wirkung geht davon aus, dass ähnlich wie bei den Hitzeschockproteinen (Wang *et al.*, 2004), die LEA-Proteine als molekulare Chaperone fungieren und so eine aktive Rückfaltung, also Renaturierung von denaturierten Proteinen, bewirken (Kovacs *et al.*, 2008). Diese Aktivität würde jedoch eine stabile Interaktion des Schutzproteins mit dem zu schützenden Protein voraussetzen und konnte bisher für LEA-Proteine nicht nachgewiesen werden (Chakrabortee *et al.*, 2012). Auch für das CDeT11-24 Protein konnten in wässriger Lösung bisher keine Interaktionspartner identifiziert werden (Facchinelli, 2009). Diese Tatsache schließt jedoch nicht aus, dass das CDeT11-24 Protein während der Austrocknung mit anderen Proteinen interagieren könnte.

#### 4.2.2 Das Lysin-reiche Sequenzelement ist ausschlaggebend für die Schutzfunktion des CDeT11-24 Proteins

Interessanterweise zeigen die Assays mit dem CDeT11-24 Protein ohne Lysin-reichen Sequenzelement ( $\Delta$ K-CDeT11-24), sowohl für Citratsynthase als auch für Lactatdehydrogenase, einen stark herabgesetzten Schutzeffekt, der vergleichbar mit dem von BSA ist (Abbildung 3.22; 3.23). Dies belegt, dass neben der in dieser Arbeit bewiesenen Beteiligung des Lysin-reichen Sequenzelements an der Phosphatidsäure Bindung (Abschnitt 3.1.5.2), dieser Sequenzbereich auch für die proteinstabilisierende Funktion des CDeT11-24 Proteins von entscheidender Bedeutung ist. Ein ähnliches Ergebnis wurde bereits für die Deletion der K-Segmente eines Gruppe 2 LEA-Proteins nachgewiesen. So zeigten Versuche mit dem RcDhn5 Protein aus *Rhododendron* ohne K-Segmente und Lactatdehydrogenase, einer starke Reduktion der Fähigkeit die Enzymaktivität von Lactatdehydrogenase vor einem Aktivitätsverlust durch Gefrieren zu schützen (Reyes *et al.*, 2008).

Aus Sichtweise der molekularen Schild theorie könnte der Verlust der Schutzfunktion auf einen rein elektrostatischen Effekt beruhen, da die Deletion des Lysin-reichen Sequenzbereichs den Verlust des einzigen bei einem physiologischen pH-Wert (pH 7), positiv geladenen Sequenzbereichs des CDeT11-24 Proteins darstellt. In Bezug auf eine Funktion als molekulares Chaperon könnte durch die Deletion des Sequenzbereichs, für den die Ausbildung einer amphipathischen Helix vorhergesagt wurde (Abschnitt 3.1.1), aber auch eine direkte Proteininteraktion unterbunden werden.



### 4.3 Strukturuntersuchungen des CDeT11-24 Proteins durch CD-Spektroskopie

Die Struktur des CDeT11-24 Proteins wurde bisher nur *in silico* untersucht (Röhrig *et al.*, 2006; Facchinelli, 2009) und dabei, wie auch in dieser Arbeit (Abbildung 3.12), als intrinsisch ungeordnet vorhergesagt. Um diese Vorhersagen experimentell zu belegen und die Struktur des CDeT11-24 Proteins tiefergehender zu charakterisieren, wurden Strukturanalysen mittels CD-Spektroskopie durchgeführt.

#### 4.3.1 Die Phosphorylierung hat keinen Einfluss auf die intrinsisch ungeordnete Struktur des CDeT11-24 Proteins

Von Röhrig *et al.* (2006) wurde in Bezug auf die Phosphorylierung des CDeT11-24 Proteins die Regulation einer möglichen Coiled-Coil-Interaktion des Proteins diskutiert. Die Phosphorylierung könnte dabei auch eine Änderung der Struktur des Proteins hervorrufen. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde sowohl phosphoryliertes als auch nicht-phosphoryliertes CDeT11-24 Protein aus *C. plantagineum* isoliert bzw. *in vitro* phosphoryliert (Abschnitt 3.2.2.1 und 3.2.2.2), und spektroskopisch untersucht.

Durch die Struktur-Analyse des CDeT11-24 Proteins aus *C. plantagineum* und des rekombinanten 6His-CDeT11-24 Proteins in Lösung konnte für beide Proteine ein CD-Spektrum aufgezeichnet werden, das den charakteristischen Merkmalen eines intrinsisch ungeordneten Proteins entspricht (Abbildung 3.16). Hierdurch werden sowohl die *in silico* Analysen von Röhrig *et al.* (2006) und Facchinelli (2009) bestätigt, als auch die in dieser vorliegenden Arbeit durchgeführten computergestützten Vorhersage (Abbildung 3.12). Weiterhin beweisen die Daten, dass das 6His-Tag bzw. die durch den Expressionsvektor kodierte Sequenz keinen Einfluss auf die intrinsisch ungeordnete Struktur des Proteins hat.

Die phosphorylierten Varianten der Proteine zeigen ebenfalls eine intrinsisch ungeordnete Struktur (Abbildung 3.16). Ein direkter Vergleich der Spektren der nicht-phosphorylierten Proteine mit denen der phosphorylierten ergibt zwar kleine Unterschiede hinsichtlich der Intensität der Elliptizität, diese beruhen wahrscheinlich jedoch nicht auf einem Strukturunterschied und sind vermutlich durch Konzentrationsunterschiede der eingesetzten Proteine zu erklären (persönliche Kommunikation Prof. Harryson). Daher kann die Aussage getroffen werden, dass keine zumindest durch CD-Spektroskopie detektierbare, Änderung der Struktur durch die Phosphorylierung erfolgt.

Diese Beobachtung wurde ebenfalls in vorangegangenen Arbeiten für die nicht-phosphorylierten und phosphorylierten Gruppe 2 LEA-Proteine, aus *A. thaliana* (Cor47, Lti31) und *Thellungiella salsuginea* (TsDHN-1, TsDHN-2) gemacht (Mouillon *et al.*, 2008; Rahman *et al.*, 2011). Interessanterweise konnte in der Arbeit von Rahman *et al.* (2011) zusätzlich gezeigt werden, dass die phosphorylierten Proteine TsDHN-1 und Ts-DHN-2 in Gegenwart von Liposomen eine höher geordnete Sekundärstruktur annehmen, als die nicht-phosphorylierten Versionen der beiden Proteine. Weiterhin konnten die phosphorylierten TsDHN-1 und Ts-DHN-2 Proteine Aktinfilamente polymerisieren. Die nicht-phosphorylierten Proteine zeigten diese Eigenschaft hingegen nicht.

Dieses Beispiel zeigt, dass auf Basis der hier durchgeführten Strukturanalyse durch CD-Spektroskopie eine mögliche Strukturänderung des CDeT11-24 Proteins durch die Phosphorylierung *in vivo* nicht ausgeschlossen wird, da es denkbar ist, dass diese Strukturänderung erst durch Bindung des CDeT11-24 Proteins an Interaktionspartner, wie Lipide oder Proteine, erfolgt und diese Bindungs-induzierte Transition sowohl positiv als auch negativ durch die Phosphorylierung beeinflusst werden könnte.

#### 4.3.2 Das CDeT11-24 Protein hat die Neigung zur „*disorder to order*“-Transition

Für einige LEA-Proteine wurde eine „*disorder to order*“-Transition durch die Helix-induzierenden Substanzen SDS und TFE (Lisse *et al.*, 1996; Soulages *et al.*, 2002; Grelet *et al.*, 2005; Shih *et al.*, 2004), sowie Austrocknung nachgewiesen (Goyal *et al.*, 2003; Shih *et al.*, 2004; Boudet *et al.*, 2006). Um die Eigenschaften der intrinsisch ungeordneten Struktur des CDeT11-24 Proteins tiefergehender zu untersuchen, wurde daher ebenfalls die Neigung des Proteins zur Ausbildung definierter Sekundärstrukturen getestet.

Durch die Titration des 6His-CDeT11-24 Proteins mit TFE wurde eine Änderung der Struktur von Random-Coil- zu  $\alpha$ -Helix-Konformation beobachtet (Abbildung 3.17). Die Sekundärstruktur änderte sich dabei von 15 %  $\alpha$ -Helix-Konformation ohne TFE, zu 35 %  $\alpha$ -Helix-Konformation mit 35 % TFE. Auch für die Proteine CDeT11-24 und  $\Delta$ K-CDeT11-24 wurde durch die Titration das gleiche Ergebnis bezüglich TFE-Konzentration und  $\alpha$ -Helix-Anteil ermittelt (Abbildung 3.20). Die Ergebnisse belegen damit, dass das CDeT11-24 Protein eine dynamische Konformation besitzt und trotz seiner intrinsisch ungeordneten Struktur unter bestimmten Umständen teilweise eine geordnete Struktur annehmen kann.

Die Helix-induzierende Eigenschaft von TFE besteht wahrscheinlich darin, dass es sich an das Protein anlagert und Wasser verdrängt. Hierdurch werden vermutlich intramolekulare

Wasserstoffbrücken und elektrostatische Interaktionen gebildet, was zu der Ausbildung einer definierten Sekundärstruktur führt (Roccatano *et al.*, 2002). Es wird einerseits darüber spekuliert, dass durch TFE die Zustände einer Bindung des intrinsisch ungeordneten Proteins an Interaktionspartner imitiert werden (Hite *et al.*, 2012). Andererseits kann man spekulieren, dass sich durch TFE auch eine Strukturänderung des CDeT11-24 Proteins ähnlich der durch eine Dehydrierung imitieren lässt. Denn auch durch Dehydrierung wird die Hydrathülle eines Proteins reduziert, wodurch intramolekulare Interaktionen wahrscheinlicher werden und eine Strukturänderung stattfinden kann (Prestrelski *et al.*, 1993). Zur Unterstützung dieser These sei auf die molekular-dynamische Simulation der Austrocknung des AavLEA1 Proteins verwiesen, die die „*disorder to order*“-Transition durch Entfernen der Hydrathülle veranschaulicht (Abschnitt 1.6.3; Li und He, 2009).

Neben der Strukturänderung durch TFE konnte auch durch SDS der  $\alpha$ -Helix-Anteil des 6His-CDeT11-24 Proteins erhöht werden (Abbildung 3.18). Hierdurch wird die mit TFE beobachtete dynamische Konformation des Proteins durch ein weiteres unabhängiges Experiment bestätigt. Eine durch SDS induzierte Strukturänderung wurde bereits für einige Gruppe 2 LEA-Proteine beschrieben (Ismail *et al.*, 1999; Koag *et al.*, 2003). Da SDS-Mizellen Oberflächen ausbilden, die vergleichbar mit Biomembranen aus Phospholipiden sind (Yamamoto *et al.*, 2004) wurde von Ismail *et al.* (1999) für die SDS induzierte Transition der Struktur, auch eine mögliche Strukturänderung durch Bindung an SDS diskutiert. Weitere Untersuchungen mit Gruppe 2 LEA-Proteinen ergaben, dass lipidbindende Proteine eine etwas stärkere Strukturänderung zeigten, als Proteine die nicht an Lipide binden (Soulages *et al.*, 2003; Eriksson und Harryson, 2011). Eine Strukturänderung durch Bindung des 6His-CDeT11-24 Proteins an SDS ist hingegen eher unwahrscheinlich und konnte mit den aufgenommenen CD-Spektren nicht eindeutig verifiziert werden (persönliche Kommunikation Prof. Harryson).

Als dritter Ansatz zur Untersuchung der „*disorder to order*“-Transition wurden CD-Spektren von getrocknetem CDeT11-24 Protein aufgenommen. Diese ergaben für das dehydrierte CDeT11-24 Protein eine Veränderung von Random-Coil- zu  $\alpha$ -Helix-Konformationen. Im hydrierten und rehydrierten Zustand hingegen war die Struktur des Proteins wie zuvor beobachtet intrinsisch ungeordnet (Abbildung 3.21). Dieses Ergebnis unterstützt die oben aufgestellte Hypothese zur dynamischen Konformation des CDeT11-24 Proteins.

Weiterhin ist es auf Basis der ermittelten *in vitro* Daten durchaus denkbar, dass das CDeT11-24 Protein seine Struktur auch während der Austrocknung von *C. plantagineum* ändert. Hieraus ergibt sich, dass eine mögliche Interaktion des CDeT11-24 Proteins mit

Proteinen oder Lipiden vielleicht erst durch diese austrocknungsbedingte Konformationsänderung stattfindet. Diese These ist nicht neu, sondern wurde zuvor schon im Zusammenhang mit den LEA-Proteinen diskutiert (Tunnacliffe und Wise, 2005, Shih *et al.*, 2010; Goyal *et al.*, 2003; Shih *et al.*, 2004; Boudet *et al.*, 2006).

#### 4.3.3 Die Struktur des Lysin-reichen Sequenzelements

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Lysin-reiche Sequenzelement an der Bindung des CDeT11-24 Proteins an Phosphatidsäure beteiligt ist (Abschnitt 3.1.5.2) und für den proteinstabilisierenden Effekt des Proteins notwendig ist (Abschnitt 3.3). Aus diesem Grund wurde das Deletionskonstrukt  $\Delta$ K-CDeT11-24 auch auf seine Struktur hin untersucht. Dies geschah vor allem im Hinblick auf die durch *in silico* Daten gestützte Vorhersage des Sequenzbereichs als amphipathischen Helix (Abschnitt 3.1.1), da hierdurch ein Strukturunterschied im Vergleich zum Protein ohne Deletion erwartet wurde.

Die CD-Spektren für das  $\Delta$ K-CDeT11-24 Protein in Lösung zeigten keine Abweichung von denen, des CDeT11-24 Proteins ohne Deletion (Abbildung 3.19). Beide Proteine sind intrinsisch ungeordnet. Auch die Titration des  $\Delta$ K-CDeT11-24 Proteins mit TFE ergab keine Abweichung bezüglich der Ausbildung  $\alpha$ -helikaler Strukturen im Vergleich zum CDeT11-24 Gesamtkonstrukt (Abbildung 3.20). Für beide Proteine wurde durch 30 % (v/v) TFE ein Maximum von ca. 35 %  $\alpha$ -Helix-Anteil nachgewiesen.

Durch die *in silico* Vorhersage der Sekundärstruktur wurde zwar für den Bereich des Lysin-reichen Sequenzelements eine helikale Struktur vorhergesagt (Abbildung 3.13), diese konnte jedoch nicht bestätigt werden.

Da dem  $\Delta$ K-CDeT11-24 Protein durch die Deletion 25 Aminosäuren der Gesamtsequenz (422 Aminosäuren) fehlen, hätte die Deletion des Lysin-reichen Sequenzelements maximal einen Strukturunterschied von ca. 6 % des  $\alpha$ -helikalen Anteils hervorrufen können. Für das K-Segment der Gruppe 2 LEA-Proteine, das dem Lysin-reichen Sequenzelement sehr ähnlich ist (Abschnitt 3.1), wurde durch CD-Spektroskopie eine intrinsisch ungeordnete Struktur in Lösung nachgewiesen (Mouillon *et al.*, 2006). Des Weiteren ließ sich für das K-Segment durch 90 % TFE nur eine Transition der Struktur von < 10 %  $\alpha$ -Helix-Anteil induzieren. Bemerkenswert ist dabei, dass Gruppe 2 LEA-Proteine mit vielen K-Segment-Wiederholungen, im Vergleich zu anderen Proteinen der Gruppe nur eine relativ geringe Strukturänderung durch TFE zeigen (Mouillon *et al.*, 2006). Aus diesem Grund wird von Mouillon *et al.* (2006) postuliert, dass die amphipathische  $\alpha$ -Helix Struktur, die für das

K-Segment vorhergesagt wird, sich nur durch Bindung an einen spezifischen biologischen Liganden ausbildet. Diese Schlussfolgerung wird dabei besonders durch das Verständnis von intrinsisch unstrukturierten Bindedomänen gestützt, für die eine „disorder to order“-Transition durch Bindung mehrfach belegt wurde (Tompa, 2005; Mohan *et al.*, 2006). Für das Lysin-reiche Sequenzelement des CDeT11-24 Proteins kann daher vermutet werden, dass nur durch die Bindung an Phosphatidsäure eine „disorder to order“-Transition stattfindet und sich hierdurch eine Konformationsänderung ergibt, die der vorhergesagten amphipathischen Helix entspricht.

#### **4.4 Isolierung und Identifikation von CDeT11-24 Kinasen**

Die erst in einer späten Phase der Austrocknung erfolgende Phosphorylierung des CDeT11-24 Proteins zeigt (Röhrig *et al.*, 2006), dass sogar noch bei einem geringen Wassergehalt von ca. 30 % RWC eine spezifische Regulation physiologischer Prozesse in *C. plantagineum* stattfindet. Es wäre berechtigt davon auszugehen, dass diese Regulation eine wichtige Funktion bei der Ausbildung der Austrocknungstoleranz besitzt. Die Eigenart der CDeT11-24 Phosphorylierung liegt jedoch nicht nur in der „späten“ Kinaseaktivität, sondern auch in der Induktion dieser posttranslationalen Modifikation, die höchst wahrscheinlich ABA-unabhängig ist (Facchinelli, 2009). Eine wichtige Voraussetzung, um sowohl den Mechanismus dieser Regulation als auch die Funktion der Phosphorylierung des CDeT11-24 Proteins aufzuklären, ist die Identifikation der beteiligten Kinasen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, CDeT11-24 Kinasen biochemisch aufzureinigen und zu identifizieren.

##### **4.4.1 Beurteilung der biochemischen Aufreinigung von CDeT11-24 Kinasen**

Zu Beginn der Kinase Aufreinigung wurde der In-Gel-Kinase-Assay als Nachweismethode etabliert. Der Assay mit MBP als Substrat zeigte dabei eine Kinaseaktivität für alle eingesetzten Gesamtproteinproben aus *C. plantagineum* mit unterschiedlichem RWC (Abbildung 3.24). Unterhalb eines RWC von 30 % konnten deutlich mehr Signale detektiert werden als in den Proben aus Pflanzenmaterial mit einem höheren RCW. Dieses Ergebnis zeigt, dass unter 30 % RWC Kinasen aktiviert werden, die in Pflanzen mit einem höheren RWC anscheinend nicht aktiv sind. Das Ergebnis ist neben der Phosphorylierung des CDeT11-24 Proteins (Röhrig *et al.*, 2006) ein weiterer Hinweis darauf, dass in der späten

Phase der Austrocknung von *C. plantagineum* noch komplexe Regulationsmechanismen erfolgen.

Im Gegensatz zum In-Gel-Kinase-Assay Standardprotokoll wurde als nächstes das rekombinante 6His-CDeT11-24 Protein erfolgreich als spezifisches Substrat eingesetzt (Abschnitt 3.4.2). Die Ergebnisse des Assays zeigten Kinaseaktivitäten bei einem RWC von 100 % und 60 % (Pfeil A, Abbildung 3.25). Bei einem Wassergehalt von 30 % und 2 % RWC konnte deutlich eine zusätzliche Kinase detektiert werden (Pfeil B, Abbildung 3.25). Weiterhin zeigten sich mehrere sehr schwache Banden, die die Aktivität weiterer Kinasen erahnen lassen. Von Röhrig *et al.* (2006) wurden für das CDeT11-24 Protein insgesamt sieben Phosphorylierungsstellen identifiziert. Aus diesem Grund ist es möglich, dass *in vivo* mehrere Kinasen das Protein phosphorylieren. Dies wird weiterhin durch die Detektion mehrerer Kinasen im In-Gel-Kinase-Assay, mit 6His-CDeT11-24 Protein als Substrat, belegt. Die spezifische Phosphorylierungsaktivität der Kinasen wurde im Weiteren mit *in vitro* Kinase Assays kontrolliert (Tabelle 3.1), wobei das stärkste Signal in der Probe mit 2 % RWC detektiert wurde.

Für die biochemische Aufreinigung wurde natives Gesamtprotein von *C. plantagineum* Pflanzenmaterial mit einem RWC von 2 % verwendet. Als Nachweismethode für die biochemische Reinigung wurden In-Gel Kinase Assays verwendet. Hierdurch konnte neben der Enzymaktivität auch das ungefähre Molekulargewicht der aktiven Kinasen detektiert werden. Eine Schwierigkeit der hier durchgeführten biochemischen Aufreinigung, lag in der Strategie, während der ersten Reinigungsschritten möglichst viele Kinasen zusammen anzureichern. Daher wurden sowohl für die Ammoniumsulfatfällung (35-60 % Ammoniumsulfat, Abschnitt 3.4.3.1) als auch für die Elution der ersten Kationen-Austauschchromatographie (600 mM NaCl IEX-Puffer, Abschnitt 3.4.3.2) Bedingungen gewählt, die nur eine grobe Reinigung erlaubten. Hierdurch konnten jedoch mehrere Kinasesignale erfolgreich gemeinsam angereichert werden (Abbildung 3.27, Abbildung 3.29). Für die weitere Aufreinigung wurde das Eluat der ersten Kationen-Austauschchromatographie durch hydrophobe Interaktionschromatographie aufgetrennt. Dabei wurden die Signale der Kinasen in mehrere Elutionsfraktionen unterteilt (Abbildung 3.30), womit eine feinere Aufreinigung durch die folgende zweite Kationen-Austauschchromatographie ermöglicht wurde. In Bezug auf die Kontrolle der Anreicherung durch die *in vitro* Kinase Assays (Tabelle 3.2) ist anzumerken, dass die detektierte spezifische Aktivität innerhalb der Ionenaustauschchromatographie Probe von allen CDeT11-24 Kinasen stammt, wo hingegen

diese Signale durch die hydrophobe Interaktionschromatographie in die einzelnen Fraktionen unterteilt worden sind.

Als letzter chromatographischer Schritt wurde eine zweite Kationen-Austauschchromatographie durchgeführt (Abschnitt 3.4.3.4), durch die eine weitere Auftrennung der Fraktionen der hydrophoben Interaktionschromatographie erfolgte. In den IGKA zeigt sich, dass durch Auftrennung der Fraktionen 0,6 M HIC und 0,3 M HIC pro Fraktion nur noch eine Kinase detektiert wurde (Abbildung 3.31, 3.32). Die SDS-PAGE mit Coomassie-Brillant-Blau-Färbung dieser Fraktionen zeigen jedoch immer noch mehrere Proteinbanden. Obwohl Kinasen aus den Fraktionen, in denen ein Signal detektiert wurde, durch MS identifiziert werden konnten, wäre eine weitere Anreicherung durch einen zusätzlichen Reinigungsschritt sicherlich möglich gewesen. Hierdurch hätte sich höchstwahrscheinlich aber auch ein weiterer Aktivitätsverlust ergeben.

#### 4.4.2 Identifizierung von CDeT11-24 Kinasen

Für die massenspektrometrische Identifizierung von CDeT11-24 Kinasen wurden die Fraktionen mit einem detektierten Signal des Mono S-Säulenlaufs eingesetzt (Abschnitt 3.4.3.4). Hierdurch konnte in dem Mono S-Lauf der 600 mM HIC Fraktion die Casein Kinase II  $\alpha$ -Untereinheit identifiziert werden. Eine Kinase Identifizierung aus den weiteren Mono S-Säulenläufe war leider nicht möglich (Daten nicht gezeigt). In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass das Genom von *C. plantagineum* nicht sequenziert ist. Daraus resultiert, dass trotz Detektion eines Peptides durch MS die Zuordnung zu einer Protein- bzw. Gensequenz, die letztendlich zu der eigentlichen Identifizierung führt, deutlich komplizierter ist als bei einem sequenzierten Organismus. Diese Tatsache wird zusätzlich durch das polyploide Genom von *C. plantagineum* erschwert (Bartels und Salamini, 2001), da hierdurch von einem Gen mehrere Allele vorliegen. Für die Identifizierung durch MS hat daher besonders die vor Kurzem durchgeführte *C. plantagineum* Transkriptom-Studie von Rodriguez *et al.* (2010) Bedeutung, in der 15000 Sequenzen UniProt-Einträgen zugeordnet werden konnten.

Um jedoch weitere Kinasen zu identifizieren, erfolgte eine zusätzliche Kinaseanreicherung der positiven Mono S-Lauf-Fraktionen, die auf einer spezifischen Bindung von biotinylierten Nukleotidderivaten beruht (Abschnitt 3.4.3.6). Mit dieser Methode konnte eine weitere Kinase identifiziert werden, die ein Homolog der VIK aus *A. thaliana* ist.

## 4.5 CDeT11-24 Kinasen

Die identifizierte CK2 $\alpha$  ist Bestandteil des CK2 Tetramers, das sich aus zwei katalytischen  $\alpha$ -Untereinheiten und zwei regulatorischen  $\beta$ -Untereinheiten zusammensetzt (Ahmed *et al.*, 2002). Sie wird oft als universelle Kinase beschrieben, da sie in allen Eukaryoten konserviert und an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt ist (Pinna 2002; Meggio, 2003). Bisher wurden mehr als 300 Proteine beschrieben, die durch die CKII phosphoryliert werden (Litchfield, 2003). In Pflanzen ist die CK2 unter anderem an der Vermittlung der abiotischen Stressantwort beteiligt (Riera *et al.*, 2003; Mulekar *et al.*, 2012). Als Substrat der CK2 wurden unter anderem die LEA-Proteine der Gruppe 2 ermittelt (Heyen *et al.*, 2002; Alesheik *et al.*, 2005; Mehta *et al.*, 2009). Weiterhin wurde für das CDeT11-24 Protein ebenfalls eine Phosphorylierung durch die CK2 vorhergesagt (Röhrig *et al.*, 2006), die in der vorliegenden Arbeit durch *in vitro* Kinase Assays bestätigt werden konnte (Abschnitt 3.2.2.2).

Um daher eine mögliche Phosphorylierung des CDeT11-24 Proteins und eine *in vivo* Bedeutung der CK2 $\alpha$  zu verifizieren, wurde die Kinase kloniert und als rekombinantes 6His-CK2 $\alpha$  Protein isoliert (Tierbach, unveröffentlicht; Pierog, 2011). Durch *in vitro* Kinase-Assays mit der CK2 $\alpha$  und dem CDeT11-24 Protein war es jedoch nicht möglich eine Phosphorylierung nachzuweisen, obwohl eine Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit ohne regulatorische Untereinheit bestätigt ist (Matsushita *et al.*, 2002, Xavier *et al.*, 2012). Um auszuschließen, dass das detektierte Signal während der Aufreinigung auf eine Autophosphorylierung zurückzuführen ist, oder die rekombinante CK2 $\alpha$  keine Aktivität besitzt, könnte daher als nächstes die Aktivität des 6His-CK2 $\alpha$  Proteins mit einem etablierten Substrat getestet werden.

Als zweite potentielle CDeT11-24 Kinase wurde das *C. plantagineum* Homolog der VIK (cpVIK) aus *A. thaliana* identifiziert (Abschnitt 3.4.3.6; Anhang 7). Diese Kinase gehört zu der MAPKKK (Abschnitt 1.8) Subgruppe C1, deren charakteristisches Merkmal das N-terminal vorkommende Ankyrin-Motiv ist (Ichimura *et al.*, 2002). Dieses aus 33 Aminosäuren bestehende Motiv bildet eine Struktur von zwei antiparallelen  $\alpha$ -Helices sowie einer  $\beta$ -Hairpin, tritt meist in Wiederholungen auf und ist dafür bekannt an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt zu sein (Gorina und Pavletich, 1996; Sedgwick und Smerdon, 1999; Rubtsov und Lopina, 2000).

In der Pflanzengattung *Medicago* wurden bereits zwei Ankyrin-Kinasen eingehender untersucht und deren Funktion in Bezug auf osmotischen Stress sowie die Wurzelentwicklung



diskutiert (Chinchilla *et al.*, 2003; Chinchilla *et al.*, 2008). Auch für die VIK in *A. thaliana* wurde zunächst eine Beteiligung an der Ausbildung der Blattnervatur nachgewiesen (Cereserani *et al.*, 2009). Die neuesten Untersuchungen der VIK ergaben des Weiteren auch eine stimulierende Wirkung auf den Glucoseimport in die Vakuole sowie eine Induktion des Gens durch Kälte, Salz und Trockenheit gezeigt werden (Wingenter *et al.*, 2011). Dies deutet darauf hin, dass die cpVIK möglicherweise auch an der Ausbildung der Austrocknungstoleranz von *C. plantagineum* beteiligt sein könnte.

Aus diesem Grund wurde ebenfalls die Expression des *cpvik* Gens in *C. plantagineum* untersucht. In diesen Studien konnte jedoch keine Induktion des Gens durch Salzstress und Austrocknung im Vergleich zu unbehandelten *C. plantagineum* Pflanzen nachgewiesen werden (Lang, 2012). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurde in der *C. plantagineum* Transkriptom-Studie für die cpVIK ein normalisiertes Expressionsniveau von 6,28 (hydriert), 8,69 (teildehydriert), 20,92 (dehydriert) und 8,78 (rehydriert) ermittelt (Rodriguez *et al.*, 2010). Diese Daten würden hingegen für eine Induktion des Gens durch Austrocknung von *C. plantagineum* sprechen. Bezüglich der Expressionsdaten ist anzumerken, dass die Regulation der Aktivität der VIK nicht zwangsläufig auf Transkriptionsebene stattfinden muss. Es ist auch durchaus denkbar, dass die Aktivität der cpVIK post-translational durch Phosphorylierung reguliert werden könnte. Weiterhin lässt sich aufgrund der in dieser Arbeit ermittelten Daten darüber spekulieren, dass das CDeT11-24 Protein erst nach einer möglichen „disorder to order“-Transition oder Rekrutierung an die Membran durch die cpVIK phosphoryliert wird.

Zur Bestätigung einer möglichen Phosphorylierung des CDeT11-24 Proteins durch die cpVIK, sollte zunächst die höchste Priorität auf die Klonierung des Gens und die Expression als rekombinantes Protein gelegt werden. Anschließend könnten dann *in vitro* Kinase Assays den Beweis erbringen, dass die cpVIK das CDeT11-24 Protein phosphoryliert.

## 4.6 Ausblick

Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ergeben sich Hinweise darauf, dass das CDeT11-24 Protein über das Lysin-reiche Sequenzelement an Phosphatidsäure bindet. Die Spezifität der Bindung sollte zunächst jedoch durch weiterführende Versuche mit Liposomen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Phosphatidsäure und anderen anionischen Phospholipiden bestätigt werden. Die Bindung des Lysin-reichen Sequenzelements wurde bisher nur durch *in vitro* Versuche belegt. Somit ergibt sich die Frage nach der *in vivo* Relevanz. Für die weiterführende Untersuchung könnte daher zunächst die Bindung des CDeT11-24 Proteins an das Membranlipid Phosphatidsäure durch GFP-Konstrukte in Pflanzen getestet werden. Hierdurch ließe sich möglicherweise die postulierte Membranbindung des CDeT11-24 Proteins bestätigen.

Da für LEA-Proteine der Gruppe 2 eine phosphorylierungsabhängige Bindung an Liposomen nachgewiesen wurde, wäre es außerdem sinnvoll, phosphoryliertes CDeT11-24 auf seine Lipidbindungseigenschaften zu prüfen. Hierzu könnten auch CDeT11-24 Proteinvarianten verwendet werden, in denen die Phosphorylierung der phosphorylierten Aminosäuren durch die gezielte Mutagenese zu negativ geladenen Aminosäuren imitiert wird. Ein weiterer Bestandteil der Untersuchung der CDeT11-24 Lipidbindung war die beobachtete Vesikelaggregation. Zur Kontrolle, ob dieser Effekt nicht nur auf die Assay Bedingungen zurückzuführen ist, sollten weitere Versuche möglichst mit *ex vivo* Membranen folgen.

Da sich durch CD-Spektroskopie kein Strukturunterschied zwischen dem CDeT11-24 Gesamtkonstrukt und dem Konstrukt  $\Delta K$ -CDeT11-24, in dem das Lysin-reiche Sequenzelement deletiert ist ergab, wurde in der vorliegenden Arbeit eine mögliche bindungsinduzierte Strukturänderung diskutiert. Um diese zu belegen, sollten daher die Struktur dieser beiden Konstrukte zusätzlich in Anwesenheit von Phosphatidsäurevesikeln untersucht werden. Möglicherweise könnte so durch FTIR-Spektroskopie eine „disorder to order“-Transition belegt werden.

Generell könnten die bisher mit dem CDeT11-24 Protein durchgeführten Versuche auch für die Homologen aus *A. thaliana*, RD29a und RD29b wiederholt werden, um eine Allgemeingültigkeit der in dieser Arbeit nachgewiesenen Funktionen für die Familie der

CAP160 Proteine zu bestätigen. Dies gilt auch besonders in Bezug auf die proteinstabilisierende Wirkung während der Austrocknung.

Da für die identifizierten CDeT11-24 Kinasen CK2 $\alpha$  und cpVIK bisher keine *in vitro* Phosphorylierung des CDeT11-24 Proteins belegt wurde, ist es zwingend erforderlich diese durchzuführen. Nur durch diese Experimente lässt sich eine mögliche *in vivo* Relevanz für die Kinasen gegenüber der CDeT11-24 Phosphorylierung ermitteln.

## 5 Zusammenfassung

Die trockentolerante Wiederauferstehungspflanze *Craterostigma plantagineum*, die Dürreperioden durch Ausbildung eines Ruhestadiums überleben kann, ist schon seit vielen Jahren ein wichtiges Modellsystem zur Erforschung der molekularen Mechanismen der Austrocknungstoleranz. Von der Pflanze werden im Verlauf der Austrocknung verschiedene Schutzmaßnahmen eingeleitet, zu denen unter anderem die Akkumulation des Proteins CDeT11-24 zählt, dessen Expression durch Austrocknung und ABA bisher gut untersucht wurde. Des Weiteren konnte für das CDeT11-24 Protein nachgewiesen werden, dass es erst in einer späten Phase der Austrocknung, anscheinend ABA-unabhängig phosphoryliert wird. Die eigentliche Funktion des Proteins und seiner Phosphorylierung in Bezug auf die Austrocknungstoleranz waren bisher unbekannt. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die Funktion, Struktur und Phosphorylierung des CDeT11-24 Proteins eingehender untersucht.

Mit Hilfe von Liposomen-Assays und Protein-Lipid-Overlay-Assays gelang es, eine Bindung von rekombinantem CDeT11-24 Protein an Phosphatidsäure nachzuweisen. Um den Einfluss des N-terminalen Lysin-reichen Sequenzelements zu untersuchen, wurde das Deletionskonstrukt  $\Delta$ K-CDeT11-24 hergestellt. Diese Deletion führte zu einer starken Reduktion der Protein-Lipid-Interaktion, wodurch eine Beteiligung des Lysin-reichen Sequenzelements an der Phosphatidsäure-Bindung bewiesen werden konnte. Trotzdem ergaben sich Hinweise darauf, dass auch eine weitere Bindungsdomäne bestehen muss.

Ein weiterer Ansatz zur Erforschung der Funktion des CDeT11-24 Proteins lag in der Durchführung von Enzym-Austrocknungs-Assays. Diese belegen, dass das CDeT11-24 Protein Citratsynthase und Lactatdehydrogenase vor einem durch Austrocknung bedingten Aktivitätsverlust schützen kann. Aus diesem Grund wird eine proteinstabilisierende Funktion des CDeT11-24 Proteins postuliert. Für das Deletionskonstrukt  $\Delta$ K-CDeT11-24 hingegen, konnte nur eine schwache Schutzfunktion ermittelt werden, womit eine zweite bedeutende Funktion für das Lysin-reiche Sequenzelement des CDeT11-24 Proteins ermittelt werden konnte.

In Bezug auf die Struktur des CDeT11-24 Proteins wurde durch CD-Spektroskopie gezeigt, dass das CDeT11-24 Protein in Lösung größtenteils in Random-Coil-Konformation vorliegt und daher ein intrinsisch-ungeordnetes Protein ist. Eine Strukturänderung durch die Phosphorylierung des CDeT11-24 Proteins konnte hingegen nicht belegt werden. Auch das

$\Delta$ K-CDeT11-24 Protein zeigte keine veränderte Struktur im Vergleich zum Gesamtkonstrukt des Proteins. Dies lässt vermuten, dass die für das Lysin-reiche Sequenzelement durch *in silico* Analysen vorhergesagte amphipathische Helix sich möglicherweise erst durch eine Bindung an Phosphatidsäure ausbildet. Es konnte für das CDeT11-24 Protein jedoch eine „disorder to order“-Transition von Random-Coil- zu  $\alpha$ -Helix-Konformation durch Trifluorethanol, SDS und Austrocknung bewiesen werden. Hierdurch ergeben sich Hinweise darauf, dass das CDeT11-24 Protein eine dynamische Konformation besitzt und möglicherweise erst durch Austrocknung oder Bindung an Interaktionspartner seine funktionelle Konformation annimmt.

Ein weiterer Teil der vorliegenden Arbeit bestand in der Isolierung und Identifizierung von CDeT11-24 Kinasen. Mit Hilfe von chromatographischen Reinigungsverfahren wurde dabei Gesamtprotein aus getrockneten *C. plantagineum* Pflanzen aufgetrennt und durch In-Gel bzw. *in vitro* Kinase Assays auf Kinaseaktivität getestet. Durch diese biochemische Reinigungsstrategie gelang es, zwei Kinasen so weit aufzugreinigen, dass es möglich war, sie massenspektrometrisch zu identifizieren. Diese Kinasen (CK2 $\alpha$  und VIK) werden beide in der Literatur mit osmotischen Stress in Verbindung gebracht und sind daher vielversprechende Kandidaten für die Phosphorylierung des CDeT11-24 Proteins während der Austrocknung von *C. plantagineum*. Um eine biologische Relevanz unter physiologischen Bedingungen bestätigen zu können sind allerdings noch Untersuchungen der Phosphorylierungsspezifität nötig.

## 6 Literaturverzeichnis

- Ahmed K, Gerber DA, Cochet C. (2002).** Joining the cell survival squad: An emerging role for protein kinase CK2. *Trends in Cell Biology* 12, 226–230.
- Alamillo J, Almoguera C, Bartels D, Jordano J. (1995).** Constitutive expression of small heat shock proteins in vegetative tissues of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Molecular Biology* 29, 1093–1099.
- Alpert P. (2005).** The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. *Integrative and Comparative Biology* 45, 685–695.
- Alpert P. (2006).** Constraints of tolerance: why are desiccation-tolerant organisms so small or rare? *Journal of Experimental Botany* 209, 1575–1584.
- Alsheikh MK, Heyen BJ, Randall SK. (2003).** Ion binding properties of the dehydrin ERD14 are dependent upon phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 278, 40882–40889.
- Anbarasan S, Janis J, Paloheimo M, Laitaoja M, Vuolanto M, Karimaki J, Vainiotalo P, Leisola M, Turunen O. (2009).** Effect of glycosylation and additional domains on the thermostability of a family 10 xylanase produced by *Thermopolyspora flexuosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 356–360.
- Aon JC, Caimi RJ, Taylor AH, Lu Q, Oluboyede F, Dally J, Kessler MD, Kerrigan JJ, Lewis TS, Wysocki LA, Patel PS. (2008).** Suppressing posttranslational gluconoylation of heterologous proteins by metabolic engineering of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 950–958.
- Apel K, Hirt H. (2004).** Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55, 373–399.
- Athenstaedt K, Daum G. (1999).** Phosphatidic acid a key intermediate in lipid metabolism. *European Journal of Biochemistry* 266, 1–16.
- Baker J, Steele C, Dure L. (1988).** Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. *Plant Molecular Biology* 11, 277–291.
- Barford D, Hu SH, Johnson LN. (1991).** Structural mechanism for glycogen phosphorylase control by phosphorylation and AMP. *Journal of Molecular Biology* 218, 233–260.
- Bartels D, Chandler JW. (2007).** Avoidance and Adaptation. In: Trimble SW (ed): *Encyclopedia of Water Science*, 222–224. CRC Press, Boca Raton.
- Bartels D, Hussain SS. (2011).** Resurrection Plants: Physiology and Molecular Biology. In: Bartels D, Lüttge U, Beck E (eds): *Plant desiccation tolerance. Ecological Studies* (215), 339–364. Springer Verlag, Heidelberg.
- Bartels D, Schneider K, Terstappen G, Piatkowski D, Salamini F. (1990).** Molecular cloning of abscisic acid-modulated genes which are induced during desiccation of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Planta* 181, 27–34.
- Bartels D, Singh M, Salamini F. (1988).** Onset of desiccation tolerance during development of the barley embryo. *Planta* 175, 485–492.
- Bartels D, Sunkar R. (2005).** Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24, 23–58.

- Bartels D. (2005).** Desiccation tolerance studied in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Integrative and Comparative Biology* 45, 696–701.
- Bateman A. (2004).** The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* 32, 138–141.
- Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garcarrubio A, Campos F, Covarrubias AA. (2008).** The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiology* 148, 6–24.
- Bhushan A, McNamee MG. (1993).** Correlation of phospholipid structure with functional effects on the nicotinic acetylcholine receptor. A modulatory role for phosphatidic acid. *Biophysical Journal* 64, 716–723.
- Bianchi G, Gamba A, Murelli C, Salamini F, Bartels D. (1991).** Novel carbohydrate metabolism in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Journal* 1, 355–359.
- Bies-Ethève N, Gaubier-Comella P, Debures A, Lasserre E, Jobet E, Raynal M, Cooke R, Delseny M. (2008).** Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 67, 107–124.
- Birnboim HC, Doly J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7, 1513–1523.
- Bockel C, Salamini F, Bartels D. (1998).** Isolation and characterization of genes expressed during early events of the dehydration process in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Journal of Plant Physiology* 152, 158–166.
- Böhm G, Muhr R, Jaenicke R. (1992).** Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Engineering* 5, 191–195.
- Boudet J, Buitink J, Hoekstra FA, Rogniaux H, Larre C, Satour P, Leprince O. (2006).** Comparative analysis of the heat stable proteome of radicles of *Medicago truncatula* seeds during germination identifies late embryogenesis abundant proteins associated with desiccation tolerance. *Plant Physiology* 140, 1418–1436.
- Boudsocq M, Lauriere C. (2005).** Osmotic signaling in plants. Multiple pathways mediated by emerging kinase families. *Plant Physiology* 138, 1185–1194.
- Boyer JS. (1982).** Plant productivity and environment. *Science* 218, 443–448.
- Božović V. (2007).** Cryoprotective activity of four dehydrins expressed in *E. coli* and their influence on thylakoid membrane permeability in comparison to cryoprotectin. Dissertation, Freie Universität Berlin.
- Bradford 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, 248–254.
- Bray EA. (1993).** Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology* 103, 1035–1040.
- Bray EA. (1997).** Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* 2, 48–54.
- Bruce W, Desbons P, Crasta O, Folkerts O. (2001).** Gene expression profiling of two related maize inbred lines with contrasting root-lodging traits. *Journal of Experimental Botany* 52, 459–468.
- Buitink J, Leprince O. (2008).** Intracellular glasses and seed survival in the dry state. *Comptes Rendus Biologies* 331, 788–795.

- Campbell SA, Close TJ. (1997).** Dehydrins: Genes, proteins, and associations with phenotypic traits. *New Phytologist* 137, 61–74.
- Campos F, Zamudio F, Covarrubias AA. (2006).** Two different late embryogenesis abundant proteins from *Arabidopsis thaliana* contain specific domains that inhibit *Escherichia coli* growth. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342, 406–413.
- Carnegie PR, Kemp BE, Dunkley PR, Murray AW. (1973).** Phosphorylation of myelin basic protein by an adenosine 3':5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Biochemical Journal* 135, 569–572.
- Ceserani T, Trofka A, Gandotra N, Nelson T. (2009).** VH1/BRL2 receptor-like kinase interacts with vascular-specific adaptor proteins VIT and VIK to influence leaf venation. *Plant Journal* 57, 1000–1014.
- Chakrabortee S, Meersman F, Kaminski Schierle GS, Bertocini CW, McGee B, Kaminski CF, Tunnacliffe A. (2010).** Catalytic and chaperone-like functions in an intrinsically disordered protein associated with desiccation tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 16084–16089.
- Chakrabortee S, Tripathi R, Watson M, Schierle GSK, Kurniawan DP, Kaminski CF, Wise MJ, Tunnacliffe A. (2012).** Intrinsically disordered proteins as molecular shields. *Molecular BioSystems* 8, 210–219.
- Chen B, Bautista R, Yu K, Zapata GA, Mulkerrin MG, Chamow SM. (2003).** Influence of histidine on the stability and physical properties of a fully human antibody in aqueous and solid forms. *Pharmaceutical Research* 20, 1952–1960.
- Chen THH, Murata N. (2002).** Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 250–257.
- Chinchilla D, Frugier F, Raices M, Merchan F, Giammaria V, Gargantini P, Gonzalez-Rizzo S, Crespi M, Ulloa R. (2008).** A mutant ankyrin protein kinase from *Medicago sativa* affects *Arabidopsis* adventitious roots. *Functional Plant Biology* 35, 501–516.
- Chinchilla D, Merchan F, Megias M, Kondorosi A, Sousa C, Crespi M. (2003).** Ankyrin protein kinases: A novel type of plant kinase gene whose expression is induced by osmotic stress in alfalfa. *Plant Molecular Biology* 51, 555–566.
- Close TJ, Kortt AA, Chandler PM. (1989).** A cDNA-based comparison of dehydration-induced proteins (dehydrins) in barley and corn. *Plant Molecular Biology* 13, 95–108.
- Close TJ. (1996).** Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia Plantarum* 97, 795–803.
- Cole C, Barber JD, Barton GJ. (2008).** The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Research* 36, 197–201.
- Crowe JH, Crowe LM, Oliver AE, Tsvetkova N, Wolkers W, Tablin F. (2001).** The trehalose myth revisited: Introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology* 43, 89–105.
- Dai A. (2011).** Drought under global warming: a review. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Climate Change* 2, 45–65.
- Dawson RCM, Elliott DC, Elliott WH, Jones KM. (1986).** *Data for Biochemical Research*. 3. Auflage. Clarendon Press, Oxford.



- Deikman J, Petracek M, Heard JE. (2012).** Drought tolerance through biotechnology: improving translation from the laboratory to farmers' fields. *Current Opinion in Biotechnology* 23, 243–250.
- Delaux P, Nanda AK, Mathé C, Sejalon-Delmas N, Dunand C. (2012).** Molecular and biochemical aspects of plant terrestrialization. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 14, 49–59.
- Ditzer A, Bartels D. (2006).** Identification of a dehydration and ABA-responsive promoter regulon and isolation of corresponding DNA binding proteins for the group 4 *LEA* gene *CpC2* from *C. plantagineum*. *Plant Molecular Biology* 61, 643–663.
- Ditzer A, Kirch H, Nair A, Bartels D. (2001).** Molecular characterization of two alanine-rich lea genes abundantly expressed in the resurrection plant *C. plantagineum* in response to osmotic stress and ABA. *Journal of Plant Physiology* 158, 623–633.
- Dosztányi Z, Csizmók V, Tompa P, Simon I. (2005).** The pairwise energy content estimated from amino acid composition discriminates between folded and intrinsically unstructured proteins. *Journal of Molecular Biology* 347, 827–839.
- Dubots E, Audry M, Yamaro Y, Bastien O, Ohta H, Breton C, Marechal E, Block MA. (2010).** Activation of the chloroplast monogalactosyldiacylglycerol synthase MGD1 by phosphatidic acid and phosphatidylglycerol. *Journal of Biological Chemistry* 285, 6003–6011.
- Dunker AK, Brown CJ, Lawson JD, Iakoucheva LM, Obradović Z. (2002).** Intrinsic disorder and protein function. *Biochemistry* 41, 6573–6582.
- Dunker AK, Obradović Z, Romero P, Garner EC, Brown CJ. (2000).** Intrinsic protein disorder in complete genomes. *Genome informatics* 11, 161–171.
- Dunker AK, Silman I, Uversky VN, Sussman JL. (2008).** Function and structure of inherently disordered proteins. *Current Opinion in Structural Biology* 18, 756–764.
- Dure L, Crouch M, Harada J, Ho TD, Mundy J, Quatrano R, Thomas T, Sung ZR. (1989).** Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology* 12, 475–486.
- Dure L, Greenway SC, Galau GA. (1981).** Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by *in vitro* and *in vivo* protein synthesis. *Biochemistry* 20, 4162–4168.
- Dure L. (1993).** A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *Plant Journal* 3, 363–369.
- Dyson HJ, Wright PE. (2005).** Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 197–208.
- Epand RM, Shai Y, Segrest JP, Anantharamiah GM. (1995).** Mechanisms for the modulation of membrane bilayer properties by amphipathic helical peptides. *Biopolymers* 37, 319–338.
- Erickson AK, Payne DM, Martino PA, Rossomando AJ, Shabanowitz J, Weber MJ, Hunt DF, Sturgill TW. (1990).** Identification by mass spectrometry of threonine 97 in bovine myelin basic protein as a specific phosphorylation site for mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 265, 19728–19735.

- Eriksson SK, Harryson P. (2011).** Dehydrins: Molecular biology, Structure and Function. In: Lüttge U, Beck E, Bartels D (eds): Plant desiccation tolerance. Ecological Studies (215), 289-305. Springer Verlag, Heidelberg.
- Eriksson SK, Kutzer M, Procek J, Grobner G, Harryson P. (2011).** Tunable membrane binding of the intrinsically disordered dehydrin Lti30, a cold-induced plant stress protein. *Plant Cell* 23, 2391–2404.
- Espelund M, Saeboe-Larsen S, Hughes D, Galau G, Larsen F, Jakobsen K. (1992).** Late embryogenesis-abundant genes encoding proteins with different numbers of hydrophilic repeats are regulated differentially by abscisic acid and osmotic stress. *Plant Journal* 2, 241–252.
- Facchinelli F. (2009).** Phosphoproteomic analysis of *Craterostigma plantagineum* upon abscisic acid and desiccation stress. Dissertation. Universität Bonn.
- Ferrer-Miralles N, Corchero J, Kumar P, Cedano J, Gupta K, Villaverde A, Vazquez E. (2011).** Biological activities of histidine-rich peptides; merging biotechnology and nanomedicine. *Microbial Cell Factories* 10, 101.
- Fischer E. (2004).** Scrophulariaceae. In: Kubitzki, JW (ed.): The families and genera of vascular plants, 333–432. Springer Verlag, Berlin Springer.
- Frank W, Munnik T, Kerkmann K, Salamini F, Bartels D. (2000).** Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Cell* 12, 111–123.
- Furihata T, Maruyama K, Fujita Y, Umezawa T, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2006).** Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 1988–1993.
- Furini A, Koncz C, Salamini F, Bartels D. (1997).** High level transcription of a member of a repeated gene family confers dehydration tolerance to callus tissue of *Craterostigma plantagineum*. *EMBO Journal* 16, 3599–3608.
- Gaff DF. (1971).** Desiccation-tolerant flowering plants in southern africa. *Science* 174, 1033–1034.
- Galau GA, Wang HYC, Hughes DW. (1993).** Cotton *Lea5* and *Lea14* encode atypical late embryogenesis-abundant proteins. *Plant Physiology* 101, 695–696.
- Garay-Arroyo A, Colmenero-Flores JM, Garcarrubio A, Covarrubias AA. (2000).** Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *Journal of Biological Chemistry* 275, 5668–5674.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. (2005).** Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker JM (ed): The Proteomics Protocols Handbook, 571-607. Humana Press, New York.
- Gautier R, Douguet D, Antonny B, Drin G. (2008).** HELIQUEST: A web server to screen sequences with specific  $\alpha$ -helical properties. *Bioinformatics* 24, 2101–2102.
- Geourjon C, Deleage G. (1995).** SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Computer applications in the biosciences* 11, 681–684.
- Gill SC, Hippel PH von. (1989).** Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry* 182, 319–326.

- Gilles GJ, Hines KM, Manfre AJ, Marcotte WR. (2007).** A predicted N-terminal helical domain of a group 1 LEA protein is required for protection of enzyme activity from drying. *Plant Physiology and Biochemistry* 45, 389–399.
- Godfray HCJ, Beddington JR, Crute IR, Haddad L, Lawrence D, Muir JF, Pretty J, Robinson S, Thomas SM, Toulmin C. (2010).** Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. *Science* 327, 812–818.
- Gorina S, Pavletich NP. (1996).** Structure of the p53 tumor suppressor bound to the ankyrin and SH3 domains of 53BP2. *Science* 274, 1001–1005.
- Gosti F, Beaudoin N, Serizet C, Webb AAR, Vartanian N, Giraudat J. (1999).** ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant Cell* 11, 1897–1909.
- Goyal K, Tisi L, Basran A, Browne J, Burnell A, Zurdo J, Tunnacliffe A. (2003).** Transition from natively unfolded to folded state induced by desiccation in an anhydrobiotic nematode protein. *Journal of Biological Chemistry* 278, 12977–12984.
- Goyal K, Walton LJ, Tunnacliffe A. (2005).** LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochemical Journal* 388, 151–157.
- Green TG, Allan S, Leopoldo G, Pintado A. (2011).** Ecophysiology of desiccation/rehydration cycles in mosses and lichens. In: Lüttge U, Beck E, Bartels D (eds): *Plant desiccation tolerance. Ecological Studies* (215), 89–120. Springer Verlag, Heidelberg.
- Grelet J, Benamar A, Teyssier E., Avelange-Macherel MH, Grunwald D, Macherel D. (2005).** Identification in pea seed mitochondria of a late-embryogenesis abundant protein able to protect enzymes from drying. *Plant Physiology* 137, 157–167.
- Gsponer J, Babu MM. (2009).** The rules of disorder or why disorder rules. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 99, 94–103.
- Guermeur Y. (1997).** Statistical classifier combination, application to protein secondary structure prediction. Dissertation. Universität Paris.
- Guy CL, Haskell D. (1987).** Induction of freezing tolerance in spinach is associated with the synthesis of cold acclimation induced proteins. *Plant Physiology* 84, 872–878.
- Guy CL, Haskell D. (1989).** Preliminary characterization of high molecular mass proteins associated with cold acclimation in spinach. *Plant Physiology and Biochemistry* 27, 777–784.
- Haaning S, Radutoiu S, Hoffmann SV, Dittmer J, Giehm L, Otzen DE, Stougaard J. (2008).** An unusual intrinsically disordered protein from the model legume *Lotus japonicus* stabilizes proteins *in vitro*. *Journal of Biological Chemistry* 283, 31142–31152.
- Hand SC, Menze MA, Toner M, Boswell L, Moore D. (2011).** LEA proteins during water stress: Not just for plants anymore. *Annual Review of Physiology* 73, 115–134.
- Hanks S, Quinn A, Hunter T. (1988).** The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241, 42–52.
- Hara M, Terashima S, Fukaya T, Kuboi T. (2003).** Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta* 217, 290–298.
- Hartl FU. (1996).** Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571–580.

- Hengen P. (1995).** Purification of His-tag fusion proteins from *Escherichia coli*. Trends in Biochemical Sciences 20, 285–286.
- Heschel MS, Riginos C. (2005).** Mechanisms of selection for drought stress tolerance and avoidance in *Impatiens capensis* (Balsaminaceae). American Journal of Botany 92, 37–44.
- Heyen BJ, Alsheikh MK, Smith EA, Torvik CF, Seals DF, Randall SK. (2002).** The calcium-binding activity of a vacuole-associated, dehydrin-like protein is regulated by phosphorylation. Plant Physiology 130, 675–687.
- Hilbricht T, Bartels D. (2003).** Das Geheimnis der Austrocknungstoleranz: Wiederauferstehungspflanzen. Biologie in unserer Zeit 33, 91–99.
- Hilbricht T, Salamini F, Bartels D. (2002).** CpR18, a novel SAP-domain plant transcription factor, binds to a promoter region necessary for ABA mediated expression of the *CDeT27-45* gene from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. Plant Journal 31, 293–303.
- Hilbricht T, Varotto S, Sgaramella V, Bartels D, Salamini F, Furini A. (2008).** Retrotransposons and siRNA have a role in the evolution of desiccation tolerance leading to resurrection of the plant *Craterostigma plantagineum*. New Phytologist 179, 877–887.
- Hincha DK, Hagemann M. (2004).** Stabilization of model membranes during drying by compatible solutes involved in the stress tolerance of plants and microorganisms. Biochemical Journal 383, 277–238.
- Hite KC, Kalashnikova AA, Hansen JC. (2012).** Coil-to-helix transitions in intrinsically disordered methyl CpG binding protein 2 and its isolated domains. Protein Science 21, 531–538.
- Hundertmark M, Hincha DK. (2008).** LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. BMC Genomics 9, 118.
- Hundertmark M, Popova AV, Rausch S, Seckler R, Hincha DK. (2012).** Influence of drying on the secondary structure of intrinsically disordered and globular proteins. Biochemical and Biophysical Research Communications 417, 122–128.
- Ichimura K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A, Kreis M, Zhang S, Hirt H, Wilson C, Heberle-Bors E, Ellis BE, Morris PC, Innes RW, Ecker JR, Scheel D, Klessig DF, Machida Y, Mundy J, Ohashi Y, Walker JC. (2002).** Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: A new nomenclature. Trends in Plant Science 7, 301–308.
- Imai R, Chang L, Ohta A, Bray EA, Takagi M. (1996).** A lea-class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. Gene 170, 243–248.
- Ingram J, Bartels D. (1996).** The molecular basis of dehydration tolerance in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 47, 377–403.
- Irar S, Oliveira E, Pagès M, Goday A. (2006).** Towards the identification of late-embryogenic-abundant phosphoproteome in *Arabidopsis* by 2-DE and MS. Proteomics 6, 175–185.
- Ismail AM, Hall AE, Close TJ. (1999).** Purification and partial characterization of a dehydrin involved in chilling tolerance during seedling emergence of cowpea. Plant Physiology 120, 237–244.

- Iturriaga G, Schneider K, Salamini F, Bartels D. (1992).** Expression of desiccation-related proteins from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* in transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology* 20, 555–558.
- Jeffery CJ. (2009).** Moonlighting proteins--an update. *Molecular BioSystems* 5, 345–350.
- Jensen AB, Goday A, Figueras M, Jessop AC, Pagès M. (1998).** Phosphorylation mediates the nuclear targeting of the maize Rab17 protein. *Plant Journal* 13, 691–697.
- Jia H, Zhang S, Ruan M, Wang Y, Wang C. (2012).** Analysis and application of *RD29* genes in abiotic stress response. *Acta Physiologiae Plantarum* 34, 1239–1250.
- Jonak C, Okresz L, Bogre L, Hirt H. (2002).** Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 415–424.
- Jones JA, Rawles R, Hannun YA. (2005).** Identification of a novel phosphatidic acid binding domain in protein phosphatase-1. *Biochemistry* 44, 13235–13245.
- Kappen L, Valladares F. (1999).** Opportunistic growth and desiccation tolerance: the ecological success of poikilohydrous autotrophs. In: Pugnaire FP, Valladares F (eds): *Handbook of Functional Plant Ecology*, 9–80. Marcel Dekker, New York.
- Katagiri T, Takahashi S, Shinozaki K. (2001).** Involvement of a novel *Arabidopsis* phospholipase D, AtPLD $\delta$ , in dehydration-inducible accumulation of phosphatidic acid in stress signalling. *Plant Journal* 26, 595–605.
- Kaye C, Neven L, Hofig A, Li QB, Haskell D, Guy C. (1998).** Characterization of a gene for spinach CAP160 and expression of two spinach cold-acclimation proteins in tobacco. *Plant Physiology* 116, 1367–1377.
- Kazuoka T, Oeda K. (1994).** Purification and characterization of COR85-oligomeric complex from cold-acclimated spinach. *Plant & Cell Physiology* 35, 601–611.
- Ke Y, Han G, He H, Li J. (2009).** Differential regulation of proteins and phosphoproteins in rice under drought stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 379, 133–138.
- Kelly SM, Jess TJ, Price NC. (2005).** How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1751, 119–139.
- Kim KM, Yi EC, Baker D, Zhang KY. (2001).** Post-translational modification of the N-terminal His tag interferes with the crystallization of the wild-type and mutant SH3 domains from chicken src tyrosine kinase. *Acta Crystallographica* 57, 759–762.
- Kirch H, Nair A, Bartels D. (2001).** Novel ABA- and dehydration-inducible aldehyde dehydrogenase genes isolated from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 28, 555–567.
- Koag M, Fenton RD, Wilkens S., Close T. J. (2003).** The binding of maize DHN1 to lipid vesicles. Gain of structure and lipid specificity. *Plant Physiology* 131, 309–316.
- Koag M, Wilkens S, Fenton RD, Resnik J, Vo E, Close TJ. (2009).** The K-segment of maize DHN1 mediates binding to anionic phospholipid vesicles and concomitant structural changes. *Plant Physiology* 150, 1503–1514.
- Kooijman EE, Burger KN. (2009).** Biophysics and function of phosphatidic acid: A molecular perspective. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1791, 881–888.

- Kooijman EE, Carter KM, van Laar EG, Chupin V, Burger KNJ, Kruijff B de. (2005a).** What makes the bioactive lipids phosphatidic acid and lysophosphatidic acid so special? *Biochemistry* 44, 17007–17015.
- Kooijman EE, Chupin V, Fuller NL, Kozlov MM, Kruijff B de, Burger KNJ, Rand PR. (2005b).** Spontaneous curvature of phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Biochemistry* 44, 2097–2102.
- Kooijman EE, Tieleman DP, Testerink C, Munnik T, Rijkers DTS, Burger KNJ, Kruijff B de. (2007).** An electrostatic/hydrogen bond switch as the basis for the specific interaction of phosphatidic acid with proteins. *Journal of Biological Chemistry* 282, 11356–11364.
- Kovacs D, Kalmar E, Torok Z, Tompa P. (2008a).** Chaperone activity of ERD10 and ERD14, two disordered stress-related plant proteins. *Plant Physiology* 147, 381–390.
- Kovacs D, Agoston B, Tompa P. (2008b).** Disordered plant LEA proteins as molecular chaperones. *Plant Signaling & Behavior* 3, 710–713.
- Krasensky J, Jonak C. (2012).** Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany* 63, 1593–1608.
- Krüger C, Berkowitz O, Stephan UW, Hell R. (2002).** A metal-binding member of the late embryogenesis abundant protein family transports iron in the phloem of *Ricinus communis* L. *Journal of Biological Chemistry* 277, 25062–25069.
- Laemmli UK. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lang A. (2012).** Untersuchungen zu Kinasen aus der trockenoleranten Pflanze *Craterostigma plantagineum*. Bachelorarbeit, Universität Bonn.
- Larcher W. (1987).** Stress in plants. *Naturwissenschaften* 74, 158–167.
- Levitt J. (1980).** Responses of plants to environmental stresses. 2. Auflage. Academic Press, New York.
- Li D, He X. (2009).** Desiccation induced structural alterations in a 66-amino acid fragment of an anhydrobiotic nematode late embryogenesis abundant (LEA) protein. *Biomacromolecules* 10, 1469–1477.
- Lisse T, Bartels D, Kalbitzer HR, Jaenicke R. (1996).** The recombinant dehydrin-like desiccation stress protein from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* displays no defined three-dimensional structure in its native state. *Biological Chemistry* 377, 555–561.
- Litchfield DW. (2003).** Protein kinase CK2: Structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochemical Journal* 369, 1–15.
- Liu Y, Zheng Y. (2005).** PM2, a group 3 LEA protein from soybean, and its 22-mer repeating region confer salt tolerance in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331, 325–332.
- Lu B, Benning C. (2009).** A 25-amino acid sequence of the *Arabidopsis* TGD2 protein is sufficient for specific binding of phosphatidic acid. *Journal of Biological Chemistry* 284, 17420–17427.

- Luo P, Baldwin RL. (1997).** Mechanism of helix induction by trifluoroethanol: A framework for extrapolating the helix-forming properties of peptides from trifluoroethanol/water mixtures back to water. *Biochemistry* 36, 8413–8421.
- Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E. (2009).** Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 324, 1064–1068.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. (1989).** *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. (2002).** The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912–1934.
- Marin M, Ott T. (2012).** Phosphorylation of intrinsically disordered regions in remorin proteins. *Frontiers in Plant Science* 3, 86.
- Marin O, Meggio F, Pinna LA. (1994).** Design and synthesis of two new peptide substrates for the specific and sensitive monitoring of casein kinases-1 and -2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 198, 898–905.
- Matsushita Y. (2003).** The catalytic subunit of protein kinase CK2 phosphorylates *in vitro* the movement protein of *Tomato mosaic virus*. *Journal of General Virology* 84, 497–505.
- Mattice WL, Riser JM, Clark DS. (1976).** Conformational properties of the complexes formed by proteins and sodium dodecyl sulfate. *Biochemistry* 15, 4264–4272.
- McCubbin WD, Kay CM, Lane BG. (1985).** Hydrodynamic and optical properties of the wheat germ EM protein. *Biochemistry and Cell Biology* 63, 803–811.
- McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT. (2000).** The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* 16, 404–405.
- McMahon HT, Gallop JL. (2005).** Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* 438, 590–596.
- Meggio F. (2003).** One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB Journal* 17, 349–368.
- Mehta PA, Rebala KC, Venkataraman G, Parida A. (2009).** A diurnally regulated dehydrin from *Avicennia marina* that shows nucleo-cytoplasmic localization and is phosphorylated by Casein kinase II *in vitro*. *Plant Physiology and Biochemistry* 47, 701–709.
- Meijer HJG, Munnik T. (2003).** Phospholipid-based signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* 54, 265–306.
- Melcher K, Ng L, Zhou XE, Soon F, Xu Y, Suino-Powell KM, Park S, Weiner JJ, Fujii H, Chinnusamy V, Kovach A, Li J, Wang Y, Li J, Peterson FC, Jensen DR, Yong E, Volkman BF, Cutler SR, Zhu J, Xu HE. (2009).** A gate–latch–lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature* 462, 602–608.
- Merlot S, Gosti F, Guerrier D, Vavasseur A, Giraudat J. (2001).** The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *Plant Journal* 25, 295–303.
- Michel D, Furini A, Salamini F, Bartels D. (1994).** Structure and regulation of an ABA- and desiccation-responsive gene from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Molecular Biology* 24, 549–560.

- Miyazono K, Miyakawa T, Sawano Y, Kubota K, Kang H, Asano A, Miyauchi Y, Takahashi M, Zhi Y, Fujita Y, Yoshida T, Kodaira K, Yamaguchi-Shinozaki K, Tanokura M. (2009). Structural basis of abscisic acid signalling. *Nature* 462, 609–614.
- Mohan A, Oldfield CJ, Radivojac P, Vacic V, Cortese MS, Dunker AK, Uversky VN. (2006). Analysis of molecular recognition features (MoRFs). *Journal of Molecular Biology* 362, 1043–1059.
- Mouillon JM, Gustafsson P, Harryson P. (2006). Structural investigation of disordered stress proteins. Comparison of full-length dehydrins with isolated peptides of their conserved segments. *Plant Physiology* 141, 638–650.
- Mouillon JM, Eriksson SK, Harryson P. (2008). Mimicking the plant cell interior under water stress by macromolecular crowding: Disordered dehydrin proteins are highly resistant to structural collapse. *Plant Physiology* 148, 1925–1937.
- Msanne J, Lin J, Stone JM, Awada T. (2011). Characterization of abiotic stress-responsive *Arabidopsis thaliana* *RD29A* and *RD29B* genes and evaluation of transgenes. *Planta* 234, 97–107.
- Mulekar JJ, Bu Q, Chen F, Huq E. (2012). Casein kinase II  $\alpha$  subunits affect multiple developmental and stress-responsive pathways in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 69, 343–354.
- Nakagami H, Pitzschke A, Hirt H. (2005). Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends in Plant Science* 10, 339–346.
- Nambara E, Marion-Poll A. (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology* 56, 165–185.
- Ning J, Li X, Hicks LM, Xiong L. (2010). A Raf-like MAPKKK gene *DSM1* mediates drought resistance through reactive oxygen species scavenging in rice. *Plant Physiology* 152, 876–890.
- Nishimura N, Hitomi K, Arvai AS, Rambo RP, Hitomi C, Cutler SR, Schroeder JI, Getzoff ED. (2009). Structural mechanism of abscisic acid binding and signaling by dimeric PYR1. *Science* 326, 1373–1379.
- Nishimura N, Sarkeshik A, Nito K, Park S, Wang A, Carvalho PC, Lee S, Caddell DF, Cutler SR, Chory J, Yates JR, Schroeder JI. (2010). PYR/PYL/RCAR family members are major *in-vivo* ABI1 protein phosphatase 2C-interacting proteins in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 61, 290–299.
- Norwood M, Toldi O, Richter A, Scott P. (2003). Investigation into the ability of roots of the poikilohydric plant *Craterostigma plantagineum* to survive dehydration stress. *Journal of Experimental Botany* 54, 2313–2321.
- Oliver MJ, Tuba Z, Mishler BD. (2000). The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. *Plant Ecology* 151, 85–100.
- Oliver MJ, Velten J, Mishler BD. (2005). Desiccation tolerance in bryophytes: A reflection of the primitive strategy for plant survival in dehydrating habitats? *Integrative and Comparative Biology* 45, 788–799.
- Park S, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow TF, Alfred SE, Bonetta D, Finkelstein R, Provart NJ, Desveaux D, Rodriguez PL, McCourt P, Zhu J, Schroeder JI, Volkman BF, Cutler SR. (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 324, 1068–1071.



- Patricelli MP, Szardenings AK, Liyanage M, Nomanbhoy TK, Wu M, Weissig H, Aban A, Chun D, Tanner S, Kozarich JW. (2007).** Functional interrogation of the kinome using nucleotide acyl phosphates. *Biochemistry* 46, 350–358.
- Peck SC. (2006).** Analysis of protein phosphorylation: Methods and strategies for studying kinases and substrates. *Plant Journal* 45, 512–522.
- Perez-Iratxeta C, Andrade-Navarro MA. (2008).** K2D2: Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *BMC Structural Biology* 8, published online.
- Petersen J, Eriksson SK, Harryson P, Pierog S, Colby T, Bartels D, Röhrig H. (2012).** The lysine-rich motif of intrinsically disordered stress protein CDeT11-24 from *Craterostigma plantagineum* is responsible for phosphatidic acid binding and protection of enzymes from damaging effects caused by desiccation. *Journal of Experimental Botany* 63, 4919–4929.
- Petersen J. (2007).** Molekulare und biochemische Untersuchungen zur Aktivität von Aldehyd-Dehydrogenasen aus *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit, Universität Bonn.
- Phillips JR, Fischer E, Baron M, van den Dries N, Facchinelli F, Kutzer M, Rahmanzadeh R, Remus D, Bartels D. (2008).** *Lindernia brevidens*: a novel desiccation-tolerant vascular plant, endemic to ancient tropical rainforests. *Plant Journal* 54, 938–948.
- Piatkowski D, Schneider K, Salamini F, Bartels D. (1990).** Characterization of five abscisic acid-responsive cDNA clones isolated from the desiccation-tolerant plant *Craterostigma plantagineum* and their relationship to other water-stress genes. *Plant Physiology* 94, 1682–1688.
- Pierog S. (2011).** Biochemische Bindungsstudien des Stressproteins CDeT11-24 aus *Craterostigma plantagineum*. Bachelorarbeit, Universität Bonn.
- Pinna LA, Allende JE. (2009).** Protein kinase CK2 in health and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66, 1795–1799.
- Pinna LA. (2002).** Protein kinase CK2: A challenge to canons. *Journal of Cell Science* 115, 3873–3878.
- Pluthero FG. (1993).** Rapid purification of high-activity Taq DNA polymerase. *Nucleic Acids Research* 21, 4850–4851.
- Population Reference Bureau. (2012).** [www.prb.org](http://www.prb.org).
- Porembski S. (2011).** Evolution, diversity, and habitats of poikilohydrous vascular plants. In: Lüttge U, Beck E, Bartels D (eds): *Plant desiccation tolerance*. *Ecological Studies* (215), 139–156. Springer Verlag, Heidelberg.
- Potts M. (1994).** Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiological Reviews* 58, 755–805. Press, New York.
- Prestrelski SJ, Tedeschi N, Arakawa T., Carpentert J. F. (1993).** Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophysical Journal* 65, 661–671.
- Rahman LN, Smith GST, Bamm VV, Voyer-Grant JAM, Moffatt BA, Dutcher JR, Harauz G. (2011).** Phosphorylation of *Thellungiella salsuginea* dehydrins TsDHN-1 and TsDHN-2 facilitates cation-induced conformational changes and actin assembly. *Biochemistry* 50, 9587–9604.

- Rahmanzadeh R, Muller K, Fischer E, Bartels D, Borsch T. (2005).** The Linderniaceae and Gratiolaceae are further lineages distinct from the Scrophulariaceae (Lamiales). *Plant Biology* 7, 67–78.
- Raven JA, Edwards D. (2004).** Physiological evolution of lower embryophytes: Adaptations to the terrestrial environment. In: Hemsley AR, Poole I (eds): *The Evolution of Plant Physiology. From whole plants to ecosystems*, 17-41. Academic Press/Elsevier, London.
- Reiland S, Messerli G, Baerenfaller K, Gerrits B, Endler A, Grossmann J, Gruissem W, Baginsky S. (2009).** Large-scale *Arabidopsis* phosphoproteome profiling reveals novel chloroplast kinase substrates and phosphorylation networks. *Plant Physiology* 150, 889–903.
- Reyes JL, Campos F, Wei H, Arora R, Yang Y, Karlson D. T, Covarrubias A. A. (2008).** Functional dissection of hydrophilins during *in vitro* freeze protection. *Plant, Cell & Environment* 31, 1781–1790.
- Reyes JL, Rodrigo M, Colmenero-Flores JM, Gil J, Garay-Arroyo A, Campos F, Salamini F, Bartels D, Covarrubias AA. (2005).** Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects *in vitro*. *Plant, Cell & Environment* 28, 709–718.
- Riera M, Figueras M, Lopez C, Goday A, Pagès M. (2004).** Protein kinase CK2 modulates developmental functions of the abscisic acid responsive protein Rab17 from maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 9879–9884.
- Risk JM, Macknight RC, Day CL. (2008).** FCA does not bind abscisic acid. *Nature* 456, E5.
- Roccatano D, Colombo G, Fioroni M., Mark AE. (2002).** Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: A molecular dynamics study. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 12179–12184.
- Rodrigo M, Bockel C, Blervacq A, Bartels D. (2004).** The novel gene *CpEdi-9* from the resurrection plant *C. plantagineum* encodes a hydrophilic protein and is expressed in mature seeds as well as in response to dehydration in leaf phloem tissues. *Planta* 219, 579–589.
- Rodriguez MCS, Edsgard D, Hussain SS, Alquezar D, Rasmussen M, Gilbert T, Nielsen BH, Bartels D, Mundy J. (2010).** Transcriptomes of the desiccation-tolerant resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Journal* 63, 212–228.
- Rohila JS, Jain RK, Wu R. (2002).** Genetic improvement of Basmati rice for salt and drought tolerance by regulated expression of a barley *Hva1* cDNA. *Plant Science* 163, 525–532.
- Röhrig H, Colby T, Schmidt J, Harzen A, Facchinelli F, Bartels D. (2008).** Analysis of desiccation-induced candidate phosphoproteins from *Craterostigma plantagineum* isolated with a modified metal oxide affinity chromatography procedure. *Proteomics* 8, 3548–3560.
- Röhrig H, Schmidt J, Colby T, Bräutigam A, Hufnagel P, Bartels D. (2006).** Desiccation of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* induces dynamic changes in protein phosphorylation. *Plant, Cell & Environment* 29, 1606–1617.
- Romero P, Obradovic Z, Li X, Garner EC, Brown CJ, Dunker AK. (2001).** Sequence complexity of disordered protein. *Proteins* 42, 38–48.

- Rubtsov AM, Lopina OD. (2000).** Ankyrins. *FEBS Letters* 482, 1–5.
- Sallon S, Solowey E, Cohen Y, Korchinsky R, Egli M, Woodhatch I, Simchoni O, Kislev M. (2008).** Germination, genetics, and growth of an ancient date seed. *Science* 320, 1464.
- Santiago J, Dupeux F, Round A, Antoni R, Park S, Jamin M, Cutler SR, Rodriguez PL, Márquez JA. (2009).** The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. *Nature* 462, 665–668.
- Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM, Waner D. (2001).** Guard cell signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52, 627–658.
- Schweighofer A, Hirt H, Meskiene I. (2004).** Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends in Plant Science* 9, 236–243.
- Sedgwick SG, Smerdon SJ. (1999).** The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends in Biochemical Sciences* 24, 311–316.
- Seki M, Ishida J, Narusaka M, Fujita M, Nanjo T, Umezawa T, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K. (2002).** Monitoring the expression pattern of around 7,000 *Arabidopsis* genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. *Functional & Integrative Genomics* 2, 282–291.
- Serber Z, Ferrell JE. (2007).** Tuning bulk electrostatics to regulate protein function. *Cell* 128, 441–444.
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. (1996).** Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry* 68, 850–858.
- Shih M, Hsieh T, Lin T, Hsing YC, Hoekstra FA. (2010).** Characterization of two soybean (*Glycine max* L.) LEA IV proteins by circular dichroism and fourier transform infrared spectrometry. *Plant & Cell Physiology* 51, 395–407.
- Shih M, Lin S, Hsieh J, Tsou C, Chow T, Lin T, Hsing YC. (2004).** Gene cloning and characterization of a soybean (*Glycine max* L.) LEA protein, GmPM16. *Plant Molecular Biology* 56, 689–703.
- Shih M-d, Hoekstra FA, Hsing Y-I. (2008).** Chapter 4 Late Embryogenesis Abundant Proteins. In: Kader J-C, Delseny M (eds): *Advances in Botanical Research* (48), 211–255. Academic Press/Elsevier, London.
- Shin JJH, Loewen C, JR. (2011).** Putting the pH into phosphatidic acid signaling. *BMC Biology* 9, 85.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M. (2003).** Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 410–417.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2006).** Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 58, 221–227.
- Singh S, Cornilescu CC, Tyler RC, Cornilescu G, Tonelli M, Lee MS, Markley JL. (2005).** Solution structure of a late embryogenesis abundant protein (LEA14) from *Arabidopsis thaliana*, a cellular stress-related protein. *Protein Science* 14, 2601–2609.
- Sivamani E, Bahieldin A, Wraith JM, Al-Niemi T, Dyer WE, Ho T, Qu R. (2000).** Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions

- in transgenic wheat constitutively expressing the barley *HVA1* gene. *Plant Science* 155, 1–9.
- Soulages JL, Kim K, Arrese EL, Walters C, Cushman JC. (2003).** Conformation of a group 2 late embryogenesis abundant protein from soybean. Evidence of poly (L-proline)-type II structure. *Plant Physiology* 131, 963–975.
- Soulages JL, Kim K, Walters C, Cushman JC. (2002).** Temperature-induced extended helix/random coil transitions in a group 1 late embryogenesis-abundant protein from soybean. *Plant Physiology* 128, 822–832.
- Srere P. (1969).** Citrate synthase: [EC 4.1.3.7 Citrate oxaloacetate-lyase (CoA-acetylating)]. In: Lowenstein JM, ed. *Methods in enzymology. Citric acid cycle*, Vol. 13.
- Stace C, Ktistakis N. (2006).** Phosphatidic acid- and phosphatidylserine-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1761, 913–926.
- Stacy RAP, Aalen RB. (1998).** Identification of sequence homology between the internal hydrophilic repeated motifs of Group 1 late-embryogenesis-abundant proteins in plants and hydrophilic repeats of the general stress protein GsiB of *Bacillus subtilis*. *Planta* 206, 476–478.
- Szabados L, Savouré A. (2010).** Proline: A multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* 15, 89–97.
- Taylor SS, Buechler JA, Yonemoto W. (1990).** cAMP-dependent protein kinase: Framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annual Review of Biochemistry* 59, 971–1005.
- Tena G, Asai T, Chiu WL, Sheen J. (2001).** Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Current Opinion in Plant Biology* 4, 392–400.
- Testerink C, Munnik T. (2005).** Phosphatidic acid: A multifunctional stress signaling lipid in plants. *Trends in Plant Science* 10, 368–375.
- Thalhammer A, Hundertmark M, Popova AV, Seckler R, Hinch DK. (2010).** Interaction of two intrinsically disordered plant stress proteins (COR15A and COR15B) with lipid membranes in the dry state. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1798, 1812–1820.
- The World Bank. (2007).** World development report 2008: Agriculture for development.
- Thomashow MF. (1999).** Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 571–599.
- Toldi O, Tuba Z, Scott P. (2009).** Vegetative desiccation tolerance: Is it a goldmine for bioengineering crops? *Plant Science* 176, 187–199.
- Tolleter D, Hinch DK, Macherel D. (2010).** A mitochondrial late embryogenesis abundant protein stabilizes model membranes in the dry state. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1798, 1926–1933.
- Tolleter D, Jaquinod M, Mangavel C, Passirani C, Saulnier P, Manon S, Teyssier E, Payet N, Avelange-Macherel M, Macherel D. (2007).** Structure and function of a mitochondrial late embryogenesis abundant protein are revealed by desiccation. *Plant Cell* 19, 1580–1589.
- Tompa P, Szász C, Buday L. (2005).** Structural disorder throws new light on moonlighting. *Trends in Biochemical Sciences* 30, 484–489.

- Tompa P. (2002).** Intrinsically unstructured proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 27, 527–533.
- Tompa P. (2005).** The interplay between structure and function in intrinsically unstructured proteins. *FEBS Letters* 579, 3346–3354.
- Towbin H, Gordon J. (1984).** Immunoblotting and dot immunobinding - Current status and outlook. *Journal of Immunological Methods* 72, 313–340.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76, 4350–4354.
- Tuba Z, Lichtenthaler HK. (2011).** Ecophysiology of homoiochlorophyllous and poikilochlorophyllous desiccation-tolerant plants and vegetations. In: Bartels D, Lüttge U, Beck E (eds): *Plant desiccation tolerance*. *Ecological Studies* (215), 157–183. Springer Verlag, Heidelberg.
- Tunnacliffe A, Wise M. (2007).** The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften* 94, 791–812.
- Ubersax JA, Ferrell Jr JE. (2007).** Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 530–541.
- UNESCO. (2012).** *Managing water under uncertainty and risk*. UNESCO Publishing, Paris.
- Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. (2000).** Two-component systems in plant signal transduction. *Trends in Plant Science* 5, 67–74.
- Uversky VN, Gillespie JR, Fink AL. (2000).** Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiological conditions? *Proteins* 41, 415–427.
- Uversky VN. (2002).** What does it mean to be natively unfolded? *European Journal of Biochemistry* 269, 2–12.
- van den Dries N, Facchinelli F, Giarola V, Phillips JR, Bartels D. (2011).** Comparative analysis of LEA-like *11-24* gene expression and regulation in related plant species within the Linderniaceae that differ in desiccation tolerance. *New Phytologist* 190, 75–88.
- Velasco R, Salamini F, Bartels D. (1998).** Gene structure and expression analysis of the drought- and abscisic acid-responsive CDeT11-24 gene family from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. *Planta* 204, 459–471.
- Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu J. (2006).** Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant Journal* 45, 523–539.
- Vogelstein B, Gillespie D. (1979).** Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76, 615–619.
- Volk OH, Leippert H. (1971).** Vegetationsverhältnisse im Windhoeker Bergland, Südwestafrika. *Journal der Südwestafrikanischen wissenschaftlichen Gesellschaft* 25, 4–44.
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A. (2004).** Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science* 9, 244–252.
- Wang X, Devaiah S, Zhang W, Welti R. (2006).** Signaling functions of phosphatidic acid. *Progress in Lipid Research* 45, 250–278.

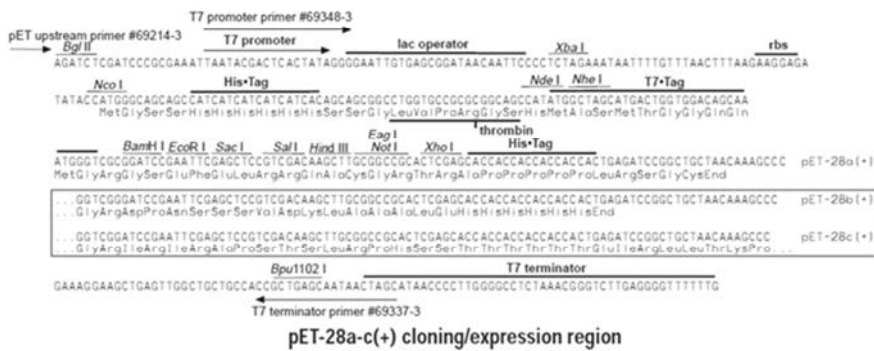
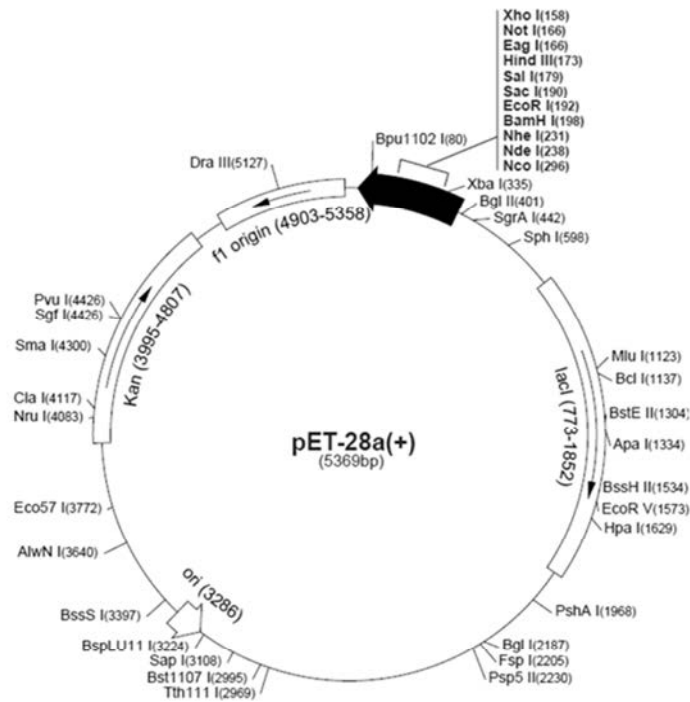
- Wang X. (2005).** Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses. *Plant Physiology* 139, 566–573.
- Welti R, Li WQ, Li MY, Sang YM, Biesiada H, Zhou HE, Rajashekar CB, Williams TD, Wang XM. (2002).** Profiling membrane lipids in plant stress responses - Role of phospholipase D alpha in freezing-induced lipid changes in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 277, 31994–32002.
- Willige BC, Kutzer M, Tebartz F, Bartels D. (2009).** Subcellular localization and enzymatic properties of differentially expressed transketolase genes isolated from the desiccation tolerant resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Planta* 229, 659–666.
- Wingenter K, Trentmann O, Wünsch I, Hörmiller II, Heyer AG, Reinders J, Schulz A, Geiger D, Hedrich R, Neuhaus HE. (2011).** A member of the mitogen-activated protein 3-kinase family is involved in the regulation of plant vacuolar glucose uptake. *Plant Journal* 68, 890–900.
- Wise MJ, Tunnacliffe A. (2004).** POPP the question: what do LEA proteins do? *Trends in Plant Science* 9, 13–17.
- Wise MJ. (2002).** The POPPs: Clustering and searching using peptide probability profiles. *Bioinformatics* 18, 38–45.
- Wolkers WF, McCreedy S, Brandt WF, Lindsey GG, Hoekstra FA. (2001).** Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses *in vitro*. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1544, 196–206.
- Wood AJ, Oliver MJ. (1999).** Translational control in plant stress: the formation of messenger ribonucleoprotein particles (mRNPs) in response to desiccation of *Tortula ruralis* gametophytes. *Plant Journal* 18, 359–370.
- Wooten MW. (2002).** In-gel kinase assay as a method to identify kinase substrates. *Science's STKE signal transduction knowledge environment*, p115.
- Wright PE, Dyson HJ. (1999).** Intrinsically unstructured proteins: Re-assessing the protein structure-function paradigm. *Journal of Molecular Biology* 293, 321–331.
- Xiong L, Schumaker KS, Zhu J. (2002).** Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* 14, 165–183.
- Xue B, Dunbrack RL, Williams RW, Dunker AK, Uversky VN. (2010).** PONDR-FIT: A meta-predictor of intrinsically disordered amino acids. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1804, 996–1010.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. (1993).** *Arabidopsis* DNA encoding two desiccation-responsive *rd29* genes. *Plant Physiology* 101, 1119–1120.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. (2006).** Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology* 57, 781–803.
- Yamamoto S, Hasegawa K, Yamaguchi I, Tsutsumi S, Kardos J, Goto Y, Gejyo F, Naiki H. (2004).** Low concentrations of sodium dodecyl sulfate induce the extension of  $\beta$  2 - microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH. *Biochemistry* 43, 11075–11082.
- Yin P, Fan H, Hao Q, Yuan X, Wu D, Pang Y, Yan C, Li W, Wang J, Yan N. (2009).** Structural insights into the mechanism of abscisic acid signaling by PYL proteins. *Nature Structural & Molecular Biology* 16, 1230–1236.

- Young BP, Shin JJH, Orij R, Chao JT, Li SC, Guan XL, Khong A, Jan E, Wenk MR, Prinz WA, Smits GJ, Loewen CJR. (2010).** Phosphatidic acid is a pH biosensor that links membrane biogenesis to metabolism. *Science* 329, 1085–1088.
- Zehr BD, Savin TJ, Hall RE. (1989).** A one-step, low background coomassie staining procedure for polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 182, 157–159.
- Zhang J, Jia W, Yang J, Ismail AM. (2006).** Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crops Research* 97, 111–119.
- Zhang W, Qin CB, Zhao J, Wang XM. (2004).** Phospholipase D 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 9508–9513.
- Zhu J, Hasegawa PM, Bressan RA, Bohnert HJ. (1997).** Molecular aspects of osmotic stress in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 16, 253–277.
- Zhu J. (2002).** Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* 53, 247–273.

# 7 Anhang

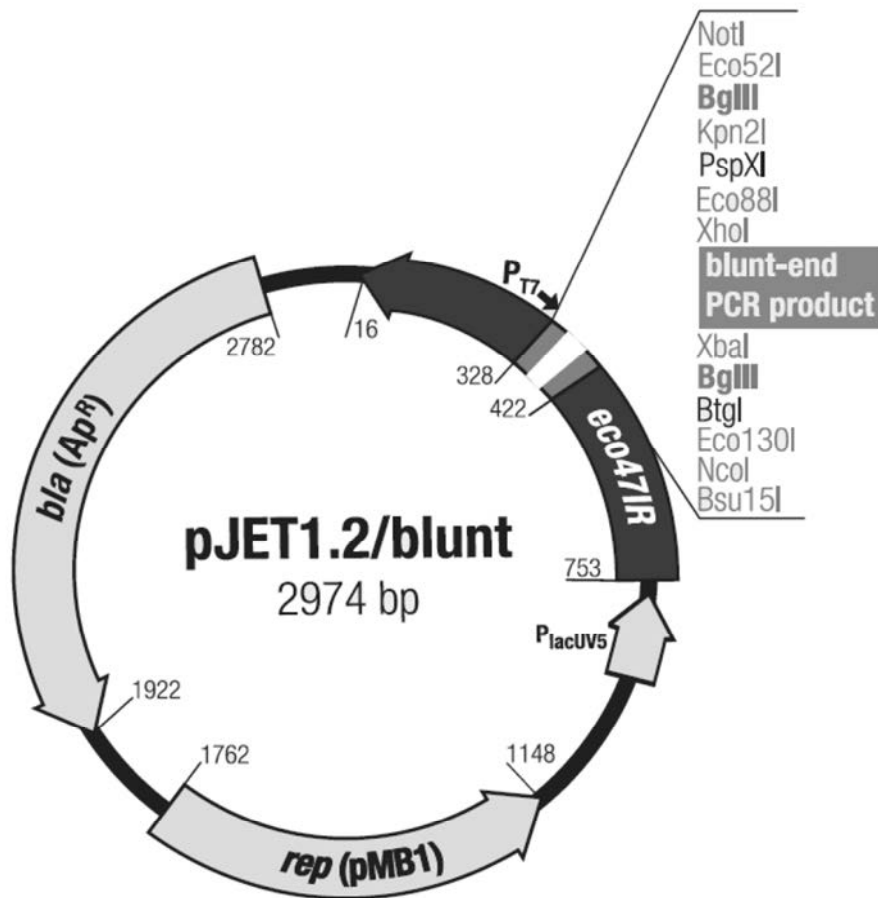
## 7.1 Vektorkarten

### pET28a





**pJET1.2**



pJET1.2 forward sequencing primer, 23-mer →

5' GGC GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA GCG GCC GCC AGA TCT TCC GGA TGG CTC GAG TTT TTC AGC AAG AT **blunt-end** A

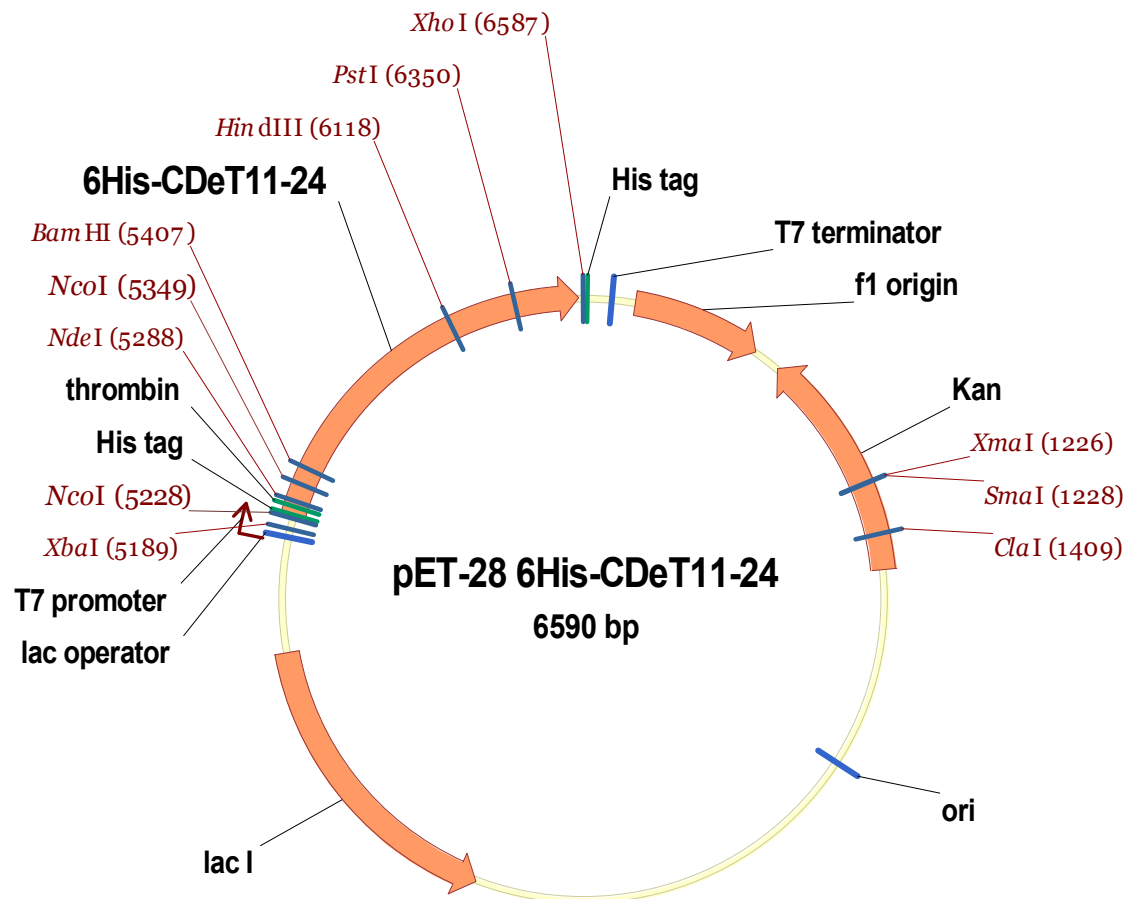
3' CCG CAT TAT GCT GAG TGA TAT CCC TCT CGC CGG CCG TCT AGA AGG CCT ACC GAG CTC AAA AAG TCG TTC TA **PCR product** T

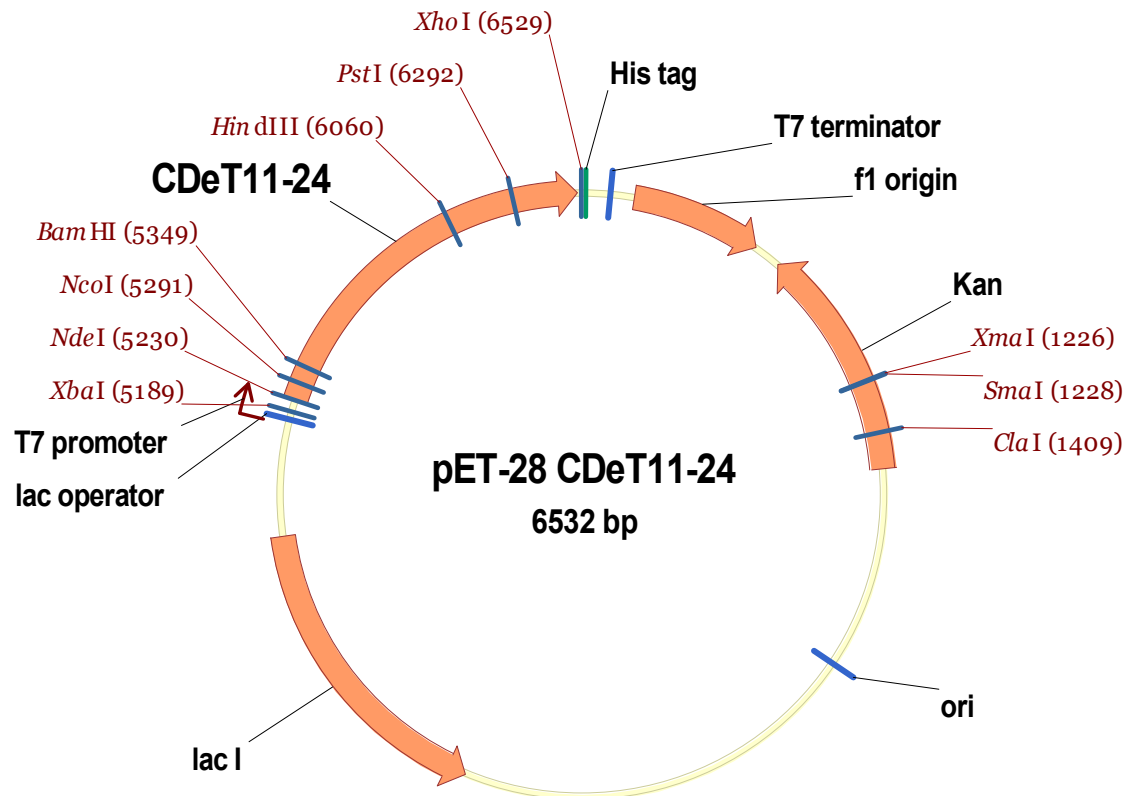
← pJET1.2 reverse sequencing primer, 24-mer

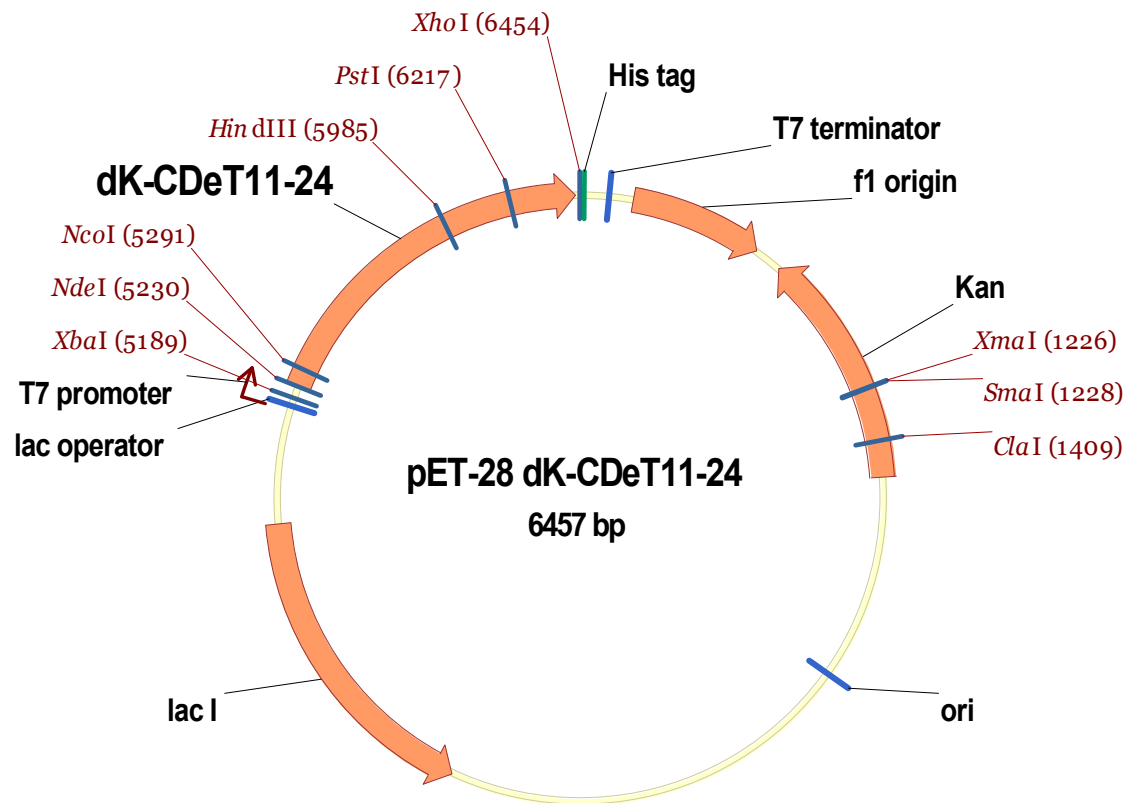
←

TCT TTC TAG AAG ATC TCC TAC AAT ATT CTC AGC TGC CAT GGA AAA TCG ATG TTC TTC T 3'

AGA AAG ATC TTC TAG AGG ATG TTA TAA GAG TCG ACG GTA CCT TTT AGC TAC AAG AAG A 5'

**pET28 6His-CDeT11-24**

**pET28 CDeT11-24**

**pET28 ΔK-CDeT11-24**

## 7.2 DNA-Sequenzen

### *cdet11-24* cDNA-Sequenz

```

1   CGCAGATTCC TTTCTCGACA GTTCTGAATAA GAAAAACAAA GCCGATAAAA AAAAATAAAG AGAATCTGAA
    CDeT11-24forNdeI
71  TATTATAAGC TATGGAATCG CAATTGCACC GCCCTACCGA GCAAGAAATG ATGGAGGGTC AAATGCTGA
141 CCATGGGGAG AAGAAGTCCA TGCTTGCAGAA AGTTAAGGAG AAGGCGAAGA AGCTCAAGGG ATCCATCAAT
211 AAGAAACATG GGTCTAGCCA AGATGATGAT GCAGATTATG ATGAGGAAAT TAATACTAGC CCTGCTGTTC
281 ACGGAGCACC AGGTATGAAT CCTCCTCCTA CGCAAGGCGG AGAGTATGGT GGCCTGAGCG AGAGAGACGT
351 GAATATTCCT CATCCTCTAG CTTCTACGGA GGCGAACTTG GACAAACCAG CTGATGTGCA AGTTCCGCCG
421 CCGGTGCCGG AGGCGACGCC GGAGGTATCA GACAAGGGCC TTAAGTGAAGA TCTTGGTTCC ACCGCCGGCC
491 AAGGTGCTAA AGAATCGGAC GTTGATCCTC TTACACGAGG CCTCAAGGGC GTGAAGTACG GCGGCGACGA
561 TTCTAACCAG TTAGCAGGCC AAGAATCTCA GGCAATTTCG GATGAACCAA AATCATTTCG TGGACAAGAA
631 AACGATCTCC CACAATCTCA CCCCTCGTCA GAAGACGAGC CTAAGAAGTT CGACGCCGCT AACGACCAGC
701 TCGAATCTAG GCGTCAAGAC ACCATTACAG GGAAGATATC CTCAGTTCCT GCTGTAATAG TCGACAAGAC
771 CGCCGCTGCT AAGAACGTAG TTGCATCAAA GCTCGGCTAT GGCGCAACC AAGCTCAACA ACCTGCCGAC
841 GCGGCGCCA CTCAGCAGAA GAAGCCTCTG ACCGAAACAG CAGCCGAGTA CAAGAACATG GTCGCGGAGA
911 AGCTTACCCC AGTTTATGAA AAGGTGCGCG GCGCTGGGTC CACCGTGACG TCTAAAGTCT GGGGAAGTGG
981 TGGAACGACG GCGGCGGAGC AGGCACAAGG AGGAGAGGGC ACAGTAGATG GAGGAGCAGC TGCCTCCGAC
1051 AAGGGTGTTC TTACGAAGGA CTACTTGTCG GAGAACTCA AGCCTGGAGA TGAAGACAAG GCGTGTGCC
1121 AAGCTATCAT GGAGAAGCTG CAGCTGAGTA AGAAGCCCGC CGCCGCGCAG GGTGGGGCCG TTGACGAAAC
1191 CAAGGCTAAC GAATCGAGCC CCGGCGTCGT GGGCAGCATC AAGGGCGTAG TGGGTTTCGT GATTGGCCGC
1261 GGTAATAAGA TTAATGCGAC TGAATCTGCT GCTGCTGCGA ATGAGCAAAC GCAAGCGCTT GGGAGCGGAG
1331 AAACGGCGGC GCGGGAAGCT GCTAAGGTTG AGCAGTGATC ATCTTCAG
    CDeT11-24revXhoI

```

## 7.3 Proteinsequenzen

### 6His-CDeT11-24

```

1   MGSSHHHHHH SSSLVPRGSH MESQLHRPTE QEMMEGQTAD HGEKKSMLAK
51  VKEKAKKLKG SINKKHGSSQ DDDADYDEEI NTSPAVHGAP GMNPPPTQGG
101 EYGGLSERDV NIPHPLASTE ANLDKPADVQ VPPVPEATP EVSDKGLTED
151 LGSTAGQGAK ESDVDPLTRG LKGVNYGGDD SNPLAQEHQ AISDEPKSFP
201 GQENDLPQSH PSSEDEPKKF DAANDQPQSM PQDTITGKIS SVPAVIVDKA
251 AAANKVVASK LGYGGNQAQQ PADAGATQQK KPLTETAAEY KNMVAEKLTP
301 VYEKVAGAGS TVTSKVVWGS GTTAGEQAQG GEGTVDGGAA APNKGVFTKD
351 YLSEKLKPGD EDKALSQAIM EKLQLSKKPA AGEKGAVDET KANESSPGVV
401 GSIKGVVGS LIGGGNKINAT ESAAAANEQT QALGSGETAA AEAAKVEQ

```

### CDeT11-24

```

1   MESQLHRPTE QEMMEGQTAD HGEKKSMLAK VKEKAKKLKG SINKKHGSSQ
51  DDDADYDEEI NTSPAVHGAP GMNPPPTQGG EYGGLSERDV NIPHPLASTE
101 ANLDKPADVQ VPPVPEATP EVSDKGLTED LGSTAGQGAK ESDVDPLTRG
151 LKGVNYGGDD SNPLAQEHQ AISDEPKSFP GQENDLPQSH PSSEDEPKKF
201 DAANDQPQSM PQDTITGKIS SVPAVIVDKA AAANKVVASK LGYGGNQAQQ
251 PADAGATQQK KPLTETAAEY KNMVAEKLTP VYEKVAGAGS TVTSKVVWGS
301 GTTAGEQAQG GEGTVDGGAA APNKGVFTKD YLSEKLKPGD EDKALSQAIM
351 EKLQLSKKPA AGEKGAVDET KANESSPGVV GSIKGVVGS LIGGGNKINAT
401 ESAAAANEQT QALGSGETAA AEAAKVEQ

```

**AK-CDeT11-24**

```

1   MESQLHRPTE QEMMEGQTAD HGSSQDDDDAD YDEEINTSPA VHGA  

51  PTQGGGEYGG SERDVNIHPH LASTEANLDK PADVQVPPP  

101 GLTEDLGSTA GQGAKESDVD PLTRGLKGVN YGGDDSNPLA GQEHQ  

151 PKSFPGQEND LPQSHPSSED EPKKFDAAND QPQSMQDPTI TGKISSV  

201 IVDKAAAANK VVASKLGYGG NQAQQPADAG ATQQKKPLTE TAAEYKN  

251 EKLTPVYEKV AGAGSTVTSK VWGSGGTTAG EQAQQGEGTV DGGAAAP  

301 VFTKDYLSEK LKPGDEKAL SQAIMEKLQL SKKPAAGEGG AVDETKAN  

351 SPGVVGSIKG VVGLIGGGN KINATESAAA ANEQTQALGS GETAAAEAA  

401 VEQ

```

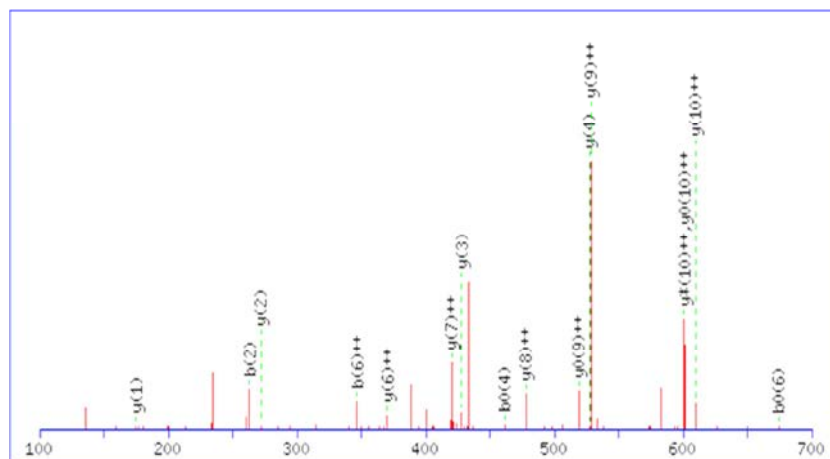
**7.4 Massenspektrometrische Kinase-Identifizierung****7.4.1 Identifizierung der CK2 $\alpha$ -Peptide****Peptid: VYTDVNVVRPR**

Abbildung 7.1: Massenspektrum der Fragmentierung des Peptids VYTDVNVVRPR.

Monoisotopische Masse des Peptids: 1316,879202 Da

Tabelle 7.1: pblast mit dem Peptid VYTDVNVVRPR. Die Tabelle gibt die ersten drei Treffer an.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
BAJ85347.1	predicted protein [ <i>Hordeum vulgare</i> <i>subsp. vulgare</i> ]	35.8	35.8	90%	0.1	100%
NP_973518.1	putative casein kinase II subunit alpha [ <i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i> ] >gb AEC07405.1	35.8	35.8	90%	0.1	100%
AAM65273.1	putative casein kinase II catalytic (alpha) subunit [ <i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i> ]	35.8	35.8	90%	0.1	100%

Zuordnung der Peptidsequenz (VYTDVNVVRPR) zu den Sequenzierungsdaten von Rodriguez *et al.* (2010):

```
>contigB14278 length=1207 numreads=48
aagcagtggtatcaacgcagagtactcggggaaaatgatagatttttaatttagattgatgagaaacagtcctgta
ggtgtgagtgaggagtgaatacgcggctggcgcacttttcgcgctctgattctcccaatctcgctagcgtgccccta
gtcgctttgctgctgcccgtgctgcttcgcctccctagtcgcctatcgcttctttcctcatctttcgccaccgtaggt
aaggcggacgacgcccgtatcgccgcagatctactcctcggagatgtcgaaatctcgggtatacaccgacgtcaac
gtggtgctgcccagggaaatactgggactacgagaatctcaccggtgcagtgggggcgaccaagatgattatgaggtg
attcgcaaagttggaaggggaaaatacagtgaaagttttcgagggcgtaaagttaataacaatgagcgcctgtatt
attaaaattctcaagcctgttaagaagaaaaagatcaagagagaaaatcaagatactccagaacctatgtggggggc
accaacattgtcaaaacttctagacgtcgtcagagatcagaattcaaaaactcctagtttgatattcgaatatgtg
aatagtacagacttcaaagttctgtatcctaccttgacagattatgacatccggttactacatttatgagcttctc
aaggctctcgattactgtcactcacagggcatcatgcacagagatgtaagcctcataatgtgatgatagaccat
gagctaaggaaacttcgtctgattgattggggcttgcagaattttatcacctggaaaggagtataatgtccgt
gttgcctcaagatactttaagggccagagcttcttggatttgcaagactatgactattcctttggaccatgtg
gagccttggtgcatgtttgcaggaatgatatttcgcaaggaaccttcttttatgggcatgataaccaagacag
cttgtaaaaattgccaaggtgcttggaaaccgatgagttgaaatgcctatttgcacaagtaccatcttgagctagat
cctcagcttgaagcccttgcgggaggcacagcagaaaaccatgggtcaaagttcatcaatgcagataaccagcat
ctcgtgtcaccagaggccattgatttcttgacaaaactacttcgctatgatcanacaggataggctcacggcaaa
agaagca
```

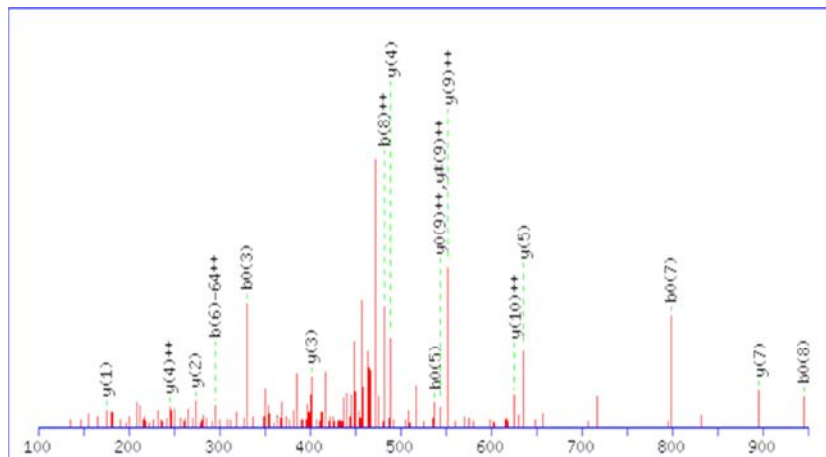
**Peptid: EAMAHPYFSQVR**

Abbildung 7.2: Massenspektrum der Fragmentierung des Peptids EAMAHPYFSQVR.

Monoisotopische Masse des Peptids: 1450,6663 Da

Tabelle 7.2: pblast mit dem Peptid EAMAHPYFSQVR. Die Tabelle gibt die ersten drei Treffer an.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
XP_002533161.1	casein kinase II, alpha chain, putative [ <i>Ricinus communis</i> ] >gb EEF29220.1	43.9	43.9	100%	2.00E-04	100%
AFK43959.1	unknown [ <i>Lotus japonicus</i> ]	43.9	43.9	100%	2.00E-04	100%
AFK43104.1	unknown [ <i>Medicago truncatula</i> ]	43.9	43.9	100%	2.00E-04	100%

Zuordnung der Peptidsequenz (EAMAHPYFSQVR) zu den Sequenzierungsdaten von Rodriguez *et al.* (2010):

```
>contigA12181 length=642 numreads=57
ccaatcttcactaatacattcatacatgagtagtactgattatcgacattcgggtaacacaagcacaagataataaaa
tacaatgcaatgtgctactctttgagtttcaaataagatacacaagcaacagctctagctagagttgcc
caacaacgtatgacattattgancggatagcatagcagatatggaaggcaaatgagcncattaggttcttgtcct
gctattctcagcagccctcacttgcgagaaatattggatgagccattgcttcttttgctgtgagcctatcctgatg
atcatagcgaagtagtttgtcaaggaaatcaatggcctctggtgacacgagatgctggttatctgcattgatgaa
ctttgaccatggtttctgctgtgctccaacaagggttcaagctgaggatctagctcaagatggtagttgtgt
aataggcattcaactcatcgggtccgagcaccttggaatttaacaagctggcttggttatcatgccataa
aagaaaggttcttgcgaaatatcattctgcaaacatgcagccaaggctccacaagtcacaagaatagtcatag
tcttgcacaatcaacaagagctctggacccttaagtagtcttg
```



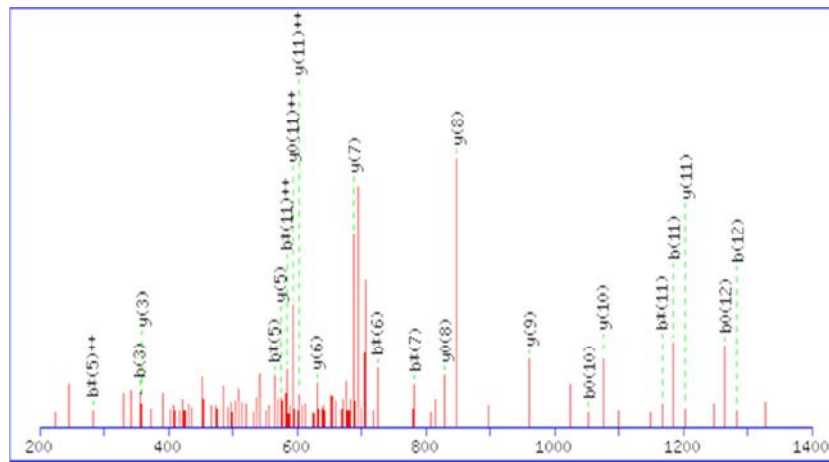
**Peptid: ILQNLCGGTNIWK**

Abbildung 7.3: Massenspektrum der Fragmentierung des Peptids ILQNLCGGTNIWK.

Monoisotopische Masse des Peptids: 1428,7759 Da

Tabelle 7.3: pblast mit dem Peptid EAMAHYPYFSQVR. Die Tabelle gibt die ersten vier Treffer an.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
XP_002669692.1	predicted protein [ <i>Naegleria gruberi</i> ] >gb EFC36948.1  predicted protein [ <i>Naegleria gruberi</i> ]	44.3	44.3	100%	2.00E-04	100%
CAN80358.1	hypothetical protein VITISV_002027 [ <i>Vitis vinifera</i> ]	39.7	39.7	100%	0.007	92%
ACJ84704.1	unknown [ <i>Medicago truncatula</i> ]	39.7	39.7	100%	0.007	92%
XP_002533161.1	casein kinase II, alpha chain, putative [ <i>Ricinus communis</i> ] >gb EEF29220.1 ]	39.7	39.7	100%	0.007	92%

Zuordnung der Peptidsequenz (ILQNLCGGTNIVK) zu den Sequenzierungsdaten von Rodriguez *et al.* (2010):

```
>contig00263 length=272 numreads=76
Agggaatactgggactacgagaatctcacctgagcagtgggggcgaccaagatgattatgaggtgattcgcaaagt
ggaaggggaaaatacagtgaggttttcgagggcgtaaatgttaataacaatgagcgctgtattataaaattctc
aagcctgttaagaagaaaaagatcaagagagaaatcaagatactccagaacctatgtgggggacccaacattgtc
aaacttctagacgtcgtcagagatcagaattcaaaaactcctagttt
```

#### 7.4.2 Identifizierung des cpVIK-Peptids

##### Peptid: LLEEDPSLVNAR

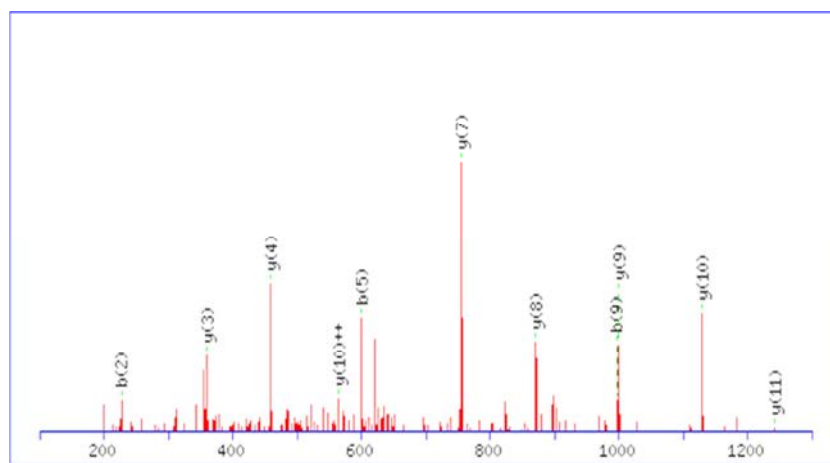


Abbildung 7.4: Massenspektrum der Fragmentierung des Peptids LLEEDPSLVNAR

Monoisotopische Masse des Peptids: 1354,7092 Da

Tabelle 7.4: pblast mit dem Peptid LLEEDPSLVNAR. Die Tabelle gibt die ersten sechs Treffer an.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
XP_002312262.1	predicted protein [ <i>Populus trichocarpa</i> ] >gb EEE89629.1	37.1	37.1	100%	0.046	92%
XP_003517809.1	PREDICTED: dual specificity protein kinase pyk1-like [ <i>Glycine max</i> ]	36.7	36.7	100%	0.063	92%
XP_003520094.1	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: serine/threonine-protein kinase TNNI3K-like [ <i>Glycine max</i> ]	36.7	36.7	100%	0.063	92%
EKC20641.1	Ankyrin repeat domain-containing protein 49 [ <i>Crassostrea gigas</i> ]	35.4	35.4	100%	0.16	83%
XP_002890035.1	kinase family protein [ <i>Arabidopsis lyrata subsp. lyrata</i> ] >gb EFH66294.1	34.6	34.6	100%	0.31	83%
NP_172853.1	VH1-interacting kinase [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ] >gb AAD39286.1 AC007576_9	34.6	34.6	100%	0.31	83%

Zuordnung der Peptidsequenz (LLEEDPSLVNAR) zu den Sequenzierungsdaten von Rodriguez *et al.* (2010):

```
>contig28544 length=386 numreads=17
tcgggggtataacgaaaaaaaaataaaaaacaaatataaaaaatatacagagaaggccttaacagttatgagcgcgaagcgag
ggaagttcaggccactcagcggcctccggcgcagcgcgcttcggcgggtggagaagaagaaggagaaggcgcgcgtg
agtcgcacgtcccaaatcctgtggcagcgcgcaaaaaacgacgcccggcgttgaggaagctcctcgaggaggat
ccttcgctggtcaacgccagagactacgatcagaggacgcctctacacgtggcagctttgcacgggtggatcgat
gttgaccaattgcctattggactacaaagccgacgtcaacgcacaggatcgggtggaaaaatact
```

## 7.5 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Dorothea Bartels für die Möglichkeit, diese Dissertation in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen. Vielen Dank für die freundliche Betreuung sowie das Vertrauen, das sie in mich gesetzt haben.

Herrn PD Dr. Hans-Hubert Kirch danke ich für die Übernahme des Koreferats. Außerdem bedanke ich mich auch dafür, dass ich ihn stets bezüglich molekularbiologischer Arbeiten um Rat fragen konnte.

Ich danke auch den weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission Herrn Prof. Dr. Erwin A. Galinski und Herrn PD Dr. Bodo M. Mösel.

Ferner danke ich Herrn Dr. Horst Röhrig für die langjährige Unterstützung, ein immer offenes Ohr und dafür, dass er sein Wissen über Proteinbiochemie mit mir geteilt hat.

Dr. Jürgen Schmidt, Dr. Thomas Colby, Anne Harzen und Ursula Wieneke vom Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen und die lehrreichen wissenschaftlichen Diskussionen.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Pia Harryson und Dr. Sylvia Eriksson vom „Department of Biochemistry and Biophysics“ an der Universität Stockholm für die Strukturanalyse des CDeT11-24 Proteins mittels CD-Spektroskopie.

Barbara Kalisch und Herrn Prof. Dr. Peter Dörmann vom IMBIO (Universität Bonn) danke ich für Bereitstellung der PLO-Assay-Membranen und Hilfestellungen bei der Auswertung der Analyse, die entscheidende Hinweise bezüglich der CDeT11-24 Phosphatidsäure Bindung ergeben haben.

Bei Frau Christiane Buchholz möchte ich mich für die Aufzucht von unzähligen *Craterostigma plantagineum* Pflanzen bedanken, die für meine Arbeit unerlässlich waren.

Der gesamten Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Dorothea Bartels danke ich für die schöne gemeinsame Zeit.

Nicht zuletzt danke ich Dr. Jessica Schmitz, Dr. Fabio Facchinelli, Fritz Waßmann, Guido Ufer, Alena Tierbach und all meinen Freunden, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Meinen Eltern und meiner Familie danke ich für die permanente Unterstützung während der Zeit meiner Doktorarbeit.

## 7.6 Teilpublikation

**Petersen J, Eriksson SK, Harryson P, Pierog S, Colby T, Bartels D, Rohrig H. (2012).** The lysine-rich motif of intrinsically disordered stress protein CDeT11-24 from *Craterostigma plantagineum* is responsible for phosphatidic acid binding and protection of enzymes from damaging effects caused by desiccation. *Journal of Experimental Botany* 63, 4919–4929.