# Strukturelle Charakterisierung von drei phloemmobilen Proteinen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Biologie

der Universität Hamburg

vorgelegt von Steffen Ostendorp

Hamburg, 2018

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juli 2013 bis Dezember 2017 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Julia Kehr in der Abteilung Molekulare Pflanzengenetik des Fachbereichs Biologie der Universität Hamburg am Biozentrum Klein Flottbek durchgeführt.

Gutachter der Dissertation:

Professor Dr. rer. nat. Julia Kehr

Professor Dr. rer. nat. Stefan Hoth

Tag der Disputation: 09.07.2018

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzu	ngsverzeichnis	IV
Abkürzu	ngen der Nukleotide	VI
Abkürzu	ngen der Aminosäuren	VI
Abbildun	ngsverzeichnis	VII
Tabellenv	verzeichnis	VIII
1 Ein	leitung	1
1.1 P	roteinstrukturen und Funktionen	2
1.2 G	efaltete und intrinsisch ungeordnete Proteine	3
1.3 V	erfahren der Strukturaufklärung von Proteinen	6
1.3.1	Proteinkristallographie	7
1.3.2	Kleinwinkel Röntgenbeugungsexperimente (SAXS)	9
1.3.3	Strukturelle Proteomik	10
1 <i>4</i> V	and Longstrockentrongnortwage day Dflange	17
1.4 K	Mabile Drotaina im Zell zu Zell und Langstreckentransport	
1.4.1	Der Transkriptionsfaktor <i>Knottad 1</i> ein über kurze Streaken mobiles Protein	13
1.4.2	Das phoemmobile Translationally controlled tumor associated Protein (TCTP)	14
1.7.5	Das phoeminoone Translationally controlled tamor associated Trolein (1011)	
15 7	ielectowne	17
1.3 L	aeisetzung	····· 1/
1.5 L		
2 Ma	terial und Methoden	
2 Ma 2.1 M	terial und Methoden	
2 Ma 2.1 M 2.1.1	terial und Methoden Iaterial Geräte	
2 Ma 2.1 M 2.1.1 2.1.2	terial und Methoden Iaterial Geräte Verbrauchsmaterialien	
2 Ma 2.1 M 2.1.1 2.1.2 2.1.3	terial und Methoden Iaterial Geräte Verbrauchsmaterialien Enzyme und Plasmide	
2 Ma 2.1 N 2.1.1 2.1.2 2.1.3 2.1.4	terial und Methoden Iaterial Geräte Verbrauchsmaterialien Enzyme und Plasmide Bakterienstämme und Pflanzen	
2 Ma 2.1 M 2.1.1 2.1.2 2.1.3 2.1.4 2.1.5	terial und Methoden Iaterial Geräte Verbrauchsmaterialien Enzyme und Plasmide Bakterienstämme und Pflanzen Software und Datenbanken	
2 Ma 2.1 M 2.1.1 2.1.2 2.1.3 2.1.4 2.1.5 2.1.6	terial und Methoden Iaterial Geräte Verbrauchsmaterialien Enzyme und Plasmide Bakterienstämme und Pflanzen Software und Datenbanken Chemikalien	
2 Ma 2.1 N 2.1.1 2.1.2 2.1.3 2.1.4 2.1.5 2.1.6 2.1.7	terial und Methoden Iaterial Geräte Verbrauchsmaterialien Enzyme und Plasmide Bakterienstämme und Pflanzen Software und Datenbanken Chemikalien Häufig genutzte Lösungen und Puffer	
2 Ma 2.1 M 2.1.1 2.1.2 2.1.3 2.1.4 2.1.5 2.1.6 2.1.7 2.1.8	terial und Methoden Iaterial Geräte Verbrauchsmaterialien Enzyme und Plasmide Bakterienstämme und Pflanzen Software und Datenbanken Chemikalien Häufig genutzte Lösungen und Puffer Sequenzierungen, DNA und RNA Oligonukleotide	
2 Ma 2.1 M 2.1.1 2.1.2 2.1.3 2.1.4 2.1.5 2.1.6 2.1.7 2.1.8	terial und Methoden Iaterial Geräte Verbrauchsmaterialien Enzyme und Plasmide Bakterienstämme und Pflanzen Software und Datenbanken Chemikalien Häufig genutzte Lösungen und Puffer Sequenzierungen, DNA und RNA Oligonukleotide	
2 Ma 2.1 M 2.1.1 2.1.2 2.1.3 2.1.4 2.1.5 2.1.6 2.1.7 2.1.8 2.2 N 2.2.1	terial und Methoden	
2 Ma 2.1 M 2.1.1 2.1.2 2.1.3 2.1.4 2.1.5 2.1.6 2.1.7 2.1.8 2.2 M 2.2.1 2.2.2	terial und Methoden         Iaterial         Geräte         Verbrauchsmaterialien         Enzyme und Plasmide         Bakterienstämme und Pflanzen         Software und Datenbanken         Chemikalien         Häufig genutzte Lösungen und Puffer         Sequenzierungen, DNA und RNA Oligonukleotide         Iethoden         Herstellung chemisch kompetenter Escherichia coli Zellen         Herstellung von gDNA und cDNA	
15       2       Ma         2.1       M         2.1.1       2.1.2         2.1.3       2.1.4         2.1.5       2.1.6         2.1.7       2.1.8         2.2       M         2.2.1       2.2.2         2.2.3       M	terial und Methoden	
15       2       Ma         2.1       M         2.1.1       2.1.2         2.1.3       2.1.4         2.1.5       2.1.6         2.1.7       2.1.8         2.2       M         2.2.1       2.2.2         2.2.3       2.2.3	terial und Methoden         Iaterial         Geräte         Verbrauchsmaterialien         Enzyme und Plasmide         Bakterienstämme und Pflanzen         Software und Datenbanken         Chemikalien         Häufig genutzte Lösungen und Puffer         Sequenzierungen, DNA und RNA Oligonukleotide         Iethoden         Herstellung chemisch kompetenter Escherichia coli Zellen         Herstellung von gDNA und cDNA         Klonierung         3.1	
15       2       Ma         2.1       N       2.1.1         2.1.2       2.1.3       2.1.4         2.1.5       2.1.6       2.1.7         2.1.8       2.2       N         2.2.1       2.2.2       2.2.3         2.2.3       2.2.3       2.2.3	terial und Methoden         Iaterial         Geräte         Verbrauchsmaterialien         Enzyme und Plasmide         Bakterienstämme und Pflanzen         Software und Datenbanken         Chemikalien         Häufig genutzte Lösungen und Puffer         Sequenzierungen, DNA und RNA Oligonukleotide         Iethoden         Herstellung chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen         Herstellung von gDNA und cDNA         Klonierung         3.1       Klonierung in pET-basierte Vektoren         3.2       Ligationsunabhängiges Klonieren	
15       2       Ma         2.1       N       2.1.1         2.1.2       2.1.3       2.1.4         2.1.5       2.1.6       2.1.7         2.1.8       2.2       N         2.2.1       2.2.2       2.2.3         2.2.3       2.2.3       2.2.3         2.2.3       2.2.3       2.2.3	terial und Methoden	
15       2       Ma         2.1       M         2.1.1       2.1.2         2.1.3       2.1.4         2.1.5       2.1.6         2.1.7       2.1.8         2.2       N         2.2.2       2.2.3         2.2.3       2.2.3         2.2.3       2.2.3         2.2.3       2.2.3	terial und Methoden	
15       2       Ma         2.1       M         2.1.1       2.1.2         2.1.3       2.1.4         2.1.5       2.1.6         2.1.7       2.1.8         2.2       M         2.2.1       2.2.2         2.2.3       2.2.3         2.2.4       2.2.4	terial und Methoden         Iaterial         Geräte         Verbrauchsmaterialien         Enzyme und Plasmide         Bakterienstämme und Pflanzen         Software und Datenbanken         Chemikalien         Häufig genutzte Lösungen und Puffer         Sequenzierungen, DNA und RNA Oligonukleotide         Herstellung chemisch kompetenter Escherichia coli Zellen         Herstellung von gDNA und cDNA         Klonierung         3.1       Klonierung in pET-basierte Vektoren         3.2       Ligationsunabhängiges Klonieren         3.3       Transformation in Escherichia coli Zellen         B.4       Colony-Screening         Polyacrylamid Gelelektrophoresen (PAGE)	
15       2       Ma         2       Ma         2.1       N         2.1.1       2.1.2         2.1.3       2.1.4         2.1.5       2.1.6         2.1.7       2.1.8         2.2       N         2.2.1       2.2.2         2.2.3       2.2.3         2.2.4       2.2.4	terial und Methoden         faterial         Geräte         Verbrauchsmaterialien         Enzyme und Plasmide         Bakterienstämme und Pflanzen         Software und Datenbanken         Chemikalien         Häufig genutzte Lösungen und Puffer         Sequenzierungen, DNA und RNA Oligonukleotide         Iethoden         Herstellung chemisch kompetenter Escherichia coli Zellen         Herstellung von gDNA und cDNA         Klonierung         3.1       Klonierung in pET-basierte Vektoren         3.2       Ligationsunabhängiges Klonieren         3.3       Transformation in Escherichia coli Zellen         3.4       Colony-Screening         Polyacrylamid Gelelektrophoresen (PAGE)         4.1       SDS-PAGE	
15       2       Ma         2.1       M         2.1.1       2.1.2         2.1.3       2.1.4         2.1.5       2.1.6         2.1.7       2.1.8         2.2       N         2.2.2       2.2.3         2.2.3       2.2.3         2.2.4       2.2.4	terial und Methoden         faterial         Geräte         Verbrauchsmaterialien         Enzyme und Plasmide         Bakterienstämme und Pflanzen         Software und Datenbanken         Chemikalien         Häufig genutzte Lösungen und Puffer         Sequenzierungen, DNA und RNA Oligonukleotide         Iethoden         Herstellung chemisch kompetenter Escherichia coli Zellen         Herstellung von gDNA und cDNA         Klonierung         3.1       Klonierung in pET-basierte Vektoren         3.2       Ligationsunabhängiges Klonieren.         3.3       Transformation in Escherichia coli Zellen         3.4       Colony-Screening.         Polyacrylamid Gelelektrophoresen (PAGE)         4.1       SDS-PAGE	

2.2.5	Proteinproduktion	31
2.2.	5.1 Expressionstest	31
2.2.	5.2 Löslichkeitstest	32
2.2.6	Protein Aufreinigung	32
2.2.	6.1 Homeotic Protein Knotted-1	33
2.2.	6.2 Translationally controlled tumor associated protein (TCTP)	34
2.2.	6.3 Tobacco Etch Virus Protease (TEV Protease)	35
2.2.	6.4 T7 RNA Polymerase	35
2.2.	6.5 Inorganische Pyrophosphatase aus <i>E. coli</i>	36
2.2.	6.6 Vitamin B12 unabhängige Methionin Synthase 1 (MS1)	36
2.2.7	Circulardichroismus (CD) Experimente	36
2.2.8	Dynamic Light Scattering (DLS) Versuche	37
2.2.9	Limitierte Proteolyse	37
2.2.10	Small angle X-Ray Scattering (SAXS) Experimente	38
2.2.11	Protein Kristallisationsexperimente	39
2.2.12	Messung intrinsischer Fluoreszenz	40
2.2.13	In vitro T7 RNA Transkription	40
2.2.14	Microscale Thermophorese Messungen	41
2.2.15	DEPC-Behandlung von Proteinen	42
2.2.16	DNA/RNA Bindestudien	42
2.2.	<b>16.1</b> Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	42
2.2.	<b>16.2</b> Zone Interference Gelelektrophorese (ZIGE)	43
2.2.	16.3 Gelfiltration	43
2.2.	.16.4 UV Crosslinking von DNA und Protein	43
2.2.17	Interaktionspartnersuche	44
2.2.	.17.1 Herstellung von Pflanzenextrakt	44
2.2.	17.2 Ligandenidentifizierung über Protein Pull-down	44
2.2.	17.3 Gelfiltration mit Pflanzenextrakt	45
2.2.	17.4 Far-Western Blots	45
2.2.18	In silico Docking Experimente	46
2.2.19	MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie	47
2.2.	<b>19.1</b> Peptide Mass Fingerprint	47
2.2.	<b>19.2</b> MS/MS Ion Search	48
2.2.	<b>19.3</b> Proteingrößenbestimmung im linearen Messmodus.	48
3 Erg	gebnisse und Diskussion	49
3.1 I u	Das phloemmobile uncharakterisierte Protein At1g64370 ist ein hochgradig ungeordnetes Pi ind besitzt Dehydrin-ähnliche Eigenschaften	otein 49
3.1.1	Bioinformatische Strukturvorhersagen und Sequenzeigenschaften	49
3.1.2	Größenbestimmung des rekombinanten At1g64370 über Gelfiltrations- und Dynamic Light Sca Experimente	<i>ttering</i> 51
3.1.3	Circulardichroismus-Experimente zeigen ligandenabhängige Konformationsänderungen	57
3.1.4	Kleinwinkel-Röntgenbeugungsexperimente (SAXS) bestätigen die ungefaltete Natur des Protei	ns und
	zeigen verschiedene Konformationen in Lösung auf	65
3.1.5	Zusammenfassung	75
3.2 I	Das pflanzliche TCTP zeigt ähnliche strukturelle und funktionelle Eigenschaften auf wie Jamologe in enderen Organsimen	76
321	Kristallisations, and Small angle Y-Ray Scattering Versuche zur Restimmung der 2D Struktur	<b>70</b> 76
J.2.1 2 7	11 CD. DI S. und Kristallisationsversuche am C terminal Histidin getagaten TCTP	07
3.2. 2 2	<ul> <li>12 SAVS Analysen am fraien und ligenden schundenen TCTD</li> </ul>	0 /
3.2.	In vitro Interaltionestudian zur Identifizionung von Interaltionenertram des TCTDs 4 de 1	84
3.2.2	in virio-interactionssitutien zur identifizierung von interactionspartnern des TCTPS aus A. Indi	ипа 89

	3.2.2.	1 Identifizierung von Protein:Protein-Interaktionen im Phloemsaft von Brassica napus	89
	3.2.2.	2 Nachweis niedermolekularer Liganden aus Pflanzenextrakt von <i>A. thaliana</i>	95
	3.2.2.	3 In silico Docking Versuche und Affinitätsmessungen vom Hemin und weiterer identifizierte	r 101
3	23	Liganden	101
0.	2.0		105
3.3	Kn	otted-1 als mobiler Transkriptionsfaktor bindet Sequenz-spezifisch DNA und RNA	. 111
3.	.3.1	Die Transaktivatordomäne (PKNOX) ist der löslichkeits- und stabilititätslimiterende Bereich des	
_	1	Knotted-1 Proteins	. 111
3.	3.2	Die isolierte Homöobox-Domäne bindet sowohl DNA als auch RNA	. 118
3.	3.3 X	SAXS, DLS und CD-Messungen zeigen eine hohe Flexibilität der Homoobox	124
5.	.3.4		129
3.4	Scl	llussfolgerung und Ausblick	. 130
4	Zusa	immenfassung	133
-			100
5	Abst	ract	136
5	ADSU	1 ACT	150
(	T :4		120
0	Liter	aturverzeichnis	130
_			
7	Anha	ang	153
71	На	untsächlich genutzte Proteinsequenzen.	153
/•1	114	uptsachnen genutzte i rotenisequenzen.	, 133
7.2	Ge	nutzte Primer für die DNA Bindestudien:	. 154
	G		
7.3	Ge	nutzte Primer für die <i>in vitro</i> Transkription:	. 154
8	Post	erpräsentationen und Publikationen	155
0.1	D		
8.1	Pos	sterpräsentationen	. 155
8.2	Pu	blikationen	. 155
9	Bete	iligungen an der Lehre	156
9.1	Ba	chelorarbeiten	. 156
9.2	Pro	piektstudien	. 156
9.3	We	eitere betreute Arbeiten	. 156
9.4	Bet	treute Praktika	. 156
<b>F</b> • •	=		<u> </u>
Eide	esstattl	icne versicherung	. 157
10	Danl	ksagung	IX
-		0 0	-

## Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström (0.1 nm)
ACN	Acetonitril
CD	Circulardichroismus
СТР	Cytosintriphosphat
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)Carbodiimid Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxiribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreithol
FT	Flowering Locus T
GAI	Gibberellic acid insensitive
GFP	Green fluorescent Protein
GTP	Guanintriphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRF	Histamine-releasing Faktor
HSP	Heat-shock Protein
IDP	Intrinsisch ungeordnetes Protein
IDR	Intrinsisch ungeordnete Region
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
KN1	Knotted-1
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight
MBP	Maltose Bindeprotein
mRNA	Messenger RNA
MW	Molekulargewicht
NCAP	Non-cell autonomous Protein
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
NMR	Nuclear Magnetic Resonance

OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
R <sub>g</sub>	Gyrationsradius
R <sub>h</sub>	hydrodynamischer Radius
RGA	Repressor of GAI
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Rotationen pro Minute
SA	Sinapinsäure
SAM	Shoot apical meristem
SAXS	Small Angle X-Ray Scattering
SCR	Scarecrow
SEL	Size Exclusion Limit
TALE	Three amino acid loop extension
ТСТР	Translationally controlled tumor associated Protein
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine
TEV	Tobacco Etch Virus
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethyl
XFEL	X-Ray free-electron Laser
x g	Relative Zentrifugalkraft
ZIGE	Zone Interference Gel Electrophoresis

## Abkürzungen der Nukleotide

А	Adenin
С	Cytosin
G	Guanin
Т	Thymin

U Urazil

## Abkürzungen der Aminosäuren

Ein-Letter Code	Drei-Letter Code	Name
А	Ala	Alanin
С	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat
Ε	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
Н	His	Histidin
Ι	Ile	Isoleucin
К	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
Μ	Met	Methionin
Ν	Asn	Asparagin
Р	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
Т	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2. Aufbau von komplexen dreidimensionalen Proteinstrukturen.	
Abbildung 2. Häufig vorkommende Motive bestehend aus $\beta$ -Faltblättern (Pfeil) und $\alpha$ -Helices (Z	Zylinder) 3
Abbildung 3. Schematischer Aufbau von Dampfdiffusions- und Microbatch Experimenten	
Abbildung 4. Phasendiagramm zur Proteinkristallisation.	
Abbildung 5. Identifizierung von Interaktionsstellen zwischen zwei Proteinen nach vorheriger c	hemischen
Modifizierung	
Abbildung 6. Aufbau der TALE Homöobox Domäne am Beispiel des Transkriptionsfaktors ME	IS1 14
Abbildung 7. Konservierte Regionen in der TCTP Struktur.	
Abbildung 8. In silico Strukturvorhersagen und Sequenzmotive für das At1g64370 Protein aus	1 <i>rabidopsis</i>
thaliana	
Abbildung 9. At1g64370 Proteinisolierung aus E. coli über eine Affinitätschromatographie- und	
Gelfiltrationssäule	
Abbildung 10. MALDI-TOF Massenspektrum vom aufgereinigten At1g643710 zur genauen	
Größenbestimmung und Abschätzung der Reinheit	55
Abbildung 11. DLS Messung mit aufgereinigtem At1g64370 Protein	56
Abbildung 12. DEPC-Modifizierung vom At1g64370 im Kupfer-gebundenen und ungebundener	n Zustand 60
Abbildung 13. Ergebnisse der Circulardichroismus-Messungen vom At1g64370 Protein	
Abbildung 14. Alignment der Proteinsequenzen vom At1g64370 und BnPP99 Protein.	
Abbildung 15. Aufgenommene Streukurven vom At1g64370 Protein mit unterschiedlichen Konz	entrationen. 67
Abbildung 16. Kratky-Plot und Distanzverteilungsfunktion der At1g64370 Konzentrationsreihe,	
beziehungsweise der 3 und 5 mg/ml Probe, sowie das Dammif ab initio Strukturm	odell 70
Abbildung 17. EOM Berechnungen zur Flexibilität und Konformation vom At1g64370 anhand d	er
unterschiedlichen Konzentrationen.	
Abbildung 18. Sequenz Alignment und Kristallkontakte der Homologe aus Plasmodium falcipart	um (pdb code:
3P3K) und Homo sapiens (pdb code: 3EBM)	
Abbildung 19. Überprüfung des Molekulargewichtes und Reinheit des rekombinanten TCTPs m	ittels MALDI-
TOF MS und anschließende DLS Langzeitmessungen	
Abbildung 20. CD-Ergebnisse für das TCTP in Gegenwart verschiedener potentieller Liganden	80
Abbildung 21. Kristallisationsergebnisse für das TCTP aus A. thaliana.	
Abbildung 22. SAXS-Ergebnisse für das TCTP aus A. thaliana.	
Abbildung 23. Coomassie gefärbtes SDS/-Gel und Far-Western Blot.	
Abbildung 24. Nachweis niedermolekularer Hemin-ähnlicher Liganden im Pflanzenextrakt aus A	A. thaliana über
Gelfiltrations- und Pull-down Experimente.	
Abbildung 25. In vitro-Dimersierungsassay mit Hemin, Artemisinin sowie proteinfreiem Zellext	rakt 100
Abbildung 26. In silico Docking Ergebnisse für das TCTP aus A. thaliana am iTasser Oberfläche	enmodell 102
Abbildung 27. Affinitätsmessungen zwischen TCTP und den Liganden Hemin und Farnesol	
Abbildung 28. Schematische Domänenverteilung im Knotted-1 Protein	
Abbildung 29. Löslichkeitsoptimierung und Nickelaffinitätschromatographie des Wildtyp Knotte	ed-1114

Abbildung 30. Löslichkeits- und Aufreinigungsversuche am MBP-getaggten Knotted-1 und der	
Homöoboxdomäne	116
Abbildung 31. Analysen zur Interaktion des Homöobox-Konstrukts FM08 mit verschiedenen DNA- und RNA	4-
Oligomeren	119
Abbildung 32. Identifizierung der möglichen DNA Bindestelle über Proteinmodifizierungen über DEPC- und	l
UV Crosslink-Versuche	122
Abbildung 33. CD- und DLS-Ergebnisse für das Knotted-1 als auch das Homöobox-Domänen Konstrukt FM	08.
	125
Abbildung 34. Kristallisationsergebnisse für das ungebundene Homöobox-Konstrukt FM08	126
Abbildung 35. SAXS-Ergebnisse für das FM08-Konstrukt ohne DNA.	128

### Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Übersicht genutzter Protein Konstrukte	26
Tabelle 2. PCR-Ansatz f             ür die Phusion-Polymerase.	25
Tabelle 3. Genutzte Primer zur Generierung der verschiedenen Konstrukte	27
Tabelle 4. Ansätze für den T4 DNA Polymerase-Verdau.	29
Tabelle 5. PCR Mix und Programm für die Colony-Screen PCR	29
Tabelle 6. Zusammensetzungen des Trenngels und des Sammelgels nach Laemmli.	29
Tabelle 7. Genutzte Puffer f         ür die Tris-Trizin-(Urea) PAGE	30
Tabelle 8. Zusammensetzung des Tris-Trizin und Tris-Trizin-Urea Gels.	30
Tabelle 9. Verwendete bakterielle Expressionsstämme und deren Eigenschaften.	31
Tabelle 10. Ansatz f             ür die in vitro RNA-Synthese mit Hilfe der T7 RNA Polymerase.	41
Tabelle 11. Berechnung der Sekundärstruktur über Circulardichroismus-Experimente	59
Tabelle 12. Experimentell ermittelte Werte f         ür unterschiedliche At1g64370 Konzentrationen mittels	
Kleinwinkelbeugungsexperimenten.	69
Tabelle 13. Ermittelte Dimensionen und Molekulargewichte für die einzelnen TCTP Proben durch SAXS.	87
Tabelle 14. Identifizierte TCTP-Interaktionspartner über Far-Western Blots	91
Tabelle 15. Mögliche niedermolekulare Liganden für das TCTP im Pflanzenextrakt von A. thaliana	98
Tabelle 16. Berechnete Affinitäten verschiedener möglicher Liganden für das TCTP aus A. thaliana	107

### 1 Einleitung

Proteine spielen in allen zellulären Abläufen eine wichtige Rolle. Sie geben einer Zelle beispielsweise Struktur, sind an der DNA-Replikation beteiligt und sind außerdem sowohl im Schutz, Abbau und Aufbau anderer Makromoleküle und niedermolekularer Substanzen involviert. Ähnlich wie DNA und RNA sind Proteine aus einzelnen Bausteinen aufgebaut. Während Nukleinsäuren Information durch eine Abfolge der Basen Adenin, Guanin, Cytosin, Thymin und im Fall von RNA zusätzlich Uracil speichern, sind Proteine aus insgesamt 20 verschiedenen Aminosäuren aufgebaut. Diese sind chemisch stark unterschiedlich und lassen sich in verschiedene Gruppen einteilen. Zu den Gruppen gehören Aminosäuren mit sauren (Glutaminsäure, Asparaginsäure), basischen (Lysin, Arginin, Histidin), unpolaren (Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Tryptophan, Prolin) und polaren Seitenketten (Serin, Threonin, Cystein, Tyrosin, Asparagin, Glutamin). Durch Verknüpfen der Carboxylgruppe (COOH) mit der Amin-Gruppe (NH<sub>2</sub>) der nächsten Aminosäure unter Abspaltung von Wasser können Polypeptidketten unterschiedlicher Länge entstehen, die je nach Zusammensetzung unterschiedliche Eigenschaften besitzen und verschiedene dreidimensionale Strukturen annehmen können. Dabei ist nicht nur die Abfolge der Aminosäuren im Polypeptid entscheidend für die biophysikalischen Eigenschaften, sondern ebenfalls der Anteil und lokale Anhäufung einzelner Aminosäuren oder Aminosäureklassen. So kann ein hoher Anteil an unpolaren Aminosäuren eine Membranlokalisation bedeuten und Bereiche mit hohem Anteil an basischen Aminosäuren eine Bindung an negativ geladene Makromoleküle, wie Nukleinsäuren und sulfatisierte Glykosaminoglykane bedeuten. Ebenfalls diktiert die Zusammensetzung der Polypeptidkette die Stabilität des daraus resultierenden gefalteten Proteins. Die Proteinbiosynthese wird durch das Ribosom, ein mehrere Megadalton großer Ribonukleoproteinkomplex, durchgeführt. Dabei beginnt jede neu synthetisierte Polypeptidkette mit einem Methionin, welches durch das Start-Codon AUG auf der mRNA kodiert vorliegt. Dieses Methionin wiederum ist häufig Ziel erster co- und posttranslationaler Modifizierungen. So kann dieses abgespalten werden oder durch Modifikationen wie Acetylierungen verändert werden. Weitere Modifizierungen, die an der neu synthetisierten Polypeptidkette auftreten können, umfassen Phosphorylierungen, Glykosylierungen, Nitrosylierungen und viele weitere. Je nachdem welche Modifikation auftritt ergeben sich teils neue Eigenschaften des neu synthetisierten Proteins. So können Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen von Proteinen die Aktivität eines Proteins anbeziehungsweise abschalten. Ebenso können Acetylierungen das Protein für den Abbau markieren oder es davor beschützen. Somit können neben der Abfolge der Aminosäuren zusätzlich durch deren Modifikation eine Vielzahl an Funktionen erfüllt werden.

#### 1.1 Proteinstrukturen und Funktionen

Die unterschiedlichen Funktionen und Interaktionen mit anderen Makromolekülen sind häufig auch auf konservierte dreidimensionale Faltungen dieser Polypeptidketten zurückzuführen. Die Abfolge der Aminosäuren innerhalb des Polypeptids wird fälschlicherweise als Primärstruktur bezeichnet. Diese Nomenklatur ist dahingehend ungenau, als dass die Aminosäuresequenz *per se* keine Struktur besitzt. Eine erste strukturelle Einteilung kann über die Sekundärstruktur erfolgen. Hierzu gehören  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblätter und zufällig verteilte Strukturen (*Random*). Sie werden durch Interaktionen des Peptidrückgrates gebildet, wobei die funktionellen Seitengruppen nicht involviert sind. Die unterschiedlichen Sekundärelemente werden durch zumeist kurze unstrukturierte Bereiche miteinander verbunden. Zu diesen gehören *Loops* und *Turns*, die über einen längeren, beziehungsweise kurzen Bereich zwischen den strukturbildenden Sekundärelementen vorliegen und maßgeblich auch die Flexibilität eines Proteins bestimmen.



Abbildung 1. Aufbau von komplexen dreidimensionalen Proteinstrukturen.

Das Vorkommen bestimmter Aminosäuren kann die Ausbildung einzelner Strukturen entlang des Polypeptids verhindern oder induzieren. So ist Prolin aufgrund seiner Ringstruktur bekannt als Helixbrecher zu fungieren, so dass diese Aminosäure seltener in helikalen Bereichen, als vielmehr in *Turns und Loops* wiederzufinden ist. Große aromatische Aminosäuren hingegen bilden vorzugsweise  $\beta$ -Faltblätter aus, da hierdurch die raumfordernden Seitenketten besser ausgerichtet sind als in Helices (1, 2).  $\beta$ -Faltblätter können in zwei verschiedenen Formen vorkommen. Als antiparallele Faltblätter verläuft der N-Terminus des einen  $\beta$ -Stranges in die entgegengesetzte Richtung vom N-Terminus des zweiten Stranges. Parallele Faltblätter bedeuten dementsprechend, dass die N-Termini beider Stränge in gleicher Richtung liegen.

Die Kombination aller Sekundärstrukturen innerhalb einer einzelnen Polypeptidkette mit einhergehender Interaktion einzelner Sekundärelemente führt zur Bildung räumlicher Konformationen, die als Tertiärstruktur bezeichnet werden (Abbildung 1). Die räumliche Konformation des Polypeptids bestimmt in vielen Fällen bereits die Aktivität des mittlerweile gefalteten monomeren Proteins. Ebenso kann die eigentliche Aufgabe des Proteins durch Bildung großer Aggregate induziert werden. Dabei können Homo- oder Heteromere unterschiedlicher Größe entstehen. Die Kombination mehrerer Proteine in einem hochmolekularen Komplex wird als Quartärstruktur bezeichnet. Cystein ist diesbezüglich in der Lage sowohl die Tertiär- als auch Quartärstruktur von Proteinen zu beeinflussen. Durch Ausbildungen einer kovalenten Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen können Konformationen und Protein:Protein-Interaktionen stabilisiert werden. Proteine lassen sich nach unterschiedlichen Aspekten klassifizieren. So ist eine Einteilung nach Art der zusätzlichen Modifizierung der Proteine möglich und erlaubt die Gruppierung beispielsweise in einfache, unmodifizierte Proteine, Phosphoproteine, Glykoproteine und Chromoproteine. Letztere besitzen keine kovalente Modifizierung wie Phosphat, sondern enthalten vielmehr prosthetische Gruppen wie das Häm im Hämoglobinprotein. Darüber hinaus können Proteine nach ihrer Form (fibrillär, globulär) und nach ihren biologischen Funktionen eingeteilt werden. Dabei lassen sich Proteine in Enzyme (Katalysatoren chemischer Reaktionen, wie Auf- und Abbau von Substanzen), Transportproteine (Transport von Ionen und anderer Makromoleküle), Strukturproteine (Erhalt der zellulären Form), Pumpen und Speicherproteine, in Hormone und Proteine, die schützend wirken, und nach vielen weiteren Funktionen einteilen. Eine zusätzliche Möglichkeit ist die Klassifizierung nach der Faltung. Proteine liegen nur zum Teil in gut gefalteten Domänen und Formen vor. Ein Großteil aller Proteine besitzt ungeordnete Bereiche zwischen einzelnen gefalteten Domänen, wiederum andere besitzen keinerlei Faltung und werden als intrinsisch ungeordnete Proteine (IDPs) bezeichnet.

#### **1.2** Gefaltete und intrinsisch ungeordnete Proteine

Ein wesentlicher Anteil an Proteinen liegt gefaltet vor oder besitzt kompakt gefaltete Domänen mit verbindenden ungeordneten Bereichen. Dabei können mehrere Varianten unterschieden werden. Neben rein aus  $\alpha$ -Helices oder aus  $\beta$ -Faltblättern bestehenden Proteinen, wie die Homöodomäne, beziehungsweise SH3-Domäne, existieren Mischformen bestehend aus  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern. Dabei werden Faltungen der Form  $\alpha + \beta$  und  $\alpha/\beta$  unterschieden (3). Erstere liegt vor, wenn beide Strukturelemente unabhängig voneinander entlang des Polypeptids vorliegen, wie am Beispiel der Ribonuklease A. Die  $\alpha/\beta$  Form liegt vor, wenn beide Elemente alterierend in der Sequenz vorkommen, wie es bei *Leucine-rich Repeat* Proteinen häufig vorkommt. Je nach Abfolge der Strukturelemente

können unterschiedliche Motive gebildet werden.

Unter den am häufigsten vorkommenden Motiven in gefalteten Proteinen gehören unter anderem das *Helix-Turn-Helix* 



Abbildung 2. Häufig vorkommende Motive bestehend aus  $\beta$ -Faltblättern (Pfeil) und  $\alpha$ -Helices (Zylinder).

Motiv, das *Greek Key* Motiv, das  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  Motiv, das  $\beta$ -Mäandermotiv und das Psi-*Loop* Motiv (Abbildung 2). Das *Greek Key* Motiv, bestehend aus vier antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern, und das  $\beta$ -Mäander Motiv sind strukturell ähnlich und sind häufig in räumlichen Formen wie  $\beta$ -Barrels oder  $\beta$ -Propellern zu finden. Ein klassisches Protein dieser Form ist das *Green fluorescent Protein* (GFP) mit einer

fassähnlichen Struktur in deren geschütztem Zentrum die Fluoreszenz ermöglicht wird (4). Im Gegensatz dazu, besteht das  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  Motiv, welches ebenfalls eine fassähnliche Struktur ausbilden kann aus zwei antiparallelen Faltblättern, die durch eine  $\alpha$ -Helix unterbrochen werden und dadurch eine Krümmung und Anordnung in Fassform ermöglicht. Eine besondere Form bildet der Psi-*Loop*. Dieser besteht aus zwei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern, die zusätzlich einen weiteren  $\beta$ -Strang dazwischengeschoben besitzen und dadurch ein Paar parallele und antiparallele  $\beta$ -Faltblätter entstehen. Ein aus hauptsächlich  $\alpha$ -Helices gebildetes Motiv ist das *Helix-Turn-Helix* oder *Helix-loop-Helix* Motiv. Hierbei sind zwei aufeinanderfolgende Helices durch einen kurzen *Turn* oder eine größere ungeordnete *Loop*-Region miteinander verbunden. Dieses Motiv kann insbesondere in DNA-bindenden Proteinen wiedergefunden werden, da es eine selektive Bindung einer der Helices in die große Furche der DNA erlaubt (5, 6).

Allen Strukturen gemein ist die Ausbildung dreidimensionaler Strukturen, die einerseits abgeschlossene Reaktionsräume für eine Vielzahl an enzymatischen Reaktionen bereitstellen. Andererseits ermöglichen sie eine Insertion in Membranen der Zelle. Nahezu alle Membran-durchspannenden Proteine bestehen aus reinen  $\alpha$ -helikalen oder  $\beta$ -Faltblattstrukturen, die entweder die Membran mehrfach durchspannen, und so eine Lokalisation unterschiedlicher Domänen desselben Proteins in unterschiedlichen Kompartimenten ermöglichen, oder aber Poren bilden um einen Stoffaustausch zu ermöglichen (7). Nahezu sämtliche enzymatische Aktivität und Struktur wird über Proteine mit gefalteten Domänen vermittelt. Zu den gefalteten Proteingruppen zählt die Gruppe der katalytisch aktiven Proteine (Proteasen, Kinasen, Ligasen und weitere), die Gruppe der Transportproteine (Zuckertransport, Elektronentransport), Proteine, beteiligt an der Biosynthese verschiedener Stoffe (Aminosäurenbiosynthese, Lipidsynthese und weitere) sowie dem Metabolismus (Karbohydratmetabolismus) und Transmembranproteine (Porine).

Intrinsisch ungeordnete Proteine und Proteine mit intrinsisch ungeordneten Regionen (IDR) hingegen spielen bei einer Vielzahl weiterer Prozesse eine wichtige Rolle. Sie sind wichtige Bestandteile in der Regulation von Signalwegen, Transkription, Translation und im Zellzyklus (8). Eine enzymatische Aktivität ist für IDPs bislang nicht bekannt. Die Beteiligung an diesen Wegen beruht hauptsächlich auf der Bindung von Nukleinsäuren, Proteinen, Ionen und Membranen. Etwa ein Drittel aller eukaryotischen Proteine gelten als intrinsisch ungeordnet, beziehungsweise besitzen größere ungeordnete Regionen. Weiterhin besitzen mehr als die Hälfte aller Proteine längere ungeordnete Regionen, wobei 70 % aller in der Signaltransduktion beteiligten Proteine eben diese Regionen besitzen (8–10). Im Vergleich zu Prokaryoten und Archaeen ist der Anteil an IDPs in Eukaryoten signifikant höher. So sind lange ungeordnete Bereiche mit einer Länge von mehr als 30 Aminosäuren ebenfalls zu knapp ein Drittel in Eukaryoten vertreten, während der Anteil bei den Archaeen mit nur 2 %, beziehungsweise 4 % bei den Prokaryoten äußerst gering ausfällt (8, 11). Erste Genom-weite Analysen an *Arabidopsis thaliana* zeigten zudem, dass im Vergleich zum humanen Proteom der Anteil an IDPs am Gesamtproteom vergleichsweise kleiner ist. Interessanterweise konnte im Vergleich zu den humanen IDPs eine

Anreicherung von Arabidopsis IDPs mit biologischen Funktionen in der Proteinfaltung, dem Stickstoffzyklus, dem Flavonoidmetabolismus, dem Eisentransport, dem Glycerolethermetabolismus und bei der Erkennung externer Stimuli festgestellt werden (10). Dabei ist die Anhäufung von Proteinen, die in der Proteinfaltung und Stimulierkennung involviert sind, wenig überraschend. Pflanzen als sessile Organismen sind Umwelteinflüssen in höherem Maße ausgesetzt als nicht sessile Organismen wie tierische Eukaryoten. Sowohl biotische als auch abiotische Einflüsse erfordern eine bessere Ausstattung an Schutz- und Reparaturmechanismen, sowie Möglichkeiten den externen Stress zu detektieren.

Allen IDPs gemein ist der hohe Anteil an hydrophilen und geladenen Aminosäuren und das Fehlen aromatischer Aminosäuren. Zusätzlich besteht ein sehr geringer Grad an Sequenzkomplexität, was bedeutet, dass nur einige Aminosäuren überproportional häufig in der Sequenz vorkommen. Hierzu gehören Unordnung fördernde Aminosäuren wie Ala, Arg, Gly, Gln, Ser, Glu, Lys und Pro. Aufgrund dieser Eigenschaften sind IDPs nicht in der Lage spontan dreidimensionale Faltungen anzunehmen, sondern verbleiben als zufällig strukturierte Polypeptidkette in Lösung (8, 12–14). Trotz dessen können spezielle Funktionen ausgeführt werden. Die Beobachtung, dass trotz nicht vorhandener dreidimensionaler Struktur diese Proteine funktionell sind, galt als Widerspruch für das lange angenommene Struktur-führt-zu-Funktion (Lock-and-Key) Paradigma. Für lange Zeit wurde angenommen, dass alle Proteine aus komplett gefalteten Polypeptidketten bestehen und nur diese biologischen Funktionen ausführen können. IDPs und IDRs hingegen wurden als biologisch inaktiv angesehen. Allerdings ist mittlerweile bekannt, dass gerade diese Proteine ihre eigentliche Funktion erst aufgrund ihrer strukturlosen Form und hoher Flexibilität erfüllen können. Durch die Flexibilität kann gewährleistet werden, dass viele verschiedene Makromoleküle gebunden werden und im Falle von IDRs, dass unterschiedliche Domänen voneinander freibeweglich vorliegen können (8, 14). Durch Bindung an andere Proteine kann jedoch lokal in den IDPs Faltung induziert werden, welche wiederum als Signal für weitere Interaktionen dienen kann. Infolge dessen wurde das starre Lock-and-Key Konzept der Bindung zwischen Protein und Ligand durch das der Natur näher beschreibende Induced-Fit Modell ersetzt, welches die Bindemechanismen der IDPs und IDRs ebenfalls erklärt. Dieses basiert auf der Annahme, dass durch das Binden eines Liganden jeglicher Art die Konformation dahingehend geändert werden kann, dass beide Interaktionspartner perfekt zueinander passen und somit die Affinität durch Konformationsänderung steigt.

Versuche IDPs einzuordnen führten zu einer Klassifizierung aller intrinsisch ungeordneten Proteine in insgesamt sechs verschiedene Gruppen. Hierzu gehören die Gruppen der *Assemblers* (Proteine, die ein Zusammensetzen größerer Komplexe ermöglichen), Chaperone (Proteine, die in der Neufaltung anderer Proteine helfen), Effektoren (Proteine, die durch Bindung eine Signalweitergabe ermöglichen), entropische Ketten (Proteine, mit hoher struktureller Flexibilität, die zumeist die Elastizität von Komplexen definieren) und *Scavengers* (Proteine, die insbesondere toxische Schwermetallionen binden und somit unschädlich machen) (8, 15–17). Einige als Chaperon fungierende IDPs sind ebenfalls als Janus Chaperone bekannt.

Als Janus Chaperone werden Proteine bezeichnet, die sowohl an der Protein- als auch an der RNA-Faltung beteiligt sind. Eine bislang noch nicht weiter verstandene Eigenschaft einiger IDPs ist deren Möglichkeit *Stress Granules* zu bilden. Diese *Granules* bilden membranfreie Kompartimente im Cytosol als auch Nukleoplasma und können somit ein zusätzliches *Silencing* auf Translationsebene ermöglichen. Diese *Stress Granules* können sowohl aus RNAs, Proteinen oder auch aus Kombinationen beider bestehen und erlauben eine stressabhängige Freisetzung der eingeschlossenen Makromoleküle, um so auf bestimmte zelluläre Prozesse regulierend wirken zu können (18).

Im Vergleich zu gefalteten Proteinen sind intrinsisch ungeordnete Proteine in der Zelle in geringerer Menge vertreten. Dies liegt hauptsächlich an der verkürzten Halbwertszeit solcher Proteine in der Zelle, ist aber auch aufgrund ihrer Vielzahl an Funktionen und Interaktionen, die sie parallel eingehen können, streng in der Zelle reguliert. Durch posttranslationale Modifizierungen wie Phosphorylierungen, Acetylierungen und weiterer ist die Halbwertszeit überdies weiter modulierbar und kann verlängert oder verkürzt werden (19).

In Pflanzen existieren zwei zusätzlich auftretende IDP Gruppen. Zu diesen gehören die Dehydrine als auch Proteine der GRAS Familie. Dehydrine sind nahezu komplett ungefaltet und können diese Unordnung selbst durch Binden an Interaktionspartner erhalten. Sie besitzen im Wesentlichen Chaperon-Funktion, insbesondere unter besonderen Wasserstressbedingungen, wie bei Trockenheit. Proteine der GRAS Familie sind wiederum in der Pflanzenentwicklung und Signalweitergabe beteiligt. Der Name GRAS leitet sich dabei aus den ersten drei in die GRAS Familie eingeteilten Proteine ab (*Gibberellic acid insensitive* (GAI), *Repressor of* GAI (RGA), *Scarecrow* (SCR)) (9).

#### 1.3 Verfahren der Strukturaufklärung von Proteinen

Um die Mechanismen hinter den Funktionen zu verstehen, ist eine genaue Analyse der dreidimensionalen Struktur des Proteins, als auch von Protein:Protein- und Protein:Ligand-Komplexen notwendig. Hierüber können Veränderungen der Konformationen, infolge der Bindung von Substraten, Inhibitoren, Proteinen und Liganden, studiert werden und geben wichtige Einblicke für beispielsweise eine zielgerichtete Entwicklung von Medikamenten über das Structure guided Drug Design (20). Ebenfalls erlaubt es Interaktionsunterschiede und damit einhergehende Strukturänderungen zu beobachten und erklären zu können. Mittlerweile existieren verschiedenste Verfahren, um die Formen und Strukturen von Makromolekülen sichtbar zu machen. Zu diesen gehören unter anderem die Proteinkristallographie und anschließende Röntgenbeugungsexperimente, Kleinwinkelröntgenbeugungsexperimente (Small Angle X-Ray Scattering, SAXS), Kernspinresonanzversuche (NMR), Cryo-Elektronenmikroskopie (Cryo-EM) und auch strukturelle Proteomik. Alle Methoden bedingen jedoch, dass das zu untersuchende Makromolekül, hier Proteine, möglichst rein vorliegt. Die Reinheit des Proteins bezieht sich dabei nicht nur auf das Entfernen etwaiger anderer Proteine in der Probe, sondern umfasst auch, dass das Protein in einer einzelnen Konformation und Aggregatszustand vorliegt. Diese Homogenität ist Voraussetzung, da sonst sowohl die Information des zu untersuchenden Proteins mit den Verunreinigungen und Mischformen kombiniert werden und somit ein komplett verfälschtes dreidimensionales Bild des Proteins darstellen. Alle oben genannten Methoden besitzen hinsichtlich ihres Auflösungsvermögens, Menge an einzusetzendem Protein und Informationsgehalt unterschiedliche Limitierungen und Anwendungsbereiche.

NMR und Cryo-EM sind beides Methoden, die deutlich größenlimitiert sind. Während NMR-Messungen nur an Proteinen mit einem maximalen Molekulargewicht von 35 kDa möglich sind, eignen sich Cryo-EM Messungen an Proteinen und Komplexen die größer als 100 kDa sind (21, 22). Die Größenlimitierung bei NMR-Messungen basiert auf der Messmethode. Durch Messung der Kernspinresonanz werden die erhaltenen Daten von größeren Protein aufgrund der Komplexität nahezu unauswertbar. Im Gegenteil dazu sind Cryo-EM Messungen allein aufgrund des Auflösungsvermögens durch die Elektronenmikroskopie begrenzt und zu kleine Proteine sind nicht mehr im Detail auflösbar. Weiterhin unterscheiden sich beide Methoden hinsichtlich ihrer molekularen Auflösung. Während NMR eine atomare Auflösung und die Bestimmung von mehreren Konformationen in Lösung erlaubt, sind Cryo-EM Strukturen vergleichsweise niedrig aufgelöst und bildnt vielmehr die Umrisse von insbesondere eher rigiden Proteinen. Alternativen bieten die Röntgenstrukturanalysen über proteinkristallographische Messungen und Messungen über Kleinwinkelbeugung an Proteinen in Lösung.

#### 1.3.1 Proteinkristallographie

Eines der ältesten Methoden zur Strukturaufklärung ist die Proteinkristallographie in Kombination mit Röntgenbeugungsexperimenten an den Proteinkristallen. Die ersten kristallisierten Proteine waren neben Hämoglobin und Insulin die Urease aus der Jackbohne, bei der zusätzlich zum ersten Mal die Aktivität des kristallisierten Proteins bestätigt werden konnte. Dadurch konnte erstmalig gezeigt werden, dass kristallisierte Proteine weiterhin in der Lage sind ihre biologische Funktion auszuüben und folglich strukturelle Untersuchungen einen Einblick in die Funktionsweise geben zu können (23). Zusätzlich dient die Kristallisation einzelner Proteine als ein Weg zur weiteren Aufreinigung des Proteins. Neben den bereits erwähnten Voraussetzungen für eine strukturelle Untersuchung der Proteine, sind weitere Parameter für die Proteinkristallisation wichtig. So muss zusätzlich eine ausreichende Löslichkeit des Proteins gewährleistet sein. Zur Kristallisation werden mehrere µg Protein benötigt, um möglichst viele Parameter, die die Kristallisation von Proteinen beeinflussen, auszutesten. Zusätzlich muss das Protein stabil vorliegen. Da sich die Proteinkristallisation in Zeiträumen von Stunden bis hin zu mehreren Monaten vollziehen kann, ist eine ausreichende Stabilität des Proteins in Lösung unerlässlich.

Beide Faktoren spielen eine wichtige Rolle um eine gesättigte Proteinlösung zu erreichen, die die Bildung von Kristallisationskeimen fördert (23). Darüber hinaus sind Proteine leichter zu kristallisieren, die möglichst wenige flexible Bereiche besitzen und hauptsächlich kompakt vorliegen.



Abbildung 3. Schematischer Aufbau von Dampfdiffusions- und *Microbatch* Experimenten. Durch die hohe Salzkonzentration im Reservoir wird dem Protein:Präzipitant Gemisch fortwährend Wasser entzogen und der Tropfen fortwährend konzentriert. Im *Microbatch* Verfahren entweicht das im Tropfen vorhandene Wasser langsam in die ölige Phase.

Eine zu hohe Flexibilität im Protein kann dazu führen, dass die symmetrische Anordnung der Proteinmoleküle in eine geordnete Kristallform unmöglich wird. Infolge dessen eignen sich intrinsisch ungeordnete Proteine als auch Proteine mit großen intrinsisch ungeordneten Regionen nicht zur Kristallisation. Im Wesentlichen existieren drei verschiedene Verfahren der Proteinkristallisation. Hierzu zählen die Dampfdiffusionsexperimente

(*Hanging/ Sitting Drop*), Kristallisation unter Öl (*Microbatch under Oil*) und die Kristallisation durch Gegendiffusion in einer Glaskapillare (*Counter Diffusion*) (Abbildung 3). Allen gemein ist, dass durch Zugabe einer Präzipitantenlösung die Bedingungen für das Protein so geändert werden, dass eine Kristallisation begünstigt wird. Hierzu zählen pH-Wert, Salzart (kosmotrop, chaotrop), Metalle und weitere Präzipitanten wie Polyethylenglykole, Ethylenglycol sowie weitere Alkohole. Ziel bei allen Versuchen ist es die metastabile Phase zu erreichen unter denen die Nukleation beginnt. Die am häufigsten verwendete Methode zum Erreichen dieser Phase, beziehungsweise zur Kristallisation im Allgemeinen ist die Dampfdiffusion durch *Sitting Drop*. Bei dieser Form der Dampfdiffusion wird die Proteinprobe zusammen mit der Präzipitantenlösung gemischt und in einem geschlossenen Gefäß inkubiert. Das Gemisch wird hierbei in eine erhöhte Einkerbung pipettiert, während unterhalb des Gemisches die reine Präzipitantenlösung pipettiert wird. Infolge der unterschiedlichen Salzkonzentration im Reservoir und Tropfen entsteht ein Diffusionsgradient hin zum Reservoir. Wasser,



Abbildung 4. Phasendiagramm zur Proteinkristallisation. Durch Dampfdiffusion ist es möglich eine vormals untersättigte Lösung in die labile Phase zu überführen, in der die Nukleation beginnt (roter Punkt). Eine weitere Erhöhung der Proteinkonzentration würde zum Präzipitieren des Proteins führen (modifiziert nach Bergfors (23))

dass aus dem Protein:Präzipitanten Gemisch verdunstet, wird durch die hohe Salzkonzentration im Reservoir angezogen und verdünnt diese, während das fehlende Wasser im Tropfen zu einer langsamen Erhöhung der Präzipitanten- und Protein-konzentration führt. Durch diese Änderung der Konzentrationen im Tropfen ist es möglich ein vormals stabil in Lösung vorliegendes Protein in die metastabile und labile Phase und somit zur Nukleation zu bringen (Abbildung 4). Diese Variante wird häufig eingesetzt, da sie eine Automatisierung durch Roboter erlaubt und so im Hochdurchsatz eine Vielzahl an Bedingungen getestet werden kann.

Neben der Bildung von einzelnen großen Kristallen können weitere Formen auftreten. Sofern die Präzipitantenkonzentration nicht ausreicht verbleibt der Tropfen komplett klar. Eine zu hohe Präzipitantenkonzentration hingegen kann dazu führen, dass das Protein selbst präzipitiert und denaturiert. Weiterhin kann eine Phasentrennung auftreten, in der eine Phase das Protein und die andere Phase den Präzipitanten enthält. Diese Beobachtung kann häufig gemacht werden, wenn insbesondere hochmolekulare Polyethylenglykole verwendet werden (24). Zur Strukturaufklärung wird an den entstandenen Kristallen durch Bestrahlung mit hochenergetischer Röntgenstrahlung ein Streubild auf einem Röntgendetektor aufgenommen, welches für die Berechnung der Proteinstruktur verwendet werden kann. Die daraus ermittelten Auflösungen reichen dabei bis auf unter 1 Å und erlauben eine atomare Auflösung. Als Röntgenquelle dienen bislang die Röntgenbremstrahlung aus Drehanoden, sowie hochenergetische Röntgenstrahlung von Synchrotronen, wie das DESY in Hamburg oder BESSY in Berlin. Je stärker die Strahlung umso kleinere Kristalle werden dabei benötigt. Während frühere Kristalle makroskopisch sichtbar sein mussten, um genügend Daten zur Strukturaufklärung sammeln zu können, reichen heute bereits wenige µm große dreidimensionale Kristalle aus. Durch die Entwicklung neuer Röntgenquellen, wie den X-Ray free-electron Laser (XFEL) werden die Anforderungen weiter herabgesetzt, so dass bereits zweidimensionale Plättchen und Nanokristalle innerhalb kürzester Zeit gemessen werden können. Im Gegensatz zu NMR und Cryo-EM ist die Proteinkristallisation nicht durch die Molekülgröße beschränkt, sondern allein auf die Kristallisierbarkeit des Moleküls. So konnten bislang sowohl Megadaltonkomplexe, wie das Ribosom als auch kleinste Oligopeptide wie Insulin erfolgreich kristallisiert und die Struktur aufgeklärt werden (25–27).

#### 1.3.2 Kleinwinkel Röntgenbeugungsexperimente (SAXS)

Proteine, die nur für kurze Zeit stabil in Lösung vorliegen oder aufgrund hoher intrinsischer Unordnung nicht kristallisiert werden können, können über SAXS-Messungen strukturell aufgeklärt werden. Ebenfalls wie Röntgenbeugungsversuche an Proteinkristallen, existieren keine Größenlimitierungen bei SAXS. Allerdings werden für diese Art von Messungen keine Festkörper, wie Kristalle benötigt, sondern eine homogene Proteinlösung. Eine homogene Proteinlösung bedeutet, dass neben einer hohen Reinheit der Probe ebenfalls nur eine einzelne Aggregatsform vorherrschen sollte, da anders als bei der Kristallisation jedes Molekül in Lösung zur Streuung beiträgt. Die Streuung selber ist überdies abhängig von der Molekülgröße. Größere Moleküle streuen die eintreffenden Röntgenstrahlen stärker als kleinere Partikel. Infolge dessen würde eine Mischung aus Proteinen oder Proteinzuständen unterschiedlicher Größe zu einer falschen Interpretation der Daten führen (28). Ein Vorteil der SAXS-Messungen neben der Analyse flexibler Proteine besteht, darin, dass Dynamiken und Strukturveränderungen in Abhängigkeit von Pufferbedingungen und in Kombination mit Interaktionspartnern unterschiedlicher Größe gemessen werden können. Allerdings kann über SAXS-Messungen eine maximale Auflösung von 10 bis 20 Å erreicht werden, sodass nicht wie bei proteinkristallographischen oder NMR-Messungen

einzelne Atome aufgelöst werden können. Jedoch erlaubt das Auflösungsvermögen eine Darstellung der Molekülform und Dimensionen in Lösung, beziehungsweise deren Änderung durch äußere Einflüsse. Da hochflexible Bereiche in Proteinkristallographiestudien nicht auflösbar sind, können die Proteinkristallstrukturen in Kombination mit den SAXS-Daten ein ganzheitliches Bild des Proteins liefern, inklusive der ungefalteten Bereiche im Protein. Das aufgenommene Streubild wird im Gegensatz zur Proteinkristallstrukturanalyse direkt zur Erzeugung eines *ab initio* Modells genutzt, das auf Grundlage der Form der Streukurve erstellt werden kann.

#### **1.3.3** Strukturelle Proteomik

Eine komplett andere Methode, mit der erste strukturelle Informationen gewonnen werden kann und insbesondere mit SAXS-Modellen eine gute Kombination darstellt, ist die Durchführung struktureller Proteomik. Die generell durchgeführten Proteomstudien befassen sich im Allgemeinen mit der Identifizierung von Proteinen und der Lokalisierung verschiedenster posttranslationaler Modifizierungen am Protein. Hierfür werden Proteinproben entweder über Elektronspray oder eine *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation* (MALDI) Massenspektrometrie näher untersucht. Zwei Herangehensweisen existieren hierbei. So unterscheidet man zwischen dem *Bottom-Up* und dem *Top-Down* Verfahren. Als *Bottom-Up* wird die Art der Identifizierung bezeichnet, in der vor der massenspektrometrischen Analyse das Protein proteolytisch verdaut wird. Dabei werden Trypsin, Chymotrypsin und weitere Proteasen verwendet, die spezifisch nach bestimmten Erkennungssequenzen schneiden. Anhand der entstandenen Peptide kann über einen *Peptide Mass Fingerprint* das Protein identifiziert werden.

Das *Top-Down* Verfahren hingegen basiert auf der Messung ganzer Proteine. Dabei wird eine Identifizierung dadurch erreicht, dass das intakte Protein entweder durch den eingesetzten Laser zur Ionisierung fragmentiert wird (*Ion source decay*) oder aber später durch einen *Collision induced Decay*. Insbesondere N- und C-terminale Proteinfragmente werden dabei gebildet, die anschließend selektiert und weiter in die einzelnen Aminosäuren fragmentiert werden können. Durch das Zusammensetzen der einzelnen Aminosäuren kann zunächst die Zusammensetzung des Fragmentes und damit einhergehend das dazugehörige Protein identifiziert werden. Das *Top-Down* Verfahren eignet sich als hervorragende Alternative zum Edman-Abbau, da sowohl Informationen vom N-, als auch vom C-Terminus erhalten werden können. Hinsichtlich der Bestimmung möglicher Degradationen oder terminale Modifizierungen können diese Informationen hilfreich sein.

Beide Verfahren eignen sich für die strukturelle Proteomik. Bei dieser Art der Proteomik wird der Umstand ausgenutzt, dass Proteine chemisch an oberflächennahen Aminosäuren modifiziert werden können.



Abbildung 5. Identifizierung von Interaktionsstellen zwischen zwei Proteinen nach vorheriger chemischen Modifizierung. Sofern beide Proteine nicht interagieren sollte die Proteinoberfläche gleichmäßig modifiziert werden können. Sobald eine Interaktion stattfindet, wird ein Teil der Proteinoberfläche verdeckt und für die chemische Modifizierung unzugänglich. Eine nachfolgende Peptidanalyse zeigt im Vergleich zu der komplett modifizierten Kontrolle, dass bestimmte Peptide nicht mehr modifiziert vorliegen und diese die mögliche Interaktionsstelle der Proteine darstellen.

Dabei können zum einen einfache Modifizierungen an einzelnen Aminosäuren und zum anderen das chemische Verknüpfen zweier naheliegender Aminosäurereste durchgeführt werden.

Einfache Modifizierungen an einzelnen Aminosäuren eignen sich dahingehend besonders, wenn entweder Bindeepitope oder aber die mögliche Konformationsänderung im Protein infolge einer Ligandenbindung bestimmt

werden müssen. Bereiche, die infolge einer Interaktion mit einem anderen Makromolekül verdeckt werden, können nicht mehr modifiziert werden. Anhand der entstandenen unterschiedlichen Peptidmuster vom ungebundenen modifizierten Protein und dem mit dem Interaktionspartner gebundenen und ebenfalls modifizierten Protein lassen sich die Bereiche ausfindig machen, die infolge der Bindung keine Veränderung der Masse durch eine chemische Modifizierung erfahren haben. Somit können Bereiche innerhalb eines Proteins kenntlich gemacht werden, die für eine Interaktion notwendig sind, beziehungsweise die Bindeeigenschaften verschiedener Interaktionspartner überprüft werden (Abbildung 5). Typische Modifizierungen die genutzt werden können umfassen beispielsweise Carbamylierungen an Cysteinen, Methylierungen von Lysinen oder Carbethoxylierungen von Histidinen, Lysinen und weiteren Aminosäuren (29-32). Entscheidend dabei ist, dass nur oberflächennahe Aminosäuren modifiziert werden können. Modifizierende Substanzen, die entweder Konformationsänderungen induzieren oder erst durch sehr lange Inkubationszeiten mit dem Protein chemisch interagieren, können dabei nicht verwendet werden. Eine noch genauere Bestimmung erlaubt die Verknüpfung von Aminosäuren untereinander oder mit Nukleinsäuren durch die Behandlung mit chemischen Crosslinking Reagenzien oder UV-Strahlung. Dabei werden einerseits chemische Crosslinker verwendet, wie Formaldehyd, Glutaraldehyd oder EDC (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimid Hydrochlorid), die in unterschiedliche Klassen eingeteilt werden können. Glutaraldehyd beispielsweise wird als homobifunktionaler Crosslinker bezeichnet, da zwei Amingruppen verknüpft werden können. EDC hingegen gilt als heterobifunktionaler Crosslinker, der Carboxyl- und Amingruppen verbindet. Weiterhin unterscheiden sich die verschiedenen Crosslinker in der Länge (Spacer) zwischen den funktionellen Gruppen. Dieser reicht von nahezu Null bis hin zu mehreren Å, wodurch auch weiter entfernte Aminosäurereste verknüpft werden können. In den meisten Fällen ist diese Verknüpfung irreversibel und erlaubt im Falle von Protein:Protein-Komplexen das fixieren des gebundenen Zustandes zweier oder mehrerer Proteine.

Das Crosslinken mittels UV-Strahlung basiert hingegen auf der Bildung von Radikalen an insbesondere aromatischen und Hydroxylseitenketten (33). Durch die Radikalisierung ist es möglich, dass zwei interagierende Aminosäurereste oder aber auch eine gebundene Nukleinsäurebase irreversibel verknüpft werden. Über Crosslink-Versuche können mit anschließender massenspektrometrischer Auswertung zwei verschiedene Aussagen getroffen werden. Zum einen erlaubt das Vernetzen von Aminosäuren einen Einblick in die Faltung des Proteins zu erlangen. Außerdem erlaubt das Crosslinken einen genaueren Einblick in die Bindeepitope von zwei interagierenden Makromolekülen. Da nur die Aminosäuren verknüpft werden, die direkt miteinander interagieren, ist so eine nahezu punktgenaue Identifizierung des Epitops möglich. Durch diese Arten der chemischen Modifikation und anschließender massenspektrometrischer Analyse können Einblicke in einzelnen Aminosäureinteraktionen erlangt werden. In Kombination mit SAXS-Messungen ist überdies die Form in Lösung bestimmbar und ermöglicht so ein besseres Bild der intra- und intermolekular vorliegenden Interaktionen, die sonst nur Kristallstrukturen erlauben würden, allerdings mit dem Vorteil, dass auch hochgradig flexible Proteine untersucht werden können.

#### 1.4 Kurz- und Langstreckentransportwege der Pflanze

In Pflanzen existieren hauptsächlich zwei verschiedene Wege Makromoleküle zwischen einzelnen Geweben und Organen auszutauschen. Man unterscheidet zwischen dem Zell-zu-Zell Transport als Möglichkeit Makromoleküle über kurze Strecken auszutauschen und der Relokalisierung der Makromoleküle in das Langstreckentransportsystem, wie das Phloem oder Xylem, zum Austausch von Molekülen zwischen weit entfernten Geweben und Organen. Für den Stoffaustausch stehen zwei unterschiedliche Varianten zur Verfügung. Der apoplastische Transport vollzieht sich durch aktives Pumpen und Relokalisieren über die Membranen mithilfe von membranständigen Transportern und Pumpen und wird hauptsächlich zum Transport von Wasser, Ionen und Zuckern genutzt (34). Der symplastische Transport beruht auf der Bildung von Membranen durchspannende Zellbrücken, den Plasmodesmen, die einen direkten Austausch zwischen den Zellen ermöglichen. Dieser erlaubt den Austausch großer Makromoleküle von Peptiden, Proteinen und verschiedener RNA-Spezies bis hin zu kompletten mRNAs (35, 36). Allerdings besteht ein Größenausschluss von etwa 70 kDa, was bedeutet, dass nur kleinere Moleküle durch die Plasmodesmen transportiert werden können (37). Eine Erhöhung des Größenausschlusslimits (SEL) kann durch Interaktion verschiedener Proteine mit den Plasmodesmen erreicht werden, sodass größere Moleküle ebenfalls ausgetauscht werden können (38). Ob die transportierten Proteine zunächst komplett entfaltet und nach dem Transport durch die Plasmodesmen erneut gefaltet werden oder ob diese in einer halbwegs nativen Form durchgeschleust werden, ist bislang nicht abschließend geklärt. Das Xylem und Phloem als die beiden Langstreckentransportsysteme der Pflanze besitzen unterschiedliche Aufgaben. Während das Xylem für den Transport von Wasser und Ionen von der Wurzel in die weiteren Organe der Pflanze zuständig ist, ist das Phloem die Haupttransportroute für photosynthetische Assimilate, Proteine und Nukleinsäuren und kann bidirektional vom Ort der Beladung (*Source*) zum Ort der Entladung (*Sink*) verlaufen. Bereits eine Vielzahl an Proteinen und RNAs konnten als Kurz- und Langstreckensignale identifiziert werden (39–43). Insbesondere die RNA-Mengen können stark schwanken und ermöglichen eine Signalweitergabe zwischen Geweben und Organen. Die Menge an miRNA399 als Signal für Phosphatstress konnte bereits gezeigt werden, ist nach Induktion des Phosphatmangels signifikant im Phloem erhöht und erlaubt die Regulation der Expression verschiedener Proteine, die eine Anpassung an den Phosphatmangel ermöglichen (42).

#### 1.4.1 Mobile Proteine im Zell-zu-Zell und Langstreckentransport

Proteine, die zwischen den Zellen ausgetauscht werden können, werden unter dem Begriff der nicht-Zell- autonomen Proteine (*Non-cell autonomous Proteins*, NCAPs) zusammengefasst. Zu ihnen gehören virale Proteine, regulatorische und Phloemproteine (36). Virale Proteine nutzen den symplastischen Transportweg zur weiteren Verbreitung in umliegendes Gewebe als auch systemisch über das Phloemsystem. Zu den am besten beschriebenen viralen Proteinen gehören die *Movement* Proteine, die direkt mit den Plasmodesmen interagieren können, eine Erhöhung des SEL induzieren und so der Verbreitung des Virus dienen (44, 45).

Regulatorische Proteine werden zumeist über kurze Distanzen ausgetauscht und spielen insbesondere in der Zellentwicklung eine übergeordnete Rolle. Im Wesentlichen handelt es sich bei diesen Proteinen um Transkriptionsfaktoren, die unter anderem im Erhalt des apikalen Meristems im Spross (*shoot apical meristem*, SAM) aber auch in der Regulation der Blüte und der Wurzelhaardifferenzierung beteiligt sind (46, 47).

Im Phloem konnte außerdem eine Vielzahl verschiedener Proteine nachgewiesen werden, die einer dritten Klasse zugeordnet werden können: Hierzu zählen Proteine, die in der Redoxregulation, im Metabolismus, in der Regulation verschiedener Entwicklungsprozesse und im Calcium- und G-Protein *Signalling* involviert sind, als auch stressbezogene und RNA-bindende Proteine (48–50). In Phloemstudien an *Brassica napus* Pflanzen konnte zudem ein kleiner Anteil an Proteinen identifiziert werden, die weder einer Klasse zugeordnet werden konnten, noch etwaige Funktionen bekannt sind. Eines dieser Proteine ist das At1g64370 Protein, dass über Proteomstudien mit Hilfe zweidimensionaler Gelelektrophoresen in mehreren *Spots* detektiert werden konnte (48). Dieses Protein liegt hoch abundant vor, ist allerdings gänzlich uncharakterisiert, wird aber aufgrund mehrerer repetitiver Sequenzen als ein hochgradig flexibles Protein vermutet. Neben den bislang unbekannten Proteinen sind insbesondere stressbezogene und regulierende Proteine interessant, da diese strukturell nur begrenzt charakterisiert sind. Wie bereits erwähnt besitzen diese aufgrund dieser Funktionen häufig größere ungeordnete

Bereiche oder sind gänzlich ungefaltet, weshalb kaum Informationen zu Konformationen und Flexibilität vorliegen.

#### 1.4.2 Der Transkriptionsfaktor Knotted-1, ein über kurze Strecken mobiles Protein

Transkriptionsfaktoren bestehen im Allgemeinen aus einer DNA-bindenden Domäne, einem Linker und einem Bereich, der entweder eine nachfolgende Genexpression unterdrückt oder aber aktiviert (Transaktivator- oder regulatorische Domäne). Dieser Bereich fungiert unter anderem als Bindedomäne für weitere Proteine, wie Repressoren, Aktivatoren und andere, aber auch für kleinere Moleküle, die durch Binden an den Transkriptionsfaktor entweder die Lokalisation oder weitere Interaktionen steuern können (51). Transkriptionsfaktoren als regulierende Proteine sind häufig hochgradig unstrukturierte Proteine, insbesondere im Bereich der regulatorischen Domäne. Der hohe Grad an Unordnung im Protein ist notwendig um eine Vielzahl verschiedener Interaktionen mit unterschiedlichen Bindepartnern eingehen zu können, die die Funktionalität oder Lokalisation beeinflussen können.

Als einer der ersten in Pflanzen entdeckten NCAPs gilt der Transkriptionsfaktor *Knotted-1* (KN1) (52). *Knotted-1* und ähnliche Homöobox Transkriptionsfaktoren sind maßgeblich an dem Zellerhalt und Erhalt der Undifferenziertheit der meristematischen Stammzellen beteiligt (53, 54). Das Meristem und die meristematischen Stammzellen sind insbesondere für eine korrekte Organogenese in der Pflanze unerlässlich. Mutationen im *Knotted-1* Gen führen zu teilweise stark veränderten Phänotypen. Eine *Loss-of-function* Mutante, die durch inkorrektes *Splicen* im ersten Exon entsteht (KN1-e1) zeigte keine Sprossentwicklung. In milderen beobachteten Phänotypen konnte zwar eine normale vegetative Entwicklung beobachtet werden, allerdings zeigten sich erhebliche Defekte in der Entwicklung der reproduktiven Organe, wie der Ausbildung des Blütenstandes und das Verzweigen der weiblichen und männlichen Blütenstände. Eine ektopische Expression des Proteins (KN1-N) in sich entwickelnden Gewebe hingegen führte zur Bildung einzelner Knoten am Blatt (55–57).

Knotted-1 aus Zea mays und dessen Homologe in Arabidospis thaliana und weiteren Organismen gehören zu den three amino acid loop extension (TALE) Homöobox Transkriptionsfaktoren. Die TALE Homöobox besteht dabei aus drei aufeinanderfolgenden  $\alpha$ -Helices, bei der die dritte Helix sequenz-spezifisch DNA in der großen Furche binden soll (58) (Abbildung 6). Die typische Homöobox besteht aus insgesamt 60 Aminosäuren. Homöobox Proteine der TALE Klasse bestehen aus insgesamt 63 Aminosäuren. Drei zusätzliche Aminosäuren befinden sich dabei in der Loop Region zwischen der ersten und zweiten Helix. Knotted-1 besitzt den typischen Aufbau Homöobox der Transkriptionsfaktorenklasse (KNOX). Die MEINOX Domäne,



Abbildung 6. Aufbau der TALE Homöobox Domäne am Beispiel des Transkriptionsfaktors MEIS1 (*pdb code*: 5BNG).

bestehend aus der KNOX1 und KNOX2 Domäne, fungiert als Suppressor der Zielgenexpression und als mögliche Homo- und Heterodimerisierungsstelle unter anderem mit weiteren Transkriptionsfaktoren wie BEL1 (59, 60). Neben der MEINOX und der Homöobox Domäne besitzt *Knotted*-1 zusätzlich die ELK Domäne, welche als nukleäres Lokalisationssignal (NLS) dienen kann (61). Das Besondere am *Knotted*-1 ist dessen Mobilität von Zelle zu Zelle. Der Zell-zu-Zell Transport ist nicht nur auf das Protein beschränkt, sondern das Protein konnte zusammen mit dessen mRNA als mobil beobachtet werden. Allerdings beschränkt sich die Mobilität der mRNA nicht auf nahe liegende Zellschichten, sondern wurde ebenfalls im Phloem, im Langstreckentransportsystem, identifiziert (52, 62, 63). Die Mobilität des Proteins ist auf die C-terminal gelegene Homöoboxdomäne zurückzuführen, welche ebenfalls in der Lage ist die eigene *Knotted*-1 mRNA zu binden und ebenfalls über die Plasmodesmen in umliegende Zellen zu transportieren (38). Der Transport des Proteins als auch der mRNA ist dabei auf die Interaktion des KN1 mit den Plasmodesmen zurückzuführen und der daraus induzierten Erhöhung des SEL, infolge dessen ein anschließender Transport ermöglicht wird (52, 64).

*Knotted*-1 interagiert mit dem *Microtubule Binding Protein* 2C (MBP2C). Das MBP2C fungiert dabei als negativer Regulator für den Transport, indem es durch Bindung an das KN1 Proteins die Assoziierung an die Plasmodesmen und den anschließenden Transport durch die Plasmodesmen verhindert. Diese Protein:Protein-Interaktion ist im Wesentlichen auf das Binden des MBP2C an der ELK Domäne in der Nähe der Homöobox bedingt. Durch Mutation der drei Lysine in der ELK Domäne zwischen den Positionen 265 und 267 zu drei Alaninen konnte diese Interaktion inhibiert werden und der Zell-zu-Zell Transport wieder verstärkt werden (38).

#### 1.4.3 Das phloemmobile Translationally controlled tumor associated Protein (TCTP)

Das TCTP konnte bereits in mehreren Proteomstudien als Phloemprotein identifiziert werden (48, 49, 65). Neben dem Protein ist ebenfalls dessen mRNA im Phloem präsent und kann ebenfalls als ein Langstreckensignalmolekül dienen (66, 67). Die Funktionen des Proteins in Pflanzen ist bislang noch nicht näher untersucht. Jedoch können aus extensiv charakterisierten homologen Proteinen aus Mensch, *Plasmodium falciparum* und Hefe Rückschlüsse auf die Funktionen in Pflanzen gezogen werden. Für das TCTP werden insbesondere regulierende Eigenschaften im Zellwachstum und der Organentwicklung zugeordnet (68, 69). Dass diese Funktionen den pflanzlichen TCTP Homologen ebenfalls zugeordnet werden können, konnte durch *Knock-out* Studien in Drosophila und *Arabidopsis thaliana* gezeigt werden. Die in den Organismen ausgeschalteten TCTP Gene konnten durch Einfügen des TCTP Gens aus dem jeweils anderen Organismus in dessen Funktion komplementiert werden (70). Zusätzlich konnten weitere biologische Funktionen zugeordnet werden, an denen TCTPs insbesondere in Tieren beteiligt sind. Neben dem Zellwachstum konnten weiterhin Zusammenhänge mit der Zellzyklusprogression, Zelldifferenzierung, Transformation von Tumoren, Apoptose und der Bewältigung verschiedener Stressarten, wie Hitze, Trockenheit und reaktive Sauerstoffspezies (ROS), gefunden werden (69, 71–74).

#### Einleitung

Diese Funktionen werden durch Interaktionen Bindepartner unterschiedlichen verschiedenster an Regionen im TCTP erreicht. Im Wesentlichen bestehen alle TCTP Homologe aus drei Bereichen. Der α-helikalen Domäne, der  $\beta$ -Core Domäne und dem flexiblen Loop mittig in der Proteinsequenz (Abbildung 7) (73). So führt die Interaktion mit p53 und Bcl-XL über die  $\alpha$ -helikale Domäne zu einem Umgehen des programmierten Zelltodes und damit einhergehend dem Überleben der Zelle (75–77). Die ß-Faltblatt Domäne konnte mit der Bindung an der kleinen GTPase Rheb in Drosophila in Verbindung gebracht werden und soll in dieser Beziehung als GTP-Austauschfaktor fungieren, auch wenn dieses kontrovers diskutiert wird (78). Die interne Loop Region



Abbildung 7. Konservierte Regionen in der TCTP Struktur. Insgesamt existieren drei größere Bereiche im Protein. Neben der gefalteten  $\alpha$ -Domäne und dem  $\beta$ -Core existiert als dritte Region ein großer flexibler Loop (pdb code: 1H6Q).

hingegen ist bekannt eine Phosphorylierungstelle für Polo-like Kinasen zu besitzen und durch die Phosphorylierung dieser Stelle in der Zellzyklusprogression beteiligt sein (79, 80). Eine weitere besondere Eigenschaft des humanen TCTPs ist dessen Beteiligung in der allergischen Reaktion. Die Dimerisierung des Proteins induziert die Ausschüttung von Histamin, weswegen das TCTP auch als Histamine-releasing Faktor (HRF) bezeichnet wird. Neben der spezifischen Interaktion mit verschiedenen Proteinen, wird ebenfalls eine unspezifische Interaktion vorhergesagt. Diese unspezifische Interaktion beruht auf der Chaperon-ähnlichen Eigenschaft des TCTPs. Mehrere Studien konnten zeigen, dass TCTP an native Proteine bindet und diese vor hitzebedingter Denaturierung schützen kann, weswegen es als kleines Heat-shock Protein (HSP) angesehen werden kann (73, 81-83). Neben diesen Chaperon-ähnlichen Eingeschalten besitzt es weitere Merkmale um verschiedenen Stressarten entgegenzuwirken. So existieren zusätzlich mehrere Interaktionen mit niedermolekularen Substanzen, wie Hemin, Calcium und Artemisinin. Hemin als prosthetische Gruppe des roten Blutfarbstoffes liegt in der Regel gebunden vor. Allerdings kann infolge verschiedener Zellstressarten freies Hemin in der Zelle vorliegen und durch das gebundene Eisen die Bildung von ROS ermöglichen. Das TCTP, so wird postuliert, dient als Puffer für freies Hemin. Durch Binden des Hemins wird die ROS-Bildung unterdrückt (73, 84). Gleichzeitig konnte jedoch gezeigt werden, dass die Heminbindung eine Dimerisierung des TCTPs induziert (84-87). Als Gegenspieler zur Dimerisierung ist die Bindung von Calciumionen zu sehen. Obwohl kein typisches EF-Hand Motiv, welches charakteristisch für die Calciumbindung von Proteinen ist, vorliegt, konnte in mehreren Homologen diese Bindeeigenschaft nachgewiesen werden (84, 88). Durch Binden von Calcium kann eine monomere Form des Proteins stabilisiert werden. Die Interaktion von Hemin und die anschließende Dimerisierung kann durch Artemisinin kovalent verknüpft werden. Artemisinin, als Anti-Malariamittel, konnte bereits als Ligand für die Plasmodien TCTPs identifiziert werden. In neueren Studien wird Artemisinin jedoch eine zusätzliche Wirkung als Antikrebsmittel zugeordnet (73, 89). Durch Binden an das TCTP und dessen kovalente Dimerisierung wird der Abbau des TCTPs in der Zelle über den proteasomalen Degradationsweg begünstigt, wodurch wie oben bereits erwähnt, die anti-apoptotische Wirkung des TCTPs aufgehoben wird. Ob dieselben molekularen Interaktionen in Pflanzen ebenfalls existieren und ob diese einen Einfluss auf die Struktur und Flexibilität, insbesondere des großen *Loops* innerhalb des Proteins haben, ist bislang gänzlich unerforscht.

#### 1.5 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war die nähere strukturelle und funktionelle Charakterisierung verschiedener pflanzlicher Proteine, die im Zell-zu-Zell *Signalling*, in der Stressantwort, als auch im RNA-Transport beteiligt sind. Hierbei sollten zum einen hochauflösende Methoden, wie Kleinwinkel-Röntgenbeugungsexperimente (SAXS) als auch Circulardichroismus (CD) - und Gelfiltrationsexperimente durchgeführt werden. Ein besonderer Fokus wurde dabei auf die Charakterisierung von Proteinen mit hoher intrinsischer Unordnung (IDPs oder IDRs) gelegt. Als geeignete Kandidaten wurden das uncharakterisierte Protein At1g64370, das TCTP als auch das *Knotted*-1 Protein ausgewählt. Alle drei Proteine besitzen unterschiedliche Anteile an hochflexiblen Regionen. Während das At1g64370 als nahezu komplett ungeordnet vorliegend vermutet wird (IDP), enthält das TCTP mit dem mittig gelegenen großen *Loop* nur eine flexible Region (IDR), die jedoch in sämtlichen Kristallstrukturen fehlt. Weiterhin sind bislang keinerlei Informationen bekannt, inwieweit dieser *Loop* mit den bekannten Interaktionspartnern, wie Hemin, Calcium und Artemisinin interagieren kann. Das *Knotted*-1 Protein ist *in vivo* bislang sehr gut untersucht worden. Allerdings fehlen strukturelle Informationen nahezu gänzlich, was auf die starke intrinsische Unordnung des Proteins zurückzuführen ist. Diese Unordnung behinderte bislang eine ausführliche Charakterisierung *in vitro*.

Allen drei Proteinen gemein, ist deren Zell-zu-Zell Mobilität oder deren Vorkommen im Phloem von Pflanzen. Ihre genaue Funktion in diesem Pflanzenkompartiment ist jedoch vermutlich unterschiedlich. Während das At1g64370 sowohl funktionell als auch strukturell gänzlich uncharakterisiert ist, sind für das TCTP und *Knotted*-1 sowohl strukturell als auch funktionell einige Eigenschaften bereits bekannt, beziehungsweise aus Homologen ableitbar.

Um die Proteine erfolgreich charakterisieren zu können, mussten diese zunächst heterolog in *Escherichia coli* hergestellt werden. Häufig führt die heterologe Expression in *E. coli* dazu, dass die Proteine zwar in großen Mengen hergestellt, aber unlöslich in Einschlusskörperchen (*Inclusion Bodies*) vorliegen und deshalb zunächst denaturiert und aufwendig neu gefaltet werden müssen. Erschwert wird die Löslichkeit häufig auch durch die Tatsache, dass posttranslationale Modifizierungen wie Disulfidbrücken, Phosphorylierungen oder Glykosylierungen das Zielprotein stabilisieren können. Diese Modifizierungen sind in *E. coli* als Expressionssystem entweder nur bedingt möglich oder komplett unmöglich.

Um die Chance auf ein lösliches Protein zu erhöhen, wurde zunächst mit Hilfe verschiedenster bioinformatischer Berechnungen versucht, geeignete Protein-Konstrukte zu finden. Für das Konstrukt-Design wurden verschiedene Bedingungen formuliert: So sollten Konstrukte weder innerhalb von einzelnen Domänen beginnen, noch innerhalb einzelner Sekundärelemente, wie  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Faltblättern. Des Weiteren sollten N- und C-Termini keine größeren ungeordneten Bereiche aufweisen, da diese häufig Ziel proteolytischer Degradation in *E. coli* darstellen. Über den *Sequences annotated by Structure Server* (EBI-SAS) (90) wurden zunächst homologe Proteine, beziehungsweise Proteinkonstrukte gesucht, die bereits erfolgreich strukturell aufgeklärt wurden. Anhand dieser bekannten Konstrukte, konnten dann mögliche At1g64370-, *Knotted-1* und TCTP-Konstrukte designt werden.

## 2 Material und Methoden

#### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

-80 °C Kühltruhe -20 °C Gefrierschrank 4 °C Kühlschrank ÄKTAprime plus Avegene Geldokumentationsgerät SLite 140S BioPhotometer Branson Sonifier 250 Heraeus<sup>R</sup> Brutschrank CD Photometer J-815 Chemidoc Touch Gel/Blot-Dokumentationsgerät DLS Gerät SpectroSize 300 DLS System SpectroLight 600 Electrophoresis Power Supply EPS 301 Fastblot 43B semi dry Blot Gerät Feinwaage ABJ Fluoreszenzspektrophotometer F4500 FPLC System Gelelektrophoresesystem Owl Heizblock OriBlock OB-1 IKAMAG RCT Magnetrührer Honeybee 961 Kristallisationsroboter Magnetrührer RSM-10HS Ultraflex III MALDI-TOF-TOF Massenspektrometer Monolith NT.115<sup>TM</sup> NanoDrop one<sup>c</sup> UV/Vis Photometer PCR Cycler T3000 peqTWIST Vortexer Peristaltikpumpe 2232 Microperplex S PETRA III Beamline P12 pH-Meter Pilatus 2M pixel X-ray Detector Schüttler Sorvall RC 6<sup>+</sup> Zentrifuge Stratalinker 2400 ThermoShaker TS1 Tischzentrifuge Sprout Vakuumpumpe Aeromat Versadoc Imager für Blots

GFL, Burgwedel (D) Liebherr, Biberach (D) Liebherr, Biberach (D) GE Healthcare, Uppsala (S) Pacific Image Electronics, New Taipei City (TWN) Eppendorf, Hamburg (D) Branson Ultrasonics, Eemnes (NL) Heraeus, Hanau (D) Jasco Labor- und Datentechnik, Groß-Umstadt (D) BioRad, München (D) Xtal Concepts, Hamburg (D) Xtal Concepts, Hamburg (D) Amersham Pharmacia, Uppsala (S) Biometra, Göttingen (D) Kern & Sohn GmbH, Balingen (D) Hitachi, Tokyo (J) Amersham Pharmacia, Uppsala (S) Owl Separation Systems Inc., Portsmouth (USA) Bibby Scientific, Stone (UK) IKA, Staufen (D) Znser Analytic GmbH, Frankfurt (D) Phoenix Instruments, Garbsen (D) Bruker Daltonics GmbH, Bremen (D) NanoTemper, München (D)

NanoDrop products, Wilmington (USA) Biometra, Göttingen (D) VWR, Darmstadt (D) Pharmacia LKB, Uppsala (S) DESY/EMBL, Hamburg (D) Mettler-Toledo, Gießen (D) Dectris, Baden-Daettwil (CH) Infors AG, Bottmingen (CH) Thermo Scientific, Darmstadt (D) Agilent, Waldbronn (D) Biometra, Göttingen (D) Biozym, Hessisch Oldendorf (D) KNF, Freiburg (D) Bio-Rad, München (D) Waage EG Wasserbad Zentrifuge 5424/5424R Zentrifuge 5417R Zentrifuge 2K15

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Anti-His Primärantikörper aus Maus Anti-Maus Sekundärantikörper aus Ziege, HRP konjugiert Anti-Maus Sekundärantikörper aus Ziege, AP konjugiert *Blot*-Membranen (PVDF/Nitrocellulose) cOmplete Protease Inhibitor Tabletten FloppyChoppy Kit GelRed DNA Stain GeneJet<sup>TM</sup> Gel Extraction Kit GeneJet<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit GeneRuler<sup>TM</sup> 1 kb plus DNA *ladder* HiLoad Superdex 75 pg Gelfiltrationssäule HiLoad Superdex 200 pg Gelfiltrationssäule HisPur 0.2 ml Spin Columns HisTrap<sup>™</sup> High Performance Säule HiTrap<sup>™</sup> Heparin HP Säule HiTrap<sup>TM</sup> Q Fast Flow Anionenaustauschersäule HiTrap<sup>™</sup> Q *High Performance* Matrix HiTrap<sup>™</sup> SP *High Performance* Matrix Monolith NT.115 Standard treated capillaries Monolith NT.115 Premium coated capillaries Monolith Protein Labeling Kit Red-NHS Monolith Protein Labeling Kit Red-Maleimide Ni-NTA Agarose PageRuler prestained 10 to 180 kDa Parafilm M PD10 Leersäulen ProtoScript® First Strand cDNA Synthesis Kit QIAquick PCR Purification Kit QS Quarz Küvette 10 mm RNA Clean & Concentrator-25 RNA Konzentrator SpectraPor Dialysemembranen SuperSignal<sup>TM</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate Vivaspin Konzentratoren

Kern & Sohn GmbH, Balingen (D) Julabo, Seelbach (D) Eppendorf, Hamburg (D) Eppendorf, Hamburg (D) Sigma, Göttingen (D)

Dianova, Hamburg (D) Dianova, Hamburg (D) Dianova, Hamburg (D) GE Healthcare, Uppsala (S) Roche, Mannheim (D) Jena Bioscience, Jena (D) Biotium, Hayward (USA) Fermentas, St. Leon-Rot (D) Fermentas, St. Leon-Rot (D) Fermentas, St. Leon-Rot (D) GE Healthcare, Uppsala (S) GE Healthcare, Uppsala (S) ThermoFisher Scientific, Waltham (USA) GE Healthcare, Uppsala (S) NanoTemper, München (D) NanoTemper, München (D) NanoTemper, München (D) NanoTemper, München (D) Qiagen, Hilden (D) Fermentas, St. Leon-Rot (D) Brand, Wertheim (D) GE Healthcare, Uppsala (S) New England Biolabs, Frankfurt a. M. (D) Qiagen, Hilden (D) Hellma GmbH, Müllheim (D) Zymo Research, Irvine (USA) Carl Roth, Karlsruhe (D) Fisher Scientific, Schwerte (D)

Sartorius, Göttingen (D)

#### 2.1.3 Enzyme und Plasmide

Antarctic Phosphatase BamHI HF Restriktionsendonuklease Bsal Restriktionsendonuklease *NcoI* HF Restriktionsendonuklease Ndel Restriktionsendonuklease DNase I dNTP Mix Inorganische Pyrophosphatase (0.1u/µl) Lysozym Phusion High-Fidelity DNA Polymerase T4 DNA Ligase T4 DNA Polymerase T7 RNA Polymerase Taq DNA Polymerase Thrombin Tobacco Etch Virus Protease XhoI HF Restriktionsendonuklease Trypsin, porcine für die Massenspektrometrie pET-22a E.coli Expressionsvektor pET-28a E.coli Expressionsvektor pET28a-GB1 E.coli Expressionsvektor pET28a-MBP E.coli Expressionsvektor pNH-TrxT E.coli Expressionsvektor pRK793 MBP-TEV E.coli Expressionsvektor

#### 2.1.4 Bakterienstämme und Pflanzen

Arabidopsis thaliana Columbiana 0 Brassica napus cv. Drakkar Escherichia coli BL21 Gold (DE3) Escherichia coli CodonPlus (DE3) RIPL Escherichia coli Rosetta-gami 2 (DE3) Escherichia coli TOP10 Escherichia coli XL10 Gold

#### 2.1.5 Software und Datenbanken

ATSAS Software AutoDock 4.2 Software AutoDock Vina Chimera 1.8 Software Dichroweb CD Analysis Server EMBL-EBI SAS *Tool* ExPASy *Bioinformatics Resource Portal* flexControl Software New England Biolabs, Frankfurt a. M. (D) Applichem, Darmstadt (D) Fermentas, St. Leon-Rot (D) New England Biolabs, Frankfurt a. M. (D) Applichem, Darmstadt (D) Fermentas, St. Leon-Rot (D) Fermentas, St. Leon-Rot (D) New England Biolabs, Frankfurt a. M. (D) In House Fermentas, St. Leon-Rot (D) GE Healthcare, Uppsala (S) In House New England Biolabs, Frankfurt a. M. (D) Promega, Mannheim (D) Merck Millipore, Darmstadt (D) Merck Millipore, Darmstadt (D) In House In House SGC Oxford, Oxford (UK) (91) David Waugh (92)

In House CBGP, Madrid (E) Agilent, Waldbronn (D) Agilent, Waldbronn (D) Merck Millipore, Darmstadt (D) Fisher Scientific, Schwerte (D) Agilent, Waldbronn (D)

EMBL, Hamburg (D) Scripps Research Institute, La Jolla (USA) Scripps Research Institute, La Jolla (USA) UCSF, San Francisco (USA) http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/sas/ http://www.expasy.org/ Bruker Daltonik, Bremen (D)

GraphPad, La Jolla (USA) http://www.matrixscience.com/ http://www.mmass.org/ NanoTemper, München (D) http://nc2.neb.com/NEBcutter2/ https://xtal.nki.nl/ccd/Welcome.html http://www.rcsb.org/ GE Healthcare, Uppsala (S) http://www.uniprot.org/ http://ffas.burnham.org/XtalPred-cgi/xtal.pl

#### 2.1.6 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von den Firmen Applichem (Darmstadt, D), Sigma-Aldrich (Steinheim, D), Carl Roth (Karlsruhe, D) und Roche Diagnostics (Mannheim, D) bestellt.

#### 2.1.7 Häufig genutzte Lösungen und Puffer

2x YT Medium	16 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 5g/l NaCl
6x SDS Ladepuffer	375 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2 % SDS, 10 % Glycerol, 100 mM DTT,
	0.01% Bromphenolblau
10x SDS Laufpuffer	30 g/l Tris, 144 g/l Glycin, 10 g/l SDS
10x Transkriptionspuffer	500 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM DTT, 20 mM
	Spermidin
20x NPS	0.5 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
50x 5052	0.5 % Glycerol, 0.05 % Glukose, 0.2 % α-Laktose
50x TAE Puffer	2 M Tris, 5.71 % Essigsäure, 50 mM EDTA
1000x Trace Metal Mix	50 mM FeCl <sub>3</sub> , 20 mM CaCl <sub>2</sub> , 10 mM MnCl <sub>2</sub> , 10 mM ZnSO <sub>4</sub> , 2 mM
	CoCl <sub>2</sub> , 2 mM CuCl <sub>2</sub> , 2 mM NiCl <sub>2</sub> , 2 mM Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2 mM Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub> , 2
	mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
Kolloidale Coomassie	0.02 % (w/v) CBB G-250, 5% (w/v) Aluminiumsulfat(14-18)-Hydrat,
Färbelösung	10 % (v/v) Ethanol (abs.), 2% (v/v) ortho-Phosphorsäure (85 %)
Kolloidale Coomassie	10 % (v/v) Ethanol (abs.), 2% (v/v) ortho-Phosphorsäure (85 %)
Entfärbelösung	
LB-Agar	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 15 g/l Agar
Solubilisierungspuffer	15 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1 % SDS, 2 M Harnstoff, 1.25 % β-
	Mercaptoethanol, 2.5 % Glycerol

PBST Puffer	4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 16 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 115 mM NaCl (pH 7.4), 0.05 $\%$
	Tween-20
Transferpuffer	25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol
TE Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA
ZY Medium	10 g/l Trypton/Pepton, 5 g/l Hefeextrakt

#### 2.1.8 Sequenzierungen, DNA und RNA Oligonukleotide

Alle Primer und DNA Oligonukleotide für PCR und Bindungsstudien wurden entweder bei der Firma Metabion (Planegg/Steinkirchen, D) oder bei Eurofins MWG (Ebersberg, D) bestellt. Sequenzierungen wurden von der Firma Eurofins MWG (Ebersberg, D) durchgeführt.

#### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Herstellung chemisch kompetenter Escherichia coli Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia coli* Zellen wurde die Methode nach Inoue *et al.* (93) in modifizierter Form angewandt. Hierfür wurden zunächst 200 ml LB Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum, typischerweise 34  $\mu$ g/ml Chloramphenicol oder 25  $\mu$ g/ml Spectinomycin, versetzt und mit einer auf LB-Agar gewachsenen Bakterienkolonie inokuliert. Die Kultur wurde über Nacht bei 24 °C unter Schütteln bei 170 rpm auf einem Schüttler inkubiert bis eine optische Dichte (OD<sub>600nm</sub>) von 0.6 erreicht wurde. Am darauffolgenden Tag wurde die Kultur auf vier 50 ml Falcon Röhren (Sarstedt) aufgeteilt und zunächst für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die gekühlten Kulturen bei 3000 x g und bei 4 °C für 10 Minuten abzentrifugiert. Das erhaltene Bakterienpellet wurde mit 16 ml eisgekühlter TB Lösung (10 mM PIPES, pH 6.7, 250 mM KCl, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 55 mM MnCl<sub>2</sub>) resuspendiert und für weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde erneut bei 3000 x g abzentrifugiert und das Pellet mit 4 ml TB Lösung resuspendiert und anschließend mit 280  $\mu$ l 100% Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wurden 200  $\mu$ l Aliquote hergestellt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### 2.2.2 Herstellung von gDNA und cDNA

Zur Isolation von gDNA wurden 100 mg Blattmaterial von *Arabidopsis thaliana* oder *Brassica napus* verwendet. Das Blattmaterial wurde durch Zugabe von 400  $\mu$ l Extraktionspuffer (200 mM Tris-HCl, pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5 % (w/v) SDS) und mit Hilfe eines Mikropistills in flüssigem Stickstoff feingemörsert. Das Lysat wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur und 16000 x g zentrifugiert, 300  $\mu$ l des Überstands in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 1:1 mit 100 % Isopropanol gemischt. Das Gemisch wurde erneut für 5 Minuten bei 16000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und erneut für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgenommen und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Sobald das Pellet getrocknet war wurde es in 100  $\mu$ l TE Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) resuspendiert.

Zur cDNA Herstellung wurde zunächst Gesamt-RNA aus Blattgewebe mit Hilfe des *Plant Total RNA Isolation Kits* (Avegene) nach Herstellerangaben isoliert und aufbereitet. Die cDNA Synthese wurde mit dem *ProtoScript*® *First Strand cDNA Synthesis Kit* (NEB) nach Herstellerangaben durchgeführt und im Anschluss bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.3 Klonierung

Die Gene für das *TCTP* aus *Arabidopsis thaliana* und Raps, sowie das *Knotted-1* Gen aus *Zea mays* wurden über die Polymerase Kettenreaktion aus zuvor isolierter gDNA oder cDNA amplifiziert. Hierbei wurden speziell für das *Knotted-1* Gen sowohl die Volllängen-Gene als auch Gen-Abschnitte kloniert. Die Genbereiche wurden über die Software *Protein-CCD* (94) und den *Sequence Annotated by Structure Server* (90) festgelegt. Dabei sollten die zu designenden Konstrukte weder in Sekundärstrukturen als auch in kompletten Domänen starten oder enden. Sofern möglich, wurden einzelne Domänen kloniert. Nachfolgend in Tabelle 1 dargestellte Konstrukte wurden erstellt.

Tabelle 1. Übersicht genutzter Protein Konstrukte.

Name	Plasmid	Protease Schnittstelle	Tag
NH-atTCTP	pET-28a	Tobacco Etch Virus	N-terminaler HisTag
NH-bnTCTP	pET-28a	Tobacco Etch Virus	N-terminaler HisTag
atTCTP-CH	pET-28a	Keine	C-terminaler HisTag
bnTCTP-CH	pET-28a	Keine	C-terminaler HisTag
Inorganische	pET-28a	Keine	C-terminaler HisTag
Pyrophophatase (E. coli)			
T7 RNA Polymerase	pET-28a	Thrombin	N-terminaler HisTag
atMS1	pET-28a	Keine	Kein
FM01-11	pET-28a	Tobacco Etch Virus	N-terminaler HisTag

SP01-08	pNH-TrxT	Tobacco Etch Virus	N-terminaler His-Trx-Tag
NH-MBP-KN1	pET-28-	Tobacco Etch Virus	N-terminaler His-MBP-Tag
	MBP		
NH-GB1a-KN1	pET-28-	Tobacco Etch Virus	N-terminaler His-GB1a-Tag
	GB1a		
NH-GB1b-KN1	pET-28-	Tobacco Etch Virus	N-terminaler His-GB1b-Tag
	GB1b		
$TEV^1$	pRK793	Tobacco Etch Virus	N-terminaler MBP-His-Tag
SP17-28	pET-28a	Tobacco Etch Virus	N-terminaler HisTag

<sup>1</sup> Das MBP-TEV Protease-Konstrukt enthält eine interne TEV-Schnittstelle zwischen dem N-terminalen MBP-Tag und dem darauffolgenden His-TEV Protein. Dadurch wird das MBP Protein in vivo in E. coli abgeschnitten.

Zur Amplifikation der Gene oder Genbereiche wurde die *Phusion DNA Polymerase* (Fermentas) verwendet, da diese eine zusätzliche *Proofreading*-Aktivität aufweist. Sofern möglich, wurde eine einheitliche Schmelztemperatur für alle genutzten Primer von 58 °C eingestellt und nach folgendem Programm (Tabelle 2) die PCR durchgeführt.

	50 µl PCR Ansatz	Programm			
5 µl	HF oder GC Puffer	Denaturierung	98 °C	30 s	
	(Fermentas)				
2.5 µl	dNTPs (NEB)	Denaturierung	98 °C	5 s	5 Zyklen
5 µl	Primer Mix (10 mM Stock)	Elongation	72 °C	1 kb/ 15 s	
					I
1 µl	DNA Template	Denaturierung	98 °C	10 s	30
0.5 µl	Phusion Polymerase	Primeranlagerung	60 °C	30 s	Zyklen
	(Fermentas)	Elongation	72 °C	1 kb/ 15 s	
35.5 µl	ddH <sub>2</sub> O				Į
		Endelongation	72 °C	5 min	

#### 2.2.3.1 Klonierung in pET-basierte Vektoren

Sowohl das TCTP, atMS1 als auch die verschiedenen *Knotted-1* Fragmente wurden in den pET-28a oder pET-22b Vektor kloniert. Durch das Verwenden der beiden pET-Plasmide konnte sowohl N-terminal (MGSSHHHHHHSSGLVPRGS) als auch C-terminal (LEHHHHHH) ein 6xHistidin-*Tag* an das Zielgen fusioniert werden. Zusätzlich wurde über den pET-Vektor eine Thrombin Schnittstelle zwischen His-*Tag* und dem Zielgen eingebracht. Sofern Thrombin sich als Protease für den *Tag*-Verdau

nicht eignete, wurde über die PCR an das Zielgen N-terminal eine TEV Schnittstelle angefügt, so dass insgesamt das Peptid MGSSHHHHHHSSGLVPRGSENLYFQG N-terminal an das Protein heranfusioniert wurde. Das TCTP wurde sowohl als N-, als auch als C-terminal His*-getaggtes* Konstrukt hergestellt. atMS1 wurde so kloniert, dass kein zusätzlicher *Tag* vorlag.

Alle *Knotted-1* Fragmente wurden an einen N-terminalen *HisTag* mit zusätzlicher TEV-Schnittstelle fusioniert. Die hierfür verwendeten Primer sind nachfolgend in Tabelle gelistet. Die amplifizierten Genabschnitte wurden zunächst über ein PCR Aufreinigungskit (Qiagen) nach vorheriger PCR aufgereinigt und anschließend 1 µg mit den entsprechenden Restriktionsenzymen bei 37 °C für eine Stunde verdaut. Der Zielvektor wurde ebenfalls mit den benötigten Restriktionsenzymen geschnitten. Im Anschluss wurden die geschnittenen PCR Produkte erneut über das *PCR Purification Kit* aufgereinigt. Der geschnittene Vektor wurde zunächst mit Hilfe der *Antarctic Phosphatase* (NEB) für 15 min am 5' Ende dephosphoryliert, anschließend über ein 0.8 %-iges TAE-Agarose Gel von ungeschnittenem Vektor aufgetrennt und über ein Gelextraktionskit (Fermentas) aufgereinigt. Für die Ligation wurden zu 200 ng geschnittenem Vektor das zu klonierende Fragment im 1:3 oder 1:5 Überschuss hinzugegeben. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 24 °C mit Hilfe der T4 DNA Ligase (NEB). 10 µl des Ligationsansatzes wurden am darauffolgenden Tag in 200 µl *E. coli* XL10 Gold Zellen transformiert.

Nama	Schnitt	Sequenz	
Name	-stellen	Sequenz	
NH-atTCTP-F <sup>1</sup>	NdeI	GATCCATATGGAGAACTTGTACTTCCAATCCATGTTGGTGTACCAAG	
		ATCTTC	
NH-atTCTP-R <sup>1</sup>	BamHI	GATCGGATCCTCAGCACTTGACCTCCTTC	
atTCTP-CH-F <sup>1</sup>	NcoI	GATCCCATGGGCTTGGTGTACCAAGATCTTC	
atTCTP-CH-R <sup>1</sup>	XhoI	GATCCTCGAGGCACTTGACCTCCTTCAAAC	
MS1_F	NdeI	GATCCATATGGCTTCACACATTGTTGG	
MS1_R	XhoI	GATCCTCGAGTCACTTGGCACTGGCGAG	
FM08-F	NdeI	GATCCATATGGAAAATCTTTATTTTCAAGATCAAGAAGGTAGCGGA	
		GG	
FM08-R	XhoI	GATCCTCGAGTCACTCGGATGGCTTCCAGTGC	
NH-MBP-KN1-F <sup>2</sup>	BamHI	GATCGGATCCGAAAATCTTTATTTTCAAATGGAGGAGATCACCCAA	
		CAC	
NH-MBP-KN1-R <sup>2</sup>	HindIII	GATCAAGCTTCTAGCCGAGCCGGTAC	
NH-GB1a-KN1-	BamHI	GATCGGATCCGAAAATCTTTATTTTCAAATGGAGGAGATCACCCAA	
F <sup>2</sup>		CAC	
NH-GB1a-KN1-	XhoI	GATCAAGCTTCTAGCCGAGCCGGTAC	
R <sup>2</sup>			

Tabelle 3. Genutzte Primer zur Generierung der verschiedenen Konstrukte.
NH-GB1b-KN1-	BamHI	GATCGGATCCGAAAATCTTTATTTTCAAATGGAGGAGATCACCCAA
F <sup>2</sup>		CAC
NH-GB1b-KN1-	XhoI	GATCAAGCTTCTAGCCGAGCCGGTAC
R <sup>2</sup>		
NH-bnTCTP-F <sup>1</sup>	NdeI	GATCCATATGGAGAACTTGTACTTCCAATCCATGTTGGTGTACCAAG
		ATCTTC
NH-bnTCTP-R <sup>1</sup>	BamHI	GATCGGATCCTCAGCACTTGACCTCCTTC
pET28a-CH-	NcoI	GATCCCATGGGCTTGGTGTACCAAGATCTTC
bnTCTP-F <sup>1</sup>		
pET28a-CH-	XhoI	GATCCTCGAGGCACTTGACCTCCTTCAAAC
bnTCTP-R <sup>1</sup>		

<sup>1</sup> Da die Sequenzen für das Gen aus Arabidopsis thaliana und auch von Brassica napus sowohl am 3 ' als auch 5 '-Ende identisch sind, wurden hier die gleichen Primer verwendet. <sup>2</sup> Da immer der gleiche Genbereich des Knotted-1 Gens kloniert und immer die gleichen Restriktionsschnittstellen eingebaut wurden, konnten immer die gleichen Primer verwendet werden.

# 2.2.3.2 Ligationsunabhängiges Klonieren

Für das ligationsunabhängige Klonieren wurde an alle zu klonierenden Genabschnitte am 5<sup>°</sup> Ende die Sequenz TACTTCCAATCCATG angehängt, sowie am 3<sup>°</sup> Ende die Sequenz TATCCACCTTTACTG. Der genutzte Zielvektor enthält das Gen für die Levansucrase (*SacB*). Dieses Gen führt bei gramnegativen Bakterien nach Induktion mit Sucrose zum Zelltod und kann folglich als Selektionsmarker für eine erfolgreiche Klonierung genutzt werden (95). Das Gen wurde zunächst über das Restriktionsenzym *BsaI* aus dem Vektor herausgeschnitten. Danach wurde der geschnittene Vektor ebenso wie die amplifizierten PCR-Fragmente über das *PCR Purification Kit* aufgereinigt. Im Anschluss wurden über die T4 DNA-Polymerase komplementäre Überhänge sowohl in den PCR-Fragmente als auch im Zielvektor erzeugt. Hierfür wurden nachfolgende Ansätze für die PCR-Fragmente als auch den Vektor pipettiert (Tabelle 4).

Für die	PCR-Fragmente (1x)	Für den Vektor	
1 µl	10x NEB 2 Puffer	11 µl	10x NEB 2 Puffer
1 µl	dCTP	2.75 µl	dGTP
0.1 µl	100x BSA	1 µl	100x BSA
0.4 µl	T4 DNA Polymerase	5 µl	T4 DNA Polymerase
2.5 µl	ddH <sub>2</sub> O	31 µl	ddH <sub>2</sub> O
5 µl	PCR-Fragment	50 µl	Bsal geschnittener Vektor

Tabelle 4. Ansätze für den T4 DNA Polymerase-Verdau.

Durch die selektive Hinzugabe eines einzelnen Nukleotids verdaut die T4 DNA-Polymerase die Enden der PCR-Produkte als auch des Vektors am 5<sup>°</sup> Strang bis zu der Stelle an der das hinzugegebene Nukleotid auftritt. Dabei wird bei den PCR-Fragmenten nur das dCTP hinzugeben und zum verdauten Vektor nur das dGTP, was zur Folge hat, dass komplementäre 12 Basen lange Überhänge entstehen, die für die Ligation genutzt werden können. Die Ansätze wurden bei 22 °C für 30 Minuten inkubiert und anschließend die Reaktion für 20 min bei 70 °C gestoppt. Im Anschluss wurden 10 µl der vorbereiteten PCR-Fragmente zu je 30 µl vorbereiteten Vektor gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die kompletten Ansätze wurden daraufhin zur Transformation in *E. coli* XL10 Gold Zellen genutzt. Da bei dieser Klonierungsmethode eine Religation des leeren Plasmids ausgeschlossen ist und Bakterien mit ungeschnittenem Plasmid aufgrund des Levansucrase-Gens auf Sucrose-haltigen Platten nicht wachsen können, wurde auf ein nachfolgendes Colony-Screening hier verzichtet und direkt zwei bis drei Klone zum Sequenzieren geschickt.

# 2.2.3.3 Transformation in Escherichia coli Zellen

Zu 200 µl chemisch kompetenten *E. coli* XL10 Gold Zellen wurden entweder 10 µl aus der pETbasierten Klonierung oder 40 µl aus der ligationsunabhängigen Klonierung hinzugegeben und zunächst für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42 °C und eine einstündige Inkubationszeit in 800 µl Regenerationsmedium (2xYT Medium, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM Glukose) bei 37 °C unter Schütteln bei 175 rpm. Die Regenerate wurden daraufhin bei 1000 x g für eine Minute bei 4 °C abzentrifugiert und 800 µl Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in dem verbliebenden Überstand resuspendiert und auf eine LB-Agar Platte mit dem benötigten Selektionsantibiotikum ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

# 2.2.3.4 Colony-Screening

Für alle pET-basierten Klonierungen wurde um sicherzustellen, dass das gewünschte Insert ligiert wurde im Anschluss an die Transformation und der Übernachtkultivierung bei 37 °C ein *Colony-Screening* durchgeführt. Die dafür notwendige PCR wurde wie nachfolgend in Tabelle beschrieben angesetzt und durchgeführt. Einzelne Kolonien wurden mittels Pipettenspitze angepickt und direkt im PCR Ansatz resuspendiert. Die Zelllyse erfolge durch die initiale Denaturierung für 2 min bei 95 °C. Durch die Verwendung der pET-spezifischen T7 Primer konnte ein standardisierter *Colony-Screen* für verschiedenste Genkonstrukte verwendet werden. Der PCR Ansatz wurde im Anschluss auf ein 0.8 %iges TAE-Agarose Gel aufgetragen und für 30 min bei 100 V die Elektrophorese laufen gelassen. Kolonien, die ein positives Signal auf der zu erwartenden Fragmentgröße aufwiesen, wurden daraufhin erneut von der LB-Agar Platte angepickt und in 5 ml LB Medium mit entsprechendem Antibiotikum inokuliert. Die Kulturen wurden bei 37 °C über Nacht unter Schütteln inkubiert und am darauffolgenden Tag die Plasmide mittels *Plasmid Miniprep Kit* (GeneJet) isoliert und zum Sequenzieren geschickt.

	PCR Ansatz		Progra	mm	
1 Kolonie	Template	Denaturierung	95 °C	2 min	
2.5 µl	10 x Thermopol Puffer	Denaturierung	95 °C	30 s	25
0.5 µl	10 mM dNTP	Anlagerung	56 °C	30 s	Zyklen
0.5 µl	T7 forward Primer (10	Elongation	68 °C	1 min/kb	
	μΜ)				
0.5 µl	T7 reverse Primer (10	Endelongation	68 °C	5 mn	1
	μΜ)				
0.5 µl	Thermopol Taq DNA				
	Polymerase				
22.5 µl	ddH <sub>2</sub> O				

Tabelle 5. PCR Mix und Programm für die Colony-Screen PCR.

# 2.2.4 Polyacrylamid Gelelektrophoresen (PAGE)

# 2.2.4.1 SDS-PAGE

Für die Auftrennung der Proteine und zur Überprüfung der Reinheit der aufgereinigten Proteine wurde eine SDS PAGE nach Laemmli durchgeführt (96). Hierzu wurde ein 0.75 mm breites diskontinuierliches Gel nach Tabelle 6 gegossen, wobei 10 bis 15 %-ige Gele verwendet wurden.

Tabelle 6. Zusammensetzungen des Trenngels und des Sammelgels nach Laemmli.

Trenngel (5 ml)	10 %	12 %	15 %	Sammelgel	1 ml
H <sub>2</sub> O	1.9 ml	1.6 ml	1.1 ml	H <sub>2</sub> O	0.68 ml
30 % Akrylamid Mix	1.7 ml	2.0 ml	2.6 ml	30 % Akrylamid Mix	0.17 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3 ml	1.3 ml	1.3 ml	1 M Tris (pH 6.8)	0.13 ml
10 % SDS	50 µl	50 µl	50 µl	10 % SDS	10 µl
10 % Ammoniumpersulfat	50 µl	50 µl	50 µl	10 % Ammoniumpersulfat	10 µl
TEMED	2 µl	2 µl	2 µl	TEMED	1 µl

Jeweils 12 µl Probe wurden mit 3 µl 6x SDS Ladepuffer versetzt, bei 95 °C für 5 min inkubiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde im MiniProtean III System (Bio-Rad) für 45 min bei 200 V mit 1x SDS Laufpuffer durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele

dreimal für 5 min in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend mit kolloidaler Coomassie Färbelösung oder Zinkfärbung angefärbt (97, 98).

# 2.2.4.2 Tris-Trizin PAGE

Tris-Trizin-(Urea) Gele wurden nach Schägger *et al.* gegossen (99). Sofern ein einfaches Trizin-SDS Gel benutzt wurde, wurde kein Harnstoff zur Gellösung hinzugegeben. Die genutzten Puffer sind in Tabelle 7 dargestellt. Das Gel wurde nach Tabelle 8 gegossen und anschließend bei 150 V für 50 min im MiniProtean III System laufen gelassen.

	<b>3x Gelpuffer</b>	10x Anodenpuffer	10x Kathodenpuffer
Tris	3 M	1 M	1 M
Trizin	-	-	1 M
HCl	1 M	0.225 M	-
SDS	0.3 %	-	1 %
рН	8.45	8.9	8.25

Tabelle 7. Genutzte Puffer für die Tris-Trizin-(Urea) PAGE.

Tabelle 8. Zusammensetzung des Tris-Trizin und Tris-Trizin-Urea Gels. Sofern ein Tris-Trizin Gel benutzt wurde, wurde kein Urea in das Sammelgel als auch Trenngel hinzugegeben.

Trenngel	16 %	16 % + Urea	Sammelgel	6 ml
30 % Akrylamid	3.34 ml	3.34 ml	30 % Akrylamid	0.8 ml
Mix (29:1)			Mix (29:1)	
6 M Urea	-	6.36 g	(6 M Urea)	(2.16 g)
<b>3x Gelpuffer</b>	3.34 ml	3.34 ml	<b>3</b> x Gelpuffer	1.5 ml
70 % Glycerol	1.4 ml	1.4 ml	10 % APS	45 µl
10 % APS	40 µl	40 µl	TEMED	4.5 µl
TEMED	4 µl	4 µl	ddH <sub>2</sub> O	Auf 6 ml
ddH <sub>2</sub> O	1,876 ml	Auf 10 ml auffüllen		auffüllen

Das fertig gelaufene Gel wurde dreimal mit  $ddH_2O$  für 5 min gewaschen und anschließend mit kolloidalem Coomassie gefärbt.

# 2.2.5 Proteinproduktion

Klone mit dem Gen im richtigen *Frame* und ohne Aminosäurenaustausch wurden nach erfolgreicher Sequenzierung in verschiedene *E. coli* Proteinexpressionszellen transformiert. Hierbei wurden drei verschiedene Stämme mit unterschiedlichen Eigenschaften verwendet (Tabelle 9).

E. coli	Cenotyn	Merkmale		
Expressionsstamm	Genotyp	WICI KIIIAK		
BL21-Gold (DE3)	$E. \ coli \ B \ F^- \ ompT \ hsdS(r_B^- m_B^-)$	Hohe Plasmidstabilität und		
	) dcm <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> gal $\lambda$ (DE3) endA	Transformationsrate,		
	Hte	Proteinexpression über IPTG/Laktose induzierbar		
CodonPlus RIPL (DE3)	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> <i>ompT</i> hsdS( $r_B^-$	Proteinexpression auch von AT- und		
	$m_{\rm B}^{-}$ ) $dcm^+$ Tet <sup>r</sup> gal $\lambda$ (DE3)	GC-reichen Genen, enthält zusätzliche		
	endA Hte [argU proL	tRNAs für Pro, Arg, Ile, Leu,		
	Cam <sup>r</sup> ] [ <i>argU</i> ileY leuW	Proteinexpression über IPTG/Laktose		
	Strep/Spec <sup>r</sup> ]	induzierbar		
Rosetta-gami 2 (DE3)	$\Delta(ara-leu)7697$ $\Delta lacX74$	Ermöglicht die Bildung von		
	$\Delta phoA$ PvuII phoR araD139	Disulfidbindungen im Zytoplasma,		
	ahpC galE galK rpsL F'[lac $^+$	zusätzliche tRNAs für Arg, Ile, Leu,		
	lacI <sup>q</sup> pro] gor522::Tn10 trxB	Pro, Gly, Proteinexpression über		
	pRARE2 (Cam <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> )	IPTG/Laktose induzierbar		

Tabelle 9. Verwendete bakterielle Expressionsstamme und deren Eigenscha	laften
---	--------

# 2.2.5.1 Expressionstest

Die heterologe Expression der Proteine wurde mit den *E.coli* Stämmen BL21 Gold (DE3), BL21 CodonPlus RIPL (DE3) und Rosetta-gami 2 (DE3) getestet. Mit diesen Stämmen konnte die Expression in Hinsicht auf *Codon Usage* und Disulfidbrückenbindungen innerhalb der Proteine getestet werden. Jeweils eine Kolonie von jedem Bakterienstamm mit dem zu untersuchenden Gen wurde in 2 ml Autoinduktionsmedium (100) (ZY Medium, 1x NPS, 1x 5052, 1 mM MgSO4, 100 µg/ml Antibiotikum) inokuliert. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C unter Schütteln bei 175 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kulturen bei 3200 x g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden dann in 2 ml Solubilisierungspuffer gelöst und für 5 min bei 95 °C aufgekocht. 5 µl der Lysate wurden in einem neuen 1.5 ml Reaktionsgefäß mit 1 µl 6x SDS-Ladepuffer (375 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2 % SDS, 10 % Glycerol, 100 mM DTT, 0.01% Bromphenolblau) gemischt und erneut für 5 min bei 95 °C erhitzt. Die kompletten 6 µl Probe wurden auf ein 12 %-iges Bio-Rad Protean MiniGel aufgetragen und im Bio-Rad Protean III bei 200 V, 60 mA für 45 min laufen gelassen.

# 2.2.5.2 Löslichkeitstest

Die Löslichkeit der Proteine wurde nach Lindwall et al. (101) in modifizierter Form getestet. Eine 50 ml Autoinduktionskultur wurde über Nacht bei 25 °C kultiviert. Am nächsten Morgen wurde die Kultur zunächst bei 3200 x g und bei 4 °C für 30 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 30 ml 10 mM Tris-HCl, pH 8.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA erneut resuspendiert. Von der Resuspension wurden 500 µl Aliquote erstellt und diese bei 12000 x g für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und die Pellets für 10 min bei -20 °C kurz eingefroren. Die Pellets wurden im Anschluss in 1 ml unterschiedlicher Puffer resuspendiert und mit Lysozym (Endkonzentration 50 µg/ml) für 5 min auf Eis inkubiert. Die Resuspensionen wurden im Anschluss jeweils für 3 min auf Eis sonifiziert (40 % Energy Output, 30 % Duty Cycle). Nach erneuter zehnminütiger Inkubation bei 4 °C wurden die Lysate bei 16000 x g für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Je 10 µl des Überstands wurde mit 2 µl 6x SDS-Ladepuffer versetzt und für 5 min aufgekocht und anschließend auf ein Bio-Rad Protean MiniGel aufgetragen, eine SDS-PAGE durchgeführt und mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Als Kontrolle wurde ein Pellet in Solubilisierungspuffer resuspendiert, für 5 min bei 95 °C inkubiert und 5 µl zusammen mit einem 1 µl 6x SDS-Ladepuffer erneut für 5 min aufgekocht und ebenfalls auf das SDS Gel aufgetragen. Im Vergleich zur Kontrolle konnte somit der Anteil an löslichem Protein quantitativ abgeschätzt werden und der Puffer entweder weiter optimiert oder für die Aufreinigung genutzt werden.

# 2.2.6 Protein Aufreinigung

Für die Aufreinigung einzelner Proteine wurden jeweils 400 ml Autoinduktionskulturen angesetzt. Hierfür wurde ein bei -80 °C gelagerter Glycerolstock zunächst angekratzt und 1:1000 in 1 ml LB Medium verdünnt. 200 μl der 1:1000 Verdünnung wurde auf einer LB-Agar Platte, versetzt mit dem Selektionsantibiotikum, ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Platte wurde am darauffolgenden Tag mit 2 ml LB Medium abgeschwemmt und 400 μl genutzt um die 400 ml Autoinduktionsmedium (370 ml ZY-Medium, 20 ml 20x NPS, 8 ml 50x 5052, 400 μl 1 M MgSO<sub>4</sub>, 400 μl Selektionsantibiotikum)zu inokulieren. Die Kulturen wurden zunächst für 1 h bei 37 °C und bei 175 rpm schüttelnd kultiviert, bevor diese über Nacht bei 25 °C weiter kultiviert wurden. Die Kulturen wurden am nächsten Tag durch Zentrifugation bei 5500 g für 30 min und bei 4 °C geerntet und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.6.1 Homeotic Protein Knotted-1

#### 2.2.6.1.1 Homöobox-Domäne

Die Homöobox-Domäne des Knotted-1 Proteins wurde über eine 3-Schritt Aufreinigung von den Bakterienproteinen isoliert. Die Aufreinigung umfasste eine Nickel-Affinitätschromatographie, Gelfiltration und eine abschließende Anionenaustauschchromatographie. Das Pellet einer 400 ml Kultur wurde in 50 ml Lysispuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM LiCl, 0.1 % CHAPS, 10 mM Imidazol, 1 mM PMSF, 1 mM DTT) resuspendiert. Lysozym (Endkonzentration 100 µg/ml) und DNase I (Endkonzentration 3 u/ ml) wurden zusammen mit 1 mM MgCl<sub>2</sub> zu der Suspension hinzugegeben und für 1 h bei 4 °C unter Rühren auf einem Magnetrührer inkubiert. Das Lysat wurde im Anschluss auf Eis im Becherglas sonifiziert (Duty Cycle: 50 %, Energy Output: 50 %) und bei 42000 x g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand nach der Zentrifugation wurde durch einen 0.45 um Spritzenfilter filtriert und auf die vorbereitete HisTrap Nickelaffinitätschromatographiesäule über eine Peristaltikpumpe bei einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen. Die HisTrap-Säule wurde zuvor mit fünf Säulenvolumen (CV) ddH<sub>2</sub>O und anschließend fünf Säulenvolumen Lysepuffer äquilibriert. Die mit dem Lysat beladene HisTrap-Säule wurde an die ÄKTA pure angeschlossen und zunächst für 10 Säulenvolumen mit Lysepuffer gewaschen. Die Elution der an die Säulenmatrix gebundenen Homöobox-Domäne erfolgte über einen Imidazolgradienten von 10 mM bis 1 M über 20 Säulenvolumen mit Hilfe des Elutionspuffers (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM LiCl, 1 M Imidazol, 1 mM PMSF, 1 mM DTT). Die Elution wurden in jeweils 2 ml Fraktionen gesammelt und jeweils 10 µl auf ein SDS Gel aufgetragen um die Reinheit der Fraktion abzuschätzen. Die Fraktionen, die das Homöobox-Protein enthielten wurden im Anschluss zusammengelegt und 200 µl selbst hergestellte TEV Protease hinzugegeben um den His-Tag zu verdauen. Der Verdau wurde in eine Dialysemembran gegeben (MWCO: 3500 Da) und gegen 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM KCl, 1 mM DTT über Nacht dialysiert. Nach erfolgter Dialyse wurde die Proteinprobe 1:3 mit Waschpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0) verdünnt. Das verdünnte Protein wurde daraufhin auf eine mit demselben Puffer äquilibrierte HiTrap Q Anionenaustauschchromatographiesäule mit Hilfe einer Peristaltikpumpe geladen. Nachdem die Säule mit 5 CV vom Waschpuffer gewaschen wurde, erfolgte die Elution ebenfalls über einen Gradienten von 0 bis 1 M NaCl gegen den Elutionspuffer (50 mM Tris, pH 8.0, 1 M KCl). Die Elution wurde wieder in 2 ml Fraktionen gesammelt, zusammengegeben und anschließend über einen Zentrifugalfilter (Vivaspin 20, MWCO: 5000 Da) auf maximal 2 ml eingeengt. Die eingeengte Proteinprobe wurde auf eine mit 25 mM Tris, pH 8.0, 250 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> äquilibrierte HiLoad 16/60 Superdex 75 pg Gelfiltrationssäule gegeben und bei einer Flussrate von 0.5 ml/min laufen gelassen. Einzelne Peaks im Chromatogramm, die das gesuchte Protein enthielten wurden getrennt voneinander gesammelt und auf maximal 16 mg/ml über einen Zentrifugalfilter aufkonzentriert, anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### 2.2.6.1.2 Maltose-Bindeprotein-Knotted-1 (MBP-KN1)

Ein Pellet einer 400 ml Kultur mit dem N-terminal MBP-getaggten Knotted-1 Protein wurde in 50 ml Lysispuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5, 1 mM DTT, 5 % Glycerol, 500 µM Gibberellinsäure) aufgenommen und mit Lysozym (100 µg/ml Endkonzentration), DNase I (3 u/ml Endkonzentration) und einer cOmplete Protease Inhibitor Tablette versetzt und für 1 h bei 4 °C inkubiert. Das Lysat wurde anschließend auf Eis sonifiziert (*Duty Cycle*: 50 %, *Energy Output*: 50 %). Nach Zentrifugation für 30 min bei 43000 x g und bei 4 °C wurde der Überstand durch einen 0.45 µm Spitzenfilter filtriert und anschließend mit Hilfe einer Peristaltikpumpe auf eine Anionenaustauschchromatographiesäule gegeben. Der Durchlauf wurde direkt auf eine angeschlossene Heparinaffinitätschromatographiesäule gegeben. Das gebundene MBP-KN1 Protein wurde von dieser Säule stufenweise mit NaCl eluiert (Konzentrationsstufen: 500 mM, 750 mM, 1 M, 2 M). Fraktionen, die das getaggte Protein enthielten wurden im Anschluss über einen Vivaspin 500 (MWCO: 30000 Da) Zentrifugalfilter eingeengt und auf eine Lösung aus 10 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 1 mM DTT. Das aufgereinigte Protein wurde erneut über Vivaspin 500 Zentrifugalfilter eingeengt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### 2.2.6.2 Translationally controlled tumor associated protein (TCTP)

Ein 200 ml Bakterienpellet wurde in 50 ml Lysepuffer (50 mM Na-HEPES, pH 7.5, 300 mM NaCl, 10 % Glycerol, 1 mM DTT) resuspendiert und mit 100 µg/ml Lysozym und 3 u/ml DNase I versetzt. Zusätzlich wurde 1 mM PMSF und 1 mM MgCl<sub>2</sub> zum Ansatz hinzugegeben und bei 4 °C für 1 h unter Rühren inkubiert. Das Lysat wurde im Anschluss auf Eis sonifiziert (50 % Duty Cycle, 50 % Energy *Output*) und anschließend bei 43000 x g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen 0.45 µm Spitzenfilter filtriert und mit Hilfe einer Peristaltikpumpe auf eine mit Lysepuffer äquilibrierte 5ml HisTrap FF Nickelaffinitätschromatographiesäule gegeben. Nach Waschen der Säule mit 10 Säulenvolumen Lysepuffer wurde das gebundene TCTP über einen Gradienten von 25 Säulenvolumen von 0 bis 500 mM Imidazol gegen den Elutionspuffer (50 mM Na-HEPES, pH 7.5, 300 mM NaCl, 10 % Glycerol, 500 mM Imidazol, 1 mM DTT) eluiert. Die Fraktionen, die das TCTP enthielten wurden gesammelt und mittels Zentrifugalfilter (Vivaspin 20, MWCO: 10000 Da) auf 2 ml eingeengt. Die eingeengte Probe wurde daraufhin auf eine mit 20 mM Na-HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 % Glycerol, 1 mM DTT äquilibrierte Gelfiltrationssäule geladen und bei 0.5 ml/min über Nacht laufen gelassen. Sofern die Fraktionen, die das TCTP enthielten nicht rein genug waren wurde im Anschluss eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt. Hierfür wurde das TCTP zunächst mit 20 mM Na-HEPES, pH 7.5, 5 % Glycerol, 1 mM DTT (Waschpuffer) soweit verdünnt, dass die Endkonzentration an NaCl in der Probe unter 100 mM lag. Die verdünnte Probe wurde dann über eine Peristaltikpumpe auf eine *HiTrap* Q Anionenaustauschchromatographiesäule geladen und zunächst mit 20 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte über einen NaCl Gradienten von 0 bis 1 M über 20 Säulenvolumen gegen den Elutionspuffer (20 mM Na-HEPES, 1 M NaCl, 5 % Glycerol, 1 mM DTT). Das Protein wurde im Anschluss erneut gesammelt und über einen Zentrifugalfilter (Vivaspin 20, MWCO: 10000 Da) auf eine Konzentration von mindestens 10 mg/ml gebracht. Das Protein wurde daraufhin aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

# 2.2.6.3 Tobacco Etch Virus Protease (TEV Protease)

Die TEV Protease wurde zunächst in 400 ml Autoinduktionsmedium in BL21 CodonPlus RIPL (DE3) Zellen hergestellt und nach dem Protokoll von Alsarraf *et al.* (102) über eine Nickelaffinitätssäule und eine Anionenaustauschchromatographie in zwei Schritten aufgereinigt. Nach einer Dialyse über Nacht gegen Lagerpuffer (50 mM Tris–HCl pH 7.6, 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 50% Glycerol) wurde eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt und anschließend im Lagerpuffer bei -80°C in 200  $\mu$ l Aliquots gelagert.

# 2.2.6.4 T7 RNA Polymerase

Für die in vitro RNA Synthese wurde die T7 RNA Polymerase mit N-terminalem 6x HisTag in BL21 Gold (DE3) E. coli Zellen mittels Autoinduktion hergestellt. Hierfür wurde aus einer Vorkultur 400 µl Zellsuspension in 400 ml ZYP-5052 Medium inokuliert und anschließend für 1 h bei 37 °C und 175 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurde die Kultivierung über Nacht bei 24 °C fortgeführt. Die Aufreinigung erfolgte nach Ellinger et al. (103). Zur weiteren Erhöhung der Reinheit wurde im die Nickelaffinitätschromatographie Anschluss an über eine weitere HiTrap 0 FF Anionenaustauschchromatographiesäule mit 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM DTT als Waschpuffer und 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 1 mM DTT als Elutionspuffer aufgereinigt. Die Elution erfolgte über einen Gradienten von 50 bis 500 mM NaCl über 20 Säulenvolumen. Fraktionen, die die Polymerase enthielten, wurden anschließend kombiniert und über Nacht gegen 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.7, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT und 50 % Glycerol dialysiert. Am nächsten Tag wurde die Probe mittels Zentrifugalkonzentrator (Vivaspin 500, MWCO 30000 Da) auf eine Konzentration von 12 mg/ml konzentriert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

# 2.2.6.5 Inorganische Pyrophosphatase aus E. coli

Das Protein wurde in *E. coli* BL21 (DE3) RIPL Zellen in 400 ml Autoinduktionskultur hergestellt. Zu 400 ml ZYP-5052 Medium wurden 400  $\mu$ l einer Vorkultur hinzugegeben und anschließend bei 37 °C für 1 h und bei 175 rpm schüttelnd inkubiert. Die Übernachtkultivierung erfolgte daraufhin bei 24 °C. Die Aufreinigung erfolgte nach Ramos *et al.* (104). Das aufgereinigte Protein wurde auf eine Konzentration von 1 u/  $\mu$ l eingestellt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### 2.2.6.6 Vitamin B12 unabhängige Methionin Synthase 1 (MS1)

Das MS1 Protein wurde mit Hilfe des Autoinduktionsmediums in BL21 CodonPlus (DE3) RIPL Zellen hergestellt. Da MS1 ein zinkbindendes Protein ist, wurde anstatt 1 mM MgSO<sub>4</sub> sowohl 0.5 mM MgSO<sub>4</sub> als auch 0.5 mM ZnSO<sub>4</sub> zur Kultur gegeben und über Nacht bei 25 °C und bei 175 rpm schüttelnd inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte wie bei Ferrer *et al.* (105) beschrieben. Das aufgereinigte Protein wurde auf mindestens 10 mg/ml aufkonzentriert und in 100 µl Aliquote schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

# 2.2.7 Circulardichroismus (CD) Experimente

CD Messungen wurden sowohl für das TCTP, als auch für KN1 und At1g64370 durchgeführt. Hierfür wurde der J-815 CD-Photometer verwendet. 200  $\mu$ l einer 5 bis 10 mikromolaren Proteinprobe wurde bei Raumtemperatur gemessen, fünf verschiedene Messungen zusammengefasst und der Graph geglättet. Für die Messungen zwischen 190-260 nm wurden die Proben jeweils in einer 1 mm Quartz Küvette gemessen und die Elliptizität ( $\theta$ ) gemessen. Die jeweils verwendeten Puffer wurden mit den gleichen Einstellungen gemessen und später von den Proben abgezogen. Die gemessene Elliptizität, als Maß für die Differenz der Absorption zwischen rechts und links polarisiertem Licht, wurde um die einzelnen Messungen besser mit einander vergleichen zu können über Gleichung (1) in MRE (*Mean Residue Ellipticity*, [deg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>]) umgewandelt (106).

$$MRE = \frac{MRW \times \theta}{10 \times c \times d}$$
[1]

MRW: durchschnittliches Molekulargewicht der Aminosäuren

- Θ: Elliptizität
- c: Proteinkonzentration in g/ml
- d: Wegstrecke durch die Probe in cm

Bei allen Messungen wurde des Weiteren darauf geachtet, dass die absolute Absorption der Probe im kompletten Wellenlängenbereich niemals höher als 3.5 Absorptionseinheiten (AU) lag. Temperaturabhängige Messungen wurden bei gleichen Einstellungen zwischen 5 und 80 °C durchgeführt. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte über den *Circulardichroism Analysis Server* (107) (http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk) unter Zuhilfenahme der SELCON3 (108), CONTIN (109) und K2D (110) Methoden. Nur Daten mit einem Fehler von unter 0.1 (NRSD) zwischen experimentellem und theoretischem Kurvenverlauf wurden als richtig angenommen. Für die SELCON als auch die CONTIN Methode wurden zwei Referenzsätze verwendet (Set 4 und 7, jeweils optimiert für Messungen zwischen 190 nm und 240 nm) und miteinander verglichen.

#### 2.2.8 Dynamic Light Scattering (DLS) Versuche

Die dynamische Lichtstreuung wurde vor jedem SAXS und Kristallisationsversuch zunächst durchgeführt. Hierfür wurden die Proteinproben zunächst für 30 min bei 20000 x g bei 4 °C zentrifugiert und 15 µl der Proteinprobe in eine staubfreie DLS Küvette gegeben. Die Messung wurde 20 Sekunden lang durchgeführt und mindestens 20-mal wiederholt. Für die Langzeitmessungen wurde zunächst eine Terazaki 96 *well* Platte mit Parafinöl überschichtet und 2 µl der jeweiligen Proteinprobe hinzupipettiert.

Die Probe wurde mittels Laser ( $\lambda = 690$  nm, 10 - 50 mW Laser Power) bestrahlt und die isotropische Streuung bei einem Winkel von 90 ° gemessen. Die experimentellen Hydratationsradien (R<sub>h</sub>) konnten unter der Annahme nahezu globulärer Proteine über die Stokes-Einstein-Gleichung bestimmt werden.

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D_0}$$
[2]

k: Boltzmann Konstante T: Temperatur

η: Viskosität

D<sub>0</sub>: Diffusionskoeffizient

# 2.2.9 Limitierte Proteolyse

Zum entfernen flexibler Bereiche innerhalb des TCTPs und damit zur Steigerung der Kristallisierbarkeit wurde das *FloppyChoppy Kit* von Jena *Bioscience* zur limitierten Proteolyse nach Herstellerangaben verwendet. Hierfür wird das native im aufgereinigte Protein mit unterschiedlichen Proteasen versetzt und anschließend verdaut. Da die native Faltung des Proteins verhindert, dass alle möglichen Proteaseschnittstellen für die Proteasen erreichbar sind, sondern nur die Bereiche verdaut werden, die für die Enzyme zugänglich sind, entstehen somit kompakte verkürzte Proteinfragmente. Die entstandenen Verdaue wurden auf ein denaturierendes SDS Polyacrylamid Gel aufgetragen um die entstandenen Fragmente voneinander zu trennen. Zur Analyse der einzelnen größeren Fragmente wurden die entsprechenden Fragmentbanden aus dem Gel ausgeschnitten und der massenspektrometrischen Analyse zugeführt. Sofern nur zwei oder drei Fragmente sichtbar waren wurde diese Protease genutzt und zu dem zu kristallisierenden TCTP hinzugegeben. Die Probe wurde für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend ein *Sparse Matrix* Kristallisationsscreen durchgeführt.

# 2.2.10 Small angle X-Ray Scattering (SAXS) Experimente

SAXS Messungen wurden an der Petra III P12 *Beamline* am EMBL (DESY, Hamburg) durchgeführt. Zu den Proben wurde zunächst 1 mM frisches DTT gegeben um möglichen Strahlenschäden vorzubeugen. Im Anschluss wurden die Proben für eine Stunde bei 20000 x g und bei 4 °C abzentrifugiert um Staub und größere Aggregate aus der Proteinprobe zu pelletieren. Im Anschluss wurde mittels DLS Messung die Homogenität und Monodispersität der Probe bestimmt bevor die Messung an der SAXS *Beamline* begonnen wurde. Zunächst wurde die SAXS Kapillare mit Wasser durchspült und im Anschluss BSA in zwei Konzentrationen als Standard gemessen. Hierbei wurden zunächst 20 µl BSA Puffer gemessen, bevor 20 µl BSA und erneut 20 µl Puffer gemessen wurden. Das doppelte Messen des Puffers diente dem Zweck mögliche Schwankungen innerhalb der Messungen besser zu erkennen und um die gemessenen Proben besser zu normalisieren. Die zu untersuchenden Proteine wurden, sofern möglich, in drei verschiedenen Konzentrationen zwischen 1 und 5 mg/ml gemessen. Ebenfalls wurden die Messungen in der Abfolge Puffer  $\rightarrow$  Protein  $\rightarrow$  Puffer durchgeführt. Die erhaltenden Daten wurden über die ATSAS Software (111) ausgewertet.

Daten desselben Proteins bei unterschiedlicher Konzentration wurden über das Programm Primus (112) hinsichtlich auftretender Konzentrationseffekte bei niedrigen Winkeln untersucht, sowie das Signal-zu-Rausch Verhältnis überprüft. Sofern Konzentrationseffekte auftraten wurden die unterschiedlichen Konzentrationsdaten zusammengefasst, indem der Bereich für kleine Winkel durch die Proteinprobe mit niedriger Konzentration und der Bereich für große Winkel durch die Proteinprobe mit hoher Konzentration bestimmt werden. Dadurch konnte das Signal-zu-Rausch Verhältnis verbessert werden. Anhand der Guinier-Approximation konnte der *Radius of Gyration* (Rg) unter der Annahme, dass für sehr kleine Winkel (sR<sub>G</sub> <1.3) die Streuintensität  $I(s) = I(0)e^{-(sR_G)^2/3}$  (113) gilt, bestimmt werden als auch geprüft werden ob die Proben aggregiert waren. Für alle Proteinproben wurde daraufhin über die P(r) Funktion mittels GNOM (114) d<sub>max</sub> bestimmt. Anhand der zusätzlich erhaltenen Information über I(0) konnte das Molekulargewicht der Proteinprobe unter Zuhilfenahme des BSA-Standards über die Gleichung [3] abgeschätzt werden.

$$MW_{Probe} = \frac{I(0)_{Probe} \times MW_{BSA}}{I(0)_{BSA}}$$
[3]

MW <sub>Probe</sub> :	Molekulargewicht der Proteinprobe
MW <sub>BSA</sub> :	Molekulargewicht vom BSA
I(0) <sub>Probe</sub> :	Streuintensität der Proteinprobe bei einem Winkel von 0 $^\circ$
$I(0)_{BSA}$ :	Streuintensität des BSA-Standards bei einem Winkel von 0 $^\circ$

*Ab initio* Modelle wurden über das Programm *Dammif* (115) erstellt. Sofern Kristallstrukturen homologer Proteine vorhanden waren, die fehlende Bereiche in der Kristallstruktur aufwiesen, wurde zunächst *SASREF* (116) verwendet um die Kristallstruktur zu den gemessenen Daten zu fitten. Über das Programm *Crysol* (117) wurden die fehlenden Bereiche hinzugerechnet. Als Maß für einen guten Fit von Kristallstruktur und gemessenen SAXS Daten wurde ein  $\chi^2$  Wert von nahe 1 angesehen. Proteine mit hoher Flexibilität oder intrinsisch ungeordnete Proteine wurden zusätzlich über die *Ensemble Optimisation Methode* (EOM) (118) ausgewertet.

# 2.2.11 Protein Kristallisationsexperimente

Die Kristallisationsexperimente vom TCTP als auch von der Knotted-1 Homöobox wurden über drei verschiedene Methoden durchgeführt. Das TCTP wurde mit einer Konzentration von mindestens 5 mg/ml und maximal 100 mg/ml versucht über verschiedene kommerziell erhältliche und vorgefertigte 96 well Grid Screens (Morpheus (119), PACT Suite (120), Index (121), JCSG<sup>+</sup> (122), Stura Footprint (123)) zu kristallisieren. Die Ansätze wurden mit Hilfe des Honeybee Kristallisationsroboters als Sitting Drop Dampfdiffusionsexperiment in eine 96 well Platte pipettiert. Dabei wurden 0,4 µl Proteinprobe mit dem Präzipitant im Verhältnis von 1:1 gemischt und anschließend luftdicht mit einer adhäsiven Folie verschlossen. Die Kristallisationsexperimente für die Knotted-1 Homöobox wurden gleichermaßen angesetzt. Genutzt wurde eine Konzentration von 16 mg/ml und die 96 well Grid Screens JCSG<sup>+</sup> und PACT Suite. Die Platten wurden bei 20 °C im Inkubator gelagert und im zeitig stetig stetigenden Turnus auf Kristalle überprüft. Geprüft wurde am selben Tag, nach einem Tag, nach drei Tagen, nach einer Woche, nach zwei Wochen und nach einem Monat. Sofern noch klare Tropfen vorhanden waren, wurde die Platte nach weiteren drei Monaten überprüft. Das TCTP als auch die Knotted-1 Homöobox wurden außerdem über die Hanging Drop Dampfdiffusion im 24 well Maßstab versucht zu kristallisieren. Dabei wurden 3 µl Tropfen in den Verhältnissen von 1:2, 1:1 und 2:1 angesetzt. Für das TCTP wurde außerdem ein Microbatch Versuch angesetzt, indem eine Terazaki Platte mit Parafinöl überschichtet und 2 µl Tropfen des Protein/Präzipitat Gemisches im 1:1 Verhältnis in die einzelnen Wells pipettiert wurde.

#### 2.2.12 Messung intrinsischer Fluoreszenz

Zur Messung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz wurden 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M der aufgereinigten Proteine verwendet. Als Referenzmessung wurde der Puffer in dem sich die jeweiligen Proteine befanden gemessen. 500  $\mu$ l Ansätze wurden für die Messung in eine Quarz UV Küvette (Hellma) pipettiert und am Fluorospektrophotometer gemessen. Die Anregungswellenlänge  $\lambda_{ex}$  wurde dabei bei 295 nm gesetzt und die Emission zwischen  $\lambda_{Em}$ = 310 bis 420 nm gemessen. Die Messungen wurden dreimal wiederholt und anschließend gemittelt und von den Puffermessungen abgezogen.

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) von Hemin an das TCTP wurden die Messungen in Triplikaten durchgeführt, wobei Hemin im Konzentrationsbereich von 1 bis 40  $\mu$ M zu 1  $\mu$ M TCTP hinzugegeben und zunächst für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Mögliche Fluoreszenz durch das Hemin wurde von den Proben abgezogen, indem nur die unterschiedlichen Heminkonzentrationen ohne Protein in Puffer gemessen wurden. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurde das Maximum der emittierten Fluoreszenz bestimmt und im Programm GraphPad gegen die steigende Heminkonzentration aufgetragen. Durch Anlegen einer nichtlinearen Regressionskurve konnte über Gleichung [4] und unter der Annahme einer spezifischen einseitigen Ligandenbindung die Dissoziationskonstante bestimmt werden

$$Y = \frac{B_{max} \times X}{K_d + X}$$
[4]

- Y: Relative Fluoreszenz aufgetragen auf der Ordinatenachse
- X: Ligandenkonzentration aufgetragen auf der Abszissenachse
- B<sub>max</sub>: maximal zu erreichender Wert von Y extrapoliert zu sehr hohen Konzentrationen von X
- K<sub>D</sub>: Dissoziationskonstante, beschrieben als den Wert von X, an dem die Hälfte des Liganden maximal gebunden hat.

# 2.2.13 In vitro T7 RNA Transkription

Zur Herstellung unterschiedlicher RNAs wurde das T7 RNA Transkriptionssystem verwendet. Hierfür wurde die T7 RNA Polymerase aus der gDNA von *E. coli* BL21 Gold (DE3) Zellen isoliert und in den pET-28a Expressionsvektor kloniert. Die Proteinexpression wurde mittels Autoinduktion in *E. coli* BL21 Gold (DE3) Zellen durchgeführt und nach Ellinger *et al.* (103) die Polymerase aufgereinigt. Zur Herstellung kleiner RNAs (<40 Basen) wurden komplementäre DNA-Oligonukleotide zuvor so designet, dass am 5'-Ende der zu synthetisierenden Sequenz der Promotor für die T7 RNA Polymerase (5'-GAA ATT AAT ACG ACT CAC TAT A-3'), gefolgt von zwei Guaninen, lokalisiert war. Die DNA-Oligonukleotide wurden hybridisiert und direkt für die *in vitro* Transkription verwendet. Die Templates für größere RNAs (>40 Basen), beziehungsweise mRNAs wurden mittels PCR hergestellt. Dabei wurde

am *forward* Primer erneut am 5° Ende die T7 RNA Polymerase-Promotor angefügt und der die PCR mit der *Phusion* DNA-Polymerase durchgeführt. Im Anschluss wurde das PCR-Produkt über das *PCR Purification Kit* (Qiagen) aufgereinigt und das Fragment in RNase-freiem Wasser eluiert. Zur RNA-Synthese nach Cazenave *et al.* (124) wurden 5 – 10 pmol *Template* DNA pro 100 µl Reaktionsansatz eingesetzt. Der Ansatz wurde nach Tabelle 10 angesetzt und zunächst für 3 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 5 u DNase I zum Ansatz hinzugegeben und für 1 h erneut bei 37 °C inkubiert. Nach dem Verdau wurde die synthetisierte RNA über *RNA Clean & Concentrator-25* Zentrifugalkonzentratoren aufgereinigt. Die Integrität der RNA wurde über eine denaturierende Urea-PAGE geprüft und die restliche RNA im Anschluss gefällt und in 95 % Ethanol bei -80 °C gelagert.

Tabelle 10. Ansatz für die in vitro RNA-Synthese mit Hilfe der T7 RNA Polymerase.

Ansatz für 100 µl				
10 µl	10x Transkriptionspuffer			
10 µl	20 mM NTP Mix			
5 µl	Inorganische Pyrophosphatase (0.1 U/µl)			
10 µl	T7 RNA Polymerase (2500 u/µl)			
$5-10 \ \text{pmol}$	DNA Template			
ad 100 µl	ddH2O (DEPC behandelt)			

# 2.2.14 Microscale Thermophorese Messungen

Zur weiteren Quantifizierung der Dissoziationskonstante wurde die *Microscale* Thermophorese angewandt. Hierfür wurde nach Herstellerangaben das Protein zunächst mit dem Fluoreszenzfarbstoff NT-647-NHS an freie Amingruppen oder über NT-647-Maleimid an freie Cysteine gekoppelt. Für die Messungen wurde vor der Thermophorese zunächst ein Kapillarscan durchgeführt um einen geeigneten Kapillartyp zu finden, an der keine Adhäsion des Proteins an die Kapillarwände zu erkennen war und um zu überprüfen ob ein konzentrationsabhängiger Fluoreszenzverlust vorliegt. Die Interaktion von TCTP und Hemin wurde im Hemin Konzentrationsbereich von 0 bis 40 µM gemessen. Sofern bei dem zunächst durchgeführten Kapillarscan eine Abnahme der Fluoreszenz mit steigender Ligandenkonzentration zu erkennen war, wurde über die Signaländerung, anstatt über die Thermophorese die K<sub>D</sub> ermittelt. Zur Thermophoresemessung wurden jeweils 60 nM gelabeltes Protein verwendet und Fluoreszenzwerte zwischen 400 und 2500 *counts* in die Auswertungen mit aufgenommen. Die Analyse und die Bestimmung der K<sub>D</sub> erfolgte über Anlegen einer nichtlinearen Regressionskurve in den Programmen *GraphPad Prism* 5 und MO.*Affinity Analysis Software*.

## 2.2.15 DEPC-Behandlung von Proteinen

Zur DEPC-Modifizierung von Proteinen wurde ein 400 mM DEPC-Stock in 100 % Acetonitril angesetzt. Zu 50  $\mu$ M Protein wurden in 100  $\mu$ l 400  $\mu$ M DEPC hinzugegeben und für maximal 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 mM Tris oder 100 mM Imidazol gestoppt. Zur Analyse wurde die modifizierte Proteinprobe im Anschluss mit einem fünffachen Volumen von 90 % Aceton, 10 % Methanol und 10 mM DTT für vier Stunden bei -20 °C gefällt. Die Fällung wurde bei 4 °C und 5000 x g für 15 min pelletiert und anschließend der Überstand verworfen. Das Pellet wurde daraufhin dreimal mit eiskaltem Aceton gewaschen. Zur nachfolgenden massenspektrometrischen Analyse wurde das Pellet in 20  $\mu$ l 50 mM (NH<sub>4</sub>)HCO<sub>3</sub> aufgenommen und für Messungen im Linearmodus auf eine *Polished Steel Target* Platte aufgetragen. Für Messungen im Reflekormodus wurde die Probe zuvor mittels Trypsin (0.01  $\mu$ g/ $\mu$ l) verdaut.

# 2.2.16 DNA/RNA Bindestudien

Zur Bestimmung der DNA/RNA Bindung an die *Knotted-1* Homöobox wurden zwei Methoden zur qualitativen Analyse eingesetzt. Über *Gelshift*-Versuche konnte ein Binden der Nukleinsäure und damit einhergehend das unterschiedliche Laufverhalten des Protein-Nukleinsäure Komplexes im Vergleich zu den einzelnen Komponenten geprüft werden. Für die Isolierung des nativen Protein-Nukleinsäurekomplexes wurde die Gelfiltration verwendet. Für die DNA Bindung wurden zunächst jeweils zwei komplementäre DNA-Stränge zusammengegeben und auf 95 °C erhitzt. Anschließend wurde die Temperatur langsam auf Raumtemperatur gesenkt um ein möglichst vollständiges Hybridisieren der beiden Einzelstränge zu einem Doppelstrang zu ermöglichen.

#### 2.2.16.1 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Zu einer 50 µM Proteinprobe wurde die gleiche molare Menge an Nukleinsäuren hinzugegeben und zunächst für 30 min auf Eis inkubiert. Die Probe wurde auf ein 1 %-iges TAE-Agarosegel aufgetragen welches zusätzlich *GelRed* für die Nukleinsäuredetektion enthielt. Die Elektrophorese wurde bei 4 °C bei 100 V für 1.5 h durchgeführt. Im Anschluss wurden die Nukleinsäuren über die Detektion des *GelRed*-Signals analysiert. Das Agarosegel wurde im Anschluss kurz in Wasser gewaschen und mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Anhand der Kodetektion von Nukleinsäuren und Protein in der gleichen Bande konnte das Vorhandensein des Protein-Nukleinsäurekomplexes nachgewiesen werden.

#### 2.2.16.2 Zone Interference Gelelektrophorese (ZIGE)

Für die ZIGE Versuche wurde ein 1%-iges (w/v) TAE-Agarosegel mit GelRed (1:10000 Verdünnung) gegossen. 30 μM FM08 wurden mit 5 % Glycerol, 0.04 % Bromphenolblau versetzt und in die einzelnen Taschen aufgetragen. Die Spannung wurde so angelegt, dass die Anode in der Nähe der Geltaschen orientiert war. Die Elektrophorese wurde bei 150 V, 100 mA und 4 °C für 1.5 h durchgeführt. Nach Ende der Elektrophorese wurde in die Geltaschen unterschiedliche Nukleinsäurekonzentrationen (für die K<sub>D</sub> Bestimmung) oder unterschiedliche Nukleinsäuren aufgetragen. Nach Ändern der Polung (Kathode in der Nähe der Geltaschen) wurde der Lauf erneut für 45 min gestartet. Die Nukleinsäuren wurden anschließend im fertig gelaufenen Gel am UV-Geldokumentationsgerät detektiert. Zur Detektion der Proteine im Agarosegel wurde das Gel kurz in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und in kolloidalem Coomassie über Nacht gefärbt.

# 2.2.16.3 Gelfiltration

Zur Isolation des *Knotted-1* Homöobox-DNA Komplexes wurde die zuvor hybridisierte DNA im 2:1 Überschuss zu der Proteinprobe hinzugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe bei 20000 x g für 30 min zentrifugiert und auf eine *HiLoad* (16/60) Superdex 75 pg Gelfiltrationssäule gegeben. Die Auftrennung erfolgte im gleichen Puffer, wie das Protein aufgereinigt wurde bei einer Flussrate von 0.3 ml/min. Die Überprüfung ob ein Protein-DNA Komplex vorlag erfolgte über das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und bei 280 nm ( $\frac{A_{260nm}}{A_{280nm}}$ ).

# 2.2.16.4 UV Crosslinking von DNA und Protein

Zur kovalenten Verknüpfung von Protein und DNA wurden 50 µM Protein äquimolar mit DNA in 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub> für 15 min auf Eis inkubiert. 15 µl der Probe wurden daraufhin in eine Mikrotiterplatte pipettiert und ohne Deckel 4-mal für 3 min im Stratalinker 2400 mit UV-Licht bestrahlt. Als Kontrolle diente Protein, welches anstelle von DNA mit zusätzlichem Puffer inkubiert und ebenfalls bestrahlt wurde. Die Proben wurden im Anschluss mit 6x SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95 °C inkubiert, auf ein 12 %-iges Tris-Trizin-Urea Gel aufgetragen und mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Die Proteinbanden wurden nach vorherigem In-Gel Trypsin Verdau massenspektrometrisch analysiert.

# 2.2.17 Interaktionspartnersuche

Die Interaktionspartnersuche vom TCTP umfasste die *in vitro* Suche mit Hilfe des TCTP als Sonde. Zum einen sollte über *Pull-down* und *Crosslink* Versuche Proteine und kleine niedermolekulare Liganden identifiziert als auch über modifizierte *Far-Western-Blots* stabile als auch moderat stabile Protein-Protein Interaktionen mit Phloemproteinen nachgewiesen werden.

#### 2.2.17.1 Herstellung von Pflanzenextrakt

2 g Blattmaterial (*Brassica napus, Arabidopsis thaliana*) wurden in flüssigem Stickstoff fein gemörsert und anschließend in 10 ml Extraktionspuffer (100 mM Na-Hepes pH 7.5, 150 mM KCl, 2 mM DTT, 5 % Glycerol) für 30 min auf Eis inkubiert. Sofern chloroplastische Proteine ebenfalls extrahiert werden sollten, wurde zusätzlich 0.25 % (w/v) CHAPS zum Puffer hinzugegeben. Das Extrakt wurde anschließend über ein feinmaschiges Sieb gefiltert und der Durchfluss bei 35000 x g für 30 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin bei -80 °C gelagert oder direkt verwendet.

#### 2.2.17.2 Ligandenidentifizierung über Protein Pull-down

Für die Identifizierung hochaffiner Liganden für das TCTP wurde zunächst ein Protein *Pull-down* Experiment durchgeführt. Hierfür wurde 6xHis-*getaggtes* TCTP zunächst an Ni<sup>2+</sup>-NTA Matrix immobilisiert und im Anschluss mit hergestelltem Pflanzenextrakt von *Arabidopsis thaliana* und *Brassica napus* inkubiert. Zur Bindung des Proteins an die Ni-NTA Matrix wurden *HisPur* Ni-NTA Zentrifugiersäulen benutzt (ThermoFisher Scientific). Diese wurden nach Herstellerangaben zunächst gewaschen, äquilibriert und anschließend 100 μg Protein hinzugegeben. Die Matrix wurde zusammen mit dem Protein für 1 h bei 4 °C inkubiert und ungebundenes Protein im Anschluss nach Herstellerangaben herausgewaschen. 500 μl Pflanzenextrakt wurden zu den mit TCTP beladenen Agarose*beads* gegeben und erneut für 1 h bei 4 °C inkubiert. Die *Beads* wurden daraufhin zunächst mit 5 ml Waschpuffer (50 mM Na-HEPES pH 7.5, 300 mM NaCl, 1 mM DTT), welcher entweder zusätzlich 8 M Harnstoff für eine denaturierende Aufreinigung oder keinen Harnstoff für eine native Aufreinigung enthielt, gewaschen. Für die native Aufreinigung wurde stattdessen nach dem Waschschritt mit 1 ml 1 M NaCl in Waschpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution mit Waschpuffer inklusive 500 mM Imidazol oder 50 mM EDTA.

# 2.2.17.3 Gelfiltration mit Pflanzenextrakt

Das Pflanzenextrakt wurde zusammen mit 100 µg TCTP in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 0.05 % Triton-X und 10 % Glycerol als 2 ml Reaktionsansatz bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Probe bei 21000 x g für 30 min abzentrifugiert. Nach Ende der Zentrifugation wurde der Überstand auf eine mit 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl und 1 mM DTT äquilibrierte *HiLoad* Superdex 75 pg Gelfiltrationssäule gegeben und die Chromatographie bei einer Flussrate von 0.5 ml/min durchgeführt. Je 2 ml Fraktionen wurden gesammelt und 10 µl jeder Fraktion nach Beendigung der Gelfiltration auf ein SDS Gel aufgetragen und die Elektrophorese gestartet.

#### 2.2.17.4 Far-Western Blots

Für die Interaktionspartnersuche auf Proteinebene wurde zunächst Phloemsaft mit Hilfe eines Zentrifugalkonzentrators (Vivaspin 500, MWCO: 10000) auf ein Sechstel des Ausgangsvolumens eingeengt und eine 2D Gelelektrophorese durchgeführt. Hierfür wurde der konzentrierte Phloemsaft zunächst in 2x Urea-Ladepuffer (120 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 4 M Harnstoff, 20% Glycerol, 0.4 % (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen und für 10 min bei 80 °C erhitzt. Im Anschluss wurde die Probe als Duplikat auf ein 10%-iges Urea-Tris-Trizin Gel aufgetragen und die Gelelektrophorese bei 150 V für 1 h gestartet. Die Gelstreifen wurden ausgeschnitten und zunächst in azidem Puffer (100 mM Tris, 150 mM HCl) gewaschen und mit 125 mM Tris-HCl pH 6.8 für 10 min äquilibriert. Im Anschluss wurde als zweite Dimension ein 12%-iges SDS-Gel laufen gelassen, indem jeweils eine komplette Bahn aus dem vorherigen Lauf auf das Gel gelegt und anschließend die Elektrophorese für eine Stunde bei 150 V durchgeführt wurde. Eines der erhaltenen 2D-Gele wurde mit kolloidalem Coomassie gefärbt, während das andere Gel auf eine PVDF Membran geblottet wurde, die zuvor mit 100 % Methanol für 15 s aktiviert wurde. Der Blot wurde bei 4 °C für 1 h mit PBST Puffer im Semi-dry Blotverfahren nach Herstellerangaben durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Denaturierung/Renaturierung der Proteine auf der Membran nach Wu et al. (125). Nach der Renaturierung wurde der Blot mit 5% BSA in PBST für 1 h bei Raumtemperatur geblockt. Nach dem Blockschritt wurde das TCTP in einer Konzentration von 5 µg/ml in Gelfiltrationspuffer auf den Blot gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Um schwache Interaktionen zu stabilisieren wurde im Anschluss der Überstand abgegossen und der Blot zunächst zweimal mit PBS für 10 min gewaschen und daraufhin mit dem Crosslinker 1-Ethyl-3-(3dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid (EDC, 3 mM EDC in PBS) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. EDC vernetzt Carboxylgruppen mit Aminogruppen und erlaubt damit mögliche transiente Interaktionen über eine kovalente Verknüpfung zu stabilisieren. Nach der erfolgten Crosslink-Reaktion wurde der Überstand abgegossen und die Reaktion für 20 min mit 100 mM Tris-HCl, pH 7.5 gestoppt. Nach dreimaligem Waschen für 10 min mit PBST wurde daraufhin der primäre Maus anti-His Antikörper in 3% Milchpulver (1:10000 verdünnt) zum Blot gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach sechsmaligen Waschen für 5 min mit PBST wurde der Sekundärantikörper (Ziege anti-Maus mit HRP oder alkaliner Phosphatase konjugiert) nach Herstellerangaben verdünnt und in 3% Milchpulver zum Blot gegeben und erneut für eine Stunde inkubiert. Nach erneutem sechsmaligem Waschen mit PBST für jeweils 5 min wurde der Blot entweder mit PBS kurz gewaschen oder für 10 min in alkalinem Phosphatasepuffer inkubiert. Die Detektion erfolgte im Falle der alkalinen Phosphatase mittels kolorimetrischen Nachweis durch Zugabe von BCIP und NBT im Verhältnis von 1:3. Der Nachweis mittels HRP erfolgte über die Detektion der Chemilumineszenz nach Zugabe von Luminol und Wasserstoffperoxid und kurzer Inkubation von etwa 10 s am ChemiDoc *Touch*.

#### 2.2.18 In silico Docking Experimente

Für die in silico Docking Experimente vom TCTP mit verschiedenen Liganden wurde zunächst ein 3D Strukturmodell vom TCTP über den in silico Docking Server iTasser (126) an Hand der NMR Struktur vom TCTP aus Saccharomyces cerevisiae erstellt. Die benötigten mol2 Dateien für die Liganden wurde vom ZINC Server (127) oder ChemSpider Datenbank (http://cssp.chemspider.com/123) erhalten. Sofern keine mol2 Datei vorlag wurde diese über das Programm Chimera (128) erstellt. Zum Docking des Liganden an das TCTP Modell wurde das Programm Autodock 4 (129) und Autodock Vina (130) verwendet. Als Vorbereitung für das Docking wurde das TCTP Modell als auch der Ligand zunächst vorprozessiert. Dabei wurde dem TCTP Modell zunächst alle Wasserstoffatome hinzugefügt, die in der pdb Datei nicht vermerkt waren. Durch Speichern des vorprozessierten TCTP Modells als pdbgt Datei wurden dem Molekül, beziehungsweise den einzelnen Aminosäureresten Ladungen zugeordnet (Gasteiger Ladungen). Der Raum, in dem der Ligand an das Modell über das Programm angelagert wird, wurde über den Befehl "Grid Box" so festgelegt, dass das komplette Modell innerhalb der Grid Box lag. Für den Liganden wurden zunächst alle rotierbaren Bindungen innerhalb des Moleküls festgelegt. Dabei wurden alle Bindungen bis auf die Amidbindung als aktiv rotierbar gesetzt. Um den Liganden in der angegebenen Grid Box docken zu lassen, wurde zunächst über das Programm AutoGrid eine "Karte" erstellt, in der jeder Atomtyp des Liganden, die Desolvatationsenergie und elektrostatische Eigenschaften hinterlegt sind. Für das Docking mit dem Programm AutoDock wurde, wie bei Eichhorn et al. (86) beschrieben, ein "Blindes Docking" mit dem "Lamarckian generic algorithm" angewandt. Die Einstellungen innerhalb des Algorithmus wurden so geändert, dass 100 Durchläufe und dabei 25 000 000 Evaluierungen pro Durchlauf durchgeführt wurden. Für die Autodock Vina Docking Versuche wurden stattdessen die 20 häufigsten Konformationen über 25 Iterationen in drei voneinander unabhängigen Dockingexperimenten bestimmt.

# 2.2.19 MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie

Mittels *Matrix assisted Laser desorption/ionisation time of flight* Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) wurde zum einen über den *Peptide Mass Fingerprint* versucht einzelne Proteine zu identifizieren, die während der Interaktionspartnersuche auftraten oder zur Identifizierung der zu überexprimierten Proteine aus *E.coli* verwendet. Außerdem wurde dieser Ansatz gewählt um die genauen Fragmente während der limitierten Proteolyse zu bestimmen. Hierfür wurden die Proben zunächst über einen in-Gel Verdau mit Trypsin präpariert, bevor die entstandenen Peptide auf eine Stahl *Target* Platte oder *AnchorChip Target* Platte zusammen mit der Matrix aufgetragen wurden. Der In-Gel Verdau wurde hierbei nach Walz *et al.* (131) modifiziert durchgeführt. Des Weiteren wurde die MALDI-TOF Massenspektrometrie angewandt um die Sauberkeit und die exakte Größe von Proteinen zu bestimmen, die zuvor aufgereinigt wurden.

# 2.2.19.1 Peptide Mass Fingerprint

Für den Peptide Mass Fingerprint als auch die Analyse von Fragmenten nach der limitierten Proteolyse wurde nach dem in-Gel Verdau 1 µl der Probe auf einen AnchorChip 600/384 oder GroundSteel Target aufgetragen und 1:1 mit 0.1%-iger TFA Lösung gemischt. Die Proben wurden bei Raumtemperatur getrocknet und mit 1 µl gesättigter HCCA Matrix (30 % Acetonitril, 70 % H<sub>2</sub>O mit 0.1 % TFA) überschichtet. Die Proben wurden erneut möglichst abgedunkelt, getrocknet und anschließend am MALDI-TOF Massenspektrometer (Ultraflex III, Bruker) im Reflektronmodus analysiert. Hierzu wurde ein m/z Detektionsbereich von 600 bis 4000 Da eingestellt und das Gerät mit einem Peptide Calibration Kit kalibriert. Die Proben wurden mit einer Laserleistung von 20 % ionisiert und mindestens 1000 Schuss gesammelt. Über das Programm mMass (132) wurde im Anschluss das zuvor erhaltene Spektrum ausgewertet. Für die Auswertung wurden Signale, die durch Kontaminationen, wie Keratin oder HCCA Matrix, als auch Trypsin Fragmente nicht berücksichtigt. Außerdem wurden Signale, die einen m/z Wertunterschied von 22 Da aufwiesen, ebenfalls nicht berücksichtigt, da diese Signale Protein-Natrium Addukte [M+Na] charakterisieren. Die so erhaltene Signalliste wurde über den MASCOT Server gegen die nichtredundante NCBI Datenbank mit folgenden Einstellungen abgeglichen (133). Als variable Modifikation wurde die Oxidation des Methionins angegeben. Außerdem wurde eine Peptidtoleranz von 0.3 Da festgelegt und die Spezies auf Viridiplantae beschränkt. Als erfolgreich identifiziert galten nur Proteine die einen MASCOT Score von über 78 aufwiesen, sowie eine Sequenzabdeckung von mindestens 25 %. Für besonders kleine Proteine (<20 kDa) mussten außerdem mindestens 5 Peptide eindeutig zugeordnet werden können. Sofern eine eindeutige Zuordnung und Identifizierung nicht möglich war, wurde eine Peptidsequenzierung über Fragmentierung mittels MS/MS Massenspektrometrie durchgeführt.

# 2.2.19.2 MS/MS Ion Search

Die zu bestimmenden Peptide wurden zunächst als *Parent Ion* festgelegt und mit 60 % Laserintensität ionisiert. Die Fragmentierung wurde im Anschluss nicht durch einen *collision induced decay* (CID) erreicht, sondern durch Steigerung der Laserintensität auf 90 %. Mindestens 1000 Schüsse wurden gesammelt und erneut über das Programm mMass ausgewertet. Dazu wurden die Signale annotiert und die erhaltene Signalliste über den MASCOT *MS/MS Ion Search* Server gegen die nichtredundante NCBI Datenbank abgeglichen. Dazu wurden folgende Einstellungen gewählt. Es wurde eine *Precursor* und MS/MS Toleranz von 0.3 Da und die Spezies auf *Viridiplantae* beschränkt. Ein Peptid galt als korrekt identifiziert sofern der MASCOT *Score* signifikant war (p < 0.05).

# 2.2.19.3 Proteingrößenbestimmung im linearen Messmodus.

Zur Bestimmung der genauen Molekulargewichte der ganzen unverdauten Proteine wurde 1 µl der Proteinprobe zunächst 1:10 mit 0.1 % TFA verdünnt. 1 µl der verdünnten Probe wurde auf ein *Polished Steel Target* aufgetragen und mit 1 µl gesättigter SA Matrix gemischt (50 % Acetonitril, 50 % H<sub>2</sub>O mit 0.1 % TFA). Die aufgetragenen Tropfen wurden abgedunkelt unter einem Abzug getrocknet. Die Proben wurden im linearen Messmodus zwischen m/z Werten von 10000 und 60000 mit einer Laserleistung von 50 % gemessen. Als Proteinstandards zur Kalibrierung dienten Lysozym, BSA und Chymotrypsinogen.

# **3** Ergebnisse und Diskussion

# 3.1 Das phloemmobile uncharakterisierte Protein At1g64370 ist ein hochgradig ungeordnetes Protein und besitzt Dehydrin-ähnliche Eigenschaften

Im Gegensatz zum TCTP, sowie *Knotted-1* ist das At1g64370 weitestgehend unbekannt. Erstmals konnte das Protein im Phloem durch Giavalisco *et al.* in Phloemproteomstudien in *Brassica napus* Pflanzen nachgewiesen werden (48). Die Existenz des Gens ist nicht nur auf Raps beschränkt, sondern ist auch in weiteren *Brassicaceae* wie *Arabidopsis thaliana* und *Arabidopsis lyrata* zu finden. Weitere Datenbankstudien bezüglich der Existenz der homologen At1g64370 mRNA in anderen Organismen wurden durch A. Ostendorp (Universität Hamburg) durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass auch in nicht verwandten Pflanzen wie Mais die mRNA vom At1g64370 Protein nachweisbar war. In Studien über die Hydrophobizität/Hydrophilizität von Phloemproteinen konnte durch A. Ostendorp das At1g64370 Homolog in Raps als hydrophiles Protein identifiziert werden, welches zusätzlich stark phosphoryliert vorlag. In nachfolgenden Funktionsstudien durch A. Ostendorp konnte bereits gezeigt werden, dass das At1g64370 Eigenschaften von Hydrophilinen, genauer den Dehydrinen, besitzt, obwohl charakteristische Strukturelle Eigenschaften aufweisen, sollten diese nachfolgend untersucht werden inwiefern neben der funktionellen Ähnlichkeit auch eine strukturelle Ähnlichkeit zu den Dehydrinen bestand.

# 3.1.1 Bioinformatische Strukturvorhersagen und Sequenzeigenschaften

Ein strukturelles Merkmal der LEA Proteine und Dehydrine im Speziellen ist deren hohe Grad an Flexibilität, beziehungsweise Unordnung (134–136). Diese wird insbesondere durch das verhältnismäßig häufige Vorkommen kleiner polarer Aminosäuren wie Glycin, Serin und Alanin gefördert. Cysteine, als auch Tryptophane fehlen indes gänzlich, weswegen viele LEA Proteine und Dehydrine als Hydrophiline bezeichnet werden (136, 137). Sofern das At1g64370 zu den Hydrophilinen und LEA Proteinen im Allgemeinen gezählt werden kann, sollte sowohl diese Unordnung als auch diese spezielle Aminosäurezusammensetzung im Protein wiederauffindbar sein. Hauptsächlich Glycin als auch Serin und Glutamin lagen prädominant in der Sequenz vor, während insbesondere Cysteine und Tryptophane fehlten. Dies implizierte, wie bereits erwähnt, eine Einteilung als Glycin- und Serin-reiches Hydrophilin (Abbildung 8b). Weiterhin wurde an der Proteinsequenz ersichtlich, dass bestimmte Motive auftraten (Abbildung 8a). Der C-Terminus wurde durch eine Serin-reiche Sequenz (S) gebildet, die starke Ähnlichkeiten zu dem S-Segment der Dehydrine aufwies. Das klassische S-Segment besteht in der Regel aus einem Serin-Asparaginsäure Duplett gefolgt von fünf bis sieben Serinen. (134). Das S-Segment im At1g64370 besitzt dieses Duplett nicht. Weiterhin ist der poly-Serin Bereich durch einzelne Glycine unterbrochen. N-terminal vor dem S-Segment befindet sich eine Lysin-reiche Region (PK),

а	I	0		
	MOYYENREKDYYEVAOGORNGYGOSOSHNHEGYGOSOSRGGYGOIHNREGYNONREGYSO	Aminosäur	e	Anteil (%)
		Glyzin	G	18.0 %
	ч ч	Serin	S	11.8 %
	SQSRPVYGLSPTLNHRSHGGFLDGLFKGQNGQKGQSGLGTFLGQHKSQEAKKSQGHGKLL	Glutamin	Q	10.7 %
		Lysin	К	9.0 %
	GOHDOKKTHETNSGLNGLGMEINNGEKKHBRKSEHKKKNKDGHGSGNESGSSSGSDSD	Asparagin	N	7.9 %
		Histidin	н	6.7 %
	PK S	Glutaminsäure	E	6.2 %
~	4	Leuzin	L	5.6 %
C	ŭ	Tyrosin	Y	5.6 %
		Arginin	R	5.1 %
		Asparaginsäure	D	3.4 %
	§ 0.5	Phenylalanin	F	2.2 %
		Threonin	т	2.2 %
		Alanin	A	1.1 %
	<b>9.00</b>	Isoleuzin	L	1.1 %
	- Ferrier - Ferr	Methionin	М	1.1 %
	<b>9</b> 0.2 − <b>9.5</b> 9	Prolin	Ρ	1.1 %
		Valin	V	1.1 %
	< 0.1]	Cystein	С	0.0 %
		Tryptophan	W	0.0 %
	0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 Residue Number ♦ Attig64370 ■ Disodered Proteins Acaded Hydropathy ■ folded ■ unfolded ■ Ordered Proteins Charge			

Abbildung 8. In silico Strukturvorhersagen und Sequenzmotive für das At1g64370 Protein aus Arabidopsis thaliana. Die Sequenz des At1g64370 weist einige Motive auf, die bereits für Dehydrine und LEA Proteine bekannt sind (a). Drei verschiedene Motive sind in der Sequenz erkennbar: das S-Segment (S), die Lysin-reiche Sequenz (PK), sowie die Glutamin-reiche Region (Q). Aufgrund des hohen Anteils an Glyzin und Serin kann das Protein als Hydrophilin klassifiziert werden (b). Der *Charge/Hydropathy Plot* zeigt als erste Übersicht, dass im Vergleich zu anderen ungefalteten, sowie gefalteten Proteinen das At1g64370 in die Gruppe der intrinsisch ungeordneten Proteine eingeordnet werden kann (grüner Punkt) (c). Eine genauere Analyse über ungefaltete Regionen im Protein über *FoldIndex* (d) bestätigte die Annahme, dass ein komplett ungefaltetes Protein vorlag und nicht durch gefaltete Bereiche oder Domänen unterbrochen wurde.

welche ebenfalls häufig in Dehydrinen zu finden ist. Typisch für diese K-reiche Region ist eine azide Aminosäure (hier Glutaminsäure, E) gefolgt von mehreren basischen Aminosäureresten wie Lysine und Arginine. Dieses Motiv ähnelt neben dem Dehydrin-spezifischen K-Segment auch nukleären Lokalisierungssequenzen (NLS). Des Weiteren ist für dieses Motiv in Dehydrinen eine DNA-bindende Eigenschaft sowie Chaperon-Aktivität postuliert worden (138–140). Weitere Dehydrincharakteristische Motive fehlten jedoch, wie das Y-Segment, eine Tyrosin-reiche Region, gefolgt vom Aminosäuretriplett GNP oder das K-Segment mit dem konservierten KIKE Motiv, weswegen das At1g64370 nicht eindeutig in die Dehydrin-Klasse eingeordnet werden konnte (134). Jedoch fielen im N-terminalen Bereich des Proteins repetitive Sequenzen vom Muster Q(G/S)Q und GY(G/S) auf (Q) auf. Diese Abfolge wiederholte sich segmentweise am N-Terminus, wurde aber für Dehydrine bisher noch nicht beschrieben.

Zumeist sind strukturelle Charakterisierungen der LEA Proteine mit Hilfe bioinformatischer Analysen durchgeführt worden. Experimentell konnte bislang hauptsächlich über Circulardichroismus Versuche ein Einblick in die Sekundärstruktur der LEA Proteine und Dehydrine unter verschiedenen Bedingungen gewonnen werden (135, 138). Da bislang das At1g64370 Protein und dessen Homologe nicht näher strukturell charakterisiert wurden, konnten mögliche Proteinkonstrukte für strukturelle Analysen über den SAS Server nicht ermittelt werden. Über den *Protein Crystallization Construct Designer* (Protein CCD, (94)) wurde daraufhin versucht die Sekundärstrukturen und Bereiche hoher Ordnung zu ermitteln. Der Protein CCD diente hierbei als Schnittstelle mehrerer bioinformatischer Vorhersagen zur

Berechnung der Sekundärstruktur, Domänenverteilung und Flexibilität von Proteinen und veranschaulicht die Ergebnisse mehrerer Server in einem Bild.

Hierbei zeigte sich, dass das At1g64370 offensichtlich nahezu komplett ungeordnet zu sein schien. Eine nähere Untersuchung mit Vorhersagen optimiert für intrinsisch ungeordnete Proteine bestätigte die Vermutung, dass das At1g64370 zu dieser Gruppe von Proteinen gehört (Abbildung 8c). Die Klassifizierung unter Zuhilfenahme eines *Charge/Hydropathy Plots* erlaubte es, anhand vorher festgelegter Proteinsets, spezifisch für gefaltete und ungefaltete Proteine, eine genaue Vorhersage über den Faltungszustand des zu untersuchenden Proteins zu erstellen. Zur Evaluierung wurden die zuvor berechnete Nettoladung als auch die Kyte-Doolittle Hydrophobizität des Proteins zueinander in Korrelation gesetzt und anhand der bekannten Proteinsets verglichen (13). Der Plot gab jedoch keine Aussage darüber, ob geordnete Bereiche im Protein vorlagen, die eventuell für Kristallisationszwecke verwendet werden konnten.

Um diese Regionen bestimmen zu können, wurde über das Programm *FoldIndex* eine genauere Vorhersage der Verteilung der Unordnung im Protein durchgeführt (Abbildung 8d). Dabei zeigte sich, dass das At1g64370 nicht nur zur Gruppe der ungefalteten Proteine gehört, sondern gänzlich ungeordnet vorzuliegen schien. Über den kompletten Sequenzbereich des Proteins konnte mit unterschiedlichen Programmen und hoher Wahrscheinlichkeit kein geordneter Bereich vorhergesagt werden. Diese Erkenntnis implizierte, dass zum einen etwaige Kristallisationsexperimente mit diesem Protein nahezu ausgeschlossen waren und zum anderen, dass die bioinformatischen Voraussagen das Protein ebenso als ungefaltet charakterisierten, wie es für Dehydrine und LEA Proteine im Allgemeinen angenommen wird (134, 135, 138). So deutete sich bereits an, dass die strukturelle Analyse des Proteins in diesem Fall nur über Kleinwinkel-Röntgenbeugungsexperimente (*Small-angle X-Ray Scattering*, SAXS), bei denen die wahrscheinlichsten Konformationen in Lösung bestimmt werden, durchgeführt werden konnte.

# 3.1.2 Größenbestimmung des rekombinanten At1g64370 über Gelfiltrations- und Dynamic Light Scattering Experimente

Während der heterologen Herstellung von Proteinen sind insbesondere ungeordnete Bereiche innerhalb von Proteinen häufig ein Ziel von verschiedenen *E. coli* Proteasen. Dies führte zum einen dazu, dass ein Großteil des hergestellten Proteins *in vivo* degradiert wurde. Zum anderen verlangte die Unordnung des At1g64370 Proteins ein sehr rasches Isolieren des nicht degradierten Proteins. Bereits während der ersten Nickelaffinitätschromatographie wurde deutlich, dass in etwa die Hälfte des hergestellten und löslichen Proteins bereits degradiert war (Abbildung 9a). Insbesondere C- und N-terminal verkürzte Proteinfragmente wurden im Durchfluss als auch in den ersten Elutionsfraktionen sichtbar.



Abbildung 9. At1g64370 Proteinisolierung aus E. coli über eine Affinitätschromatographie- und Gelfiltrationssäule. Aufgrund fehlender Proteinfaltungen innerhalb des Proteins wurde das Protein bereits nach kürzester Zeit stark proteolytisch degradiert und konnte nur teilweise von nicht-proteolytisch prozessiertem At1g64370 über eine Nickelaffinitätschromatographie getrennt werden (a). Nach Entfernen des 6xHistidin-Tags konnte das Protein selektiv an mit unterschiedlichen Metallionen beladene NTA-Matrix immobilisiert werden und erst durch hohe Imidazolkonzentrationen oder EDTA von der Zink- und Nickelsäule eluiert werden. Durch Magnesium konnte diese Immobilisierung des Proteins an die Matrix nicht erreicht werden, ebenso wie an einer zuvor mit EDTA behandelten Matrix (b). Die Auftrennung nach dem Molekulargewicht über eine Größenausschlusschromatographie zeigte ein elongiertes aber monomeres Protein (c und d). Zur Größenabschätzung wurde die Säule zuvor mit BSA (66 kDa), Chymotrypsinogen (Chy, 27 kDa) und Myoglobin (Myo, 17 kDa) kalibriert. DF: Durchfluss, W: Waschfraktionen 1 -3, E: Elutionsfraktionen.

Auch unter Einsatz von verschiedenen Proteaseinhibitoren wie dem Serinprotease-spezifischen Inhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und dem *Protease Inhibitor Cocktail* (Roche), der bis auf Metalloproteasen alle gängigen Proteaseklassen zu 99 % inhibieren kann, kam es zu starken Degradationserscheinungen infolge restlicher Proteaseaktivitäten.

Die Elution des Proteins erfolgte ab einer Imidazolkonzentration von über 300 mM. Üblicherweise eluieren 6-fach Histidin-*getaggte* Proteine bei 120 bis 150 mM Imidazol. Infolgedessen konnte vermutet werden, dass das At1g64370 Protein entweder als stabiles Oligomer vorlag, wodurch die Konzentration von Imidazol erhöht werden musste um das Protein zu eluieren oder aber, dass das Protein selbst ein Binder zweiwertiger Metallionen ist und dadurch zusätzlich zum *HisTag* noch spezifisch an das immobilisierte Nickel gebunden hatte.

Ob die Oligomerisierung Ursache für das verspätete Eluieren war, konnte durch Entfernen des *HisTags* überprüft werden. Mit Hilfe von Thrombin wurde über Nacht bei 4 °C der *HisTag* an der nach ihm Cterminal folgenden und für die Thrombinprotease spezifischen Sequenz LVPRGS zwischen dem Arginin und dem Glycin geschnitten. Nach Verdau des *HisTags* wurde das nun *ungetaggte* Protein erneut über die Nickelaffinitätschromatographiesäule gegeben. Sofern der *HisTag* die einzige Möglichkeit darstellte an die Matrix zu binden, sollte das Protein im Durchfluss wiederzufinden sein. Jedoch zeigte sich erneut, dass das At1g64370 erst ab etwa 100 mM Imidazol von der Säule eluierbar war. Somit konnte eine etwaige Oligomerisierung und eine damit einhergehende Verstärkung der Bindung an die Nickelmatrix über mehrere *HisTags* ausgeschlossen werden. Die Vermutung, dass das At1g64370 selbst zweiwertige Ionen binden kann, konnte allerdings hierdurch nicht gänzlich bestätigt werden.

Dass das At1g64370 möglicherweise divalente Ionen binden konnte, ist potentiell durch dessen Eigenschaft RNAs zu binden, wie durch A. Ostendorp gezeigt, zu erklären. So ist beispielsweise Magnesium in der Nukleotid- und Nukleinsäurebindung durch Proteine häufig wiederzufinden, da dieses Ion die Nukleinsäurebindung am Protein über dessen Ladung koordinieren kann.

Ebenso ist Zink bekannt Protein:Nukleinsäure Interaktionen zu ermöglichen. Über die Bildung sogenannter Zinkfinger-Motive können Proteine spezifisch Nukleinsäuren erkennen. Abbildung 9b zeigt die beobachtete Selektivität des At1g64370 Proteins zu bestimmten Metallionen, wobei in erster Linie Metallionen gewählt wurden, die bei der Bindung von Nukleinsäuren und der hier durchgeführten Proteinaufreinigung eine Rolle spielen. Nach dem Beladen der NTA Matrix mit jeweils Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> und Ni<sup>2+</sup> Ionen und dem Binden des *ungetaggten* At1g64370 Proteins an die Matrix konnte das Protein nach mehreren Waschschritten mit 1 M NaCl nur noch in der Zink- und der Nickelprobe im Eluat nachgewiesen werden, was für eine selektive Bindung des Proteins an diese Ionen sprechen könnte.

Nickel und Zink, ebenso wie Kupfer und Kobalt Ionen werden häufig über Histidine koordiniert, weswegen diese Ionen auch zur Affinitätschromatographie von 6xHis-*getaggten* Protein eingesetzt werden können. Dabei wird je ein divalentes Metallion durch zwei Histidinreste koordiniert. Im Falle des At1g64370 sind über den gesamten Sequenzbereich keine zwei aufeinanderfolgende Histidine vorhanden, was offensichtlich im Widerspruch zu der beobachteten Selektivität steht.

Hara *et al.* konnten für das Kupfer bindende Dehydrin CuCOR15 aus *Citrus unshiu* als auch für das HIRD11 Dehydrin aus *A. thaliana* die gleiche Selektivität für Ionen (Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> und Zn<sup>2+</sup>) detektieren (140, 141). Das Binden dieser divalenten Ionen wird vermutet, dient dem Schutz vor der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die durch diese Metallionen in ungebundener Form in Lösung induziert werden können (142). Ebenfalls ist durch Binden divalenter Metallionen eine Nukleinsäure Interaktion für das CuCOR15 Protein beschreiben (143). Die gefundenen Metallbindeepitope enthielten allesamt histidinreiche Sequenzen, wobei häufig Sequenzen mit zwei aufeinanderfolgenden Histidinen die besten Metallbindeeigenschaften, beziehungsweise den größten Schutz vor der ROS-Bildung bewirkten (140). Dass das At1g64370 ebenso die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies über die Bindung divalenter Ionen an das Protein inhibieren kann, konnte durch A. Ostendorp gezeigt werden. Die Oxidation von NADH zu NAD<sup>+</sup> kann durch Zugabe von Kupfer als Katalysator mit Hilfe von Wasserstoffperoxid induziert werden. Sofern jedoch das At1g64370 hinzugegeben wurde, konnte diese Oxidation unterbunden werden, indem das Kupfer durch das Protein gebunden wurde. Ob das *ungetaggte* Protein diese Ionenbindung als Monomer oder als Oligomer vollzieht, konnte allerdings über diesen Versuch nicht bestimmt werden. Zur Entfernung noch

vorhandener Kontaminationen durch bakterielle Proteine und zur genauen Größenabschätzung des Proteins wurde nach der Nickelaffinitätschromatographie und anschließendem *Tag*-Verdau das Protein über eine Größenausschlusschromatographiesäule weiter aufgereinigt.

Um eine genaue Größenbestimmung des nativen Proteins in Lösung zu ermöglichen, wurde die Gelfiltrationssäule zunächst mit einem Proteinstandard, bestehend aus mehreren Proteinen mit unterschiedlichen Molekulargewichten, kalibriert. Dazu wurde aus den Elutionsvolumen (V<sub>el</sub>) der Proteine eine Kalibriergerade erstellt und über diese das Molekulargewicht (MW) vom At1g64370 abgeschätzt (Gleichung [5]).

$$V_{el} = 264.5 - 44.7 \log(MW)$$
<sup>[5]</sup>

So zeigte sich, dass das Protein in monomerer Form vorliegen musste (Abbldung 9c). Mit einem Molekulargewicht von etwa 20 kDa sollte das monomere Protein in etwa zusammen mit dem 17 kDa großen Myoglobin von der Säule eluieren. Ein dimeres At1g64370 hingegen wäre zwischen dem BSA (66 kDa) und dem Chymotrypsinogen (27 kDa) eluiert, beziehungsweise ein trimeres Protein zusammen mit BSA. Die genaue Größe des Proteins konnte anhand der Gleichung [5] bestimmt werden. Dabei wurde ein Molekulargewicht von etwa 27 kDa anstatt der theoretischen 20 kDa berechnet, was einem Unterschied von etwa 37 % entspricht. Diese Diskrepanz zwischen theoretischem und beobachtetem Molekulargewicht ist durch die vorliegende Konformation des Proteins erklärbar. Die eingesetzten Standardproteine haben allesamt globuläre und somit kompakte Formen. Die Form des aufzutrennenden Proteins hat einen signifikanten Einfluss auf das Migrationsverhalten innerhalb der Gelfiltrationssäule (144). Proteine, die über eine Größenausschlusschromatographie aufgetrennt werden, migrieren abhängig von ihren Friktionskoeffizienten (*f*). Dieser ist abhängig von der Viskosität ( $\eta$ ) des eingesetzten Puffers, sowie vom Stokes-Radius (R<sub>s</sub>) des Proteins (Gleichung [6]).

$$f = 6\pi\eta R_{\rm s}$$
 [6]

Der Stokes-Radius ist wiederum definiert als der Radius einer idealen Kugel, im Falle der aufzutrennenden Proteine der hydrodynamische Radius ( $R_h$ ) (145). Dieser ist abhängig von der Größe und Form des Proteins.

Die als Größenstandards eingesetzten Proteine besitzen allesamt globuläre Formen und sind somit als nahezu ideale Sphären anzusehen, wodurch der Stokes-Radius über den kleinsten Radius definiert wird. Der Stokes-Radius von elongierten Proteinen mit gleichem Molekulargewicht wird hingegen definiert durch den größten im Protein vorkommenden Radius, der f am besten beschreibt. Dieser ist abhängig von der Proteinasymmetrie und der Hydrathülle des Proteins (145). Somit können ellipsoide Proteine wesentlich größer erscheinen und folglich von der Säule früher eluieren, als gleichgroße sphärische Partikel. Dies kann unter Umständen die Bestimmung der genauen Größe und des



Abbildung 10. MALDI-TOF Massenspektrum vom aufgereinigten At1g643710 zur genauen Größenbestimmung und Abschätzung der Reinheit. Die theoretischen und gemessenen Massen wichen um 16 Da ab, was innerhalb des zu erwartenden Messfehlers von 0.1 % (ca. 20 Da) für den linearen Messbereich lag. Dies deutete darauf hin, dass keine etwaigen posttranslationalen Modifizierungen oder Aminosäureaustausche durch E. coli durchgeführt wurden.

Oligomerisierungsgrades beeinflussen, sofern beispielsweise das Elutionsvolumen für ein monomeres elongiertes Protein dem gleichen entspricht, wie einem dimeren globulären Protein.

Als weitere Auffälligkeit im Chromatogramm ist die asymmetrische Form des Proteinpeaks I (Abbildung 9c) zu beobachten. Dieses als "*peak tailing*" genannte Phänomen kann auftreten, wenn ionische Interaktionen zwischen dem Protein und der stationären Phase auftreten und kann zu aberranten Retentionsvolumen bis hin zu Änderungen der dreidimensionalen Struktur führen (146–148). Sofern es sich beim At1g64370 um ein hoch flexibles Protein handelt, könnten somit durch die stationäre Phase innerhalb des Proteins elongiertere Konformationen induziert und kompaktere unterdrückt worden sein, die sonst in Lösung vorgeherrscht hätten. So wurde über die Gelfiltration im Vergleich zum theoretischen Molekulargewicht eine größere monomere Form ermittelt. Diese Vergrößerung könnte auch durch posttranslationale Modifizierungen oder einzelnen Aminosäureaustauschen resultieren, die in gewisser Form auch durch *E. coli* durchgeführt werden können (149). Insbesondere hinsichtlich möglicher funktioneller als auch struktureller Eigenschaften können diese Arten von Modifizierungen signifikant sein, da sie die Konformation als auch den Oligomerisierungszustand beeinflussen können. Eine abschließende Qualitätskontrolle und Größenbestimmung des aufgereinigten Proteins in dessen

denaturierter Form wurde mittels der MALDI-TOF Massenspektrometrie erreicht, die aufgrund ihrer Sensitivität selbst kleinste Spuren von Verunreinigungen in der Proteinprobe detektieren kann (Abbildung 10). Die massenspektrometrische Untersuchung des Proteins zeigte indes, dass die theoretische Masse und die gemessene Masse nur um 16 Da abwichen. Die typische Massenabweichung eines MALDI-TOF Massenspektrometers im linearen Messmodus beträgt etwa 0.1 % (150). Im Falle von Proteinen der Größe vom At1g64370 entsprach diese Abweichung etwa 20 Da. Die ermittelte Diskrepanz lag somit innerhalb des zu erwartenden Fehlers und etwaige mögliche Modifizierungen des Proteins konnten ausgeschlossen werden. Die abweichende Größe während der Gelfiltration konnte demnach nicht auf ein modifiziertes Protein zurückgeführt werden.



Abbildung 11. DLS Messung mit aufgereinigtem At1g64370 Protein. Das Protein wurde zunächst für 30 min bei 4 °C abzentrifugiert um Staub und größere Aggregate aus der Lösung zu entfernen. Im Anschluss wurde über 6 min die Streuung der Proteinprobe gemessen. Hierbei zeigte sich, dass das At1g64370 monodispers in der Lösung, das heißt in nur einer Form vorliegend, vorlag (a). Diese Monodispersität hat sich auch im Verlauf der 6-minütigen Messung nicht verändert. Der ermittelte hydrodynamische Radius von  $4 \pm 0.6$  nm ist äquivalent zu einem theoretischen Molekulargewicht von etwa 75 kDa, was einer mindestens trimeren Form des Proteins entspräche (b).

Somit lässt sich abschließend aus dem Gelfiltrationsexperiment sagen, dass die beobachtete größere Molekülmasse von 27 kDa dadurch erklärbar war, dass das At1g64370 nicht in kompakter Form, sondern monomer und elongiert in Lösung vorliegen musste.

Da die Stabilität des Proteins, beziehungsweise dessen Aggregationstendenz über einen längeren Zeitraum über die Gelfiltration nicht bestimmt werden konnte, wurde die Änderung der Molekülgröße in Lösung und damit einhergehend die Änderung des hydrodynamischen Stokes-Radius über die dynamische Lichtstreuung (*Dynamic Light Scattering*, DLS) bestimmt. Innerhalb der Messzeit von 6 Minuten zeigte sich keine Veränderung des hydrodynamischen Radius (Abbildung 11a). Weiterhin konnte nur ein primäres Signal bei etwa 4 nm detektiert werden (Abbildung 11b).

Folglich wurde die Probe als monodispers und stabil angesehen und stand für weitere Messungen zur strukturellen Aufklärung zur Verfügung. Damit keine störenden Einflüsse während der Messung etwa durch Staubpartikel auftraten, wurde die Probe zuvor abzentrifugiert. Ebenso wie bei der Gelfiltration ist auch hier die ermittelte Molekülmasse größer als die theoretische. Jedoch wurde über die DLS Messung eine Masse von etwa 75 kDa ermittelt, was einem trimeren anstatt einem monomeren Protein entspräche. Die Berechnung der Molekülmasse über DLS ist ebenso, wie mit Hilfe der Gelfiltration, abhängig vom Stokes-Radius der Moleküle und ist idealisiert für sphärische Partikel. Die dynamische Lichtstreuung ist insbesondere für große Partikel sehr empfindlich, da die Streuintensität nach der Rayleigh-Streuung mit der sechsten Potenz vom Partikeldurchmesser korreliert. Folglich streut ein Partikel mit einem Durchmesser von 10 nm eine Million Mal stärker als ein Partikel mit 1 nm Durchmesser. Dieser starke Streuunterschied würde eine Detektion kleinerer Partikel bei Anwesenheit größer Aggregate oder Staubpartikel unmöglich machen. Aus Abbildung 18 wird ersichtlich, dass keine Partikel größer als 4 nm in der Lösung vorlagen. Kleinere Partikel, resultierend von zum Beispiel Proteinfragmenten kleiner als das At1g64370, können allerdings nicht mit absoluter Gewissheit ausgeschlossen werden, da wie bereits erwähnt, das At1g64370 selbst zu stark streut um kleinere

Partikel sicher detektieren zu können. Aufgrund der schmalen *Peak*form scheint außerdem eine erhöhte strukturelle Monodispersität des Proteins vorzuliegen. Starke Variabilität in den Faltungszuständen, beispielhaft eine wechselnde elongierte und globuläre Konformation, führt ebenfalls zur Änderung des theoretischen hydrodynamischen Radius. Folglich wird das eigentliche Proteinsignal in diesem Fall verbreitert. Wenn nur eine elongierte Form oder nur eine globuläre Form vorliegt, ist ein bestimmter hydrodynamischer Radius definierbar und somit auch die Signalbreite verringert.

Anhand der bekannten Stokes-Radien der genutzten Kalibrierproteine während der Gelfiltration konnte ein hydrodynamischer Radius des untersuchten Proteins von etwa 2.3 nm bestimmt werden. Dieser ist signifikant kleiner als durch DLS ermittelt (4 nm). Typischerweise sind ermittelte Radii aus Gelfiltrations- und DLS-Experimenten mit einem maximalen Fehler von 10 % sehr gut miteinander vergleichbar. Wie bereits erwähnt, können durch Protein-Matrix Interaktionen Änderungen der Konformation während der Gelfiltration induziert werden (147, 148). Da im Gegensatz zur Gelfiltration der R<sub>s</sub> bei DLS-Messungen in Lösung bestimmt wird, konnte der hier ermittelte Wert von 4 nm als wahrscheinlicher angenommen werden. Jedoch konnte über die DLS Messung keine Aussage zum Oligomerisierungszustand gemacht werden, da nicht von einem sphärischen Partikel ausgegangen werden konnte. Eine abschließende Aussage zur Partikelform als auch Oligomerisierungszustand konnte jedoch mit Hilfe von SAXS-Experimenten gefällt werden.

# 3.1.3 Circulardichroismus-Experimente zeigen ligandenabhängige Konformationsänderungen

Über Circulardichroismus-Experimente konnte ein erster Einblick in die strukturellen Eigenschaften vom At1g64370 gewonnen werden. Diese Daten unterstützten die Vermutung, die aus den bioinformatischen Vorhersagen resultierte, dass es sich bei diesem Phloemprotein um ein hochgradig unstrukturiertes Protein handeln musste. Bei den CD-Messungen lassen sich im Wesentlichen drei verschiedene Proteinformen unterscheiden. Hauptsächlich  $\alpha$ -helikale Proteine bilden charakteristische Minima bei 208 und 222 nm und ein Maximum bei 193 nm, während hauptsächlich aus  $\beta$ -Faltblättern bestehende Proteine ein Minimum bei 218 nm und ein Maximum bei 195 nm ausbilden. Jedoch unterscheiden sich beide Varianten weiterhin signifikant von ungefalteten Proteinen, welche im Wesentlichen nur ein Minimum bei etwa 195 nm aufweisen (151–153).

Gemessen wurden jeweils 5 bis 10 µM At1g64370 in 5 mM Tris-HCl pH 7.5 Puffer mit 50 mM NaCl. NaF wurde in einer primären Messung verwendet, da dieses Salz am geeignetsten für CD-Messungen gilt (106). Jedoch konnte zwischen NaCl und NaF in diesem Konzentrationsbereich kein Unterschied detektiert werden, weswegen das für Standardpuffer übliche NaCl für alle weiteren Messungen genutzt wurde. Der üblicherweise für CD-Messungen verwendete Phosphat-Puffer wurde vermieden, da nach Zugabe divalenter Metallionen diese mit dem Phosphat unlösliche Salze bilden und nicht an das Protein binden würden. Um den durch den Puffer bewirkten Hintergrund von der Proteinprobe abzuziehen wurde jeder Puffer einzeln gemessen und später von der Proteinprobe subtrahiert.

Das At1g64370 ohne weitere Additive zeigte bei den Messungen einhergehend mit den bioinformatischen Vorberechnungen, dass dieses Protein hauptsächlich ungefaltet vorlag. Die besten Vorhersagen konnten mit der CONTIN-LL Methode erzielt werden (109). Der allgemeine Fehler dieser Berechnungen (NRMSD) lag bei einem Wert von unter 0.1. Voraussagen mit einem Fehler von unter 0.25 können dabei als korrekt angesehen werden. Somit lag nahezu das gesamte Protein ungefaltet vor und nur ein geringer  $\alpha$ -helikaler Anteil schien noch vorzuherrschen (< 10 %).

Inwiefern dieser prozentuale Anteil an geordneten Bereichen variiert, konnte mittels CD-Messungen nicht eindeutig geklärt werden. Durch Verwenden verschiedener Proteinsets können die berechneten Sekundärstrukturanteile teilweise stark variieren. Um diesen Fehler zu minimieren wurden alle Daten entsprechend mit den SELCON, CONTIN-LL und K2D Referenzsets ausgewertet. Dabei waren die ermittelten Fehler bei der CONTIN-LL Referenz zum einen am kleinsten (< 0.1) und zum anderen nahezu gleichbleibend in allen Datenreihen. Trotzdem könnte die bestimmte Sekundärstrukturverteilung unter Umständen fehlerhaft sein, da alle Referenzsets hauptsächlich globuläre Proteine als Referenzspektren enthalten und nur vereinzelt Daten von ungefalteten Proteinen hinzugefügt werden (154). Somit können die beobachteten von 5 bis 9 % schwankenden Werte für a-helikale Strukturbereiche insgesamt als gleichbleibend betrachtet werden. Divalente als auch trivalente Ionen (Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>) wurden bereits während der Aufreinigung als mögliche Liganden des At1g64370 Proteins vermutet (Abbildung 13b). Alle Ionen wurden im 1:5 Überschuss zum At1g64370 hinzugegeben. Mg<sup>2+</sup> und Fe<sup>3+</sup> als Nichtbinder führten zu keiner Änderung der Konformation, ebenso wie Ni<sup>2+</sup> als bindendes Ion (Abbildung 13b und c, Tabelle 11). Allerdings zeigte sich bei Zn<sup>2+</sup> eine signifikante Veränderung der Konformation durch Bildung neuer  $\beta$ -Faltblattstrukturen ohne den  $\alpha$ helikalen Anteil zu reduzieren (Tabelle 11) Warum Zink als bindendes Ion im Gegensatz zu Nickel eine Konformationsänderung induzierte, bleibt spekulativ. Versuche die Affinität des Proteins mit den Metallionen über MicroScale Thermophorese Messungen zu bestimmen zeigten jedoch, dass bereits Protein-zu-Zink-Verhältnisse ab 1:5 zu einem Aggregieren und Ausfällen des Proteins führten, während Nickel und andere Ionen dieses erst bei wesentlich höheren Ionenverhältnissen (1:15) induzierten. Diese Beobachtung ließ vermuten, dass das At1g64370 zum einen bestimmte Metallionen binden kann und zum anderen diese mit unterschiedlicher Affinität bindet. Durch Binden dieser Ionen werden diese aus der Lösung chelatiert und führen als Komplex zur Aggregation und Präzipitation des Proteins.

Die gleiche Beobachtung konnte, wie bereits erwähnt, für das Dehydrin HIRD11 aus *Arabidopsis thaliana* gemacht werden (141). Durch insbesondere Histidin-reiche Regionen im HIRD11 Protein mit je zwei aufeinanderfolgenden Histidinen konnten die stärksten Ionenbindungen beobachtet werden, während einzelne Histidine hingegen nur schwache Bindungen zeigten. Im Vergleich zum HIRD11 besitzt das At1g64370 selbst keine zwei aufeinanderfolgende Histidine, weswegen die Bindung wahrscheinlich entweder über die Kombination eines einzelnen Histidins mit einer anderen Aminosäure ermöglicht wird oder aber, dass zwei räumlich entfernte Histidine entweder intra- oder intermolekular die Ionenbindung erlauben.

Additiv	α-helikal	β-Faltblatt	Random
At1g64370 <sub>Phos</sub>	5 %	0 %	95 %
At1g64370	5 %	0 %	95 %
+ SDS			
0.5 mM	21 %	11 %	68 %
5 mM	38 %	6 %	56 %
10 mM	44 %	12 %	44 %
+ 0.1 % Tween-20	5 %	0 %	95 %
+ 5 µM tRNA	6 %	0 %	94 %
+ 50 μM Fe <sup>3+</sup>	9 %	0 %	91 %
$+ 50 \ \mu M \ Mg^{2+}$	7 %	0 %	93 %
+ 50 μM Ni <sup>2+</sup>	5 %	0 %	95 %
+ 50 μM Zn <sup>2+</sup>	7 %	7 %	86 %

Tabelle 11. Berechnung der Sekundärstruktur über Circulardichroismus-Experimente. Über die Zugabe verschiedener Additive, wie Ionen, Detergenzien als auch tRNA wurde untersucht, inwiefern das Binden dieser eine Änderung der Sekundärstrukturverhältnisse innerhalb des Proteins bewirkt.

Weiterhin konnte beim HIRD11 nach Zugabe von Kupfer und weiteren bindenden Ionen, wie Zink, Kobalt und Nickel ebenfalls eine Abschwächung des CD-Signals bei unter 200 nm beobachtet werden, ebenso wie ein struktureller Gewinn an  $\beta$ -Faltblatt, während bei nicht-bindenden Ionen wie Magnesium und Kalzium dies nicht zu beobachten war. Diese Beobachtung wurde dadurch erklärt, dass das atHIRD11 durch Binden von Kupfer selbst assoziiert ohne dabei zu aggregieren, so wie für das At1g64370 vermutet wird. Dass keine Aggregation vorlag wurde dabei über die nicht sichtbare Turbidizität der Probe nach Zugabe von Kupfer erklärt. Außerdem konnte keine Signalabschwächung bei 222 nm in den CD Spektren detektiert werden, was laut Hara *et al.* auf  $\alpha$ -helikale Aggregation zurückzuführen sei (141, 155). Als letzter Punkt wurde das fehlende Signal im 1-Anilino-8naphtalensulfonat (1,8-ANS)-Test als Beweis gegen eine Proteinaggregation des HIRD11 angebracht: So könnte das HIRD11 in seiner nativen Form kein 1,8-ANS binden, würde es allerdings aggregieren, so kann 1,8-ANS binden und es wäre ein Signal bei 470 nm detektierbar Da dieses Signal nicht gemessen werden konnte, wurde vermutet, dass das 1,8-ANS nicht binden kann und es sich somit nicht um Proteinaggregate handelt (141, 156).

Jedoch sind die aufgeführten Erklärungen gegen eine Metall-induzierte Proteinaggregation nicht vollends überzeugend. Die Turbidizität, die Hara *et al.* als Maß für die Proteinaggregation anführt, konnte für das At1g64370 beobachtet werden. Allerdings war diese Trübung erst sichtbar sobald eine ausreichende Proteinkonzentration ab etwa 50  $\mu$ M und höher vorlag. Die einzusetzende Menge von etwa 5 bis 10  $\mu$ M Protein während der CD-Messungen machen jedoch eine makroskopische Aussage über den Trübungsgrad der Probe nahezu unmöglich.



GSMQYYENRE KDYYEVAQGQ RNGYGQSQSH NHEGYGQSQS RGGYGQIHNR EGYNQNREGY SQSQSRPVYG LSPTLNHRSH GGFLDGLFKG ONGQKGQSGL GTFLGQHKSQ EAKKSQGHGK LLGQHDQKKT HETNSGLNGL GMFINNGEKK HRRKSEHKKK NKDGHGSGNE SGSSSGSDSD GSMQYYENRE KDYYEVAQGQ RNGYGQSQSH NHEGYGQSQS RGGYGQIHNR EGYNQNREGY SQSQSRPVYG LSPTLNHRSH GGFLDGLFKG QNGQKGQSGL GTFLGQHKSQ EAKKSQGHGK LLGQHDQKKT HETNSGLNGL GMFINNGEKK

HRRKSEHKKK NKDGHGSGNE SGSSSGSDSD

Abbildung 12. DEPC-Modifizierung vom At1g64370 im Kupfer-gebundenen und ungebundenen Zustand. Mit Hilfe von massenspektrometrischen Analysen am unverdauten Protein, als auch dem erhaltenen Peptidspektrum nach Trypsin Verdau, konnten durchschnittlich 20 Carbethoxylierungen (CE) verteilt über die gesamte Sequenz festgestellt werden (blau hinterlegte Sequenz). Nach Zugabe von Kupfer reduzierte sich die durchschnittliche Modifizierungszahl auf etwa 4 bis 5 Carbethoxylierungen und konnte nur in einem kleinen Bereich wiedergefunden werden (orange hinterlegte Sequenz).

Weiterhin konnte nach Zugabe von Zink zwar keine Zunahme von  $\alpha$ -helikalen Bereichen beobachtet werden, jedoch ist dies, sowie die nicht vorhandene Änderung bei 222 nm kein Maß dafür, dass keine Aggregation vorlag. Ebenso wie  $\alpha$ -Helices durch Aggregation in Proteinen zunehmen können, ist bekannt, dass insbesondere amyloide, beziehungsweise ungefaltete Proteine durch Aggregation vermehrt  $\beta$ -Faltblatt-ähnliche Strukturen ausbilden können (157, 158). Diese Beobachtung indes konnte sowohl für das HIRD11 als auch das At1g64370 gemacht werden. Es kann jedoch nicht genauer über die CD-Daten geklärt werden, ob diese Aggregate amyloider Natur sind oder ob es sich nur um einen geringfügigen Sekundärstrukturgewinn handelt.

A. Ostendorp konnte in Zusammenarbeit mit der AG Kragler (MPI Potsdam-Golm) *in vivo* beobachten, dass das At1g64370 als YFP-getaggtes Fusionsprotein große Aggregate bilden kann, die betrachtet bei höherer Auflösung scheinbar elongierte, fibrillenähnliche Formen bilden. Diese Beobachtungen *in vivo* können im Einklang mit den CD-Daten *in vitro* auf eine etwaige Induktion amyloider Strukturen durch Schwermetalle, wie Zink, Kupfer und Nickel hindeuten. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass das At1g64370 in der Lage ist große, aber trotzdem noch lösliche Aggregate zu bilden.

Diese Annahme konnte durch den zusätzlich durchgeführten DEPC-Assay weiter bestätigt werden (Abbildung 12). DEPC modifiziert Proteine spezifisch an Histidinen, Tyrosinen, Serinen, Threoninen und Lysinen durch Anfügen einer Carbethoxy-Gruppe an Hydroxyl-, beziehungsweise Amin-Gruppen, sofern diese dem Solvenz exponiert vorliegen (31, 32) und erhöht dadurch das Molekulargewicht pro Modifizierung um 72 Da. Dabei kann der Grad der Carbethoxylierung Aufschluss über eine mögliche Struktur des Proteins geben. So können beispielsweise Aminosäuren in Bereichen, die den gefalteten Protein-Kern bilden, nicht modifiziert werden. Anhand des DEPC-Assays konnten zunächst die CD Experimente dahingehend validiert werden, dass nahezu die komplette Sequenz zugänglich zu sein scheint und dazu führten, dass durchschnittlich 20 Carbethoxylierung modifizierter Aminosäurereste führte jedoch zu keinem eindeutigen Ergebnis, da sich Peptide mit mehreren möglichen Modifikationsstellen überlagerten und so zu Fragmentspektren führten, die eine eindeutige

Positionszuordnung unmöglich machten. Bis auf den N-Terminus konnten die Positionen der Carbethoxylierungen nicht eindeutig identifiziert werden, jedoch wurde aus dem nach dem Trypsinverdau erhaltenen Spektrum ersichtlich, dass häufig Lysine und Histidine modifiziert wurden. Sobald jedoch Cu<sup>2+</sup>-Ionen in hohem Überschuss zu dem At1g64370 hinzugegeben wurden, änderte sich der Grad der Carbethoxylierung signifikant. Kupfer wurde ebenso wie Zink, Nickel und Kobalt vom At1g64370 gebunden und war in der Lage bei ausreichend hoher Konzentration das Protein auszufällen. Unter Gegenwart von Kupferionen konnten durchschnittlich nur noch vier Carbethoxylierungen am Protein durchgeführt werden. Diese Modifizierungen konzentrieren sich dabei auf eine kleine Region mittig in der Proteinsequenz. Dass der vormals größte Teil der Sequenz nicht mehr modifiziert werden konnte, kann auf die fortwährende Aggregation des Protein:Kupfer-Komplexes hindeuten. So schirmten Aggregationen die vormals zugänglichen Bereiche im Protein vom Solvent ab und konnten somit nicht weiter chemisch modifiziert werden. Folglich konnte dieser drastische Unterschied der möglichen Modifizierungen durch DEPC als Hinweis für das Auftreten von Aggregationen gedeutet werden.

Dieser Schluss könnte auch für das HIRD11 zutreffen, obwohl der zusätzlich als Anhaltspunkt gegen eine Aggregation angebrachte 1,8-ANS Test negativ war. Sowohl das HIRD11 als auch das At1g64370 können neben der Klassifizierung als Dehydrin oder Dehydrin-like Protein auch den Hydrophilinen zugeordnet werden, da hydrophobe Aminosäuren in den Proteinen signifikant unterrepräsentiert sind. 1,8-ANS als Marker für die Proteinfaltung führt jedoch nur zu einem Signal bei 470 nm, sofern diese Substanz in hydrophoben Bereichen oder in Vertiefungen binden kann. Ein Mangel an hydrophoben Aminosäuren, wie es beiden Proteinen der Fall ist, führt nun dazu, dass 1,8-ANS zwar bindet, jedoch nicht bei 470 nm detektiert werden kann. Auch wenn die Hydrophiline aggregieren würden, sind diese hydrophoben Bereiche weiterhin nicht existent und würden weiterhin kein Signal im 1,8-ANS-Test nach sich ziehen. Folglich ist hier von einem falsch-negativen Ergebnis auszugehen und die Frage ob Hydrophiline, hier HIRD11 und At1g64370, Proteinaggregate bilden können über diese Methode nicht klärbar. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bei einer ausreichend hohen Ionenkonzentration das gebundene Protein abzentrifugiert werden konnte und nicht in Lösung verblieb. Zusammenfassend kann diesbezüglich gesagt werden, dass obwohl das At1g64370 und das HIRD11 bis auf das S-Segment keinerlei Sequenzhomologien aufweisen, beziehungsweise keine Histidin-reiche Regionen für die selektive Ionenbindung im At1g64370 existieren, beide Proteine gewissermaßen ähnliche strukturelle Eigenschaften sowohl im Komplex mit spezifisch-bindenden Metallionen als auch ohne diese aufwiesen.

Im Gegensatz zum HIRD11 besitzt das At1g64370 allerdings einen stark basischen pI von 9.6 (pI vom HIRD11 6.7), was auf eine zusätzliche Nukleinsäurebindung hindeuten könnte. Diesbezüglich konnte bereits durch A. Ostendorp gezeigt werden, dass tRNA ein Bindungspartner vom At1g64370 ist.



Abbildung 13. Ergebnisse der Circulardichroismus-Messungen vom At1g64370 Protein. Das Protein liegt nativ gänzlich ungefaltet vor. Durch Zugabe verschiedener Additive, wie divalente und trivalente Ionen, tRNA und Detergenzien sollte die strukturelle Veränderung des Proteins untersucht werden (a-e). Zink zeigte als einziges Ion eine Abschwächung des Signals, während durch Zugabe des denaturierenden Detergens SDS eine Faltung des Proteins beobachtet werden konnte (a, d, e). Auch eine Phosphorylierung des S-Segments durch CKII zeigte keine Strukturänderung (f). Die durch SDS gewonnene Ordnung konnte auch über Temperaturen zwischen 5 bis 80 °C nicht revertiert werden, sondern blieb bestehen (g). Dazu im Vergleich wurde keine Bildung sekundärer Elemente im Protein ohne SDS über den gleichen Temperaturbereich beobachtet (h).
Zur Analyse ob die tRNA eine strukturelle Veränderung im At1g64370 bewirkt, wurde der At1g64370:tRNA-Komplex zunächst über eine Gelfiltration isoliert, um für die CD-Messungen den Einfluss ungebundener tRNA zu reduzieren.

Des Weiteren wurde tRNA im Puffer als separate Messung durchgeführt und später von den Protein-Messungen abgezogen. Hierbei konnte erneut keine Veränderung bezüglich der Konformation vom At1g64370 beobachtet werden (Abbildung 13b, Tabelle 11).

Neben Liganden kann ebenfalls eine Veränderung des Proteins selbst eine Strukturveränderung bewirken. Für einige intrinsisch ungeordnete Proteine ist ein Strukturgewinn nach vorheriger Phosphorylierung beschrieben, die aufgrund der zusätzlichen negativen Ladung elektrostatische Wechselwirkungen begünstigt und so die Strukturbildung fördert (159). Das At1g64370 konnte durch A. Ostendorp gezeigt werden, liegt nativ hochgradig phosphoryliert vor und kann durch die Casein Kinase II (CKII) insbesondere am S-Segment phosphoryliert werden. Das C-terminal phosphorylierte At1g64370 zeigt in den CD-Messungen im Vergleich zum unphosphorylierten Protein allerdings keinen Strukturgewinn (Abbildung 13f, Tabelle 11). Eine ähnliche Beobachtung konnte für zwei Dehydrine aus *Thellungiella salsuginea* gemacht werden. Obwohl eine ähnliches S-Segment in beiden Protein vorkam und dieses Segement ebenfalls über CKII phosphoryliert werden konnte, war über CD-Messungen keinerlei signifikante Änderung festgestellt worden (159).

Für einige Dehydrine ist interessanterweise bekannt nach Zugabe von SDS eine vermehrt geordnete Konformation anzunehmen (160–162). Obwohl das At1g64370 keinerlei Dehydrin-spezifische Motive aufweist, wurde ebenfalls der Einfluss von verschiedenen SDS Konzentrationen auf das At1g64370 untersucht. Nach Zugabe von SDS zwischen 0.5 bis 10 mM war ebenfalls ein signifikanter Strukturgewinn zu erkennen (Tabelle 11, Abbildung 13d), der von der vorherrschenden SDS Konzentration abhängig war. Ab einem Protein:SDS-Verhältnis von 1:50 (500 µM SDS zu 10 µM Protein) war der Anteil von ungefalteten Bereichen von abermals etwa 95 % auf 68 % gesunken. Gleichzeitig stieg der Anteil an  $\alpha$ -helikalen Bereichen und  $\beta$ -Faltblättern auf 21 % und 11 %. Insbesondere der α-helikale Anteil stieg bei weiterer Erhöhung der SDS Konzentration bis auf 10 mM (1:1000 Verhältnis) auf bis zu 44 %. Der β-Faltblatt-Anteil hingegen blieb nahezu konstant. Es wurden keine höheren SDS-Konzentrationen untersucht, da ab einer Konzentration von 10 mM die kritische Micellenkonzentration (CMC) vom SDS erreicht wurde, bei der das SDS sich in größere Detergensmicellen zusammenlagert und die CD-Messungen verfälschen würde. SDS als anionisches Tensid besitzt proteindenaturierende Eigenschaften, weswegen es für die SDS Gelelektrophorese von Proteinen eingesetzt wird. Hier jedoch schien SDS einen genau entgegengesetzten Effekt auszulösen, so dass große Mengen an SDS zu einem hochgradig gefalteten Protein führten. Der gleiche Effekt ließ sich mit Tween-20, einem nichtionischen Detergens nicht wiederholen (Abbildung 13a).

Der mutmaßliche Mechanismus wie das SDS zur erhöhten Ordnung im Protein führt, wird auf eine bestimmte Sequenz, die alle Dehydrine gemein haben, zurückgeführt. Das sogenannte K-Segment mit dem Minimalmotiv "KIKE" soll in der Lage sein nach Zugabe von SDS eine amphipathische Helix

At1g64370 BnPP99	1 1	MQYYENREKDYYEVAQGQRNGYGQSQSHNHEGYGQSQSRGGYGQIHNREGYNQNREGYS( MQYYETREKEYYDVAQGQSRQSYGQNHQGYG(			
		*****.**:**:***** *:.**.**			
At1g64370 BnPP99	61	SQSRPVYGLSPTLNHRSHGGFLDGLFKGQNGQKGQSGLGTFLGQHKSQEAKKSQGHGKLL	120		
2	33	\$25RPVIGNSPTLNIKSHGGFLDGLFKGKNGQNGLGSFLGQHKNQDTNQGHGHGKLL	92		
At1g64370 BnPP99	121 93	GQHDQKKTHETNSGLNGLGMFINNGEKKHRRKSEHK-KKNKDGHGSGNESGSSSGSDSD GQHQ-KKTHETNKGVNGLGMFINNGEKKHKKQNEHKKKKNKDGHASGNESGSSSGSDSE	178 150		
		***: *******.*:*************:::.*** ******.********			



auszubilden. Das Binden des SDS wird nicht durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen K-Segment und Detergens erreicht, sondern geschieht, so postuliert, über elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem positiv geladenen K-Segment und der negativ geladenen Sulfat-Gruppe vom SDS (134). Weitere Membranbindungen konnten mit Liposomen bestehend aus anionischen Phospholipiden beobachtet werden (134, 160, 163). Tween-20 als nicht-ionisches Detergens konnte hingegen keine Strukturänderung induzieren, was im Einklang mit der Vorstellung über elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Protein und polarer Kopfgruppe steht.

Obwohl diese Strukturänderungen bislang nur im Hinblick auf das K-Segment untersucht wurden, konnte der gleiche Effekt auch beim At1g64370 beobachtet werden, welches kein K-Segment, sondern nur eine K-reiche Sequenz besitzt. Anhand der CD-Daten kann spekuliert werden, dass die Ausbildung von  $\alpha$ -helikalen Strukturen nicht allein auf das K-Segment beschränkt ist, sondern auch durch ähnliche K-reiche Sequenzen induziert werden kann.

Weiterhin ist es möglich, dass weitere Bereiche im At1g64370 α-helikal vorliegen, entweder infolge der Helikalisierung der K-reichen Sequenz oder unabhängig davon. Wäre die Helikalisierung nur auf die Kreiche Sequenz beschränkt, welche nur einen Bereich von etwa 8 % der gesamten Proteinsequenz ausmacht, müsste ein weitaus geringerer Anteil an α-Helices nach Zugabe von SDS entstehen als zu beobachten war. Dieser stieg bei Anwesenheit von 10 mM SDS auf bis zu 44 % an, was nahezu der Hälfte des Proteins entspricht. Versuche den At1g64370:SDS-Komplex über eine Gelfiltration zu isolieren, scheiterten jedoch an der reduzierten Löslichkeit des Proteins in einer SDS-haltigen Lösung und an der sehr hohen Polydispersität der Probe, die nach Zugabe des SDS entstand.

Physiologisch betrachtet soll die Ausbildung einer amphipathischen Helix das Binden des Dehydrins an Membranen erlauben um diese vor Schäden durch Dehydratation und Salzstress zu schützen (134). Dehydrine bestehen neben dem immer vorhandenen K-Segment zusätzlich aus Y- und S-Segmenten. Von diesen beiden letzteren Sequenzen kann zweifelsfrei nur das S-Segment dem At1g64370 zugeordnet werden, jedoch gibt es kein K-Segment, welches alle Dehydrine gemein haben, weswegen eine Klassifizierung des Proteins in die Klasse der Dehydrine nicht möglich ist. Allerdings spricht die beobachtete Strukturveränderung unter SDS im At1g64370 wiederum für eine Dehydrin-ähnliche Eigenschaft. Die gleiche Strukturänderung konnte auch bei dem At1g64370 Homolog aus *Brassica napus* beobachtet werden (Abbildung 13d). Nach Zugabe von SDS lag das Protein, wie das At1g64370, hauptsächlich gefaltet vor. Jedoch ist das *Brassica napus* Homolog, BnPP99, deutlich kleiner als sein Homolog aus *Arabidopsis*. Insbesondere der Q-reiche Bereich zwischen dem zwanzigsten und fünfzigsten Aminosäurerest fehlt komplett im BnPP99 Protein (Abbildung 14). Folglich kann angenommen werden, dass dieser Bereich nicht an der Helikalisierung beteiligt ist.

Üblicherweise wurden alle CD-Messungen bei Raumtemperatur durchgeführt. Von einigen Dehydrinen ist bekannt, dass diese bei tiefen Temperaturen die Entstehung von Eis durch Bindung an entstehende Eispartikel stören und somit als *Antifreeze* Proteine fungieren (164, 165). Ob ein Absenken der Temperatur einen Effekt auf die Sekundärstruktur auslöst, wurde über eine temperaturabhängige CD-Messung untersucht. Dabei wurde im Bereich von +5 °C bis +80 °C zwischen 190 nm und 260 nm die Polarisation gemessen. Ebenso wurde eine mit SDS behandelte Probe im gleichen Temperaturbereich analysiert. Sowohl das At1g64370 ohne als auch mit dem zusätzlichen SDS zeigten in dem gemessenen Temperatur ungefaltet blieb, konnte die SDS behandelte Probe nicht wieder entfaltet werden. So blieb die hauptsächlich  $\alpha$ -helikale Form sowohl bei 5 °C als auch bei 80 °C erhalten. Die ausgebildete helikale Struktur durch das SDS scheint somit äußerst stabil vorzuliegen (Abbildung 13g und h). Jedoch kann über den genauen Grund sowie die physiologische Relevanz dieser Beobachtung nur spekuliert werden.

### 3.1.4 Kleinwinkel-Röntgenbeugungsexperimente (SAXS) bestätigen die ungefaltete Natur des Proteins und zeigen verschiedene Konformationen in Lösung auf

Anders als bei Röntgenbeugungsexperimenten an Proteinkristallen werden SAXS-Messungen von Proteinen in wässrigen Lösungen durchgeführt. Insbesondere Proteine, die nicht kristallisierbar sind, entweder auf Grund hoher intrinsischer Flexibilität oder infolge von struktureller Instabilität, können mittels SAXS-Experimenten strukturell untersucht werden. Nachteilig an SAXS-Messungen ist im Vergleich zu Kristall-Röntgenbeugungsexperimenten die geringe Auflösung (116, 166). Beugungsexperimente an Proteinkristallen ermöglichen eine Auflösung von unter 1 Å. Dem gegenüber steht eine Auflösung mittels SAXS im Bereich zwischen 10 bis 20 Å (22).

Trotzdem ermöglichen SAXS-Messungen es weitere Informationen über Konformation und Flexibilität von Proteinen, sowie den Oligomerisierungszustand der Probe in Lösung zu erlangen. Andere komplementäre Methoden wie nukleare Magnetresonanzspektroskopie (NMR) ermöglichen zwar auch strukturelle Charakterisierungen von Proben in Lösung, jedoch werden sie im Vergleich zu SAXS-Experimenten durch ein eindeutiges Größenlimit begrenzt, bis zu dem Proteine strukturell aufgeklärt werden können. Wie bereits über CD-Messungen bestätigt werden konnte, handelt es sich bei dem

At1g64370 um ein hochgradig ungefaltetes Protein und ist somit gänzlich ungeeignet um dessen Struktur über kristallografische Versuche aufzuklären.

Bevor SAXS Experimente unternommen wurden, musste sichergestellt werden, dass die Proteinprobe monodispers in Lösung vorlag. Monodispersität der Probe ist Voraussetzung, da polydisperse Proben dazu führen, dass eine strukturelle Auswertung der SAXS Daten unmöglich wird. Um zu prüfen, ob die präparierten Proteinproben monodispers vorlagen, wurden vor den eigentlichen SAXS-Messungen erneut DLS Analysen durchgeführt. Das ermittelte SAXS Profil ist hierbei die Mittelung aller Streukurven für alle möglichen Konformationen eines Moleküls in Lösung. Folglich würde eine polydisperse Probe sowohl die Streukurven des Monomers als auch aller weiteren Aggregate in derselben Probe beinhalten (28).

Je höher die Proteinkonzentration der Probe ist, desto besser ist das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Streukurve aus dem SAXS-Experiment. Üblicherweise werden bei einem SAXS-Experiment mehrere Proteinkonzentrationen desselben Proteins gemessen um konzentrationsbedingte Effekte, wie Aggregationen erkennen und ausschließen zu können. Für intrinsisch ungeordnete Proteine (IDPs) kommt weiterhin hinzu, dass bei höheren Konzentrationen der sogenannte *Crowding*-Effekt stärker die Struktur des Proteins in Lösung beeinflusst als bei kompakten globulären Proteinen (14, 142). IDPs besitzen auf Grund ihrer hohen Flexibilität eine Vielzahl an möglichen Konformationen in Lösung. Durch eine erhöhte Proteinkonzentration wird diese Flexibilität jedoch immer weiter eingeschränkt und führt zu strukturellen Einschränkungen. So können IDPs durch diesen *Crowding*-Effekt zum Beispiel nur noch in elongierte Formen gezwungen werden oder aber lokal strukturierte Regionen ausbilden, die bei niedrigen Konzentrationen nicht vorliegen würden (167, 168).

Das At1g64370 wurde an zwei unterschiedlichen Messzeiten mit Konzentrationen zwischen 1 und 10.8 mg/ml gemessen. Die Messungen wurden bei 15 °C an der PETRA III P12 Beamline am EMBL Hamburg durchgeführt. Im direkten Vergleich der entstandenen Streukurven zwischen Streuwinkeln von 0 bis 5 nm<sup>-1</sup> für 1.57, 3, 5 und 10.8 mg/ml war der Effekt der steigenden Konzentration auf das Signal-zu-Rausch-Verhältnis deutlich zu Gunsten höherer Konzentrationen vom Protein zu sehen (Abbildung 15a). Unter der Annahme, dass keine Konzentrationseffekte auftraten, sollten sich alle drei Kurven nach dem Normalisieren dieser gegen die eingesetzte Proteinkonzentration komplett überlagern lassen können. Allein aus den nicht normalisierten Streukurven war eine eindeutige Überlagerung aller drei Kurven nicht möglich (Abbildung 15a). Während bei kleinen Winkeln die 1.57 und 3 mg/ml Proben gut zueinander skalierbar waren, schienen die 3, 5 und 10.8 mg/ml Proben nur bei größeren Winkeln (> 2 nm<sup>-1</sup>) kohärent zu verlaufen. Konzentrationseffekte lassen sich insbesondere im Kleinwinkelbereich gut erkennen. Nach Überlagerung aller drei Streukurven zeigte sich, dass sowohl die 1.57 und die 3 mg/ml Proben sehr gut übereinanderlegbar waren. Die 5 und 10.8 mg/ml Proben hingegen zeigten in diesem Bereich einen Aufwärtstrend der Streukurve, was auf eine andere Konformation hindeuten könnte. Ein abruptes Ansteigen im Kleinwinkelbereich bei höheren Konzentrationen kann aber auch bedeuten, dass attraktive Kräfte vorherrschen, folglich das Protein zunehmend beginnt zu aggregieren



Abbildung 15. Aufgenommene Streukurven vom At1g64370 Protein mit unterschiedlichen Konzentrationen. Aufgenommen wurden Streukurven von Proteinproben zwischen 1 und 10.8 mg/ml (a). Die Proben wurden zur Überprüfung an zwei verschiedenen Messzeiten wiederholt gemessen. Die auf die Konzentration normalisierten Streukurven wurden im kleinen Streuwinkelbereich auf mögliche repulsive oder aggregierende Effekte hin untersucht (b). Die Gyrationsradien am Beispiel der drei näher bestimmten Proteinproben vom At1g64370 wurden in der Guinier-Region (linerarer Bereich der Streukurve bei sehr kleinen Streuwinkeln) bestimmt (c). Anhand der ermittelten Gyrationsradien konzentrationsbedingte Effekte und deren Einfluss auf das Molekulargewicht ermittelt werden (d + e).

(Abbildung 15b). Die Auswirkungen solcher zunehmenden Aggregation lassen sich gut anhand der Linearität der Guinier-Region bestimmen. Die Guinier-Region ist jene Region, in der die Streukurve im natürlichen Logarithmus dargestellt, linear verläuft und für die Bestimmung des Gyrationsradius (R<sub>g</sub>) verwendet werden kann (Abbildung 15c) (113).

Als Annäherung für stark gefaltete Proteine liegt dieser Bereich bei  $sR_g < 1.3$ . Für elongierte Proteine jedoch verkürzt sich dieser Bereich auf  $sR_g < 0.8$ . Weiterhin führen Interpartikeleffekte in diesem Bereich zu einem Abfallen oder plötzlichen Ansteigen der Kurve, so dass kein ausreichend großer linearer Bereich vorliegt, um den Gyrationsradius zu bestimmen. In Abbildung 15c ist dieser Anstieg bereits ab einer Konzentration von 3 mg/ml zu erkennen. Durch weitere Erhöhung der Konzentration verkleinerte sich der lineare Bereich fortwährend und der abrupte Anstieg der Kurve ist ein Zeichen, dass bei hohen Konzentrationen ab 3 mg/ml Aggregationen entstehen und deswegen nicht für die Auswertung geeignet waren. Da bei der 3 mg/ml Probe bereits ein schwacher Aufwärtstrend zu sehen war, jedoch noch ein ausreichend großer linearer Bereich für die Berechnung des Gyrationsradius vorlag, wurde diese Probe noch in die weitere Auswertung mit einbezogen.

Als Gyrationsradius (R<sub>g</sub>) bezeichnet man den mittleren Abstand zwischen einzelnen Atomen gegenüber dem Massenschwerpunkt des gesamten Moleküls. Dieser Radius ist in der Regel konformationsunabhängig, jedoch anfällig gegenüber Oligomerisierungen, beziehungsweise Aggregationen, da sich dadurch der Massenschwerpunkt des Molekülaggregates verschiebt (28, 169). Für stark elongierte Proteine, beziehungsweise unstrukturierte Proteine kann die Bestimmung des R<sub>g</sub>- Wertes über die Guinier-Annäherung jedoch zu größeren Werten hin verschoben sein (170, 171). Da das At1g64370 ungeordnet, wie über die CD-Messungen gezeigt, und vermutlich nicht in globulärer Form vorlag, analysiert über die DLS und Gelfiltrationsexperimente, jedoch nicht bekannt ist, ob das Protein in Lösung komplett elongiert ist, wurde die Grenze von sRg < 1 gesetzt. Diese Grenze wird klassischerweise genutzt um den Gyrationsradius zu bestimmen. Aus dem Anstieg der interpolierenden Geraden konnte über  $R_g = \sqrt{-3a}$ , wobei a dem Anstieg der Geraden entspricht, der R<sub>g</sub>-Wert berechnet werden. Die angelegte Gerade ermöglicht außerdem die Molekülmasse des gemessenen Partikels zu bestimmen. Die Molekülmasse kann über die Intensität (I(0)) bei einem Winkel von 0 nm<sup>-1</sup> bestimmt werden, wenn gleichzeitig I(0) eines Standards bekannt ist (Gleichung [3]).

$$MW = I(0)_{Probe} x \frac{MW_{Standard}}{I(0)_{Standard}}$$
[3]

I(0) kann über die interpolierende Gerade bestimmt werden. Sowohl für die Streukurve von der 1.57 mg/ml als auch vom 3 mg/ml Proteinprobe konnte eine Grenze von  $sR_g < 1$  eingehalten werden. Für die ab 5 mg/ml konzentrierten Proben konnten weder diese Grenze, noch ein  $sR_g < 1.3$  genutzt werden (Abbildung 15c). Der Grund hierfür ist, dass bei dieser Probe ein *"Smile"*-Effekt zu beobachten war. Als *"Smile"*-Effekt wird die Beobachtung genannt, wenn durch Anlegen einer interpolierenden Gerade die Fehler zwischen Gerade und reellen Messpunkten nach außen hin größer werden, so dass eine parabolische Form entsteht.

Im Vergleich der ermittelten Gyrationsradien der unterschiedlichen Proteinkonzentrationen bestätigte sich der Verdacht, dass bereits die 5 mg/ml Probe sich signifikant von den anderen Konzentrationen unterschied und Anzeichen von Aggregationen aufwies. Bis etwa 3 mg/ml blieb der R<sub>g</sub>-Wert hingegen relativ konstant.

Die ermittelten  $R_g$ -Werte für die unterschiedlichen At1g64370 Konzentrationen lagen selbst bei den niedrig konzentrierten Proben weit oberhalb des zu erwartenden  $R_g$ -Wertes. Monomer in Lösung vorliegendes BSA besitzt einen  $R_g$  von etwa 2.8 nm bei einem Molekulargewicht von 66 kDa (28). Die kleinsten ermittelten  $R_g$ -Werte für das 20 kDa große At1g64370 Protein lagen hingegen im Bereich von 3.9 nm, was auf vorliegende Aggregationen oder elongierte Konformationen hindeuten könnte. Über den bereits ermittelten hydrodynamischen Radius  $R_h$  aus der DLS-Messungen konnte der  $R_g$  Wert über Gleichung [7] berechnet werden (172).

$$R_g = \sqrt{3/5} R_h \tag{7}$$

Conc (mg/ml)	R <sub>g</sub> (nm)	R <sub>g</sub> Porot	D <sub>max</sub> (nm)	V <sub>p</sub> (nm³)	Mm <sub>exp</sub> (kDa)	Mm <sub>calc</sub> (kDa)
1.00	3.94 ± 0.24	3.74 ± 0.1	15.2 ± 0.5	41.82 ± 2	25 ± 5	19.8
1.57	3.96 ± 0.07	$4.01 \pm 0.1$	16.1 ± 0.5	64.86 ± 2	28 ± 5	19.8
3.00	3.94 ± 0.05	4.05 ± 0.1	16.2 ± 0.5	67.58 ± 2	27 ± 5	19.8
5.00	4.5 ± 0.07	4.34 ± 0.4	18.0 ± 0.5	76.71 ± 5	35 ± 5	19.8
10.8	5.18 ± 0.36	5.55 ± 0.1	21.2 ± 0.5	146.96 ± 5	67 ± 5	19.8

Tabelle 12. Experimentell ermittelte Werte für unterschiedliche At1g64370 Konzentrationen mittels Kleinwinkelbeugungsexperimenten.

Der gemessene R<sub>h</sub> durch die DLS Messung ergab einen berechneten R<sub>g</sub> von  $3.1 \pm 0.46$  nm was kleiner als der ermittelte Wert aus der Guinier-Annäherung war (Tabelle 12), aber immer noch wesentlich größer als der theoretisch zu erwartende Wert ist. Für globuläre Proteine wie das BSA können die R<sub>g</sub>-Werte mithilfe der R<sub>h</sub> Bestimmung über DLS Versuche mit einem Fehler von 10 % bestimmt werden. Da das At1g64370 nicht als kompaktes Protein angenommen werden konnte, ergaben die bestimmten R<sub>g</sub>-Werte für das At1g64370 erneut, dass das Protein entweder in seiner elongierten Konformation vorlag oder aber das Protein bereits bei niedrigen Konzentrationen während der Probenmessung aggregierte. Aggregationen während der Probenmessung können auftreten, wenn Strahlenschäden durch die einstrahlende Röntgenstrahlung am Protein entstehen. Um diese zu minimieren wurde, obwohl keine Cysteine im Protein vorhanden waren, 1 bis 2 mM DTT als Reduktionsmittel hinzugegeben. Zur Überprüfung ob Aggregationen vorlagen oder ob die erhöhten R<sub>g</sub> Werte auf elongierte Konformationen zurückzuführen waren, wurde über I(0) die Molekülmasse der einzelnen Proben bestimmt. Dabei zeigte sich zum einen, dass bis etwa 3 mg/ml die ermittelten Molekulargewichte auf eine monomere Form schließen ließen und zum anderen, dass sich die Probe mit den höheren Konzentrationen signifikant unterschied (Abbildung 15d und e, Tabelle 12).

Aus diesem Grund wurde die At1g64370 Probe mit Konzentrationen ab 5 mg/ml von weiteren Auswertungen ausgeschlossen. Die 3 mg/ml Probe konnte mit den niedriger konzentrierten Proben nahezu fehlerfrei überlagert werden. Dieser Umstand und auf Grund der konstant bleibenden Werte für  $R_g$  und dem Molekulargewicht (MM) wurde nur die 3 mg/ml Proben für weitere, genauere Auswertungsschritte verwendet. Um eine ersten Hinweis auf die Konformation des At1g64370 zu bekommen, wurden die SAXS-Daten als dimensionsloser und normalisierter Kratky-Plot dargestellt (Abbildung 16a.). Bei dieser Art des Kratky-Plots werden die Streuintensitäten (I(s)) gegen I(0) normiert, mit (s $R_g$ )<sup>2</sup> skaliert und in Abhängigkeit zu s $R_g$  gesetzt. Hierdurch können verschiedene Proteinkonzentrationen und verschiedene Proteine direkt verglichen und Unterschiede direkt sichtbar gemacht werden. Kompakte, globuläre Proteine zeigen in dieser Art der Darstellung eine glockenförmige Kurve mit distinktem Maximum bei s $R_g = \sqrt{3}$  (168).



Abbildung 16. Kratky-Plot und Distanzverteilungsfunktion der At1g64370 Konzentrationsreihe, beziehungsweise der 3 und 5 mg/ml Probe, sowie das *Dammif ab initio* Strukturmodell. Strukturelle Unterschiede zwischen den Proben konnten im dimensionslosen normalisierten Kratky-Plot sichtbar gemacht werden. Während kompakte, globuläre Proteine eine glockenförmige Form mit einem Maximum bei  $sR_g = \sqrt{3}$  aufweisen (BSA), zeigen elongierte und unstrukturierte Proteine dieses Maximum nicht auf, sondern verlaufen entweder parallel zur Abszissenachse oder sind stetig steigend (a). Zur Bestimmung des maximalen Radius und weiteren Abschätzung der Proteinform wurde die 3 mg/ml At1g64370 Probe als P(r) Plot dargestellt (b). Das Dammif Kugelmodell bestätigte die Vermutung aus dem Kratky-Plot, dass das At1g64370 Protein keine Globularität besaß, stattdessen hauptsächlich unstrukturiert und elongiert vorliegen musste. Dargestellt ist das Minimalmodell nach Überlagerung aller berechneten Modelle und Mittelung dieser (c). Dabei zeigt sich eine sehr gute Überlagerung der theoretischen Streukurve des berechneten Modells mit den experimentellen Daten (d).

Partiell ungefaltete Proteine oder intrinsisch ungeordnete Proteine hingegen führen dazu, dass die Kurve bei größeren Streuwinkeln zunächst ein Plateau erreicht und anschließend aufwärts gerichtet weiter verläuft und im Falle von IDPs kein Maximum innerhalb des Kurvenverlaufs sichtbar ist. Partiell gefaltete Proteine oder Proteine mit kurzen Abschnitten an Sekundärstrukturen verlaufen zwischen diesen beiden Kurven (168).

Gegenüber den höheren Proteinkonzentrationen ab 5 mg/ml zeigte der Kratky-Plot, kein eindeutiges Maximum, wie es für kompakte globuläre Proteine zu erwarten wäre, sondern schien in Richtung großer Streuwinkel ein Plateau auszubilden und anschließend nahezu parallel zur horizontalen Achse zu verlaufen (Abbildung 16a). Bei Konzentrationen unterhalb von 5 mg/ml veränderte sich dieser Verlauf scheinbar zunehmend zu Gunsten eines sich bildenden Maximums zwischen sR<sub>g</sub> Werten von 2 und 3. Bereits die 3 mg/ml Probe zeigte bei großen Winkeln, dass der Kurvenverlauf nicht wie üblich für partiell oder komplett ungeordnete Proteine von der Achse weg, sondern zur Achse hin gerichtet war. Ein ähnlicher Kurvenverlauf wird zum einen für Proteine mit elongierter Form beschrieben, zum anderen aber auch für partiell gefaltete Proteine (168, 173, 174). Dieser sichtbare Unterschied könnte dementsprechend darauf hinweisen, dass durch die erhöhte Proteinkonzentration eine Verschiebung der

möglichen Konformationen am wahrscheinlichsten von partiell gefalteten hin zu komplett ungefalteten und elongiert vorliegenden Proteinen mit kurzen Abschnitten an Sekundärstrukturelementen stattfand.

Diese Beobachtung deckte sich komplett mit der durch die CD-Messungen ermittelte Sekundärstrukturzusammensetzung des Proteins, als auch über die P(r) Funktion ermittelten maximalen Abstände ( $d_{max}$ ) innerhalb des Proteins (Abbildung 16b). Die Form der P(r) Funktion ist charakteristisch für ungefaltete Proteine (166, 174). Globuläre Proteine besitzen eine symmetrische Glockenform mit zentralem Maximum, während das Maximum für elongierte, ungefaltete Proteine in Richtung kleiner Werte von d verschoben ist und daher sehr große  $d_{max}$  besitzen. Mit steigender Proteinkonzentration vom At1g64370 stieg dieser  $d_{max}$  Wert weiter an, was ebenfalls wie der Kratky-Plot auf eine weitere Streckung der Proteinkonformation hindeutete. Somit stehen der hohe Rg-Wert von 3.94 als auch  $d_{max}$ im Einklang mit der Vorstellung, dass ein ungefaltetes, elongiertes Protein in Lösung vorlag.

Ein erstes *ab initio* 3D-Modell wurde von der 3 mg/ml Probe mit Hilfe des Programms *Dammif* durchgeführt. Hierfür wurden zunächst 10 verschiedene *ab initio* Modelle berechnet und anschließend die theoretische Streukurve dieser Modelle mit der berechneten Streukurve verglichen. Die Modelle, die zu stark von der experimentellen Streukurve abwichen, wurden im Anschluss aus den weiteren Analysen herausgenommen. Die Modelle, die innerhalb des akzeptablen Fehlers lagen wurden im Anschluss genutzt, um über das Programm *Damaver* ein gemitteltes 3D Modell zu erstellen. Allerdings ist dieses Modell ungeeignet, um insbesondere flexible Systeme darzustellen, da für flexible Proteine mehrere Modelle berechnet werden können und das daraus ergebene gemittelte Modell folglich wesentlich größer wäre als es die Proteingröße zulassen würde. Eine genauere Darstellung des Modells konnte durch *Damfilt* erreicht werden. Hierbei werden alle gemittelten Modelle miteinander verglichen und der Bereich, der in den meisten Modellen überlagert wird, zur Erstellung eines Minimalmodells behalten, während äußere Bereiche, die eventuell nur durch ein einzelnes Modell beschrieben werden, aus der gemittelten Struktur herausgenommen werden

Als Qualitätsmaß für das finale *ab initio* Modell wurde Chi<sup>2</sup> ( $\chi^2$ ) angegeben. Gute Übereinstimmung der experimentellen Streukurve und dem *ab initio* Modell sollten ein  $\chi^2$  von etwa 1 ergeben. Das ermittelte Modell zeigte ein  $\chi^2$  von 0.953 (Abbildung 16d), was eine hinreichend gute Übereinstimmung zwischen Modell und Experiment darstellte. Das finale *ab initio* Modell deckte sich gut mit den Beobachtungen aus dem dimensionslosen Kratky-Plot (Abbildung 16a, c). Wie bereits erwähnt, zeigte der Kratky-Plot, dass das At1g64370 im Gegensatz zum BSA-Standard keinerlei kompakten Kern zu besitzen schien, sondern vielmehr als ein intrinsisch ungeordnetes und eher elongiertes Protein vorlag. Diese elongierte Form ist ebenfalls im *Dammif* Modell klar zu erkennen. Obwohl eine wesentliche Eigenschaft von strukturell ungeordneten Proteinen deren hohe strukturelle Flexibilität ist, ist trotzdem die Variabilität häufig auf wenige signifikant verschiedene Konformationen beschränkt. In Lösung können exemplarisch hauptsächlich mehr oder weniger kompakte Formen vorliegen, jedoch unter Veränderung der Umgebung, entweder durch Änderung der Salzkomposition oder aber durch lokale Steigerung der Proteinkonzentration, kann es dazu kommen, dass eine andere Form bevorzugt ausgebildet wird, die jedoch mit der vorherigen im Gleichgewicht steht.

Die prozentuale Verteilung der unterschiedlichen Formen ist über ein *Dammif* Modell nicht vorhersagbar. Hierfür wird die sogenannte *Ensemble Optimization Method* (EOM) verwendet. Diese Methode ist insbesondere für flexible Proteine geeignet, da neben einem Pool von mindestens 10000 verschiedenen Strukturen, die durch die Streukurve erklärbar wären, dieser Pool auf einzelne Strukturen reduziert wird, so dass Redundanzen innerhalb des Pools beseitigt werden und nur noch wenige höher aufgelöste Strukturen übrigbleiben.

Das isolierte Ensemble aus dem Pool von 10000 unterschiedlichen Strukturen zeigte im Wesentlichen zwei Subpopulationen (Abbildung 17a). Ein erstes Maximum konnte bei einem Rg-Wert von etwa 3.6 nm festgestellt werden, was im Vergleich zu dem Rg-Wert, der über die Guinier-Region aus den experimentellen Daten ( $R_g = 4.05$ ) wesentlich kleiner ist und auf mitunter kompaktere Strukturen hindeutete. Der errechnete Rg-Wert mit Hilfe des Rh aus der DLS Messung hingegen konnte annähernd erreicht werden. Eine weitere Schulter bei etwa 4.4 nm steht hingegen für elongiertere Konformationen, die jedoch im Vergleich zur ersten Subpopulation bei 3.6 nm in deutlich geringerer Häufigkeit auftraten. Interessanterweise ist diese Verteilung stark konzentrationsabhängig. Während die 1.57 mg/ml Probe im Wesentlichen nur ein Maximum bei unter 4 nm besaß, sank dieses Maximum bei steigender Konzentration, während gleichzeitig bei über 4 nm ein weiteres Maximum entstand (Abbildung 17a). Diese Veränderungen hin zu größeren Rg-Werten bei steigender Konzentration kann als weiterer Beleg für Konformationsänderungen durch den Crowding-Effekt gesehen werden, wie es bereits aus dem Kratky-Plot spekuliert worden war. Aufgrund der hohen Flexibilität des Proteins konnte offensichtlich durch kleine Veränderungen in der Konzentration eine signifikante Konformationsänderung induziert werden. Dabei lag das Protein bei niedrigen Konzentrationen zunächst hauptsächlich kompakt, beziehungsweise im molten globule state vor. Durchsteigende Konzentrationen änderte sich diese hauptsächlich kompakte Form zu hauptsächlich gestreckten Konformationen, wie es für komplett flexible und ungefaltete Proteine anzunehmen wäre.

Die 3 mg/ml At1g64370 Probe zeigte sowohl eine kompakte Form für die niedrigen Konzentrationen als auch die beginnende Streckung der Proteinkonformationen bei höheren Konzentrationen, weswegen diese Probe für weitere genauere Ensemble-Analysen genutzt wurde. Der mittlere R<sub>g</sub>-Wert aus dem bestimmten Ensemble der mittleren Konzentration von 3 mg/ml lag bei 4.16 nm, was sehr gut mit dem bestimmten Gyrationsradius aus den experimentellen Daten übereinstimmte. Zur weiteren Überprüfung, wie gut das bestimmte Ensemble und die Messdaten übereinstimmten, wurde, wie bereits für das *Dammif*-Modell gezeigt, die experimentelle Streukurve mit der theoretischen Streukurve von dem Modell-Ensemble miteinander verglichen und diese konnten mit einem  $\chi^2$  von 1.033 sehr gut gefittet werden (Abbildung 17b).



Abbildung 17. *EOM* Berechnungen zur Flexibilität und Konformation vom At1g64370 anhand der unterschiedlichen Konzentrationen. Zur Berechnung der Proteinflexibilität wurden über die *EOM* Methode 10000 Modelle generiert, die Kurven mit den experimentellen Streukurven verglichen und die Subpopulationen, die die experimentellen Daten am besten beschrieben selektiert. Anhand des ausgewählten Ensembles zeigte sich, dass neben einem größeren Anteil an Konformationen mit relativ kleinem  $R_g$  (< 4 nm) weitere weniger häufig auftretende Konformationen mit hohem  $R_g$  (> 4 nm) auftraten (a) Die Verteilung dieser beiden Populationen sind stark konzentrationsabhängig, was auf einen möglichen Einfluss durch molekulares *Crowding* hindeutete. Zur Abschätzung wie gut das ausgewählte Ensemble den experimentellen Daten entsprach, wurde die ermittelte Streukurve der 3 mg/ml Probe mit der theoretischen Streukurve des Ensembles miteinander verglichen (b). Über die mittlere absolute Abweichung, Standardabweichung, geometrischen Durchschnitt, Schiefe und Kurtose konnte die bevorzugte Ordnung des Proteins sowie über  $R_{\sigma}$  die Datenqualität abgeschätzt werden (c). Über die Programme *RanCh* und *GAJOE* konnte das Ensemble, das die Daten am besten beschrieb als 3D Strukturen berechnet werden. Diese Strukturen bildeten nicht exakt die Strukturen in Lösung ab, sondern beschrieben das Verhalten des Proteins in Lösung (d).

Neben dem  $\chi^2$  als Qualitätsmerkmal dienen bei EOM Berechnungen zusätzlich R<sub>flex</sub> und R<sub> $\sigma$ </sub> als Indikatoren für eine korrekte Modellberechnung. R<sub>flex</sub> beschreibt den Grad der Flexibilität des Ensembles und des Modellpools. Ein R<sub>flex</sub> von 100 % ist hierbei gleichbedeutend mit einem komplett flexiblen System, wohingegen ein R<sub>flex</sub> von 0% ein komplett rigides System beschreibt (175).

Zur Überprüfung, ob die bestimmten Werte von  $R_{flex}$  eine plausible Lösung ergaben, wurde  $R_{\sigma}$  als weitere Kenngröße verwendet.  $R_{\sigma}$  beschreibt die Varianz der Ensembleverteilung im Verhältnis zum Pool und kann genutzt werden, um Artefakte in der Berechnung des Ensembles festzustellen, welche durch schlechte Datenqualität auftreten können. Ein  $R_{\sigma}$ , welcher sich 1 annähert, beschreibt ein Ensemble welches komplett durch den Pool abgedeckt wird. Ein  $R_{\sigma}$  von >1 kann als gültige Lösung angesehen werden, wenn  $R_{flex}$  des Ensembles ebenfalls größer als  $R_{flex}$  des Pools ist (175). Die EOM Modellberechnungen ergaben ein  $R_{flex}$  vom Ensemble (Pool) von 86.72% (83.51%) und ein  $R_{\sigma}$  von 1.24 (Abbildung 17c). Folglich kann das System als äußerst flexibel angesehen werden.

Des Weiteren ist die berechnete Flexibilität des Ensembles in etwa die gleiche wie für das komplette System. Der dazugehörige  $R_{\sigma}$ -Wert lag oberhalb von 1, was zusammen mit den  $R_{flex}$ -Werten die erhaltenen Modelle, beziehungsweise das Ensemble als auch die dazugehörigen SAXS Daten als auswertbar und vor allem korrekt interpretiert klassifizierte.

Anhand der mittleren absoluten Abweichung (statistische Variabilität), der Standardabweichung, dem geometrischen Durchschnitt, der Schiefe (Asymmetrie der Wahrscheinlichkeitsverteilung) und der Kurtose (Wölbung) war es möglich die allgemein bevorzugte Form des Proteins in Lösung im Vergleich zu dem angelegten Strukturpool zu bestimmen (Abbildung 17c) (175), die bei dieser Probe als vorwiegend kompakt bis intermediär kompakt klassifiziert werden konnte.

Zur Berechnung der 3D Strukturen des am besten passenden Ensembles wurde im Anschluss an die Ensemble Optimierung über RanCh und GAJOE zum einen die 3D Strukturen erstellt als auch entsprechend gewichtet. Diese errechneten Strukturen bildeten jedoch nicht alle möglichen Strukturen in Lösung ab, sondern sind vielmehr als das Verhalten des Proteins in Lösung zu verstehen. Insgesamt konnten die SAXS Daten in sechs verschiedene EOM Modelle eingeteilt werden (Abbildung 17d). Dabei zeigte sich, dass neben vergleichsweise kompakten Konformationen (je 8% und 17%) ebenso stark elongierte Formen in Lösung auftraten (25 und 33%).

Dass insgesamt vier vorzugsweise kompakte Formen im Ensemble vorlagen und nur wenige elongierte steht im Einklang mit der R<sub>g</sub>-Verteilung, die für die 3 mg/ml Probe bestimmt wurde (Abbildung 17a). Die hohe Flexibilität des Proteins ermöglicht dem Protein mehrere kompakte Strukturen anzunehmen, so dass der jeweilige Anteil entsprechend reduziert ist (je 8 %). Durch die allmählig gesteigerte Konzentration wird das Protein in elongiertere Konformationen gezwungen, ohne dabei große Variationen zu erlauben, weswegen der Anteil vergleichsweise hoch ist (33 %). Obwohl die kompakten Formen scheinbar dominieren, zeigten die CD-Messungen, dass trotzdem keine Sekundärstrukturen vorlagen. Jedoch kann spekuliert werden, dass Liganden, die die Sekundärstruktur des Proteins beeinflussen konnten, wie SDS als auch Zink, einen Einfluss auf die Proteinformen in Lösung haben und somit über SAXS nachweisbar wären.

Das At1g64370 Protein zusammen mit SDS als auch im Komplex mit Zink sollte deshalb ebenfalls über SAXS-Messungen untersucht werden, jedoch führte die Zugabe von diesen Liganden dazu, dass die vormals monodisperse Proteinprobe entweder präzipitierte oder aber hochgradig polydispers vorlag, so dass einzelne Oligomere nicht getrennt werden konnten und Gelfiltrationsexperimente mit anschließenden SAXS-Messungen nicht möglich waren.

#### 3.1.5 Zusammenfassung

Zusammenfassend kann zum At1g64370 gesagt werden, dass sowohl die bioinformatischen Vorhersagen als auch die experimentelle Datenlage die hochgradig ungeordnete Natur des Proteins belegen. Des Weiteren besitzt das Protein Dehydrin-ähnliche strukturelle Eigenschaften, wie sie bereits vom Dehydrin HIRD11 aus Arabidopsis thaliana bekannt sind, obwohl Dehydrin-charakteristische Motive im Proteine nahezu komplett fehlen. Dazu gehören die selektive Bindung von Schwermetallen, wie Zink, Nickel, Kupfer und Kobalt als auch die Zunahme an Sekundärelementen während der CD-Messungen. Dabei induziert die Bindung der Ionen das Aggregieren und Präzipitieren des Proteins, was über die CD-Analyse als auch durch DEPC-Modifizierungsstudien belegt werden konnte. Weiterhin konnte, wie für Dehydrine beschrieben, durch die Zugabe von SDS aus dem vormals ungefalteten Protein eine signifikante Zunahme an Sekundärstruktur induziert werden. Während die DLS- als auch Gelfiltrationsexperimente bereits auf elongierte Konformationen des Proteins hindeuteten, konnte diese über SAXS Experimente und anschließender Ensemble Optimierungen nachgewiesen und genauer analysiert werden. Außerdem zeigte sich, dass die Konformation des Proteins in Lösung ist stark konzentrationsabhängig ist und im Wesentlichen in zwei Subpopulationen eingeteilt werden kann: Bei niedrigen Konzentrationen herrschen kompakte molten globule ähnliche Konformationen vor, während bei hohen Proteinkonzentrationen elongierte ungefaltete Formen dominieren, was auf einen möglichen Effekt durch molekulares Crowding zu erklären ist. Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten strukturellen Analysen kann das At1g64370, welches bislang weder einer Proteinfamilie zugeordnet werden konnte und dessen Funktion bisher noch nicht geklärt wurde, zumindest als Dehydrin-ähnliches Protein bezeichnet werden. Diese können innerhalb des Organismus verschiedenste Aufgaben übernehmen, beispielsweise über die Interaktion mit Ionen, Membranen, Nukleinsäuren oder auch Proteinen. Diese müssten über in vitro-Studien noch genauer untersucht werden, um endgültig zu klären, ob es sich bei dem Protein auch auf funktioneller Ebene um ein Dehydrin-ähnliches Protein handelt. Außerdem wären auch in vivo-Studien für eine Identifizierung der Funktion innerhalb der Pflanze hilfreich, so könnte zum einen die Lokalisation des Proteins identifiziert werden und zum anderen über zukünftige Mutations-, beziehungsweise Knock-out Studien die Funktion des Proteins oder einzelner Bereiche in der Pflanze untersucht werden. Zum anderen bleibt die Frage offen, ob durch das At1g64370 bestimmte Stressszenarien von Pflanzen besser bewältigt werden können oder ob andere phänotypische Auffälligkeiten auftreten, wenn dieses Protein überexprimiert oder aber ausgeschaltet wird.

## **3.2 Das pflanzliche TCTP zeigt ähnliche strukturelle und funktionelle** Eigenschaften auf wie Homologe in anderen Organsimen

Das translationally controlled tumour-associated Protein (TCTP) ist ein hoch konserviertes Protein, das in einer Vielzahl eukaryotischer Organismen vorkommt und bei verschiedenen zellulären Prozessen, wie dem zellulären Wachstum, der Apoptose, der Zellzyklus-Progression aber auch bei zellulärem Stress, eine wichtige Rolle einnimmt (68). Daher ist es nicht verwunderlich, dass es bereits eingehend strukturell untersucht wurde und außerdem bereits einige Proteine, als auch niedermolekulare Substanzen als Interaktionspartner identifiziert wurden. Allerdings sind nahezu alle Analysen am menschlichen Homolog als auch am verwandten Protein aus dem Malaria Erreger *Plasmodium falciparum* gemacht worden. Im Vergleich zu diesen beiden genannten Proteinen ist über pflanzliche TCTP-Homologe relativ wenig bekannt. So wurden bisher noch keine Interaktionspartner identifiziert, noch ist erforscht, ob sie strukturell und funktionell Ähnlichkeiten zu ihren Verwandten aufweisen. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit das TCTP aus *Arabidopsis thaliana* hinsichtlich seiner Struktur sowie Funktion genauer analysiert werden: Hierfür sollte zum einen über Kristallisations- und SAXS-Studien die strukturelle Organisation mit den tierischen Homologen verglichen werden und über *in vitro-Assays* mit Phloemsaft aus Raps Interaktionspartner identifiziert werden.

# 3.2.1 Kristallisations- und *Small angle X-Ray Scattering* Versuche zur Bestimmung der 3D Struktur

Vom TCTP aus anderen Organismen wie Mensch, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium knowlesi* und *Schizosaccharomyces pombe* existieren bereits hochauflösende Kristall-, beziehungsweise NMR-Strukturen (71, 72, 86, 176). Solche strukturellen Charakterisierungen sind jedoch auf die genannten Organismen beschränkt und in Pflanzen bisher gänzlich unerforscht. Bei der Betrachtung der Homologie auf Aminosäureebene zeigt sich, dass diese in den bereits untersuchten Proteinen zueinander vergleichsweise hoch ist, woraus auch die hohe strukturelle Ähnlichkeit resultiert. Im Gegensatz dazu sind die Aminosäuresequenzen der pflanzlichen Homologe nur wenig identisch mit den bereits kristallisierten TCTP-Varianten. Trotz der hohen Sequenzunterschiede zwischen den unterschiedlichen Organismen, sind zwei Bereiche weitestgehend konserviert (Abbildung 18a). Neben dem konservierten N-Terminus ist zentral in der Proteinsequenz in der Nähe der ersten großen  $\alpha$ -Helix erneut ein konservierter Bereich erkennbar. Außerdem zeigte sich, dass insbesondere am C-Terminus vergleichsweise wenig Sekundärelemente vorhanden sind und dieser Bereich dementsprechend hochvariabel in der Aminosäurezusammensetzung zwischen den verschiedenen Organismen ist.



Abbildung 18. Sequenz Alignment und Kristallkontakte der Homologe aus Plasmodium falciparum (pdb code: 3P3K) und Homo sapiens (pdb code: 3EBM). Verglichen wurden sowohl pflanzliche TCTP Proteine aus Arabidopsis thaliana, Brassica napus und Nicotiana tabacum, als auch je zwei Vertreter aus den Familien der Säugetiere (Homo sapiens, Mus musculus), Hefen (Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe) und Plasmodien (Plasmodium falciparum, Plasmodium knowlesi). In Grau dargestellt sind die vorhergesagten Sekundärstrukturen für das A. thaliana TCTP anhand bekannter Strukturen von homologen TCTPs (a). Stark konservierte Bereiche sind rot markiert, schwach konservierte Bereiche absteigend orange und gelb. Für die Wahl des HisTags wurden bereits kristallisierte TCTP-Homologe auf ihre Kristallkontakte zwischen den einzelnen Proteinen untersucht (b). Direkt interagierende Aminosäuren sind gelb dargestellt, verborgende Aminosäurereste dunkelblau. Anhand dieser Darstellung konnte gezeigt werden, dass der C-terminale HisTag wesentlich an den Kristallkontakten beteiligt ist, weswegen dieser für das TCTP aus A. thaliana ebenfalls genutzt wurde.

Das hier zu untersuchende *Arabidopsis thaliana* TCTP-Homolog (aTCTP) besitzt eine Sequenzidentität von unter 33 % zu den nächstähnlichen kristallisierten TCTP-Homologen (*P. knowlesi, H. sapiens*). Da beide Varianten einen nicht entfernbaren C-terminalen *HisTag* besaßen wurde mit Hilfe des PDBePISA Servers (177) bestimmt, welche Aminosäurereste in den beiden zum *Arabidopsis thaliana* TCTP ähnlichsten Kristallstrukturen für die Kristallkontakte innerhalb der einzelnen Moleküle im Kristall verantwortlich waren. Insbesondere der C-terminale *HisTag* bildete etliche Salzbrücken innerhalb der Proteinkristalle. Dies ist umso signifikanter, da Symmetrie, Raumgruppe, als auch die Anzahl der Moleküle in der asymmetrischen Einheit ein beiden untersuchten Kristallstrukturen unterschiedlich sind (Abbildung 18b). Folglich wurde für ein mögliches Proteinkonstrukt der C-terminale *HisTag* in Betracht gezogen, obwohl dieser artifiziell und nicht entfernbar wäre. Weitere Bereiche für die Kristallbildung sind in geringerem Maße der N-Terminus, sowie ein größerer Bereich zwischen der 100. und 140. Aminosäure. Obwohl ebenfalls GST-*getaggte* TCTP-Homologe erfolgreich kristallisiert werden konnten, wurde der *HisTag* favorisiert, da er aufgrund seiner kleinen Größe und seinem geringen Einfluss auf die Löslichkeit und Expression besser geeignet war.

#### 3.2.1.1 CD-, DLS- und Kristallisationsversuche am C-terminal Histidin-getaggten TCTP

Für Kristallisationsversuche ist ebenso wie für SAXS-Experimente ein hochgradig reines und monodisperses Protein erforderlich. Über eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie, gefolgt von einer Größenausschlusschromatographie konnte das C-terminal *getaggte* Protein bis zu einer Reinheit von über 95 % aufgereinigt werden (Abbildung 19a). Nur wenige Degradationsbanden in geringer Konzentration waren noch vorhanden, und auch über eine anschließende Anionenaustausch-chromatographie nicht komplett aus der Probe entfernt werden.

Versuche das N-terminal *getaggte* Protein, bei dem der Tag hätte entfernt werden können, herzustellen als auch aufzureinigen scheiterten So konnte zum einen wesentlich weniger Protein im bakteriellen Expressionssystem löslich hergestellt werden und zum anderen schien der N-terminale *Tag* nur partiell zugänglich vorzuliegen, da ein Großteil des Proteins nicht an die Nickel-NTA Matrix zur Aufreinigung gebunden hatte und verhältnismäßig starke Kontaminationen durch *E. coli* Proteine vorlagen. Ebenfalls wichtig für Kristallisationsexperimente ist eine ausreichend hohe Löslichkeit des Proteins. Für erste Kristallisationsversuche wurden Konzentrationen zwischen 5 und 100 mg/ml genutzt. Zur Evaluierung der Löslichkeit wurde ein Löslichkeitsoptimierungstest durchgeführt und Puffer, Salz und pH-Wert den optimalen Bedingungen angepasst (178). Im Vergleich zum Gelfiltrationspuffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM DTT) konnte jedoch keinerlei Löslichkeitssteigerung beobachtet werden, da selbst im Gelfiltrationspuffer Proteinkonzentrationen bis zu 200 mg/ml erreicht wurden.

Darüber hinaus sollte getestet werden inwiefern sich bekannte Liganden für das TCTP auf das Kristallisationsverhalten auswirken. So wurde neben dem freien TCTP zusätzlich TCTP mit Hemin und TCTP mit Calcium aufgereinigt und auf 30 bis 200 mg/ml aufkonzentriert. Neben einer ausreichenden Konzentration musste sichergestellt werden, dass das rekombinant hergestellte Protein nicht durch *E. coli* posttranslational modifiziert wurde, beziehungsweise Ziel proteolytischer Aktivität war. Hierfür wurde zunächst das unverdaute Protein im linearen Modus und anschließend auch die trypsinierte Probe aus dem SDS Gel im Reflektor-Modus über MALDI-TOF MS analysiert (Abbildung 19a). Im linearen Messmodus konnten insgesamt drei Signale um 20000 Da detektiert werden, wobei das Hauptsignal bei 19888 Da signifikant vom theoretischen Molekulargewicht des TCTPs (20020 Da) abwich. Die zu erwartende Molekülmasse des untersuchten Proteins ist allerdings durch das zweite Signal bei exakt 20020 Da beschreibbar. Die Differenz zwischen beiden Signalen betrug etwa 132 Da, was theoretisch einem Verlust des N-terminalen Methionins entsprach. Das dritte Signal, welches um etwa 72 Da größer als die theoretische Molekülmasse war, konnte allerdings nicht zugeordnet werden.

Falls das Initiator-Methionin durch *E. coli* abgespalten wurde, sollte dies als zusätzliches Peptid nach Trypsinverdau des Proteins und anschließender massenspektrometrischen Messung wieder auffindbar sein. Wie bereits vermutet konnte das N-terminale erste Fragment vom TCTP bei 2505 Da nicht im Spektrum gefunden werden. Stattdessen war ein zusätzliches Signal bei 2373 Da erkennbar, welches dem N-terminalen Peptid mit fehlendem Methionin und sonst keinem anderen Peptid zugeordnet werden konnte.



Abbildung 19. Überprüfung des Molekulargewichtes und Reinheit des rekombinanten TCTPs mittels MALDI-TOF MS und anschließende DLS Langzeitmessungen. Die Fraktionen mit der höchsten Reinheit nach der Gelfiltration wurden zusammengegeben und weiter aufkonzentriert (roter Rahmen). Das konzentrierte, unverdaute TCTP zeigte im linearen Messmodus drei Signale. Allerdings stimmte das stärkste Signal nicht mit der zu erwartenden Größe überein, was auf den Verlust einer Aminosäure zurückgeführt werden konnte (a). Ein weiteres Signal konnte nicht näher erklärt werden. Das mit Trypsin verdaute TCTP bestätigte die Vermutung, dass N-terminal das Initiator-Methionin durch *E. coli* abgespalten wurde und somit ein Massen *Shift* von 130 Da auftrat (b). Die Polydispersität in Lösung und die Stabilität über einen längeren Zeitraum wurde über DLS-Messungen bestimmt (c). Dabei wurden Messungen sowohl über 35 Minuten als auch über 5 Tage durchgeführt um das Aggregationsverhalten des Proteins zu überprüfen.

Das zusätzliche Signal im linearen Modus konnte auch über den Trypsinverdau und Messung im Reflektormodus nicht identifiziert werden, so dass angenommen wurde, dass es sich hierbei um ein Protein:Matrix Addukt handelte.

Das Entfernen des N-terminalen Initiator-Methionins gehört zu den häufigsten co-translationalen Proteinmodifikationen und konnte in allen Organismen nachgewiesen werden. Für viele Proteine ist das Entfernen des ersten Methionins nötig um funktionell aktiv und stabil in der Zelle vorzuliegen. Weiterhin liegen etwa 60 % aller *E. coli* Proteine im Cytosol ohne das Initiator-Methionin (179–182) vor. Ob das Initiator-Methionin im nativen pflanzlichen TCTP vorhanden ist oder co-translational entfernt wird, ist bislang nicht bekannt. Weiterhin konnte nicht abgeschätzt werden, ob das Fehlen des Methionins Auswirkungen auf die Stabilität und Kristallisierbarkeit des Proteins haben könnte.

Die Langzeitstabilität des Proteins sowie die Polydispersität wurde erneut über DLS-Messungen bestimmt (Abbildung 19c). Die Dispersität nach der Aufreinigung wurde über 35 min gemessen. Für die Bestimmung der Langzeitstabilität wurde hingegen eine Messung über 5 Tage bei Raumtemperatur durchgeführt. Wie beim At1g64370 Proteins konnte hier ein hochgradig monodisperses Protein hergestellt werden, welches als scharfes Signal erkennbar war. Als weiteres wesentliches Merkmal, das ein Protein zur Kristallisation aufweisen muss, ist dessen Langzeitstabilität. So wird das Protein für die Kristallisation mit unterschiedlichen Präzipitanten für mehrere Wochen bis Monate inkubiert unter denen die Nukleation, beziehungsweise das Kristallwachstum stattfindet. Für die Nuclei-Bildung ist das Erreichen der metastabilen Phase notwendig. Diese Phase ist abhängig von der Proteinkonzentration als auch von der Präzipitantenkonzentration und ist proteinspezifisch.



Abbildung 20. CD-Ergebnisse für das TCTP in Gegenwart verschiedener potentieller Liganden. Neben dem TCTP ohne weiteren Liganden (zuvor mit EDTA behandelt) wurden Calcium und Hemin als bekannte Liganden für das TCTP-Homolog aus *P. falciparum* und *H. sapiens*, als auch Magnesium als Kontrolle für das Calcium gemessen (a). Anhand der erhaltenen CD-Daten konnte keine strukturelle Veränderung festgestellt werden, wobei die Strukturverteilung über die K2D Methode berechnet wurde (b).

Da das Erreichen dieser Phase zur Kristallbildung unerlässlich ist, muss das zu kristallisierende Protein bis zum Erreichen dieser Phase im Kristallisationsansatz stabil vorliegen und darf zuvor nicht aggregieren und eventuell ausfallen. Die Langzeitmessung zeigte, dass die Polydispersität innerhalb dieser fünf Tage zwar nicht zunahm, sich der hydrodynamische Radius und somit auch das Molekulargewicht jedoch stetig erhöhte. Dieser Effekt kann bedeuten, dass das TCTP über längere Zeit dazu neigt spezifisch zu aggregieren, noch bevor die metastabile Phase erreicht wird.

Wann die metastabile Phase erreicht wird ist ebenfalls von der Art des eingesetzten Präzipitanten abhängig. So kann sich die Phase innerhalb von Stunden bis Wochen ausbilden oder aber nie erreicht werden. Bisherige TCTP-Homologe konnten innerhalb einer Woche kristallisiert werden und zeigten bereits nach drei Tagen erste Kristalle. Dass die Kristallisation in relativ kurzer Zeit geschieht könnte das Problem mit der Langzeitstabilität minimieren. Allerdings konnte keine weitere Aussage getroffen werden, ob das TCTP aus *A. thaliana* ebenfalls innerhalb einer Woche kristallisieren könnte, beziehungsweise überhaupt kristallisiert.

Für eine erste Abschätzung der möglichen Struktur, wurde zunächst über CD-Messungen untersucht, wie das rekombinant hergestellte Protein in Lösung vorlag. Hierfür wurden 5  $\mu$ M TCTP in 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.5 und 50 mM NaF gemessen. Ebenso ist für das TCTP aus *P. falciparum* als auch *H. sapiens* bekannt Hemin und Calcium zu binden, weswegen beide Liganden ebenfalls gemessen wurden (84, 86). Als weitere Kontrolle diente Magnesium, welches bislang nicht als Ligand für das TCTP bekannt ist. Für das humane TCTP ist infolge der Bindung von Hemin beschrieben, eine dimere Form anzunehmen, welche sich ebenfalls über CD-Messungen beobachten ließ (84). Dieser Effekt zeigte sich bei Heminkonzentrationen größer als 40 μM und führte zu einer Zunahme an α-helikalen Regionen, weswegen für alle durchgeführten Messungen eine Ligandenkonzentration von 50 μM festgelegt wurde. Interessanterweise konnten in den durchgeführten Analysen keine Veränderung des CD-Spektrums im Vergleich zum freien TCTP detektiert werden, ungeachtet welcher Ligand zugegeben wurde. Jedoch ergaben die berechneten Strukturanteile ein zum Großteil gefaltetes Protein mit einem α-

helikalen Anteil von etwa 35 % und einem β-Faltblatt Anteil von etwa 17 % (Abbildung 20). Ob die Liganden an das pflanzliche TCTP binden konnten, oder ob eine Bindung der Liganden im Gegensatz zu den Homologen aus Mensch und *P. falciparum* keine Strukturveränderung induziert, konnte über die CD-Messungen nicht geklärt werden.

Da das Protein hauptsächlich gefaltet vorzuliegen schien und aufgrund des Langzeittests wurden insgesamt fünf verschiedene Kristallisationsscreens (JCSG, PACT, Stura Footprint, Morpheus, SGC Screen 1) mit je 96 verschiedenen Bedingungen getestet und über einen Zeitraum von drei Monaten geprüft unter welchen Bedingungen das Protein eventuell kristallisieren könnte. Darüber hinaus wurde neben den unterschiedlichen Screens die Proteinkonzentration zwischen 5 mg/ml und 30 mg/ml variiert, das Verhältnis zwischen Protein und Präzipitanten 1:1, 1:2 und 2:1 getestet sowie der Einfluss der Inkubationstemperatur bei 4 °C und 20 °C untersucht. Trotz Variieren der unterschiedlichen Parameter konnten nur in wenigen Bedingungen Kristalle beobachtet werden. Das TCTP präzipitierte in einem Großteil aller Bedingungen bereits nach weniger als einer Woche, unabhängig von der Temperatur und Proteinkonzentration. Einige wenige Bedingungen zeigten allerdings noch nach mehr als einem Monat keine Anzeichen von Präzipitationen, weswegen diese Bedingungen als Ausgangspunkt für weitere Optimierungen genutzt wurden und höhere Proteinkonzentrationen unter diesen Bedingungen getestet wurden. In den wenigen Bedingungen, die in etwa einer bis zwei Wochen zu einzelnen Kristallen führten, konnte nicht zwischen Protein- und Salzkristallen unterschieden werden. Daher wurden zur Unterscheidung die Kristalle mittels UV-Licht bestrahlt. Sofern es sich um Proteinkristalle handelt, sollte die intrinsische Tryptophanfluoreszenz dazu führen, dass die Kristalle deutlich sichtbar aufleuchten, während Salzkristalle nicht sichtbar wären (Abbildung 21d und e). Auf diese Weise konnten fluoreszierende Proteinkristalle von nicht fluoreszierenden, vermutlichen Salzkristallen unterschieden werden. Die als Proteinkristalle identifizierten Kristalle wurden daraufhin am DESY an der PETRA Beamline P11 gemessen. Jedoch zeigte das Streubild eindeutig, dass obwohl eine UV-Fluoreszenz detektiert werden konnte, dass diese Kristalle aus Salz bestanden (Abbildung 21a und b). Weiterhin konnten bei 0.2 M MgCl<sub>2</sub> 6xH<sub>2</sub>O, 0.1 M Bis-Tris pH 6.5 und 20 % PEG 3350 ein Nadelhaufen beobachtet werden (Abbildung 21c). Dieser war jedoch zu klein um mittels UV-Licht genauer zu untersuchen. Auch über weitere Optimierungen dieser Bedingung konnte die Bildung einzelner größerer Kristalle jedoch nicht erreicht werden. Da die Bildung von Kristallen mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die flexiblen Bereiche im Protein, wie größere Loop-Regionen oder ungeordnete Endbereiche, gestört wurde, im Anschluss versucht diese Bereiche über eine limitierte Proteolyse mit unterschiedlichen Proteasen zu entfernen (183, 184).

Hierzu wurde zum nativen Protein in unterschiedlichen Ansätzen verschiedene Proteasen hinzugegeben, die die unstrukturierten und somit zugänglichen Bereiche abschneiden. Dadurch wird das Protein entweder getrimmt, wobei flexible Bereiche der Termini entfernt werden, oder es entstehen durch die Entfernung flexibler Bereiche innerhalb des Proteins stabile Fragmente.



Abbildung 21. Kristallisationsergebnisse für das TCTP aus *A. thaliana*. Getestet wurden Proteinkonzentrationen zwischen 30 und 5 mg/ml in insgesamt 480 verschiedenen Kristallisationsbedingungen jeweils bei Raumtemperatur und bei 4 °C. Neben häufig auftretenden Präzipitationen (f) und klaren Tropfen konnte in einzelnen Bedingungen eine Kristallbildung beobachtet werden (a, c, d). Jedoch zeigten alle Kristalle keine UV-Absorption weswegen von Salzkristallen ausgegangen werden musste (b, d). Durch eine limitierte Proteolyse durch die Enzyme Trypsin, Chymotrypsin, Subtilisin und Papain, sollten flexible Bereiche des TCTPs entfernt werden, um die anschließende Kristallisation zu vereinfachen (g). Nach Behandlung mit Subtilisin konnte eine Verbesserung der Kristallisierbarkeit festgestellt werden (h, i).

Weiterhin gewährte dieser proteolytische Ansatz einen Einblick in die mögliche Konformation des Proteins im Hinblick auf strukturell zugängliche Bereiche (185). Getestet wurden die Proteasen Trypsin, Chymotrypsin, Papain und Subtilisin in einer 1:10, 1:100 und 1:1000 Verdünnung. Aus den Kristallstrukturen der TCTP- Homologe ist bekannt, dass im N-terminalen Bereich zwischen Aminosäure 44 und 66 ein größerer *Loop* vorhanden ist, der in den bisherigen Kristallstrukturen auch nicht aufgelöst werden konnte. Dieser *Loop* könnte unter anderem das Kristallsieren des pflanzlichen TCTPs erschweren oder verhindern.

Über die limitierte Proteolyse sollte nun die Protease identifiziert werden, die im Idealfall diesen *Loop* entfernt und im Wesentlichen maximal zwei größere Fragmente nach dem Verdau generierte. Nach Inkubation der Proteasen mit dem TCTP und anschließender SDS-PAGE zeigte sich, dass insbesondere Subtilisin und Papain geeignete Proteasen zu sein schienen (Abbildung 21g). Ein Verdau mit diesen Proteasen führte zur Bildung von hauptsächlich zwei Fragmenten. Eine nachfolgende massen-spektrometrische Analyse dieser Fragmente bestätigte den Nutzen insbesondere vom Subtilisin, da hier

82

offensichtlich nur die *Loop*-Region durch die Protease verdaut wurde. Weiterhin scheint auch bei dem pflanzlichen TCTP dieser *Loop* an der gleichen Stelle konserviert vorzuliegen. Nachfolgend wurde das TCTP mit einer 1:100 Verdünnung vom Subtilisin zusammengegeben und so erneut versucht das Protein unter Verwendung zweier verschiedener *Screens* (JCSG, PACT) zu kristallisieren. Allerdings konnten auch hier nur vereinzelt Salzkristalle und keine Kristallbildung beobachtet werden, die auf ein erfolgreich kristallisiertes Protein hindeutete. Zusätzlich konnten bei 0.2 M Zinkacetat, 0.1 Natriumcacodylat pH 6.5 und 10 % 2-Propanol eine Phasentrennung beobachtet werden, wobei die Tropfen scheinbar kristalline Formen beinhalteten (Abbildung 21i). Diese waren jedoch zu klein, um weitere Versuche damit durchführen zu können. Insgesamt konnte aber eine Verbesserung der Kristallisierbarkeit des TCTPs im Vergleich zum unverdauten Protein festgestellt werden. So zeigen die Bilder in Abbildung 21f als auch 21i die gleichen Kristallisationsbedingungen bei gleicher Proteinkonzentration und Inkubationstemperatur, wobei im Ansatz in Abbildung 21i zusätzlich Subtilisin zum TCTP hinzugegeben wurde. Dieser Verdau des TCTPs führte dazu, dass das vormals präzipitierende TCTP in die Phasentrennung überging und kleine kristalline Nadeln bildete.

Weitere Optimierungen der Kristallisationsbedingungen waren allerdings im Rahmen der Arbeit nicht möglich, jedoch konnten für zukünftige strukturelle Analysen elementare Erkenntnisse aus den durchgeführten Arbeiten gewonnen werden. So interferierte die auffällig hohe Proteinlöslichkeit vermutlich mit der Kristallbildung und ebenso könnte das Fehlen des N-terminalen Methionins die zur Kristallisation benötigten Kristallkontakte verhindern. Eine hohe Proteinlöslichkeit ist häufig der Fall, wenn insbesondere viele geladene Aminosäuren, wie Lysin, Glutamat, Aspartat und Arginin im Wesentlichen die Proteinoberfläche bilden, wodurch eine hohe Solvatisierung des Makromoleküls durch den wässrigen Puffer erreicht wird. Zur Reduzierung der Oberflächenladung und der damit einhergehenden Reduzierung der Löslichkeit des Proteins können zugängliche Aminosäurereste mit Hilfe des Protein Engineering durch andere weniger geladene Aminosäurereste ersetzt werden. Alternativ könnte durch reduktive Methylierung von Lysinen die sonst positiv geladene Seitenkette neutralisiert werden und die Kristallisierbarkeit erhöhen (186). Das Entfernen des N-terminalen Methionins gehört zu den co-translationalen Modifizierungen bei der Proteinbiosynthese und wird durch entsprechende Methionin- Aminopeptidasen (MetAP) vom Protein abgespalten. Das Entfernen des Initiator-Methionins ist substratspezifisch und erfolgt sofern nachfolgend an das initiale Methionin kleine Aminosäuren wie Glycin, Alanin, Serin, Valin, Prolin oder Threonin folgen (187-192). Des Weiteren besteht je nach MetAP-Klasse eine Sequenzerkennung bis zur vierten Position nach dem Methionin.

Aufgrund des auftretenden Klonierungsartefakts bestand der N-Terminus des rekombinanten TCTPs aus den Aminosäuren MGLV anstatt MLV. Durch das zusätzlich an zweiter Stelle inserierte Glycin, bildet sich somit ein hervorragendes Substrat für die *E. coli* MetAPs. Die bereits kristallisierten Konstrukte aus anderen Organismen besaßen nach dem Initiator-Methionin keine entsprechende Aminosäure, die zum Abbau des Methionins führe würde, sondern enthielten im Wesentlichen große

Seitenketten, wie Lysin und Isoleucin (Abbildung 18a). Um ein Entfernen des Initiator-Methionins zu vermeiden, wäre ebenfalls eine Sequenzoptimierung durch Mutagenese an der zweiten Aminosäureposition möglich. Durch Entfernen des Glycins könnte der native N-Terminus wiederhergestellt werden und der wohl mögliche Einfluss auf die Kristallisation durch Fehlen des Methionins beseitigt werden. Als zusätzliche Sequenzoptimierung könnte der zentral gelegene *Loop*, der durch Subtilisin und Papain entfernt werden konnte, aus künftigen Proteinkonstrukten entfernt werden und beide Fragmente durch einen kurzen Glycin-Serin-Linker verknüpft werden, um somit die Flexibilität des Proteins zu reduzieren.

#### 3.2.1.2 SAXS-Analysen am freien und ligandengebundenen TCTP

Da keine befriedigende Kristallbildung zur Strukturaufklärung erreicht werden konnte, wurde nachfolgend versucht die Proteinstruktur in Lösung über SAXS Versuche zu ermitteln. Die Konzentration in den Experimenten wurde ebenfalls zwischen 1 mg/ml bis 5 mg/ml festgelegt und drei verschiedene Konzentrationen gemessen. Im Allgemeinen wird angenommen, dass obwohl geringe Ähnlichkeiten auf Aminosäuresequenz-Ebene vorliegen, strukturell eine hohe Ähnlichkeit besteht (193). Für die genaue Bestimmung der Konformation mittels SAXS wurde neben der Berechnung eines Dummy Atom Modells über Dammif ein in silico-Strukturmodell mit Hilfe des iTasser Servers erstellt (126). Als Berechnungsgrundlage diente das NMR-Modell aus Schizzosaccharomyces pombe (pdb code: 1H6Q). Diese NMR-Struktur wurde als Grundlage für die Berechnungen genutzt, da zum einen die höchste Sequenzübereinstimmung zu dem atTCTP bestand und zum anderen postuliert wurde, dass pflanzliche TCTPs in zwei strukturell unterschiedliche Klassen einzuteilen sind. So teilen sich die Konformationen in atTCTP1-like und cmTCTP-like (Curcubita maxima) auf. Die Differenzierung beider Konformationen erfolgte aufgrund von in silico-Modellen mit Hilfe des Swiss Model Servers (194) und den daraus sichtbaren Unterschieden insbesondere in der Region zwischen der 139. und 149. Aminosäure. So ähnelte das atTCTP der NMR-Struktur von Schizzosaccharomyces pombe und zeigte in diesem Bereich eine offene Tasche, während für das cmTCTP eine dem pfTCTP ähnliche geschlossene Tasche berechnet wurde (Abbildung 22a) (80). Dementsprechend wurde für das atTCTP die NMR-Struktur von Schizzosaccharomyces pombe verwendet und mit der Kristallstruktur vom pfTCTP verglichen (Abbildung 22a und b). Im Vergleich zur Kristallstruktur des TCTP-Homologs aus Plasmodium falciparum (pdb code: 3P3K) zeigen sich nur marginale Unterschiede zum iTasser Modell des atTCTP, was allerdings im Widerspruch zu der postulierten Konformation und damit Klassifizierung des atTCTPs steht. Beide Strukturen zeigten die offene Tasche zwischen der 139. und 149. Aminosäure, obwohl dieser Bereich bei beiden unterschiedlich hätte sein müssen.



Abbildung 22. SAXS-Ergebnisse für das TCTP aus *A. thaliana*. Das TCTP besitzt eine hohe strukturelle Konservierung in allen bislang strukturell untersuchten Homologen. N-terminal zwischen der 40. bis 70. Aminosäure befindet sich in allen Homologen ein hochgradig flexibler *Loop* und konnte über Kristallisationsstudien nicht aufgelöst werden (*pdb code*: 3P3K). Rot umkreist ist die mögliche offene Tasche, die eine Einteilung in atTCTP-1 *like* und cmTCTP-*like* Klassen erlaubte (a). Über *iTasser* wurde ein *in silico*-Modell des atTCTPs (blau) erstellt, mit dem Kristallmodell aus *Plasmodium falciparum* (grün) verglichen und zeigte dabei eine hochkonservierte Faltung auf (b). In das *Dummy Atom* Modell, welches über das Programm *Dammif* von der TCTP-Probe mit EDTA berechnet wurde, konnte die Kristallstruktur gut gefittet werden und stimmte im Wesentlichen mit der Oberflächenstruktur des TCTPs überein, wobei der Bereich des flexiblen *Loops* in der Cartoon-Darstellung fehlt (c und d). Um die Flexibilitätsänderungen des TCTPs nach Zugabe von Magnesium, Calcium und Hemin genauer untersuchen zu können, wurden die SAXS-Daten als dimensionsloser Kratky-Plot dargestellt und die jeweiligen P(r) Funktionen berechnet (e und f). Da der Kratky-Plot eine Änderung der Flexibilität nach Zugabe einzelner Liganden zeigte, wurde über das Programm *EOM* versucht den fehlenden *Loop* in den jeweiligen Proben zu rekonstruieren, um eine Aussage zu den Auswirkungen der Liganden auf die *Loop*-Flexibilität treffen zu können (g).

Da zur Modellbildung ein anderer Server verwendet wurde, könnte die widersprüchliche Strukturberechnung auf verschiedene Berechnungsmethoden zurückgeführt werden und somit eventuell keine Rückschlüsse auf mögliche Konformationsklassen erlauben.

Erst durch den Vergleich hochauflösender Kristallstrukturen könnte somit eine Aussage über geschlossene und offene Konformationen getroffen werden.

Im Wesentlichen besteht die Struktur aus insgesamt sieben bis neun  $\beta$ -Faltblättern und vier  $\alpha$ -Helices mit einem großen *Loop* zwischen der 44. und 66. Aminosäure (Abbildung 22a und b) (86). Dieser zentrale große *Loop* wurde aus der Berechnung herausgenommen, da dieser aufgrund der hohen Flexibilität unter Umständen nicht die Konformationen annehmen könnte, wie das TCTP aus der Hefe, was als Berechnungsgrundlage fungierte.

Zur Überprüfung des *iTasser* Modells und um eine Abschätzung der möglichen *Loop*-Konformationen zu erlangen, wurde ein erstes *Dammif Dummy Atom* Modell aus den gemessenen SAXS-Daten erstellt. Das *Dummy Atom* Modell spiegelt dabei die äußere Form des Proteins in Lösung wider. Als Vergleich wurde das Oberflächenmodell vom *Plasmodium falciparum* TCTP erstellt (Abbildung 22c). In Abbildung 22d wird gut sichtbar, dass zum einen die äußere Form des generierten SAXS-Modells sehr gut mit der Oberflächenstruktur des *P. falciparum* Proteins übereinstimmte und zum anderen das jene Kristallstruktur komplett durch das *ab inito*-Modell abgedeckt werden konnte. Weitere Auffälligkeiten sind darüber hinaus, dass der zentrale *Loop*, der durch die Kristallstruktur nicht beschrieben werden kann, in dem *ab initio*-Modell sichtbar war und auch in Form und Größe dem berechneten *Loop* entspricht.

Neben dem *Loop* konnte ebenfalls der C-terminal gelegene, artifizielle *HisTag* im *ab initio*-Modell wiedergefunden werden. Da über die CD-Messungen keine Unterschiede zwischen freiem TCTP und TCTP mit den Liganden Calcium, Magnesium und Hemin feststellbar waren, wurden zur Überprüfung, ob diese Liganden zumindest die Flexibilität des Proteins, insbesondere im Bereich des großen *Loops*, beeinflussen, SAXS-Messungen mit den genannten Additiven durchgeführt.

Die Bindung von Calcium im ungeordneten Bereich in der Nähe der  $\alpha$ -Helices führt zu einem monomer vorliegenden Protein, während die Heminbindung eine Dimerisierung induziert (84, 195). Als Kontrolle diente TCTP, welches zuvor mit EDTA behandelt wurde. Der dimensionslose Kratky-Plot, erstellt aus den ermittelten SAXS-Daten, zeigte, dass im Gegensatz zum zuvor untersuchten At1g64370 ein vergleichsweise kompaktes Protein vorlag, das nur wenige flexible Bereiche aufwies (Abbildung 22e). Als Kontrolle wurde erneut BSA verwendet. Alle TCTP-Proben zeigten den gleichen typischen Verlauf wie BSA, mit dem Unterschied, dass das Maximum nicht, wie es für kompakte, globuläre Proteine zu erwarten ist, bei  $\sqrt{3}$  lag, sondern geringfügig zu höheren sR<sub>g</sub>-Werten verschoben vorlag. Darüber hinaus zeigten die Proben untereinander teilweise starke Unterschiede im weiteren Verlauf. Während die mit EDTA behandelte Probe nach dem lokalen Maximum bei etwa sR<sub>g</sub> = 2 und anschließendem Abfall der Kurve einen stetig steigenden Kurvenverlauf bei höheren sR<sub>g</sub> Werten annahm, war dieser Anstieg bei der mit Magnesium, Calcium und Hemin behandelten Probe fortwährend schwächer. Diese

Unterschiede im Kratky-Plot könnten darauf hindeuten, dass durch Binden der Liganden bestimmte Konformationen des TCTPs stabilisiert werden, sodass die Flexibilität des Proteins. wahrscheinlich hauptsächlich der Bereich des großen Loops zwischen

 Tabelle 13. Ermittelte Dimensionen und Molekulargewichte für die einzelnen TCTP Proben durch SAXS.

Ligand	R <sub>g</sub> (nm)	D <sub>max</sub> (nm)	V <sub>p</sub> (nm³)	Mm <sub>exp</sub> (kDa)	Mm <sub>calc</sub> (kDa)
EDTA	$2.14 \pm 0.04$	6.5 ± 0.5	48.1 ± 2	18 ± 2	19.9
Mg	2.08 ± 0.02	6.3 ± 0.5	43.2 ± 2	17 ± 2	19.9
Са	2.15 ± 0.05	6.0 ± 0.5	48.1 ± 2	13 ± 5	19.9
Hemin	2.19 ± 0.10	6.0 ± 0.5	48.1 ± 5	17 ± 2	19.9

den Aminosäureresten 44 und 66, beeinflusst wurde. Eine Dimerisierung des TCTPs nach Binden des Hemins konnte hier über die SAXS-Messungen nicht beobachtet werden. Ebenso konnten für die weiteren Liganden keine Unterscheide bezüglich des Oligomerisierungszustandes detektiert werden. Als Indiz für eine etwaige Dimerisierung oder weitere Oligomerisierung wurde wie beim At1g64370 zum einen die Gyrationsradien und zum anderen die aus der Intensität I(0) berechnete Molekülmasse bestimmt (Gleichung Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden., Tabelle 13). Auch über die Berechnung von d<sub>max</sub> über die P(r) Funktion konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Proben beobachtet werden (Abbildung 22f). Der Verlauf der Funktion ist nahezu charakteristisch für kompakte Proteine und besaß eine annähernd Gauß'sche Verteilung. Da, wie bereits im Kratky-Plot zu sehen war, noch flexible Regionen im Protein vorhanden sind, ist die mittlere Abstandverteilung zu größeren Werten hin verschoben. Insgesamt konnte angenommen werden, dass der beobachtete Flexibilitätsverlust, der bei Anwesenheit von Calcium und Hemin stärker und bei Magnesium schwächer ausfiel, auf das Binden der Liganden am monomeren Protein zurückzuführen war, wodurch die Loop-Region wahrscheinlich stabilisiert wurde. Inwiefern sich explizit der hoch flexible Loop infolge der Ligandenbindung veränderte, wurde über weitere Berechnungen mittels der EOM Methode ermittelt.

Hierfür wurde der kompakte Teil des Proteins mit der Kristallstruktur vom *P. falciparum* TCTP als *rigid body model* zunächst fixiert, so dass nur die *Loop*-Region als flexibler Bereich aus den SAXS-Daten berechnet wurde. Die berechneten mittleren Gyrationsradien der unterschiedlichen Proben zeigten erneut kaum Abweichung untereinander, waren jedoch im Vergleich zum zuvor berechneten Pool zu geringfügig größeren R<sub>g</sub>-Werten verschoben und zeigten eine bimodale Verteilung (Abbildung 22g). Für die mit EDTA behandelte TCTP-Probe konnten zwei wahrscheinliche Konformationen des *Loops* berechnet werden ( $\chi^2 = 1.141$ , R<sub>flex</sub> (*random*): 70.2 % (90.1 %), R<sub>\sigma</sub>: 0.54). Allerdings fiel auf, dass diese Konformationen stark voneinander abwichen. Während bei der wahrscheinlichsten Konformation (68 %) der *Loop* zur Seite weggeklapptvorliegt, ist eine nach oben hin offene *Loop* Form, wie sie auch durch das *Dummy Atom* Modell vorhergesagt wurde, nur zu 32 % wahrscheinlich. Insgesamt lag somit eine hohe Variabilität der *Loop*-Konformationen vor. Magnesium als potentiell nicht bindender Ligand zeigte bereits mehrere mögliche Konformationen des *Loops*, die alle zwischen der zur Seite weggeklappten und der offenen Konformation lagen ( $\chi^2 = 1.022$ , R<sub>flex</sub> (*random*): 77.9 % (90.5 %), R<sub>\si</sub>: 0.68). Bei Anwesenheit der bekannten Liganden Calcium und Hemin konnten drei und sogar vier mögliche *Loop*-Konformationen berechnet werden, die nun allerdings allesamt der offenen elongierten Konformation ähnlich waren und nicht mehr zur Seite weggeklappt schienen (Calcium:  $\chi^2 = 1.186$ , R<sub>flex</sub> (*random*): 68.8 % (90.5 %), R<sub> $\sigma$ </sub>: 0.42; Hemin:  $\chi^2 = 1.533$ , R<sub>flex</sub> (*random*): 68.8 % (88.3 %), R<sub> $\sigma$ </sub>: 0.44). Die erhaltenen R<sub>flex</sub>-Werte unterstützen die Annahme, dass die *Loop*-Region bei Anwesenheit von den bindenden Liganden insgesamt weniger Flexibilität besitzt als vermutet. Mit einer durchschnittlichen Flexibilität von 68 % konnte angenommen werden, dass weder komplett zufällige Konformationen in dieser Region vorherrschen noch, dass diese Region starr vorliegt.

Die berechneten  $R_{flex}$ -Werte lagen allesamt unterhalb des *Pools* bei gleichzeitigen  $R_{\sigma}$ -Werten von unter 1. Diese Kombination der  $R_{flex}$ - und  $R_{\sigma}$ -Werten sind zwar abweichend von denen, wie sie beim At1g64370 beobachtet wurden (Abbildung 17c), sind jedoch für Systeme mit geringerer Flexibilität trotzdem als richtig anzunehmen (175). Die durch die *EOM* Methode ermittelten Konformationen bei der Bindung von Hemin und Calcium korrelierten sehr gut mit dem bereits im Kratky-Plot vermuteten Flexibilitätsverlust, bedingt durch das Binden der Liganden. In Kombination mit den CD-Ergebnissen kann somit angenommen werden, dass die bereits beschriebenen Liganden vom TCTP (Calcium und Hemin) zwar keine signifikanten strukturellen Veränderungen induzierten, wie es für das TCTP aus *H. sapiens* beobachtet wurde, jedoch die Bindung einen Einfluss auf die Flexibilität, insbesondere des *Loops* besaß. Änderungen der Flexibilität können über CD-Messungen nur schwer beobachtet werden, sofern keine Änderungen in der Sekundärstruktur auftreten. Erst durch die anschließenden SAXS-Messungen konnte dieser Effekt eindeutig für beide Liganden nachgewiesen werden, weswegen erst die Kombination beider Messungen, die sich gegenseitig ergänzten, ein zum Teil anderes Bild der Ligand-Protein-Wechselwirkungen zeigten, als das, was für homologe Proteine bereits beschrieben wurde.

Die über SAXS bestimmte Flexibilität der *Loop*-Region könnte die bislang nicht erfolgreiche Kristallisation des TCTPs aus *A. thaliana* erklären. Obwohl große Mengen von hochreinem und monodispersem Protein hergestellt und eine Proteinlöslichkeit von bis zu 200 mg/ml beobachtet werden konnte, könnten die identifizierten, flexiblen Bereiche die Entstehung der Kristall-*Nuclei* inhibieren. Obwohl Hemin und auch Calcium die *Loop*-Region zu bestimmten Konformationen hin stabilisieren konnten, konnte kein positiver Effekt dieser Liganden auf die Kristallisierbarkeit beobachtet werden. Sowohl Hemin, als auch Calcium wurden zu Kristallisationsansätzen hinzugegeben und die gleichen *Screens,* bei gleicher Temperatur und gleichen Proteinkonzentrationen durchgeführt. Trotzdem wurden keine signifikanten Unterschiede zu den Kristallisationsversuchen vom freien TCTP festgestellt.

## 3.2.2 *In vitro*-Interaktionsstudien zur Identifizierung von Interaktionspartnern des TCTPs aus *A. thaliana*

Da die Bindung der in Pflanzen vorkommenden TCTP-Homologe an Hemin, was in anderen Organismen eine Dimerisierung des Proteins bedingt, bisher noch nicht untersucht wurde, ist über die Bindungsaffinität des pflanzlichen TCTPs bisher nichts bekannt. Somit könnte die bei der strukturellen Charakterisierung des atTCTPs nicht beobachtete Dimerisierung auch durch eine schwächere Bindung dieses Liganden an das Protein zu erklären sein. Eine niedrigere Affinität könnte zwar die Flexibilität reduzieren, wie über die SAXS-Messungen bestätigt werden konnte, aber die eingesetzten 50 µM Hemin könnten unzureichend gewesen sein, um die Dimerisierung zu induzieren. Daher wurde die Stärke der Bindung des TCTPs zum Hemin anschließend näher untersucht. Außerdem sollten Protein:Protein-Interaktionen des TCTPs untersucht werden, um geeignete Kandidaten für zukünftige Ko-Kristallisationsexperimente zu identifizieren. Darüber hinaus wurde in Kooperation mit der AG Willmitzer (MPI Potsdam-Golm) auch nach pflanzlichen niedermolekularen Interaktionspartnern gesucht, die möglicherweise anstelle des in Pflanzen eher weniger vorkommenden Hemins an das atTCTP binden.

#### 3.2.2.1 Identifizierung von Protein: Protein-Interaktionen im Phloemsaft von Brassica napus

Zur Identifizierung von Protein:Protein-Interaktionen wurde das TCTP aus A. thaliana über Pull-down und Far-Western Experimente mit Pflanzenextrakt als auch Phloemsaft behandelt. Zur Identifizierung stabiler Proteininteraktionen wurden zunächst Pull-down Experimente durchgeführt, wobei das Protein an einer Nickel-NTA-Matrix immobilisiert und mit Phloemsaft beziehungsweise Pflanzenextrakt behandelt wurde. Allerdings konnten aufgrund der Vielzahl bindender Proteine, die in der Negativkontrolle (ohne TCTP) an der Matrix zu finden waren, keine stabilen Interaktionen identifiziert werden. Weiter kam erschwerend hinzu, dass für das Minimieren dieser unspezifischen Bindungen höhere Salzkonzentrationen notwendig waren (>300 mM), die unter Umständen für schwächere Interaktionen mit dem TCTP zu hoch waren. Eine Beobachtung, die für alle durchgeführten Pull-Down-Assays mit Pflanzenextrakt aus Arabidopsis zutraf, war, dass das TCTP scheinbar sehr stabile Dimere bildete, die auch in der anschließenden SDS-PAGE nicht aufgetrennt werden konnten. Auch könnten etwaige Interaktionspartner auf Größe des dimeren TCTPs somit nicht beobachtete werden. Da Pulldown Experimente insbesondere für den Nachweis von starken Wechselwirkungen zwischen Proteinen geeignet sind und transiente als auch moderate Interaktionen nicht detektiert werden können, wurden weitere Interaktionspartnersuchen über modifizierte Far-Western Versuche durchgeführt (125, 196, 197). Diese Methode basiert auf der Detektion eines Köderproteins (Bait) über einen Western Blot, welches zuvor an die spezifischen Interaktionspartner in einer Probe gebunden hat.



Abbildung 23. Coomassie gefärbtes SDS/-Gel und *Far-Western Blot*. Konzentrierter Phloemsaft wurde über eine zweidimensionale Urea/SDS-PAGE aufgetrennt, über Coomassie angefärbt (a) oder anschließend auf eine PVDF Membran geblottet. Nach anschließender Neufaltung und Inkubation mit TCTP wurde das gebundene TCTP über einen *HisTag*-spezifischen Zweitantikörper über eine chemilumineszente Reaktion detektiert (b). Aus dem Coomassie gefärbten Gel wurden die korrespondierenden Spots vom *Blot* (b) ausgestochen und über die MALDI-TOF Massenspektrometrie identifiziert.

Dazu wurde die Proteinprobe mit den möglichen Interaktionspartnern, in diesem Fall mit Phloemsaft aus Raps, zunächst in einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Membran (Nitrocellulose oder PFDF) transferiert. Da jedoch das Phloemproteom äußerst komplex ist, wurde anstelle einer einfachen SDS-PAGE eine zweidimensionale Urea/SDS-PAGE durchgeführt. Durch die doppelte Denaturierung der Probe über zwei verschiedene Methoden und den unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen des Gels konnten hydrophilere von hydrophoberen Proteinen getrennt werden und erschienen als einzelne Spots im Gel (198). Proteine die weder besonders hydrophil noch hydrophob sind konzentrieren sich dabei in einer Diagonalen im Gel, während hydrophile Proteine in der zweiten Dimension im Gel unterhalb und hydrophobere oberhalb der Diagonalen zu finden sind.

Hierdurch konnten die Proteine der komplexen Phloemprobe deutlich besser voneinander getrennt werden, was die anschließende massenspektrometrische Analyse deutlich vereinfachte.

Bei Protein:Protein-Interaktionen wird zwischen stabilen, hochaffinen, moderat affinen und transienten Bindungen unterschieden. Bei den häufigsten Interaktionspartnersuchen *in vitro* können teilweise nur hochaffine, stabile Interaktionen nachgewiesen werden. Transiente und moderat affine Bindungen sind häufig nicht detektierbar. Der Vorteil des *Far-Western* Ansatzes ist die Möglichkeit auch moderat affine Bindungen nachzuweisen (199). Auch transiente Interaktionen können zum Teil über diese Methode identifiziert werden. Um dies zu ermöglichen musste die auf eine Membran transferierte Phloemproteinprobe zunächst über Nacht renaturiert werden und nach Zugabe des *Bait*-Proteins (TCTP) wurde ein *Crosslinker* hinzugegeben. Der *Crosslinker* (Glutaraldehyd und EDC) diente zur chemischen und irreversiblen Vernetzung der interagierenden Proteine über Amin- oder Carboxylgruppen (200, 201). Folglich wurde in den nachfolgenden Waschschritten weniger *Bait*-Protein abgewaschen und konnte später detektiert werden.

Zur Detektion des gebundenen TCTPs wurde ein *HisTag*-spezifischer primärer Antikörper verwendet, der den C-terminalen *HisTag* vom rekombinant hergestellten TCTP erkannte.

**Tabelle 14. Identifizierte TCTP-Interaktionspartner über** *Far-Western Blots.* Neben bereits bekannten Interaktionen aus anderen Organismen, konnten einzelne neue mögliche Interaktionen identifiziert werden. Analysiert wurde aus mehreren Blots, die entweder mit alkaliner Phosphatase oder HRP entwickelt wurden, insgesamt zehn Spots, die teilweise mehrere Proteine enthielten. Abkürzungen: *Brassica napus: B. napus, Brassica oleracea: B. oleracea, Brassica rapa: B. rapa*, Detektion mittels alkaliner Phosphatase: AP, Detektion mittels *Horseradish Peroxidase*: HRP, Coimmunpräzipitation: CoIP, *Yeast-Two-Hybrid*: Y2H, *Crosslink*: CL.

Spot	Protein	Acc. No.	MW <sub>exp</sub> [kDa]	MW <sub>obs</sub> [kDa]	Organism	Detection Method	MASCOT Score	Known interaction
1	Histidine-rich glycoprotein	XP_009105086.1	28	35	B. rapa	EDC-Far- Western/AP	119	
2	Annexin D1-like	NP_001303102.1	37	37	B. oleracea	EDC-Far- Western/AP	107	
2	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	XP_013600147	36	37	B. napus	EDC-Far- Western/AP	113	CoIP (202)
3	Cystine lyase CORI3	CDY69765.1	47	47	B. napus	EDC-Far- Western/AP	177	
4	HSP 90-2	XP_013628650.1	80	80	B. oleracea	EDC-Far- Western/AP	114	
4	MS1	XP_013728797.1	85	80	B. napus	EDC-Far- Western/AP	118	
A1	Rubisco large chain	AHY18972.1	54	62	B. rapa	EDC-Far- Western/HRP	126	
A1	Tubulin α-3	XP_013721970.1	52	62	B. napus	EDC-Far- Western/HRP	154	CoIP (202, 203)
A1	Eukaryotic translation initiation factor 1α	CDY58828.1	63	62	B. napus	EDC-Far- Western/HRP	112	Y2H (204) CoIP (202)
A2	Rubisco Große Untereinheit	KJ473492.1	54	58	B. rapa	EDC-Far- Western/HRP	132	
A2	UTP-Glucose-1- phosphate Uridylyltransferase 2	XP_013637785	52	58	B. oleracea	EDC-Far- Western/HRP	96	
A2	Tubulin α-6	NP_001302943	49	58	B. napus	EDC-Far- Western/HRP	97	CoIP (202, 203)
A3	Adenosylhomo- cysteinase 1	CDY50423.1	53	70	B. napus	EDC-Far- Western/HRP	93	
B1	cystine lyase CORI3	XP_013718098	36	42	B. napus	EDC-Far- Western/HRP	131	
B1	Sulfotransferase	XP_013590640	38	42	B. oleracea	EDC-Far- Western/HRP	95	
B2	Aktin 7	NP_001302939	42	40	B. napus	EDC-Far- Western/HRP	198	CL (205) CoIP (202)
B3	cystine lyase CORI3	XP_009108611	48	48	B. rapa	EDC-Far- Western/HRP	237	

Durch Binden eines Sekundärantikörpers an den Primärantikörper, der entweder mit der alkalinen Phosphatase (AP) oder der *Horseradish Peroxidase* (HRP), konjugiert vorlag, konnte mittels kolorimetrischer, beziehungsweise chemilumineszenter Detektion mögliche interagierende *Spots* sichtbar gemacht werden. Der *Blot* wurde mit einem parallel angefertigtem und mit kolloidalem Coomassie gefärbten SDS-Gel aus der zweiten Dimension, überlagert und die übereinstimmenden *Spots* ausgestochen und über MALDI-TOF massenspektrometrische Analysen näher untersucht. Erste Versuche das gebundene TCTP mit einem alkaline Phosphatase-konjugierten Sekundärantikörper zu detektieren führten nur zu äußerst schwachen Signalen auf dem *Blot*, deren korrespondierende *Spots* im Coomassie gefärbten Gel nur abgeschätzt werden konnten.

Insgesamt fünf Signale zwischen 25 und 80 kDa konnten entsprechenden *Spots* im Coomassie Gel zugeordnet werden (Gel nicht gezeigt, *Spots* 1-5, Tabelle 14). Die nachfolgende Proteinidentifizierung ergab das *Histidine-rich Glycoprotein*, Annexin D1, Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, die Cystine Lyase CORI3, HSP90 und MS1 als mögliche Interaktionspartner für das TCTP im Phloemsaft.

Da wie bereits erwähnt die Detektion mit Hilfe der alkalischen Phosphatase nur zu sehr schwachen Signalen führte wurde der Versuch wiederholt und statt der alkalischen Phosphatase ein Sekundärantikörper mit konjugierter *Horseradish Peroxidase* (HRP) verwendet. Die anschließend erhaltenen Signale aus der chemilumineszenten Reaktion von Luminol und  $H_2O_2$  mit Hilfe der Peroxidase waren stark genug um diese eindeutig einzelnen *Spots* auf dem Coomassie gefärbten Gel zuzuordnen (Abbildung 23). Unter den in insgesamt sechs sichtbaren *Spots* konnten 11 Proteine im gleichen Größenbereich identifiziert werden (Spots A1 – B3, Tabelle 14). Als Kontrolle wurde At1g64370 als weiteres *Bait* Protein verwendet um falsch-positive Interaktionen auszuschließen. Zu den hier identifizierten Proteinen gehörten das Tubulin alpha 3 und alpha 6, Aktin 7 als auch der eukaryotische Translation Initiationsfaktor 1 $\alpha$  (EEF1A).

Alle vier Proteine wurden bereits in früheren Proteomstudien im Phloem von Raps nachgewiesen und sind aus vorhergehenden Studien mit menschlichem TCTP und Plasmodium-Homologen in Yeast-Two Hybrid (Y2H), Coimmunpräzipitations- (CoIP) und Crosslink (CL) Experimenten als TCTP-Interaktionspartner bekannt (48, 202-205). Jedoch wurden diese Interaktionen noch nicht in Pflanzen, beziehungsweise im Phloem nachgewiesen. Dieser Nachweis der gleichen Interaktionen ist dahingehend interessant, da die Aminosäuresequenz zwischen dem menschlichen und dem pflanzlichen TCTP nur zu etwa 33 % identisch ist. Die Bindung an den eEF1a wird angenommen dient dem tRNA Channeling der aminoacylierten tRNA (204). TCTP bindet hauptsächlich an die inaktive, GDP-gebundene Form des eEF1a welche deacylierte tRNA bindet (206). Durch Binden des TCTPs soll die Aktivierung des eEF1a infolge der Bindung von GTP unterdrückt werden. Dadurch soll eine mögliche Interaktion des eEF1a mit anderen Komponenten der Translation unterdrückt werden und so den Austausch der deacylierten tRNA zu einer acylierten tRNA fördern, was zur Steigerung der Translationsgeschwindigkeit beitragen soll (204). Hierbei dient das TCTP als Guanine nucleotide dissociation inhibitor (GDI). Im Gegensatz zur Bindung an den eEF1a soll die Bindung an Tubulin als auch Aktin zur Regulierung der Zellform dienen, da die Bindung des TCTPs die Polymerisierung der Aktin und Tubulin-Bündel stabilisiert (207). Als weitere mögliche Interaktionspartner konnten über den Far-Western Blot die große Untereinheit von RubisCo, die Adenosylcysteinase 1, die UTP-Glucose-1-Phophat Uridylyltransferase 2 und die Sulfotransferase 2 identifiziert werden. Daneben konnte auch CORI3 erneut nachgewiesen werden. Drei weitere Signale bei etwa 25 kDa konnten keinem Protein eindeutig zugeordnet werden, da die einzelnen Spots mehrere Proteine enthielten und die massenspektrometrische Analyse unmöglich machte. Ebenso konnte die MS/MS Analyse einzelner Peptide keinen weiteren Aufschluss über die vorliegenden Proteine geben, da die ausgewählten Parent Ions zum Teil schlecht fragmentierten oder unzureichend einem Protein zugeordnet werden konnten. Da die Lokalisierung der drei Spots mit denen aus dem Blot mit der alkalinen Phosphatase-Detektion übereinstimmten, konnte angenommen werden, dass es sich bei den dort vorkommenden Proteinen um die gleichen handelte, die bereits in Spot 1-3 identifiziert wurden. Sowohl das Histidine-rich Glycoprotein als auch CORI3 wurde als Interaktionspartner für das TCTP ausgeschlossen, da beide Proteine auch in der Kontrolle mit dem At1g64370 identifiziert wurden. Da ein *HisTag*-spezifischer Antikörper zur Detektion des gebundenen TCTPs verwendet wurde, wurde vermutet, dass insbesondere das *Histidine-rich Glycoprotein*, das mehrere Histidin-reiche Sequenzbereiche besitzt, die ein Binden des Antikörpers ermöglichen könnten, durch diesen Antikörper und nicht durch das TCTP gebunden wurde. In diesem Bereich wurde außerdem die Glyceraldehyde-phosphate Dehydrogenase (GAPDH) identifiziert, die durch Li *et al.* als möglicher Interaktionspartner des TCTPs über CoIP mit anschließender LC-MS/MS Analyse bereits identifiziert wurde (202). GAPDH als Bestandteil der Glykolyse besitzt interessanterweise neben der Dehydrogenaseaktivität eine weitere trans-Nitrosylase-Aktivität, wodurch eine eigene Nitrosylierung am Cystein auf andere Proteine übertragen werden kann (208, 209).

Ob die nitrosylierte GAPDH oder die nicht-nitrosylierte Form möglicherweise mit dem TCTP interagieren könnte, ist bislang nicht weiter bekannt und müsste über weitere *in vitro* Interaktionsstudien überprüft werden. Da Nitrosylierungen am Cystein bereits bei niedrigen Energien in MALDI-TOF MS Analysen fragmentieren, konnte eine mögliche Nitrosylierung der GAPDH im Phloemsaft bisher nicht direkt bestimmt werden (210).

Das ebenfalls auf der Höhe von 37 kDa identifizierte Annexin D 1-*like* Protein könnte auf Grund von Ungenauigkeiten bei der Zuordnung der Spots, infolge der schwachen Signale im Blot, ein falschpositives Signal sein. Allerdings wurde das Annexin B10 aus *Drosophila melanogaster* über *Affinity Capture* Massenspektrometrie-Versuche als Interaktionspartner für das TCTP bereits identifiziert (211). Weitere *in vitro* als auch *in vivo* Versuche müssten die Interaktion zwischen Annexin D1 und TCTP jedoch weiter bestätigen, da bislang keine weiteren Informationen über diese Interaktion bekannt sind. Annexin B10 ist ebenfalls wie das TCTP ein Aktin-Binder und bindet darüber hinaus Calcium und Phospholipide (212, 213). Welche Rolle dabei die Bindung von TCTP an das Annexin B10 spielt, ist weiterhin unbekannt. Annexin D1 im Gegensatz dazu besitzt neben der Calcium und Phospholipid-Bindeaktivität eine zusätzliche Peroxidaseaktivität und ist insbesondere bei verschiedenen abiotischen Stressarten beteiligt, wie Kälte, Hitze, Trockenheit und Salzstress (214, 215). Eine Bindung an Aktin, wie für das Annexin B10 beschrieben, ist nicht bekannt.

Die beiden übrigen identifizierten Interaktionspartner bei etwa 80 kDa sind ebenfalls noch nicht als mögliche Interaktionspartner bekannt. Da das TCTP mit anderen *Heat shock* Proteinen interagieren kann, könnte angenommen werden, dass auch hier eine Interaktion mit dem HSP90 durchaus realistisch wäre (202, 216). Die darüber hinaus im selben *Spot* identifizierte Vitamin B12-unabhängige Methionin Synthase (MS1) Protein wurde zur Überprüfung der putativen Interaktion mit dem TCTP ebenfalls rekombinant in *E. coli* hergestellt, aufgereinigt und anschließend die Interaktion über Gelfiltrationsversuche überprüft. Dabei wurden beide Protein in 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT als auch in Gegenwart von nativem Pflanzenextrakt aus *A. thaliana* inkubiert und versucht den Proteinkomplex zu isolieren. Allerdings konnte in keinem Gelfiltrationsexperiment, welches selbst moderat affine Interaktionen auflösen kann, eine Interaktion zwischen beiden Proteinen beiden Proteinen

Western Blot möglicherweise zwischen dem TCTP und dem HSP90 und nicht dem MS1 stattfand, welche im selben *Spot* vertreten waren. Dies müsste jedoch weiter untersucht werden. Im Gegensatz zu den mit der AP detektierten Blots, konnten mittels HRP-Detektion mehrere eindeutig, bestätigte Interaktionspartner aus anderen Organsimen auch für das pflanzliche TCTP gefunden werden. Hierzu zählten das Tubulin  $\alpha$  3 und 6, Aktin als auch der eEF1a (202–205). Da erneut mehrere Proteine pro Spot identifiziert wurden, jedoch in jedem Spot mindestens ein bereits beschriebener Interaktionspartner gefunden wurde, wurden alle weiteren Proteine als falsch-positive Interaktionen gewertet. Hierzu gehörte erneut auch das CORI3, welches in mehreren Spots zu finden war. Drei weitere Signale auf der gleichen Höhe, die auch bei anderen durchgeführten *Blots* mit anschließender AP-Detektion bereits beobachtet und identifiziert wurden (*Spots* 1 und 2, Tabelle 14), konnten in diesem Fall nicht erneut gefunden werden.

Mithilfe der Far-Western Blotting Methode konnten somit mehrere Interaktionspartner für das TCTP identifiziert werden, die aus anderen Organsimen und Geweben bereits bekannt sind, jedoch bislang in Pflanzen als Interaktionspartner noch nicht identifiziert wurden. Aufgrund der großen Unterschiede in der Aminosäuresequenz der bereits charakterisierten TCTPs und der pflanzlichen TCTP-Homologe sowie der Tatsache, dass auch falsch positive Signale detektiert wurden, ist es wichtig die Interaktion über in vitro-Studien noch genauer zu analysieren. Außerdem spielen posttranslationale Modifizierungen möglicherweise eine Rolle bei der Interaktion. So könnten zum Beispiel bestimmte Bindungen des TCTPs nicht beobachtet worden sein, weil entweder das Zielprotein oder aber das TCTP nicht die entsprechende Modifizierung trug, die eine Interaktion erst ermöglicht. Eine falsch-positive Detektion im Far-Western Blot ist außerdem an mehreren Stellen möglich. Infolge der Denaturierung und des erforderlichen Renaturierungsschrittes könnten mögliche Epitope, die in vivo nicht zugänglich sind, in den einzelnen Proteinen nun zugänglich sein, die vom TCTP erkannt werden und dieses im bindet. Für die Renaturierung der Proteine wurden absteigendende Anschluss daran Guanidiniumchlorid-Konzentrationen verwendet, um die denaturierten Protein auf der Membran stufenweise neu zu falten. Allerdings ist Guanidiniumchlorid ein stark denaturierendes Agens, dass selbst bei niedrigen Konzentrationen denaturierend wirkt. Alternativ hätte Harnstoff genutzt werden können, das nur bei höheren Konzentrationen denaturierende Eigenschaften besitzt. Jedoch hat Harnstoff den Nachteil das spontan Carbamylierungen an den Proteinen auftreten, die die Protein-Interaktionen stören. Daher wurde, obwohl eine effizientere Neufaltung gewähreistet werden könnte, auf Harnstoff verzichtet und stattdessen das Guanidiniumchlorid verwendet. Darüber hinaus kann durch den verwendeten Primärantikörper, der den 6xHisTag am TCTP bindet, ein falsches Signal detektiert werden, da dieser anstelle des getaggten TCTPs an ähnliche Epitope binden könnte. Neben den identifizierten Proteinen konnten noch weitere Signale im Blot beobachtet werden. Diese jedoch waren nicht eindeutig über MALDI-TOF massenspektrometrische Messungen identifizierbar, da in diesen Spots nicht einzelne, sondern mehrere Proteine vorhanden waren. Dadurch, dass zur Analyse der Interaktionspartner der Far-Western Blot und das SDS-Gel separat durchgeführt wurden, war es aufgrund der nicht exakten Deckungsgleichheit des *Blots* und des Gels zum Teil schwierig den Signalen im *Blot* den richtigen *Spots* im Gel zuzuordnen, wodurch Interaktionspartner leicht verwechselt werden konnten.

#### 3.2.2.2 Nachweis niedermolekularer Liganden aus Pflanzenextrakt von A. thaliana.

Neben den bekannten Proteinen als Interaktionspartner sind für das TCTP auch niedermolekulare Liganden bekannt, die bereits durch SAXS-Messungen untersucht wurden. Zu den bekannten Liganden zählen Calcium, Hemin als auch Artemisinin (84, 86, 87, 217). Dabei stabilisiert die Calciumbindung am humanen TCTP als auch am *Plasmodium*-Homolog die monomere Form in Lösung, während die Bindung von Hemin eine Dimerisierung induziert (84). Artemisinin als weiterer Ligand hingegen führt zu kovalent verknüpften Dimeren, Trimeren und höheren Oligomeren insbesondere in Kombination mit Hemin (85, 86).

Hemin und Calcium wurden bereits näher durch SAXS-Messungen am Protein untersucht. Hier konnte keine Dimerisierung des Proteins in Gegenwart von Hemin gemessen werden. Stattdessen schien die Loop-Region bei Anwesenheit von Hemin an Flexibilität zu verlieren, wobei die elongierte Form des Loops scheinbar stabilisiert wurde. Als weitere Überprüfung der Oligomerisierung des TCTPs wurden Gelfiltrationsexperimente, wie bei Lucas et al. beschrieben, durchgeführt (84). Ob ähnliche Liganden in Pflanzen eine Dimerisierung induzieren können wurde ebenfalls getestet. Hierfür wurde rekombinant hergestelltes TCTP mit zuvor frisch hergestelltem Pflanzenextrakt aus Blattgewebe in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 0.05 % Triton-X, 10 % Glycerol bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert, abzentrifugiert und erneut über eine Gelfiltrationssäule der Größe nach fraktioniert. Bereits nach der Zentrifugation fiel auf, dass ein Großteil des TCTPs präzipitiert war. Für die noch löslich vorliegende TCTP-Probe konnte in der Größenausschlusschromatographie jedoch keine Dimerisierung beobachtet werden. Allerdings enthielt das vor der Gelfiltration abzentrifugierte Proteinpellet verschiedene kovalent vorliegende TCTP-Aggregate, die selbst unter den denaturierenden Bedingungen während der SDS-PAGE erhalten blieben (Abbildung 24b). Sowohl monomeres, dimeres, trimeres als auch höhere Oligomere waren in dieser Probe deutlich sichtbar. Diese Beobachtung ist umso erstaunlicher, da dieselbe Beobachtung von SDS stabilen TCTP-Oligomeren bei der Bindung von Artemisinin und Artemisinin-Derivaten an die TCTP-Homologe aus Plasmodium und Mensch gemacht wurde (85, 86).



Abbildung 24. Nachweis niedermolekularer Hemin-ähnlicher Liganden im Pflanzenextrakt aus *A. thaliana* über Gelfiltrations- und *Pull-down* Experimente. Das TCTP wurde für den Nachweis einer Dimerisierung nach Binden von Hemin über eine Gelfiltration der Größe nach aufgetrennt. Vergleicht wurde die Hemin-behandelte Probe mit frisch aufgereinigtem TCTP, als auch mit Pflanzenextrakt behandeltem TCTP (a). Für die Hemin Probe konnte eine kleine Schulter vor dem eigentlichen Peak beobachtet werden, die ebenfalls das TCTP enthielt. Die Bindung von Hemin induzierte einen *Shift* des Proteins im SDS Gel in beiden Peaks. Im Gegensatz zum Hemin präzipitierte ein Großteil des mit Pflanzenextrakt behandelten TCTPs und zeigte im anschließenden SDS Gel mehrere kovalent verknüpfte TCTP Oligomere (schwarze Pfeile, b). Zur Identifizierung des möglichen Liganden wurde das TCTP über *Pull-down* Experimente mit Pflanzenextrakt behandelt. Da das Eluat aus der TCTP Probe im Gegensatz zur Negativkontrolle leicht gelb-grünlich gefärbt war, wurde ein UV/Vis Spektrum von der Probe aufgenommen. Dabei zeigte sich der charakteristische Peak für die Chlorophylle a und b in der TCTP Probe (c), welcher identisch mit dem reinen Pflanzenextrakt ohne Zugabe von TCTP war (d).

Artemisinin als Malaria-Therapeutikum und Gegenstand aktueller Krebsforschung ist ein Sekundärmetabolit aus dem einjährigen Beifuß (*Artemisia annuae*). Der genaue Wirkmechanismus ist bislang noch nicht verstanden. Vermutet wird aber, dass insbesondere in Anwesenheit von Eisenionen die intramolekulare Peroxidbindung aufgespalten wird und durch die Entstehung von freien Radikalen die Induktion von oxidativem Stress gefördert wird (218, 219). Das TCTP konnte dabei als *Target* für das Artemisinin identifiziert werden, welches erst durch die Bindung von Hemin durch Artemisinin modifiziert werden kann (217). In den letzten Jahren gewann TCTP als therapeutisches Ziel immer mehr Bedeutung, sodass es inzwischen aufgrund seiner Beteiligung in der Zellzyklusregulation, Apoptose und Histaminfreisetzung sowohl in der Anti-Malaria-Therapie als auch zur Reversion von Tumoren eingesetzt wird (87, 217).

Infolge der Beobachtung kovalente TCTP-Oligomere mit Pflanzenextrakten induzieren zu können, stellte sich die Frage, ob einerseits Artemisinin-Derivate in Brassicaceen wie *A. thaliana* und *B. napus* vorkommen und ob andererseits die zuvor benötigte Dimerisierung unter Bindung eines anderen

Liganden als Hemin, das in Pflanzen weniger stark vertreten ist, induzierbar ist. Darüber hinaus sollte geprüft werden, ob Artemisinin ebenfalls in der Lage ist das pflanzliche TCTP zusammen mit Hemin kovalent zu verknüpfen.

Da über die bisher durchgeführten Studien mit Hemin, keine Dimerisierung des pflanzlichen TCTPs beobachtet werden konnte, sollte zunächst überprüft werden, ob beim pflanzlichen TCTP die über Hemin-Bindung induzierte Dimerisierung erst durch eine höhere Hemin-Konzentration erfolgt oder ob im pflanzlichen TCTP überhaupt keine Dimerisierung durch Hemin induziert wird. Dazu wurden 100  $\mu$ M TCTP mit 100  $\mu$ M Hemin für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut auf eine Gelfiltrationssäule (*HiLoad* Superdex 75) gegeben um freies TCTP von Hemin gebundenem TCTP und möglichen TCTP-Dimeren zu trennen.

Wie bereits in den SAXS-Versuchen, konnte auch hier keine Dimerisierung beobachtet werden, obwohl über die Gelfiltration auch schwächere Wechselwirkungen zwischen Proteinen nachweisbar sind. Der Großteil des Proteins lag weiterhin in monomerer Form vor. Ein kleiner Anteil jedoch konnte im Chromatogramm als vorlaufende Schulter identifiziert werden (Abbildung 24a). Das Elutionsvolumen entsprach allerdings erneut nicht dem eines dimeren Protein, stattdessen aber dem einer möglichen elongierten Form des Proteins. Sowohl die unbehandelte TCTP-Probe als auch die mit Pflanzenextrakt behandelte Proteinprobe zeigten neben dem *Peak* für das monomere Protein einen weiteren *Peak* bei etwa 48 ml. Dieses Signal resultiert jedoch aus unspezifischen Aggregaten, die während der Gelfiltration infolge hoher Proteinkonzentrationen auftraten. Die Molekulargewichte dieser Aggregate konnten allerdings mit der verwendeten Gelfiltrationssäule nicht abgeschätzt werden. Zum einen war der TCTP:Hemin-Komplex deutlich als gelbe Lauffront während der Chromatographie sichtbar und zum anderen konnte ein *Shift* der Proteinbanden im SDS-Gel beobachtet werden, welcher für freies TCTP nicht zu beobachten war (Abbildung 24b). Die gelbe Farbe des Hemins resultiert aus dem koordinierten Fe(II) Ion, welches über einen Porphyrin-Ring koordiniert ist.

Hemin selbst ist stark hydrophob und bleibt von der SDS-Behandlung unverändert, was bei einer Interaktion mit einem Protein ein verändertes Migrationsverhalten im SDS-Gel induzieren kann. Um den potentiellen Liganden aus dem Pflanzenextrakt zu isolieren, wurden nachfolgend verschiedene *Pull-down* Versuche mit Pflanzenextrakt durchgeführt. Für den *Pull-down* wird der Umstand genutzt, dass das TCTP C-terminal den 6xHistidin-*Tag* besitzt. Hierdurch kann das Protein zunächst an einer Ni-NTA-Matrix immobilisiert werden und im Anschluss mit dem Pflanzenextrakt inkubiert werden. Nach anschließendem Waschen mit einem Waschpuffer mit niedriger Salzkonzentration und wenig Imidazol um unspezifische Bindungen mit der Nickelmatrix zu minimieren, wurde das TCTP mit der Ni-NTA-Matrix inkubiert, gewaschen und eluiert. Darüber hinaus wurde eine mit Pflanzenextrakt behandelte TCTP-Probe mit 1 M NaCl gewaschen, um insbesondere unspezifische Bindungen zwischen Pflanzenproteinen und Nickelmatrix zu entfernen.

Ligand	Absorptionsmaxima [nm]	Struktur
Chlorophyll a	666 nm (220)	$H_{i,C} \rightarrow H_{i} \qquad (H_{i} \ CH_{i} \ H_{i} \ CH_{i} \ CH$
Chlorophyll b	653 nm (220)	$H_{LC} \leftarrow H_{L} \qquad \qquad$
β-Caroten	442 nm, 471 nm (221)	$\bigcup_{d_{N_{3}}}^{CH_{3}} \bigcup_{d_{N_{3}}}^{CH_{3}} \bigcup_{d_{N_{3}}}^{CH_{3}} \bigcup_{d_{N_{3}}}^{CH_{3}} \bigcup_{d_{N_{3}}}^{CH_{3}} \bigcup_{d_{N_{3}}}^{CH_{3}} \bigcup_{d_{N_{3}}}^{CH_{3}} \bigcup_{d_{N_{3}}}^{CH_{3}}$
Hemin	388 nm (222)	
Artemisinin		H <sub>5</sub>
Farnesol		H,C,C,C,H,C,H,C,H,C,H,C,H,C,H,C,H,C,H,C
Rhamnose		H <sub>3</sub> C <sub>111</sub> HO OH

Tabelle 15. Mögliche niedermolekulare Liganden für das TCTP im Pflanzenextrakt von *A. thaliana*. Neben den bekannten niedermolekularen Interaktionspartnern Hemin und Artemisinin konnten weitere mögliche Liganden für das TCTP identifiziert werden.

Sofern der mögliche Ligand im Pflanzextrakt ähnlich hydrophob wie das Hemin ist, sollte dieser weiterhin am TCTP gebunden bleiben und nur ionische Interaktionen beseitigt werden. Die eluierte Probe zeigte eine leicht grün-gelbliche Farbe auf, die ebenso in der mit 1 M NaCl gewaschenen Probe sichtbar war.

Da durch die EDTA-Elution auch das Nickel von der NTA-Matrix entfernt wurde, könnte die Farbe auch durch das Nickel verursacht worden sein. Allerdings konnte die Verfärbung des Eluates in der Pflanzenextraktkontrolle nicht beobachtet werden. Der Extraktionspuffer wurde so gewählt, dass neben zytosolischen Proteinen auch die Proteine der Organellen, wie Chloroplasten, freigesetzt wurden, wodurch eine tief grüne Farbe des Extraktes sichtbar war.

Da die beobachtete Farbe des TCTP-Eluates auf viele verschiedene chemische Verbindungen zurückgeführt werden kann, beispielsweise auf das bereits verwendete Hemin, als auch auf
Chlorophylle, Xantophylline und Carotinoide, wurde für die Identifizierung des Liganden ein UV/Vis-Spektrum zwischen 280 und 900 nm von dieser Probe aufgenommen (Abbildung 24c und d). Dabei konnte ein Absorptionsmaximum bei etwa 670 nm detektiert werden, welches für Chlorophyll a als Ligand sprechen würde (Tabelle 15). Andere häufig in Pflanzen vorkommende farbige Substanzen wie Chlorophyll b und  $\beta$ -Carotene besitzen deutlich unterschiedliche Absorptionsmaxima und schieden daher als mögliche Liganden aus. Gleiches galt für Hemin, da Hemin zum einen nur in Spuren in Pflanzen vorkommt und zum anderen ein Absorptionsmaximum bei 388 nm besitzt. Chlorophyll besteht wie das Hemin mit dem Chlorin aus einem Porphyrin-ähnlichen Ringsystem mit einem zentral koordinierten Magnesium-Ion anstelle des Fe(II)- Ions im Hemin. Darüber hinaus besitzt das Chlorophyll a eine zusätzliche lange hydrophobe Seitenkette, die das Chlorophyll an hydrophobe Proteine in der Thylakoidmembran verankert.

Somit könnte die hohe strukturelle Ähnlichkeit zwischen beiden Molekülen die Bindung des Chlorophylls an das TCTP erklären. Da in der Pflanzenextrakt-behandelten Probe kovalente Oligomere im SDS-Gel beobachtet werden konnten und dies bislang nur für die Bindung von TCTP an Hemin und Artemisinin beschrieben wurde, stellte sich nun die Frage, ob ähnliche Substanzen wie das Artemisinin im Pflanzenextrakt vorlagen, die die zuvor entstandenen nichtkovalenten Dimere miteinander verknüpfen konnten. Hierfür wurden die im Gel sichtbaren Banden aus einem zweiten nicht gefärbten Gel, in dem die Proteine nicht fixiert vorlagen, ausgestochen, einzeln mikroeluiert und anschließend in Zusammenarbeit mit Aleksandra Skyrisz (AG Willmitzer, MPI Potsdam-Golm) über GC-MS/MS analysiert. Parallel dazu wurden mit Pflanzenextrakt-behandelte TCTP-Proben mit 90% Aceton, 10 % Methanol und10 mM DTT gefällt, der Überstand eingedampft und sowohl das Proteinpellet als auch der eingedampfte Überstand mittels GC-MS/MS analysiert. Dabei konnten zwei mögliche Substanzen identifiziert werden, die möglicherweise an das TCTP gebunden haben könnten. Dazu gehörten die Rhamnose als auch Farnesol. Da aufgrund sehr schwacher Signale im Massenspektrum diese Substanzen nicht eindeutig identifiziert werden konnten, sind auch strukturell ähnliche Substanzen weiterhin als mögliche Liganden denkbar. Rhamnose als Zucker sollte im SDS-Gel vom Protein dissoziieren können, weshalb diese als Ligand ausgeschlossen wurde. Allerdings könnte das Farnesol als hoch hydrophobe Substanz die Behandlung mit SDS unverändert überstehen und wurde daher als möglicher Ligand in Betracht gezogen.

Eine Artemisinin-ähnliche Substanz konnte somit nicht identifiziert werden. Um zu überprüfen ob Artemisinin zusammen mit Hemin ebenfalls in der Lage ist das pflanzliche TCTP kovalent zu verknüpfen oder ob diese Beobachtung nur mit dem Chlorophyll und einer weiteren unbekannten Substanz im Pflanzenextrakt möglich ist, wurde TCTP sowohl mit Hemin, Artemisinin, Pflanzenextrakt als auch in Kombination zunächst bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf ein 12 %iges SDS-Gel aufgetragen. Eichhorn *et al.* zeigten bereits, dass die Dimerisierung umso effizienter stattfindet, sofern Ascorbinsäure als Reduktionsmittel für das koordinierte Fe(II) mit hinzugegeben wurde (86).



Abbildung 25. *In vitro*-Dimersierungsassay mit Hemin, Artemisinin sowie proteinfreiem Zellextrakt. Ob Hemin gebundenes TCTP in Gegenwart von Artemisinin und Ascorbinsäure kovalent verknüpft werden konnte, wurde über SDS-Gel-Analysen überprüft. Dabei konnte keine Dimerisierung mit Hemin und Artemisinin induziert werden und war nur in Gegenwart von proteinfreiem Pflanzenextrakt (PlantEx) zu beobachten (a), was auf kleine Artemisinin-ähnliche Substanzen im Extrakt hindeutete. Dass Hemin an das TCTP gebunden hatte konnte neben der entstandenen Doppelbande im Gel auch an der Färbung der Banden im ungefärbten SDS-Gel bestätigt werden (b).

Erneut zeigte sich, dass Hemin selbst, als auch in Kombination mit Artemisinin und Ascorbinsäure, nicht in der Lage war kovalente Dimere zu bilden, während die mit Pflanzenextrakt behandelte Probe deutlich Dimere und größere Aggregate zeigte (Abbildung 25). Zur weiteren Eingrenzung der möglichen Substanzen, die für die kovalente Verknüpfung verantwortlich sein könnten, wurde das Pflanzenextrakt zuvor mit 90% Aceton,10 % Methanol,10 mM DTT fraktioniert und nur die lösliche, proteinfreie Phase für die TCTP-Behandlung verwendet. Hier zeigte sich, dass auch das proteinfreie Extrakt in der Lage war die Oligomerisierung zu induzieren.

Es ist somit anzunehmen, dass im Gegensatz zu den tierischen Homologen, bei den pflanzlichen TCTPs die Dimerisierung nicht auf Grundlage des seltener vorkommenden Hemins durchgeführt wird, sondern diese vielmehr auf das häufiger auftretende Chlorophyll zurückzuführen ist.

Die Dimerisierung nach Ligandenbindung hat eine wichtige Funktion innerhalb der Zelle. Freies Hemin in tierischen Zellen fördert die Bildung von ROS, was wiederum zu oxidativem Stress bis hin zur Apoptose führen kann. Somit soll durch Binden des freien Hemins durch das TCTP die Bildung von ROS unterdrückt werden (84). Durch eine anschließende Dimerisierung konnte am humanen TCTP gezeigt werden, dass eine Cytokin-ähnliche Aktivität induziert wird, die in monomerer Form nicht vorliegt (223, 224). Aufgrund dieser Eigenschaft wird das menschliche TCTP auch *Histamine releasing factor* genannt (HRF). Da in Pflanzen Hemin nur in geringen Mengen vorliegt, könnte sich die Ligandenspezifität der TCTP-Homologe in Richtung anderer Hemin-ähnlicher Substanzen, wie zum Beispiel Chlorophylle, verändert haben, um einen ähnlichen Effekt innerhalb der Pflanze auslösen zu können.

### 3.2.2.3 *In silico Docking* Versuche und Affinitätsmessungen vom Hemin und weiterer identifizierter Liganden

Die möglichen Bindungsstellen vom Hemin an das TCTP sind bislang unbekannt. Für das menschliche TCTP konnte allerdings eine Bindestelle in der Nähe der *Loop*-Region experimentell bestimmt werden (84). Zur Bestimmung, wo mögliche Bindeepitope für Hemin, Artemisinin und andere mögliche Liganden lokalisiert sind, wurden zuerst über *FTmap* Bindestellen identifiziert, die für die Liganden in Erwägung kommen würden (225). Über den FTmap Server wurden dazu 16 verschiedene kleine Moleküle der Größe von Ethanol bis zu Benzaldehyd und Phenol mit möglichst niedriger Bindungsenergie an die 3D-Struktur des *iTasser* Modells gedockt. Bereiche, in denen sich mehrere dieser kleinen Liganden anhäuften, bildeten dabei lokale Cluster, die mögliche Bindeepitope für potentielle Liganden darstellten.

Insgesamt konnten drei Bereiche im Strukturmodell identifiziert werden, in denen mehrere kleine Molekülgruppen erfolgreich gedockt werden konnten. Zwei dieser Bereiche lagen in näherer Umgebung zum *Loop*, während eine andere Region in der Nähe des C-Terminus lokalisiert war (Abbildung 26a). Allen drei Epitopen gemein ist deren hydrophober Charakter. Die Interaktionen zwischen dem Hemin und dem TCTP erfolgten im Wesentlichen über kurze Aminosäurereste wie Alanin, Glycin und Valin, die mit dem ungeladenen Porphyrin-Ring interagierten und nicht mit den geladenen Seitengruppen des Liganden. Diese drei Bereiche bildeten somit mögliche Bindestellen für das Hemin und die anderen Liganden. Zur Überprüfung, ob das Hemin in einem oder mehreren dieser Bereiche binden konnte, wurde über das Programm Autodock Vina verwendet, wobei auch erste Abschätzungen der Affinitäten getroffen wurden (130). Dabei wurden die 20 häufigsten Konformationen über 25 Iterationen in drei voneinander unabhängigen Dockingexperimenten berechnet. Die Bindungstaschen, die mit gleichbleibender Affinität berechnet werden konnten, wurde aus der berechneten Bindeenergie ( $\Delta$ G) über die Gleichung [8] mit T = 298.15 K und R<sub>cal</sub> = 1.98719 berechnet.

$$K_I = e^{\frac{\Delta G}{R_{cal} * T}}$$
[8]

Für Hemin wurden dabei zwei mögliche Bindestellen identifiziert, wobei Affinitäten zwischen 3 und 4  $\mu$ M für beide Bindestellen berechnet wurden (Tabelle 16). Als Grundlage für die Affinitätsberechnungen der Liganden an das TCTP wurde das *Rigid Body Docking* verwendet, das auf der Annahme beruht, dass durch Binden der Moleküle keine Strukturveränderungen in der Bindetasche des Proteins induziert werden. Außerdem wurde für das *Docking* kein spezifisches Epitop zum Docken spezifiziert, sondern vielmehr ein *Random Docking* durchgeführt, bei dem die komplette Proteinoberfläche für Berechnungen zur Verfügung stand. Hierdurch konnten zwar einige wenige Epitope identifiziert werden, jedoch konnte aufgrund der beiden festgelegten Parameter (*Random* 



Abbildung 26. In silico Docking Ergebnisse für das TCTP aus A. thaliana am iTasser Oberflächenmodell. Über den FTmap Server konnten drei Cluster identifiziert werden, in denen mehrere Molekülgruppen gedockt werden konnten (a). Die Bindung von Hemin wurde über das Docking Programm AutoDock Vina überprüft, wobei zwei der drei zuvor ermittelten Regionen als mögliche Bindestellen für das Hemin berechnet wurden (b). Anhand von MS-Daten konnten diese Taschen als mögliche Bindestellen für das Hemin bestätigt werden (rot markierte Bereiche).

*Docking, Rigid Body*) keine genaue Affinität des Hemins an das TCTP bestimmt werden. Diese konnte nur abgeschätzt und musste experimentell überprüft werden. Dass durch das Binden der Liganden keine Veränderung der Sekundärstruktur induziert wird, konnte bereits in den CD-Messungen gezeigt werden. Da allerdings über die anschließenden SAXS-Messungen eine Änderung der Konformation des *Loops* beobachtet werden konnte, musste angenommen werden, dass insbesondere Affinitäten, die für das Hemin in der Nähe des *Loops* berechnet wurden, unter Umständen stark von der wirklichen Affinität abwichen.

Da der Hemin:TCTP-Komplex auch im SDS Gel erhalten blieb und zwei markante Banden im Gel zeigte, während freies Protein nur eine Bande bildete (Abbildung 25), wurden zur experimentellen Bestimmung der Bindetaschen die jeweiligen Banden aus dem Gel ausgeschnitten, die Proteine mit Trypsin in-Gel verdaut und anschließend massenspektrometrisch analysiert, um Unterschiede im Peptidmuster feststellen zu können.

Im Gegensatz zu freiem TCTP, welches als Kontrolle ebenfalls analysiert wurde, zeigte sich bei beiden Hemin:TCTP-Proben, dass zusätzliche *Miscleavages* auftraten. Während in der Kontrollprobe nur vereinzelt einzelne *Miscleavages* auftraten, erhöhte sich die Anzahl dieser in beiden Hemin-Proben auf über zwei pro Peptid.

Das Binden von Hemin in diesen Bereichen des Proteins könnte somit zur Folge gehabt haben, dass die Schnittstelle für das Trypsin durch die Bindung des Liganden blockiert wurde und somit zusätzliche unverdaute Peptide auftraten, die auch nach verlängerter Inkubationszeit von 24 h nicht verschwanden. Die ungeschnittenen Peptide konnten anschließend zwei Regionen im Protein zugeordnet werden und lagen nicht über das Protein zufällig verteilt (Abbildung 26b). Die Regionen in denen zusätzliche *Miscleavages* auftraten umfassten, die drei durch den *FTmap Server* ermittelten Bereiche in denen mögliche Liganden binden könnten. *Cluster* I und III wurden zusätzlich über das Programm Autodock Vina als mögliche Bindestellen für das Hemin berechnet. Obwohl ebenfalls *Cluster* II im Bereich der *Miscleavages* lag, konnte hier jedoch keine Heminbindung mit hoher Affinität gedockt werden und wurde diesbezüglich nicht weiter betrachtet. Ähnliche Beobachtungen konnten für das humane TCTP gemacht werden (84). Ebenfalls konnten nach Bindung von Hemin an das TCTP mehrere Peptide identifiziert werden, die nur partiell verdaut wurden. Die dabei identifizierte Bindestelle im humanen TCTP für das Hemin entsprach dem möglichen *Cluster* I im *A. thaliana* TCTP. Dabei konnten zwei aufeinanderfolgende Histidine an den Positionen 76 und 77 im humanen TCTP als maßgeblich an der Heminbindung beteiligte Aminosäuren identifiziert werden, von denen eines in allen Organismen hochkonserviert vorliegen sollte. Ein Austausch dieser beiden Histidine gegen zwei Alanine führte zum Verlust der Heminbindung. Daher wird vermutet, dass das zentral koordinierte Fe(II) Ion im Porphyrin-Ring mit den Histidinseitengruppen interagiert und somit das Hemin in der Bindetasche stabilisiert, während sonst nur hydrophobe Interaktionen vorherrschen. Weitere Heminbindestellen wurden für das humane TCTP nicht gefunden.

Bhisutthibhan *et al.* konnten zum einen für das TCTP aus *Plasmodium falciparum* ebenfalls die Dimerisierung des Proteins beobachten. Zusätzlich konnte die Bindung zweier Heminmoleküle pro TCTP Molekül beschrieben werden, wobei die genauen Stellen weiterhin unbekannt sind (87). Interessanterweise besitzen sowohl das TCTP aus *A. thaliana* als auch aus *P. falciparum* die für die Heminbindung als erforderlich postulierten Histidine nicht. Stattdessen konnten an gleicher Position entweder FR oder aber FQ als Aminosäureduplett gefunden werden, welches ausgeschlossen von TCTP-Homologe aus Säugetieren, sowohl in den pflanzlichen, Plasmodien- und Hefe- TCTP-Homologen zu finden war (Abbildung 18a). Da diese Spezies hinsichtlich des Grades der Konservierung der beiden Histidine durch Lucas *et al.* (84) nicht mit einbezogen wurden, könnte die Annahme, dass zumindest ein Histidin vorhanden sein muss, um eine Heminbindung zu ermöglichen, falsch sein.

Stattdessen könnte eine aromatische Aminosäure in Kombination mit einer neutralen bis basischen die fehlenden Histidine komplementieren, was durch zwei Alanine nicht mehr möglich war.

Allerdings könnten die Histidine eine höhere Affinität des Hemins an das TCTP zur Folge haben. So ist für das humane TCTP, welches beide Histidine an Position 76 und 77 besitzt eine Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) von 4.8 µM bestimmt worden, während für das Homolog aus *P. falciparum* ohne die beiden Histidine die  $K_D$  bei etwa 18 µM lag. Somit könnte die Art der Aminosäuren an den Positionen 76 und 77 die Affinität des Hemins an das TCTP festlegen und nicht die Bindung im Allgemeinen. Für das TCTP aus *A. thaliana* konnte über die *in silico*-Docking Versuche eine Affinität von 3 bis 4 µM berechnet werden, was näher an den Werten des humanen TCTPs lag.

Zur experimentellen Bestimmung der  $K_D$  wurden zwei verschiedene Bindeassays durchgeführt. Zum einen wurde wie bereits beschrieben die intrinsische Tryptophanfluoreszenz ausgenutzt (84). Hierbei wird der Umstand ausgenutzt, dass Tryptophan im UV-Bereich bei 280 bis 295 nm angeregt werden kann und dabei zwischen 310 und 450 nm Licht emittiert. Diese Fluoreszenz ist abhängig von der lokalen Umgebung des Tryptophans. Durch Änderungen des lokalen Milieus (zum Beispiel pH-Wert oder Ionenstärke) oder der Interaktion mit benachbarten Aminosäureresten kann diese Fluoreszenz unterdrückt werden, beziehungsweise führt zu einer Verschiebung des Wellenlängenmaximums (*Quench*-Effekt).



Abbildung 27. Affinitätsmessungen zwischen TCTP und den Liganden Hemin und Farnesol. Die Affinität zwischen TCTP und Hemin wurde über drei verschiedene Methoden bestimmt. Hierzu wurde über die intrinsische Tryptophanfluoreszenz (a), dem Fluoreszenzverlust von gelabeltem TCTP (b) und über *MicroScale* Thermophorese (c) die Affinitäten zum Hemin bestimmt. Zum Vergleich wurde ebenfalls Farnesol mittels Thermophorese überprüft (d). Die Qualität und berechneten Dissoziationskonstanten für die Heminbindung variierten in Abhängigkeit von der verwendeten Messmethode stark voneinander (e).

Durch Binden eines Liganden und einer entsprechenden lokalen Strukturveränderung in der Nähe des fluoreszierenden Tryptophans kann die Abnahme der Fluoreszenz mit der Affinität des bindenden Liganden in Korrelation gesetzt werden. Das *A. thaliana* TCTP besitzt im Gegensatz zum humanen TCTP zwei Tryptophane, die in der Nähe des *Clusters* I und III lokalisiert sind und somit eine Untersuchung beider vorhergesagten Bindestellen für das Hemin durch die intrinsische Fluoreszenz erlaubte.

Dazu wurde in Triplikaten bei steigender Heminkonzentration gegen 5  $\mu$ M TCTP (Abbildung 27a) die Veränderung des Maximums bei etwa 330 nm bestimmt. Ebenfalls wie beim humanen TCTP konnte mit steigender Heminkonzentration ein zunehmender *Quenching*-Effekt beobachtet werden. Die daraus berechnete K<sub>D</sub> betrug 10  $\mu$ M ± 1  $\mu$ M, welche im Vergleich zum humanen TCTP in etwa doppelt so hoch war, gleichzeitig jedoch nur etwa halb so hoch wie für das *Plasmodium falciparum* TCTP.

Trotz nicht vorhandener Histidine konnte somit eine relativ gute Affinität von Hemin zum pflanzlichen TCTP bestimmt werden, die zwischen der vom humanen und *P. falciparum* TCTP lag. Zur Überprüfung der bestimmten K<sub>D</sub>, wurde die Affinität parallel über *MicroScale* Thermophorese Messungen ermittelt. Hierzu wurde zum einen ein Lysin-reaktiver und ein Cystein-reaktiver Fluoreszenzfarbstoff verwendet und das Protein damit möglichst äquimolar gelabelt. Lysin-*gelabeltes* TCTP konnte für die MST-Messungen nicht verwendet werden, da mit steigender Heminkonzentration die Fluoreszenz des gekoppelten Farbstoffes abnahm. Die beobachtete Abnahme der Fluoreszenz kann durch zwei mögliche Phänomene erklärt werden. Einerseits könnte das Binden des Liganden an das TCTP in der Nähe der fluoreszenz-gekoppelten Aminosäure mit der Fluoreszenz interferieren. Andererseits kann die Fluoreszenz allein durch Ändern des umgebenen Milieus nach Zugabe des Liganden beeinträchtigt

werden, ohne dass eine Bindung des Liganden an das Protein stattfindet. Sofern der Fluoreszenzverlust aus der Bindung des Liganden resultiert, könnte daraus ebenfalls wie bei den *Quenching*-Versuchen die Affinität bestimmt werden.

Zur Überprüfung welches der beiden möglichen Phänomene den Fluoreszenzverlust bewirkte wurde das Lysin-*gelabelte* TCTP einerseits nativ im MST Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05 % Tween-20) belassen und andererseits eine Probe in 1x SDS Ladepuffer für 5 min bei 95 °C hitzedenaturiert. Die Fluoreszenz der nativen als auch der denaturierten Probe wurde miteinander verglichen. Im Anschluss wurde zu beiden Proben 50 µM Hemin hinzugegeben und die Fluoreszenz erneut gemessen. Dabei zeigte sich ein Fluoreszenz in den denaturierten Proben mit und ohne Hemin konstant blieb. Somit konnte von einem bindungsabhängigen Fluoreszenzverlust ausgegangen werden, was die Berechnung der Dissoziationskonstante erlaubte. Eine zusätzliche Veränderung der Fluoreszenz in den denaturierten Proben hingegen hätte hingegen auf eine Abhängigkeit der Fluoreszenz vom umgebenen Milieu hingedeutet und eine Berechnung der K<sub>D</sub> nicht ermöglicht.

Über die Fluoreszenzverluste konnte hier eine Affinität zum Hemin zwischen 20 und 25 µM bestimmt werden, die in etwa doppelt so hoch war, wie bei den zuvor gemessenen Quench-Versuchen (Abbildung 27b). Unter der Annahme, dass im atTCTP ebenfalls zwei Heminbindestellen vorhanden sind, könnte die beobachtete schwächere Affinität auf das Binden in der niedrigaffinen Tasche erklärt werden. Durch die Docking Berechnungen kommen Cluster I und III als mögliche Bindeepitope in Frage. Cluster III besitzt im Gegensatz zu Cluster I ein frei zugängliches Lysin, welches Fluoreszenz-gekoppelt werden könnte. Sofern diese Bindetasche eine geringere Affinität für Hemin besitzt als Cluster I, könnte die Bindung vom Hemin in Cluster III durch den Fluoreszenzverlust nach Binden von Hemin bestimmt worden sein. Die Bindung des Hemins in Cluster I konnte unter dieser Annahme nicht gemessen werden. Folglich könnte die Diskrepanz zwischen beiden Messmethoden auf das Binden von Hemin in unterschiedlichen Epitopen am Protein erklärt werden, die durch das Tryptophan-Quenching und den Fluoreszenzverlust beim gelabelten Protein gemessen wurden. Eine andere Erklärung für die schwächere Bindung wäre, dass an der Heminbindung beteiligte Lysine durch die Kopplung an den Fluoreszenzfarbstoff sterisch wie ionisch blockiert wurden, sodass Interaktionen zwischen Lysin und Hemin reduziert, beziehungsweise nicht mehr möglich sind und somit die Affinität des Liganden reduziert wurde.

Thermophorese-Messungen konnten mit dem Cystein-gelabelten TCTP durchgeführt werden. Da das einzige Cystein im Protein außerhalb aller möglichen Bindetaschen für das Hemin lag, konnte kein Fluoreszenzverlust beobachtet werden. Die nachfolgenden MST-Messungen ergaben eine Affinität von 1.6  $\mu$ M was deutlich unter den über das *Quenching* und den Fluoreszenzverlust ermittelten Werten lag. Die experimentell über MST-Messungen ermittelten Affinitäten entsprachen in etwa den zuvor über das *Docking* berechneten Werten (Tabelle 16) und lagen im Bereich der für das humane TCTP bekannten Affinität von etwa 5  $\mu$ M. Jedoch bestand eine große Diskrepanz der über Thermophorese und der über Tryptophan-*Quenching* und Fluoreszenzverlust ermittelten K<sub>D</sub>-Werte. Die bestimmten Affinitäten über das Tryptophan-*Quenching* und den Fluoreszenzverlust des gelabelten Proteins basieren beide darauf, dass der Ligand in der Nähe der für die Fluoreszenz-verantwortlichen Aminosäurereste bindet. Somit sind diese Methoden stark abhängig davon wo diese verantwortlichen Aminosäurereste im Protein lokalisiert sind. Im Gegensatz dazu wird in den Thermophorese-Messungen nicht die Änderung der Fluoreszenz gemessen, sondern die unterschiedliche Diffusionsgeschwindigkeit von ligandengebundenem und freiem Protein. Diese ist somit unabhängig von der Lokalisation einzelner Aminosäurereste und erlaubt es die Bindung in der hochaffinen Bindetasche zu analysieren.

Die Affinität, die über die Tryptophan-*Quenching* Experimente ermittelt wurde, lag zwischen der über die Thermophorese-Messung und der über den Fluoreszenzverlust des gelabelten Proteins bestimmten Werte. Lucas *et al.* konnten über die Tryptophan- *Quenching* Methode die Affinität von Hemin an das humane TCTP auf einen Wert von 4.8 µM festlegen (84). Da das humane TCTP im Gegensatz zum Homolog aus *A. thaliana* kein Tryptophan besaß, wurde in der Nähe der zu erwartenden Bindetasche im humanen TCTP ein Tryptophan eingefügt, um die Messung zu ermöglichen. Dies musste für das *A. thaliana* TCTP nicht durchgeführt werden, da intrinsisch zwei Tryptophane im Protein vorlagen. Allerdings war jedes Tryptophan in unterschiedlich postulierten Bindetaschen lokalisiert. Trp36 befand sich in Nähe des *Cluster* I, während Trp30 in *Cluster* III lokalisiert war. Als Folge konnte die Fluoreszenz, beziehungsweise das *Quenchen* beider Tryptophane durch die Heminbindung beeinflusst werden. Stark unterschiedlich sind, laufen indes in einer einzigen Sättigungskurve ineinander und werden somit als eine durchschnittliche Affinität bestimmt.

Die Affinität des schwächer bindenden Epitops hätte über die Thermophorese-Messungen bestimmt werden können. Allerdings konnte bei hohen Heminkonzentrationen oberhalb von 25 µM erneut ein Fluoreszenzverlust beobachtet werden, obwohl anstelle des Lysin-gekoppelten Farbstoffes ein Cystein-gekoppeltes Protein verwendet wurde. Das Cystein ist jedoch in relativer Nähe zur Bindetasche III, so dass bei genügend hohen Heminkonzentrationen auch dieses in dessen Fluoreszenz beeinflusst wird. Infolge dessen mussten Proben mit höherer Heminkonzentration aus den Messungen ausgeschlossen werden und erlaubten keine Bestimmung der zweiten Affinität über die Thermophorese.

Zusammenfassend kann daraus postuliert werden, dass die von Lucas *et al.* bestimmte Bindetasche auch im TCTP aus *A. thaliana* vorhanden ist und eine ähnliche Affinität aufweist, obwohl die als maßgeblich an der Bindung beteiligten Histidine im *A. thaliana* Homolog fehlen. Des Weiteren konnte eine zweite schwächere Region definiert werden, in der Hemin mit einer durchschnittlichen Affinität von 25 µM binden konnte. Diese Affinität entsprach in etwa der für das *P. falciparum* TCTP, für welches ebenfalls zwei Heminbindestellen postuliert wurden. Da mehrere Bindestellen vorzuliegen schienen und die unterschiedlichen Bindeassays unterschiedlich stark dadurch beeinflusst wurden, ergaben sich teils signifikante Unterschiede in der Affinität von Hemin.

Tabelle 16. Berechnete Affinitäten verschiedener möglicher Liganden für das TCTP aus *A. thaliana*. Die gemessenen Affinitäten basieren auf den *in silico*-Docking Ergebnissen, das durch ein *Random Docking* mit Autodock Vina durchgeführt wurde. Die Liganden wurden dabei von höchster zu niedrigster Affinität sortiert. Für Hemin, Artemisinin und Farnesol wurden über Fluoreszenz- und MST-Messungen experimentell die Dissoziationskonstanten bestimmt.

Ligand	Tasche	Bindeenergie	kI	Anzahl Konformationen von 20	Gemessene Affinität
Chlorophyll a	2	-9.1 kcal/mol	0.2 μΜ	10	
	1	-8.3 kcal/mol	0.8 µM	9	
Hemin	3	-7.5 kcal/mol	3.2 µM	6	$1.6-25\ \mu M$
	1	-7.3 kcal/mol	4.5 μΜ	12	
Artemisinin	1	-7.5 kcal/mol	3.2 µM	9	> 100 µM
Farnesol	2	-6.3 kcal/mol	24 µM	12	> 100 µM
Rhamnose	3	-4.8 kcal/mol	303 µM	6	

In <sup>45</sup>Ca *Overlay Assays* konnte bereits eine Calciumbindeeigenschaft für das TCTP aus *A. thaliana* nachgewiesen werden, jedoch fehlten bislang Informationen über die Affinität dieses Ions zum Protein (88). Für das menschliche TCTP ist eine Affinität für das Calcium von 8 mM bestimmt worden (84). Da allerdings nur das C-terminal *getaggte* TCTP löslich hergestellt und aufgereinigt werden konnte, waren mögliche Calcium-Affinitätsmessungen nicht möglich, da der verwendete *HisTag* ebenfalls das Calcium binden würde und somit nicht die Bindung zwischen Ion und Protein, sondern zwischen Ion und *Tag* untersucht werden würde. Insbesondere aufgrund der vorhergesagten schwachen Bindung des Calciums an das Protein wäre eine Bestimmung so unmöglich.

Weitere bekannte niedermolekulare Interaktionspartner wurden ebenfalls hinsichtlich ihrer Affinität zum *A. thaliana* TCTP überprüft. Hierzu wurden Artemisinin als bekannter Interaktionspartner als auch Chlorophyll a, Farnesol und Rhamnose als neu entdeckte mögliche Liganden zunächst über *in silico* Docking Experimente mit Hemin verglichen. Insgesamt konnte das bereits über *Pull-down* Versuche beobachtete Binden von Chlorophyll a auch in den *Docking* Versuchen bestätigt werden. Dies schien im Vergleich zum Hemin eine signifikant höhere Affinität zu besitzen und als mögliches Bindeepitop wurde ebenfalls *Cluster* I vorhergesagt (Tabelle 16). Die höchste Affinität konnte für *Cluster* II vorhergesagt werden, in das Hemin nicht *gedockt* werden konnte.

Experimentell konnte die Interaktion des TCTPs zu Chlorophyll a nicht überprüft werden, da hochreines Chlorophyll a nicht zur Verfügung stand. Die Affinität von Artemisinin als weiterer bekannter Ligand konnte bereits für das pfTCTP mit einer Affinität von 77 bis 120 µM experimentell bestimmt werden. Trotz der sehr schwachen Affinität konnte dabei durch Artemisinin die kovalente Dimerisierung induziert werden (86). Die zuvor über Docking-Experimente bestimmte Bindungsenergie von -6.5 kcal/mol (K<sub>1</sub>: 17 µM) ergab jedoch eine deutlich höhere Affinität des Artemisinins, als experimentell bestimmt wurde. Übereinstimmend zu diesen Beobachtungen für das pfTCTP konnte in Docking Versuchen für das atTCTP ebenfalls eine höhere Affinität von Artemisinin berechnet werden und lag im Bereich der Affinität vom Hemin, wobei die gleiche Bindetasche vorhergesagt wurde (Cluster I). In anschließenden experimentellen Messungen über MST konnte allerdings innerhalb des Messbereichs von 2 nM bis 100 µM keine Sättigungskurve beobachtet werden, weswegen ebenfalls von einer Affinität von über 100 µM auszugehen ist und somit die Interaktion nur als gering affin anzusehen war. Die weiter entdeckten Liganden Farnesol als auch Rhamnose wurden ebenfalls näher untersucht. Während für das Farnesol eine annehmbare Affinität berechnet werden konnte, war die über die Docking Versuche bestimmte Affinität für Rhamnose bereits deutlich oberhalb von 100 µM und wurde im Gegensatz zum Farnesol nicht weiter experimentell überprüft. Farnesol mit einer berechneten Affinität von 24 µM zeigte erst ab einer Konzentration von 50 µM den Beginn der sigmoidalen Kurve (Abbildung 27d). Höhere Werte als 100 µM konnten nicht gemessen werden, da aufgrund der hohen Hydrophobizität von Farnesol die Löslichkeit des Liganden im MST-Puffer erreicht wurde. Somit zeigte sich ebenfalls für Farnesol, dass keine annehmbare Affinität zwischen Ligand und TCTP vorlag, wie sie auch für das Artemisinin bereits beobachtet wurde. Die teilweise großen Unterschiede zwischen in silico und experimentell bestimmten Bindungskonstanten können unter anderem auf die Art des Dockings zurückgeführt werden, wie bereits für das Hemin Docking beschrieben wurde.

Insbesondere für die kleinen Liganden mit unbestimmten Affinitäten und Bindeepitopen könnte das als Berechnungsgrundlage verwendete in silico Modell zu falsch-positiven Ergebnissen im Docking führen, da weiterhin keine Kristallstruktur vom atTCTP existiert. Das Modell beruht auf struktureller Ähnlichkeit zu homologen Proteinen, allerdings können sich zwischen den Kristallstrukturen Form und Position von möglichen Bindetaschen teilweise stark unterscheiden. Darüber hinaus wurde ein Random Docking durchgeführt, wobei die Oberfläche des Proteins als rigide und nicht flexibel festgelegt wurde. Mit der Ligandenbindung können jedoch lokal strukturelle Veränderungen einhergehen und entsprechend die Affinität beeinflussen. Da die Bindetaschen vorher nicht bekannt waren und somit keine Aminosäuren als flexibel festgelegt werden konnten, ist der beobachtete Unterschied zwischen Vorhersage und Experiment entsprechend hoch. Als weiteren Punkt, der bisher nicht berücksichtigt wurde, ist, dass eine Kombination aus mehreren Liganden existieren könnte. Durch Binden eines hochaffinen Liganden, wie Hemin oder Chlorophyll a könnte die Affinität für einen weiteren Liganden beeinflusst werden. Ebenfalls könnte eine Dimerisierung des Proteins, wie im Pflanzenextrakt gesehen, den gleichen Effekt auslösen. Dieser Mechanismus wurde bereits für die Aktivität von Artemisinin postuliert. Die experimentell bestimmte Affinität von Artemisinin an das pfTCTP ist stark abweichend von der IC<sub>50</sub> für die Inhibition des Parasitenwachstums. Sodass die Wirkung von Artemisinin darauf zurückgeführt wird, dass erst zuvor gebildete TCTP-Dimere durch Artemisinin modifiziert werden können, während monomeres Protein durch Artemisinin nicht verändert wird (86).

Dieser konzertierte Effekt mehrerer Liganden, beziehungsweise die oligomerisierungsspezifische Ligandenbindung müsste in zukünftigen Studien noch näher untersucht werden.

#### 3.2.3 Zusammenfassung

Zusammenfassend konnten für das atTCTP Interaktionspartner sowohl auf Protein- als auch niedermolekulare Ebene identifiziert werden. Ein Großteil aller identifizierten Proteine konnten bereits in anderen Organismen und mit anderen Detektionsmethoden als mögliche Interaktionspartner für das TCTP gefunden werden. Jedoch blieb bislang die Frage offen, ob diese Interaktionen zum einen auch in Pflanzen möglich sind und zum anderen ob diese Interaktionen auch im Phloem, in dem das TCTP bereits nachgewiesen werden konnte, existent sind und so etwas über die Rolle des Proteins innerhalb dieses Kompartiments verraten. Einige der bereits gezeigten Interaktionen konnten dabei mit Hilfe der *Far-Western* Experimente bestätigt werden, wobei die Versuche in Triplikaten durchgeführt wurden. Außerdem konnten neue mögliche Interaktionspartner identifiziert werden, deren Bindung an das TCTP jedoch noch über *in vitro*-Studien belegt werden müssen.

Die beobachtete Bindung des atTCTPs an Hemin ist in der Hinsicht überraschend, da die daran beteiligten Aminosäurereste an Position 76 und 77 im humanen TCTP als zwei aufeinanderfolgende Histidine charakterisiert wurden. Diese jedoch fehlen im atTCTP, weswegen entweder keine oder eine nur schwache Bindung zu erwarten gewesen wäre. Es konnte über *Docking* Versuche als auch MST-Messungen gezeigt werden, dass für das untersuchte Protein eine hochaffine und schwächer affine Bindung des Hemins vorliegen könnte. Neben der Bindung von Hemin konnte über die Verwendung von *Pull-down* Experimenten eine Interaktion mit Chlorophyll a detektiert werden, das außerdem als potentieller Ligand im Vergleich zu Hemin mit höherer Affinität gedockt werden konnte. Eine experimentelle Analyse der Affinität des identifizierten Liganden steht allerdings noch aus.

Ob im Gegensatz zu den homologen TCTP Proteinen in Säugetieren die pflanzlichen TCTPs eine evolutionär veränderte Affinität und Selektivität zu Hemin-ähnlichen Substanzen, wie dem Chlorophyll aufweisen, muss für weitere Homologe aus anderen pflanzlichen Organsimen noch überprüft werden, um eine eindeutige Aussage treffen zu können. Weitere mögliche Interaktionen konnten weder beobachtet noch berechnet werden. Für tierische TCTP-Homologe ist eine Hemin-abhängige Dimerisierung beschrieben worden, die ebenfalls einen Einfluss auf die Sekundärstruktur hat. So soll durch Bindung von Hemin der C-Terminus des Proteins zugänglich werden und die Dimerisierung ermöglichen (223, 224). Zwar konnte die Heminbindung auch im atTCTP bestätigt werden, allerdings konnte keine Strukturveränderung über CD-Messungen beobachtet werden, die die Heminbindung induzieren sollte (84). Die Bindung von Hemin war bezüglich der Affinität mit dem humanen TCTP vergleichbar. Da jedoch die Dimerisierung erst ab Heminkonzentrationen von über 40 µM gezeigt werden konnte (84), wurde in allen Versuchen zur Dimersisierung des atTCTPs eine Konzentration oberhalb von 40 µM gewählt. Jedoch konnte die Dimerisierung des untersuchten Proteins bei

Anwesenheit von Hemin wederin den Gelfiltrations- noch in SAXS-Experimenten beobachtet werden. Allerdings deuteten SAXS-Versuche mit unterschiedlichen Ligand:TCTP-Konzentrationen daraufhin, dass Hemin einen Einfluss auf die Flexibilität des hochgradig unstrukturierten *Loops* hatte.

Hemin und ähnliche Substanzen könnten somit bestimmte Konformationen des Proteins stabilisieren und so andere Interaktionen ermöglichen, die sonst im ungebundenen Zustand nicht möglich wären. Ob das Hemin- oder Chlorophyll-gebundene TCTP mit weiteren Proteinen interagieren könnte, müsste diesbezüglich überprüft werden. Da Artemisinin nicht die für andere TCTPs beobachtete kovalente Verknüpfung der TCTP-Homodimere induzieren konnte, diese aber nach Pflanzenextraktbehandlung gezeigt werden konnte, wurde versucht etwaige ähnliche Substanzen in Extrakten von A. thaliana zu identifizieren. Dazu wurden erste GC-MS/MS Analysen durchgeführt, worüber aber noch nicht eindeutige Ligandenkandidaten gefunden werden konnten. Dies könnte daraus resultieren, dass der Ligand durch das Verknüpfen selbst strukturell modifiziert wird, wie für das Artemisinin vermutet wird, und was somit eine Bestimmung des möglichen Liganden erschwert. Dieser müsste also über weitere Versuche, beziehungsweise durch weitere Extraktionsmethoden in zukünftigen Studien isoliert werden. Versuche das Protein zu kristallisieren waren bislang nicht erfolgreich. Aufgrund der sehr hohen Löslichkeit des Proteins und gleichzeitig reduzierter Stabilität, wie sie im DLS-Experiment beobachtet wurde, müssten weitere Proteinoptimierungen durchgeführt werden. Zum einen könnten oberflächenzugängliche Lysine durch Methylierungen modifiziert werden, um durch eine veränderte Ladung die Löslichkeit zu reduzieren (186). Außerdem könnte durch Verwenden weiterer Kristallisationsscreens und Ändern weiterer Parameter wie Tropfengröße oder auch Protein: Präzipitant-Verhältnis nach Kristallvorstufen gesucht werden. Ein auch erfolgsversprechender Ansatz ist die Entfernung des hoch-flexiblen Loops und Verbindung der zwei geordneten Proteinanteile über einen Serin-Glycin Linker, um die Flexibilität zu reduzieren. Sofern auch diese Maßnahmen nicht zum gewünschten Ergebnis führen, wären ebenfalls Co-Kristallisationen mit den identifizierten Proteinen als auch niedermolekularen Interaktionspartnern denkbar. Das Binden dieser kann zum einen die lokale Flexibilität reduzieren und zum anderen im Komplex eine Kristallisation fördern. Versuche den TCTP:Hemin-Komplex zu kristallisieren, führten bislang nicht zum Erfolg, weswegen insbesondere Protein:Protein-Interaktionspartner in Betracht werden diese gezogen sollten, da als Kristallisationsanker dienen können.

Insgesamt konnten somit für das TCTP aus *Arabidopsis thaliana* wesentliche Merkmale aus anderen Organismen bestätigt werden, jedoch auch weitere Informationen über Wechselwirkungen zwischen Protein und Bindepartnern über Bindeassays und SAXS-Experimente gewonnen werden. Darauf aufbauend müsste überprüft werden, ob diese Interaktionen im Phloem, als auch anderen *in vivo* existieren und wie sich ein Fehlen dieser Interaktionen in der Pflanze auswirken würde.

# 3.3 *Knotted*-1 als mobiler Transkriptionsfaktor bindet Sequenz-spezifisch DNA und RNA

Im Gegensatz zu dem At1g64370 und TCTP ist das Knotted-1 Protein kein typischerweise im Phloem vorkommendes Protein. Dessen Lokalisation im Phloem wird erst durch die Interaktion des Proteins mit dessen mRNA sowie dem viralen Movement Protein ermöglicht. Knotted-1 als Transkriptionsfaktor ist somit in der Lage neben der DNA-Bindung zusätzlich mRNA zu binden. Für die DNA-Bindung wird als Minimalmotiv TGAC als Sequenz angenommen (226). Inwiefern die mRNA sequenzspezifisch oder strukturspezifisch gebunden wird, ist noch nicht näher bekannt. Obwohl Knotted-1 bereits seit längerem untersucht wird, sind bislang keine näheren strukturellen Informationen bekannt. Eine strukturelle Charakterisierung an diesem Protein scheiterte bislang an der schlechten Löslichkeit des rekombinant hergestellten Proteins sowie der geringen Stabilität. Das Protein musste bislang aufwendig aus den bakteriellen Einschlusskörperchen (Inclusion Bodies) isoliert, denaturiert und neu gefaltet werden. Da diese Prozedur häufig zu einem hohen Grad falsch gefaltetem Protein führt und dadurch die Ausbeute an korrekt gefaltetem Protein dementsprechend gering ist, war Gegenstand der Studien zunächst ein Protokoll zur nativen Aufreinigung des Knotted-1 Proteins zu etablieren, mit dem erste strukturelle Untersuchungen durchgeführt werden können. Das rekombinant hergestellte native Knotted-1 Konstrukt sollte in darauffolgenden Versuchen hinsichtlich dessen RNA/DNA Bindeeigenschaften in vitro getestet werden und wenn möglich über SAXS Versuche die Konformation in Lösung bestimmt werden.

## 3.3.1 Die Transaktivatordomäne (PKNOX) ist der löslichkeits- und stabilititätslimiterende Bereich des *Knotted*-1 Proteins

Wesentliche Merkmale des *Knotted*-1 Proteins sind mehrere repetitive Sequenzbereiche am N-Terminus. So besitzt *Knotted*-1 neben Serin-reichen Bereichen eine Histidin-reiche Region, die dem *HisTag* hochgradig ähnelt. Dieses Merkmal in der Aminosäuresequenz sollte sich für spätere Aufreinigungsschritte zu Nutze gemacht werden, so dass kein artifizieller *HisTag* an das Protein fusioniert wurde. Analysen an menschlichen Proteinen zeigten einen Zusammenhang von Histidin *Repeats* und der Proteinlokalisation in den nukleären *Speckles* auf. So soll diese Lokalisation ab fünf aufeinanderfolgenden Histidinen zunehmend effektiv stattfinden, wohingegen nah verwandte Proteine ohne poly-Histidin Bereiche nicht in diesen *Speckles* zu finden waren (227). Ob in Pflanzen eine ähnliche Lokalisierung möglich ist, beziehungsweise ob Knotted-1 durch diesen poly-Histidin Stretch in diesen *Speckles* relokalisiert werden kann, ist bislang nicht näher bekannt.



Abbildung 28. Schematische Domänenverteilung im Knotted-1 Protein. Neben Bereichen mit hoher Unordnung (Low) existieren im Wesentlichen vier Domänen. Neben den beiden zentral gelegenen Transaktivatordomänen (KNOX 1 und 2), ist am C-Terminus zusätzlich die DNA Bindedomäne lokalisiert (HOX), welche zur Klasse der Homöobox DNA-Bindemotive zählt. Weitere Merkmale sind ein bis zwei ELK Domänen (ELK), welche unter anderem als NLS-Signal für den Kerntransport dienen. SP01 bis SP28, sowie FM01 bis FM11 stellen die im Rahmen der Arbeit analysierten Proteinkonstrukte dar.

Weiter C-terminal von diesen repetitiven Sequenzbereichen befindet sich die MEINOX Domäne gefolgt von einer bis zwei ELK-Domänen, sowie einer Lysin-reichen Region (Abbildung 28). Die MEINOX Domäne besteht aus zwei einzelnen Domänen (KNOX1 und 2) (228). KNOX1 konnte als Transkriptionssuppressor identifiziert werden, während KNOX2 für die Bildung von Homodimeren verantwortlich ist (59, 229, 230). Die Funktion der ELK-Domäne ist noch nicht explizit geklärt. Unterschiedliche Studien zeigten, dass diese Domäne ebenfalls verantwortlich für Protein:Protein-Interaktionen ist und zusätzlich den Transport in den Nukleus ermöglicht. Allerdings konnten diese Eigenschaften in weiteren Studien nicht reproduziert werden (59, 61, 231–233). Weiterhin wird angenommen, dass dieser Bereich als Lysin-reiche Sequenz, ebenfalls an der DNA-Bindung beteiligt ist (59, 234). Mutationsstudien in diesem Bereich zeigten zusätzlich eine mögliche Beteiligung im Zell-zu-Zell Transport und Bindestelle für das MPB2C Protein (38). C-terminal am Protein gelegen, befindet sich die DNA-bindende Homöobox-Domäne, durch welche die sequenzspezifische DNA-Bindung erreicht werden soll. Die Homöobox im *Knotted-1* gehört zur Gruppe der *three-amino acid loop extension (TALE*) Homöobox und kann ebenfalls eine Homodimerisierung induzieren (59, 234).

Zur Etablierung eines Protokolls zur Herstellung und Aufreinigung des nativen *Knotted*-1 Proteins wurden drei verschiedene Herangehensweisen durchgeführt. Als Startpunkt wurde das Wildtyp Protein genutzt und ohne artifiziellen Fusions-*Tag* für die Aufreinigung mittels Autoinduktionsmedium hergestellt. Nachfolgend sollte das Protein möglichst nativ isoliert und aufgereinigt werden, wobei zuvor Löslichkeitsoptimierungen durch *Screenen* verschiedener Pufferadditive durchgeführt nach

Lindwall *et al.* wurden (101). Als zweiter Weg wurden verschiedene *Tags* verwendet, die die Expression, Löslichkeit und Stabilität des daran fusionierten Wildtyp *Knotted-1* Proteins verbessern sollten. Getestet wurden mit aufsteigendem Molekulargewicht ein N-terminaler 6x*HisTag*, die azide und basische GB1 Domäne, das Thioredoxin h (Trx h) und das Maltose Bindeprotein (MBP) (235). Als dritte Möglichkeit wurden das Volllängenprotein N- und C-terminal verkürzt, sowie die einzelnen Domänen des *Knotted-1* hergestellt und aufgereinigt. Da die genauen Domänengrenzen nicht bekannt waren, wurden verschiedene Konstrukte erstellt und alle Proteinvarianten hinsichtlich Löslichkeit und Stabilität getestet. Als größere Konstrukte dienten dabei die MEINOX Domäne, sowie die Homöobox-Domäne. Die zusätzlichen ELK und Lysin-reichen Regionen wurden zusätzlich in Konstrukte der Homöobox-Domäne aufgenommen (Abbildung 28)

Für die Löslichkeitsoptimierung des Wildtyp Proteins wurde neben dem Variieren des pH-Wertes von 5 bis 8 zusätzlich die Salzkonzentration untersucht unter der das Protein nach dem Zellaufschluss löslich vorlag. Dabei konnte kein Einfluss des pH-Wertes und der Salzkonzentration auf die Löslichkeit beobachtet werden. Nahezu das gesamte hergestellte Protein verblieb unlöslich im Zellpellet. Als weitere Parameter wurden im Anschluss die Salzart als auch zusätzliche Detergenzien mit einbezogen. Die genutzten Salze wurden dabei nach der Hofmeister Serie ausgewählt, so dass der Effekt von chaotropen und kosmotropen Salzen unterschiedlicher Stärke getestet werden konnte (236). Hierbei insbesondere mit niedrigen Konzentrationen konnte an Harnstoff eine signifikante Löslichkeitsverbesserung erreicht werden (Abbildung 29a). Harnstoff ist insbesondere bei höheren Konzentrationen ein starkes chaotropisches Salz, welches dazu führt, dass die Wasserstruktur um gelöste Makromoleküle zerstört werden. Dadurch verringert sich einerseits der hydrophobische Effekt, andererseits kann dies auch dazu führen, dass Wechselwirkungen zwischen Harnstoff und Protein das Aufbrechen von Sekundärstrukturen bedingen und das Protein entfaltet wird. Sofern das rekombinant hergestellte Protein in den Inclusion Bodies lokalisiert wäre, würden die untersuchten geringen Urea-Konzentration nicht genügen, um das Protein größtenteils zu solubilisieren. Urea, wie L-Arginin sind bekannt in geringen Konzentrationen die Neufaltung von korrekt gefaltetem und aktivem Protein zu fördern und die Aggregatformation zu unterdrücken (237). Dieser Effekt könnte unter Umständen auch beim Knotted-1 helfen das Protein nativ zu isolieren, um strukturelle, sowie funktionelle Untersuchungen durchführen zu können. Daher wurden daraufhin weitere Additive wie L-Arginin, MgCl<sub>2</sub>, Imidazol und unterschiedliche Konzentrationen an NaCl bezüglich ihres Einflusses auf die Proteinlöslichkeit und auf die Durchführbarkeit der Nickelaffinitätschromatographie. Dabei zeigte sich, dass insbesondere hohe Konzentrationen an NaCl die Löslichkeit verringerten, auch wenn 3 M Urea im Puffer vorlagen (Abbildung 29b). Eine genügend hohe Salzkonzentration ist jedoch unerlässlich um unspezifische Interaktionen zwischen bakteriellen Proteinen und Nickel-NTA Matrix zu vermeiden. Folglich wurde für den Lysepuffer eine Salzkonzentration von 50 mM NaCl gewählt, während das gebundene Protein auf der Säule mit 500 mM NaCl gewaschen wurde.



Abbildung 29. Löslichkeitsoptimierung und Nickelaffinitätschromatographie des Wildtyp *Knotted*-1 Proteins. Eine Löslichkeitssteigerung konnte erst durch Zugabe von steigenden Urea Konzentrationen beobachtet werden (a). Um eine Stabilisierung des Proteins in Lösung weiter zu erhöhen wurden neben Urea weitere Additive getestet, die einen Einfluss auf die Proteinstabilität haben können (b). Der finale Puffer aus 2.5 M Urea mit 0.5 M L-Arginin wurde daraufhin genutzt und eine erste Nickelaffinitätschromatographie durchgeführt (c). Da nachfolgend jedoch das Protein bereits während der Elution präzipitierte wurden weitere Additive getestet, die für den Elutionspuffer infrage kamen. Dabei wurde eine Kombination aus dem Detergenz Natriumdesoxycholat und Urea verwendet, mit dem das Protein für etwa zwei Tage stabil in Lösung gehalten werden konnte ohne signifikante Mengenverluste während der Nickelaffinitätschromatographie zur Folge zu haben (d).

L-Arginin wurde ebenfalls mit einer Konzentration von 500 mM zu allen Puffern hinzugegeben, obwohl keine weitere Löslichkeitsverbesserung sichtbar war. L-Arginin dient aber als molekulares Chaperon (237, 238) und kann daher verwendet werden, um gelöstes Protein in nicht aggregierter Form zu halten. So konnte mit 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 2.5 M Urea, 0.5 M L-Arginin und 1 mM DTT das *Knotted-1* erfolgreich von der Ni-NTA Säule eluiert werden (Abbildung 29c).

Allerdings konnte keine höhere Konzentration des Proteins als 0.8 mg/ml erreicht werden und zudem war das Protein nur für kurze Zeit stabil in Lösung zu halten. Weitere Versuche 2.5 M Urea mit verschiedenen Detergenzien zu kombinieren, zeigten, dass insbesondere Natriumdesoxycholat bis zu einer Konzentration von 0.25 % (w/v) zu ähnlichen Löslichkeitsverbesserungen führte und ein Aufreinigen des Proteins erlaubte (Abbildung 29d). Die Konzentrationsgrenze von unter 1 mg/ml konnte

mit 0.1 % (w/v) Natriumdesoxycholat auf über 36 mg/ml erhöht werden, was für spätere Proteinkristallisationsexperimente ausreichen würde. Natriumdesoxycholat besitzt jedoch neben einer niedrigen CMC (CMC: < 0.25 %) die Eigenschaft Protein:Protein Interaktionen abzuschwächen, auch wenn das Protein in seinem nativen Zustand erhalten bleibt. Allerdings ist für das Knotted-1 und homologen Proteinen bekannt Homodimere zu bilden (59), welche durch das Natriumdesoxycholat nicht untersucht werden konnten. Trotz dessen konnte die Probe für erste CD- und DLS- Messungen nach einer vorherigen Gelfiltration genutzt werden. Der Austausch mit einem milderen Detergens wie CHAPS scheiterte bislang, da sich die Löslichkeit dadurch erneut auf maximal 0.8 mg/ml reduzierte und sich ebenfalls die Stabilität des aufgereinigten Proteins auf wenige Stunden verringerte. Weitere funktionelle als auch strukturelle Untersuchungen waren mit dem Wildtyp Protein nicht möglich, weswegen zusätzlich versucht wurde die Löslichkeit über verschiedene Fusionsproteine zu beeinflussen. Durch das Anfügen eines zusätzlichen Tags an das Zielprotein kann unter Umständen die Löslichkeit, sowie Stabilität des Zielproteins erhöht werden (235). Daher wurden fünf verschiedene Tags (6xHisTag, die azide und basische GB1 Domäne, das Thioredoxin h (Trx h) und das Maltose-Bindeprotein (MBP) N-terminal an das Knotted-1 fusioniert, wobei alle Fusionsproteine am N-Terminus einen HisTag aufwiesen, und erneut die Expression und Löslichkeit untersucht. Getestet wurden verschiedene Pufferkombinationen mit pH-Werten zwischen 7 und 8, sowie unter geringen (150 mM NaCl) als auch hohen Salzkonzentrationen (500 mM NaCl). Das MBP-Knotted-1 Konstrukt zeigte hierbei eine gute Löslichkeit in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 1 mM DTT, während alle anderen Tags keine Verbesserung der Löslichkeit in den untersuchten Puffern zeigten (Abbildung 30a). Es konnten jedoch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Puffern gefunden werden, weswegen der oben genannte Puffer, der auch optimale Bedingungen für die Nickelaffinitätschromatographie bot, für die Aufreinigung genutzt. Das Maltose Bindeprotein ist bekannt dafür neben der Expression einen Einfluss auf die Faltung der fusionierten Proteine zu haben. Auf Grund dieser Chaperon-ähnlichen Eigenschaften kann das MBP insbesondere für schlecht lösliche Proteine Faltung induzieren und somit zum einen die Löslichkeit und zum anderen die Stabilität steigern (239).

Trotz des N-terminal am MBP gelegenen *HisTags* und des intrinsischen nona-Histidins im *Knotted-1* Protein konnte keine Bindung des Proteins an die Nickel-NTA Matrix erreicht werden. Die fehlende Bindung der zwei *HisTags* kann einerseits darauf zurückgeführt werden, dass durch das MBP das Protein so gefaltet vorlag, dass beide *Tags* gleichermaßen verdeckt vorlagen. Andererseits könnte ebenso eine Oligomerisierung und eine damit einhergehende Abdeckung der Epitope die Beobachtung erklären.

Beim *Knotted-1* handelt es sich wie bereits erwähnt um ein DNA-bindendes Protein, was sich aufgrund dieser Eigenschaft möglicherweise über eine Affinitätschromatographie mit dem Liganden Heparin aufreinigen lässt. Durch eine Heparinaffinitätschromatographie können Protein bezüglich ihrer Affinität zu Nukleinsäuren nativ aufgereinigt werden, wobei die Elution über eine genügend hohe



Abbildung 30. Löslichkeits- und Aufreinigungsversuche am MBP-getaggten Knotted-1 und der Homöoboxdomäne. Das MBP-getaggte Knotted-1 konnte als einziges Konstrukt in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 1 mM DTT in Lösung gehalten werden (schwarzer Pfeil) (a). Da die anschließende Nickelaffinitätschromatographie nicht erfolgreich war, wurde das Fusionsprotein über eine Heparinaffinitätschromatographie aufgereinigt (b). Allerdings lag das Protein im Anschluss stark proteolytisch degradiert vor (schwarze Pfeile) und konnte nur in Spuren als 80 kDa Protein beobachtet werden. Eine anschließende Gelfiltration über eine Superdex 75 und Superdex 200 Säule ermöglichte zwar die Isolierung des MBP-getaggten Knotted-1 in hoher Reinheit, jedoch in sehr geringer Menge und Konzentration (c). Außerdem wurden verschiedene Konstrukte der einzelnen Domänen erstellt. Das dabei größte Konstrukt mit der höchsten Löslichkeit bestand dabei aus der ELK- und der Homöobox-Domäne (d). Über die anschließende Nickelaffinitätschromatographie konnte nahezu das gesamte rekombinant hergestellte Protein aufgereinigt werden (e). Eine abschließende Gelfiltration führte zu einem hochgradig reinen, monodispersen Protein mit einer Konzentration von über 16 mg/ml (f).

Salzkonzentration erfolgt (240). Diese Variante führte zu hinreichend sauberen Protein. Der verwendete MBP-*Tag* erlaubte eine höhere Konzentration als 1 mg/ml (> 3 mg/ml), führte allerdings dazu, dass das Protein innerhalb kürzester Zeit durch Proteasen, die in Spuren noch in der Probe vorlagen, degradiert wurde (Abbildung 30b). Selbst durch Zugabe verschiedener Protease-Inhibitoren (PMSF, EDTA, Inhibitor Cocktail (Roche)) konnte dieser Verdau nicht verhindert werden. Nachfolgende Gelfiltrationsversuche mit Hilfe einer Superdex 75 Säule mit dem zuvor über die Heparin-affinitätschromatographie isoliertem Protein zeigten, dass das bis dahin noch lösliche MBP-*Knotted-1* vermutlich unspezifisch aggregierte, wodurch es nicht verdaut wurde. Da das Auflösungsvermögen der Superdex 75 Säule nahezu der Molekülgröße vom MBP-*getaggten Knotted-1* entsprach wurde zur Vergewisserung eine weitere Gelfiltration mit einer Superdex 200 Säule durchgeführt. Erneut konnte das Protein nur im Ausschlussvolumen gefunden werden, was einer Molekülgröße oberhalb von 600 kDa entsprach und somit weder dem Monomer noch dem Dimer zuzuordnen war, sondern vielmehr unspezifischen Aggregationen. Trotz dessen konnte ein hochgradig reines Protein gewonnen werden (Abbildung 30c). Zusätzlich zu den beobachteten Aggregationen auf der Gelfiltrationssäule, setzte sich

das übrig gebliebene Protein innerhalb weniger Tage Inkubation bei 4 °C als Präzipitat am Boden des Reaktionsgefäßes ab.

Zusammenfassend konnte über den MBP-Tag die initiale Löslichkeit des Knotted-1 zwar erhöht werden, so dass eine native Aufreinigung mittels Heparinaffinitätschromatographie möglich war, allerdings blieb das Protein weiterhin äußerst instabil und war bereits nach kurzer Zeit wieder präzipitiert. Da das Knotted-1 Volllängenprotein nahezu unmöglich nativ und vor allem stabil hergestellt und aufgereinigt werden konnte, wurden als letzte Herangehensweise verschiedene verkürzte Konstrukte vom Knotted-1 hergestellt, die N-terminal einen HisTag und TEV-Schnittstelle aufwiesen. Zur Evaluierung der N- und C-terminalen Grenzen der Konstrukte, wurden zunächst über den Crystallization Construct Designer (CCD, NKI) Vorhersagen über die Sekundärstrukturelemente und vorhandene Domänen erstellt. Beim Konstrukt-Design wurde darauf geachtet, dass das neue Konstrukt nicht innerhalb von Domänen beziehungsweise in vorhergesagten Sekundärelementen, wie α-Helices oder β-Faltblätter, begann und so wenig wie möglich ungeordnete Bereiche enthalten waren. Nach Analyse der Proteinsequenz wurden insgesamt 30 verschiedene Proteinkonstrukte mit unterschiedlichen Längen hergestellt und auf ihre Proteinlöslichkeit und Stabilität getestet. Die Konstrukte umfassten dabei Vollängenproteine, die N-und C-terminal vor, beziehungsweise nach den Domänen unterschiedlich weit verkürzt wurden (SP01 bis SP08), als auch Proteine unterschiedlicher Länge, die nur die Transaktivatordomäne (SP18 bis SP28) oder Homöobox enthielten (FM01 bis FM11, Abbildung 28). In Kohärenz zu den bereits beobachteten Löslichkeits- und Stabilitätsproblemen, konnten die auch die SP01-SP08 Konstrukte, die alle Domänen beinhalteten und nur N- und C-terminal verkürzt waren, nicht in löslicher Form hergestellt werden. Ebenso konnte kein Konstrukt der Transaktivatordomäne löslich gewonnen werden. Im Gegensatz zur Transaktivatordomäne jedoch konnte ein Großteil der Homöobox-Konstrukte löslich und vor allem stabil hergestellt und aufgereinigt werden.

Für weitere strukturelle Analysen wurde das größte noch lösliche und stabile Proteinkonstrukt gewählt. Dieses enthielt neben der DNA-bindenden Domäne zusätzlich noch die ELK-Domäne (Abbildung 30d) und den ungeordneten Bereich N-terminal vor ihr. Ein Minimalkonstrukt bestehend aus der Homöobox und ohne weitere flexible Bereiche für Kristallisationszwecke wäre am besten geeignet gewesen um insbesondere Kristallisationsexperimente durchzuführen. Da die Homöobox bestehend aus den drei Helices strukturell sehr stark konserviert vorliegt und bereits eingehend durch Homologe Proteine strukturelle untersucht wurde, wurde der flexible N-terminale Bereich vor der Homöobox miteinbezogen. So könnte durch ein größeres Proteinkonstrukt neben der Bindung der DNA auch die Flexibilität des Proteins vor und nach der Bindung an die DNA näher untersucht werden, was mit der Homöobox allein nicht möglich gewesen wäre. Sowohl eine hohe initiale Löslichkeit, als auch die Möglichkeit das Protein über eine Nickel-NTA Matrix aufzureinigen waren gegeben. Nach Entfernen des *HisTags* mittels TEV Protease Verdau und nachfolgender Gelfiltration konnte ein monomeres, hochgradig monodisperses und reines Protein isoliert werden, was auf eine Konzentration von bis zu 16 mg/ml aufkonzentriert werden konnte (Abbildung 30e und f). Dass *in vitro* keine Dimerisierung mehr

zu beobachten war, kann auf das Fehlen der KNOX2 Domäne zurückgeführt werden. Obwohl auch die Homöobox zur Homo- als auch Heterodimerisierung beiträgt, konnte bereits am homologen Protein aus Reis gezeigt werden, dass insbesondere in Gegenwart der KNOX2 Domäne eine Dimerisierung eintrat (59). Ob eine Bindung an DNA eine nachfolgende Dimerisierung ermöglicht, musste noch nähergehend untersucht werden.

Die im Rahmen der Arbeit durchgeführte Charakterisierung der einzelnen Domänen zeigte, welcher Bereich im *Knotted-1* Protein der löslichkeits- und stabilitätsbestimmende Faktor war. So konnte die Homöobox-Domäne, inklusive des ELK-Motivs nativ, sowie löslich hergestellt und aufgereinigt werden. Zudem zeigte das größte Konstrukt (FM08) eine Langzeitstabilität von mehr als einem Monat bei 4 °C und machte dieses Konstrukt somit zu einem guten Kandidaten für Kristallisations- und SAXS-Experimente. Alle Konstrukte, die die MEINOX-Domäne enthielten konnten hingegen nicht löslich hergestellt werden. Empirisch lässt sich aus den untersuchten Konstrukten sagen, dass die Transaktivatordomäne den limitierenden Faktor für die Herstellung und Aufreinigung des *Knotted-*1 darstellte und dass nahezu der gesamte C-Terminus, der für die DNA-Bindung wichtig ist, löslich und stabil hergestellt und genutzt werden konnte.

#### 3.3.2 Die isolierte Homöobox-Domäne bindet sowohl DNA als auch RNA

Da das Volllängenprotein nicht nativ in löslicher Form hergestellt und aufgereinigt werden konnte, wurde an Konstrukten, die die Homöobox-Domäne umfassten, getestet , ob diese allein in der Lage ist DNA, beziehungsweise das Motiv TGAC, wie postuliert, zu binden oder ob die Bindung erst durch ein Zusammenspiel mit der Transaktivatordomäne spezifisch wird (226). Hierzu wurden Bindestudien mit kurzen, doppelsträngigen DNA-Fragmenten, die aus insgesamt 20 Nukleotiden bestanden und zentral die TGAC Sequenz trugen durchgeführt. Um die Bindespezifität des Proteins zu überprüfen, wurden neben dem TGAC-Motiv (So1) weitere Sonden mit Einzelnukleotidaustauschen von diesem Motiv untersucht. Neben dem Austausch des 5'-Thymins zu einem Cytosin (T $\rightarrow$  C, CGAC, So2) wurde eine weitere Sonde mit einem weiteren Basenaustausch an zweiter Position getestet (G  $\rightarrow$  A, CAAC, So3) (Abbildung 31a).

Der Nachweis der Bindung erfolgte über ein *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA). Das Protein wurde hierfür zunächst mit der jeweiligen Sonde auf Eis in einem molaren Verhältnis von 1:1 für 5 Minuten inkubiert und in einem Agarosegel bei 4 °C aufgetrennt. Eine starke Interaktion der DNA mit dem Protein sollte zur Ausbildung einer definierten Bande im Gel führen, wobei über *GelRed* die DNA und über eine kolloidale Coomassie Färbung das Protein visualisiert werden kann. Im Gegensatz zu den Motiven CGAC und CAAC war bei der Sonde mit der zentralen Sequenz TGAC eine einzelne definierte Bande sichtbar (Abbildung 31b).



Abbildung 31. Analysen zur Interaktion des Homöobox-Konstrukts FM08 mit verschiedenen DNA- und RNA-Oligomeren. Die Selektivität der DNA-Bindung wurde mittels drei verschiedener doppelsträngiger DNA-Fragmente, die 20 Nukleotide umfasste, überprüft. Dabei wurde das postulierte Bindemotiv TGAC mittig in der DNA-Sequenz lokalisiert und einzelne Basensubstitutionen in der Bindesequenz ebenfalls untersucht (a). Über EMSA-Versuche konnte die Bindung des TGAC-Motivs durch das Homöobox Konstrukt FM08 bestätigt werden (b). Zur Bestimmung der Affinität des TGAC-Motivs wurde daraufhin über ZIGE-Versuche mit absteigender DNA-Konzentration eine Sättigungskurve aufgenommen und über die Migrationsstrecken die K<sub>D</sub> bestimmt (c). Neben der Überprüfung der DNA-Bindeeigenschaften wurde parallel die RNA-Bindung vom FM08 überprüft. Dabei wurde sowohl *Knotted*-1 mRNA als auch UGAC als RNA-Pendant zum TGAC-Motiv getestet. Darüber hinaus wurden drei weitere Sequenzen überprüft, die im 3<sup>e</sup>-Ende der *Knotted*-1 mRNA lokalisiert sind (d). Dieser Bereich soll eine Haarnadelstruktur ausbilden können, wobei untersucht werden sollte, ob die Haarnadel selbst oder bereits Teilsequenzen dieser Struktur gebunden werden konnten (e).

Da die Homöobox-Domäne einen isoelektrischen Punkt (pI) von 10 besitzt, migrierte das ungebundene Protein zur negativ geladenen Kathode, während die negativ geladene DNA zur positiv geladenen Anode migriert. Allein aufgrund des hohen pIs wäre die Homöobox in der Lage die DNA aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen zu binden und würde als Komplex im Gel migrieren. Die beobachtete Bande bei der Probe mit der TGAC-Sonde könnte demnach allein aus dem unspezifischen Binden der DNA, beziehungsweise des negativ geladenen Phosphatrückgrats, an das Protein aufgrund der unterschiedlichen Ladung resultieren. Außerdem könnte die Bindung der DNA außerhalb des TGAC-Motivs erfolgen, da dieses Motiv von jeweils 8 Basen am 5'- und 3'-Ende flankiert wird. Da allerdings bei den beiden anderen verwendeten Sonden diese definierte Bande nicht auftrat und stattdessen ein undefiniertes diffuses Signal sowohl im Coomassie als auch GelRed gefärbten Gel sichtbar war (Abbildung 31b), ist davon auszugehen, dass diese diffuse Verteilung des Proteins bei eben diesen Sonden aus einer unspezifischen und somit schwächeren Bindung der DNA an das Protein resultiert (Abbildung 31a und b). Insbesondere der Austausch der ersten Base Thymin gegen ein Cytosin in der vorhergesagten Bindesequenz zeigte eine signifikante Abschwächung der Bindungsstärke. Thymin besitzt im Gegensatz zu dem in der Sonde 2 substituierten Cytosin neben der Methylgruppe am C5-Atom im Pyrimidin-Ring eine Keto-Gruppe anstelle eines Amins am C2-Atom (Abbildung 31a). 119

Thymine werden insbesondere durch Threonin, Phenylalanin und Prolin erkannt, wobei Phenylalanin und Prolin eine Erkennung des Cytosins ebenfalls erlauben (241). Die weitere Substitution der zweiten Base in der Erkennungssequenz zeigte keine weitere Abschwächung der Bindung, sondern verblieb auf dem Niveau der Einzelsubstitution des Thymins.

Zur Bestimmung der Affinität des Proteins zur TGAC-Sequenz wurde eine spezielle Form des EMSAs die Zone Interference Gel Elektrophorese (ZIGE) durchgeführt. Dabei wird der Umstand ausgenutzt, dass Protein und Nukleinsäure im verwendeten TAE-Puffer unterschiedlich geladen sind. Für die Interaktionsstudien wurde zunächst für 45 min die Elektrophorese mit dem Protein, wobei die Konzentration konstant gehalten wurde, durchgeführt, wobei das Protein zur Kathode migrierte. Im Anschluss wurde die DNA mit sinkender Konzentration in die gleichen Agarosegeltaschen geladen und die angelegte Polung umgedreht. Hierdurch lief das Protein zurück zu den Taschen und somit der einlaufenden DNA entgegen. Diese Methode erlaubt sowohl die Analyse schwacher Interaktionen , als auch eine Bestimmung der Bindungskonstante für die DNA-Bindung (242, 243). Die erhaltene Lauffront des Proteins im Coomassie gefärbten Gel beschreibt dabei eine typische sigmoidale Sättigungskurve.

Über die Migrationsstrecke des freien Proteins und des Protein:DNA Komplexes ließ sich über Gleichung 6 die K<sub>D</sub> berechnen, wobei d<sub>exp</sub> die Migrationsstrecke des Proteins mit variierender DNA Konzentration ist, dM die Distanz des ungebundenen Proteins, dML die Wegstrecke des Protein:DNA Komplexes und L die Konzentration der DNA ist. Durch Darstellen von  $\frac{d_{exp}-dM}{[L]}$  gegen d<sub>exp</sub> konnte über den Anstieg m = -1/K<sub>D</sub> die K<sub>D</sub> bestimmt werden (Abbildung 31c).

$$\frac{d_{exp} - dM}{[L]} = -\frac{d_{exp} - dML}{K_D}$$
<sup>[9]</sup>

Die daraus bestimmte Dissoziationskonstante für das TGAC-Motiv betrug etwa 100-200 nM. Im Vergleich zu den Affinitäten, die für das TCTP und dessen Liganden experimentell gefunden wurden, konnte in diesem Fall von einer hochaffinen Bindung ausgegangen werden. Allerdings scheint diese hochaffine Bindung nicht allein aus der selektiven Erkennung der Sequenz, beziehungsweise des einzelnen Thymins, zu resultieren. So ist es möglich, dass durch das selektive Erkennen der richtigen Sequenz Konformationsänderungen der Homöobox-Domäne induziert werden, so dass eine stärkere Interaktion mit weiteren Aminosäureresten und der Ziel-DNA möglich wird.

Die Bindung zwischen DNA und Homöobox sollte weiterhin über MST-Messungen bestätigt und genauer verifiziert werden. Hierfür muss jedoch einer der Interaktionspartner mit einem Fluorophor markiert vorliegen, wobei zwei Farbstoffe zur Verfügung stehen: ein cystein- und ein lysin-reaktiver Farbstoff. Während die Cysteinmarkierung aufgrund fehlender Cysteine nicht möglich war, war auch das Lysin-spezifische *Labeln* des Proteins problematisch. So können Lysine aufgrund ihrer positiven Ladung wesentlich an der Nukleinsäurebindung beteiligt sein, wobei durch Anfügen des Fluorophors

an die  $\epsilon$ -NH2-Gruppe die positive Ladung des Lysins aufgehoben wird. Daher konnte die Bindeaffinität des Proteins über MST-Messung nicht bestimmt werden.

Neben der DNA-Bindung wurde für Knotted-1 ebenfalls die Bindung an dessen eigener mRNA gezeigt (38). Ob die Homöobox ebenfalls mRNA binden konnte, beziehungsweise ob bestimmte Motive allein genügen, um eine Bindung zu ermöglichen, wurde erneut über EMSA Shift Assays untersucht. Analysiert wurden dabei die Knotted-1 mRNA, sowie die Sequenzen UGGC, UCAG und AGAGACUCAGAAGGUGGCACUGGCUGAGUCU, welche in vitro über das T7-Transkriptionssystem hergestellt wurden (Abbildung 31 e). Da bereits gezeigt werden konnte, dass schon der Austausch der ersten Base im TGAC-Motiv die DNA-Bindung negativ beeinflusste, wurde diese Sequenz auf RNA- Ebene erneut getestet. Da auch hier Sequenzen aus 4 Nukleotiden für Shift Assays zu klein waren, wurden erneut 20 Nukleotide umfassende RNAs hergestellt, die zentral in der Sequenz die zu untersuchenden Motive trugen.

Wie in Abbildung 31d sichtbar, konnte die *Knotted-1* mRNA-Bindung an die Homöobox über die durchgeführten *Shift Assays* bestätigt werden. Ebenfalls konnte die Bindung an der Haarnadelstruktur, als auch an den einzelnen kleineren Sequenzen aus der Haarnadelsequenz beobachtet werden. Ob diese kleinen Sequenzen spezifisch erkannt wurden und ob jeweils der gleiche Bereich in der Homöobox dafür verantwortlich ist, konnte über die Analyse nicht geklärt werden. Erneut zeigte sich, dass die modifizierte Sequenz TGAC  $\rightarrow$  UGAC nicht durch das Protein gebunden werden konnte, was zum einen ein Bindungsartefakt der übrigen bindenden kurzen Sequenzen ausschloss, da die gleichen flankierenden RNA Sequenzen genutzt wurden. Zum anderen zeigte dies, dass die Erkennung des TGAC-Motivs möglicherweise auf die Erkennung des C5-Methyl-Restes zurückzuführen ist, welche wie im substituierten Cytosin an dieser Stelle im Uracil fehlt. Beschrieben wird die Erkennung der Methylgruppe durch die Aminosäure Threonin, während andere Aminosäurereste teils unspezifisch alle weiteren Basen erkennen können (241). Allerdings können auch zwei Aminosäurereste in Kombination eine spezifische Erkennung ermöglichen.

Die mögliche Bindestelle im Protein sollte nachfolgend über strukturelle *Proteomic*-Studien mittels UV-*Crosslinking* und DEPC-Modifikation in Kombination mit MS-Analysen identifiziert werden. Untersucht wurde dabei inwiefern sich eine DEPC-Behandlung von freiem und DNA-gebundenem FM08 unterschied. Hierfür wurde zunächst das Protein mit der DNA in Lösung inkubiert und anschließend ein Teil der Probe mit DEPC für 5 min behandelt. Sofern die DNA gebunden vorlag, sollten Bereiche, die an der Bindung des Proteins an die DNA beteiligt sind, nicht durch das DEPC modifiziert werden.



Abbildung 32. Identifizierung der möglichen DNA Bindestelle über Proteinmodifizierungen über DEPC- und UV-*Crosslink-*Versuche. Protein und DNA wurden für die DEPC-Versuche zunächst miteinander inkubiert und anschließend eine Probe zusätzlich mit DEPC behandelt. Nach anschließender Fällung und Verdau mit Trypsin konnte für die DEPCmodifizierte Probe ein signifikanter Teil des Proteins nicht mehr im Spektrum gefunden werden, während der potentielle DNA-bindende Bereich weiterhin identifiziert werden konnte (a). Parallel dazu wurde der Protein:DNA-Komplex mittels UV-Licht vernetzt und anschließend auf ein Tris-Trizin Gel aufgetragen. Dabei konnten für die DNA behandelte Probe zwei zusätzliche Banden detektiert werden (b). Die nachfolgende massenspektrometrische Analyse des Peptidmusters der verdauten Banden zeigte im Vergleich zur Probe ohne DNA, dass ein Peptid nur in der Probe ohne DNA nachgewiesen werden konnte (c). Anhand der vorhergesagten Sekundärstrukturen innerhalb der Sequenz und bekannter DNA-Interaktionsstellen von homologen Homöobox-Proteinen (grün gepunktet) konnte sowohl über die DEPC-Behandlung (roter Rahmen) als auch die UV *Crosslink*-Versuche (schwarzer Rahmen) experimentell die gleichen Bereiche für die DNA-Bindung in der *Knotted*-1 Homöobox gefunden werden (d). Eine genauere Lokalisation der DNA-Bindestelle war nur über das UV *Crosslinking* möglich und lieferte die Sequenz QQLLSWWDQHK als potentielle DNA-Bindestelle für die DNA-Sonde mit dem TGAC-Motiv (e).

Nach anschließender Fällung des Proteins mit 90%Aceton /10% Methanol /10 mM DTT und darauffolgendem Trypsin-Verdau wurde das Peptidmuster beider Proben miteinander verglichen (Abbildung 32a). Ohne Inkubation mit DEPC konnte etwa 80 % der Proteinsequenz detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnte nur knapp 40 bis 50 % der Sequenz in der DEPC-behandelten Probe über die anschließende MS-Analyse identifiziert werden. N-terminale Peptide waren in der DEPC-modifizierten Probe nicht detektierbar. Ein modifiziertes Peptid konnte weiterhin für den Bereich zwischen der 45. Und 56. Aminosäure gefunden werden. Dass der N-Terminus nicht gefunden wurde, deutete bereits darauf hin, dass dieser Bereich nicht mit der DNA interagierte. Dieser Bereich umfasste im Wesentlichen den Sequenzbereich zwischen der Lys-reichen Sequenz und der ELK Domäne. Durch das DEPC könnten auch Lysine modifiziert worden sein, was den Trypsin-Verdau erschwert oder nicht mehr ermöglicht. Da darüber hinaus in diesem Bereich durch Trypsin vergleichsweise große Peptide generiert werden (>2500 Da), könnte eine chemische Modifizierung der Lysine dazu führen, dass infolge der zusätzlich auftretenden Miscleavages die entstandenen Peptide außerhalb des Detektionsbereichs von 600 bis 4000 Da lagen. Der hier identifizierte Bereich, der möglicherweise an der Interaktion mit der DNA beteiligt ist, konnte anhand von Kristallstrukturen für homologe Proteine bereits charakterisiert werden: er besteht im Wesentlichen aus drei aufeinanderfolgenden Helices im Helix-Turn-Helix Motiv, die für die DNA-Bindung verantwortlich sind. Dabei sind insbesondere die ELK-Sequenz als auch die Helix 1 und 3 für die meisten DNA-Interaktionen zuständig (Abbildung 32d).

Diese Bereiche waren aufgrund der DNA-Bindung nicht für das DEPC zugänglich, konnten infolge dessen nicht modifiziert werden, was zur Folge hatte, dass im Anschluss eine Fragmentierung durch Trypsin möglich war und somit diese Bereiche weiterhin detektierbar waren. Folglich konnte zum einen der Bereich der möglichen Interaktion der DNA-Sonde mit dem Protein eingegrenzt werden, wobei die Unzugänglichkeit des DEPC sowohl durch Bindung an die DNA als auch durch vorhandene Strukturen erklärbar wäre. Andererseits konnten allerdings keine genaueren Informationen über die direkte Interaktionsstelle zwischen DNA und Protein ermittelt werden.

Für eine genauere Lokalisierung der DNA-Bindestelle wurde nachfolgend über UV-Crosslink-Versuche die DNA kovalent an das Protein verknüpft. Dabei bilden insbesondere Pyrimidine durch UV-Licht bei 254 nm freie Radikale. Diese können mit verschiedenen in der Nähe befindlichen Aminosäuren verknüpft werden, zu denen Cysteine, Serine, Methionine, Lysine, Arginine, Histidine und alle aromatischen Aminosäuren gehören, und sind selbst im SDS-Gel stabil als Komplex vorzufinden (33, 244). Nach UV-Bestrahlung der FM08 Probe mit und ohne DNA-Sonde, die das Bindemotiv TGAC trug und anschließender Tris-Trizin PAGE zeigte sich, dass die UV-Behandlung das Protein stark fragmentierte und einzelne Fragmente auch verknüpfen konnte (Abbildung 32c). Zusätzlich konnten in der Probe mit DNA zwei weitere Banden beobachtet werden, die bei etwa 20 und 60 kDa migrierten. Die starke Fragmentierung des freien Proteins ist der verwendeten Wellenlänge des UV-Lichtes geschuldet. Da die Radikalisierung der Pyrimidine bei 254 nm am effektivsten geschieht, wurde speziell diese UV-Wellenlänge gewählt. Gleichzeitig kann diese hochenergetische Strahlung über einen längeren Zeitraum das Protein selbst schädigen, so dass durch interne Radikalbildung Quervernetzungen entstehen (244). Dass bei der DNA-behandelten Probe zwei unterschiedlich hohe zusätzliche Banden sichtbar waren, könnte auf ein unterschiedliches Verhältnis zwischen Protein und DNA erklärbar sein. Während die Bande bei 20 kDa aus einer Bindung von einem Proteinmolekül pro DNA resultiert, könnte die höhere Bande ein höheres Verhältnis von Protein zu DNA von zum Beispiel 2:1 oder noch höher bedeuten.

Diese beiden zusätzlich auftretenden Banden in der Protein-DNA Probe wurden nach vorherigem In-Gel Trypsin Verdau massenspektrometrisch analysiert. Dabei zeigten beide Banden das Fehlen des Peptids QQLLSWWDQHYK, welches in der Kontrollprobe eindeutig zu finden war (Abbildung 32c und f). Dieses Fragment bestehend aus mehreren aromatischen Aminosäuren (Tryptophan und Tyrosin) konnte als einziges wiederholend nicht detektiert werden, was auf eine mögliche Kopplung des Peptids an das Oligonukleotid zurückzuführen sein könnte. Diese Sequenz lag im Bereich der ersten Nterminalen Helix in der Homöobox-Domäne. Aus den Kristallstrukturen von DNA und Homöobox-Proteinen aus anderen Organismen ist bekannt, dass eine Helix direkt mit den Basen der DNA in der großen Furche interagiert, während die anderen beiden Helices entweder nicht oder mit den Phosphatgruppen der DNA interagieren (58).Welche Helix dabei die Basenbindung vollzieht ist von Protein zu Protein unterschiedlich, so dass vermutet werden kann, dass die erste Helix in der *Knotted-1* Homöobox diese Interaktionen und damit die Erkennung des TGAC-Motivs ermöglicht. Obwohl die isolierte Sequenz als auch die Helix im Ganzen kein Threonin enthielt, welches als einzige Thymin bindende Aminosäure postuliert wurde (241), könnte eine Kombination aus zwei aufeinanderfolgenden Aminosäuren möglicherweise die gleiche Selektivität ermöglichen. Während die aromatischen Aminosäuren in der Sequenz vorzugsweise zwischen die Basen interkalieren, binden die Glutamine als auch das Histidin und Aspartat Basen, woraus die Selektivität resultieren könnte (241). Ob eine strukturelle Veränderung des Proteins infolge der DNA-Bindung induziert wird, sollte nachfolgend über SAXS- und DLS-Messungen überprüft werden. Außerdem wurde über CD-Messungen die Sekundärstruktur der Homöobox zu sowie des Wildtyp *Knotted-1* analysiert.

#### 3.3.3 SAXS, DLS und CD-Messungen zeigen eine hohe Flexibilität der Homöobox

Trotz der bereits beschriebenen Limitierungen hinsichtlich Löslichkeit und Stabilität des kompletten *Knotted-1* Proteins konnten erste strukturelle Informationen über CD-Messungen erhalten werden. Für diese Messungen werden nur sehr geringe Konzentrationen benötigt, die bereits erreicht wurden. Anhand derer konnte gezeigt werden, dass frisch aufgereinigtes *Knotted-1* als Volllängenprotein im Gegensatz zum At1g64370 nur zu etwa 50 % ungeordnet vorlag und ein größerer Anteil an  $\alpha$ -helikalen Bereichen im Protein vorherrschte (27 %, Abbildung 33e).

Inwiefern die semi-denaturierende Aufreinigung oder die Tendenz zu aggregieren die Konformation des Proteins beeinflussten, konnte nicht näher bestimmt werden. DLS-Messungen, die neben der Gelfiltration eine Aussage über den Aggregationszustand geben konnten, zeigten außerdem, dass die Aggregatsform je nach verwendetem Puffer stark unterschiedlich war. Die Zugabe von 1.5 M Harnstoff als auch niedrigere Mengen des Detergens CHAPS führten zu hauptsächlich großen Aggregaten im Mega- bis Gigadalton Bereich. Eine weitere Erhöhung der CHAPS Konzentration auf bis zu 0.8 % führte zu einer weiteren Verbesserung der Dispersität und verschob die vorkommenden Aggregatsgrößen zu kleineren Werten. Natriumdesoxycholat als Detergenz zum Aufbrechen von Protein: Protein-Interaktionen zeigte bereits bei sehr niedrigen Konzentration von 0.1 % ein potentiell monomer vorliegendes Protein, das bei Messungen von über zwei Stunden weiterhin stabil vorlag (Abbildung 33a, b und f). Weiterführende Untersuchungen konnten jedoch nicht mit dem Knotted-1 Volllängenprotein durchgeführt werden, da zum einen Interaktionsstudien aufgrund des Natriumdesoxycholats nicht möglich waren und zum anderen das Protein maximal 12 Stunden in Konzentrationen von maximal 5 mg/ml stabil in Lösung gehalten werden konnte. Obwohl steigende Konzentrationen an CHAPS einen ähnlichen Effekt auslösten wie 0.1 % Natriumdesoxycholat, wurde auf eine weitere Erhöhung der CHAPS-Konzentration verzichtet, da bereits die CMC vom CHAPS mit Konzentrationen von 0.5 bis 0.8 % erreicht war und eine weitere Erhöhung dazu geführt hätte, dass nicht die Dispersität des Proteins allein, sondern zusammen mit den entstehenden Detergenzmicellen bestimmt wurde.



Abbildung 33. CD- und DLS-Ergebnisse für das *Knotted*-1 als auch das Homöobox-Domänen Konstrukt FM08. Frisch aufgereinigte *Knotted*-1 Proben wurden hinsichtlich ihrer Monodispersität in den unterschiedlichen Puffern über DLS-Messungen getestet (a). Dabei zeigten sowohl die Proben mit 0.5 % CHAPS als auch 1.5 M Urea eine hohe Dispersität, während die Zugabe von 0.1 % Natriumdesoxycholat (DC) eine weitestgehend monodisperse Probe zur Folge hatte. Diese Monodispersität konnte bei einer Konzentration von 4.7 mg/ml für 2 h erhalten werden, zeigte jedoch keine scharfen Signale wie es für strukturell monodisperse Proben der Fall wäre (b). Im Gegensatz dazu zeigte das FM08-Konstrukt in 1 mM HEPES pH 7.5, 10 mM KCl, und 1 mM MgCl<sub>2</sub> nur eine Form, die abhängig von der Konzentration zu größeren Aggregaten verschoben war. Durch Zugabe von äquimolaren Mengen an doppelsträngiger DNA sank diese strukturelle Polydispersität und führte zu einem Komplex der geringfügig größer war als das freie FM08 (c). Die bestimmten Radii als auch die dadurch abgeschätzten Molekulargewichte (Est. MW) sind in (f) zusammengetragen. Über anschließende CD-Messungen der Homöobox als auch des Knotted-1 in 1 mM HEPES pH 7.5, 10 mM KCl, und 1 mM MgCl<sub>2</sub>, beziehungsweise 2.5 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM NaCl, 0.05 % Natriumdesoxycholat wurde die Sekundärstrukturverteilung beider Konstrukte bestimmt (d). Dabei lag das FM08 zur Hälfte  $\alpha$ -helikal vor während das Volllängen *Knotted*-1 zu etwa 27 % helikal vorlag (e).

Da für das Homöobox-Konstrukt FM08 bereits Protein:DNA-Interaktionsstudien durchgeführt werden konnten und dieses Protein ohne weitere Detergenzien stabil mit einer Konzentration von bis zu 16 mg/ml vorlag, wurde ebenfalls die Tendenz zum Aggregieren dieses Konstrukts, als auch die Veränderung des hydrodynamischen Radius in Gegenwart des bindenden DNA-Motivs TGAC über DLS-Messungen untersucht.

Bei allen gemessenen Konzentrationen (70  $\mu$ M (0.9 mg/ml) und 840  $\mu$ M (11 mg/ml)) lag das Protein monodispers vor, wobei hohe Konzentrationen offensichtlich infolge von Aggregationen einen höheren hydrodynamischen Radius aufwiesen (Abildung 33c und f). Weiterhin waren beide Signale sehr breit, was auf eine strukturelle Polydispersität und damit hohen Flexibilität hindeutete. Durch Zugabe äquimolarer Mengen von DNA verschob sich zum einen der hydrodynamische Radius der 70  $\mu$ M Probe zu leicht größeren Werten, zum anderen reduzierte sich interessanterweise die Flexibilität des Systems, was anhand der reduzierten Signalbreite zu beobachten war. Zur Kontrolle wurde ebenfalls die freie DNA in einer Konzentration von 70  $\mu$ M gemessen. In Kombination mit den Protein:DNA-Interaktionsanalysen über DEPC-Modifizierung könnte dies bedeuten, dass insbesondere der Bereich der Homöobox in freier Form einen hohen Grad an Flexibilität aufweist, welche sobald die DNA gebunden wird drastisch reduziert wird.



Abbildung 34. Kristallisationsergebnisse für das ungebundene Homöobox-Konstrukt FM08. Das Protein wurde mit einer Anfangskonzentration von 16 mg/ml für Kristallisationsexperimente verwendet. Dabei konnten unter 0.2 M Ammoniumnitrat, 20 % PEG 3350 nadelförmige Kristalle beobachtet werden, die bereits wenige Minuten nach Ansetzen der Bedingung entstanden und wobei es sich wahrscheinlich um Salzkristalle handelte (a). Ebenso konnten unter 0.1 M Tris-HCl pH 8.5, 20 % Ethanol kleine Spherulite beobachtet werden (b). Nach weitere Optimierung der Bedingungen konnten einzelne große Kristalle bei 0.1 M HEPES pH 6.5, 10 % PEG 6000 beobachtet werden (c).

Diese Reduktion könnte durch die Ausbildung der dreidimensionalen *Helix-Turn-Helix* Motive induziert werden, welche in Lösung so eventuell nicht vorliegen. Ebenfalls könnte die ELK-Sequenz zusätzlich durch Binden an die DNA eine kompaktere Form des Proteins induzieren.

Dass die Annahme der Existenz der drei Helices richtig sein könnte, wurde nach Überprüfung der Sekundärstruktur über CD-Messungen bestätigt. Im Gegensatz zum kompletten *Knotted-1* lag das FM08 Konstrukt zu über der Hälfte α-helikal vor und bestand nur zu knapp einem Drittel aus ungeordneten Bereichen (Abbildung 33d und e). Aus den Strukturvorhersagen anhand homologer Proteine kann der helikale Bereich sehr gut die Homöobox-Domäne abdecken, während der N-terminale Bereich davor den hauptsächlich ungeordneten Anteil ausmacht. Da sowohl für die Aufreinigung als auch für die CD-Messung MgCl<sub>2</sub> hinzugegeben wurde, was sich während der Aufreinigung als stabilisierendes Additiv herausstellte, war es erforderlich dies zunächst mittels EDTA zu chelatieren, um dessen Einfluss auf die Sekundärstruktur des freien FM08 überprüfen zu können. Es konnten allerdings in Abhängigkeit vom vorhandenen Magnesium keine Veränderungen in der Sekundärstrukturzusammensetzung festgestellt werden.

Der hohe Anteil an Faltung in dem Homöobox-Konstrukt erlaubte eine mögliche Kristallisation. Das freie Protein wurde dabei mit einer Konzentration von 16 mg/ml in zwei verschiedenen *Screens* (JCSG, PACT) getestet. Der genutzte Proteinpuffer bestand aus 10 mM HEPES pH 7.5, 150 mM KCl und 10 mM MgCl<sub>2</sub>. In mehreren Bedingungen konnte bereits wenige Stunden nach Ansetzen der Bedingungen eine Kristallbildung beobachtet werden. Diese Bedingungen enthielten Ammoniumnitrat oder Phosphatsalze.

Da der Puffer Magnesium enthielt ist davon auszugehen, dass die schnelle Kristallisation durch Bildung von Salzkristallen bestehend aus Magnesiumnitrat oder Magnesiumphosphat zu erklären war (Abbildung 34a). Bedingungen, die ausschließlich Substanzen enthielten, die eine Salzkristallbildung unwahrscheinlich machten, führten zu kleinen Spheruliten oder Phasentrennung der Probe. Nach weiterer Optimierung der Bedingungen konnten einzelne große Kristalle hergestellt werden (Abbildung 34b und c). Die optimale Bedingung bestand aus 100 mM HEPES pH 6.5 und 10 % PEG 6000 und führte zu großen einzelnen Kristallen, die für strukturelle Analysen verwendet werden konnten. Ein anschließend durchgeführter Tryptophan-Fluoreszenztest der Kristalle konnte keinen Aufschluss geben ob ein Salz- oder Proteinkristall vorlag. Ebenso konnte kein schlüssiges Streubild über die Drehanode generiert werden. Versuche den Komplex aus DNA und Protein zu kristallisieren wurden bislang nicht durchgeführt.

Bisherige Strukturinformationen über die Homöobox-Proteine sind auf das Minimalmotiv bestehend aus den drei Helices beschränkt und ließen sich über Strukturhomologien auch auf die *Knotted-1* Homöobox übertragen. Allerdings fehlt zum einen Informationen über die Flexibilität der Domäne in Lösung als auch das Verhalten zusätzlicher Motive und Domänen, wie die ELK-Domäne. Um Informationen über die Flexibilität der Homöobox zu erlangen, als auch um einen weiteren Einblick in die räumliche Ordnung der N-terminal gelegenen ELK-Domäne zu erlangen wurde neben den Kristallisations- auch SAXS-Versuche mit dem freien als auch mit dem DNA gebundenen FM08 Konstrukt durchgeführt. Der Konzentrationsbereich lag erneut zwischen 1 und 5 mg/ml. Höhere Konzentrationen wurden vermieden, da bereits in den DLS-Messungen eine konzentrationsabhängige Aggregation zu beobachten war (Abbildung 33c). Für die Messung des DNA gebundenen FM08 wurde zuvor der Komplex über eine Gelfiltration von freiem Protein und DNA getrennt und anschließend konzentriert. Die Auswertung erfolgte entsprechend der Herangehensweise vom At1g64370 Protein, da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass das freie Protein in Lösung hochgradig flexibel vorliegen könnte.

Zur Berechnung der EOM Modelle wurde einerseits keine feste Domäne deklariert und andererseits ein *Knotted-1* Homöobox *in silico* Strukturmodel verwendet. Dieses Modell auf Basis der NMR-Struktur der Homöodomäne des humanen PNOX1 (*pdb code*: 1X2N) wurde über den SWISS-MODEL Server erstellt (194). Im Vergleich zum At1g64370 sowie TCTP konnte bereits zwischen 1 und 5 mg/ml eine konzentrationsabhängige Aggregation beobachtet werden.

Während sich bei der 1 mg/ml Probe für die Proteingröße entsprechende R<sub>g</sub>-Werte und Molekulargewichte berechnen ließen, stiegen diese berechneten Werte mit steigender Konzentration des Proteins linear an. Auch konnten alle drei Streukurven nicht übereinandergelegt werden und zeigten insbesondere im Kleinwinkelbeugungsbereich einen stärker werdenden Aufwärtstrend (Abbildung 35a). Folglich wurde für nachfolgende Untersuchungen nur die 1 mg/ml Probe für die Auswertungen herangezogen. Nach Darstellen der Daten in einem dimensionslosen Kratky-Plot konnte eine ähnliche Form wie für das TCTP beobachtet werden. Neben einem kompakten Kern lagen im Protein größere flexible Bereiche vor, sodass das typische Maximum für kompakte Proteine bei  $\sqrt{3}$  in Richtung größere sR<sub>g</sub>-Werte verschoben vorlag und nachfolgend der Graph immer weiter anstieg. Die P(r) Funktion hingegen ähnelte der vom At1g64370 mit einem Maximum bei kleineren Werten und einem vergleichsweise großem Wert für d<sub>max</sub>.



Abbildung 35. SAXS-Ergebnisse für das FM08-Konstrukt ohne DNA. Bereits für geringe Konzentrationserhöhungen konnte ein linearer Anstieg des  $R_g$  als auch des Molekulargewichtes beobachtet werden, wodurch alle drei Konzentrationen in der Guinier-Region (a) nicht deckungsgleich waren. Infolge dessen wurde in anschließenden Auswertungen die niedrigste Konzentration von 1 mg/ml verwendet, da hier keine Aggregationseffekte beobachtet werden konnten (a). Der anschließende dimensionslose Kratky-Plot zeigt, dass ebenfalls wie das TCTP eine gewisse Globularität verbunden mit flexiblen Bereichen (b). Die Paarverteilungsfunktion hingegen ähnelte der vom At1g64370 mit zu großem d<sub>max</sub> als es für ein kompaktes Protein möglich wäre (c). Das *ab initio Dammif* Modell zeigt jedoch die typische Form der Homöobox, welche den kompakten Kern bildete (d) und sich sehr gut mit der NMR-Struktur der Homöobox aus dem humanen Homolog PNOX1 (*pdb code*: 1X2N) überlagern ließ (e + f). Unter der Annahme einer unflexiblen Homöobox-Domäne wurde über EOM Berechnungen der N-terminale Bereich vor der *Knotted*-1-Homöobox in Lösung berechnet. Dabei konnten insgesamt fünf Konformationen aus dem Ensemble von 10000 Strukturen das erhaltene Beugungsbild vollständig abdecken und erklärten außerdem die großen d<sub>max</sub>-Werte (g). Die Qualität der *EOM* Ergebnisse konnte erneut über ein gültiges R<sub>σ</sub> bestätigt werden und so konnte die insgesamt hohe Flexibilität von kompakteren zu elongierten Konformationen gezeigt werden (h).

In Kombination der Rohdaten konnte somit angenommen werden, dass das FM08 sowohl einen kompakten Kern besaß als auch flexibel und elongiert vorliegen musste. Somit ist die vorherige Annahme, dass die Homöobox-Konformation mit den drei Helices in Lösung nicht vorliegen kann, falsch.

Die Reduzierung des hydrodynamischen Radius bei Anwesenheit von DNA in den DLS-Messungen könnte somit durch Umlagerung des flexiblen N-terminalen Bereich des Konstruktes erfolgen.

Die Vermutung deckte sich gut mit dem über *Dammif* berechneten *ab initio* Modell (Abbildung 35d und f). Die typische Form der Homöobox, so wie sie aus Kristall und NMR-Strukturen bekannt ist, konnte

dem größeren kompakten Bereich im Modell zugeordnet werden, während der N-terminale flexible Bereich die sichtbare Verlängerung darstellen könnte. Ein genaueres Bild wurde erneut über Berechnungen mit Hilfe der EOM Methode geschaffen. Für die Berechnungen wurde zum einen die Homöobox-Domäne als unveränderlich angesehen und die NMR-Struktur des humanen PKNOX1 in die Berechnungen miteinbezogen. Zum anderen wurde separat das komplette FM08 als flexibel angenommen ohne zuvor eine Domäne wie die Homöobox als rigide zu deklarieren. Die erhaltenen Werte zeigten, dass insbesondere die Annahme einer rigiden Homöobox zu einem besseren Fit der Daten auf das Ensemble führte als für die Berechnung mit dem komplett flexiblen Protein ( $\chi^2_{rigide}$ : 1.152,  $\chi^2_{\text{flexibel}}$ : 1.424). In Abbildung 35g ist zu sehen, dass neben der kompakten Homöobox der N-terminale Bereich bestehend aus dem Abschnitt nach der Lysin-reichen Region und der ELK-Sequenz alternierend elongiert bis kompakt vorlag und hochgradig flexibel war. Obwohl die CD-Messungen nur einen Anteil an Unordnung von etwa 34 % ermittelten, die Homöobox allein allerdings nur etwa 50 % des Konstrukts ausmachten, könnte angenommen werden, dass innerhalb des N-terminalen Bereichs weitere Sekundärelemente vorhanden sind, die jedoch keine Auswirkungen auf die Flexibilität haben und in den EOM Modellen nicht als Sekundärelemente sichtbar gemacht werden konnten. Somit ist es erklärbar, dass das FM08-Konstrukt, obwohl es nur 12 kDa groß ist einen größeren Rg-Wert aufwies als das größere TCTP (Abbildung 35h). Obwohl beide einen kompakten Kern aufweisen lag das FM08 insgesamt in gestreckter Form vor, während das TCTP mit Ausnahme des Loops kompakt vorlag.

Die SAXS-Messungen des Komplexes aus DNA und FM08 konnten zwar durchgeführt werden, jedoch zeigten die erhaltenen Daten entweder starke Aggregationen oder aber nur die vorhandene DNA und nicht den Komplex aus DNA und Protein. Ein Grund hierfür kann sein, dass aufgrund des stärkeren Kontrastes durch Streuung der DNA der Anteil an Proteinstreuung nicht signifikant genug war, um ihn später von der DNA-Probe herausrechnen zu können (245). Ebenfalls durchgeführte Messungen am Volllängen *Knotted-1* bei Konzentration von unter 1 mg/ml führten nicht zum gewünschten Ergebnis, da es auch hier zur Bildung großer Aggregate kam, wie sie bereits in Gelfiltrationsstudien gefunden werden konnten.

#### 3.3.4 Zusammenfassung

Zusammenfassend konnte für das *Knotted-1* der löslichkeitslimitierende Bereich identifiziert werden. Dieser bestand im Wesentlichen aus dem Bereich der MEINOX-Region, welche die KNOX1 und 2 Domänen enthielt. Nahezu der komplette C-Terminus konnte löslich und stabil hergestellt werden und erfolgreich auf dessen DNA- und RNA-Bindeeigenschaft hin untersucht werden. Dabei zeigte die Homöobox die bereits vermutete Spezifität für die Sequenz TGAC, aber keine Bindung der gleichen Sequenz auf RNA-Ebene, während RNA-Sequenzen aus dem Bereich der KNAT-homologen Sequenz binden konnten. KNAT bezieht sich dabei auf das Knotted-1 Homolog, welches in Arabidopsis thaliana zu finden ist. Die Circulardichroismus-Daten in Kombination mit DLS- und SAXS-Ergebnissen zeigten eine Homöobox, die offensichtlich infolge der DNA-Bindung drastisch an Flexibilität verliert, was eventuell strukturelle Veränderungen in der MEINOX-Region im Volllängenprotein nach sich ziehen könnte. Über die durchgeführten SAXS-Experimente konnte die Homöobox sowie der N-terminale Bereich vor ihr erstmals gut strukturell charakterisiert und auf Flexibilität überprüft werden. Allerdings war es weiterhin nicht möglich über die SAXS-Analysen strukturelle Informationen für den Protein:DNA-Komplex als auch für das Knotted-1 Protein in dessen kompletter Form zu erhalten. Da offensichtlich die initiale Löslichkeit und damit Möglichkeit der Aufreinigung des Knotted-1 durch Fusionieren mit dem MBP gesteigert werden konnte, jedoch auch weiterhin die Stabilität des Proteins nicht gegeben war, könnten Informationen über Konformationsänderung der Homöodomäne infolge der DNA-Bindung dazu beitragen bessere Pufferbedingungen zu finden, in denen Knotted-1 stabil vorliegt. Hierzu könnte die Zugabe großer Mengen kurzer DNA-Sequenzen zählen, die das Bindemotiv TGAC enthalten. Durch Bindung dieser DNA durch die Homöobox könnte bedingt durch Konformationsänderungen die Stabilität eventuell gesteigert werden. Sofern das Knotted-1 Protein monodispers und stabil produziert werden kann, können neben SAXS- und Kristallisationsexperimenten auch durch chemische Modifizierung Einblicke in die Konformation des Volllängenproteins über Massenspektrometrische Analysen erlangt werden.

#### 3.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten drei nicht-Zell autonome Proteine (NCAPs) erfolgreich strukturell analysiert werden. Allen drei gemein ist das Vorkommen von teils großen unstrukturierten Bereichen, die sowohl die Stabilität als auch die möglichen Herangehensweisen zur Strukturaufklärung beeinflussen. Ungeordnete Proteine spielen in Eukaryoten eine herausragende Rolle, da sie in nahezu allen regulatorischen Prozessen mitwirken und aufgrund ihrer Flexibilität eine Vielzahl an möglichen Bindepartnern besitzen. Das At1g64370 als eines der beiden phloemmobilen Proteine, die hier untersucht wurden, konnte bislang nur in Proteomstudien identifiziert werden. Allerdings lag bislang keine Information zu dessen Funktion und möglichen strukturellen Aufbau vor. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das Protein ein intrinsisch ungeordnetes Protein ist und einige Eigenschaften von Dehydrinen aufweist, obwohl eine Klassifizierung in die Dehydrinklasse aufgrund des Fehlens des K-Segments nach bisherigem Dogma nicht möglich ist. Zu den Dehydrin-ähnlichen Eigenschaften gehören die selektive Bindung von Metallen, wie Zink, Kupfer, Nickel (IMAC Versuche), der hohe Grad an Unordnung (CD-, SAXS-Messungen) und die Konformationsänderungen infolge der Bindung von SDS und Zink (CD-Messungen). Insbesondere die Eigenschaft Metalle zu binden ist dahingehend interessant, da bislang angenommen wurde, dass zwei aufeinanderfolgende Histidine hierfür notwendig sind. Diese jedoch sind in im At1g64370 nicht vorhanden, weswegen die Metallbindung eventuell auf intra- und intermolekulare Beteiligungen mehrerer Histidine in unterschiedlichen Bereichen zurückzuführen wäre. Das At1g64370 besitzt Homologien zum Arabidopsis Dehydrin HIRD11 und könnte infolge dessen als Dehydrin-*like* Protein klassifiziert werden. Ob sich beide Proteine gegenseitig in der Pflanze komplementieren können oder ob das At1g64370 eine stärkere Bindung von RNAs ermöglicht, müsste in künftigen *Knock-out* und Überexpressionsstudien in transgenen Pflanzen untersucht werden. Diesbezüglich könnte ebenfalls studiert werden, ob eine Überexpression des At1g64370 eine Schutzfunktion vor verschiedenen Stressbedingungen, wie Hitze, Kälte oder Trockenheit bietet. A. Ostendorp konnte zeigen, dass das At1g64370 Chaperon-ähnliche Eigenschaften gegenüber Proteinen besitzt. Ob das Protein ebenfalls als RNA-Chaperon fungiert und somit als Janus Chaperon klassifiziert werden kann, müsste in *in vitro Assays* getestet werden. Eine Chaperon-Funktion auf RNAs zum Erhalt der Sekundärstrukturen wäre eine interessante Beobachtung, da dieses Protein hoch abundant im Phloem vorkommt und dies somit womöglich den Transport intakter RNAs im Phloem erlauben könnte.

Das TCTP in Pflanzen ist auf funktionaler und struktureller Sicht weniger gut charakterisiert als in anderen Eukaryoten. Es konnte gezeigt werden, dass Struktur und Funktion des TCTPs aus Arabidopsis thaliana weitestgehend denen aus anderen Organismen entsprechen. So konnte eine Bindung von Hemin, ebenso wie die Interaktion mit mehreren bekannten Proteinen aus anderen Organismen beobachtet werden, die aber bislang in Pflanzen und genauer im Phloem nicht bekannt waren. Interessanterweise, konnte eine kovalente Dimerisierung des Proteins beobachtet werden, sofern das TCTP mit Pflanzenextrakt inkubiert wurde. Dies könnte auf Artemisinin-ähnliche Substanzen hindeuten, die in der Lage sind das Protein zu verknüpfen. Die dafür verantwortliche Substanz konnte nicht isoliert und identifiziert werden und müsste in weiteren Studien gefunden werden. Eine Artemisinin-ähnliche Substanz wäre dahingehend von Interesse, da dem Artemisinin und dessen Derivaten neben dem Nutzen als Anti-Malariamittel eine Wirkung auf bestimmte Krebsarten zugesagt wird. Über SAXS-Versuche konnte gezeigt werden, dass die Loop Region nach dem Binden der unterschiedlichen Liganden unterschiedliche Konformationen einnimmt. Die Kristallisation blieb jedoch bislang ergebnislos. Allerdings zeigten Versuche über die limitierte Proteolyse, dass ein Entfernen des Loops einen positiven Effekt auf die Kristallisierbarkeit des Proteins haben könnte. Ebenso könne ein Herabsenken der Löslichkeit des Proteins durch Methylierung oberflächennaher Lysine künftige Erfolgsaussichten das Protein zu kristallisieren steigern. Da darüber hinaus einige Interaktionspartner identifiziert wurden, könnten Ko-Kristallisationsversuche ebenfalls durchgeführt werden und möglicherweise eine hochauflösende atomare Proteinstruktur ermöglichen.

Das *Knotted*-1 ist im Vergleich zu den beiden vorhergenannten Proteinen kein phloemmobiles, sondern vielmehr über kurze Distanzen mobiles Protein. Allein dessen mRNA konnte bislang im Phloem identifiziert werden. *Knotted*-1 als mobiler Transkriptionsfaktor konnte bislang kaum *in vitro* untersucht werden. Häufig führte eine Überexpression in *E. coli* zur Anhäufung des Proteins in *Inclusion Bodies*. Infolge dessen musste zunächst denaturierend das Protein aufgereinigt, um im Anschluss neugefaltet werden zu können. Dies führt jedoch häufig zur falsch gefaltetem und instabilen Proteinformen. In dieser Arbeit wurden Wege gesucht das Protein löslich herzustellen und aufreinigen zu können. Dabei konnte die MEINOX Domäne als der löslichkeits- und stabilitätslimitierende Bereich im Protein identifiziert

werden. Es konnte zwar das Volllängenprotein löslich isoliert werden, allerdings gelang dieses nur durch Zugabe von Urea und Natriumdesoxycholat, einem Detergenz, das Protein:Protein Interaktionen aufbrechen kann. Trotzdem verblieb die Proteinlöslichkeit bei unter 1 mg/ml bei gleichzeitig schlechter Stabilität. Eine signifikante Verbesserung konnte mit Konstrukten, bestehend aus der Homöobox und ELK Domäne, erreicht werden. Diese konnten auf bis zu 16 mg/ml konzentriert werden und lagen selbst nach einem Monat stabil in Lösung vor. Von dieser Domäne konnten erste SAXS-Daten gesammelt werden und zeigen den hohen flexiblen Charakter des Proteins. Zukünftige SAXS-Studien müssten zeigen, dass die Homöobox in Kombination mit kurzen RNA oder DNA Oligomeren eine Konformationsänderung induziert, wie sie in den DLS-Messungen beobachtet wurde. Ebenfalls könnte versucht werden die hochaffine DNA-Bindung auszunutzen und die Homöobox zusammen mit der DNA in Ko-Kristallisationsversuchen strukturell aufzuklären. Ein starrer Komplex aus DNA und Protein könnte eine höhere Erfolgswahrscheinlichkeit auf Kristalle bedeuten und die Strukturaufklärung ermöglichen. Da allerdings die Homöobox allein schon relativ gut strukturell analysiert wurde, müssten weitere Löslichkeitsstudien durchgeführt werden, um noch größere Bereiche des Knotted-1 löslich herstellen zu können. Das Nutzen des MBP als Löslichkeits-Tag zeigte bereits Verbesserungen in der initialen Löslichkeit des Knotted-1. In weiteren Studien könnte dieser Tag genutzt werden um Konstrukte, die die MEINOX Domäne einschließen, erfolgreich aufzureinigen und zu kristallisieren. Auch könnte die semi-native Aufreinigungsmethode genutzt werden um über strukturelle Proteomik-Ansätze mehr Informationen über die Konformation des Proteins zu erlangen.

Insgesamt konnten alle drei Proteine über SAXS und weiteren Messmethoden näher strukturell charakterisiert werden. Das Analysieren von insbesondere flexiblen Proteinen erlaubt einen tieferen Einblick in die regulatorischen Abläufe in der Pflanze, verlangt häufig jedoch eine spezielle Präparation der Proteine. Diese sind im Vergleich zu kompakten Proteinen, schlechter löslich, besitzen eine geringere Stabilität und eignen sich häufig nicht um hochauflösende Kristallstrukturen zu erzeugen. Hier erlaubten die SAXS-Messungen wichtige Einblicke, die sonst nicht möglich gewesen wären und zeigten überdies eine Abhängigkeit der Konformationen von der Proteinkonzentration und bindenden Liganden. Diese Einblicke können in künftigen Studien helfen die regulatorischen und Signalwege in der Pflanze besser zu verstehen.

### 4 Zusammenfassung

Pflanzen als sessile Organismen sind häufig biotischen, wie abiotischen Stress ausgesetzt. Die Erkennung dieser externen Stimuli und Weitergabe der Informationen in weiter entfernte Gewebe und Organe bedingt die Ausbildung von Langstreckentransportsystemen. Mit dem Xylem und Phloem besitzen Pflanzen zwei Transportsysteme mit unterschiedlichen Aufgaben. Während das Xylem zum Ionen- und Wassertransport von der Wurzel in die übrigen Pflanzenorgane zuständig ist, ist das Phloem Haupttransportroute vieler verschiedener Makromoleküle. Der Transport erfolgt hier im Gegensatz zum Xylem bidirektional und jeweils vom Ort der Beladung (*Source*) zum Ort des Verbrauchs (*Sink*). Zu den transportierten Molekülen gehören Photoassimilate, Phytohormone, aber auch Proteine und RNAs. Letztere sind bereits bekannt als Informationsüberträger zu dienen und im Falle von Stress, wie Phosphat- oder Schwefelmangel, die Information in weit entfernte Gewebe zu tragen. Zu den identifizierten Signalüberträgern zählen mehrere miRNAs wie beispielsweise miR399 oder miR168, aber auch eine ganze Reihe an verschiedenen mRNAs, wie vom *Knotted*-1, TCTP und *Flowering Locus* T (FT).

Neben den RNAs spielen Proteine eine weitere wichtige Rolle in der Signalübertragung. Phloemproteomstudien an Raps führten zur Identifikation einzelner im Phloem existierender Calcium und G-Protein Signalling Proteine, Chaperone und Proteine, die in der Zellentwicklung beteiligt sind. Eines dieser Proteine ist das TCTP, welches an einer Vielzahl verschiedener biologischer Prozesse beteiligt ist. So besitzt es anti-apoptotische, als auch Heat-Shock Protein-ähnliche Eigenschaften. Es ist an der Zellzyklusprogression ebenso beteiligt, wie an der Bewältigung verschiedener Stressarten, von Wasser- bis ROS-induzierten Stress. Interessanterweise konnten einzelne unbekannte Proteine ebenfalls identifiziert werden, die hochabundant im Phloem vorzuliegen scheinen. Zu diesen Proteinen gehört das At1g64370, welches in mehreren Spots in 2D Gelen gefunden werden konnte. Dieses Protein konnte bislang weder einer Proteinklasse zugeordnet, noch eine mögliche biologische Funktion vorhergesagt werden. Da dieses Protein einen isoelektrischen Punkt von über 9 besitzt, konnte angenommen werden, dass es bei der RNA-Bindung und dem Transport im Phloem eine Rolle spielt oder aber als Chaperon fungieren könnte. Phloemproteine gehören zur Gruppe der nicht-Zell autonomen Proteine (NCAPs) zu denen auch virale und Proteine, die über kurze Distanzen von Zelle zu Zelle transportiert werden können, gehören. Eines der ersten identifizierten NCAPs ist das Knotted-1. Knotted-1 ist ein Transkriptionsfaktor und für den Erhalt der meristematischen Stammzellen verantwortlich. Die Besonderheit vom Knotted-1 ist dessen Fähigkeit von Zelle zu Zelle transportiert zu werden, ebenso wie dessen mRNA. Eine ektopische Expression des Proteins oder ein Knock-out führen zu teilweise schweren Phänotypen, wie der Bildung kleiner Knoten im Blatt oder dem Ausbleiben der Sprossentwicklung.

Nahezu allen Signal- und Chaperonproteinen gemein ist deren vergleichsweise hohe Grad an struktureller Unordnung. Diese reicht von kurzen ungeordneten Regionen bis hin zur kompletten intrinsischen Unordnung. Circa ein Drittel aller in Eukaryoten vorkommenden Proteine besitzen ein gewisses Maß an intrinsischer Unordnung, wobei 70 % aller am *Signalling* beteiligten Proteine größere ungeordnete Regionen besitzen.

Die Analyse solcher Proteine ist im Vergleich zu kompakten gefalteten Proteinen wesentlich komplizierter. So sind Bereiche hoher Unordnung häufig Ziel proteolytischer Aktivität und reduzieren die Stabilität des Proteins in Lösung. Für eine Vielzahl von *in vitro* Studien reichen Proteinmengen im mikromolaren Bereich. Für eine eingehende strukturelle Untersuchung jedoch werden Mengen im Milligrammbereich benötigt. Erschwerend kommt hinzu, dass ungeordnete Proteine und Proteinregionen die Kristallisation erschweren, beziehungsweise nicht erlauben, weswegen folglich kaum strukturelle Informationen von diesen Proteinklassen existieren. Eine Alternative, die die Kristallisation von Proteinen nicht benötigt, ist die Messung in Lösung über SAXS. SAXS erlaubt die Bestimmung der Konformation des Moleküls in Lösung und gleichzeitig auch die Änderung der Konformation durch Ändern des Lösemittels, des pH-Wertes, der Salzart oder auch nach Zugabe von bindenden Liganden jeglicher Molekülgröße. Somit können über SAXS Messungen Einblicke in die Flexibilität und die Änderung dieser erlangt werden, die mit anderen Methoden, wie der Kristallisation nicht möglich wären.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die NCAPs *Knotted*-1, TCTP und das uncharakterisierte Protein At1g64370 näher strukturell, wie auch funktionell über SAXS, CD und struktureller Proteomik analysiert werden. Weiterhin sollte das TCTP auf dessen *in vitro* Bindeeigenschaften gegenüber Phloemproteinen und niedermolekularen Substanzen, wie Hemin und Artemisinin getestet werden. Für das *Knotted*-1 sollten zunächst Protokolle zur nativen Aufreinigung erstellt werden um anschließend RNA/DNA Bindeassays und SAXS Versuche durchführen zu können.

Die strukturellen Analysen über SAXS, CD, DLS und struktureller Proteomik zeigten bei allen drei Proteinen, dass diese zu unterschiedlichen Anteilen intrinsisch ungeordnet vorliegen und diese Unordnung durch Zugabe von Bindungspartnern beeinflusst werden konnte. Den größten Effekt zeigte das At1g6437, das bei Gegenwart von SDS und Zink mehr Struktur annahm. Aufgrund seiner beobachteten strukturellen Eigenschaften konnte angenommen werden, dass es sich bei diesem Protein um ein Dehydrin-*like* Protein handeln könnte, obwohl das charakteristische K-Segment fehlt.

Das pflanzliche TCTP ist *in vitro* nur spärlich charakterisiert. Es konnte in mehreren Interaktionsstudien gezeigt werden, dass gleiche Interaktionspartner, wie aus anderen Organismen bekannt, existieren und selbst die Bindung von Hemin möglich ist, obwohl die postulierten benötigten Aminosäuren nicht vorhanden waren. Interessanterweise, zeigten *Pull-down* Experimente, dass möglicherweise Chlorophyll a ein Ligand sein könnte, der zu einer Dimerisierung des Proteins führt, was durch das Hemin nicht induziert werden konnte.
Zu guter Letzt konnten mögliche lösliche *Knotted*-1 Konstrukte, bestehend aus der Homöobox und ELK Domäne, erstellt werden und erste SAXS Messungen durchgeführt werden. Die Interaktion von DNA und RNA schien sequenzspezifisch und hochaffin zu sein, wie über verschiedene *Gel Shift Assays* zu beobachten war. Die Bindung der DNA hatte zusätzlich zur Folge, dass das vormals flexible Protein eine kompaktere Form annahm. Zusammenfassend konnte mit der hier durchgeführten Studie Einblicke in die Flexibilität und die Änderung dieser über verschiedene strukturelle Aufklärungsmethoden gewonnen werden, die zu einem besseren Verständnis der molekularen Eigenschaften und Funktionen von IDPs und IDRs in Pflanzen führen können. Hochauflösende Strukturaufklärungen über Proteinkristallisation verlief bislang erfolglos, jedoch konnten für das TCTP Erkenntnisse für zukünftige Versuche gewonnen werden, die eine Kristallisation ermöglichen und somit zur ersten TCTP Kristallstruktur aus Pflanzen führen könnten.

## 5 Abstract

Plants as sessile organisms have to cope with different biotic and abiotic stress situations. The recognition of the external stimuli and their transduction to distant tissues and organs emphasizes the necessity of developing long distance transport systems. The xylem and phloem are two transportation routes with distinct duties. Whereas the xylem is the main transport route for ions and water from roots to upper organs, the phloem system is predominantly responsible for the relocation of different macromolecules. In contrast to the unidirectional transport within the xylem, a bidirectional transport from regions of loading (source) to regions of consumption (sink) is possible in the phloem. Photoassimilates, phytohormones, proteins and RNAs belong to those molecules being transported within the phloem stream. The latter is known to function as a signal transmitter and enables the transmission of stress information, like phosphate or sulphur starvation to distant tissues. Among these signal transducers are several miRNAs like miR399 or miR168, as well as several mRNAs, like knotted-1, TCTP and Flowering Locus T (FT).

Besides RNAs, proteins play a significant role in signal transduction. Phloem proteome studies on oilseed rape led to the identification of phloem-localized Calcium and G-protein signaling proteins, chaperones, and proteins, involved in cell development. TCTP is one of these proteins, being involved in many different biological processes. It is known to have antiapoptotic, as well as heat shock protein-like activities. It is involved in cell cycle progression and in clearing different type of stress, like water or ROS-induced stresses. Interestingly, some unknown proteins could be identified within these proteome studies, showing high abundancies. The At1g64370 is one of these identified proteins, that was found in several spots in 2d gels. So far, neither a protein class, nor any biological function could be addressed to this protein. Due to its high isoelectric point of larger than 9 it has been suggested that RNA binding and transport within the phloem or acting as a chaperone are possible functions. Phloem proteins belong to the non-cell autonomous proteins (NCAPs), as well as viral proteins and proteins being transported over short distances from cell to cell. Knotted-1 is one of the first identified NCAPs. Knotted-1 as a transcription factor is responsible for the maintenance of meristematic stem cells and is mobile on protein and mRNA level. An ectopic expression or knock-out will lead to severe phenotypes ranging from the formation of tiny knots to the missing of shoot development.

Nearly all signaling and chaperone proteins show a high degree of structural disorder ranging from short unordered regions to entirely intrinsically disorder. Approximately one third of all eukaryotic proteins harbor disorder regions, whereas 70 % of all proteins involved in signaling show a large fraction of disorder.

The analysis of disorder proteins is more tedious and complicated than for compact and well-folded proteins. Regions of high disorder are prone to act as targets for proteolytic activity and reduce protein stability in solution. For many *in vitro* studies micromolar protein concentrations are sufficient. Proper structural investigations instead rely on the availability of milligrams of highly pure protein. Furthermore, disordered proteins and regions aggravate their crystallization propensity leading to only sparse information of these protein classes. An alternative that circumvents protein crystallization is using SAXS measurements in solution. SAXS allows the determination of the molecule conformation in solution and simultaneously its alterations after changing the solute, pH, salt type or after adding interacting ligands regardless of their size. Following that, SAXS measurements enable a closer look on protein flexibilities and their changes, which would be impossible with protein crystallization trials.

Within this study Knotted-1, TCTP and At1g64370 as NCAPs are objects of structural and functional characterization including SAXS, CD measurements and structural proteomics. Furthermore, the binding behavior of TCTP to phloem proteins and small molecules, like hemin and artemisinin were investigated *in vitro*. Studies on Knotted-1 were first focused on establishing protocols to natively purify the protein for subsequent RNA/DNA binding assays and SAXS experiments.

Structural analyses via SAXS, CD, DLS and structural proteomic approaches showed different contributions if intrinsic disorder in all three proteins. Furthermore, this disorder could be modulated upon addition of binding ligands. The most impressive gain of structure was seen for the At1g64370 protein upon addition if SDS and zinc. Due to this and further observations a classification as a dehydrin-like protein seemed legit, although the characteristic K-segment is missing.

So far, the plant TCTP has been characterized *in vitro* only sparingly. Many protein interaction partners exist for homologs from different organisms. These interactions could be identified and confirmed for phloem proteins, as well as the binding of hemin, although this binding has been postulated to be impossible due to the missing of two mandatory amino acids. Interestingly, pull-down experiments indicated that chlorophyll a may be a further ligand for TCTP inducing a stable dimerization which was not inducible with hemin.

Finally, several highly soluble and stable knotted-1 protein constructs including the homeobox and ELK domain could be purified successfully and enabled first SAXS measurements. The interaction of DNA and RNA tended to be sequence specific as visible during different gel shift assays. Additionally, the DNA binding induced a conformational shift from a mainly flexible to a compact protein:DNA complex. In brief, within this study further insights into flexibilities and their changes could be achieved using different structural methods, leading to a better understanding of molecular properties and functions of IDPs and IDRs in plants. High-resolution structure determination remained unsuccessful, although further information on improving the crystallization propensity of TCTP could be gathered, potentially leading to protein crystals in future studies.

# 6 Literaturverzeichnis

- 1. Pace, C.N. and Scholtz, J.M. (1998) A Helix Propensity Scale Based on Experimental Studies of Peptides and Proteins. *Biophys. J.*, **75**, 422–427.
- 2. Fujiwara,K., Toda,H. and Ikeguchi,M. (2012) Dependence of alpha-helical and beta-sheet amino acid propensities on the overall protein fold type. *BMC Struct. Biol.*, **12**, 18.
- 3. Murzin, A.G. (1995) SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.*, **247**, 536–540.
- Palm,G.J., Zdanov,A., Gaitanaris,G.A., Stauber,R., Pavlakis,G.N. and Wlodawer,A. (1997) The structural basis for spectral variations in green fluorescent protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 4, 361–365.
- 5. Sauer, R.T., Yocum, R.R., Doolittle, R.F., Lewis, M. and Pabo, C.O. (1982) Homology among DNAbinding proteins suggests use of a conserved super-secondary structure. *Nature*, **298**, 447–51.
- 6. Brennan, R.G. and Matthews, B.W. (1989) The helix-turn-helix DNA binding motif. J. Biol. Chem., **264**, 1903–6.
- 7. Alberts, B., Bray, D., Watson, J. and Lewis, J. (2002) Molecular Biology of the Cell Garland Science.
- 8. Uversky, V.N. (2011) Intrinsically disordered proteins from A to Z. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **43**, 1090–1103.
- 9. Pazos, F., Pietrosemoli, N., García-Martín, J.A. and Solano, R. (2013) Protein intrinsic disorder in plants. *Front. Plant Sci.*, **4**, 1–5.
- Pietrosemoli, N., García-Martín, J.A., Solano, R. and Pazos, F. (2013) Genome-Wide Analysis of Protein Disorder in Arabidopsis thaliana: Implications for Plant Environmental Adaptation. *PLoS One*, 8, e55524.
- 11. Dunker, A.K., Obradovic, Z., Romero, P., Garner, E.C. and Brown, C.J. (2000) Intrinsic protein disorder in complete genomes. *Genome Informatics*, **11**, 161–171.
- 12. Dunker, A.K., Lawson, J.D., Brown, C.J., Williams, R.M., Romero, P., Oh, J.S., Oldfield, C.J., Campen, A.M., Ratliff, C.M., Hipps, K.W., *et al.* (2001) Intrinsically disordered protein. *J. Mol. Graph. Model.*, **19**, 26–59.
- 13. Uversky, V.N., Gillespie, J.R. and Fink, A.L. (2000) Why are 'natively unfolded' proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins*, **41**, 415–27.
- 14. Daughdrill,G.W., Pielak,G.J., Uversky,V.N., Cortese,M.S. and Dunker,A.K. (2008) Natively Disordered Proteins. In *Protein Folding Handbook*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, Vol. 1, pp. 275–357.
- 15. Tompa, P. (2002) Intrinsically unstructured proteins. Trends Biochem. Sci., 27, 527-533.
- 16. Tompa, P. and Csermely, P. (2004) The role of structural disorder in the function of RNA and protein chaperones. *FASEB J.*, **18**, 1169–1175.
- 17. Tompa, P. (2003) The functional benefits of protein disorder. J. Mol. Struct. Theochem., 666–667, 361–371.
- 18. Järvelin, A.I., Noerenberg, M., Davis, I. and Castello, A. (2016) The new (dis)order in RNA regulation. *Cell Commun. Signal.*, **14**, 9.

- Gsponer, J., Futschik, M.E., Teichmann, S.A. and Babu, M.M. (2008) Tight Regulation of Unstructured Proteins: From Transcript Synthesis to Protein Degradation. *Science (80-. ).*, **322**, 1365–1368.
- 20. Taylor, P., Talley, T.T., Radic', Z., Hansen, S.B., Hibbs, R.E. and Shi, J. (2007) Structure-guided drug design: Conferring selectivity among neuronal nicotinic receptor and acetylcholine-binding protein subtypes. *Biochem. Pharmacol.*, **74**, 1164–1171.
- Wu,Y.-M., Wang,C.-H., Chang,J., Chen,Y., Miyazaki,N., Murata,K., Nagayama,K. and Chang,W.-H. (2013) Zernike phase contrast cryo-electron microscopy reveals 100 kDa component in a protein complex. J. Phys. D. Appl. Phys., 46, 494008.
- 22. Mertens, H.D.T. and Svergun, D.I. (2010) Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering. J. Struct. Biol., 172, 128–41.
- 23. McPherson, A. (2009) Protein Crystallization 2nd ed. Bergfors, T. (ed) International University Line.
- 24. Zeelen, J.P. (2009) Interpretation of the Crystallization Drop Results. In Bergfors, T. (ed), *Protein Crystallization*. International University Line, pp. 179–194.
- 25. Wlodawer, A., Savage, H. and Dodson, G. (1989) Structure of insulin: results of joint neutron and X-ray refinement. *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci.*, **45**, 99–107.
- 26. Schluenzen, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F., *et al.* (2000) Structure of Functionally Activated Small Ribosomal Subunit at 3.3 Å Resolution. *Cell*, **102**, 615–623.
- 27. Harms, J., Schluenzen, F., Zarivach, R., Bashan, A., Gat, S., Agmon, I., Bartels, H., Franceschi, F. and Yonath, A. (2001) High Resolution Structure of the Large Ribosomal Subunit from a Mesophilic Eubacterium. *Cell*, **107**, 679–688.
- 28. Jeffries, C.M., Graewert, M.A., Blanchet, C.E., Langley, D.B., Whitten, A.E. and Svergun, D.I. (2016) Preparing monodisperse macromolecular samples for successful biological small-angle X-ray and neutron-scattering experiments. *Nat. Protoc.*, **11**, 2122–2153.
- Cao,X.-J. and Garcia,B.A. (2016) Global Proteomics Analysis of Protein Lysine Methylation. In *Current Protocols in Protein Science*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, Vol. 86, p. 24.8.1-24.8.19.
- 30. Pruijn,G.J.M. (2015) Citrullination and Carbamylation in the Pathophysiology of Rheumatoid Arthritis. *Front. Immunol.*, **6**, 192.
- 31. Mendoza, V.L. and Vachet, R.W. (2008) Protein surface mapping using diethylpyrocarbonate with mass spectrometric detection. *Anal. Chem.*, **80**, 2895–904.
- Zhou, Y. and Vachet, R.W. (2012) Diethylpyrocarbonate Labeling for the Structural Analysis of Proteins: Label Scrambling in Solution and How to Avoid It. J. Am. Soc. Mass Spectrom., 23, 899–907.
- Chodosh,L.A. (2001) UV Crosslinking of Proteins to Nucleic Acids. In *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, United States, Vol. Chapter 12, p. Unit 12.5.
- Läuchli, A. (1976) Apoplasmic Transport in Tissues. In *Transport in Plants II*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 3–34.
- 35. Oparka,K.J. (2004) Getting the message across: how do plant cells exchange macromolecular complexes? *Trends Plant Sci.*, **9**, 33–41.

- 36. Kim,J.-Y. (2005) Regulation of short-distance transport of RNA and protein. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **8**, 45–52.
- Xu,M., Cho,E., Burch-Smith,T.M. and Zambryski,P.C. (2012) Plasmodesmata formation and cellto-cell transport are reduced in decreased size exclusion limit 1 during embryogenesis in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 109, 5098–5103.
- Winter, N., Kollwig, G., Zhang, S. and Kragler, F. (2007) MPB2C, a Microtubule-Associated Protein, Regulates Non-Cell-Autonomy of the Homeodomain Protein KNOTTED1. *Plant Cell*, 19, 3001–3018.
- 39. Hall,S.M. and Baker,D.A. (1972) The chemical composition of Ricinus phloem exudate. *Planta*, **106**, 131–140.
- 40. Lucas, W.J., Yoo, B.C. and Kragler, F. (2001) RNA as a long-distance information macromolecule in plants. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 849–857.
- 41. Yoo,B.-C. (2004) A Systemic Small RNA Signaling System in Plants. Plant Cell, 16, 1979–2000.
- 42. Buhtz,A., Springer,F., Chappell,L., Baulcombe,D.C. and Kehr,J. (2008) Identification and characterization of small RNAs from the phloem of Brassica napus. *Plant J.*, **53**, 739–749.
- 43. Kehr,J. and Buhtz,A. (2012) Endogenous RNA Constituents of the Phloem and Their Possible Roles in Long-Distance Signaling. In Thompson,G.A., van Bel,A.J.E. (eds), *Phloem*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, pp. 186–208.
- 44. Waigmann, E., Lucas, W.J., Citovsky, V. and Zambryski, P. (1994) Direct functional assay for tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein and identification of a domain involved in increasing plasmodesmal permeability. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**, 1433–7.
- 45. Wolf,S., Deom,C.M., Beachy,R.N. and Lucas,W.J. (1989) Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. *Science (80-. ).*, **246**, 377–9.
- 46. Kragler, F., Monzer, J., Shash, K., Xoconostle-Cazares, B. and Lucas, W.J. (1998) Cell-to-cell transport of proteins: requirement for unfolding and characterization of binding to a putative plasmodesmal receptor. *Plant J.*, **15**, 367–381.
- 47. Wada, T., Kurata, T., Tominaga, R., Koshino-Kimura, Y., Tachibana, T., Goto, K., Marks, M.D., Shimura, Y. and Okada, K. (2002) Role of a positive regulator of root hair development, CAPRICE, in Arabidopsis root epidermal cell differentiation. *Development*, **129**, 5409–19.
- 48. Giavalisco, P., Kapitza, K., Kolasa, A., Buhtz, A. and Kehr, J. (2006) Towards the proteome of Brassica napus phloem sap. *Proteomics*, **6**, 896–909.
- 49. Lin,M.-K., Lee,Y.-J., Lough,T.J., Phinney,B.S. and Lucas,W.J. (2008) Analysis of the Pumpkin Phloem Proteome Provides Insights into Angiosperm Sieve Tube Function. *Mol. Cell. Proteomics*, **8**, 343–356.
- 50. Taylor, J.S., Thompson, B., Pate, J.S., Atkins, C.A. and Pharis, R.P. (1990) Cytokinins in the Phloem Sap of White Lupin (Lupinus albus L.). *Plant Physiol.*, **94**, 1714–20.
- 51. Levin, E.R. (2005) Integration of the Extranuclear and Nuclear Actions of Estrogen. *Mol. Endocrinol.*, **19**, 1951–1959.
- 52. Lucas, W.J., Bouché-Pillon, S., Jackson, D.P., Nguyen, L., Baker, L., Ding, B. and Hake, S. (1995) Selective trafficking of KNOTTED1 homeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata. *Science (80-. ).*, **270**, 1980–3.
- 53. Vollbrecht, E., Veit, B., Sinha, N. and Hake, S. (1991) The developmental gene Knotted-1 is a

member of a maize homeobox gene family. Nature, 350, 241-243.

- 54. Lincoln,C., Long,J., Yamaguchi,J., Serikawa,K. and Hake,S. (1994) A knotted1-like homeobox gene in Arabidopsis is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. *Plant Cell*, **6**, 1859–1876.
- 55. Freeling, M. and Hake, S. (1985) Developmental Genetics of Mutants That Specify Knotted Leaves in Maize. *Genetics*, **111**, 617–634.
- Smith,L.G., Greene,B., Veit,B. and Hake,S. (1992) A dominant mutation in the maize homeobox gene, Knotted-1, causes its ectopic expression in leaf cells with altered fates. *Development*, 116, 21–30.
- 57. Vollbrecht, E., Reiser, L. and Hake, S. (2000) Shoot meristem size is dependent on inbred background and presence of the maize homeobox gene, knotted1. *Development*, **127**, 3161–72.
- 58. Gehring, W.J. (1992) The homeobox in perspective. Trends Biochem. Sci., 17, 277-280.
- 59. Nagasaki,H., Sakamoto,T., Sato,Y. and Matsuoka,M. (2001) Functional analysis of the conserved domains of a rice KNOX homeodomain protein, OSH15. *Plant Cell*, **13**, 2085–98.
- 60. Bellaoui, M., Pidkowich, M.S., Samach, A., Kushalappa, K., Kohalmi, S.E., Modrusan, Z., Crosby, W.L. and Haughn, G.W. (2001) The Arabidopsis BELL1 and KNOX TALE Homeodomain Proteins Interact through a Domain Conserved between Plants and Animals. *Plant Cell*, **13**, 2455 LP-2470.
- 61. Meisel,L. and Lam,E. (1996) The conserved ELK-homeodomain of KNOTTED-1 contains two regions that signal nuclear localization. *Plant Mol. Biol.*, **30**, 1–14.
- 62. Duan,X., Zhang,W., Huang,J., Zhao,L., Ma,C., Hao,L., Yuan,H., Harada,T. and Li,T. (2015) KNOTTED1 mRNA undergoes long-distance transport and interacts with movement protein binding protein 2C in pear (Pyrus betulaefolia). *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, **121**, 109–119.
- 63. Mahajan, A., Bhogale, S., Kang, I.H., Hannapel, D.J. and Banerjee, A.K. (2012) The mRNA of a Knotted1-like transcription factor of potato is phloem mobile. *Plant Mol. Biol.*, **79**, 595–608.
- 64. Kragler, F., Monzer, J., Xoconostle-Cázares, B. and Lucas, W.J. (2000) Peptide antagonists of the plasmodesmal macromolecular trafficking pathway. *EMBO J.*, **19**, 2856 LP-2868.
- Barnes, A., Bale, J., Constantinidou, C., Ashton, P., Jones, A. and Pritchard, J. (2004) Determining protein identity from sieve element sap in Ricinus communis L. by quadrupole time of flight (Q-TOF) mass spectrometry. J. Exp. Bot., 55, 1473–81.
- Hinojosa-Moya, J.J., Xoconostle-Cázares, B., Toscano-Morales, R., Arturo Ramirez-Ortega, F., Luis Cabrera-Ponce, J. and Ruiz-Medrano, R. (2013) Characterization of the pumpkin Translationally-Controlled Tumor Protein CmTCTP. *Plant Signal. Behav.*, 8, 1–8.
- Rodriguez-Medina, C., Atkins, C.A., Mann, A.J., Jordan, M.E. and Smith, P.M. (2011) Macromolecular composition of phloem exudate from white lupin (Lupinus albus L.). *BMC Plant Biol.*, 11, 36.
- 68. Bommer, U.-A. and Thiele, B.-J. (2004) The translationally controlled tumour protein (TCTP). *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **36**, 379–385.
- 69. Amson, R., Pece, S., Marine, J.-C., Fiore, P.P. Di and Telerman, A. (2013) TPT1/ TCTP-regulated pathways in phenotypic reprogramming. *Trends Cell Biol.*, **23**, 37–46.
- 70. Brioudes, F., Thierry, A.-M., Chambrier, P., Mollereau, B. and Bendahmane, M. (2010) Translationally controlled tumor protein is a conserved mitotic growth integrator in animals and

plants. Proc. Natl. Acad. Sci., 107, 16384-16389.

- Susini,L., Besse,S., Duflaut,D., Lespagnol,A., Beekman,C., Fiucci,G., Atkinson,A.R., Busso,D., Poussin,P., Marine,J.-C., *et al.* (2008) TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing bax function. *Cell Death Differ.*, **15**, 1211–20.
- 72. Thaw,P., Baxter,N.J., Hounslow,A.M., Price,C., Waltho,J.P. and Craven,C.J. (2001) Structure of TCTP reveals unexpected relationship with guanine nucleotide-free chaperones. *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 701–4.
- Bommer, U. (2017) The Translational Controlled Tumour Protein TCTP: Biological Functions and Regulation. In Telerman, A., Amson, R. (eds), Results and Problems in Cell Differentiation. Springer International Publishing, Cham, Vol. 64, pp. 69–126.
- Chen, Y., Chen, X., Wang, H., Bao, Y. and Zhang, W. (2014) Examination of the leaf proteome during flooding stress and the induction of programmed cell death in maize. *Proteome Sci.*, 12, 33.
- 75. Amson, R., Pece, S., Lespagnol, A., Vyas, R., Mazzarol, G., Tosoni, D., Colaluca, I., Viale, G., Rodrigues-Ferreira, S., Wynendaele, J., *et al.* (2011) Reciprocal repression between P53 and TCTP. *Nat. Med.*, **18**, 91–99.
- 76. Chen, Y., Fujita, T., Zhang, D., Doan, H., Pinkaew, D., Liu, Z., Wu, J., Koide, Y., Chiu, A., Lin, C.C.-J., *et al.* (2011) Physical and Functional Antagonism between Tumor Suppressor Protein p53 and Fortilin, an Anti-apoptotic Protein. *J. Biol. Chem.*, **286**, 32575–32585.
- 77. Yang,Y., Yang,F., Xiong,Z., Yan,Y., Wang,X., Nishino,M., Mirkovic,D., Nguyen,J., Wang,H. and Yang,X.-F. (2005) An N-terminal region of translationally controlled tumor protein is required for its antiapoptotic activity. *Oncogene*, **24**, 4778–4788.
- Dong,X., Yang,B., Li,Y., Zhong,C. and Ding,J. (2009) Molecular Basis of the Acceleration of the GDP-GTP Exchange of Human Ras Homolog Enriched in Brain by Human Translationally Controlled Tumor Protein. J. Biol. Chem., 284, 23754–23764.
- 79. Yarm, F.R. (2002) Plk Phosphorylation Regulates the Microtubule-Stabilizing Protein TCTP. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 6209–6221.
- 80. Gutiérrez-Galeano, D.F., Toscano-Morales, R., Calderón-Pérez, B., Xoconostle-Cázares, B. and Ruiz-Medrano, R. (2014) Structural divergence of plant TCTPs. *Front. Plant Sci.*, **5**, 361.
- Gnanasekar, M., Dakshinamoorthy, G. and Ramaswamy, K. (2009) Translationally controlled tumor protein is a novel heat shock protein with chaperone-like activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 386, 333–337.
- 82. Mak,C.H., Poon,M.W., Lun,H.M., Kwok,P.Y. and Ko,R.C. (2007) Heat-inducible translationally controlled tumor protein of Trichinella pseudospiralis: cloning and regulation of gene expression. *Parasitol. Res.*, **100**, 1105–1111.
- 83. Rinnerthaler, M., Lejskova, R., Grousl, T., Stradalova, V., Heeren, G., Richter, K., Breitenbach-Koller, L., Malinsky, J., Hasek, J. and Breitenbach, M. (2013) Mmi1, the Yeast Homologue of Mammalian TCTP, Associates with Stress Granules in Heat-Shocked Cells and Modulates Proteasome Activity. *PLoS One*, 8, e77791.
- Lucas, A.T., Fu, X., Liu, J., Brannon, M.K., Yang, J., Capelluto, D.G.S. and Finkielstein, C. V. (2014) Ligand Binding Reveals a Role for Heme in Translationally-Controlled Tumor Protein Dimerization. *PLoS One*, 9, e112823.
- 85. Bhisutthibhan,J. and Meshnick,S.R. (2001) Immunoprecipitation of [3H]Dihydroartemisinin Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP) Adducts from Plasmodium falciparum-

Infected Erythrocytes by Using Anti-TCTP Antibodies. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 2397–2399.

- Eichhorn, T., Winter, D., Büchele, B., Dirdjaja, N., Frank, M., Lehmann, W.-D., Mertens, R., Krauth-Siegel, R.L., Simmet, T., Granzin, J., *et al.* (2013) Molecular interaction of artemisinin with translationally controlled tumor protein (TCTP) of Plasmodium falciparum. *Biochem. Pharmacol.*, **85**, 38–45.
- Bhisutthibhan,J., Pan,X., Hossler,P. a, Walker,D.J., Yowell,C. a, Carlton,J., Dame,J.B. and Meshnick,S.R. (1998) The Plasmodium falciparum Translationally Controlled Tumor Protein Homolog and Its Reaction with the Antimalarial Drug Artemisinin. *J. Biol. Chem.*, 273, 16192– 16198.
- 88. Hoepflinger, M., Reitsamer, J., Geretschlaeger, A., Mehlmer, N. and Tenhaken, R. (2013) The effect of Translationally Controlled Tumour Protein (TCTP) on programmed cell death in plants. *BMC Plant Biol.*, **13**, 135.
- 89. Efferth, T. (2006) Molecular Pharmacology and Pharmacogenomics of Artemisinin and its Derivatives in Cancer Cells. *Curr. Drug Targets*, **7**, 407–421.
- Milburn, D., Laskowski, R.A. and Thornton, J.M. (1998) Sequences annotated by structure: a tool to facilitate the use of structural information in sequence analysis. *Protein Eng. Des. Sel.*, 11, 855– 859.
- 91. Savitsky, P., Bray, J., Cooper, C.D.O., Marsden, B.D., Mahajan, P., Burgess-Brown, N. a and Gileadi, O. (2010) High-throughput production of human proteins for crystallization: The SGC experience. *J. Struct. Biol.*, **172**, 3–13.
- 92. Kapust,R.B., Tözsér,J., Fox,J.D., Anderson,D.E., Cherry,S., Copeland,T.D. and Waugh,D.S. (2001) Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency. *Protein Eng.*, 14, 993–1000.
- 93. Inoue,H., Nojima,H. and Okayama,H. (1990) High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene*, **96**, 23–28.
- Mooij,W.T.M., Mitsiki,E. and Perrakis,A. (2009) ProteinCCD: Enabling the design of protein truncation constructs for expression and crystallization experiments. *Nucleic Acids Res.*, 37, W402-5.
- 95. Reyrat, J.M., Pelicic, V., Gicquel, B. and Rappuoli, R. (1998) Counterselectable markers: untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis. *Infect. Immun.*, **66**, 4011–7.
- 96. Laemmli,U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–5.
- 97. Hardy, E. and Castellanos-Serra, L.R. (2004) 'Reverse-staining' of biomolecules in electrophoresis gels: Analytical and micropreparative applications. *Anal. Biochem.*, **328**, 1–13.
- 98. Dyballa,N. and Metzger,S. (2009) Fast and sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. *J. Vis. Exp.*, 10.3791/1431.
- 99. Schägger, H. (2006) Tricine-SDS-PAGE. Nat. Protoc., 1, 16–22.
- 100. Studier, F.W. (2005) Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.*, **41**, 207–234.
- 101. Lindwall,G., Chau,M.-F., Gardner,S.R. and Kohlstaedt,L. a. (2000) A sparse matrix approach to the solubilization of overexpressed proteins. *Protein Eng. Des. Sel.*, **13**, 67–71.

- 102. Alsarraf,H.M.A.B., Laroche,F., Spaink,H., Thirup,S. and Blaise,M. (2011) Purification, crystallization and preliminary crystallographic studies of the TLDc domain of oxidation resistance protein 2 from zebrafish. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 67, 1253–1256.
- 103. Ellinger, T. and Ehricht, R. (1998) Single-step purification of T7 RNA polymerase with a 6histidine tag. *Biotechniques*, 24, 718–20.
- 104. Ramos, A., Adham, S.A.I. and Gil, J.A. (2003) Cloning and expression of the inorganic pyrophosphatase gene from the amino acid producer Brevibacterium lactofermentum ATCC 13869. *FEMS Microbiol. Lett.*, 225, 85–92.
- 105. Ferrer, J.-L., Ravanel, S., Robert, M. and Dumas, R. (2004) Crystal Structures of Cobalaminindependent Methionine Synthase Complexed with Zinc, Homocysteine, and Methyltetrahydrofolate. J. Biol. Chem., 279, 44235–44238.
- 106. Kelly,S.M., Jess,T.J. and Price,N.C. (2005) How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics*, **1751**, 119–139.
- 107. Whitmore, L. and Wallace, B.A. (2004) DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res.*, **32**, W668– W673.
- 108. Sreerama, N. and Woody, R.W. (1993) A Self-Consistent Method for the Analysis of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism. *Anal. Biochem.*, **209**, 32–44.
- 109. Provencher, S.W. and Gloeckner, J. (1981) Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry*, **20**, 33–37.
- 110. Andrade, M.A., Chacón, P., Merelo, J.J. and Morán, F. (1993) Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Eng.*, 6, 383–90.
- 111. Petoukhov, M. V., Franke, D., Shkumatov, A. V., Tria, G., Kikhney, A.G., Gajda, M., Gorba, C., Mertens, H.D.T., Konarev, P. V. and Svergun, D.I. (2012) New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Crystallogr.*, 45, 342–350.
- 112. Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, M.H.J. and Svergun, D.I. (2003) PRIMUS : a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. J. Appl. Crystallogr., 36, 1277–1282.
- 113. Guinier, A. (1939) La Diffraction des rayons X aux très pétits angles: application à l'etude de phénomènes ultramicroscopiques.
- 114. Svergun, D.I. (1992) Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. J. Appl. Crystallogr., 25, 495–503.
- 115. Franke, D. and Svergun, D.I. (2009) DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *J. Appl. Crystallogr.*, **42**, 342–346.
- 116. Petoukhov, M. V and Svergun, D.I. (2005) Global Rigid Body Modeling of Macromolecular Complexes against Small-Angle Scattering Data. *Biophys. J.*, **89**, 1237–1250.
- 117. Svergun, D., Barberato, C. and Koch, M.H.J. (1995) CRYSOL a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates. J. Appl. Crystallogr., 28, 768–773.
- 118. Bernado, P., Mylonas, E., Petoukhov, M. V, Blackledge, M. and Svergun, D.I. (2007) Structural characterization of flexible proteins using small-angle X-ray scattering. *J.Am.Chem.Soc.*, **129**,

5656-5664.

- 119. Gorrec, F. (2009) The MORPHEUS protein crystallization screen. J. Appl. Crystallogr., 42, 1035–1042.
- 120. Newman, J., Egan, D., Walter, T.S., Meged, R., Berry, I., Ben Jelloul, M., Sussman, J.L., Stuart, D.I. and Perrakis, A. (2005) Towards rationalization of crystallization screening for small- to mediumsized academic laboratories: the PACT/JCSG+ strategy. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 61, 1426–1431.
- 121. D'Arcy, A., Mac Sweeney, A., Stihle, M. and Haber, A. (2003) The advantages of using a modified microbatch method for rapid screening of protein crystallization conditions. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, **59**, 396–399.
- 122. Page, R., Grzechnik, S.K., Canaves, J.M., Spraggon, G., Kreusch, A., Kuhn, P., Stevens, R.C. and Lesley, S.A. (2003) Shotgun crystallization strategy for structural genomics: an optimized twotiered crystallization screen against the Thermotoga maritima proteome. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, **59**, 1028–1037.
- 123. Stura, E.A., Nemerow, G.R. and Wilson, I.A. (1992) Strategies in the crystallization of glycoproteins and protein complexes. J. Cryst. Growth, 122, 273–285.
- 124. Cazenave, C. and Uhlenbeck, O.C. (1994) RNA template-directed RNA synthesis by T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**, 6972–6976.
- 125. Wu,Y., Li,Q. and Chen,X.-Z. (2007) Detecting protein–protein interactions by far western blotting. *Nat. Protoc.*, **2**, 3278–3284.
- 126. Zhang, Y. (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, **9**, 40.
- 127. Irwin, J.J., Sterling, T., Mysinger, M.M., Bolstad, E.S. and Coleman, R.G. (2012) ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. J. Chem. Inf. Model., 52, 1757–1768.
- 128. Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C. and Ferrin, T.E. (2004) UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.*, 25, 1605–1612.
- 129. Morris, G. and Huey, R. (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. J. ..., **30**, 2785–2791.
- 130. Trott,O. and Olson,A.J. (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J. Comput. Chem.*, **31**, 455–461.
- 131. Walz, C., Juenger, M., Schad, M. and Kehr, J. (2002) Evidence for the presence and activity of a complete antioxidant defence system in mature sieve tubes. *Plant J.*, **31**, 189–197.
- 132. Strohalm, M., Hassman, M., Kosata, B. and Kodícek, M. (2008) mMass data miner: an open source alternative for mass spectrometric data analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **22**, 905–8.
- 133. Perkins, D.N., Pappin, D.J.C., Creasy, D.M. and Cottrell, J.S. (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data Proteomics and 2-DE. *Electrophoresis*, **20**, 3551–3567.
- 134. Graether, S.P. and Boddington, K.F. (2014) Disorder and function: a review of the dehydrin protein family. *Front. Plant Sci.*, **5**, 576.
- 135. Lisse, T., Bartels, D., Kalbitzer, H.R. and 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. *Biol. Chem.*, **377**, 555–61.

- 136. Olvera-Carrillo, Y., Luis Reyes, J. and Covarrubias, A.A. (2011) Late embryogenesis abundant proteins. *Plant Signal. Behav.*, **6**, 586–589.
- Garay-Arroyo, A., Colmenero-Flores, J.M., Garciarrubio, A. and Covarrubias, A.A. (2000) Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. J. Biol. Chem., 275, 5668–74.
- 138. Mouillon, J.-M., Gustafsson, P. and Harryson, P. (2006) Structural investigation of disordered stress proteins. Comparison of full-length dehydrins with isolated peptides of their conserved segments. *Plant Physiol.*, **141**, 638–50.
- 139. Hundertmark, M. and Hincha, D.K. (2008) LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in Arabidopsis thaliana. *BMC Genomics*, **9**, 118.
- 140. Hara, M., Fujinaga, M. and Kuboi, T. (2005) Metal binding by citrus dehydrin with histidine-rich domains. *J. Exp. Bot.*, **56**, 2695–703.
- 141. Hara,M., Kondo,M. and Kato,T. (2013) A KS-type dehydrin and its related domains reduce Cupromoted radical generation and the histidine residues contribute to the radical-reducing activities. *J. Exp. Bot.*, **64**, 1615–24.
- 142. Eriksson,S.K. and Harryson,P. (2011) Dehydrins: Molecular Biology, Structure and Function. In Lüttge,U., Beck,E., Bartels,D. (eds), *Plant Desiccation Tolerance*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 289–305.
- 143. Hara, M., Shinoda, Y., Tanaka, Y. and Kuboi, T. (2009) DNA binding of citrus dehydrin promoted by zinc ion. *Plant, Cell Environ.*, **32**, 532–41.
- 144. Irvine, G.B. (2001) Determination of molecular size by size-exclusion chromatography (gel filtration). *Curr. Protoc. cell Biol.*, Chapter 5, Unit 5.5.
- 145. Erickson, H.P. (2009) Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. *Biol. Proced. Online*, **11**, 32–51.
- 146. Tantipolphan, R., Romeijn, S., Engelsman, J. den, Torosantucci, R., Rasmussen, T. and Jiskoot, W. (2010) Elution behavior of insulin on high-performance size exclusion chromatography at neutral pH. J. Pharm. Biomed. Anal., 52, 195–202.
- 147. Kopaciewicz, W. and Regnier, F.E. (1982) Nonideal size-exclusion chromatography of proteins: effects of pH at low ionic strength. *Anal. Biochem.*, **126**, 8–16.
- 148. Arakawa, T., Philo, J.S., Ejima, D., Tsumoto, K. and Arisaka, F. (2006) Aggregation Analysis of Therapeutic Proteins, Part 1. *Bioprocess Int.*, **4**, 42–43.
- 149. Aon,J.C., Caimi,R.J., Taylor,A.H., Lu,Q., Oluboyede,F., Dally,J., Kessler,M.D., Kerrigan,J.J., Lewis,T.S., Wysocki,L.A., *et al.* (2008) Suppressing posttranslational gluconoylation of heterologous proteins by metabolic engineering of Escherichia coli. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 950–8.
- 150. Gao, S.X. and Zhang, M. (2009) Mass Spectromy Applications in Protein Crystallography. In Bergfors, T. (ed), *Protein Crystallization*. International University Line, p. 504.
- 151. Holzwarth, G. and Doty, P. (1965) The Ultraviolet Circular Dichroism of Polypeptides. J. Am. Chem. Soc., 87, 218–28.
- 152. Venyaminov SYu, Baikalov, I.A., Shen, Z.M., Wu, C.S. and Yang, J.T. (1993) Circular dichroic

analysis of denatured proteins: inclusion of denatured proteins in the reference set. *Anal. Biochem.*, **214**, 17–24.

- 153. Greenfield, N.J. (2006) Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat. Protoc.*, **1**, 2876–2890.
- 154. Woody,R.W. (2010) Circular Dichroism of Intrinsically Disordered Proteins. In Uversky,V.N., Longhi,S. (eds), *Instrumental Analysis of Intrinsically Disordered Proteins*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 303–321.
- 155. Zhong,L. and Johnson,W.C. (1992) Environment affects amino acid preference for secondary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **89**, 4462–4465.
- 156. Tompa,P. and Fersht,A. (2009) Structure and Function of Intrinsically Disordered Proteins Chapman and Hall/CRC.
- 157. Shivu,B., Seshadri,S., Li,J., Oberg,K.A., Uversky,V.N. and Fink,A.L. (2013) Distinct β-sheet structure in protein aggregates determined by ATR-FTIR spectroscopy. *Biochemistry*, **52**, 5176– 83.
- 158. Fink, A.L. (1998) Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold. Des.*, **3**, R9-23.
- 159. Rahman,L.N., Smith,G.S.T., Bamm,V. V., Voyer-Grant,J.A.M., Moffatt,B.A., Dutcher,J.R. and 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.
- 160. Koag,M.-C., Wilkens,S., Fenton,R.D., Resnik,J., Vo,E. and Close,T.J. (2009) The K-segment of maize DHN1 mediates binding to anionic phospholipid vesicles and concomitant structural changes. *Plant Physiol.*, **150**, 1503–14.
- 161. Hernández-Sánchez,I.E., Martynowicz,D.M., Rodríguez-Hernández,A.A., Pérez-Morales,M.B., Graether,S.P. and Jiménez-Bremont,J.F. (2014) A dehydrin-dehydrin interaction: the case of SK(3) from Opuntia streptacantha. *Front. Plant Sci.*, 5, 520.
- 162. Ismail,A.M., Hall,A.E. and Close,T.J. (1999) Purification and partial characterization of a dehydrin involved in chilling tolerance during seedling emergence of cowpea. *Plant Physiol.*, 120, 237–44.
- 163. Koag,M.-C., Fenton,R.D., Wilkens,S. and Close,T.J. (2003) The binding of maize DHN1 to lipid vesicles. Gain of structure and lipid specificity. *Plant Physiol.*, **131**, 309–16.
- 164. Hughes, S.L., Schart, V., Malcolmson, J., Hogarth, K.A., Martynowicz, D.M., Tralman-Baker, E., Patel, S.N. and Graether, S.P. (2013) The importance of size and disorder in the cryoprotective effects of dehydrins. *Plant Physiol.*, **163**, 1376–86.
- 165. Wisniewski, M., Webb, R., Balsamo, R., Close, T.J., Yu, X.-M. and Griffith, M. (1999) Purification, immunolocalization, cryoprotective, and antifreeze activity of PCA60: A dehydrin from peach (Prunus persica). *Physiol. Plant.*, **105**, 600–608.
- 166. Kikhney, A.G. and Svergun, D.I. (2015) A practical guide to small angle X-ray scattering (SAXS) of flexible and intrinsically disordered proteins. *FEBS Lett.*, **589**, 2570–2577.
- 167. Bremer, A., Wolff, M., Thalhammer, A. and Hincha, D.K. (2017) Folding of intrinsically disordered plant LEA proteins is driven by glycerol-induced crowding and the presence of membranes. *FEBS J.*, **284**, 919–936.
- 168. Receveur-Brechot, V. and Durand, D. (2012) How random are intrinsically disordered proteins? A

small angle scattering perspective. Curr. Protein Pept. Sci., 13, 55-75.

- 169. Boldon,L., Laliberte,F. and Liu,L. (2015) Review of the fundamental theories behind small angle X-ray scattering, molecular dynamics simulations, and relevant integrated application. *Nano Rev.*, 6, 25661.
- 170. Moncoq,K., Broutin,I., Craescu,C.T., Vachette,P., Ducruix,A. and Durand,D. (2004) SAXS study of the PIR domain from the Grb14 molecular adaptor: a natively unfolded protein with a transient structure primer? *Biophys. J.*, **87**, 4056–64.
- 171. Uversky, V.N. and Longhi, S. eds. (2010) Instrumental Analysis of Intrinsically Disordered Proteins John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- 172. Smilgies, D.-M. and Folta-Stogniew, E. (2015) Molecular weight-gyration radius relation of globular proteins: a comparison of light scattering, small-angle X-ray scattering and structure-based data. *J. Appl. Crystallogr.*, **48**, 1604–1606.
- 173. Borysik, A.J., Kovacs, D., Guharoy, M. and Tompa, P. (2015) Ensemble Methods Enable a New Definition for the Solution to Gas-Phase Transfer of Intrinsically Disordered Proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 13807–17.
- 174. Kozłowska, M., Tarczewska, A., Jakób, M., Bystranowska, D., Taube, M., Kozak, M., Czarnocki-Cieciura, M., Dziembowski, A., Orłowski, M., Tkocz, K., *et al.* (2017) Nucleoplasmin-like domain of FKBP39 from Drosophila melanogaster forms a tetramer with partly disordered tentacle-like C-terminal segments. *Sci. Rep.*, **7**, 40405.
- 175. Tria,G., Mertens,H.D.T., Kachala,M. and Svergun,D.I. (2015) Advanced ensemble modelling of flexible macromolecules using X-ray solution scattering. *IUCrJ*, **2**, 207–217.
- 176. Vedadi, M., Lew, J., Artz, J., Amani, M., Zhao, Y., Dong, A., Wasney, G.A., Gao, M., Hills, T., Brokx, S., *et al.* (2007) Genome-scale protein expression and structural biology of Plasmodium falciparum and related Apicomplexan organisms. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **151**, 100–10.
- 177. Krissinel, E. and Henrick, K. (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. J. Mol. Biol., **372**, 774–97.
- 178. Jancarik, J., Pufan, R., Hong, C., Kim, S.H. and Kim, R. (2004) Optimum solubility (OS) screening: An efficient method to optimize buffer conditions for homogeneity and crystallization of proteins. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, **60**, 1670–1673.
- 179. Waller, J.-P. (1963) The NH2-terminal residues of the proteins from cell-free extracts of E. coli. *J. Mol. Biol.*, 7, 483–IN1.
- 180. Liao, Y.-D., Jeng, J.-C., Wang, C.-F., Wang, S.-C. and Chang, S.-T. (2004) Removal of N-terminal methionine from recombinant proteins by engineered E. coli methionine aminopeptidase. *Protein Sci.*, 13, 1802–1810.
- 181. Liao,Y.-D., Wang,S.-C., Leu,Y.-J., Wang,C.-F., Chang,S.-T., Hong,Y.-T., Pan,Y.-R. and Chen,C. (2003) The structural integrity exerted by N-terminal pyroglutamate is crucial for the cytotoxicity of frog ribonuclease from Rana pipiens. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 5247–55.
- 182. Endo,S., Yamamoto,Y., Sugawara,T., Nishimura,O. and Fujino,M. (2001) The additional methionine residue at the N-terminus of bacterially expressed human interleukin-2 affects the interaction between the N- and C-termini. *Biochemistry*, **40**, 914–9.
- 183. Wernimont, A. and Edwards, A. (2009) In Situ Proteolysis to Generate Crystals for Structure Determination: An Update. *PLoS One*, **4**, e5094.
- 184. Dong, A., Xu, X., Edwards, A.M., Midwest Center for Structural Genomics, Structural Genomics

Consortium, Chang, C., Chruszcz, M., Cuff, M., Cymborowski, M., Di Leo, R., *et al.* (2007) In situ proteolysis for protein crystallization and structure determination. *Nat. Methods*, **4**, 1019–21.

- 185. Fontana, A., de Laureto, P.P., Spolaore, B., Frare, E., Picotti, P. and Zambonin, M. (2004) Probing protein structure by limited proteolysis. *Acta Biochim. Pol.*, **51**, 299–321.
- 186. Walter, T.S., Meier, C., Assenberg, R., Au, K.-F., Ren, J., Verma, A., Nettleship, J.E., Owens, R.J., Stuart, D.I. and Grimes, J.M. (2006) Lysine Methylation as a Routine Rescue Strategy for Protein Crystallization. *Structure*, **14**, 1617–1622.
- 187. Ben-Bassat, A., Bauer, K., Chang, S.Y., Myambo, K., Boosman, A. and Chang, S. (1987) Processing of the initiation methionine from proteins: properties of the Escherichia coli methionine aminopeptidase and its gene structure. *J. Bacteriol.*, **169**, 751–7.
- 188. Flinta, C., Persson, B., Jörnvall, H. and von Heijne, G. (1986) Sequence determinants of cytosolic N-terminal protein processing. *Eur. J. Biochem.*, **154**, 193–6.
- 189. Tsunasawa,S., Stewart,J.W. and Sherman,F. (1985) Amino-terminal processing of mutant forms of yeast iso-1-cytochrome c. The specificities of methionine aminopeptidase and acetyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **260**, 5382–91.
- 190. Chang, Y.H., Teichert, U. and Smith, J.A. (1990) Purification and characterization of a methionine aminopeptidase from Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem., 265, 19892–7.
- 191. Walker, K.W. and Bradshaw, R.A. (1999) Yeast methionine aminopeptidase I. Alteration of substrate specificity by site-directed mutagenesis. J. Biol. Chem., 274, 13403–9.
- Xiao, Q., Zhang, F., Nacev, B.A., Liu, J.O. and Pei, D. (2010) Protein N-Terminal Processing: Substrate Specificity of Escherichia coli and Human Methionine Aminopeptidases. *Biochemistry*, 49, 5588–5599.
- 193. Hinojosa-Moya, J., Xoconostle-Cázares, B., Piedra-Ibarra, E., Méndez-Tenorio, A., Lucas, W.J. and Ruiz-Medrano, R. (2008) Phylogenetic and Structural Analysis of Translationally Controlled Tumor Proteins. J. Mol. Evol., 66, 472–483.
- 194. Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Cassarino, T.G., Bertoni, M., Bordoli, L., *et al.* (2014) SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res.*, **42**, W252–W258.
- 195. Feng,Y., Liu,D., Yao,H. and Wang,J. (2007) Solution structure and mapping of a very weak calcium-binding site of human translationally controlled tumor protein by NMR. *Arch. Biochem. Biophys.*, **467**, 48–57.
- 196. Edmondson, D.G. and Roth, S.Y. (2001) Identification of Protein Interactions by Far Western Analysis. In *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, United States, Vol. Chapter 20, p. Unit 20.6.
- 197. Synowsky,S.A., van den Heuvel,R.H.H., Mohammed,S., Pim Pijnappel,W.W.M. and Heck,A.J.R. (2006) Probing Genuine Strong Interactions and Post-translational Modifications in the Heterogeneous Yeast Exosome Protein Complex. *Mol. Cell. Proteomics*, 5, 1581–1592.
- 198. Rais, I., Karas, M. and Schägger, H. (2004) Two-dimensional electrophoresis for the isolation of integral membrane proteins and mass spectrometric identification. *Proteomics*, **4**, 2567–71.
- 199. Burgess, R.R., Arthur, T.M. and Pietz, B.C. (2000) Mapping protein-protein interaction domains using ordered fragment ladder far-western analysis of hexahistidine-tagged fusion proteins. *Methods Enzymol.*, **328**, 141–57.
- 200. Lepvrier, E., Doigneaux, C., Moullintraffort, L., Nazabal, A. and Garnier, C. (2014) Optimized

Protocol for Protein Macrocomplexes Stabilization Using the EDC, 1-Ethyl-3-(3-(dimethylamino)propyl)carbodiimide, Zero-Length Cross-Linker. *Anal. Chem.*, **86**, 10524–10530.

- 201. Nakajima, N. and Ikada, Y. (1995) Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media. *Bioconjug. Chem.*, **6**, 123–30.
- 202. Li,S., Chen,M., Xiong,Q., Zhang,J., Cui,Z. and Ge,F. (2016) Characterization of the Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP) Interactome Reveals Novel Binding Partners in Human Cancer Cells. *J. Proteome Res.*, **15**, 3741–3751.
- 203. Gachet, Y., Tournier, S., Lee, M., Lazaris-Karatzas, A., Poulton, T. and Bommer, U.A. (1999) The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle. *J. Cell Sci.*, **112** (**Pt 8**, 1257–71.
- 204. Cans, C., Passer, B.J., Shalak, V., Nancy-Portebois, V., Crible, V., Amzallag, N., Allanic, D., Tufino, R., Argentini, M., Moras, D., *et al.* (2003) Translationally controlled tumor protein acts as a guanine nucleotide dissociation inhibitor on the translation elongation factor eEF1A. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **100**, 13892–13897.
- 205. Tsarova,K., Yarmola,E.G. and Bubb,M.R. (2010) Identification of a cofilin-like actin-binding site on translationally controlled tumor protein (TCTP). *FEBS Lett.*, **584**, 4756–4760.
- 206. Petrushenko,Z.M., Budkevich,T. V, Shalak,V.F., Negrutskii,B.S. and El'skaya,A. V (2002) Novel complexes of mammalian translation elongation factor eEF1A·GDP with uncharged tRNA and aminoacyl-tRNA synthetase. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 4811–4818.
- 207. Bazile, F., Pascal, A., Arnal, I., Le Clainche, C., Chesnel, F. and Kubiak, J.Z. (2009) Complex relationship between TCTP, microtubules and actin microfilaments regulates cell shape in normal and cancer cells. *Carcinogenesis*, **30**, 555–565.
- 208. Fares, A., Rossignol, M. and Peltier, J.-B. (2011) Proteomics investigation of endogenous Snitrosylation in Arabidopsis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **416**, 331–336.
- 209. Kohr, M.J., Murphy, E. and Steenbergen, C. (2014) Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Acts as a Mitochondrial Trans-S-Nitrosylase in the Heart. *PLoS One*, **9**, e111448.
- 210. Wang, Y., Liu, T., Wu, C. and Li, H. (2008) A Strategy for Direct Identification of Protein S-Nitrosylation Sites by Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. J. Am. Soc. Mass Spectrom., 19, 1353–1360.
- 211. Guruharsha,K.G., Rual,J.-F., Zhai,B., Mintseris,J., Vaidya,P., Vaidya,N., Beekman,C., Wong,C., Rhee,D.Y., Cenaj,O., *et al.* (2011) A Protein Complex Network of Drosophila melanogaster. *Cell*, 147, 690–703.
- 212. Johnston, P.A., Perin, M.S., Reynolds, G.A., Wasserman, S.A. and Südhof, T.C. (1990) Two novel annexins from Drosophila melanogaster. Cloning, characterization, and differential expression in development. *J. Biol. Chem.*, **265**, 11382–8.
- 213. Goldstein,L.S. and Gunawardena,S. (2000) Flying through the drosophila cytoskeletal genome. *J. Cell Biol.*, **150**, F63-8.
- 214. Gorecka,K.M., Konopka-Postupolska,D., Hennig,J., Buchet,R. and Pikula,S. (2005) Peroxidase activity of annexin 1 from Arabidopsis thaliana. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **336**, 868–875.
- 215. Cantero,A., Barthakur,S., Bushart,T.J., Chou,S., Morgan,R.O., Fernandez,M.P., Clark,G.B. and Roux,S.J. (2006) Expression profiling of the Arabidopsis annexin gene family during

germination, de-etiolation and abiotic stress. Plant Physiol. Biochem., 44, 13-24.

- 216. Katsogiannou, M., Andrieu, C., Baylot, V., Baudot, A., Dusetti, N.J., Gayet, O., Finetti, P., Garrido, C., Birnbaum, D., Bertucci, F., *et al.* (2014) The Functional Landscape of Hsp27 Reveals New Cellular Processes such as DNA Repair and Alternative Splicing and Proposes Novel Anticancer Targets. *Mol. Cell. Proteomics*, **13**, 3585–3601.
- 217. Bhisutthibhan, J., Philbert, M.A., Fujioka, H., Aikawa, M. and Meshnick, S.R. (1999) The Plasmodium falciparum translationally controlled tumor protein: subcellular localization and calcium binding. *Eur. J. Cell Biol.*, **78**, 665–670.
- 218. Berman, P.A. and Adams, P.A. (1997) Artemisinin Enhances Heme-Catalysed Oxidation of Lipid Membranes. *Free Radic. Biol. Med.*, **22**, 1283–1288.
- 219. Wu,Y. (2002) How Might Qinghaosu (Artemisinin) and Related Compounds Kill the Intraerythrocytic Malaria Parasite? A Chemist's View. *Acc. Chem. Res.*, **35**, 255–259.
- 220. Boardman,N.K. and Thorne,S.W. (1971) Sensitive fluorescence method for the determination of chlorophyll a-chlorophyll b ratios. *Biochim. Biophys. Acta*, **253**, 222–31.
- 221. Takaichi,S. and Shimada,K.B.T.-M. in E. (1992) [35] Characterization of carotenoids in photosynthetic bacteria. In *Carotenoids Part A: Chemistry, Separation, Quantitation, and Antioxidation*. Academic Press, Vol. 213, pp. 374–385.
- 222. Lombardo, M.E., Araujo, L.S., Ciccarelli, A.B. and Batlle, A. (2005) A spectrophotometric method for estimating hemin in biological systems. *Anal. Biochem.*, **341**, 199–203.
- 223. Kim,M., Min,H.J., Won,H.Y., Park,H., Lee,J.-C., Park,H.-W., Chung,J., Hwang,E.S. and Lee,K. (2009) Dimerization of Translationally Controlled Tumor Protein Is Essential For Its Cytokine-Like Activity. *PLoS One*, 4, e6464.
- 224. Kim,M., Maeng,J. and Lee,K. (2013) Dimerization of TCTP and its clinical implications for allergy. *Biochimie*, **95**, 659–666.
- 225. Kozakov, D., Grove, L.E., Hall, D.R., Bohnuud, T., Mottarella, S.E., Luo, L., Xia, B., Beglov, D. and Vajda, S. (2015) The FTMap family of web servers for determining and characterizing ligand-binding hot spots of proteins. *Nat. Protoc.*, **10**, 733–755.
- 226. Bolduc, N. and Hake, S. (2009) The maize transcription factor KNOTTED1 directly regulates the gibberellin catabolism gene ga2ox1. *Plant Cell*, **21**, 1647–58.
- 227. Salichs, E., Ledda, A., Mularoni, L., Albà, M.M. and de la Luna, S. (2009) Genome-Wide Analysis of Histidine Repeats Reveals Their Role in the Localization of Human Proteins to the Nuclear Speckles Compartment. *PLoS Genet.*, **5**, e1000397.
- 228. Bürglin, T.R. (1997) Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 4173–80.
- 229. Lu,Q. and Kamps,M.P. (1996) Selective repression of transcriptional activators by Pbx1 does not require the homeodomain. *PNAS*, **93**, 470–4.
- 230. Tamaoki,M., Tsugawa,H., Minami,E., Kayano,T., Yamamoto,N., Kano-Murakami,Y. and Matsuoka,M. (1995) Alternative RNA products from a rice homeobox gene. *Plant J. cell Mol. Biol.*, 7, 927–38.
- 231. Hofer, J., Gourlay, C., Michael, A. and Ellis, T.H. (2001) Expression of a class 1 knotted1-like homeobox gene is down-regulated in pea compound leaf primordia. *Plant Mol. Biol.*, 45, 387– 98.

- 232. Mushegian, A.R. and Koonin, E. V (1996) Sequence analysis of eukaryotic developmental proteins: ancient and novel domains. *Genetics*, **144**, 817–28.
- 233. Sakamoto, T., Nishimura, A., Tamaoki, M., Kuba, M., Tanaka, H., Iwahori, S. and Matsuoka, M. (1999) The conserved KNOX domain mediates specificity of tobacco KNOTTED1-type homeodomain proteins. *Plant Cell*, **11**, 1419–32.
- 234. Passner, J.M., Ryoo, H.D., Shen, L., Mann, R.S. and Aggarwal, A.K. (1999) Structure of a DNAbound Ultrabithorax–Extradenticle homeodomain complex. *Nature*, **397**, 714–719.
- 235. Hammarström, M., Hellgren, N., van den Berg, S., Berglund, H. and Härd, T. (2009) Rapid screening for improved solubility of small human proteins produced as fusion proteins in Escherichia coli. *Protein Sci.*, **11**, 313–321.
- 236. Hofmeister, F. (1888) Zur Lehre von der Wirkung der Salze. Arch. für Exp. Pathol. und Pharmakologie, **24**, 247–260.
- 237. Chen, J., Liu, Y., Li, X., Wang, Y., Ding, H., Ma, G. and Su, Z. (2009) Cooperative effects of urea and l-arginine on protein refolding. *Protein Expr. Purif.*, **66**, 82–90.
- 238. Ghahghaei,A. and Mohammadian,S. (2014) The Effect of Arg on the Structure Perturbation and Chaperone Activity of α-Crystallin in the Presence of the Crowding Agent, Dextran. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **174**, 739–750.
- 239. Kapust,R.B. and Waugh,D.S. (1999) Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci.*, **8**, 1668–1674.
- 240. Xiong, S., Zhang, L. and He, Q.-Y. (2008) Fractionation of Proteins by Heparin Chromatography. In.pp. 213–221.
- 241. Luscombe, N.M., Laskowski, R.A. and Thornton, J.M. (2001) Amino acid-base interactions: a three-dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level. *Nucleic Acids Res. Res.*, **29**, 2860–74.
- 242. Abrahams, J.P., Kraal, B. and Bosch, L. (1988) Zone-interference gel electrophoresis: a new method for studying weak protein-nucleic acid complexes under native equilibrium conditions. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 10099–108.
- 243. Ponnusamy, R., Moll, R., Weimar, T., Mesters, J.R. and Hilgenfeld, R. (2008) Variable Oligomerization Modes in Coronavirus Non-structural Protein 9. J. Mol. Biol., 383, 1081–1096.
- 244. Luo, M.-J. and Reed, R. (2003) Identification of RNA Binding Proteins by UV Cross-Linking. In *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- 245. Tokuda, J.M., Pabit, S.A. and Pollack, L. (2016) Protein–DNA and ion–DNA interactions revealed through contrast variation SAXS. *Biophys. Rev.*, **8**, 139–149.

# 7 Anhang

### 7.1 Hauptsächlich genutzte Proteinsequenzen:

#### atTCTP:

MLVYQDLLTGDELLSDSFPYKEIENGILWEVEGKWVTVGAVDVNIGANPSAEEGGEDEGV DDSTQKVVDIVDTFRLQEQPTYDKKGFIAYIKKYIKLLTPKLSEEDQAVFKKGIEGATKF LLPRLSDFQFFVGEGMHDDSTLVFAYYKEGSTNPTFLYFAHGLKEVKC

#### At1g64370:

MQYYENREKDYYEVAQGQRNGYGQSQSHNHEGYGQSQSRGGYGQIHNREGYNQNREGYSQ SQSRPVYGLSPTLNHRSHGGFLDGLFKGQNGQKGQSGLGTFLGQHKSQEAKKSQGHGKLL GQHDQKKTHETNSGLNGLGMFINNGEKKHRRKSEHKKKNKDGHGSGNESGSSSGSDSD

#### MS1:

MASHIVGYPRMGPKRELKFALESFWDGKSTAEDLQKVSADLRSSIWKQMSAAGTKFIPSN TFAHYDQVLDTTAMLGAVPPRYGYTGGEIGLDVYFSMARGNASVPAMEMTKWFDTNYHYI VPELGPEVNFSYASHKAVNEYKEAKALGVDTVPVLVGPVSYLLLSKAAKGVDKSFELLSL LPKILPIYKEVITELKAAGATWIQLDEPVLVMDLEGQKLQAFTGAYAELESTLSGLNVLV ETYFADIPAEAYKTLTSLKGVTAFGFDLVRGTKTLDLVKAGFPEGKYLFAGVVDGRNIWA NDFAASLSTLQALEGIVGKDKLVVSTSCSLLHTAVDLINETKLDDEIKSWLAFAAQKVVE VNALAKALAGQKDEALFSANAAALASRRSSPRVTNEGVQKAAAALKGSDHRRATNVSARL DAQQKKLNLPILPTTTIGSFPQTVELRRVRREYKAKKVSEEDYVKAIKEEIKKVVDLQEE LDIDVLVHGEPERNDMVEYFGEQLSGFAFTANGWVQSYGSRCVKPPVIYGDVSRPKAMTV FWSAMAQSMTSRPMKGMLTGPVTILNWSFVRNDQPRHETCYQIALAIKDEVEDLEKGGIG VIQIDEAALREGLPLRKSEHAFYLDWAVHSFRITNCGVQDSTQIHTHMCYSHFNDIIHSI IDMDADVITIENSRSDEKLLSVFREGVKYGAGIGPGVYDIHSPRIPSSEEIADRVNKMLA VLEQNILWVNPDCGLKTRKYTEVKPALKNMVDAAKLIRSQLASAK

#### **Knotted-1:**

MEEITQHFGVGASSHGHGHGQHHHHHHHHHPWASSLSAVVAPLPPQPPSAGLPLTLNTVA ATGNSGGSGNPVLQLANGGGLLDACVKAKEPSSSSPYAGDVEAIKAKIISHPHYYSLLTA YLECNKVGAPPEVSARLTEIAQEVEARQRTALGGLAAATEPELDQFMEAYHEMLVKFREE LTRPLQEAMEFMRRVESQLNSLSISGRSLRNILSSGSSEEDQEGSGGETELPEVDAHGVD QELKHHLLKKYSGYLSSLKQELSKKKKKGKLPKEARQQLLSWWDQHYKWPYPSETQKVAL AESTGLDLKQINNWFINQRKRHWKPSEEMHHLMMDGYHTTNAFYMDGHFINDGGLYRLG

#### **T7 RNA Polymerase:**

MNTINIAKNDFSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEARFRKMFERQLK AGEVADNAAAKPLITTLLPKMIARINDWFEEVKAKRGKRPTAFQFLQEIKPEAVAYITIK TTLACLTSADNTTVQAVASAIGRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKKNVEEQLNKRVGHVYKK AFMQVVEADMLSKGLLGGEAWSSWHKEDSIHVGVRCIEMLIESTGMVSLHRQNAGVVGQD SETIELAPEYAEAIATRAGALAGISPMFQPCVVPPKPWTGITGGGGYWANGRRPLALVRTH SKKALMRYEDVYMPEVYKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVEDIPAIEREEL PMKPEDIDMNPEALTAWKRAAAAVYRKDKARKSRRISLEFMLEQANKFANHKAIWFPYNM DWRGRVYAVSMFNPQGNDMTKGLLTLAKGKPIGKEGYYWLKIHGANCAGVDKVPFPERIK FIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVQHHGLSYNCSLPLAFDGSC SGIQHFSAMLRDEVGGRAVNLLPSETVQDIYGIVAKKVNEILQADAINGTDNEVVTVTDE NTGEISEKVKLGTKALAGQWLAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQPAID SGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIWESVSVTVVAAVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDKKTGEILR KRCAVHWVTPDGFPVWQEYKKPIQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAP

```
NFVHSQDGSHLRKTVVWAHEKYGIESFALIHDSFGTIPADAANLFKAVRETMVDTYESCD
VLADFYDQFADQLHESQLDKMPALPAKGNLNLRDILESDFAFA
```

#### Inorganische Pyrophosphatase (E. coli):

```
MSLLNVPAGKDLPEDIYVVIEIPANADPIKYEIDKESGALFVDRFMSTAMFYPCNYGYIN
HTLSLDGDPVDVLVPTPYPLQPGSVIRCRPVGVLKMTDEAGEDAKLVAVPHSKLSKEYDH
IKDVNDLPELLKAQIAHFFEHYKDLEKGKWVKVEGWENAEAAKAEIVASFERAKNK
```

#### **MBP-TEV Protease:**

```
MKTEEGKLVIWINGDKGYNGLAEVGKKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGPDI
IFWAHDRFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALSLIYNK
DLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGKYDIK
DVGVDNAGAKAGLTFLVDLIKNKHMNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGPWAWSNIDTSK
VNYGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPL
GAVALKSYEEELAKDPRIAATMENAQKGEIMPNIPQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDE
ALKDAQTNSSSNNNNNNNNLGIEGRGENLYFQGHHHHHHHGESLFKGPRDYNPISSTI
CHLTNESDGHTTSLYGIGFGPFIITNKHLFRRNNGTLLVQSLHGVFKVKNTTTLQQHLID
GRDMIIIRMPKDFPPFPQKLKFREPQREERICLVTTNFQTKSMSSMVSDTSCTFPSSDGI
FWKHWIQTKDGQCGSPLVSTRDGFIVGIHSASNFTNTNNYFTSVPKNFMELLTNQEAQQW
VSGWRLNADSVLWGGHKVFMVKPEEPFQPVKEATQLMNRRRR
```

### 7.2 Genutzte Primer für die DNA Bindestudien:

Name	Sequenz
KN1-S1_For	GGCGCTGACCCTGAA
KN1-S1_Rev	TTCAGGGTCAGCGCC
KN1-S2_For	GGCGCCGACCCTGAA
KN1-S2_Rev	TTCAGGGTCGGCGCC
KN1-S3_For	GGCGCCAACCCTGAA
KN1-S3_Rev	TTCAGGGTTGGCGCC

#### 7.3 Genutzte Primer für die in vitro Transkription:

Name	Sequenz
So4_For	GAAATTAATACGACTCACTATAGGCGCTGACCCTGAA
~	
So4_Rev	TTCAGGGTCAGCGCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTC
So5_For	GAAATTAATACGACTCACTATAGGAGAGACTCAGAAGGTGGC
So5_Rev	AGACTCAGCCAGTGCCACCTTCTGAGTCTCT
So6 For	GAAATTAATACGACTCACTATAGGCGCTGGCCCTGAA
So6 Rev	TTCAGGGCCAGCGCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTC
So7_For	GAAATTAATACGACTCACTATAGGCGCTCAGCCTGAA
So7 Rev	TTCAGGCTGAGCGCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTC

# 8 Posterpräsentationen und Publikationen

Während der Promotionszeit vom 1. Juli 2013 bis 31. Dezember 2017 wurden folgende Konferenzen besucht und folgende Artikel publiziert oder geschrieben.

### 8.1 Posterpräsentationen

- **Ostendorp, A., <u>Pahlow, S.</u>, Kragler, F., Falke, S., Betzel, C. and Kehr, J. (2014).** Towards the structural-functional characterisation of mobile RNA-binding proteins. EMBO Workshop. Intercellular communication in plant development and disease. 24 29 August, Bischoffsheim, Frankreich
- <u>Pahlow, S.,</u> Ostendorp, A., Alarcin, C., Kragler, F. and Kehr, J. (2017). Characterisation of a phloem-mobile, dehydrin-like protein. EMBO Workshop. Intercellular communication in development and disease. 10 – 15 July, Berlin, Deutschland

## 8.2 Publikationen

- Ostendorp, A., <u>Pahlow, S.</u>, Deke, J., Thieß, M., and Kehr, J. (2016). Protocol: optimisation of a grafting protocol for oilseed rape (Brassica napus) for studying long-distance signalling. Plant Methods 12: 22.
- Ostendorp, A., <u>Pahlow, S.</u>, Krüßel, L., Hanhart, P., Garbe, M.Y., Deke, J., Giavalisco, P., and Kehr, J. (2017). Functional analysis of Brassica napus phloem protein and ribonucleoprotein complexes. New Phytol. **214**: 1188–1197.
- Ponnusamy, R., Lebedev, A.A., <u>Pahlow, S.</u>, and Lohkamp, B. (2014). Crystal structure of human CRMP-4: Correction of intensities for lattice-translocation disorder. Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. 70: 1680–1694.
- <u>Pahlow S.</u>, Ostendorp A., Krüßel L and Kehr J. (2017). Phloem Sap Sampling from *Brassica napus* for 3D-PAGE of Protein and Ribonucleoprotein Complexes. JoVE

Manuscript accepted

Kholgi, M., Toorchi, M., Shakiba, M.R., Bandeh-hagh, A., <u>Pahlow, S</u>., Ostendorp, A., and Kehr, J. (2018). Comparative proteomic analysis of salt-responsive proteins in canola roots. Planta.

Under Review

Ostendorp, S., Ostendorp, A., Falke, S., Betzel, C. and Kehr, J. Functional-structural characterization of an unusual dehydrin-like phloem protein from oilseed rape and Arabidopsis.

Manuscript in progress

# 9 Beteiligungen an der Lehre

## 9.1 Bachelorarbeiten

- Johanna Maria Klose: Studien am rekombinant hergestellten KNOTTED1 aus Zea mays (2014)
- Frida Mandik: Charakterisierung der Knotted-1-Homöobox (2015)
- Marcel Studt: Design neuer E. coli Expressionsvektoren (2015)
- Lara Meier: Etablierung des T7 RNA-Polymerase *in vitro*-Transkriptionssystems zur Produktion von RNA (2015)
- Katharina Kender: Studien zur Expression und Aufreinigung der *Knotted*-1 Transaktivator-Domäne (2016)
- Julia Latreider: Inhibitorische Eigenschaften des Phloemsafts von *Brassica napus* am Beispiel der *Tobacco Etch Virus* Protease und der Ribonuklease A und H (2017)
- Laura Carlsen: Klonierung und Herstellung der inorganischen Pyrophosphatase aus *Escherichia coli* zur Steigerung der *in vitro* RNA Synthese

## 9.2 Projektstudien

— Maria Sasonowa: Klonierung, Überexpression und funktionell-strukturelle Charakterisierung des *Translationally Controlled Tumor Proteins* (TCTP) (2015)

## 9.3 Weitere betreute Arbeiten

— Viktor Teraz: Overexpression and initial characterization of Knotted-1 (2014)

## 9.4 Betreute Praktika

- Genetikpraktikum Bachelor Biologie (2015-16)
- MLS Master Wahlpflichtkurs Genfunktionsanalysen (2014-2017)
- MoPS Lab course B (2016)
- Bachelor Biologie Wahlmodul Proteomics (2017)

# **Eidesstattliche Versicherung**

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

Hamburg, den .....

.....

# **10 Danksagung**

Ein großer Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. Julia Kehr und dafür, dass sie mir die Möglichkeit gegeben hat so frei dieses interessante und breit gefächerte Thema zu bearbeiten und immer dazu unterstützt hat über den Tellerrand hinauszuschauen. Außerdem gebührt noch ein extra großes Dankeschön für die Auswahl der zweiten Doktorandin, mit der ich zur gleichen Zeit angefangen habe. Unvergessen bleiben auch die Weihnachtsmarktbesuche und Wissen-vom-Fass Beiträge.

Ebenfalls möchte ich mich bei Friedrich Kragler für die immer sehr inspirierenden Gespräche auf den Konferenzen und natürlich für die tolle Zusammenarbeit bedanken.

Lena und Sandra danke ich für die gute Zusammenarbeit bei den ganzen Problemen und Aufgaben und natürlich für die Kaffeepausen. Auch die Entwicklung des "KrOsten-Blots" sollte an dieser Stelle würdigend erwähnt werden.

Da ich im Laufe der Zeit einige Studenten "quälen" durfte, möchte ich mich bei allen, die ich betreuen durfte, für die guten Ergebnisse und eure Lernbereitschaft bedanken. Ganz besonders möchte ich Jenny danken. Deine Hilfe in all der Zeit war Gold wert!

Auch allen anderen in der Arbeitsgruppe möchte ich ein Dank für die vergangenen Jahre ausrichten, sowohl allen Studenten, TAs, Postdocs, als auch Doktoranden.

Meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Freunden muss ich an dieser Stelle ebenfalls für ihre tatkräftige Hilfe bei allem bedanken. Durch euch bin ich das geworden was ich jetzt bin.

Zu guter Letzt gilt mein besonderer Dank meiner Frau und Kollegin Anna. Wir haben viel erlebt in der Zeit und noch viel mehr erreicht. Wenn ich eine Stütze brauchte warst du da, so wie ich für dich da war.