

**Identifizierung und funktionelle Charakterisierung
eines unbekanntes RNA-bindenden
Phloemproteins**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

an der Fakultät Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Fachbereich Biologie

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Anna 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 Pflanzen-genetik des Fachbereichs Biologie der Universität Hamburg am Biozentrum Klein Flottbek durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Julia Kehr

2. Gutachter: Prof. Dr. Sigrun Reumann

Tag der Disputation: 15.06.2018

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungen	IX
Abkürzungen der Aminosäuren	X
1 Einleitung	1
1.1 Aufbau und Funktion des Leitgewebes.....	1
1.2 Inhaltsstoffe des Phloems	2
1.2.1 Nukleinsäuren im Phloem	3
1.2.2 Das Phloemproteom.....	4
1.2.2.1 Strukturelle Proteine im Phloem.....	5
1.2.2.2 Proteine mit Beteiligung an der Proteinmodifizierung und dem Protein <i>Turnover</i>	5
1.2.2.3 Proteine mit Beteiligung an der Redoxregulation	6
1.2.2.4 Lipid-Bindeproteine	7
1.2.2.5 Phloem-mobile RNA-Bindeproteine	7
1.2.3 Stress-relevante Proteine	8
1.3 Ziele der Arbeit	11
2 Material & Methoden	12
2.1 Geräte, Chemikalien, Oligonukleotide, Vektoren, Enzyme & Antikörper.....	12
2.2 Verbrauchsmaterial	13
2.3 Bioinformatische Analysen.....	14
2.4 Arbeiten mit Bakterien und Pflanzen	14
2.4.1 Verwendete Bakterienstämme und Pflanzen	14
2.4.2 Anzucht und Herstellung von <i>E. coli</i> -Dauerkulturen.....	15
2.4.3 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	15
2.4.4 Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	15
2.4.5 Herstellung chemisch kompetenter Agrobakterien.....	16
2.4.6 Transformation chemisch kompetenter Agrobakterien.....	16
2.4.7 Anzucht von <i>A. thaliana</i>	16
2.4.8 Anzucht von <i>B. napus</i>	16
2.4.9 Anzucht von <i>Nicotiana benthamiana</i>	17
2.4.10 Sammeln von Phloemsaft aus Rapspflanzen.....	17
2.4.11 Sterilisation und Anzucht von Saatgut.....	17
2.4.12 Transiente Expression in <i>Nicotiana benthamiana</i> mittels Agroinfiltration	17

2.5	Molekularbiologische Methoden.....	18
2.5.1	Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA, PCR-Produkten und RNA.....	18
2.5.2	Isolierung genomischer DNA aus Pflanzenmaterial	18
2.5.3	RNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial.....	18
2.5.4	Reverse Transkription	19
2.5.5	Polymerase-Ketten-Reaktion.....	19
2.5.6	<i>Site-directed</i> Mutagenese	19
2.5.7	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und PCR-Produkten	20
2.5.8	Auftrennung von Nukleinsäuren mittels Agarosegelelektrophorese	20
2.5.9	Northern Blot Assay.....	20
2.5.10	<i>In vitro</i> -Transkription.....	21
2.6	Proteinanalytische Methoden	22
2.6.1	Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial	22
2.6.2	Proteinpräzipitation.....	22
2.6.3	SDS-PAGE	22
2.6.4	Visualisierung von Proteinen.....	23
2.6.4.1	Nachweis von Proteinen mittels kolloidaler Coomassie-Brilliant-Blau Färbung.....	23
2.6.4.2	Nachweis von Phosphoproteinen mittels ProQ-Diamond Färbung.....	23
2.6.4.3	Western Blot	23
2.6.5	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	24
2.6.5.1	Bestimmung der molekularen Masse von Proteinen.....	24
2.6.5.2	Identifizierung von Proteinen mittels <i>Peptide mass fingerprint</i>	24
2.6.5.3	Identifizierung von Proteinen mittel <i>MS/MS Ion Search</i>	25
2.6.5.4	Bestimmung der Integrität und Größe von RNA	26
2.7	Proteomanalysen von Phloemsaft.....	26
2.7.1	Aufkonzentrierung von Phloemsaft.....	26
2.7.2	Bestimmung der Proteinkonzentration im Phloemsaft mittels Bradford Assay	26
2.7.3	Blue Native PAGE.....	26
2.7.4	Tris-Tricin-Urea PAGE.....	27
2.7.5	Heparin-Affinitätschromatographie	27
2.8	Herstellung und Aufreinigung von rekombinanten At1g64370-Proteinen.....	28
2.8.1	Verwendung des pET-basierten <i>E. coli</i> -Expressionssystems	28
2.8.2	Herstellung des rekombinanten Proteins in <i>E. coli</i> mittels Autoinduktion.....	28
2.8.3	Zellaufschluss.....	28
2.8.4	Nickel-Affinitätschromatographie	29
2.8.5	Entsalzung mittels Dialyse und Thrombinverdau	29
2.8.6	Größenausschlusschromatographie	29
2.8.7	Konzentrationsbestimmung und Lagerung.....	30
2.9	Proteincharakterisierung.....	30
2.9.1	<i>Cell viability Assay</i> mit <i>E. coli</i> -Zellen.....	30

2.9.2	<i>In vitro</i> -Phosphorylierung des rekombinanten At1g64370-Proteins mittels Casein Kinase II aus Hefe	31
2.9.3	Phosphorylierung des rekombinanten At1g64370-Proteins mit nativem Phloemsaft	31
2.9.4	Identifizierung von posttranslationalen Modifizierungen mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	31
2.9.5	Identifizierung von Interaktionspartnern.....	32
2.9.5.1	Untersuchung von Oligonukleotid-At1g64370-Interaktionen mittels Zonen-Interferenz Gelelektrophorese	32
2.9.5.2	Identifizierung von At1g64370-RNA-Interaktionsstellen mittels <i>UV-Crosslinking</i> ...	32
2.9.5.3	Identifizierung stabiler Protein-Protein Interaktionen mittels <i>Pull down Assay</i>	32
2.9.5.4	Identifizierung transienter Interaktionen mittels chemischer <i>Crosslinker</i>	33
2.9.5.5	Identifizierung transienter Protein-Protein Interaktionen mittels <i>FarWestern Blot</i> ...	34
2.9.5.6	Identifizierung ionischer Interaktionen mittels IMAC.....	35
2.9.5.7	Identifizierung möglicher Interaktionsstellen mittels struktureller <i>Proteomics</i>	35
2.9.5.8	Trypsin-Sensitivitätsassay.....	35
2.9.5.9	Quantifizierung von At1g64370-Interaktionen mittels <i>MicroScale Thermophoresis</i> ...	36
3	Ergebnisse & Diskussion	37
3.1	Analyse des Phloem-Proteoms von <i>Brassica napus</i>	37
3.1.1	Sammeln und Qualitätskontrolle von Phloemsaft.....	38
3.1.2	Identifizierung von Komplexen im Phloemsaft von <i>B. napus</i>	39
3.1.2.1	Identifizierung ribosomaler Fragmente im Phloemsaft von Raps.....	42
3.1.2.2	Im Phloemsaft von <i>B. napus</i> existieren sowohl ubiquitinierte Proteine als auch ein funktionales Proteasom.....	45
3.1.2.3	Weitere identifizierte Komplexe im Phloemsaft von <i>B. napus</i>	51
3.1.3	Identifizierung möglicher Nukleinsäure- und Metallionen-Bindeproteine	52
3.1.3.1	Identifizierung putativer Nukleinsäure-Bindeproteine aus Phloemsaft von <i>B. napus</i> mittels Heparin-Affinitätschromatographie.....	53
3.1.3.2	Identifizierung von Phloemproteinen mit Metallionenbinde-eigenschaft	56
3.1.4	Auftrennung von Phloemproteinen bezüglich ihrer Hydrophobizität.....	58
3.2	Charakterisierung eines bisher unbekanntes Phloemproteins	61
3.2.1	<i>In silico</i> -Analysen des bisher uncharakterisierten Proteins At1g64370	61
3.2.2	Funktionelle Charakterisierung des At1g64370-Proteins.....	65
3.2.2.1	Genorganisation und Expression des putativen Dehydrin-ähnlichen Proteins At1g64370	65
3.2.2.2	Herstellung und Aufreinigung des At1g64370-Proteins	67
3.2.2.3	Analyse möglicher posttranslationaler Modifizierungen des unbekanntes Phloemproteins	69
3.2.2.3.1	Phosphorylierung des Dehydrin-ähnlichen Proteins aus <i>A. thaliana</i> und <i>B. napus</i>	71
3.2.2.3.2	Identifizierung weiterer posttranslationaler Modifizierungen.....	78
3.2.2.4	Untersuchung des At1g64370 in Bezug auf seine Dehydrin-Eigenschaften.....	80

Inhaltsverzeichnis

3.2.2.4.1	Stressversuche in <i>E. coli</i> - <i>Cell viability Assay</i>	80
3.2.2.4.2	Interaktion des At1g64370-Proteins mit Nukleinsäuren	82
3.2.2.4.3	Interaktion mit Proteinen	88
3.2.2.4.4	Interaktion des At1g64370-Proteins mit Ionen.....	91
3.2.2.5	<i>In vivo</i> -Studien zur Funktion und subzellulären Lokalisation des At1g64370	96
4	Schlussfolgerung & Ausblick	104
5	Zusammenfassung	111
5	Abstract	113
6	Literaturverzeichnis	115
7	Anhang	127
7.1	Identifizierung von Komplexen im Phloemsaft von Raps – Tabellen.....	127
7.2	Herstellung und Aufreinigung des At1g64370 – Vektorkarten und Sequenzen	131
7.3	Lokalisationsstudien in <i>A. thaliana</i> - Vektorkarte und Sequenz des pEG104-YFP-At1g6430.....	133
8	Publikationen & Konferenzbeiträge im Rahmen der Arbeit	135
8.1	Publikationen.....	135
8.2	Konferenzbeiträge.....	135

Abbildungsverzeichnis & Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Aufbau des Leitgewebes und des Leitbündels im Spross von Dikotyledonen. 1

Abb. 1-2: Schematische Darstellung des Assimilat-Transports von *Source* nach *Sink*. 2

Abb. 1-3: Schematische Darstellung einer *Plasmodesmal Pore Unit* zwischen Geleitzelle und Siebelement. 4

Abb. 3-1: Phloemsaftentnahme bei *B. napus* cv. Drakkar. 38

Abb. 3-2: Überprüfung der Reinheit des gesammelten Phloemsafts von *B. napus*. 38

Abb. 3-3: 2D-Gelelektrophorese von nativem und denaturiertem Phloemsaft aus *B. napus*. 40

Abb. 3-4: Übersicht zur Analyse des Komplexoms im Phloemsaft von *B. napus* mittels
hochauflösender 3D-Gelelektrophorese. 41

Abb. 3-5: Dritte Dimension der vier hochmolekularen Proteinkomplexe aus Raps-Phloemsaft..... 42

Abb. 3-6: Identifizierung verschiedener ribosomaler Fragmente im Phloemsaft von *B. napus*..... 44

Abb. 3-7: Schematische Darstellung der Ubiquitinierung. 46

Abb. 3-8: Schematische Darstellung des Proteasoms..... 47

Abb. 3-9: Identifizierung von ubiquitinierten Proteinen und einem proteasomalen Abbauweg im
Phloemsaft von Raps..... 48

Abb. 3-10: Spezifität des verwendeten Antikörpers zur Identifizierung von ubiquitinierten
Phloemproteinen. 50

Abb. 3-11: Struktur von Heparin. 53

Abb. 3-12: Trennung von Phloemproteinen mittels Heparin-Affinitätschromatographie. 54

Abb. 3-13: IMAC von nativem Phloemsaft aus *B. napus*. 57

Abb. 3-14: Auftrennung von Phloemproteinen nach ihrer Hydrophobizität..... 59

Abb. 3-15: Sequenz-Alignment des uncharakterisierten Proteins At1g64370 aus *A. thaliana* und
B. napus..... 61

Abb. 3-16: *In silico*-Analyse der Struktur des At1g64370-Proteins aus *A. thaliana* und des Orthologs
aus *B. napus* mittels IUPred 62

Abb. 3-17: Darstellung der Sequenzmotive von Dehydrinen..... 63

Abb. 3-18: Vergleich der Sequenzen bisher bekannter LEA-Proteine mit dem At1g64370-Protein. 64

Abb. 3-19: Sequenz-Alignment des KS-Typ-Dehydrins HIRD11 mit dem uncharakterisierten Proteins
At1g64370..... 64

Abb. 3-20: Sequenz-Alignment von At1g64370-Homologen in anderen Organismen..... 66

Abb. 3-21: RT-PCR zum Nachweis der mRNA des At1g64370-Homologs in unterschiedlichen Geweben
von Raps..... 66

Abb. 3-22: Herstellung und chromatographische Aufreinigung der rekombinant hergestellten
Proteine am Beispiel des At1g64370-Proteins aus *A. thaliana*..... 68

Abb. 3-23: Stabilitätsassay des rekombinanten At1g64370-Proteins aus *A. thaliana*. 69

Abb. 3-24: Vorhersagen über mögliche Modifizierungen an *Short Linear Motifs*. 70

Abb. 3-25: Vorhersagen möglicher Phosphorylierungsstellen im At1g64370-Protein und dem
Homolog aus *B. napus*. 71

Abb. 3-26: <i>In vitro</i> -Phosphorylierung des unbekanntes Proteins mittels Casein Kinase II.....	72
Abb. 3-27: Identifizierung der Casein Kinase II-Phosphorylierungsstelle im untersuchten Protein aus <i>Arabidopsis</i>	73
Abb. 3-28: <i>In vitro</i> -Phosphorylierung des rekombinanten Proteins mit Phloemsaft.....	74
Abb. 3-29: Vereinfachte, schematische Darstellung von MAPK-Kaskaden.	76
Abb. 3-30: Identifizierung der N-terminalen Acetylierung des At1g64370-Homologs aus Raps.....	79
Abb. 3-31: Schematische Darstellung der Funktion von Dehydrinen.	80
Abb. 3-32: Testen der protektiven Wirkung des unbekanntes Proteins auf <i>E. coli</i> -Zellen unter verschiedenen Stressbedingungen.....	81
Abb. 3-33: Analyse der Nukleinsäure-Spezifität des At1g64370-Proteins mittels Zonen-Interferenz Gelelektrophorese.....	83
Abb. 3-34: Zonen-Interferenz Gelelektrophorese zur Quantifizierung der Bindungsaffinität des At1g64370-Proteins zu tRNA und miR164.....	84
Abb. 3-35: <i>MicroScale</i> Thermophorese Analyse zur Quantifizierung der Interaktion des At1g64370- Proteins mit tRNA und DNA.	85
Abb. 3-36: Identifizierung der möglichen RNA-Bindestelle mittels ZIGE.	85
Abb. 3-37: UV-Crosslinking Versuch zur Identifizierung möglicher RNA-Bindestellen im At1g64370- Protein.....	86
Abb. 3-38: Analyse der protektiven Wirkung des At1g64370-Proteins mittels des LDH-Assays.....	90
Abb. 3-39: Untersuchung der Ionenbindeeeigenschaft des At1g64370-Proteins aus <i>A. thaliana</i>	92
Abb. 3-40: Reaktion von Histidin mit DEPC.....	93
Abb. 3-41: Trypsin-Sensitivitätsassay.....	94
Abb. 3-42: Kapillar-Scan zur MST-Messung des Homologs des At1g64370 aus Raps mit verschiedenen Ionen.....	95
Abb. 3-43: Arbeiten mit der putativen tDNA-Insertionsmutante im AT1G64370-Gen.....	97
Abb. 3-44: Hitzestressexperiment mit Col-0-Wildtyp-Pflanzen und unterschiedlichen At1g64370- überexprimierenden Pflanzen.....	98
Abb. 3-45: Subzelluläre Lokalisation des At1g64370-Proteins in agro-infiltrierten Tabakblättern.	99
Abb. 3-46: Vorhersage einer NoLS des At1g64370-Proteins.....	100
Abb. 3-47: Vergleich der nukleären Lokalisation des Wildtyp-At1g64370 und einer At1g64370- Mutante in agro-infiltrierten Tabakblättern.	101
Abb. 3-48: Subzelluläre Lokalisation des YFP-At1g64370-Proteins in einer transgenen <i>A. thaliana</i> Col-0 Pflanze.....	102
Abb. 7-1: Vektorkarte für die Herstellung des rekombinanten Proteins aus <i>B. napus</i>	131
Abb. 7-2: Vektorkarten für die Herstellung des rekombinanten Proteins aus <i>A. thaliana</i>	132
Abb. 7-3: Vektorkarte des pEG104-YFP-At1g64370.....	133
Abb. 7-4: Sequenz des YFPs und At1g64370 im pEG104.....	134

Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1: Phloem-mobile RNA-Transkripte und ihre Funktion.3

Tab. 2-1: Genotypen der verwendeten Bakterienstämme. 15

Tab. 2-2: Zusammensetzung der Aktivierungs- und Infiltrationslösung 18

Tab. 2-3: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur cDNA-Synthese. 19

Tab. 2-4: Verwendete Oligonukleotide zur Erstellung von Mutanten mittels *Site-directed* Mutagenese. 20

Tab. 2-5: Zusammensetzung der verwendeten Puffer. 20

Tab. 2-6: Verwendete Oligonukleotide zur Detektion von ribosomalen RNAs im Phloemsaft
von *B. napus*. 21

Tab. 2-7: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur Herstellung von RNA. 21

Tab. 2-8: Zusammensetzung der verwendeten Puffer der SDS-PAGE. 22

Tab. 2-9: Zusammensetzungen des Trenngels und des Sammelgels nach *Laemmli*. 23

Tab. 2-10: Zusammensetzung der verwendeten kolloidalen Coomassie Färbe- und Entfärbelösung. 23

Tab. 2-11: Zusammensetzung der beim Western Blot verwendeten Puffer. 24

Tab. 2-12: Zusammensetzung der bei der Blue Nativ PAGE verwendeten Laufpuffer. 27

Tab. 2-13: Verwendete Puffer für die Tris-Tricin-Urea PAGE. 27

Tab. 2-14: Zusammensetzung des Tris-Tricin-Urea Gels. 27

Tab. 2-15: Verwendete Medien und Lösungen zur Herstellung des Autoinduktionsmediums. 28

Tab. 2-16: Zusammensetzung der im Rahmen der Nickelaffinitätschromatographie
verwendeten Puffer. 29

Tab. 2-17: Übersicht über modifizierungsbedingten Massenunterschiede. 31

Tab. 2-18: Zusammensetzung der *Pull down Assay* Puffer. 33

Tab. 2-19: Verwendete *Crosslinker* und ihre Eigenschaften. 33

Tab. 2-20: Zusammensetzung der beim *FarWestern Blot* verwendeten De- und Renaturierungspuffer. 34

Tab. 3-1: Bisherige Analysen des Phloemproteoms in verschiedenen Pflanzenspezies. 37

Tab. 3-2: Über MS-Analysen identifizierte Proteine der Heparin-Affinitätschromatographie. 55

Tab. 3-3: Mittels *Peptide mass fingerprint* identifizierte Phloemproteine mit
Metallbindeeigenschaften. 58

Tab. 3-4: Mittels *Peptide mass fingerprint* identifizierte Phloemproteine mit stark hydrophilen
Eigenschaften. 60

Tab. 3-5: Aminosäurezusammensetzung und biochemische Eigenschaften des At1g64370-Proteins
aus *A. thaliana* und des Orthologs aus *B. napus*. 62

Tab. 3-6: Übersicht über Homologe des At1g64370-Proteins in anderen Organismen. 65

Tab. 3-7: Darstellung der über die MAP-Kinase 3 modifizierten Peptidfragmente aus dem *Arabidopsis*
und Raps Protein. 75

Tab. 3-8: Übersicht über die Beteiligung von MAPK3- und MAPK6-Kaskaden in *Arabidopsis thaliana* und
Mais. 77

Tab. 3-9: An Bindung bestimmter Ionen beteiligte Aminosäurereste. 91

Tab. 3-10: Übersicht über die im Rahmen der Arbeit untersuchten *A. thaliana* Mutanten. 97

Tab. 3-11: Position und Aminosäuresequenz der für das At1g64370 aus <i>A. thaliana</i> vorhergesagten NLS und NES.	100
Tab. S7-1: Identifizierte Proteine des Komplexes I im Phloemsaft von <i>B. napus</i>	127
Tab. S7-2: Identifizierte Proteine des Komplexes II im Phloemsaft von <i>B. napus</i>	128
Tab. S7-3: Identifizierte Proteine des Komplexes III im Phloemsaft von <i>B. napus</i>	129
Tab. S7-4: Identifizierte Proteine des Komplexes IV im Phloemsaft von <i>B. napus</i>	130

Abkürzungen

μ	Mikro
Abb.	Abbildung
BN	Blue Native
BSA	Rinderserumalbumin
CC	<i>Companion cell</i> , Geleitzelle
CK II	Casein Kinase II
cv.	Cultivar
Da	Dalton
DEPC	Diethyldicarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	Doppelsträngig
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimide Hydrochlorid
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
g	Gramm
GRAVY	<i>Grand average of hydropathicity</i>
IDP	<i>Intrinsically disordered protein</i>
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEX	Ionenaustausch
IMAC	<i>Immobilised metal affinity chromatography</i>
IPTG	<i>Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid</i>
l	Liter
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LEA	<i>Late embryogenesis abundant</i>
MALDI	<i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein Kinase</i>
ml	Milliliter
MS	Massenspektrometrie
nm	Nanometer
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
ORF	<i>Open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PPU	<i>Plasmodesmal pore unit</i>
RBP	RNA-Bindeprotein
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> , Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	<i>Sieve element</i> , Siebelement
Tab.	Tabelle
TOF	<i>Time of flight</i>
UV	Ultraviolett
xg	fach Erdbeschleunigung
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>
ZIGE	Zonen-Interferenz Gelelektrophorese

Abkürzungen der Aminosäuren

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

1 Einleitung

Aufgrund ihrer sessilen Lebensweise sind höhere Pflanzen nicht in der Lage ungünstigen Umwelteinflüssen zu entkommen, dazu zählen neben Wasser- und Nährstoffmangel auch der Befall durch Pathogene. Um diese Einschränkungen unbeschadet zu überwinden, haben Pflanzen vielfältige und effiziente Mechanismen entwickelt. Somit sind Pflanzen in der Lage sich an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen und so ihr Wachstum und ihre Entwicklung zu sichern. Dieses erfordert insbesondere eine Kommunikation zwischen entfernten Geweben und Organen, welche über den Transport von Signalmolekülen innerhalb der Pflanze ermöglicht wird. Ein Kompartiment, das bei der Weiterleitung von Signalen eine wichtige Rolle einnimmt ist das Gefäßsystem. Dieses verbindet über den Spross selbst entfernte Organe miteinander und wird als Leitbündel bezeichnet. Es ist für den Transport von Wasser, gelösten Substanzen und auch Assimilaten im Blatt, im Spross sowie in der Wurzel verantwortlich. Während des primären Wachstums differenziert sich das Gefäßsystem aus einem Kontinuum von der Wurzel zum Spross, was schließlich zu einer unterschiedlichen Anordnung und Art der Leitbündel in den unterschiedlichen Organen führt (1). Somit sind die Leitbündel je nach Art und Gewebe der Pflanze unterschiedlich aufgebaut. *Arabidopsis thaliana* besitzt im Spross ein offen kollaterales Leitbündel, bestehend aus einem röhrenartigen System, das sich wiederum aus dem Gefäßteil (Xylem) und dem Siebteil (Phloem) zusammensetzt. Beide sind in Sprossbereich über das Kambium voneinander getrennt (Abb. 1-1), während in älteren Wurzeln Xylem, Kambium und Phloem in konzentrischen Kreisen angeordnet sind (2).

1.1 Aufbau und Funktion des Leitgewebes

Das Leitgewebe höherer Pflanzen besteht aus einem röhrenartigen System, wobei das Xylem vom Phloem unterschieden wird. Beim Xylem handelt es sich um den holzigen Teil des Leitgewebes, der für den

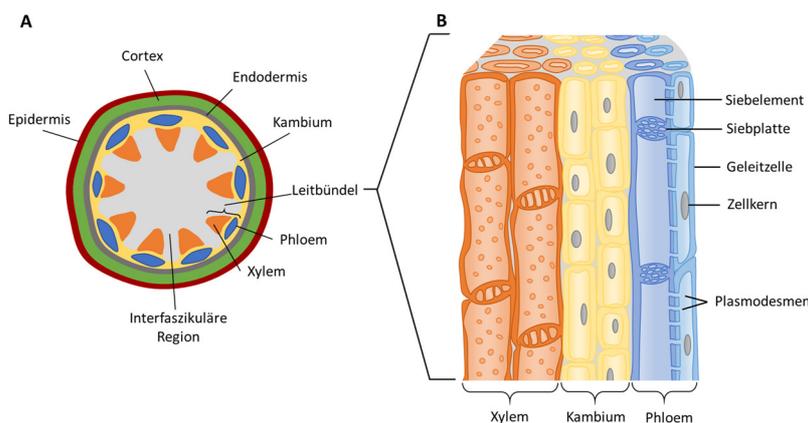


Abb. 1-1: Aufbau des Leitgewebes und des Leitbündels im Spross von Dikotyledonen.

Schematische Darstellung eines Querschnitts des Leitgewebes (A) und des offen kollateralen Leitbündels im Sprossbereich (B), wie es in vielen Dikotylen vorkommt. Es besteht aus dem Gefäßteil (Xylem) und dem Siebteil (Phloem), wobei beide vom Kambium getrennt werden. Das Phloem besteht aus den Siebelementen, die im Laufe ihrer Entwicklung den Zellkern verloren haben und über Siebplatten miteinander verbunden sind. Verbunden sind die Siebelemente über Plasmodesmen mit den Geleitzellen.

Transport von Wasser und gelösten Nährstoffen von der Absorptionszone der Wurzel in die Sprossachse und Blätter der Pflanze zuständig ist. Es besteht aus Tracheen, Tracheiden, Sklerenchymfasern und Xylemparenchymzellen. Bei den ersteren handelt es sich um tote lignifizierte Zellen, die von Hoftüpfeln unterbrochene Zellwände besitzen, die im Rahmen der Ausdifferenzierung des

Xylems durch programmierten Zelltod entstehen. Sie sind zuständig für den Transport, während die Sklerenchymfasern und die Xylemparenchymzellen Stütz- und Speicherfunktion übernehmen.

Das Phloem ist hingegen für den Transport von Assimilaten von den photosynthetisch aktiven Geweben (*source* - Blätter) zu den Geweben des Verbrauchs (*sink* - Wurzel, Meristem und Blüte) verantwortlich (Abb. 1-2) und besteht aus Siebelementen (*sieve element*, SE), Geleitzellen (*companion cell*, CC), Phloemfasern, Strahlzellen und Phloemparenchymzellen. Dabei übernehmen die drei zuletzt genannten wiederum die Stütz- und Speicherfunktion. Die SEs bilden

zusammen mit den CCs eine leitfähige Siebröhre, den SE-CC-Komplex (Abb. 1-1 B). Dieser Komplex geht aus einer ungleichen Teilung einer gemeinsamen Mutterzelle hervor. Während ihrer Ausdifferenzierung verlieren die SEs wichtige zelluläre Komponenten wie die Ribosomen und den Zellkern (3), verbleiben aber während ihrer gesamten Lebenszeit mit den kernhaltigen Geleitzellen durch spezielle sekundäre Plasmodesmen, die als *Plasmodesmal pore units* (PPU) bezeichnet werden (4), verbunden. Bei den Plasmodesmen (PD) handelt es sich um zytoplasmatische Kanäle in den Zellwänden, die mit dem endoplasmatischen Retikulum durchzogen sind und stellen einen Teil des symplastischen Transports dar. Die PPU sind im Vergleich zu PDs anderer

Gewebe auf der Seite der Geleitzellen weit verzweigt und münden in den Siebelementen in einem Kanal (5) (Abb. 1-3). Die einzelnen Siebelemente sind über Siebplatten miteinander verbunden und transportieren Phloemsaft, der neben Photoassimilaten auch verschiedenste Makromoleküle enthält.

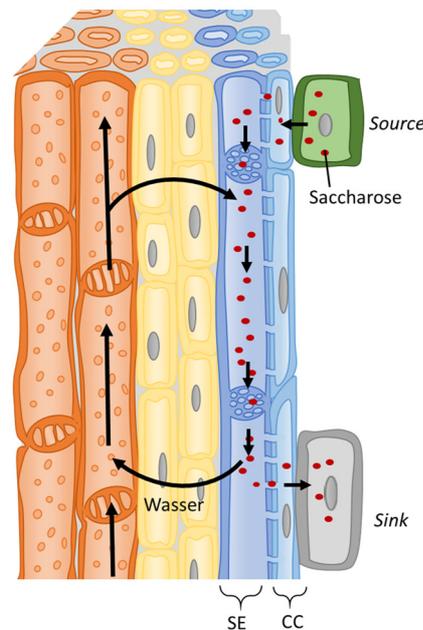


Abb. 1-2: Schematische Darstellung des Assimilat-Transports von *Source* nach *Sink*. Daran sind vermutlich aktive und passive Transportmechanismen beteiligt.

1.2 Inhaltsstoffe des Phloems

Das Phloem ist in erster Linie für die Verteilung von Photoassimilaten (zum Beispiel Saccharose) vom Ort ihrer Produktion zum Ort des Gebrauchs zuständig (6). Neben diesen konnten auch Phytohormone, Aminosäuren sowie anorganische Ionen als Bestandteil des Phloemsafts identifiziert werden (6, 7). Inzwischen wurden auch Makromoleküle wie Ribonukleinsäuren (RNA), Proteine und Lipide im Phloemsaft verschiedener Spezies nachgewiesen (8–12), wobei über *Grafting*-Experimente gezeigt werden konnte, dass sowohl RNA als auch Proteine innerhalb des Phloems weite Strecken zurücklegen und somit vermutlich als Signalmoleküle fungieren (13) und so unter anderem wichtige physiologische Prozesse steuern (14). Während der Langstreckentransport von Photoassimilaten und kleineren Signalmolekülen bereits gut untersucht ist, ist über den Transport Phloem-mobiler Makromoleküle über lange Strecken bisher wenig bekannt. Dies gilt sowohl für die Mechanismen des Eintritts in das Phloem, den Transport

innerhalb des Phloems, sowie des Austritts der Makromoleküle aus dem Phloem heraus ins Zielgewebe. Dabei wird allerdings angenommen, dass sie gleichermaßen wie Photoassimilate vom Ort ihrer Synthese über den Massenstrom, getrieben über einen osmotischen Gradienten (15), zum Ort ihres Verbrauchs transportiert werden. Der Verlust des Zellkerns und der Ribosomen innerhalb der SEs lässt vermuten, dass diese Zellen die Fähigkeit der Transkription und Translation verloren haben. Ein Indiz dafür sind auch die Studien von Zhang *et al.*, die zeigen konnten, dass die Translation im Phloem durch darin befindliche Komponenten, nämlich tRNA-Hälften, sogar inhibiert wird (16). Deshalb wird angenommen, dass die im Phloem befindlichen Makromoleküle, wie RNA und Proteine, in den benachbarten CCs synthetisiert werden und über die PPU in die SEs geschleust werden.

1.2.1 Nukleinsäuren im Phloem

Über verschiedene Studien konnten bereits unterschiedliche RNA-Spezies in Phloemexsudaten nachgewiesen werden. Hierzu zählen neben proteinkodierenden Transkripten (mRNA), auch nicht-kodierende RNAs wie Transfer-RNA (tRNA), ribosomale RNA (rRNA) sowie kleine, nicht-kodierende RNAs wie Mikro-RNAs (miRNA) und (siRNA) (16–21). Innerhalb der Phloemexsudate konnte bisher keine RNase-Aktivität detektiert werden (16, 22, 23), was zeigt, dass ihre Integrität innerhalb des Phloems gewahrt werden soll und sie somit möglicherweise als Signalmoleküle fungieren. Die Verteilung sowie Funktion als Signalmolekül konnte bisher für nur wenige Phloem-mobile mRNAs und miRNAs ermittelt werden: So demonstrierten *Grafting*-Experimente, dass etwa 20 % des gesamten Transkriptom über das Siebelementsystem von *A. thaliana* in entfernte Organe transportiert wird und die transportierten Transkripte auf Veränderungen in der Nährstoffzugänglichkeit reagierten (18), was die Vermutung zulässt, dass sie bei Nährstoffstress als Signal fungieren. Andere im Phloem identifizierte mRNAs scheinen hingegen an der Regulation der pflanzlichen Entwicklung beteiligt zu sein (Tab. 1-1): So wurde gezeigt, dass die mRNA des FLOWERING LOCUS T (FT) in *A. thaliana* und Tabak zusammen mit dem FT-Protein von den Blättern ins vegetative Wurzelmeristem transportiert wird und dort die Blühinduktion reguliert (24). Die Transkripte CmNACP und CmGAIP, die in Kürbis über *Grafting*-Experimente identifiziert werden konnten, scheinen in der Meristem- beziehungsweise Blattentwicklung involviert zu sein (14, 25, 26). Neuste Studien zeigen, dass das mobile mRNA-Transkript des Homöodomänen-Transkriptionsfaktors (*STBEL5*) die Knollenentwicklung in Kartoffeln reguliert (27).

Tab. 1-1: Phloem-mobile RNA-Transkripte und ihre Funktion.

mRNA	Organismus	Funktion	
FT	<i>A. thaliana</i> , <i>N. benthamiana</i>	Blühinduktion	Lu <i>et al.</i> , 2012 (24)
BEL5	Kartoffel	Knollenbildung	Hannapel & Banerjee, 2017 (27)
Mouse ears	Tomate	Blattmorphologie	Kim <i>et al.</i> , 2001 (28)
GAI	<i>A. thaliana</i> , Tomate, Kürbis	Blattmorphologie	Haywood <i>et al.</i> , 2005 (26)

Neben den Protein-kodierenden Transkripten konnten auch siRNAs und miRNAs als Phloem-mobile Makromoleküle identifiziert werden, wobei erstere eine essentielle Rolle bei der pflanzlichen Entwicklung und der Abwehr von Pathogenen spielen (29). Auch miRNAs konnten bereits in Phloemexsudaten

verschiedenster Spezies nachgewiesen werden, zum Beispiel Kürbis (19), Lupine (30), Raps (10, 20) und Apfel (31). Sie sind zwischen 21-24 nt lang und sind zuständig für die post-transkriptionelle Regulation der Genexpression, indem sie die Menge ihrer Zieltranskripte herunterregulieren. Die Funktion der im Phloem gefundenen miRNAs ist zum größten Teil noch ungeklärt und konnte bisher für nur wenige Spezies ermittelt werden: So scheinen die miRNAs bei der pflanzlichen Entwicklung (32) sowie Nährstoff-bedingtem Stress eine Rolle einzunehmen, da für einige Spezies gezeigt werden konnte, dass sie auf den Mangel bestimmter Ionen reagieren. So konnte beispielsweise unter Phosphat- und Sulfatmangel in *Brassica napus* eine Zunahme der miR395 beziehungsweise miR399 im Phloem beobachtet werden (10, 33).

Allerdings ist der Transportmechanismus der RNA in die SEs, der Transport dieser innerhalb der SEs zu spezifischen Geweben und deren Entladung im Zielgewebe bisher nicht gut untersucht. Jedoch existieren derzeit zwei verschiedene Hypothesen wie die RNA innerhalb des Phloems in entfernte Gewebe transportiert wird: Dabei wird einerseits ein unselektiver Transport der RNA ins Phloem angenommen (34) und andererseits wird vermutet, dass der Import von RNA in die SEs selektiv erfolgt, wobei aktive Mechanismen beteiligt sind (35). Dabei spielen RNA-Bindeproteine (RBP), welche ebenfalls im Phloem identifiziert wurden, möglicherweise eine Rolle (19, 36, 37). Diese Annahme eines selektiven Mechanismus wird gestützt von der Tatsache, dass einerseits einige RNAs, die innerhalb des Gefäßsystems stark exprimiert werden nicht Phloem-mobil sind, und andererseits nicht alle RNAs im Phloem identifiziert werden konnten (10, 16, 18).

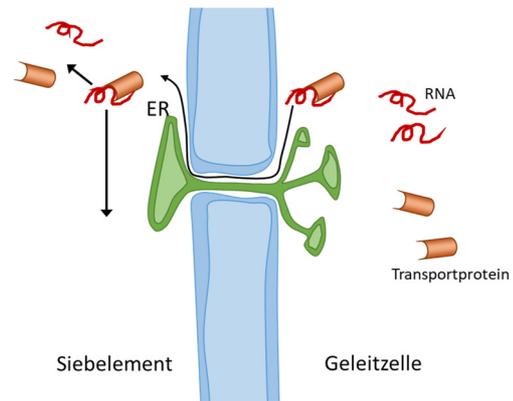


Abb. 1-3: Schematische Darstellung einer Plasmodesmal Pore Unit zwischen Geleitzelle und Siebelement. Eine Besonderheit der PPU ist das verzweigte ER in der CC, das in einem Kanal in der SE endet. Dargestellt ist außerdem ein möglicher Mechanismus des RNA-Transports über die PPU unter Beteiligung eines Chaperons.

1.2.2 Das Phloemproteom

Neben RNAs enthält das Phloemexsudat außerdem lösliche Proteine, die scheinbar immer vorhanden sind. Im Phloemsaft von Kürbis wurde sogar eine Proteinkonzentration von 100 mg/ml ermittelt (38), so dass Proteine scheinbar einen Hauptbestandteil des Phloems darstellen.

Da ausdifferenzierte SEs durch den Verlust des Zellkern und der Ribosomen nicht zur mRNA- sowie Proteinsynthese in der Lage sind, wird vermutet, dass diese Makromoleküle in den benachbarten Geleitzellen synthetisiert werden und symplastisch über die PPU in das Siebelement gelangen, so wie es bereits für die Phloemproteine PP1 und PP2 aus Kürbis gezeigt werden konnte (39). Dabei wird der Transport von Proteinen in die SEs über die Größenausschlussgrenze (*Size exclusion limit*, SEL) der PPU limitiert. Diese ist vermutlich von der Pflanzenart, dem Gewebe, der Art des Phloems sowie dem Entwicklungsstadium abhängig. Für *Arabidopsis thaliana* CCs konnte mittels Überexpression des GFPs und eines GFP-Fusionsproteins unter einem Geleitzell-spezifischem Promotor (SUC2) bereits gezeigt werden,

dass diese vermutlich ein SEL von 67 kDa besitzen (40, 41). Außerdem wird die Beteiligung von Chaperonen beim Import von Proteinen in die SEs diskutiert (42). Für den Transport innerhalb des Phloems wird vermutet, dass die Phloembestandteile durch den Massenstrom transportiert werden (43), jedoch konnte für das CmPP1 und CmPP2 auch ein selektiver Transport innerhalb des Phloems gezeigt werden (44). Für die Entladung am Zielgewebe wie Wurzelspitzen, Früchte sowie Samen wird ebenfalls ein symplastischer Transport angenommen (45).

Auch die bisher durchgeführten Phloemproteomstudien in unterschiedlichen Pflanzenspezies wie Kürbis (46, 47), *Ricinus* (48), Raps (11), Reis (49), Gurke (50), Brokkoli (51) und Lupine (52) konnten belegen, dass das Phloem aller untersuchten Spezies eine Vielzahl an Polypeptiden enthält. Außerdem wird über einen Vergleich aller bisher durchgeführten Studien deutlich, dass die Proteinzusammensetzung in nahezu allen Spezies ähnlich zu sein scheint. So konnten beispielsweise in den Proteomstudien des Phloemexsudats von *Brassica napus* über 2D-Gelelektrophoresen und anschließender MALDI-Massenspektrometrie 140 Proteine eindeutig identifiziert werden, die an Prozessen wie dem Metabolismus (Enzyme der Glykolyse und des Aminosäure-Metabolismus), der Proteinmodifizierung und dem Protein *Turnover* beteiligt sind, sowie Proteine, die an der Stress- und Abwehr-Reaktion, dem Transport, der Bindung von Nukleinsäuren, sowie der Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) involviert sind. Ein weiterer Bestandteil sind strukturelle Proteine.

1.2.2.1 Strukturelle Proteine im Phloem

Während lange Zeit geglaubt wurde, dass das Siebelement kein konventionelles Zytoskelett besitzt, konnten inzwischen sowohl in Phloemexsudaten von Raps als auch Kürbis Aktin, Profilin und Aktin-Depolymerisierungsfaktoren identifiziert werden (11, 47). Alle sind an der Bildung von Mikrofilamenten beteiligt. Dabei reguliert das Profilin die Polymerisierung des Aktins, wobei es bedingungsabhängig die Polymerisierung fördert oder auch inhibiert. Ähnlich wie das Profilin regulieren die Aktin-Depolymerisierungsfaktoren den Organisationsstatus des Aktins, wobei letztere pH-abhängig sind. Kulikova *et al.* konnten über elektronenmikroskopische Analysen erstmals Aktin-Mikrofilamente im Siebelementsystem von Kürbis zeigen (53), wobei die Funktion des Aktin-Zytoskeletts im Phloem bisher noch nicht geklärt ist. Eine mögliche Erklärung ist, dass das kontraktile Aktin-Myosin-System die Transportrate über die Veränderung des Siebporendurchmessers steuert (53).

1.2.2.2 Proteine mit Beteiligung an der Proteinmodifizierung und dem Protein *Turnover*

Über posttranslationale Modifizierungen, wobei an eine Aminosäure des Proteins entweder Zucker, Fettsäuren, Phosphat-, Methyl- oder auch Hydroxylgruppen oder sogar Proteine (Ubiquitin) übertragen werden, erhalten Proteine ihre endgültige Struktur und Funktion. Die meisten Modifizierungen sind

reversibel, weshalb sie an verschiedensten Prozessen, wie dem Proteintransport, bei der Signalweiterleitung und dem Protein *Turnover* – zum Beispiel dem Abbau über Proteasen – beteiligt sind.

Sowohl in Raps, in Kürbis als auch Lupinen konnten Komponenten des Ubiquitin-abhängigen proteasomalen Abbauwegs identifiziert werden (11, 47, 52). Dazu zählen neben proteasomalen Proteinen auch Ubiquitin, sowie Ubiquitin-aktivierende, Ubiquitin-konjugierende Enzyme, Ubiquitin-Ligasen und Deubiquitinierungsenzyme. Dabei vermuten die Autoren, dass die Ubiquitinierung entweder mit dem Protein-*Sorting* oder auch der Degradation innerhalb des Siebelements im Zusammenhang steht. Letzteres ist besonders im Hinblick auf die Abwehr von Pathogenen, die sich häufig über das Phloem ausbreiten denkbar (54).

Weitere Komponenten, die am Protein *Turnover* beteiligt sind und in Phloemexsudaten verschiedener Spezies nachgewiesen werden konnten, sind Protease-Inhibitoren. Hierbei handelt es sich um Proteine, die proteolytisch aktive Enzyme binden und so den Abbau anderer Proteine unterbinden. Die identifizierten Protease-Inhibitoren konnten verschiedenen Klassen zugeordnet werden, wie den Aspartatprotease-, Chymotrypsin-, Trypsin-, Serin- und Cysteinprotease-Inhibitoren (11, 46, 48, 50, 55). Über die Anwesenheit dieser Inhibitoren scheint die Stabilität der Proteine reguliert zu werden, was zeigt, dass die Integrität der Proteine innerhalb des Phloems erhalten bleiben soll und sie scheinbar eine wichtige Rolle innerhalb des Phloems einnehmen (11). Außerdem wird aufgrund ihres abundanten Vorkommens im Phloem vermutet, dass sie an der Abwehr von Pphloemsaft-saugenden Insekten beteiligt sind (56).

1.2.2.3 Proteine mit Beteiligung an der Redoxregulation

Im Fall von biotischem oder abiotischem Stress reagiert die Pflanze als erstes mit der Herstellung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Hierzu gehören Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Superoxidradikale ($\text{O}_2^{\cdot -}$), Hydroxylradikale (OH^{\cdot}), die durch unvollständige Reduktion entstehen, und *Singlet Oxygen* ($^1\text{O}_2$), was über die Exzitation von molekularem Sauerstoff gebildet wird (57). Diese ROS sind stark oxidativ und reagieren mit einer Vielzahl von biologischen Molekülen (58). Während geringe Konzentrationen wohl als Signale fungieren um eine Stressantwort auszulösen, führen höhere Konzentrationen vermutlich zum programmierten Zelltod (59). Über die Bildung solcher freien Radikale kommt es außerdem zu einer Quervernetzung von Proteinen mit Nukleinsäuren. Um die Funktion des Siebelementsystems unter Stress aufrechtzuerhalten, gibt es im Phloem Proteine und Substanzen mit reduktiven sowie antioxidativen Eigenschaften. Hierzu gehören in erster Linie Proteine, die in der Lage sind ROS zu entfernen und zum anderen durch oxidativen Stress inaktivierte Proteine zu regenerieren. Proteine, die in diesem Zusammenhang im Phloem identifiziert werden konnten, sind die Glutathion S-Transferase, das Thioredoxin h, das Glutaredoxin, die Glutathion-Peroxidase, die Monodehydroascorbat-Reduktase, die Ascorbat-Peroxidase und die Dehydroascorbat-Reduktase.

1.2.2.4 Lipid-Bindeproteine

Neben RNA und Proteinen konnten auch Lipide als Bestandteile des Phloems identifiziert werden, wie kleine lipophile Moleküle, lipophile Hormone und Glycerolipid (60–62). Zu den lipophilen Molekülen gehört auch Jasmonat (JA), was als Antwort auf Verwundung durch Herbivore gebildet wird. Außerdem konnten im Phloemsaft verschiedener Spezies, wie Lupine, *Arabidopsis*, Raps, und Kürbis, Lipid-Bindeproteine detektiert werden (11, 47, 49, 50, 62–64).

Daher wird vermutet, dass auch Phloem-mobile Lipide als Regulatoren von Entwicklungsprozessen bei abiotischem Stress beteiligt sind (65): So fungieren sie möglicherweise als Signalmoleküle, bewegen sich aber vermutlich nicht frei im Phloem, sondern gelangen im Komplex mit Lipid-Bindeproteinen ins Siebelement und werden dort über weite Strecken zum Zielgewebe transportiert (66). Die dabei identifizierten Proteine umfassen eine Lipase (GDSL-Motiv-Lipase), einen Lipidrezeptor (PIG-P-ähnliches Protein) und ein mögliches Lipidtransportprotein (*Phloem Lipid Associated Family Protein*, PLAFP) (65). Während die Lipase für die Freisetzung der Lipide ins Phloem zuständig ist, werden diese dort von PLAFP gebunden, was als Transporter und Co-Signal innerhalb des Phloems fungiert. Da gezeigt werden konnte, dass die Expression beider Proteine über den gleichen abiotischen Stress induziert wird, wird vermutet, dass beide als Signalmoleküle im selben Signalweg involviert sind (65).

1.2.2.5 Phloem-mobile RNA-Bindeproteine

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl mRNA als auch kleine nicht-kodierende RNAs zwischen Zellen aber auch über weit entfernte Strecken über das Phloem transportiert werden und zum Teil als Signalmoleküle fungieren (14). Zwar wird vermutet, dass diese RNAs in den Geleitzellen synthetisiert werden und über die PPU's ins Siebelement gelangen, allerdings ist über den genauen Transportmechanismus bisher nur wenig bekannt. Auch wenn im Phloem bisher keine RNase-Aktivität detektiert werden konnte, woraus geschlossen werden kann, dass Phloem-mobile RNAs im Siebelement nur bedingt oder gar nicht degradiert werden (67), wird angenommen, dass die RNAs an RNA-Bindeproteine (RBP) gekoppelt sind, die die Lokalisation und Stabilität der RNA beeinflussen (35). Sie werden auch als RNA-Chaperone bezeichnet.

Diese RBP sind an vielen Prozessen des RNA-Metabolismus beteiligt wie der Synthese, der Lokalisation, und dem Transport und besitzen in der Regel bestimmte Domänen, über die sie mit der RNA wechselwirken. Hierzu gehören das RNA-Erkennungsmotiv (RRM), die Zinkfinger-Domäne, die *K-Homology* Domäne, die RGG-Box oder eine doppelsträngige RNA-Bindedomäne (dsRBD). Allerdings wurden in den letzten Jahren auch zunehmend stark ungeordnete Proteine mit RNA-Bindeeigenschaften identifiziert, die keine Bindedomäne aufwiesen. Hierbei wird eine Interaktion aufgrund der hohen Flexibilität und einem *induced fit* Mechanismus diskutiert (68).

Das erste RNA-Bindeprotein, das im Phloemsaft von Kürbis identifiziert werden konnte, ist das Phloem Protein 16 (CmPP16) (25). Hierbei handelt es sich um ein 16 kDa großes Protein, das ähnliche

Eigenschaften wie das virale *Movement* Protein besitzt. Dieses Protein interagiert mit den Plasmodesmen und induziert dadurch eine Erhöhung des Größenausschlusslimits (SEL). Außerdem konnte gezeigt werden, dass es zusammen mit seiner mRNA (CmPP16 mRNA) von den CCs über die Plasmodesmen in die SEs transportiert wird. Ähnliches konnte für das *Phloem Small RNA-Binding Protein 1* (PSRBP1), ebenfalls aus Kürbis, gezeigt werden (19).

Ein weiteres bereits gut charakterisiertes RNA-bindendes Phloemprotein ist das Phloem Protein 2 aus Kürbis (CsPP2). Hierbei handelt es sich um ein etwa 26 kDa großes zu den Lectinen gehörendes Protein und scheint das im Phloemsaft abundanteste Protein zu sein. Während die mRNA des CsPP2 ausschließlich in den CCs nachgewiesen werden konnte, akkumuliert das Protein in den SEs (39). Es interagiert mit viroider RNA und ermöglicht so die Ausbreitung des Pathogens in entfernte Pflanzenorgane. Dieses resultiert vermutlich aus der nicht-sequenz-spezifischen Interaktion mit RNA (69).

Über verschiedene Proteomstudien konnten inzwischen etliche putative RNA-Bindeproteine im Phloemsaft verschiedener Spezies nachgewiesen werden (11, 47, 49, 52, 70), deren Funktion aber noch genauer untersucht werden muss. Allerdings wird hier eine Beteiligung am selektiven RNA-Transport sowie am Erhalt der RNA-Integrität diskutiert.

1.2.3 Stress-relevante Proteine

Im Laufe der letzten Jahre kam es weltweit zu starken Wetterfluktuationen, die bedingt durch Überflutung oder auch Austrocknung von Feldern zu starken Ernteverlusten führten. Aufgrund des Klimawandels und insbesondere des Anstiegs der Temperaturen, der sich voraussichtlich auch in den kommenden Jahren noch verstärkt, wird auch in den kommenden Perioden mit Ernteeinbußen zu rechnen sein. Das stellt bei der stetig wachsenden Bevölkerungszahl und dem damit verbundenen höheren Bedarf an Nahrungsmitteln ein immer größer werdendes Problem dar.

Pflanzen, die aufgrund ihrer Bodenverwurzelung nicht beweglich sind, sind natürlicherweise den äußeren Einflüssen wie beispielsweise Temperaturveränderungen, unterschiedlichem Nährstoffangebot und auch Wassermangel ausgesetzt. Lösen diese Faktoren in der Pflanze Stress aus, so dass sie den Stoffwechsel und somit die Entwicklung und das Wachstum beeinflussen, spricht man von abiotischem Stress. Zu den abiotischen Stressfaktoren in Pflanzen zählen Trockenheit, Kälte, hohe Salzkonzentrationen, Nährstoffmangel und Hitze (71). Neben abiotischen gibt es auch biotische Stressoren. Dabei handelt es sich in der Regel um Pathogene, wie Viren, Bakterien oder Pilze, aber auch Fraßfeinde.

Eine Klasse von Proteinen, die zur Abwehr von Herbivoren in *Brassicaceen* weit verbreitet sind (72) und auch im Phloemsaft von Raps nachgewiesen werden konnten, sind Myrosinase (11).

Dabei handelt es sich um Enzyme, die große Aggregate bilden (73) und den Abbau von Glucosinolaten zu Glukose, Sulfat und Cyanat, Thiocyanat, Nitril und weiteren giftigen Abbauprodukten katalysieren (74). Die Bildung dieser Substanzen, beispielsweise der stechend riechenden oder scharf schmeckenden Senföle, dient der Pflanze als Abwehrmechanismus gegen herbivore Insekten und wird insbesondere durch eine Verletzung des Pflanzengewebes induziert. Während im unverletzten Zustand sowohl Enzym als auch

Substrat in unterschiedlichen Kompartimenten räumlich voneinander getrennt vorliegen, kommt es durch Verletzungen zur Freisetzung der Glucosinolate, die dann durch die Enzyme direkt zu giftigen Abbauprodukten umgesetzt werden und so vor weiterem Fraß schützen (75). Eine weitere Proteinklasse, die an der Abwehr herbivorer Pathogene beteiligt ist, sind die bereits erwähnten Protease-Inhibitoren. Sie dienen insbesondere der Abwehr von Phloemsaft-saugenden Insekten, indem sie Verdauungsenzyme der Insekten inhibieren.

Viele Stressarten wie Hitze und Trockenheit, aber auch Kälte und hohe Salzkonzentrationen bedingen in Pflanzen eine Veränderung des Wasserpotentials. Wasser spielt auch im Siebelementsystem eine wichtige Rolle und so ist es nicht überraschend, dass in Phloemproteomstudien auch dehydratationsabhängige Proteine wie Dehydrine, aber auch Kälte-regulierte Proteine, Hitzeschockproteine und Chaperone identifiziert werden konnten.

Als Chaperone wird eine Proteinfamilie bezeichnet, die an der Proteinfaltung, -neufaltung und der sogenannten Proteostase beteiligt ist. Als Proteostase wird die Regulation der Proteinsynthese, Faltung, Entfaltung und Degradation von Proteinen bezeichnet. Chaperone besitzen die Eigenschaft an nicht nativ vorliegende Proteine zu binden und deren Neufaltung zu unterstützen. Um eine möglichst breite Substratabdeckung zu gewährleisten, ist die Affinität zu anderen Proteinen vergleichsweise schwach (76). Ein weiteres wesentliches Merkmal aller Chaperone ist deren hoher Grad an intrinsischer Unordnung. Diese erlaubt die Ausbildung einer Vielzahl verschiedener Konformationen in Lösung und ermöglicht so die Bindung an verschiedene Substrate. Eine der am besten untersuchten Chaperonklassen ist die der Hitzeschockproteine (HSP). Diese Klasse, zu der das gut untersuchte HSP70 und HSP90 gehören, sind in der Lage unter Hydrolyse von ATP falsch gefaltete oder aggregierte Proteine neu zu falten, beziehungsweise die Aggregate aufzulösen. Neben dem Aufrechterhalten der nativen Proteinkonformation besitzt beispielsweise das HSP90 regulatorische Eigenschaften. So ist es beteiligt an der Reifung von Signalproteinen, die im Zellzyklus und der Entwicklung beteiligt sind (76). Chaperone fungieren dabei häufig nicht als Monomer, sondern bilden größere Komplexe aus Homo- und Heteromeren. Neben den hauptsächlich mit Proteinen interagierenden Chaperonproteinen existieren spezialisierte Chaperone zum Erhalt der Sekundärstruktur von RNAs. Zu diesen Proteinen gehören unter anderem ribosomale oder *Cold Shock Domain* Proteine, die wie die HSPs eine Neufaltung von falsch gefalteten Nukleinsäuren (77) ermöglichen. Einige ribosomale Proteine sind weiterhin als Janus-Chaperone bekannt. Als Janus-Chaperone werden Proteine bezeichnet, die sowohl Proteine, als auch RNAs binden können und eine Neufaltung oder Schutz der vorliegenden Faltung ermöglichen können (78). Viele als Chaperon klassifizierte Proteine sind nicht beteiligt an der Neufaltung der Substrate, sondern sind vielmehr als molekulares Schild anzusehen. Durch Änderungen der äußeren Bedingungen, wie unter verschiedenen Wasserstressszenarien, wie Trockenheit oder Überflutung, lagern sich diese Proteine an deren native Substrate an und verhindern so ein Denaturieren. Selbst unter starken Wassermangelbedingungen oder hohen Salzkonzentrationen können so enzymatische Reaktionen aufrechterhalten werden.

Bei Wasserstress reagiert die Pflanze mit einer Stressantwort, bei der auch stark hydrophile Proteine synthetisiert werden (79, 80). Erstmals charakterisiert wurden diese Proteine in Baumwolle (*Gossypium hirsutum*) in der späten Phase der Embryogenese (81), weshalb sie als LEA (*Late Embryogenesis Abundant*)

Proteine bezeichnet wurden. Später wurden Homologe dazu auch im Samen anderer höherer Pflanzen entdeckt, wo sie den Samen vor Austrocknung schützen. Dabei sind LEA-Proteine, die inzwischen in vielen Pflanzengewebe identifiziert werden konnten, aber keineswegs pflanzenspezifisch, sondern kommen auch in Bakterien wie *Deinococcus radiodurans* (83) und *Bacillus subtilis* (84), Cyanobakterien (85), Rotiferen (86), Pilzen (87) und Invertebraten vor (88–91). In allen Organismen scheinen sie eine wichtige Rolle beim Schutz vor Dehydrierung zu übernehmen, welche über Trockenheit, Frost aber auch hohe Salzkonzentrationen ausgelöst wird. Allen LEA-Proteinen gemein ist eine bestimmte Aminosäurezusammensetzung, wobei Alanin, Glycin und Serin hauptsächlich vertreten sind, was wiederum dazu führt, dass sie einen hohen Grad an Hydrophilizität aufweisen und sehr hitzestabil sind. Die pflanzlichen LEA-Proteine wurden aufgrund ihrer unterschiedlich konservierter Sequenzmotive in verschiedene Gruppen eingeteilt (82, 92–95). Eine Untergruppe der LEA-Proteine sind die Dehydrine.

Bei den Dehydrinen handelt es sich um stark hydrophile Proteine. Sie bilden die zweitgrößte Untergruppe der LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) Proteine (auch als Group 2 oder D-11 bezeichnet) und kommen ausschließlich in photosynthetisch aktiven Organismen vor (96). Sie akkumulieren in Pflanzen unter Stressbedingungen, die zu zellulären Dehydratation führen, wobei ihre genaue Funktion aber bisher noch nicht eindeutig geklärt ist. In *Arabidopsis thaliana* wurden bisher zehn verschiedene Dehydrin-Gene gefunden. Allen Dehydrinen gemein ist deren hoher Grad an intrinsischer Unordnung, weshalb Dehydrine auch als *intrinsically disordered proteins* (IDPs) bezeichnet werden. Im Allgemeinen bestehen Dehydrine aus drei konservierten Aminosäure-Motiven, namentlich die Y-, S- und K-Segmente. Während das Y- als auch das S-Segment nicht zwingend vorkommen müssen, um ein Protein als Dehydrin bezeichnen zu können, ist das K-Segment essentiell, auch wenn Ausnahmen existieren (97). Das K-Segment wird generell durch das konservierte Motiv EKKGIMDKIKELPG mit dem Kernmotiv KIKE beschrieben. Im Gegensatz zum K-Segment ist das Y-Segment variabler aufgebaut. Vor dem hoch konserviertem GNP-Aminosäuretriplett wird typischerweise die Sequenz (V/T)D(E/Q)Y gefunden. Das letzte generelle Motiv, das S-Segment, ist konservierter: Fünf bis sieben aufeinanderfolgenden Serinen folgen häufig einem Duplett aus Ser-Asp. Dieses Motiv, so wird postuliert, dient als Hyperphosphorylierungsstelle und könnte im Protein-*Targeting* eine Rolle spielen. Einige Dehydrine besitzen neben dem K-Segment eine weitere weniger konservierte K-reiche Region, die dem K-Segment und dem nukleären Lokalisierungssignal (NLS) ähnelt. Darüber hinaus ist für diese Regionen eine Chaperon-Aktivität und eine DNA-Bindungseigenschaft vorhergesagt (64, 96, 98). Ein weiteres strukturelles Merkmal einiger Dehydrine ist das Vorhandensein von Histidin-reichen Sequenzen wie H-X₃-H, HH, H_n, deren Beteiligung an der Bindung von Kationen vermutet wird. Für einige Dehydrine konnte der Chaperon-ähnliche Schutz von Enzymen bereits *in vitro* gezeigt werden. Üblicherweise werden diese Proteine entweder immer oder erst nach Auftreten eines Stresses exprimiert. Allerdings konnte bislang über keine Phloemproteomstudie ermittelt werden, ob es Phloem-spezifische Dehydrine gibt und welche Aufgabe sie im Siebelementsystem übernehmen.

1.3 Ziele der Arbeit

Das Phloem ist Teil des Langstrecken-Transport-Systems sessiler Pflanzen und nimmt vermutlich auch bei der Signalweiterleitung in entfernte Organe eine wichtige Rolle ein. So ermöglicht es die Anpassung an verändernde Umweltbedingungen und das Überleben der Pflanze auch unter extremen Bedingungen. Dies ist gerade im Hinblick auf die klimatischen Veränderungen, die für die nächsten Jahrzehnte prognostiziert werden, ein hoch relevantes Thema. So ist es wichtig die Anpassungsmechanismen der Pflanze gerade bei wirtschaftlich bedeutenden Nutzpflanzen (Getreide, Mais und Raps) zu verstehen, um auch zukünftig Ernteeinbußen durch extreme Witterungen (beispielsweise Hitze, Überflutung, Pathogenbefall) vorbeugen zu können. Dafür ist es notwendig die Mechanismen innerhalb des Siebelementsystems zu verstehen.

Da die Erforschung der Rolle des Phloems bei der Stressantwort noch an den Anfängen steht, sollten im Rahmen dieser Arbeit ergänzende Proteomstudien mit Phloemsaft aus Raps durchgeführt werden. Dabei handelt es sich um eine wirtschaftlich relevante Nutzpflanze, die für die Herstellung von Speiseöl und Treibstoff genutzt wird und bietet den Vorteil, dass sie zum einen ein naher Verwandter der gut untersuchten Pflanze *Arabidopsis thaliana* ist und zum anderen die Isolierung großer Mengen nativen Phloemsafts zulässt. Im Gegensatz zu den bisher durchgeführten Proteomstudien mit Phloemexsudaten sollte hier nativer Phloemsaft zum Einsatz kommen, was insbesondere Aufschluss über mögliche Protein-Protein- als auch Protein-Nukleinsäure-Interaktionen im Siebelementsystem gibt. Dazu sollte zunächst ein System etabliert werden um mögliche Komplexe zunächst nativ voneinander zu trennen und anschließend die einzelnen Komponenten identifizieren zu können. Da für Phloem-mobile miRNAs und mRNAs in den letzten Jahren gezeigt werden konnte, dass sie an der pflanzlichen Stressantwort involviert sind, war es außerdem ein Ziel mögliche RNA-Bindeproteine zu identifizieren. So wird vermutet, dass diese als RNA-Chaperon fungieren, also den Transport der RNAs ins Siebelement vermitteln und innerhalb des Phloems die Integrität der RNA erhalten. Außerdem sollten insbesondere Proteine mit möglicher Beteiligung an Stress- und Abwehrreaktionen zunächst identifiziert und funktionell charakterisiert werden.

2 Material & Methoden

2.1 Geräte, Chemikalien, Oligonukleotide, Vektoren, Enzyme & Antikörper

Geräte

-80 °C Kühltruhe	GFL, Burgwedel (D)
-20 °C Gefrierschrank	Liebherr, Biberach (D)
4 °C Kühlschranks	Liebherr, Biberach (D)
ÄKTAprime plus	GE Healthcare, Uppsala (S)
Avegene Geldokumentationsgerät SLite 140S	Pacific Image Electronics, New Taipei City (TWN)
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg (D)
Branson Sonifier 250	Branson Ultrasonics, Eemnes (NL)
Brutschrank Heraeus ^R	Heraeus, Hanau (D)
Chemidoc Touch Gel/Blot-Dokumentationsgerät	BioRad, München (D)
Electrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham Pharmacia, Uppsala (S)
Fastblot 43B semi dry Blot	Biometra, Göttingen (D)
Feinwaage ABJ	Kern & Sohn GmbH, Balingen (D)
FPLC System	Amersham Pharmacia, Uppsala (S)
Gelelektrophoresesystem Owl	Owl Separation Systems Inc., Portsmouth (USA)
Heizblock OriBlock OB-1	Bibby Scientific, Stone (UK)
Hybridisierungsinubator Typ 7601	GFL, Burgwedel (D)
IKAMAG RCT Magnetrührer	IKA, Staufen (D)
Magnetrührer RSM-10HS	Phoenix Instruments, Garbsen (D)
Mini-PROTEAN III	BioRad, München (D)
Monolith NT.115 TM	NanoTemper, München (D)
NanoDrop one ^c UV/Vis Spectrophotometer	NanoDrop products, Wilmington (USA)
PCR Cycler T3000	Biometra, Göttingen (D)
peqTWIST Vortexer	VWR, Darmstadt (D)
Peristaltikpumpe 2232 Microperplex S	Pharmacia LKB, Uppsala (S)
pH-Meter	Mettler-Toledo, Gießen (D)
Schüttler	Infors AG, Bottmingen (CH)
Sorvall RC 6+ Zentrifuge	Thermo Scientific, Darmstadt (D)
Stratalinker UV Crosslinker 2400	Stratagene, San Diego (USA)
The XCell SureLock Mini-Cell	Thermo Scientific, Darmstadt (D)
ThermoShaker TS1	Biometra, Göttingen (D)
Tischzentrifuge Sprout	Biozym, Hessisch Oldendorf (D)
Ultraflex III MALDI-TOF-TOF Massenspektrometer	Bruker, Bremen (D)
Vakuumpumpe Aeromat	KNF, Freiburg (D)
Waage EG	Kern & Sohn GmbH, Balingen (D)
Wasserbad	Julabo, Seelbach (D)
Zentrifuge 5424/5424R	Eppendorf, Hamburg (D)
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg (D)
Zentrifuge 2K15	Sigma, Göttingen (D)

Chemikalien

Sofern nicht gesondert vermerkt, wurden alle Chemikalien von AppliChem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Serva (Heidelberg) sowie Merck (Darmstadt) bezogen.

Oligonukleotide

Die synthetischen Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Planegg/Steinkirchen) und Eurofins MWG Operon (Ebersberg) hergestellt.

Vektoren

pET-28a <i>E.coli</i> Expressionsvektor	Merck Millipore, Darmstadt (D)
pET-30b <i>E.coli</i> Expressionsvektor	Merck Millipore, Darmstadt (D)
pEarleyGate104	Earley <i>et al.</i> , 2006 (99)

Enzyme

Antarctic Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt a. M. (D)
<i>Bam</i> HI HF Restriktionsendonuklease	New England Biolabs, Frankfurt a. M. (D)
Casein Kinase II	New England Biolabs, Frankfurt a. M. (D)
DNase I	AppliChem, Darmstadt (D)
DNase I, RNase-frei	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt (D)
dNTP Mix	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt (D)
Lysozym	AppliChem, Darmstadt (D)
<i>Nco</i> I HF Restriktionsendonuklease	New England Biolabs, Frankfurt a. M. (D)
<i>Nde</i> I Restriktionsendonuklease	New England Biolabs, Frankfurt a. M. (D)
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt (D)
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt (D)
Taq DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt (D)
Thrombin	GE Healthcare, Uppsala (S)
Trypsin, <i>porcine</i> für die Massenspektrometrie	Promega, Mannheim (D)
<i>Xho</i> I HF Restriktionsendonuklease	New England Biolabs, Frankfurt a. M. (D)

Antikörper

α -His Primärantikörper aus Maus	Dianova, Hamburg (D)
α -Maus Sekundärantikörper aus Ziege HRP konjugiert	Dianova, Hamburg (D)
α -Maus Sekundärantikörper aus Ziege AP konjugiert	Dianova, Hamburg (D)
α -Ubiquitin monoklonaler Antikörper (BML-PW8805)	Enzo Life Sciences, Lörrach (D)

2.2 Verbrauchsmaterial

Das Plastikverbrauchsmaterial wie Pipettenspitzen und Petrischalen wurden von der Firma Sarstedt (Nümbrecht (D)) und Reaktionsgefäße von der Firma Eppendorf (Hamburg (D)) bezogen.

Amersham Hybond-N+	GE Healthcare, Uppsala (S)
Blot-Membranen (PVDF/Nitrocellulose)	GE Healthcare, Uppsala (S)
GelRed DNA Stain	Biotium, Hayward (USA)
GeneRuler™ 1 kb plus DNA ladder	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt (D)
HisPur Ni-NTA Zentrifugiersäulen	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt (D)
HisTrap™ High Performance Säule	GE Healthcare, Uppsala (S)

HiTrap™ Heparin HP Säule	GE Healthcare, Uppsala (S)
Kimtech Science Precision Wipes Tissue	Kimberly-Clark Professional, Koblenz-Rheinhafen (D)
Monolith NT.115 Standard treated capillaries	NanoTemper, München (D)
Monolith NT.115 Premium coated capillaries	NanoTemper, München (D)
Monolith Protein Labeling Kit Red-MALEIMIDE	NanoTemper, München (D)
Monolith Protein Labeling Kit Red-NHS	NanoTemper, München (D)
Ni-NTA Agarose	Qiagen, Hilden (D)
PageRuler prestained 10 to 180 kDa	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt (D)
Parafilm M	Brand, Wertheim (D)
PD10 Leersäulen	GE Healthcare, Uppsala (S)
ProtoScript® First Strand cDNA Synthesis Kit	New England Biolabs, Frankfurt a. M. (D)
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt (D)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden (D)
SpectraPor Dialysemembranen	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Sterican® Einmalkanüle G 21 x 1" / ø 0,80 x 25 mm	B. Braun, Melsungen (D)
Pierce Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module Kit	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt (D)
Vivaspin Konzentratoren	Sartorius, Göttingen (D)

2.3 Bioinformatische Analysen

Für die *in silico*-Analysen und Auswertungen wurden folgende Internet-Tools und Programme verwendet:

Clustal Omega	www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/
Eukaryotic Linear Motif (ELM) resource	www.elm.eu.org/
ExPASy <i>Bioinformatics Resource Portal</i>	www.expasy.org/
flexControl Software	Bruker Daltonik, Bremen (D)
GPS	www.gps.biocuckoo.org/online.php
IUPred	www.iupred.enzim.hu/
LocNES NES prediction tool	www.prodata.swmed.edu/LocNES/LocNES.php
MASCOT Server	www.matrixscience.com/
mMass Software	www.mmass.org/
MO.Affinity Analysis Software	NanoTemper, München (D)
NEBcutter V2.0	www.nc2.neb.com/NEBcutter2/
NetPhos 2.0	www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos-2.0/
ProtParam	www.web.expasy.org/protparam/
T-Coffee	www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/
<i>Unicorn Control</i> Software	GE Healthcare, Uppsala (S)
UniProt Protein Datenbank	www.uniprot.org/

2.4 Arbeiten mit Bakterien und Pflanzen

2.4.1 Verwendete Bakterienstämme und Pflanzen

<i>Arabidopsis thaliana</i> Columbiانا 0	MPI (AG Kragler), Golm (D)
<i>Arabidopsis thaliana</i> SALK201485	NASC, Loughborough (UK)
<i>Brassica napus</i> cv. Drakkar	CBGP, Madrid (E)
<i>Nicotiana benthamiana</i>	<i>In house</i>
<i>Escherichia coli</i> BL21-Gold (DE3)	Agilent, Waldbronn (D)
<i>Escherichia coli</i> BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL	Agilent, Waldbronn (D)
<i>Escherichia coli</i> Rosetta-gami 2 (DE3)	Merck Millipore, Darmstadt (D)
<i>Escherichia coli</i> XL10-Gold	Agilent, Waldbronn (D)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404	<i>In house</i>

Tab. 2-1: Genotypen der verwendeten Bakterienstämme.

XL10-Gold	<i>Tet^rΔ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]</i>
BL21-Gold (DE3)	<i>E. coli B F⁻ ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal λ(DE3) endA Hte</i>
BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL	<i>E. coli B F⁻ ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal λ(DE3) endA Hte [argU proL Cam^r] [argU ileY leuW Strep/Spec^r]</i>
Rosetta-gami 2 (DE3)	<i>Δ(ara-leu)7697 ΔlacX74 ΔphoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F'[lac⁺ lacI^q pro] gor522::Tn10 trxB pRARE2 (Cam^R, Str^R, Tet^R)</i>

2.4.2 Anzucht und Herstellung von *E. coli*-Dauerkulturen

Die Anzucht der Bakterien erfolgte über Nacht bei 37 °C entweder in 2x YT-Flüssigmedium (16 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl) oder auf TYE-Agar-Platten (2xYT mit 1,5 % Agar) mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum. Zur Herstellung bakterieller Dauerkulturen wurden 700 µl der Bakteriensuspension mit 300 µl 100 % Glycerol vermischt, direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.4.3 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte in Anlehnung an Inoue *et al.* (100). Dazu wurden zunächst 200 ml LB-Medium mit 5-10 Kolonien inokuliert und über Nacht bei 28 °C unter leichtem Schütteln (150 rpm) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 - 0,8 inkubiert. Nach 10-minütiger Inkubation der Kultur auf Eis wurden die Zellen bei 1200 xg und 4 °C für 10 Minuten geerntet. Das Pellet wurde anschließend in eisgekühltem TB-Puffer vorsichtig resuspendiert, für 10 Minuten auf Eis inkubiert und daraufhin bei 1200 xg und 4 °C für 10 Minuten pelletiert. Im Anschluss wurde das Pellet in 16 ml eisgekühltem TB-Puffer vorsichtig resuspendiert, mit 1,4 ml DMSO versetzt und 200 µl der Bakteriensuspension in gekühlte Reaktionsgefäße überführt. Diese Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

TB-Puffer: 10 mM PIPES-KOH pH 6,7, 250 mM KCl, 15 mM CaCl₂, 5 mM MnCl₂

2.4.4 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Übertragung von Plasmiden in *E. coli* wurden chemisch kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, etwa 100 ng Plasmid zugegeben und auf Eis für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad für 20-30 s und eine 2-minütige Regeneration auf Eis, bevor die Zellen mit 800 µl 2xYT-

Medium versetzt und bei 37 °C für etwa 1 h inkubiert wurden. Danach wurden 200 µl der Bakteriensuspension auf Festmedium mit passendem Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

2.4.5 Herstellung chemisch kompetenter Agrobakterien

Zur Herstellung chemisch kompetenter Agrobakterien wurden diese zunächst in 50 ml LB-Medium bei 28 °C unter leichtem Schütteln (150 rpm) auf eine OD₆₀₀ von 0,6 – 0,8 angezogen. Anschließend wurden die Zellen bei 3000 xg für 10 min bei 4 °C geerntet und das Pellet mit 2 ml einer eisgekühlten CaCl₂-Lösung (20 mM) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.4.6 Transformation chemisch kompetenter Agrobakterien

Für den Transfer von Plasmiden in Agrobakterien wurden die kompetenten Zellen zunächst auf Eis aufgetaut und 0,1-0,5 µg DNA zugegeben, bevor sie in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Darauffolgend wurden die Zellen bei 37 °C im Wasserbad für 5 min inkubiert und im Anschluss an eine 30-minütige Inkubation auf Eis auf zuvor erwärmten LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert. Die Kultivierung der Agrobakterien erfolgte bei 28 °C für zwei Tage.

2.4.7 Anzucht von *A. thaliana*

Die *Arabidopsis thaliana* (Columbiana 0, SALK_201485c) wurden in Töpfen auf einem Erde-Sand-Blähton-Gemisch (65 % : 25 % : 10 %) in der Phytokammer unter Langtagbedingungen (16 h Licht (100 µE), 8 h Dunkelheit), bei 22 °C und einer Luftfeuchte von 70 % kultiviert. Die Pflanzen wurden alle zwei Tage bewässert.

2.4.8 Anzucht von *B. napus*

Die Rapspflanzen (*B. napus* cv. Drakkar) wurden in Töpfen (Ø 18 cm) in einem Erde-Sand-Gemisch (3:1) (Einheitserde, Uetersen) bei 25 °C unter Langtagbedingungen, bei 70 % Luftfeuchte und automatischer Bewässerung im Gewächshaus kultiviert.

2.4.9 Anzucht von *Nicotiana benthamiana*

Die Anzucht der Tabakpflanzen (*N. benthamiana*) erfolgte in Töpfen mit Erde (Einheitserde, Uetersen) bei 25 °C und 70 % Luftfeuchte unter Langtagbedingungen und automatischer Bewässerung im Gewächshaus.

2.4.10 Sammeln von Phloemsaft aus Rapspflanzen

Zum Sammeln von Phloemsaft wurden acht Wochen alte Rapspflanzen mit einer sterilen Kanüle (Ø 0,8 mm) unterhalb der noch nicht blühenden Infloreszenz mehrfach punktiert. Das zunächst austretende Exsudat wurde mit einem Tuch (*Kimtech Science Precision Wipes Tissue*) abgenommen und die anschließenden Tropfen mit einer Pipette in ein Reaktionsgefäß, das in flüssigem Stickstoff gekühlt wurde, gesammelt. Bis zur Verwendung wurde der Phloemsaft bei -80°C gelagert.

2.4.11 Sterilisation und Anzucht von Saatgut

Die Oberflächensterilisation von *A. thaliana* und *B. napus* Samen erfolgte in Anlehnung an Sparrow & Irwin (101). Dazu wurden die Samen zunächst für 2 min mit 70 % (v/v) Ethanol behandelt um die Benetzbarkeit dieser zu erhöhen. Anschließend wurden die Samen mit 7 % Natriumhypochloritlösung und ein paar Tropfen 0,1 % Tween-20 für 15 min oberflächensterilisiert. Nach fünfmaligem Waschen der Samen mit sterilem Wasser wurden die Samen auf Keimungsplatten (1/2 MS-Medium mit 1 % Agar) ausgebracht und zunächst für drei Tage bei 4 °C im Dunkeln stratifiziert, bevor sie in horizontaler Ausrichtung unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit, bei 25 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70 % und einer Belichtungsintensität von 100 µE) kultiviert wurden.

2.4.12 Transiente Expression in *Nicotiana benthamiana* mittels Agroinfiltration

Zur Analyse der Lokalisation des At1g64370-Proteins wurde eine transiente Transformation von Tabakpflanzen (*Nicotiana benthamiana*) durchgeführt. Dazu wurden *A. tumefaciens* LBA4404 mit einem *pEarly Gate 104* Vektor, der den ORF für ein YFP-At1g64370-Fusionskonstrukt enthielt (*pEG104-YFP-At1g64370*, Vektorkarte und Sequenz im Anhang Abb. 7-3 & Abb. 7-4) und dessen Expression über den CaMV-35S-Promotor reguliert wurde, transformiert und über Nacht bei 25 °C unter Schütteln (150 rpm) in LB-Medium mit Kanamycin (50 µg/ml) eine Vorkultur erstellt. Diese wurde anschließend in 50 ml Aktivierungslösung bei 25 °C und 150 rpm über Nacht vermehrt. Nach dem Pelletieren der Agrobakterien (3000 xg, 4 °C, 15 min.) wurde eine Zellsuspension mit Infiltrationslösung hergestellt, diese auf eine OD₆₀₀ von etwa 1 eingestellt und für weitere 2 h bei 25 °C und 150 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden mit der Zellsuspension drei bis vier Wochen alte Tabakpflanzen infiltriert. Nach 48-stündiger Inkubation der

Pflanzen unter Kurztagbedingungen (8 h Licht und 16 h Dunkelheit, Lichtintensität 70 μE) bei 25 °C und einer relativen Luftfeuchte von 70 % wurde die Expression des Fusionskonstruktes mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

Tab. 2-2: Zusammensetzung der Aktivierungs- und Infiltrationslösung.

Aktivierungslösung	Infiltrationslösung
LB-Medium	10 mM MES-KOH pH 5,6
10 mM MES-KOH pH 5,6	10 mM MgCl ₂
10 mM MgCl ₂	150 μM Acetosyringon

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA, PCR-Produkten und RNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*, von PCR-Produkten, DNA aus Agarosegelen und RNA wurden die folgenden Kits nach Angaben des Herstellers verwendet.

GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt (D)
GeneJET™ PCR Purification Kit	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt (D)
GeneJET™ Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt (D)
RNA Clean & Concentrator™ 25 Kit	Zymo Research, Irvine (USA)

2.5.2 Isolierung genomischer DNA aus Pflanzenmaterial

Die Isolierung genomischer DNA aus frischem Pflanzenmaterial erfolgte nach *Lu* (102). Dazu wurden etwa 100 mg Pflanzenmaterial zunächst in flüssigem Stickstoff zermörsert, mit 400 μl Edwards-Extraktionspuffer versetzt und unter Verwendung eines Vortexers bei RT 5 s vermischt. Nach 2-minütiger Zentrifugation bei 12000 x g wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 300 μl Isopropanol hinzugegeben und für 2 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die DNA mittels Zentrifugation (5 min, bei 12000 x g) pelletiert und mit 70 % Ethanol gewaschen. Nachdem das Pellet bei RT getrocknet war, wurde es in 100 μl ddH₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.5.3 RNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial

Zur Isolierung von RNA aus frischem Pflanzengewebe oder Phloemsaft wurde *TRIzol Reagent* (Thermo Fisher Scientific) verwendet, wobei stets nach den Angaben des Herstellers vorgegangen wurde.

2.5.4 Reverse Transkription

Im ersten Schritt erfolgte zunächst die Isolierung von Gesamt-RNA aus Phloemsaft oder gemörsertem Pflanzengewebe (Blatt, Wurzel, Infloreszenzstängel, Blüte) mittels *TRizol Reagent*. Hierzu wurde als Ausgangsmaterial 300 µl Phloemsaft oder 100 mg gemörsertes Pflanzengewebe verwendet. Im Anschluss an die Isolierung wurde die Gesamt-RNA in 50 µl DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt. Zur Entfernung genomischer DNA wurde zunächst ein DNaseI-Verdau durchgeführt, der nach einstündiger Inkubation durch die Zugabe von 1 µl 50 mM EDTA und Inkubation bei 65 °C für 10 min gestoppt wurde. Nach der Aufreinigung der RNA mittels des RNA Clean & Concentrator™ 25 Kits und der Kontrolle der Qualität der RNA mittels UV-Vis-Spektrophotometrie, erfolgte die Herstellung von cDNA mittels des *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kits* (Thermo Fisher Scientific) nach Angaben des Herstellers. Hierfür wurden 5 µg von der Gesamt-RNA als Template verwendet und die Reaktion wie unten dargestellt angesetzt. Der Ansatz wurde für 60 min bei 42 °C inkubiert und die Reaktion schließlich über eine Erhöhung der Temperatur auf 70 °C für 5 min beendet. Die so synthetisierte cDNA wurde anschließend direkt für PCR eingesetzt.

Tab. 2-3: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur cDNA-Synthese.

1-fach Reaktionsansatz zur cDNA-Synthese	
Template RNA (Gesamt-RNA)	5 µg
Oligo(dt) ₁₈ Primer	1 µl
Nuklease-freies Wasser	auf 12 µl auffüllen
<i>Bei GC-reichen oder RNA mit Sekundärstruktur wurde der Ansatz zunächst bei 65°C für 5 min inkubiert und anschließend folgende Komponenten zugegeben:</i>	
5x Reaktionspuffer	4 µl
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl)	1 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
RevertAid M-MuLV RT (200 U/µl)	1 µl
Gesamtvolumen	20 µl

2.5.5 Polymerase-Ketten-Reaktion

Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde eine Polymerase-Ketten-Reaktion durchgeführt. Dabei wurde zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten für die Klonierung in Expressionsvektoren die *Phusion High Fidelity Polymerase* und bei Kolonie-PCR die Taq-DNA-Polymerase verwendet. Dabei wurden die Ansätze und Zyklen gemäß den Herstellerangaben in Abhängigkeit der verwendeten Oligonukleotide und der Produktgröße angepasst.

2.5.6 Site-directed Mutagenese

Zur Erstellung von Mutanten wurde eine *Site-directed* Mutagenese nach den Angaben des Qiagen Quickchange Protokolls durchgeführt. Dabei wurde die *Phusion High Fidelity Polymerase* verwendet und die Ansätze gemäß den Herstellerangaben erstellt. Die dabei verwendeten Primer sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tab. 2-4: Verwendete Oligonukleotide zur Erstellung von Mutanten mittels *Site-directed* Mutagenese.

Mutante	Name	Sequenz	T _m [°C]
At1g64370_ΔC	At1g435stop_for: At1g435stop_rev:	GGCCTTGGAAATGTTTCATTAACAATGGTTAGAAGAAACATAGGAGG CCTCCTATGTTTCTTCTAACCATTGTTAATGAACATTCCAAGGCC	80,7
At1g64370_169A	S165_169A_for: S165_169A_rev:	GATGGGCATGGCGCTGGTAATGAGGCTGGAAGCAGCAGCGG CCGCTGCTGCTTCCAGCCTCATTACCAGCGCCATGCCATC	81,3
At1g64370_177A	S175_177A_for: S175_177A_rev:	GGAAGCAGCAGCGGTGCCGACGCCGACTGACTCGAGC GCTCGAGTCAGTCGGCGTCGGCACCGCTGCTGCTTCC	83,5
At1g64370_177A	S169-177A_for: S169-177A_rev:	GGCGCTGGTAATGAGGCTGGAGCCGCCCGGTGCCGACGCCG CGGCGTCGGCACCGCGCGGCTCCAGCCTCATTACCAGCGCC	83,2

2.5.7 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und PCR-Produkten

Für die Restriktion von Plasmid-DNA oder amplifizierten PCR-Produkten wurden, sofern nicht anders hervorgehoben, Restriktionsendonukleasen der Firmen Thermo Fisher Scientific oder NEB mit den dazugehörigen Puffern nach Vorgaben des Herstellers verwendet.

2.5.8 Auftrennung von Nukleinsäuren mittels Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse von DNA-Isolationen und PCR-Produkten wurde in der Regel eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Dabei wurden in Abhängigkeit der Fragmentgröße 0,8 - 2 %-ige Agarosegele verwendet. Die Proben wurden zunächst mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und die Nukleinsäuren in TAE-Laufpuffer bei 100 V für 45 - 60 min aufgetrennt. Die Visualisierung der Nukleinsäuren erfolgte mittels GelRed auf einem Dokumentationssystem (Avegene Geldokumentationsgerät SLite 140S) und zur Abschätzung der Größe wurde in der Regel der Größenstandard GeneRuler 1kb Plus mit auf das Gel aufgetragen.

Tab. 2-5: Zusammensetzung der verwendeten Puffer.

6x DNA-Ladepuffer	50x TAE-Laufpuffer
30 % (v/v) Glycerol	2 M Tris
0,25 % (w/v) Bromophenol Blau	1 M Essigsäure
0,25 % (w/v) Xylencyanol FF	50 mM EDTA

2.5.9 Northern Blot Assay

Zum Nachweis von ribosomaler RNA in den Phloemkomplexom-Analysen wurde ein Northern Hybridisierungsassay nach Yoo *et al.* (70) durchgeführt. Dazu wurde die zuvor mittels Blue Nativ PAGE aufgetrennte RNA auf eine H-bond Nylon-Membran (Amersham Hybond-N+) transferiert, mittels UV-Licht verknüpft (Stratalinker) und anschließend mittels ULTRAhyb© Ultrasensitive Hybridization Buffer (Ambion®, life technologies, (LT)) für 1 h bei 68 °C prähybridisiert. Im Anschluss wurde die Membran mit 100 nM 3'biotinylierten Oligonukleotiden (Sequenzen in der Tab. 2-6) erneut bei 68 °C inkubiert mit einer

anschließenden Abkühlung auf 37 °C für 12 h, bevor die Membran mit 2x SSC Puffer bei RT für 2 min gewaschen wurde. Die Detektion der RNA erfolgte unter Verwendung des Pierce *Chemiluminescent Nucleic Acid Detection* Module Kit und des ChemiDoc Touch.

2x SSC Puffer: 300 mM NaCl, 30 mM Na₃Citrat pH 7,0

Tab. 2-6: Verwendete Oligonukleotide zur Detektion von ribosomalen RNAs im Phloemsaft von *B. napus*.

rRNA	Größe	Organismus	Accession Nr.	Sequenz (5' to 3')	Zielsequenz
5S	120 bp	<i>B. napus</i>	gi 17866	AAGCACGCTTAACTGCGGAGTTCTGAT	5S rRNA antisense (37...63)
5.8S	164 bp	<i>B. napus</i>	gi 217882:195-358	CGATGGTTCACGGGATTCTGCAATTCA	5.8S rRNA antisense (72...99)
25S	3378 bp	<i>B. napus</i>	gi 217882:546-3923	CCTGATGCGGTTATGAGTACGACCG	25S rRNA antisense (18...42)
18S	1628 bp	<i>B. napus</i>	CCCW010000853	CAAGAAAGAGCTCTCAGTCTGTCAATC	18S rRNA antisense (1218...1247)

2.5.10 *In vitro*-Transkription

Zur Herstellung verschiedener RNA-Spezies wurde eine *in vitro*-Transkription mittels selbst hergestellter T7-RNA-Polymerase aus *E. coli* nach Cazenave & Uhlenbeck (103) durchgeführt. Dazu wurden die Ansätze nach der folgenden Tabelle angesetzt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Zur Entfernung des DNA-*Templates* wurde der Ansatz anschließend für 30 min bei 37 °C mit 10 U RNase-freier DNaseI behandelt und die Reaktion im Anschluss mit 5 µl 500 mM EDTA gestoppt. Zur Entfernung der Proteine wurde darauffolgend die RNA mittels des RNA Clean & Concentrator™ 25 Kits nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und aufkonzentriert. Zur Überprüfung der RNA-Qualität wurde im Anschluss eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt und die Konzentration mittels NanoDrop One^c UV/Vis Spektrophotometers bestimmt. Für eine Lagerung der RNA über einen Zeitraum von über einer Woche, wurde die RNA mit 70 % Ethanol gefällt bevor sie mittels Stickstoffs eingefroren und bei - 80 °C gelagert wurde.

Tab. 2-7: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur Herstellung von RNA.

1-fach Reaktionsansatz (100 µl)	
10 µl	10x Reaktionspuffer (500 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT, 20 mM Spermidin)
10 µl	10x NTP-Mix (je 20 mM, ATP, GTP, UTP, CTP)
5-10 pmol	DNA- <i>Template</i> 1 µg
5 µl	<i>Inorganic Pyrophosphatase</i> (0,1 U/µL), final 0,005 U/µl
2,5 µl	RiboLock RNase-Inhibitor
10 µl	T7 RNA Polymerase (25 U/µL final)
ad 100 µl	DEPC-behandeltes Wasser

2.6 Proteinanalytische Methoden

2.6.1 Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial

Zur Extraktion von Proteinen aus Pflanzenmaterial, beispielsweise Blättern, Samen oder Wurzeln, wurde dieses zunächst mit flüssigem Stickstoff zermörsert und anschließend in einem Verhältnis von 1:5 mit Extraktionspuffer vermischt und nochmals gut mit dem Mörser zerkleinert. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 30000 x g und 4 °C wurde der Überstand filtriert (0,45 µm) und für weitere Analysen genutzt.

Extraktionspuffer: 0,2 M Na₂HPO₄ pH 7,0, 10 % Glycerol, 5 % PEG 6000, 2 mM DTT, Protease-Inhibitor (Complete EDTA-frei, Roche)

2.6.2 Proteinpräzipitation

Zur Proteinpräzipitation wurden die Protein-enthaltenen Proben mit dem 5-fachen Volumen eisgekühltem Fällungsreagenz versetzt und die Proteine über Nacht bei -20 °C gefällt. Anschließend wurde das Präzipitat abzentrifugiert (5000 x g, 4 °C, 20 min), das Pellet zweimal mit Aceton gewaschen und nach Lufttrocknung in der passenden Lösung aufgenommen.

Fällungsreagenz: 90 % Aceton, 10 % Methanol, 10 mM DTT

2.6.3 SDS-PAGE

Zur Auftrennung von Proteinen wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) in diskontinuierlichen Gelsystemen nach *Laemmli* durchgeführt. Dazu wurden die Proben mit 6x SDS-Ladepuffer versetzt, bei 95 °C aufgekocht und anschließend auf das Gel, bestehend aus einem 10, 12 oder 15 %-igen Trenn- und einem 4 %-igen Sammelgel, aufgetragen. Anschließend wurde die Gelelektrophorese in einem BioRad Protean III System bei 150-180 V, 60 mA für 55-60 Minuten mit 1-fach SDS-Laufpuffer durchgeführt. Zur Abschätzung des Molekulargewichts wurde zusätzlich der Proteinstandard (PageRuler™ Prestained Protein *Ladder*) aufgetragen.

Tab. 2-8: Zusammensetzung der verwendeten Puffer der SDS-PAGE.

10x SDS-Laufpuffer	6x SDS-Ladepuffer
30 g/l Tris	60 % Glycerin
144 g/l Glycin	0,6 M DTT
10 g/l SDS	9 % SDS
	0,375 M Tris-HCl pH 6,8
	0,02 % Bromphenolblau

Tab. 2-9: Zusammensetzungen des Trenngels und des Sammelgels nach *Laemmli*.

Trenngel (5 ml)	10 %	12 %	15 %	Sammelgel (4 %)	1 ml
H ₂ O	1,9 ml	1,6 ml	1,1 ml	H ₂ O	0,68 ml
30 % Acryl/Bisacrylamid Mix (37,5:1)	1,7 ml	2,0 ml	2,6 ml	30 % Acryl/Bisacrylamid Mix (37,5:1)	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 % APS	50 µl	50 µl	50 µl	10 % APS	10 µl
TEMED	2 µl	2 µl	2 µl	TEMED	1 µl

2.6.4 Visualisierung von Proteinen

2.6.4.1 Nachweis von Proteinen mittels kolloidaler Coomassie-Brilliant-Blau Färbung

Zur Visualisierung der Proteine in Gelen wurde eine kolloidale Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung nach Dyballa (104) durchgeführt. Dazu wurde das Gel zunächst dreimal für 5 min in ddH₂O gewaschen, danach für mindestens 1 h in der Färbelösung inkubiert und anschließend mit Entfärbelösung behandelt.

Tab. 2-10: Zusammensetzung der verwendeten kolloidalen Coomassie Färbe- und Entfärbelösung.

Kolloidale Coomassie Färbelösung		Entfärbelösung	
0,02 % (w/v)	CBB G-250	10 % (v/v)	Ethanol (abs.)
5 % (w/v)	Aluminiumsulfat(14-18)Hydrat	2 % (v/v)	ortho-Phosphorsäure (85%)
10 % (v/v)	Ethanol (abs.)		
2 % (v/v)	ortho-Phosphorsäure (85%)		

2.6.4.2 Nachweis von Phosphoproteinen mittels ProQ-Diamond Färbung

Zum Nachweis von Phosphoproteinen wurde die ProQ-Diamond Färbelösung (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt (D)) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Die Detektion der Proteine erfolgte auf dem VersaDoc 4000 mp (BioRad, München (D)).

2.6.4.3 Western Blot

Für die Identifizierung von ubiquitinierten Phloemproteinen wurde ein Western Blot durchgeführt. Dabei wurden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine zunächst mittels *Semi Dry*-Verfahrens mit dem Fastblot 43B semi dry Blot-Gerät auf eine PVDF-Membran transferiert. Diese wurde zunächst in Methanol für 15 s aktiviert und anschließend mit dem Transferpuffer äquilibriert. Die Apparatur wurde gemäß den Angaben des Herstellers mit dem Filterpapier, der Membran und dem Gel beladen und der Transfer der Proteine bei einer Stromstärke von 3,5 mA/cm² für 45-60 min durchgeführt. Anschließend wurde die Membran mit 2 % BSA in 1-fach PBS-T für 1 h geblockt, dreimal 5 min mit 1-fach PBS-T gewaschen, bevor

die Membran für 1-2 h mit dem Primär-Antikörper, entweder in 2 % Milchpulver oder 1 % BSA gelöst in 1-fach PBS-T, inkubiert wurde. Nach fünfmaligem Waschen mit 1-fach PBS-T für je 5 min, erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 1 h, der in der Regel mit einer Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert war. Nach weiteren Waschschritten (5x für je 5 min) mit 1-fach PBS-T erfolgte die Detektion der Proteine mittels des SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific) und des ChemiDoc Touch Imaging Systems.

Tab. 2-11: Zusammensetzung der beim Western Blot verwendeten Puffer.

Transferpuffer	PBS-T
25 mM Tris-Base	4 mM KH ₂ PO ₄
192 mM Glycin	16 mM Na ₂ HPO ₄
20 % (v/v) Methanol	115 mM NaCl
	0.05 % Tween-20
	pH 7,4

2.6.5 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Zur Bestimmung der molekularen Masse aufgereinigter oder posttranslational modifizierter Proteine wurde eine MALDI-TOF-MS Analyse im Linearmodus durchgeführt. Für die Identifizierung von Proteinen oder auch posttranslational modifizierter Aminosäuren innerhalb der Proteine wurde die *Peptide Mass Fingerprint* Methode verwendet.

2.6.5.1 Bestimmung der molekularen Masse von Proteinen

Zur Bestimmung der molekularen Massen von aufgereinigten Proteinen und posttranslational modifizierten Proteinen wurden diese im linearen, positiven Modus mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Dazu wurde der Analyt im Verhältnis 1:10 mit 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) verdünnt und zusammen mit einer gesättigten Sinapinsäure (SA)-Matrix auf eine *Polish Steel Target* Platte aufgetragen und luftgetrocknet. Die Proben wurden im linearen Messmodus in einem Messbereich von 10000 und 60000 Da mit einer Laserintensität von 50 % gemessen. Als Proteinstandards zur Kalibrierung dienten Lysozym, BSA und Chymotrypsinogen.

SA-Matrix: Sinapinsäure in 50 % Acetonitril, 0,1 % TFA

2.6.5.2 Identifizierung von Proteinen mittels *Peptide mass fingerprint*

Zur Identifizierung von Proteinen wurde das Verfahren des *Peptide mass fingerprints* verwendet. Dazu wurde mit den Proteinen von Interesse in Anlehnung an Walz *et al.* (50) ein in-Gel-Trypsinverdau durchgeführt. Hierfür wurde die Proteinbande in der Regel aus einem SDS-Gel ausgeschnitten und zunächst in einem 0,5 ml *LowBind* Reaktionsgefäß für 5 min mit 50 mM NH₄CO₃ gewaschen. Anschließend wurde das

Gelstück mit 50 % Acetonitril (ACN) und 50 % 50 mM NH₄CO₃ bei 37 °C entfärbt und dann die Dehydrierung des Gels mit 100 % ACN bei RT für 10 min durchgeführt. Nach dem Verwerfen des ACN und dem Trocknen des Gelstückes erfolgte die Zugabe von 20 µl Trypsinlösung (0,001 µg/µl) und die Rehydrierung des Gelstückes bei RT für 20 min. Damit das Gel vollständig mit der Trypsinlösung bedeckt war, wurden noch 10 - 50 µl 50 mM NH₄CO₃ zugegeben und der Verdau für 1 - 16 h bei 37 °C durchgeführt. Im Anschluss wurde 1 µl der verdauten Probe zusammen mit 1 µl TA30 auf einen *AnchorChip* 600/384 Target aufgetragen, luftgetrocknet und anschließend mit 1 µl der entsprechenden Matrix überschichtet. Neben den Proben wurde das Target außerdem mit 1 µl des Kalibrierungsstandards *Peptide Calibration Standard* (# 206195, Bruker Daltronik) beladen. Die Messung der Peptidfragmente erfolgte am MALDI-TOF/TOF-MS Ultraflex III. Nach der Kalibrierung des Gerätes wurden unter Verwendung des positiven oder negativen Reflektormodus und eines Detektionsbereichs von 600 bis 4000 Da die Spektren aufgenommen. Die Auswertung der Spektren erfolgte im Anschluss mit dem Programm mMass (105). Dazu wurden Protein-spezifische Fragmente annotiert und die erhaltene Signalliste über den MASCOT *Peptide Mass Fingerprint* Server gegen die nichtredundante NCBI Datenbank abgeglichen (106). Dabei wurden folgende Einstellungen festgelegt: Als variable Modifikation wurde die Oxidation des Methionins angegeben. Außerdem wurde eine Peptidtoleranz von 0,3 Da festgelegt, ein *Miscleavage* von 1 erlaubt und die Spezies auf *Viridiplantae* beschränkt. Als erfolgreich identifiziert galten Proteine nur, wenn sie einen signifikanten MASCOT-Score und eine Sequenzabdeckung von mindestens 25 % aufwiesen. Für kleine Proteine (< 20 kDa) mussten außerdem mindestens fünf Peptide eindeutig zugeordnet werden können. Sofern eine eindeutige Identifizierung nicht möglich war, wurde eine Peptidsequenzierung über Fragmentierung mittels MS/MS-Massenspektrometrie durchgeführt.

TA30: 30 % Acetonitril, 70 % H₂O mit 0,1 % TFA

HCCA-Matrix: α-Cyano-4-hydroxymethylsäure in TA30 (gesättigt)

sDHB-Matrix: 10 mg/ml 2,5-Dihydroxybenzoesäure und 2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure (90:10) in TA30

2.6.5.3 Identifizierung von Proteinen mittel *MS/MS Ion Search*

Zur Identifizierung von Proteinen, die über die *peptide mass fingerprint* Methode nicht eindeutig zugeordnet werden konnten, wurden einzelne Peptide mittels MS/MS analysiert. Dazu wurden einzelne Peptide des zuvor erhaltenen Spektrums ausgewählt und zunächst als *Parent Ion* festgelegt. Die anschließende Fragmentierung erfolgte über eine Steigerung der Laserintensität auf 90 %. Die Auswertung der erhaltenen Spektren erfolgte über das Programm mMass. 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 festgelegt und die Spezies auf *Viridiplantae* beschränkt.

2.6.5.4 Bestimmung der Integrität und Größe von RNA

Um die Integrität und Molekulargröße der selbst synthetisierten miRNA zu überprüfen wurde MALDI-TOF-Massenspektrometrie verwendet. Dazu wurde 1 µl des Analyten mit 1 µl einer gesättigten 2,4,6-Trihydroxyacetophenone (THAP)-Matrix vermischt und direkt 1 µl auf ein *GroundSteel* Target aufgetragen. Nach der Trocknung des Analyt-Matrix-Gemisches an der Luft erfolgte die Analyse mittels des Ultraflex III Massenspektrometers im linearen, positiven Modus.

THAP-Matrix: THAP in 50 % Ethanol, 50 % di-Ammoniumhydrogencitrat (15 mg solubilisiert in 1 ml 50 % Acetonitril), 0,1 % Trifluoressigsäure

2.7 Proteomanalysen von Phloemsaft

2.7.1 Aufkonzentrierung von Phloemsaft

Um die Proteine im Phloemsaft aufzukonzentrieren wurden Vivaspin® 500 Centrifugal Konzentratoren (Mwco 10 kDa) verwendet. Damit wurde der Phloemsaft gemäß den Herstellerangaben auf etwa ein Sechstel seines Ausgangsvolumens aufkonzentriert.

2.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration im Phloemsaft mittels Bradford Assay

Die Konzentration von Proteingemischen wurde mittels Bradford Assays bestimmt. Dazu wurde das Protein Assay Kit (BioRad, München (D)) verwendet. Dabei wurde in der Regel ein *Microassay* nach Angaben des Herstellers durchgeführt und die Absorption der Reaktionsansätze mittels des NanoDrop One^c UV/Vis Spektrophotometer detektiert.

2.7.3 Blue Native PAGE

Um die Komplexe des Phloemsafts aufzutrennen wurde als erste Dimension eine Blue Native PAGE in Anlehnung an Fiala *et al.* (107) und Wittig *et al.* (108) durchgeführt. Hierzu wurde der aufkonzentrierte Phloemsaft auf ein NativePAGE Novex 4-16% Bis-Tris Protein Gel (Invitrogen, USA) aufgetragen. Zunächst wurde die Elektrophorese bei 150 V und 4 °C mit Kathodenpuffer B und Anodenpuffer im The XCell SureLock Mini-Cell System durchgeführt. Nachdem die Probe etwa ein Drittel des Gels durchlaufen hatte, wurde der Kathodenpuffer B gegen Kathodenpuffer B/10 ausgetauscht und die Elektrophorese bei 150 V für weitere 2-3 Stunden durchgeführt. Die im Gel sichtbaren Banden der Komplexe wurden anschließend ausgestochen und für anschließende Analysen eingesetzt.

Tab. 2-12: Zusammensetzung der bei der Blue Nativ PAGE verwendeten Laufpuffer.

Kathodenpuffer B	Kathodenpuffer B/10	Anodenpuffer
15 mM Bis-Tris pH 7,0	15 mM Bis-Tris pH 7,0	50 mM Bis-Tris pH 7,0
50 mM Tricin	50 mM Tricin	
0,02 % Coomassie Blue G250	0,002 % Coomassie Blue G250	

2.7.4 Tris-Tricin-Urea PAGE

Für die Tris-Tricin-Urea PAGE wurden die ausgeschnittenen Banden zunächst in 2x SDS-Ladepuffer nach *Laemmli* überführt, 10 Minuten inkubiert, kurz erwärmt und anschließend nochmals für 15 Minuten bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Gelstücke in die Taschen des 10 %-igen Tris-Tricin-Urea Gels, das nach Schägger (109) vorbereitet wurde, überführt und die Elektrophorese in einem Mini-PROTEAN® III System für etwa 50 Minuten bei 150 V durchgeführt. Darauffolgend wurden die Gelstreifen von Interesse ausgeschnitten und für die dritte Dimension verwendet. Dazu wurde der Gelstreifen zunächst in azidem Puffer (100 mM Tris, 150 mM HCl) für etwa 10-20 Minuten inkubiert und anschließend in 125 mM Tris pH 6,8 äquilibriert, bevor er auf ein 12 %-iges SDS-Gel überführt wurde.

Tab. 2-13: Verwendete Puffer für die Tris-Tricin-Urea PAGE.

	3x Gelpuffer	10x Anodenpuffer	10x Kathodenpuffer
Tris	3 M	1 M	1 M
Tricin	-	-	1 M
HCl	1 M	0,225 M	-
SDS	0,3 %	-	1 %
pH	8,45	8,9	8,25

Tab. 2-14: Zusammensetzung des Tris-Tricin-Urea Gels.

	Trenngel 10 % (10 ml)	Sammelgel 6 ml
3x Gelpuffer	3,34 ml	1,5 ml
6 M Urea	6,36 g	2,16 g
30 % Acryl-/Bisacrylamid Mix (29:1)	3,34 ml	0,8 ml
70 % Glycerol	1,4 ml	
10 % APS	40 µl	45 µl
TEMED	4 µl	4,5 µl
ddH ₂ O	auf 10 ml auffüllen	auf 6 ml auffüllen

2.7.5 Heparin-Affinitätschromatographie

Zur partiellen Aufreinigung von Phloemsaft wurde eine Heparin-Affinitätschromatographie durchgeführt. Dazu wurden etwa 1,5 ml Phloemsaft mit Puffer A im Verhältnis 1:5 verdünnt, abzentrifugiert (20000 x g, 4 °C, 30 min) und anschließend mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min auf eine 1 ml-Heparin-Säule

geladen. Im Anschluss an einen Waschschriff mit Puffer A (15 ml) wurden die Proteine über einen NaCl-Gradienten (100 % Puffer B über 15 ml) eluiert. Nach einer Fällung der Protein-enhaltenen Fraktionen wurde eine SDS-PAGE zur Analyse der Aufreinigung durchgeführt.

Puffer A: 10 mM NaH₂PO₄ pH 7,0

Puffer B: 10 mM NaH₂PO₄ pH 7,0, 2 M NaCl

2.8 Herstellung und Aufreinigung von rekombinanten At1g64370-Proteinen

2.8.1 Verwendung des pET-basierten *E. coli*-Expressionssystems

Die Herstellung der rekombinanten Proteine erfolgte mittels des pET-basierten Expressionssystems in *E. coli*. Dazu wurde der offene Leserahmen des Proteins aus *A. thaliana* und *B. napus* in den pET30b und pET28a übertragen. Beide Konstrukte enthielten einen N-terminalen 6-fach Histidin-Tag, der über einen Thrombinverdau vom Protein entfernt werden konnte (Vektorkarten und Sequenzen im Anhang Abb. 7-1 & Abb. 7-2).

2.8.2 Herstellung des rekombinanten Proteins in *E. coli* mittels Autoinduktion

Die Herstellung der rekombinanten At1g64370-Proteine erfolgte in *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL Zellen unter Verwendung von Autoinduktionsmedium. Dazu wurde ausgehend von einer Kolonie zunächst eine Übernachtskultur auf LB-Festmedium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum (Kanamycin) angefertigt. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht, wurden die Kolonien mittels 1 ml ZY-Medium abgeschwemmt und mit 400 µl der Bakteriensuspension 400 ml des Autoinduktionsmediums auf eine OD₆₀₀ von etwa 0,05 angeimpft. Nach der Kultivierung bei 37 °C für 1 h unter Schütteln (170 rpm) erfolgte eine Inkubation bei 25 °C und 170 rpm für etwa 20 Stunden. Am nächsten Tag wurden die Zellen mittels Zentrifugation (7500 x g, 4 °C, 30 min) geerntet und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Tab. 2-15: Verwendete Medien und Lösungen zur Herstellung des Autoinduktionsmediums.

ZY-Medium	20x NPS	50x 5052	Autoinduktionsmedium
10 g/l Trypton/Pepton	0,5 M (NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 % Glycerol	370 ml ZY-Medium
5 g/l Hefeextrakt	1 M KH ₂ PO ₄	0,05 % Glukose	20 ml 20x NPS
	1 M Na ₂ HPO ₄	0,2 % α-Laktose	8 ml 50x 5052
			400 µl 1 M MgSO ₄
			400 µl Kanamycin

2.8.3 Zellaufschluss

Zur Aufreinigung der rekombinanten Proteine aus *E. coli* wurde das Zellpellet aus 400 ml Expressionskultur zunächst auf Eis aufgetaut und anschließend in Lysispuffer resuspendiert. Daraufhin wurde die Suspension in ein Becherglas überführt und unter Rühren bei 4 °C für 1 h inkubiert. Danach erfolgte zusätzlich ein

physikalischer Zellaufschluss mittels Sonifizierer, wobei die Suspension in ein Becherglas überführt wurde und auf Eis acht-mal für 30 s (50 % *duty cycle*, *energy output* 5) behandelt wurde. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 36000 x g und 4 °C wurde der Überstand filtriert und für die weitere Aufreinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie verwendet.

Lyse-Puffer: 50 mM Tris-HCl pH 7,5 (@ 4 °C), 300 mM NaCl, 30 mM Imidazol, 5 u DNaseI, 1 mM MgCl₂, 100 µg/ml Lysozym, Protease-Inhibitor (Complete EDTA-frei, Roche)

2.8.4 Nickel-Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung der His-getaggten At1g64370-Proteine erfolgte mittels *Immobilised metal affinity chromatography* (IMAC) an Nickelionen. Dazu wurde das filtrierte Lysat auf eine zuvor mit Lysis-Puffer äquilibrierte HisTrap-Säule (5 ml) geladen. Anschließend wurde die Säule mit dem fünf-fachen Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen, bevor die Proteine über einen Imidazolgradienten (von 30 mM auf 1 M Imidazol) mit dem Elutionspuffer bei einer Flussgeschwindigkeit von 2 ml/min eluiert wurden. Dabei wurden 2 ml-Fractionen gesammelt, die im Anschluss mittels SDS-PAGE auf ihren Proteingehalt geprüft wurden.

Tab. 2-16: Zusammensetzung der im Rahmen der Nickelaffinitätschromatographie verwendeten Puffer.

Lysispuffer	Waschpuffer	Elutionspuffer
50 mM Tris-HCl pH 7,5 (@ 4 °C)	50 mM Tris-HCl pH 7,5 (@ 4 °C)	50 mM Tris-HCl pH 7,5 (@ 4 °C)
300 mM NaCl	1 M NaCl	300 mM NaCl
30 mM Imidazol	30 mM Imidazol	1 M Imidazol

2.8.5 Entsalzung mittels Dialyse und Thrombinverdau

Zur Entfernung des His-Tags wurden die At1g64370-enthaltenen Fraktionen (etwa 16 ml) vereint und zusammen mit 20 u Thrombin in eine Dialysemembran (Mwco 12-14 kDa) überführt. Die Dialyse erfolgte anschließend über Nacht bei 4 °C unter ständigem Rühren gegen 2 l Dialysepuffer.

Dialysepuffer: 50 mM Tris-HCl pH 7,5 (@ 4 °C), 250 mM NaCl

2.8.6 Größenausschlusschromatographie

Zur Entfernung noch vorhandener Kontaminationen wurde als finaler Aufreinigungsschritt eine Größenausschlusschromatographie (*Size exclusion chromatography*, SEC) durchgeführt. Dazu wurde die Probe zunächst mittels Vivaspin Zentrifugalkonzentratoren (Mwco 10 kDa) auf ein Volumen von 2 ml aufkonzentriert und anschließend auf die äquilibrierte Superdex-Säule (HiLoad Superdex 16/60, 75 µg) geladen. Die Proteine wurden der Größe nach über 150 ml SEC-Puffer über die ÄktaPrime mit einer

Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min von der Säule eluiert und wiederum in 2 ml-Fractionen aufgefangen. Nach der Bestimmung der Protein-enthaltenen Fractionen mittels SDS-PAGE wurden diese vereint und wiederum über die Zentrifugalkonzentratoren aufkonzentriert, die Konzentration bestimmt und das Protein in Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

SEC-Puffer: 25 mM Tris-HCl pH 7,5 (@ 4 °C), 250 mM NaCl

2.8.7 Konzentrationsbestimmung und Lagerung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von aufgereinigtem Protein erfolgte am NanoDrop One^c UV/Vis Spektrophotometer. Dazu wurde die Absorption der Probe bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen und die Proteinkonzentration anschließend unter Verwendung der unten dargestellten Parameter über das *Lambert-Beersche* Gesetz bestimmt.

At1g64370	MW [Da]	Extinktionskoeffizient [M⁻¹ cm⁻¹]
<i>A. thaliana</i>	19697.06	14900
<i>B. napus</i>	16697.00	10430

2.9 Proteincharakterisierung

2.9.1 *Cell viability Assay* mit *E. coli*-Zellen

Um zu überprüfen, ob das Protein eine protektive Wirkung auf Zellen unter verschiedenen Stressbedingungen hat, wurde ein *Cell viability Assay* in *E. coli* durchgeführt. Dazu wurden zunächst Übernachtskulturen der *E. coli*-Stämme, die den pET30b entweder mit oder ohne den *ORF* des At1g64370 enthielten, auf LB-Agarplatten mit Kanamycin bei 37 °C über Nacht erstellt. Am nächsten Tag wurden fünf Kolonien dieser Platte in je 50 ml LB-Medium mit Kanamycin überführt und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert. Daraufhin wurde die Herstellung des Proteins über die Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG, Endkonzentration 1 mM) induziert. Nach 3-stündiger Inkubation wurden beide Kulturen auf eine OD₆₀₀ von 1 verdünnt und anschließend 5 µl der verschiedenen Verdünnungsstufen (1:10, 1:20, 1:50, 1:100) auf der Kontrollplatte oder den unterschiedlichen Stressbedingungen (650 µM NaCl, 350 µM NiSO₄, 2,7 mM H₂O₂) ausplattiert. Im Fall des Hitze- und Froststresses wurden die Kulturen im Anschluss für eine Stunde bei 50 °C weiter inkubiert beziehungsweise mit drei Gefrier- und Tauzyklen (-20 °C/4 °C) behandelt. Anschließend wurden wiederum 5 µl der verdünnten Kulturen auf eine Agarplatte ausgebracht. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht wurde die Dichte der Kolonien dokumentiert.

LB-Medium: 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl

2.9.2 *In vitro*-Phosphorylierung des rekombinanten At1g64370-Proteins mittels Casein Kinase II aus Hefe

Zur *in vitro*-Phosphorylierung des At1g64370-Proteins wurde die Casein Kinase II aus Hefe (NEB, Frankfurt am Main (D)) verwendet. Die Phosphorylierungsreaktion wurde in einem Volumen von 50 µl durchgeführt und dazu wurden 20 µM des rekombinanten Proteins mit 0,2 mM ATP und 100 U CKII in dem CKII-Reaktionspuffer bei 30 °C für 2 h inkubiert.

2.9.3 Phosphorylierung des rekombinanten At1g64370-Proteins mit nativem Phloemsaft

Zur Phosphorylierung des rekombinant hergestellten Proteins wurde außerdem nativer Phloemsaft aus Raps verwendet. Dazu wurden 20 µM des rekombinanten Proteins aus *A. thaliana* und *B. napus* mit 30 µl Phloemsaft bei 30 °C für 2 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben entweder direkt massenspektrometrisch analysiert oder zunächst mittels SDS-PAGE separiert.

2.9.4 Identifizierung von posttranslationalen Modifizierungen mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Zur Identifizierung der Anzahl an modifizierten Stellen im Protein nach der CKII- oder Phloemsaft-Behandlung wurde zum einen die Zunahme der molekularen Masse mittels MALDI-TOF-MS-Analyse im Linearmodus wie unter 2.6.5.1 beschrieben durchgeführt.

Zur Bestimmung der posttranslational modifizierten Aminosäuren innerhalb des Proteins wurde das native oder mit CKII-behandelte Protein mit Trypsin verdaut und ein *Peptide mass fingerprint*, gemäß 2.6.5.2 durchgeführt. Als Kontrolle fungierte unbehandeltes, rekombinantes Protein und bei der Auswertung mit mMass wurden Unterschiede in den Spektren der unterschiedlichen Proben herausgearbeitet. Dabei wurden die in der Tab. 2-17 dargestellten modifizierungsbedingten Massenunterschiede berücksichtigt.

Tab. 2-17: Übersicht über modifizierungsbedingten Massenunterschiede.

Durchschnittliche Massenveränderung	Modifizierung
14 Da	Methylierung (N-Terminus, N-Epsilon von Lysin, O von Serin, Threonin oder C-Terminus, N von Asparagin)
42 Da	Acetylierung (N-Terminus, N-Epsilon von Lysin, O von Serin)
80 Da	Phosphorylierung (O von Serin, Threonin, Tyrosin and Aspartat, N-Epsilon von Lysin)

2.9.5 Identifizierung von Interaktionspartnern

Zur Identifizierung möglicher Interaktionspartner wurden Versuche sowohl mit Nukleinsäuren, Proteinen als auch verschiedenen Ionen durchgeführt.

2.9.5.1 Untersuchung von Oligonukleotid-At1g64370-Interaktionen mittels Zonen-Interferenz Gelelektrophorese

Aufgrund des hohen pIs des untersuchten Proteins wurde für die Interaktionsstudien mit Nukleinsäuren eine besondere Form des *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA) durchgeführt – die Zonen-Interferenz Gelelektrophorese (ZIGE). Dazu wurden in einem 1 %-igen Agarosegel, versetzt mit GelRed (1:10000), zunächst 36 µM des untersuchten Proteins versetzt mit 6x ZIGE-Ladepuffer (50 % DMSO mit einer Spur Bromphenol Blau) aufgetragen und die Elektrophorese in TAE-Puffer (pH 8,0 @ 4 °C) bei 4 °C durchgeführt. Dabei wurden die positiv geladenen Proteine zunächst für 90 min in Richtung Kathode beschleunigt. Daraufhin wurde der Lauf pausiert und die Nukleinsäure-Probe, ebenfalls versetzt mit 6x ZIGE-Ladepuffer, in verschiedenen Konzentrationen aufgetragen. Anschließend wurde die Polarisation geändert und die Elektrophorese für 45 min durchgeführt. Nach der Detektion der Nukleinsäuren mittels UV-Licht, wurden die Proteine im Gel mittels kolloidaler Coomassie-Färbelösung visualisiert.

2.9.5.2 Identifizierung von At1g64370-RNA-Interaktionsstellen mittels *UV-Crosslinking*

Um mögliche Interaktionsstellen zwischen dem At1g64370 und RNA genauer identifizieren zu können, wurde ein *UV-Crosslinking* durchgeführt. Dafür wurden 10 µM des Proteins mit 5-10 µM der selbst synthetisierten miR164 in Bindepuffer (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 250 mM NaCl) zusammengegeben, in eine Mikrotiterplatte überführt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte auf Eis in den UV-Stratalinker überführt und die UV-Verknüpfung dreimal für 3 min durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine mittels SDS-PAGE separiert, differentielle Banden in-Gel trypsinisiert und über MALDI-TOF-MS genauer analysiert.

2.9.5.3 Identifizierung stabiler Protein-Protein Interaktionen mittels *Pull down Assay*

Um stabile Interaktionen zwischen Proteinen zu identifizieren, wurden *Pull down Assays* mit Pflanzenextrakt und Phloemsaft durchgeführt. Hierfür wurden HisPur Ni-NTA Zentrifugiersäulen mit 20 µl Säulenmaterial verwendet, das zuvor nach Herstellerangaben mit Waschpuffer gewaschen und äquilibriert wurde. Im Anschluss wurden die *Beads* mit 100 µg aufgereinigtem, Histidin-getagtem Protein für 1 h bei 4 °C behandelt und danach ungebundenes Protein über fünf Waschschrte mit je 300 µl des Waschpuffers entfernt. Nach einer einstündigen Inkubation des immobilisierten Proteins mit 300 µl Pflanzenextrakt oder

Phloemsaft wurden unspezifisch gebundene Proteine wiederum über fünf Waschschrte mit Waschpuffer entfernt. Anschließend erfolgte die Elution der Proteine mit 40 μ l des Elutionspuffers. Um unspezifische Interaktionen der Proteine mit dem Säulenmaterial ausschließen zu können, wurde parallel eine Säule nur mit Pflanzenextrakt oder Phloemsaft behandelt. Die eluierten Proben wurden im Anschluss mittels SDS-PAGE voneinander separiert und differenzielle Banden massenspektrometrisch analysiert.

Tab. 2-18: Zusammensetzung der *Pull down Assay* Puffer.

Waschpuffer	Elutionspuffer
50 mM Tris-HCl pH 7,5	50 mM Tris-HCl pH 7,5
250 mM NaCl	250 mM NaCl
20 mM Imidazol	1 M Imidazol

2.9.5.4 Identifizierung transienter Interaktionen mittels chemischer *Crosslinker*

Zur Identifizierung schwacher Protein-Protein-Interaktionen wurde ein chemisches *Crosslinking* durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen chemischen Vorgang, bei dem zwei oder mehr Moleküle kovalent miteinander verbunden werden. Hierfür stehen unterschiedliche *Crosslinking*-Reagenzien zur Verfügung, die spezifische funktionelle Gruppen aufweisen, über die sie mit bestimmten Aminosäuren reagieren. Hierzu zählen primäre Amine (Lysin), Sulfhydrylgruppen (Cystein) oder auch Carboxylgruppen (Glutamat, Aspartat, C-Terminus). Hinsichtlich ihrer Reaktivität werden homobifunktionale und heterobifunktionale *Crosslinker* unterschieden, die außerdem noch unterschiedliche Eigenschaften bezüglich ihrer *Spacer*-Armlänge und Schnittstelle aufweisen. Im Rahmen der Arbeit wurden die zwei in der Tabelle dargestellten *Crosslinker* verwendet.

Tab. 2-19: Verwendete *Crosslinker* und ihre Eigenschaften.

Name	Reaktive Gruppen	Spacerarmlänge	Eigenschaften
EDC	Carboxyl-Amin	0 Å	Irreversibel
Lomant's Reagenz (DSP)	Amin-Amin	12 Å	Reversibel: reduzierbare Disulfidbrücke innerhalb des Spacer-Arms

Für die Reaktion wurde rekombinantes, aufgereinigtes Protein zunächst umgepuffert (50 mM HEPES-KOH pH 7,5, 250 mM NaCl). Anschließend wurden 30 μ M des Proteins mit Pflanzenextrakt oder Phloemsaft behandelt, die entsprechenden *Crosslinking* Substanzen in einem 30-fach molaren Überschuss zugegeben und der Ansatz für 1 h bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend über die Zugabe von Tris-HCl pH 7,5 (Endkonzentration 50 mM) und 20-minütiger Inkubation gestoppt. Darauffolgend wurden die verknüpften Proben mittels SDS-PAGE separiert und differenzielle Signale im Gel mittels Massenspektrometrie analysiert. Als Negativkontrolle fungierte Pflanzenextrakt oder Phloemsaft ohne Zugabe des rekombinanten Proteins.

2.9.5.5 Identifizierung transienter Protein-Protein Interaktionen mittels *FarWestern Blot*

Zur Identifizierung transienter Protein-Protein-Interaktionen wurden *FarWestern Blots* nach Wu *et al.* (110) in Kombination mit chemischen *Crosslinkern* verwendet. Dazu wurden die Proteine aus Phloemsaft oder auch Pflanzenextrakt zunächst in einer Dimension (SDS-PAGE) oder zwei Dimensionen (Tris-Tricin-Urea PAGE/SDS-PAGE) aufgetrennt. Dabei wurden zwei parallele Gele angefertigt. Während ein Gel direkt mit kolloidaler Coomassie Färbelösung behandelt wurde, wurden die Proteine aus dem zweiten Gel anschließend mittels *Semi Dry*-Verfahrens auf eine PVDF-Membran bei 4 °C für 45-60 min nach Angaben des Herstellers transferiert. Im Anschluss wurden die übertragenen Proteine auf der Membran über die Verwendung von Puffern mit unterschiedlichen Guanidiniumchloridkonzentrationen (Tab. 2-20) de- und renaturiert. Nach dem Blockieren der freien Bindestellen mit einer BSA-Lösung (5 % Milchpulver in PBS-T) für 1 h bei RT wurde die Membran nach einem Waschschrift mit PBS-T mit dem rekombinanten Histidin-getaggten Protein in einer Konzentration von 5 µg/ml in SEC-Puffer (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 250 mM NaCl) für 2 h bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für je 10 min, wurde das *Crosslinking* Reagenz EDC (3 mM in PBS) zugegeben, die Vernetzungsreaktion für 30 min bei RT durchgeführt und anschließend über die Zugabe von 100 mM Tris-HCl pH 7,5 und einer Inkubation von 20 min gestoppt. Nach dem Waschen der Membran für 10 min mit PBS-T wurde der primäre Antikörper (anti-His Maus-Antikörper in 2 % Milchpulver (1:10000 verdünnt)) auf die Membran gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Nach sechsmaligen Waschen für je 5 min mit PBS-T erfolgte die Zugabe des sekundären Antikörpers (anti-Maus Ziege-HRP in 2 % Milchpulver in PBS-T) und eine erneute Inkubation für 1 h bei RT. Nach der Entfernung des ungebundenen Antikörpers über sechs Waschschriffe mit PBS für 5 min, erfolgte der Nachweis der Proteine über die Detektion der Chemilumineszenz mittels SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate nach Angaben des Herstellers am ChemiDoc *Touch*.

Tab. 2-20: Zusammensetzung der beim *FarWestern Blot* verwendeten De- und Renaturierungspuffer.

	Guanidiniumchloridkonzentration				
	6 M	3 M	1 M	0,1 M	0 M
Glycerin (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
5 M NaCl (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
1 M Tris-HCl pH 7,5 (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
0,5 M EDTA (ml)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
10 % Tween-20 (ml)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
8 M Guanidiniumchlorid (ml)	18,75	9,3	3,13	0,31	0
Milchpulver (g)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
1 M DTT (µl)	25	25	25	25	25
ddH ₂ O	2,45	12,82	18,07	20,89	21,2
Gesamtvolumen	25	25	25	25	25
Zeit/Temperatur	30 min/RT	30 min/RT	30 min/RT	30 min/ 4°C	Ü.N./ 4 °C

2.9.5.6 Identifizierung ionischer Interaktionen mittels IMAC

Die Interaktion des At1g64370-Proteins mit Metallionen wurde mittels *Immobilised metal ion affinity chromatography* (IMAC) analysiert. Dazu wurden 30 µl NTA-*Beads* über die Behandlung mit 15 µl 100 mM MgCl₂, ZnCl₂, NiCl₂, CdCl₂, FeCl₃, CaCl₂, CuCl₂ oder CoCl₂ mit den entsprechenden Ionen beladen. Nach der Entfernung überschüssiger Metallionen durch Waschen mit 300 µl ddH₂O wurde die Säule mit Puffer A (50 mM Tris pH 7,5 @ RT, 1 M NaCl) äquilibriert. Anschließend wurden 20 µM des At1g64370-Proteins in Puffer A auf die *Beads* gegeben, für 5 min bei RT inkubiert und der Durchfluss für die anschließende SDS-PAGE aufgefangen. Nach fünf Waschschritten mit Puffer A, wobei der letzte Schritt für die SDS-PAGE aufgefangen wurde, erfolgte die Elution mit Puffer B (50 mM Tris pH 7,5, 50 mM EDTA). Anschließend wurden 10 µl der Proben für eine SDS-PAGE verwendet, wobei Ni-NTA-*Beads* ohne Metallionen als Kontrolle fungierten.

2.9.5.7 Identifizierung möglicher Interaktionsstellen mittels struktureller *Proteomics*

Zur Identifizierung möglicher Interaktionsstellen des Proteins mit Ionen wurde eine Modifizierung mit Diethylcarbonat (DEPC) durchgeführt, welches in erster Linie Histidine und Lysine durch eine Carboxylierung modifiziert. Während die Modifizierung an Histidinen über die Zugabe nukleophiler Substanzen wie Hydroxylamin (HA) reversibel ist, sind die Lysinmodifizierungen irreversibel. Dazu wurde zunächst ein 400 mM DEPC-Stock in 100 % Acetonitril angesetzt. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 100 µl durchgeführt, wobei 50 µM Protein und 400 µM DEPC eingesetzt wurden. Nach einer maximalen Inkubation von 5 min bei RT, wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 mM Tris-HCl pH 7,5 gestoppt. Zur Entfernung der Carboxylierung an den Histidinen wurde im Anschluss an die DEPC-Behandlung HA in einer finalen Konzentration von 100 mM zugegeben. Während ein Teil der behandelten Proben für die massenspektrometrische Analyse gefällt wurde, wurden mit der restlichen Probe IMAC-Versuche durchgeführt.

2.9.5.8 Trypsin-Sensitivitätsassay

Um zu überprüfen, ob sich durch Zugabe von Ionen die Zugänglichkeit von Trypsin zum untersuchten Protein ändert wurde ein Trypsin-Sensitivitätsassay nach Mu *et al.* (111) durchgeführt. Dabei wurden 25 µg des Proteins in einem Puffer (10 mM HEPES-KOH pH 7,5, 100 mM NaCl) mit und ohne 1 mM CuCl₂ mit 200 ng Trypsin über 30 min verdaut. Dabei wurden zum Zeitpunkt 0 sowie alle 10 min je 10 µl vom Reaktionsansatz abgenommen, direkt mit 2 µl 6-fach SDS-Ladepuffer versetzt und bei 95 °C für 5 min aufgeköcht. Zur Kontrolle des Verdaus wurde anschließend eine SDS-PAGE durchgeführt.

2.9.5.9 Quantifizierung von At1g64370-Interaktionen mittels *MicroScale Thermophoresis*

Zur Quantifizierung der Interaktionen des At1g64370-Proteins mit Nukleinsäuren und Ionen wurden MST-Messungen durchgeführt. Dafür wurden 20 μM des aufgereinigten Proteins über das Monolith NT™ Protein Labeling Kit NT 647 nach Angaben des Herstellers mit einem Fluoreszenzfarbstoff, der entweder kovalent an freien Aminogruppen (N-terminale Aminogruppe oder die freie Aminogruppe an der ϵ -Stelle der Seitenkette des Lysins) oder an freie Cysteingruppen bindet, markiert. Nach der Entfernung des freien Farbstoffs und der Berechnung des Verhältnisses von Protein zu Farbstoff (NT-647-NHS; $A = 650 \text{ nm}$, $\epsilon = 250.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) wurde das Protein für die Messungen verwendet. Zur Bestimmung der geeigneten Kapillare und des geeigneten Puffers wurde vor der Messung ein Kapillarscan durchgeführt. Die anschließenden Messungen erfolgten in *Premium Coated* Kapillaren mit dem Puffer (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 0,1 mg/ml BSA, 0,01% Tween-20). Die MST-Messungen wurden mit dem Monolith NT.115 durchgeführt.

3 Ergebnisse & Diskussion

3.1 Analyse des Phloem-Proteoms von *Brassica napus*

Das Langstreckentransportsystem höherer Landpflanzen gliedert sich in das Xylem und das Phloem. Letzteres wird gebildet aus einem Siebelementsystem – bestehend aus kernbildenden Geleitzellen und den kernlosen Siebelementen. Während das Xylem für die Verteilung von Wasser und Nährstoffen von der Wurzel zu den oberirdischen Pflanzenorganen zuständig ist, versorgt das Phloem sich entwickelnde Organe (*sink*) mit Makromolekülen wie Zucker oder Aminosäuren, die in photosynthetisch aktiven Geweben (*source*) hergestellt werden. Neben diesen Bestandteilen wurden außerdem Proteine, aber auch verschiedene RNA-Spezies, wie mRNA, tRNA, kleine RNA-Moleküle als auch virale Nukleinsäuren im Strom des Phloems nachgewiesen, so dass vermutet werden kann, dass das Siebelementsystem als Transportsystem zur Verteilung von Signalen über lange Strecken (*long distance transport*) fungiert (112). Über verschiedene Proteomanalysen konnten bereits eine Vielzahl von Proteinen im Phloem in verschiedenen Pflanzenspezies identifiziert werden (Tab. 3-1).

Tab. 3-1: Bisherige Analysen des Phloemproteoms in verschiedenen Pflanzenspezies. Über verschiedene proteomische Ansätze konnten im Phloem verschiedener Organismen eine unterschiedliche Anzahl an Proteinen identifiziert werden.

Organismus	Proteomischer Ansatz	Anzahl identifizierter Proteine	
Kürbis (<i>Cucurbita maxima</i>)	2D-E, MALDI-MS	17	Haebel & Kehr, 2001 (46)
	IEX-Chromatographie, Co-IP, LC-MS/MS	1209	Lin <i>et al.</i> , 2008 (47)
Wunderbaum (<i>Ricinus communis</i>)	2D-E, Q-TOF	18	Barnes <i>et al.</i> , 2004 (48)
Raps (<i>Brassica napus</i>)	1D-E, 2D-E, MALDI-TOF-MS/MS	140	Giavalisco <i>et al.</i> , 2006 (11)
Gurke (<i>Cucumis sativus</i>)	1D-E, 2D-E, MALDI-TOF-MS/MS	45	Walz <i>et al.</i> , 2004 (50)
Reis (<i>Oryza sativa</i>)	1D-E, reversed phase nano LC-MS	118	Aki <i>et al.</i> , 2008 (49)
Brokkoli (<i>Brassica oleracea</i>)	LC-MS-MS	377	Anstead <i>et al.</i> , 2013 (51)
Weißer Lupine (<i>Lupinus albus</i>)	2D-E, MALDI-MS	86	Rodriguez-Medina <i>et al.</i> , 2011 (52)

Alle bisher durchgeführten Analysen zur Charakterisierung des Phloemproteoms verdeutlichen, dass drei Faktoren für die Qualität der Analyse ausschlaggebend sind: Dies sind zum einen die Menge und Komplexität und zum anderen die dynamische Veränderung der Phloemprobe (47). Über einen Vergleich aller bisher durchgeführten Studien zur Proteinzusammensetzung des Phloems wird deutlich, dass das Phloemproteom konserviert zu sein scheint, da bestimmte Proteinklassen sowohl im Phloem monokotyler Pflanzen (Reis) als auch dikotyler Pflanzen (Kürbis, Raps, Gurke, Brokkoli) auftreten. Hierzu zählen RNA-Bindeproteine, stress-abhängige Proteine, ribosomale und auch proteasomale Proteine. Dies lässt die Vermutung zu, dass das Phloem nicht nur für die Verteilung von Zuckern, Aminosäuren und RNA zuständig ist, sondern möglicherweise eine regulatorische Rolle einnimmt. Ob die bisher identifizierten ribosomalen

oder auch proteasomalen Proteine nur monomer oder auch in nativen Komplexen im Phloem vorliegen und ob Ribonukleoproteinkomplexe im Phloem existieren, konnte bisher noch nicht gezeigt werden, da die Proteine bei den bisher durchgeführten Proteomstudien unter denaturierenden Bedingungen präzipitiert wurden. Die Identifizierung solcher Protein-Protein- oder auch Protein-Nukleinsäure-Interaktionen würde jedoch wichtige Hinweise für eine weitere funktionelle Charakterisierung des Phloems liefern. Daher war die Analyse zum Vorhandensein funktioneller Komplexe im Siebelementsystem ein Bestandteil dieser Arbeit und sollte über die Verwendung von zwei- beziehungsweise dreidimensionalen Gelelektrophoresen sowie anschließenden MALDI-TOF-MS/MS-Analysen erreicht werden. Hierzu galt es zunächst Phloemsaft von Raps in ausreichender Menge und Qualität zu sammeln.

3.1.1 Sammeln und Qualitätskontrolle von Phloemsaft

Zur Gewinnung von Phloemsaft wurden 8 bis 10 Wochen alte Rapspflanzen (cv. Drakkar) mit einer sterilen Kanüle mehrmals kurz unter der Infloreszenz punktiert (Abb. 3-2). Der erste Tropfen des austretenden Phloemexsudats, der möglicherweise noch Kontaminationen durch das verletzte Pflanzengewebe enthielt, wurde verworfen und anschließend die Tropfen mit einer Pipette direkt in ein mit flüssigem Stickstoff gekühltes Reaktionsgefäß gesammelt. Um die Reinheit des Phloemsafts zu analysieren und Kontaminationen durch zerstörtes, benachbartes Zellgewebe, sowie Blütenpollen auszuschließen wurde eine RT-PCR durchgeführt. Dabei wurde zum einen die Expression des photosynthetisch relevanten Gens RubisCO (*small subunit*, *ss*) und zum anderen des im Phloem vorkommenden Thioredoxin H sowie des pollenspezifischen Pollenhüllproteins (PCP) überprüft. Da das Phloem keine photosynthetische Aktivität aufweist, sollte das Transkript der RubisCO (*ss*) ebenso wie des pollenspezifischen Pollenhüllproteins nicht im Phloem nachweisbar sein. Das Ergebnis der RT-PCR (Abb. 3-1) zeigt, dass zwar das Thioredoxin H, aber weder die RubisCO (*ss*) noch das Pollenprotein im Phloemsaft nachgewiesen werden konnten.



Abb. 3-2: Phloemsaftentnahme bei *B. napus* cv. Drakkar. Dargestellt ist das austretende Exsudat einer 9 Wochen alten Rapspflanze, die mittels einer sterilen Kanüle punktiert wurde.

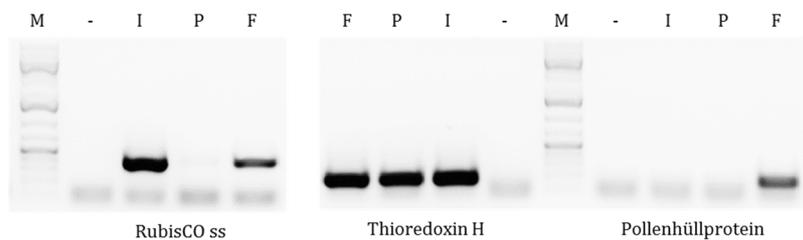


Abb. 3-1: Überprüfung der Reinheit des gesammelten Phloemsafts von *B. napus*. Zur Untersuchung der Reinheit des Phloemsafts wurde zunächst RNA aus Infloreszenzstängel (I), Blüte (F) sowie Phloemsaft (P) isoliert und daraufhin cDNA synthetisiert. Im Anschluss wurden mittels PCR gewebespezifische Transkripte (RubisCO *small subunit*, Thioredoxin H, sowie das Pollenhüllprotein) amplifiziert. Der Ansatz wurde in einem Volumen von 50 µl durchgeführt, wobei 25 µl mittels Agarosegelelektrophorese in einem 1,5 %-igen TAE-Agarosegel analysiert wurden. Als Größenstandard (M) wurde der GeneRuler Plus 1kb verwendet. Um zu überprüfen, ob die RT-Produkte von RNA und nicht von noch vorhandener DNA resultierten, wurde eine Negativkontrolle ohne Reverse Transkriptase (-) durchgeführt.

Aufgrund bereits durchgeführter Analysen zur Bestimmung der Qualität des Phloemsafts (11) sowie dieser Analyse kann davon ausgegangen werden, dass der gesammelte Phloemsaft frei von Kontaminationen aus dem Infloreszenzstängel sowie Pollen war und sich somit für künftige Proteom-Analysen eignete.

Die Durchführung solcher Proteom-Studien wird limitiert durch die geringe Phloemzugänglichkeit in vielen Pflanzen. Dafür ist es dennoch essentiell qualitativ-hochwertigen Phloemsaft in ausreichender Menge zur Verfügung zu haben. Eine Möglichkeit der Phloemsaftentnahme, die bei vielen Pflanzenspezies funktioniert ist die *Stylectomy*. Dabei kommt es zum Einsatz von Blattläusen, die mit ihrem Saugrüssel gezielt ins Phloem des Leitbündels stechen und dort den Phloemsaft saugen. Diese Methode ist allerdings methodisch sehr aufwändig und liefert nur sehr geringe Mengen an Phloemsaft (113). Eine einfachere und für viele Pflanzen gut etablierte Methode zum Sammeln von Phloemsaft ist die EDTA-bedingte Exsudation (114, 115). Dabei verhindert EDTA über die Bindung divalenter Ionen, beispielsweise Ca^{2+} -Ionen, das Verschließen der Siebplatten über P-Proteine oder Callose, wodurch der Phloemsaft austreten kann. Obwohl die Durchführung sehr einfach ist, ist diese Methode anfällig für Kontaminationen aus dem verletzten Gewebe und erlaubt auch nicht die Analyse nativer Proteine, da durch den Entzug von Calcium Komplexe möglicherweise zerstört werden. Die im Rahmen der Arbeit durchgeführte spontane Exsudation ist eine weitere Methode zur Isolation von Phloemsaft, die allerdings nur bei einer begrenzten Anzahl von Pflanzenspezies funktioniert (116). Hierfür eignet sich Raps des Ecotyps Drakkar jedoch hervorragend. Dabei tritt über kleine Punctionen im Bereich des Infloreszenzstängels Phloemsaft aus. Die Methode erlaubt das Sammeln großer Phloemsaftmengen innerhalb kürzester Zeit, so dass aus fünf Pflanzen bis zu 700 μl Phloemsaft isoliert werden kann. Hierbei handelt es sich um reinen Phloemsaft wie bereits andere Analysen, beispielsweise die Bestimmung des Sucrose-Gehalts (11) oder auch die in dieser Arbeit durchgeführte RT-PCR zum Nachweis gewebespezifischer Transkripte zeigt. Somit eignet sich diese Methode hervorragend um reinen Phloemsaft in ausreichender Menge zu isolieren und bietet weiterhin den Vorteil, dass mit diesem Exsudat unter nativen Bedingungen weitergearbeitet werden kann und somit Studien zum Phloem-Komplexom durchgeführt werden können.

3.1.2 Identifizierung von Komplexen im Phloemsaft von *B. napus*

Über bisherige Phloemproteom-Analysen konnte bereits eine Vielzahl von Phloem-mobilen Proteinen in unterschiedlichen Organismen nachgewiesen werden. Dabei wurden neben monomeren Proteinen auch Proteine identifiziert, die normalerweise Bestandteile größerer Komplexe sind. Hierzu zählen neben ribosomalen Proteinen auch Komponenten des 26S Proteasoms, welches für die Ubiquitin-induzierte Degradation von Proteinen zuständig ist. Da im Phloem von Kürbis über LC-MS/MS eine Vielzahl proteasomaler Proteine nachgewiesen werden konnte (47), eröffnet sich die Frage, ob diese im Phloem monomer oder im Komplex vorliegen und möglicherweise sogar ein aktives Proteasom bilden. Zum Nachweis von Komplexen im Phloem wurde mit dem gesammelten Phloemsaft zunächst 2D-Gelelektrophoresen aus einer Kombination einer nativen Blue Native-PAGE (BN-PAGE) und einer denaturierenden SDS-PAGE durchgeführt. Dazu wurde Phloemsaft nach dem Sammeln zunächst auf 1/6 seines Ausgangsvolumens aufkonzentriert, 25 μl des reinen Phloemsafts ($\sim 20\text{-}30 \mu\text{g}$ Gesamt-Protein) pro

Tasche aufgetragen und die Proteine in der ersten Dimension mittels BN-PAGE im Gradientengel in ihrer nativen Form aufgetrennt. Um auch das Migrationsverhalten monomerer Proteine unter diesen Bedingungen zu analysieren wurde außerdem die gleiche Menge an denaturiertem Phloemsaft, der zuvor mit 10 % SDS und 95 °C für 10 Minuten behandelt wurde, als Kontrolle separiert. Im Anschluss wurden beide über die BN-PAGE aufgetrennten Proben unter denaturierenden Bedingungen mittels einer SDS-PAGE weiter aufgetrennt und anschließend visualisiert (Abb. 3-3 A). Bei der Kombination dieser beiden Elektrophoresen migrieren monomere Proteine in einer hyperbolischen Diagonale, während Komponenten von Multiproteinkomplexen unterhalb dieser Diagonale lokalisiert sind. Dabei liegen Proteinuntereinheiten, die einen Komplex bilden in der zweiten Dimension in einer vertikalen Linie (107, 117). Bereits nach der ersten Auftrennung des nativen Phloemsafts mittels BN-PAGE konnten definierte Banden im höher molekularen Bereich detektiert werden (Abb. 3-3 B), die beim denaturierten Phloemsaft nicht auftraten. Hierbei handelte es sich um Multiproteinkomplexe wie aus der zweiten Dimension (Abb. 3-3 C) hervorgeht. Hier konnten diese Komplexe in einzelne Proteine aufgetrennt werden, während die

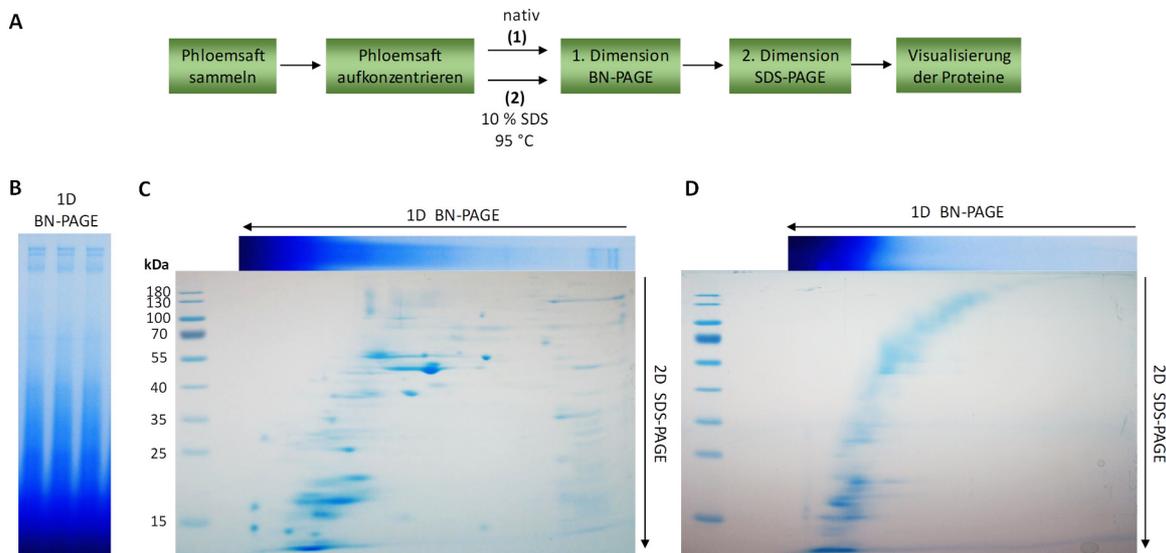


Abb. 3-3: 2D-Gelelektrophorese von nativem und denaturiertem Phloemsaft aus *B. napus*. Gemäß der Übersicht (A) wurde zur Analyse von Proteinkomplexen im Phloemsaft von Raps dieser zunächst aufkonzentriert und 20-30 µg Gesamtprotein entweder nativ oder denaturiert in der ersten Dimension mittels BN-PAGE in einem Gradientengel (4-16 %) (B) und anschließend mittels SDS-PAGE (12 %) (C & D) separiert. Dargestellt ist die zweite Dimension des nativen (C) beziehungsweise denaturierten Phloemsafts (D).

denaturierte Phloemprobe keine weiteren Spots außerhalb der typischen hyperbolischen Diagonale im Gel zeigte (Abb. 3-3 D). Somit konnte über diese Analyse erstmals gezeigt werden, dass der Phloemsaft von *B. napus* hauptsächlich aus monomeren Proteinen besteht, jedoch auch Multiproteinkomplexe, sowohl im niedrigen als auch im hohen Molekulargewichtsbereich, enthält. Zur eindeutigeren Identifizierung der Phloem-mobilen Multiproteinkomplexe wurden anschließend hochauflösende 3D-Gelelektrophoresen durchgeführt. Diese Art der Elektrophorese besteht aus einer Kombination von drei aufeinanderfolgenden Gelelektrophoresen (Abb. 3-4 A): Nach der Auftrennung der Multiproteinkomplexe in der nativen BN-PAGE werden diese aus dem Gel ausgeschnitten und zur genaueren Auftrennung der einzelnen Komponenten über eine denaturierende Tris-Tricin-Urea PAGE und anschließend über eine SDS-PAGE separiert (Abb. 3-4 B). Im Anschluss an die Gelelektrophoresen konnten die einzelnen Bestandteile der Komplexe über die *Peptide mass fingerprint*-Methode mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert werden.

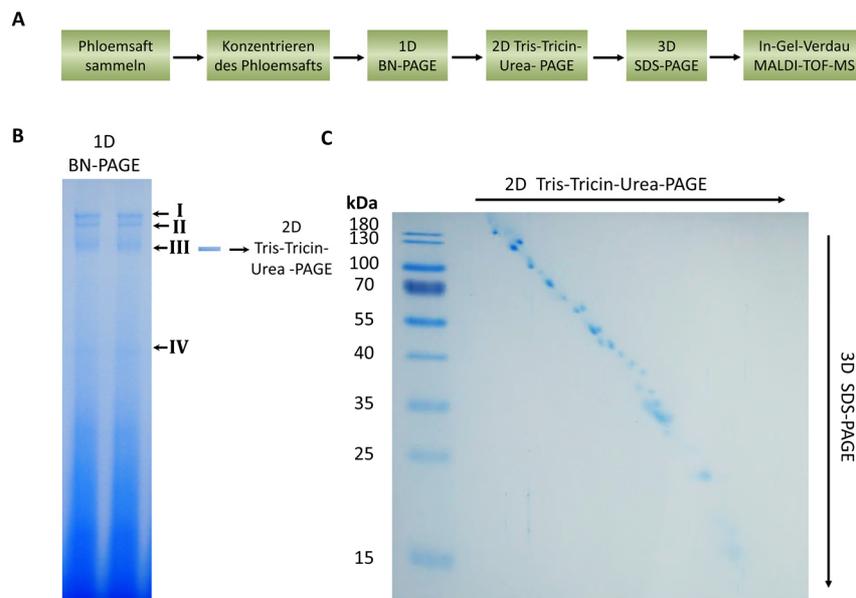


Abb. 3-4: Übersicht zur Analyse des Komplexoms im Phloemsaft von *B. napus* mittels hochauflösender 3D-Gelelektrophorese. Dargestellt ist zum einen die schematische Übersicht des Ablaufs der Komplexomanalyse des Phloemsafts (A) sowie das Ergebnis der nativen BN-PAGE (B) und die finale SDS-PAGE des Komplexes III (C). Dazu wurden zunächst 25 µl des reinen Phloemsafts, der zuvor auf 1/6 seines Ausgangsvolumens aufkonzentriert wurde, auf ein Gradientengel (4-16 %) geladen und mittels BN-PAGE die Proteine in ihrer nativen Form separiert. Die Banden der Komplexe wurden ausgeschnitten und die Komplexe zunächst mittels Tris-Tricin-Urea PAGE und anschließend mittels SDS-PAGE in ihre einzelnen Proteinkomponenten zerlegt.

Außerdem konnten über diese aufeinanderfolgenden Gelelektrophoresen gleich große Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Hydrophobizität (118) aufkonzentriert und besser voneinander getrennt werden, was die anschließende Identifizierung der Proteine mittels MALDI-MS deutlich vereinfachte (Abb. 3-4 C).

Über diese Methode konnten vier hochmolekulare Komplexe aus dem Phloemsaft von Raps isoliert werden. Da in der nativen BN-PAGE das Molekulargewicht nicht eindeutig bestimmt werden kann (119, 120), konnten die Größen der Komplexe erst aufgrund der darauffolgenden Auftrennungen und Identifizierungen der Einzelkomponenten abgeschätzt werden. Die isolierten Komplexe setzten sich, wie die anschließenden denaturierenden PAGEs zeigten, aus bis zu 30 Proteinen zusammen, die mittels MALDI-TOF-MS eindeutig identifiziert werden konnten (Tabellen im Anhang, Tab. 7-S1 bis 7-S4).

Dabei bestanden die einzelnen Komplexe im Wesentlichen aus Fragmenten der Untereinheiten der Ribosomen und des Proteasoms. Des Weiteren wurden in den Komplexen Myrosinasen und Myrosinase-Bindeproteine identifiziert, von denen bekannt ist, dass sie im Phloem von Raps stark vertreten sind und in der Lage sind große Aggregate (bis zu 1 MDa) zu bilden (73).

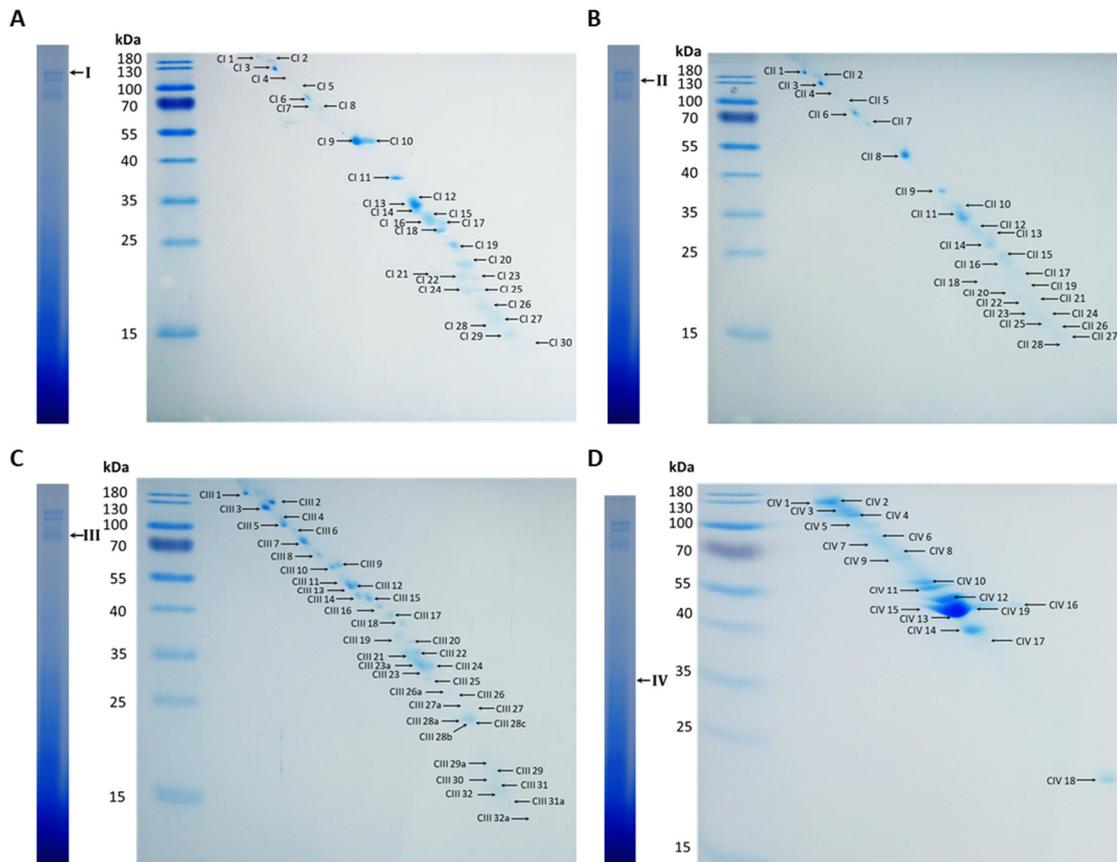


Abb. 3-5: Dritte Dimension der vier hochmolekularen Proteinkomplexe aus Raps-Phloemsaft. Die finale Auftrennung der Proteineinzelkomponenten erfolgte im 15 %-igen SDS-PA-Gel, die anschließend mittels kolloidaler Coomassie-Färbung detektiert wurden. Die sichtbaren Protein-Spots der analysierten Komplexe (Komplex I-IV (A-D)) wurden in-Gel trypsinisiert und anschließend mittels MALDI-TOF-MS analysiert (Zahlen).

3.1.2.1 Identifizierung ribosomaler Fragmente im Phloemsaft von Raps

Bei den Ribosomen handelt es sich um gut untersuchte Ribonukleoproteinkomplexe, die sowohl in Pro- als auch Eukaryoten vorkommen und für die mRNA-abhängige Herstellung von Proteinen aus Aminoacyl-tRNAs, ATP- oder auch GTP-Substraten zuständig sind (121). In Pflanzen kommen drei ribosomale Proteome vor: das plastidäre, das mitochondriale und das zytoplasmatische. Letzteres ist das in *A. thaliana* gut untersuchte 80S-Ribosom, das sich aus der 60S großen Untereinheit und der 40S kleinen Untereinheit zusammensetzt. Während die 60S-Untereinheit aus drei ribosomalen RNAs (5S, 5.8S, 25S) und 47 r-Proteinen besteht, umfasst die kleine Untereinheit 33 r-Proteine und eine rRNA (18S) (122). Im Phloemsaft verschiedener Spezies der Angiospermen konnten in bisherigen Analysen neben verschiedenen ribosomalen Proteinen (r-Proteine) (11, 47) auch ribosomale rRNA (10, 16) identifiziert werden. Ob diese Komponenten im Phloemsaft getrennt, als unvollständiger Komplex oder sogar als komplettes Ribosom vorliegen, wurde bisher nicht analysiert. Jedoch konnte eine translationale Aktivität innerhalb des Siebelementsystems nicht detektiert werden (16). Über die Kombination von nativen, denaturierenden PAGEs und MALDI-TOF-Massenspektrometrie konnten im Rahmen dieser Arbeit aus nativem Phloemsaft

von Raps drei hochmolekulare Komplexe isoliert werden, die aus ribosomalen Proteinen des 80S-Ribosoms zusammengesetzt sind. Während der größte Komplex (Komplex I) ausschließlich r-Proteine der großen Untereinheit (60S) enthielt, wobei 43 % aller ribosomalen Proteine mittels MS identifiziert werden konnten, waren in Komplex II, der in der BN-PAGE unterhalb des ersten Komplexes zu finden war, r-Proteine beider Untereinheiten vertreten. Dabei konnten 33 % der Proteine der 60S-Untereinheit und 16 % der 40S-Untereinheit ermittelt werden. Im kleinsten der drei Komplexe ribosomalen Ursprungs (Komplex III) befanden sich 28 % aller ribosomalen Proteine der kleinen Untereinheit (Abb. 3-6 A). Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Komplexe weitere Proteine enthielten, die aufgrund von Limitierungen der verwendeten Methode nicht identifiziert werden konnten. So ist es möglich, dass Proteine mit ähnlicher Größe sowie ähnlichen hydrophilen Eigenschaften im selben Spot lokalisiert waren, was die Identifizierung der Einzelkomponenten mittels MS deutlich erschwerte. Über LC-MS/MS-Analysen von Phloemsaft aus Kürbis konnte ebenfalls nur ein Teil der ribosomalen Proteine nachgewiesen werden (16). Dabei wurden insgesamt nur elf Proteine identifiziert, deutlich weniger als über die hier durchgeführte Methode. Dies zeigt, dass auch die häufig für Phloem-Proteom-Studien verwendete LC-MS/MS-Methode, die als sensitiv gilt, nicht alle Proteine erfassen kann. Eine weitere Limitierung dieser LC-MS/MS-Analyse ist außerdem, dass die Proteine zunächst präzipitiert werden müssen, was die Analysen von Komplexen unmöglich macht. Daher kann anders als bei den über 3D-Gelelektrophorese und MALDI-TOF-MS identifizierten Proteinen nicht davon ausgegangen werden, dass diese Teil von Komplexen sind. Da die BN-PAGE aufgrund des Erhalts der Proteinkonformation und dem daraus resultierenden Migrationsverhalten eine Größenbestimmung der aufgetrennten ribosomalen Komplexe nicht ermöglichte (119, 120), konnte erst über die mittels MALDI-TOF-MS identifizierten Proteine eine ungefähre molekulare Größe der Komplexe abgeschätzt werden. Dabei wurde nur unter Berücksichtigung der identifizierten ribosomalen Proteine für Komplex I ein Molekulargewicht von etwa 660 kDa, für Komplex II 500 kDa und für Komplex III 430 kDa ermittelt. Dass diese Komplexe in der nativen ersten Dimension, bei der ein Gradientengel verwendet wurde, das laut Herstellerangaben Proteine bis zu 10 MDa auflösen kann, jedoch deutlich größer erschienen könnte einerseits daraus resultieren, dass diese ihre natürliche Konformation beibehielten und somit anders migrierten. Da es sich um nativen Phloemsaft handelte und ribosomale RNA als Bestandteil des Phloemsafts bereits nachgewiesen werden konnte (10, 16), konnte außerdem nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um Ribonukleoproteinkomplexe – also Komplexe aus r-Proteinen und rRNA- handelte. Um dies zu überprüfen wurde die BN-PAGE direkt auf eine Nylonmembran gebロットet und im Anschluss *Northern Blot* Analysen durchgeführt. Hierfür wurden spezifische Sonden (Sequenzen Tab. 2-6) für die drei rRNAs der großen Untereinheit (5.8S, 25S, 5S) und eine für die 40S rRNA (18S) verwendet. Dabei zeigte sich, dass es sich bei den isolierten Komplexen um Ribonukleoproteinkomplexe handelte, die sich in ihrer Zusammensetzung unterschieden (Abb. 3-6 B): So konnten im Komplex I, der ausschließlich r-Proteine der 60S-Untereinheit enthielt, auch alle drei rRNAs (5.8S, 25S, 5S) dieser Untereinheit nachgewiesen werden. Im Komplex II waren alle rRNAs beider Untereinheiten (5.8S, 25S, 5S sowie 18S) zu finden und Komplex III wies ausschließlich die 18S rRNA auf, was sich ebenfalls komplementär zu der Proteinzusammensetzung verhielt. Beim *Northern Blot* mit der 5S

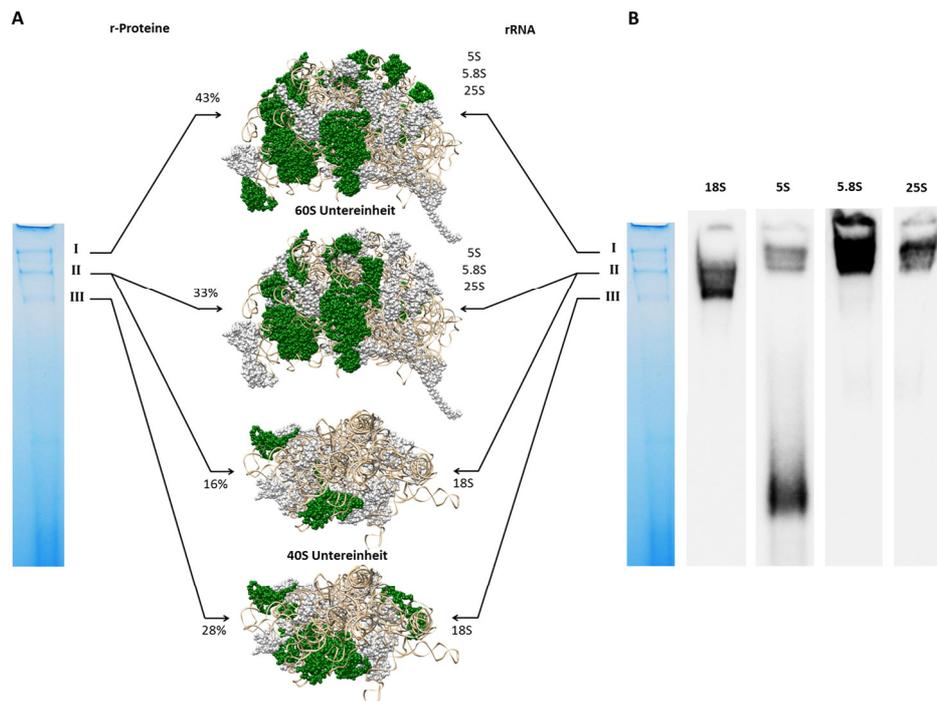


Abb. 3-6: Identifizierung verschiedener ribosomaler Fragmente im Phloemsaft von *B. napus*. Über die massenspektrometrische Analyse dreier hochmolekularer Komplexe (I-III) konnte eine Vielzahl von ribosomalen Proteinen verschiedener Untereinheiten identifiziert werden (grün hervorgehoben in der 3D-Struktur der 60S- und 40S-Untereinheit von *Saccharomyces cerevisiae* (pdb code: 4V7R)) (A). Über die anschließende *Northern Blot* Analyse mit rRNA-spezifischen Sonden konnte gezeigt werden, dass die Fragmente passend zu ihrer Proteinzusammensetzung die entsprechenden rRNAs enthielten (B).

rRNA spezifischen Sonde trat außerdem ein Signal im unteren Bereich des Gels auf, wobei vermutet wird, dass es sich hierbei um freie rRNA handelte.

Über die Auftrennung von nativem Phloemsaft unter Verwendung der BN-PAGE konnten zum ersten Mal Komplexe im Phloemsaft nachgewiesen werden. Über die Kombination dieser PAGE mit einer *Northern Blot* Analyse, die im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal zum Einsatz kam, war es sogar möglich Komplexe aus Nucleinsäuren und Proteinen zu isolieren und zu identifizieren. Somit bietet diese Methode ein breites Anwendungsspektrum nicht nur zur Isolierung von Protein-Protein- sondern auch von Protein-Nucleinsäure-Komplexen. Wie bereits andere Phloem-Studien zeigen konnten, existieren im Phloem verschiedener Angiosperm-Spezies sowohl ribosomale Proteine der großen und kleinen Untereinheit als auch ribosomale RNA (10, 16). Diese Koexistenz lässt vermuten, dass innerhalb des Siebelementsystems Proteinsynthese erfolgen kann (47). Allerdings konnten bis zum jetzigen Zeitpunkt solche für die Translation relevanten Protein-Protein- oder auch Protein-RNA-Interaktionen im Phloemsaft noch nicht nachgewiesen werden. Dies resultiert zum einen aus der limitierten Zugänglichkeit von reinem und nativem Phloemsaft und zum anderen aus der Verwendung von denaturierenden *Proteomic*-Ansätzen. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es jedoch über die Kombination einer nativen BN-PAGE, gefolgt von zwei denaturierenden PAGEs und anschließender MALDI-TOF-MS/MS drei verschiedene Komplexe aus dem Phloemsaft von Raps zu isolieren, wobei es sich ribosomale Ribonukleoproteinkomplexe handelte. Dabei konnten neben den schon im Phloemsaft nachgewiesenen rRNAs außerdem viele ribosomale Proteine identifiziert werden, die bisher im Phloemsaft von Raps noch nicht gefunden wurden. Hinsichtlich der Beobachtung, dass im Siebelementsystem ein Großteil der für die Proteinsynthese erforderlichen Proteine

existent ist, und der Vermutung, dass somit einige Proteine innerhalb des Siebelementsystems hergestellt werden können (47), ist zu unterstreichen, dass ausschließlich Fragmente der verschiedenen ribosomalen Untereinheiten gefunden werden konnten. So handelte es sich bei Komplex I um ein Fragment der 60S-Untereinheit, bestehend aus allen 60S rRNAs und bestimmten r-Proteinen. Bei Komplex II konnten hingegen ribosomale Proteine und rRNAs beider Untereinheiten identifiziert werden. Aufgrund der Tatsache, dass dieser Komplex in der nativen PAGE ein höheres Migrationsverhalten aufwies als Komplex I, deutet daraufhin, dass es sich hier vermutlich um zwei co-migrierende Fragmente der 60S- und 40S-Untereinheit handelt und weniger um ein ribosomales Fragment aus beiden Untereinheiten. Auch konnte ein weiteres Fragment der 40S-Untereinheit im kleinsten analysierten Komplex III nachgewiesen werden. Komplette Ribosomen konnten im Rahmen dieser Studie nicht gezeigt werden, lassen sich aber bedingt durch das Auflösungsvermögen der bei der BN-PAGE verwendeten Gradienten-Gelen möglicherweise auch nicht auflösen. Da außerdem von Zhang *et al.* gezeigt werden konnte, dass der Phloemsaft die Proteinsynthese eher inhibiert (16), ist es wahrscheinlich, dass die gefundenen Fragmente aus sich teilenden Phloemzellen freigesetzt werden oder möglicherweise unter bestimmten Bedingungen, beispielsweise Verwundung, ins Phloem gelangen und dort unter diesen Umständen dann aktive Komplexe bilden (123). Auch konnte bislang in keiner Phloemproteomstudie die Existenz aller ribosomalen Proteine bestätigt werden. So könnte neben der allgemein inhibierenden Umgebung im Phloem auch das Fehlen einzelner ribosomaler Proteine die Aktivität dieser Komplexe verhindern.

3.1.2.2 Im Phloemsaft von *B. napus* existieren sowohl ubiquitinierte Proteine als auch ein funktionales Proteasom

Viele physiologisch relevanten Prozesse in Pflanzen, wie Wachstum und Entwicklung, werden über den selektiven Abbau von kurzlebigen, regulatorischen Proteinen gesteuert. Hieran beteiligt ist ein proteolytischer Weg, bei dem Ubiquitin und das 26S-Proteasom eine Rolle spielen.

Beim Ubiquitin (Ub) handelt es sich um ein kleines Protein, das 76 Aminosäuren umfasst, ubiquitär vorliegt und sowohl in Tieren als auch in Pflanzen stark konserviert ist (Abb. 3-7 A). Es kann als posttranslationale Modifikation kovalent an Proteine gebunden werden und reguliert so verschiedenste zelluläre Prozesse wie Protein-Targeting, Rekrutierung von Proteinen des DNA-Reparatursystems, Membranrecycling, Aktivierung von Kinasen sowie die Degradierung zellulärer Proteine über das 26S Proteasom (124). In *Arabidopsis thaliana* sind 6 % aller Proteine am Ubiquitin-Signalweg beteiligt (125). Für die posttranslationale Modifizierung von Proteinen mit einem oder mehreren Ubiquitinen ist eine komplexe Kaskade von drei Enzymen erforderlich – das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1, das Ubiquitin-konjugierende Enzym E2 und die Ubiquitin-Ligase E3 (126).

Im ersten Schritt der Kaskade, der ATP-abhängig ist, wird Ubiquitin durch E1 aktiviert, indem eine hoch-energetische Thioester-Brücke zwischen Cysteinrest und dem Glycin am C-Terminus des Ubiquitins erzeugt wird. Im nächsten Schritt entsteht ein Ubiquitin-E2-Intermediat, indem das aktivierte Ubiquitin auf einen Cysteinrest des E2-Enzyms transferiert wird (Transesterifizierung). Dieses Ubiquitin-Intermediat fungiert als Ub-Donor, das daraufhin mit E3 interagiert. Dieses katalysiert den Transfer von Ubiquitin auf das Lysin

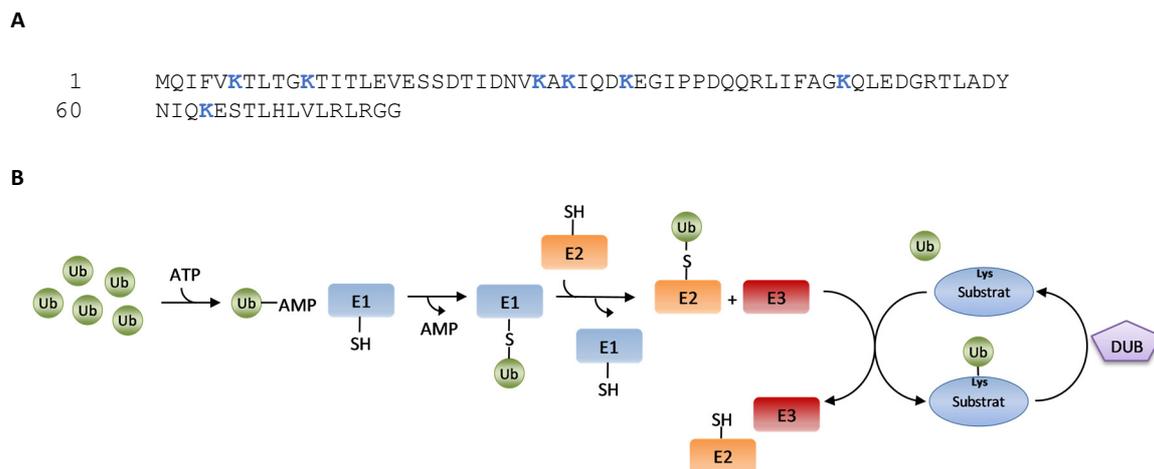


Abb. 3-7: Schematische Darstellung der Ubiquitinierung. Aminosäuresequenz des Ubiquitins aus *A. thaliana*. Dabei sind die sieben Lysinreste farblich hervorgehoben, an denen sich verschiedene Polyubiquitinketten ausbilden können (A). Bei dieser posttranslationalen Modifizierung wird Ubiquitin (Ub) auf ein Protein übertragen. Dieser Vorgang ist ATP-abhängig und wird über eine Kaskade von drei Enzymen katalysiert – Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1), Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2) und der Ubiquitin-Ligase (E3). Es handelt sich dabei um eine reversible Modifizierung, die über Deubiquitinierungsenzyme (DUB) rückgängig gemacht werden kann (B).

des Targetproteins, wobei beide über eine Isopeptidbindung verknüpft werden (126). In *Arabidopsis thaliana* wurden über biochemische Studien aber auch Datenbankabgleiche konservierter Regionen bisher viele Enzyme, die an der Ubiquitinierung beteiligt sind, identifiziert. So kommen im Genom von *A. thaliana* zwei für E1, 45 für E2 und über 1400 für E3 kodierende Gene vor (127). Neben den Enzymen zur Herstellung ubiquitiniertes Proteine wurden bisher 64 Deubiquitinierungsenzyme (DUBs) identifiziert, die die Entfernung von Ubiquitin von Proteinen katalysieren.

Auf diese Weise können Targetproteine entweder mit einem Ubiquitin (Monoubiquitinierung), mehreren einzelnen Ubiquitinen (Multimonoubiquitinierung) oder Polyubiquitinketten (in der Regel mehr als vier verknüpfte Ubiquitine, Polyubiquitinierung) modifiziert sein. Aufgrund seiner sieben Lysine ist Ubiquitin in der Lage acht verschiedene Polyubiquitinketten zu bilden, wobei eine Isopeptidbrücke zwischen dem carboxyterminalen Glycin des einen Ubiquitins mit der seitenständigen ϵ -Aminogruppe eines Lysins des anderen Ubiquitins (K⁶, K¹¹, K²⁷, K²⁹, K³³, K⁴⁸ oder K⁶³) ausgebildet wird. Dabei entscheidet die Art der Polyubiquitinierung über die Aufgabe des Proteins. So werden beispielsweise K²⁹- und K⁴⁸-verknüpfte polyubiquitinierte Proteine durch einen Protease-Komplex, dem 26S-Proteasom, erkannt und degradiert (127). Beim 26S-Proteasom handelt es sich um einen 2 MDa großen, ATP-abhängigen proteolytischen Komplex, der bestimmte Ubiquitin-modifizierte Proteine abbaut. Das Proteasom konnte in Pflanzen zum ersten Mal in Erbsen identifiziert werden (128) und wurde inzwischen in nahezu allen Spezies gefunden (127). Das 26S Proteasom aus *A. thaliana* besteht aus insgesamt 33 Komponenten (129), die zwei unterschiedliche Untereinheiten bilden – die regulatorische 19S- und die katalytisch aktive 20S-Untereinheit (Kernprotease) (Abb. 3-8). Letztere ist zylindrisch aufgebaut und besteht aus vier heteroheptameren Ringen. Die beiden zentralen Ringe setzen sich aus sieben β -Proteinen (β_{1-7}) zusammen und sind umgeben von zwei peripheren Ringen, die aus je sieben α -Proteinen (α_{1-7}) bestehen. Dabei bilden die Proteine β_1 , β_2 und β_5 das aktive Zentrum der Protease (130). Es konnte gezeigt werden, dass das 20S-Proteasom eine Peptidylglutamyl-, eine Trypsin- und eine Chymotrypsin-ähnliche Aktivität aufweist (131) und somit nahezu jede Peptidbindung spalten kann. Der an den β -Ring angrenzende α -Ring bildet einen

Tunnel, der den Zugang zum aktiven Zentrum kontrolliert (132, 133). Diese Kernprotease ist entweder an einem oder an beiden Enden mit der regulatorischen Einheit (19S) assoziiert, die zum einen die ATP-

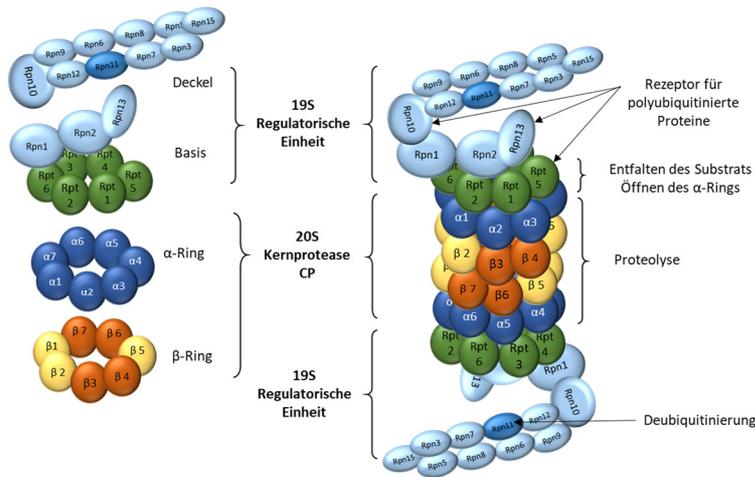


Abb. 3-8: Schematische Darstellung des Proteasoms. Das Proteasom besteht aus 33 verschiedenen Proteinen und unterteilt sich in die proteolytisch aktive Kernprotease (CP) und eine oder zwei regulatorische Untereinheiten (19S), die sich wiederum aus dem Deckel und der Basis zusammensetzen. Während für viele Proteine die Funktion noch nicht eindeutig geklärt wurde, konnte bestimmten Bereichen bereits eine Aufgabe zugeordnet werden.

Proteasoms ist vermutlich zuständig für die Erkennung und die Entfaltung des Substrats, für die Entfernung des kovalent gebundenen Ubiquitins sowie für das Öffnen des α -Rings und das Einleiten des Substrats ins katalytische Zentrum. Während die Funktionen der meisten Einzelproteine noch nicht bekannt sind, konnte gezeigt werden, dass der RPT-Ring ATP hydrolysiert, um den α -Ringtunnel zu öffnen und das Substrat zu entfalten (134). RPN₁₀ verbindet die Basis mit dem Deckel der 19S-Untereinheit (135) und fungiert vermutlich als Rezeptor für K⁴⁸-verknüpfte polyubiquitinierte Proteine (136). Dass das RPN₁₀ vermutlich nicht die alleine für die Ubiquitin-Erkennung zuständig ist, zeigten Analysen in *A. thaliana* (137). Weitere Kandidaten, die an der Erkennung von Ubiquitin-modifizierten Proteinen beteiligt sind, sind RPT₅ und RPN₁₃. Während RPN₁ möglicherweise als *Shuttle* fungiert, indem es das Substrat bindet und ins Proteasom schleust (138), ist RPN₁₁, wobei es sich um eine Metalloprotease mit DUB-Aktivität handelt, für den Abbau der Ubiquitinkette zuständig (139).

Im Phloemsaft von Raps und Kürbis konnten neben ribosomalen Proteinen auch Komponenten des Proteasoms sowie Enzyme zur Ubiquitinierung von Proteinen nachgewiesen werden (11, 47). Da es sich hier aber um denaturierende Proteomstudien handelte, konnte über die Anwesenheit eines komplett zusammengesetzten und insbesondere funktionalen Proteasoms und somit eine Beteiligung des Phloems beim Protein-*Turnover* bisher nur spekuliert werden.

Bei der Analyse von Komplexen im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Komplex identifiziert werden, der eine Vielzahl proteasomaler Proteine enthielt – Komplex III. Dieser co-migrierte mit einem Fragment der 40S-Untereinheit. Bei der massenspektrometrischen Analyse konnten sowohl Anteile der regulatorischen 19S-Untereinheit als auch Proteine des katalytisch aktiven 20S-Proteasoms identifiziert werden. Während der Großteil der Proteine der regulatorischen Untereinheit gefunden werden konnte – 70 % des 19S-Deckels und 67 % der 19S Basis- waren nur insgesamt jeweils ein Protein des α -Rings (α 6) und des β -Rings (β 4)

Abhängigkeit und zum anderen die Spezifität für K⁴⁸-verknüpfte polyubiquitinierte Proteine festlegt (131, 133). Die 19S-Untereinheit wird in die 19S-Basis und den 19S-Deckel unterteilt. Die Basis grenzt dabei direkt an den α -Ring und besteht aus einem Ring von sechs AAA-ATPasen (RTP₁₋₆) und drei nicht-ATPasen (RPN_{1, 2, 10}). Daran assoziiert ist der Deckel, der ausschließlich aus nicht-ATPasen (RPN_{3, 5-9, 10-12}) besteht. Diese Untereinheit des

des Kernpartikels identifizierbar (Abb. 3-9 A). Über LC-MS/MS-Analysen mit Phloemsaft von Kürbis konnten nahezu alle Proteine der Kernprotease ermittelt werden, weswegen spekuliert wurde, dass ein vollständig zusammengesetztes und aktives Proteasom im Phloem existieren könnte (47). Unter Berücksichtigung dieser Beobachtung, der Größe des Komplexes im nativen Gel und der Limitierung der hier verwendeten Methode wurde vermutet, dass im Phloemsaft von Raps ein zusammengesetztes Proteasom – also bestehend aus mindestens einer regulatorischen (19S) und einer katalytischen Einheit (20S) - vorliegt. Um also zu testen, ob es sich hierbei nur um ein Fragment oder aber ein proteolytisch aktives Proteasom handelt, sollte die Aktivität des Proteasoms analysiert werden. Hierzu wurde ein 20S Proteasom *Activity Assay* Kit verwendet, wobei der Umsatz des proteasomalen Substrats LLVY-AMC gemessen wurde. Über die Durchführung des Assays mit zuvor über Hitze denaturiertem Phloemsaft, um die enzymatische Aktivität zu inaktivieren, konnte über die Zugabe eines reinen 20S Proteasoms gezeigt werden, dass die Umgebung des Phloemsafts eine proteasomale Aktivität zulässt (Abb. 3-9 B). Diese Aktivität konnte über die Zugabe des Proteasom-spezifischen Inhibitors Lactacystin vollständig inhibiert

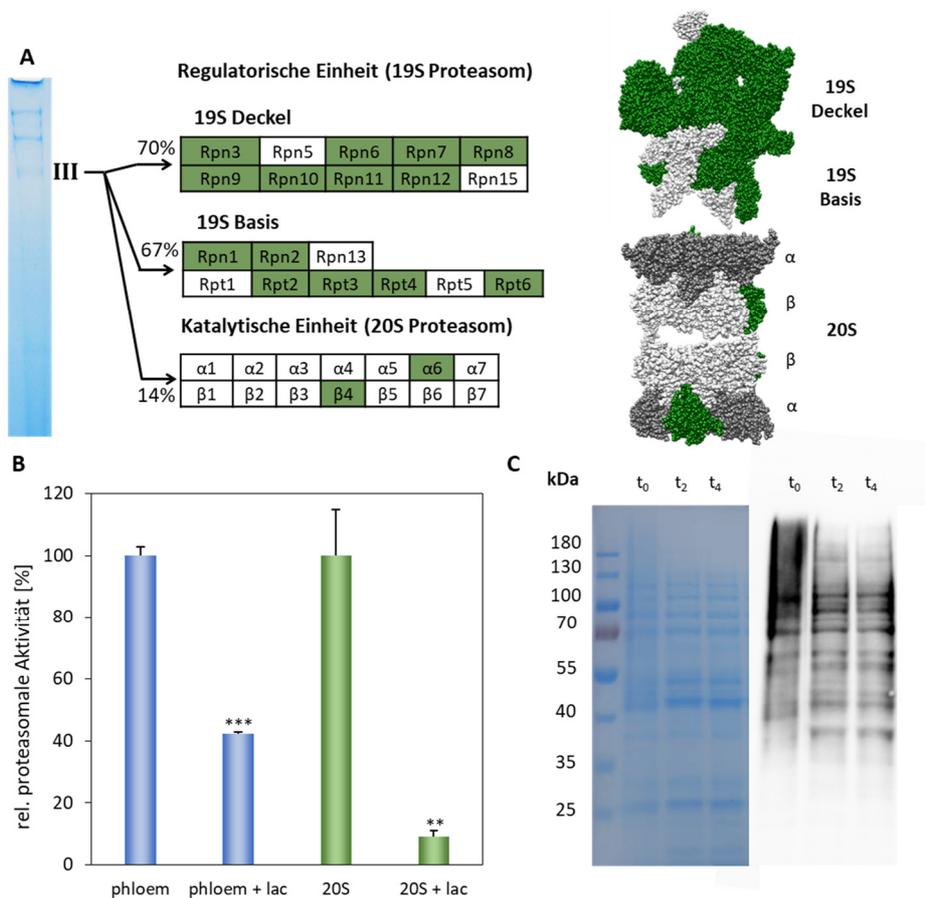


Abb. 3-9: Identifizierung von ubiquitinierten Proteinen und einem proteasomalen Abbauweg im Phloemsaft von Raps. Über die massenspektrometrische Analyse des Komplexes III konnte eine Vielzahl proteasomaler Proteine identifiziert werden. So wurden 74 % aller Proteine der regulatorischen 19S-Untereinheit und 14 % der katalytischen 20S-Untereinheit gefunden (grün hervorgehoben in der 3D Struktur des Proteasoms aus *Saccharomyces cerevisiae* (pdb code: 5A5B)) (A). Über einen 20S Proteasom Aktivitätsassay mit nativem Phloemsaft (phloem) und hitze-inaktiviertem Phloemsaft mit einer Positivkontrolle des 20S-Proteasoms (20S) konnte im Phloemsaft eine proteasomale Aktivität detektiert werden. Über die Zugabe des Proteasom-spezifischen Inhibitors Lactacystin (lac) konnte die Aktivität signifikant reduziert werden. Dabei ist die Standardabweichung über die Fehlerbalken dargestellt (phloem vs phloem+lac ***, $P < 0.001$, $n = 5$; 20S vs 20S+lac **, $P < 0.036$, $n = 3$) (B). Über einen *Western Blot* mit konzentriertem Phloemsaft (t₀), der für zwei beziehungsweise vier Stunden bei 22 °C inkubiert wurde (t₂, t₄), einem primären Antikörper, der α-mono-, multimono- sowie K²⁹-, K⁴⁸- und K⁶³-verknüpfte poly-ubiquitinierte Proteine erkennt, und einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper konnten ubiquitinierte Proteine im Phloem detektiert werden (C).

werden. Bei der Analyse mit nativem Phloemsaft wurde das proteasomale Substrat nahezu vollständig abgebaut, während die Anwesenheit des Inhibitors zu einer deutlichen Reduktion der Aktivität des Proteasoms führte, die allerdings im Vergleich zu der zuvor durchgeführten Positivkontrolle weniger stark war. So konnte gezeigt werden, dass im Phloemsaft trotz der Anwesenheit einiger Protease-Inhibitoren (11, 56) der Abbau von Proteinen durch das Proteasom im Phloem möglich ist. Eine weitere Tatsache die diesen Sachverhalt unterstützt ist das Vorkommen von Enzymen, die die Ubiquitinierung von Proteinen katalysieren. Hierzu zählen Ubiquitin-aktivierende sowie Ubiquitin-konjugierende Enzyme, Ubiquitin-Ligasen und deubiquitinierende Enzyme, die bereits im Rahmen anderer Proteomstudien in Raps nachgewiesen werden konnten (11). Außerdem ist schon lange bekannt, dass freies Ubiquitin in Phloemsaftproben vorhanden ist (140), was die Annahme zulässt, dass im Siebelementsystem ubiquitinierte Proteine vorhanden sind. Um dieses zu testen, wurde ein *Western Blot* mit Phloemsaft und einem spezifischen Antikörper durchgeführt, der mono- und multimono-ubiquitinierte Proteine sowie K²⁹-, K⁴⁸- und K⁶³-verknüpfte polyubiquitinierte Proteine detektieren kann. Wie in Abb. 3-9 C zu sehen ist, konnte so eine Vielzahl von ubiquitinierten Proteinen im Phloemsaft nachgewiesen werden. Während im Bereich über 75 kDa in der Coomassie-Färbung nur wenige Signale sichtbar waren, war hier im *Western Blot* ein sehr starkes Signal erkennbar, was vermutlich auf die Anwesenheit von polyubiquitinierten Proteinen hindeutet. Um zu analysieren, ob diese ubiquitinierten Proteine durch das im Phloemsaft vorhandene Proteasom abgebaut werden können, wurde der reine Phloemsaft bis zu mehreren Stunden (0 bis 4 Stunden) bei Raumtemperatur inkubiert, die Proteine über eine SDS-PAGE separiert und im Anschluss ein *Western Blot* durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass das Ubiquitin-Signal bereits nach zweistündiger Inkubation deutlich nachließ und danach konstant blieb. Dies war vor allem im höheren Molekulargewichtsbereich erkennbar: Während Phloemsaft, der direkt nach der Sammlung denaturiert wurde, im Bereich über 75 kDa ein stark diffuses Signal zeigte, waren nach zwei Stunden in diesem Bereich deutliche Banden zu sehen. Diese blieben sowie einige Banden unterhalb dieses Bereichs auch nach mehrstündiger Inkubation erhalten. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um polyubiquitinierte Proteine handelte, die durch das Proteasom nicht als Substrat erkannt wurden und somit eine andere Funktion haben, während andere Proteine durch dieses abgebaut wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte über die Kombination hochauflösender 3D-Gelelektrophoresen und MALDI-TOF-MS/MS im Phloemsaft von *B. napus* im Vergleich zu vorherigen Studien (11) einerseits deutlich mehr Komponenten des Proteasoms identifiziert werden und andererseits gezeigt werden, dass diese einen proteolytisch aktiven Komplex bilden. Dabei wurden nahezu alle Komponenten der regulatorischen 19S-Untereinheit, sowohl Rpn- als auch Rpt-Proteine, aber nur wenige Proteine der Kernprotease (20S) gefunden. Während erstere für die Erkennung und die Bindung der zum Abbau bestimmten Proteine zuständig sind, hydrolysieren die Rpt-Proteine ATP (131, 133). Ob es sich hierbei um ein an einer oder beiden Seiten mit der 19S-Untereinheit assoziiertes 20S-Proteasom handelt oder um co-migrierende 19S- und 20S-Untereinheiten konnte allerdings nicht genauer differenziert werden. Die Existenz der Komplexe lässt jedoch die Vermutung zu, dass im Phloem möglicherweise ein funktionaler, proteasomaler Degradationsweg vorkommt. Für die proteolytische Aktivität sind die Proteine β_1 , β_2 und β_5 zuständig und es konnte gezeigt werden, dass das Proteasom eine Peptidylglutamyl-, eine Trypsin- und eine

Chymotrypsin-ähnliche Aktivität besitzt (131). Letztere kann über den Proteasom-spezifischen Inhibitor Lactacystin inhibiert werden. Über einen Proteasom-Aktivitätsassay konnte erstmals der proteasomale Abbau eines Proteasom-spezifischen Substrates im Phloem nachgewiesen werden. Dabei konnte die Degradation einerseits über Hitzeinaktivierung des Phloemsafts und zum anderen über die Zugabe des spezifischen Inhibitors Lactacystin inhibiert werden. Somit scheint unter den gegebenen Bedingungen im Phloemsaft von Raps ein aktives Proteasom vorzuliegen. Dies ist überraschend, da bereits in anderen Studien gezeigt werden konnte, dass im Phloem eine Vielzahl verschiedener Protease-Inhibitoren existent ist. Dabei wird vermutet, dass sie bei der Abwehr von Phloemsaft-saugenden Insekten eine wichtige Rolle spielen (56). Diese Inhibitoren sind spezifisch für Serin-, Aspartyl- und Cystein-Proteasen, jedoch scheint es im Phloem keine Proteasom-spezifischen Inhibitoren zu geben, so dass Phloemproteine im Siebelementsystem direkt abgebaut werden können und nicht erst aus dem Phloem heraus transportiert werden müssen. Dass innerhalb des Siebelementsystems Proteindegradation durch das Proteasom stattfindet, sollte bei der Sammlung und Verarbeitung der Phloemproben zukünftig berücksichtigt werden. So kann es aufgrund der unterschiedlich langen Sammel-Dauer oder bei Inkubation bei Raumtemperatur zu stark variierenden Proteomprofilen kommen, die einen Vergleich der Phloemproteome aus verschiedenen Pflanzen erschweren.

Um zu analysieren, ob im Phloemsaft auch Substrate des Proteasoms vorhanden sind – nämlich polyubiquitinierte Proteine - wurde ein *Western Blot* mit einem Ubiquitin-spezifischen Antikörper durchgeführt. So konnte eine Vielzahl ubiquitiniertes Proteine im Phloem von Raps identifiziert werden. Dieser primäre Antikörper wies eine Spezifität für mono-, multimono- und polyubiquitinierte Proteine auf, die über K²⁹-, K⁴⁸- und K⁶³-verknüpft sind. Diese unterschiedlich verknüpften Modifizierungen übernehmen in Pflanzen verschiedene Aufgaben (Abb. 3-10). Während mono- und multimono-ubiquitinierte Proteine bei nicht-proteolytischen Prozessen, wie dem endosomalen *Sorting*, dem nukleären Transport und der

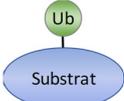
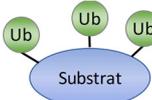
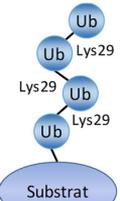
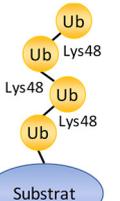
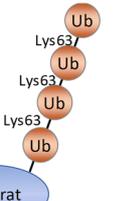
Mono-Ubiquitinierung	Multimono-Ubiquitinierung	Poly-Ubiquitinierung		
		 <p>K²⁹-Polyubiquitin</p>	 <p>K⁴⁸-Polyubiquitin</p>	 <p>K⁶³-Polyubiquitin</p>
<p>Endozytose, Endosomales <i>Sorting</i>, Regulation der Histonfunktion, Kerntransport (141) (272)</p>	<p>Rezeptor-Endozytose (273)</p>	<p>Proteindegradation von DELLA- Proteinen über 26S-Proteasom (274)</p> <p>Beteiligung an: Antwort auf Gibberellinsäure (274)</p>	<p>Proteindegradation über das 26S-Proteasom (275)</p>	<p>Aktivierung von Kinasen, Proteinsynthese, DNA-Reparatur, Chromosomale Regulation (276)</p> <p>Beteiligung an: Apikaldormanz, DNA-Reparatur, Eisen-Mangel (277)</p>

Abb. 3-10: Spezifität des verwendeten Antikörpers zur Identifizierung von ubiquitinierten Phloemproteinen. Schematische Darstellung der mittels Antikörper detektierbaren Ubiquitin-Modifizierung und ihre Funktion bei zellulären Prozessen.

Endozytose eine Rolle spielen (141), sind K⁶³-verknüpfte ubiquitinierte Proteine an Prozessen wie der DNA-Reparatur oder auch dem intrazellulären Transport beteiligt (142–145). Für den proteasomalen Abbau werden Proteine über eine K²⁹- und K⁴⁸-verknüpfte Polyubiquitinkette markiert (146, 147). Um zu ermitteln, ob die identifizierten Ubiquitin-modifizierten Proteine im Phloem durch das Proteasom abgebaut werden, wurde der Phloemsaft für mehrere Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und die Veränderung des Ubiquitin-Signals über die Zeit mittels *Western Blot* analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass gerade im höher molekularen Bereich über 75 kDa das Signal im Western Blot im Vergleich zum Zeitpunkt Null deutlich abnahm, während andere kleinere Proteine scheinbar nicht abgebaut wurden, da hier das Signal über die Zeit unverändert blieb. Dies demonstriert, dass es im Phloemsaft von Raps ubiquitinierte Proteine gibt, die vermutlich über ein funktionales Proteasom direkt im Siebelementsystem abgebaut werden. Zudem existieren eine Vielzahl anderer ubiquitiniertes Proteine, die scheinbar nicht degradiert werden und das Ubiquitin hier eine andere Funktion vermittelt. Dabei wäre im Falle des untersuchten Gewebes auch das Protein *Sorting* denkbar. So konnte erstmals gezeigt werden, dass es im Phloem zur Degradation ubiquitiniertes Phloemproteine kommt und somit das Phloem direkt am Protein-Turnover beteiligt ist. Da das Phloem für die Weiterleitung von Signalen über lange Strecken fungiert, wird außerdem eine Beteiligung des Proteasoms bei der Abwehr von Pathogenen diskutiert. So nutzen Pathogene, wie Bakterien und Viren, das Phloem, um sich in der Pflanze auszubreiten (54). Letztere werden häufig von Phloemsaft-saugenden Insekten ins Phloem abgegeben (54). Um eine Verbreitung dieser Viren in der Pflanze zu verhindern und die Infektion lokal einzugrenzen werden die pathogenen Proteine über den Ubiquitin/26S-Proteasom-Degradationsweg zunächst markiert und schließlich abgebaut (148).

3.1.2.3 Weitere identifizierte Komplexe im Phloemsaft von *B. napus*

Weitere Komplexe, die im Rahmen der Komplexomanalyse nachgewiesen wurden, konnten den Myrosinase zugeordnet werden. So waren in allen vier analysierten Banden Myrosinase in Kombination mit mehreren Myrosinase-Bindeproteinen auffindbar. Bei den Myrosinase handelt es sich Enzyme, die vor allem in Brassicaceen vorkommen, große Aggregate bilden (73) und bei der Abwehr von Fraßfeinden eine wichtige Rolle einnehmen (72). Dabei katalysieren sie den Abbau der in Raps vorkommenden Glucosinolate zu Glukose, Sulfat und Cyanat, Thiocyanat, Nitril und weiteren giftigen Abbauprodukten (74), wobei stechend riechende oder scharf schmeckende Senföle entstehen. Die Bildung dieser Substanzen dient Pflanzen als Abwehrmechanismus gegen herbivore Insekten und wird insbesondere durch eine Verletzung des Pflanzengewebes induziert. Während in unverletztem Zustand sowohl Enzym als auch Substrat in unterschiedlichen Kompartimenten räumlich voneinander getrennt vorliegen, kommt es durch Verletzungen zur Freisetzung der Glucosinolate, die dann durch die Enzyme direkt zu giftigen Abbauprodukten umgesetzt werden und so vor weiterem Fraß schützen (75). Da bei der Phloemsaftentnahme mittels Exsudation das pflanzliche Gewebe verletzt wird, ist es nicht weiter verwunderlich, dass Myrosinase im Phloem gefunden wurden. Da diese allerdings in allen untersuchten Komplexen auftraten, scheinen diese zusammen mit den Myrosinase-Bindeproteinen unterschiedlich große Komplexe zu bilden. Ob es sich hierbei um unspezifische oder spezifische Aggregate handelt und ob die Größe der Myrosinasekomplexe zum Beispiel einen Einfluss auf die Enzymaktivität hat, ist nicht bekannt.

Im Gegensatz zu den Komplexen I bis III lagen im vierten Komplex keine ribosomalen oder proteasomalen Fragmente vor. Hier konnten zum einen große Proteine mit Molekulargewichten von über 100 kDa (*Putative disease resistance protein At4g19050*) und zum anderen verschiedene *Heat shock* Proteine, sowie die Cystin Lyase CORI und verschiedene tRNA-Ligasen identifiziert werden. Unter Berücksichtigung der bisher untersuchten oder vermuteten Funktionen, scheinen die identifizierten Proteine insbesondere bei pflanzlichem Stress beteiligt zu sein: Die Beteiligung der Hitzeschock-Proteine an pflanzlichem Stress konnte bereits in verschiedenen Studien gezeigt werden (149–151), wobei sie häufig als Homodimere vorliegen (151). Auch CORI konnte in *A. thaliana* als Dimer nachgewiesen werden (152) und spielt vermutlich bei verschiedensten Stressantworten eine Rolle, wobei die Induktion der CORI-Expression bei Verwundung bereits gezeigt werden konnte (153). Außerdem konnten verschiedene tRNA-Ligasen identifiziert werden. Dass es sich auch hierbei um Ribonukleoproteinkomplexe handelte, konnte Lena Krüßel über *Northern Blot* Analysen dieses Komplexes mit verschiedensten tRNA-spezifischen Sonden zeigen. Über strukturelle Analysen der Threonin--tRNA-Ligase aus *E. coli* konnte bereits gezeigt werden, dass das Protein als Homodimer zwei tRNAs bindet (154), so dass aufgrund der molekularen Größe der Einzelkomponenten von einer Komplexgröße von etwa 200 kDa ausgegangen werden kann. Ob die identifizierten Proteine allerdings größere Komplexe bilden können ist bisher nicht untersucht, so dass die Größe des Komplexes nur schwer abgeschätzt werden kann. Interessanterweise konnte in diesem Komplex auch ein sehr kleines Protein identifiziert werden. Hierbei handelte es sich um das Cyclophilin (CYP) 18-3, was etwa 20 kDa groß und vermutlich an der pflanzlichen Stressantwort beteiligt ist. So konnte beispielsweise eine erhöhte CYP18-3 Expression bei Licht, hohen Salzkonzentrationen und Verwundung (155, 156) und eine Beteiligung an der Pathogenabwehr bei *P. syringae* und *A. tumefaciens* (157, 158) gezeigt werden. Dass das Protein in einem so großen Komplex identifiziert werden konnte, lässt vermuten, dass es mit einem oder sogar mehreren anderen identifizierten Proteinen interagiert. Wobei der genaue Interaktionspartner über weitere Studien nachgewiesen werden müsste.

3.1.3 Identifizierung möglicher Nukleinsäure- und Metallionen-Bindeproteine

Neben einer Vielzahl anderer Proteine konnten in früheren Proteomstudien neben ribosomalen Proteinen auch weitere RNA-Bindeproteine gefunden werden. Sie spielen bei einer Vielzahl essentieller Prozesse in Zellen eine Rolle, wie beim RNA-Metabolismus, RNA-Transport und übernehmen vermutlich auch eine Schlüsselrolle bei der pflanzlichen Anpassung an veränderte Umweltbedingungen oder auch Stress (67). Im Phloem konnten bisher verschiedene RNA-Spezies (mRNA, miRNA, siRNA und virale RNA) nachgewiesen werden (112), wobei vermutet wird, dass das Phloem für den Transport der RNA über lange Strecken zuständig ist. So transportierte RNAs fungieren als Langstrecken-Signale (9) und sind an Prozessen wie dem *Gen-Silencing*, der Antwort gegen Parasiten und Pathogen, der Entwicklung und der Stressantwort beteiligt (67). Wie diese RNAs im Siebelementsystem transportiert werden ist bisher nicht gut analysiert, allerdings wird eine Beteiligung von RNA-Bindeproteinen diskutiert (67).

Über Analysen durch J. Latreider in der AG Kehr (MPG, Universität Hamburg) konnte gezeigt werden, dass im Phloemsaft von Raps die RNase-Aktivität inhibiert wird. Dazu wurden sowohl der proteinreiche als auch

Protein-freie Teil des Phloemsafts auf seine RNase-inhibierenden Eigenschaften hin untersucht. Während im Protein-freien Teil des Phloemsafts die Nukleasen aktiv waren, schützte der proteinreiche Anteil die zugegebenen tRNAs durch den Abbau von applizierten RNasen. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Phloem-RNAs durch RNA-bindende Phloemproteine vor der Degradation geschützt werden können. Um also RNA-Bindeproteine im Phloem zu identifizieren wurde anschließend mit nativem Phloemsaft eine Heparin-Affinitätschromatographie durchgeführt.

3.1.3.1 Identifizierung putativer Nukleinsäure-Bindeproteine aus Phloemsaft von *B. napus* mittels Heparin-Affinitätschromatographie

Bei der Heparin-Affinitätschromatographie wird als Ligand das sulfatisierte Glucosaminoglycan Heparin genutzt (Abb. 3-11). Dies fungiert zum einen als starker Kationenaustauscher und zum anderen als Affinitätsligand. An letzteren binden Proteine, die eine Affinität zu Heparin besitzen, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren, Proteinsynthesepoteine, Enzyme aber auch Nukleinsäure-Bindeproteine. Letzteres resultiert daraus, dass das Heparin aufgrund des hohen Gehalts an anionischen Sulfatgruppen die polyanionische Struktur der Nukleinsäuren imitiert (159).

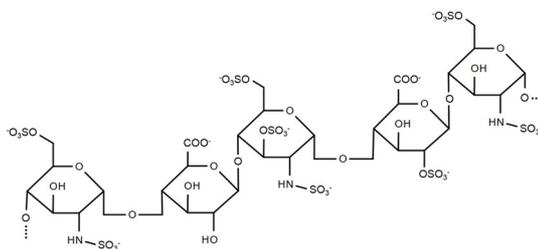


Abb. 3-11: Struktur von Heparin.

Zur partiellen Auftrennung von Phloemproteinen wurde eine Heparin-Affinitätschromatographie durchgeführt. Dazu wurden mit Puffer A (10 mM NaH_2PO_4 pH 7.0) verdünnter Phloemsaft auf eine Heparin-Säule geladen und die Proteine über einen NaCl-Gradienten eluiert (von 0 auf 2 M NaCl). Die Fraktionen wurden gesammelt und anschließend zur Aufkonzentrierung der Proteine mit einem Aceton-Methanol-DDT-Gemisch gefällt. Im Anschluss wurde die Proteinzusammensetzung der vereinten Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert. So gelang es Phloem-Proteine aufgrund ihrer Ladung über den starken Kationenaustauscher aber auch ihrer Affinität zu Heparin oder Nukleinsäuren aufzukonzentrieren (Abb. 3-12). Während zunächst über eine NaCl-Konzentration bis zu 1 M NaCl, aufgrund der Kationenaustauscheigenschaft der Säule, positiv geladene Proteine von der Säule eluierten (Fraktion 1-3), wurden bei höheren Salzkonzentrationen (von 1-2 M NaCl) spezifisch gebundene Proteine voneinander separiert. Hierbei handelte es sich möglicherweise um Proteine, die entweder Heparin als Liganden binden oder um Proteine, die mit Nukleinsäuren interagieren. Über einen Phosphoprotein-spezifischen Farbstoff konnten einige der Proteinbanden deutlich sichtbar gemacht werden, so dass ein Großteil der Proteine vermutlich phosphoryliert vorlag (Abb. 3-12 C). Zur Identifizierung der Proteine, die über Heparin angereichert werden konnten und erst bei hohen Salzkonzentrationen eluierten, wurde ein *Peptide mass fingerprint* durchgeführt. Dazu wurden die Banden ausgeschnitten, mittels Trypsin in Sequenz-spezifische Peptide verdaut und die Fragmente mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Über die MASCOT-Datenbank konnten anschließend die in der Abb. 3-12 B hervorgehobenen Proteine identifiziert werden (Tab. 3-2).

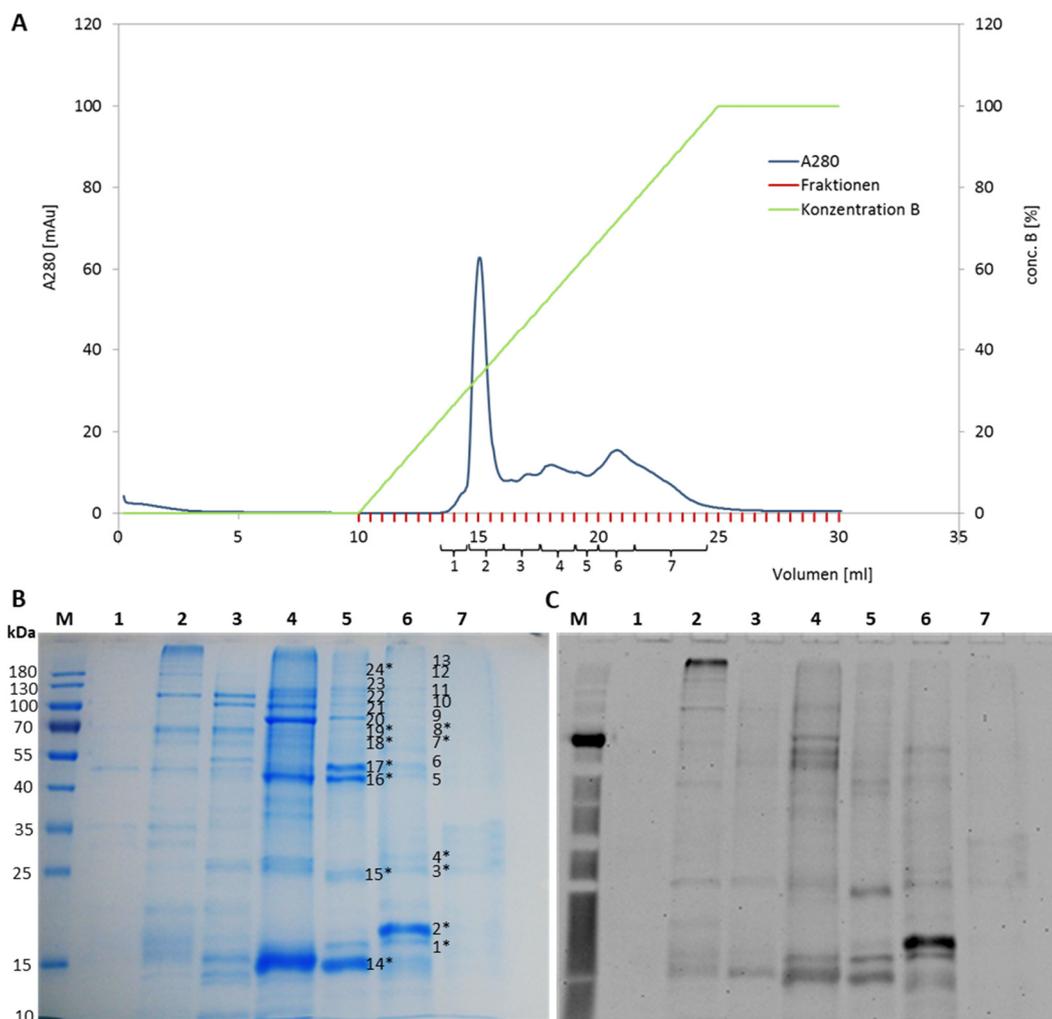


Abb. 3-12: Trennung von Phloemproteinen mittels Heparin-Affinitätschromatographie. Dargestellt ist das Chromatogramm (A). Dazu wurden 1,5 ml Phloemsaft verdünnt mit 7 ml Puffer A (10 mM NaH_2PO_4) auf eine 1 ml-Heparin-Säule geladen. Anschließend wurde über 10 Säulenvolumen mit Puffer A gewaschen und daraufhin die gebundenen Proteine über einen Gradienten von 0 bis 100 % Puffer B über 15 ml von der Säule eluiert (grüne Linie). Dabei wurden die Proteine bei einer Wellenlänge von 280 nm detektiert (blaue Linie). Im Anschluss wurden die Protein-enhaltenden Fraktionen (rot dargestellt) teilweise vereinigt und über Nacht die Proteine gefällt. Die Proteinzusammensetzung der gefällten Fraktionen (1-7) wurde anschließend mittels SDS-PAGE analysiert, wobei die Proteine sowohl mit Pro-Q Diamond Färbelösung (C) als auch mit Coomassie (B) detektiert wurden. Mit Zahlen hervorgehoben sind die Banden, die mittels *Peptide mass fingerprint* und MALDI-MS identifiziert werden sollten. Sternchen (*) markieren phosphorylierte Proteine, die über die Pro-Q Diamond Färbelösung angefärbt wurden.

Die Anreicherung von Proteinen, bei denen eine Interaktion mit Nucleinsäuren bereits nachgewiesen wurde, wie dem Elongationsfaktor 1-alpha oder auch den tRNA-Ligasen, zeigt, dass ab einer Salzkonzentration von etwa 1,2 M NaCl spezifisch gebundene Proteine von der Säule eluiert wurden. Zu den weiteren identifizierten Proteinen, die mittels der Heparin-Affinitätschromatographie angereichert werden konnten, gehören auch Nucleotid-bindende Proteine, wie beispielsweise das *GTP-binding nuclear protein*, das auch in anderen Proteomstudien im Phloemsaft von Raps schon nachgewiesen werden konnte (11) und das *Putative disease resistance protein At4g19050*, für das aufgrund von Sequenzhomologien eine ATP-Bindung und eine Beteiligung an der Pathogenabwehr vermutet wird. Außerdem konnten Proteine isoliert werden, die bereits gut charakterisiert sind, für die jedoch bisher weder eine Interaktion mit Glykosaminoglykanen noch mit Nucleinsäuren nachgewiesen werden konnte: Cystin Lyase (CORI), *Cobalamin-independent methionine Synthase* und *Sieve element occlusion (SEO) Protein*. Letzteres wurde

erstmalig in *Fabaceae* entdeckt, inzwischen wurden aber auch in *A. thaliana* zwei SEO-Gene identifiziert (160). Die SEO-Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Verwundung des Siebelementsystems, wobei sie große Aggregate bilden und so den weiteren Austritt von Phloemsaft verhindern (161). Allerdings konnte auch hier eine Interaktion mit Polysacchariden oder auch Nucleinsäuren bisher nicht gezeigt werden. Ein weiteres Protein, das angereichert werden konnte, ist das *Myrosinase-binding protein 2*. Dieses bildet wie bereits oben beschrieben zusammen mit den Myrosinase große Komplexe im Siebelementsystem. Dass diese Proteine mittels der Heparin-Affinitätschromatographie angereichert werden konnten, resultiert vermutlich aus der strukturellen Ähnlichkeit der Glucosinolate mit dem Glykosaminoglykan Heparin, die beide sulfatisierte Seitengruppen aufweisen.

Tab. 3-2: Über MS-Analysen identifizierte Proteine der Heparin-Affinitätschromatographie Abb. 3-12.

Spot Nr.	MW obs. [kDa]	Identifizierung	Organismus	Accession Nr.	MW [kDa]	MASCOT Score	Sequenz-abdeckung %
1	16	Uncharakterisiertes Protein At1g64370	B. n	XP_013661529	16,6	95	56/100
2	17	Uncharakterisiertes Protein At1g64370	B. n	XP_013661529	16,6	95	46/100
3	24	Histidine-rich glycoprotein-like	B. r	XP_009105339	22,5	53	30/100%
4	26	n.i.					
5	45	Cystine lyase COR13-like	B. o	XP_013628642	47,6	149	58/91
6	46	Elongation factor 1- alpha	B. n	CDY61938	46,9	101	42/99
7	56	n.i.					
8	60	Protein NETWORKED 4B-like	B. n	XP_013733946	54,6	100	37/98
9	70	n.i.					
10	80	Sieve element occlusion	B. n	CDY37506	84,7	91	24/90
11	110	n.i.					
12	130	Putative disease resistance protein At4g19050	B. n	CDX78917	131,1	178	26/99
13	200	n.i.					
14	15	Dehydrin HIRD11	B. r	XP_009136136	10,5	109	63/92
15	25	GTP-binding nuclear protein	B. r	Bra035562.1	27,9	86	36/77
16	50	Cystine lyase COR13-like	B. o	XP_013628642	47,6	225	68/91
17	46	Elongation factor 1-alpha	B. n	CDY61938	46,9	81	37/99
18	60	Aspartate--tRNA ligase 2	B. n	XP_013679459	61,6	169	40/99
19	70	Lysine--tRNA ligase-like	B. n	XP_013644762	69,1	102	34/100
20	80	Cobalamin-independent methionine Synthase	B. n	XP_013722294	84,4	176	33/94
21	100	n.i.					
22	110	n.i.					
23	120	Myrosinase-binding protein 2-like	B. n	XP_013655529	115,6	186	26/100
24	180	n.i.					

Abkürzungen: B. n: *Brassica napus*; B. o: *Brassica oleracea*; B. r: *Brassica rapa*; n.i.: nicht identifiziert.

Ein weiteres Protein, welches abundant im Phloem vorkommt und erst bei hohen Salzkonzentrationen von der Säule eluiert werden konnte, ist das *Brassica napus* Homolog des Dehydrins HIRD11 aus *A. thaliana*. Dieses ist bereits gut charakterisiert, jedoch besitzt es weder bekannte Nucleinsäure-Bindedomänen noch konnte eine Interaktion mit Nucleinsäuren oder auch Polysacchariden nachgewiesen werden. Die Bindung des Proteins ist dabei vermutlich auf das C-terminal gelegene Lysin-reiche Segment (KKKKKDKKEKK) zurückzuführen, welches aufgrund der starken positiven Ladung mit Polyanionen interagieren kann. Somit handelt es sich bei dem HIRD11 um ein putatives RNA-Bindeprotein, dessen Interaktion mit RNA jedoch noch genauer untersucht werden muss.

Auch konnten über diese Methode zwei bisher nicht charakterisierte Phloemproteine identifiziert werden. Dazu zählen zum einen das putative *Histidine-rich glycoprotein*, das im Phloem von Raps bisher nicht identifiziert werden konnte, und zum anderen ein Homolog des At1g64370-Proteins, eines in *A. thaliana* bisher uncharakterisierten Proteins, das im Phloensaft abundant auftritt und scheinbar stark phosphoryliert vorliegt. Obwohl beiden Proteinen noch keine Funktion zugeordnet werden konnte, lässt sich für das At1g64370-Homolog vermuten, dass es ähnlich wie das HIRD11 mit dem Heparin interagiert, da es ebenfalls ein Lysin-reiches Segment (EKKLLKKQNEHKKKKKNKDG) aufweist. Außerdem konnten beide Proteine in unterschiedlichen Banden identifiziert werden, was entweder darauf zurückzuführen ist, dass im *B. napus* Phloensaft mehrere Isoformen des Proteins vorliegen oder die Proteine möglicherweise unterschiedliche Modifizierungen tragen.

Über die Heparin-Affinitätschromatographie mit nativem Phloensaft konnten somit verschiedenste Phloemproteine angereichert werden. Beim Heparin handelt es sich um ein verestertes Glykosaminoglykan, das nur in menschlichen und tierischen Geweben vorkommt und sich aus D-Glucosamin und einer Uronsäure zusammensetzt. Es fungiert somit zum einen als Ligand, imitiert zum anderen aber auch die polyanionische Struktur von Nukleinsäuren. Somit kann es sich bei den Proteinen, die sich erst bei einer hohen Ionenstärke vom Liganden lösen, entweder um Proteine handeln, die mit Glycosaminoglykanen oder mit Nukleinsäuren interagieren. Um genauer differenzieren zu können, ob es sich bei den separierten Proteinen um Nukleinsäure- oder spezifische Heparinbinder handelt, ist es notwendig diese Interaktionen mittels *in vitro*-Studien genauer zu verifizieren. Im Falle der Interaktion mit RNA oder DNA könnten beispielsweise *Shift-Assays* oder auch *MicroScale* Thermophorese-Studien genauere Einblicke geben.

3.1.3.2 Identifizierung von Phloemproteinen mit Metallionenbinde-eigenschaft

Pflanzen benötigen zum Überleben Mikronährstoffe wie Eisen (Fe), Mangan (Mn), Zink (Zn), Kobalt (Co) und Kupfer (Cu). Diese werden durch die Wurzel aufgenommen und über komplexe Wege innerhalb der Pflanze verteilt. Bei der Verteilung dieser Mikronährstoffe über weite Strecken spielt das Leitgefäßsystem eine wichtige Rolle. Da aber freie Metalle auch toxisch wirken, wird vermutet, dass diese Metalle in Pflanzensäften nicht als freie Ionen vorkommen, sondern als weniger chemisch reaktive Formen vorliegen. Als mögliche Liganden werden in erster Linie keine Moleküle wie Citrat und Malat, Aminosäuren (NA, H, C), Phytosiderophore aber auch Peptide und Proteine (zum Beispiel Metallothioneine) diskutiert (162). Im Falle von toxischen Metallen wie Cadmium und Quecksilber reagieren Pflanzen mit der Herstellung von Phytochelatinen, die diese Ionen abfangen (162). Die Mikronährstoffe sind für unterschiedliche zelluläre Prozesse notwendig, so fungieren sie zum einen als Cofaktoren von Enzymen, sind zum anderen aber auch zur Stabilisierung von Nukleinsäure-Protein-Interaktionen zuständig.

Um Phloemproteine zu identifizieren, die eine Affinität zu Metallionen besitzen, wurde mit nativem Phloensaft eine *Immobilised metal affinity chromatography* (IMAC) mit verschiedenen Metallionen (Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} und Zn^{2+}) durchgeführt. Die Elution der spezifisch gebundenen Proteine erfolgte mittels EDTA und die eluierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE separiert und anschließend mittels *Peptide mass*

fingerprint identifiziert. Als Negativkontrolle wurde auch unbeladenes Säulenmaterial mit Phloemsaft behandelt, um unspezifische Interaktionen auszuschließen.

Wie aus der Abb. 3-13 hervorgeht, konnten so Proteine aus dem Phloemsaft von Raps aufgrund ihrer Interaktion mit Metallionen isoliert werden. Dabei konnten die in der Tab. 3-3 aufgelisteten Proteine identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um ein Homolog des Dehydrin HIRD11, für das bereits eine Interaktion mit Kupfer, Cobalt, Nickel und Zink gezeigt werden konnte (163) und wobei vermutet wird, dass dies der Reduktion der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies dient.

Ein weiteres Protein, was aber ausschließlich mittels der IMAC mit Kupfer angereichert werden konnte ist eine Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase (PPIase). Diese weist eine Sequenzähnlichkeit von 92,9 % zu der in *A. thaliana* gut untersuchten PPIase

CYP19-1 auf und ist an der Proteinfaltung beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass das CYP19-1-Gen unter bestimmten Stressbedingungen wie Licht, Verwundung und Pathogeninfektion hoch reguliert ist (155) und dass es bei Pathogenbefall an der Herstellung von ROS beteiligt ist (156). Hier konnte bisher allerdings eine Bindung an Kupferionen noch nicht identifiziert werden. Jedoch konnte für ein Cyclophilin-Gen aus Hefe (Cpr1) demonstriert werden, dass bei dessen Überexpression in *Saccharomyces cerevisiae* die Stresstoleranz gegenüber den Stressoren Cadmium, Kupfer, Kobalt und Wasserstoffperoxid erhöht (164), so dass eine Bindung an Ionen durchaus denkbar wäre. Ein weiteres Protein, das mittels der Interaktion an Kupfer und Zink isoliert werden konnte, ist die Amylase. Die Amylase konnte bereits im Phloem von Brassicaceen nachgewiesen werden (165) und dabei handelt es sich um ein Enzym, das Polysaccharide abbaut, indem es die Glykosidbindung spaltet. Zwar benötigen einige Amylasen spezifische Ionen (zum Beispiel Ca^{2+} oder Mg^{2+}) für ihre Aktivität, allerdings konnte für eine alpha-Amylase aus *Bacillus subtilis* gezeigt werden, dass diese bei Anwesenheit von Cu^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} sowie Ba^{2+} inhibiert wird (166). Daher könnte man davon ausgehen, dass es sich bei der Bindung an Cu^{2+} , Co^{2+} oder auch Zn^{2+} um eine kompetitive Bindung handelt, also der Cofaktor verdrängt wird, woraus eine reduzierte Enzymaktivität resultiert. Neben den schon gut charakterisierten Proteinen konnten außerdem zwei Proteine mit möglicher Bindeaffinität zu Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} und Zn^{2+} angereichert werden, deren Funktion bisher noch nicht genauer analysiert wurde. Hierbei handelte es sich wiederum um das *Histidine-rich Glycoprotein* und ein Homolog des uncharakterisierten Proteins At1g64370. Während ersteres vermutlich über die zahlreichen Histidine mit

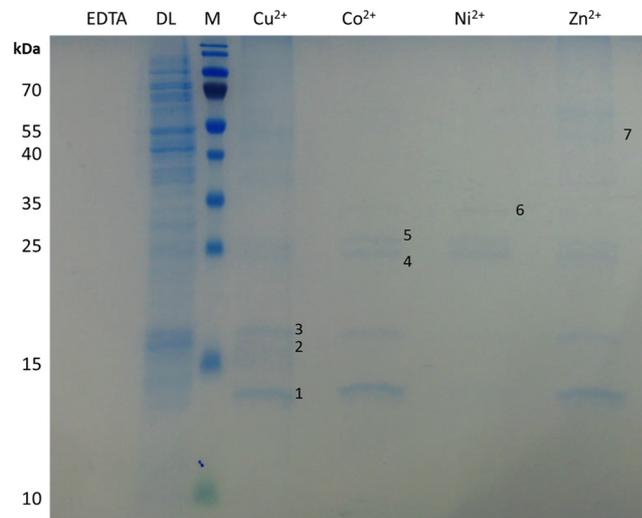


Abb. 3-13: IMAC von nativem Phloemsaft aus *B. napus*. Dafür wurden 30 μl der NTA-Beads unbeladen (EDTA) oder mit Kupfer (Cu^{2+}), Kobalt (Co^{2+}), Nickel (Ni^{2+}) und Zink (Zn^{2+}) beladen mit 300 μl Phloemsaft inkubiert, der Durchlauf (DL) der Ni-Säule aufgefangen und nach diversen Waschschritten mit einer hohen Salzkonzentration (1 M NaCl) die angereicherten Proteine mittels EDTA eluiert. 15 μl der Elutionsfraktionen wurden auf ein 15%-iges SDS-Gel aufgetragen, separiert und mittels kolloidalem Coomassie gefärbt. Als Größenstandard fungierte der PageRuler Plus (M) verwendet und die angereicherten und mittels *Peptide mass fingerprint* analysierten Banden sind mit Nummern markiert.

Tab. 3-3: Mittels *Peptide mass fingerprint* identifizierte Phloemproteine mit Metallbindeigenschaften.

Nr.	MW _{obs} [kDa]	Identifizierung	Organismus	Accession Nr.	MW [kDa]	MASCOT Score	Sequenzabdeckung	Bindung an
1	14	Dehydrin HIRD11	<i>B. rapa</i>	XP_009136136.1	10,5	133	65/98%	Cu ²⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺ , Zn ²⁺
2	15	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	<i>B. oleracea</i>	XP_013611453.1	18,4	115	51/100%	Cu ²⁺
3	17	Uncharakterisiertes Protein At1g64370-Homolog	<i>B. napus</i>	XP_013661529.1	16,6	138	58/100%	Cu ²⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺ , Zn ²⁺
4	24	Histidine-rich glycoprotein-like isoform X2	<i>B. oleracea</i>	XP_013587768.1	25,0	72*	30/100%	Cu ²⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺ , Zn ²⁺
5	25	Histidine-rich glycoprotein-like isoform X2	<i>B. oleracea</i>	XP_013587768.1	25,0	147	32/100%	Cu ²⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺ , Zn ²⁺
6	30	Histidine-rich glycoprotein-like isoform X2	<i>B. oleracea</i>	XP_013587768.1	25,0	64*	24/100%	Co ²⁺ , Ni ²⁺
7	45	Probable alpha-Amylase 2	<i>B. napus</i>	XP_013717940.1	47	119	30/77 %	Cu ²⁺ , Zn ²⁺

* über MALDI-TOF-MS/MS eindeutig identifiziert.

den Ionen interagiert, konnte anhand von Sequenzanalysen die Bindung des At1g64370 an Ionen nicht erklärt werden.

So konnten mehrere mögliche Phloemproteine mit Affinität zu Ionen identifiziert werden. Ob es sich bei den hier identifizierten Proteinen tatsächlich um Metallionenbinder handelt und ob sie Aufgaben beim Transport von Ionen oder der Verhinderung von ROS übernehmen, müsste jedoch über weitere *in vitro*-Studien genauer verifiziert werden.

3.1.4 Auftrennung von Phloemproteinen bezüglich ihrer Hydrophobizität

In Proteinen existieren sowohl hydrophobe als auch hydrophile Bereiche. Diese werden durch die jeweilige Aminosäurezusammensetzung festgelegt und die Hydrophobizität eines Proteins korreliert mit der Proteinfaltung. Dabei sind hydrophobe Aminosäuren eher im Kern eines Proteins verborgen, während polare Aminosäuren der Oberfläche zugewandt sind (167). So nimmt das Protein eine dreidimensionale Struktur an, die eng mit der Funktion des Proteins verbunden ist. Jedoch konnte mit fortschreitender Technik (SAXS, NMR) in der Strukturaufklärung gezeigt werden, dass ein Großteil des Proteoms insbesondere in höheren Organismen strukturell ungeordnet ist, dieser jedoch wichtige Funktionen übernimmt (168). Kommen diese Bereiche der Unordnung in bestimmten Abschnitten von Proteinen vor, so bezeichnet man diese als intrinsisch ungeordnete Regionen (*intrinsically disordered regions*, IDR), erstrecken sie sich allerdings über das gesamte Protein, so spricht man von intrinsisch ungeordneten Proteinen (*intrinsically disordered proteins*, IDP). Letztere weisen teilweise oder ausschließlich geladene und polare Aminosäuren auf, was verhindert, dass sie eine gut definierte, stabile und globuläre dreidimensionale Struktur ausbilden (169). Stattdessen sind sie hochgradig dynamisch und flexibel und können innerhalb kürzester Zeit verschiedenste Konformationen annehmen. Diese Flexibilität macht es möglich, dass diese Proteine nicht eine bestimmte Funktion, sondern vielmehr verschiedene Funktionen übernehmen können. So wird beispielsweise eine Beteiligung an regulatorischen Prozessen, aber auch

zellulären Signalprozessen vermutet (170). Um zu analysieren, ob im Phloemsaft von Raps solche Proteine existent sind, die stark ungeordnet sind und somit verschiedenste Aufgaben, auch im Hinblick auf abiotischen und biotischen Stress übernehmen können, wurde 6-fach konzentrierter, nativer Phloemsaft über eine Kombination von zwei denaturierenden PAGEs aufgetrennt. Dabei wurde zunächst eine Tris-Tricin-Urea PAGE in einem 10 %-igen Gel und anschließend eine SDS-PAGE in einem 15 %-igen Gel durchgeführt. Über die Kombination dieser beiden PAGEs lassen sich aufgrund der An- und Abwesenheit von Urea und der unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen gleich große Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Hydrophobizität separieren.

Das Ergebnis der durchgeführten PAGEs ist in der Abb. 3-14 dargestellt und zeigt, dass so besonders im Bereich bis etwa 40 kDa deutliche Protein-Spots unterhalb der Diagonalen auftraten. Hierbei handelt es sich

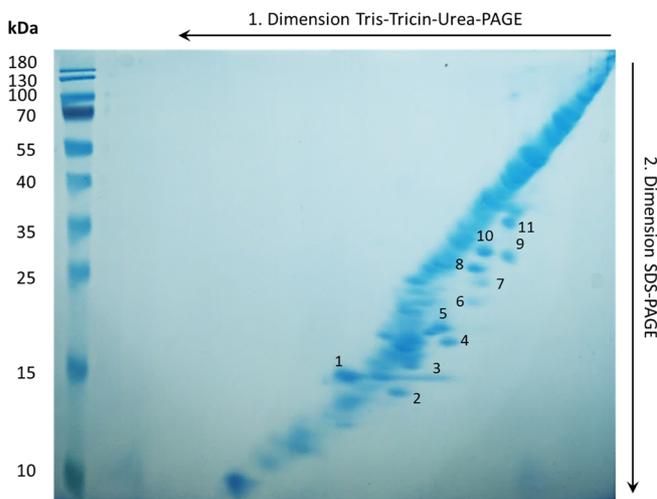


Abb. 3-14: Auftrennung von Phloemproteinen nach ihrer Hydrophobizität. Dazu wurden 20 µl des 6-fach konzentrierten Phloemsafts versetzt mit 2x Urea-Ladepuffer zunächst mittels Tris-Tricin-Urea PAGE (10 %-iges Gel) separiert. Im Anschluss wurde der Gelstreifen auf ein 15 %-iges SDS-Gel überführt und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die finale PAGE wurde mit kolloidalem Coomassie gefärbt und die Proteine von Interesse, die mittels MALDI-TOF-Analyse identifiziert werden sollten, mit Nummern markiert.

um Proteine mit stark hydrophilen Eigenschaften. Die Trennung der Proteine nach ihrer Hydrophobizität ist auf die unterschiedlichen Migrationseigenschaften der Proteine zurückzuführen, die aufgrund der unterschiedlichen Aminosäurezusammensetzung bei An- und Abwesenheit von Urea unterschiedliche elektrophoretische Mobilitäten aufweisen. So verursacht Urea eine veränderte Bindung von SDS an die Proteine und somit eine anormale Migration stark hydrophober Proteine in den unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen. Infolge dessen wandern stark hydrophobe Proteine schneller als wasserlösliche und

moderat hydrophobe Proteine gleicher molekularer Masse durch die erste Dimension mit geringer Acrylamidkonzentration. In der zweiten Dimension bei hoher Acrylamidkonzentration weisen diese Proteine hingegen eine normale elektrophoretische Mobilität auf. Daraus resultiert schließlich, dass die hydrophoben Proteine in der finalen PAGE in und oberhalb der Diagonalen migrieren, während hydrophile Proteine unterhalb dieser Diagonalen zu finden sind (118).

Die Spots (2-11), die unterhalb der Diagonale migrierten und somit putativ hydrophile Eigenschaften aufwiesen, wurden in-Gel trypsinisiert, um anschließend mittels *Peptide mass fingerprint*-Methode die Identität der Proteine zu analysieren (Tab. 3-4). Da Spot 1 ebenfalls eine deutlich andere Migration aufwies, wurde dieses Protein ebenfalls analysiert. Hierbei handelte es sich wiederum um das Dehydrin HIRD11, welches außerdem unterhalb der Diagonale (Spot 3) identifiziert werden konnte. Beim HIRD11 handelt es sich um ein Dehydrin. Dehydrine bilden eine Untergruppe der LEA-Proteine, zeichnen sich durch einen

Tab. 3-4: Mittels *Peptide mass fingerprint* identifizierte Phloemproteine mit stark hydrophilen Eigenschaften.

Nr.	MWobs [kDa]	Identifizierung	Accession	Organismus	MW [kDa]	Sequenzabdeckung	MASCOT Score	GRAVY
1	15	Dehydrin HIRD11	XP_009136136.1	<i>B. rapa</i>	10,5	66/98 %	172	-1,889
2	14	Profilin-1	CDY68825.1	<i>B. napus</i>	14,1	40/61 %	MS/MS	-0,212
3	15	Dehydrin HIRD11	XP_009136136.1	<i>B. rapa</i>	10,5	53/98 %	MS/MS	-1,889
4	18	Eukaryotic translation initiation factor 5A-2	XP_009110029.1	<i>B. rapa</i>	17,1	87/100 %	92	-0,399
5	20	Uncharakterisiertes Protein At1g64370-Homolog	CDY46524.1	<i>B. napus</i>	16,6	63/100 %	90	-1,675
6	22	Histidine-rich glycoprotein-like	XP_009105339.1	<i>B. rapa</i>	22,5	29/100 %	96	-1,321
7	23	n.i.						
8	24	Histidine-rich glycoprotein-like	XP_013649273.1	<i>B. napus</i>	26,4	33/80 %	85	-1,287
9	25	Histidine-rich glycoprotein-like Isoform X1	XP_009105086.1	<i>B. rapa</i>	27,9	35/72 %	79	-1,349
10	25	Histidine-rich glycoprotein-like Isoform X2	XP_013587768.1	<i>B. oleracea</i>	25,0	41/80 %	78	-1,386
11	30	Histidine-rich glycoprotein-like Isoform X1	XP_009105086.1	<i>B. rapa</i>	27,9	46/69 %	101	-1,349

hohen Gehalt an Glycin und den kleinen Aminosäuren Serin sowie Alanin aus und sind bedingt durch ihre Aminosäurezusammensetzung stark hydrophil (94). Dies beweist auch der Grad an Hydrophobizität (*Grand average of hydropathicity*, GRAVY) von -1,889. Somit handelt es sich um ein wenig hydrophobes Protein und müsste unterhalb der Diagonalen migrieren. Allerdings konnte das Dehydrin in zwei verschiedenen *Spots* identifiziert werden: Während ein Großteil des Proteins oberhalb der Diagonalen zu finden war (*Spot* Nr. 1), konnte auch ein kleiner Anteil unterhalb der Diagonalen identifiziert werden (*Spot* Nr. 3). Somit scheinen im Phloemsaft von Raps zwei verschiedene Formen des Proteins vorzuliegen, wobei es sich möglicherweise um unterschiedlich posttranslational modifizierte Formen des Proteins handelt. So wird beispielsweise für das HIRD11 eine Phosphorylierung durch die Casein Kinase II vermutet (171). Für verschiedene Dehydrine konnte gezeigt werden, dass sie bei Anwesenheit von SDS nicht entfaltet werden, sondern im Gegenteil strukturell geordneter vorliegen (172, 173), was auf die Anwesenheit des Dehydrin-spezifischen K-Segments zurückgeführt wird (173). Auch das Dehydrin HIRD11 besitzt ein solches K-Segment und obwohl es für dieses Protein noch nicht gezeigt wurde, könnte es ebenfalls mit SDS interagieren, was wiederum die veränderte Migration des Proteins in den beiden durchgeführten PAGEs erklären könnte.

Außerdem konnten wiederum zwei uncharakterisierte Proteine identifiziert werden, ein Homolog des At1g64370-Proteins und ein *Histidine-rich Glycoprotein*. Beide weisen einen sehr negativen theoretischen GRAVY auf, so dass ihr Migrationsverhalten in der 2D-PAGE nicht überraschend ist. Während das At1g64370-Protein allerdings nur in einem *Spot* nachgewiesen werden konnte (*Spot* 5), scheinen vom *Histidine-rich Glycoprotein* verschiedene Isoformen zu existieren (*Spot* 6,8,9,10,11). Aufgrund ihrer Position im Gel scheinen diese Proteine sich einerseits in ihrer Größe und andererseits in ihrer hydrophoben Eigenschaft zu unterscheiden. Außerdem wurden ein Homolog des *Eukaryotic translation initiation factor 5A-2* sowie das Profilin-1 identifiziert. Beide sind weit unterhalb der Diagonalen zu finden, weisen

allerdings eine moderate Hydrophobizität auf. Ersteres ist in *A. thaliana* gut untersucht und handelt sich um ein Phosphoprotein, das den programmierten Zelltod bei Infektion mit virulenten Pathogenen reguliert (174, 175). Beim Profilin-1 handelt es sich um ein im Cytosol vorkommendes, kleines Aktin-bindendes Protein, das am Aufbau des Cytoskeletts beteiligt ist. Die meisten der bisher in Pflanzen identifizierten Profileine besitzen ein MAP-Kinase Phosphorylierungsmotiv und sind phosphoryliert (176). Durch diese posttranslationalen Modifizierungen könnte sich durch Anhängen einer Ladung die Hydrophobizität des Proteins im Vergleich zum theoretischen GRAVY des unmodifizierten Proteins ändern, wodurch sich das Migrationsverhalten verändert. Diese beiden Proteine zeigen, dass der GRAVY nur eine theoretische Größe ist, die durch verschiedene Faktoren, beispielsweise posttranslationale Modifizierungen oder Bindung an Liganden, beeinflusst werden kann. Daher ist diese Methode gut, um sich einen ersten Überblick zu verschaffen, allerdings muss die genaue Struktur der jeweiligen Proteine über spätere Analysen genauer untersucht werden.

3.2 Charakterisierung eines bisher unbekanntes Phloemproteins

Im Rahmen der Proteomstudien mit Phoemsaft von Raps trat ein Homolog des bisher uncharakterisierten At1g64370-Proteins immer wieder in Erscheinung. Hierbei handelt es sich um ein scheinbar stark phosphoryliertes, abundantes Phloemprotein mit möglicherweise ungeordneter Struktur und der Eigenschaft an Nukleinsäuren sowie Ionen zu binden. Somit kann es scheinbar vielfältige Funktionen übernehmen und so möglicherweise bei Stress eine wichtige Rolle im Langstreckentransportsystem von Raps einnehmen. Daher sollte neben der strukturellen Charakterisierung, die von S. Ostendorf übernommen wurde, eine funktionelle Charakterisierung des Proteins im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt werden.

3.2.1 *In silico*-Analysen des bisher uncharakterisierten Proteins At1g64370

Das 19,7 kDa große At1g64370-Protein aus *A. thaliana* umfasst 178 Aminosäuren, während dessen Orthologe aus Raps vermutlich im Laufe der Evolution auf 151 Aminosäuren verkürzt wurden und somit nur noch ein Molekulargewicht etwa 16 kDa aufweisen (Abb. 3-15).

```

A. thaliana  MQYYENREKDYEVAQGQRNGYGQSQSHNHEGYGQSQRGGYGQIHNREGYNQNREGYSQSQRVPVYGL
B. napus     MQYYETREKEYYDVAQGQ-----SRQSYGQNHQGYGQSQRVPVYGN
          *****.***:***:*****                      .*:.*.***:*.*****

A. thaliana  SPTLNHRSHGGFLDGLFKGQNGQKQSGGLGTLGQHKSQEAKKSQGHGKLLGQHDQKKTHTNSGLNGL
B. napus     SPTLNYSRSHGGFLDGLFKGKNGQKQNGLGSFLGQHKNQDTNQGHGKLLGQH-QKKTHTNKGVNGL
          *****:*****:*****.***:*****.***:*****.*****:*****.***

A. thaliana  GMFINNGEKKHRRKSEHKK-KNKDGHGSGNEESGSSSGSDSD
B. napus     GMFINNGEKKHKKQNEHKKKKKNKDGHASGNEESGSSSGSDSE
          *****:*.*** *****.*****:
                    Lysin-reich          Serin-reich
    
```

Abb. 3-15: Sequenz-Alignment des uncharakterisierten Proteins At1g64370 aus *A. thaliana* und *B. napus*. Das Alignment wurde mit T-Coffee durchgeführt (278–282) und zeigt, dass die Sequenz bis auf einen 28-Aminosäuren langen Bereich am N-Terminus hoch konserviert ist. Außerdem gibt es einen Lysin- und einen Serin-reichen Bereich, der jeweils farblich hervorgehoben ist.

Beide Proteine zeichnen sich durch einen hohen Anteil an Glycin, Lysin, Glutamin, Asparagin und Serin aus und besitzen keine Struktur-gebenden Aminosäuren wie Cystein und Tryptophan (Tab. 3-5). Aufgrund der

Tab. 3-5: Aminosäurezusammensetzung und biochemische Eigenschaften des At1g64370-Proteins aus *A. thaliana* und des Orthologs aus *B. napus*.

At1g64370 Protein aus <i>A. thaliana</i>			At1g64370-Homolog aus <i>B. napus</i>		
Ala (A)	2	1.1%	Ala (A)	2	1.3%
Arg (R)	9	5.1%	Arg (R)	4	2.7%
Asn (N)	14	7.9%	Asn (N)	12	8.0%
Asp (D)	6	3.4%	Asp (D)	6	4.0%
Cys (C)	0	0.0%	Cys (C)	0	0.0%
Gln (Q)	19	10.7%	Gln (Q)	12	8.0%
Glu (E)	11	6.2%	Glu (E)	9	6.0%
Gly (G)	32	18.0%	Gly (G)	26	17.3%
His (H)	12	6.7%	His (H)	15	10.0%
Ile (I)	2	1.1%	Ile (I)	1	0.7%
Leu (L)	10	5.6%	Leu (L)	7	4.7%
Lys (K)	16	9.0%	Lys (K)	19	12.7%
Met (M)	2	1.1%	Met (M)	2	1.3%
Phe (F)	4	2.2%	Phe (F)	5	3.3%
Pro (P)	2	1.1%	Pro (P)	2	1.3%
Ser (S)	21	11.8%	Ser (S)	13	8.7%
Thr (T)	4	2.2%	Thr (T)	6	4.0%
Trp (W)	0	0.0%	Trp (W)	0	0.0%
Tyr (Y)	10	5.6%	Tyr (Y)	7	4.7%
Val (V)	2	1.1%	Val (V)	2	1.3%

Organismus	pl	Anzahl positiver Aminosäuren	Anzahl negativer Aminosäuren	Anteil Glycin [%]	GRAVY
<i>A. thaliana</i>	9,56	25	17	18 %	-1.634
<i>B. napus</i>	9.57	23	15	17,3 %	-1.687

Aminosäurezusammensetzung ergibt sich für das uncharakterisierte Protein ein relativ hoher isoelektrischer Punkt (pI) von etwa 9,5 und ein stark negativer GRAVY (*Grand average of hydropathicity*) von -1,6, so dass das Protein vermutlich stark hydrophil ist.

Über die anschließend durchgeführten strukturellen Vorhersagen mittels IUPred (177, 178) zeigte sich, dass die Proteine insgesamt strukturell stark ungeordnet sind (Abb. 3-16). Dies konnte bereits über die 2D-PAGE mit Phloemsaft gezeigt werden, wobei die Proteine nach ihren hydrophoben

Eigenschaften voneinander separiert wurden (3.1.4). Auch die strukturellen Analysen durch S. Ostendorf konnten belegen, dass das Protein komplett ungeordnet ist, so dass das Protein den intrinsisch ungeordneten Proteinen (*intrinsically disordered proteins*, IDP) zugeordnet werden kann. Ein statistischer Sequenzvergleich aller bisher identifizierter IDPs zeigt, dass sie sich in ihrer Aminosäurezusammensetzung

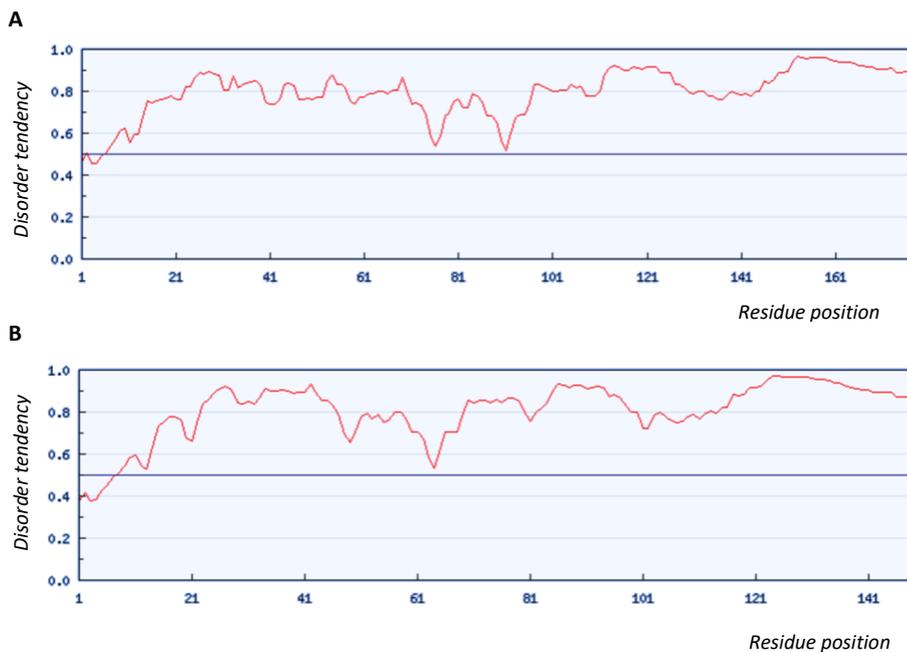


Abb. 3-16: In silico-Analyse der Struktur des At1g64370-Protein aus *A. thaliana* (A) und des Orthologs aus *B. napus* (B) mittels IUPred (177, 178). Für beide Proteine wird dabei eine hochgradig ungeordnete Struktur vorhergesagt.

stark ähneln: Dabei wird deutlich, dass hydrophobe Aminosäurereste, die die Faltung und somit Ordnung fördern (Asn, Cys, His, Ile, Leu, Phe, Thr, Trp, Tyr, Val), eher weniger vorkommen, während polare, geladene Aminosäuren (Arg, Asp, Lys, Gln, Glu, Met, Pro, Ser) stark vertreten sind (179). Solche IDPs wurden seit Mitte der Neunziger Jahre zunehmend und in nahezu allen Organismen identifiziert und sind vor allem in Eukaryoten weit verbreitet (180). Inzwischen ist bekannt, dass diese hoch flexiblen Proteine an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt sind. Dazu zählen neben der Regulation des Wachstums und der Entwicklung auch die Beteiligung an der Stressantwort (169). Eine Protein-Klasse, die alle genannten Eigenschaften aufweist sind die Hydrophiline: Diese besitzen einen hohen Anteil an kleinen Aminosäuren wie Alanin und Serin, sind stark hydrophil, besitzen eine niedrige molare Masse (< 40 kDa), einen hohen Glycin-Anteil (> 6%) und einen negativen GRAVY (94). Bedingt durch all diese Eigenschaften weisen sie keine geordnete Sekundärstruktur auf, sind im nativen Zustand hochgradig flexibel und spielen häufig bei zellulären Prozessen, bei denen osmotischer Stress involviert ist, eine wichtige Rolle (80). Proteine, die diese Hydrophilin-Eigenschaften aufweisen und bei Wasserstress eine Rolle einnehmen, sind Mitglieder der als erstes in Pflanzen beschriebenen LEA-Proteine. Sie wurden inzwischen auch in anderen Organismen identifiziert (90) und stabilisieren bei Wasserstress Proteine und Membranen, binden an Ionen und wirken so antioxidantisch (181).

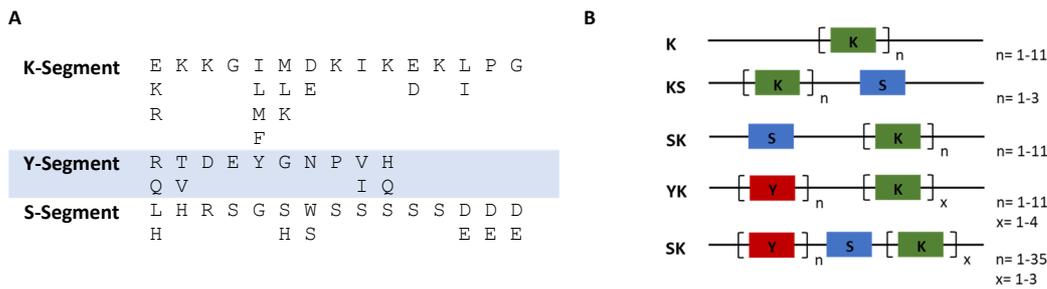


Abb. 3-17: Darstellung der Sequenzmotive von Dehydrinen. Dabei besitzen die jeweiligen Segmente eine unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung (A) und bedingt durch die Anwesenheit und Anordnung der Segmente ergeben sich unterschiedliche Untergruppen der Dehydrine (B).

Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten werden die LEA-Proteine in sieben Gruppen eingeteilt, die bereits ausführlich beschrieben wurden (94, 95, 181). LEA-Proteine der Gruppe 2 werden auch als Dehydrine bezeichnet und kommen ausschließlich in Pflanzen vor (94). Sie besitzen in der Regel kein Tryptophan und Cystein und weisen bestimmte Sequenzmotive auf, aufgrund derer sie in unterschiedliche Untergruppen eingeteilt werden (Abb. 3-17). Ein für Dehydrine essentielles Motiv ist das 15-Aminosäure lange K-Segment (EKKGIMDKIKEKLP), welches zwischen mindestens einer und bis zu elf Kopien im Protein vorliegt. Ein weiteres Motiv, das viele Dehydrine aufweisen ist das Y-Segment, [V/T]D[E/Q]YGNP, welches in mehreren Wiederholungen (bis zu 35) am N-Terminus vorkommt und das S-Segment, eine Reihe von mehreren Serinresten, die möglicherweise phosphoryliert werden können (85, 182). Aufgrund des Vorhandenseins sowie der Anordnung dieser Segmente innerhalb des Proteins existieren fünf verschiedene Untergruppen der Dehydrine (Abb. 3-17 B) (183). Um zu analysieren, ob es sich bei dem unbekanntem Phloemprotein um ein LEA-Protein handelt, wurde basierend auf Hundertmark und Hinch (96), die Sequenzen aller bisher bekannten LEA-Proteine und die Sequenz des At1g64370-Proteins miteinander verglichen (Abb. 3-18).

Demnach ist das At1g64370 (Abb. 3-18 Nr. 52) der Familie der LEA-Proteine zuzuordnen, wobei es die größten Homologien zu der Untergruppe der Dehydrine aufweist. Dabei konnte das Dehydrin HIRD11 (Nr. 8) als nächster Verwandter des At1g64370 identifiziert werden. Vergleicht man die Sequenzen des At1g64370-Proteins und des KS-Typ-Dehydrins HIRD11 miteinander (Abb. 3-19), so zeigt sich, dass beide Proteine einen ähnlichen C-Terminus aufweisen. Dieser besteht aus einer Lysin- und einer Serin-reichen Region, wobei letztere dem für Dehydrine beschriebene S-Segment sehr ähnlich ist. Des Weiteren fällt auf, dass das At1g64370-Protein im Vergleich zum HIRD11 kein K-Segment aufweist. Dieses K-Segment ist charakteristisch für die Gruppe der Dehydrine und soll bei Temperaturstress eine schützende Wirkung haben (184), indem es eine amphipathische Helix ausbildet und darüber mit Membranen und Proteinen interagiert (90, 94, 96, 185).

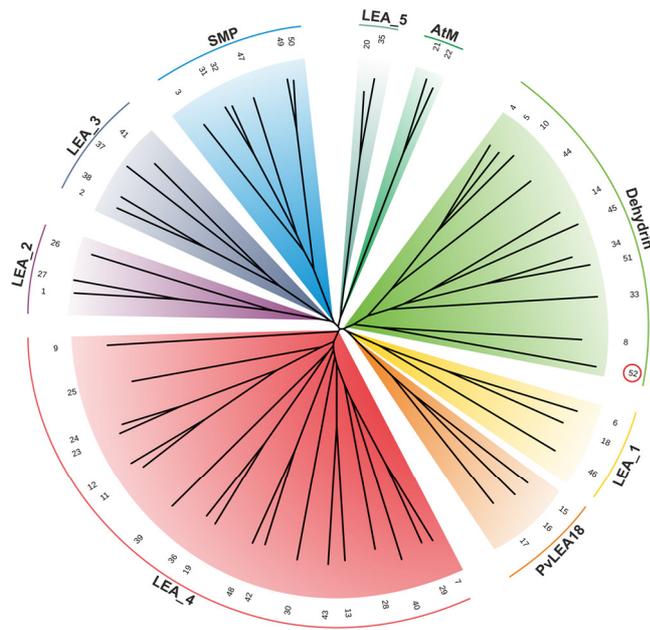


Abb. 3-18: Vergleich der Sequenzen bisher bekannter LEA-Proteine mit dem At1g64370-Protein. Dazu wurde zunächst ein *unrooted* Dendrogramm aller in *Arabidopsis thaliana* bekannter LEA-Proteine erstellt, wobei das Sequenz-Alignment, wie bei Hundertmark und Hinch (96) beschrieben, mit Clustal Omega durchgeführt wurde. Farblich hervorgehoben sind die unterschiedlichen Klassen der LEA-Proteine. Aufgrund seiner Aminosäuresequenz konnte das At1g64370-Protein (Nr. 52) den Dehydrinen zugeordnet werden, wobei dessen nächster Verwandter das Dehydrin HIRD11 ist.

Daher sollte im folgenden Verlauf der Arbeit analysiert werden, ob das At1g64370-Protein trotz des Fehlens des K-Segments Dehydrin-ähnliche Eigenschaften aufweist.

```

HIRD11      MAGLINKIGDALHIGGGNKEGEHKKEEE-HKKHVDEHKSGEH-----KEGI
At1g64370   MQYYENREKDYIEVAQGQRNGYGQSQSHNHEGYGQSQSRGGYGQIHNREGYNQNREGYSQSRPVYGL
*   * : *  . . * : : *  : : : *  : : : *  : : : *  : * :

```

```

HIRD11      VDKIKDKIHGG-----EGKS-----H-----DGE
At1g64370   SPTLNHRSHGGFLDGLFKGQNGQKQSGGLGTFLGQHKQSQAQKKSQGHGKLLGQHDQKKTHTNSGLNGL
. . . . * * *      : * : *      *      : *

```

```

HIRD11      GK-SHDGEKKKQKDKKEKKHDGHHSS-----SSSDSDSD
At1g64370   GMFINNGEKKHRRKSEHKKKNKDGHGSGNESGSSSGSDSD
*   . : * * * : : : . . * : : * * * * * * * * * * * * * * *

```

Abb. 3-19: Sequenz-Alignment des KS-Typ-Dehydrins HIRD11 mit dem uncharakterisierten Protein At1g64370. Während das Dehydrin ein K-Segment (grün), ein S-Segment (blau) sowie eine Lysin-reiche Sequenz aufweist (orange), enthält das uncharakterisierte Protein nur das S-Segment sowie eine Lysin-reiche Sequenz.

3.2.2 Funktionelle Charakterisierung des At1g64370-Proteins

Zur genaueren Analyse des im Phloem von Raps identifizierten Homologs des uncharakterisierten Proteins At1g64370 sollten die Proteine aus beiden Organismen rekombinant in *E. coli* hergestellt und mittels verschiedenster molekularbiologischer und proteinbiochemischer Methoden genauer charakterisiert werden. Hierbei sollten zum einen im Vergleich mit nativem Protein mögliche posttranslationale Modifizierungen ermittelt werden und zum anderen die mögliche Nucleinsäure- und Ionenbinde-eigenschaft genauer untersucht werden. Aufgrund der Ähnlichkeit zum Dehydrin HIRD11 sollte außerdem analysiert werden, ob das Protein ähnliche Eigenschaften aufweist und ob es im Zusammenhang mit Stress eine wichtige Rolle im Phloem einnimmt. Außerdem wurden YFP-Fusionskonstrukte erstellt und damit Lokalisationsstudien in Tabak und *A. thaliana* Pflanzen durchgeführt, um zu analysieren, ob das Phloem-abundante Protein auch in anderen Geweben zu finden ist.

3.2.2.1 Genorganisation und Expression des putativen Dehydrin-ähnlichen Proteins At1g64370

Der *Open Reading Frame* des AT1G64370 Gens (Synonym F15H21.1) ist in *Arabidopsis thaliana* auf Chromosom 1 an der Position 23888920...23889661 lokalisiert und umfasst ausschließlich ein Exon (186). Es steht unter Kontrolle eines TATA-Box Promotors (AGTATATATAGA, Position 23888884 - 23888895) und wird über REG600 (TAATTGGG, *Element II of Arabidopsis PCNA-2, cell cycle/meristematic expression*) reguliert. Während es in *Arabidopsis thaliana* nur ein Gen gibt, das für das Protein codiert, kommen in Raps insgesamt fünf Gen *Loci* vor, die für verschiedene Homologe des Proteins codieren.

Das At1g64370 konnte über Genom- und Expressionsstudien bisher vor allem in Brassicaceen nachgewiesen werden (Tab. 3-6). Jedoch konnte mittels cDNA-Bibliothek, erstellt aus stress-induziertem Mais-Saatgut, ein Homolog des At1g6470-Gens erstmals in monokotyledonen Pflanzen identifiziert werden (187).

Ein Sequenzvergleich auf Aminosäureebene zeigt, dass das Protein in allen untersuchten Organismen konserviert vorliegt, wobei das Protein im Laufe der Evolution wohl zunehmend auf funktional

Tab. 3-6: Übersicht über Homologe des At1g64370-Proteins in anderen Organismen.

Organismus	Accession Nr.	Länge	Nachweislevel	Gewebe	
<i>Arabis alpina</i>	KFK33697	199 aa	Genom		Willing <i>et al.</i> , 2015 (283)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_564833	178 aa	Genom	ganze Pflanze	Theologis <i>et al.</i> , 2000 (186)
<i>Arabidopsis lyrata</i>	XP_002887892	168 aa	Genom		Hu <i>et al.</i> , 2011 (284)
<i>Eutrema salsugineum</i>	XP_006391626	158 aa	Genom		Yang <i>et al.</i> , 2013 (285)
<i>Brassica napus</i>	XP_013661529	150 aa	Proteomstudie	Phloem	Giavalisco <i>et al.</i> , 2006 (11)
<i>Brassica rapa</i>	XP_009112884	151 aa	Genom		Wang <i>et al.</i> , 2011 (286)
<i>Brassica oleracea</i>	XP_013606701	150 aa	Genom		Parkin <i>et al.</i> , 2014 (287)
<i>Capsella rubella</i>	XP_006302966	150 aa	Genom		Slotte <i>et al.</i> , 2013 (288)
<i>Camelina sativa</i>	XP_010418500	148 aa	Genom		Kagale <i>et al.</i> , 2014 (289)
<i>Raphanus sativus</i>	XP_018456149	146 aa	Genom		Nie <i>et al.</i> , 2016 (290)
<i>Zea mays</i>	DQ245347	151 aa	Transkript	Stress-induziertem Keimling	Jia <i>et al.</i> , 2006 (187)

3 Ergebnisse & Diskussion

A. alpina	MQYYETTREKDYEVAQQRHEGYGQGN--HQGYGLNSQGYGQSQNHQGHGLNPNPGYGLNPNPGYGLNPNQGYGQSQTKPV
A. lyrata	MQYYE-NREKDYEVAQQR-NGYGQSQG--HEGYGQS-----QTRGGYQI-----QNREEYSQSQSRPV
A. thaliana	MQYYE-NREKDYEVAQQR-NGYGQSQSHNHEGYGQS-----QSRGGYQI-----HNREGYNQNREGYSQSQSRPV
B. napus	MQYYE-TRAKEYYDVAQGSRSQSYG--QN--H-----QGYGQSQSRPV
B. oleracea	MQYYE-TREKEYYDVAQGSQSYG--QN--H-----QGYGQSQSRPV
B. rapa	MQYYE-TRAKEYYDVAQGSRSQSYG--QN--H-----QGYGQSQSRPV
C. rubella	MQYYE-NREKDYEVAQQR-NGYGQSQS--H-----EGYGQSQSRPV
C. sativa	MQYYE-NREKDYEGAQQR-NGYGHQS--H-----EGYGQKPTRPV
E. salsugineum	MQYYE-TREKEYYDVTQVQSRPGYDQ--S--HQGH-----GQNHQGHGLIQSRPV
R. sativus	MQYYG-THEKEYYDVAHGQSRQSN--QN--H-----QGYDQSQSRPV
Z. mays	MQYYE-TRAKEYYDVAQGSRSQSYG--QN--H-----QGYGQSQSRPV
	**** .: *:*: :. . . *
	: :. :.*
A. alpina	YGHSPMLNHRSHGGFLDGLFKGQNGQKQSGGLGSLFGQRKSNDEVTKSHGHGKLLGQH-QKKTHTETDKGMNGLGMFINNG
A. lyrata	YGSPTLNHRSHGGFLDGLFKGQNGQKQSGGLGTLFGQHKSQ-EANKGQGHGKLLGQH-QKKTHTETNKGMLGMFINNG
A. thaliana	YGLSPTLNHRSHGGFLDGLFKGQNGQKQSGGLGTLFGQHKSQ-EAKKSQGHGKLLGQHDQKKTHTETNSGLNGLGMFINNG
B. napus	YGHSPMLNHRSHGGFLDGLFKGKNGQKQNGLGSFVGEHKNQ-DTNKDHEHGKLLGQH-EKKTQETNKGVNLGMFINCG
B. oleracea	YGHSPMLNHRSHGGFLDGLFKGKNGQKQNGLGSFVGEHKNQ-DTNKGHGHGKLLGQH-QKKTHTETNKGKVLGMFINNG
B. rapa	YGHSPMLNHRSHGGFLDGLFKGKNGQKQNGLGSFVGEHKNQ-DTNKDHEHGKLLGQH-EKKTQETNKGVNLGMFINCG
C. rubella	YGLSPTLNHRSHGGFLDGLFKGQTLRQSGVGTFLGQRKTQ-DANKGHGHGKLLGQH-QKKTHTETNKGMLGMFINNG
C. sativa	YGLSPTMNRSHGGFLDGLFKGQTLRQSGVGTFLGQHKTH-ETNKGHGHGKLLGQH-QKKTHTETNKGMLGMFINNG
E. salsugineum	YGNSPMLNHRSHGGFLDGLFKGKNGQKQTLGAFGLGQHNSQ-EPNKDHGHGKLLGHH-QKKTHTETNKVTNGLGMFINNG
R. sativus	YGHSPMLNHRSHGGFLDGLFKGRNGQKQNGLGSFVGEHKNQ-EANKGHGHGKLLGQH-QKTNETNKVTNGLGLFINNG
Z. mays	YGHSPMLNHRSHGGFLDGLFKGKNGQKQNGLGSFVGEHKNQ-DTNKDHEHGKLLGQH-EKKTQETNKGVNLGMFINCG
	** **:*:*****:.* :.* *:*:*:*: :. :.*: *****:* :*.:*:*: :****:* *
A. alpina	EKKHKKKDGGLKK-KKNKDGNGSGSNGESSSSSDSD
A. lyrata	EKKHRRKSEHKK--KNKDGHGSGNESGSSSGSDSD
A. thaliana	EKKHRRKSEHKK--KNKDGHGSGNESGSSSGSDSD
B. napus	EKKLKKQNEHKK-KKNKDGHASGNESSSGSDSD
B. oleracea	EKKHKKQNEHKK-KKNKDGHASGNESSSGSDSD
B. rapa	EKKLKKQNEHKKKKNKDGHASGNESSSGSDSD
C. rubella	EKKHRRQSEHKK--KSKDGHGSGDESSSGSDSD
C. sativa	EKKHRRQSEHKK-KNNKDGHGSGDESSSGSDSD
E. salsugineum	EKKHKKQNEHKKKSKDGHGSGNESSSDSDSD
R. sativus	EKKHKKQNEHKK-KKNKDGH---ESGSSSGSDSD
Z. mays	EKKLKKQNEHKKKKNKDGHASGNESSSGSDSD
	*** :.:. * * :.*: . ***.***

Abb. 3-20: Sequenz-Alignment von At1g64370-Homologen in anderen Organismen. Die Sequenzen wurden über die NCBI-Datenbank über BLAST-Analysen identifiziert und mittels T-Coffee aligniert.

erforderliche Bereiche verkürzt wurde (Abb. 3-20). Dabei ist insbesondere der C-Terminus, bestehend aus der K-reichen Sequenz und dem S-Segment, hochkonserviert.

Über Expressionsstudien konnte bereits gezeigt werden, dass das At1g64370 in *Arabidopsis thaliana* in nahezu allen pflanzlichen Organen und nahezu allen Entwicklungsstadien vorkommt (188, 189). Über

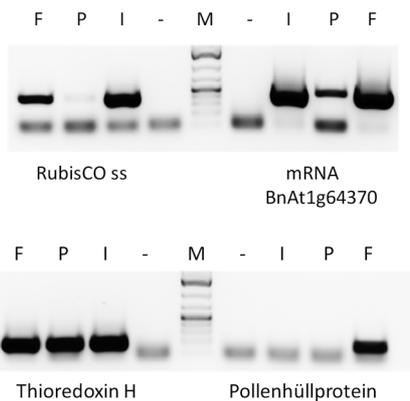


Abb. 3-21: RT-PCR zum Nachweis der mRNA des At1g64370-Homologs in unterschiedlichen Geweben von Raps. Zur Kontrolle wurden die gewebespezifischen Transkripte RubisCO ss und das Pollenhüllprotein, sowie das Thioredoxin H in Blüte (F), Phloem (P) und Infloreszenz (I) nachgewiesen. Als Größenmarker fungierte der GeneRuler 1kb *ladder* und als Negativkontrolle (-) wurde ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase verwendet.

Phosphatmangel-Versuche wurde durch *Lin et al.* bewiesen, dass das Expressionslevel vom At1g64370 bereits nach sechs Stunden in der gesamten Wurzel im Vergleich zur Kontrolle erhöht ist (190). Dass das At1g64370 möglicherweise an der abiotischen Stressantwort in Pflanzen beteiligt ist, zeigen auch Studien von *Kilian et al.* und *Wilkins et al.*, die zeigen konnten, dass das mRNA-Level von At1g6470 unter osmotischem Stress (191) und in trockengestressten Pflanzen (192) erhöht ist.

Des Weiteren konnte durch *Thieme et al.* gezeigt werden, dass die mRNA vom At1g64370 in *A. thaliana* von Zelle-zu-Zelle (*cell-to-cell*) mobil ist und über das Phloem in entfernte Gewebe

transportiert wird (18). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch die mRNA des At1g64370-Homologs im Phloemsaft von Raps existent ist (Abb. 3-21). Hierfür wurde Gesamt-RNA isoliert, revers transkribiert und anschließend über eine PCR mit spezifischen Primern das Transkript nachgewiesen. Als Kontrolle fungierten wiederum Transkripte wie Thioredoxin, das Pollenhüllprotein sowie die kleine Untereinheit der RubisCO. Vergleicht man die Signalstärke der amplifizierten Transkripte, so wird deutlich, dass beispielsweise die mRNA des *Housekeeping*-Gens Thioredoxin H in allen untersuchten Geweben Infloreszenz (I), Phloem (P) sowie Blüte (F) gleich stark vertreten ist. Dies ist bei der mRNA des Homologs vom At1g64370 nicht der Fall: Während das amplifizierte Transkript in Blüte und Infloreszenz ein etwa gleich starkes Signal zeigt, ist es im Phloem deutlich weniger vertreten. Da im Phloem bisher noch keine Transkription sowie Translation (16) nachgewiesen werden konnte, ist davon auszugehen, dass die mRNA möglicherweise vom Ort ihrer Synthese über das Phloem in entferntere Gewebe transportiert wird.

3.2.2.2 Herstellung und Aufreinigung des At1g64370-Proteins

Zur Herstellung des rekombinanten Proteins in *E. coli* wurde der offene Leserahmen des At1g64370 aus *A. thaliana* und eines Homologs aus Raps in den Vektor pET30b beziehungsweise pET28a integriert (Vektorkarte und Sequenz im Anhang, Abb. 7-1 & Abb. 7-2). Beide Konstrukte enthielten einen N-terminalen 6-fachen His-Tag, einen SSG-Linker sowie eine Thrombinschnittstelle (Abb. 3-22 A). Die Herstellung der Proteine erfolgte im modifizierten *E. coli*-Stamm BL21-(DE3)-CodonPlus-RIPL unter Verwendung von Autoinduktionsmedium. Nach der Identifizierung des geeigneten Puffers nach einem Löslichkeitstest nach Lindwall *et al.* (193) wurde das Protein im ersten Schritt aus der löslichen Fraktion mittels Nickelaffinitätschromatographie isoliert. Zur Entfernung des Tags erfolgte über Nacht der Verdau mittels Thrombin und als finaler Aufreinigungsschritt eine Größenausschlusschromatographie. So konnte zu 95 % reines Protein isoliert werden, das mittels Zentrifugalkonzentratoren in der Regel auf eine Konzentration von 200 μ M (~ 3 mg/ml) aufkonzentriert wurde. Der einzige Stamm, in dem das Protein erfolgreich in *E. coli* hergestellt werden konnte, ist der modifizierte Stamm BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL. Dies ist vermutlich auf die unterschiedliche Codon-Verwendung der beiden verschiedenen Organismen zurückzuführen. Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Stämmen BL21 (DE3) und BL21-Gold (DE3) sind im RIPL-Stamm weitere tRNA-Sequenzen kodiert, wodurch trotz der unterschiedlichen Codon-Verwendung die Herstellung des At1g64370 ermöglicht wurde. Dennoch konnte man im Verlauf der Expression mittels Autoinduktion beobachten, dass das bakterielle Wachstum nach der Induktion der Proteinexpression im Vergleich zu anderen Proteinen deutlich abnahm, was möglicherweise auf eine Toxizität des Proteins auf *E. coli* zurückzuführen ist. Dies könnte beispielsweise aus einer möglichen Interaktion des Proteins mit bakterieller RNA resultieren. Jedoch konnte auch mittels Autoinduktion genügend Protein hergestellt werden. Dass sich das Protein bei der Nickelaffinitätschromatographie erst ab einer relativ hohen Imidazolkonzentration von etwa 300 mM von der Säule löste, ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass das Protein selbst in der Lage ist zweiwertige Ionen zu binden, was bereits die IMAC-Analysen mit nativem Phloemsaft vermuten ließen. Ebenfalls überraschend war, dass das Protein in der

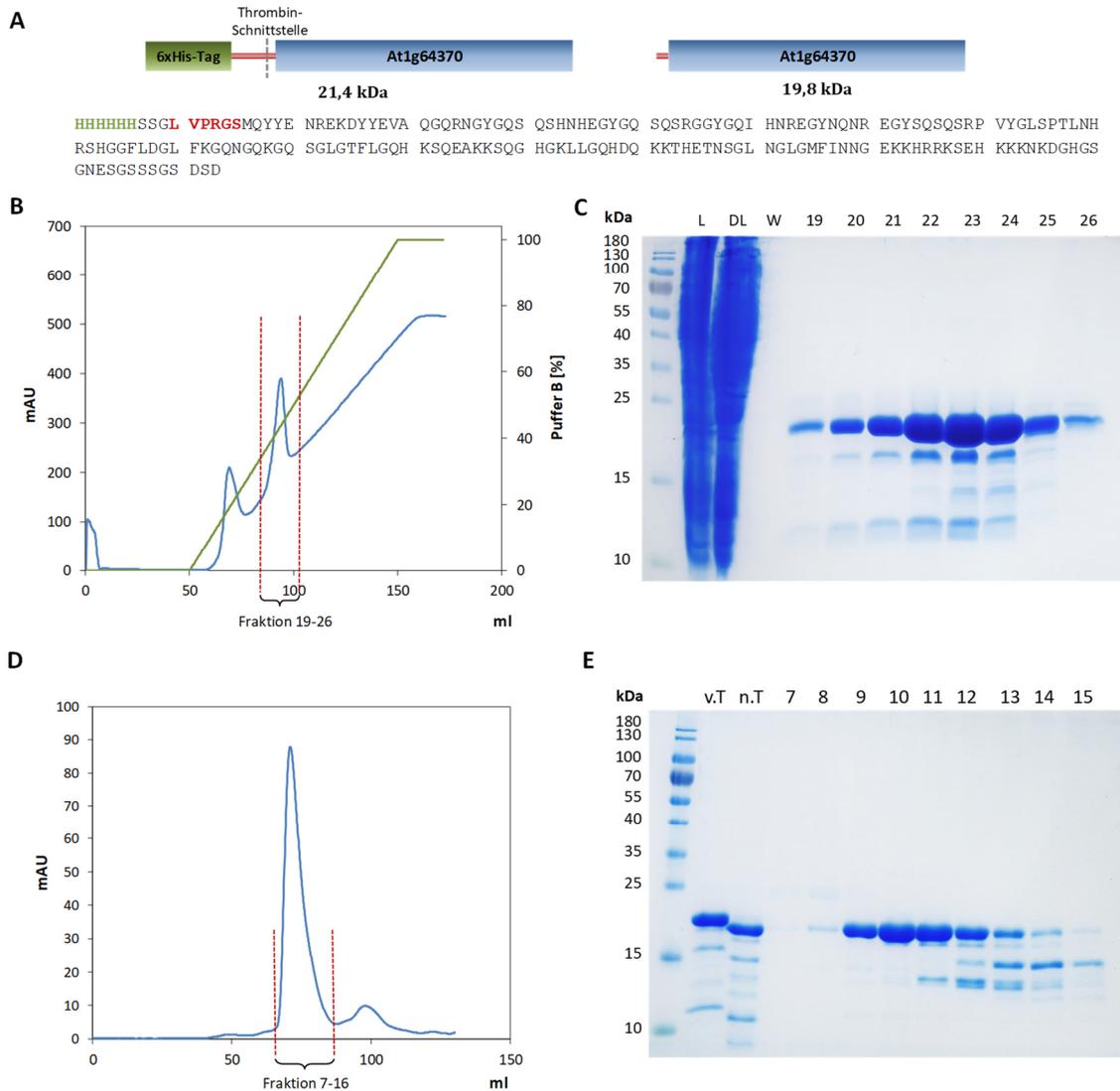


Abb. 3-22: Herstellung und chromatographische Aufreinigung der rekombinant hergestellten Proteine am Beispiel des At1g64370-Proteins aus *A. thaliana*. Die schematische Darstellung zeigt den Aufbau der verwendeten Proteinkonstrukte (A). Im ersten Schritt der Aufreinigung wurde eine Nickelaffinitätschromatographie durchgeführt, wobei ein charakteristisches Chromatogramm aufgenommen wurde (B) und im Anschluss eine SDS-PAGE durchgeführt wurde (C). Dazu wurden 5 µl des Lysats (L) und des Durchlaufs (DL), sowie 10 µl des finalen Waschschritts (W) und der eluierten Fraktionen (19-26) aufgetragen. Als finaler Aufreinigungsschritt erfolgte eine Größenausschlusschromatographie des mit Thrombin verdauten Proteins. Das Chromatogramm (D) zeigte einen definierten Peak nach etwa 68 ml und über die finale SDS-PAGE wurde der erfolgreiche Thrombinverdau sowie die Reinheit der gesammelten Fraktionen überprüft (E). Dazu wurden jeweils 10 µl der Probe vor (vT) und nach dem Thrombinverdau (nT) sowie der Fraktionen 7-16 auf ein 15-%iges SDS-Gel aufgetragen.

Größenausschlusschromatographie wie ein 25 kDa großes Protein eluierte, was möglicherweise auf eine stark elongierte Form des Proteins unter den gegebenen Bedingungen zurückzuführen ist. Dies konnte für das Protein durch die strukturellen Analysen durch S. Ostendorp bestätigt werden. Im Laufe der Aufreinigungsprozedur konnte außerdem beobachtet werden, dass das Protein trotz der Anwesenheit von Protease-Inhibitoren in definierte Fragmente abgebaut wurde. Diese waren etwa 15 kDa beziehungsweise 18 kDa groß und eine massenspektrometrische Analyse mittels *Peptide mass fingerprint* zeigte, dass die Proteine sowohl vom N- als auch C-terminalen Ende verkürzt vorlagen. Dies lässt die Vermutung zu, dass das Protein in diesem Bereich hochgradig flexibel vorliegt und somit für Proteasen eine ideale Angriffsfläche bietet. Da sich diese Abbaubanden bereits in Expressionsgelen zeigten, ist davon auszugehen, dass die

rekombinanten Proteine bereits in *E. coli* abgebaut wurden (Ergebnisse nicht gezeigt). Ob die Toxizität durch das native Vollängenprotein oder aber durch dessen Proteinfragmente resultiert, konnte nicht geklärt werden. Jedoch konnte das Vollängen-Protein bei zügigem Arbeiten in ausreichender Menge hergestellt und aufgereinigt werden.

Über einen anschließend durchgeführten Stabilitätsassay konnte gezeigt werden, dass das Protein

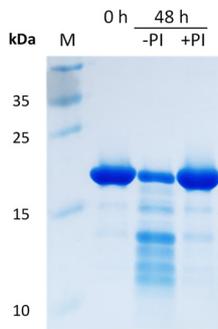


Abb. 3-23: Stabilitätsassay des rekombinanten At1g64370-Proteins aus *A. thaliana*. Dazu wurden 20 μ M des Proteins direkt nach dem Auftauen (0 h), nach 48 h bei 4°C ohne Protease-Inhibitor (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail, Roche) (48h -PI) und mit Inhibitor (48 h +PI) in einem 15 %-iges SDS-Gel aufgetrennt.

hochgradig instabil ist und bei Abwesenheit von Protease-Inhibitoren innerhalb von 48 Stunden bei 4 °C stark abgebaut wurde (Abb. 3-23), während das Protein bei Anwesenheit eines Inhibitors unverändert vorlag. Eine Erhöhung der Inkubationstemperatur auf Raumtemperatur erhöhte die Aktivität noch vorhandener Proteasen, was dazu führte, dass das gesamte Protein innerhalb von 24 h vollständig abgebaut wurde. Dies lässt darauf schließen, dass der Großteil des Proteins vermutlich ungeordnet und nicht globulär vorliegt, somit für Proteasen gut zugänglich ist und sehr schnell abgebaut wird, was für weitere Analysen berücksichtigt werden musste.

3.2.2.3 Analyse möglicher posttranslationaler Modifizierungen des unbekanntem Phloemproteins

Nach ihrer Synthese am Ribosom werden Proteine in der Regel posttranslational modifiziert. Diese Modifikationen erfolgen entweder am N- oder C-Terminus aber auch an bestimmten Aminosäureseitenketten. Dabei werden Zucker, Fettsäuren, Phosphat-, Methyl- oder auch Hydroxylgruppen oder sogar Proteine (Ubiquitin) an die Aminosäuren angeknüpft, wodurch das Protein seine endgültige Struktur und Funktion erhält. Die meisten Modifizierungen sind reversibel, weshalb diese auch eine Rolle beim Proteintransport, bei der Signalweiterleitung und der Prozessierung – zum Beispiel dem Abbau über Proteasen – spielen. Aufgrund der Tatsache, dass diese Modifizierungen an bestimmten Motiven erfolgen, ist eine Vorhersage über *in silico*-Programme, mit denen sich putative Modifizierungsstellen an sogenannten *Short linear motifs* vorhersagen lassen, möglich (194). Dabei konnten für das Protein aus *A. thaliana* und dessen Homolog aus *B. napus* verschiedene Modifizierungen vorhergesagt werden, wobei diese unter Berücksichtigung der vorhergesagten Proteinfaltung ermittelt wurden (Abb. 3-24). Aufgrund der berechneten starken Unordnung des Proteins konnte jeder Bereich der Sequenz für Modifikationen als zugänglich angesehen werden. Eine putativ modifizierte Sequenz, die über das Internet-Tool ELM (195, 196) identifiziert werden konnte, ist die N-terminal gelegene Sequenz, die vermutlich die *in vivo* Halbwertszeit des Proteins über den *N end rule pathway*, einen Teil des Ubiquitin-Proteasom-Systems, determiniert (197). Ist der N-Terminus eines Proteins unstrukturiert, zugänglich und enthält zugängliche Lysine in der Umgebung, so ist dies häufig ein Signal für die Degradation des Proteins,

<i>A. thaliana</i>	MQYYENREKDYVEVAQGQRNGYQSQSHNHEGYGQSQSRGGYGQIHNREGYNQNREGYSQ
<i>B. napus</i>	MQYYETRAKEYYDVAQGQS-----RQSYGQNHQGYGQ
	***** * :*:*:***** * :. * * :*:*. *
<i>A. thaliana</i>	SQSRPVYGLSPTLNHRSHGGFLDGLFKGQNGQKQKQSGLGTFLGQHKSQEAKKSQGHGKLL
<i>B. napus</i>	SQSRPVYGHSPTLNHRSHGGFLDGLFKGKNGQKQKQNGLGSFIGKHKNQDTNKDHEHGKLL
	***** * :*:*:*****:*****:*****.***:*.***:*.***:*.***:*.***
<i>A. thaliana</i>	GQHDQKKTHETNSGLNGLGMFINNGEKKHRRKSEHK--KKNKDGHGSGNESGSSSGSDSD
<i>B. napus</i>	GQHEK-KTQETNKGVNGLGMFINCGEKKLKKQNEHKKKKKKNKDGHASGNESGSSSGSDSD
	: * :*:*.:***** * :*.*** * :*.*** * :*.***:*****:*****

Abb. 3-24: Vorhersagen über mögliche Modifizierungen an Short Linear Motifs. Die Sequenzen wurden über die NCBI-Datenbank über BLAST-Analysen identifiziert und mittels T-Coffee aligniert. Über ELM (196) wurden mögliche funktionelle Bereiche des Proteins identifiziert, die farblich hervorgehoben sind: N-terminale Sequenz für den Abbau über das 26S-Proteasom, wobei dieses Motiv an der UBR-Box des N-Recognins bindet (rot). Mögliche Phosphorylierungsstelle der *Prolin-directed* MAP-Kinase (blau). Klassische Variante der NLS, die stark basisch geladen ist und für den Transport des Proteins in den Nucleus zuständig ist (grün). Mögliche Phosphorylierungsstelle der Casein Kinase I und II (orange).

das als N-Degron bezeichnet wird (198). Dieser N-Terminus wird zugänglich und wird von der UBR-Box der Ubiquitin E3 Ligase (N-Recognin) nur unter bestimmten Situationen oder als Antwort auf spezifische Signale erkannt. Damit ein Protein zum Abbau durch das 26S Proteasom markiert wird, müssen folgende Bedingungen erfüllt sein:

1. Der N-Terminus muss unstrukturiert und zugänglich sein.
2. Das Protein besitzt am N-Terminus eine destabilisierende Aminosäure (entweder unmodifiziert oder acetyliert).
3. Das Protein besitzt in der Nähe des N-Terminus ein Lysin-Rest, der als Rezeptor für das Ubiquitin fungiert.

Da eine komplett unstrukturierte Konformation des At1g64370 angenommen wird und an siebter Stelle ein Lysin in der Sequenz lokalisiert ist, werden zwei der drei Bedingungen bereits erfüllt. Allerdings gelten als destabilisierende Aminosäuren nur D, E, N, Q und C (198). Sofern das Initiator-Methionin *in vivo* nicht durch entsprechende Aminopeptidasen abgespalten wird, kann die zweite Bedingung allerdings als nicht erfüllt angesehen werden. Eine Acetylierung des Methionins hingegen hat den gegenteiligen Effekt. Hierdurch wird der Abbau des Proteins über das N-Degron inhibiert (199). Für eine weitere Sequenz, die in allen Organismen hochgradig konserviert ist, wurde mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Phosphorylierungsstelle für die Prolin-gerichtete MAP-Kinase vorhergesagt (YGLSPTL). Zusätzlich werden für das S-Segment (SGSSSGSDSD) mehrere Phosphorylierungsstellen prognostiziert, wobei diese putativ über die Casein Kinase I oder II modifiziert werden.

Unmittelbar vor dieser putativen Phosphorylierungsstelle liegt eine stark basische Aminosäuresequenz, die K-reiche Region. Diese bildet ein klassisches Kernlokalisierungssignal (*Nuclear localisation signal*, NLS), das in der Regel einen Transport in den Zellkern vermittelt (HKKKNK).

Da über die Phosphoproteinfärbung bei der Heparin-Affinitätschromatographie für das unbekannte Phloemprotein bereits gezeigt werden konnte, dass es vermutlich phosphoryliert vorliegt, sollte im Folgenden die Phosphorylierung genauer untersucht werden und eventuell weitere Modifizierungen über MALDI-TOF-Analysen des nativen Proteins identifiziert werden.

3.2.2.3.1 Phosphorylierung des Dehydrin-ähnlichen Proteins aus *A. thaliana* und *B. napus*

Reversible Phosphorylierungen von Proteinen spielen bei einer Vielzahl von zellulären Prozessen eine wichtige Rolle, wie Protein-Protein-Interaktionen (200), Protein-Nukleinsäure-Interaktionen (201), der zellulären Signaltransduktion (202) und der subzellulären Lokalisation von Proteinen (203). Auch wird eine Beteiligung von Kinasen bei der Virusverbreitung innerhalb der Pflanze seit einigen Jahren diskutiert. So werden Proteine einiger pflanzenpathogener Viren über wirtsspezifische Proteinkinasen wie CKI, CKII, Proteinkinase A sowie Proteinkinase C phosphoryliert (204–206).

Bereits über die Vorhersagen über die *short linear motifs* wurden mögliche Phosphorylierungsstellen im At1g64370-Protein und dessen Homolog aus Raps für die MAP-Kinase und die Casein-Kinase vorhergesagt. Unter der Verwendung des Phosphorylierungs-spezifischen *Tools* NetPhos 2.0 (207) werden für das Protein aus *A. thaliana* insgesamt 20 Phosphorylierungsstellen vorhergesagt – 8 an Tyrosinresten und 12 an Serinresten. Für das Protein aus Raps werden 5 Tyrosin-, 2 Threonin- und 8 Serinphosphorylierungen vorhergesagt (Abb. 3-25 A & B). Über genauere Analysen unter Berücksichtigung der Zugänglichkeit der jeweiligen Aminosäurereste mittels des Phosphorylierungstools *Group-based Prediction System* (GPS Phosphorylation) (208–210) werden insbesondere für das Serin-reiche Segment am C-Terminus Phosphorylierungen durch die Casein Kinase II vorhergesagt.

A

```

MQYYENREKDYYYEVAQGQRNGYGQSQSHNHEGYGQSQRGGYGQIHNREGYNQNREGYSQSQRSPVYGLSPTLNHRSHGG      80
FLDGLFKGQNGQKQSGLGTFLGQHKSQEAKKSQGHGKLLGQHDQKKTHETNSGLNGLGMFINNGEKKHRRKSEHKKKNK      160
DGHGSGNESSSSSDSD      240

```

B

```

MQYYETRAKEYYDVAQGQSRQSYGQNHQGYGQSQRSPVYGHSPTLNNYRSHGGFLDGLFKGKNGQKQNGLSFGKHKHQ      80
DTNKDHEHGKLLGQHEKKTQETNKGVNGLGMFINCGEKKLKKQNEHKKKKKNKDGHASGNESSSSDSD      160

```

Abb. 3-25: Vorhersagen möglicher Phosphorylierungsstellen im At1g64370-Protein und dem Homolog aus *B. napus*. Unter Verwendung des *Tools* NetPhos 2.0 wurden für das Protein aus *A. thaliana* (A) und *B. napus* (B) die folgenden Phosphorylierungsstellen, die farblich hervorgehoben und unterstrichenen sind, vorhergesagt. Eine genauere Analyse mittels GPS liefert für das Protein aus *A. thaliana* mögliche CKI und CKII Phosphorylierungsstellen, die zusätzlich fett hervorgehoben sind.

Bei der CKII handelt es sich um eine Ser/Thr-Kinase, die sich aus zwei 44 kDa katalytischen α -Untereinheiten und zwei 26 kDa regulatorischen β -Untereinheiten zusammensetzt. Diese bilden Heterotetramere ($\alpha_2\beta_2$) und phosphorylieren Serin- beziehungsweise Threoninreste, die folgende Erkennungssequenzen SXXE/D, SXE/D und S/D oder ähnliche Sequenzen enthalten. Wichtig dabei ist nur, dass der Serinrest (seltener Threoninrest) an der Position -2 bis +5 mit einem oder mehreren negativ geladenen Aminosäuren lokalisiert ist, wie aus den oben vorhergesagten Sequenzen hervorgeht.

Um zu überprüfen, ob das rekombinant hergestellte Proteine – wie vorhergesagt – mittels der CKII phosphoryliert werden kann, wurde eine *in vitro*-Phosphorylierung über eine kommerziell erhältliche CKII durchgeführt. Dazu wurde sowohl das Protein aus *A. thaliana* als auch aus *B. napus* mit der CKII inkubiert, anschließend die Proteine der Größe nach aufgetrennt und mittels Pro-Q Diamond Färbung die Phosphorylierungen nachgewiesen. Dabei war deutlich erkennbar, dass beide Proteine über die Casein

Kinase phosphoryliert wurden (Abb. 3-26 A & C). Des Weiteren zeigten beide Proteine am Anschluss an die Phosphorylierung im Vergleich zur unphosphorylierten Variante im SDS-Gel eine geringere Mobilität, was auf einen deutlichen Massenunterschied des phosphorylierten Proteins im Vergleich zum unphosphorylierten hindeutet (Abb. 3-26 A & C). Neben den Banden des rekombinanten Proteins sind außerdem weitere Banden erkennbar, wobei es sich um Abbauprodukte des Proteins handelt. Diese resultieren vermutlich, wie im Stabilitätsassay bereits gezeigt werden konnte, aus der starken Unordnung des Proteins, welches dadurch selbst für Spuren an Proteasen gut zugänglich ist.

Um den Phosphorylierungsgrad des Proteins zu ermitteln sollte zunächst der Massenunterschied zwischen der phosphorylierten und unphosphorylierten Variante mittels MALDI-TOF-MS analysiert werden (Abb. 3-26 B & D). Dabei wurde im Fall des Proteins aus *Arabidopsis thaliana* ein Massenunterschied von 531 Da und beim Raps-Homolog ein Unterschied von 604 Da zwischen der un- und phosphorylierten Variante detektiert. Unter der Annahme, dass eine Phosphorylierung einen Massengewinn von 80 Da bedeutet, würde eine solche Zunahme bedeuten, dass etwa 6-8 Serinreste modifiziert wurden. Aufgrund der negativen Ladung des Phosphats kommt es häufig zu einer Interaktion mit Natriumionen, wodurch sich dann die Masse pro Modifizierung auf 102 Da erhöht. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache, ergibt sich dann eine Modifikation an 5-6 Serinresten. Über einen anschließenden in-Gel-Verdau mit verschiedenen Proteasen, einer Verwendung verschiedener Matrices und einer MALDI-TOF-MS-Analyse im Positiv-

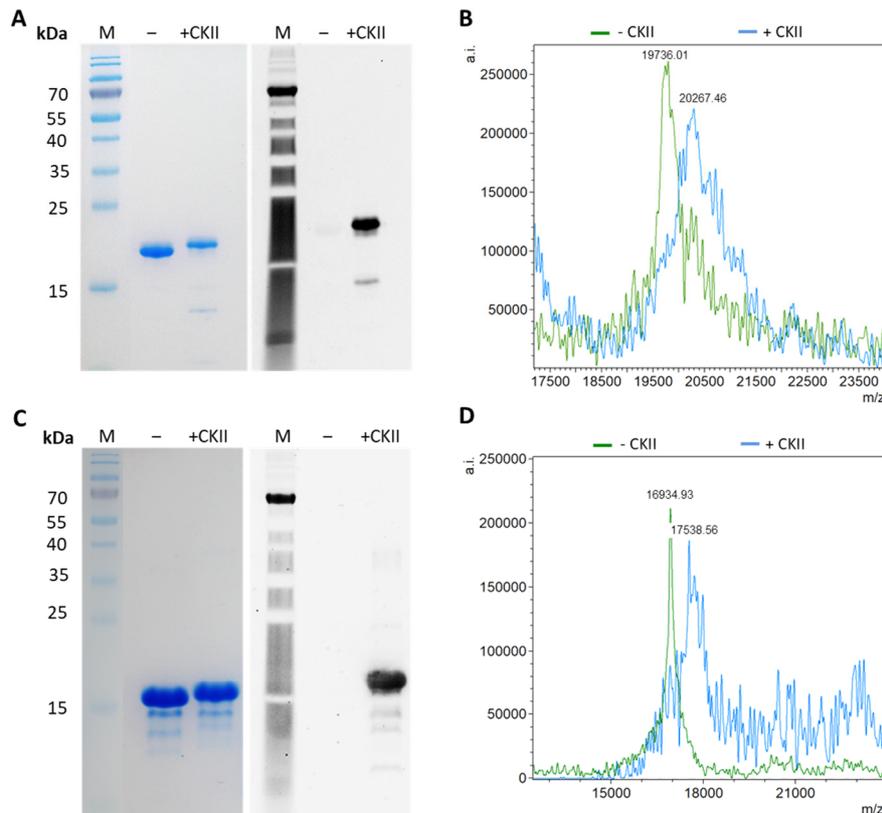


Abb. 3-26: In vitro-Phosphorylierung des unbekanntes Proteins mittels Casein Kinase II. Dazu wurden 10-20 μ M des rekombinanten Proteins aus *A. thaliana* (A) beziehungsweise *B. napus* (C) für 2 h bei 30 °C mit der CKII behandelt und die Proben ohne (-CKII) und mit Kinase (+CKII) im Anschluss in einem 15 %-igen SDS-Gel aufgetrennt. Zur Detektion der Phosphoproteine wurde zunächst eine Pro-Q Diamond Färbung (grau) und anschließend eine kolloidale Coomassie-Färbung durchgeführt. Um die Anzahl der Phosphorylierungen identifizieren zu können, wurde ein Teil der Probe mittels MALDI-TOF-MS im Linear-Modus analysiert und dabei die Masse des Proteins aus *A. thaliana* (B) sowie Raps (D) mit und ohne CKII detektiert.

beziehungsweise Negativmodus, konnten die Phosphorylierungsstellen jedoch nicht eindeutig identifiziert werden. Das Peptid DGHGSGNESGSSSGSDSD, das in der Trypsin-verdauten Negativkontrolle in der Regel schwach detektierbar war, konnte in den CKII-modifizierten Proben nicht nachgewiesen werden, was die Vermutung zuließ, dass es sich hierbei um das phosphorylierte Peptid handeln könnte.

Um zu identifizieren ob es sich bei den Serinen am C-Terminus, für die eine Phosphorylierung mittels Casein Kinase bereits vorhergesagt wurde, um Modifizierungsstellen handelt, wurde zunächst eine C-terminal verkürzte Mutante des Proteins (At1g64370D_ΔC) mittels *Site-directed* Mutagenese generiert (Abb. 3-27 A). Bei dieser fehlten sowohl die Lysin-reiche Sequenz als auch das S-Segment. Mit dem rekombinant

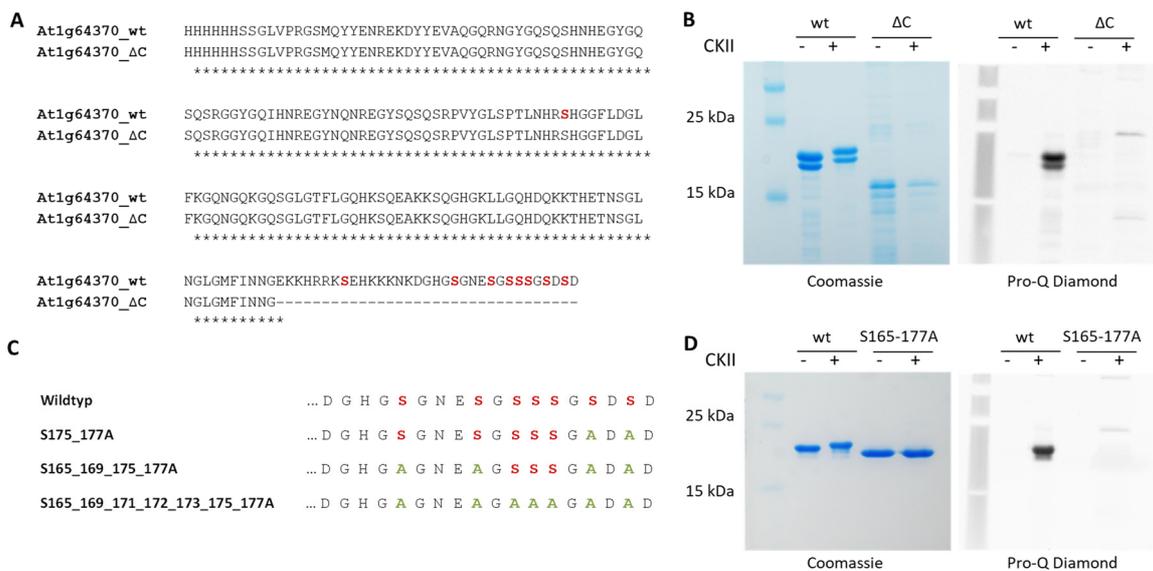


Abb. 3-27: Identifizierung der Casein Kinase II-Phosphorylierungsstelle im untersuchten Protein aus *Arabidopsis*. Dazu wurde eine C-terminal verkürzte Mutante erstellt, bei der die vorhergesagte CKII-Phosphorylierungsstelle (rot hervorgehoben) fehlt (A). Im Anschluss an die *in vitro*-Phosphorylierung mittels CKII wurden 10 μM des Wildtyp-Proteins (wt) und der Mutante (ΔC) in ihrer un- (-) und CKII-behandelten Form (+) mittels SDS-PAGE in einem 15 %-igen Gel aufgetrennt und mittels Phosphoprotein- und kolloidaler Coomassie-Färbung visualisiert (B). Über *Site-directed* Mutagenese wurden anschließend die Serine seriell an dargestellten Positionen (C) gegen Alanine ausgetauscht. Die rekombinant hergestellten und aufgereinigten Proteine wurden anschließend über die CKII phosphoryliert, wiederum mittels SDS-PAGE aufgetrennt und wie oben beschrieben gefärbt (D).

hergestellten Protein und der mutierten Form wurde erneut eine *in vitro*-Phosphorylierung mit der CKII durchgeführt, wobei die Mutanten in der anschließenden Phosphoproteinfärbung kein Signal mehr zeigten, während das Wildtyp-Protein deutlich sichtbar war (Abb. 3-27 B). So konnte bewiesen werden, dass das Protein C-terminal durch die CKII phosphoryliert wird. Um weitere Studien hinsichtlich der Funktion der Phosphorylierung durchführen zu können, wurde ebenfalls über *Site-directed* Mutagenese eine *Loss-of function*-Mutante generiert, bei der die Serine am C-Terminus seriell gegen Alanine ausgetauscht wurden (Abb. 3-27 C) und der *in vitro*-Phosphorylierungsassay mit der CKII erneut durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass erst die Mutante, bei der die Serine an den Positionen 165, 169, 171, 172, 173, 175, 177 gegen Alanin ausgetauscht wurden, kein Signal mehr in der Pro-Q Diamond Färbung zeigte (Abb. 3-27 D). Somit wurde gezeigt, dass das At1g64370-Protein aus *A. thaliana* an den C-terminalen Serinresten über die Casein Kinase II phosphoryliert wird, während die anderen vorhergesagten CKI beziehungsweise CKII-Phosphorylierungsstellen (S77 und S153) nicht modifiziert werden.

Da über die Phloemproteom-Studien bereits gezeigt werden konnte, dass das At1g64370-Homolog im Rapsphloem stark phosphoryliert vorliegt, sollte anschließend analysiert werden, ob die Phosphorylierung im oder außerhalb des Phloems erfolgt. Dazu wurde das rekombinant hergestellte Protein mit nativem Phloensaft für 2 h bei 30 °C inkubiert und anschließend 15 µl des Ansatzes mittels SDS-PAGE separiert und die Proteine zunächst mittels Phosphoproteinfärbung und anschließend Coomassie-Färbung visualisiert

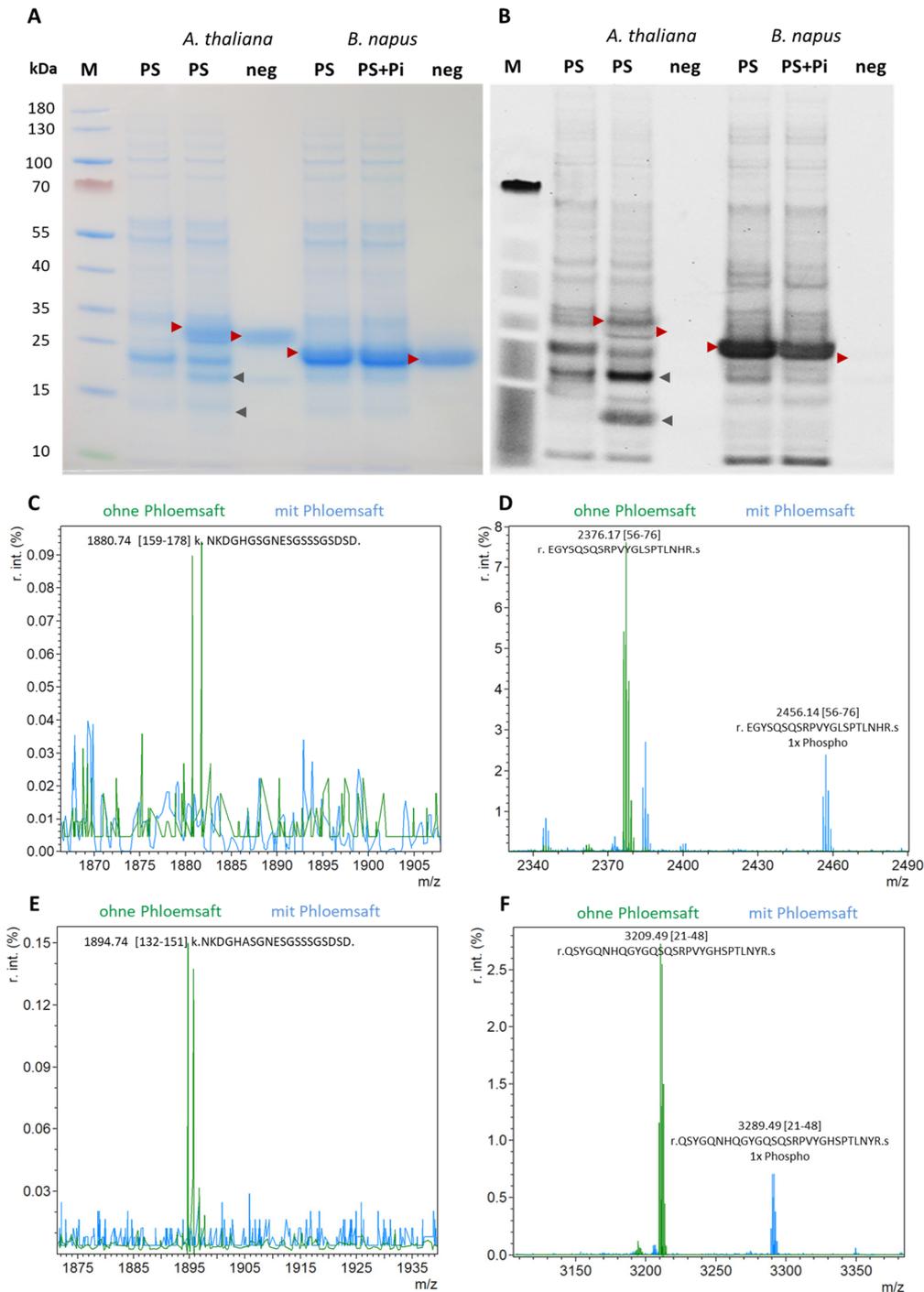


Abb. 3-28: *In vitro*-Phosphorylierung des rekombinanten Proteins mit Phloensaft. Dazu wurden 20 µM des rekombinanten Proteins zusammen mit nativem Phloensaft für 2 h bei 30 °C inkubiert und anschließend die Proteine in einem 15 %-igen SDS-Gel aufgetrennt. Zur Detektion der Proteine wurde zum einen eine Phosphoproteinfärbung (B) und zum anderen eine Coomassie-Färbung (A) durchgeführt. Im Gelbild sind die rekombinanten Proteine mit roten Pfeilen markiert. Diese Proteinbanden wurden im Anschluss trypsinisiert und mittels MALDI-TOF-MS phosphorylierte Peptidfragmente des Proteins aus *Arabidopsis* (C & D) und aus Raps (E & F) identifiziert.

(Abb. 3-28 B & A). Dabei zeigte das mit Phloemsaft behandelte Protein im Gegensatz zum unbehandelten einen Massen-*Shift* im Gel und ein deutliches Signal in der Phosphoproteinfärbung. Somit konnten beide Proteine im Phloemsaft phosphoryliert werden, wobei das Homolog aus *B. napus* im Vergleich zum Protein aus *Arabidopsis* ein stärkeres Signal aufwies. Es fällt jedoch auch auf, dass beim *Arabidopsis*-Protein zusätzliche Banden in der Phosphoproteinfärbung im unteren Bereich auftraten (schwarze Pfeile). Hierbei handelte es sich, wie die anschließende MS-Analyse zeigte, um Abbauprodukte des Proteins, wobei diese N-terminal verkürzt waren. Somit scheint dieses Protein im Vergleich zu seinem Homolog aus Raps im Phloemsaft von Raps weniger stabil zu sein. Dies könnte möglicherweise aus einer Art Schutzmechanismus vor Fremdproteinen im Phloem resultieren. So nutzen beispielsweise Viren das Phloem um sich in der Pflanze auszubreiten. Um dies zu verhindern, wird vermutet, dass die Pflanze diese artfremden Proteine markiert, beispielsweise über Ubiquitin, und diese dann durch das Proteasom abgebaut werden (54). Anschließend wurden die Banden der un- sowie phosphorylierten Variante (mit roten Pfeilen markiert) aus den Gelen ausgeschnitten, ein Trypsinverdau durchgeführt und mittels MALDI-TOF-MS im Reflektormodus analysiert. Da es aus vorherigen Analysen bereits Hinweise darauf gab, dass das Protein am C-Terminus durch die Casein Kinase phosphoryliert wird, wurde zunächst dieses Peptid analysiert. Dieses Peptidfragment zeigte bei beiden unmodifizierten Proteinen ein sehr schwaches Signal in der MS-Analyse (*A. thaliana* Abb. 3-28 C und *B. napus* Abb. 3-28 E), was vermutlich auf eine schlechte Ionisierung des Peptids zurückzuführen ist. Dieser Peak war im Falle der phosphorylierten Variante verschwunden, jedoch konnte keine Art des modifizierten Peptids im Spektrum gefunden werden. Dies deutet darauf allerdings hin, dass das Fragment modifiziert wird. Jedoch konnte über einen Massen-*Shift* nicht identifiziert werden, wie viele Modifizierungen des Peptids nach der Behandlung vorliegen. Somit kann auch keine Aussage darüber getroffen werden, ob das Protein im Phloem in eventuell in unterschiedlich stark phosphorylierten Formen vorkommt.

Neben dieser möglichen Casein Kinase-Phosphorylierungsstelle konnte für beide Proteine eine weitere Phosphorylierungsstelle identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um die in der Tab. 3-7 dargestellten Peptide. Beide Peptide zeigen bei der unmodifizierten Variante ein monoisotopisches Signal, welches nach der Behandlung mit Phloemsaft um 80 Da verschoben ist (*A. thaliana* Abb. 3-28 D und *B. napus* Abb. 3-28 F). Laut Vorhersagen über GPS handelt es sich hierbei um eine MAP-Kinase Phosphorylierungsstelle, die bereits durch Hoehenwarter *et al.* (211) als mögliche MAPK3-Phosphorylierungsstelle des At1g64370-Proteins in *A. thaliana* (EGYSQSRPVYGLS(p)PTLNHR) identifiziert wurde.

Tab. 3-7: Darstellung der über die MAP-Kinase 3 modifizierten Peptidfragmente aus dem *Arabidopsis* und Raps Protein.

At1g64370-Protein aus	Modifizierung	Peptidfragment	Mismatch	m/z [Da]
<i>A. thaliana</i>	unphosphoryliert	EGYSQSRPVYGLSPTLNHR	1	2376.17
	phosphoryliert	EGYSQSRPVYGLS(p)PTLNHR	1	2456.14
<i>B. napus</i>	unphosphoryliert	QSYGQNHQGYGQSRPVYGHSPNLNYR	1	3209.49
	phosphoryliert	QSYGQNHQGYGQSRPVYGHSPNLNYR(p)	1	3289.49

Dieser *in vitro*-Phosphorylierungsassay mit Phloemsaft liefert neue Einblicke in die Funktion des Phloems. So wurden über bisherige Proteomstudien nur wenige Kinasen im Phloem nachgewiesen. Hierzu zählen vor allem Ca-abhängige Kinasen wie CPK1 (212) in Kürbis. In früheren Studien mit Phloemsaft von Reis, konnten Nakamura *et al.* demonstrieren, dass im Phloemsaft von Reis eine aktive CKII-Kinase vorliegt (213). Die Ergebnisse im Rahmen dieser Studie zeigen zum einen, dass im Phloem das richtige Milieu – pH-Wert und Vorhandensein des Substrats ATP- vorherrscht und zum anderen Kinasen vorhanden sind, die das rekombinante At1g64370-Protein phosphorylieren. Außerdem scheint es im Phloem keine Phosphatasen zu geben, beziehungsweise scheinen diese im verwendeten Phloemsaft nicht aktiv zu sein. Die im Rahmen der Phosphorylierungsstudien identifizierten Kinasen sind zum einen die Casein Kinase, deren Aktivität bereits durch Nakamura im Phloem von Reis gezeigt werden konnte und zum anderen die MAP-Kinase 3, die bisher im Phloem noch nicht nachgewiesen wurde.

Die meisten Analysen der CKI wurden in Hefe und tierischen Zellen durchgeführt und bisher ist von der Funktion der CKI in höheren Pflanzen nur wenig bekannt. In Tieren kommen sechs Isoformen der Kinase vor und sind an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt, wie dem Vesikeltransport, der DNA-Reparatur, Wachstum, der Zellteilung und dem circadianen Rhythmus (214). In *Arabidopsis* wurde eine zur Familie der CKI gehörende Kinase, die *Plasmodesmal-associated protein kinase* (PAPK), identifiziert. Diese ist an den Plasmodesmen lokalisiert und phosphoryliert eine Vielzahl nicht-zellautonomer Proteine, wie das *Movement*-Protein des Tabakmosaikvirus (215), wobei vermutet wird, dass die Phosphorylierung einen Einfluss auf den Transport über die Plasmodesmen hat. Die ubiquitäre CKII ist beteiligt an verschiedenen Entwicklungsprozessen aber auch an der Stressantwort in Pflanzen, beispielsweise bei der Lichtsignalweiterleitung und der circadianen Uhr (216). Über bisherige *Knock-out* Studien konnte gezeigt werden, dass die CKII in erster Linie regulatorische Proteine und Transkriptionsfaktoren phosphoryliert, woraufhin sich die Proteinfunktion verändert. Dies kann sich auf Ebene der Stabilität, Oligomerisierung, von Protein-Protein-Interaktionen, der subzellulären Lokalisation abspielen oder auch zu Veränderungen der DNA-Bindeaffinität führen (217).

Die *Mitogen-activated protein* Kinasen (MAPK) bilden Kaskaden aus dreistufigen Signalkaskade-Modulen, die in allen Eukaryoten zu finden sind (218) und der Signaltransduktion dienen. Dabei werden über hierarchisch angeordnete Phosphorylierungskaskaden extrazelluläre Stimuli zunächst verstärkt und lösen dann verschiedene intrazelluläre Antworten aus (Abb. 3-29). Über Genom-Sequenzierungen wurden in *Arabidopsis* 20 MAP-Kinasen, 10 MAPK-Kinasen und 80 MAPKK-Kinasen nachgewiesen (219). Diese MAPK-Kaskaden fungieren in *Arabidopsis* sowie in allen anderen Spezies als Signalkaskaden, die über verschiedene Stimuli,

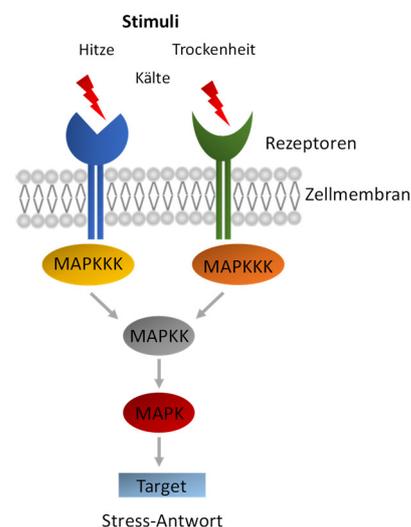


Abb. 3-29: Vereinfachte, schematische Darstellung von MAPK-Kaskaden. Extrazelluläre Stimuli werden über Rezeptoren erkannt und leiten das Signal über die Phosphorylierung der MAPKKK ins Zellinnere. Dort werden dann MAPKK phosphoryliert, die wiederum MAPK über Phosphorylierung aktivieren. Die MAPK phosphorylieren schließlich die Targetproteine, die für die Stressantwort zuständig sind.

in erster Linie biotischen und abiotischen Stress, wie Hitze, Kälte, Salz, UV-Licht, Verwundung, osmotischen Stress sowie Schwermetalle aktiviert werden (220). Dabei werden die Kaskaden nicht nur über eine einzelne Stressart, sondern vielmehr über mehrere verschiedene aktiviert.

Hoehenwarter *et al.* identifizierten das At1g64370-Protein als putatives MAPK3- und MAPK6-Substrat (211). Diese beiden Kinase-Kaskaden wurden bereits in verschiedenen Pflanzenspezies genauer untersucht, wobei gezeigt werden konnte, dass sie an unterschiedlichen Signalwegen und Stressantworten beteiligt sind (Tab. 3-8.).

Tab. 3-8: Übersicht über die Beteiligung von MAPK3- und MAPK6-Kaskaden in *Arabidopsis thaliana* und Mais.

Organismus	Komponente der MAPK-Kaskade	Beteiligung an	Referenz
<i>A. thaliana</i>	AtMAPK3	Berührung, Kälte, Salzstress Hypo-Osmolarität, Ozon Oxidativer Stress	Mizoguchi <i>et al.</i> , 1996 (291) Droillard <i>et al.</i> , 2002 (292) Kovtun <i>et al.</i> , 2000 (293)
		Hypo-Osmolarität, Ozon	Ahlfors <i>et al.</i> , 2004 (294)
<i>A. thaliana</i>	AtMAPK6	Hyperosmotischer Stress, Berührung, Verwundung, Salzstress, Kälte, Dehydratation	Ichimura <i>et al.</i> , 2000 (295)
		O ₃ , H ₂ O ₂ , Ethylen, ABA- & JA-Signalwegen	Sinha <i>et al.</i> , 2011 (220)
		Oxidativer Stress	Kovtun <i>et al.</i> , 2000 (293)
Mais	ZmMAPK3	ABA, H ₂ O ₂ , JA, SA, Kälte, UV-Licht, Trockenheit, Salz, Verwundung, Schwermetalle	Wang <i>et al.</i> , 2007 (296)

Dass die Kaskaden dabei über verschiedene Stimuli aktiviert werden, zeigten auch Studien von Gao *et al.*: Sie zeigten über die Identifizierung von DNA-Sequenzen in der Promotorregion von MAPK3, die auf Trockenheit, hohe Salzkonzentrationen, Verwundung sowie niedrige Temperaturen reagieren, dass die AtMAPK3-Expression über verschiedene abiotische Stress-Stimuli kontrolliert wird (221).

Die *in vitro*-Phosphorylierung des rekombinant hergestellten Proteins mittels Phloemsaft zeigen, dass die Phosphorylierung des Proteins im Siebelementsystem erfolgen kann. Ob diese bereits vor dem Eintritt ins Phloem geschieht, kann jedoch aus den Ergebnissen nicht abgeleitet werden. Jedoch konnte das At1g64370-Protein mittels Heparin-Affinitätschromatographie aus keinem anderen Gewebe (Wurzel, Samen, Blatt) isoliert werden (Daten nicht gezeigt), so dass man davon ausgehen kann, dass es hauptsächlich im Phloem vorkommt. Um dies genauer verifizieren zu können, wurden auch Lokalisationsstudien durchgeführt. Der Grund für die Phosphorylierung des Proteins kann zum jetzigen Zeitpunkt nur gemutmaßt werden: So könnte die Phosphorylierung der Casein-Kinase möglicherweise die subzelluläre Lokalisation des At1g64370-Proteins beeinflussen oder auch die Konformation ändern, so dass die Funktion des Proteins verändert wird.

Die MAPK-Phosphorylierung deutet hingegen daraufhin, dass das Protein auch an abiotischen und biotischen Stressantworten beteiligt sein könnte. Da die Kinasen nicht durch einzelne Stimuli, sondern über verschiedene Stimuli aktiviert werden, ist es schwer zu deuten, ob es nur bei einer bestimmten oder möglicherweise bei mehreren verschiedenen Stressarten eine Rolle einnimmt. Letzteres wäre aufgrund der stark ungeordneten Struktur und der damit verbundenen hohen Flexibilität durchaus denkbar. Ein

möglicher Stimulus, der zur Phosphorylierung des At1g64370-Proteins im Phloem führt, ist Verwundung. So konnte bereits für die AtMAPK6 und die ZmMAPK3 gezeigt werden, dass sie bei Verwundung aktiviert werden. So könnte durch die Sammelmethode des Phloemsafte, bei der der Infloreszenzstängel mit einer sterilen Kanüle punktiert wird und somit das Siebelements-system verwundet wird, eine MAPK-Kaskade aktiviert werden, an deren Ende die MAPK3 oder auch MAPK6 Targetproteine, die an der Stressantwort gegen Verwundung beteiligt sind, über Phosphorylierung aktiviert werden.

Untersucht man das Phloemproteom in Bezug auf Phosphorylierungen so zeigt sich, dass ein Großteil der Phloemproteine phosphoryliert vorliegen. Dies zeigen zum einen die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in silico*-Analysen der 140 Phloemproteine (Daten nicht gezeigt), die bei der Charakterisierung des Phloemsafte von Raps durch Giavalisco *et al.* identifiziert wurden (11), und zum anderen die Proteomstudien, wobei die Proteine mittels der Pro-Q Diamond Färbelösung visualisiert wurden. Welche Aufgaben diese Modifizierungen spielen kann bisher nur vermutet werden: So sind sie zum einen eventuell für die Ausübung ihrer Funktion essentiell, beispielsweise die Interaktion mit Interaktionspartnern, aber zum anderen auch möglicherweise für die subzelluläre Lokalisation erforderlich. Letzteres könnte über Lokalisationsstudien innerhalb der Pflanze mit der Mutante ohne die Casein Kinase-Phosphorylierungsstellen untersucht werden. So könnte die Eliminierung der Phosphorylierungsstellen zur Folge haben, dass das Protein nicht mehr ins Phloem transportiert werden kann.

3.2.2.3.2 Identifizierung weiterer posttranslationaler Modifizierungen

Über MS-Analysen von nativem Protein, das aus dem Phloem von Raps isoliert wurde, sollten weitere posttranslationalen Modifizierungen mittels *Peptide mass fingerprint* Methode identifiziert werden. Dabei konnte das N-terminale Peptid (MQYYETR) nur mit einem Massenunterschied von 26 Da beziehungsweise 42 Da identifiziert werden (Abb. 3-30 A), wobei es sich möglicherweise um eine acetylierte Form des Peptids handelt. Zur eindeutigen Identifizierung der möglichen posttranslationalen Modifizierung wurde im Anschluss eine MS/MS-Analyse der Peptide mit den molekularen Massen von 1032 Da und 1048 Da durchgeführt. Dabei zeigte sich eindeutig, dass der N-Terminus des Proteins acetyliert vorlag (Abb. 3-30 B & C).

Bei der Acetylierung handelt es sich um eine irreversible posttranslationale Modifizierung von Proteinen, bei der eine Acetylgruppe von Acetyl-CoA entweder auf eine α -Aminogruppe der ersten Aminosäure eines Proteins oder auf die ϵ -Aminogruppe von Lysinen übertragen wird (222). Vergleichende Proteomstudien zwischen pflanzlichen und tierischen Zellen zeigten, dass 72 % aller *A. thaliana* Proteine N-terminal acetyliert sind (223). Diese N-terminale Acetylierung wird über N-terminale Acetyltransferasen (NAT) an den Ribosomen auf Proteine übertragen, die bestimmte Erkennungsmotive dafür besitzen. Die Funktion dieser Nt-Acetylierungen ist bisher noch nicht gut verstanden, jedoch wird die Beteiligung bei der Regulation von Entwicklungs- und Wachstumsprozessen diskutiert (224). Während lange Zeit geglaubt wurde, dass solche N-terminalen Modifizierungen das Protein vor dem Abbau durch das Proteasom schützen, wurde in den letzten Jahren auch ein Abbau-Weg von Proteinen beschrieben, bei dem eine solche

Modifizierung des N-Terminus essentiell ist, der sogenannte *N-rule pathway*. Dabei fungiert die Acetylierung des N-Terminus als Kontrollsignal für beispielsweise Ubiquitin-Ligasen, die diese Modifizierung erkennen und daraufhin das Protein ubiquitinieren und so für den Abbau durch das Proteasom markieren (225).

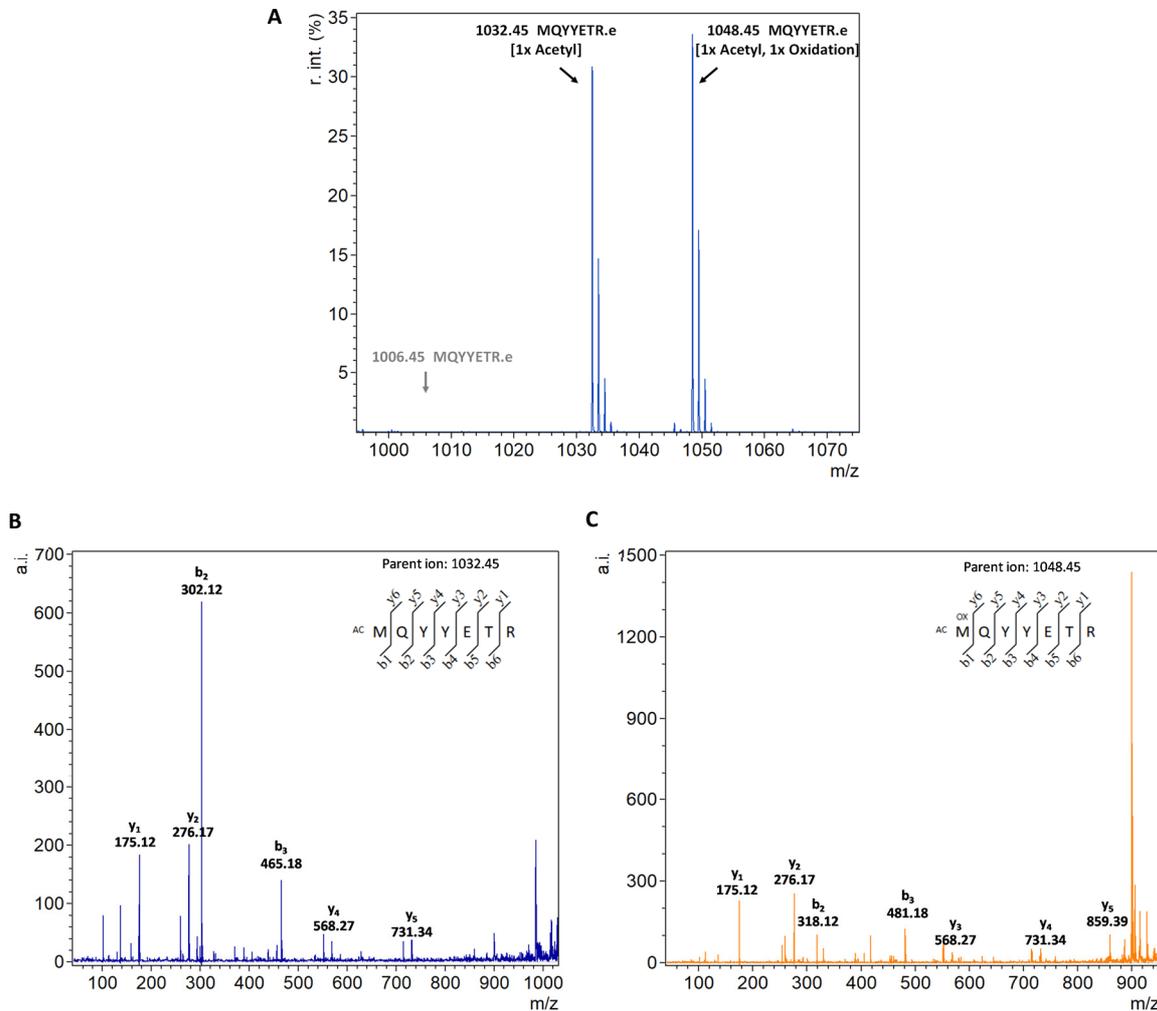


Abb. 3-30: Identifizierung der N-terminalen Acetylierung des At1g64370-Homologs aus Raps. Dazu wurde eine *Peptide mass fingerprint*-Analyse von nativem Protein, isoliert aus Phloemsaft von *B. napus*, durchgeführt. Dargestellt ist das Peptid des N-Terminus im Spektrum (A), während die unmodifizierte Variante kein Signal zeigt (erwarteter monoisotopischer Peak bei 1006.45 (grau über Pfeil angedeutet)), existiert dieses Peptid nur in acetylierter Form (Peak bei 1032.45 Da), wobei dieses außerdem mit Oxidation am Methionin (Peak bei 1048.45 Da) ein Signal zeigt. Über eine anschließende MS/MS-Analyse konnte die α -Aminogruppe des N-Terminus des Proteins als Träger der Acetylierung eindeutig identifiziert werden (B & C).

Über die hier durchgeführte Analyse wurde zum ersten Mal ein acetyliertes Phloemprotein identifiziert. Da das At1g64370-Protein stark ungeordnet vorliegt, ist durchaus denkbar, dass die N-terminale Acetylierung hier die Stabilität des Proteins beeinflusst. Dabei wird die acetylierte Form des Proteins vermutlich eher vor der Ubiquitinierung und somit dem Abbau durch das Proteasom geschützt, als dessen nicht-acetylierte Form. Des Weiteren konnte im Phloem keine ubiquitinierte Form des At1g64370-Homologs identifiziert werden. Dieses könnte dadurch begründet sein, dass im Phloem sowohl die für die Ubiquitinierung erforderlichen Enzyme (47), sowie ATP und ein funktionsfähiges Proteasom vorliegen (226), die einen schnellen Abbau der ubiquitinierten Proteine bedingen.

3.2.2.4 Untersuchung des At1g64370 in Bezug auf seine Dehydrin-Eigenschaften

Bei den Dehydrinen handelt es sich um Proteine, die bei Wassermangel, bedingt durch Hitze, Frost oder auch hohen Salzkonzentrationen eine wichtige Rolle einnehmen. Hierzu sind sie in der Regel stark ungeordnet, weshalb sie vielfältige Aufgaben übernehmen können. Dabei interagieren sie mit verschiedensten Liganden (Abb. 3-31). So konnten bereits Interaktionen von Dehydrinen mit Membranen, Proteinen, Nukleinsäuren, mit dem Zytoskelett sowie mit Ionen nachgewiesen werden (227).

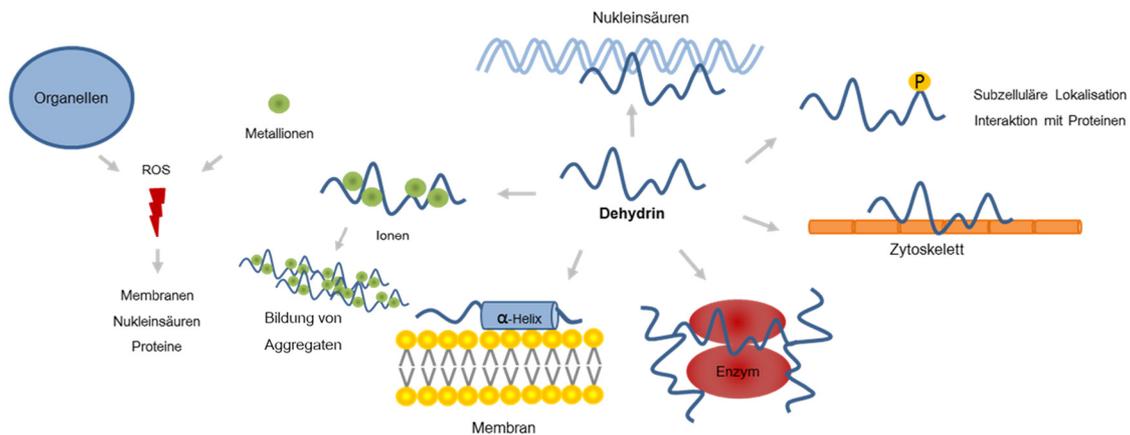


Abb. 3-31: Schematische Darstellung der Funktion von Dehydrinen. Dehydrine können aufgrund ihrer hohen strukturellen Flexibilität vielfältige Funktionen einnehmen. Dabei übernehmen sie im Falle von Wasserstress eine protektive Rolle, indem sie mit unterschiedlichen Liganden interagieren. Zu den Liganden zählen Membranen, Ionen, Enzyme, Zytoskelettkomponenten oder auch Nukleinsäuren. Dazu werden die Dehydrine häufig phosphoryliert, wobei vermutet wird, dass dies mit der subzellulären Lokalisation und Interaktion mit Proteinen in Zusammenhang steht. Modifiziert nach Hara, 2010 (227).

Um zu überprüfen, ob das At1g64370-Protein Dehydrin-Eigenschaften aufweist und somit beispielsweise eine protektive Wirkung auf Zellen hat, wurden Stressversuche zum einen in *E. coli* und zum anderen mit At1g64370-überexprimierenden Pflanzen durchgeführt. Dabei wurden Stressversuche durchgeführt, die in der Regel zu Hydratationsstress führen, wie Hitze- und Froststress sowie hohe Salzkonzentrationen.

3.2.2.4.1 Stressversuche in *E. coli* - Cell viability Assay

Um zu testen, ob das At1g64370-Protein eine schützende Wirkung auf Organismen vor Umwelteinflüssen hat, wurde ein *Cell viability Assay* mit *E. coli* durchgeführt. Während die Kontrollkultur ausschließlich den Leervektor enthielt, exprimierte die zu testende Kultur das Dehydrin-ähnliche Protein aus *A. thaliana*. Nach der Induktion der Expression mittels IPTG wurde das Protein durch die *E. coli*-Zellen für drei Stunden bei 37 °C hergestellt. Anschließend wurden beide Kulturen auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt und anschließend die verschiedenen Stressarten induziert.

Im Fall des Hitzestresses wurden die Kulturen im Anschluss für eine Stunde bei 50 °C weiter inkubiert, während die Bakterien für den Kältestress in drei Zyklen bei -20 °C eingefroren und aufgetaut wurden, anschließend wurden verschiedene Verdünnungen (1:10, 1:20, 1:50, 1:100) hergestellt und 5 µl dieser

verdünnten Kulturen auf eine Agarplatte ausgebracht. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht wurde die Dichte der Kolonien dokumentiert.

Für den Salz-, Schwermetall- sowie ROS-Stress wurden die auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellten Kulturen direkt verdünnt und auf Agarplatten, die verschiedene Konzentrationen an NaCl, Schwermetallen oder Wasserstoffperoxid enthielten, ausgebracht. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und dabei konnte gezeigt werden, dass das At1g64370-Protein weder bei Frost noch bei Salz-, ROS- und Schwermetallstress eine schützende Wirkung auf die Zellen hatte. Bei Hitze hingegen konnten die Zellen, die das Protein hergestellt hatten im Gegensatz zu den Zellen mit Leervektor selbst bei höheren Verdünnungsstufen sichtbare Kolonien bilden (Abb. 3-32). Somit scheint das Protein bei Hitze eine protektive Wirkung auf die Bakterienzellen zu haben und bietet diesen im Falle von verändernden Umweltbedingungen scheinbar einen Vorteil. Bei Hitze reagieren *E. coli*-Bakterien in der Regel mit der Herstellung des Hitzeschutzproteins – GroE. Beim GroE handelt es sich um ein Chaperon und bildet zusammen mit GroEL einen Komplex, der aus 21 Untereinheiten besteht und unter ATP-Verbrauch Proteine faltet (228). So können die Zellen bis zu einer Temperatur von 46 °C überleben (229). Die *E. coli*-Zellen, die das At1g64370-Protein produzierten, konnten allerdings im Vergleich zu der Negativkontrolle bei einer Temperatur von 50 °C überleben. Somit scheint die Anwesenheit des Proteins die Hitzetoleranz der Bakterienzellen zu erhöhen. Auf welcher Ebene das Protein seine protektive Wirkung entfaltet kann nur gemutmaßt werden. Denkbar wären hier die Interaktion mit Proteinen, mit Membranen, aber auch der Reduktion von ROS, da es bei Hitze in Zellen neben der Denaturierung von Proteinen auch zu einer Destabilisierung von Membranen und zur Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies (230, 231) kommt.

Über die Stressversuche in *E. coli* konnte gezeigt werden, dass das At1g64370-Protein eine protektive Wirkung auf den Organismus bei Hitzestress hat. Daher wurde außerdem überprüft, ob das rekombinant

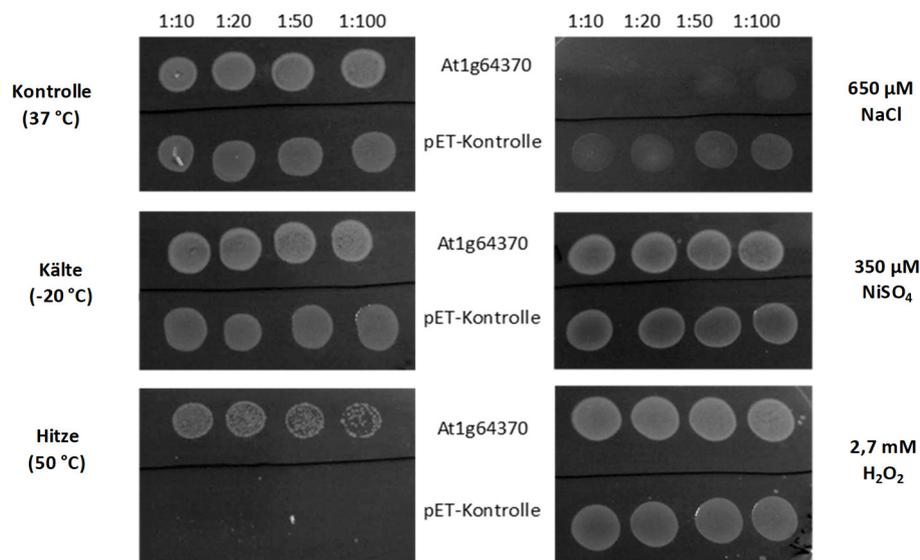


Abb. 3-32: Testen der protektiven Wirkung des unbekannten Proteins auf *E. coli*-Zellen unter verschiedenen Stressbedingungen. Dazu wurden die *E. coli*-Stämme mit beziehungsweise ohne den ORF des At1g64370 zunächst kultiviert und bei einer OD₆₀₀ von 0,6 mit IPTG die Expression des Proteins induziert. Nach 3-stündiger Inkubation wurden beide Kulturen auf eine OD₆₀₀ von 1 verdünnt und anschließend verschiedene Verdünnungsstufen auf der Kontrollplatte beziehungsweise den unterschiedlichen Stressbedingungen ausplattiert. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt.

hergestellte Protein eine Hitzestabilität aufweist. Dazu wurde das Protein aus *E. coli* aufgereinigt, wobei das Lysat für 15 Minuten bei 75 °C erhitzt wurde. Anschließend wurde das Protein über Nickel-Affinitätschromatographie und anschließende Größenausschlusschromatographie aufgereinigt. Dies zeigte, dass das Protein selbst unter hohen Temperaturen stabil blieb und nicht denaturierte. Auch diese Eigenschaft der Hitzestabilität weisen viele intrinsisch ungeordnete Proteine und somit Dehydrine auf, was den Vorteil hat, dass sie über eine Lyse der Zellen durch Hitze aufgereinigt werden können (232).

Um zu analysieren auf welcher molekularen Ebene das Protein seine protektive Wirkung entfaltet, sollten im Folgenden die Interaktionen des At1g64370-Proteins mit Liganden wie Nukleinsäuren, Proteinen sowie Ionen genauer identifiziert werden.

3.2.2.4.2 Interaktion des At1g64370-Proteins mit Nukleinsäuren

Dass das At1g64370 bereits über die Heparin-Affinitätschromatographie aus dem Phloemsaft von *B. napus* angereichert werden konnte (3.1.3.1), zeigt, dass das Protein in der Lage ist entweder mit sulfatiserten Glykosaminoglykanen oder mit Nukleinsäuren zu interagieren. Letzteres resultiert aus der Struktur des Heparins, das die Polyanionenstruktur der Nukleinsäure imitiert. Um zu testen um welche Art von Interaktion es sich handelt, wurden mit rekombinanten Proteinen aus *A. thaliana* sowie *B. napus* diverse *in silico*- und *in vitro*-Analysen durchgeführt. Über *in silico*-Analysen konnten weder DNA-Bindemotive (zum Beispiel Homöobox-Domäne, *Leucine Zipper*-Domäne) noch RNA-Bindedomänen (zum Beispiel RNA-Erkennungsmotiv (RRM), dsRBD, Zink-Finger-, DEAD box Helikase- oder *K homology* (KH)-Domäne) im Protein identifiziert werden. Jedoch weist das Protein, das aufgrund seiner ungeordneten Struktur nahezu überall zugänglich ist, einige positiv geladene Aminosäureabschnitte auf, die möglicherweise mit den polyanionischen Nukleinsäuren interagieren (Abb. 3-33 A). Um die Interaktion des Proteins genauer zu analysieren wurden *Shift*-Assays in Agarosegelen mit verschiedenen Nukleinsäurespezies durchgeführt. Da das Protein einen hohen pI aufweist und somit bei dem pH-Wert des verwendeten Laufpuffers (pH ~ 8,0) in die entgegengesetzte Richtung der negativ geladenen Nukleinsäure migrieren würde, wurde eine besondere Form des *Shift*-Assays – die Zonen-Interferenz Gelelektrophorese (ZIGE) nach Abraham (233) – durchgeführt (Abb. 3-33 B). Die ZIGE-Analyse mit der *Knotted-1* DNA sowie mRNA, die im Phloem bereits nachgewiesen werden konnte (225) und sich aufgrund der Größe von 1080 bp sehr gut für *Shift*-Analysen eignet, zeigte, dass das Protein mit der mRNA stärker interagiert, was sich in einer deutlichen und hochaufgelösten Bande äußerte (Abb. 3-33 C). Im Gegensatz dazu zeigte die Analyse mit der DNA, die die gleiche Größe aufwies, in der GelRed- sowie der Coomassie-Färbung keine definierte Bande im Gel, sondern lediglich ein sehr diffuses Signal (Abb. 3-33 C), was auf eine sehr schwache, unspezifische Interaktion hindeutete. Auch das Testen weiterer DNA-Spezies unterschiedlicher Größe, sowie doppelsträngiger und einzelsträngiger Formen, zeigte in den durchgeführten ZIGE-Versuchen keine Interaktion mit dem Protein (Ergebnisse nicht gezeigt), während weitere Analysen mit Gesamt-RNA (bestehend hauptsächlich aus größeren RNAs wie mRNA, rRNA und tRNA), tRNA sowie miRNA demonstrierten, dass das Protein in der Lage war mit allen getesteten RNA-Spezies zu interagieren (Ergebnisse nicht gezeigt). Da diese modifizierte

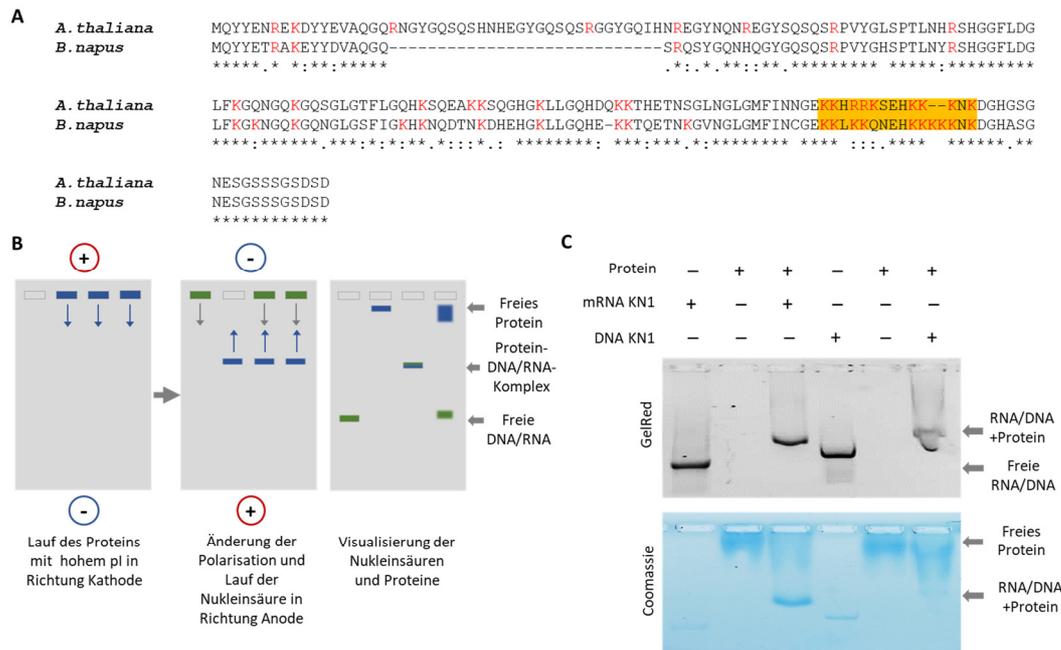


Abb. 3-33: Analyse der Nukleinsäure-Spezifität des At1g64370-Proteins mittels Zonen-Interferenz Gelelektrophorese. Über die *in silico*-Analyse konnte in den untersuchten Proteinen eine konservierte Sequenz aus positiv geladenen Aminosäuren (rot hervorgehoben) identifiziert werden, die möglicherweise eine Rolle bei der Bindung an Nukleinsäuren einnimmt (gelb hinterlegt) (A). Schematische Darstellung des durchgeführten *Shift*-Assays (B). Zur Analyse der Spezifität des At1g64370-Proteins aus *Arabidopsis* wurden ZIGE-Analysen mit der DNA sowie mRNA von *Knotted-1* durchgeführt. Dazu wurden zunächst 30 µM des Proteins, versetzt mit 6x ZIGE-Ladepuffer in einem 1 %-igen Agarose-Gel aufgetragen und die Proteine bei 150 V in Richtung Kathode migriert. Nach 90 Minuten wurde der Lauf gestoppt, 0,5 µg der Nukleinsäuren aufgetragen, die Polarisation geändert und die Nukleinsäuren bei 150 V für 45 Minuten in Richtung Anode migriert. Zur Detektion der Nukleinsäuren wurde GelRed in einem Verhältnis von 1:10000 dem Agarosegel zugegeben und das Gel im Anschluss an den Lauf auf dem UV-Tisch dokumentiert, bevor die Proteine mittels kolloidaler Coomassie-Färbung visualisiert wurden (C).

Form des EMSAs auch die Analyse schwacher Interaktionen erlaubt, kann über die Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen eines Liganden und der anschließenden Bestimmung der Laufweite von freiem und gebundenem Protein eine erste Bestimmung der Affinität durchgeführt werden. Da hier zur Visualisierung mittels GelRed große Mengen an RNA notwendig waren, wurde die Analyse in erster Linie mit kommerziell erhältlicher tRNA aus Hefe durchgeführt. Ein Vorteil dieser RNA-Spezies ist die strukturelle Vielfalt des Moleküls, welches sowohl einzelsträngige, doppelsträngige als auch *Loop*-Bereiche aufweist. Die ZIGE-Versuche mit tRNA zur Bestimmung der Affinität des At1g64370-Proteins zu dieser RNA wurden in Triplikaten durchgeführt, wobei die Konzentration des Proteins konstant gehalten wurde, während die tRNA in einer Konzentration von 65,4 µM bis 0,51 µM eingesetzt wurde. Über die anschließende Bestimmung der Lauffront zwischen dem freien Protein ($d(M)$) und dem mit RNA-interagierenden Protein ($d(exp)$), was in der Abb. 3-34 A beispielhaft an einer Messung dargestellt ist, und der Formel (1) wurde für die Interaktion des analysierten Proteins mit der tRNA eine Dissoziationskonstante (K_D) von 4 - 10 µM ermittelt. Außerdem wurde über die gleiche Weise die Interaktion mit einer selbst synthetisierten Mikro-RNA (miR164) charakterisiert. Diese miRNA konnte bereits im Phloem von Raps identifiziert und charakterisiert werden (10), macht aber aufgrund ihrer geringen Größe und dem daraus resultierenden kleineren Massenunterschied zwischen freiem und gebundenem Protein, die Bestimmung der K_D schwieriger. Dennoch konnte so eine ähnliche K_D von 6 - 10 µM bestimmt werden. Bei der ZIGE-Analyse des rekombinanten Proteins aus *B. napus* mit tRNA konnten ebenfalls K_D -Wert in den genannten Bereichen ermittelt werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

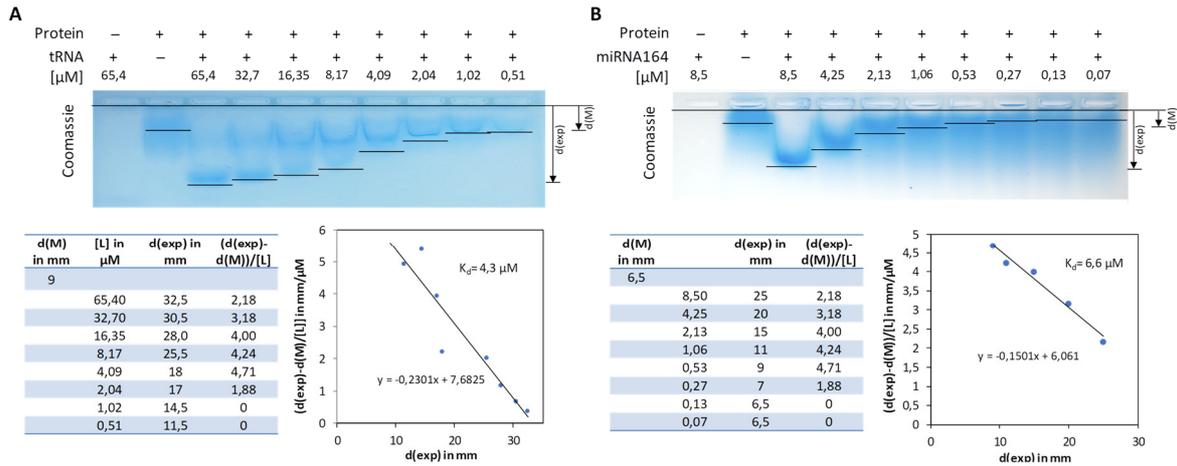


Abb. 3-34: Zonen-Interferenz Gelelektrophorese zur Quantifizierung der Bindungsaffinität des At1g64370-Proteins zu tRNA und miR164. Dazu wurde zunächst eine ZIGE mit 36 µM des rekombinanten Proteins mit unterschiedlichen Konzentrationen an tRNA (A) und miR164 (B) durchgeführt und zur Visualisierung des unterschiedlich migrierenden Proteins wurde das 1 %-ige Agarose-Gel im Anschluss mit kolloidaler Coomassie-Färbelösung behandelt. Darauf folgend wurden die Laufweiten zwischen dem ungebundenen (d(M)) und dem mit RNA-interagierenden Proteinen ermittelt (d(exp)). Die Bestimmung der K_D -Werte aus den experimentell bestimmten Werten erfolgte über die Formel $[(d(\text{exp}) - d(M)) / [L] = - (d(\text{exp}) - d(M)) / K_D]$ (1) und aus dem daraus erstellten Graphen.

Eine exaktere Methode zur Bestimmung der Affinität bietet die *MicroScale* Thermophorese (MST). Dazu wurden die rekombinanten Proteine aus *Arabidopsis* und Raps zunächst fluoreszenz-markiert. Da das Protein aus *Arabidopsis* keine Cysteine besitzt, konnten nur der Lysin-reaktive Farbstoff verwendet werden. Aufgrund der hohen Anzahl an Lysinen im Protein, die aufgrund der strukturellen Unordnung des Proteins alle zugänglich sind, war es nahezu unmöglich eine homogene Fluoreszenzmarkierung des Proteins zu erreichen. Eine homogenere Markierung des Proteins hätte erreicht werden können, indem das Protein bei der Fluoreszenzmarkierung mit einem schwachen Liganden inkubiert wird, der die für die Bindung notwendigen Stellen blockiert und der Fluoreszenzfarbstoff nur an zugänglichen Stellen binden kann. Da es aber bezüglich der Bindeepitope sowie Affinitäten des Proteins keine Informationen gab, war es zunächst das Ziel erste Affinitätsmessungen mit einer Label-Effizienz von einem Fluoreszenzmolekül pro Proteinmolekül durchzuführen. Um eine Vergleichbarkeit mit den bereits durchgeführten ZIGE-Experimenten zu gewährleisten wurden die MST-Analysen ebenfalls mit der tRNA aus Hefe durchgeführt. Auch hier wurde die Konzentration des Proteins (200 nM) konstant gehalten, während die Konzentration der tRNA zwischen 30 µM und 15 nM variierte. Die Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt und da über die bisher durchgeführten Bindestudien gezeigt werden konnte, dass DNA durch das Protein nicht spezifisch gebunden werden konnte, wurden außerdem Messungen mit DNA durchgeführt. Während hier für das At1g64370-Protein keine spezifische Bindung zu DNA ermittelt werden konnte, wurden für beide rekombinanten Proteine aus *Arabidopsis* sowie Raps Affinitäten zu tRNA bestimmt: Diese lagen im Bereich von 4-10 µM und waren somit vergleichbar mit den über ZIGE ermittelten Werten (Abb. 3-35 A & B).

Die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Interaktionsstudien mit Nukleinsäuren zeigten, dass das Protein spezifisch mit RNA interagiert, wobei die Art der RNA keinen Einfluss zu haben scheint. Da über die *in silico*-Analysen keine RNA-Bindemotive identifiziert werden konnten, lässt sich vermuten, dass die Interaktion über positiv geladene Aminosäuren erfolgt. Die Frage, die sich hier ergibt, ist allerdings wie das Protein

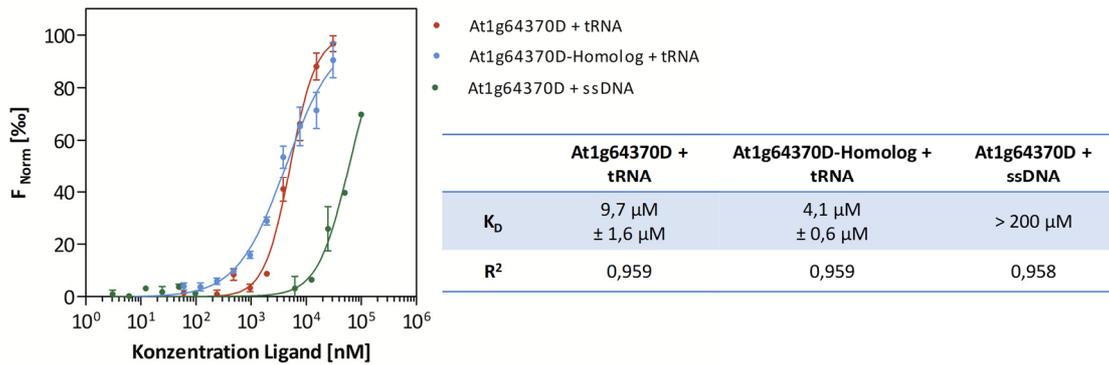


Abb. 3-35: MicroScale Thermophoresis Analyse zur Quantifizierung der Interaktion des At1g64370-Proteins mit tRNA und DNA. Dazu wurde das Protein in einer Konzentration von 200 nM konstant gehalten, das zuvor mit dem Lysin-reaktiven Fluoreszenzfarbstoff NT-647-NHS in einem Verhältnis von 1:1 gekoppelt wurde, mit verschiedenen Konzentrationen des Liganden inkubiert und mittels MST analysiert. Für die Analyse der Thermophoresis ist die Differenz der normalisierten Fluoreszenz [%] gegen die Ligandenkonzentration aufgetragen. Dabei zeigt sich, dass freies Protein ein weniger starkes Fluoreszenzsignal zeigt als gebundenes Protein. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus drei unabhängigen Messungen dar. Über einen nicht-linearen Fit wurden die in der Tabelle dargestellten K_D -Werte ermittelt.

dann zwischen RNA und DNA unterscheiden kann. Während sich DNA und RNA in erster Linie hinsichtlich des Zuckerrückrats und der Base Thymin und Uracil unterscheiden, ist die RNA wesentlich flexibler als DNA, so dass sie sogar Sekundär- aber auch Tertiärstrukturen bildet. So existieren in RNA einzelsträngige, doppelsträngige Bereiche, aber auch sogenannte *Hairpin-Loops*, Pseudo-Knoten, *Stem-Loops* und *Bulges*. Wobei letztere häufig an der Interaktion mit Proteinen beteiligt sind (225). Über strukturelle Analysen der Protein-RNA-Interaktion unabhängig von Bindemotiven konnte gezeigt werden, dass RNA-Protein-Interaktionen hauptsächlich über Van-der-Waals-Bindungen und weniger über Wasserstoffbrücken zwischen Aminosäure-Resten und der Ribose erfolgen. Daran beteiligt sind geladene Aminosäuren wie Lysin und Arginin, aber auch aromatische Aminosäuren wie Phenylalanin oder Tyrosin, die mit den Basen der RNA interkalieren (225). Somit könnte das At1g64370-Protein entweder bestimmte Strukturen in der

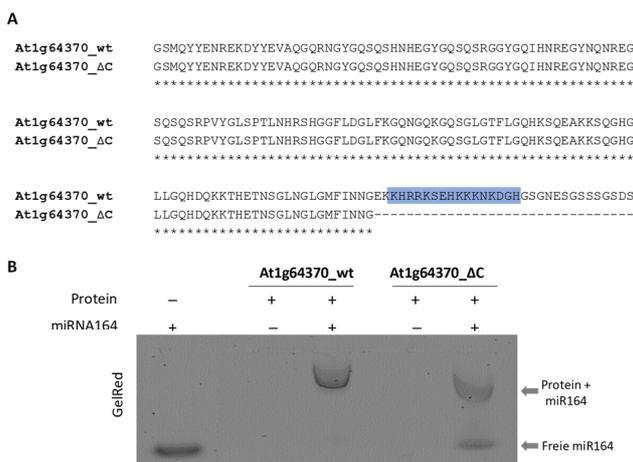


Abb. 3-36: Identifizierung der möglichen RNA-Bindestelle mittels ZEMSA. Um zu analysieren, ob die Sequenz der positiv geladenen Aminosäuren (blau hervorgehoben) eine Rolle bei der RNA-Bindung einnimmt, wurde mit einem C-terminal verkürzten Protein, das weder das S-Segment noch die Lysin-reiche Region enthielt (A), *Shift-Assays* mit miR164 durchgeführt. Dazu wurden 36 μ M des Wildtyp-Proteins (At1g64370_wt) und der mutierten Form (At1g64370_ΔC) mit und ohne miR164 analysiert (B).

RNA erkennen, wahrscheinlicher erscheint jedoch die Interaktion mit der RNA über bestimmte Sequenzen, die positiv geladene und aromatische Aminosäuren aufweisen. Betrachtet man die Sequenzen der analysierten Proteine so zeigen sich die in der Abbildung hervorgehobenen Sequenzen als mögliche Interaktionsstellen (Abb. 3-36 A). Um die Interaktionsstelle genauer zu identifizieren, wurde mit einer rekombinant hergestellten Mutante des At1g64370-Proteins aus *Arabidopsis*, bei der der C-Terminus einschließlich der konservierten Lysin-reichen Region (KKHRRKSEHKKKND) eliminiert wurde (Abb. 3-36 A), und der selbst synthetisierten miR164, die bereits als

Interaktionspartner identifiziert werden konnte, ZIGE-Versuche durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die mutierte Form des Proteins zwar noch in der Lage war die miR164 zu binden, allerdings schien die Interaktion im Vergleich zum Wildtyp deutlich weniger stark zu erfolgen, da trotz gleicher Konzentration des Proteins und des Liganden, mehr freie miR164 auftrat, was sich in der GelRed-Färbung zeigte (Abb. 3-36 B).

Um genauer zu verifizieren, ob die Lysin-reiche Region an der RNA-Bindung beteiligt ist, wurde mit der miR164 (Abb. 3-37 A) und dem rekombinant hergestellten Protein ein UV-Crosslinking durchgeführt. UV-Crosslinking ist eine Standardmethode zur Identifizierung von RNA-Bindeproteinen. In der Regel bindet RNA über transiente nicht-kovalente Interaktionen, beispielsweise elektrostatische Bindungen oder auch Wasserstoffbrückenbindung, an Proteine. Über die Verwendung kurzwelliger UV-Strahlung ist es möglich

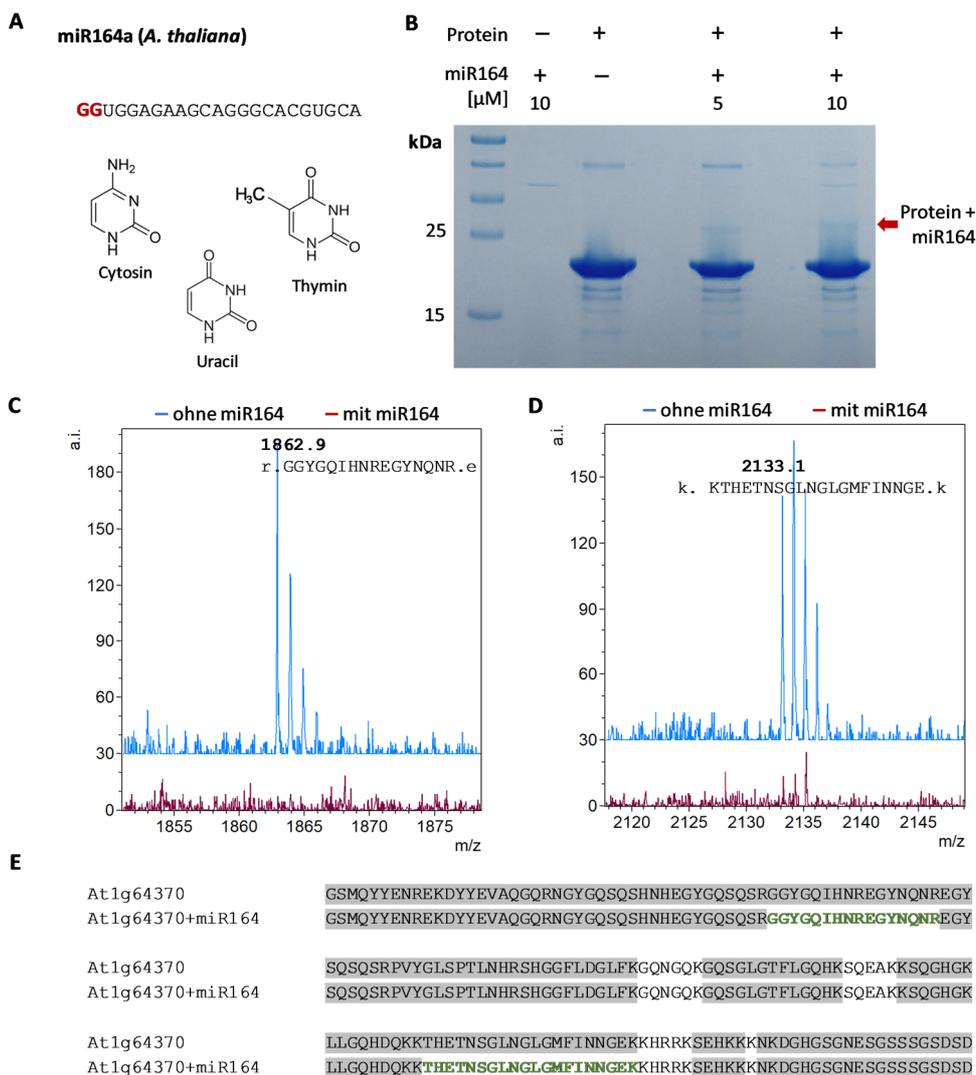


Abb. 3-37: UV-Crosslinking Versuch zur Identifizierung möglicher RNA-Bindestellen im At1g64370-Protein. Für das UV-Crosslinking wurde die selbst synthetisierte miR164 verwendet, die am 3'-Ende zwei artifizielle Guanine (rot) und sechs Pyrimidine aufweist (A). Für die Reaktion wurden 20 µM des rekombinanten Proteins mit 5 µM beziehungsweise 10 µM miR164 inkubiert, bei 254 nm für 12 min. miteinander verknüpft und die Proben anschließend mittels SDS-PAGE in einem 15 %-igen SDS-Gel aufgetrennt (B). Im Anschluss an die kolloidale Coomassie-Färbung wurden zusätzliche Banden (roter Pfeil) sowie das Protein ohne miR164 in-Gel trypsinisiert und mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Über einen Vergleich der Spektren wurden Unterschiede herausgearbeitet, wobei die in grau unterlegten Bereiche identifiziert werden konnten (E). Jedoch fehlten im Spektrum der mit miR164 behandelten Probe zwei Peptidfragmente (C & D), wobei es sich um putative RNA-Bindestellen handelt, die in (E) farblich hervorgehoben sind.

aromatische Ringe, die in unmittelbarer Nähe liegen, kovalent miteinander zu verknüpfen. Da aromatische Ringe sowohl in einigen Aminosäuren (Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan) als auch in Basen von Nucleinsäuren vorkommen, können durch die Verwendung von UV-Licht interagierende RNAs und Proteine miteinander irreversibel verknüpft werden (234). Dabei bilden die in Lösung befindlichen Pyrimidine 10-fach mehr freie Radikale im Vergleich zu Purinen und können dann mit verschiedenen Aminosäuren wie Cystein, Serin, Methionin, Lysin, Arginin, Histidin, Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin verknüpft werden (235). Diese kovalent-verknüpften RNA-Protein-Komplexe sind selbst in Polyacrylamidgelen noch stabil und ermöglichen eine anschließende MS-Analyse zur Identifizierung möglicher Interaktionsstellen: So sollte im Vergleich zu der unbehandelten Probe das an der RNA-Bindung beteiligte Peptid im Spektrum fehlen, da es durch die irreversible Vernetzung mit der RNA eine andere Masse besitzt. Obwohl die im Rahmen der Arbeit durchgeführte UV-Crosslinking Methode bei einer Wellenlänge von 254 nm ohne modifizierte Basen in der Regel sehr ineffizient ist, konnte im Polyacrylamidgel im Vergleich zur Kontrollreaktion (Protein ohne miR164) in den mit miR164-verknüpften Proben eine zusätzliche Bande detektiert werden (Abb. 3-37 B). Über die anschließende Analyse der in-Gel trypsinierten Proben mittels MALDI-TOF-MS konnten zwei Peptide identifiziert werden (Abb. 3-37 C & D), die im Vergleich zur Negativkontrolle fehlten und somit möglicherweise in nahem Kontakt zu der miR164 während der UV-Crosslinking-Reaktion standen. Hierbei handelt es sich um mögliche Interaktionsstellen. Eine der beiden möglichen Bindestellen liegt im Bereich der Lysin-reichen-Region am C-Terminus, die bereits als mögliche RNA-Bindestelle diskutiert wurde (Abb. 3-37 E).

Auf diese Weise wurden für das At1g64370-Protein die folgenden Peptide (GGYGQIHNREGYNQNR und THETNSGLNGLGMFINNGEK) ermittelt, die putativ mit der RNA interagieren oder zumindest in unmittelbarer Nähe zur RNA liegen. Während ersteres sowohl positiv geladenen Aminosäuren und aromatische Aminosäuren aufweist, welche bei der RNA-Bindung eine wichtige Rolle spielen, liegt das zweite identifizierte Peptid in unmittelbarer Nähe der Lysin-reichen Sequenz.

Aus den im Rahmen der Arbeit durchgeführten Analysen lässt sich schließen, dass das untersuchte Protein aufgrund seiner Affinität zu RNA mittels Heparin-Affinitätschromatographie nativ aus Phloemsaft isoliert werden konnte. Daher könnte es sich um ein Phloem-mobiles RNA-Bindeprotein (RBP) handeln. Dieses weist mit einer Dissoziationskonstante im Bereich von 10^{-6} M eine moderate Affinität zu tRNA und miR164 auf, während für DNA nur eine sehr schwache und somit wahrscheinlich unspezifische Bindung gezeigt werden konnte. Aufgrund der Tatsache, dass es sich beim At1g64370-Protein um ein stark ungeordnetes Protein handelt, könnte es als RNA-Chaperon fungieren. Somit könnte es im Phloem für den Langstreckentransport verschiedener RNA-Spezies zuständig sein, diese vor dem Abbau durch RNasen schützen und so die Integrität der RNA und deren Struktur erhalten. Da im Phloem bisher keine transkriptionelle Aktivität gezeigt werden konnte (10, 16), müssen die im Phloem befindlichen RNAs vom Ort ihrer Synthese ins Phloem gelangen. Dazu müssen die RNAs die Plasmodesmen – die sogenannten *Plasmodesmal Pore Units* (PPUs) - zwischen den Geleitzellen und den Siebelementen passieren, wobei zwei Theorien zum Transport existieren. Dabei werden zum einen ein ungerichteter, nicht-selektiver Mechanismus über Diffusion (34) und zum anderen ein gerichteter Transport über Carrier diskutiert (19).

Letzterer erfordert die Beteiligung von Transportproteinen, wie es bereits für ein 27 kDa Phloemprotein gezeigt werden konnte (19).

Bei der Untersuchung von RBPs in den letzten Jahren, zeigte sich, dass ein Großteil der RNA-Bindeproteine keine Bindedomäne besitzt, sondern intrinsisch ungeordnet ist. In Säugetieren konnte gezeigt werden, dass 20 % aller identifizierten RBPs eine ungeordnete Struktur von 80 % besitzen (236, 237). Bei der Analyse dieser RNA-Binderegionen konnten drei Klassen von ungeordneten Regionen mit RNA-Bindeeigenschaft ermittelt werden: die RS-Repeats, RG[G]-Repeats und K/R basische Bereiche. Im Menschen existieren 47 RBPs, die keine RNA-Bindemotive besitzen, jedoch über K-reiche Segmente, die meist am C-Terminus lokalisiert sind, spezifisch an RNA binden. Da es sich hierbei um Interaktion der positiv geladenen AS-Reste mit der negativ geladenen Phosphatgruppe handelt, ist bisher nicht bekannt wie trotzdem eine Spezifität für RNA gewährleistet werden kann (238). Diese spezifischen Bindungen resultieren aber vermutlich aus einem *Induced fit*-Mechanismus, wobei das Protein bei der Bindung an RNA seine Konformation so verändert, dass es perfekt mit der Nukleinsäure interagieren kann (68). Beschrieben ist dieses Phänomen für das ribosomale Protein L11. Dieses besitzt zwei Loops, die in der Regel stark ungeordnet sind. Bindet jedoch RNA an das Protein, so bilden sie über eine Konformationsänderung eine definierte Komplexstruktur (239). Zwar konnte über CD-Messungen des At1g64370 durch S. Ostendorp gezeigt werden, dass das Protein durch die Bindung mit tRNA keine zusätzliche Sekundärstrukturen ausbildet, allerdings ist es dennoch möglich, dass es seine Konformation ändert um mit der RNA interagieren zu können und diese für die Bindung nicht notwendig sind.

Zwar wird für Dehydrine beschrieben, dass sie in der Lage sind mit Nukleinsäuren zu interagieren, allerdings ist über den Bindemechanismus bisher wenig bekannt. Dabei wird diskutiert, dass das K-reiche Segment, das in einigen Dehydrinen zusätzlich auftritt, an der Bindung an DNA beteiligt ist (98), jedoch konnte eine spezifische Interaktion von Dehydrinen mit RNA zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht nachgewiesen werden. Lediglich eine unspezifische Bindung des CuCOR15 an DNA und RNA bei Anwesenheit von Zink konnte durch Hara *et al.* gezeigt werden (240).

Phosphorylierungen in der Nähe der RNA-Bindestelle können die Interaktion mit RNA beeinflussen, allerdings ist noch nicht bekannt auf welche Weise dies geschieht. So kommt es aber vermutlich aufgrund der Ladung zu abstoßenden Effekten, was möglicherweise zu einer Entladung der RNA vom Protein führt. Aufgrund der Tatsache, dass das native Homolog des At1g64370 im Phloemsaft stark phosphoryliert vorliegt und trotzdem über die Heparinsäule angereichert werden konnte, deutet allerdings bereits darauf hin, dass die Interaktion des untersuchten Proteins mit RNA durch die Phosphorylierung nicht beeinflusst wird.

3.2.2.4.3 Interaktion mit Proteinen

Die Dehydrine spielen eine Rolle bei zellulärer Dehydrierung und sollen die Integrität der Zellen aufrechterhalten. Dabei konnte bereits über verschiedene *in vitro*-Studien gezeigt werden, dass sie dazu mit verschiedenen Liganden interagieren, beispielsweise Membranen, aber auch Proteinen (185). Zur Analyse

der Bindung des At1g64370-Proteins an andere Proteine wurden im Rahmen der Arbeit zum einen *Pull-Down Assays*, *Crosslinking*-Versuche sowie *Far Western Blots* mit den rekombinanten Proteinen und Phloemsaft durchgeführt. Dabei konnten über die *Pull-Down Assays* weder spezifische stabile Interaktionen noch über *Far Western Blot* und *Crosslinking*-Versuche spezifische transiente Interaktionen identifiziert werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Das Einzige, das über die Versuche gezeigt werden konnte, war, dass das At1g64370 Protein vermutlich Oligomere bildet.

Da über die durchgeführten Analysen kein spezifischer Interaktionspartner gefunden werden konnte und Dehydrine in der Regel auch keinen spezifischen, sondern ähnlich wie Chaperone mehrere Interaktionspartner besitzen, sollte im nächsten Schritt überprüft werden, ob das At1g64370-Protein die Eigenschaft besitzt sich unter bestimmten Stressbedingungen an Proteine anzulagern, um diese so vor Denaturierung zu schützen. Ein *in vitro*-Test, über den die protektive Wirkung verschiedener Dehydrine bereits gezeigt werden konnte, ist ein Protektionsassay mit der thermo-labilen Lactat-Dehydrogenase (LDH) (241–244), die nach mehreren Gefrier- und Tauzyklen denaturiert und aggregiert und so ihre Aktivität verliert (243). Die LDH ist ein Enzym der Milchsäuregärung und katalysiert die Bildung von L-Lactat aus Pyruvat, wobei das Coenzym NADH zu NAD⁺ oxidiert wird. Letzteres lässt sich über eine Messung der Absorption bei 340 nm detektieren. Bei diesem Assay wird die eigentlich frost-labile LDH in Anwesenheit von Additiven eingefroren und die cryoprotektive Wirkung dieser Additive über die Ermittlung der enzymatischen Restaktivität bestimmt. Da allerdings nicht nur Frost, sondern auch Hitze das Wasserpotential in einem Gewebe reduziert, wurden im Rahmen der Arbeit nicht nur die protektive Wirkung des At1g64370-Proteins bei Frost, sondern auch bei Hitze getestet. Dazu wurde das Enzym ohne oder mit dem möglichen Cryoprotektanten (At1g64370-Protein), dem cryoprotektiven BSA und als Negativkontrolle mit Lysozym entweder in mehreren Zyklen eingefroren und aufgetaut oder bei 60 °C für 3 Minuten erhitzt. Im Anschluss wurde die Restaktivität der LDH über die Oxidation des Cofaktors NADH, durch Messung der Absorption bei 340 nm über 15 Minuten, analysiert. Über die Auftragung der relativen Absorption bei 340 nm gegen die Zeit (Abb. 3-38 A & B), wurde die Steigung ermittelt, über die schließlich die Restaktivität der LDH mit Additiven im Vergleich zur Aktivität ohne Additive bestimmt wurde. Dabei zeigte sich, dass das untersuchte Protein die LDH bei Hitze schützte, so dass diese nach der Hitzebehandlung noch eine 5,6-fache Restaktivität gegenüber der LDH ohne weitere Additive aufwies, während die Restaktivitäten bei Zugabe von Lysozym (2,8-fach) und BSA (2,4-fach) deutlich geringer ausfielen (Abb. 3-38 A & C).

Bei Frost zeigte sich hingegen ein anderes Ergebnis: Hier zeigte das BSA erwartungsgemäß eine starke cryoprotektive Wirkung (6,3-fache Restaktivität) und das Lysozym nur eine sehr schwache schützende Wirkung (1,35-fache Restaktivität) (245). Mit einer 3,1-fachen Restaktivität der LDH-Restaktivität hat auch das putative Dehydrin At1g64370D eine geringe cryoprotektive Wirkung, allerdings ist diese schützende Wirkung im Vergleich zur Hitzebehandlung deutlich schwächer (Abb. 3-38 B & D).

Durch Kombination des hier durchgeführten LDH-Assays mit dem *Cell viability Assay* in *E. coli* (3.2.2.4.1) lässt sich vermuten, dass das untersuchte At1g64370-Protein in der Lage ist sich bei Hitze an Proteine anzulagern und diese so bei Wasserentzug vor Denaturierung zu schützen. Dafür scheint das Protein im

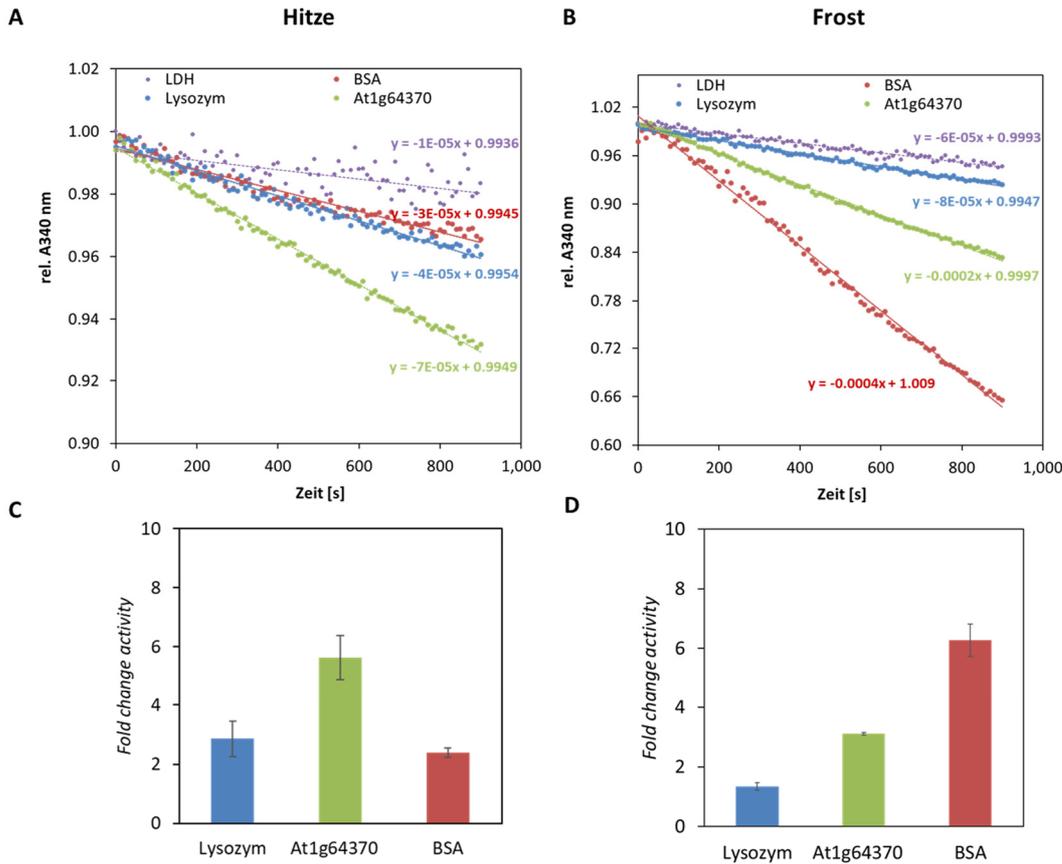


Abb. 3-38: Analyse der protektiven Wirkung des At1g64370-Proteins mittels des LDH-Assays. Dabei wurde die Wahrung der LDH-Aktivität bei Hitze und Frost in Ab- und Anwesenheit von Additiven (Lysozym, BSA und At1g64370-Protein) analysiert. Dazu wurde das Enzym in einer Konzentration von 50 µg/ml eingesetzt, die Additive in einer Konzentration von 750 nM vor der Hitze- (60 °C für 3 min) (A & C) beziehungsweise Frostbehandlung (drei Gefrierzyklen bei -20 °C und anschließendem Auftauen bei RT) (B & D) zugegeben und im Anschluss der Umsatz des Substrates bei einer Wellenlänge von 340 nm über einen Zeitraum von 900 s in Triplikaten gemessen. Anschließend wurde die relative Absorption bei 340 nm (rel. A_{340 nm}) gegen die Zeit aufgetragen (A & B) und aus den Steigungen der *Fold change* der Aktivität zwischen den Messungen der LDH-Aktivität ohne beziehungsweise mit Additiven bestimmt (C & D).

Fälle von Frost induziertem Stress eine weniger protektive Wirkung zu besitzen. Diese Eigenschaft des Proteins lässt sich vermutlich auf die stark intrinsisch ungeordnete Struktur und der sich daraus ergebenden Hitzestabilität zurückführen und zeigt nochmals den Vorteil solcher intrinsisch ungeordneteren Proteine gegenüber globulären, geordneten Proteinen, die bei Hitze ebenfalls denaturieren und so ihre Funktion verlieren, wie es beim BSA deutlich wurde.

Somit konnten die Protein-Protein-Interaktionsstudien zeigen, dass das At1g6370-Protein zwar keinen spezifischen hoch affinen Interaktionspartner auf Proteinebene besitzt, allerdings unter Stressbedingungen in der Lage ist Proteine vor Denaturierung zu schützen. Dies erfolgt vermutlich weniger über eine spezifische Interaktion als vielmehr über ein Anlagern an das zu schützende Protein. Somit besitzt es eine Chaperon-Eigenschaft. Solch eine protektive Wirkung auf Proteine unter verschiedenen Stressbedingungen konnte bereits für verschiedene Proteine gezeigt werden (242, 246–248). Dabei wird immer wieder vermutet, dass das für Dehydrine essentielle K-Segment für die cryoprotektive Rolle verantwortlich ist (244). Allerdings konnten weitere Studien zeigen, dass neben dem K-Segment auch die Größe und der Grad der Ungeordnetheit des Dehydrins eine Rolle spielt (249). Daher wird angenommen, dass die Dehydrine weniger über direkte Interaktion mit dem Protein ihre schützende Wirkung entfalten, sondern im Falle von

Wassermangel sich vielmehr wie ein molekulares Schild um das zu schützende Protein legen und so die Aggregation und den Funktionsverlust vermeiden (249). Da das At1g64370-Protein kein K-Segment besitzt, jedoch eine schwache cryoprotektive Wirkung zeigt, scheint die Annahme, dass allein das K-Segment die schützende Wirkung bei Frost bedingt nicht zu stimmen. Außerdem scheint dieses Segment für die schützende Wirkung bei Hitze keine Rolle zu spielen, sodass vermutet werden kann, dass die gezeigte protektive Wirkung des untersuchten Proteins eher auf die ungeordnete Struktur zurückzuführen ist. So konnte S. Ostendorp im Rahmen seiner Arbeit über SAXS-Messungen zeigen, dass das Protein mit zunehmender Konzentration des Proteins in seiner Struktur stärker elongiert vorliegt. Dieser Effekt wird als *Crowding* bezeichnet und tritt auch bei Wassermangel auf, so dass vermutet werden kann, dass das Protein unter diesen Bedingungen in seiner elongierten Form vorliegt und daher seine Funktion als molekulares Schild perfekt ausführen kann.

3.2.2.4.4 Interaktion des At1g64370-Proteins mit Ionen

Eine weitere Eigenschaft von Dehydrinen ist die Bindung von freien Metall-Ionen. Bei diesen Metallen handelt es sich in der Regel um Mikronährstoffe, die für die Funktion einiger Enzyme notwendig sind und somit für das Überleben eines Organismus essentiell sind. Hierbei handelt es sich um zweiwertige Kationen wie Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , die allerdings, wenn sie in hohen Konzentrationen in der Zelle vorkommen zur Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führen und somit schädlich sind, da sie Proteine, Nukleinsäuren oder auch Membranen zerstören. Über die Identifizierung Metall-bindender Proteine aus dem Phloemsaft mittels IMAC (3.1.3.2), konnte bereits nachgewiesen, dass das abundant im Phloem vorkommende Homolog des At1g64370-Proteins an verschiedenen Ionen (Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} -Ionen) bindet. Über eine Pro-Q-Färbung der Proteine konnte bereits gezeigt werden, dass es sich bei den Proteinen, die mittels verschiedener IMACs angereichert werden konnten, um Phosphoproteine handelt. Durch diese Phosphorylierungen wird die Oberflächenladung der Proteine verändert, was eine Bindung an Ionen verursachen könnte. Um zu überprüfen, ob die Bindung der Ionen an das At1g64370-Protein aus der Phosphorylierung resultiert oder durch andere Aminosäuren, beispielsweise die insgesamt zwölf über die Sequenz verteilten Histidine (Abb. 3-39 A), herbeigeführt wird, wurde die IMAC mit verschiedenen Liganden mit rekombinantem, unphosphoryliertem Protein wiederholt. Auch hier zeigte sich, dass auch das unmodifizierte Protein in der Lage ist zweiwertige Ionen zu binden. Während es mit Cobalt, Kupfer, Nickel

Tab. 3-9: An Bindung bestimmter Ionen beteiligte Aminosäurereste.

Ion	An Bindung beteiligte Aminosäure-Reste
Ca^{2+}	Asp, Glu, Asn, Gly
Cu^{2+}	His
Mg^{2+}	Asp, Glu
Fe^{3+}	His, Glu, Asp, Cys, Tyr
Mn^{2+}	Asp, His, Glu
Zn^{2+}	Cys, His

und Zink interagierte, konnte für Calcium, Magnesium, Cadmium und Eisen keine Interaktion nachgewiesen werden (Abb. 3-39 B). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass das At1g64370 allein über die Phosphorylierung mit den zweiwertigen Ionen interagiert. Eine weitere Möglichkeit, über die ein Protein mit Ionen interagieren kann, ist über

Aminosäure-Reste der sauren Aminosäuren wie Aspartat, Glutamat und Asparagin, aber auch Glycin, Tyrosin, Cystein und vor allem Histidin, wobei vermutet wird, dass bestimmte Ionen die Bindung an

bestimmte Aminosäure-Reste bevorzugen (Tab. 3-9) (250). Für das Dehydrin HIRD11 konnte bereits gezeigt werden, dass es in der Lage ist zweiwertige Ionen wie Cobalt, Kupfer, Nickel und Zink zu binden, was einen Strukturgewinn induziert (171). Dabei wurden als Bindestellen der Ionen Histidine identifiziert, wobei vermutet wird, dass dafür mindestens zwei aufeinander folgende Histidine zuständig sind (163). Obwohl das At1g64370-Protein eine Reihe von Histidinen aufweist, jedoch keine davon unmittelbar aufeinander folgend, sollte im Folgenden getestet werden, ob das Protein ebenfalls über Histidin-Reste mit den Ionen interagiert. Dazu wurde das Protein zunächst mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt. Das DEPC ist ein Reagenz zur Modifizierung von Histidin-Resten (Abb. 3-40). Da das DEPC in Wasser unlöslich ist, wird dieses zunächst in einem organischen Lösemittel aufgenommen, beispielsweise Acetonitril. Die

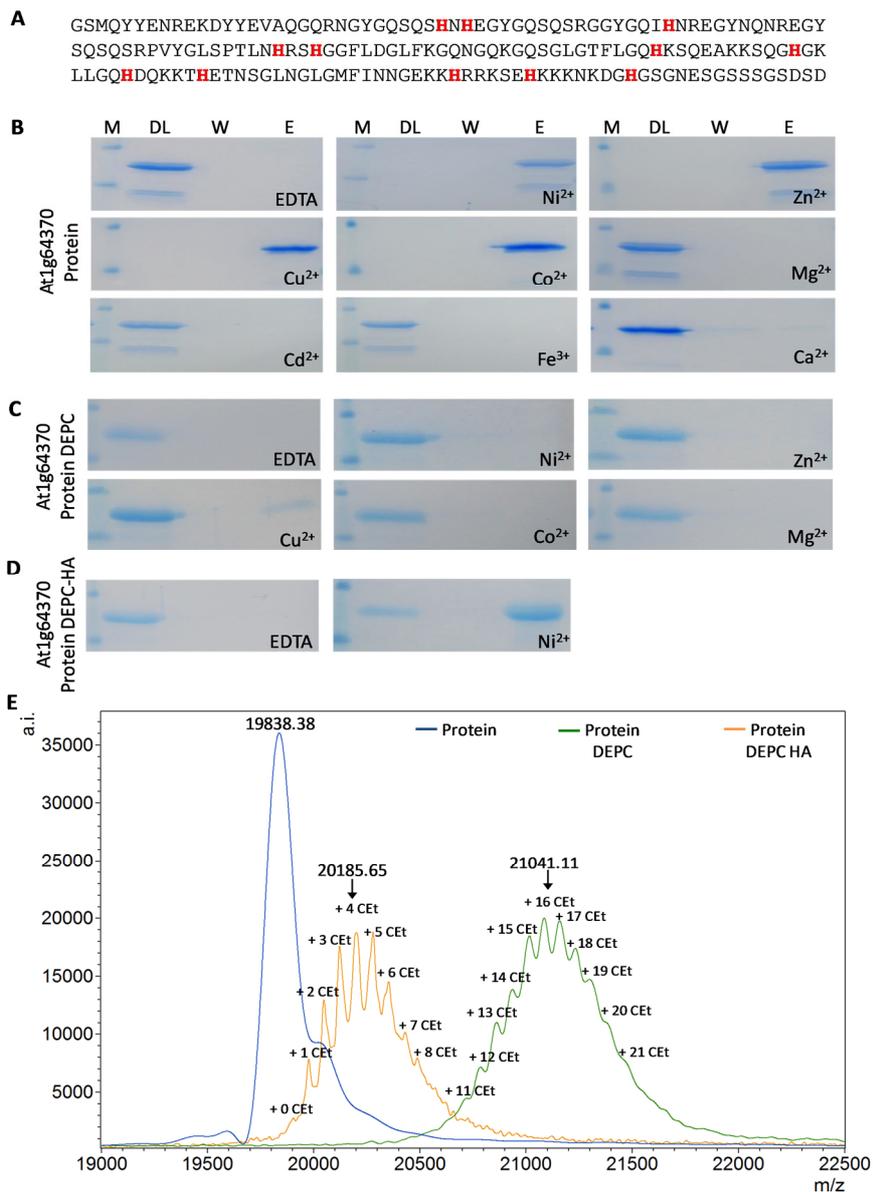


Abb. 3-39: Untersuchung der Ionenbindeeeigenschaft des At1g64370-Proteins aus *A. thaliana*. Das rekombinant hergestellte Protein enthält zwölf Histidin-Reste, die möglicherweise die Bindung der Ionen bedingen (rot hervorgehoben) (A). Die IMAC wurde mit unbeladenen (EDTA) und mit Ionen beladenen NTA-Beads (Ni, Zn, Cu, Co, Mg) und 20 µM At1g64370-Protein durchgeführt. Auf einem 15 %-igen SDS- Gel wurden der Durchlauf (DL), der letzte Waschschrift (W), sowie die mittels EDTA-eluierten Proben (E) aufgetragen und separiert (B). Um zu überprüfen, ob Histidine an der Bindung der Ionen beteiligt sind, wurde das Protein mit DEPC modifiziert und die Modifizierung an den Histidinen über die Behandlung mit Hydroxylamin (HA) wieder rückgängig gemacht. Die Modifizierungen wurden mittels MALDI-TOF-MS im Linear-Modus überprüft (E) und die IMAC mit dem DEPC-modifizierten Protein (C) und DEPC-modifiziertem und HA-behandeltem Protein (D) erneut durchgeführt.

Reaktion wird in der Regel bei RT oder 37 °C, bei einem pH-Wert von 5,5-7,5 und einem 0,5-1000-fachen molaren Überschuss des DEPCs für 1 bis 120 Minuten durchgeführt. Über MS-basierte Studien konnte gezeigt werden, dass DEPC unter bestimmten Bedingungen auch Threonin-, Serin-, Cystein-, Tyrosin-,

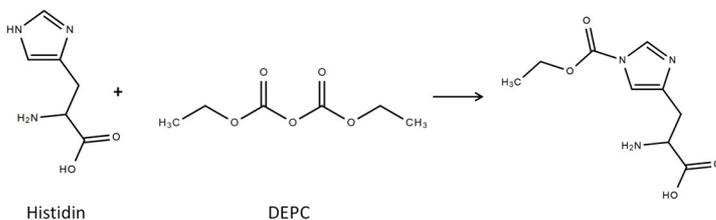


Abb. 3-40: Reaktion von Histidin mit DEPC.

Arginin- und Lysin-Reste modifizieren kann, wobei bei einem pH-Wert zwischen 6-8 der Lysin-Anteil relativ hoch ist (251). Somit bildet das DEPC in erster Linie mit Histidinen und primären Aminogruppen (zum Beispiel am N-

Terminus und an Lysinen) eine Iminbindung aus, wobei man von einer Carbethoxylierung spricht. Diese Modifizierungen an Histidinen sind bei Zugabe von nucleophilen Substanzen, wie Hydroxylamin (HA) oder Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), reversibel (252), während Modifizierung an Lysinen in der Regel erhalten bleiben.

Im Rahmen der Arbeit wurde die Reaktion in einem 50 mM MOPS-Puffer bei einem pH-Wert von 7,5 für 1 Minute mit einem 400-fach molaren Überschuss an DEPC (gelöst in Acetonitril) durchgeführt. Diese kurze Inkubationszeit, der pH, sowie der molare Überschuss wurden dabei so gewählt, um möglichst nur Histidin- und Lysin-Modifizierungen zu erhalten und den Anteil anderer Modifizierungen so niedrig wie möglich zu halten. Um den Anteil Lysin-modifizierter Reste zu identifizieren, wurde im Anschluss an die DEPC-Behandlung die nucleophile Substanz HA hinzugegeben. Nach der Inkubation des At1g64370-Protein mit dem DEPC und HA wurde mittels MALDI-TOF-MS analysiert, ob die Modifizierung und die reversible Reaktion mittels HA erfolgreich war (Abb. 3-39 E). Darüber wurde deutlich, dass das Protein durch DEPC an 11 bis 21 Stellen modifiziert werden konnte, wobei 16 Modifizierungen durchschnittlich am häufigsten auftraten. Durch die anschließende Behandlung mit HA konnten einige der Carbethoxylierung rückgängig gemacht werden, was sich in einer reduzierten Masse im Vergleich zum modifizierten Protein äußerte. So traten nach der Behandlung mit DEPC und HA 0 bis 8 Modifizierungen auf, wobei 4 modifizierte Stellen am häufigsten auftraten. Somit konnten durch die HA-Behandlung im Schnitt 12 Carbethoxylierungen rückgängig gemacht werden. Da diese Modifizierung nur an Histidin-Resten reversibel ist, lässt sich daraus schließen, dass vermutlich alle 12 Histidine zugänglich sind und durch das DEPC modifiziert vorlagen. Da aber auch mehr als 12 Modifizierungen am Protein auftraten, die durch das Hydroxylamin nicht entfernt werden konnten, wird deutlich, dass trotz der kurzen Inkubationszeit mit DEPC auch andere Aminosäuren modifiziert werden konnten. Hierbei handelt es sich vermutlich um die Aminogruppe am N-Terminus und Lysinreste. Eine exakte Identifizierung der modifizierten Stellen mittels Trypsin-Verdau und anschließender MALDI-TOF-MS-Analyse war nur bedingt möglich, da es sich zum einen um eine Vielzahl verschieden modifizierter Proteine handelte und zum anderen die modifizierten Fragmente häufig dieselbe Masse besaßen und so eine MS/MS-Analyse nicht möglich war. Jedoch wurden neben Histidinen, auch Tyrosine und Lysine modifiziert. Letztere bewirkten außerdem *Miscleavages* beim Trypsin-Verdau, welche die MS-Auswertung außerdem erschwerten.

Mit den DEPC-modifizierten Proteinen sowie den anschließend mit HA-behandelten Proteinen wurde wiederum eine IMAC mit Ni²⁺-Ionen durchgeführt, wobei sich zeigte, dass das DEPC-modifizierte Protein nicht mehr in der Lage war an den Ionen zu binden (Abb. 3-39 C), während die Proteine, bei denen die Modifizierung der Histidine über das HA aufgehoben wurde, wieder an der Säule zurückgehalten werden konnten (Abb. 3-39 D). Dies beweist, dass die Histidin-Reste an der Bindung der Ionen beteiligt sind. Während beim HIRD11, dem nahen Verwandten des At1g64370-Proteins gezeigt werden konnte, dass für die Bindung der Ionen zwei Histidin-Reste in Reihe verantwortlich sind (98), existieren diese im untersuchten Protein nicht und scheinen für die Bindung nicht essentiell zu sein. Unter der Annahme, dass das At1g64370-Protein Histidine nutzt um mit Ionen zu interagieren, ergeben sich verschiedene Möglichkeiten: Entweder interagieren die einzelnen Histidine mit den Ionen und die Bindung wird über saure Aminosäuren, in der Nähe der Histidine stabilisiert oder das Protein ändert seine Konformation so, dass zwei Histidine in unmittelbarer Nähe liegen und so das Ion komplexieren. Außerdem wäre denkbar, dass es mit den Ionen zu einer intermolekularen Bindung kommt, wobei die Ionen mit zwei Histidinen unterschiedlicher Proteine interagieren, wodurch das Protein beginnt Aggregate zu bilden. Um dies auf struktureller Ebene genauer zu klären, führte S. Ostendorp mit dem rekombinanten Protein und Ionen und ebenfalls strukturelle *Proteomic*-Studien mit DEPC durch, wobei sich andeutete, dass es induziert durch die Ionen zu einer Aggregatbildung des Proteins kommt. Um dies genauer zu analysieren wurde im Anschluss im Rahmen dieser Arbeit ein Trypsin-Sensitivitätsassay nach Mu *et. al.* durchgeführt.

Dazu wurden 25 µg des Proteins in einem Puffer mit und ohne 1 mM CuCl₂ mit 100 ng Trypsin über eine Zeitspanne von 30 Minuten verdaut, wobei nach 0, 10, 20, 30 Minuten je 10 µl Probe entnommen wurde und diese direkt mit 2 µl 6x SDS-Ladepuffer versetzt und aufgeköcht wurde. Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

Dabei konnte gezeigt werden, dass das At1g64370-Protein, wenn es mit Ionen inkubiert wurde für das Trypsin weniger zugänglich war als das freie Protein. Somit scheint das At1g64370-Protein, das wie bereits

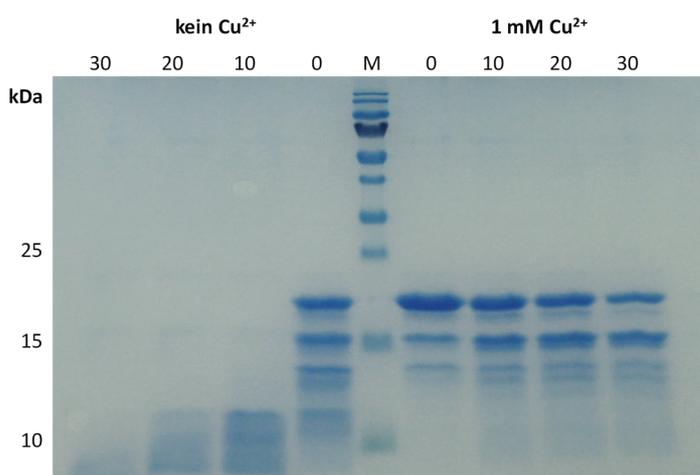


Abb. 3-41: Trypsin-Sensitivitätsassay. Um zu analysieren, ob die Zugabe von Ionen die Zugänglichkeit des uncharakterisierten Proteins für Trypsin beeinflusst, wurde das Protein ohne Cu²⁺ und mit 1 mM Cu²⁺ behandelt und durch Zugabe von 100 ng Trypsin verdaut. Zur Überprüfung des erfolgreichen Verdaus wurden die Proben direkt (0), nach 10-, 20- und 30-minütiger Inkubation auf ein 15 %-iges SDS-Gel aufgetragen und anschließend die separierten Proteine mit einer kolloidalen Coomassie-Färbelösung visualisiert.

durch einen Stabilitätsassay (3.2.2.2) gezeigt werden konnte für Proteasen gut zugänglich ist, durch die Bindung an Kupferionen seine Konformation so zu verändern, dass es für das Trypsin weniger zugänglich ist. Letzteres könnte auch daraus resultieren, dass es bedingt durch die Ionen beginnt zu aggregieren.

Über anschließende *Microscale* Thermophorese-Analysen sollte die Interaktion des unbekanntes Proteins mit den Ionen genauer untersucht werden. Dabei wurde mit dem Homolog aus Raps gearbeitet, da dies

im Gegensatz zum Protein aus *Arabidopsis* ein Cystein besaß und so spezifisch nur an diesem Rest gelabelt werden konnte. Die Analysen mit den Ionen zeigten bereits im Kapillar-Scan (Abb. 3-42: Kapillar-Scan zur MST-Messung des At1g64370-Homologes aus Raps mit verschiedenen Ionen. Abb. 3-42 A), dass es durch Zugabe von Ionen ab einer bestimmten Konzentration zu einem signifikanten Fluoreszenzverlust kam. Zwar konnte dieser Verlust zunächst durch Reduktion der Ligandenkonzentration im Kapillar-Scan verhindert werden, jedoch trat dieser Effekt mit zunehmender Messzeit wieder auf. Zusätzlich zum Fluoreszenzverlust konnte für die Zinkprobe ein Aggregieren in der Kapillare beobachtet werden, was durch die Ausbildung eines Doppelsignals im Kapillar-Scan deutlich wurde. Nach längerer Inkubation war dieses Aggregieren auch in weiteren Proben mit anderen Metallen sichtbar. Ein solcher Fluoreszenzverlust kann dadurch erklärt werden, dass infolge der Bindung der Ionen in der Nähe des Fluorophors, dessen Quantenausbeute beeinträchtigt wird. Gleiches kann auch durch Strukturänderungen induziert werden, wenn infolge der Bindung und anschließender Strukturänderung der Fluorophor in eine andere chemische Umgebung verschoben wird. Als dritte

Möglichkeit kann der Verlust durch Aggregation erklärt werden. Durch fortwährende Aggregation wird sowohl die Struktur verändert als auch der Anteil des in Lösung befindlichen Proteins reduziert. Über CD-Messungen konnte S. Ostendorp bereits zeigen, dass keine Konformationsänderungen des Proteins nach Zugabe der unterschiedlichen Ionen nachweisbar war. Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass nur bestimmte Ionen in der Lage waren an das Protein zu binden. Somit konnte eine Aggregation des Proteins als Auslöser des Fluoreszenzverlustes angenommen werden. Da so die Messung im gesättigten Konzentrationsbereich nicht durchgeführt werden konnte,

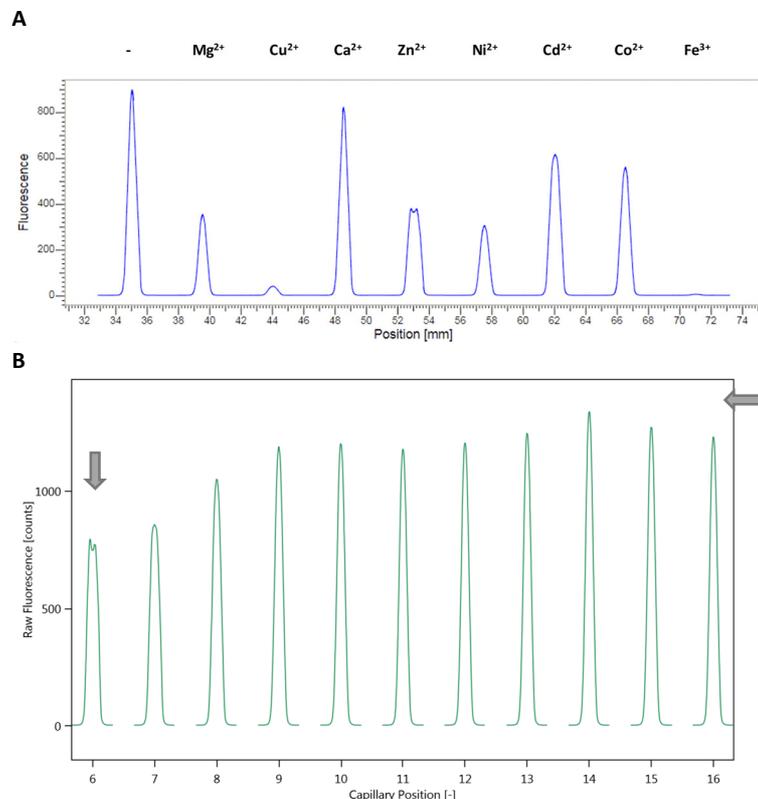


Abb. 3-42: Kapillar-Scan zur MST-Messung des At1g64370-Homologes aus Raps mit verschiedenen Ionen. Dazu wurde das rekombinante Protein des Homologes aus *B. napus* mit dem Cystein-reaktiven Farbstoff NT-647-Maleimid in einem Verhältnis 1:1 markiert und 200 nM des Proteins mit 5 μM des jeweiligen Liganden inkubiert, bevor die Fluoreszenz der Probe analysiert wurde (A). Auch der Kapillar-Scan mit Zink in einer Konzentration von 3 μM bis 3 nM zeigte bereits deutlich einen Fluoreszenzverlust, der durch Aggregation des Proteins bedingt wurde (B).

war die Bestimmung der Dissoziationskonstanten mit dieser Methode nicht möglich. Allerdings deutete sich an, dass Zink am stärksten mit dem Protein interagierte und bereits bei einem molaren Verhältnis von 5:1 zu Aggregationen führte, die als typisches Doppelsignal im Kapillar-Scan sichtbar waren (Abb. 42 B). Diese

Aggregation konnte für die weiteren analysierten Ionen erst bei wesentlich höheren Verhältnissen beobachtet werden.

Ähnliches konnte bereits für das Dehydrin HIRD11 beobachtet werden: So wurde das Protein, das normalerweise für Trypsin sehr gut zugänglich ist, bei Zugabe von Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} und Zn^{2+} durch die Protease nicht mehr abgebaut (163). Begründet wurde diese Beobachtung mit der Zunahme an α -Helices. Die im Rahmen von S. Ostendorp durchgeführten CD-Analysen mit verschiedenen Ionen, konnten allerdings nicht zeigen, dass sich die Struktur des Proteins bei Anwesenheit der genannten Ionen verändert. Daher scheint im Falle des At1g64370-Proteins die Interaktion mit Ionen zu einer Aggregatbildung zu führen.

Eine mögliche Erklärung für die Metallbindeeigenschaft von Dehydrinen ist der Schutz vor Entstehung von ROS in Pflanzen (98). Bei Wasserstress kommt es aufgrund des Verlustes von Wasser zu einer Konzentrationserhöhung der Ionen innerhalb des Gewebes. Diese Ionen fungieren als Mikronährstoffe sind aber in höheren Konzentrationen maßgeblich an der Entstehung von ROS beteiligt, so dass vermutet wird, dass es bei Wassermangel vermehrt zu einer Bildung von ROS kommt. Um dies und somit eine Denaturierung von Proteinen, Nucleinsäuren oder auch Membranen zu verhindern, sind Dehydrine in der Lage diese freien Ionen abzufangen. Diese Eigenschaft von Dehydrinen konnte bereits sowohl *in vitro* unter Verwendung eines Cu-Ascorbat-Systems (163) als auch *in vivo* mit der Expression zweier Dehydrine aus *Brassica juncea* in transgenen Tabakpflanzen unter Schwermetallstress demonstriert werden (253). Ein ähnlicher Versuch wurde ebenfalls auch für das At1g64370 durchgeführt. Dabei wurde ausgenutzt, dass das NADH in Gegenwart von freien Kupferionen und Wasserstoffperoxid zu NAD^+ oxidiert, wobei die Kupferionen die Reaktion beschleunigen. Bei der Zugabe von At1g6470 in den Reaktionsansatz konnte eine deutliche Abnahme der Oxidation beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies resultiert aus dem Abfangen der Kupferionen durch das At1g64370, für das die Kupferbindung über die IMAC gezeigt werden konnte. Somit besitzt auch das untersuchte Phloemprotein die Fähigkeit bestimmte Ionen zu binden und ist somit möglicherweise an der Verhinderung der ROS-Entstehung beteiligt. In diesem Zusammenhang wird diskutiert, dass die Effektivität der Proteine zur Verhinderung von ROS von der Menge an Histidinen im Protein abhängig ist (163), wobei spekuliert wird, dass Histidin-Histidin-Dipeptide für die Bindung zuständig sind. Da das At1g64370-Protein jedoch keine zwei aufeinanderfolgende Histidine besitzt, muss die Ionenbindung hier auf eine andere Weise erfolgen. Bezüglich der Beobachtung mit der Ionen-induzierten Aggregation des Proteins ist die intermolekulare Bindung der Ionen über Histidine unterschiedlicher Proteine am wahrscheinlichsten.

3.2.2.5 *In vivo*-Studien zur Funktion und subzellulären Lokalisation des At1g64370

Um die Rolle des At1g64370 innerhalb der Pflanze zu untersuchen, wurde eine tDNA-Insertionslinie (SALK_201485) bestellt, bei der die tDNA in der 3'UTR des Gens AT1G64370 inseriert wurde (Abb. 3-43 A). Unter normalen Wachstumsbedingungen zeigte diese *A. thaliana* Mutante keinen auffälligen Phänotyp (Abb. 3-43 C). Über die Isolation der Gesamt-RNA aus Blattmaterial dieser Mutante und RT-PCR konnte die

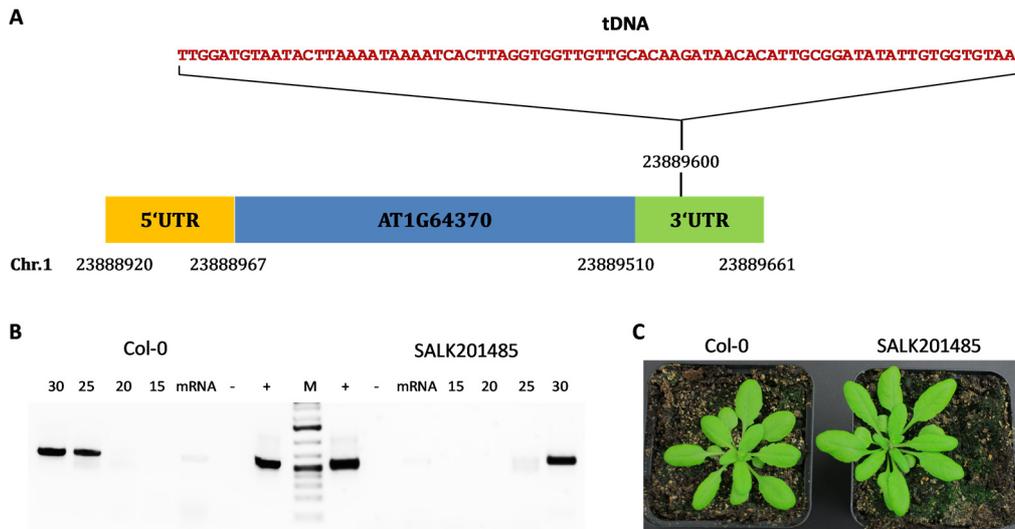


Abb. 3-43: Arbeiten mit der tDNA-Insertionsmutante im AT1G64370-Gen. Für die *in vivo*-Studien wurde die tDNA-Insertionsmutante SALK201485 verwendet, bei der die tDNA in der 3'UTR des Gens inseriert wurde (A). Diese Mutante zeigte unter normalen Wachstumsbedingungen keine phänotypischen Auffälligkeiten (C). Über RT-PCR konnte die mRNA des At1g64370 im Blatt allerdings noch nachgewiesen werden (B). Dabei wurde auf einem 1 %-igen Agarosegel die Positivkontrolle (+), die Wasserkontrolle (-), Negativkontrolle ohne Reverse Transkriptase (mRNA) sowie die PCR-Ansätze nach 15-30 Zyklen (15, 20, 25, 30) aufgetragen.

mRNA allerdings weiterhin nachgewiesen werden (Abb. 3-43 B). Die 3'UTR ist in der Regel für die Stabilität und Lokalisation der mRNA wichtig und ist an der Translation beteiligt (254). Dies könnte bedingen, dass die Übersetzung der mRNA auf Proteinebene möglicherweise nicht stattfindet, jedoch konnte nicht eindeutig von einer homozygoten *Knock-out* Mutante ausgegangen werden. Daher wurde in Kooperation mit der AG Kragler (Golm) eine homozygote *A. thaliana Knock-out* Mutante des AT1G64370-Gens erstellt. Erste Studien unter normalen Wachstumsbedingungen zeigten, dass der Verlust dieses Proteins scheinbar keinen Einfluss auf den Phänotyp der Pflanze hat. Da nach den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien allerdings eine Beteiligung des Proteins bei Stress vermutet wird, sollen zukünftig vergleichende Analysen mit dem Wildtyp und der Mutante unter verschiedenen Stresssituationen wie Hitze und Trockenheit durchgeführt werden. Da das HIRD11 scheinbar sehr ähnliche Eigenschaften aufweist wie das untersuchte Protein, soll ebenfalls der Verlust des AT1G64370-Proteins auf die Expression des HIRD11 überprüft werden. Sollte sich hier zeigen, dass die Pflanze über eine Anpassung der HIRD11 Expression den Verlust des At1g64370 ausgleichen kann, sind auch Versuche mit Doppel-*Knock out* Mutanten des HIRD11 und des AT1G64370 geplant.

Tab. 3-10: Übersicht über die im Rahmen der Arbeit untersuchten *A. thaliana* Mutanten

Bezeichnung		Eigenschaften	Phänotyp*
At1g64370 <i>Knock out</i>	homozygot	<i>Knock out</i> des AT1G64370-Gens	kein
SALK201485	homozygot	tDNA Insertion in der 3'UTR des AT1G64370-Gens	kein
35S::YFP-At1g64370-wt	homozygot	Expression des At1g64370-Wildtypproteins als YFP-Fusionsprotein unter Kontrolle des 35S-Promotors	kein
35S::YFP-At1g64370-S165-177A	homozygot	Expression der At1g64370 CKII-Phosphorylierungsdefizienten als YFP-Fusionsprotein unter Kontrolle des 35S-Promotors	kein

* unter normalen Wachstumsbedingungen

Weitere *A. thaliana* Mutanten, die im Rahmen der Zusammenarbeit mit der AG Kragler entstanden und für Lokalisationsstudien generiert wurden, sind *A. thaliana* Pflanzen, die unter Kontrolle des Cam35S-Promotors sowohl das At1g64370-Wildtyp-Protein als auch die At1g64370-Mutante, bei der C-terminal die CKII-Phosphorylierungsstellen eliminiert wurden, als YFP-Fusionsprotein, exprimieren (Tab. 3-10). Auch diese Pflanzen zeigten im Vergleich zu Col-0 Wildtyp-Pflanzen keine phänotypischen Auffälligkeiten unter normalen Wachstumsbedingungen. Um einen möglichen Vorteil der Überexpression des At1g64370 bei Stress zu analysieren, wurde mit diesen Pflanzen erste Hitzestress-Versuche durchgeführt. Dazu wurden der Col-0 Wildtyp als auch die Mutanten auf Erde unter Langtagbedingungen bei 25 °C kultiviert und im Alter von 21 Tagen einem Hitzestress von 37 °C bei 12 h ausgesetzt, während die Kontrollpflanzen unter normalen Bedingungen weiter kultiviert wurden. Im Anschluss an die Stressbehandlung wurden die Pflanzen für weitere drei Wochen unter normalen Wachstumsbedingungen weiter kultiviert und anschließend Unterschiede im Wachstum analysiert. Dabei deutete sich an, dass die At1g64370-überexprimierenden Pflanzen im Vergleich zu den Col-0 Wildtyp-Pflanzen bei Hitze einen Wachstumsvorteil hatten: Während direkt nach der Hitzestressbehandlung die Pflanzen keine phänotypischen Unterschiede zeigten, wuchsen die At1g64370-Überexprimierer im Vergleich zum Wildtyp jedoch schneller, was sich nach weiterer Kultivierung von 21 Tagen deutlich zeigte. Während die Hitze-behandelten Col-0 Wildtyp-Pflanzen im Vergleich zur Kontrolle deutlich kleiner waren, zeigten die Mutanten kein verändertes Wachstum. Dabei schien auch die Phosphorylierungs-defiziente Mutante keinen Nachteil zu haben. Diese ersten Studien wurden mit je 20 Pflanzen pro Behandlung durchgeführt und deuten an, dass das Protein die Fähigkeit besitzt auch Pflanzen vor Hitzestress zu schützen, wie es bereits beim *Cell viability Assay* für *E. coli* gezeigt werden konnte. Hierbei handelt es sich aber lediglich um erste Versuche die zukünftig reproduziert werden müssten, um eindeutigere und signifikantere Ergebnisse zu erhalten.

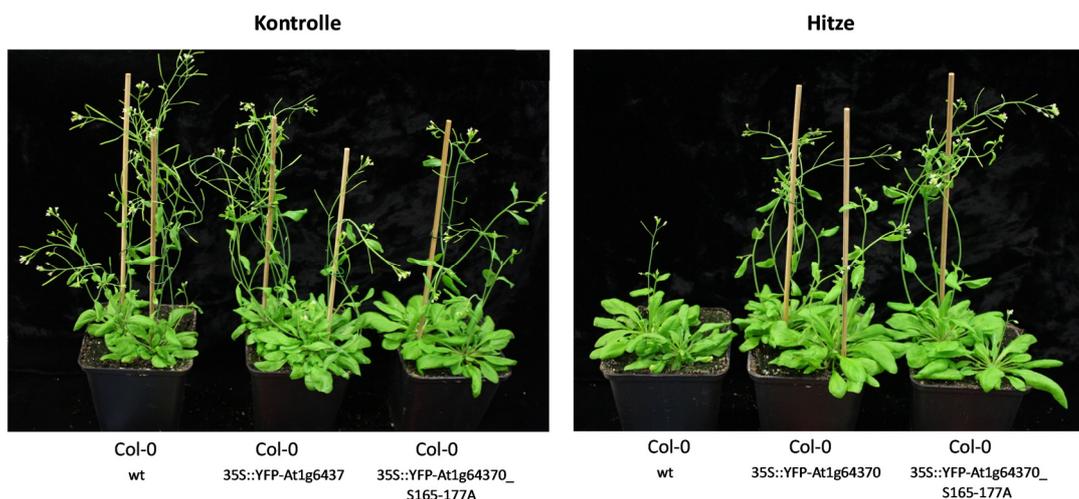


Abb. 3-44: Hitzestressexperiment mit Col-0-Wildtyp-Pflanzen und unterschiedlichen At1g64370-überexprimierenden Pflanzen. Dazu wurden die Pflanzen zunächst auf Erde unter normalen Wachstumsbedingungen (LD, 25 °C) für 21 Tage kultiviert und anschließend eine Hitzebehandlung für 12 h bei 37 °C durchgeführt. Nach der Kultivierung der Pflanzen unter normalen Bedingungen für weitere 21 Tage wurde die Entwicklung zwischen den Kontroll- und Hitze-behandelten Pflanzen verglichen. Verglichen wurde dabei das Wachstum von Pflanzen des Col-0 Wildtyp (links), des YFP-At1g64370-Überexprimierers (Mitte) sowie des phosphorylierungs-defizienten YFP-At1g64370_S165-177A-Überexprimierers (rechts),

Dehydriene sind ubiquitäre Pflanzenproteine, die während der Pflanzenentwicklung, des Wachstums und als Antwort auf Stress in unterschiedlichen Gewebe akkumulieren (185, 255). Lokalisiert sind sie in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten, zum Beispiel im Zytoplasma, an Membranen und am ER, in Chloroplasten, Mitochondrien, Vakuolen und im Zellkern (185).

Um die subzelluläre Lokalisation des At1g64370-Proteins zu analysieren, wurde wie oben bereits erwähnt ein N-terminales YFP-At1g64370-Fusionskonstrukt erstellt. Dazu wurde der ORF des AT1G64370 in einen binären pEG104 Gateway Vektor kloniert (99), wobei die Expression des Gens über einen 35S-Promotor

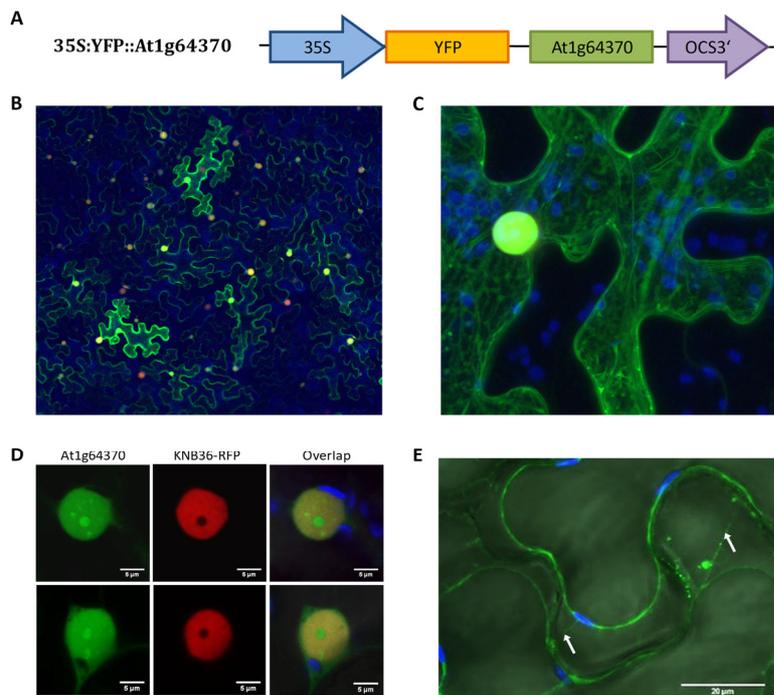


Abb. 3-45: Subzelluläre Lokalisation des At1g64370-Proteins in agro-infiltrierten Tabakblättern. Schematische Darstellung des YFP-At1g64370 Konstruktes, das für die subzelluläre Lokalisationsstudie verwendet wurde (A). Zytoplasmatische und nukleäre Lokalisation des YFP::At1g64370 Fusionsproteins in epidermalen Zellen von agro-infiltrierten Tabakblättern (B,C). Detektion des Fusionsproteins im Kernkörperchen (D). Plasmolyse der Epidermiszellen der Tabakblätter (E), dabei zeigen die weißen Pfeile die Hechtschen Fäden.

und einen OCS3'-Terminator reguliert wurde (Abb. 3-45 A). Die Studien zur Expression und Lokalisation des YFP::At1g64370-Konstruktes wurden mittels transienter Expression in agro-infiltrierten Blättern von *Nicotiana benthamiana* durch die Arbeitsgruppe von Dr. Kragler am MPI Golm durchgeführt. Um eine Kernlokalisierung zu visualisieren wurde eine DAPI-Färbung durchgeführt und die Fluoreszenzaufnahmen mittels eines Laser-Scanning Mikroskops gemacht. So konnte für das Fluoreszenz-markierte At1g64370-Protein sowohl eine zytoplasmatische als auch nukleäre Lokalisation in den Epidermalzellen des Tabaks

nachgewiesen werden (Abb. 3-45 B & C). Über einen Vergleich mit dem RFP-markierten KNB36-Proteins, dessen nukleäre Lokalisation auf das Kernzytoplasma beschränkt ist, konnte des Weiteren gezeigt werden, dass sich das At1g64370-Protein außerdem im Kernkörperchen ansammelt (Abb. 3-45 C). Dabei wurde außerdem ersichtlich, dass sich das At1g64370-Protein auch im Kernzytoplasma anhäuft, was anhand sogenannter „Speckles“ ersichtlich wird (Abb. 3-45 D). Über Plasmolyse der epidermalen Zellen wurde außerdem untersucht, ob das Protein in den Plasmodesmen vorhanden ist (Abb. 3-45 E).

Im Rahmen der durchgeführten *in silico*-Analyse des At1g64370-Proteins (3.2.1) wurde bereits ein mögliches nukleäres Lokalisationssignal (NLS) vorhergesagt, wobei es sich um die klassische monopartite Variante der NLS handelt. Das Vorhandensein dieser NLS zeigt, dass das Protein möglicherweise über den größten Multiprotein-Kanal, hauptsächlich aus verschiedenen Nucleoporinen bestehenden nukleären Kernporenkomplex (*nuclear pore complex*, NPC), vom Zytoplasma in den Zellkern transportiert wird.

Während kleine Moleküle (> 40 kDa) den Kernporenkomplex ohne Regulation passieren können (256), interagieren größere Moleküle (RNA und Proteine) mit nukleären Transport-Rezeptoren, die zur Familie der β -Karyopherine gehören und über den NPC kontrolliert in den Zellkern geschleust werden (257). Dabei unterscheidet man Importine (zum Beispiel Importin β 1) und Exportine (zum Beispiel Crm1). Beim Import erkennt das Importin die NLS des Proteins und beim Transport aus dem Zellkern ins Zytoplasma sind Exportine beteiligt, die sogenannte Nukleäre Export Signale (*nuclear export signal*, NES), die meist aus Leucin-reichen Sequenzen bestehen erkennen. Reguliert werden der nukleäre Im- sowie Export über kleine Ras-GTPasen, wie Ran. Über das Internet-*Tool* LocNES (258) konnte für das At1g64370-Protein ebenfalls

Tab. 3-11: Position und Aminosäuresequenz der für das At1g64370 aus *A. thaliana* vorhergesagten NLS und NES.

	Position	Sequenz
NLS	155-160	HKKKNK
NES	126-140	KKTHETNSGLNGLGM

eine NES, die durch das Exportin Crm1 erkannt wird, identifiziert werden. Obwohl das At1g64370-Protein nur etwa 19,8 kDa groß ist und somit die Kernpore unreguliert passieren könnte, besitzt es sowohl eine NLS als auch eine NES (Tab. 3-11), so dass es vermutlich sowohl in den Kern als auch wieder ins Zytoplasma transportiert wird. Besitzen Proteine beide Sequenzen, so wird vermutet, dass eine der beiden Transportwege zusätzlich über posttranslationale Modifizierungen gesteuert wird.

Im Gegensatz zu der nukleären Lokalisation ist die Translokation in das Kernkörperchen derzeit weniger gut untersucht. Bisher konnten weder bestimmte Sequenzen noch Strukturen identifiziert werden, die für den Transport in den Nukleolus verantwortlich sind, jedoch scheinen diese Sequenzen, die als NoLS (*Nucleolar localisation signals*) bezeichnet werden, Arginin- und Lysin-reich zu sein. Für eine genauere Vorhersage wurde zusätzlich der *Nucleolar Localisation Sequence Detector* verwendet (259, 260). Dabei

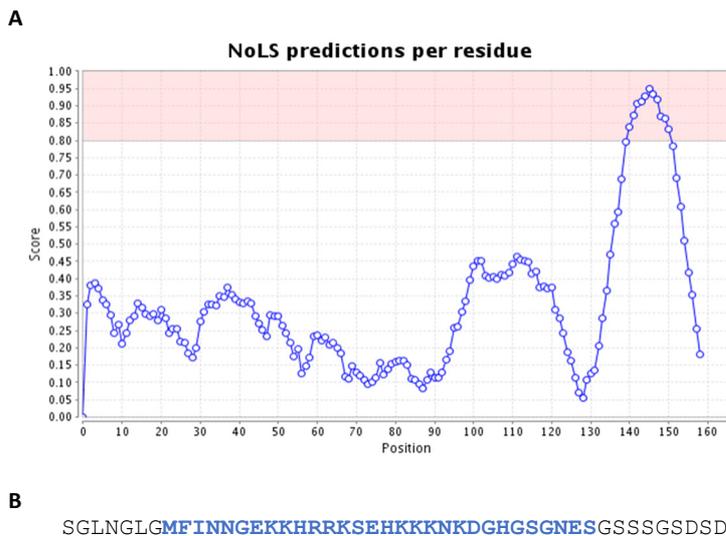


Abb. 3-46: Vorhersage einer NoLS des At1g64370-Proteins. Zur Bestimmung einer möglichen nukleolären Lokalisationssequenz wurde eine *in silico* Vorhersage mittels des *Nucleolar Localisation Sequence Detectors* durchgeführt (A). Dabei wurde eine 30 Aminosäure umfassende Sequenz als mögliche nukleoläre Lokalisationssequenz ermittelt (B).

konnte eine 30 Aminosäure umfassende Sequenz ermittelt werden, die den nukleolären Import des At1g64370-Proteins bedingen könnte (Abb. 3-46 A & B) und mit der NLS überlappt. Beim Nukleolus handelt es sich um eine dynamische Struktur, die in Pflanzen aus vier verschiedenen Regionen besteht: dem fibrillären Zentrum, umgeben von der dichten fibrillären Komponente, von der granulären Komponenten und abschließend der nukleären Vakuole. Im Nukleolus findet in erster Linie die Ribosomen-Untereinheit-Biogenese statt, so wird im fibrillären Zentrum

beispielsweise die 45S prä-rRNA aus rDNA transkribiert, die anschließend in der fibrillären Komponente in 5S, 18S und 25S rRNA prozessiert wird. In der umgebenden granulären Komponente findet schließlich der Zusammenbau der Ribosomen statt, bevor sie ins Zytoplasma exportiert werden (261). Neben rRNA kommt im Nukleolus außerdem prä-tRNA vor und es wird angenommen, dass der Nukleolus als Sensor für

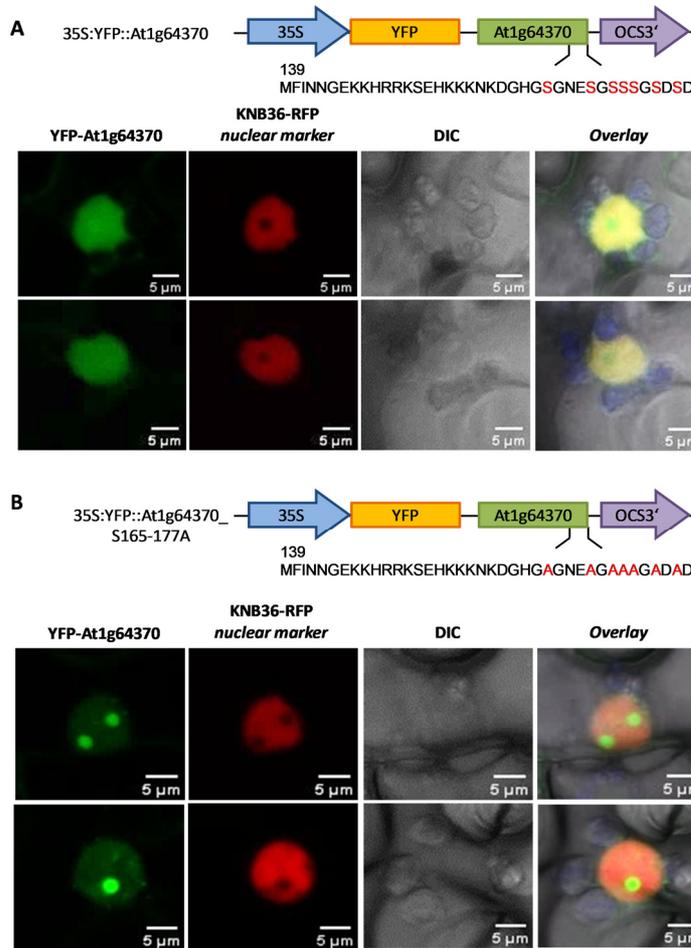


Abb. 3-47: Vergleich der nukleären Lokalisation des Wildtyp-At1g64370 und einer At1g64370-Mutante in agro-infiltrierten Tabakblättern. Schematische Darstellung des YFP::At1g64370 Wildtyp-Konstruktes, das für die subzelluläre Lokalisationsstudie mittels Laser-Scanning Konfokalmikroskopie verwendet wurde. Es zeigt eine zytoplasmatische und nukleäre Lokalisation in epidermalen Zellen von agro-infiltrierten Tabakblättern (A). Die gleiche Analyse wurde für die mutierte Form des At1g64370-Proteins, bei der die CKII- Phosphorylierungsstellen am C-Terminus eliminiert wurden, durchgeführt (B). Dabei ist von links nach rechts dargestellt: das YFP-Spektrum, der nukleäre Marker KNB36-RFP, das Breitfeldspektrum sowie die überlagerten Signale.

zellulären Stress fungiert (262). Zwar konnte das At1g64370-Protein in bisher durchgeführten Nukleoproteom-Studien in *A. thaliana* nicht identifiziert werden (263), jedoch zeigen die hier durchgeführten Lokalisationsstudien, dass es sowohl im Zytoplasma, aber auch im Nukleus und sogar Nukleolus vorkommt. Eine nukleäre sowie nukleoläre Lokalisation konnte für die Dehydrine Rab17 und OpsDHN1 schon gezeigt werden (264, 265), so dass vermutet werden kann, dass die Dehydrine auch im Zellkern eine protektive Aufgabe übernehmen. Da für das At1g64370-Protein in den *in vitro* Analysen nachgewiesen werden konnte, dass es in der Lage ist verschiedene RNA-Spezies zu binden, könnte es im Nukleus bei Stress die rRNA schützen.

Da das At1g64370-Protein sowohl eine NLS als auch ein NES besitzt, ist es wahrscheinlich, dass entweder der Import oder der

Export über eine posttranslationale Modifizierung reguliert wird. Hierbei handelt es sich häufig um Phosphorylierungen in der Nähe dieser Signale. Über Sequenzanalysen (3.2.1) des At1g64370-Proteins wurde in unmittelbarer Nähe des NLS und des NoLS eine sieben Serine umfassende CKII-Phosphorylierungsstelle vorhergesagt, die, wie die *in vitro*-Analysen zeigen konnten, über die CKII phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung des S-Segments konnte ebenfalls für einige andere Dehydrine gezeigt werden (171, 266–269), wobei diskutiert wird, dass diese posttranslationale Modifizierung die Protein-Interaktion oder auch die subzelluläre Lokalisation beeinflusst (227).

Um einen möglichen Einfluss der Phosphorylierung auf die Lokalisation des At1g64370 zu überprüfen, wurde auch die Lokalisation der At1g64370-Mutante in agro-infiltrierten Blättern von Tabak analysiert, bei der die C-terminalen Phosphorylierungsstellen eliminiert wurden (At1g64370_S165-177A). Dabei zeigte sich, dass das mutierte Protein im Vergleich zum Wildtyp-Protein weniger im Zytosol oder nukleären Zytoplasma vorkam, sondern viel mehr im Kernkörperchen angehäuft wurde (Abb. 3-47 A & B). Daraus lässt sich schließen, dass die Phosphorylierung am C-Terminus einen Einfluss auf den Transport aus dem Nukleolus ins Kernzytoplasma hat. So scheint der Verlust der Phosphorylierung zu bedingen, dass das Protein nicht mehr aus dem Kernkörperchen heraus transportiert werden kann und sich dort ansammelt. Somit scheint die Phosphorylierung des Proteins den nukleären sowie nukleolären Transport zu beeinflussen. Während das phosphorylierte Protein abundant im Kern-Zytoplasma vertreten ist, ist die unphosphorylierte Form eher im Kernkörperchen zu finden. Somit könnte die zusätzliche negative Ladung am C-Terminus den nukleolären Export regulieren. Da die Casein Kinasen in Pflanzen in unterschiedlichsten Kompartimenten vorkommen und aktiv sind, beispielsweise im Zytoplasma, im Nucleus, am ER und vesikulären Strukturen, kann keine Aussage darüber getroffen werden, wo die Phosphorylierung stattfindet.

Auch die Lokalisationstudien in stabil exprimierenden *A. thaliana* Pflanzen zeigten eine zytoplasmatische und nukleäre Lokalisation des Proteins. Da es unter Kontrolle des konstitutiv aktiven 35S-Promotors stand, konnte die Lokalisation des Proteins während des gesamten Lebenszyklus (vom Keimling bis zur blühenden Pflanze) analysiert werden. Dabei zeigte sich, dass das Protein in der gesamten Pflanze verteilt ist und vor allem im Phloem konzentriert auftritt. Außerdem scheint es in sich entwickelndem Gewebe stärker exprimiert zu werden, während es sich in älteren Geweben im Leitgefäßsystem ansammelt (Abb. 3-48 A). Dieses verstärkte Auftreten des Proteins im Leitgefäßsystem ist dabei in der gesamten Pflanze zu beobachten. Dies zeigt sich sowohl in den Blüten (Abb. 3-48 B), jungen Rosettenblättern (Abb. 3-48 C) sowie den Wurzeln (Abb. 3-48 E & F). Hier bewegt sich das Protein vermutlich in unterschiedlich großen Aggregaten, die mit einer Größe von bis zu 8 μm eine ähnliche Größe wie Zellkerne aufweisen, durch das Leitsystem und wird am Ort des Bedarfs (*Sink*-Organe) aus dem Phloem entladen (Abb. 3-48 F). Dabei fällt

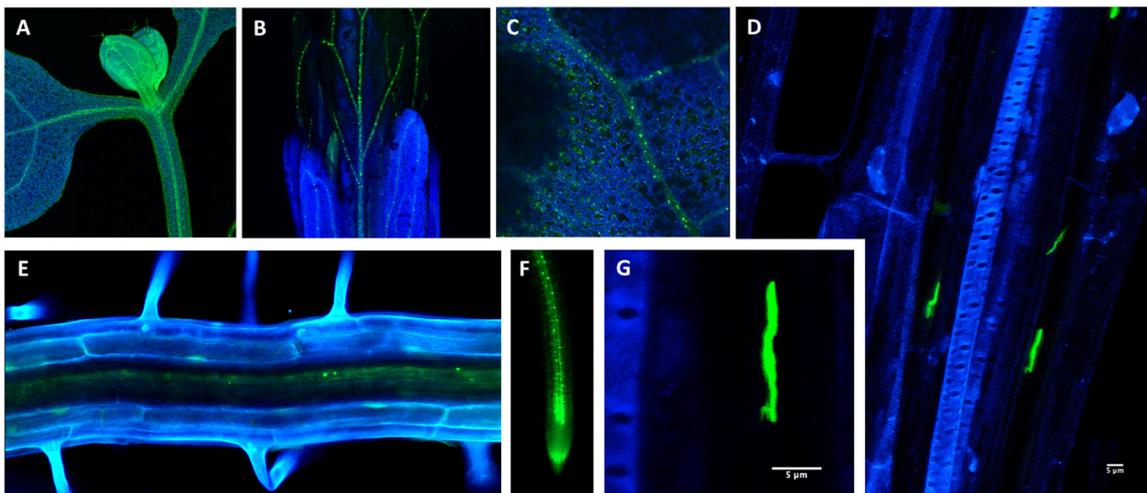


Abb. 3-48: Subzelluläre Lokalisation des YFP-At1g64370-Proteins in einer transgenen *A. thaliana* Col-0 Pflanze. Dabei wurde die Expression des YFP-Fusionsproteins *in vivo* mittels Fluoreszenzmikroskopie in unterschiedlichen Entwicklungsstadien und Geweben analysiert. Dabei wurden Keimlinge (A) und von adulten Pflanzen Blüte (B), Rosettenblätter (C, D, G) und Wurzeln (E & F) untersucht.

auf, dass diese Aggregate innerhalb eines Siebelementsystems nicht auf eine Siebröhre beschränkt sind, sondern auch in der Lage sind die Siebplatte, die zwei Siebröhren miteinander verbindet, zu überqueren. Bei genauerer Betrachtung der Aggregate fällt auf, dass diese fibrillen-ähnliche Strukturen bilden (Abb. 3-48 D & G). Ob sich diese Proteinaggregate frei im Strom bewegen oder an Zytoskelettelementen entlang transportiert werden, die bereits im Phloemsaft identifiziert werden konnten (11), müsste allerdings in zukünftigen Studien genauer untersucht werden.

Dadurch, dass das Protein im Phloem große Aggregate bildet, konnten hinsichtlich des Phloemtransports neue Einblicke gewonnen werden: So zeigten die Analysen, dass das Protein innerhalb desselben Siebelementsystems in unterschiedlichen Siebröhren in gegensätzliche Richtungen transportiert wird, was bisher nur vermutet wurde.

Somit scheint das Protein sowohl im Zytoplasma und Zellkern, so wie es für andere Dehydrine wie WCS120 aus Weizen (270), Rab17 aus Mais (182), sowie MtCAS31 aus *Medicago truncatula* (271) bereits gezeigt wurde, als auch im Nukleolus lokalisiert zu sein. Außerdem konnte über die Lokalisationsstudien demonstriert werden, dass es hauptsächlich im Siebelement vertreten ist, was sich im Rahmen der Arbeit bereits andeutete. Über Lokalisationsstudien des Dehydrins DHN24 aus *Solanum sagarandinum* konnte bereits gezeigt werden, dass dieses Protein in Siebelementen und Geleitzellen von Wurzel und Stängel lokalisiert ist. Dabei kam es im Zytoplasma, in der Nähe von Organellenmembranen, im Lumen von Phloemproteinfilamenten, aber auch im Zellkern vor (193). Somit scheinen im Phloem verschiedener Pflanzenspezies Dehydrine vorzukommen. Welche genaue Aufgabe sie dort übernehmen ist allerdings noch nicht geklärt. Dabei kann nur vermutet werden, dass sie das Siebelement, das als Langstrecken-Transport-System für das Überleben der Pflanze essentiell ist, bei verschiedenen abiotischen Stressoren schützen. So scheint das At1g64370 aufgrund seiner hohen strukturellen Flexibilität, vielfältige Funktionen übernehmen zu können, wie die *in-vitro* Studien belegen. Ob sich stress-bedingt die Lokalisation des At1g64370 ändert, müsste über weitere Lokalisationsstudien in beispielsweise Kälte- und Hitze-gestressten Pflanzen analysiert werden.

Das Dehydrin HIRD11, das über Sequenzvergleiche als naher Verwandter des At1g64370-Proteins identifiziert werden konnte, konnte im Rahmen der Proteomstudien ebenfalls aus dem Phloemsaft von Raps isoliert werden. Dabei zeigte sich, dass es wie das Homolog des At1g64370 abundant im Phloem vorkommt und ebenfalls stark phosphoryliert vorliegt. Außerdem wies es ähnliche Eigenschaften wie das untersuchte Protein auf: So ist das native Protein scheinbar in der Lage die gleichen Ionen (Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} und Zn^{2+}) und Nucleinsäuren zu binden. Ersteres ist für das Protein bereits gut analysiert und außerdem konnte eine Lokalisation des Homologs in *A. thaliana* im Nukleus sowie Zytoplasma gezeigt werden (171). Aufgrund der scheinbar ähnlichen Funktion beider Proteine eröffnet sich die Frage, warum beide Proteine im Phloem von Raps koexistieren. Im Gegensatz zum HIRD11 weist das At1g64370 kein K-Segment auf und besitzt außerdem einen wesentlich höheren pI. Dies lässt vermuten, dass beide Proteine möglicherweise unterschiedliche Aufgaben innerhalb des Siebelementsystems übernehmen. Da das K-Segment vermutlich eine protektive Wirkung auf Proteine und Membranen hat (173, 244), könnte gemutmaßt werden, dass das HIRD11 für den Schutz von Proteinen und Membranen zuständig ist, während das At1g64370 vielleicht eher als RNA-Chaperon fungiert und somit die Integrität der RNA unter Stressbedingungen im Phloem erhält.

4 Schlussfolgerung & Ausblick

Das Phloem ist Teil des Langstreckentransport-Systems sessiler Pflanzen und es nimmt neben der Verteilung von Assimilaten auch bei der Signalweiterleitung in entfernte Organe eine wichtige Rolle ein. So transportiert es auch Signalmoleküle wie Lipide, Proteine aber auch RNA innerhalb der Pflanze und ermöglicht so die Anpassung an verändernde Umweltbedingungen und das Überleben der Pflanze auch unter extremen Bedingungen. Dies ist gerade im Hinblick auf die klimatischen Veränderungen und den stetig wachsenden Bedarf an Nahrungsmitteln und alternativen Treibstoffen ein hoch relevantes Thema, das in den letzten Jahren in der pflanzlichen Grundlagenforschung zunehmend in den Vordergrund gerückt ist. Gerade im Bereich der Nutzpflanzen (Getreide, Mais und Raps) ist es wichtig die Mechanismen der pflanzlichen Anpassungsreaktion auf verschiedene Stressoren zu verstehen, um auch zukünftig Ernteeinbußen durch extreme Witterungen (Hitze, Kälte, Überflutung und Pathogenbefall) vorbeugen zu können.

Über verschiedenste Studien mit Phloemsaft unterschiedlicher Spezies konnte bereits gezeigt werden, dass Phloem-mobile RNAs, aber auch Proteine vermutlich eine wichtige Rolle bei der abiotischen und biotischen Stressantwort einnehmen (10, 11). Dabei ist allerdings noch nicht verstanden wie die Makromoleküle überhaupt in das kern- und ribosomfreie Siebelement gelangen, auf welche Weise sie innerhalb des Phloems transportiert werden und wie sie schließlich in ihr Zielgewebe entlassen werden.

Da hier im Hinblick auf den Langstreckentransport von RNA eine Beteiligung von RNA-Bindeproteinen vermutet wird, sollten im Rahmen der Arbeit Phloem-Proteomstudien mit nativem Phloemsaft durchgeführt werden, was die Identifizierung von Protein-Protein- und Protein-Nukleinsäure-Interaktionen erlaubt.

Dabei gelang es über eine hochauflösende 3D-Gelelektrophorese vier hochmolekulare Komplexe aus dem Phloemsaft zu isolieren und die einzelnen Komplexkomponenten so voneinander zu trennen, dass sie über die anschließend durchgeführte MS-Analyse identifiziert werden konnten. Des Weiteren konnten über eine Kombination der nativen BN-PAGE mit anschließender *Northern Blot* Analyse Ribonukleoprotein-Komplexe identifiziert werden. Hierbei handelte es sich um ribosomale Fragmente, bestehend aus ribosomalen Proteinen der 40S- oder 60S-Untereinheit und den entsprechenden ribosomalen RNAs. Da im Siebelementsystem bisher keine translationale Aktivität gezeigt werden konnte (16) und unter Berücksichtigung des energetischen Aspekts und der Tatsache, dass im Phloemsaft spezifische Fragmente, die eine spezifische Größe und Zusammensetzung aufweisen, isoliert werden konnten, lässt die Vermutung zu, dass es sich nicht um Abbauprodukte handelt, sondern vielmehr um spezifische Fragmente, die eine andere Aufgabe innerhalb des Phloems übernehmen. Außerdem ist es möglich, dass sich diese Fragmente bedingt durch spezifische Inhibitoren oder der Abwesenheit bestimmter Proteine bilden. Diese könnten aber unter bestimmten Umständen, zum Beispiel in sich entwickelndem Gewebe, gebildet werden oder vorhanden sein und könnten dazu führen, dass die Ribosomen hier aktiviert werden und ihre Funktion ausführen.

Außerdem konnte erstmals ein aktives Proteasom und ubiquitinierte Proteine im Phloemsaft identifiziert werden. In Kombination mit Studien, die Ubiquitin sowie Enzyme der Ubiquitinierungskaskade identifizieren konnten (11, 127) lässt sich daraus schließen, dass im Siebelementsystem Phloemproteine

für den Abbau markiert und über das Proteasom abgebaut werden können. So ist es möglich, dass über die Degradation bestimmter Proteine innerhalb des Phloems wichtige zelluläre Prozesse gesteuert werden. Dies könnte insbesondere bei der Entwicklung von neuem Phloemgewebe eine wichtige Rolle einnehmen. Ebenso denkbar ist aber auch, dass das Ubiquitin-Proteasom-System eine schützende Wirkung innerhalb des Phloems ausübt, indem es beispielsweise artfremde Proteine im Phloem markiert und abbaut, um so eine Ausbreitung innerhalb der Pflanze zu verhindern. Somit können über dieses System insbesondere Pathogene, die sich über das Phloemsystem ausbreiten, abgewehrt werden.

Neben Ubiquitinmodifizierungen, die das Protein für den Abbau durch das Proteasom markieren, gibt es auch andere verzweigte Ubiquitinketten an Proteinen, die eine andere Funktion ausüben und beispielsweise an der Aktivierung von Proteinen oder auch am Protein *Targeting* beteiligt sind. Über die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Studien mit ubiquitinierten Phloemproteinen zeigte sich bereits, dass während einige modifizierte Proteine scheinbar abgebaut wurden, andere stabil im Phloem vorlagen. Dies lässt bereits die Vermutung zu, dass im Phloem Proteine über verschiedene Ubiquitinierungen modifiziert sind. Um die Funktion der Ubiquitinierung innerhalb des Phloems genauer verstehen zu können, ist es daher wichtig zu analysieren, welche Ubiquitinierungen vorliegen. Dieses könnte beispielsweise über Western Blot Analysen mit einem spezifischeren Ubiquitin-Antikörper erfolgen. Außerdem wäre es hilfreich zu wissen welche Proteine über Ubiquitin modifiziert werden. Dazu könnten die ubiquitinierten Proteine mittels Co-Immunopräzipitationsassay aus dem Phloemsaft isoliert werden und mittels MS-Analysen identifiziert werden.

Da im Phloem auch RNAs nachgewiesen wurden und vermutet wird, dass diese nicht frei, sondern eher an Proteinen gebunden durch das Phloem transportiert werden, wurde mit nativem Phloemsaft eine Heparin-Affinitätschromatographie durchgeführt, über die nachweislich auch Nukleinsäure-Bindeproteine isoliert werden können. Außerdem wurden Phloem-mobile Proteine aufgrund ihrer Interaktion mit Ionen über eine Metall-Affinitätschromatographie angereichert. In Kombination mit MS-Analysen konnten so Proteine mit putativer Nukleinsäure- und Ionenbindeeeigenschaft identifiziert werden. Ein Protein, das in nahezu allen Studien zu finden war, war ein Homolog des bisher uncharakterisierten At1g64370-Proteins aus *A. thaliana* und wurde daher im Rahmen der Arbeit genauer charakterisiert.

Hierbei handelt es sich um ein abundantes Phloemprotein, das gemäß der bereits veröffentlichten Expressionsstudien in nahezu allen Geweben und nahezu allen Entwicklungsstadien exprimiert wird. Auf Proteinebene konnte es im Rahmen der Arbeit allerdings nur im Phloemsaft nachgewiesen werden, während es aus anderen Geweben wie Blüte, Blatt, Wurzel mittels Heparin-Affinitätschromatographie nicht angereichert werden konnte. Über die zu Beginn durchgeführten *in silico*-Analysen deutete sich bereits an, dass es sich um ein stark ungeordnetes Protein handelt, was über Strukturanalysen im Rahmen der Arbeit von S. Ostendorp auch bestätigt werden konnte. Über Stabilitätsassays zeigte sich, dass das Protein aufgrund seiner hohen Flexibilität hochgradig instabil ist, jedoch Hitze sowie Kälte keine Denaturierung des Proteins bedingt. In Kombination mit anderen Eigenschaften, die über *in silico*-Analysen vorhergesagt (hoher Glycingehalt, niedriger GRAVY) und zum Teil über *in vitro*-Studien auch nachgewiesen werden konnten (niedriger GRAVY), konnte das Protein zunächst der Klasse der Hydrophiline und über einen Sequenzvergleich schließlich den Dehydrinen, einer Untergruppe der LEA-Proteine, zugeordnet werden. Dabei konnte als nächster Verwandter das Dehydrin HIRD11 identifiziert werden, was ebenfalls im

Phloemsaft von Raps über die durchgeführten Proteomstudien nachgewiesen werden konnte. Dehydrine zeichnen sich in erster Linie durch das Vorhandensein bestimmter Sequenzen aus, die als K-, Y- und S-Segment bezeichnet werden. Ein Segment, das nach der Einteilung von Dure (81) alle Dehydrine aufweisen, ist das K-Segment. Dieses tritt beim HIRD11 auf, fehlt jedoch im untersuchten Protein. Um dennoch zu analysieren, ob das Protein ähnliche Eigenschaften wie Dehydrine aufweist, die bei pflanzlichem Stress, der zu einer Dehydration führt, eine wichtige Rolle einnehmen, sollte das Protein genauer untersucht werden.

Zur funktionellen Charakterisierung wurde zum einen mit nativem Protein aus Phloemsaft von *B. napus* aber auch mit der rekombinanten Form aus *A. thaliana* und Raps gearbeitet. Dazu wurden die Proteine aus beiden Organismen in *E. coli* hergestellt und mittels Nickelaffinitäts- sowie Größenausschlusschromatographie aufgereinigt. Das so gewonnene Protein war zu 98 % rein und konnte für verschiedene *in vitro*-Studien verwendet werden: Da das aus nativem Phloemsaft isolierte Protein in der Phosphoproteinfärbung (ProQ Diamond) stets ein starkes Signal zeigte, sollten zunächst posttranslationale Modifizierungen des nativen Proteins mittels massenspektrometrischer Analyse identifiziert werden. Darüber konnte eine MAPK3-Phosphorylierungsstelle eindeutig identifiziert werden. Da es sich aber aufgrund der Signalstärke in der Phosphoproteinfärbung vermutlich um ein mehrfach phosphoryliertes Protein handelte, wurden weitere *in vitro*-Phosphorylierungsstudien mit den rekombinanten Proteinen durchgeführt. Dazu wurde das Protein, für das mehrere Casein Kinase II-Phosphorylierungsstellen innerhalb des Proteins vorhergesagt wurden, mittels der CKII *in vitro* phosphoryliert. Zwar konnte das Protein über die Kinase modifiziert werden, allerdings konnte über die anschließenden MS-Analysen die genauen Phosphorylierungsstellen nicht eindeutig identifiziert werden. Daher wurden verschiedene Mutanten des Proteins aus *Arabidopsis* generiert, wobei die putativen CKII-Phosphorylierungsstellen am C-Terminus über den Austausch der Serine gegen Alanine eliminiert wurden. Darüber konnten sieben CKII-Phosphorylierungsstellen am C-Terminus eindeutig zugeordnet werden.

Da Phosphorylierungen unterschiedliche Funktionen innerhalb eines Proteins erfüllen können, so beeinflussen sie die Funktion über die Interaktion mit Liganden oder legen die subzelluläre Lokalisation fest, sollte zunächst analysiert werden, ob das Protein innerhalb oder außerhalb des Phloems modifiziert wird. Dazu wurde rekombinantes Protein aus beiden Organismen mit Phloemsaft inkubiert und dabei zeigte sich, dass die Proteine im Anschluss ein Signal in der Phosphoproteinfärbung zeigten. Dies war bei dem Protein aus Raps stärker als beim Homolog aus *A. thaliana*. Über die anschließende MS-Analyse konnte wiederum die MAPK3-Phosphorylierungsstelle eindeutig identifiziert werden, während die *in vitro* gezeigte CKII-Phosphorylierungsstelle am C-Terminus nur indirekt nachgewiesen werden konnte. Auf diese Weise konnte erstmals gezeigt werden, dass im Phloemsaft von Raps Proteine phosphoryliert werden können und Kinasen, wie die MAPK3 und die Casein Kinase II, ein Bestandteil des Phloemsafts sind. Ob die Phosphorylierung die Funktion des analysierten Proteins oder seine subzelluläre Lokalisation beeinflusst, war zu dem Zeitpunkt nicht eindeutig zu klären und sollte über *in vivo*-Studien genauer analysiert werden. Eine weitere posttranslationale Modifizierung, die über die MS-Analyse mit nativem Protein identifiziert werden konnte, ist eine N-terminale Acetylierung. Ob diese Modifikation das Protein vor der Ubiquitinierung schützt oder es bedingt, dass es ubiquitiniert wird, so wie es für das N-Degron beschrieben wird, kann nur gemutmaßt werden: Da es sich um ein stark ungeordnetes Protein handelt, das im

Phloemsaft von Raps in großer Menge auftritt, ist es eher wahrscheinlich, dass es vor der Markierung mit Ubiquitin und dem proteasomalen Abbau geschützt wird. Ob diese Acetylierung direkt am Anschluss an die Synthese des Proteins erfolgt oder erst im Phloem durchgeführt wird, konnte im Rahmen der Arbeit nicht genauer analysiert werden, da das rekombinante Protein N-terminal infolge des Thrombinverdaus mit Glycin und Serin zwei Klonierungsartefakte aufwies und so der N-Terminus durch die zuständigen Acetylase vermutlich nicht erkannt wird. Dies könnte aber in zukünftigen Studien mit rekombinantem Protein, ohne N-terminalen His-Tag und somit ohne zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus, genauer analysiert werden, indem das rekombinante Protein mit Phloemsaft behandelt wird. Dabei ist zu berücksichtigen, dass im Phloemsaft, wie bereits gezeigt, ein aktives Proteasom vorliegt, so dass es wichtig ist den möglichen Abbau des Proteins über den Proteasom-spezifischen Inhibitor Lactacystin zu inhibieren. Eine mögliche Ubiquitinierung des Proteins könnte dann über einen spezifischen Antikörper und eine MS-Analyse nachgewiesen werden.

Dehydrine spielen bei Wasserstress eine wichtige Rolle und sind aufgrund ihrer hohen strukturellen Flexibilität in der Lage die Integrität der Zellen bei Wasserverlust zu erhalten. Um zu analysieren, ob auch das At1g64370-Protein eine protektive Wirkung auf Zellen bei unterschiedlichen Stressoren hat, wurde ein *Cell viability* Assay mit *E. coli* durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass das Protein die Zellen bei Hitzestress schützte. Ähnliches zeigten auch erste Hitzestress-Versuche mit At1g64370-überexprimierenden *A. thaliana* Pflanzen. Um zu analysieren auf welcher Ebene das Protein seine schützende Wirkung entfaltet, wurden Interaktionsstudien mit unterschiedlichen Liganden – Nukleinsäuren, Proteinen und Ionen – durchgeführt.

Dabei konnte gezeigt werden, dass das Protein mit RNA – mRNA, tRNA und miRNA – nicht aber mit DNA interagiert. Über verschiedene Methoden konnte dabei eine mittlere Affinität des Proteins zu tRNA und miRNA bestimmt werden. Über die Durchführung einer Zonen-Interferenz Gelelektrophorese sowie UV-*Crosslinking* Versuchen und anschließender MS-Analyse mit dem rekombinanten Wildtyp-Protein sowie einer C-terminal verkürzten Variante des At1g64370 aus *Arabidopsis* konnte eine mögliche Bindestelle identifiziert werden. Dabei handelt es sich um eine Sequenz unmittelbar vor dem C-terminal gelegenen K-reichen Segment, welches die RNA-Interaktion möglicherweise über elektrostatische Bindungen stabilisiert. Somit könnte es sich bei dem Protein um ein RNA-Chaperon handeln, das seine protektive Wirkung auf Zellen über die Bindung an RNA ausübt. Solche Chaperone werden auch als Transporter für RNA innerhalb des Phloems diskutiert, die die RNA im Phloem vor dem Abbau schützen und so eine Signalweiterleitung ermöglichen. Um zu prüfen, ob das At1g64370 eine solche RNA-Chaperon-Eigenschaft aufweist und beispielsweise in der Lage ist Sekundärstrukturelemente in der RNA zu schützen, könnten zukünftig *Thermal Shift Assays* durchgeführt werden, wobei die Schmelzkurven von RNA detektiert werden. Das Prinzip des Assays beruht dabei auf der Hitze-bedingten Auflösung von Sekundärstrukturen innerhalb der RNA, was sich in einer Veränderung der Absorption bei 260 nm äußert. Sollte das Protein die RNA bei Hitze schützen, so sollte sich dies in der Absorption im Vergleich zu freier RNA deutlich zeigen. Außerdem könnte über einen RNase-Protektionsassay ermittelt werden, ob sich das Protein wie ein molekulares Schild um die RNA legt und diese so vor dem Abbau durch die RNase schützt. Somit könnte möglicherweise geklärt werden, ob das Protein für den Schutz der RNA und den Transport innerhalb des Siebelements zuständig

ist, allerdings kann darüber, ob es auch am Transport der RNA aus den CCs in die SEs beteiligt ist, keine Aussage getroffen werden.

Über die Interaktionsstudien mit Proteinen konnten weder stabile noch transiente spezifische Interaktionspartner identifiziert werden. Da aber für die meisten Dehydrine keine spezifischen Interaktionen nachgewiesen werden konnten, wurde über einen Lactat-Dehydrogenase-Assay analysiert, ob das Protein das thermolabile Enzym bei Stress schützen kann. Hierbei konnte demonstriert werden, dass das Protein im Vergleich zu BSA, einem bekannten Cryoprotektanten, eine eher schwache cryoprotektive Wirkung hat, bei Hitze das Enzym aber am stärksten vor der Denaturierung schützen konnte. Wie genau das Protein diese Funktion ausführt, ist nur schwer zu ermitteln. Während einige vermuten, dass diese protektive Wirkung ausschließlich durch das K-Segment bedingt wird (244), diskutieren andere zusätzlich einen Einfluss der Größe des Proteins, des Grades an Unordnung sowie des Stokes-Radius (243). Da das untersuchte Protein kein K-Segment besitzt, kann ausgeschlossen werden, dass es seine schützende Wirkung über dieses ausübt. Dabei erscheint viel plausibler, dass sich das Protein im Falle von Wasserentzug – wobei es dazu kommt, dass die Proteinkonzentration innerhalb des Gewebes zunimmt – wie ein schützendes Schild um die Proteine legt und so den Verlust der Hydrathülle und somit eine Denaturierung oder Aggregation verhindert. Dafür sprechen auch die von S. Ostendorp durchgeführten SAXS-Messungen, wobei gezeigt werden konnte, dass das untersuchte Protein bei zunehmender Konzentration immer stärker elongierte.

Im letzten Schritt wurde die Interaktion zu Ionen analysiert. Dabei zeigte sich in den IMAC-Analysen mit unterschiedlichen Ionen, dass sowohl das native Protein aus *B. napus* als auch rekombinante Protein aus *A. thaliana* in der Lage ist verschiedene Ionen – Kupfer, Cobalt, Zink und Nickel, nicht aber Magnesium, Calcium, Mangan und Eisen – zu binden. Über die Behandlung des Proteins mit DEPC, das in erster Linie Histidine und Lysine modifiziert, einer anschließenden Behandlung mit HA und einer MS-Analyse konnte nachgewiesen werden, dass diese Eigenschaft des Proteins über die Histidine bedingt wird. Da das Protein nur einzelne und keine aufeinanderfolgenden Histidinreste besitzt, die häufig mit der Bindung von Ionen genannt werden, scheint hier die Bindung über einzelne Histidine zu erfolgen. Bei dem Versuch die Affinitäten des Proteins zu den einzelnen Ionen zu bestimmen, fiel bereits auf, dass das Protein bereits bei geringen Konzentrationen des Liganden ausfiel. Somit schien das Protein bedingt durch die Anwesenheit der Ionen Aggregate zu bilden. Dies konnte auch über einen Trypsin-Sensitivitätsassay gezeigt werden: So wurde das hoch flexible Protein innerhalb kürzester Zeit durch das Trypsin vollständig verdaut, während das mit Cu-Ionen behandelte Protein auch nach längerer Inkubation nicht abgebaut werden konnte. Dies zeigt, dass das Protein bei der Anwesenheit von Ionen vermutlich große Aggregate bildet und so für das Trypsin nicht mehr zugänglich ist. Eine mögliche Erklärung dieser Eigenschaft des Phloemproteins ist, dass es die Ionen durch das Phloem transportiert und freie Ionen, die im Falle von Stress – zum Beispiel Verletzung des Gewebes – frei werden abfängt und so die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die Proteine, Membranen aber auch Nukleinsäuren beschädigen, verhindert.

So konnte gezeigt werden, dass das Protein Dehydrin-ähnliche Eigenschaften besitzt und bei Hitze eine schützende Wirkung auf Zellen hat.

Im letzten Schritt sollten über Lokalisationsstudien in *A. thaliana* erste Einblicke über die Funktion des Proteins in Pflanzen gewonnen werden. Dazu wurde das Protein N-Terminal mit einem YFP fusioniert und unter Kontrolle eines 35S-Promotors und eines OCS-Terminators transient in Tabak und stabil in *A. thaliana* hergestellt. Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen in *Arabidopsis* zeigten, dass das Protein im Blatt im Cytosol, im Zellkern sowie Nukleolus vorhanden war. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass es sich innerhalb des Siebelementsystems anreicherte und dort sehr große Aggregate bildete. Diese Aggregate traten in nahezu allen Leitbahnen in den unterschiedlichen Geweben (Stängel, Wurzel, Blättern und Blüten auf) und wurden in den Wurzeln entladen. Über heterogene *Grafting*-Experimente konnte außerdem bewiesen werden, dass das Protein Phloem-mobil ist und über die *Graft*-Verbindung transportiert werden konnte. Dass das Protein Aggregate bildet, konnte bereits in den *in vitro*-Studien gezeigt werden. Ob diese Aggregate erscheinen, weil das untersuchte Protein Ionen, RNA oder auch Proteine im Phloem abschirmt kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht gesagt werden. Um diese Aggregate genauer analysieren zu können, müssten diese möglichst nativ aus dem Phloemsaft isoliert werden, was sich bei *Arabidopsis* im Gegensatz zu Raps hinsichtlich der Menge und der Methode eher schwierig gestaltet.

Diese Aggregate ermöglichten jedoch eine Analyse der Proteinbewegung innerhalb des Phloems: So konnte gezeigt werden, dass das Protein innerhalb eines Phloems in unterschiedlichen Siebelementen simultan in unterschiedliche Richtungen transportiert wird, was bisher nur vermutet wurde.

Neben den *in vivo*-Lokalisationsstudien des Wildtyp-Proteins wurde außerdem die Lokalisation des mutierten At1g64370-Proteins, bei dem die CKII-Phosphorylierungsstellen am C-Terminus eliminiert wurden, überprüft. Hier zeigte sich, dass die Phosphorylierung scheinbar einen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation hat. So schien sich die Mutante im Gegensatz zum Wildtyp im Nukleolus anzureichern, so dass vermutet werden könnte, dass die Phosphorylierung entweder einen stärkeren Import in den Nukleolus oder einen schwächeren Export aus dem Nukleolus in den Nukleus bedingt. Auch bei der RNA-Bindung könnte die Phosphorylierung einen Einfluss haben: So wäre denkbar, dass es aufgrund der Phosphorylierung – also dem geballten Auftreten von negativer Ladung im Bereich der möglichen RNA-Interaktionsstelle – dazu kommt, dass die RNA aufgrund von Abstoßungseffekten nicht mehr binden kann oder vom Protein entladen wird. Somit wäre es denkbar, dass das unphosphorylierte Protein stärker mit RNA interagiert und somit im RNA-reichen Nukleolus angereichert wird. Allerdings konnte das native, stark phosphorylierte Protein mittels der Heparin-Affinitätschromatographie angereichert werden, was wiederum nicht dafür spricht, dass die Phosphorylierung die RNA-Bindung nicht beeinflusst. Eindeutig ist dies aber vermutlich erst über Messung der Affinität, beispielsweise mittels MST, zu klären. Um eine Aggregatbildung als Artefakt der hohen Expression des Proteins auszuschließen ist es außerdem sinnvoll, dass Protein unter einem natürlichen Promotor zu exprimieren. Ein guter Kandidat wäre der *SUC2*-Promotor, der ausschließlich in den Geleitzellen aktiv ist.

Um ein genaueres Verständnis zu erlangen, welche Rolle das Protein in der Pflanze spielt, ist es wichtig eine *Knock-out* Mutante des At1g64370 in *A. thaliana* zu generieren. Dies ermöglicht zu schauen, ob der Verlust des Proteins einen Einfluss auf das Wachstum, die Entwicklung sowie das Überleben und Fertilität der

Pflanze hat. Dazu wurde in Kooperation mit dem MPI Golm (AG Kragler) über das CRISPR/CAS-System eine homozygote *Knock-out*-Mutante des At1g64370 in *A. thaliana* hergestellt, die jedoch hinsichtlich phänotypischer Veränderungen bei Stress, wie Hitze, Kälte und Trockenheit, noch genauer analysiert werden müsste. Aufgrund der Ähnlichkeit des untersuchten Proteins zum HIRD11, das im Phloem ebenfalls identifiziert werden konnte und ähnliche Eigenschaften aufweist, ist es auch möglich, dass sich beide Proteine in ihrer Funktion ergänzen. So könnte die Expression des HIRD11 bedingt durch den Verlust des At1g64370 erhöht werden, um den Verlust zu kompensieren. Dies könnte allerdings über vergleichende qPCR-Analysen genauer untersucht werden. Sollte sich hier eine Veränderung zeigen, ist es vermutlich erforderlich eine Doppelmutante zu erstellen, um die Funktion der Proteine in der Pflanze genauer untersuchen zu können. Um außerdem den Einfluss der Phosphorylierung, beispielsweise auf die Lokalisation des Proteins auch im Phloem, genauer untersuchen zu können, wäre es außerdem interessant die gleichen Versuche mit der *Loss-of-function* Mutante durchzuführen.

5 Zusammenfassung

Die globalen Veränderungen des Klimas und die stetig steigenden Bevölkerungszahlen stellen uns hinsichtlich der Nahrungsmittel- und Treibstoffproduktion vor eine große Aufgabe. Um zukünftige Ernteverluste durch abiotischen Stress, wie Trockenheit, Hitze und Kälte, zu verhindern, ist es erforderlich die Signale innerhalb der Pflanze zu verstehen, die für die Veränderungen in der Pflanzenentwicklung und den daraus resultierenden Anpassungen verantwortlich sind. Ein Gewebe, dem bei der pflanzlichen Adaption an Stress eine wichtige Rolle zugesprochen wird, ist das Phloem, für das bereits gezeigt werden konnte, dass es neben Photoassimilaten auch wichtige Signalmoleküle wie RNA, Lipide und Proteine transportiert. Allerdings befindet sich die Untersuchung der Beteiligung des Phloems an der Stressantwort noch am Anfang und so sollten über Proteomstudien mit Phloemsaft von Raps im Rahmen dieser Arbeit neue Erkenntnisse gewonnen werden.

Über die Proteomstudien konnten erstmals native Protein-Protein- sowie Protein-Nukleinsäure-Komplexe im Phloemsaft identifiziert werden. Hierbei handelte es sich zum einen um drei ribosomale Komplexe einer definierten Größe, die sowohl ribosomale RNA als auch ribosomale Proteine enthielten. Außerdem konnte die Existenz eines funktionalen Proteasoms sowie das Vorhandensein ubiquitinerter Phloemproteine im Siebelementsystem zum ersten Mal gezeigt werden. Diese Beobachtung beweist, dass die Proteolyse von Phloemproteinen innerhalb des Siebelements möglich ist, welches vermutlich auch mit der Abwehr von Pathogenen im Zusammenhang steht. Über weitere Analysen der Proteine im Phloem konnten mögliche RNA-Bindeproteine, Proteine mit Ionenbindeeeigenschaft und auch stark ungeordnete Proteine, die in den letzten Jahren als Regulatoren der Stressantwort immer mehr in den Focus gerückt sind, identifiziert werden. Ein Protein, das in nahezu allen Analysen immer wieder in Erscheinung trat und abundant im Phloemsaft von Raps vertreten war, ist ein Homolog des in *A. thaliana* bisher uncharakterisierten Proteins At1g64370. Dieses Protein sollte im Verlauf der vorliegenden Arbeit genauer charakterisiert werden:

Dazu wurden sowohl mit nativem als auch rekombinant hergestelltem Protein verschiedenste Studien durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass es sich um ein stark ungeordnetes Protein handelt, dass über Sequenzvergleiche am ehesten der Familie der Dehydrine zugeordnet werden konnte, allerdings das für diese Proteinklasse essentielle K-Segment nicht aufweist. Es stellte sich heraus, dass das Protein im Phloem N-terminal acetyliert und stark phosphoryliert vorliegt. Dabei konnten über Massenspektrometrie-basierte Analysen zum einen die genaue Stelle der Acetylierung sowie sieben CKII- und eine MAP3-Kinase-Phosphorylierungsstelle identifiziert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierungen am rekombinanten Protein mit nativem Phloemsaft induziert werden konnten. Über IMAC-Analysen mit nativem Phloemsaft konnte das Protein über Zn^{2+} -, Ni^{2+} -, Cu^{2+} - und Co^{2+} -Ionen angereichert werden. Dieses konnte für das rekombinante Protein reproduziert werden und über strukturelle *Proteomic*-Studien mit DEPC konnte demonstriert werden, dass die im Protein befindlichen Histidine die Interaktion mit den zweiwertigen Kationen bedingen. Dabei bildete das Protein große Aggregate, was über einen Trypsin-Sensitivitätsassay gezeigt werden konnte. Über die Studien zu Protein-Protein-Interaktionen konnte kein spezifischer Interaktionspartner identifiziert werden, allerdings zeigte das Protein im LDH-Protektionsassay eine protektive Wirkung auf das thermolabile Enzym im Falle von

Hitze, was darauf schließen ließ, dass es keine spezifische Interaktion eingeht, sondern sich eher wie ein molekulares Schild schützend um die Proteine lagert. Diese protektive Wirkung bei Hitze konnte außerdem über einen *Cell viability Assay* in *E. coli* bestätigt werden und auch erste *in vivo*-Studien mit At164370-überexprimierenden *A. thaliana* Pflanzen deuteten auf eine Beteiligung des Proteins bei Hitzestress hin. Des Weiteren demonstrierten Interaktionsstudien, dass das Protein scheinbar spezifisch mit verschiedenen RNA-Spezies wechselwirkt, wobei über verschiedene Methoden eine moderate Affinität ermittelt werden konnte. Über *UV-Crosslinking* Versuche in Kombination mit MS-Analysen konnte außerdem eine mögliche Interaktionsstelle im Bereich der K-reichen Region ermittelt werden. Lokalisationsstudien mit einem YFP-At1g64370-Fusionskonstrukt offenbarten eine subzelluläre Lokalisation im Zytoplasma, im Zellkern, sowie im Nukleolus. Dabei war das Protein aufgrund der Verwendung des 35S-Promotors in nahezu allen Geweben zu finden, allerdings deutete sich an, dass sich das Protein im Leitgewebe ansammelte und dort große Aggregate bildete.

5 Abstract

The global climate change and the steadily increasing population challenge us in terms of food and fuel production. In order to prevent future crop losses due to abiotic stress, such as drought, heat and cold, it is necessary to understand signals within the plant that are responsible for changes in plant development and the resulting adaptations. A tissue that plays an important role in plant adaptation to stress is the phloem, which is not only responsible for transport of photoassimilates, since being the major transport route for important signaling molecules such as RNA, lipids, and proteins. However, the study of phloem involvement in stress response is still in its infancy, and further insights through proteome studies on rapeseed phloem sap are necessary.

In a first proteome attempt the identification of native protein-protein and protein-nucleic acid complexes in the phloem sap was proven successful. These were on the one hand three ribosomal complexes of a defined size, which contained both ribosomal RNA and ribosomal proteins. In addition, the existence of a functional proteasome as well as the presence of ubiquitinated phloem proteins in the sieve element system could be demonstrated for the first time. This observation proves that the proteolysis of phloem proteins within the sieve element is possible, which is probably also related to the defense against pathogens. Further analyzes of the proteins in the phloem have identified potential RNA binding proteins, proteins with ion binding properties and also highly disordered proteins, which have come more and more in focus of attention as regulators of stress response in recent years. A protein that appeared in almost all analyzes and being abundantly present in the phloem sap of oilseed rape was a homologue of the protein At1g64370, a so far uncharacterized protein in *A. thaliana*. To elucidate possible functions this protein was further characterized in the course of this work:

For this purpose, various studies were carried out with both native and recombinantly produced protein. This showed that At1g64370 is a highly disordered protein that could be assigned by sequence comparisons most likely to the family of dehydrins, but does not harbor the essential K segment, that is typical for this protein class. Furthermore, the native protein isolated from phloem sap is N-terminally acetylated and strongly phosphorylated. Mass spectrometry-based analyzes identified the exact site of acetylation as well as seven CKII and one MAP3 kinase phosphorylation sites. In addition, it could be shown that phosphorylation on the recombinant protein could be induced with native phloem sap. The protein could be enriched via Zn²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺ and Co²⁺ ions by native phloem-sap IMAC analyzes. This could be reproduced for the recombinant protein and structural proteomic studies with DEPC demonstrated that histidines within the protein cause interaction with the divalent cations. The protein formed large aggregates, which could be demonstrated by a trypsin sensitivity assay. No specific interaction partner could be identified via protein-protein interaction studies. However, LDH protection assays showed a protective effect on the thermolabile enzyme in the case of heat, suggesting that it does not undergo any specific interaction, but rather act like a molecular shield protecting the protein from heat. In addition, this protective effect on heat could be confirmed by a cell viability assay in *E. coli*, and initial *in vivo* studies with At164370-overexpressing *A. thaliana* plants also suggested an involvement of the protein in heat stress. Furthermore, RNA interaction studies demonstrated that the protein seems to interact specifically with different RNA species, with moderate affinity being determined by various methods. Using UV crosslinking experiments

in combination with MS analyzes, a possible interaction site near the K-rich region could be identified. Localization studies with a YFP-At1g64370 fusion construct revealed subcellular localization in the cytoplasm, nucleus, and nucleolus. The protein could be found in almost all tissues due to the use of the 35S promoter, although it was suggested that the protein accumulated in the conducting tissue and formed large aggregates there.

6 Literaturverzeichnis

1. Esau, K. (1965) Plant anatomy. *New York, USA Wiley*.
2. De Rybel, B., Mähönen, A.P., Helariutta, Y. and Weijers, D. (2015) Plant vascular development: from early specification to differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **17**, 30–40.
3. Esau, K. (1969) The phloem 5th ed. Zimmermann, W., Ozenda, P., Wulff, H. (eds) Gebr. Borntraeger, Berlin, Stuttgart.
4. van Bel, A.J.E. (2003) The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant, Cell Environ.*, **26**, 125–149.
5. Oparka and Turgeon (1999) Sieve elements and companion cells-traffic control centers of the phloem. *Plant Cell*, **11**, 739–50.
6. Hall, S.M. and Baker, D.A. (1972) The chemical composition of Ricinus phloem exudate. *Planta*, **106**, 131–140.
7. Weiler, E.W. and Ziegler, H. (1981) Determination of phytohormones in phloem exudate from tree species by radioimmunoassay. *Planta*, **152**, 168–170.
8. Lacombe, B. and Achard, P. (2016) Long-distance transport of phytohormones through the plant vascular system. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **34**, 1–8.
9. 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.
10. 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.
11. Giavalisco, P., Kapitza, K., Kolasa, A., Buhtz, A. and Kehr, J. (2006) Towards the proteome of Brassica napus phloem sap. *Proteomics*, **6**, 896–909.
12. Turnbull, C.G.N. and Lopez-Cobollo, R.M. (2013) Heavy traffic in the fast lane: long-distance signalling by macromolecules. *New Phytol.*, **198**, 33–51.
13. Lough, T.J. and Lucas, W.J. (2006) Integrative plant biology: role of phloem long-distance macromolecular trafficking. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **57**, 203–232.
14. Ruiz-Medrano, R., Xoconostle-Cázares, B. and Lucas, W.J. (1999) Phloem long-distance transport of CmNACP mRNA: implications for supracellular regulation in plants. *Development*, **126**, 4405–4419.
15. Münch, E. (1930) Die Stoffbewegungen in der Pflanze Fischer.
16. Zhang, S., Sun, L. and Kragler, F. (2009) The phloem-delivered RNA pool contains small noncoding RNAs and interferes with translation. *Plant Physiol.*, **150**, 378–87.
17. Omid, A., Keilin, T., Glass, A., Leshkowitz, D. and Wolf, S. (2007) Characterization of phloem-sap transcription profile in melon plants. *J. Exp. Bot.*, **58**, 3645–3656.
18. Thieme, C.J., Rojas-Triana, M., Stecyk, E., Schudoma, C., Zhang, W., Yang, L., Miñambres, M., Walther, D., Schulze, W.X., Paz-Ares, J., et al. (2015) Endogenous Arabidopsis messenger RNAs transported to distant tissues. *Nat. Plants*, **1**, 15025.
19. Yoo, B.-C., Kragler, F., Varkonyi-Gasic, E., Haywood, V., Archer-Evans, S., Lee, Y.M., Lough, T.J. and Lucas, W.J. (2004) A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell*, **16**, 1979–2000.
20. Buhtz, A., Pieritz, J., Springer, F. and Kehr, J. (2010) Phloem small RNAs, nutrient stress responses, and systemic mobility. *BMC Plant Biol.*, **10**, 64.
21. Melnyk, C.W., Molnar, A. and Baulcombe, D.C. (2011) Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. *EMBO J.*, **30**, 3553–3563.
22. Gaupels, F., Buhtz, A., Knauer, T., Deshmukh, S., Waller, F., van Bel, A.J.E., Kogel, K.-H. and Kehr, J. (2008) Adaptation of aphid stylectomy for analyses of proteins and mRNAs in barley phloem sap. *J. Exp. Bot.*, **59**, 3297–3306.
23. Doering-Saad, C., Newbury, H.J., Bale, J.S. and Pritchard, J. (2002) Use of aphid stylectomy and RT-PCR for the detection of transporter mRNAs in sieve elements. *J. Exp. Bot.*, **53**, 631–7.
24. Lu, K.-J., Huang, N.-C., Liu, Y.-S., Lu, C.-A. and Yu, T.-S. (2012) Long-distance movement of Arabidopsis FLOWERING LOCUS T RNA participates in systemic floral regulation. *RNA Biol.*, **9**, 653–662.
25. Xoconostle-Cázares, B., Xiang, Y., Ruiz-Medrano, R., Wang, H.L., Monzer, J., Yoo, B.C., McFarland, K.C., Franceschi, V.R. and Lucas, W.J. (1999) Plant paralog to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem. *Science*, **283**, 94–98.
26. Haywood, V., Yu, T.-S., Huang, N.-C. and Lucas, W.J. (2005) Phloem long-distance trafficking of GIBBERELLIC ACID-INSENSITIVE RNA regulates leaf development. *Plant J.*, **42**, 49–68.
27. Hannapel, D. and Banerjee, A. (2017) Multiple Mobile mRNA Signals Regulate Tuber Development in Potato. *Plants*, **6**, 8.
28. Kim, M., Canio, W., Kessler, S. and Sinha, N. (2001) Developmental changes due to long-distance movement of a homeobox fusion transcript in tomato. *Science (80-.)*, **293**, 287–9.

29. Molnar,A, Melnyk,C.W., Bassett,A., Hardcastle,T.J., Dunn,R. and Baulcombe,D.C. (2010) Small Silencing RNAs in Plants Are Mobile and Direct Epigenetic Modification in Recipient Cells. *Science (80-.)*, **328**, 872–875.
30. Atkins,C.A. and Smith,P.M.C. (2007) Translocation in legumes: assimilates, nutrients, and signaling molecules. *Plant Physiol*, **144**, 550–561.
31. Varkonyi-Gasic,E., Gould,N., Sandanayaka,M., Sutherland,P. and MacDiarmid,R.M. (2010) Characterisation of microRNAs from apple (*Malus domestica* 'Royal Gala') vascular tissue and phloem sap. *BMC Plant Biol*, **10**, 159.
32. Bonnet,E., Van de Peer,Y. and Rouze,P. (2006) The small RNA world of plants. *New Phytol*, **171**, 451–468.
33. Pant,B.D., Musialak-Lange,M., Nuc,P., May,P., Buhtz,A., Kehr,J., Walther,D. and Scheible,W.-R. (2009) Identification of nutrient-responsive Arabidopsis and rapeseed microRNAs by comprehensive real-time polymerase chain reaction profiling and small RNA sequencing. *Plant Physiol*, **150**, 1541–1555.
34. Paultre,D.S.G., Gustin,M.-P., Molnar,A. and Oparka,K.J. (2016) Lost in Transit: Long-Distance Trafficking and Phloem Unloading of Protein Signals in Arabidopsis Homografts. *Plant Cell*, **28**, 2016–2025.
35. Haywood,V., Kragler,F. and Lucas,W.J. (2002) Plasmodesmata: pathways for protein and ribonucleoprotein signaling. *Plant Cell*, **14 Suppl**, S303–25.
36. Gómez,G., Torres,H. and Pallás,V. (2005) Identification of translocatable RNA-binding phloem proteins from melon, potential components of the long-distance RNA transport system. *Plant J. cell Mol. Biol*, **41**, 107–16.
37. Ham,B.-K., Bandom,J.L., Xoconostle-Cázares,B., Ringgold,V., Lough,T.J. and Lucas,W.J. (2009) A polypyrimidine tract binding protein, pumpkin RBP50, forms the basis of a phloem-mobile ribonucleoprotein complex. *Plant Cell*, **21**, 197–215.
38. Richardson,P.T., Baker,D.A. and Ho,L.C. (1982) The Chemical Composition of Cucurbit Vascular Exudates. *J. Exp. Bot.*, **33**, 1239–1247.
39. Bostwick,D.E., Dannenhoffer,J.M., Skaggs,M.I., Lister,R.M., Larkins,B.A. and Thompson,G.A. (1992) Pumpkin phloem lectin genes are specifically expressed in companion cells. *Plant Cell*, **4**, 1539–1548.
40. Imlau,A., Truernit,E. and Sauer,N. (1999) Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *Plant Cell*, **11**, 309–22.
41. Stadler,R., Wright,K.M., Lauterbach,C., Amon,G., Gahrtz,M., Feuerstein,A., Oparka,K.J. and Sauer,N. (2005) Expression of GFP-fusions in Arabidopsis companion cells reveals non-specific protein trafficking into sieve elements and identifies a novel post-phloem domain in roots. *Plant J*, **41**, 319–31.
42. Balachandran,S., Xiang,Y., Schobert,C., Thompson,G.A. and Lucas,W.J. (1997) Phloem sap proteins from *Cucurbita maxima* and *Ricinus communis* have the capacity to traffic cell to cell through plasmodesmata. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 14150–5.
43. Roberts,A.G., Cruz,S.S., Roberts,I.M., Prior,D., Turgeon,R. and Oparka,K.J. (1997) Phloem Unloading in Sink Leaves of *Nicotiana benthamiana*: Comparison of a Fluorescent Solute with a Fluorescent Virus. *Plant Cell*, **9**, 1381–1396.
44. Aoki,K., Suzui,N., Fujimaki,S., Dohmae,N., Yonekura-Sakakibara,K., Fujiwara,T., Hayashi,H., Yamaya,T. and Sakakibara,H. (2005) Destination-Selective Long-Distance Movement of Phloem Proteins. *Plant Cell*, **17**, 1801–1814.
45. Patrick,J.W. (1997) PHLOEM UNLOADING: Sieve Element Unloading and Post-Sieve Element Transport. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **48**, 191–222.
46. Haebel,S. and Kehr,J. (2001) Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry peptide mass fingerprints and post source decay: A tool for the identification and analysis of phloem proteins from *Cucurbita maxima* Duch. separated by two-dimensional polyacryla. *Planta*, **213**, 586–593.
47. Lin,M.-K., Lee,Y.-J., Lough,T.J., Phinney,B.S. and Lucas,W.J. (2009) Analysis of the Pumpkin Phloem Proteome Provides Insights into Angiosperm Sieve Tube Function. *Mol. Cell. Proteomics*, **8**, 343–356.
48. 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**, 1473–1481.
49. Aki,T., Shigyo,M., Nakano,R., Yoneyama,T. and Yanagisawa,S. (2008) Nano scale proteomics revealed the presence of regulatory proteins including three FT-Like proteins in phloem and xylem saps from rice. *Plant Cell Physiol*, **49**, 767–90.
50. Walz,C., Giavalisco,P., Schad,M., Juenger,M., Klose,J. and Kehr,J. (2004) Proteomics of curcubit phloem exudate reveals a network of defence proteins. *Phytochemistry*, **65**, 1795–1804.
51. Anstead,J. a, Hartson,S.D. and Thompson,G. a (2013) The broccoli (*Brassica oleracea*) phloem tissue proteome. *BMC Genomics*, **14**, 764.
52. 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.
53. Kulikova, A.L., Turkina, M. V and Puryaseva, A.P. (2003) Cytoskeletal proteins in the phloem tissues and phloem sap of higher plants. *Cell Biol. Int.*, **27**, 223–224.
54. Hipper, C., Brault, V., Ziegler-Graff, V. and Revers, F. (2013) Viral and cellular factors involved in Phloem transport of plant viruses. *Front. Plant Sci.*, **4**, 154.
55. Dannenhoffer, J.M., Suhr, R.C. and Thompson, G.A. (2001) Phloem-specific expression of the pumpkin fruit trypsin inhibitor. *Planta*, **212**, 155–162.
56. Kehr, J. (2006) Phloem sap proteins: their identities and potential roles in the interaction between plants and phloem-feeding insects. *J. Exp. Bot.*, **57**, 767–774.
57. Gechev, T.S., Van Breusegem, F., Stone, J.M., Denev, I. and Laloi, C. (2006) Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays*, **28**, 1091–1101.
58. Petrov, V.D. and Van Breusegem, F. (2012) Hydrogen peroxide—a central hub for information flow in plant cells. *AoB Plants*, **2012**, pls014.
59. Gechev, T.S. and Hille, J. (2005) Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *J. Cell Biol.*, **168**, 17–20.
60. Shah, J., Chaturvedi, R., Chowdhury, Z., Venables, B. and Petros, R.A. (2014) Signaling by small metabolites in systemic acquired resistance. *Plant J.*, **79**, 645–658.
61. Behmer, S.T., Olszewski, N., Sebastiani, J., Palka, S., Sparacino, G., Sciarrino, E. and Grebenok, R.J. (2013) Plant phloem sterol content: forms, putative functions, and implications for phloem-feeding insects. *Front. Plant Sci.*, **4**, 370.
62. Guelette, B.S., Benning, U.F. and Hoffmann-Benning, S. (2012) Identification of lipids and lipid-binding proteins in phloem exudates from *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.*, **63**, 3603–3616.
63. Hoffmann-Benning, S., Gage, D.A., McIntosh, L., Kende, H. and Zeevaert, J.A.D. (2002) Comparison of peptides in the phloem sap of flowering and non-flowering *Perilla* and lupine plants using microbore HPLC followed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Planta*, **216**, 140–147.
64. 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. physiology*, **141**, 638–50.
65. Barbaglia, A.M., Tamot, B., Greve, V. and Hoffmann-Benning, S. (2016) Phloem Proteomics Reveals New Lipid-Binding Proteins with a Putative Role in Lipid-Mediated Signaling. *Front. Plant Sci.*, **7**.
66. Benning, U.F., Tamot, B., Guelette, B.S. and Hoffmann-Benning, S. (2012) New aspects of Phloem-mediated long-distance lipid signaling in plants. *Front. Plant Sci.*, **3**, 53.
67. Pallas, V. and Gómez, G. (2013) Phloem RNA-binding proteins as potential components of the long-distance RNA transport system. *Front. Plant Sci.*, **4**, 1–6.
68. Williamson, J.R. (2000) Induced fit in RNA-protein recognition. *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 834–837.
69. Gomez, G. and Pallas, V. (2004) A long-distance translocatable phloem protein from cucumber forms a ribonucleoprotein complex in vivo with Hop stunt viroid RNA. *J. Virol.*, **78**, 10104–10110.
70. Yoo, B.-C. (2004) A Systemic Small RNA Signaling System in Plants. *Plant Cell*, **16**, 1979–2000.
71. Pereira, A. (2016) Plant Abiotic Stress Challenges from the Changing Environment. *Front. Plant Sci.*, **7**, 1123.
72. Rask, L., Andréasson, E., Ekblom, B., Eriksson, S., Pontoppidan, B. and Meijer, J. (2000) Myrosinase: Gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Mol. Biol.*, **42**, 93–113.
73. Eriksson, S., Andréasson, E., Ekblom, B., Granér, G., Pontoppidan, B., Taipalensuu, J., Zhang, J., Rask, L. and Meijer, J. (2002) Complex formation of myrosinase isoenzymes in oilseed rape seeds are dependent on the presence of myrosinase-binding proteins. *Plant Physiol.*, **129**, 1592–9.
74. Andersson, D., Chakrabarty, R., Bejai, S., Zhang, J., Rask, L. and Meijer, J. (2009) Myrosinases from root and leaves of *Arabidopsis thaliana* have different catalytic properties. *Phytochemistry*, **70**, 1345–1354.
75. Barth, C. and Jander, G. (2006) *Arabidopsis* myrosinases TGG1 and TGG2 have redundant function in glucosinolate breakdown and insect defense. *Plant J.*, **46**, 549–562.
76. Saibil, H. (2013) Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **14**, 630–642.
77. Rajkowitsch, L., Chen, D., Stampfl, S., Semrad, K., Waldsich, C., Mayer, O., Jantsch, M.F., Konrat, R., Bläsi, U. and Schroeder, R. (2007) RNA chaperones, RNA annealers and RNA helicases. *RNA Biol.*, **4**, 118–30.
78. Kovacs, D., Rakacs, M., Agoston, B., Lenkey, K.,

- Semrad,K., Schroeder,R. and Tompa,P. (2009) Janus chaperones: Assistance of both RNA- and protein-folding by ribosomal proteins. *FEBS Lett.*, **583**, 88–92.
79. Allagulova,C.R., Gimalov,F.R., Shakirova,F.M. and Vakhitov,V.A. (2003) The plant dehydrins: structure and putative functions. *Biochemistry (Mosc)*, **68**, 945–51.
80. 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.
81. Dure,L., Pyle,J.B., Chlan,C.A., Baker,J.C. and Galau,G.A. (1983) Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination. *Plant Mol. Biol.*, **2**, 199–206.
82. Galau,G.A., Hughes,D.W. and Dure,L. (1986) Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (Lea) mRNAs. *Plant Mol. Biol.*, **7**, 155–170.
83. Battista,J.R., Park,M.J. and McLemore,A.E. (2001) Inactivation of two homologues of proteins presumed to be involved in the desiccation tolerance of plants sensitizes *Deinococcus radiodurans* R1 to desiccation. *Cryobiology*, **43**, 133–9.
84. Stacy,R.A.P. and Aalen,R.B. (1998) Identification of sequence homology between the internal hydrophilic repeated motifs of Group 1 late-embryogenesis-abundant proteins in plants and hydrophilic repeats of the general stress protein GsiB of *Bacillus subtilis*. *Planta*, **206**, 476–478.
85. Close,T.J. and Lammers,P.J. (1993) An osmotic stress protein of cyanobacteria is immunologically related to plant dehydrins. *Plant Physiol.*, **101**, 773–9.
86. Denekamp,N.Y., Reinhardt,R., Kube,M. and Lubzens,E. (2010) Late embryogenesis abundant (LEA) proteins in nondesiccated, encysted, and diapausing embryos of rotifers. *Biol. Reprod.*, **82**, 714–24.
87. Abba',S., Ghignone,S. and Bonfante,P. (2006) A dehydration-inducible gene in the truffle *Tuber borchii* identifies a novel group of dehydrins. *BMC Genomics*, **7**, 39.
88. Gal,T.Z., Glazer,I. and Koltai,H. (2004) An LEA group 3 family member is involved in survival of *C. elegans* during exposure to stress. *FEBS Lett.*, **577**, 21–26.
89. Kikawada,T., Nakahara,Y., Kanamori,Y., Iwata,K., Watanabe,M., McGee,B., Tunnacliffe,A. and Okuda,T. (2006) Dehydration-induced expression of LEA proteins in an anhydrobiotic chironomid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **348**, 56–61.
90. Hand,S.C., Menze,M.A., Toner,M., Boswell,L. and Moore,D. (2011) LEA Proteins During Water Stress: Not Just for Plants Anymore. *Annu. Rev. Physiol.*, **73**, 115–134.
91. Marunde,M.R., Samarajeewa,D.A., Anderson,J., Li,S., Hand,S.C. and Menze,M.A. (2013) Improved tolerance to salt and water stress in *Drosophila melanogaster* cells conferred by late embryogenesis abundant protein. *J. Insect Physiol.*, **59**, 377–86.
92. Dure,L., Crouch,M., Harada,J., Ho,T.-H.D., Mundy,J., Quatrano,R., Thomas,T. and Sung,Z.R. (1989) Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol. Biol.*, **12**, 475–486.
93. Bray,E.A. (1993) Responses to Water Deficit'. *Plant Physiol.*, **103**, 1035–1040.
94. Battaglia,M., Olvera-Carrillo,Y., Garciarrubio,A., Campos,F. and Covarrubias,A.A. (2008) The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol.*, **148**, 6–24.
95. Bies-Ethève,N., Gaubier-Comella,P., Debures,A., Lasserre,E., Jobet,E., Raynal,M., Cooke,R. and Delseny,M. (2008) Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. 10.1007/s11103-008-9304-x.
96. Hundertmark,M. and Hincha,D.K. (2008) LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, **9**, 118.
97. Perdiguero,P., Collada,C. and Soto,Á. (2014) Novel dehydrins lacking complete K-segments in Pinaceae. The exception rather than the rule. *Front. Plant Sci.*, **5**, 682.
98. Hara,M., Fujinaga,M. and Kuboi,T. (2005) Metal binding by citrus dehydrin with histidine-rich domains. *J. Exp. Bot.*, **56**, 2695–2703.
99. Earley,K.W., Haag,J.R., Pontes,O., Opper,K., Juehne,T., Song,K. and Pikaard,C.S. (2006) Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J.*, **45**, 616–629.
100. Inoue,H., Nojima,H. and Okayama,H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, **96**, 23–28.
101. Sparrow,P.A.C., Dale,P.J. and Irwin,J.A. (2006) Brassica oleracea. In Wang,K. (ed), *Agrobacterium Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 417–426.
102. Lu,Y. Extraction of Genomic DNA from *Arabidopsis* leaves (can be used for other tissues as well).
103. Cazenave,C. and Uhlenbeck,O.C. (1994) RNA template-directed RNA synthesis by T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 6972–6.

104. 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.
105. Strohal,M., Hassman,M., Kosata,B. and Kodíček,M. (2008) mMass data miner: an open source alternative for mass spectrometric data analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **22**, 905–8.
106. Pruitt,K., Brown,G., Tatusova,T. and Maglott,D. (2002) The Reference Sequence (RefSeq) Database. In *The NCBI Handbook*, pp. 1–24.
107. Fiala,G.J., Schamel,W.W.A. and Blumenthal,B. (2011) Blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) for analysis of multiprotein complexes from cellular lysates. *J. Vis. Exp.*, 10.3791/2164.
108. Wittig,I., Braun,H.-P. and Schägger,H. (2006) Blue native PAGE. *Nat. Protoc.*, **1**, 418–428.
109. Schägger,H. (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protoc.*, **1**, 16–22.
110. Wu,Y., Li,Q. and Chen,X.-Z. (2007) Detecting protein-protein interactions by Far western blotting. *Nat. Protoc.*, **2**, 3278–3284.
111. Mu,P., Feng,D., Su,J., Zhang,Y., Dai,J., Jin,H., Liu,B., He,Y., Qi,K., Wang,H., *et al.* Cu Zp triggers reversible aggregation of a disordered His-rich dehydrin MpDhn12 from *Musa paradisica*. 10.1093/jb/mvr082.
112. Kehr,J. and Buhtz,A. (2008) Long distance transport and movement of RNA through the phloem. *J. Exp. Bot.*, **59**, 85–92.
113. Kennedy,J.S. and Mittler,T.E. (1953) A Method of obtaining Phloem Sap via the Mouth-parts of Aphids. *Nature*, **171**, 528–528.
114. King,R.W. and Zeevaart,J.A. (1974) Enhancement of Phloem exudation from cut petioles by chelating agents. *Plant Physiol.*, **53**, 96–103.
115. Tetyuk,O., Benning,U.F. and Hoffmann-Benning,S. (2013) Collection and analysis of Arabidopsis phloem exudates using the EDTA-facilitated Method. *J. Vis. Exp.*, 10.3791/51111.
116. Dinant,S. and Kehr,J. (2013) Sampling and Analysis of Phloem Sap. In *Plant Mineral Nutrients*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 185–194.
117. Swamy,M., Siegers,G.M., Minguet,S., Wollscheid,B. and Schamel,W.W.A. (2006) Blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) for the identification and analysis of multiprotein complexes. *Sci. STKE*, **2006**, p1-18.
118. Rais,I., Karas,M. and Schägger,H. (2004) Two-dimensional electrophoresis for the isolation of integral membrane proteins and mass spectrometric identification. *Proteomics*, **4**, 2567–2571.
119. Schamel,W.W. (2001) Biotinylation of protein complexes may lead to aggregation as well as to loss of subunits as revealed by Blue Native PAGE. *J. Immunol. Methods*, **252**, 171–4.
120. Eubel,H., Braun,H.-P. and Millar,A.H. (2005) Blue-native PAGE in plants: a tool in analysis of protein-protein interactions. *Plant Methods*, **1**, 11.
121. Kapp,L.D. and Lorsch,J.R. (2004) The Molecular Mechanics of Eukaryotic Translation. *Annu. Rev. Biochem.*, **73**, 657–704.
122. Wilson,D.N. and Doudna Cate,J.H. (2012) The Structure and Function of the Eukaryotic Ribosome. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **4**, a011536–a011536.
123. Knoblauch,M. (1998) Sieve Tubes in Action. *PLANT CELL ONLINE*, **10**, 35–50.
124. Bhat,K.P. and Greer,S.F. (2011) Proteolytic and non-proteolytic roles of ubiquitin and the ubiquitin proteasome system in transcriptional regulation. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.*, **1809**, 150–155.
125. Downes,B. and Vierstra,R.D. (2005) Post-translational regulation in plants employing a diverse set of polypeptide tags. *Biochem. Soc. Trans.*, **33**, 393–399.
126. Hershko,A. and Ciechanover,A. (1998) The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 425–479.
127. Smalle,J. and Vierstra,R.D. (2004) The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **55**, 555–90.
128. Skoda,B. and Malek,L. (1992) Dry pea seed proteasome : purification and enzymic activities. *Plant Physiol.*, **99**, 1515–9.
129. Yang,P., Fu,H., Walker,J., Papa,C.M., Smalle,J., Ju,Y.-M. and Vierstra,R.D. (2004) Purification of the Arabidopsis 26 S Proteasome. *J. Biol. Chem.*, **279**, 6401–6413.
130. Unno,M., Mizushima,T., Morimoto,Y., Tomisugi,Y., Tanaka,K., Yasuoka,N. and Tsukihara,T. (2002) Structure determination of the constitutive 20S proteasome from bovine liver at 2.75 Å resolution. *J. Biochem.*, **131**, 171–3.
131. Voges,D., Zwickl,P. and Baumeister,W. (1999) THE 26S PROTEASOME : A MOLECULAR MACHINE DESIGNED FOR CONTROLLED.
132. Groll,M., Glickman,M.H., Finley,D., Bajorek,M., Köhler,A., Moroder,L., Rubin,D.M. and Huber,R. (2000) A gated channel into the proteasome core particle. *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 1062–1067.
133. Hartmann-Petersen,R., Seeger,M. and Gordon,C. (2003) Transferring substrates to the 26S proteasome. *Trends Biochem. Sci.*, **28**, 26–31.
134. Köhler,A., Cascio,P., Leggett,D.S., Woo,K.M.,

- Goldberg,A.L. and Finley,D. (2001) The Axial Channel of the Proteasome Core Particle Is Gated by the Rpt2 ATPase and Controls Both Substrate Entry and Product Release. *Mol. Cell*, **7**, 1143–1152.
135. Fu,H., Reis,N., Lee,Y., Glickman,M.H. and Vierstra,R.D. (2001) Subunit interaction maps for the regulatory particle of the 26S proteasome and the COP9 signalosome. *EMBO J.*, **20**, 7096–107.
136. Fu,H., Sadis,S., Rubin,D.M., Glickman,M., van Nocker,S., Finley,D. and Vierstra,R.D. (1998) Multiubiquitin chain binding and protein degradation are mediated by distinct domains within the 26 S proteasome subunit Mcb1. *J. Biol. Chem.*, **273**, 1970–81.
137. Smalle,J., Kurepa,J., Yang,P., Emborg,T.J., Babiychuk,E., Kushnir,S. and Vierstra,R.D. (2003) The pleiotropic role of the 26S proteasome subunit RPN10 in Arabidopsis growth and development supports a substrate-specific function in abscisic acid signaling. *Plant Cell*, **15**, 965–80.
138. Elsasser,S., Gali,R.R., Schwickart,M., Larsen,C.N., Leggett,D.S., Müller,B., Feng,M.T., Tübing,F., Dittmar,G.A.G. and Finley,D. (2002) Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains. *Nat. Cell Biol.*, **4**, 725–730.
139. Verma,R., Aravind,L., Oania,R., McDonald,W.H., Yates,J.R., Koonin,E. V and Deshaies,R.J. (2002) Role of Rpn11 Metalloprotease in Deubiquitination and Degradation by the 26S Proteasome. *Science (80-)*, **298**, 611–615.
140. Schobert,C., Großmann,P., Gottschalk,M., Komor,E., Pecsvaradi,A. and Mieden,U. zur (1995) Sieve-tube exudate from *Ricinus communis* L. seedlings contains ubiquitin and chaperones. *Planta An Int. J. Plant Biol.*, **196**, 205–210.
141. Hicke,L. (2001) Protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 195–201.
142. Deng,L., Wang,C., Spencer,E., Yang,L., Braun,A., You,J., Slaughter,C., Pickart,C. and Chen,Z.J. (2000) Activation of the I κ B Kinase Complex by TRAF6 Requires a Dimeric Ubiquitin-Conjugating Enzyme Complex and a Unique Polyubiquitin Chain. *Cell*, **103**, 351–361.
143. Sobhian,B., Shao,G., Lilli,D.R., Culhane,A.C., Moreau,L.A., Xia,B., Livingston,D.M. and Greenberg,R.A. (2007) RAP80 Targets BRCA1 to Specific Ubiquitin Structures at DNA Damage Sites. *Science (80-)*, **316**, 1198–1202.
144. Bennett,E.J. and Harper,J.W. (2008) DNA damage: ubiquitin marks the spot. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 20–22.
145. Grice,G.L. and Nathan,J. a. (2016) The recognition of ubiquitinated proteins by the proteasome. *Cell. Mol. Life Sci.*, **73**, 3497–3506.
146. Chau,V., Tobias,J., Bachmair,A., Marriott,D., Ecker,D., Gonda,D. and Varshavsky,A. (1989) A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science (80-)*, **243**, 1576–1583.
147. Johnson,E.S., Ma,P.C.M., Ota,I.M. and Varshavsky,A. (1995) A Proteolytic Pathway That Recognizes Ubiquitin as a Degradation Signal. *J. Biol. Chem.*, **270**, 17442–17456.
148. Mekuria,T., Bamunusinghe,D., Payton,M. and Verchot-Lubicz,J. (2008) Phloem Unloading of *Potato virus X* Movement Proteins Is Regulated by Virus and Host Factors. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **21**, 1106–1117.
149. Sung,D.Y., Vierling,E. and Guy,C.L. (2001) Comprehensive expression profile analysis of the Arabidopsis Hsp70 gene family. *Plant Physiol.*, **126**, 789–800.
150. Aparicio,F., Thomas,C.L., Lederer,C., Niu,Y., Wang,D. and Maule,A.J. (2005) Virus induction of heat shock protein 70 reflects a general response to protein accumulation in the plant cytosol. *Plant Physiol.*, **138**, 529–536.
151. Oh,S.E., Yeung,C., Babaei-Rad,R. and Zhao,R. (2014) Cosuppression of the chloroplast localized molecular chaperone HSP90.5 impairs plant development and chloroplast biogenesis in Arabidopsis. *BMC Res. Notes*, **7**, 643.
152. Lopukhina,A., Dettenberg,M., Weiler,E.W. and Hollander-Czytko,H. (2001) Cloning and characterization of a coronatine-regulated tyrosine aminotransferase from Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **126**, 1678–1687.
153. Titarenko,E., Rojo,E., Leon,J. and Sanchez-Serrano,J.J. (1997) Jasmonic acid-dependent and -independent signaling pathways control wound-induced gene activation in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol.*, **115**, 817–826.
154. Fang,P., Yu,X., Jeong,S.J., Mirando,A., Chen,K., Chen,X., Kim,S., Francklyn,C.S. and Guo,M. (2015) Structural basis for full-spectrum inhibition of translational functions on a tRNA synthetase. *Nat. Commun.*, **6**, 6402.
155. Chou,I.T. and Gasser,C.S. (1997) Characterization of the cyclophilin gene family of Arabidopsis thaliana and phylogenetic analysis of known cyclophilin proteins. *Plant Mol. Biol.*, **35**, 873–92.
156. Pogorelko,G. V., Mokryakova,M., Fursova,O. V., Abdeeva,I., Piruzian,E.S. and Bruskin,S.A. (2014) Characterization of three Arabidopsis thaliana immunophilin genes involved in the plant defense response against *Pseudomonas syringae*. *Gene*, **538**, 12–22.
157. Aumuller,T., Jahreis,G., Fischer,G. and Schiene-Fischer,C. (2010) Role of prolyl cis/trans isomers in cyclophilin-assisted *Pseudomonas*

- syringae AvrRpt2 protease activation. *Biochemistry*, **49**, 1042–1052.
158. Deng, W., Chen, L., Wood, D.W., Metcalfe, T., Liang, X., Gordon, M.P., Comai, L. and Nester, E.W. (1998) Agrobacterium VirD2 protein interacts with plant host cyclophilins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 7040–7045.
159. Xiong, S., Zhang, L. and He, Q.-Y. (2008) Fractionation of Proteins by Heparin Chromatography. In: Humana Press, pp. 213–221.
160. Rüping, B., Ernst, A.M., Jekat, S.B., Nordziede, S., Reineke, A.R., Müller, B., Bornberg-Bauer, E., Prüfer, D. and Noll, G.A. (2010) Molecular and phylogenetic characterization of the sieve element occlusion gene family in Fabaceae and non-Fabaceae plants. *BMC Plant Biol.*, **10**, 219.
161. Will, T., Furch, A.C.U. and Zimmermann, M.R. (2013) How phloem-feeding insects face the challenge of phloem-located defenses. *Front. Plant Sci.*, **4**, 336.
162. Álvarez-Fernández, A., Díaz-Benito, P., Abadía, A., Lopez-Millan, A.-F. and Abadía, J. (2014) Metal species involved in long distance metal transport in plants. *Front. Plant Sci.*, **5**, 105.
163. Hara, M., Kondo, M. and Kato, T. (2013) A KS-type dehydrin and its related domains reduce Cu-promoted radical generation and the histidine residues contribute to the radical-reducing activities. *J. Exp. Bot.*, **64**, 1615–1624.
164. Kim, I.-S., Kim, H.-Y., Shin, S.-Y., Kim, Y.-S., Lee, D.H., Park, K.M. and Yoon, H.-S. (2010) A cyclophilin A CPR1 overexpression enhances stress acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cells*, **29**, 567–574.
165. Wang, Q., Monroe, J. and Sjolund, R.D. (1995) Identification and Characterization of a Phloem-Specific [beta]-Amylase. *Plant Physiol.*, **109**, 743–750.
166. Najafi, M.F., Deobagkar, D. and Deobagkar, D. (2005) Purification and characterization of an extracellular alpha-amylase from *Bacillus subtilis* AX20. *Protein Expr. Purif.*, **41**, 349–354.
167. Moelbert, S., Emberly, E. and Tang, C. (2004) Correlation between sequence hydrophobicity and surface-exposure pattern of database proteins. *Protein Sci.*, **13**, 752–62.
168. Uversky, V.N. (2011) Intrinsically disordered proteins from A to Z. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **43**, 1090–1103.
169. Dyson, H.J. and Wright, P.E. (2005) Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 197–208.
170. Wright, P.E. and Dyson, H.J. (2015) Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **16**, 18–29.
171. Hara, M., Shinoda, Y., Kubo, M., Kashima, D., Takahashi, I., Kato, T., Horiike, T. and Kuboi, T. (2011) Biochemical characterization of the Arabidopsis KS-type dehydrin protein, whose gene expression is constitutively abundant rather than stress dependent. *Acta Physiol. Plant.*, **33**, 2103–2116.
172. 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.
173. 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.
174. Łębska, M., Ciesielski, A., Szymona, L., Godecka, L., Lewandowska-Gnatowska, E., Szczegieliński, J. and Muszyńska, G. (2010) Phosphorylation of Maize Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (eIF5A) by Casein Kinase 2. *J. Biol. Chem.*, **285**, 6217–6226.
175. Hopkins, M.T., Lampi, Y., Wang, T.-W., Liu, Z. and Thompson, J.E. (2008) Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A Is Involved in Pathogen-Induced Cell Death and Development of Disease Symptoms in Arabidopsis. *PLANT Physiol.*, **148**, 479–489.
176. Limmongkon, A., Giuliani, C., Valenta, R., Mittermann, I., Heberle-Bors, E. and Wilson, C. (2004) MAP kinase phosphorylation of plant profilin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **324**, 382–386.
177. Dosztányi, Z., Csizmok, V., Tompa, P. and Simon, I. (2005) IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics*, **21**, 3433–4.
178. Dosztányi, Z., Csizmók, V., Tompa, P. and Simon, I. (2005) The Pairwise Energy Content Estimated from Amino Acid Composition Discriminates between Folded and Intrinsically Unstructured Proteins. *J. Mol. Biol.*, **347**, 827–839.
179. Radivojac, P., Iakoucheva, L.M., Oldfield, C.J., Obradovic, Z., Uversky, V.N. and Dunker, A.K. (2007) Intrinsic disorder and functional proteomics. *Biophys. J.*, **92**, 1439–1456.
180. Xue, B., Dunker, A.K. and Uversky, V.N. (2012) Orderly order in protein intrinsic disorder distribution: disorder in 3500 proteomes from viruses and the three domains of life. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **30**, 137–49.
181. Tunnacliffe, A. and Wise, M.J. (2007) The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften*, **94**, 791–812.
182. Goday, A., Jensen, A.B., Culiáñez-Macià, F. and Mar

- Albà,M., Figueras,M., Serratos,J., Torrent,M. and Pagès,M. (1994) The maize abscisic acid-responsive protein Rab17 is located in the nucleus and interacts with nuclear localization signals. *Plant Cell*, **6**, 351–360.
183. Graether,S.P. and Boddington,K.F. (2014) Disorder and function: a review of the dehydrin protein family. *Front. Plant Sci.*, **5**, 576.
184. Yang,W., Zhang,L., Lv,H., Li,H., Zhang,Y., Xu,Y. and Yu,J. (2015) The K-segments of wheat dehydrin WZY2 are essential for its protective functions under temperature stress. *Front. Plant Sci.*, **6**, 406.
185. Rorat,T. (2006) Plant dehydrins — Tissue location, structure and function. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, **11**, 536–556.
186. Theologis,A., Ecker,J.R., Ecker,J.R., Palm,C.J., Palm,C.J., Federspiel,N. a, Federspiel,N. a, Kaul,S., Kaul,S., White,O., *et al.* (2000) Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **408**, 816–820.
187. Jia,J., Fu,J., Zheng,J., Zhou,X., Huai,J., Wang,J., Wang,M., Zhang,Y., Chen,X., Zhang,J., *et al.* (2006) Annotation and expression profile analysis of 2073 full-length cDNAs from stress-induced maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Plant J.*, **48**, 710–727.
188. Winter,D., Vinegar,B., Nahal,H., Ammar,R., Wilson,G. V. and Provart,N.J. (2007) An 'electronic fluorescent pictograph' Browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One*, **2**, 1–12.
189. Schmid,M., Davison,T.S., Henz,S.R., Pape,U.J., Demar,M., Vingron,M., Schölkopf,B., Weigel,D. and Lohmann,J.U. (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat. Genet.*, **37**, 501–6.
190. Lin,W.-D., Liao,Y.-Y., Yang,T.J.W., Pan,C.-Y., Buckhout,T.J. and Schmidt,W. (2011) Coexpression-Based Clustering of *Arabidopsis* Root Genes Predicts Functional Modules in Early Phosphate Deficiency Signaling. *Plant Physiol.*, **155**, 1383–1402.
191. Kilian,J., Whitehead,D., Horak,J., Wanke,D., Weinl,S., Batistic,O., D'Angelo,C., Bornberg-Bauer,E., Kudla,J. and Harter,K. (2007) The AtGenExpress global stress expression data set: Protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant J.*, **50**, 347–363.
192. Wilkins,O., Bräutigam,K. and Campbell,M.M. (2010) Time of day shapes *Arabidopsis* drought transcriptomes. *Plant J.*, **63**, 715–727.
193. Lindwall,G., Chau,M., Gardner,S.R. and Kohlstaedt,L.A. (2000) A sparse matrix approach to the solubilization of overexpressed proteins. *Protein Eng.*, **13**, 67–71.
194. Van Roey,K., Uyar,B., Weatheritt,R.J., Dinkel,H., Seiler,M., Budd,A., Gibson,T.J. and Davey,N.E. (2014) Short Linear Motifs: Ubiquitous and Functionally Diverse Protein Interaction Modules Directing Cell Regulation. *Chem. Rev.*, **114**, 6733–6778.
195. Dinkel,H., Van Roey,K., Michael,S., Davey,N.E., Weatheritt,R.J., Born,D., Speck,T., Kruger,D., Grebnev,G., Kuban,M., *et al.* (2014) The eukaryotic linear motif resource ELM: 10 years and counting. *Nucleic Acids Res.*, **42**, D259–D266.
196. Dinkel,H., Van Roey,K., Michael,S., Kumar,M., Uyar,B., Altenberg,B., Milchevskaya,V., Schneider,M., Kühn,H., Behrendt,A., *et al.* (2016) ELM 2016--data update and new functionality of the eukaryotic linear motif resource. *Nucleic Acids Res.*, **44**, D294–300.
197. Varshavsky,A. (1997) The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes to Cells*, **2**, 13–28.
198. Varshavsky,A. (2011) The N-end rule pathway and regulation by proteolysis. *Protein Sci.*, **20**, 1298–1345.
199. Kim,H.-K., Kim,R.-R., Oh,J.-H., Cho,H., Varshavsky,A. and Hwang,C.-S. (2014) The N-Terminal Methionine of Cellular Proteins as a Degradation Signal. *Cell*, **156**, 158–169.
200. Trott,R.L., Kalive,M., Karandikar,U., Rummer,R., Bishop,C.P. and Bidwai,A.P. (2001) Identification and characterization of proteins that interact with *Drosophila melanogaster* protein kinase CK2. *Mol. Cell. Biochem.*, **227**, 91–8.
201. Schuck,S., Ruse,C. and Stenlund,A. (2013) CK2 phosphorylation inactivates DNA binding by the papillomavirus E1 and E2 proteins. *J. Virol.*, **87**, 7668–79.
202. Moreno-Romero,J., Armengot,L., Marqués-Bueno,M.M., Cadavid-Ordóñez,M. and Martínez,M.C. (2011) About the role of CK2 in plant signal transduction. *Mol. Cell. Biochem.*, **356**, 233–240.
203. Nardozi,J.D., Lott,K. and Cingolani,G. (2010) Phosphorylation meets nuclear import: a review. *Cell Commun. Signal.*, **8**, 32.
204. Lee,J.Y. and Lucas,W.J. (2001) Phosphorylation of viral movement proteins--regulation of cell-to-cell trafficking. *Trends Microbiol.*, **9**, 5–8; discussion 8.
205. Link,K., Vogel,F. and Sonnewald,U. (2011) PD Trafficking of Potato Leaf Roll Virus Movement Protein in *Arabidopsis* Depends on Site-specific Protein Phosphorylation. *Front. Plant Sci.*, **2**, 18.
206. Hung,C.-J., Huang,Y.-W., Liou,M.-R., Lee,Y.-C., Lin,N.-S., Meng,M., Tsai,C.-H., Hu,C.-C. and Hsu,Y.-H. (2014) Phosphorylation of Coat Protein by Protein Kinase CK2 Regulates Cell-to-Cell Movement of *Bamboo mosaic virus* Through Modulating RNA Binding. *Mol. Plant-*

- Microbe Interact.*, **27**, 1211–1225.
207. Blom, N., Gammeltoft, S. and Brunak, S. (1999) Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.*, **294**, 1351–1362.
208. Xue, Y., Zhou, F., Zhu, M., Ahmed, K., Chen, G. and Yao, X. (2005) GPS: a comprehensive www server for phosphorylation sites prediction. *Nucleic Acids Res.*, **33**, W184–W187.
209. Xue, Y., Ren, J., Gao, X., Jin, C., Wen, L. and Yao, X. (2008) GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy. *Mol. Cell. Proteomics*, **7**, 1598–608.
210. Xue, Y., Liu, Z., Cao, J., Ma, Q., Gao, X., Wang, Q., Jin, C., Zhou, Y., Wen, L. and Ren, J. (2011) GPS 2.1: enhanced prediction of kinase-specific phosphorylation sites with an algorithm of motif length selection. *Protein Eng. Des. Sel.*, **24**, 255–260.
211. Hoehenwarter, W., Thomas, M., Nukarinen, E., Egelhofer, V., Rohrig, H., Weckwerth, W., Conrath, U. and Beckers, G.J.M. (2013) Identification of Novel in vivo MAP Kinase Substrates in Arabidopsis thaliana Through Use of Tandem Metal Oxide Affinity Chromatography. *Mol. Cell. Proteomics*, **12**, 369–380.
212. Yoo, B.-C., Lee, J.-Y. and Lucas, W.J. (2002) Analysis of the Complexity of Protein Kinases within the Phloem Sieve Tube System
CHARACTERIZATION OF CUCURBITA MAXIMA CALMODULIN-LIKE DOMAIN PROTEIN KINASE 1*. 10.1074/jbc.M200382200.
213. Nakamura, S., Hayashi, H., Mori, S. and Chino, M. (1995) Detection and Characterization of Protein Kinases in Rice Phloem Sap. *Plant Cell Physiol.*, **36**, 19–27.
214. Knippschild, U., Gocht, A., Wolff, S., Huber, N., Löhler, J. and Stöter, M. (2005) The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell. Signal.*, **17**, 675–689.
215. Lee, J.-Y., Taoka, K., Yoo, B.-C., Ben-Nissan, G., Kim, D.-J. and Lucas, W.J. (2005) Plasmodesmal-Associated Protein Kinase in Tobacco and Arabidopsis Recognizes a Subset of Non-Cell-Autonomous Proteins. *PLANT CELL ONLINE*, **17**, 2817–2831.
216. Mulekar, J.J., Bu, Q., Chen, F. and Huq, E. (2012) Casein kinase II alpha subunits affect multiple developmental and stress-responsive pathways in Arabidopsis. *Plant J.*, **69**, 343–354.
217. Mulekar, J.J. and Huq, E. (2014) Expanding roles of protein kinase CK2 in regulating plant growth and development. *J. Exp. Bot.*, **65**, 2883–2893.
218. Ichimura, K., Shinozaki, K., Tena, G., Sheen, J., Henry, Y., Champion, A., Kreis, M., Zhang, S., Hirt, H., Wilson, C., et al. (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: A new nomenclature. *Trends Plant Sci.*, **7**, 301–308.
219. Colcombet, J. and Hirt, H. (2008) Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochem. J.*, **413**, 217–226.
220. Sinha, A.K., Jaggi, M., Raghuram, B. and Tuteja, N. (2011) Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signal. Behav.*, **6**, 196–203.
221. Gao, F., Su, Q., Fan, Y. and Wang, L. (2010) Expression pattern and core region analysis of AtMPK3 promoter in response to environmental stresses. *Sci. China Life Sci.*, **53**, 1315–1321.
222. Drazic, A., Myklebust, L.M., Ree, R. and Arnesen, T. (2016) The world of protein acetylation. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, **1864**, 1372–1401.
223. Bienvenut, W. V., Sumpton, D., Martinez, A., Lilla, S., Espagne, C., Meinel, T. and Giglione, C. (2012) Comparative large scale characterization of plant versus mammal proteins reveals similar and idiosyncratic N-alpha-acetylation features. *Mol. Cell. Proteomics*, **11**, M111.015131.
224. Silva, R.D. and Martinho, R.G. (2015) Developmental roles of protein N-terminal acetylation. *Proteomics*, **15**, 2402–2409.
225. Arnesen, T. (2011) Towards a Functional Understanding of Protein N-Terminal Acetylation. *PLoS Biol.*, **9**, e1001074.
226. Ostendorp, A., Pahlow, S., 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.
227. Hara, M. (2010) The multifunctionality of dehydrins: An overview. *Plant Signal. Behav.*, **5**, 503–508.
228. Walter, S. (2002) Structure and function of the GroE chaperone. *Cell. Mol. Life Sci.*, **59**, 1589–97.
229. Rudolph, B., Gebendorfer, K.M., Buchner, J. and Winter, J. (2010) Evolution of Escherichia coli for Growth at High Temperatures. *J. Biol. Chem.*, **285**, 19029–19034.
230. Yuk, H.-G. and Marshall, D.L. (2003) Heat Adaptation Alters Escherichia coli O157:H7 Membrane Lipid Composition and Verotoxin Production. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 5115–5119.
231. Marcén, M., Ruiz, V., Serrano, M.J., Condón, S. and Mañas, P. (2017) Oxidative stress in E. coli cells upon exposure to heat treatments. *Int. J. Food Microbiol.*, **241**, 198–205.
232. Livernois, A.M., Hnatchuk, D.J., Findlater, E.E. and

- Graether,S.P. (2009) Obtaining highly purified intrinsically disordered protein by boiling lysis and single step ion exchange. *Anal. Biochem.*, **392**, 70–76.
233. 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**, 10099–10108.
234. Poria,D.K. and Ray,P.S. (2017) RNA-protein UV-crosslinking Assay. *Bio-protocol*, **7**, e2193.
235. Chodosh,L.A. (2001) UV crosslinking of proteins to nucleic acids. *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, **Chapter 12**, Unit 12.5.
236. Castello,A., Fischer,B., Eichelbaum,K., Horos,R., Beckmann,B.M., Strein,C., Davey,N.E., Humphreys,D.T., Preiss,T., Steinmetz,L.M., *et al.* (2012) Insights into RNA Biology from an Atlas of Mammalian mRNA-Binding Proteins. *Cell*, **149**, 1393–1406.
237. Kwon,S.C., Yi,H., Eichelbaum,K., Föhr,S., Fischer,B., You,K.T., Castello,A., Krijgsveld,J., Hentze,M.W. and Kim,V.N. (2013) The RNA-binding protein repertoire of embryonic stem cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 1122–1130.
238. Järvelin,A.I., Noerenberg,M., Davis,I. and Castello,A. (2016) The new (dis)order in RNA regulation. *Cell Commun. Signal.*, **14**, 9.
239. Wimberly,B.T., Guymon,R., McCutcheon,J.P., White,S.W. and Ramakrishnan,V. (1999) A detailed view of a ribosomal active site: the structure of the L11-RNA complex. *Cell*, **97**, 491–502.
240. Hara,M., Shinoda,Y., Tanaka,Y. and Kuboi,T. (2009) DNA binding of citrus dehydrin promoted by zinc ion. *Plant. Cell Environ.*, **32**, 532–541.
241. Lin,C. and Thomashow,M.F. (1992) A cold-regulated Arabidopsis gene encodes a polypeptide having potent cryoprotective activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **183**, 1103–1108.
242. Goyal,K., Walton,L.J. and Tunnacliffe,A. (2005) LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem. J.*, **388**, 151–7.
243. Hughes,S. and Graether,S.P. (2011) Cryoprotective mechanism of a small intrinsically disordered dehydrin protein. *Protein Sci.*, **20**, 42–50.
244. Drira,M., Saibi,W., Brini,F., Gargouri,A., Masmoudi,K. and Hanin,M. (2013) The K-segments of the wheat dehydrin DHN-5 are essential for the protection of lactate dehydrogenase and beta-glucosidase activities in vitro. *Mol. Biotechnol.*, **54**, 643–650.
245. Lopez-Matas,M.-A., Nunez,P., Soto,A., Allona,I., Casado,R., Collada,C., Guevara,M.-A., Aragoncillo,C. and Gomez,L. (2004) Protein cryoprotective activity of a cytosolic small heat shock protein that accumulates constitutively in chestnut stems and is up-regulated by low and high temperatures. *Plant Physiol.*, **134**, 1708–1717.
246. Momma,M., Kaneko,S., Haraguchi,K. and Matsukura,U. (2003) Peptide mapping and assessment of cryoprotective activity of 26/27-kDa dehydrin from soybean seeds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 1832–1835.
247. Chakrabortee,S., Boschetti,C., Walton,L.J., Sarkar,S., Rubinsztein,D.C. and Tunnacliffe,A. (2007) Hydrophilic protein associated with desiccation tolerance exhibits broad protein stabilization function. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **104**, 18073–18078.
248. Kovacs,D., Kalmar,E., Torok,Z. and Tompa,P. (2008) Chaperone Activity of ERD10 and ERD14, Two Disordered Stress-Related Plant Proteins. *Plant Physiol.*, **147**, 381–390.
249. Hughes,S.L., Scharf,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**, 1376–1386.
250. Lu,C.-H., Lin,Y.-F., Lin,J.-J. and Yu,C.-S. (2012) Prediction of Metal Ion-Binding Sites in Proteins Using the Fragment Transformation Method. *PLoS One*, **7**, e39252.
251. Mendoza,V.L. and Vachet,R.W. (2008) Protein Surface Mapping Using Diethylpyrocarbonate with Mass Spectrometric Detection. *Anal. Chem.*, **80**, 2895–2904.
252. Miles,E.W. (1977) Modification of histidyl residues in proteins by diethylpyrocarbonate. *Methods Enzymol.*, **47**, 431–442.
253. Xu,J., Zhang,Y.X., Wei,W., Han,L., Guan,Z.Q., Wang,Z. and Chai,T.Y. (2008) BjDHNs Confer Heavy-metal Tolerance in Plants. *Mol. Biotechnol.*, **38**, 91–98.
254. Hesketh,J. (2005) 3' UTRs and Regulation. In *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester.
255. Nylander,M., Svensson,J., Palva,E.T. and Welin,B. V. (2001) Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol. Biol.*, **45**, 263–279.
256. Fahrenkrog,B. and Aebi,U. (2003) The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 757–766.
257. Freitas,N. and Cunha,C. (2009) Mechanisms and signals for the nuclear import of proteins. *Curr. Genomics*, **10**, 550–7.
258. Xu,D., Marquis,K., Pei,J., Fu,S.-C., Cagatay,T.,

- Grishin, N. V and Chook, Y.M. (2015) LocNES: a computational tool for locating classical NESs in CRM1 cargo proteins. *Bioinformatics*, **31**, 1357–1365.
259. Scott, M.S., Boisvert, F.-M., McDowall, M.D., Lamond, A.I. and Barton, G.J. (2010) Characterization and prediction of protein nucleolar localization sequences. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 7388–7399.
260. Scott, M.S., Troshin, P. V and Barton, G.J. (2011) NoD: a Nucleolar localization sequence detector for eukaryotic and viral proteins. *BMC Bioinformatics*, **12**, 317.
261. Hernandez-Verdun, D. (2006) Nucleolus: from structure to dynamics. *Histochem. Cell Biol.*, **125**, 127–137.
262. Hiscox, J.A. (2007) RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus. *Nat. Rev. Microbiol.*, **5**, 119–127.
263. Pendle, A.F., Clark, G.P., Boon, R., Lewandowska, D., Lam, Y.W., Andersen, J., Mann, M., Lamond, A.I., Brown, J.W.S. and Shaw, P.J. (2005) Proteomic analysis of the Arabidopsis nucleolus suggests novel nucleolar functions. *Mol. Biol. Cell*, **16**, 260–9.
264. Godoy, J. a, Lunar, R., Torresschumann, S., Moreno, J., Rodrigo, R.M. and Pintortoro, J. a (1994) Expression, Tissue Distribution and Subcellular-Localization of Dehydrin Tas14 in Salt-Stressed Tomato Plants. *Plant Mol. Biol.*, **26**, 1921–1934.
265. Hernández-Sánchez, I.E., Maruri-López, I., Ferrando, A., Carbonell, J., Graether, S.P. and Jiménez-Bremont, J.F. (2015) Nuclear localization of the dehydrin OpsDHN1 is determined by histidine-rich motif. *Front. Plant Sci.*, **6**, 1–8.
266. Röhrig, H., Schmidt, J., Colby, T., Bräutigam, A., Hufnagel, P. and Bartels, D. (2006) Desiccation of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* induces dynamic changes in protein phosphorylation. *Plant. Cell Environ.*, **29**, 1606–17.
267. Plana, M., Itarte, E., Eritja, R., Goday, A., Pages, M. and Martinez, M.C. (1991) Phosphorylation of maize RAB-17 protein by casein kinase 2. *J. Biol. Chem.*, **266**, 22510–22514.
268. Riera, M., Figueras, M., Lopez, C., Goday, A. and Pages, M. (2004) Protein kinase CK2 modulates developmental functions of the abscisic acid responsive protein Rab17 from maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 9879–9884.
269. Alsheikh, M.K., Svensson, J.T. and Randall, S.K. (2005) Phosphorylation regulated ion-binding is a property shared by the acidic subclass dehydrins. *Plant, Cell Environ.*, **28**, 1114–1122.
270. Houde, M., Daniel, C., Lachapelle, M., Allard, F., Laliberté, S. and Sarhan, F. (1995) Immunolocalization of freezing-tolerance-associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues. *Plant J.*, **8**, 583–593.
271. Xie, C., Zhang, R., Qu, Y., Miao, Z., Zhang, Y., Shen, X., Wang, T. and Dong, J. (2012) Overexpression of MtCAS31 enhances drought tolerance in transgenic Arabidopsis by reducing stomatal density. *New Phytol.*, **195**, 124–135.
272. Passmore, L.A. and Barford, D. (2004) Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. *Biochem. J.*, **379**, 513–25.
273. Haglund, K., Sigismund, S., Polo, S., Szymkiewicz, I., Di Fiore, P.P. and Dikic, I. (2003) Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat. Cell Biol.*, **5**, 461–466.
274. Wang, F., Zhu, D., Huang, X., Li, S., Gong, Y., Yao, Q., Fu, X., Fan, L.-M. and Deng, X.W. (2009) Biochemical Insights on Degradation of Arabidopsis DELLA Proteins Gained From a Cell-Free Assay System. *PLANT CELL ONLINE*, **21**, 2378–2390.
275. Glickman, M.H. and Ciechanover, A. (2002) The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. *Physiol. Rev.*, **82**, 373–428.
276. Jacobson, A.D., Zhang, N.-Y., Xu, P., Han, K.-J., Noone, S., Peng, J. and Liu, C.-W. (2009) The Lysine 48 and Lysine 63 Ubiquitin Conjugates Are Processed Differently by the 26 S Proteasome. *J. Biol. Chem.*, **284**, 35485–35494.
277. Li, W. and Schmidt, W. (2010) A lysine-63-linked ubiquitin chain-forming conjugase, UBC13, promotes the developmental responses to iron deficiency in Arabidopsis roots. *Plant J.*, **62**, 330–343.
278. O'Sullivan, O., Suhre, K., Abergel, C., Higgins, D.G. and Notredame, C. (2004) 3DCoffee: combining protein sequences and structures within multiple sequence alignments. *J. Mol. Biol.*, **340**, 385–95.
279. Notredame, C., Higgins, D.G. and Heringa, J. (2000) T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.*, **302**, 205–17.
280. Armougom, F., Moretti, S., Poirot, O., Audic, S., Dumas, P., Schaeli, B., Keduas, V. and Notredame, C. (2006) Espresso: automatic incorporation of structural information in multiple sequence alignments using 3D-Coffee. *Nucleic Acids Res.*, **34**, W604-8.
281. Di Tommaso, P., Moretti, S., Xenarios, I., Orobitg, M., Montanyola, A., Chang, J.-M., Taly, J.-F. and Notredame, C. (2011) T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic Acids Res.*, **39**,

- W13-7.
282. Poirot,O., Suhre,K., Abergel,C., O'Toole,E. and Notredame,C. (2004) 3DCoffee@igs: a web server for combining sequences and structures into a multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res.*, **32**, W37-40.
283. Willing,E.-M., Rawat,V., Mandakova,T., Maumus,F., James,G.V., Nordstrom,K.J. V., Becker,C., Warthmann,N., Chica,C., Szarzynska,B., *et al.* (2015) Genome expansion of *Arabis alpina* linked with retrotransposition and reduced symmetric DNA methylation. *Nat. plants*, **1**, 14023.
284. Hu,T.T., Pattyn,P., Bakker,E.G., Cao,J., Cheng,J.-F., Clark,R.M., Fahlgren,N., Fawcett,J.A., Grimwood,J., Gundlach,H., *et al.* (2011) The *Arabidopsis lyrata* genome sequence and the basis of rapid genome size change. *Nat. Genet.*, **43**, 476–481.
285. Yang,R., Jarvis,D.E., Chen,H., Beilstein,M.A., Grimwood,J., Jenkins,J., Shu,S., Prochnik,S., Xin,M., Ma,C., *et al.* (2013) The Reference Genome of the Halophytic Plant *Eutrema salsugineum*. *Front. Plant Sci.*, **4**, 46.
286. Wang,X., Wang,H., Wang,J., Sun,R., Wu,J., Liu,S., Bai,Y., Mun,J.-H., Bancroft,I., Cheng,F., *et al.* (2011) The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa*. *Nat. Genet.*, **43**, 1035–1039.
287. Parkin,I.A., Koh,C., Tang,H., Robinson,S.J., Kagale,S., Clarke,W.E., Town,C.D., Nixon,J., Krishnakumar,V., Bidwell,S.L., *et al.* (2014) Transcriptome and methylome profiling reveals relics of genome dominance in the mesopolyploid *Brassica oleracea*. *Genome Biol.*, **15**, R77.
288. Slotte,T., Hazzouri,K.M., Ågren,J.A., Koenig,D., Maumus,F., Guo,Y.-L., Steige,K., Platts,A.E., Escobar,J.S., Newman,L.K., *et al.* (2013) The *Capsella rubella* genome and the genomic consequences of rapid mating system evolution. *Nat. Genet.*, **45**, 831–835.
289. Kagale,S., Koh,C., Nixon,J., Bollina,V., Clarke,W.E., Tuteja,R., Spillane,C., Robinson,S.J., Links,M.G., Clarke,C., *et al.* (2014) The emerging biofuel crop *Camelina sativa* retains a highly undifferentiated hexaploid genome structure. *Nat. Commun.*, **5**.
290. Nie,S., Li,C., Xu,L., Wang,Y., Huang,D., Muleke,E.M., Sun,X., Xie,Y. and Liu,L. (2016) De novo transcriptome analysis in radish (*Raphanus sativus* L.) and identification of critical genes involved in bolting and flowering. *BMC Genomics*, **17**, 389.
291. Mizoguchi,T., Irie,K., Hirayama,T., Hayashida,N., Yamaguchi-Shinozaki,K., Matsumoto,K. and Shinozaki,K. (1996) A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 765–9.
292. Droillard,M.-J., Boudsocq,M., Barbier-Brygoo,H. and Laurière,C. (2002) Different protein kinase families are activated by osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana* cell suspensions. *FEBS Lett.*, **527**, 43–50.
293. Kovtun,Y., Chiu,W.-L., Tena,G. and Sheen,J. (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97**, 2940–2945.
294. Ahlfors,R., Macioszek,V., Rudd,J., Brosché,M., Schlichting,R., Scheel,D. and Kangasjärvi,J. (2004) Stress hormone-independent activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana* during ozone exposure. *Plant J.*, **40**, 512–522.
295. Ichimura,K., Mizoguchi,T., Yoshida,R., Yuasa,T. and Shinozaki,K. (2000) Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *Plant J.*, **24**, 655–665.
296. Wang,J., Ding,H., Zhang,A., Ma,F., Cao,J. and Jiang,M. (2010) A Novel Mitogen-Activated Protein Kinase Gene in Maize (*Zea mays*), ZmMPK3, is Involved in Response to Diverse Environmental Cues. *J. Integr. Plant Biol.*, **52**, 442–452.

7 Anhang

7.1 Identifizierung von Komplexen im Phloemsaft von Raps – Tabellen

Tab. S7-1: Identifizierte Proteine des Komplexes I im Phloemsaft von *B. napus*. Abkürzungen: n.i.: nicht identifiziert, MW: Molekulargewicht, obs.: beobachtet, B.n: *Brassica napus*, B.o: *Brassica oleracea*, B.r: *Brassica rapa*, Stern: identifiziert über MS/MS ion search.

Spot Nr.	MW obs. [kDa]	Identifizierung	Organismus	Accession Nr.	MW [kDa]	MASCOT score
CI_1	180	n.i.				
CI_2	150	myrosinase-binding protein 2-like	B.n	XP_013655529	115,6	173
CI_3	120	myrosinase-binding protein 2-like	B.n	CDY51195	116	162
CI_4	100	n.i.				
CI_5	80	uncharacterised protein	B.n	CDY08190	90	90
CI_6	70	myrosinase-like isoform X2	B.n	CDY37226	61,8	130
CI_7	60	n.i.				
CI_8	60	myrosinase	B.n	ABQ42337	60	154
CI_9	45	60S ribosomal protein L4-1	B.n	CDY44721	44,6	91
		60S ribosomal protein L3-1	B.r	XP_009123677	44,6	90
CI_10	45	60S ribosomal protein L4-1	B.n	CDY44721	44,6	111
CI_11	38	60S ribosomal protein L5	B.n	CDY15089	39,1	103
CI_12	35	60S ribosomal protein L7Ae	B.n	CDX76668	32,2	91
		60S ribosomal protein L8-3-like	B.r	XP_009138409	28	83
CI_13	34	60S ribosomal protein L8-1-like	B.n	XP_013672357	28	109
CI_14	33	60S ribosomal protein L1	B.o	XP_013602047	26,2	110
CI_15	32	60S ribosomal protein L13-1-like	B.r	XP_009149775	23,6	117
CI_16	30	60S ribosomal protein L7-2	B.o	XP_013616063	27,9	134
CI_17	30	60S ribosomal protein L10a-2-like	B.r	XP_009103604	24,4	82
CI_18	28	60S ribosomal protein L15-1-like	B.n	XP_013739641	24,3	143
CI_19	24	60S ribosomal protein L9-1	B.n	CDY32946	21,9	96
CI_20	23	60S ribosomal protein L18a-2-like	B.r	XP_009132991	21,2	54
CI_21	22	60S ribosomal protein L23a	B.n	CDX93259	24,3	82
		60S ribosomal protein L26-1-like	B.n	XP_013748571	16,9	96
CI_22	22	60S ribosomal protein L21-1	B.n	XP_013714937	18,6	57*
CI_23	22	60S ribosomal protein L11-2 isoform	B.r	XP_009132184	20,9	159
		X1				
CI_24	20	60S ribosomal protein L23a-1-like	B.r	XP_009133367	16,9	102
		60S ribosomal protein L26-1-like	B.n	XP_013748571	16,9	98
CI_25	20	60S ribosomal protein L23a-2	B.n	XP_009116223	17,3	148
		60S ribosomal protein L12-2-like	B.r	XP_009116035	17,9	53
CI_26	18	60S ribosomal protein L18e	B.n	CDY12475	12,7	82
CI_27	16	60S ribosomal protein L34-2-like	B.r	XP_009127750	13,7	82
		60S ribosomal protein L35-1	B.n	CDY07930	18,0	77
CI_28	15	n.i.				
CI_29	14	60S ribosomal protein L14-2	B.o	XP_013583256	15,5	80
CI_30	13	60S acidic ribosomal protein P2-2-like	B.r	XP_009140817	11,4	47*
		60S ribosomal protein L30-2	B.r	XP_009106439	12,2	59*

Tab. S7-2: Identifizierte Proteine des Komplexes II im Phloemsaft von *B. napus*. Abkürzungen: n.i: nicht identifiziert, MW: Molekulargewicht, obs.: beobachtet, B.n: *Brassica napus*, B.o: *Brassica oleracea*, B.r: *Brassica rapa*, Stern: identifiziert über MS/MS ion search.

Spot Nr.	MW obs. [kDa]	Identifizierung	Organismus	Accession Nr.	MW [kDa]	MASCOT score
CII_1	190	clathrin heavy chain 1	B.r	XP_009146750	193,3	146
CII_2	120	myrosinase-binding protein 2-like	B.n	XP_013655529	115,6	117
CII_3	110	myrosinase-binding protein 2-like	B.n	XP_013724785	116,1	223
CII_4	100	n.i.				
CII_5	90	n.i.				
CII_6	75	myrosinase-like isoform X2	B.n	XP_013729265	61,9	105
CII_7	60	myrosinase-like precursor	B.n	XP_013678032	62,7	87
CII_8	49	60S ribosomal protein L3-1-like isoform X1	B.n	XP_013696748	45,4	87
CII_9	37	60S ribosomal protein L5	B.n	CDY15089	36,8	137
CII_10	36	n.i.				
CII_11	35	40S ribosomal protein S6-1-like	B.n	XP_013650213	28,4	93
CII_12	34	40S ribosomal protein S4-1-like	B.n	XP_013708194	29,6	50*
		60S ribosomal protein L8-3	B.o	XP_013584042	27,9	72
CII_13	33	60S ribosomal protein L13-1 or 2	B.r	XP_009151668	23,6	106
CII_14	32	60S ribosomal protein L10a-3-like	B.r	XP_009120660	24,5	69
CII_15	31	60S ribosomal protein L7-2	B.o	XP_013616063	27,9	93
CII_16	30	60S ribosomal protein L15-1-like	B.n	XP_013739641	24,2	90
CII_17	25	60S ribosomal protein L9-1-like	B.n	XP_013717489	22	84
CII_18	24	40S ribosomal protein S9-1	B.r	XP_009131450	22,9	105
		60S ribosomal protein L9-1	B.r	XP_009123738	22,0	78
CII_19	22	n.i.				
CII_20	21	60S ribosomal protein L17-2	B.r	XP_009127555	19,8	124
CII_21	20	60S ribosomal protein L11	B.n	CDY62552	19,7	104
CII_22	19	60S ribosomal protein L21-1-like	B.r	XP_009110810	18,5	87
CII_23	18	40S ribosomal protein S15-1	B.r	XP_009118657	17,1	63
CII_24	18	60S ribosomal protein L23a-1	B.r	XP_009143312	17,4	109
CII_25	17	40S ribosomal protein S16-3-like	B.r	XP_009134755	16,5	123
CII_26	17	60S ribosomal protein L32-1-like	B.n	XP_013654096	15,2	79
CII_27	16	60S ribosomal protein L36-2-like	B.o	XP_013625552	12,6	108
CII_28	15	60S ribosomal protein L14-2-like	B.o	XP_013583256	15,5	135
		60S ribosomal protein L22-2	B.r	XP_009134831	14	67

7 Anhang

Tab. S7-3: Identifizierte Proteine des Komplexes III im Phloemsaft von *B. napus*. Abkürzungen: n.i: nicht identifiziert, MW: Molekulargewicht, obs.: beobachtet, B.n: *Brassica napus*, B.o: *Brassica oleracea*, B.r: *Brassica rapa*, Stern: identifiziert über MS/MS ion search.

Spot no.	MW obs. [kDa]	Identification	Organism	Accession no.	MW [kDa]	MASCOT score
CIII_1	180	clathrin heavy chain 1-like	B.n	XP_013729579	193,3	93
CIII_2	130	26S proteasome regulatory complex component	B.n	CDY19162	108,9	108
CIII_3	125	myosinase-binding protein 2-like	B.n	XP_013724785	116,1	226
CIII_4	110	26S proteasome regulatory complex component	B.n	CDY29907	97,8	90
CIII_5	100	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 homolog B	B.o	XP_013598567	97,7	83
CIII_6	95	n.i.				
CIII_7	70	myosinase-like isoform X2	B.n	XP_013729265	61,9	116
CIII_8	65	myosinase-like precursor	B.n	NP_001303128	62,6	94
CIII_9	60	Proteasome regulatory subunit C-terminal	B.n	CDX87648	54,8	82
CIII_10	58	26S proteasome regulatory subunit 4 homolog B-like	B.n	XP_013707211	45,8	142
CIII_11	55	n.i.				
CIII_12	50	26S protease regulatory subunit 6B-like protein	B.n	CDY32995	45,4	121
CIII_13	50	tRNA (guanine(10)-N2)-methyltransferase homolog	B.o	XP_013613398	54,1	118
CIII_14	45	26S protease regulatory subunit 8 homolog A-like	B.o	XP_013620664	47,1	88
CIII_15	45	26S protease regulatory subunit 10B homolog A	B.r B.n	XP_009123705 CDY43320	44,7 46,6	121 86
CIII_16	40	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11 homolog	B.r	XP_009109236	44,1	81
CIII_17	39	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6 homolog	B.o	XP_013622244	43,9	86
CIII_18	38	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13 homolog	B.n	XP_013724003	34,7	91
CIII_19	37	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7 homolog A	B.n	XP_013641806	35,7	141
CIII_20	36	guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like	B.n	XP_013641806	35,7	141
CIII_21	36	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	B.n	CDY59032	26,5	92
CIII_22	35	ribosomal protein uS5	B.n	CDY06903	27,9	89
CIII_23	35	40S ribosomal protein S3-2-like	B.n	XP_013734128	27,3	102
CIII_23b	30	n.i.				
CIII_23b	30	40S ribosomal protein S4-1-like	B.o	XP_013622723	29,7	112
CIII_24	30	40S ribosomal protein S8	B.n	CDX92472	27,3	101
CIII_24	30	40S ribosomal protein S4-1-like	B.n	XP_013708194	29,8	86
CIII_25	28	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8 homolog A	B.o	XP_013608683	30,7	84
CIII_26a	27	proteasome subunit alpha type-6-B	B.r	XP_009102355	27,3	111
CIII_26b	26	n.i.				
CIII_27a	25	n.i.				
CIII_27b	24	proteasome subunit beta type-4	B.r	XP_009113387	29,4	73
CIII_28a	22	40S ribosomal protein S7	B.n	XP_013735701	22,1	82
CIII_28b	22	40S ribosomal protein S9-1	B.r	XP_009131450	22,9	83
CIII_28c	22	Rab5_related protein	B.n	CDY55834	21,8	72
CIII_29a	17	pepsin_retropepsin_like	B.n	CDX70463	20	64
CIII_29b	17	n.i.				
CIII_30	16	40S ribosomal protein S13-2 isoform X2	B.o	XP_013590122	15,9	89
CIII_31	15	n.i.				
CIII_32	14	Uncharacterised protein	B.n	CDY35947	15,1	61
CIII_33	13	40S ribosomal protein S19-1	B.r	XP_009147386	15,8	104
CIII_34	12	40S ribosomal protein S15a-1-like	B.n	XP_013652949	13,4	76

Tab. S7-4: Identifizierte Proteine des Komplexes IV im Phloemsaft von *B. napus*. Abkürzungen: n.i.: nicht identifiziert, MW: Molekulargewicht, obs.: beobachtet, B.n: *Brassica napus*, B.o: *Brassica oleracea*, B.r: *Brassica rapa*, Stern: identifiziert über MS/MS ion search.

Spot Nr.	MW obs. [kDa]	Identifizierung	Organismus	Accession Nr.	MW [kDa]	MASCOT score
CIV_1	130	Putative disease resistance protein At4g19050	<i>B. napus</i>	CDX78917	131,1	110
CIV_2	130	Putative disease resistance protein At4g19050	<i>B. napus</i>	CDX78917	131,1	89
CIV_3	100	Heat shock 70 kDa protein 14-like	<i>B. napus</i>	XP_013748865	89,9	113
CIV_4	90	Eukaryotic elongation factor 2	<i>B. napus</i>	CDX90241	89,5	111
		Cell division control protein 48 homolog A	<i>B. napus</i>	CDY41316.1	89,5	197
CIV_5	85	Heat shock protein 90-2-like	<i>B. rapa</i>	XP_009132342	79,8	172
CIV_6	80	Threonine--tRNA ligase	<i>B. oleracea</i>	XP_013599115	81,5	110
		Glycine--tRNA ligase	<i>B. napus</i>	CDY43195	80,8	88
CIV_7	70	Heat shock protein 70 kDa	<i>B. oleracea</i>	XP_013685267	67,8	230
		Lysine--tRNA ligase-like	<i>B. napus</i>	XP_013747530	69,9	150
CIV_8	65	Myrosinase	<i>B. napus</i>	ABQ42337	60,6	183
		Aspartate--tRNA ligase 2	<i>B. napus</i>	XP_013670803	61,6	141
		Asparagine--tRNA ligase 1	<i>B. napus</i>	XP_013729126	63,5	153
CIV_9	60	Myrosinase	<i>B. napus</i>	ABQ42337	60,6	164
CIV_10	55	Adenosylhomocysteinase 2-like	<i>B. rapa</i>	XP_009135865	53,1	139
CIV_11	55	Elongation factor 1-alpha 1-like	<i>B. oleracea</i>	XP_013586115	51,9	161
CIV_12	50	Cystine lyase COR13-like	<i>B. napus</i>	XP_013653143	48,1	237
CIV_13	44	Cystine lyase COR13-like	<i>B. rapa</i>	XP_009108611	48,3	213
CIV_14	38	Fructose-bisphosphate aldolase	<i>B. rapa</i>	XP_009115993	38,4	226
CIV_15	45	Cystine lyase COR13-like	<i>B. rapa</i>	XP_009108611	48,3	219
CIV_16	45	Cystine lyase COR13	<i>B. rapa</i>	CDY69765	46,9	209
CIV_17	38	Fructose-bisphosphate aldolase	<i>B. rapa</i>	XP_009115993	38,4	124
CIV_18	18	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP18-3-like	<i>B. napus</i>	XP_009101932	18,3	128
CIV_19	45	Cystine lyase COR13-like	<i>B. rapa</i>	XP_009108611	48,3	177


```

attacaattacattacaattaccatgggtgagcaagggcgaggagctgttcaccggggtg
I T I T F T I T M V S K G E E L F T G V
gtgccatcctggtcgagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggc
V P I L V E L D G D V N G H K F S V S G
gagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgaccctgaagttcatctgcaccaccggc
E G E G D A T Y G K L T L K F I C T T G
aagctgcccggtgcctggccaccctcgtgaccaccttcggctacggcctgcagtgcttc
K L P V P W P T L V T T F G Y G L Q C F
gcccgtaccvccgaccacatgaagcagcagcacttctcaagtcgcccattgcccgaaggc
A R Y P D H M K Q H D F F K S A M P E G
tacgtccaggagcgcaccatcttctcaaggacgacggcaactacaagaccgcgcccag
Y V Q E R T I F F K D D G N Y K T R A E
gtgaagttcgagggcgacaccctggatgaaccgcatcgagctgaagggcatcgacttcaag
V K F E G D T L V N R I E L K G I D F K
gaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctat
E D G N I L G H K L E Y N Y N S H N V Y
atcatggccgacaagcagaagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
I M A D K Q K N G I K V N F K I R H N I
gaggacggcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
E D G S V Q L A D H Y Q Q N T P I G D G
cccgtgctgctgccgacaaccactacctgagctaccagtcggcctgagcaaaagcccc
P V L L P D N H Y L S Y Q S A L S K D P
aacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgaccgcccgggatcactctc
N E K R D H M V L L E F V T A A G I T L
ggcatggacgagctgtacaagtcggactcagatctcgagctcaagcttcaattctgca
G M D E L Y K S G L R S R A Q A S N S A
gtcgacgggtaccgcccggggccgggatcatcaacaagtttgtaaaaaaagcaggctccacc
V D G T A G P G S S T S L Y K K A G S T
atgggcatgcagtactacgaaaaccgtgagaaagactactacgaggtggctcaaggccaa
M G M Q Y Y E N R E K D Y Y E V A Q G Q
cgcaatggttatggccagagccagagccacaaccacgagggatattggccagagccagagc
R N G Y G Q S Q S H N H E G Y G Q S Q S
cgtgggggatattggccagatccataaccgtgaggggtataacccaaaaccgtgaggggat
R G G Y G Q I H N R E G Y N Q N R E G Y
agccaaagccagagtcgcccagttatgggcttagcccactttgaaccaccgtagccac
S Q S Q S R P V Y G L S P T L N H R S H
ggtgggtttcttgatgggctcttcaagggtcaaaatggccaaaagggtcagagtgggcta
G G F L D G L F K G Q N G Q K G Q S G L
ggcacgtttctagggcaacacaagagccaagaggctaaaagagtcaggacatgggaag
G T F L G Q H K S Q E A K K S Q G H G K
ctcttggggcaacatgaccagaagaaaactcatgagacaaacagtggtcttaattggcctt
L L G Q H D Q K K T H E T N S G L N G L
ggaatggtcattaacaatggtgagaagaacataggaggaaaagtgagcacaagaagaag
G M F I N N G E K K H R R K S E H K K K
aacaaggatgggcatggcagtggtaatgagagtggaagcagcagcagcagcagcagcagc
N K D G H G S G N E S G S S S G S D S D
tgaagatctcgagctcaagcttcaattctgcagtcgacgggtaccgag
- R S R A Q A S N S A V D G T A

```

Abb. 7-4: Sequenz des YFPs und At1g64370 im pEG104. Die korrekte Sequenz wurde mittels Sequenzierung verifiziert. Dabei ist das N-terminale YFP gelb und das At1g64370 grau unterlegt.

8 Publikationen & Konferenzbeiträge im Rahmen der Arbeit

8.1 Publikationen

1. **Ostendorp A.**, Pahlow S., Deke J., Thieß M., Kehr J. (2016): Protocol: optimisation of a grafting protocol for oilseed rape (*Brassica napus*) for studying long-distance signaling. *Plant Methods*. 2016 Mar; **12**:22.
2. **Ostendorp A.**, Pahlow S., Krüßel L., Hanhart P., Garbe M.Y., Deke J., Giavalisco P., Kehr J. (2017): Functional analysis of Brassica napus phloem protein and ribonucleoprotein complexes. *New Phytol.* 2017 May;214(3):1188-1197.
3. Pahlow S., **Ostendorp A.**, Krüßel L., Kehr J. (2018): Phloem Sap Sampling from Brassica napus for 3D-PAGE of Protein and Ribonucleoprotein Complexes. *J. Vis. Exp.* (131), e57097.
4. Kholgi, M., Toorchi, M., Shakiba, M.R., Bandeh-hagh, A., Pahlow, S., **Ostendorp, A.**, and Kehr, J. (2018): Comparative proteomic analysis of salt-responsive proteins in canola roots. *Planta*. (Under Review)
5. 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)

8.2 Konferenzbeiträge

1. **Ostendorp, A.**, Pahlow, S., 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. (Posterpräsentation)
2. Pahlow, S., **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. (Posterpräsentation)

Eidesstattliche Erklärung

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

Hamburg, den